

# Thèse de Doctorat

**Aurore RAUSCHER**

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Biologie-Santé

Discipline : Pharmacologie expérimentale et clinique

Spécialité : Radiopharmacie

Unité de recherche : Equipe 13 Inserm UMR 892 CNRS UMR 6299

Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers

Soutenue le 2 septembre 2015

## Optimisation du ciblage tumoral avec des liposomes radiomarqués et vectorisés par une technique de préciblage en deux temps pour des applications en radioimmunothérapie

### JURY

Rapporteurs : **Benjamin GUILLET**, Professeur d'Université – Praticien Hospitalier, Aix Marseille Université  
**André LUXEN**, Professeur, Université de Liège

Examineur : **Luc ZIMMER**, Professeur d'Université – Praticien Hospitalier, Université Claude Bernard Lyon 1

Invité : **Jacques BARBET**, Directeur de Recherche CNRS, Université de Nantes

Directeur de Thèse : **Alain FAIVRE-CHAUVET**, Professeur d'Université – Praticien Hospitalier, Université de Nantes  
Co-directeur de Thèse : **Marie MOUGIN-DEGRAEF**, Maître de Conférence – Praticien Hospitalier, Université de Nantes

# **REMERCIEMENTS**

---

*Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à,*

*Monsieur le Professeur André LUXEN et Monsieur le Professeur Benjamin GUILLET, pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail de thèse, ainsi que pour l'intérêt et le temps consacré à la lecture de ce manuscrit.*

*Monsieur le Professeur Luc ZIMMER pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse et de bien vouloir juger mon travail.*

*Monsieur le Docteur Jacques BARBET pour me faire le grand honneur de participer à ce jury de thèse. Je tiens à vous témoigner toute ma reconnaissance pour l'intérêt que vous avez toujours porté à ce travail et les conseils avisés que vous nous avez régulièrement apportés.*

*Je tiens également à remercier Madame le Professeur Françoise KRAEBER-BODERE, Monsieur le Docteur Jacques BARBET et Monsieur le Professeur Michel CHEREL pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe 13 « Recherche en Oncologie Nucléaire », Inserm UMR 892 / 6299 CNRS du Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, au sein de laquelle j'ai eu le privilège d'effectuer ma thèse.*

*Je remercie Madame le Professeur Catherine PASSIRANI et Monsieur le Docteur Nicolas LEPAREUR, pour avoir participé à mon jury de comité de suivi de thèse durant ces quatre années.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement mes encadrants de thèse,*

***Madame le Docteur Marie MOUGIN-DEGRAEF**, qui a codirigé ce travail de thèse. Merci Marie pour m'avoir aussi bien encadrée durant toutes ces années, et m'avoir fait confiance dans ce travail. Merci pour ton aide précieuse à chaque fois que j'en ai eu besoin, pour tes conseils, ta compétence, ton extrême gentillesse, ta disponibilité et toutes ces heures de relecture. Mais mes remerciements vont bien au-delà de cette thèse, et je profite également de ces quelques lignes pour t'exprimer ma sincère et véritable amitié. Marie, merci pour tout...*

***Monsieur le Professeur Alain FAIVRE-CHAUVET**, pour avoir dirigé cette thèse et m'avoir aussi bien accueillie à Nantes il y a déjà presque 6 ans. Merci Alain de m'avoir formée au métier passionnant de la Radiopharmacie et m'avoir permis d'évoluer dans le domaine de la recherche. Merci pour tes conseils au cours de cette thèse, pour tout ce que tu m'as appris au cours de ces années, mais surtout merci de m'avoir fait confiance et soutenue pour l'accès à ce poste que j'occupe aujourd'hui. J'espère en être digne et pouvoir collaborer avec toi encore longtemps.*

*Marie, Alain, puissiez-vous trouver ici le témoignage de ma plus sincère reconnaissance et de toute mon amitié.*

*Je voudrais également exprimer toute mon amitié à **toute l'équipe 13** que j'ai eu la chance de connaître et plus particulièrement Patou, Agnès, Holisoa, Joëlle, François, Jean-François et remercier toutes les personnes qui ont contribué à ce travail par leur diverses compétences :*

***Catherine MAUREL**, pour ta gentillesse, toute l'aide que tu nous a apporté au cours des manip' animales et ces heures consacrées à nos petites souris.*

***Mike MAILLASSON**, pour ton aide et le temps consacré aux études d'affinité au Biacore®.*

***Sébastien GOUARD**, **Steven NEDELLEC** et **Philippe HULIN** pour vos conseils et le temps consacré à mes études de microscopie.*

***Holisoa RAJERISON**, pour mes petits problèmes de chimie*

***Ludovic FERRER**, pour le temps que tu as passé sur toutes mes questions de dosimétrie.*

***Loïc CAMPION**, pour nos grandes réflexions sur mes problèmes de statistiques et les simulations de Bootstrap même si nous n'aurons pas eu le temps d'aller au bout de cette idée.*

*Je souhaite également profiter de ce travail de thèse pour exprimer mon amitié et toute ma reconnaissance aux personnes avec qui j'ai eu plaisir à travailler depuis le début de mon internat, et en particulier :*

***A Marie-Laure SERMENT**, pour m'avoir fait connaître au tout début de mon internat l'existence du métier de Radiopharmacien et m'en avoir parlé avec un tel enthousiasme. Marie-Laure, je profite de cette Thèse pour t'exprimer toute ma reconnaissance, et également remercier le destin d'avoir croisé ta route au bon moment ; sans quoi la mienne n'aurait sûrement pas pris le même chemin. Merci Marie-Laure.*

***A Françoise KRAEBER-BODERE**, pour m'avoir accueillie au sein de son service dès ma deuxième année d'internat. Françoise, je tiens à t'exprimer toute ma gratitude pour m'avoir accordé ta confiance, m'avoir autant soutenue et permis d'accéder au poste de Radiopharmacien à l'ICO.*

***A tout le service de Médecine Nucléaire de l'Hôtel Dieu**, pour m'avoir accueillie si chaleureusement pendant mon internat, et particulièrement à Brigitte, pour m'avoir formée au labo chaud, mais aussi pour sa gentillesse et son amitié.*

***A tout le service de Médecine Nucléaire de l'ICO**, avec qui j'ai plaisir à travailler depuis deux ans et en particulier à :*

***Mathilde Colombié** ma voisine de bureau, j'espère travailler avec toi encore très longtemps (sait-on jamais !)*

***Caroline Rousseau**, merci Caroline d'avoir, peut-être sans le savoir, trouvé les mots qui m'ont motivé à continuer quand j'ai eu des doutes au cours de cette thèse.*

***A tous les internes de Nantes** et plus particulièrement à Mathieu, compagnon de guerre (heu... de thèse, mais c'est presque pareil !), pour toutes ces heures de travail passées ensemble, nos entraînements sportifs à la piscine et ton amitié, j'espère encore pouvoir continuer à travailler avec toi dans un futur plus ou moins proche. Mais aussi à Julie & Franck, Fanny & Etienne, les 2 Anaïs, pour tous ces bons moments passés ensemble au cours de l'internat et votre amitié encore aujourd'hui que nous sommes devenus grands.*

*Enfin mes pensées vont tout naturellement,*

*A ma famille et mes parents, merci pour votre présence et votre soutien durant ces longues années d'études (pas toujours facile à suivre) et qui s'achèvent enfin...*

*A ma sœur si géniale, merci pour notre complicité si précieuse, que celle-ci dure toujours, et à **Manu**, mon p'tit beau-frère,*

*A **Colette et Patrick**, merci de m'avoir si bien accueillie,*

*A **Céline, Mathieu**, depuis tout ce temps, **Anne-C & Richard, Steph & Jo**, amis si importants, que notre amitié perdure encore longtemps,*

*A toi mon **Amour**, que j'aime tant, merci d'être là tout simplement, et de me faire très prochainement le plus beau des cadeaux...*

# SOMMAIRE

---

SOMMAIRE .....	1
LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES.....	6
TABLE DES ILLUSTRATIONS .....	8
<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>13</b>
<b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE : Présentation de la radioimmunothérapie et des liposomes ...</b>	<b>15</b>
LA RADIOIMMUNOTHERAPIE.....	16
<b>I. Introduction .....</b>	<b>16</b>
<b>II. Paramètres conditionnant la RIT .....</b>	<b>17</b>
II.1. L'antigène tumoral .....	17
II.2. La cible tumorale .....	18
II.3. Le vecteur immunologique.....	19
II.3.1. Structure des immunoglobulines .....	19
II.3.2. Notion d'affinité.....	20
II.3.3. Les anticorps humanisés.....	20
II.3.4. Les fragments d'anticorps .....	21
II.3.5. Les anticorps bispécifiques.....	22
II.3.6. Les anticorps en RIT.....	23
II.4. Le choix du radionucléide .....	24
II.4.1. Propriétés physiques .....	25
II.4.2. Propriétés chimiques .....	27
<b>III. Applications cliniques de la RIT .....</b>	<b>28</b>
III.1. RIT en hématologie.....	28
III.2. RIT des tumeurs solides .....	30
III.3. Limites de la RIT pour les tumeurs solides et intérêt des liposomes .....	33
GENERALITES SUR LES LIPOSOMES.....	35
<b>I. Historique.....</b>	<b>35</b>
<b>II. Structure et composition des liposomes .....</b>	<b>36</b>
II.1. Définition.....	36
II.2. Classification des liposomes.....	37
II.3. Composition des liposomes .....	37
II.3.1. Les phospholipides .....	37
II.3.2. Le cholestérol .....	39
II.3.3. Les lipides pégylés.....	40
<b>III. Devenir <i>in vivo</i> des liposomes .....</b>	<b>41</b>
III.1. Pharmacocinétique des liposomes.....	41

III.2. Biodistribution des liposomes .....	42
III.2.1. Les différents types d'endothéliums vasculaires .....	42
III.2.2. L'effet EPR (enhanced permeability and retention) .....	43
III.3. Interactions liposomes/cellules .....	44
METHODES DE PREPARATION DES LIPOSOMES .....	46
<b>I. Méthodes conventionnelles .....</b>	<b>46</b>
I.1. Méthode de Bangham, hydratation d'un film lipidique .....	46
I.2. Evaporation en phase inverse .....	46
I.3. Injection d'une solution éthanolique / infusion d'éther .....	47
I.4. Dispersion de micelles mixtes .....	47
I.5. Méthode de la double émulsion .....	48
I.6. Procédés de post-formation .....	48
I.6.1. Modification de la taille et de la lamellarité .....	48
I.6.2. Elimination des solvants résiduels .....	48
I.6.3. Optimisation des taux d'encapsulation .....	49
I.7. Conclusion .....	49
<b>II. Nouvelles méthodes de préparation .....</b>	<b>50</b>
II.1. Lyophilisation d'une solution monophasique .....	50
II.2. Méthode microfluidique .....	50
II.3. Méthode par chauffage .....	51
II.4. Méthodes utilisant les gaz denses et les fluides supercritiques .....	51
II.4.1. Définition .....	51
II.4.2. Procédés solvant .....	53
II.4.3. Procédés anti-solvant .....	54
II.4.4. Synthèse sur les procédés supercritiques .....	55
<b>III. Conclusion .....</b>	<b>55</b>
UTILISATION CLINIQUE DES LIPOSOMES .....	57
<b>I. Utilisation en oncologie .....</b>	<b>57</b>
I.1. Anthracyclines liposomales .....	57
I.1.1. Doxorubicine liposomale .....	59
I.1.2. Daunorubicine liposomale, DaunoXome <sup>®</sup> .....	61
I.2. Cytarabine liposomale, Depocyte <sup>®</sup> .....	62
I.3. Vincristine liposomale, Marqibo <sup>®</sup> .....	63
I.4. Autres formulations liposomales d'anticancéreux en cours d'essais cliniques .....	64
<b>II. Autres domaines d'application .....</b>	<b>65</b>
II.1. Utilisation en infectiologie, exemple d'Ambisome <sup>®</sup> .....	66
II.2. Utilisation en vaccinologie .....	67
II.2.1. Epaxal <sup>®</sup> .....	67
II.2.2. Inflexal <sup>®</sup> V .....	68
II.3. Utilisation en analgésie : DepoPur <sup>®</sup> , Exparel <sup>®</sup> .....	69
II.4. Utilisation en ophtalmologie : Visudyne <sup>®</sup> .....	69
<b>III. Liposomes radioactifs en clinique .....</b>	<b>71</b>
CONCLUSION .....	73

**PARTIE EXPERIMENTALE : Optimisation du ciblage tumoral avec des liposomes radiomarqués et vectorisés par une technique de préciblage en deux temps pour des applications en radioimmunothérapie ..... 75**

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE..... 76

CHAPITRE I : PREPARATION ET MARQUAGE DES LIPOSOMES ..... 79

**I. Préparation des liposomes ..... 79**

I.1. Matériels et méthodes..... 79

I.1.1. *Matières premières* ..... 79

I.1.2. *Formulations*..... 80

I.1.3. *Préparation des liposomes*..... 82

I.1.4. *Purification des liposomes*..... 85

I.1.5. *Contrôle des liposomes* ..... 85

I.2. Résultats ..... 86

I.2.1. *Purification des liposomes*..... 86

I.2.2. *Contrôle du pH* ..... 88

I.2.3. *Contrôle granulométrique* ..... 88

I.3. Discussion ..... 90

**II. Radiomarquage des liposomes ..... 92**

II.1. Matériels et méthodes..... 92

II.1.1. *Matières premières* ..... 92

II.1.2. *Radiomarquage de la bicouche lipidique*..... 92

II.1.3. *Radiomarquage de la phase aqueuse* ..... 95

II.1.4. *Double-marquage des liposomes*..... 97

II.2. Résultats ..... 98

II.2.1. *Marquage à l'<sup>111</sup>In et quantification de l'haptène*..... 98

II.2.2. *Radiomarquage du réactif de Bolton-Hunter à l'<sup>125</sup>I*..... 100

II.2.3. *Double marquage des liposomes*..... 101

II.3. Discussion..... 101

II.3.1. *Méthodes de marquage des liposomes* ..... 101

II.3.2. *Marquage de surface à l'<sup>111</sup>In, quantification de l'haptène*..... 103

II.3.3. *Marquage de la phase aqueuse à l'<sup>125</sup>I* ..... 104

CHAPITRE II : CARACTERISATION DES LIPOSOMES..... 106

**I. Etude de l'affinité liposomes-anticorps au Biacore..... 106**

I.1. Principes ..... 107

I.1.1. *La résonance plasmonique de surface*..... 107

I.1.2. *Application : Le BIACore®*..... 108

I.1.3. *Calcul des constantes cinétiques et d'affinité*..... 109

I.2. Matériels et méthodes..... 110

I.2.1. *Matières premières* ..... 110

I.2.2. *Appareillage*..... 110

I.2.3. *Immobilisation des liposomes* ..... 111

I.2.4. *Injection de l'anticorps en cinétique* ..... 111

I.2.5. *Analyse des résultats*..... 111

I.3. Résultats ..... 111

I.3.1. *Immobilisation des liposomes sur le biocapteur*..... 111

I.3.2. *Injection de l'anticorps en cinétique* ..... 112

I.3.3. *Constantes cinétiques et constante apparente de dissociation*..... 114

I.4. Discussion ..... 116

<b>II. Etude des paramètres pharmacocinétiques .....</b>	<b>119</b>
II.1. Matériels et méthodes.....	119
II.2. Résultats .....	120
II.3. Discussion.....	123
<b>III. Etude de l'interaction cellulaire des liposomes par microscopie de fluorescence.....</b>	<b>125</b>
III.1. Matériels et méthodes .....	125
III.1.1. <i>Matières premières</i> .....	125
III.1.2. <i>Appareillage</i> .....	126
III.1.3. <i>Culture cellulaire</i> .....	126
III.1.4. <i>Traitement des images</i> .....	127
III.2. Résultats .....	128
III.2.1. <i>Résultats sur cellules fixées</i> .....	128
III.2.2. <i>Résultats sur cellules vivantes</i> .....	129
III.3. Discussion .....	137
III.3.1. <i>Justification des traceurs fluorescents utilisés</i> .....	137
III.3.2. <i>Expérimentations sur cellules fixées</i> .....	137
III.3.3. <i>Expérimentations sur cellules vivantes</i> .....	138
<b>CHAPITRE III : BIODISTRIBUTIONS ET CIBLAGE TUMORAL .....</b>	<b>141</b>
<b>I. Etudes de Biodistribution .....</b>	<b>141</b>
I.1. Matériels et méthodes.....	142
I.1.1. <i>Matières premières</i> .....	142
I.1.2. <i>Protocole expérimental</i> .....	142
I.1.3. <i>Expression des résultats</i> .....	143
I.1.4. <i>Analyses statistiques</i> .....	144
I.2. Résultats .....	145
I.2.1. <i>Biodistributions globales</i> .....	145
I.2.2. <i>Comparaison ciblage actif/ciblage passif à 24 h</i> .....	147
I.2.3. <i>Ciblage tumoral</i> .....	149
I.2.4. <i>Résultats cumulés en AUC</i> .....	150
I.3. Discussion .....	152
<b>II. Comparaison statistique des AUC .....</b>	<b>155</b>
II.1. Matériels et méthodes.....	155
II.2. Résultats .....	156
II.3. Discussion.....	157
<b>III. Dosimétrie .....</b>	<b>159</b>
III.1. Matériels et Méthodes .....	159
III.2. Résultats .....	161
III.3. Discussion .....	164
<b>DISCUSSION GENERALE &amp; PERSPECTIVES .....</b>	<b>169</b>
<b>I. Formulations, radiomarquage et caractérisation des liposomes .....</b>	<b>169</b>
I.1. Stabilité des formulations.....	169
I.2. Intérêt du radiomarquage de liposomes pour la RIT .....	170
I.3. Caractérisation et choix des liposomes pour le ciblage tumoral .....	172
<b>II. Ciblage tumoral et biodistribution .....</b>	<b>174</b>
II.1. Choix du système de ciblage .....	174
II.2. Immunospécificité du ciblage <i>in vitro</i> évalué par microscopie et corrélation avec les résultats <i>in vivo</i> .....	175
II.3. Ciblage tumoral <i>in vivo</i> .....	176

II.4. Considérations pour l'utilisation des liposomes en RIT.....	178
II.5. Voies d'optimisation et perspectives.....	180

<b>CONCLUSION.....</b>	<b>183</b>
------------------------	------------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	185
-----------------------------------	-----

## ***LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES***

---

% DI/g	pourcentage de dose injectée par gramme
§	paragraphe
<sup>111</sup> In	indium-111
<sup>125</sup> I	iode-125
<sup>131</sup> I	iode-131
<sup>177</sup> Lu	lutétium-177
<sup>90</sup> Y	yttrium-90
Å	activité cumulée
Ac	anticorps
ACE	antigène carcino-embryonnaire
AcM	anticorps monoclonal
AES	affinity enhancement system
Ag	antigène
AMM	autorisation de mise sur le marché
AS	activité spécifique
BH	Bolton-Hunter
BMEDA	bismercaptoéthyl-diéthylène diamine
BPF	bonnes pratiques de fabrication
Bq	becquerel
BSA	bovine serum albumin
CA	ciblage actif
CCM	chromatographie sur couche mince
CD	Cluster de différenciation
CDR	complementarity determining region
CMT	carcinome médullaire de la thyroïde
CO <sub>2</sub>	dioxyde de carbone
CP	ciblage passif
DMLA	dégénérescence maculaire liée à l'âge
DMPC	dimyristoyl phosphatidylcholine
DMPE	dimyristoyl phosphatidyléthanolamine
DPPE	dipalmitoyl phosphatidyléthanolamine
DSPC	distéaroyl phosphatidylcholine
DSPE	distéaroyl phosphatidyléthanolamine
DSPG	distéaroyl phosphatidylglycérol
DTPA	diéthylène triamine pentaacétique
EDTA	éthylène diamine tétraacétique
EGFR	récepteurs de facteur de croissance épidermiques
EMA	European Medicines Agency
EPC	phosphatidylcholine d'œuf
EPG	phosphatidylglycérol d'œuf
EPR	enhanced permeability and retention
eV	électron volt
ex/em	excitation/emission
Fab	fragment antigen binding

Fc	fragment cristallisable
FDA	Food and Drug Administration
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
GMP	good manufacturing practice
HAMA	anticorps humain anti-souris
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HER2	human epidermal growth factor receptor-2
HPLC	chromatographie liquide haute performance
HSPC	phosphatidylcholine de soja hydrogénée
Ig	immunoglobuline
In	indium
InCl <sub>3</sub>	chlorure d'indium
$k_a$	constante cinétique d'association
$k_d$	constante cinétique de dissociation
$K_D$	constante apparente de dissociation
LAL	leucémie aigüe lymphoblastique
LDL	low density lipoprotein
LNH	lymphome non hodkinien
LUV	large unilamellar vesicle
MHRA	Medicines and Health care products Regulatory Agency
MLV	multilamellar vesicle
mol%	pourcentage molaire
MTD	dose maximale tolérée
MVV	multivesicular vesicle
NTA	acide nitrilotriacétique
Pa	pascal
PBS	phosphate buffer saline
PC	phosphatidylcholine
PdI	index de polydispersité
PE	phosphatidyléthanolamine
PEG	polyéthylène glycol
PO43-	phosphate
PSMA	antigène membranaire spécifique de la prostate
rho	rhodamine
RIT	radioimmunothérapie
RU	unité de résonance
scFv	single chain variable fragment
SPR	surface plasmon resonance
SRE	système réticuloendothélial
SUV	small unilamellar vesicle
SVF	serum de veau fœtal
T/O	tumeur/organe
$T_{1/2}$	demi-vie
TEL	transfert d'énergie linéique
TEP	tomographie par émission de positon
$T_m$	température de transition de phase
VEGFR	récepteur de facteur de croissance vasculaire endothélial
VIH	virus de l'immunodéficience humaine

## **TABLE DES ILLUSTRATIONS**

---

<b>Figure 1</b> : Représentation schématique de la structure des immunoglobulines G.....	20
<b>Figure 2</b> : De l'anticorps murin, à l'anticorps humain (en rouge les parties murines et en blanc et jaunes les parties humaines) (15) .....	21
<b>Figure 3</b> : Représentation schématique de différentes formes d'Ac préparés par digestion enzymatique ou par génie génétique, d'après Sharkey et al. (16) .....	22
<b>Figure 4</b> : Production d'anticorps bispécifiques, d'après Goldenberg et al. (17).....	23
<b>Figure 5</b> : Représentation schématique du principe du système AES, d'après Barbet et al. (33) .....	32
<b>Figure 6</b> : Structure d'un liposome formé d'une bicouche de phospholipides ( <a href="http://www.thehormoneshop.net/liposomes.htm">http://www.thehormoneshop.net/liposomes.htm</a> ).....	36
<b>Figure 7</b> : Formule chimique d'un phospholipide, exemple de la distéaroyl phosphatidyléthanolamine (DSPE) – La tête hydrophile polaire est entourée d'un cercle bleu. ....	38
<b>Figure 8</b> : Formule chimique de la molécule de cholestérol .....	40
<b>Figure 9</b> : Schéma du système microfluidique utilisé pour la préparation des liposomes par Jahn et al. (82,90) .....	51
<b>Figure 10</b> : Diagramme de phase d'un corps pur .....	52
<b>Figure 11</b> : Représentation schématique de l'encapsulation de la doxorubicine (DOX) dans des liposomes par un double gradient d'ions ammonium et de pH .....	59
<b>Figure 12</b> : Principe de la radioimmunothérapie en deux temps avec un anticorps bispécifique et des liposomes fonctionnalisés.....	76
<b>Figure 13</b> : Ionisation de la molécule d'arginine en fonction du pH.....	81
<b>Figure 14</b> : Couplage de l'arginine à la FITC (isothiocyanate de fluorescéine) .....	82
<b>Figure 15</b> : Préparation des liposomes par hydratation d'un film lipidique ( <a href="http://avantilipids.com">http:// avantilipids.com</a> )	83
<b>Figure 16</b> : Technique d'extrusion sur membrane de polycarbonate employant le Mini-extruder™ (Avanti® Polar Lipids).....	84
<b>Figure 17</b> : Profil chromatographique des liposomes à 280 nm sur colonne Superdex® G200 (élution en tampon phosphate 0,15 M pH 5,6 à un débit de 0,7 mL/min) .....	87
<b>Figure 18</b> : Profil chromatographique des liposomes à 220 nm sur colonne Superdex® G200 (élution en tampon phosphate 0,15 M pH 5,6 à un débit de 0,7 mL/min). Mise en évidence de l'arginine non encapsulée. ....	87
<b>Figure 19</b> : Profils d'élution sur colonne Sephadex® G25 de liposomes froids en bleu (par analyse de l'absorbance au Nanodrop®), et de liposomes marqués à l' <sup>111</sup> In en vert (par comptage de l'activité au compteur gamma).....	88

<b>Figure 20</b> : Distribution des liposomes en fonction de leur taille. Résultats obtenus par granulométrie au Malvern High Performance Particle Size (HPPS).....	89
<b>Figure 21</b> : Principe du marquage intra-liposomal à l' <sup>125</sup> I.....	95
<b>Figure 22</b> : Profils d'élution témoins sur colonne Sephadex <sup>®</sup> G25 en tampon phosphate 0,15 M pH 5,6 de l'indium-111 dans les conditions de marquage .....	98
<b>Figure 23</b> : Profils d'élution après purification de liposomes marqués avec des quantités croissantes d'indium (de 0,5 à 10 équivalents In par DTPA théorique) sur colonne Sephadex <sup>®</sup> G25 .....	99
<b>Figure 24</b> : Rendement de marquage (%) et quantité d'In fixé (nmol) en fonction de la quantité d'In mise en jeu pour le marquage d'1 µmol de lipides " DTPA-PEG <sub>2000</sub> 5,0%".....	100
<b>Figure 25</b> : Analyse du BH radioiodé par chromatographie sur couche mince (CCM) révélée au phosphor-imager.....	100
<b>Figure 26</b> : Allure d'un sensorgramme théorique en relation avec l'association et la dissociation des anticorps sur les liposomes préalablement immobilisés sur le biocapteur .....	108
<b>Figure 27</b> : Principe de l'analyse en temps réel de l'interaction entre deux molécules au BIAcore <sup>®</sup> utilisant la résonance plasmonique de surface.....	109
<b>Figure 28</b> : Signal obtenu au BIAcore <sup>®</sup> lors de l'immobilisation de liposomes sur la L1 chip suivi d'un lavage par NaOH ("PEG <sub>2000</sub> 5,0%").....	112
<b>Figure 29</b> : Sensorgrammes obtenus au BIAcore <sup>®</sup> après injection de l'anticorps bispécifique hMN14x734 (7,8 à 250 nM) sur les liposomes "DTPA-PEG <sub>2000</sub> 5,0%" préalablement immobilisés sur la L1 chip.....	113
<b>Figure 30</b> : Résultats obtenus au BIAcore <sup>®</sup> après injection de l'anticorps 734 sur les liposomes témoins "PEG <sub>2000</sub> 5,0% sans DTPA".....	113
<b>Figure 31</b> : Représentation schématique de liposomes portant l'haptène directement sur la bicouche lipidique (A) ou à l'extrémité des chaînes de PEG (B).....	117
<b>Figure 32</b> : Clairance sanguine des liposomes (mL/h) en fonction du degré de pégylation des liposomes.....	122
<b>Figure 33</b> : Plan d'expérience suivi pour l'observation au microscope des cellules fixées en présence de liposomes fluorescents.....	127
<b>Figure 34</b> : Cellules fixées après 2 h d'incubation avec les liposomes (en ciblage actif), observées à l'objectif x60 sur 1 champ (212x212 microns) .....	128
<b>Figure 35</b> : De gauche à droite, cellules après 1 h, 2 h ou 3 h d'incubation avec les liposomes, observées à l'objectif x60 zoom 1 pour le temps 1 h (212x212 microns) et zoom 4 pour les temps 2 et 3 h (53x53 microns) .....	129
<b>Figure 36</b> : Ciblage actif de liposomes 15 min, 2h50 et 5h50 après l'ajout des liposomes sur les cellules (de gauche à droite), observé à l'objectif x20 sur 3x3 champs (620x620 microns).....	130
<b>Figure 37</b> : Représentation en niveau de gris, de gauche à droite, des cellules en fond clair, du signal fluorescent de la fluorescéine (ex/em 488/525 nm) et de la rhodamine (ex/em 561/595 nm) de la	

première image (en haut) et de la dernière image (en bas) d'une acquisition time lapse sur quinze minutes, après l'ajout des liposomes sur les cellules (objectif x20, 640x640microns).....	130
<b>Figure 38</b> : Comparaison de la fixation cellulaire des liposomes après 2h30 d'incubation, sans supplémentation du milieu de culture (à gauche) et avec supplémentation en glutamine 2 mM et SVF 10 % (à droite), à l'objectif x20 (640x640 µm) .....	131
<b>Figure 39</b> : Ciblage actif de liposomes, à l'objectif x20 sur 16 champs (2545x2545 µm) pour la première ligne et sur 1 champ (640x640 µm) pour les Zoom 1 et 2 .....	133
<b>Figure 40</b> : Ciblage passif de liposomes, à l'objectif x20 sur 16 champs (2545x2545 µm) pour la première ligne et sur 1 champ (640x640 µm) pour les Zoom 1 et 2 .....	134
<b>Figure 41</b> : Images obtenues lors de l'acquisition de 30 plans focaux consécutifs selon l'axe Z (avec un pas de 0,5 µm) à l'objectif x60 sur 1 champ (50x50 µm) .....	136
<b>Figure 42</b> : Principe du calcul des aires sous la courbe (AUC) par la méthode des trapèzes à partir des données expérimentales.....	144
<b>Figure 43</b> : Comparaison des taux en <sup>111</sup> In et en <sup>125</sup> I à 24 h dans les trois principaux organes de captation des liposomes pour chaque formulation .....	147
<b>Figure 44</b> : Comparaison du ciblage passif (CP) et du ciblage actif (CA) en <sup>111</sup> In et en <sup>125</sup> I à 24 h pour les trois formulations de liposomes.. .....	148
<b>Figure 45</b> : Influence de la formulation de liposomes sur le ciblage tumoral et comparaison du ciblage passif (CP) et actif (CA) 24 h après l'injection des liposomes.....	150
<b>Figure 46</b> : 64 possibilités d'association pour 3 x 4 souris par biodistribution.....	155
<b>Tableau 1</b> : Propriétés pharmacocinétiques des Ac et des fragments, d'après Sharkey <i>et al.</i> ....	21
<b>Tableau 2</b> : Radionucléides pour la radioimmunothérapie, d'après Kraeber-Bodéré <i>et al.</i> .....	25
<b>Tableau 3</b> : Classification des liposomes selon leur taille et leur lamellarité.....	37
<b>Tableau 4</b> : Principaux groupements polaires estérifiés sur le phosphate des phospholipides .....	38
<b>Tableau 5</b> : Exemple de phospholipides synthétiques neutres avec leur température de transition de phase (T <sub>m</sub> ) et le nombre de carbones et d'insaturations des chaînes d'acide gras.....	39
<b>Tableau 6</b> : Différentes classes d'anticancéreux utilisés sous forme liposomale en oncologie. Liposomes déjà approuvés par la FDA et l'EMA ou encore au stade d'essais cliniques.....	58
<b>Tableau 7</b> : Médicaments à base de liposomes utilisés dans les domaines d'application autres que l'oncologie par type d'application. Liposomes déjà approuvés ou encore au stade d'essais cliniques. 65	
<b>Tableau 8</b> : Composition en % molaire des constituants de la bicouche lipidique pour les différentes formulations de liposomes préparés .....	81
<b>Tableau 9</b> : Analyse des fractions d'élution sur colonne PD10 de liposomes froids par mesure de l'absorbance au Nanodrop <sup>®</sup> , et de liposomes marqués à l' <sup>111</sup> In par comptage au compteur gamma ....	88

<b>Tableau 10 :</b> Diamètre moyen des liposomes (Z-Ave, nm) et Index de Polydispersité (PdI) avec écart-type pour les mesures en triplicate, obtenus par granulométrie .....	90
<b>Tableau 11 :</b> Résultats du marquage d'1 µmol de lipides "DTPA-PEG <sub>2000</sub> 5,0%" avec des quantités croissantes d' <sup>111</sup> In.....	100
<b>Tableau 12 :</b> Constantes cinétiques d'association (k <sub>a</sub> ) et de dissociation (k <sub>d</sub> ) et constante apparente de dissociation (K <sub>D</sub> ) obtenues avec l'IgG 734 sur les différentes formulations de liposomes.....	114
<b>Tableau 13 :</b> Influence de la densité des chaînes de PEG sur l'affinité Ac-liposomes .....	115
<b>Tableau 14 :</b> Influence de la longueur des chaînes de PEG sur l'affinité Ac-liposomes .....	115
<b>Tableau 15 :</b> Variation du K <sub>D</sub> (nM) en fonction du degré de pégylation des liposomes (d° PEG) défini comme le produit de la longueur et du pourcentage molaire des chaînes de PEG.....	115
<b>Tableau 16 :</b> Constantes cinétiques d'association (k <sub>a</sub> ) et de dissociation (k <sub>d</sub> ) et constante apparente de dissociation (K <sub>D</sub> ) obtenues avec le fragment F(ab') <sub>2</sub> bispécifique hMN14x734 sur les différentes formulations de liposomes.....	116
<b>Tableau 17 :</b> Demi-vies (T <sub>1/2</sub> ) et clairances sanguines obtenues pour chaque formulation, en <sup>125</sup> I et en <sup>111</sup> In , après analyse des données expérimentales par le logiciel Pharmacokinetics (moy ± ET).....	120
<b>Tableau 18 :</b> Demi-vies (T <sub>1/2</sub> ) et clairances sanguines moyennes obtenues pour chaque formulation, après analyse des données expérimentales par le logiciel Pharmacokinetics (moy ± ET). .....	121
<b>Tableau 19 :</b> Variation de la clairance sanguine des liposomes (mL/h) en fonction du degré de pégylation des liposomes (d° PEG).....	122
<b>Tableau 20 :</b> Paramètres pharmacocinétiques en fonction de la pégylation des liposomes .....	123
<b>Tableau 21 :</b> Tableau récapitulatif de l'analyse du ciblage actif et du ciblage passif en terme de fluorescence (quantifiée en pixels par image) et en nombre de cellules par image .....	135
<b>Tableau 22 :</b> Masses moyennes des tumeurs (Moy) exprimées en mg, avec l'écart-type (ET) et le coefficient de variation (CV) pour chaque formulation .....	142
<b>Tableau 23 :</b> Biodistribution des liposomes "PEG <sub>1000</sub> 2,5%" doublement radiomarqués à 3 h, 24 h et 48 h après injection de 500 nmol de lipides à des souris ayant reçu l'anticorps bispécifique 24 h avant les liposomes (ciblage actif). .....	145
<b>Tableau 24 :</b> Biodistribution des liposomes "PEG <sub>2000</sub> 5,0%" doublement radiomarqués à 3 h, 24 h et 48 h après injection de 500 nmol de lipides à des souris ayant reçu l'anticorps bispécifique 24 h avant les liposomes (ciblage actif). .....	146
<b>Tableau 25 :</b> Biodistribution des liposomes "DTPA-PEG <sub>2000</sub> 5,0%" doublement radiomarqués à 3 h, 24 h et 48 h après injection de 500 nmol de lipides à des souris ayant reçu l'anticorps bispécifique 24 h avant les liposomes (ciblage actif). .....	146
<b>Tableau 26 :</b> Tableau récapitulatif des aires sous la courbe (AUC) calculées pour les principaux organes (en % DI/g.h) pour le marquage externe ( <sup>111</sup> In) et le marquage interne ( <sup>125</sup> I).....	151
<b>Tableau 27 :</b> AUC moyennes et écart-types (AUC ± ET) avec calcul des ratios tumeurs/organes moyens et écart-types associés (T/O ± ET).....	156

<b>Tableau 28 :</b> Demi-vie physique en h et énergie moyenne par désintégration en MeV.MBq <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> des trois radionucléides choisis pour l'étude de dosimétrie (234).....	160
<b>Tableau 29 :</b> Doses de tolérance des principaux organes à risque (OAR) .....	160
<b>Tableau 30 :</b> Simulation des doses absorbées (mGy/MBq) et des ratios tumeur/organe (T/O) pour les "PEG <sub>1000</sub> 1,5%" avec un radiomarquage externe par de l' <sup>90</sup> Y ou du <sup>177</sup> Lu et un radiomarquage interne par de l' <sup>131</sup> I .....	161
<b>Tableau 31 :</b> Simulation des doses absorbées (mGy/MBq) et des ratios tumeur/organe (T/O) pour les "PEG <sub>2000</sub> 5,0%" avec un radiomarquage externe par de l' <sup>90</sup> Y ou du <sup>177</sup> Lu et un radiomarquage interne par de l' <sup>131</sup> I .....	162
<b>Tableau 32 :</b> Simulation des doses absorbées (mGy/MBq) et des ratios tumeur/organe (T/O) pour les "DTPA-PEG <sub>2000</sub> 5,0%" avec un radiomarquage externe par de l' <sup>90</sup> Y ou du <sup>177</sup> Lu et un radiomarquage interne par de l' <sup>131</sup> I .....	162
<b>Tableau 33 :</b> Simulation de la dose absorbée à chaque organe (Gy) pour une activité injectée (GBq) calculée de façon à se placer à une dose de 1,5 Gy à la moelle osseuse .....	163
<b>Tableau 34 :</b> Résultats des études d'affinité avec l'anticorps bispécifique hMN14x734 (K <sub>D</sub> ) et de pharmacocinétique (T <sub>1/2</sub> ) pour chaque formulation .....	172

# ***INTRODUCTION GENERALE***

---

La radioimmunothérapie (RIT) est une forme de radiothérapie interne vectorisée utilisant des anticorps monoclonaux radiomarqués capables de reconnaître de façon spécifique des antigènes exprimés par les cellules tumorales. Si l'efficacité de la RIT n'est plus à démontrer dans le traitement de tumeurs hématologiques, elle reste encore limitée pour le traitement des tumeurs solides, en raison des faibles rapports tumeur sur tissus sains et de l'activité spécifique des vecteurs parfois limitante. L'objectif de ce travail est de proposer les liposomes comme nouveau vecteur, permettant de véhiculer des activités supérieures à celles habituellement obtenues avec des anticorps ou des peptides. Les liposomes sont des petites vésicules artificielles sphériques, nano ou micrométriques, dont l'enveloppe est constituée d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides. Cette paroi lipidique renferme un cœur aqueux isolé du milieu extérieur. Les liposomes sont biodégradables, atoxiques et principalement employés comme systèmes de délivrance de principes actifs.

Après une présentation des facteurs conditionnant l'efficacité de la RIT, ses applications cliniques et ses limites, la première partie bibliographique de ce manuscrit portera sur les liposomes. Les considérations générales sur les liposomes rappelant leur structure, leur composition et leur devenir *in vivo*, seront suivies d'une présentation des différentes méthodes de préparation. Le développement considérable de ces méthodes depuis les premiers liposomes décrits il y a une cinquantaine d'années témoigne du grand intérêt suscité par ces vecteurs dans de nombreux domaines. Les formulations liposomales de médicaments déjà utilisées en clinique seront ensuite présentées. Pour chaque médicament bénéficiant d'une AMM, sera développé l'avantage qu'apporte la formulation liposomale par rapport à une formulation classique. A travers ces exemples montrant la réalité clinique que représentent les liposomes, sera mis en évidence le potentiel technologique de ces petites vésicules. Les liposomes pourraient alors également être envisagés pour un nouveau défi pharmaceutique : palier aux limites de la RIT des tumeurs solides, ce qui sera proposé dans la suite de ce travail.

La deuxième partie de ce mémoire sera alors consacrée au travail de recherche réalisé au sein de l'équipe 13 « Recherche en Oncologie Nucléaire » de l'unité Inserm UMR 892 / CNRS 6299 du Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers (CRCNA). Ce travail représente un exemple d'étude préclinique, parmi les très nombreux domaines dans lesquels les liposomes font l'objet de recherches, basé sur l'utilisation de liposomes comme vecteurs de radioactivité pour la radioimmunothérapie. L'utilisation de liposomes radiomarqués pourrait être une des voies

d'optimisation possible de la RIT. Ce travail a alors pour objectif d'optimiser le ciblage tumoral de liposomes fonctionnalisés, par une technique de préciblage en deux temps basée sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux bispécifiques. Pour atteindre cet objectif, ce travail se décline en plusieurs étapes ayant pour but :

- de mettre au point différentes formulations de liposomes pégylés et fonctionnalisés avec un haptène greffé à leur surface
- d'utiliser des techniques de marquage (avec des radionucléides ou des fluorochromes) simples et efficaces permettant notamment de radiomarquer les liposomes préformés avec de fortes activités spécifiques
- d'étudier *in vitro* les interactions de ces liposomes fonctionnalisés avec la lignée cellulaire ciblée par des techniques de résonance plasmonique de surface et de microscopie de fluorescence
- évaluer le préciblage et la dosimétrie des liposomes radiomarqués sur un modèle animal afin d'envisager leur utilisation thérapeutique dans la RIT des tumeurs solides.

# **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **Présentation de la radioimmunothérapie et des liposomes**

# ***LA RADIOIMMUNOTHERAPIE***

---

## **I. INTRODUCTION**

La radioimmunothérapie (RIT) est une radiothérapie interne moléculaire, où de faibles débits de dose sont délivrés aux cellules tumorales, grâce aux radionucléides vectorisés par un anticorps monoclonal (AcM), capable de reconnaître les antigènes (Ag) tumoraux (1). Les mécanismes cytotoxiques impliquent alors à la fois des effets radiobiologiques et immunologiques (2,3). L'émission d'un rayonnement à partir d'une désintégration nucléaire est omnidirectionnelle. Ceci explique la possibilité, à partir d'une fixation ponctuelle d'un radionucléide sur une cellule tumorale, d'obtenir un dépôt d'énergie à distance. Ainsi, un AcM radiomarqué peut détruire non seulement sa cible mais également les cellules voisines, non directement ciblées. Ce phénomène est connu sous le nom de "feu croisé" (4). Les dépôts d'énergie vont entraîner la formation de radicaux libres et de peroxydes dans la matière, provoquant la mort des cellules ciblées. Les effets biologiques obtenus se rapprochent de ceux mentionnés avec une irradiation externe à bas ou très bas débit de dose.

Les anticorps radiomarqués ont été développés pour des applications tout d'abord en imagerie puis en thérapie depuis plus de 30 ans. Bien que les premiers anticorps polyclonaux radiomarqués aient été envisagés dès le début des années 1950, le véritable point de départ est la découverte de la technologie des hybridomes (5), qui a rapidement offert de nouvelles perspectives pour la reconnaissance des cellules tumorales avec la production d'anticorps monoclonaux (6,7). Une des premières applications envisagées pour ces AcM a été l'imagerie des cancers par immunoscintigraphie (7), mais cette technique a vite été supplantée par le développement de la tomographie par émission de positon (TEP) offrant une très bonne détection des tumeurs, malgré l'utilisation d'un traceur non spécifique (le [<sup>18</sup>F]-fluorodesoxy-gluucose).

En parallèle, l'immunogénicité des AcM a été réduite par le développement d'anticorps chimériques, humanisés ou la production d'anticorps humains. L'immunothérapie, utilisée à haute dose et souvent combinée à la chimiothérapie a ensuite montré un grand intérêt en hématologie notamment avec le rituximab (anti-CD20) dans le lymphome non hodgkinien (LNH), et le trastuzumab (anti-HER2) dans le cancer du sein (8,9). Basés sur le vieux concept des « magic bullets », les AcM transportant des radionucléides montrent maintenant leur potentiel dans le traitement des cancers, avec la RIT, en particulier dans le LNH et quelques tumeurs solides (10,11).

L'efficacité de la RIT est conditionnée par quatre éléments qui seront exposés dans la suite de ce chapitre. Il s'agit de l'antigène, de la nature de la tumeur, du vecteur immunologique et du radionucléide utilisé. Pour finir, les principales utilisations cliniques de la RIT ainsi que leurs limites seront présentées.

## **II. PARAMETRES CONDITIONNANT LA RIT**

### **II.1. L'antigène tumoral**

La sélection de l'antigène de surface et de l'AcM est cruciale pour le succès de la RIT. Idéalement, l'Ag doit être fortement exprimé et de façon homogène à la surface des cellules, il ne doit pas être exprimé par les tissus sains et ne doit pas être sécrété dans la circulation sanguine. Malheureusement, sauf exceptions, les Ag ne sont pas spécifiques d'une tumeur. Ils peuvent en effet être exprimés de façon physiologique par certains tissus, ou au cours de processus pathologiques variés. Toutefois, la cellule cancéreuse les exprime en concentration beaucoup plus importante. Il s'agit donc d'une spécificité quantitative. De plus, l'expression varie entre les cellules d'une même tumeur et entre deux masses tumorales chez un même individu, par exemple la tumeur primitive et une métastase.

Les Ag habituellement ciblés sont des macromolécules exprimées à la surface des cellules et facilement accessibles depuis le compartiment sanguin et le milieu extracellulaire. Différentes classes de cibles antigéniques peuvent être citées :

- des antigènes oncofœtaux comme l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) ou l'alphafœtoprotéine (AFP)
- des clusters de différenciation hématopoïétiques (CD20 et CD22 dans les lymphomes, CD33 et CD45 dans la leucémie aigue myéloïde).
- des enzymes comme l'antigène membranaire spécifique de la prostate (PSMA) et l'anhydrase carbonique
- des composants vasculaires comme les intégrines, le récepteur de facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGFR) ou la fibronectine B
- des molécules de transduction du signal comme les récepteurs de facteur de croissance épidermiques (EGFR, HER2)
- des glycolipides, des carbohydrates..., la liste n'est pas exhaustive.

L'internalisation ou non du complexe antigène-anticorps est également un paramètre extrêmement important pour le choix du radionucléide. Une fois internalisé, l'anticorps sera

métabolisé en peptides et acides aminés exprimés à la surface des cellules. En fonction du radionucléide, l'internalisation constituera un véritable atout ou sera au contraire délétère. Les radiométaux ( $^{111}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ...) auront en effet tendance à s'hydrolyser et à rester piégés dans les cellules, potentialisant l'accumulation tumorale. A l'inverse, les halogènes, comme l'iode seront excrétés de la cellule sous forme d'iodo-tyrosine après déshalogénéation.

## II.2. La cible tumorale

Différents paramètres concernant la tumeur conditionnent la biodistribution de l'Ac radiomarqué et la réponse tumorale aux rayonnements ionisants. L'efficacité thérapeutique va dépendre en effet de la radiosensibilité de la tumeur et surtout de la capacité de l'Ac à atteindre sa cible en quantité suffisante.

De nombreuses barrières s'opposent au transport de l'Ac du compartiment vasculaire vers le compartiment interstitiel puis vers le compartiment cellulaire, notamment dans les tumeurs volumineuses. Au cours de son développement, la tumeur présente des besoins métaboliques nécessitant l'apparition d'une néovascularisation (angiogenèse). Cette angiogenèse présente des caractéristiques différentes de la vascularisation physiologique. La vascularisation tumorale est en effet très hétérogène et anarchique, les vaisseaux dilatés et tortueux. Le flux sanguin tumoral est très hétérogène. En périphérie, il peut être plus élevé que dans les tissus sains adjacents mais il diminue au centre de la tumeur, devenant inférieur au flux normal. La densité vasculaire au centre de la tumeur diminue également, du fait de la prolifération tumorale plus rapide que l'angiogenèse. Ce phénomène ajouté à la pression exercée par la tumeur sur les vaisseaux explique l'apparition d'une zone centrale hypoxique et nécrotique, peu accessible aux Ac et qui majore la radiorésistance tumorale (12).

Avant d'atteindre sa cible antigénique, l'Ac doit traverser la paroi vasculaire. Son extravasation s'effectue par des mécanismes de diffusion et de convection. La diffusion est proportionnelle à la surface d'échange du capillaire et à la différence de concentration d'Ac entre le plasma et le liquide interstitiel. Elle est généralement bonne du fait de la structure des vaisseaux tumoraux, caractérisés par l'absence de membrane basale et la présence de nombreux espaces entre les cellules endothéliales. Par contre, la convection, mécanisme prépondérant d'extravasation des Ac à travers la paroi des vaisseaux, est peu efficace. En effet, ce phénomène est proportionnel à la surface et aux différences de pressions entre les compartiments vasculaire et interstitiel. Or il a été démontré que la pression interstitielle dans les tumeurs est supérieure à celle des tissus normaux, principalement au centre de la tumeur. Ce phénomène diminue l'extravasation des Ac et est d'autant plus important que la tumeur est volumineuse.

La nature de la cible tumorale conditionne sa radiosensibilité qui est directement liée aux capacités intrinsèques de la cellule à réparer les dommages causés par les rayonnements ionisants. Il existe une corrélation entre la vitesse de croissance d'une tumeur et sa radiosensibilité. Une croissance rapide sera le plus souvent liée à une meilleure radiosensibilité qu'une croissance lente. Par ailleurs, la radiosensibilité varie également en fonction du type histologique, mais également au cours de la croissance. Le neuroblastome ou le cancer du poumon à petites cellules sont réputés très radiosensibles alors que les carcinomes coliques sont relativement plus résistants. Les zones hypoxiques sont également plus radiorésistantes.

## **II.3. Le vecteur immunologique**

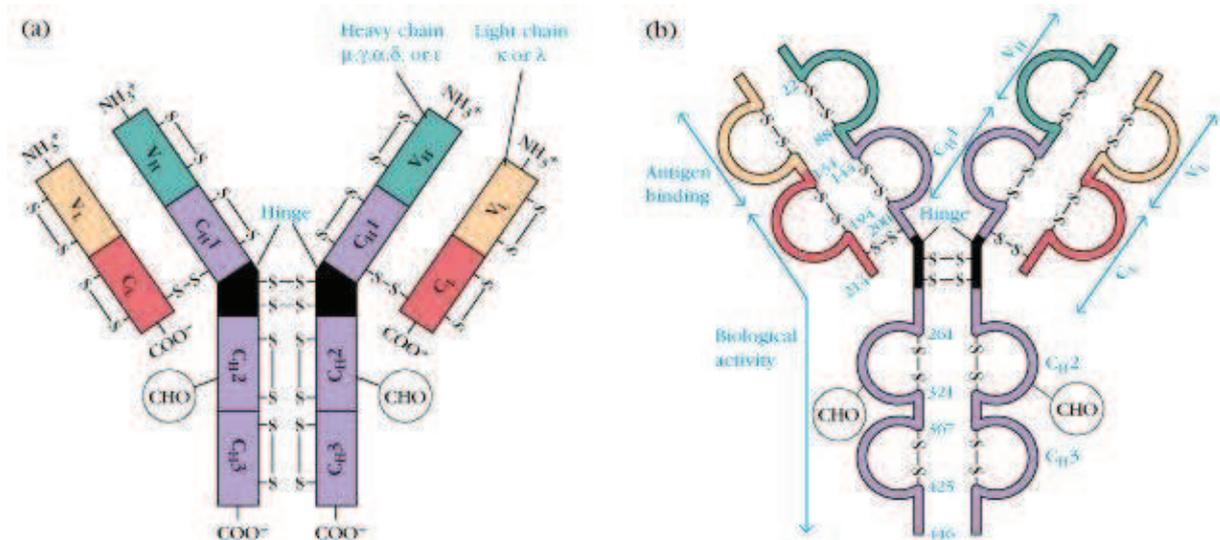
### **II.3.1. Structure des immunoglobulines**

Les Ac naturels sont des immunoglobulines (Ig), synthétisées et secrétées par les lymphocytes B en réponse à une stimulation antigénique. Malgré leur très grande diversité, les Ig ont une structure commune. Elles sont toutes constituées par des chaînes lourdes (H pour heavy) d'environ 50 kDa et légères (L pour light) d'environ 25 kDa, comprenant chacune des domaines variables (V) et constants (C). Les chaînes H et L sont liées entre elles par des ponts disulfures et par un ensemble d'interactions non covalentes pour former un hétérodimère (H-L). Ces mêmes types de liaisons relient deux hétérodimères entre eux pour former la structure d'immunoglobuline de base à quatre chaînes, le dimère  $(H-L)_2$  (*Figure 1*).

Les domaines variables des chaînes légères ( $V_L$ ) et des chaînes lourdes ( $V_H$ ), représentent environ 110 acides aminés de la partie amino-terminale de chaque chaîne. L'association entre les domaines  $V_H-C_H1$  et  $V_L-C_L1$  adjacents définit la région Fab (fragment antigen binding) contenant le domaine de reconnaissance de l'antigène, le paratope. De façon plus précise, les régions hypervariables (qui constituent les principales différences entre les anticorps) sont situées dans les domaines variables à l'intérieur de zones appelées régions de complémentarité (CDR, complementarity determining region). Les 6 régions CDR (3 pour la  $V_L$  et 3 pour la  $V_H$ ) forment le paratope qui correspond au site de liaison à l'antigène de la molécule d'immunoglobuline. La région reconnue par le paratope au niveau de l'antigène est appelée l'épitope.

Les domaines constants des chaînes lourdes forment la région Fc (fragment cristallisable) et ne sont pas impliqués dans la reconnaissance du complément mais interviennent au niveau de l'activité biologique (liaison aux cellules de l'immunité, activation du système du complément, cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps).

Il existe cinq types d'immunoglobulines selon le type de chaîne lourde :  $\gamma$  pour les IgG,  $\alpha$  pour les IgA,  $\mu$  pour les IgM,  $\delta$  pour les IgD et  $\epsilon$  pour les IgE. Les chaînes légères sont identiques pour toutes les classes, et peuvent être soit de type kappa soit de type lambda.



**Figure 1** : Représentation schématique de la structure des immunoglobulines G (13)

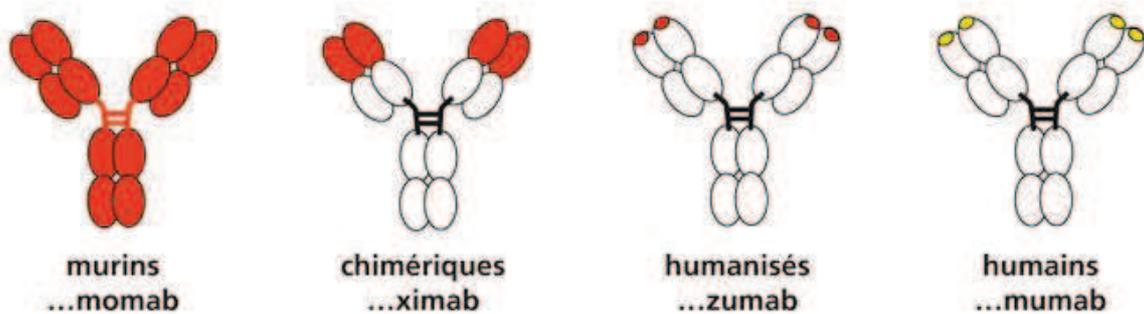
### II.3.2. Notion d'affinité

L'interaction antigène-anticorps est une association réversible impliquant diverses interactions entre l'épitope et le paratope. Ces interactions non covalentes qui forment la base de la liaison antigène-anticorps incluent les liaisons hydrogènes, les liaisons ioniques, les interactions hydrophobes et les interactions de Van der Waals. La force et la stabilité de toutes ces interactions non covalentes définissent l'affinité de l'anticorps pour l'antigène. Cette affinité est caractérisée par une constante de dissociation  $K_D$  qui varie de  $10^{-4}$  M (faible affinité) à  $10^{-11}$  M (forte affinité).

### II.3.3. Les anticorps humanisés

Les premiers AcM utilisés en clinique et produits par la technologie de l'hybridome (fusion de lymphocytes B et de cellules de myélome d'origine murine) étaient entièrement murins. Ces AcM entraînaient alors après injection, l'apparition chez le patient d'Ac anti-souris HAMA ("Human Anti-Mouse Antibodies") susceptibles de neutraliser leur activité thérapeutique, voire de provoquer des réactions allergiques. Ces HAMA apparaissent surtout en cas d'injection de quantités d'anticorps supérieures au mg ou d'injections répétées. Cette contrainte a rendu indispensable la production d'anticorps humanisés et beaucoup de progrès ont été réalisés pour réduire leur immunogénicité. L'évolution des biotechnologies dans le domaine de l'ADN recombinant a en effet permis d'humaniser progressivement les AcM. L'objectif consiste à remplacer par génie génétique des

portions de plus en plus nombreuses de l'anticorps murin, par des parties humaines comme le montre la *Figure 2* (14).



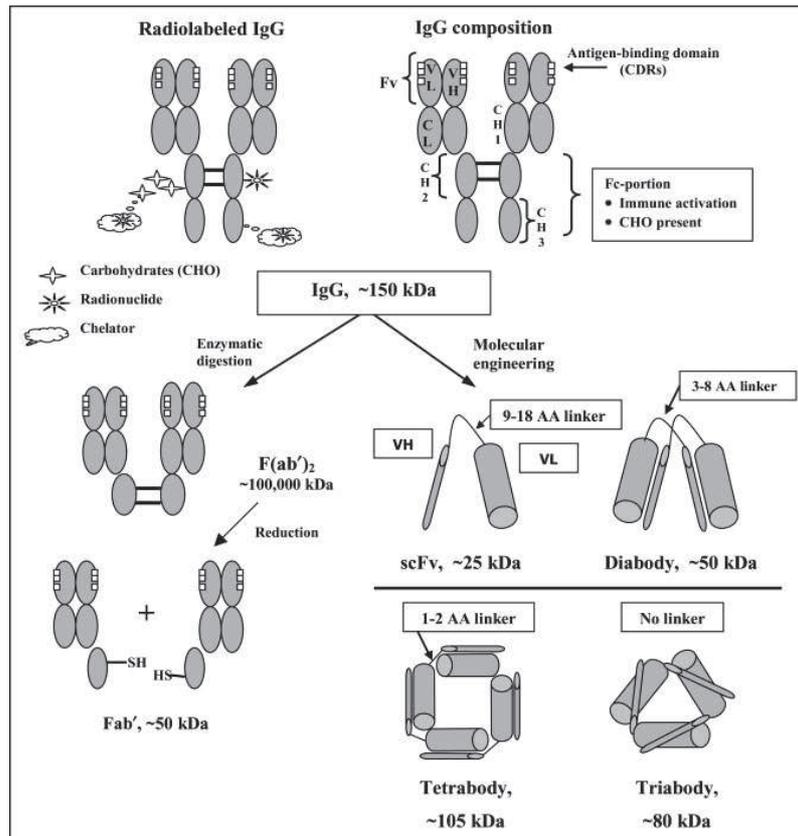
**Figure 2 :** De l'anticorps murin, à l'anticorps humain (en rouge les parties murines et en blanc et jaunes les parties humaines) (15)

### II.3.4. Les fragments d'anticorps

Les immunoglobulines circulent relativement longtemps (demi-vie plasmatique de 2 à 3 jours) ce qui a conduit au développement de plusieurs fragments et sous-fragments pour modifier les paramètres pharmacocinétiques et la biodistribution des Ac entiers. Les fragments bivalents  $F(ab')_2$  et monovalents Fab' (pour "antigen binding") sont obtenus par action de la pepsine sur un Ac entier. L'isolement du fragment constitué des domaines variables  $V_H$  et  $V_L$  et sa stabilisation par des peptides de liaison très courts, a permis de construire différentes molécules : scFv (single chain variable fragment), bi-scFv ou "diabodies", "triabodies", "tetrabodies", représentés *Figure 3* et dont les propriétés pharmacocinétiques sont résumées dans le *Tableau 1*.

	<b>IgG</b>	<b>F(ab')<sub>2</sub></b>	<b>Fab'</b>	<b>Diabody</b>	<b>scFv</b>
Poids moléculaire (Da)	150	100	50	50	25
T <sub>1/2</sub> plasmatique	2-3 j	1-2 j	3 h	3 h	3 h
Principale voie d'élimination	hépatique	hépatique	rénale	rénale	rénale

**Tableau 1 :** Propriétés pharmacocinétiques des Ac et des fragments, d'après Sharkey et al. (16)



**Figure 3 :** Représentation schématique de différentes formes d'Ac préparés par digestion enzymatique ou par génie génétique, d'après Sharkey et al. (16)

### II.3.5. Les anticorps bispécifiques

Les anticorps bispécifiques sont des immunoglobulines de synthèse qui reconnaissent deux antigènes distincts. Les premiers Ac bispécifiques ont été obtenus par couplage chimique entre deux fragments Fab' provenant de deux IgG différentes pour former un conjugué F(ab')<sub>2</sub>. Cette technique utilise un agent couplant qui réagit entre les groupements amines des Ac ou les groupements thiols provenant de la réduction des ponts disulfures (Figure 4).

Une méthode plus récente utilise l'ingénierie moléculaire avec la méthode « Dock-and Lock » (18). Cette méthode conduit à la production d'anticorps bispécifiques et trivalents (tri-Fab'), puisque 2 Fab' sont dirigés contre un Ag tumoral et un Fab' contre un haptène. Comme présenté dans la Figure 4, cette technique consiste à introduire un domaine de dimérisation et d'ancrage (DDD : dimerization and docking domain), formé par un petit peptide de 44 acides aminés, dérivé de la protéine kinase A, sur les deux premiers fragments Fab'. Après dimérisation de ces deux Fab' anti-Ac, le domaine DDD permet l'ancrage du 3<sup>ème</sup> Fab' modifié par un domaine d'ancrage (AD, peptide de 17 acides aminés dérivé de la protéine-kinase A). L'auto-assemblage de ces différents dérivés de protéine kinase (« dock ») est finalement verrouillé (« lock ») grâce à la modification des deux domaines "DDD" et "AD" par des cystéines qui vont réagir entre elles pour former des ponts-disulfures.

En RIT, les anticorps bispécifiques sont utilisés dans les techniques de ciblage comportant plusieurs étapes qui seront développées plus loin (cf § III.2, p.30).

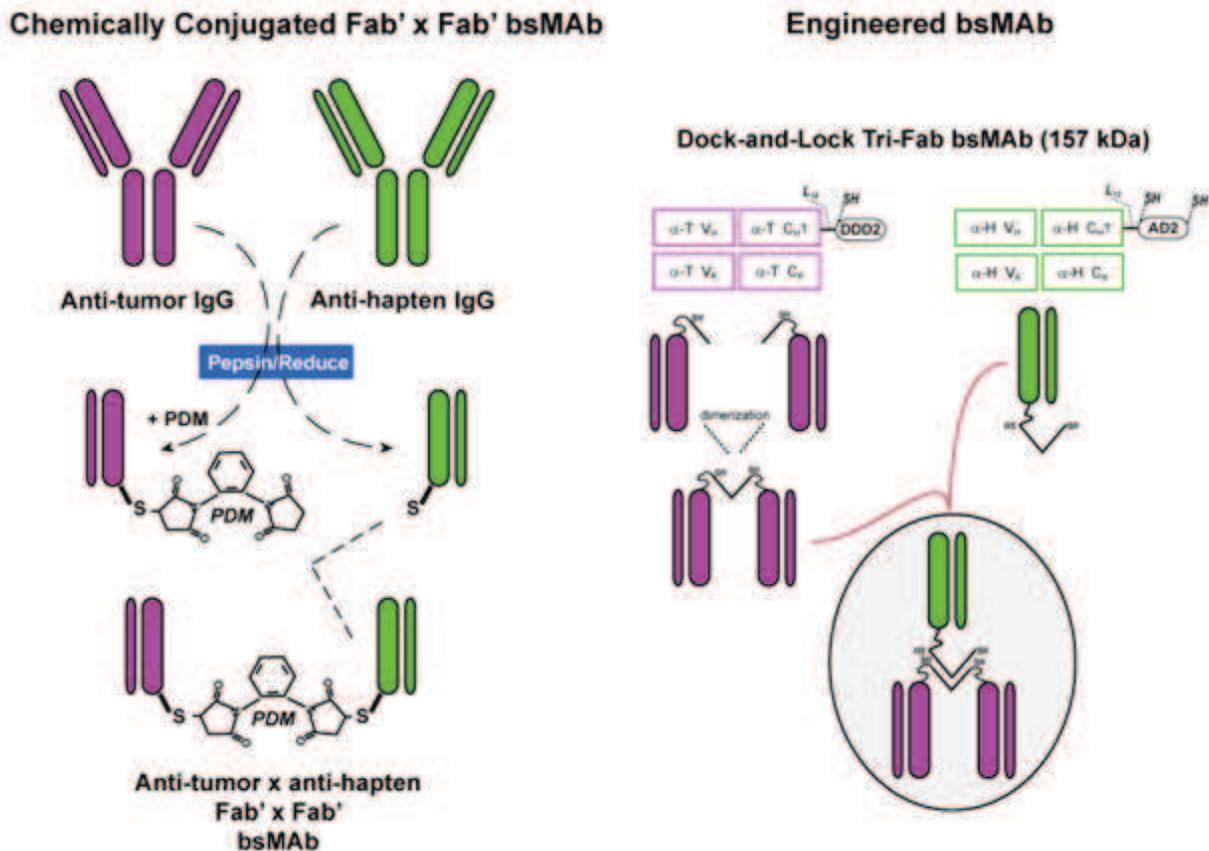


Figure 4 : Production d'anticorps bispécifiques, d'après Goldenberg *et al.* (17)

### II.3.6. Les anticorps en RIT

La réussite de la RIT dépend en partie du vecteur immunologique et va être notamment conditionnée par ses propriétés pharmacocinétiques et son affinité pour l'Ag. Wittrup *et al.* se sont basés sur un modèle pharmacocinétique pour établir des recommandations permettant de sélectionner l'agent idéal pour d'obtenir une captation tumorale optimale (19). La pénétration et la captation tumorale peuvent en effet être prédites en fonction de l'affinité et de la taille de l'anticorps.

Cette analyse théorique suggère qu'une IgG entière ( $\approx 20$  nm) corresponde au bon compromis entre les taux de diffusion dans la tumeur et la clairance rénale pour permettre une captation tumorale optimale. A l'inverse les fragments d'Ac plus petits, comme les fragments scFv ( $\approx 6-8$  nm), sont excrétés trop rapidement au niveau rénal pour diffuser au centre des tumeurs. Ces fragments d'anticorps ont pourtant été envisagés dans le but de limiter l'irradiation non spécifique avec une élimination rapide, tout en améliorant l'accumulation tumorale. Cependant, la comparaison de la pharmacocinétique et de la biodistribution des différentes formes d'Ac a fait l'objet d'études

précliniques qui montrent, dans la majorité des modèles, une fixation tumorale et un temps de résidence supérieurs pour les IgG entières (20). L'IgG entière a néanmoins plus de difficultés à atteindre sa cible tumorale et à y pénétrer. De plus, sa clairance sanguine plus lente augmente les risques d'irradiation non spécifique, en particulier de la moelle osseuse (20). Du fait de leur plus faible taille, les fragments permettent, grâce à une meilleure pénétration tumorale et à une cinétique plasmatique plus rapide, d'augmenter le contraste au niveau de la tumeur et de diminuer le caractère immunogène dû au fragment Fc de l'IgG. Cependant, le temps de résidence tumoral de ces fragments est trop court pour pouvoir délivrer une dose d'irradiation thérapeutique. Ces fragments d'Ac ne sont donc pas adaptés à la RIT, d'autant plus qu'après administration intra-veineuse, une fixation rénale précoce importante est retrouvée.

L'affinité de l'anticorps pour son antigène est un élément également très important à prendre en compte. Le modèle de Wittrup *et al.* montre que des petits fragments nécessitent une meilleure affinité pour être retenus dans les tumeurs comparativement à de grosses molécules pour lesquelles la rétention n'est que peu influencée par l'affinité. Les petits peptides dépendent donc étroitement de l'affinité et nécessitent d'avoir des  $K_D$  sub-nanomolaires pour montrer une rétention suffisante dans les tumeurs. A l'inverse, pour les molécules de la taille d'une IgG, l'augmentation de l'affinité au-delà de 10 nM n'aura que peu d'impact sur l'accumulation tumorale (19). Par ailleurs, il a également été montré qu'un Ac de faible affinité pénétrait plus profondément qu'un Ac de forte affinité. En effet, un Ac très affiné va se fixer dès qu'il rencontre l'Ag et sature ainsi les sites superficiels sans qu'il n'y ait de diffusion. Ce phénomène introduit par Fujimori *et al.* est appelé « binding site barrier » (21). De la même manière, l'endocytose du complexe anticorps-antigène peut également limiter la diffusion de l'anticorps (19).

Une balance entre la diffusion de l'Ac, l'affinité et l'endocytose est donc nécessaire. Le consensus général reste néanmoins d'utiliser des Ac de haute affinité afin d'améliorer le ciblage. Par ailleurs, la spécificité de l'Ac est également très importante car elle conditionne en partie la distribution dans les tissus et donc les effets secondaires.

## II.4. Le choix du radionucléide

Le choix du radionucléide repose sur de nombreuses considérations physico-chimiques mais également pratiques. En effet, un radionucléide considéré comme parfait du point de vue de ses caractéristiques physiques et radiobiologiques, pourra ne pas être utilisé si sa disponibilité est trop faible (dépendant du mode de production), qu'il est trop onéreux, ou que la procédure de marquage est trop compliquée. Les principaux radionucléides utilisés en RIT sont présentés dans le *Tableau 2*.

Radionuclide	T <sub>1/2</sub> (hours)	Main Emissions	E Max (keV)	Range Max in Soft Tissue (mm)	Usual Labeling Method
Iodine-131	193	$\beta^-$ $\gamma$	610 362	2.9	Direct labeling (tyrosine)
Yttrium-90	64	$\beta^-$	2250	11	Polyamino-carboxylic acids: DOTA
Rhenium-188	17	$\beta^-$ $\gamma$	2120 155	10	Direct labeling or N2S2 or N3S complexes (chemistry analogous to that of technetium)
Lutetium-177	162	$\beta^-$ $\gamma$	498 208	2.0	Polyamino-carboxylic acids: DOTA
Copper-67	62	$\beta^-$ $\gamma$	392–577 184	1.8	Many different chelating agents
Bismuth-212	1.01	$\alpha$ $\gamma$	6051 and 6090 727	0.07	Polyamino-carboxylic acids: CHX-DTPA, DOTA
Bismuth-213	0.76	$\alpha$ $\gamma$	8,400 440	0.1	Polyamino-carboxylic acids: CHX-DTPA, DOTA
Astatine-211	7.2	$\alpha$ X	5870 and 7450 77–92	0.055–0.080	Stannylated synthons: SAB, SAPS
Actinium-225	240	$\alpha$	+ alpha emitting daughters	*	Polyamino-carboxylic acids: DOTA

**Tableau 2 :** Radionucléides pour la radioimmunothérapie, d'après Kraeber-Bodéré et al. (22)

## II.4.1. Propriétés physiques

Chaque radionucléide est caractérisé par des propriétés physiques qui lui sont propres : le type d'émission, la demi-vie physique, l'énergie des rayonnements émis (en keV), le parcours moyen dans la matière, et le transfert d'énergie linéique (TEL) défini comme la quantité d'énergie transférée par unité de longueur du parcours dans la matière (en keV/ $\mu\text{m}$ ).

### II.4.1.1. Type d'émission

Seuls les radionucléides particuliers (alpha, bêta, électrons Auger) peuvent délivrer suffisamment d'énergie de manière locale pour une action thérapeutique.

#### a. Emetteurs $\beta^-$

Les émetteurs  $\beta^-$  sont les plus utilisés en clinique. L'<sup>131</sup>I et l'<sup>90</sup>Y sont connus et utilisés depuis longtemps avec notamment deux spécialités autorisées (Bexxar<sup>®</sup> et Zevalin<sup>®</sup>) pour la RIT du LNH. Le <sup>177</sup>Lu et le <sup>188</sup>Re sont en train d'émerger et le <sup>67</sup>Cu est considéré également comme très prometteur.

Ces radionucléides sont des atomes dont le noyau présente un excès de neutrons. Lors d'une désintégration  $\beta^-$ , un neutron se transforme en proton en générant l'émission d'un électron négatif éjecté du noyau : la particule  $\beta^-$ . Ces particules d'énergie intermédiaire (30 keV à 2,3 MeV) perdent

leur énergie cinétique avec un long parcours dans la matière ( $\approx 0,1-12$  mm) et un faible TEL ( $\approx 0,2$  keV/ $\mu\text{m}$ ).

Leur faible TEL implique que leur utilisation nécessite des concentrations élevées pour être efficace. Par contre, leur trajet relativement long, permet d'irradier des cellules qui n'ont pas été directement ciblées par l'Ac, c'est le phénomène de « feux croisés » (4). Ce phénomène permet ainsi aux particules d'atteindre des cellules n'exprimant pas l'antigène ou qui sont peu accessibles par l'anticorps, ce qui réduit également l'hétérogénéité du ciblage tumoral. Cependant, ce long parcours dans la matière peut également donner lieu à des irradiations aspécifiques des tissus voisins, pouvant entraîner des toxicités notamment de la moelle osseuse. Théoriquement les émetteurs  $\beta^-$  sont plus adaptés à des tumeurs volumineuses, car dans le cas des petites tumeurs, la dose serait déposée en dehors de la cible.

Il est important de noter que certains radionucléides peuvent être mixtes, c'est-à-dire qu'ils peuvent avoir des émissions associées à l'émission particulaire, en émettant par exemple des rayonnements gamma, ce qui peut constituer un avantage comme un inconvénient. Ces rayonnements  $\gamma$ , en fonction de leur énergie d'émission, pourront permettre en parallèle l'acquisition d'images scintigraphiques, permettant de connaître la biodistribution du vecteur et de réaliser des études dosimétriques. Cependant, dans certains cas, notamment pour l' $^{131}\text{I}$ , l'émission de rayonnements  $\gamma$  énergétiques couplée à sa longue demi-vie, pose des contraintes de radioprotection supplémentaires.

### *b. Emetteurs alpha*

Outre la mise sur le marché du premier médicament pharmaceutique  $\alpha$  (Xofigo<sup>®</sup>) dans le cancer de la prostate, consistant en l'injection de  $^{223}\text{Ra}$  seul, les radiomarquages de vecteurs avec des émetteurs  $\alpha$  sont en cours de développement et sont en train d'émerger pour des applications en RIT. Le  $^{213}\text{Bi}$ , disponible à partir d'un générateur ( $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ ), fait l'objet de nombreuses recherches malgré sa courte demi-vie de 45 min. L' $^{211}\text{At}$  obtenu par un cyclotron, serait un meilleur candidat avec une demi-vie plus favorable de 7 h, mais présente une chimie plus complexe. D'autres émetteurs pourraient être disponibles, comme l' $^{225}\text{Ac}$ , mais il présente une cascade d'émission alpha ce qui peut être un problème.

Les émetteurs  $\alpha$  sont des atomes radioactifs lourds qui se désintègrent en émettant un noyau d'hélium. Cette particule lourde est émise avec une énergie très importante de 5 à 9 MeV sur 50 à 100  $\mu\text{m}$  seulement, conduisant à des TEL très élevés de 50 à 250 keV/ $\mu\text{m}$ .

L'effet de « feux croisés » est donc très faible avec ces particules qui n'atteignent que quelques cellules, et nécessite que l'activité soit délivrée à proximité des cellules. Ces émetteurs sont plus adaptés à des cellules isolées ou à de la maladie résiduelle minimale. Par contre, leur TEL très élevé les rend extrêmement cytotoxiques.

### II.4.1.2. *Demi-vie physique*

La demi-vie physique est un paramètre important à prendre en compte dans le choix du radionucléide. La demi-vie du radionucléide choisi doit en effet correspondre à celle du vecteur utilisé. En effet, une demi-vie trop courte conduira à une irradiation non spécifique tout au long de la phase de distribution du vecteur jusqu'à sa cible. Une demi-vie trop longue par rapport au vecteur entraînera l'émission de rayonnement pendant la phase d'élimination du vecteur. Par ailleurs cette demi-vie doit être également compatible aux conditions et durées de marquage, et être suffisamment longue pour une utilisation confortable jusqu'à l'administration au patient. Des demi-vies très longues peuvent également poser des problèmes de radioprotection et de gestion des déchets.

### II.4.1.3. *Energie et TEL*

Comme évoqué précédemment, le TEL est responsable de la cytotoxicité induite par le radionucléide. Le faible TEL des émetteurs  $\beta^-$  nécessitera d'avoir une concentration dans la matière assez importante pour être efficace. En effet, au niveau moléculaire, ces émetteurs ne provoquent que quelques ionisations, causent des lésions individuelles de l'ADN (cassure simple ou double brin) et des dommages protéiques facilement réparables. A l'inverse le TEL très élevé des émetteurs  $\alpha$  (50-250 keV/ $\mu\text{m}$ ), les rend extrêmement cytotoxiques. Du fait de la forte densité d'ionisation de ces particules  $\alpha$ , elles causent de multiples lésions très proches les unes des autres sur l'ADN, avec une forte probabilité de cassures double brin non réparables et létales. Cette toxicité semble par ailleurs indépendante de la dose et de l'oxygénation des tissus.

### II.4.1.4. *Parcours dans la matière*

Comme déjà évoqué, le choix du radionucléide devra également être considéré en fonction de son parcours moyen dans la matière qui devra être compatible, dans la mesure du possible, à la taille de la tumeur. Ainsi l' $^{90}\text{Y}$ , avec son parcours dans la matière de 12 mm, sera préféré pour les tumeurs volumineuses alors que le  $^{177}\text{Lu}$  (parcours de 2 mm), sera plus favorable pour de la maladie résiduelle.

## II.4.2. **Propriétés chimiques**

Les propriétés chimiques de chaque radionucléide vont avoir des conséquences sur le mode de marquage ainsi que sur le devenir *in vivo* de la molécule marquée.

### II.4.2.1. *Radiomarquage*

En fonction du radionucléide choisi, la méthode de marquage sera différente. L'iode, comme la plupart des halogènes, permet des marquages directs par substitution électrophile, sur des noyaux aromatiques comme les résidus histidine ou tyrosine des protéines. Les radiométaux comme l' $^{90}\text{Y}$ , le

$^{177}\text{Lu}$ , le  $^{188}\text{Re}$ , le  $^{67}\text{Cu}$ , le  $^{213}\text{Bi}$ ... nécessitent quant à eux un agent chélatant intermédiaire. Ces métaux, généralement sans entraîneur ou obtenus par élution d'un générateur, peuvent présenter des contaminants métalliques résiduels provenant du mode de production, susceptibles de diminuer l'activité spécifique (AS) des molécules marquées. Afin d'augmenter cette AS, des agents chélatants plus spécifiques ont été développés (23). De plus, pour éviter les phénomènes de transmétallation *in vivo*, le complexe formé doit être très stable, ce qui nécessite un agent chélatant présentant une très bonne stabilité cinétique. Le radiomarquage ne doit pas non plus influencer les propriétés du vecteur. Par ailleurs les marquages doivent être simples, efficaces pour limiter les étapes de purification et suffisamment rapides par rapport à la demi-vie physique du radionucléide. Enfin dans le cas d'une filiation, notamment avec l' $^{225}\text{Ac}$ , la liaison entre le radionucléide et le vecteur doit être la plus solide possible car l'énergie de recul qui accompagne la désintégration peut conduire à la libération du radionucléide fils entraînant une irradiation non spécifique.

#### II.4.2.2. *Devenir in vivo*

Comme déjà évoqué précédemment, après internalisation et métabolisme du vecteur, l'iode sera excrété de la cellule après déshalogénéation sous forme d'iodo-tyrosine. Ces phénomènes de déshalogénéation diminuent l'irradiation de la tumeur mais conduisent de plus à l'irradiation non spécifique de la thyroïde pour l'iode et de l'estomac pour l'astate. A l'inverse, en cas d'internalisation, les métaux auront tendance à rester piégés au sein des cellules, potentialisant la dose à la tumeur. Les métaux sont par contre susceptibles de subir des phénomènes de transchélation et transmétallation avec les protéines comme la transferrine et la céruloplasmine entraînant une accumulation hépatique de ces radionucléides. Le radioimmunoconjugué devra donc avoir la meilleure stabilité possible *in vitro* mais surtout *in vivo*.

### III. APPLICATIONS CLINIQUES DE LA RIT

#### III.1. RIT en hématologie

Pour de nombreuses raisons, la RIT constitue une approche particulièrement intéressante pour les hémopathies malignes. En effet, de nombreux antigènes de surface spécifiques, non exprimés dans d'autres tissus, ont été identifiés. De nombreux anticorps ciblant les hémopathies malignes ont été développés. Enfin, les leucémies et les lymphomes sont extrêmement sensibles aux irradiations. Par

ailleurs, la pratique du recueil de cellules souches devenue courante dans de nombreux centres d'oncologie, et également utilisée dans le cadre des chimiothérapies à haute dose, permet l'utilisation de la RIT à dose myéloablative. Cela est particulièrement vrai lorsqu'il est possible de réaliser une greffe de cellules souches autologues (recueil des cellules souches du patient même). Ces protocoles permettent ainsi d'augmenter les doses délivrées à la tumeur.

Les premières études utilisant la RIT à dose myéloablative, suivie d'une transplantation de moelle osseuse, ont donné de très bons résultats avec des taux de réponse complète supérieurs à 80 % et des survies médianes supérieures à 5 ans (24). Cependant ces protocoles de greffe de moelle et la gestion des hautes doses d'<sup>131</sup>I restent lourds à mettre en place. Le développement de traitements avec de plus faibles doses a abouti à l'approbation par la FDA (US Food and Drug Administration) de deux anticorps murins anti-CD20 marqués à l'<sup>131</sup>I ou à l'<sup>90</sup>Y, dans le traitement du lymphome non hodgkinien (LNH) réfractaire ou en rechute. L'<sup>131</sup>I-Tositumomab (Bexxar®, GlaxoSmithKline) a été approuvé par la FDA en 2003, mais il n'est plus commercialisé à ce jour, et le l'<sup>90</sup>Y-Ibritumomab (Zevalin® Spectrum Pharmaceuticals) bénéficie d'une AMM européenne depuis janvier 2004 et est également autorisé aux Etats-Unis, en Asie, et en Afrique.

Les anticorps anti-CD20 radiomarqués à l'<sup>131</sup>I ou à l'<sup>90</sup>Y ont permis d'obtenir de meilleurs résultats qu'avec les anticorps non radiomarqués avec des taux de réponse globale de 60 à 80 % et des taux de réponse complète de 15-40 % (25,26) dans le LNH en rechute. Globalement la RIT est bien tolérée, la toxicité hématologique est l'effet indésirable majeur et dépend de l'envahissement de la moelle osseuse avant traitement. Les autres toxicités non hématologiques sont relativement faibles. La myélosuppression et la survenue de cancers secondaires à long terme ont été rapportées mais ne sont pas augmentées par rapport aux traitements par chimiothérapie (27).

Néanmoins, de nouvelles stratégies sont proposées pour encore optimiser la RIT en hématologie. Des protocoles à haute dose avec des activités myéloablatives de RIT ou des activités standards de RIT combinées à de hautes doses de chimiothérapies (incluant la carmustine, l'étoposide, la cytarabine et le melphalan) donnent des résultats intéressants dans les lymphomes agressifs (28). L'utilisation de la RIT en première ligne en consolidation après l'induction d'une première chimiothérapie a permis d'obtenir d'excellents taux de réponse globale de 90 à 100 %, avec 60 à 100 % de réponse complète, dans des NHL nouvellement diagnostiqués (24). Cette efficacité a conduit à l'approbation en Europe et aux Etats-Unis, d'une nouvelle indication pour le Zevalin®, en consolidation après induction d'une rémission par une première ligne de traitement. Une dernière voie prometteuse pour le traitement des lymphomes est le ciblage d'autres antigènes que l'anti-CD20. Le CD22 est également hautement exprimé par les cellules malignes de lymphome B. L'anticorps humanisé epratuzumab anti-CD22 radiomarqué à l'<sup>90</sup>Y est actuellement en cours d'études cliniques avec des résultats très prometteurs. Cet anticorps pourrait alors être utilisé pour des patients n'exprimant par ou peu le CD20, ou non répondeur à l'anticorps froid anti-CD20 (rituximab) ou bien encore être utilisé en association à cet anticorps froid (11).

La RIT est également très prometteuse dans d'autres hémopathies malignes pour lesquelles des résultats encourageants ont été rapportés sur des modèles précliniques, ou dans des études cliniques pilotes. C'est effectivement le cas pour le myélome multiple, par ciblage de l'antigène CD138, de la leucémie aigüe myéloïde par ciblage du CD33 ou du CD45, ou encore de la leucémie aigüe lymphoïde avec l'anticorps anti-CD22 épratuzumab (11,24).

### **III.2. RIT des tumeurs solides**

Bien que la RIT ait montré tout son intérêt dans le traitement des lymphomes, son efficacité clinique reste très limitée dans les tumeurs solides, plus radiorésistantes et moins accessibles. Les réponses ayant pu être observées se limitent généralement à une stabilisation de la maladie ou à une réduction des biomarqueurs tumoraux. La raison principale de ces résultats très modestes est certainement l'index thérapeutique trop faible des anticorps radiomarqués (ratio tumeur/tissus sains insuffisant). En effet, injectés par voie systémique, les anticorps se distribuent via le compartiment sanguin, aussi bien dans la tumeur que dans les tissus sains, en particulier le foie et la moelle osseuse. Les toxicités pouvant limiter les doses injectées sont majoritairement les myélotoxicités de type thrombopénie et neutropénie. Cependant, quelques résultats prometteurs ont tout de même pu être obtenus dans des tumeurs présentant une forte expression antigénique et en utilisant des procédures de RIT en consolidation, en doses fractionnées, en combinaison avec de la chimiothérapie, ou par une approche de préciblage.

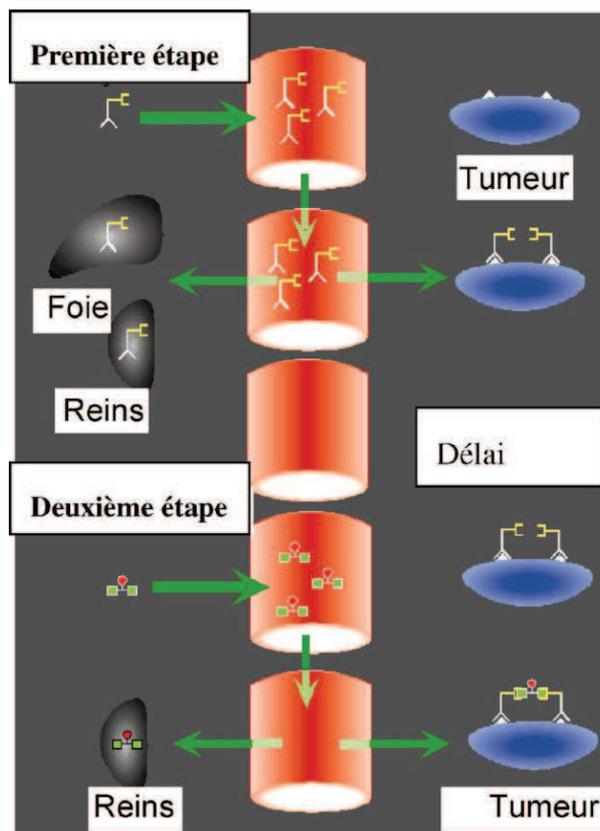
Une étude de RIT par l'anti-ACE <sup>131</sup>I-labetuzumab, en consolidation après résection chirurgicale de métastases hépatiques, dans le cancer colorectal métastatique, a en effet permis d'obtenir une survie à 5 ans de 51,3 %. Par comparaison à des groupes contrôles historiques et contemporains n'ayant pas bénéficié de la RIT, les auteurs ont conclu dans cette étude que la survie était améliorée par la RIT utilisée en adjuvant (29).

De bons résultats ont également été obtenus dans une étude de phase I sur le cancer du pancréas avec un protocole de RIT fractionnée, associé à de la gemcitabine comme agent radiosensibilisant. L'anticorps utilisé est le <sup>90</sup>Y-clivatuzumab tetraxetan administré les semaines 2, 3 et 4 par cycle de 4 semaines, la gemcitabine étant administrée toutes les semaines. Sur 38 patients inclus, 25 n'ont bénéficié que d'un seul cycle tandis que les 13 autres ont été traités pendant 1 à 3 cycles supplémentaires. L'activité maximale tolérée était de 444 MBq/m<sup>2</sup> par semaine sur le premier cycle puis inférieure à 333 MBq/m<sup>2</sup> sur les cycles suivants. Au total, 16 % des patients ont montré une réponse partielle et 42 % une stabilisation de leur maladie (30).

Une autre approche particulièrement intéressante pour la RIT des tumeurs solides est le préciblage dont l'objectif est d'améliorer les ratios tumeur/tissus sains par rapport au ciblage direct. Cette stratégie nécessite plusieurs étapes pour dissocier la phase de distribution des Ac (relativement lente) à l'administration d'un agent radiomarqué. Cette technique permet alors à l'Ac non radiomarqué, injecté dans un premier temps, d'aller s'accumuler dans la tumeur tout en évitant une irradiation non spécifique des tissus sains au cours de sa distribution. Après avoir atteint une accumulation maximale au sein de la tumeur et l'élimination partielle de l'Ac du milieu circulant, une deuxième molécule radiomarquée, de faible poids moléculaire et présentant une forte affinité pour l'anticorps, est ensuite injectée. Grâce à sa petite taille, cette deuxième molécule est rapidement distribuée, pénétrant rapidement au sein des tumeurs où elle va pouvoir se lier avec l'Ac prélocalisé. Par ailleurs, cette molécule radiomarquée est assez petite pour que les fractions non liées puissent être rapidement éliminées au niveau urinaire. Plusieurs stratégies ont été proposées pour effectuer ce préciblage, l'une d'elles est basée sur le système avidine-biotine, et l'autre qui nous intéressera plus particulièrement est basée sur le système AES (affinity enhancement system) qui utilise un anticorps bispécifique et un haptène bivalent (31).

Plusieurs approches reposant sur le système avidine-biotine ont été proposées. L'une d'elles par exemple, consiste à injecter successivement un complexe Ac-streptavidine puis de la biotine marquée. Une étape de chasse, entre l'injection de l'anticorps et celle de la biotine marquée, est réalisée par injection d'albumine biotinylée permettant d'éliminer rapidement les complexes Ac-streptavidine circulants. Ce schéma en 3 temps a été expérimenté en clinique avec des résultats positifs permettant d'obtenir des ratios tumeurs/moelle de 63:1, en comparaison au ratio de 6:1 rapporté précédemment en RIT conventionnelle (32). Cependant, le caractère immunogène de la streptavidine et la complexité des protocoles de chasse rendent difficile leur utilisation en clinique. L'approche de préciblage AES, en deux étapes, semble plus simple à réaliser en pratique.

Le principe du système AES repose sur l'administration dans un premier temps d'un anticorps bispécifique anti-Ag/anti-haptène, suivi après un certain délai, de l'injection d'un haptène bivalent radiomarqué (*Figure 5*). Tout l'intérêt de ce système réside alors sur ces haptènes bivalents capables de se fixer à deux anticorps prélocalisés au sein de la tumeur. La coopérativité de cette double fixation doit alors permettre d'augmenter la stabilité des complexes formés, pour augmenter le temps de résidence de l'haptène radiomarqué dans la tumeur. A l'inverse la liaison de l'haptène à l'anticorps résiduel éventuellement présent dans la circulation sanguine reste réversible, permettant une élimination rapide de l'excès d'haptène, d'où le nom d'*affinity enhancement system* (AES).



**Figure 5 :** Représentation schématique du principe du système AES, d'après Barbet et al. (33)

L'AES a tout d'abord été utilisé en clinique pour l'immunoscintigraphie des tumeurs exprimant l'ACE et a montré la possibilité d'une imagerie diagnostique sensible et spécifique dans les cancers colorectaux, certains cancers pulmonaires et le cancer médullaire de la thyroïde avec un anticorps anti-ACE/anti-DTPA-In, marqué à l' $^{111}\text{In}$  (34–36). Une étude clinique de RIT dans le cancer du poumon à petites cellules a ensuite été réalisée avec le même Ac et le même haptène bivalent, mais cette fois-ci marqué à l' $^{131}\text{I}$ . Sur les 12 patients évalués, 2 réponses partielles ont été obtenues (dont un patient avec une réponse quasiment complète pendant 3 mois), et 1 stabilisation de plus de 24 mois (37).

D'autres études cliniques ont été réalisées par la suite avec le même système dans le carcinome médullaire de la thyroïde (CMT), tumeur radorésistante mais exprimant intensément l'Ag ACE. Après avoir obtenu d'encourageants premiers résultats cliniques, une étude de phase II multicentrique a été menée chez des patients atteints du CMT en progression. Cette étude réalisée sur 42 patients a permis d'observer un contrôle de la maladie (stabilisation et réponse objective) pour 32 patients (72,6 %) incluant une réponse complète d'au moins 40 mois pour un patient et une stabilisation durable de la maladie ( $\geq 6$  mois) pour 31 patients (38).

Ce premier système basé sur l'haptène di-DTPA-In ne peut être marqué qu'à l'indium ou à l'iode (sur le peptide tyrosyl-lysine faisant le lien entre les 2 DTPA). D'autres haptènes bivalents ont alors été développés sur la base de l'haptène histamine-succinyl-glycine (HSG) et pouvant être marqués par d'autres radiométaux. C'est le cas par exemple de l'haptène IMP288, fonctionnalisé par

un DOTA. Cet haptène est utilisé en combinaison avec un anticorps bispécifique trivalent (cf § II.3.5, p.22), anti-ACE/anti-HSG, le TF2, qui présente deux valences pour l'Ag tumoral ACE et une valence pour l'haptène HSG. Une première étude clinique d'optimisation a été réalisée avec l'Ac TF2 et l'haptène IMP288 marqué au  $^{177}\text{Lu}$ . Des doses de 2,5 à 7,4 GBq ont été injectées avec une assez bonne tolérance permettant un ciblage spécifique et rapide de la tumeur (39). Actuellement deux études cliniques de phase I sont en cours en France avec l'Ac TF2 et le  $^{177}\text{Lu}$ -IMP288 (une injection) dans le cancer du poumon métastatique exprimant l'ACE, et avec l' $^{90}\text{Y}$ -IMP288 (injection fractionnée) dans le cancer colorectal métastatique (40,41).

### **III.3. Limites de la RIT pour les tumeurs solides et intérêt des liposomes**

Comme nous avons pu le voir, si l'efficacité de la RIT n'est plus à démontrer dans le traitement des tumeurs malignes hématologiques, notamment le lymphome, son intérêt reste très modeste dans les tumeurs solides. L'index thérapeutique de la RIT par ciblage direct, est en effet trop faible dans le cas des tumeurs solides, et constitue le principal problème. Le préciblage utilisant le système AES, a permis d'améliorer considérablement les ratios tumeurs/tissus sains et a montré d'encourageants résultats. Cette technique, qui nécessite néanmoins de devoir optimiser les quantités d'anticorps injectées, les quantités d'haptène bivalent injectées et le délai entre ces deux injections, peut encore présenter une certaine limite : l'activité spécifique (AS) de l'haptène. En effet, il est inutile d'injecter plus d'haptènes radiomarqués qu'il ne reste d'Ac dans l'organisme. Les quantités d'anticorps injectées doivent rester raisonnablement faibles pour limiter l'immunogénicité et le risque de réactions allergiques, et il est également inutile d'injecter plus d'anticorps qu'il ne le faut pour saturer la tumeur. Par ailleurs les rapports molaires optimum Ac/haptène sont généralement de 10 à 50 molécules d'anticorps pour 1 molécule d'haptène, bien qu'il soit possible d'utiliser des rapports aussi faibles que 2 pour 1 (33). Cela implique tout de même que la quantité molaire d'haptène à injecter soit relativement faible, et qu'elle doit en même temps être capable de vectoriser des quantités importantes de radioactivité, ce qui implique d'avoir des activités spécifiques relativement élevées. En fonction du radionucléide utilisé, de la technique de marquage, cette activité spécifique peut être limitante (42). Un exemple est l'étude préclinique de Schoffelen *et al.* sur un modèle murin de cancer colique avec l'Ac TF2 et l'IMP288 marqué au  $^{177}\text{Lu}$ . Les doses molaires optimales dans cette étude étaient de 5 nmol de TF2 pour 0,28 nmol d'haptène maximal à injecter. L'activité spécifique maximale du  $^{177}\text{Lu}$  étant de 90 MBq/nmol, il n'était donc pas possible d'injecter plus de 25 MBq par souris, ce qui était bien en dessous de la dose maximale tolérée (43).

Le développement de la RIT doit passer par l'optimisation des techniques de préciblage et l'augmentation de la dose délivrée à la tumeur afin de pouvoir traiter les tumeurs solides les plus résistantes. Pour cela, le développement d'une vectorisation d'agents radioactifs à haute activité spécifique est essentiel et semble réalisable avec l'utilisation de liposomes radiomarqués. Les liposomes permettent en effet l'encapsulation d'un grand nombre de noyaux radioactifs à l'intérieur des vésicules et peuvent également être radiomarqués en surface au niveau de la bicouche lipidique. Le principal intérêt des liposomes serait alors ici de véhiculer des activités spécifiques supérieures aux Ac ou aux haptènes radiomarqués, ce qui devrait permettre d'augmenter les doses délivrées aux cellules tumorales. Par ailleurs, le marquage par encapsulation de petites molécules radiomarquées hydrosolubles, devrait également permettre, après métabolisation des liposomes, une élimination rapide de la radioactivité afin de limiter l'irradiation non spécifique. Enfin, un troisième avantage attendu avec des liposomes immunospécifiques serait l'augmentation de l'avidité du fait de la multiplicité des liaisons liposomes/cellules cibles.

La suite de cette première partie bibliographique portera alors sur une présentation générale des liposomes, avec leurs modes de préparation et leurs principales utilisations cliniques, avant de passer à l'étude expérimentale proposant des liposomes fonctionnalisés et radiomarqués comme outil d'optimisation de la RIT des tumeurs solides, en utilisant un système de préciblage en deux temps.

# ***GENERALITES SUR LES LIPOSOMES***

---

## **I. HISTORIQUE**

L'origine du mot « liposome » vient du grec « lipo » = « gras » et « soma » = « corps ». Les liposomes sont en effet des vésicules formées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques. Ces vésicules ont été décrites pour la première fois en 1961 par l'hématologue Alec Douglas Bangham à Cambridge, lors de l'essai d'un nouveau microscope électronique, avec l'observation de phospholipides (44). La ressemblance avec les membranes plasmiques était évidente, et ces images microscopiques ont alors constitué la première preuve que les membranes cellulaires étaient formées de bicouches lipidiques.

Les liposomes ont alors tout d'abord été utilisés comme modèles d'étude des membranes cellulaires notamment pour l'étude de la perméabilité cellulaire (45). On retrouve encore aujourd'hui ces applications biochimiques et biophysiques avec par exemple l'étude des étapes de fusion membranaire (46).

De par leur nature non toxique et biodégradable, les liposomes ont rapidement été proposés comme vecteurs de substances médicamenteuses (47). Les premiers essais ne furent malheureusement pas à la hauteur des espérances de part leur faible durée de vie après injection intraveineuse liée à la reconnaissance par le système réticulo-endothélial ou après administration entérale liée à la destruction par les sels biliaires et les lipases pancréatiques. De considérables progrès galéniques et techniques ont été réalisés avec l'arrivée des liposomes « furtifs », des immunoliposomes, des liposomes cationiques et leur applications médicales sont maintenant nombreuses que ce soit en thérapeutique (anticancéreuse, anti-infectieuse...), en thérapie génique (transfection génique avec les lipoplexes), comme support vaccinal (virosoles), ou encore en imagerie (agents de contraste).

Mais les applications actuelles des liposomes sont très variées dans des secteurs aussi différents que l'agroalimentaire (encapsulation de compléments alimentaires, nutriments, vitamines, enzymes, conservateurs antibactérien...) (48), l'industrie textile (lavage, blanchiment, coloration ...) (49), la cosmétologie (produits anti-âge, maquillage, protections solaires...) et bien évidemment la pharmacie.

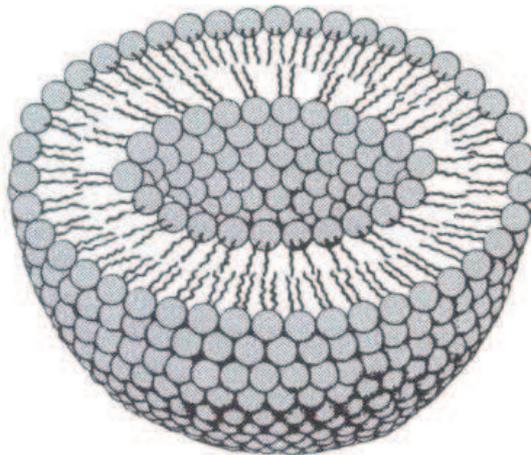
## II. STRUCTURE ET COMPOSITION DES LIPOSOMES

### II.1. Définition

Les liposomes sont des petites vésicules artificielles sphériques, d'une vingtaine de nanomètres à quelques micromètres de diamètre, constituées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques organisées entre deux compartiments aqueux.

Ces bicouches lipidiques sont majoritairement constituées de phospholipides. Les phospholipides sont des molécules amphiphiles possédant une tête polaire et une queue apolaire. Les liposomes résultent alors de l'organisation spontanée des phospholipides en milieu aqueux en bicouches lipidiques. Les interactions hydrophobes avec l'eau repoussent les queues apolaires au centre de la bicouche tandis que les têtes polaires s'exposent, au contraire, au milieu aqueux. Les bicouches lipidiques ainsi formées se referment sur elles mêmes, internalisant un compartiment aqueux et formant ce qu'on appelle un liposome.

Leur intérêt réside principalement dans la possibilité de vectoriser des molécules de solubilité très différente (hydrophile, amphiphile, lipophile) soit par inclusion dans la membrane lipidique, soit par encapsulation dans l'espace interne aqueux.



**Figure 6** : Structure d'un liposome formé d'une bicouche de phospholipides (<http://www.thehormoneshop.net/liposomes.htm>)

## II.2. Classification des liposomes

L'hydratation des phospholipides en milieu aqueux conduit à la formation de liposomes de différentes tailles et différentes morphologies en fonction de la méthode de préparation utilisée. Les liposomes sont généralement classés en fonction de leur taille et de leur lamellarité (nombre de bicouches lipidiques) (50,51).

On distingue alors les vésicules unilamellaires constituées d'une seule bicouche lipidique et les vésicules multilamellaires. Parmi les multilamellaires, sont différenciées les vésicules à plusieurs bicouches lipidiques concentriques, appelées MLV (multilamellar vesicles) de diamètre supérieur à 0,5  $\mu\text{m}$  ; et les vésicules contenant plusieurs bicouches lipidiques non concentriques appelées MVV (multivesicular vesicles) généralement supérieures à 1  $\mu\text{m}$ .

Parmi les vésicules unilamellaires on distingue celles de petite taille entre 0,02  $\mu\text{m}$  et 0,1  $\mu\text{m}$  appelées SUV (small unilamellar vesicles) et celles supérieures à 0,1  $\mu\text{m}$  appelées LUV (large unilamellar vesicles).

Cette classification est reprise dans le *Tableau 3* ci-dessous :

Type	SUV	LUV	MLV	MVV
Morphologie				
Taille ( $\mu\text{m}$ )	0,02 - 0,1	> 0,1	> 0,5	> 1

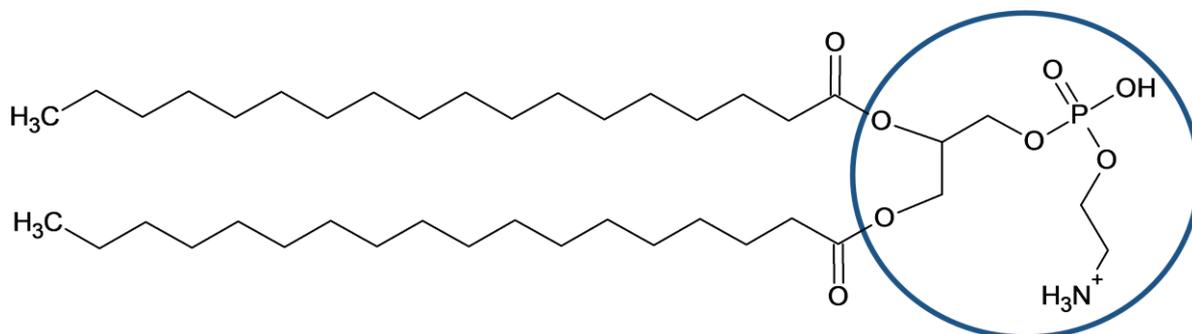
*Tableau 3: Classification des liposomes selon leur taille et leur lamellarité*

## II.3. Composition des liposomes

### II.3.1. Les phospholipides

Les phospholipides représentent le constituant majeur et indispensable à la formation de liposomes. Les phospholipides font partie des glycérolipides, lipides majoritairement présents dans les membranes biologiques. Les glycérolipides comportent un squelette glycérol central sur lequel deux fonctions hydroxyles sont estérifiées par des chaînes d'acides gras, formant la zone hydrophobe apolaire. Lorsque la troisième fonction hydroxyle présente un groupement phosphate on parle alors de phospholipide. Ce groupement phosphate est lui-même estérifié par d'autres groupements formant la

tête hydrophile polaire du phospholipide (*Figure 7*). Les principaux groupements sont présentés dans le *Tableau 4*, les deux groupements les plus fréquemment retrouvés dans les membranes biologiques sont la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine (52).



**Figure 7 :** Formule chimique d'un phospholipide, exemple de la distéaroyl phosphatidyléthanolamine (DSPE) – La tête hydrophile polaire est entourée d'un cercle bleu.

Ethanolamine		Choline	
Glycérol		Inositol	
Sérine			

**Tableau 4 :** Principaux groupements polaires estérifiés sur le phosphate des phospholipides (estérification sur l'hydroxyle en rouge)

Le choix des phospholipides utilisés va influencer les caractéristiques des liposomes. Les propriétés des phospholipides vont être à la fois dictées par la nature des chaînes d'acide gras et du groupement constituant la tête polaire.

En fonction du phospholipide choisi, la tête polaire sera chargée ou non. La présence de charges de surface permet de limiter les phénomènes d'agrégation des liposomes entre eux. La charge électrique des bicouches lipidiques entraîne en effet des phénomènes de répulsion électrostatique. La nature du groupement polaire va également permettre ou non de modifier les phospholipides avec d'autres molécules, généralement grâce à une amidification sur une fonction amine. Ces modifications vont permettre notamment de rendre les liposomes « furtifs » grâce au couplage de chaînes de polyéthylène glycol, de fonctionnaliser les liposomes avec des cages chélatantes permettant leur radiomarquage de surface, ou encore de les rendre immunosécifiques avec par exemple le couplage d'anticorps, de peptides ou d'haptènes.

Les acides gras diffèrent par la longueur de leur chaîne carbonée ainsi que par leur nombre d'insaturations. Les phospholipides présents au niveau des membranes biologiques portent des acides gras généralement composés de 16 à 18 carbones. La longueur de la chaîne carbonée va influencer la rigidité membranaire des bicouches lipidiques tout comme le nombre d'insaturations. En effet ces deux paramètres caractérisant les acides gras vont directement influencer les propriétés des phospholipides et notamment leur température de transition de phase ( $T_m$ ).

La température de transition de phase des phospholipides est la température à partir de laquelle les phospholipides passent d'une phase « gel » à une phase « fluide ». La phase « gel » est une configuration solide des phospholipides où les chaînes lipidiques sont ordonnées, parallèles entre elles et peu mobiles. En phase « fluide » la configuration des phospholipides est plus désordonnée et les chaînes hydrophobes sont animées de mouvements plus ou moins pendulaires. Comme le montre le *Tableau 5* avec quelques exemples de phospholipides (53), la  $T_m$  augmente avec le nombre de carbones de la chaîne d'acide gras mais diminue considérablement avec le nombre d'insaturations. La  $T_m$  va donc fortement influencer la rigidité et la fluidité de la bicouche lipidique. Les liposomes seront d'autant plus rigides et stables que la  $T_m$  des phospholipides sera élevée et au contraire une  $T_m$  faible conduira à des liposomes dont la membrane sera beaucoup plus fluide et perméable.

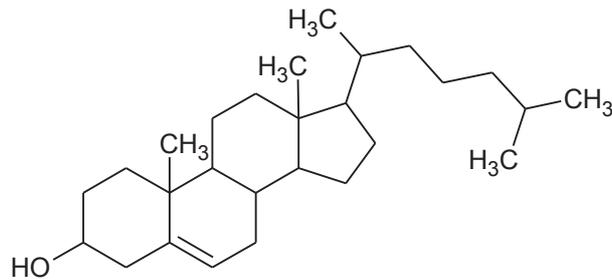
Lipide	Abréviation	carbones/ insaturations	$T_m$ (°C)
Dimyristoyl phosphatidylcholine	DMPC	14 : 0	23
Dipalmitoyl phosphatidylcholine	DPPC	16 : 0	41
Distéaroyl phosphatidylcholine	DSPC	18 : 0	58
Dioleoyl phosphatidylcholine	DOPC	18 : 1	- 22
Dimyristoyl phosphatidyléthanolamine	DMPE	14 : 0	40
Dipalmitoyl phosphatidyléthanolamine	DPPE	16 : 0	60
Distéaroyl phosphatidyléthanolamine	DSPE	18 : 0	74
Dioleoyl phosphatidyléthanolamine	DOPE	18 : 1	- 16

**Tableau 5 :** Exemple de phospholipides synthétiques neutres avec leur température de transition de phase ( $T_m$ ) et le nombre de carbones et d'insaturations des chaînes d'acide gras

### II.3.2. Le cholestérol

Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols que l'on retrouve à l'état naturel dans les membranes biologiques du monde animal. Le cholestérol n'est pas un constituant indispensable à la formation des liposomes mais il contribue à la stabilité des liposomes *in vitro* et *in vivo* (54–56).

La molécule de cholestérol (*Figure 8*) s'oriente dans la bicouche lipidique entre les molécules de phospholipides avec son groupe hydroxyle tourné vers la phase aqueuse et le cœur polycyclique inséré entre les premiers atomes de carbone des chaînes hydrocarbonées des acides gras.



**Figure 8 :** Formule chimique de la molécule de cholestérol

Le cholestérol permet ainsi d'augmenter la fluidité des membranes lorsque la température est inférieure à la  $T_m$  des liposomes. Au contraire, lorsque la température est supérieure à la  $T_m$ , il augmente la rigidité des membranes en limitant les mouvements des phospholipides au sein de la bicouche (52,57). Le cholestérol permet également de réduire la perméabilité des membranes pour les molécules hydrosolubles et d'augmenter la stabilité des liposomes dans les fluides biologiques. Les liposomes sans cholestérol ont tendance à interagir avec les protéines sanguines comme l'albumine, la transferrine et les macroglobulines qui déstabilisent les membranes (52). Le cholestérol est alors ajouté dans une proportion d'environ 30 % par rapport à la quantité de lipides totaux pour augmenter la stabilité des liposomes (53).

### II.3.3. Les lipides pégylés

Le polyéthylène glycol (PEG) est un autre composant fréquemment retrouvé dans la formulation des liposomes. Ces chaînes de PEG ne font pas partie intégrante de la bicouche des liposomes mais sont inclus dans les liposomes sous la forme de lipides pégylés, couplés de façon covalente aux phospholipides comme la phosphatidyléthanolamine (58) ou au cholestérol (59).

Ces chaînes de PEG sont des polymères polyéther inertes, solubles dans les milieux aqueux et organiques, non toxiques, et très faiblement immunogènes. La pégylation est une stratégie largement utilisée pour améliorer la distribution *in vivo* de certaines molécules (60,61). L'utilisation de tels polymères dans la formulation des liposomes a pour principal objectif d'améliorer leur temps de circulation *in vivo* (62). Les chaînes de PEG forment en effet une sorte de capsule hydrophile autour des liposomes, permettant d'une part d'éviter l'agrégation des vésicules entre elles, mais aussi de les protéger de l'interaction avec les protéines plasmatiques et de l'adsorption d'opsonines à leur surface, afin d'éviter leur capture par le système réticulo-endothélial. Les liposomes pégylés (Stealth<sup>®</sup> liposomes) présentent ainsi des demi-vies sanguines augmentées, une clairance plasmatique et un volume de distribution diminués par rapport à des liposomes dits conventionnels (60).

### **III. DEVENIR *IN VIVO* DES LIPOSOMES**

Le devenir des liposomes dans l'organisme et de leur contenu ne dépend pas uniquement de leur composition et de leurs caractéristiques structurales mais est également étroitement lié au milieu biologique auquel ils sont confrontés. En effet, avant d'atteindre leur cible, les liposomes et leur contenu vont subir un certain nombre d'interactions et vont devoir franchir un certain nombre d'obstacles. Le potentiel thérapeutique de ces formulations sera alors directement lié à leur comportement et à leur stabilité *in vivo*, c'est pourquoi il est indispensable de connaître la pharmacocinétique et la biodistribution des liposomes après leur administration par voie parentérale.

#### **III.1. Pharmacocinétique des liposomes**

Dans le compartiment sanguin, les liposomes peuvent être facilement déstabilisés par leurs interactions avec les protéines plasmatiques, les lipoprotéines, et les cellules sanguines. Les interactions avec les lipoprotéines plasmatiques consistent essentiellement à des échanges de phospholipides avec les lipoprotéines de haute densité (HDL) entraînant des fuites plus ou moins rapides du principe actif encapsulé. Les liposomes peuvent également interagir avec les membranes plasmatiques des cellules sanguines essentiellement par des mécanismes de fusion ou de transfert de phospholipides, à l'origine d'une déstabilisation des vésicules, et d'une augmentation de leur clairance.

Après administration intraveineuse, les liposomes sont essentiellement capturés par les cellules du système réticulo-endothélial (SRE) ou système phagocytaire mononucléé (SPM) et sont ainsi rapidement éliminés de la circulation sanguine par les macrophages. La capture et l'élimination des liposomes par les macrophages est un phénomène très rapide, qui se compte en minutes, après administration intraveineuse de doses non saturantes. Elle se fait principalement au niveau hépatique par les cellules de Küpffer (macrophages présents au niveau des endothéliums hépatiques), puis par les macrophages au niveau splénique et médullaire quand les doses importantes de liposomes ont entraîné une saturation hépatique (63).

L'élimination des liposomes dépend également de leur taille et de leur charge. Ils sont d'autant plus rapidement éliminés que leur diamètre est grand (58), et sont préférentiellement éliminés au niveau splénique pour les liposomes supérieurs à 300  $\mu\text{m}$  de diamètre (64). De même, les liposomes chargés négativement sont éliminés plus rapidement que les liposomes neutres ou cationiques (65).

L'élimination des liposomes par le SRE est médiée par l'interaction des liposomes avec des protéines plasmatiques appelées opsonines. Ces opsonines s'adsorbent en effet à la surface des liposomes et vont permettre leur reconnaissance par les cellules du SRE. Les opsonines impliquées dans l'élimination des liposomes sont des immunoglobulines, la fibronectine, la  $\beta$ 2-glycoprotéine, la protéine C-réactive et la  $\beta$ 2-macroglobuline (66).

Dans l'objectif de diminuer cette adsorption protéique, et donc d'augmenter les temps de circulation des liposomes, le concept de stabilisation stérique a été développé, avec la pégylation des liposomes (60–63,67). L'utilisation de lipides pégylés (cf. § II.3.3 p.40) dans la formulation des liposomes permet de créer une sorte de capsule autour des liposomes, entraînant la répulsion stérique des opsonines et autres protéines plasmatiques. Cette répulsion stérique est directement proportionnelle au degré de polymérisation des chaînes de PEG (longueur des chaînes) et à leur densité à la surface des liposomes, jusqu'à un pourcentage molaire d'environ 5 mol% de PEG 5000 (58). La pégylation des liposomes entraîne alors l'augmentation de leur demi-vie sanguine d'environ 1 h avec des liposomes conventionnels à plus de 20 h par exemple chez la souris avec des liposomes de 100 nm contenant 6 mol% de PEG 1900 (67).

## **III.2. Biodistribution des liposomes**

Nous avons vu que les liposomes conventionnels étaient très rapidement éliminés de la circulation sanguine par les macrophages, et qu'ils étaient ainsi captés au niveau des organes du SRE, c'est-à-dire essentiellement par le foie, la rate et la moelle osseuse où ils sont dégradés par phagocytose. Les liposomes pégylés, présentent quant à eux des temps de circulation prolongés dans le sang leur permettant de se distribuer de manière intacte. Le ciblage des liposomes vers les cellules cibles nécessite en effet le passage des liposomes du secteur sanguin vers le secteur tissulaire. La distribution des liposomes dans l'organisme est toutefois limitée par leur diamètre, et par la nature des capillaires sanguins dans lesquels ils circulent.

### **III.2.1. Les différents types d'endothéliums vasculaires**

Il existe trois types d'endothéliums vasculaires auxquels peuvent être confrontés les liposomes : les capillaires continus, fenestrés et discontinus sinusoidaux. Les capillaires de type continu sont constitués d'une monocouche de cellules jointives, réunies par des jonctions serrées et d'une membrane basale elle-même continue. Ces capillaires retrouvés dans la très grande majorité des tissus, muscles lisses et striés, cerveau, cœur, poumon et peau, s'opposent au transfert passif des liposomes (68).

Les capillaires de type fenestré, à la différence des capillaires continus, possèdent de nombreuses fenestrations ou « pores » de 30 à 80 nm de diamètre. Ces fenêtres sont fermées par un mince diaphragme excepté pour certains organes, et en particulier le rein, où son absence permet le passage de petites SUV.

Les capillaires discontinus sinusoïdaux sont les plus favorables à l'extravasation des liposomes dans les tissus. En effet ces capillaires sont caractérisés par l'absence de jonctions intercellulaires et de membrane basale, laissant place à de multiples pores de 100 à 500 nm. Ces capillaires sont rencontrés dans le foie, la rate, et la moelle osseuse.

De ce fait, en situation physiologique, les liposomes sont retrouvés majoritairement dans le foie, la rate et la moelle osseuse, par accumulation passive après l'extravasation des capillaires discontinus, mais également après capture par les macrophages du SRE.

### **III.2.2. L'effet EPR (enhanced permeability and retention)**

En situation pathologique, les liposomes s'accumulent également au niveau des sites infectieux, inflammatoires ou tumoraux. Cette accumulation s'explique par des modifications de la vascularisation survenant en situation pathologique, notamment par l'augmentation de la perméabilité vasculaire. L'accumulation tumorale de liposomes (avec des temps de circulation prolongés) est expliquée par un phénomène appelé "EPR-effect" pour « Enhanced Permeability and Retention effect ». L'effet EPR a initialement été découvert et décrit par Matsumara et Maeda en 1986 (69). Ces auteurs ont montré l'accumulation tumorale de la macromolécule SMANCS : neocarzinostatine (NCS) conjuguée à un copolymère de styrène/acide maléique (SMA).

L'effet EPR concerne les macromolécules et permet un ciblage spécifique des tissus tumoraux. Cet effet s'explique par les différences anatomiques et physiopathologiques de la vascularisation tumorale par rapport aux tissus sains (12,70). Les tissus tumoraux sont en effet caractérisés par :

- une hypervascularisation avec une forte angiogenèse,
- l'absence de muscles lisses empêchant l'effet vasoconstricteur de l'angiotensine, et facilitant l'extravasation des vaisseaux tumoraux sous un état hypertendu,
- une architecture vasculaire irrégulière avec de larges fenestrations,
- un flux sanguin anarchique sans direction constante,
- une clairance lymphatique diminuée et un faible retour veineux entraînant la rétention et l'accumulation accrue des macromolécules et des particules lipidiques dans le tissu interstitiel tumoral.

A l'exception de quelques tumeurs (comme le gliome par exemple), la majorité sont angiogéniques donnant lieu à l'effet EPR. L'effet EPR permet alors aux liposomes présentant une circulation sanguine prolongée de s'extravaser de la circulation sanguine pour s'accumuler dans les tissus tumoraux et d'y être retenus. De la même manière les liposomes peuvent s'accumuler au niveau

de sites inflammatoires ou infectieux. En effet, l'inflammation est caractérisée par une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire. La seule différence étant la durée de rétention, car dans les tissus sains où apparaît un processus inflammatoire, celui-ci n'est que transitoire et le système de drainage lymphatique est toujours opérationnel.

Le principe de l'effet EPR est maintenant largement accepté comme principe de ciblage tumoral, avec le développement de molécules nanoparticulaires pour le traitement des cancers, c'est ce que l'on appelle le ciblage passif (71).

### **III.3. Interactions liposomes/cellules**

L'objectif de la vectorisation de principes actifs par des liposomes est d'aller délivrer leur contenu aux cellules cibles. Quatre mécanismes différents d'interaction des liposomes avec les cellules peuvent être décrits. Le mécanisme mis en jeu dépend des caractéristiques des liposomes (telles que leur composition, leur taille, leur charge, ou la présence de dispositif de ciblage), mais aussi du type de cellule et du milieu environnant.

Les liposomes peuvent tout d'abord libérer leur contenu dans le milieu extracellulaire, qui pourra ensuite pénétrer à l'intérieur des cellules par transport actif ou passif.

Les liposomes peuvent aussi délivrer des molécules par transfert de molécules lipophiles, de la bicouche liposomale à la membrane plasmique, après adsorption des liposomes sur les cellules (72). Dans certaines circonstances, des molécules hydrosolubles encapsulées dans la phase aqueuse peuvent aussi être transférées par ce mécanisme. La composition de la membrane liposomale et les caractéristiques physico-chimiques des molécules transférées jouent un rôle important dans ce mécanisme d'échange après adsorption (73).

Les liposomes peuvent encore interagir avec les cellules par endocytose. L'internalisation des liposomes par endocytose est ensuite suivie de la dégradation des liposomes et de la libération de leur contenu dans le milieu intracellulaire. L'endocytose et la phagocytose, souvent médiées par des récepteurs telles que les opsonines, sont des mécanismes fréquemment impliqués avec les macrophages du foie et de la rate mais aussi les hépatocytes.

Le dernier mécanisme impliqué est le phénomène de fusion membranaire entre la membrane liposomale et la membrane cellulaire entraînant la libération du contenu des liposomes en intracellulaire. Ce phénomène implique cependant la présence de protéines de fusion analogues à celles présentes à la surface des virus. De nombreux travaux ont d'ailleurs conduit à combiner les propriétés fusiogènes des virus aux liposomes, conduisant à la formation de virosomes, des liposomes présentant à leur surface des protéines virales de fusion (74).

De nombreux efforts ont été fournis pour cibler les liposomes de manière spécifique sur les tissus ou cellules cibles afin d'améliorer leur biodistribution et leur interaction avec les cellules. Pour améliorer leurs propriétés de ciblage, une variété de ligands spécifiques ont été couplés à leur surface dont des peptides, des anticorps ou fragments d'anticorps (75–78). De nombreuses études montrent de très bonnes propriétés de ciblage spécifique *in vitro*, mais *in vivo* les résultats de ciblage spécifique ne sont pas spectaculaires, de part un ciblage passif déjà naturellement élevé. Néanmoins, l'un des principaux avantages des liposomes ciblés spécifiquement est l'augmentation de leurs interactions avec les cellules cibles une fois localisés au sein de la tumeur (79). Cette interaction accrue avec les cellules cibles se traduit généralement par l'internalisation des liposomes par endocytose.

# ***METHODES DE PREPARATION DES LIPOSOMES***

---

## **I. METHODES CONVENTIONNELLES**

Diverses méthodes dites « conventionnelles » ont été utilisées pour la préparation des liposomes. Toutes ces méthodes reposent sur la combinaison de lipides avec une phase aqueuse. On trouve parmi celles-ci la traditionnelle méthode de Bangham, l'évaporation en phase inverse, ou encore l'injection d'éthanol pour n'en citer que trois. Les méthodes conventionnelles impliquent en général la solubilisation des lipides dans un solvant organique avant leur dispersion dans la phase aqueuse. La plupart de ces méthodes conventionnelles nécessitent également l'utilisation de procédés de post-formation, afin notamment de réduire et d'homogénéiser la taille des liposomes, d'éliminer d'éventuels solvants résiduels, ou encore d'augmenter les taux d'encapsulation.

### **I.1. Méthode de Bangham, hydratation d'un film lipidique**

La méthode de Bangham (2) est une des méthodes les plus largement utilisées. Il s'agit d'une méthode simple et facile à mettre en œuvre. Cette méthode consiste dans un premier temps à solubiliser les lipides dans un solvant organique qui sera évaporé sous vide jusqu'à la formation d'un film lipidique sur les parois d'un ballon. Ce film lipidique est ensuite hydraté par l'ajout de la phase aqueuse sous agitation et à une température supérieure à la température de transition de phase des lipides. Une population hétérogène de MLV de grande taille est alors obtenue (54) avec des taux d'encapsulation qui restent faibles.

### **I.2. Evaporation en phase inverse**

La méthode d'évaporation en phase inverse ou REV (reverse phase evaporation) consiste à hydrater les lipides directement dans le solvant organique. La phase aqueuse est en effet ajoutée directement (en faible proportion) à la solution organique de lipides. Une étape de sonication permet ensuite d'obtenir une émulsion eau dans huile dans laquelle les phospholipides sont organisés en

micelles inverses entourant des compartiments aqueux. L'évaporation du solvant sous pression réduite conduit à l'obtention d'un gel visqueux puis à la destruction de certaines micelles libérant leur phase aqueuse et un excès de lipides. Dans ce nouvel environnement polaire, l'excès de lipide s'organise autour des micelles restantes pour former les liposomes (55). Les vésicules obtenues forment une population hétérogène de vésicules de grande taille multilamellaires ou non mais ont l'avantage d'avoir un volume encapsulé quatre fois plus important que par la méthode de Bangham et surtout de présenter des taux d'encapsulation allant jusqu'à 65% (55). L'inconvénient de cette méthode est la dénaturation possible des protéines par les solvants organiques si l'on choisit d'encapsuler de telles molécules par cette méthode.

### **I.3. Injection d'une solution éthanolique / infusion d'éther**

Ces deux méthodes reposent sur la dispersion d'une solution organique de phospholipides dans une phase aqueuse.

L'injection d'une solution éthanolique de phospholipides dans une solution aqueuse conduit à la formation spontanée de liposomes. Le diamètre des vésicules dépend de divers paramètres : la concentration des phospholipides dissouts, la vitesse d'injection et la vitesse d'agitation (80). Les vésicules obtenues sont alors des SUV ou des LUV en fonction des conditions expérimentales. Les taux d'encapsulation sont cependant peu élevés.

L'infusion d'éther introduite par Deamer et Bangham en 1976 (81) repose sur le même principe. Les phospholipides solubilisés dans l'éther sont injectés dans la phase aqueuse. L'éther est ensuite éliminé par évaporation sous vide conduisant à la formation de LUV. Bien que le volume encapsulé soit relativement important, les taux d'encapsulation restent peu élevés.

### **I.4. Dispersion de micelles mixtes**

Des LUV peuvent également être obtenues par une méthode impliquant la formation de micelles mixtes après solubilisation des phospholipides en milieu aqueux à l'aide d'un détergent. Le détergent est éliminé dans un deuxième temps par dialyse, chromatographie d'exclusion diffusion ou par absorption sur des résines hydrophobes (53). Lorsque le détergent est éliminé, les micelles fusionnent entre elles et les phospholipides adoptent une configuration en bicouche ce qui forme les liposomes. Ces méthodes sont souvent longues avec des taux d'encapsulation généralement bas.

## I.5. Méthode de la double émulsion

Dans cette méthode, un faible volume de phase aqueuse est tout d'abord ajouté à une solution organique de phospholipides. L'agitation de ce mélange conduit à la formation d'une émulsion eau dans huile, les phospholipides étant organisés en micelles inverses autour des compartiments aqueux. Un grand volume de phase aqueuse est alors ajouté, permettant d'obtenir après agitation une double émulsion eau dans huile dans eau. Les phospholipides s'organisent également autour des gouttes organiques, l'ensemble formant des cœurs aqueux entourés de 2 monocouches de phospholipides séparées d'un film organique. Le solvant organique est ensuite éliminé par l'application d'un courant d'azote, laissant place à une suspension de SUV avec un taux d'encapsulation élevé (82).

## I.6. Procédés de post-formation

Les méthodes conventionnelles nécessitent fréquemment des procédés dits de « post-formation » permettant notamment de calibrer la taille des liposomes (homogénéisation et réduction du diamètre), diminuer la lamellarité des liposomes, éliminer les traces de solvants résiduels, ou encore augmenter les taux d'encapsulation.

### I.6.1. Modification de la taille et de la lamellarité

**La sonication** (83) peut être utilisée pour obtenir des SUV à partir de MLV, la taille moyenne des SUV obtenues et leur distribution dépendant de la composition et de la concentration en lipides, de la durée, de la température ainsi que de la puissance des ultrasons durant la sonication.

**L'extrusion** (84) qui consiste à forcer une suspension liposomale à travers des membranes de polycarbonate de porosité bien définie permet d'obtenir à partir de MLV une suspension de SUV relativement homogène et dont le diamètre est proche de la porosité des membranes utilisées.

Des SUV peuvent encore être obtenues à partir de MLV en utilisant un Microfluidizer<sup>TM</sup> par **homogénéisation à haute pression** (85). Dans cette technique les liposomes sont dirigés à haute pression dans une chambre d'interaction où se produisent des collisions entre les liposomes avec un transfert d'énergie élevé conduisant à la rupture des grandes vésicules et à la formation de SUV.

### I.6.2. Elimination des solvants résiduels

Les solvants résiduels retrouvés dans les suspensions liposomales notamment avec la méthode par évaporation inverse peuvent être éliminés par dialyse, gel filtration ou centrifugation, ajoutant une étape à la préparation des liposomes (55).

### **I.6.3. Optimisation des taux d'encapsulation**

Des techniques employées sur des liposomes préformés telles que la « congélation-décongélation », « lyophilisation-réhydratation » ou « déshydratation-réhydratation » (86) permettent d'augmenter les taux d'encapsulation dans les liposomes.

La congélation des liposomes leur fait perdre leur structure vésiculaire et conduit à la formation d'agrégats multilamellaires. Les MLV obtenues après décongélation présentent des espaces interlamellaires plus importants expliquant les volumes et les taux d'encapsulation accrus. D'autres méthodes consistent à déshydrater ou lyophiliser les vésicules préformées dans un milieu aqueux contenant le soluté à encapsuler. Au cours du processus de déshydratation les liposomes se concentrent avec le soluté jusqu'à former de gros agrégats. Le soluté est alors présent dans la plupart des espaces interlamellaires conduisant lors de la réhydratation à une encapsulation efficace jusqu'à plus de 80 % (87).

## **I.7. Conclusion**

Ces méthodes conventionnelles de préparation des liposomes ne sont pas toujours appropriées notamment pour l'encapsulation de molécules fragiles qui peuvent être dégradées par les solvants organiques, les détergents, la sonication ou encore les forces de cisaillement élevées lors des processus d'homogénéisation. Un autre inconvénient de ces méthodes repose sur leur mode de préparation comportant souvent plusieurs étapes, consommatrices de temps, avec des procédés qui ne sont généralement pas transférables à la production à grande échelle. L'utilisation de solvants organiques reste le principal inconvénient de ces méthodes qui peuvent d'une part dégrader les molécules encapsulées, et d'autre part avoir un impact sur la stabilité même des liposomes, mais aussi contribuer à leur toxicité (88). L'utilisation de solvants implique donc l'utilisation de méthodes d'élimination de ces solvants, mais aussi le dosage de ces solvants résiduels afin de garantir le respect des limites imposées pour une utilisation en clinique. La présence de solvants résiduels peut notamment être un frein à la mise sur le marché de nouveaux médicaments sous forme liposomale.

## II. NOUVELLES METHODES DE PREPARATION

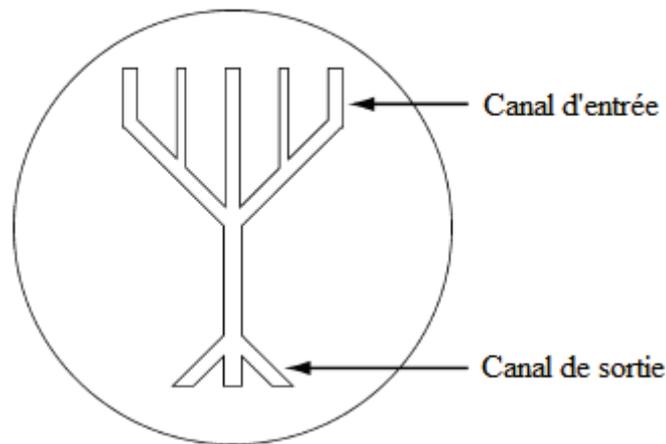
Récemment de nouvelles méthodes ont été développées permettant des productions à grande échelle, avec des productions de liposomes en une seule étape, ou qui s'affranchissent de l'utilisation de solvants.

### II.1. Lyophilisation d'une solution monophasique

Cette méthode repose tout d'abord sur la préparation d'une solution monophasique isotrope de phospholipides solubilisés dans du *tert*-butanol à laquelle est ajoutée une solution aqueuse de saccharose. Après filtration stérilisante cette solution est lyophilisée par congélation puis dessiccation. La réhydratation de ce lyophilisat conduit à une suspension de liposomes homogènes dont la taille (entre 0,1 et 0,2  $\mu\text{m}$ ) et la polydispersité (PDI) dépend de la concentration initiale en saccharose. Plus cette concentration est élevée, plus la taille des liposomes et le PDI diminuent. Cette méthode permet d'encapsuler des molécules hydrophiles ou lipophiles par encapsulation passive ou active (89) et ne nécessite pas d'étape d'homogénéisation ou de réduction de taille des liposomes.

### II.2. Méthode microfluidique

Jahn *et al.* (90) ont développé une méthode de préparation de liposomes monodispersés utilisant la microfluidique. Dans cette technique une solution de lipides dans de l'alcool isopropylique est injectée dans le canal central d'un système microfluidique (*Figure 9*). Le flux de lipides passe alors entre deux gaines de solution aqueuse formées par l'injection concomitante d'une solution de PBS (phosphate buffer saline) dans les canaux adjacents au canal central. Le mélange se produisant à l'interface des liquides conduit à la formation spontanée des liposomes. La taille des liposomes peut être contrôlée de 0,05 à 0,15  $\mu\text{m}$  en modifiant le débit des flux injectés. Cette méthode de préparation très rapide en une seule étape ne nécessite donc pas de processus d'homogénéisation de la taille des liposomes.



**Figure 9 :** Schéma du système microfluidique utilisé pour la préparation des liposomes par Jahn et al. (82,90)

### II.3. Méthode par chauffage

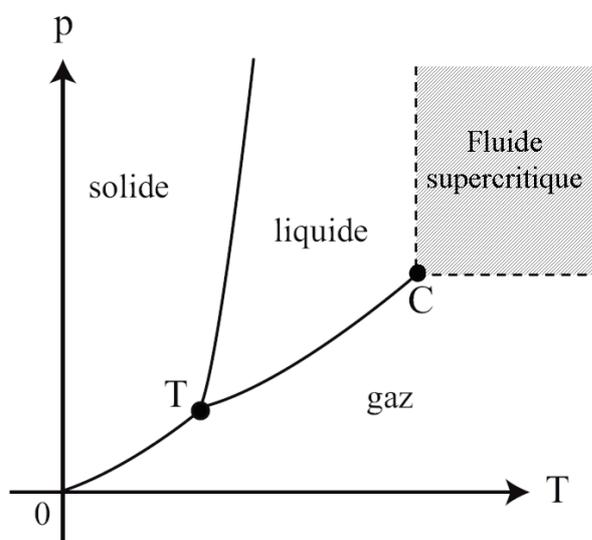
Une méthode de préparation des liposomes sans solvant a été introduite par Mozafari au début des années 2000 (88). Cette méthode repose essentiellement sur le chauffage d'une dispersion de phospholipides dans une solution aqueuse contenant 3 % (v/v) de glycérol. Le mélange est chauffé jusqu'à 60°C ou 120°C lorsque les liposomes contiennent du cholestérol. Le glycérol, soluble dans l'eau, permet de disperser les lipides dans la solution aqueuse, puis une fois les liposomes formés, d'augmenter leur stabilité en prévenant les phénomènes de fusion et de sédimentation. Non toxique, le glycérol n'a pas besoin d'être éliminé de la préparation finale, et le chauffage de la préparation permet également de s'affranchir d'un processus de stérilisation. En fonction de la thermosensibilité des composés à encapsuler, ceux-ci peuvent être ajoutés au mélange dès le début de la fabrication, une fois la température redescendue juste au-dessus de la température de transition de phase des phospholipides ou même à température ambiante une fois les liposomes formés. Cette technique de chauffage a notamment été utilisée pour l'encapsulation de plasmides dans des liposomes anioniques (91).

### II.4. Méthodes utilisant les gaz denses et les fluides supercritiques

#### II.4.1. Définition

Un gaz dense est une substance qui, dans des conditions normales de température et de pression existe à l'état de gaz mais qui présente des propriétés entre celles des liquides et des gaz dans des

conditions proches ou au-dessus du « point critique ». Le diagramme de phase d'un corps pur (*Figure 10*) présente les trois états possibles de la matière (solide, liquide et gaz) en fonction de la température et de la pression. Le « point critique » noté C, est un point au-delà duquel la distinction liquide/gaz n'existe plus. Un fluide supercritique peut être défini comme un gaz dense placé dans des conditions de température et de pression supérieures à celles du point critique de ce fluide. Les fluides supercritiques présentent un pouvoir solvant proche de celui des liquides et des propriétés de transport de masse proche de celles des gaz (57). Les propriétés des fluides supercritiques ont été exploitées pour remplacer de nombreux solvants organiques et permettre l'amélioration de techniques de traitement, en particulier de séparation, de purification, et de micronisation.



**Figure 10 :** Diagramme de phase d'un corps pur

Le dioxyde de carbone est aujourd'hui le fluide supercritique le plus couramment utilisé. Ce gaz est en effet facilement disponible, atoxique, non-inflammable et possède des conditions d'accès à l'état supercritique relativement accessibles à partir de 31°C et 74 MPa (82). La température critique étant relativement basse, un faible apport énergétique est nécessaire pour obtenir le CO<sub>2</sub> à l'état supercritique, ce qui permet également son utilisation pour des molécules thermolabiles.

Les fluides supercritiques sont ainsi utilisés pour la préparation de liposomes. De part leurs propriétés, les fluides supercritiques permettent l'obtention de formulations homogènes sans étape de post-formation. Les procédés utilisés permettent de travailler en conditions stériles et sont transférables à la production à grande échelle. Les procédés sont en général réalisés en une étape réduisant les temps de production et les coûts (50). Différents procédés ont été élaborés pour la préparation des liposomes utilisant les fluides supercritiques. On distinguera notamment les procédés solvant et les procédés anti-solvant.

## II.4.2. Procédés solvant

Le principe des procédés solvant est d'utiliser le fluide supercritique pour solubiliser le soluté à précipiter. Un co-solvant est généralement employé pour permettre la solubilisation. Une fois le soluté solubilisé, le mélange est détendu au travers d'une buse ou d'un capillaire afin de faire chuter brutalement la masse volumique et donc le pouvoir solvant du fluide supercritique, éliminé à l'état gazeux, ce qui provoque la précipitation du soluté.

### II.4.2.1. *Méthode par injection et méthode par décompression*

Les méthodes par injection et décompression furent les premières méthodes utilisant les fluides supercritiques pour la préparation des liposomes, décrites par Castor et Chu en 1994 (92,93). La méthode par injection consiste à injecter un mélange formé de lipides, d'un co-solvant organique (éthanol, 2% massique) et du fluide supercritique (CO<sub>2</sub>) dans la solution aqueuse à travers une buse. Cette méthode conduit à la formation de liposomes unilamellaires avec un diamètre moyen compris entre 0,01 et 0,3 µm. Dans la méthode par décompression, la phase aqueuse est directement ajoutée au mélange de lipides, co-solvant et fluide supercritique et ce mélange est détendu dans de l'air par passage à travers une buse pour former les liposomes. Les liposomes formés sont des liposomes multilamellaires avec un diamètre moyen compris entre 0,06 et 2 µm (57).

Frederiksen et al. (94) ont mis au point un procédé batch basé sur la méthode par injection de Castor et al. (92). Deux populations de liposomes sont formées à partir de ce procédé : environ 90 % de SUV (diamètre compris entre 0,02 et 0,05 µm) et environ 10 % de MLV (diamètre d'environ 0,25 µm).

### II.4.2.2. *Evaporation supercritique en phase inverse*

Le principe de cette méthode décrite par Otake *et al* en 2001 (95) repose sur l'introduction de lipides, d'un co-solvant (éthanol 7 % massique) et du CO<sub>2</sub> supercritique dans une cellule à volume variable sous agitation. La phase aqueuse est ensuite introduite lentement formant tout d'abord une émulsion eau dans CO<sub>2</sub> puis conduit à la formation de micelles inverses lorsque la proportion d'eau augmente. Les liposomes se forment par évaporation du CO<sub>2</sub> obtenu par dépressurisation. Cette méthode permet l'obtention de LUV de diamètre moyen compris entre 0,1 et 1,2 µm avec des efficacités d'encapsulation élevées pour des composés hydrophobes ou hydrophiles. Plus récemment les mêmes auteurs ont développé une méthode sans éthanol, appelée « procédé amélioré de l'évaporation supercritique en phase inverse » (96). Les taux d'encapsulation et la stabilité des liposomes d'1,5 µm de diamètre sont améliorés avec cette méthode du fait de l'absence d'éthanol.

### II.4.2.3. Procédé RESS

Wen *et al.* (97) ont développé un procédé batch appelé le procédé RESS (Rapid Expansion of a Supercritical Solution) modifié, qui repose sur deux autoclaves montés en série. Dans le premier autoclave, les lipides et composés hydrophobes à encapsuler sont tout d'abord solubilisés par le CO<sub>2</sub> supercritique et son co-solvant (éthanol). Ce mélange est ensuite introduit dans le deuxième autoclave via une buse coaxiale dans laquelle est injectée au même moment une solution tampon. La formation des liposomes et l'encapsulation des composés se produisent lors de la dispersion des lipides dans la solution tampon pendant la dépressurisation. Les liposomes formés par cette méthode ont un diamètre moyen de 0,17 µm et une efficacité d'encapsulation de 82 % (97).

### II.4.3. Procédés anti-solvant

Les premières méthodes décrites ci-dessus utilisent le CO<sub>2</sub> supercritique comme solvant, associé en général à un co-solvant, pour solubiliser les lipides et composés hydrophobes. Le CO<sub>2</sub> supercritique peut également être utilisé comme anti-solvant pour précipiter le soluté ; et dans ce cas, les procédés utilisés permettent la production de phospholipides divisés et non de liposomes. Ces phospholipides divisés, devront être hydratés sous agitation pour conduire à la formation de liposomes dans un deuxième temps.

L'effet anti-solvant repose sur la diminution de solubilité d'un soluté pour un solvant organique lors de l'ajout d'un anti-solvant, ici le fluide supercritique. Dans les techniques anti-solvant, le soluté à microniser est solubilisé dans un solvant organique. Ce dernier est totalement soluble dans le fluide supercritique à l'inverse du soluté. La solution organique liquide est ensuite mise en contact avec le fluide supercritique qui se solubilise dans la phase liquide tandis que le solvant diffuse vers la phase continue. Il y a ainsi sursaturation du soluté et précipitation (57).

Différents procédés anti-solvant ont été décrit depuis le début des années 2000, le procédé SAS (Supercritical Anti-Solvent), le procédé ASES (Aerosol Solvent Extraction System), le procédé GAS (Gas Anti-Solvent) ou encore le procédé SEDS (Solution Enhanced dispersion by Supercritical Fluids). Ces procédés reposent sur le même principe mais diffèrent par le mode de mise en contact de la solution organique et du fluide supercritique.

Le premier procédé utilisé est le procédé SAS (Supercritical Anti-Solvent), utilisée au départ par Magnan (98) et Badens (99) pour la micronisation de lécithine de soja, avec l'obtention de sphères partiellement agglomérées de 1 à 40 µm de diamètre.

Naik *et al.* (100) ont hydraté des phospholipides divisés avec le procédé SAS pour former des liposomes pégylés encapsulant du docetaxel. Les efficacités d'encapsulation obtenues varient entre 50,1 et 71,1% et la taille des liposomes formés est comprise entre 0,25 et 2,0 µm.

Kunastitchai *et al.* (101) ont utilisé le procédé ASES pour microniser des lipides (phosphatidylcholine et cholestérol) avec la molécule à encapsuler (miconazole). Les particules

micronisées ont un diamètre compris entre 10 et 40  $\mu\text{m}$  et après hydratation les liposomes formés vont de 2,7 à 9,4  $\mu\text{m}$  en fonction du pH de la solution aqueuse avec des efficacités d'encapsulation mesurées entre 19 et 38 %.

Kadimi *et al* (102) ont micronisé des phospholipides puis les ont hydratés dans le même autoclave alors que le dispositif était encore sous pression, par le procédé GAS (Gas Anti-Solvent). Les liposomes formés après la dépressurisation ont un diamètre compris entre 0,15 et 3  $\mu\text{m}$ . Des efficacités d'encapsulation de 20 % ont été obtenues pour l'encapsulation de l'amphotéricine B.

#### **II.4.4. Synthèse sur les procédés supercritiques**

La préparation des liposomes par procédés solvant est apparue dans les années 90 alors que les procédés anti-solvant sont apparus plus tardivement, dans les années 2000. Les procédés solvant sont des procédés batch alors que les procédés anti-solvant sont soit des procédés batch, soit des procédés semi-continus.

Les procédés solvant nécessitent des conditions opératoires en moyenne autour de 22 MPa et 58°C alors que les procédés anti-solvant requièrent des pressions et températures opératoires plus faibles (moyenne à 12 MPa et 42°C). Les procédés anti-solvant semblent ainsi être plus avantageux en termes de dépenses énergétiques ; mais de plus, l'utilisation de températures de travail plus douces représente un avantage pour encapsuler des principes actifs thermolabiles dans les liposomes.

Concernant l'emploi de co-solvant ou de solvant, les procédés solvant utilisent de l'éthanol comme co-solvant alors que les procédés anti-solvant emploient indifféremment de l'éthanol ou des solvants plus nocifs tels que le méthanol, le chloroforme ou le dichlorométhane.

Les procédés anti-solvant aboutissent à la production de liposomes divisés nécessitant une deuxième étape d'hydratation pour former les liposomes. Les procédés solvant apparaissent comme des procédés plus compacts qui aboutissent directement à la formation de liposomes. Enfin, les liposomes produits sont de taille plus petite avec les procédés solvant (de la dizaine à la centaine de nanomètres) qu'avec les procédés anti-solvant (de l'ordre du micromètre).

### **III. CONCLUSION**

Les liposomes présentent un fort potentiel pour l'industrie pharmaceutique, mais la production industrielle nécessite des procédés simples, si possible en une seule étape, à faible coût et conformes aux restrictions imposées par les bonnes pratiques de fabrication (BPF et GMP américaines). Des avancées considérables ont déjà eu lieu depuis la première méthode décrite par Bangham (45). Mais de

nombreux procédés sont encore en cours de développement pour répondre aux enjeux majeurs de la production des liposomes. L'optimisation des techniques conventionnelles et celles utilisant les gaz denses doit permettre d'éliminer les solvants organiques, d'intensifier les productions, et d'augmenter la stabilité des liposomes et des produits encapsulés, tout en garantissant les qualités pharmaceutiques de ces formulations.

# ***UTILISATION CLINIQUE DES LIPOSOMES***

---

De nombreuses spécialités liposomales ont été développées pour une utilisation clinique dans divers domaines d'application. Une partie de ces formulations ont déjà été approuvées par les autorités régissant le médicament, notamment par la FDA (Food and Drug Administration) américaine et l'EMA (European Medicines Agency) européenne. De nombreuses autres formulations sont encore en cours d'évaluation chez l'homme. La majorité de ces liposomes ont des applications en oncologie et sont regroupés dans le *Tableau 6*. Les autres applications des liposomes, présentés dans le *Tableau 7* (p.65), couvrent des domaines tels que l'infectiologie, la vaccinologie, l'analgésie... Ces tableaux rassemblent les liposomes déjà autorisés sur le marché ou en cours d'essais cliniques (103).

## **I. UTILISATION EN ONCOLOGIE**

Les applications des liposomes en oncologie sont les plus représentées, avec plusieurs médicaments sur le marché contenant des anthracyclines, molécules les plus largement étudiées avec les liposomes. En cancérologie, les formes liposomales permettent d'augmenter l'index thérapeutique des drogues anticancéreuses soit en augmentant leur concentration au sein de la tumeur soit en diminuant l'exposition des tissus sains (104).

### **I.1. Anthracyclines liposomales**

Les anthracyclines sont des molécules très largement utilisées dans le traitement des tumeurs solides et hématologiques, comme agent intercalant de l'ADN. Mais leur principal inconvénient est la cardiotoxicité qu'elles peuvent engendrer. L'affinité des anthracyclines (chargées positivement) pour la cardiolipine (lipide chargé négativement et présent en abondance dans le tissu cardiaque) expliquerait cette cardiotoxicité (105). Leur utilisation est de ce fait limitée à une certaine dose cumulée. Des formulations d'anthracyclines liposomales ont alors été développées pour améliorer l'index thérapeutique et traiter des tumeurs agressives comme le cancer métastatique du sein ou de l'ovaire ou encore le sarcome de Kaposi (106).

<b>Substance Active</b>	<b>Nom Commercial</b>	<b>Date d'approbation ou essais clinique</b>
<b>Agents intercalants - Anthracyclines</b>		
Doxorubicine	Doxil <sup>®</sup> /Caelyx <sup>®</sup>	1995 (FDA) / 1996 (EMA)
Doxorubicine	Myocet <sup>®</sup>	2000 (EMA)
<i>Doxorubicine</i>	<i>ThermoDox<sup>®</sup></i>	<i>phase III en cours</i>
Daunorubicine	DaunoXome <sup>®</sup>	1996 (FDA + EMA)
<i>Annamycine</i>	<i>Liposome-annamycin</i>	<i>phase I/II (2009)</i>
<i>Mitoxantrone</i>	<i>LEM</i>	<i>phase I (2004)</i>
<b>Antimétabolite - Analogue des bases pyrimidiques</b>		
Cytarabine	Depocyté <sup>®</sup>	1999 (FDA) / 2001 (EMA)
<i>Cytarabine/Daunorubicine (5:1)</i>	<i>CPX-351</i>	<i>phase II (2012)</i>
<b>Poisons du fuseau - Alcaloïdes de la Pervenche</b>		
Vincristine	Marqibo <sup>®</sup>	2012 (FDA)
<i>Vinorelbine</i>	<i>VLI</i>	<i>phase I en cours</i>
<b>Poisons du fuseau - Dérivés des Taxanes</b>		
<i>Paclitaxel</i>	<i>LEP-ETU</i>	<i>phase II (2011)</i>
<i>Paclitaxel</i>	<i>EndoTAG-1</i>	<i>phase II en cours</i>
<b>Alkylants - Dérivés des sels de platine</b>		
<i>Cisplatine</i>	<i>Lipoplatin<sup>®</sup></i>	<i>phase III (2011)</i>
<i>Analogue du Cisplatine (NDDP)</i>	<i>Aroplatin<sup>®</sup></i>	<i>phase II (2006)</i>
<i>Cisplatine</i>	<i>SPI-077</i>	<i>phase II (1999)</i>
<b>Inhibiteurs de la topoisomérase I - Dérivés de la Camptothécine</b>		
<i>Irinotécan</i>	<i>IHL-305, LE-SN38, CPX-1, NL CPT-11, PEP-02</i>	<i>phase I et II (phase II en cours)</i>
<i>Lurtotécan</i>	<i>OSI-211</i>	<i>phase II (2003)</i>
<i>Topotécan</i>	<i>liposomal topotecan</i>	<i>phase III en cours</i>
<i>autres analogues</i>	<i>SCKD602, L9NC</i>	<i>phase II (2007)</i>
<b>Agent différenciateur - Rétinoïde</b>		
<i>Trétinoïne</i>	<i>Atragen<sup>®</sup></i>	<i>phase II (2001)</i>

**Tableau 6 :** Différentes classes d'anticancéreux utilisés sous forme liposomale en oncologie. Liposomes déjà approuvés par la FDA et l'EMA (avec l'année d'approbation) ou encore au stade d'essais cliniques (en italique, avec la phase et l'année du dernier essai clinique).

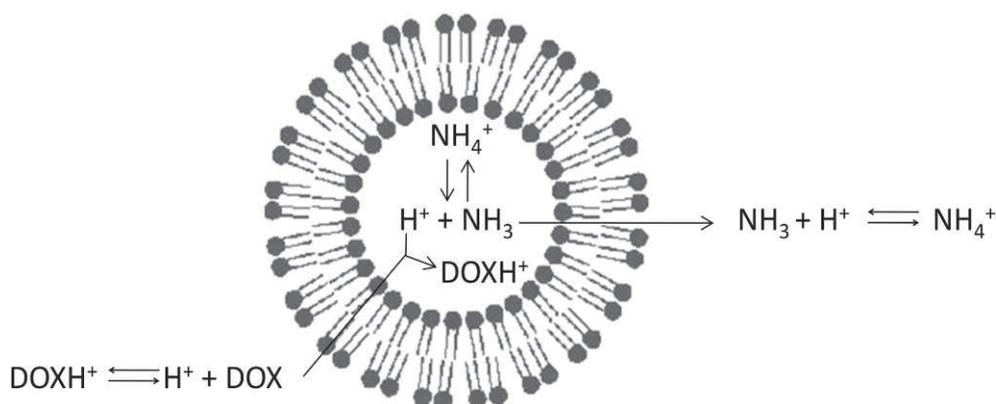
## I.1.1. Doxorubicine liposomale

### I.1.1.1. *Doxil*<sup>®</sup>/*Caelyx*<sup>®</sup>

*Doxil*<sup>®</sup> est la première forme liposomale à avoir été approuvée par la FDA (Food and Drug Administration) en novembre 1995. Il a ensuite également été autorisé en Europe en juin 1996 sous la dénomination *Caelyx*<sup>®</sup>. *Doxil*<sup>®</sup> et *Caelyx*<sup>®</sup> sont commercialisés par Janssen Cilag International, et sont autorisés dans le sarcome de Kaposi chez les patients infectés par le VIH, le cancer de l’ovaire après échec d’une chimiothérapie de première ligne à base de platine, le myélome multiple en association et en deuxième ligne, et dans le cancer du sein métastatique (pour l’AMM européenne) (107,108).

*Doxil*<sup>®</sup>/*Caelyx*<sup>®</sup> est la seule formulation de liposomes pégylés autorisée par la FDA et l’EMA. Il n’existe pas de brevet propre à *Doxil*<sup>®</sup> (106), mais la fabrication de ces liposomes est basée sur deux brevets différents. Un brevet porte sur l’encapsulation active de bases faibles telles que la doxorubicine (109) et l’autre concerne l’utilisation de lipides pégylés afin d’augmenter les temps de circulation (62).

Ces liposomes d’un diamètre moyen de 100 nm sont composés de phosphatidylcholine de soja hydrogénée (HSPC), de cholestérol, et de DSPE-PEG (au ratio molaire de 55:40:5) pour la bicouche lipidique (66,104). La phase aqueuse contient du sulfate d’ammonium (2 mg/mL) et de la doxorubicine en acide chlorhydrique (2 mg/ml) (107,108). L’encapsulation active de la doxorubicine (*Figure 11*) est réalisée grâce à un double gradient de pH et d’ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) avec des taux d’encapsulation supérieurs à 90 % (107). Ce double gradient (*Figure 11*) permet ainsi la sortie d’une molécule neutre d’ammoniaque ( $\text{NH}_3$ ) contre l’entrée d’une molécule de doxorubicine qui après avoir traversé la bicouche se protonne et ne peut plus ressortir (109).



**Figure 11** : Représentation schématique de l’encapsulation de la doxorubicine (DOX) dans des liposomes par un double gradient d’ions ammonium et de pH

Une autre formulation similaire à *Doxil*<sup>®</sup>/*Caelyx*<sup>®</sup> est la spécialité *Lipo-dox*<sup>®</sup>, non commercialisée en Europe ou aux Etats-Unis, mais qui est notamment produite en Inde et à Taïwan.

Cette formulation diffère de Doxil<sup>®</sup> par l'utilisation de DSPC (distéaroyl phosphatidylcholine) à la place de l'HSPC. L'utilisation de phospholipides entièrement saturés et avec une chaîne d'acide gras plus longue, lui confère une meilleure stabilité et des temps de circulation plus longs. En conséquence, Lipo-dox<sup>®</sup> présente également une toxicité accrue avec une dose toxique limitante plus basse que Doxil<sup>®</sup> du fait de l'augmentation de l'incidence de cas de stomatites sévères (104).

#### I.1.1.2. *Myocet<sup>®</sup>*

Myocet<sup>®</sup> est une autre forme de doxorubicine liposomale (non pégylée) bénéficiant d'une AMM européenne centralisée depuis le 13 juillet 2000 dont le titulaire est Cephalon Europe, mais n'est pas encore approuvé aux Etats-Unis. Myocet<sup>®</sup> est indiqué en première ligne dans le traitement du cancer du sein métastatique en association au cyclophosphamide (110).

Ces liposomes multilamellaires de 190 nm de diamètre moyen sont composés de phosphatidylcholine d'œuf (EPC) et de cholestérol dans un rapport molaire 55:45 (104,111). L'encapsulation active de doxorubicine est effectuée extemporanément avant utilisation, par gradient de pH. Myocet<sup>®</sup> est commercialisé sous forme de trois flacons distincts contenant : une poudre de chlorhydrate de doxorubicine lyophilisée, une dispersion de liposomes contenant de l'acide citrique, une solution de tampon carbonate.

La préparation extemporanée des liposomes requiert alors plusieurs étapes avant administration. La suspension de liposomes est tout d'abord diluée dans le tampon carbonate de manière à créer un gradient de pH. Le pH est maintenu entre 4 et 5 à l'intérieur des liposomes grâce à l'acide citrique tandis que le pH externe est compris entre 7 et 8 par l'ajout de tampon carbonate. Les liposomes ainsi dilués sont ajoutés à la doxorubicine préalablement reconstituée dans du sérum physiologique et chauffée à 55-60°C (110,112). Lorsque la doxorubicine est incubée avec les liposomes présentant un tel gradient de pH, la forme neutre de la doxorubicine diffuse à l'intérieur des liposomes (par gradient de concentration) où elle est protonnée et donc piégée. La molécule neutre diffuse ainsi aussi longtemps que le tampon interne maintient le delta de pH, conduisant à des taux d'encapsulation très élevés (113).

#### I.1.1.3. *Avantages par rapport à la doxorubicine libre*

La petite taille des liposomes de Doxil<sup>®</sup> (100 nm) et l'utilisation de lipides pégylés dans la bicouche lipidique leur confèrent une pharmacocinétique unique avec une demi-vie d'élimination de 55 h (107) contre 2,5 h pour les liposomes de Myocet<sup>®</sup> qui diffèrent par leur taille (190 nm) et ne sont pas pégylés, et 0,2 h pour la doxorubicine seule (104).

Une étude de phase III comparant Myocet<sup>®</sup> à la doxorubicine conventionnelle en traitement de première ligne dans le cancer du sein métastatique montre des résultats similaires en termes de survie à un an (64 % pour Myocet<sup>®</sup> vs 69 % pour la doxorubicine) et de survie sans progression (3,8 vs 4,3

mois). Cependant Myocet<sup>®</sup> présente moins d'effets indésirables que la doxorubicine seule avec notamment moins de cardiotoxicité (13 % vs 29 % pour la doxorubicine seule), mais également moins de mucites/stomatites et de nausées/vomissements (114). Myocet<sup>®</sup> ne permet donc pas d'améliorer l'efficacité tumorale, mais avec une efficacité similaire à la doxorubicine conventionnelle, il permet de diminuer les toxicités.

Doxil<sup>®</sup> présente de la même manière une diminution de la cardiotoxicité (3,9 % vs 18,8 % pour la doxorubicine seule), de la neutropénie, des vomissements et de l'alopecie (115). Cette autre étude de phase III dans le cancer du sein métastatique montre également une efficacité équivalente entre Doxil<sup>®</sup> et la doxorubicine avec une survie sans progression (6,9 vs 7,8 mois) et une durée de survie globale (21 vs 22 mois) similaires. Cependant, Doxil<sup>®</sup> présente un nouvel effet indésirable : le syndrome main-pied (48 % vs 2 %) mais également plus de mucites et de stomatites que la doxorubicine conventionnelle. Cette toxicité est principalement due à la très longue circulation de ces liposomes pégylés.

#### I.1.1.4. *Une nouvelle génération de doxorubicine liposomale*

Une nouvelle génération de doxorubicine liposomale thermosensible est développée par Celsion, sous le nom commercial ThermoDox<sup>®</sup>. ThermoDox<sup>®</sup> est actuellement en cours d'investigation dans un essai clinique de phase III dans le carcinome hépatocellulaire (116). Cette nouvelle génération de liposomes contient un phospholipide présentant une  $T_m$  de 41,5°C, la dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) et un lysolipide (phospholipide avec une seule chaîne d'acide gras), le monopalmitoyl phosphatidylcholine (MSPC) permettant encore de diminuer légèrement la température de transition de phase des liposomes. De la DSPE-PEG 2000 est également utilisée pour rendre les liposomes furtifs. L'intérêt de ces liposomes thermosensibles est de pouvoir libérer efficacement et spécifiquement leur contenu au niveau des zones tumorales par l'induction d'une hyperthermie. Ces liposomes sont en effet capables de libérer 80 % de leur contenu en 20 secondes à 41,3°C, contre environ 20 % en 30 min à 37-38°C (117).

### **I.1.2. Daunorubicine liposomale, DaunoXome<sup>®</sup>**

La daunorubicine est une autre anthracycline très largement utilisée dans les hémopathies malignes, mais son utilisation est également limitée par sa cardiotoxicité. DaunoXome<sup>®</sup> est une formulation liposomale de daunorubicine approuvée par la FDA et l'EMA en 1996, pour le traitement du Sarcome de Kaposi chez des patients à un stade avancé de l'infection par le VIH (118,119).

La furtivité de ces liposomes est ici obtenue par leur petite taille (45 nm de diamètre moyen) et la rigidité de leur bicouche. Ils sont constitués de DSPC, de cholestérol et de daunorubicine encapsulée (10:5:1 mol%). La préparation de ces liposomes requiert plusieurs étapes (120) et l'encapsulation de la daunorubicine, repose sur le même principe que pour Myocet<sup>®</sup>. Les liposomes sont tout d'abord

préparés à partir d'une dispersion homogène du mélange de lipides sous forme de poudre. Ce mélange de lipides est hydraté par une phase aqueuse contenant de l'acide citrique (à pH 2-2,5) permettant la formation des liposomes. La taille des liposomes est ensuite réduite par sonication. Puis la daunorubicine est ajoutée avec une solution de soude pour créer un gradient de pH. La daunorubicine sous forme neutre traverse la bicouche des liposomes où elle est protonnée et forme un sel avec l'acide citrique. La daunorubicine non encapsulée est ensuite éliminée par gel filtration.

Une étude de phase III comparant la daunorubicine liposomale à la daunorubicine conventionnelle chez des patients de plus de 60 ans atteints de leucémie myéloïde aigüe n'a pas montré de différence significative ni en terme d'efficacité ni en terme de toxicité (121). Une autre étude de phase III a comparé l'utilisation de DaunoXome<sup>®</sup> à la doxorubicine associée à de la bléomycine et de la vincristine (protocole ABV) dans le traitement du Sarcome de Kaposi. Cette étude montre encore une fois l'équivalence en terme d'efficacité et de réponse, par contre le traitement par DaunoXome<sup>®</sup> a montré moins d'alopécie (8 % vs 36 %) et moins de neuropathies (13 % vs 41 %).

## **I.2. Cytarabine liposomale, Depocyte<sup>®</sup>**

Dépoocyte<sup>®</sup> est une formulation de cytarabine liposomale approuvée par la FDA en 1999 et l'EMA en 2001, indiquée dans le traitement intrathécal de la méningite lymphomateuse (122,123). La cytarabine est un cytotoxique antimétabolique analogue de la pyrimidine. Pour les antimétaboliques spécifiques de la phase du cycle cellulaire, la durée d'exposition des cellules néoplasiques à des concentrations cytotoxiques est déterminante quant à l'efficacité du traitement.

Les liposomes de Dépoocyte<sup>®</sup> sont de grands liposomes multivésiculaires d'environ 20 µm de diamètre, à libération prolongée, dont la technologie est brevetée sous le nom de DepoFoam<sup>®</sup> (124). Ces liposomes sont constitués de cholestérol, trioléine (triglycéride de l'acide oléique), dioleoyl phosphatidylcholine (DOPC), et dipalmitoyl phosphatidylglycérol (DPPG) dans un rapport molaire 11:1:7:1. La pharmacocinétique de la cytarabine encapsulée dans de tels liposomes est alors considérablement modifiée. La demi-vie de la cytarabine dans le liquide céphalorachidien est de 100 à 263 h pour des posologies de 12,5 à 75 mg de Dépoocyte<sup>®</sup> contre 3,4 h pour 30 mg de cytarabine libre (122). L'administration intrathécale de cytarabine encapsulée prolonge ainsi l'exposition soutenue de la tumeur à des concentrations cytotoxiques de cytarabine, avec une libération lente et continue à partir des liposomes de DepoFoam<sup>®</sup>. L'exposition au médicament est ainsi prolongée dans le temps, avec des pics de concentration plus faibles et une durée d'exposition plus longue par rapport à la cytarabine libre (125).

L'intérêt de Dépoocyte<sup>®</sup> dans le traitement des méningites lymphomateuses est retrouvé dans les résultats de plusieurs essais cliniques. Un premier essai comparant la cytarabine liposomale à la

cytarabine libre montre tout d'abord des taux de réponse bien plus importants avec la forme liposomale (71 % *versus* 15 %), et également une meilleure qualité de vie mesurée par le score de Karnofsky (126). La cytarabine liposomale a également été comparée au traitement de référence par injection intrathécale de méthotrexate (127). Dans cet essai, les taux de réponse étaient comparables dans les deux bras de traitement ; tout comme la fréquence et le grade des effets indésirables. Cependant, Dépocyte<sup>®</sup> a significativement augmenté le temps jusqu'à progression tout en offrant un schéma posologique bien moins contraignant avec une injection toutes les deux semaines, contrairement au méthotrexate qui nécessite une injection deux fois par semaine.

### **I.3. Vincristine liposomale, Marqibo<sup>®</sup>**

Marqibo<sup>®</sup> est le dernier médicament liposomal approuvé par la FDA en août 2012 dans le traitement des leucémies aigües lymphoblastiques (LAL) à chromosome Philadelphie négatif, après rechute ou échec d'au moins deux premières lignes de traitement (128,129). Ce médicament a été autorisé selon le programme d'approbation accéléré de la FDA pour le traitement de maladies graves pour lesquelles il n'existe pas d'autre option de traitement standard, mais continue en parallèle d'être évalué par des essais cliniques.

Les liposomes de Marqibo<sup>®</sup> sont constitués de sphingomyéline et de cholestérol (avec un rapport molaire 58:42) brevetés sous le nom d'Optisomes<sup>™</sup>. Cette formulation de liposomes est plus stable vis-à-vis de la vincristine qu'une formulation composée de DSPC et de cholestérol (130). L'encapsulation de la vincristine dans ces liposomes est réalisée par encapsulation active avec un gradient de pH.

La vincristine est un poison du fuseau de la famille des alcaloïdes de la pervenche. C'est une molécule standard utilisée dans le traitement des LAL mais son efficacité est limitée par son index thérapeutique étroit avec une neurotoxicité dose-limitante. L'encapsulation de la vincristine peut alors permettre d'administrer des doses plus élevées et d'optimiser son utilisation. Un premier essai clinique de phase I a en effet déterminé la dose maximale tolérée (MTD) de Marqibo<sup>®</sup> à 2,4 mg/m<sup>2</sup> (131), alors qu'elle est de 1,4 mg/m<sup>2</sup> pour la vincristine seule. Une phase II conduite en 2006 chez des patients avec une LAL réfractaire ou en rechute a montré des résultats encourageants dans cette pathologie de mauvais pronostic. Un taux de réponse de 14 % (1 réponse complète et 1 réponse partielle) a été obtenu avec cet essai clinique utilisant Marqibo<sup>®</sup> à une dose de 2 mg/m<sup>2</sup> toutes les deux semaines (132). Un essai de phase I-II a ensuite été mené en 2009 intensifiant le traitement avec l'administration de Marqibo<sup>®</sup> toutes les semaines jusqu'à 2,4 mg/m<sup>2</sup>, associé à de la dexaméthasone. La MTD a été déterminée à 2,25 mg/m<sup>2</sup> et une efficacité supérieure a été démontrée, avec un taux de réponse de 19 %, et de 29 % si l'on ne considère que les patients en première ligne de rattrapage (133). Une étude de

phase III est actuellement en cours comparant Marqibo<sup>®</sup> à la vincristine standard, chez des patients d'au moins 60 ans dans le traitement de la LAL nouvellement diagnostiquée (134).

#### **I.4. Autres formulations liposomales d'anticancéreux en cours d'essais cliniques**

Bien d'autres anticancéreux administrés sous forme de liposomes sont évalués dans le cadre d'essais cliniques, on y retrouve des dérivés des taxanes, des sels de platines ou encore des dérivés de la camptothécine.

Le paclitaxel est un anticancéreux de la classe des taxanes commercialisé sous le nom de Taxol<sup>®</sup>, indiqué dans le traitement du cancer de l'ovaire, du sein, du poumon ou encore dans le sarcome de Kaposi. Le paclitaxel étant faiblement soluble dans l'eau, son utilisation intraveineuse repose sur l'utilisation d'un surfactant non ionique, le Crémophor EL<sup>®</sup> qui a l'inconvénient de conduire à des réactions d'hypersensibilité. Des formulations de liposomes de paclitaxel ont alors été développées dans le but de s'affranchir du Crémophor EL<sup>®</sup>, de diminuer les autres toxicités liées au paclitaxel et potentiellement de délivrer des doses plus importantes d'anticancéreux aux tumeurs. Deux formulations ont ainsi été développées : LEP-ETU et Endo-TAG-1. Un essai de phase I avec LEP-ETU a notamment déterminé une MTD de 325 mg/m<sup>2</sup> alors que Taxol<sup>®</sup> est administré à une posologie comprise entre 135 et 200 mg/m<sup>2</sup> (135).

Des formulations liposomales de sels de platine, dont l'utilisation est limitée par leur néphrotoxicité, ont également été développées, notamment la spécialité Lipoplatine<sup>®</sup> qui sera certainement prochainement commercialisée. Lipoplatine<sup>®</sup> est une formulation liposomale de cisplatine, qui a été évaluée dans de nombreux essais dont des essais de phase III et a permis de réduire significativement les effets indésirables du cisplatine (dont la néphrotoxicité) tout en conservant une efficacité similaire (136,137). Les auteurs considèrent que Lipoplatine<sup>®</sup> serait le meilleur substitut du cisplatine en termes de toxicité et d'efficacité, au moins dans le traitement du carcinome du poumon non à petites cellules.

## II. AUTRES DOMAINES D'APPLICATION

Substance Active	Nom Commercial	Date d'approbation ou essais clinique
<b>Infectiologie - Antifongiques/Antibiotiques</b>		
Amphotéricine B	Ambisome <sup>®</sup>	1997 (FDA) / 1998 (EMA)
<i>Nystatine</i>	<i>Nyotran<sup>®</sup></i>	<i>phase I/II (2004)</i>
<i>Amikacine</i>	<i>Mikasome<sup>®</sup></i>	<i>phase I (1997)</i>
<i>Amikacine</i>	<i>Arikace<sup>®</sup></i>	<i>phase III en cours</i>
<b>Vaccinologie</b>		
virus inactivé de l'hépatite A	Epaxal <sup>®</sup>	1994 (SWISSMEDIC <sup>1</sup> )
hémagglutinines inactivées du virus de la grippe	Inflexal <sup>®</sup>	1997 (SWISSMEDIC <sup>1</sup> )
<i>sous-unité Ag tuberculinique</i>	<i>CAF01</i>	<i>phase I (1996)</i>
<i>peptide VIH 1</i>	<i>AF018-CAF01</i>	<i>phase I (2010)</i>
<i>antigène RTS,S (Malaria)</i>	<i>AS01</i>	<i>phase II (2009)</i>
<b>Vaccinothérapie</b>		
<i>BLP25 lipopeptide</i>	<i>Stimuvax<sup>®</sup></i>	<i>phase III en cours</i>
<i>peptides tumoraux</i>	<i>CNT-10</i>	<i>phase I en cours</i>
<i>peptides tumoraux</i>	<i>DPX-0907</i>	<i>phase I en cours</i>
<b>Analgésie</b>		
Morphine sulfate	DepoPur <sup>®</sup>	2004 (FDA) / 2006 (MHRA <sup>2</sup> )
Bupivacaïne	Exparel <sup>®</sup>	2011 (FDA)
<i>Fentanyl</i>	<i>Aerolef<sup>®</sup></i>	<i>phase II (2004)</i>
<b>Autres</b>		
Ophtalmologie - Dégénérescence maculaire liée à l'âge		
Verteporfine	Visudyne <sup>®</sup>	2000 (FDA + EMA)
Hématologie - Hémophilie A		
<i>facteur VIII recombinant humain</i>	<i>PEGLip-rFVIII-FS</i>	<i>phase II (2008)</i>
Maladie vasculaire périphérique		
<i>Prostaglandine E1</i>	<i>Liprostin<sup>®</sup></i>	<i>phase II (2003)</i>

**Tableau 7 :** Médicaments à base de liposomes utilisés dans les domaines d'application autres que l'oncologie par type d'application. Liposomes déjà approuvés (avec l'année d'approbation) ou encore au stade d'essais cliniques (en italique, avec la phase et l'année du dernier essai clinique).

<sup>1</sup> SWISSMEDIC : Autorité du Médicament en Suisse

<sup>2</sup> MHRA (Medicines and Health care products Regulatory Agency) : Autorité du Médicament en Angleterre

## II.1. Utilisation en infectiologie, exemple d'Ambisome<sup>®</sup>

Ambisome<sup>®</sup> est une formulation liposomale d'amphotéricine B, approuvée en 1997 par la FDA puis en 1998 par l'EMA pour le traitement des aspergilloses, candidoses, leishmanioses, et autres infections fongiques en particulier en cas d'insuffisance rénale (138,139).

L'amphotéricine B, est un antifongique polyénique présentant une forte affinité pour les stérols et notamment pour l'ergostérol de la paroi des cellules fongiques. Sa liaison à l'ergostérol entraîne la formation de pores, perturbant la perméabilité membranaire et entraînant la mort cellulaire. L'amphotéricine B est une molécule amphiphile très peu soluble dans l'eau, c'est pourquoi elle est administrée sous forme de micelles (Fungizone<sup>®</sup>), de complexes lipidiques (Abelcet<sup>®</sup> et Amphotec<sup>®</sup>) ou encore de liposomes avec Ambisome<sup>®</sup>. Le principal effet indésirable de l'amphotéricine est sa néphrotoxicité qui peut être largement diminuée par l'utilisation de formulations lipidiques et de liposomes (140).

Ces liposomes sont des SUV inférieures à 100 nm de diamètre, composées de HSPC, de cholestérol et de distearoylphosphatidylglycérol (DSPG) dans un rapport molaire de 2:1:0,8. La fabrication des liposomes d'amphotéricine B requiert plusieurs étapes (141). La première étape est la formation d'un complexe entre l'amphotéricine B et la DSPG qui permet alors de résoudre les problèmes de solubilité de l'amphotéricine B seule. A ce complexe, en solution dans un mélange chloroforme/méthanol (1:1), sont ajoutés les autres lipides (HSPC et cholestérol). Cette solution lipidique est atomisée pour former une poudre homogène du mélange lipidique. Les liposomes sont ensuite formés par hydratation de cette poudre par une phase aqueuse contenant du lactose puis homogénéisés par microémulsification. Les liposomes ainsi formés sont conservés par lyophilisation grâce à la présence de lactose qui permet leur stabilisation. Le lyophilisat est reconstitué extemporanément. Les liposomes obtenus contiennent ainsi l'amphotéricine B intercalée dans la bicouche lipidique.

Plusieurs essais cliniques ont comparé l'efficacité et la toxicité de l'amphotéricine B sous sa forme liposomale ou non (138). Un essai clinique conduit dans le traitement d'induction de l'histoplasmosse chez des patients sidéens, a montré une meilleure efficacité pour Ambisome<sup>®</sup> (88 % *versus* 64 %). Cet essai montre également une tolérance accrue pour Ambisome<sup>®</sup> avec seulement 9 % de néphrotoxicité contre 37 % pour l'amphotéricine B déoxycholate, ainsi qu'une meilleure tolérance à la perfusion (142). Un autre essai conduit dans la cryptococcose aiguë neuro-méningée du sidéen montre également une meilleure tolérance à la perfusion et significativement moins de néphrotoxicité (143). L'efficacité était cependant comparable entre l'amphotéricine B liposomale et conventionnelle.

## II.2. Utilisation en vaccinologie

Deux formes liposomales de vaccins sont actuellement commercialisées dans une quarantaine de pays (mais non présents sur le marché français). Il s'agit d'Epaxal<sup>®</sup> (Berna Biotech Ltd, Berne, Suisse) un vaccin contre l'hépatite A commercialisé pour la première fois en 1994 en Suisse et Inflexal<sup>®</sup>V (Berna Biotech Ltd) un vaccin antigrippal autorisé en 1997 en Suisse.

Ces vaccins reposent sur la technologie des virosomes. Les virosomes sont des liposomes présentant des protéines virales intercalées entre les phospholipides de leur bicouche lipidique. Les virosomes sont dépourvus du matériel génétique des virus, ils sont en conséquence dans l'impossibilité de se répliquer ou de provoquer une infection, mais sont capables de fusionner avec les cellules par l'intermédiaire des protéines virales à leur surface, notamment via les neuraminidases purifiées du virus grippal. Les virosomes ont en effet de réelles propriétés mimétiques des membranes virales.

Les virus inactivés utilisés dans la composition des vaccins sont peu immunogènes et nécessitent d'être associés à des adjuvants pour entraîner une réponse immunitaire efficace et durable. Les adjuvants les plus connus et les plus utilisés sont les sels d'aluminium sur lesquels le virus inactivé est adsorbé. Les sels d'aluminium provoquant une réponse inflammatoire locale au point d'injection confèrent ainsi les propriétés immunogènes du vaccin en recrutant les cellules de l'immunité.

Les virosomes constituent un autre type d'adjuvant avec la propriété de présenter naturellement les antigènes qu'ils portent aux cellules compétentes de l'immunité (lymphocyte B, cellules dendritiques) sans induire de réponse inflammatoire non spécifique. Les virosomes sont ainsi capables d'induire des réponses hautement immunogènes en conférant une protection immunitaire à long terme (144).

### II.2.1. Epaxal<sup>®</sup>

L'obtention des virosomes d'Epaxal<sup>®</sup> consiste dans un premier temps à obtenir des SUV d'environ 150 nm constituées de phosphatidylcholine et phosphatidyléthanolamine entre lesquels se sont intercalées les glycoprotéines obtenues après purification du virus de la grippe (hémagglutinine et neuraminidase). Ces virosomes constituent alors l'adjuvant sur lequel le virus inactivé de l'hépatite A va être absorbé dans un deuxième temps (145).

L'injection d'Epaxal<sup>®</sup> conduit alors à une excellente immunostimulation sans induire de réponse inflammatoire non-spécifique au site d'injection (146). Un essai clinique conduit chez des enfants de 6 mois à 7 ans a montré une séroconversion à 100 % après la vaccination primaire chez des enfants présentant des anticorps maternels ou non (144). A contrario le taux de séroconversion après la première vaccination par Havrix<sup>®</sup> (vaccin de l'hépatite A contenant des sels d'aluminium comme adjuvant) chez des enfants avec des anticorps maternels préexistants n'était que de 67,7% ; la

séroconversion complète n'étant obtenue qu'après la dose de rappel. Epaxal<sup>®</sup> est par ailleurs bien toléré chez les enfants que ce soit après la vaccination primaire ou la dose de rappel.

### **II.2.2. Inflexal<sup>®</sup>V**

Inflexal<sup>®</sup>V, également commercialisé sous le nom d'InfectoVac<sup>®</sup>Flu en Allemagne, d'Isiflu<sup>®</sup>V en Italie et de Viroflu<sup>®</sup> au Royaume-Uni est le seul vaccin antigrippal autorisé pour toutes les classes d'âge. Comme pour tout vaccin antigrippal, il répond aux recommandations annuelles de l'OMS (Organisation mondiale de la Santé) et de l'EMA sur les trois souches endémiques que doivent contenir les vaccins (147). Le vaccin est alors constitué de trois pools de virosomes contenant chacun les protéines de surface (hémagglutinines et neuraminidases) de chacune des souches recommandées. Chaque pool contenant une souche du virus grippal est préparé et analysé séparément. Le virus est tout d'abord obtenu sur culture d'œuf avant d'être inactivé par la bêta-propiolactone. Les protéines de surfaces purifiées (30 %) du virus sont ensuite mélangées à la phosphatidylcholine (70 %) pour obtenir les virosomes d'environ 150 nm. Les trois pools de virosomes sont ensuite mélangés constituant le lot final (148). Contrairement à Epaxal<sup>®</sup> qui nécessitait l'adsorption du virion de l'hépatite A, pour Inflexal<sup>®</sup>, le virosome en lui-même constitue le vaccin puisqu'il présente déjà à sa surface la neuraminidase, antigène majeur du virus de la grippe.

Une étude menée par Kanra et al (149) compare l'immunogénicité et la tolérance d'Epaxal<sup>®</sup> et Fluarix<sup>®</sup> (vaccin grippal inactivé à virion fragmenté) chez des enfants de 6 mois à 6 ans. Cette étude montre une réponse immunitaire efficace pour les deux vaccins, avec une supériorité significative dans les taux de séroconversion et de séroprotection d'Epaxal<sup>®</sup> par rapport à Fluarix<sup>®</sup> chez les enfants non sensibilisés. Par ailleurs les deux vaccins sont bien tolérés.

Ces formes liposomales constituent une bonne alternative aux adjuvants à bases de sels d'aluminium actuellement présents dans la majorité des vaccins commerciaux.

Bien que ce nouveau type de vaccination par virosomes ne soit pas en mesure d'aboutir systématiquement à une protection immunitaire supérieure à celle obtenue par un vaccin classique, cette nouvelle approche utilisant le liposome comme adjuvant joue un rôle important dans la prévention de la morbidité pouvant être associée à la vaccination.

D'autres pathologies que la grippe et l'hépatite A ont fait l'objet d'essais cliniques évaluant des vaccins à base de liposomes. On retrouve alors des études relatives à la vaccination contre l'hépatite B (150), la malaria (151) ou encore la méningite (152).

A cette vaccination préventive utilisant des liposomes en infectiologie, s'ajoute également des protocoles de vaccinothérapie en cancérologie, avec la spécialité Stimuvax<sup>®</sup>, actuellement en cours d'évaluation clinique (153,154).

### **II.3. Utilisation en analgésie : DepoPur<sup>®</sup>, Exparel<sup>®</sup>**

DepoPur<sup>®</sup> et Exparel<sup>®</sup> sont deux formulations utilisées en analgésie et basées sur la technologie de liposomes à libération prolongée DepoFam<sup>®</sup> (124). Ces liposomes ont donc la même formulation que ceux de Dépocyt<sup>®</sup> utilisés en cancérologie pour l'encapsulation de la cytarabine.

DepoPur<sup>®</sup> a été autorisé en 2004 par la FDA et en 2006 en Angleterre, par la MHRA (Medicines and Health care products Regulatory Agency). DepoPur<sup>®</sup> est une formulation de liposomes à libération prolongée de sulfate de morphine destinée à l'administration d'une dose unique, par voie péridurale au niveau lombaire, pour le traitement de la douleur après une intervention chirurgicale importante. DepoPur<sup>®</sup> est administré avant la chirurgie ou lors de césarienne après clampage du cordon ombilical. Ces liposomes ont montré une analgésie supérieure et prolongée en comparaison à l'injection épidurale de morphine conventionnelle, par exemple en cas de césarienne (155) ou de chirurgie abdominale basse (156). L'utilisation de DepoPur<sup>®</sup> nécessite en effet moins de médication supplémentaire pour les accès douloureux paroxystiques sans entraîner d'augmentation significative d'effets indésirables.

Exparel<sup>®</sup> est quant à lui une formulation liposomale de bupivacaïne, anesthésique local, approuvé par la FDA en 2011. Cette formulation liposomale à libération prolongée a montré comme pour DepoPur<sup>®</sup> un pouvoir analgésiant efficace. Exparel<sup>®</sup> est notamment indiqué pour l'analgésie postopératoire des ostéotomies et hémorrhoidectomies. Il est administré en per-opératoire en injection lente par infiltration dans les tissus mous entourant la résection chirurgicale (157). Exparel<sup>®</sup> est aussi actuellement évalué dans d'autres indications avec plusieurs essais cliniques en cours.

### **II.4. Utilisation en ophtalmologie : Visudyne<sup>®</sup>**

Visudyne<sup>®</sup> est un médicament à base de liposomes constitués de phosphatidylglycérol d'œuf (EPG) et de DMPC avec un rapport molaire 3:5. Le principe actif encapsulé dans ces liposomes est la vertéporfine. La vertéporfine est un agent photo-sensibilisant, qui lorsqu'elle est activée par la lumière, engendre des agents cytotoxiques capables de provoquer des lésions conduisant à des occlusions vasculaires locales. La sélectivité de Visudyne<sup>®</sup> pour les tissus biologiques est basée, outre l'exposition lumineuse localisée, sur la capture et la rétention de la vertéporfine par les cellules à prolifération rapide et en particulier l'endothélium des néovaisseaux choroïdiens. Ce médicament a ainsi été autorisé par la FDA et l'EMA en 2000 pour la photothérapie dynamique en cas de néovascularisation choroïdienne dans la DMLA (dégénérescence maculaire liée à l'âge) et la myopie forte (158). Des essais cliniques ont en effet montré l'intérêt de Visudyne<sup>®</sup> (comparé à un placebo), avec une meilleure acuité visuelle, une meilleure sensibilité aux contrastes et de meilleurs résultats à

l'angiographie pour les patients traités par Visudyne<sup>®</sup>, en particulier dans les cas où la néovascularisation choroïdienne occupe au moins 50 % de la lésion (159).

L'intérêt d'une formulation liposomale pour ce traitement est d'ordre galénique. En effet la vertéporfine a tendance à s'auto-agréger dans les milieux aqueux ce qui diminue fortement sa biodisponibilité dans les systèmes biologiques. Il est alors important d'administrer la vertéporfine sous sa forme monomérique, c'est pourquoi elle a été encapsulée dans des liposomes pour une injection intraveineuse (160). Les lipides utilisés dans la formulation de ces liposomes leur confèrent une certaine fluidité avec des membranes facilement déstabilisées dans la circulation sanguine. La vertéporfine est alors rapidement libérée et transférée sur les lipoprotéines plasmatiques (notamment aux LDL, lipoprotéines de faible densité). Les LDL agissent alors à leur tour comme vecteur pour transporter la vertéporfine dans les sites de néovascularisation qui présentent une surexpression des récepteurs aux LDL (160,161).

### III. LIPOSOMES RADIOACTIFS EN CLINIQUE

L'utilisation de liposomes radiomarqués a déjà été envisagée chez l'homme avec la spécialité Vescan<sup>®</sup>, non commercialisée, mais qui a été utilisée dans le cadre d'essais cliniques pour l'imagerie en oncologie (162). Vescan<sup>®</sup> est une SUV non pégylée de 40 à 70 nm de diamètre composée de DSPC et de cholestérol (2:1), du ionophore A23187 et dont la phase aqueuse contient de l'acide nitrilotriacétique (NTA) permettant son marquage extemporané avec de l'<sup>111</sup>In par encapsulation. Après addition de tampon citrate de sodium 0,1 M et de l'activité désirée en <sup>111</sup>In, le marquage est réalisé par chauffage à 80°C pendant 30 min. Les taux d'encapsulation contrôlés par chromatographie à base de chélex sont supérieurs à 80 % et l'excès d'indium non encapsulé est ensuite chélaté par l'ajout d'une solution d'EDTA 0,1 M.

L'utilisation de Vescan<sup>®</sup> a débutée en 1984 et a été évaluée jusque dans des essais de phase III. Presque 400 patients ont ainsi pu être imagés incluant de nombreux types de tumeurs : carcinome du sein, poumon, tête et cou, prostate, colon, ovaires, col de l'utérus, thyroïde, reins, testicules, mélanome, sarcome et lymphome (163–166). Dans une étude de phase III, l'injection de 100 mg de lipides a permis par exemple la détection de 3 tumeurs sur 5 dans le cancer du sein (60 %), 10 sur 15 dans le cancer du poumon (67 %), 9 sur 9 dans des cancers "tête et cou" (100 %) et 5 sur 9 dans d'autres types de tumeurs (56 %), dont 83 % de tumeurs primitives et 65 % de métastases (166). Malgré une bonne spécificité, supérieure à 95 %, la sensibilité d'environ 70 % n'a pas permis de développer d'avantage cette spécialité pour laquelle l'objectif à atteindre était une sensibilité supérieure à 85 %.

Vescan<sup>®</sup> n'a donc pas été commercialisé mais a par contre ouvert la voie au développement et à la commercialisation d'autres spécialités liposomales dont DaunoXome<sup>®</sup> et Ambisome<sup>®</sup>. DaunoXome<sup>®</sup> est en effet directement dérivé de Vescan<sup>®</sup>, avec la même composition lipidique : DSPC et cholestérol (2:1), et a été approuvé dans de nombreux pays pour le traitement du Sarcome de Kaposi chez des patients atteints du SIDA (cf § I.1.2, p.61), tumeur qui avait pu être imagée par Vescan<sup>®</sup>.

Plus récemment, Harrington et *al.* ont également utilisé des liposomes radiomarqués et pégylés pour l'exploration de tumeurs solides à un stade avancé (167). Les liposomes utilisés sont composés d'HSPC, de cholestérol et de DSPE-PEG<sub>2000</sub> (56,2:38,3:5,3) et dont la phase aqueuse contient du DTPA. Le marquage est alors réalisé par incubation des liposomes à température ambiante pendant 1 h avec une solution d'oxine d'<sup>111</sup>In. L'excès d'indium non encapsulé est complexé par l'ajout d'une solution d'EDTA. L'efficacité de marquage moyenne obtenue est de 95 %. Dans cette étude, ces liposomes marqués à l'<sup>111</sup>In ont été utilisés chez 17 patients et des images positives ont été obtenues pour 15 d'entre eux. Les taux d'accumulation tumorale maximums ont été obtenus dans les cancers tête et cou (33,0 ± 15,8 % DI/kg), les cancers pulmonaires ont montré des taux intermédiaires (18,3 ±

5,7 % DI/kg) et les taux les plus faibles ont été obtenus pour les cancers du sein ( $5,3 \pm 2,6$  % DI/kg). Ces taux de captation tumorale élevés ont conduit les auteurs à conclure à l'intérêt que pourrait avoir les liposomes pégylés contenant des émetteurs  $\beta^-$ , pour des applications thérapeutiques, en particulier dans les cancers tête et cou.

## ***CONCLUSION***

---

Cette première partie a permis d'appréhender la place que pouvait avoir les liposomes dans l'arsenal thérapeutique. En effet, avec une dizaine de spécialités bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché, et bien plus encore en recherche médicale, les liposomes constituent une véritable réalité clinique. Cette réalité est renforcée par les avancées considérables ayant eu lieu au niveau de la préparation des liposomes qui témoignent bien de leur attrait pour l'industrie pharmaceutique. Le développement de ces procédés de fabrication tend en effet vers la production continue de gros volumes, avec de nombreux efforts pour répondre aux qualités pharmaceutiques requises par les BPF et les GMP.

Outre la réalité clinique des liposomes, ce premier chapitre permet également de mettre en évidence le potentiel technologique de ces petites vésicules. Les liposomes sont en effet bien plus que de simples vecteurs de médicaments, mais permettent aussi de répondre à différentes problématiques.

La première et principale problématique à laquelle ont répondu les liposomes a été l'optimisation de l'index thérapeutique de nombreux anticancéreux en diminuant leur toxicité, ce qui a été le cas par exemple pour les anthracyclines. La baisse significative des toxicités est alors traduite par l'obtention de doses maximales tolérées plus fortes (ex : Marqibo<sup>®</sup>, LEP-ETU...) ce qui a alors conduit dans certains cas à une efficacité accrue. L'augmentation du pouvoir thérapeutique de ces formulations liposomales est également obtenue par la modification de la biodisponibilité et de la pharmacocinétique avec une accumulation privilégiée au sein des tumeurs, grâce à l'effet EPR.

Une autre problématique que les liposomes ont résolue est la libération prolongée d'une molécule. Cela a été démontré avec les liposomes DepoFoam<sup>®</sup> permettant de diminuer la fréquence d'administration et pouvant conduire à une augmentation du taux de réponse (ex : Dépocyte<sup>®</sup>).

Les liposomes permettent également de répondre à des problèmes d'ordre galénique. C'est effectivement le cas pour Ambisome<sup>®</sup> avec l'amphotéricine B très peu soluble dans l'eau, le paclitaxel permettant de s'affranchir du Crémophor EL<sup>®</sup> utilisé dans ses formulations non liposomales, ou encore la vertéporfine qui n'est commercialisée que sous forme liposomale pour le traitement de la DMLA.

Un autre potentiel présenté ici est celui de substitut aux adjuvants classiques des vaccins. En effet, les liposomes sont capables de présenter naturellement des antigènes aux cellules compétentes de l'immunité, permettant ainsi de s'affranchir par exemple des sels d'aluminium (ex : Inflexal<sup>®</sup>, Epaxal<sup>®</sup>).

Tout le potentiel des liposomes mis en évidence ci-dessus réside dans la grande flexibilité des formulations, et les quelques médicaments présentés auparavant permettent de se rendre compte de l'importance du développement galénique à mettre en œuvre pour chaque application. Pour des applications anticancéreuses par voie intraveineuse, il sera important de privilégier des phospholipides à haute  $T_m$  et d'introduire du cholestérol pour favoriser la stabilité des liposomes. Dans le même sens, il faudra également favoriser des liposomes de petites tailles et l'utilisation de lipides pégylés pour prolonger les temps de circulation et permettre l'extravasation au sein des tumeurs par l'effet EPR. Comme nous avons pu également le voir, pour parvenir à des libérations prolongées dans le temps, il faudra plutôt favoriser de gros liposomes multivésiculaires. Dans le cas de Visudyne<sup>®</sup>, le choix de phospholipides a été orienté au contraire pour permettre une libération rapide de la vertéporfine avec une bicouche lipidique très fluide sans cholestérol plutôt qu'une bicouche rigide.

L'intérêt des liposomes ne se limite pas à ce qui existe déjà en clinique, mais de nombreuses perspectives concernant leur utilisation thérapeutique font l'objet d'une multitude de travaux de recherche au niveau préclinique. Les liposomes sont effet très étudiés pour des utilisations en thérapie génique grâce aux liposomes cationiques appelés lipoplexes qui permettent la transfection de gènes (168). Les liposomes sont également évalués en imagerie, avec des agents de contraste, des radionucléides émetteurs gamma, ou encore avec des émetteurs de positons (79,169). De nouveaux types de liposomes sont également en cours de développement permettant une libération spécifique de leur contenu sous l'effet de la chaleur (liposomes thermosensibles comme ThermoDox<sup>®</sup>), du pH (170) ou encore des ultrasons (171).

Les liposomes actuellement sur le marché en oncologie sont tous basés sur la vectorisation d'agent de chimiothérapie. Mais il est également possible d'envisager l'utilisation des liposomes rendus immunospécifiques pour de la radioimmunothérapie en encapsulant des radionucléides d'intérêt thérapeutique comme il l'a été suggéré par Harrington *et al.* suite l'utilisation clinique de liposomes pégylés radiomarqués pour la détection des tumeurs (cf § III, p.71) (167). La RIT est en effet un autre domaine dans lequel les liposomes sont retrouvés. C'est cet exemple de recherche préclinique qui sera spécifiquement développé dans la deuxième partie de ce mémoire, avec une étude d'optimisation du ciblage tumoral par des liposomes immunospécifiques doublement radiomarqués.

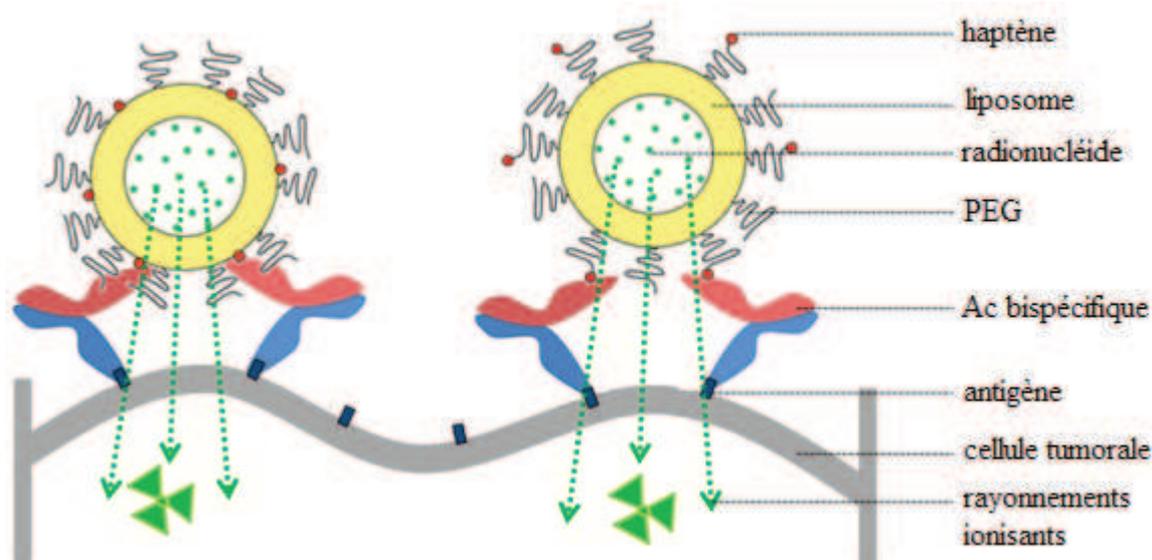
## **PARTIE EXPERIMENTALE :**

Optimisation du ciblage tumoral avec des liposomes radiomarqués et vectorisés par une technique de préciblage en deux temps pour des applications en radioimmunothérapie

## OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

---

L'utilisation de liposomes comme vecteurs de radioactivité a déjà été décrite essentiellement à des fins diagnostiques, y compris chez l'homme (162,167), mais également thérapeutiques dans des études pré-cliniques (172–174). Dans ce travail de recherche, nous proposons d'utiliser des liposomes pour optimiser la RIT des tumeurs solides avec un système de ciblage en deux étapes comme celui décrit dans l'AES. Le principal intérêt des liposomes est ici de véhiculer des activités spécifiques supérieures aux AcM ou aux haptènes radiomarqués, ce qui devrait permettre d'augmenter les doses délivrées aux cellules tumorales. Les liposomes permettent en effet l'encapsulation d'un grand nombre de noyaux radioactifs à l'intérieur des vésicules et peuvent également être radiomarqués en surface au niveau de la bicouche lipidique. Il est alors envisageable d'utiliser des radioisotopes à visée thérapeutique et d'imaginer un système de ciblage analogue à celui utilisé dans l'AES comme le montre la *Figure 12*. Les buts recherchés à l'utilisation des liposomes pour la RIT sont l'augmentation de l'avidité du fait de la multiplicité des liaisons liposomes / cellules cibles, et l'augmentation de la dose délivrée à la tumeur grâce au nombre potentiellement élevé de noyaux radioactifs portés par les liposomes. Par ailleurs, le marquage par encapsulation de petites molécules radiomarquées hydrosolubles, devrait également permettre, après métabolisation des liposomes, une élimination rapide de la radioactivité afin de limiter l'irradiation non spécifique.



**Figure 12** : Principe de la radioimmunothérapie en deux temps avec un anticorps bispécifique et des liposomes fonctionnalisés

Le principal intérêt de ce travail est d'optimiser cette nouvelle stratégie thérapeutique anti-tumorale, basée sur l'utilisation de liposomes radiomarqués et capables de cibler les cellules tumorales de façon spécifique. Des liposomes pégylés ont déjà donné des résultats satisfaisants en termes de stabilité et de pharmacocinétique mais notre objectif est d'augmenter le ciblage tumoral. Cette étude sera réalisée sur un modèle de souris greffées avec une lignée d'adénocarcinome colique humain (LS174T) exprimant l'antigène carcino-embryonnaire (ACE), en utilisant une technique de préciblage en 2 temps à l'aide d'un anticorps bispécifique hMN14x734 (anti-ACE x anti-complexe DTPA-indium) et d'un haptène DTPA-indium couplé à la surface des liposomes. La reconnaissance de l'haptène à la surface des liposomes par l'anticorps est essentielle à cet égard, tout comme le temps de circulation des liposomes *in vivo*. La pégylation des liposomes est déterminante pour ces deux aspects que sont l'affinité Ac-liposomes et la demi-vie des liposomes. Elle permet en effet d'augmenter les temps de circulation en rendant les liposomes « furtifs » mais de l'autre, elle peut entraver la reconnaissance de l'haptène par l'Ac. Cette étude d'optimisation sera donc essentiellement basée sur la formulation des liposomes en étudiant l'impact de la pégylation sur l'affinité Ac/liposomes et sur les paramètres pharmacocinétiques, ces deux paramètres jouant un rôle important sur l'efficacité du ciblage tumoral. L'immunospécificité du ciblage sera ensuite testée *in vitro* avant de tester les meilleures formulations sur le modèle animal décrit plus haut.

Ce travail, réalisé au sein du laboratoire de recherche de l'équipe 13 « Recherche en Oncologie Nucléaire » de l'unité Inserm UMR 892 CNRS 6299 à Nantes, s'articule alors en trois chapitres dont les principaux objectifs sont les suivants :

### **1) Préparation et marquage des liposomes**

Ce premier chapitre présente les pré-requis nécessaires aux expérimentations des chapitres suivants, à savoir la préparation et le radiomarquage des différentes formulations qui seront utilisées par la suite.

#### **➤ Préparation des différentes formulations de liposomes**

L'objectif est d'obtenir différentes formulations de liposomes variant au niveau de leur degré de pégylation, en jouant sur les longueurs de chaînes de PEG et sur leur densité à la surface des liposomes. En fonction des formulations, la localisation de l'haptène sera également envisagée soit directement sur la bicouche lipidique, soit à l'extrémité des chaînes de PEG.

#### **➤ Double marquage des liposomes à l'<sup>111</sup>In et à l'<sup>125</sup>I**

Un double marquage en une seule étape sera réalisé sur les liposomes préformés. Le radiomarquage a été envisagé de deux manières différentes. La première consiste à marquer la paroi des liposomes à l'<sup>111</sup>In par l'intermédiaire d'un agent chélatant, le DTPA couplé de façon covalente à un phospholipide membranaire. La seconde consiste à incorporer dans la phase aqueuse des liposomes un réactif radioiodé (le réactif de Bolton-Hunter) par une technique d'encapsulation active. Ce double marquage permettra par la suite de suivre le devenir et l'intégrité des liposomes *in vivo*.

## 2) Caractérisation des différentes formulations

Dans le but de sélectionner les formulations les plus favorables au ciblage tumoral, différentes études de caractérisation seront réalisées :

### ➤ **Evaluation *in vitro* de l'affinité entre les liposomes fonctionnalisés et l'anticorps.**

La reconnaissance de l'haptène par l'anticorps sera analysée *in vitro* par résonance plasmonique de surface avec le BIAcore®. Les affinités liposome/anticorps seront ainsi déterminées pour chacune des formulations préparées, la corrélation avec le degré de pégylation des liposomes sera étudiée.

### ➤ **Etude pharmacocinétique**

Des études pharmacocinétiques *in vivo* seront réalisées pour chaque formulation, et permettront de déterminer le temps de circulation des liposomes en lien avec leur pégylation.

### ➤ **Etude de l'interaction cellulaire des liposomes *in vitro***

L'analyse *in vitro* de l'interaction cellulaire sera évaluée par microscopie de fluorescence afin d'étudier l'immunospécificité du système de ciblage en deux temps ainsi que l'internalisation des liposomes dans les cellules.

## 3) Biodistribution et ciblage tumoral

Les études de biodistribution et de ciblage tumoral ne seront réalisées qu'après avoir déterminé les formulations les plus intéressantes sur la base des données d'affinité du BIAcore® et des demi-vies plasmatiques obtenues.

### ➤ **Biodistribution**

Ces études seront réalisées dans l'objectif d'évaluer la biodistribution générale des liposomes, la faisabilité du ciblage tumoral *in vivo* ainsi que son immunospécificité.

### ➤ **Etude statistique**

Afin de comparer les formulations entre-elle, une étude statistique sera réalisée.

### ➤ **Etude dosimétrique**

Une étude dosimétrique sera présentée afin d'évaluer la faisabilité de l'utilisation des liposomes en RIT.

# **CHAPITRE I :**

## **PREPARATION ET MARQUAGE DES LIPOSOMES**

---

Le premier chapitre de cette partie expérimentale permet de présenter les pré-requis nécessaires aux expérimentations des chapitres suivants, c'est-à-dire la préparation et le contrôle des différentes formulations de liposomes ainsi que leur radiomarquage. Les protocoles expérimentaux utilisés au sein de ce premier chapitre ont été préalablement mis au point et optimisés au sein du laboratoire, notamment pour ce qui concerne le marquage des liposomes à l' $^{125}\text{I}$  par encapsulation passive (51,175–177).

### **I. PREPARATION DES LIPOSOMES**

#### **I.1. Matériels et méthodes**

##### **I.1.1. Matières premières**

La DSPC (distéaroyl phosphatidylcholine), le cholestérol, l'arginine et l'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) ont été fournis par le laboratoire Sigma-Aldrich. La DSPE-PEG-1000 ou 2000 (distéaroyl phosphatidyléthanolamine couplée à différentes longueurs de chaînes de polyéthylène glycol) et la DPPE-rhodamine (dipalmitoyl phosphatidyléthanolamine couplée à de la rhodamine) proviennent du laboratoire Avanti Polar Lipids ; tout comme le mini-extrudeur et le matériel associé utilisé pour la calibration des liposomes. La DSPE-DTPA (distéaroyl phosphatidyléthanolamine couplée à l'acide diéthylène-triamine-pentaacétique) et la DSPE-PEG<sub>2000</sub>-DTPA (DSPE-PEG-2000 avec l'acide diéthylène-triamine-pentaacétique couplé à l'extrémité des chaînes de PEG) ont été synthétisés par l'Ecole Nationale de Chimie de Rennes. Pour les liposomes fluorescents, la FITC provient du laboratoire Sigma-Aldrich.

Les solvants sont obtenus chez Fischer Scientific, le chloroforme est de qualité « réactif analytique » (présence de métaux résiduels : Pb < 0,001 ppm, Cu < 0,001 ppm, Ca : 0,001 ppm, Fe : 0,002 ppm) et le méthanol est de qualité « HPLC » (sans résidu détecté après évaporation).

## I.1.2. Formulations

Les liposomes sont principalement constitués de phospholipides. Pour une bonne stabilité, ils doivent également contenir un minimum de 30 % de cholestérol (53). Les phospholipides utilisés sont des dérivés de la phosphatidylcholine (PC) et de la phosphatidyléthanolamine (PE) dont la fonction amine terminale permet le couplage d'autres molécules comme des polymères de polyéthylène glycol (PEG), des haptènes, des agents chélatants... Les liposomes préparés ici contiennent notamment du DTPA (acide diéthylène-triamine-pentaacétique) couplé à de la PE. Le DTPA est alors utilisé comme agent chélatant permettant le marquage de la surface des liposomes avec l'indium-111 ( $^{111}\text{In}$ ). Une fois complexé à l'indium, le DTPA-In constitue également l'haptène reconnu spécifiquement par un anticorps : l'anticorps 734. Pour les études *in vitro* de microscopie, des liposomes doublement fluorescents ont également été préparés avec notamment de la rhodamine couplée à de la PE, et utilisée comme traceur de la bicouche lipidique. La phase aqueuse a dans ce cas également été tracée avec de la fluorescéine couplée à de l'arginine.

Les longueurs de chaînes d'acide gras doivent être homogènes. Des phospholipides à longues chaînes carbonées (18 carbones) et insaturées ont été choisis pour la formulation des liposomes avec la DSPC et la DSPE. Les températures de transition de phase ( $T_m$ ) de ces phospholipides sont respectivement de 55°C et 74°C.

### I.1.2.1. *Bicouche lipidique*

Différentes formulations de liposomes ont été préparées en faisant varier la longueur des chaînes de PEG ainsi que leur pourcentage. Des liposomes sans PEG dits « conventionnels » ont également été préparés. Par ailleurs, la localisation du DTPA et donc de l'haptène, varie en fonction de la formulation : l'haptène est soit directement couplé à la DSPE au niveau de la membrane lipidique (DSPE-DTPA), soit couplé à l'extrémité des chaînes de PEG (DSPE-PEG-DTPA). Des liposomes sans DTPA, par conséquent sans haptène, ont aussi été synthétisés.

La composition des différentes formulations de liposomes est répertoriée dans le *Tableau 8*. Ces liposomes sont constitués principalement de DSPC (62,0 à 68,0 % molaire) et de cholestérol (30,5 % molaire) pour assurer la rigidité de la bicouche lipidique à 37°C. Afin d'augmenter leur demi-vie *in vivo*, les liposomes contiennent également 1,5 à 6,0 % molaire de DSPE-PEG avec différentes longueurs de PEG (1000 ou 2000). Enfin, la fonctionnalisation des liposomes (reconnaissance spécifique par l'Ac 734) est obtenue en ajoutant 1,5 % molaire de DTPA sous forme de DSPE-DTPA ou DSPE-PEG-DTPA. Les liposomes témoins sont représentés par les liposomes non pégylés (ou "Conventionnels") et les liposomes non fonctionnalisés ("PEG<sub>2000</sub> 5,0% sans DTPA").

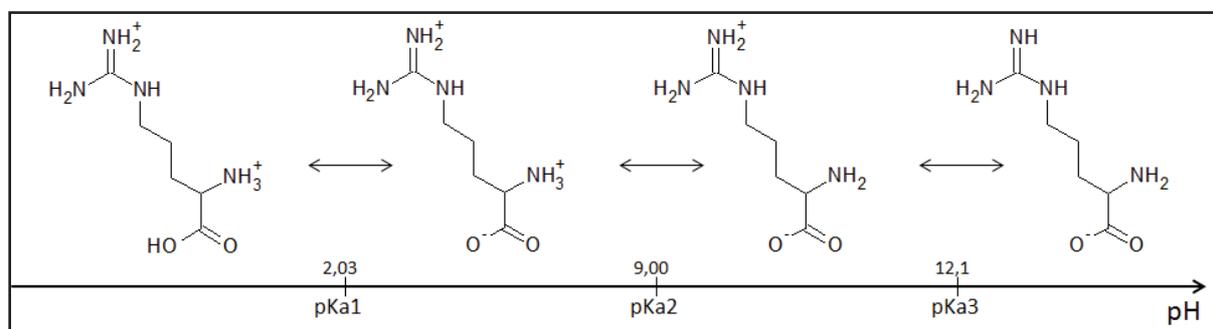
Pour les liposomes fluorescents, 0,5 % molaire de dipalmitoyl phosphatidyl-éthanolamine couplée à de la rhodamine (DPPE-rho) a été ajoutée.

FORMULATIONS		DSPC	Chol	DSPE-PEG	DSPE-DTPA	DSPE-PEG-DTPA
DSPC/Chol/DSPE-DTPA 68 : 30,5 : 1,5	Conventionnels	68,0%	30,5%	/	1,5%	/
DSPC/Chol/DSPE-PEG <sub>1000</sub> /DSPE-DTPA 65,5 : 30,5 : 2,5 : 1,5	PEG <sub>1000</sub> 2,5%	65,5%	30,5%	2,5%	1,5%	/
DSPC/Chol/DSPE-PEG <sub>1000</sub> /DSPE-DTPA 6 : 1,5	PEG <sub>1000</sub> 6,0%	62,0%	30,5%	6,0%	1,5%	/
DSPC/Chol/DSPE-PEG <sub>2000</sub> /DSPE-DTPA 66,5 : 30,5 : 1,5 : 1,5	PEG <sub>2000</sub> 1,5%	66,5%	30,5%	1,5%	1,5%	/
DSPC/Chol/DSPE-PEG <sub>2000</sub> /DSPE-DTPA 65,5 : 30,5 : 2,5 : 1,5	PEG <sub>2000</sub> 2,5%	65,5%	30,5%	2,5%	1,5%	/
DSPC/Chol/DSPE-PEG <sub>2000</sub> /DSPE-DTPA 63 : 30,5 : 5 : 1,5	PEG <sub>2000</sub> 5,0%	63,0%	30,5%	5,0%	1,5%	/
DSPC/Chol/DSPE-PEG <sub>2000</sub> /DSPE-PEG <sub>2000</sub> -DTPA 64,5 : 30,5 : 3,5 : 1,5	DTPA-PEG <sub>2000</sub> 5,0%	64,5%	30,5%	3,5%	/	1,5%
DSPC/Chol/DSPE-PEG <sub>2000</sub> 64,5 : 30,5 : 5	PEG <sub>2000</sub> 5,0% sans DTPA	64,5%	30,5%	5,0%	/	/
DSPC/Chol /DSPE-PEG <sub>2000</sub> /DSPE-PEG <sub>2000</sub> -DTPA/DPPE-rho 64,0 : 30,5 : 3,5 : 1,5 : 0,5	Fluorescents	64,0%	30,5%	3,5%	/	1,5%

**Tableau 8 :** Composition en % molaire des constituants de la bicouche lipidique pour les différentes formulations de liposomes préparés

### I.1.2.2. Phase aqueuse interne

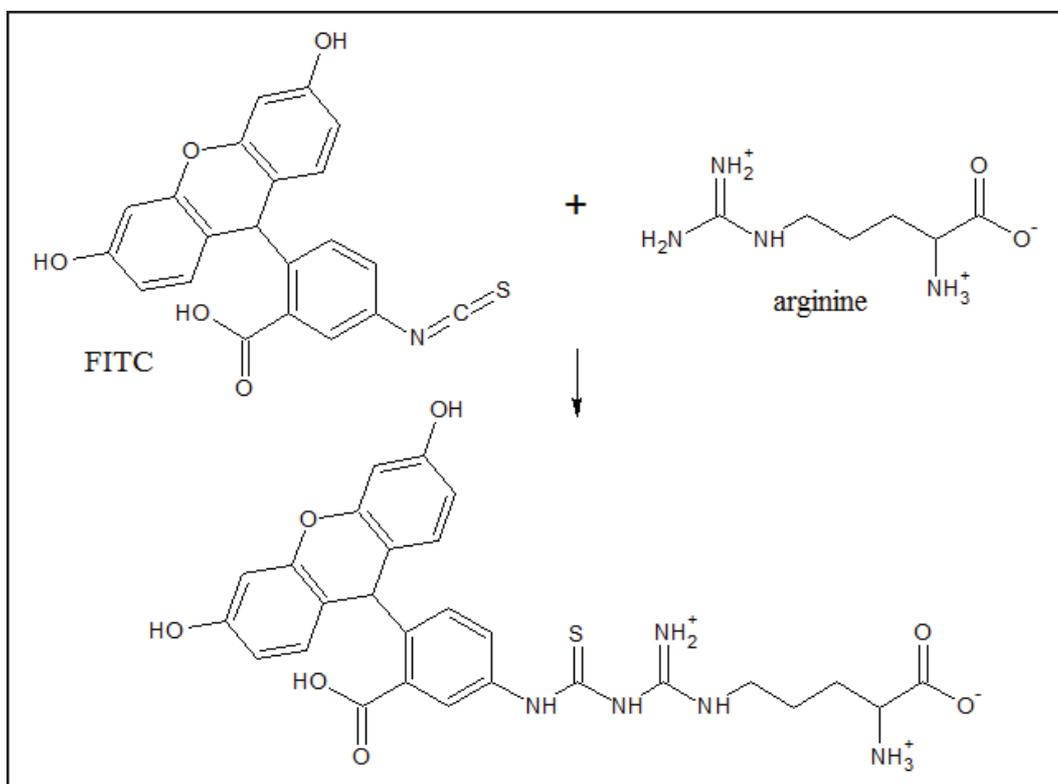
La phase aqueuse contient de l'arginine 80 mM en tampon HEPES 80 mM pH 8. L'arginine est une base faible présentant 3 pKa (2,03 ; 9,00 et 12,10 à 25°C (178)), elle est donc ionisée différemment selon le pH (*Figure 13*). A pH 8, l'arginine est ionisée tout en conservant une amine réactive utilisée pour le marquage à l'iode par encapsulation active (cf. § II.1.3, p.95).



**Figure 13 :** Ionisation de la molécule d'arginine en fonction du pH

La phase aqueuse des liposomes fluorescents contient également 20 mM environ de fluorescéine préalablement couplée à de l'arginine et encapsulée de façon passive lors de la

préparation des liposomes. Afin de permettre le couplage de l'arginine à la fluorescéine cette dernière est utilisée sous forme d'isothiocyanate (FITC). Le couplage est alors obtenu par la formation d'une thio-urée entre l'isothiocyanate et l'amine primaire réactive de l'arginine, comme le montre la *Figure 14* ci-dessous.



**Figure 14 :** Couplage de l'arginine à la FITC (isothiocyanate de fluorescéine)

Le couplage est réalisé en ajoutant directement la quantité nécessaire de FITC à la solution de phase aqueuse (80 mM d'arginine en tampon HEPES 80 mM pH 8). La FITC est ajoutée à un ratio 1 pour 4 arginines, soit à une concentration finale d'environ 20 mM. La solubilisation et le couplage sont obtenus par agitation du mélange pendant au moins une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Le contrôle du couplage est réalisé sur chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque de gel de silice (TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>) en acétate d'éthyle 100 %. Dans ces conditions la FITC-arginine reste au point de dépôt alors que la FITC sous forme libre ou hydrolysée migre.

### I.1.3. Préparation des liposomes

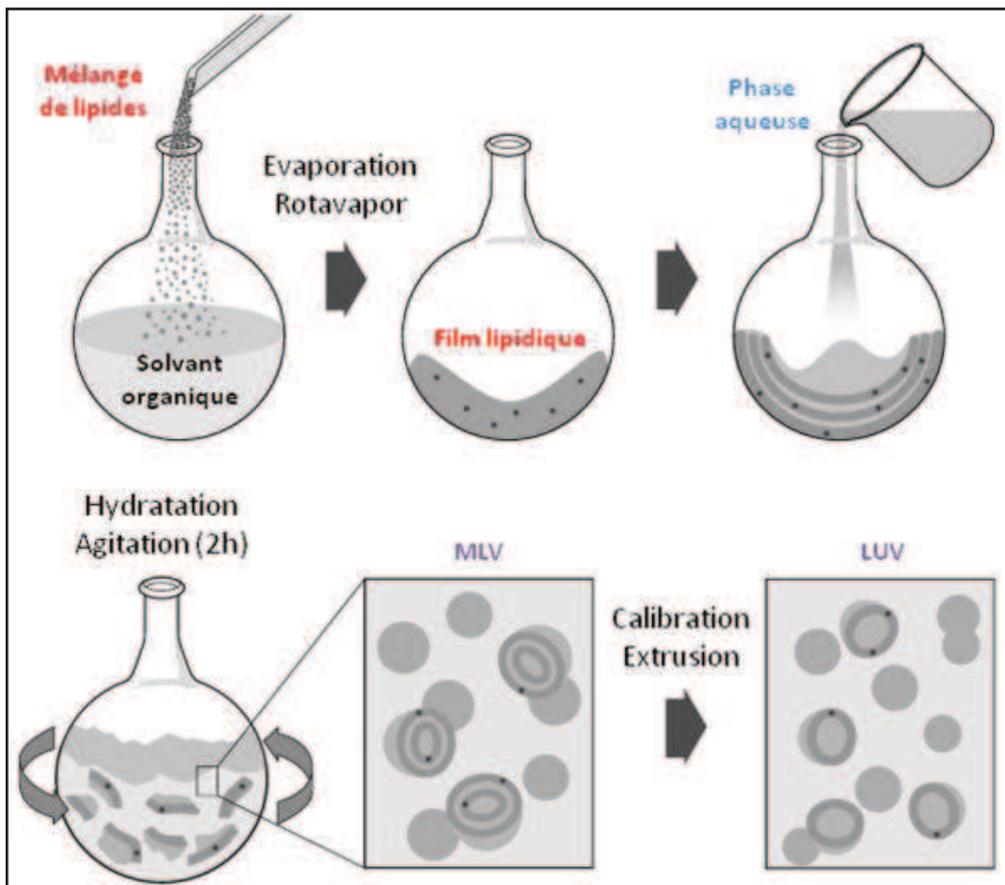
Les liposomes sont préparés selon la méthode de Bangham (cf § I.1, p.46) par hydratation d'un film lipidique (45), puis calibrés par extrusion.

### I.1.3.1. Formation du film lipidique

Chaque formulation de liposomes contient une quantité finale de lipides de 40  $\mu\text{mol}$ . Les rapports molaires de chaque formulation permettent de calculer la quantité nécessaire de chaque constituant de la bicouche lipidique. Pour chaque lipide, une quantité au moins égale à la masse désirée est exactement pesée dans un tube à hémolyse en verre de 5 mL, puis individuellement solubilisée par 1 mL d'un mélange chloroforme/méthanol 9:1 (v/v). Le volume correspondant à la masse exacte nécessaire de chaque lipide est ensuite prélevé et transféré dans un ballon en verre de 10 mL de façon à obtenir un mélange de lipides homogène.

Le solvant est ensuite évaporé grâce à un évaporateur rotatif sous vide (Rotavapor<sup>®</sup>, Buchi) pendant 30 min, permettant l'obtention d'un film lipidique sur les parois du ballon. L'homogénéité et la finesse du film lipidique sont contrôlées visuellement. En cas d'inhomogénéité du film lipidique, celui-ci est repris en chloroforme et le solvant est à nouveau évaporé sous vide.

### I.1.3.2. Hydratation du film lipidique



**Figure 15 :** Préparation des liposomes par hydratation d'un film lipidique ([http:// avantlipids.com](http://avantlipids.com))

Les liposomes sont ensuite formés par hydratation du film lipidique (Figure 15) par simple ajout de la phase aqueuse et une agitation vigoureuse. La phase aqueuse est préalablement chauffée et

l'agitation est maintenue à une température supérieure à la température de transition de phase ( $T_m$ ) du phospholipide ayant la  $T_m$  la plus élevée (DSPE :  $T_m = 74^\circ\text{C}$ ). Pour ce faire, après avoir ajouté 2 mL de phase aqueuse, le ballon est placé sous agitation grâce à un évaporateur rotatif sans vide. L'agitation est maintenue pendant 2h au bain-marie à  $75^\circ\text{C}$ - $80^\circ\text{C}$ . Des MLV (Multilamellar Large Vesicles) sont ainsi obtenues à une concentration lipidique finale de 20 mM.

Le ballon est pesé avant et après ajout de la phase aqueuse, puis après les 2 heures d'hydratation. Ces pesées permettent de déterminer le volume de phase aqueuse évaporé lors de l'hydratation et de recalculer la concentration lipidique exacte de la suspension de liposomes.

### I.1.3.3. Calibration des liposomes par extrusion

L'extrusion permet d'obtenir des LUV (Large Unilamellar Vesicles) de taille homogène. Cette méthode consiste à forcer une suspension de liposomes à travers un filtre de porosité bien définie afin d'obtenir des liposomes taille proche des pores du filtre. Elle doit être réalisée à une température supérieure à la  $T_m$  des phospholipides choisis, la fluidité de la bicouche lipidique favorisant le passage des liposomes à travers les filtres utilisés.

L'extrusion est réalisée à l'aide d'un mini-extruder<sup>TM</sup> (Avanti<sup>®</sup> Polar Lipids) placé sur une plaque chauffante à  $75^\circ\text{C}$  dont la température est contrôlée par un thermomètre. Deux seringues en verre de 1 mL sont positionnées de part et d'autre d'une membrane de polycarbonate permettant le passage répété des liposomes à travers cette membrane (Figure 16). Une membrane de 200 nm de porosité est utilisée avant la membrane de 100 nm de porosité afin de réduire une première fois la taille des MLV et d'éviter la destruction du filtre de 100 nm. Vingt passages successifs sont réalisés permettant l'obtention d'une suspension translucide et homogène de LUV d'environ 100 nm de diamètre moyen, qui sera contrôlé par granulométrie laser.



**Figure 16 :** Technique d'extrusion sur membrane de polycarbonate employant le Mini-extruder<sup>TM</sup> (Avanti<sup>®</sup> Polar Lipids)

## I.1.4. Purification des liposomes

### I.1.4.1. *Purification sur colonne Superdex<sup>®</sup> G200*

Les liposomes obtenus à l'issue de l'extrusion sont en suspension dans du tampon HEPES 80 mM à pH 8 contenant 80 mM d'arginine, et le cas échéant, de l'arginine-fluorescéine. Afin d'éliminer l'arginine et la fluorescéine non encapsulées dans les liposomes et de changer le pH externe des liposomes, ceux-ci sont purifiés par chromatographie d'exclusion-diffusion ou gel-filtration en tampon phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) 0,15 M pH 5,6. Un pH légèrement acide est en effet nécessaire au marquage à l'indium (cf. § II.1.2.1. p.92).

Cette purification est réalisée avec une colonne Superdex<sup>®</sup> G200 (24 mL, 10 x 300 mm, Amersham Pharmacia Biotech) branchée sur un système de chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplé à un spectrophotomètre UV. Le débit d'élution est fixé à 0,7 mL/min. Les liposomes sont recueillis en suivant les variations de l'absorbance à 220 et 280 nm. La durée totale de cette purification est de 30 min. Cette méthode est notamment choisie lorsque le marquage à l'<sup>125</sup>I est réalisé (cf. § II.1.3. p.95) afin d'éliminer correctement l'arginine non encapsulée (visible à 220 nm).

### I.1.4.2. *Purification sur colonne Sephadex<sup>®</sup> G25*

Une technique d'exclusion-diffusion plus rapide est utilisée pour changer la solution tampon dans laquelle se trouvent les liposomes (pour un marquage simple à l'<sup>111</sup>In par exemple) ou pour séparer la radioactivité libre de celle fixée aux liposomes après un radiomarquage. Il s'agit d'une technique de chromatographie par gravité avec les colonnes Sephadex<sup>®</sup> G-25 M (8,3 mL, 1,45 x 5,0 cm, colonne PD-10, GE Healthcare). Ces colonnes sont préalablement saturées avec 15 mL de PBS (phosphate buffered saline) contenant 0,5 % de BSA (bovine serum albumin) puis équilibrées par 20 mL du tampon d'élution. Les liposomes sont déposés sur la colonne sous un volume de 0,5 mL et l'élution est réalisée par fractions de 0,5 mL de tampon. Les liposomes sont recueillis en rassemblant les fractions d'élution qui apparaissent légèrement opalescentes. Après purification, les liposomes sont conservés entre 4 et 8°C.

## I.1.5. Contrôle des liposomes

### I.1.5.1. *Contrôle du pH*

Après purification des liposomes contenant de l'arginine, ceux-ci se conservent plusieurs semaines entre 4 et 8°C. Il est cependant nécessaire avant leur utilisation, notamment lors d'un marquage, de vérifier le pH des liposomes. Le pH est contrôlé par des bandelettes Acilit<sup>®</sup> pH-indicator strips pH 0 – 6, Merck Millipore (sensibilité de 0,5).

Pour le radiomarquage de la paroi des liposomes, le pH externe doit en effet être proche de 5,5 mais l'intérieur des liposomes étant à pH 8, il faut vérifier au cours du temps qu'un équilibre ne s'est pas produit entre l'intérieur et l'extérieur des liposomes et que l'arginine n'est pas ressortie.

### I.1.5.2. *Contrôle de la taille*

La taille des liposomes est mesurée après leur préparation, puis contrôlée systématiquement avant leur utilisation, pour vérifier qu'ils ne se sont pas désintégrés ni agglomérés au cours du temps.

La distribution de la taille des liposomes est évaluée par une technique de diffusion dynamique de la lumière (spectroscopie à corrélation photonique) grâce au granulomètre Malvern High Performance Particle Size (HPPS-ET, Instrument SA, UK). Cette méthode repose sur la mesure des fluctuations de la lumière diffusée par les particules soumises aux mouvements browniens (179,180). La suspension de liposomes est ici illuminée par un laser de 633 nm et la lumière diffusée par les liposomes est recueillie à 173°. Le mouvement brownien des particules dans un fluide dépend de leur taille. Les petites particules se déplacent plus vite que les grandes provoquant ainsi des fluctuations plus rapides de l'intensité de la lumière diffusée. L'analyse de ces fluctuations d'intensité permet de déterminer le coefficient de diffusion des particules, converti en taille de particules (diamètre moyen).

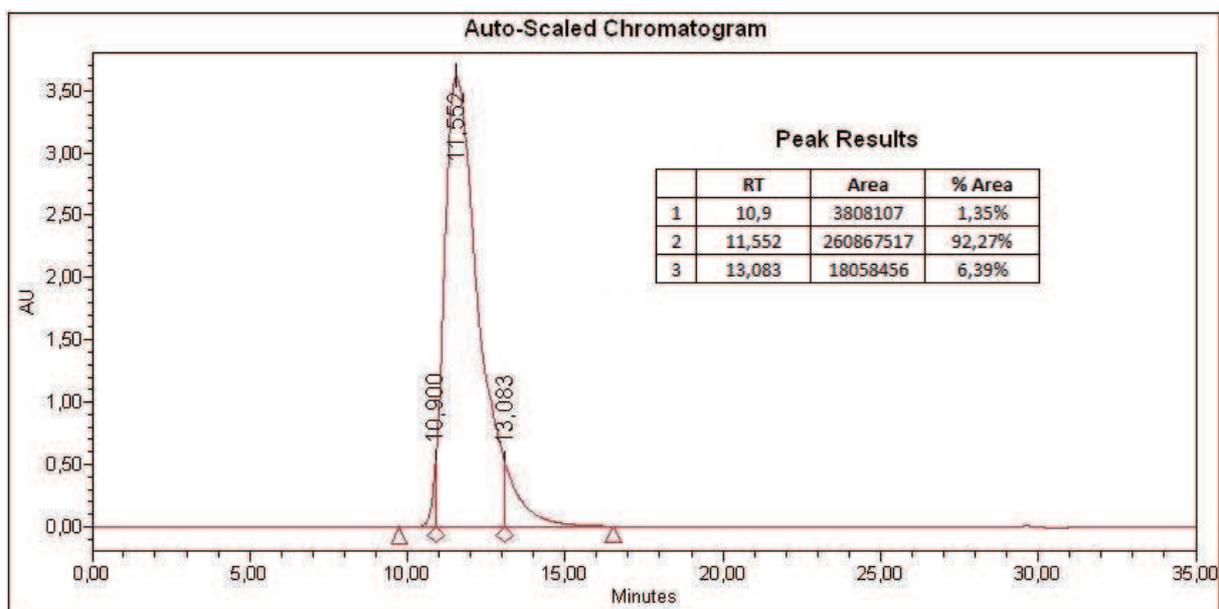
Les mesures sont réalisées en triplicate après dilution de la suspension de liposomes en PBS. Pour chaque mesure, environ 100 nmol de lipides sont diluées et homogénéisées dans 1,4 mL de PBS préalablement filtré (sur filtre 0,45 µm).

## I.2. Résultats

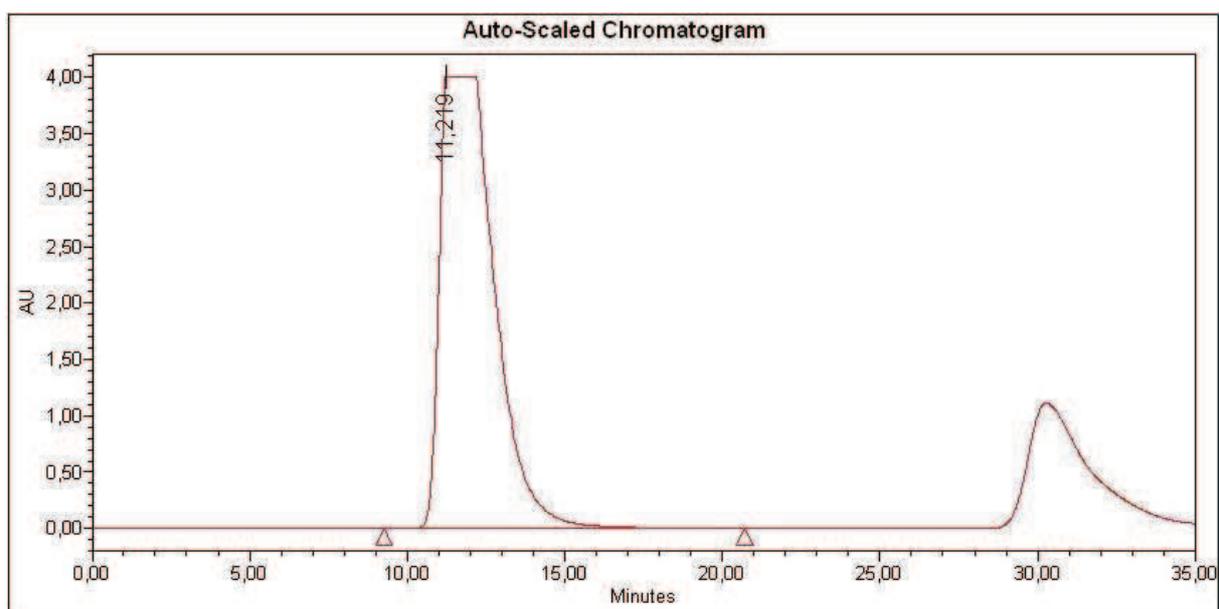
### I.2.1. Purification des liposomes

#### I.2.1.1. *Purification sur colonne Superdex<sup>®</sup> G200*

Les liposomes purifiés par système HPLC avec une colonne Superdex<sup>®</sup> G200, ont un volume de rétention compris entre 7,7 à 9,1 mL. Les liposomes recueillis pour ce volume de rétention représentent 92 % du pic des liposomes, comme le montre la *Figure 17* qui représente le profil d'élution des liposomes à 280 nm. La *Figure 18* montre quant à elle le profil d'élution à 220 nm, permettant de visualiser l'arginine non encapsulée avec un volume de rétention d'environ 21 mL. Les volumes de rétention des liposomes et de l'arginine correspondent bien aux volumes d'exclusion et de diffusion de la colonne qui sont respectivement de 7 mL et 22 mL (données fabricant).



**Figure 17 :** Profil chromatographique des liposomes à 280 nm sur colonne Superdex<sup>®</sup> G200 (élution en tampon phosphate 0,15 M pH 5,6 à un débit de 0,7 mL/min)



**Figure 18 :** Profil chromatographique des liposomes à 220 nm sur colonne Superdex<sup>®</sup> G200 (élution en tampon phosphate 0,15 M pH 5,6 à un débit de 0,7 mL/min). Mise en évidence de l'arginine non encapsulée.

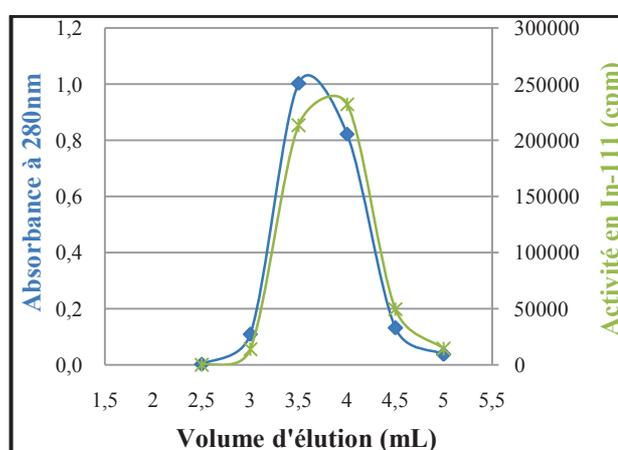
#### I.2.1.2. Purification sur colonne Sephadex<sup>®</sup> G25

Après purification sur colonne Sephadex<sup>®</sup> G25 (PD-10), les liposomes ont un volume de rétention compris entre 2,5 et 4,5 mL (*Figure 19*), ce qui correspond au volume d'exclusion de la colonne qui est de 3 mL (données fabricant). Leur présence est facilement décelable par l'opalescence générée et peut être vérifiée par l'analyse de l'absorbance de chaque fraction d'élution au Nanodrop<sup>®</sup>

ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) pour des liposomes « froids », ou par comptage de chaque fraction avec un compteur gamma pour des liposomes radiomarqués ou « chauds ». En recueillant ainsi la totalité des liposomes à partir de 2,5 mL et jusqu'à 4,5 mL d'éluion, les liposomes sont alors dilués dans 2 mL. Pour obtenir une suspension de liposomes plus concentrée, il est possible de recueillir uniquement les fractions d'éluion de 3 à 4 mL. Environ 90 % seulement des liposomes sont ainsi récupérés mais sous un volume de 1 mL.

Le *Tableau 9* montre un exemple d'analyse des fractions d'éluion au Nanodrop® ou au compteur gamma, permettant ainsi de calculer le pourcentage de liposomes récupérés entre 3 et 4 mL d'éluion. Les deux méthodes d'analyse donnent des résultats identiques.

Volume d'éluion (mL)	Absorbance à 280 nm	Activité en <sup>111</sup> In (cpm)
2,5	0,003	20
3,0	0,109	13823
3,5	1,003	213437
4,0	0,822	232320
4,5	0,131	49862
5,0	0,037	14436
Fraction récupérée de 3 à 4 mL		88,4%
Moyenne		87,9%



**Tableau 9 :** Analyse des fractions d'éluion sur colonne PD10 de liposomes froids par mesure de l'absorbance au Nanodrop®, et de liposomes marqués à l'<sup>111</sup>In par comptage au compteur gamma

**Figure 19 :** Profils d'éluion sur colonne Sephadex® G25 de liposomes froids en bleu (par analyse de l'absorbance au Nanodrop®), et de liposomes marqués à l'<sup>111</sup>In en vert (par comptage de l'activité au compteur gamma)

### I.2.2. Contrôle du pH

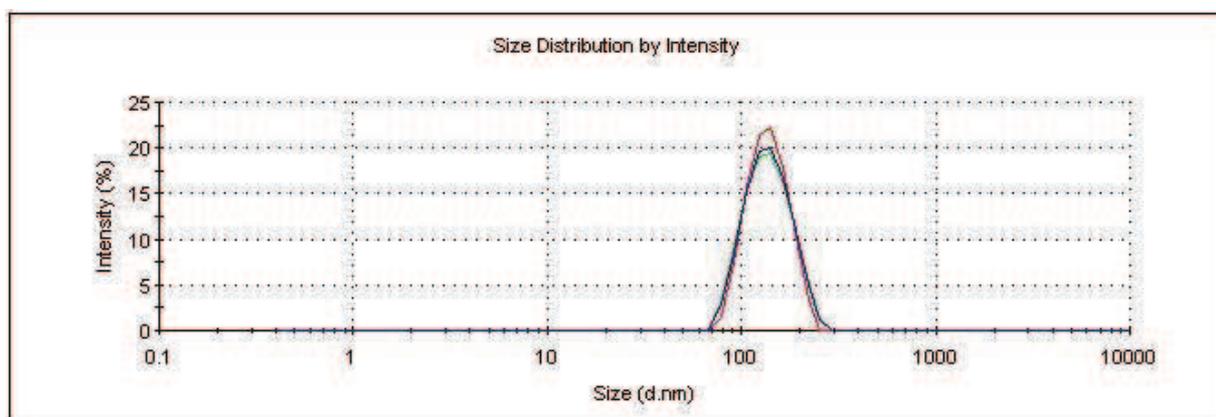
La purification des liposomes ayant pour but d'éliminer l'arginine libre et de changer le milieu externe des liposomes, notamment avec une modification du pH, il est nécessaire de contrôler ce pH. Il est égal à 8 avant purification et passe à 5,5 après changement de tampon et reste stable jusqu'à au moins 1 mois après purification.

### I.2.3. Contrôle granulométrique

Après extrusion des liposomes, la suspension de liposomes obtenue est translucide avec un reflet caractéristique témoignant de l'homogénéité de la taille des liposomes (effet Tyndall).

Leur analyse au granulomètre (Malvern HPPS) permet de connaître la distribution des liposomes en fonctions de leur taille (*Figure 20*) et de déterminer leur diamètre moyen (Z-average)

ainsi que l'index de polydispersité (Pdl) correspondant qui représente la distribution de taille d'une population de particules.



**Figure 20 :** Distribution des liposomes en fonction de leur taille. Résultats obtenus par granulométrie au Malvern High Performance Particle Size (HPPS)

La taille des liposomes a été déterminée en triplicate pour chaque formulation sur les solutions mères de liposomes (concentration lipidique : 20  $\mu\text{mol/mL}$ ) le jour de leur préparation, et contrôlée par une mesure après un mois de stockage à 4°C. Le diamètre des liposomes a également été contrôlé sur les solutions de liposomes purifiés en tampon phosphate (concentration lipidique : 2,5  $\mu\text{mol/mL}$ ) un mois après leur élution sur colonne Sephadex<sup>®</sup> G25. Les résultats obtenus sont reportés dans le *Tableau 10*.

Le diamètre moyen de toutes les formulations confondues, au moment de leur préparation, est de 105,5 nm ( $\pm$  6,4 nm), ce qui corrèle bien avec la porosité des membranes de polycarbonate utilisées pour l'extrusion. Excepté pour les liposomes conventionnels qui semblent un peu plus dispersés, l'index de polydispersité est inférieur à 0,1. Ces résultats témoignent de l'intégrité des liposomes et de l'homogénéité de leur taille après extrusion.

Un mois après leur préparation, le diamètre des liposomes pégylés reste inchangé (les différences observées sont inférieures à 5%) et l'index de polydispersité est toujours inférieur à 0,1, que ce soit pour les solutions mères concentrées ou les solutions diluées après chromatographie d'exclusion. Les liposomes pégylés sont donc stables un mois après leur préparation.

Une différence significative est néanmoins observée pour les liposomes conventionnels non pégylés. On observe en effet une augmentation du diamètre des liposomes de 9 % pour les liposomes dilués (2,5  $\mu\text{mol/mL}$  de lipides) et de 20 % pour les liposomes concentrés (20  $\mu\text{mol/mL}$  de lipides), accompagnée d'une augmentation de l'index de polydispersité.

Formulation	Mesure après préparation Solution mère 20 µmol/mL n = 3		Mesure après 1 mois (stockage à 4°C)			
	Z-Ave (nm)	PdI	Solution mère 20 µmol/mL n = 1		Solution purifiée 2,5 µmol/mL n = 1	
	Z-Ave	PdI	Z-Ave	PdI	Z-Ave	PdI
Conventionnels	115,2 ± 0,6	0,137 ± 0,023	144,3	0,360	126,0	0,226
PEG <sub>1000</sub> 2,5 %	111,2 ± 0,7	0,048 ± 0,034	113,6	0,019	112,6	0,073
PEG <sub>1000</sub> 6,0 %	95,4 ± 1,3	0,027 ± 0,011	97,3	0,005	96,7	0,033
PEG <sub>2000</sub> 1,5 %	105,5 ± 0,7	0,047 ± 0,031	104,8	0,088	105,5	0,026
PEG <sub>2000</sub> 2,5 %	108,1 ± 0,8	0,057 ± 0,003	109,5	0,028	109,8	0,027
PEG <sub>2000</sub> 5,0 %	102,8 ± 0,5	0,033 ± 0,012	104,3	0,047	106,2	0,067
DTPA-PEG <sub>2000</sub> 5,0 %	105,8 ± 0,2	0,092 ± 0,014	110,6	0,078	107,1	0,078
PEG <sub>2000</sub> 5,0 % sans DTPA	97,0 ± 1,9	0,030 ± 0,022	97,4	0,026	100,6	0,082

**Tableau 10 :** Diamètre moyen des liposomes (Z-Ave, nm) et Index de Polydispersité (PdI) avec écart-type pour les mesures en triplicate, obtenus par granulométrie au Malvern High Performance Particle Size (HPPS)

### I.3. Discussion

Comme nous avons pu le voir dans la partie bibliographique de ce manuscrit, les méthodes de préparation des liposomes sont nombreuses et peuvent aboutir à la formation de plusieurs types de vésicules différant par leur taille, leur structure et leur capacité d'encapsulation. Par la méthode d'hydratation d'un film lipidique suivie d'une extrusion, nous avons choisi une méthode de préparation simple, rapide et reproductible permettant d'obtenir des petites quantités de liposomes (SUV) adaptées à l'échelle expérimentale en laboratoire. Cette méthode présente néanmoins l'inconvénient d'utiliser des solvants dont la teneur résiduelle devrait être contrôlée pour une utilisation clinique, mais bien d'autres méthodes s'affranchissant de l'utilisation de solvants peuvent être utilisées pour une production à l'échelle industrielle.

Nous avons choisi de calibrer nos liposomes à 100 nm qui est la taille la plus appropriée pour envisager une application *in vivo*. La taille des liposomes est en effet primordiale puisqu'elle va modifier directement le temps de circulation des liposomes : plus les liposomes seront gros, plus ils seront pris en charge rapidement par le système réticulo-endothélial et majoritairement par la rate. La taille influe également sur l'accumulation tumorale en jouant sur la perméation à travers les

microvaisseaux tumoraux et leur rétention au sein de la tumeur. D'après la littérature, la taille optimale est située entre 100 et 200 nm (181).

Les phospholipides entrant dans la formulation des liposomes préparés lors de cette étude, sont des lipides à longue chaîne carbonée (18 carbones) et saturés, ce qui leur confèrent une  $T_m$  élevée (55°C et 74°C). Ces lipides, par ailleurs retrouvés dans les membranes plasmiques des mammifères, ont été spécifiquement choisis pour ces caractéristiques qui permettent d'assurer la rigidité de la bicouche lipidique des liposomes et leur stabilité à 37°C *in vivo*. Le cholestérol a également été incorporé à hauteur de 30 mol% dans le même objectif de rigidifier et de stabiliser la bicouche lipidique (53). Afin de diminuer les interactions des liposomes entre eux, mais aussi et surtout avec les protéines sériques rencontrées *in vivo*, et ainsi prolonger leur temps de circulation, nous avons également choisi de pégyliser nos liposomes (60,61,182). Par ailleurs, les molarités de la phase aqueuse (arginine 80 mM en tampon HEPES 80 mM) et du tampon phosphate (150 mM) dans lequel seront dispersés les liposomes après purification, ont été choisies de façon à obtenir une osmolarité proche de celle des milieux physiologiques ( $\approx 300$  mosmol).

Après extrusion, les solutions de liposomes sont conservées pendant plusieurs semaines à 4°C. Elles doivent rester translucides et sans apparition d'agrégats. La purification par la technique HPLC est réalisée extemporanément, avant le marquage pour une utilisation *in vivo*, afin d'éviter une modification de la composition interne des liposomes par échange de substances diffusibles à travers la paroi.

Les contrôles effectués sur les liposomes confirment leur stabilité *in vitro* avec des contrôles de pH et de granulométrie qui restent stables jusqu'à un mois après la préparation et la purification des liposomes. Concernant les contrôles granulométriques nous avons en effet observé que la taille des liposomes pégylés restait inchangée un mois après leur préparation (purifiés ou non). Nous avons cependant pu observer que la taille des liposomes conventionnels (non pégylés) avait augmenté de 9 à 20 % respectivement pour les suspensions purifiées (diluées) et les solutions mères, avec parallèlement une augmentation de l'index de polydispersité. Cette augmentation de taille des liposomes non pégylés au cours du temps s'explique facilement par l'agrégation et la fusion des liposomes entre eux, et ce d'autant plus que les liposomes sont concentrés, augmentant la probabilité d'interaction. Ce phénomène n'est pas observé avec les liposomes pégylés car les chaînes de PEG présentes à leur surface empêchent leur agrégation et stabilisent ainsi les suspensions de liposomes. La présence des chaînes de PEG produit en effet une force de répulsion entre les membranes des liposomes surpassant l'attraction des forces de Van der Waals (66).

## II. RADIOMARQUAGE DES LIPOSOMES

De nombreuses méthodes de marquage des liposomes avec différents radionucléides ont été développées depuis les années 1970 (183–185). On peut distinguer les méthodes de marquages ayant lieu lors de la préparation des liposomes et les méthodes de marquages sur des liposomes préformés ; les deux pouvant être réalisées pour le marquage de la phase aqueuse et/ou le marquage de la bicouche lipidique. Deux méthodes différentes ont été choisies pour le radiomarquage des liposomes utilisés dans cette étude, avec deux radionucléides différents : l' $^{111}\text{In}$  comme traceur de la bicouche lipidique et l' $^{125}\text{I}$  comme traceur de la phase aqueuse. Ce double marquage est réalisé en même temps sur des liposomes préformés.

### II.1. Matériels et méthodes

#### II.1.1. Matières premières

L'indium-111 ( $^{111}\text{In}$ ) est fourni par le laboratoire Covidien, sous forme de chlorure d'indium en solution dans de l'acide chlorhydrique (HCl à 0,05 N). L'activité volumique et l'activité spécifique à calibration sont respectivement de 370 MBq/mL et de 1850 MBq/ $\mu\text{g}$ . Le chlorure d'indium ( $\text{InCl}_3$ ) froid provient quant à lui du laboratoire Sigma Aldrich.

L'iode-125 ( $^{125}\text{I}$ ) est fourni par le laboratoire Perkin Elmer, sous forme de iodure de sodium en solution dans de la soude (NaOH à 0,1 M). L'activité volumique et l'activité spécifique à calibration sont respectivement de 3,7 GBq/mL et de 629 MBq/ $\mu\text{g}$ .

Le réactif de Bolton-Hunter (N-succinimidyl 3-(4-hydroxyphényl) propionate) est commercialisé par Pierce Chemical Co. La Chloramine-T, utilisée comme agent oxydant de l' $^{125}\text{I}$ , provient du laboratoire Sigma Aldrich.

#### II.1.2. Radiomarquage de la bicouche lipidique

##### II.1.2.1. Considérations générales

Le marquage de la bicouche lipidique des liposomes par de l'indium-111, émetteur  $\gamma$ , a tout d'abord été envisagé par Holmberg pour réaliser des études de biodistribution des liposomes *in vivo* en utilisant un compteur gamma (186). Un agent chélatant, le DTPA, est alors couplé à 2 stéarylamides, puis marqué à l' $^{111}\text{In}$  avant d'être utilisé dans la préparation des liposomes par hydratation d'un film

lipidique. Le bis-stéarylamide s'insère au niveau de la bicouche lipidique des phospholipides permettant ainsi le marquage de la paroi lipidique au cours de la préparation des liposomes.

Le marquage à  $^{111}\text{In}$  de nos liposomes est également réalisé par complexation avec le DTPA. Cette technique est basée sur la très grande affinité du DTPA avec les métaux trivalents et notamment l'indium. La constante de stabilité du complexe  $[\text{In-DTPA}]^{2-}$  est en effet de l'ordre de  $10^{29}$  (187). Le DTPA est ici directement couplé aux phospholipides utilisés dans la formulation des liposomes : soit directement au niveau de la tête polaire du phospholipide (DSPE-DTPA), soit à l'extrémité des chaînes de PEG (DSPE-PEG<sub>2000</sub>-DTPA). Dans tous les cas, le DTPA représente 1,5 % molaire de la formulation. Les liposomes sont préparés avec les phospholipides chélatants non radiomarqués, et le marquage à  $^{111}\text{In}$  est ensuite effectué extemporanément sur les liposomes préformés.

Plusieurs précautions sont nécessaires à la bonne réalisation du marquage. Tous les tampons utilisés dès la préparation des liposomes doivent préalablement être traités par de la chélex, résine échangeuse de cations permettant de complexer les métaux « contaminants » qui pourraient entrer en compétition avec l'indium lors de la complexation avec le DTPA.

Par ailleurs, le radiomarquage doit être réalisé en milieu légèrement acide (pH compris entre 5 et 6) pour éviter la formation de précipités d'indium sous forme d'hydroxydes. Ces conditions justifient la nécessité de purifier les liposomes avant marquage en tampon phosphate 0,15 M pH 5,6 et de réaliser le marquage en présence de tampon citrate pH 5. Outre son pH acide, le tampon citrate permet la formation d'un « complexe-intermédiaire », le citrate d'indium. Ce complexe intermédiaire empêche l'association de l'indium avec des hydroxydes, et facilite sa complexation, par transchélation, avec les DTPA à la surface des liposomes.

### II.1.2.2. *Protocole de marquage à $^{111}\text{In}$*

Le marquage est réalisé avec entraîneur,  $^{111}\text{In}$  étant en quantité négligeable par rapport à l'indium froid (environ 40 kBq par marquage test).

Les essais de marquage à l'indium sont réalisés sur 1  $\mu\text{mol}$  de lipides et à l'équivalence entre In/DTPA. La quantité de DTPA présente dans les liposomes étant de 1,5 % molaire, 1  $\mu\text{mol}$  de lipides correspond donc à 15 nmol de DTPA. En considérant statistiquement qu'une molécule sur deux de DTPA soit orientée à l'intérieur des liposomes, 7,5 nmol de DTPA peuvent théoriquement se complexer à l'indium.

Le marquage est réalisé dans un tube à hémolyse en verre de 5 mL. Tout d'abord 7,5 nmol d'indium chlorure ( $\text{InCl}_3$ ) froid, soit 15  $\mu\text{L}$  d'une solution à  $5 \cdot 10^{-4}$  M (en HCl 0,06 N) et 1  $\mu\text{L}$  d' $^{111}\text{InCl}_3$  (environ 40 kBq) sont ajoutés à 30  $\mu\text{L}$  de tampon citrate 0,1 M pH 5. Le volume de tampon citrate 0,1 M pH 5 est calculé de manière à obtenir une concentration finale en citrate de 10 mM. Enfin, 1  $\mu\text{mol}$  de lipides est ajoutée (solution de liposomes à 4  $\mu\text{mol/mL}$  purifiés en tampon  $\text{PO}_4^{3-}$  0,15 M pH 5,6). Le mélange réactionnel est ensuite vortexé puis incubé à 37°C pendant ½ h.

A la fin de l'incubation, 10 équivalents molaires d'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) par rapport à l'indium sont ajoutés. Sur le même principe que l'utilisation de l'EDTA en fin de marquage du Zevalin<sup>®</sup> (188), l'EDTA est ici utilisé pour complexer l'indium libre ou fixé de manière non spécifique aux liposomes. Avec une constante de stabilité pour l'indium 1000 fois plus faible que le DTPA, l'EDTA [ $K_s = 10^{25,3}$  M (189)] ne risque pas de déplacer l'indium déjà complexé au DTPA, ce que nous avons vérifié expérimentalement jusqu'à 10000 équivalents EDTA/DTPA.

Pour les études *in vivo*, des quantités supérieures de liposomes doivent être marquées. Ce protocole est alors adapté en recalculant tous les volumes de réactifs, pour respecter les rapports molaires ci dessus.

### II.1.2.3. *Purification des liposomes radiomarqués et calcul des rendements de marquage*

Après marquage des liposomes, une purification par gel-filtration sur colonne PD10 (Sephadex<sup>®</sup> G25) est réalisée pour éliminer la radioactivité non liée aux liposomes (cf. § I.1.4.2 p. 85). Le volume réactionnel est complété à 500  $\mu$ L avec du tampon  $\text{PO}_4^{3-}$  0,15 M pH 5,6 ; avant d'être déposé sur la colonne préalablement saturée en PBS-BSA 0,5 % et équilibrée en tampon d'élution. L'élution est réalisée en tampon  $\text{PO}_4^{3-}$  0,15 M pH 5,6 par fractions de 500  $\mu$ L.

Le rendement de marquage est calculé après comptage des fractions d'élution avec un compteur gamma (Wallac 1480-Wizard<sup>®</sup> 3, Perkin-Elmer) sur une fenêtre de comptage de 150 à 400 keV.

L'activité initiale de la solution de marquage est également comptée par prélèvement d'une fraction aliquote de 5  $\mu$ L, avant réalisation de la purification. L'activité non déposée sur la colonne est déterminée pour être déduite de l'activité initiale totale en comptant le tube vide du marquage et le cône de prélèvement. Le rendement de marquage est ensuite calculé en rapportant l'activité éluee avec les liposomes (entre 2,5 et 4,5 mL) à l'activité totale.

### II.1.2.4. *Détermination du nombre d'haptènes à la surface des liposomes*

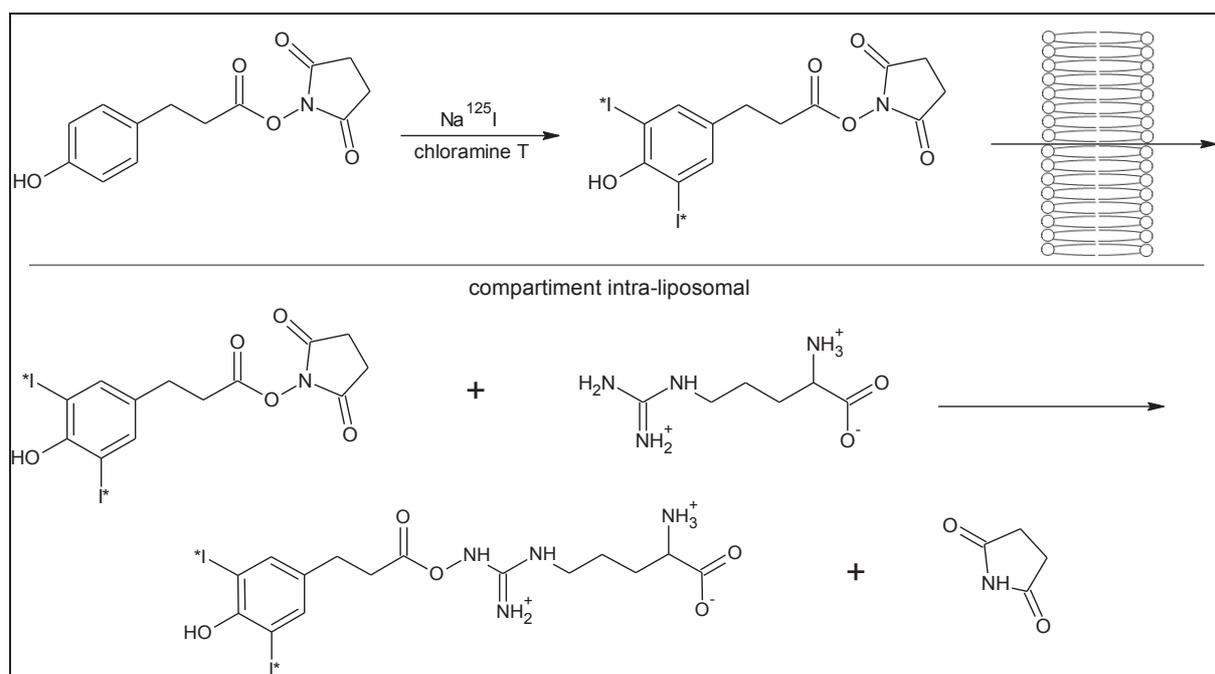
Le radiomarquage des liposomes à l'<sup>111</sup>In permet de déterminer la quantité de DTPA-In et donc d'haptènes, présents à la surface des liposomes. Des essais de marquage à l'<sup>111</sup>In avec entraîneur ont été réalisés sur 1  $\mu$ mol de lipides avec une quantité croissante d' $\text{InCl}_3$  froid (en HCl 0,06 N) de manière à obtenir une gamme allant de 0,5 à 10 équivalents molaires d'In par DTPA théorique.

L'objectif de ces marquages est d'obtenir une courbe représentant la quantité absolue d'indium fixée par  $\mu$ mol de lipides jusqu'à saturation. La quantité obtenue à saturation représentant alors le nombre d'haptènes à la surface des liposomes.

### II.1.3. Radiomarquage de la phase aqueuse

L'incorporation de radioactivité à l'intérieur des liposomes est envisagée selon une méthode d'encapsulation active, qui repose sur la possibilité pour une substance lipophile de traverser les membranes lipidiques, tandis qu'une substance hydrophile en est incapable. De nombreux travaux ont utilisé des bases ou acide faibles, qui sous forme non ionisée dans un milieu de pH adapté, diffusent à travers les membranes lorsqu'ils sont mis en présence de liposomes. Si le pH du milieu préalablement encapsulé a été correctement choisi, la molécule s'ionise et, ne pouvant ressortir, s'accumule dans ce milieu (190,191).

La méthode de radiomarquage des liposomes à l' $^{125}\text{I}$  utilisée ici, repose sur une méthode d'encapsulation active d'une molécule radioiodée suffisamment lipophile pour traverser les membranes, et qui après couplage à une autre molécule ionisée et préalablement encapsulée dans la phase aqueuse, va y rester piégée. Le marquage de la phase aqueuse sur des liposomes préformés est alors réalisé en deux étapes comme le montre la *Figure 21*.



**Figure 21** : Principe du marquage intra-liposomal à l' $^{125}\text{I}$

La première étape consiste alors à radiomarquer un groupement bifonctionnel ou agent prosthétique, le réactif de Bolton-Hunter [N-succinimidyl 3-(4-hydroxyphényl)-propionate] qui présente un site d'iodation permettant le marquage stable de la molécule. La deuxième étape consiste ensuite, après traversée de la bicouche lipidique, à faire réagir cet ester activé (fonction hydroxysuccinimide) sur les fonctions amines des molécules d'arginine encapsulées à forte concentration dans la phase aqueuse des liposomes. Tout l'intérêt de cette méthode par encapsulation

active réside dans le fait que le réactif de Bolton-Hunter (sous sa forme d'ester activé) est suffisamment lipophile pour traverser de manière passive la bicouche lipidique des liposomes. Sa réaction avec l'arginine pré-encapsulée permet ensuite d'obtenir un dérivé ionisé qui reste piégé à l'intérieur des liposomes où il s'y accumule.

### II.1.3.1. *Marquage du réactif de Bolton-Hunter à l'<sup>125</sup>I*

L'utilisation du réactif de Bolton-Hunter a été envisagée pour la première fois pour le marquage d'hormones à l'iode avec une haute activité spécifique, en alternative au marquage direct via la chloramine-T (192). Cette méthode indirecte présente l'avantage d'éviter le contact direct de la molécule à marquer à la fois avec l'agent oxydant et la solution mère d'iode qui sont susceptibles de dégrader la molécule.

### II.1.3.2. *Protocole de marquage du réactif de Bolton-Hunter*

Le réactif de Bolton-Hunter est marqué à l'iode en présence d'un agent oxydant, la chloramine-T. Cette méthode de marquage est facile et peu coûteuse, et consiste simplement à ajouter la chloramine-T et l'<sup>125</sup>I (sous forme de NaI) au substrat à température ambiante. La chloramine-T est un agent oxydant essentiel pour obtenir l'iode à un degré d'oxydation +I permettant le marquage du réactif de Bolton-Hunter par substitution électrophile aromatique (193). Le marquage s'effectue sur le cycle aromatique du Bolton-Hunter, activé par le groupement hydroxyle inducteur donneur. L'iodation est effectuée en ortho du groupement hydroxyle, et en fonction des quantités de chloramine-T et d'iode mises en jeu, il est possible d'obtenir le dérivé mono ou di-iodé (175).

Le réactif de Bolton-Hunter est solubilisé en dioxane anhydre à une concentration suffisante (classiquement 60 µmol/mL) pour avoir la quantité de réactif nécessaire à marquer sous un petit volume (≤ 5 µL). Pour éviter l'hydrolyse du réactif, le marquage doit se faire rapidement (en moins de 40 secondes) et la solution de Bolton-Hunter doit être renouvelée à chaque fois.

Le marquage est effectué dans un tube à hémolyse en verre de 5 mL dans lequel sont préalablement introduits 50 µL de tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4 et 50 µL de chloramine-T à 4 mg/mL également en tampon phosphate. Le volume de Na<sup>125</sup>I correspondant à l'activité nécessaire au marquage est ajouté dans le tube à hémolyse, suivi en dernier par le volume nécessaire de réactif de Bolton-Hunter (large excès de BH). La solution de marquage est agitée, puis rapidement, 400 µL de tampon phosphate à 0,1 M pH 7,4, sont ajoutés pour obtenir au total 500 µL de phase aqueuse. Le réactif de Bolton-Hunter radioiodé est ensuite extrait par 500 µL de toluène anhydre.

### II.1.3.3. *Contrôle du marquage du Bolton-Hunter*

Après extraction, l'activité des deux phases (organique et aqueuse) est mesurée à l'aide d'un activimètre. Le rendement de marquage est calculé en rapportant l'activité retrouvée dans la phase organique, dans laquelle a été extrait le Bolton-Hunter radioiodé, à l'activité totale initiale (somme des deux phases).

La pureté radiochimique de la phase organique est ensuite contrôlée par chromatographie sur couche mince sur gel de silice (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck) avec un mélange de chloroforme/acétate d'éthyle (1:1 v/v). Après migration sur environ 10 cm, la chromatographie est révélée au phosphor-imager (445SI Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech). La chromatographie permet ainsi de déterminer les proportions d'iode libre, de Bolton-Hunter mono ou di-iodé, ou encore de Bolton-Hunter hydrolysé.

### II.1.3.4. *Encapsulation active du Bolton-Hunter radiomarqué*

Le volume de phase organique correspondant à l'activité nécessaire au radiomarquage des liposomes est transféré dans un autre tube à hémolyse en verre de 5 mL. Le solvant est évaporé à l'aide d'un courant d'azote relié à un piège à soude (10 M) jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de trace de solvant. Les liposomes purifiés en tampon phosphate 0,15 M pH 5,6 sont ensuite ajoutés sur le résidu sec de Bolton-Hunter radioiodé, et après agitation, l'ensemble est placé dans une étuve à 37°C pour 30 min d'incubation.

Les conditions de marquage ont été préalablement optimisées dans notre laboratoire. Elles permettent d'obtenir un taux d'encapsulation d'environ 60 % en incubant 90 nmol de Bolton-Hunter par  $\mu\text{mol}$  de lipides (176).

Ce taux d'encapsulation peut être déterminé après purification des liposomes sur colonne PD10 de la même manière que les liposomes marqués à  $^{111}\text{In}$  (cf. § II.1.2.3, p.94), puisque  $^{125}\text{I}$  libre est élué très tardivement par rapport aux liposomes. Le rendement de marquage est déterminé à l'aide du compteur gamma (Wallac 1480-Wizard<sup>®</sup> 3, Perkin-Elmer) mais sur une fenêtre de comptage centrée sur l'émission X de  $^{125}\text{I}$  (29 keV).

## II.1.4. **Double-marquage des liposomes**

Pour la suite des études réalisées *in vivo* (pharmacocinétique et biodistribution), les liposomes sont doublement radiomarqués, à la fois en surface par  $^{111}\text{In}$  et dans la phase aqueuse par  $^{125}\text{I}$ . Ce double marquage est très intéressant pour vérifier l'intégrité des liposomes *in vivo* par corrélation des comptages obtenus avec les deux radio-isotopes.

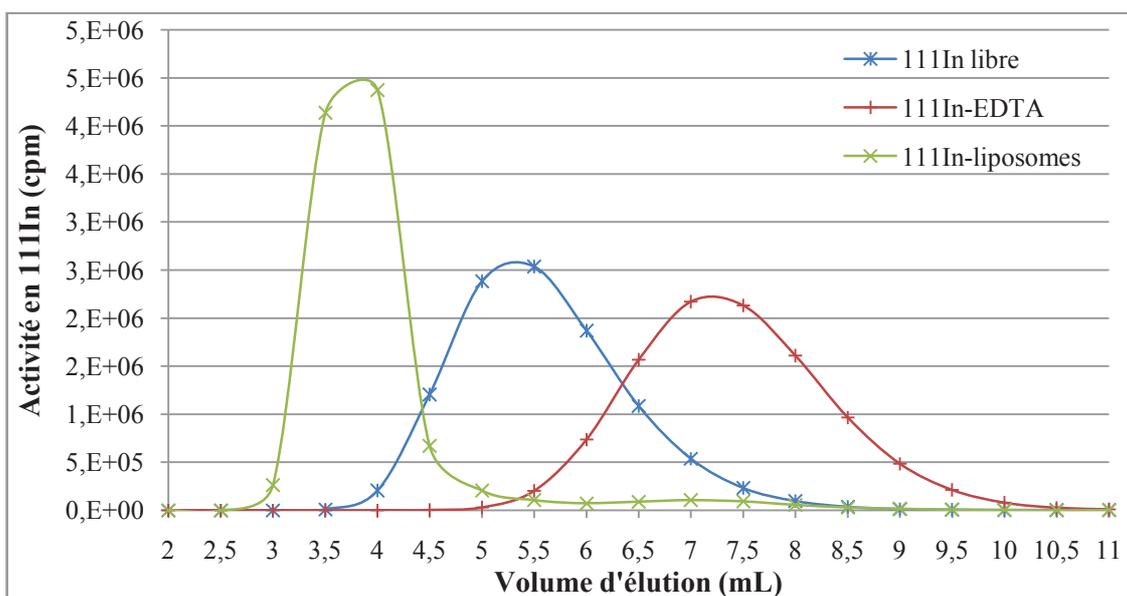
Le double marquage des liposomes est facilement obtenu en alliant les deux protocoles de marquage détaillés ci-dessus (§ II.1.2 p.92 et II.1.3 p.95). Les liposomes sont ajoutés au résidu sec du réactif de Bolton-Hunter radioiodé. Le mélange d' $\text{InCl}_3$  froid et d' $^{111}\text{In}$  en tampon citrate est ensuite

ajouté aux liposomes. Le mélange réactionnel est vortexé et mis à incuber, 30 min à 37°C, avant d'ajouter l'EDTA nécessaire à la complexation de l'indium libre. Les liposomes sont ensuite purifiés sur colonne PD10 par gel-filtration et les fractions d'élution sont analysées au compteur gamma (Wallac 1480-Wizard<sup>®</sup> 3, Perkin-Elmer). Les rendements de marquage sont calculés dans un premier temps pour l'<sup>111</sup>In, et après décroissance de l'<sup>111</sup>In, ils sont recalculés pour l'<sup>125</sup>I.

## II.2. Résultats

### II.2.1. Marquage à l'<sup>111</sup>In et quantification de l'haptène

Le radiomarquage des liposomes à l'<sup>111</sup>In seul a été étudié lors de ce travail. En effet, outre l'intérêt de constituer un traceur radioactif pour localiser les liposomes, l'<sup>111</sup>In complexé au DTPA constitue l'haptène, spécifiquement reconnu par l'anticorps qui sera utilisé pour le ciblage de ces liposomes. L'analyse des rendements de marquage à l'<sup>111</sup>In permet ainsi de déterminer le nombre d'haptènes présents à la surface des liposomes.

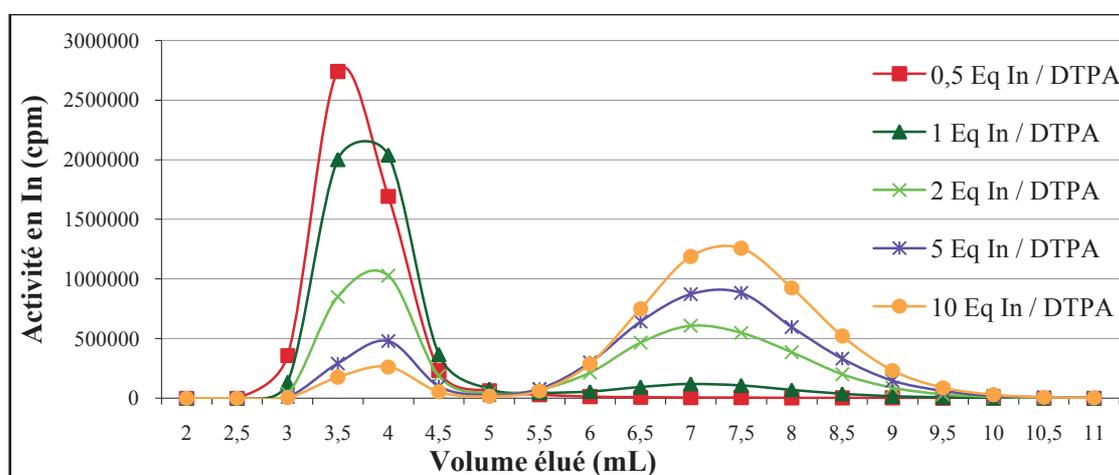


**Figure 22** : Profils d'élution témoins sur colonne Sephadex<sup>®</sup> G25 en tampon phosphate 0,15 M pH 5,6 de l'indium-111 dans les conditions de marquage (<sup>111</sup>In libre en bleu, <sup>111</sup>In-EDTA en rouge, <sup>111</sup>In-liposomes en vert)

La Figure 22 représente tout d'abord les profils témoins de l'élution de l'<sup>111</sup>In sur colonne Sephadex<sup>®</sup> G25 (PD10) en tampon phosphate (0,15 M pH 5,6) sous forme d'indium libre, complexé à l'EDTA, ou fixé aux liposomes (complexé au DTPA à la surface des liposomes). Ces profils témoins montrent l'importance de complexer l'indium libre à l'EDTA en fin de marquage pour bien séparer les liposomes radiomarqués de l'indium libre. En effet, les pics d'élution des liposomes radiomarqués et

de l'indium non complexé à l'EDTA se chevauchent. Sans complexation finale par l'EDTA, les liposomes seraient récupérés avec une fraction d'indium libre.

La bonne séparation entre l'indium libre et les liposomes radiomarqués permet ensuite de calculer les rendements de marquage en comptant l'activité de chaque fraction d'élution à l'aide d'un compteur gamma. La *Figure 23* présente par exemple les profils d'élution lors de la purification d'1  $\mu\text{mol}$  de lipides après marquage avec des quantités croissantes d'indium, sur des liposomes présentant l'haptène à l'extrémité des chaînes de PEG. Plus les quantités d'indium mises en jeu lors du marquage augmentent, plus le pic d'activité lié aux liposomes (entre 2,5 et 4,5 mL) est petit, au profit du pic d'activité lié au complexe In-EDTA (entre 5,5 et 9,5 mL), c'est-à-dire plus le rendement de marquage diminue.



**Figure 23 :** Profils d'élution après purification de liposomes marqués avec des quantités croissantes d'indium (de 0,5 à 10 équivalents In par DTPA théorique) sur colonne Sephadex® G25 (Liposomes "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%")

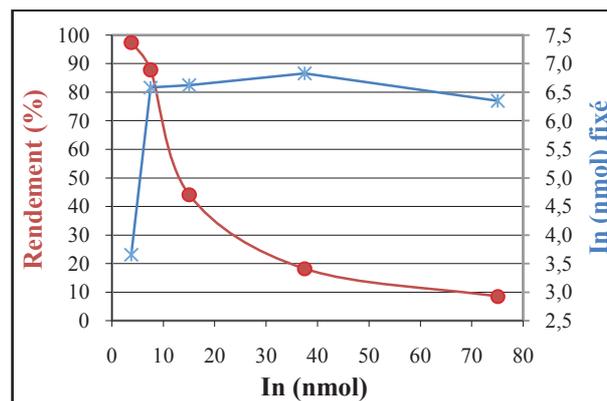
Le *Tableau 11* et la *Figure 24* présentent les résultats obtenus après analyse des profils d'élution précédents, reprenant les quantités d'indium fixé par  $\mu\text{mol}$  de lipides et les rendements de marquage, en fonction du nombre d'équivalents d'indium.

De manière générale, le rendement de marquage atteint quasiment 100 % lorsque celui-ci est réalisé en défaut d'indium (97,5 % pour les liposomes présentant l'haptène à l'extrémité des chaînes de PEG, *Tableau 11*). A l'équivalence In/DTPA, les rendements de marquage sont en général > 80 % (87,8 % pour l'exemple du *Tableau 11*).

Ces marquages réalisés sur les liposomes "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%" avec différents rapports In/DTPA ont permis d'obtenir une courbe de saturation de l'indium fixé (*Figure 24*). En effet, dès le marquage à l'équivalence In/DTPA, la quantité d'indium fixée atteint un plateau à 6,6 nmol de moyenne (ET 0,2 nmol, CV 2,7 %), quelle que soit la quantité d'indium utilisée lors du marquage. La quantité d'haptène présente à la surface des liposomes est donc de 6,6 nmol pour 1  $\mu\text{mol}$  de lipides.

Eq In / DTPA	In (nmol)	Rendement (%)	In fixé (nmol)
0,5	3,75	97,5	3,7
1	7,5	87,8	6,6
2	15	44,1	6,6
5	37,5	18,2	6,8
10	75	8,5	6,3

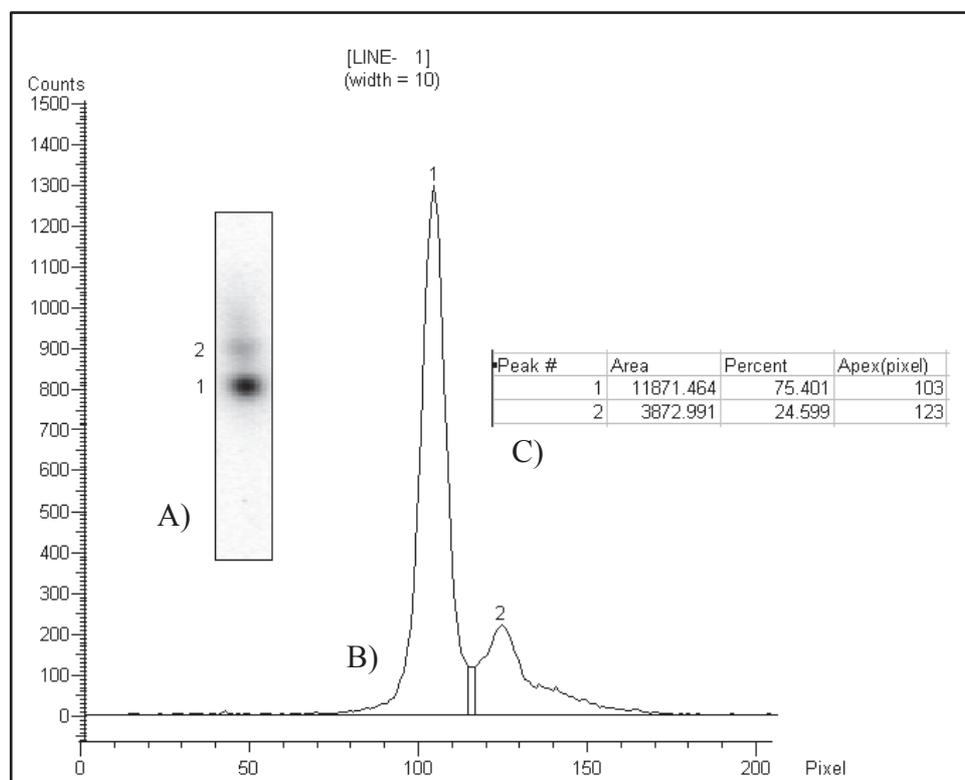
**Tableau 11 :** Résultats du marquage d'1  $\mu$ mol de lipides "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%" avec des quantités croissantes d'In



**Figure 24 :** Rendement de marquage (%) et quantité d'In fixé (nmol) en fonction de la quantité d'In mise en jeu pour le marquage d'1  $\mu$ mol de lipides " DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%"

## II.2.2. Radiomarquage du réactif de Bolton-Hunter à l'<sup>125</sup>I

Après extraction du réactif de Bolton-Hunter (BH) radiomarké en phase organique (toluène), la mesure des activités de la phase aqueuse (contenant l'iode libre) et de la phase organique permet de déterminer un rendement de marquage compris entre 60 et 70 %.



**Figure 25 :** Analyse du BH radioiodé par chromatographie sur couche mince (CCM) révélée au phosphor-imager. A) Révélation des spots radioactifs sur la CCM, B) Courbe représentant la répartition de la radioactivité le long de la CCM, C) Analyse de la courbe par intégration des pics de radioactivité

L'analyse de la phase organique par chromatographie sur couche mince (CCM) révèle deux spots (*Figure 25*) correspondant respectivement au monoiodo-BH ( $R_f = 0,5$ ) et au diiodo-BH ( $R_f = 0,6$ ). L'absence d'un troisième spot à  $R_f = 0,9$  signifie qu'il n'y a pas de BH hydrolysé (175). La formation de BH hydrolysé n'est pas souhaitable car cette forme ne permet pas le couplage à l'arginine de la phase aqueuse des liposomes.

Les taux de BH mono et di-iodé sont ici respectivement de 25 % et 75 % mais ils sont dépendants des rapport molaires BH/iode lors du marquage et des quantités de chloramine T utilisées (51).

### **II.2.3. Double marquage des liposomes**

Une fois le réactif de Bolton-Hunter radioiodé, il est possible de procéder au double marquage des liposomes par encapsulation active du  $^{125}\text{I}$ -BH et par complexation simultanée de  $^{111}\text{In}$  sur les DTPA à la surface des liposomes. La purification des liposomes par gel-filtration et le comptage des fractions d'élution au compteur gamma ont permis de déterminer des rendements compris entre 70 et 90 % pour le marquage de surface à  $^{111}\text{In}$ , et compris entre 30 et 50 % pour le marquage interne à  $^{125}\text{I}$ .

## **II.3. Discussion**

### **II.3.1. Méthodes de marquage des liposomes**

De nombreuses techniques de marquages ont été développées pour radiomarquer les liposomes (183–185). Ces méthodes peuvent être divisées en quatre grandes approches : l'encapsulation passive, le marquage de membrane, la chélation de surface et l'encapsulation active. Ces méthodes de marquage ont lieu soit au cours de la préparation des liposomes, soit sur des liposomes préformés.

Le marquage par encapsulation passive est par définition réalisé au cours de la préparation des liposomes. Dans ce cas, le radionucléide (le plus souvent complexé à un agent chélatant) est ajouté dans la solution d'hydratation des liposomes. L'encapsulation passive dépend donc étroitement du volume de phase aqueuse piégé au sein des liposomes et de la concentration lipidique lors de la formation des liposomes. L'efficacité d'encapsulation reste, en général, inférieure à 10 % pour des liposomes de 100 nm, c'est pourquoi cette méthode est peu utilisée.

Le marquage de membrane peut avoir lieu, soit au cours de la préparation des liposomes, soit sur des liposomes préformés. Le radionucléide est alors incorporé dans la bicouche des liposomes ou conjugué à leur surface. Une molécule lipophile est alors préalablement radiomarquée et viendra s'insérer au sein de la bicouche lipidique, il s'agira le plus souvent d'un lipide entrant dans la

composition des liposomes. Les radionucléides concernés sont typiquement l'iode ou le fluor, mais cette chimie qui implique des procédés de purification est alors peu utilisée dans le marquage des liposomes.

Les liposomes radiomarqués doivent souvent être utilisés dans un intervalle de temps limité à cause de la décroissance radioactive, il est donc préférable de réaliser le radiomarquage extemporanément. La complexation à la surface des liposomes et l'encapsulation active peuvent être utilisées sur des liposomes préformés. L'efficacité d'incorporation élevée et la bonne rétention des radionucléides, font de ces deux méthodes les plus utilisées.

La complexation de surface est obtenue par l'utilisation de lipides chélatants dans la formulation des liposomes. Cette méthode permet d'obtenir des efficacités de marquage jusqu'à 90 %. Cependant, le radionucléide présent à la surface du liposome, est exposé au milieu extérieur et peut interagir avec les protéines et macromolécules des milieux biologiques. La stabilité *in vivo* du marquage de surface des liposomes est alors très dépendante de la constante de stabilité du complexe. Cette méthode a notamment été utilisée avec plusieurs radionucléides ( $^{111}\text{In}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$  et  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) avec de la DMPE-DTPA (184). Des marquages au  $^{64}\text{Cu}$  ont également été réalisés avec cette méthode (194).

L'encapsulation active de radionucléides dans la phase aqueuse des liposomes, implique l'utilisation d'un ionophore ou d'un agent chélatant lipophile pour transporter le radionucléide à travers la membrane des liposomes préformés. Cette approche permet de concentrer le radionucléide dans la phase aqueuse interne, assurant des efficacités d'encapsulation généralement supérieures à 90 % et semblant apporter les meilleures stabilités en prévenant les échanges du radionucléide avec le milieu biologique. Les méthodes utilisant l'encapsulation active peuvent être divisées en trois catégories.

Le radionucléide peut tout d'abord être transporté à travers la bicouche lipidique par un chélatant lipophile puis subir une transchélation avec un deuxième chélatant pré-encapsulé et rester ainsi piégé dans la phase aqueuse. Nous pouvons ainsi citer des exemples d'encapsulation de  $^{111}\text{In}$  complexé à de l'acétylacétone pour la traversée de la bicouche lipidique avant d'être complexé à l'acide nitrilotriacétique (NTA) (195,196), ou encore du  $^{64}\text{Cu}$  complexé à la 2-hydroxyquinoline avant une transchélation avec le DOTA en intra-liposomal (197). Pour avoir une bonne rétention du radionucléide, cette méthode nécessite que l'agent chélatant encapsulé ait une affinité supérieure à celle de l'agent chélatant lipophile.

La seconde catégorie d'encapsulation active réside dans l'utilisation d'ionophores créant des pores hydrophiles dans la bicouche lipidique, et permettant le passage direct d'ions métalliques. Le ionophore A23187 a notamment été utilisé pour le transport de  $^{111}\text{InCl}_3$  à l'intérieur des liposomes, où  $^{111}\text{In}$  est secondairement complexé à un chélatant pré-encapsulé comme le NTA (198). Cette méthode est à la base du Vescan<sup>®</sup>, non commercialisé mais testé comme agent d'imagerie dans des essais cliniques de cancérologie (162).

La troisième catégorie réside dans l'utilisation d'un gradient de pH entre le milieu externe et le milieu interne des liposomes et repose alors sur un agent chélatant lipophile dont le complexe formé avec le radionucléide restera neutre au pH du milieu extérieur et s'ionisera au pH du milieu intérieur. C'est le cas par exemple du bismercaptoéthyl-diéthylène diamine (BMEDA) utilisé pour l'encapsulation du rhénium ou du technétium. Dans ce cas, la phase aqueuse des liposomes contient du sulfate d'ammonium à pH 5,5, tandis que le milieu extérieur est en PBS à pH 7,4. A pH 7,4 le complexe formé est neutre, mais il s'ionise à pH 5,5 par protonation des groupes amines du BMEDA (199).

Les deux méthodes qui ont été choisies dans ce travail de thèse, sont deux méthodes différentes de marquage sur liposomes préformés, et correspondent à celles les plus utilisées. Le marquage à  $^{111}\text{In}$  est réalisé par complexation au DTPA à la surface des liposomes et le marquage à  $^{125}\text{I}$  par encapsulation active. L'encapsulation active de  $^{125}\text{I}$  repose notamment sur une méthode originale qui allie à la fois la traversée de la bicouche lipidique par une molécule lipophile, et sur un gradient de pH, avec non pas la protonation directe de cette molécule lipophile, mais sa conjugaison avec une autre molécule déjà ionisée et pré-encapsulée. Ces méthodes de marquage sur liposomes préformés sont bien plus appropriées que les méthodes utilisées au cours de la préparation des liposomes. En effet, elles ne nécessitent pas de préparer de nouveaux lots de liposomes pour chaque expérimentation et, grâce à leur efficacité de marquage plus élevée, permettent de manipuler des activités plus faibles pour atteindre une même activité spécifique.

Toutes ces méthodes de marquage ont été initialement développées en grande majorité pour des radionucléides avec des applications en imagerie (200,201), mais les liposomes commencent également à être radiomarqués avec des radionucléides pour la thérapie (202). Il est alors possible de trouver des études avec des liposomes marqués au  $^{186}\text{Re}$  (203), à  $^{90}\text{Y}$  (172,204) et plus récemment avec des émetteurs alpha tel que le  $^{223}\text{Ra}$  (205), le  $^{213}\text{Bi}$  (173) ou encore  $^{225}\text{Ac}$  (206–208).

### **II.3.2. Marquage de surface à $^{111}\text{In}$ , quantification de l'haptène**

Le marquage radioactif de la paroi des liposomes à  $^{111}\text{In}$ , grâce au DTPA (DSPE-DTPA ou DSPE-PEG-DTPA), repose sur une technique simple dont le principe peut être repris avec différents agents chélatants, comme le DOTA, afin de réaliser des marquages avec d'autres radionucléides comme  $^{90}\text{Y}$  ou le  $^{177}\text{Lu}$ .  $^{111}\text{In}$ , émetteur gamma, n'a en effet ici aucun rôle thérapeutique pour la radioimmunothérapie, mais dans cette étude il permet de suivre les liposomes *in vivo*, et notamment leur bicouche lipidique. En double marquage, en comparant *in vivo* le devenir des deux traceurs ( $^{111}\text{In}$  et  $^{125}\text{I}$ ), on peut également s'assurer de l'intégrité des liposomes (cf § II.3.3 p.104). Enfin, il permet principalement, après complexation avec le DTPA, de former l'haptène « In-DTPA », spécifiquement reconnu par l'Ac 734. Il est donc notre « outil » de fonctionnalisation spécifique des liposomes et la

réussite du marquage à l'indium conditionne donc en grande partie le ciblage tumoral (ciblage spécifique).

Le marquage de surface des liposomes à l' $^{111}\text{In}$  a été réalisé avec de très bons rendements de marquage, de l'ordre de 100 %, en défaut d'indium. Lorsque nous nous sommes placés à l'équivalence théorique In/DTPA, le rendement de marquage obtenu a été de 87,8 %, pour les liposomes présentant l'haptène à l'extrémité des chaînes de PEG.

La quantité théorique de DTPA a en effet été calculée sur la base de 1,5 % molaire de DTPA, soit 15 nmol pour 1  $\mu\text{mol}$  de lipides. En considérant qu'un DTPA sur deux soit orienté vers l'intérieur, 7,5 nmol de DTPA par  $\mu\text{mol}$  de lipides sont théoriquement disponibles pour complexer l'indium. Le marquage à l'équivalence a alors été réalisé avec 7,5 nmol d'indium. Des gammes utilisant des quantités croissantes d'indium ont permis de déterminer qu'il n'y avait pas 7,5 nmol de DTPA disponibles puisque seulement 6,6 nmol ont été marquées. La différence observée expérimentalement peut avoir différentes causes. Tout d'abord, il est possible que dans notre produit de départ, le DSPE-PEG<sub>2000</sub>-DTPA, toutes les chaînes de PEG ne soient pas couplées à un DTPA. Par ailleurs, la présence de métaux contaminants, lors de la préparation des liposomes, dans les solvants organiques ou dans la phase aqueuse peut également diminuer le nombre de DTPA disponibles pour le marquage à l'In, même si la présence de chélex (résine complexante) limite ce phénomène. Cela est particulièrement vrai pour le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) dont la constante de stabilité avec le DTPA ( $\beta = 10^{28,7}$  (209)) est très proche de celle du complexe In-DTPA. Les complexes Fe-DTPA formés lors de la préparation des liposomes sont alors difficilement déplaçables par l'In.

La quantification du nombre de DTPA marqués à l'indium nous permet finalement de connaître le nombre d'haptènes présents à la surface des liposomes. Nous avons en effet observé que la fixation de l'indium aux liposomes était saturable à 6,6 nmol d'indium pour 1  $\mu\text{mol}$  de lipides. La saturation de cette fixation nous permet alors d'affirmer que cette liaison est spécifique, et qu'il s'agit bien de la complexation de l'indium avec les DTPA. Cette caractérisation des liposomes est essentielle pour le ciblage tumoral en deux temps. Il permet, en effet, d'ajuster les quantités de liposomes injectées, de façon à connaître et fixer un ratio molaire précis entre l'haptène et l'anticorps.

### **II.3.3. Marquage de la phase aqueuse à l' $^{125}\text{I}$**

Pour les études *in vivo*, les liposomes injectés aux souris ont été doublement radiomarqués. En effet, en complément du marquage de surface à l'indium, la phase aqueuse a également été radiomarquée à l' $^{125}\text{I}$ . Le double marquage des liposomes est une méthode intéressante pour connaître l'intégrité des vésicules, par comparaison du marquage de la paroi et de l'espace interne. Une bonne corrélation entre ces deux marquages permettant d'affirmer que les liposomes sont entiers. Par ailleurs, dans la perspective d'une application clinique, ce double marquage permet d'envisager à la fois un suivi diagnostique des vésicules et une efficacité thérapeutique associée.

Le marquage de la phase aqueuse a été réalisé par une méthode originale d'encapsulation active développée au laboratoire et qui conduit à des activités spécifiques élevées (176). Tout comme l'<sup>111</sup>In, l'<sup>125</sup>I n'a aucun intérêt thérapeutique, mais les méthodes utilisées avec l'<sup>125</sup>I sont directement transposables à son isotope émetteur bêta moins ( $\beta^-$ ), l'<sup>131</sup>I, ou à l'<sup>124</sup>I ( $\beta^+$ ) pour la TEP. On pourrait également facilement imaginer des méthodes similaires, avec un émetteur alpha ( $\alpha$ ), l'astate-211, qui appartient également à la famille des halogènes et présente donc des propriétés proches de celles de l'iode.

## ***Chapitre II :***

# **CARACTERISATION DES LIPOSOMES**

---

Après avoir abordé la préparation et le radiomarquage des liposomes, ce deuxième chapitre présente les différentes études de caractérisation réalisées dans le but de sélectionner les formulations les plus favorables au ciblage tumoral. Des études au BIAcore® ont ainsi permis d'appréhender l'impact de la pégylation sur l'affinité des liposomes pour l'anticorps et des études de pharmacocinétique, l'influence de la pégylation sur leur élimination sanguine. Enfin, une étude d'interaction cellulaire par microscopie de fluorescence a été menée afin d'évaluer l'immunospecificité du ciblage cellulaire et l'éventuelle internalisation des liposomes.

## **I. ETUDE DE L’AFFINITE LIPOSOMES-ANTICORPS AU BIACORE**

La constante d'affinité d'une réaction ou constante apparente de dissociation  $K_D$  est habituellement déterminée par des méthodes de titration où les concentrations des réactifs et du produit sont mesurées à l'équilibre. De nombreuses méthodes, incluant les dosages radio-immunologiques (RIA), les dosages immuno-enzymatiques (ELISA), la chromatographie, la titration calorimétrique isotherme, des techniques basées sur la résonance magnétique nucléaire ou encore la spectrométrie de masse peuvent être utilisées pour estimer ou déterminer la constante d'affinité d'une réaction (210,211).

Ces méthodes d'analyse peuvent être soit directes soit indirectes. Les méthodes directes permettent d'analyser l'interaction moléculaire sans l'utilisation de marqueurs alors qu'avec une méthode indirecte, l'utilisation d'un traceur tel qu'un radionucléide, une enzyme ou un fluorophore est nécessaire.

La résonance plasmonique de surface (SPR : surface plasmon resonance) est une méthode directe (212). Elle permet d'analyser l'interaction entre des analytes en solution et leur ligand fixé à la surface d'un biocapteur. Le signal obtenu est directement proportionnel à la concentration en substrat présent à la surface du biocapteur (213), et les étapes de formation et de dissociation du complexe analyte-ligand sont visualisées en temps réel.

Cette technologie peut alors être utilisée pour les analyses d'affinité et de cinétique des interactions protéine-protéine, par exemple anticorps-antigène. Quelques courbes de fixation entre le ligand et l'analyte suffisent pour la détermination des constantes cinétiques d'association ( $ka$ ) et de dissociation ( $kd$ ). L'affinité, traduite par la constante apparente de dissociation  $K_D$  est alors ensuite calculée par le ratio  $kd / ka$ .

## I.1. Principes

### I.1.1. La résonance plasmonique de surface

La résonance plasmonique de surface repose sur des principes optiques. Lorsqu'un faisceau de lumière polarisée illumine une interface entre deux milieux d'indice de réfraction différents, une partie de la lumière incidente est réfléchi sur l'interface et l'autre partie de la lumière est réfractée à travers la surface.

Lorsque l'angle du faisceau incident est supérieur à l'angle limite de réfraction  $\theta_i$ , toute la lumière est réfléchi, avec  $\text{Sin}(\theta_i) = n_2/n_1$  ( $n_1$  et  $n_2$  étant les indices de réfraction des 2 milieux de l'interface). En condition de réflexion totale, on observe toutefois une perturbation électromagnétique en surface, l'onde évanescente. Cette onde se propage perpendiculairement à l'interface sur une distance équivalente à sa longueur d'onde, appelé le champ évanescent.

A l'interface d'un milieu conducteur, comme un métal (milieu riche en électrons libres), et d'un milieu diélectrique comme le verre, il se produit un couplage entre les photons de l'onde évanescente et les électrons libres du métal, proches de l'interface. Les électrons ainsi excités entrent en résonance créant des trains d'ondes électromagnétiques dans toutes les directions de l'espace. Ce phénomène est appelé résonance plasmonique de surface. Ces ondes sphériques perturbent l'intensité lumineuse réfléchi en créant des interférences.

Une conséquence énergétique de cette résonance est visible dans le faisceau réfléchi qui, analysé avec une barrette de diodes, présente une chute d'intensité à un angle défini. L'angle pour lequel l'intensité du faisceau réfléchi est minimale s'appelle l'angle de résonance. Il varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu présent dans le champ évanescent. En conséquence, si dans le champ évanescent les éléments du milieu changent, les indices varient, l'angle de résonance varie aussi.

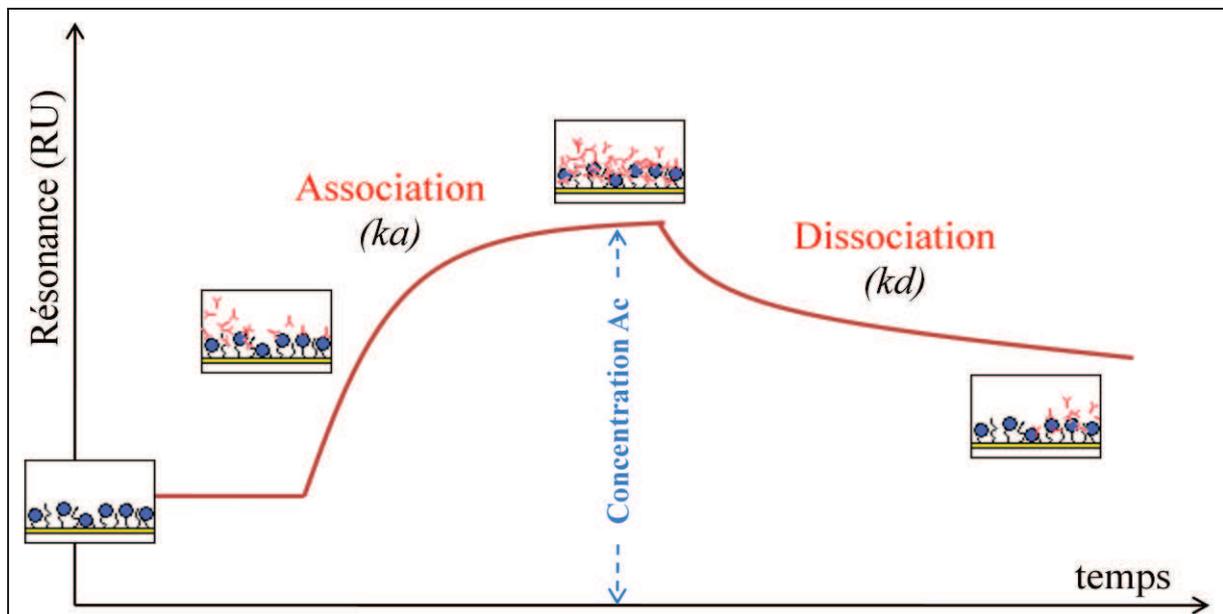
### I.1.2. Application : Le BIAcore®

Le principe de la résonance plasmonique de surface a été mis à profit pour l'analyse des interactions de surface entre une molécule adsorbée sur une surface métallique très fine (or ou argent) et une autre présente dans le milieu en contact.

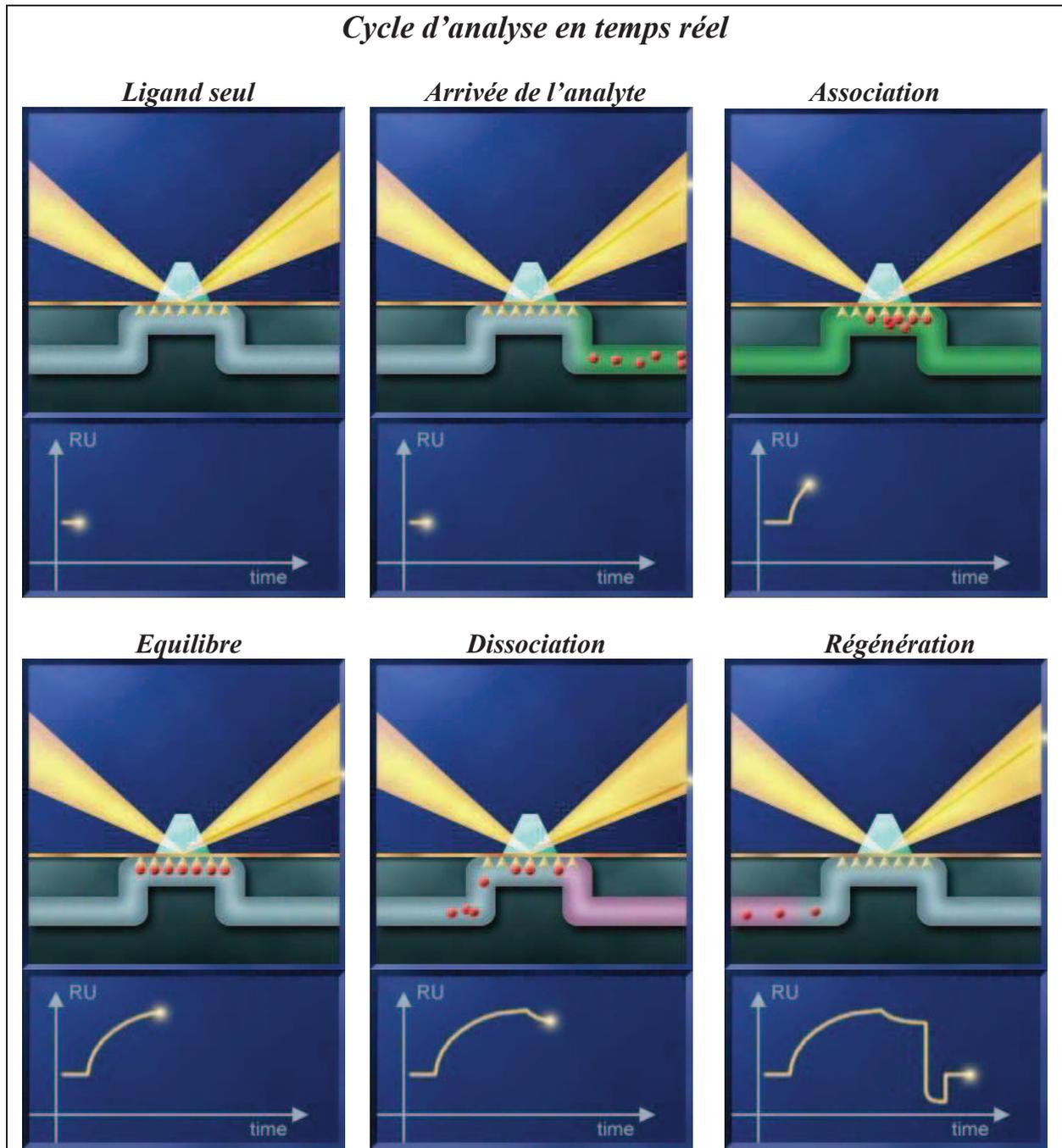
Plusieurs appareils utilisant la résonance plasmonique de surface sont disponibles dans le commerce, parmi ceux-ci le BIAcore® est le système le plus largement utilisé. Avec ce système, la molécule greffée sur la feuille d'or est retenue de manière spécifique sur une interface appelée sensor chip (biocapteur). L'autre molécule est quant à elle diluée dans un tampon qui circule à flux constant à la surface du biocapteur.

Les changements de masse induits par l'association ou la dissociation des complexes modifient la réfringence du milieu et décalent la position de l'angle de résonance. L'enregistrement de la variation de l'angle de résonance permet de suivre en temps réel la fixation des molécules injectées sur le biocapteur. Le signal est ensuite exprimé en unités de résonance (RU). L'enregistrement de ce signal est appelé sensorgramme. Les différentes étapes d'un cycle d'analyse en temps réel au BIAcore® sont représentées dans la *Figure 27 p.109*.

Dans notre étude nous avons utilisé la SPR avec le BIAcore® pour analyser l'interaction spécifique entre des liposomes pégylés, porteurs de l'haptène DTPA-In immobilisés sur un biocapteur et un anticorps monoclonal anti-DTPA-In. L'allure du sensorgramme théorique est représentée par la *Figure 26* ci-dessous :



**Figure 26 :** Allure d'un sensorgramme théorique en relation avec l'association et la dissociation des anticorps sur les liposomes préalablement immobilisés sur le biocapteur

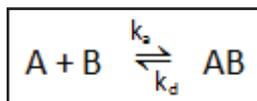


**Figure 27** : Principe de l'analyse en temps réel de l'interaction entre deux molécules au BIACore<sup>®</sup> utilisant la résonance plasmonique de surface

### I.1.3. Calcul des constantes cinétiques et d'affinité

Des programmes mathématiques permettent de déterminer les cinétiques d'association ( $k_a$ ) et de dissociation ( $k_d$ ) entre les molécules, puis de calculer les constantes apparentes d'association  $K_A$  et de dissociation  $K_D$ .

Soit A, l'haptène DTPA-In et B, l'anticorps monoclonal anti-DTPA-In, la réaction d'association obéit à la loi d'action de masse :



L'équation régissant cette réaction est la suivante :  $d[AB]/dt = k_a \times [A] \times [B] - k_d \times [AB]$ , avec :

- $k_a$  : constante cinétique d'association ( $M^{-1}.s^{-1}$ )
- $k_d$  : constante cinétique de dissociation ( $s^{-1}$ )

Ces constantes cinétiques peuvent être calculées en remplaçant dans l'équation ci dessus :

- [B] : par la concentration connue de l'anticorps injecté
- [AB] : par le signal obtenu en unité de résonance (RU) au temps t (RU<sub>t</sub>)
- [A] : par « RU<sub>max</sub> - RU<sub>t</sub> ». En effet [A] est la concentration de l'haptène libre, c'est donc la

différence entre la concentration totale de l'haptène (pouvant être traduit par le signal maximal obtenu en unité de résonance : RU<sub>max</sub>) et la concentration de l'haptène déjà complexée ([AB] traduit par RU<sub>t</sub>)

La constante apparente de dissociation ou  $K_D$  (exprimée en molarité, M) est calculée à partir des constantes cinétiques :  $K_D = k_d / k_a = [A] \times [B] / [AB]$ .  $K_D$  traduit l'affinité de l'anticorps pour son haptène : plus  $K_D$  est petit, meilleure est l'affinité.

## I.2. Matériels et méthodes

### I.2.1. Matières premières

Les liposomes utilisés pour les études au BIAcore® ont été préparés selon la technique précédemment décrite (cf § I.1.3, p.82). Les liposomes n'ont cependant pas été radiomarqués, mais ont été saturés en indium froid afin de présenter l'haptène DTPA-In à leur surface. Cette saturation est réalisée dans les mêmes conditions que le marquage des liposomes à l'<sup>111</sup>In (cf. II.1.2.2 § p.93) à la seule exception que seul de l'indium froid est utilisé et avec un rapport molaire de 10 équivalents par rapport au DTPA.

Deux anticorps anti-DTPA-In ont été testés : l'anticorps 734 et l'anticorps hMN14x734. L'anticorps 734 est une IgG murine anti-DTPA-In produite par Immunotech SA (France). L'anticorps bispécifique hMN14x734 est un fragment F(ab')<sub>2</sub> anti-ACE/anti-DTPA-In fourni par IBC Pharmaceuticals (New Jersey, USA).

### I.2.2. Appareillage

L'appareil utilisé est le BIAcore® 2000 (GE Healthcare) de la plateforme IMPACT, SFR François Bonamy, muni d'un système microfluidique à 4 canaux d'injection parallèles et permettant

une manipulation des fluides entièrement automatisée. Le biocapteur utilisé est la L1 chip, puce composée d'une matrice de dextran carboxyméthylée modifiée par des substances lipophiles, permettant l'adsorption des liposomes intacts (214).

### **I.2.3. Immobilisation des liposomes**

La L1 chip est conditionnée par l'injection de trois pulses de 1 min à 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  de NaOH 50 mM : isopropanol (3:2 ; v:v) afin d'obtenir la ligne de base. Les liposomes sont ensuite injectés à un débit de 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  à la concentration de 260 nM en PBS, jusqu'à hauteur de 2000 RU. Une fois immobilisés, les liposomes sont lavés par l'injection d'une solution de 50 mM de NaOH pendant 1 min à 20  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , ce qui permet d'éliminer les liposomes mal accrochés.

### **I.2.4. Injection de l'anticorps en cinétique**

Sur les liposomes préalablement immobilisés, l'anticorps est injecté en cinétique dans la veine liquide, avec un débit de 40  $\mu\text{L}/\text{min}$  pendant 3 min. La dissociation par l'injection de tampon seul (PBS) est ensuite monitorée pendant 10 min. Enfin, la régénération est réalisée par l'injection pendant 1 min de NaOH 50 mM. Plusieurs gammes de concentration d'anticorps sont testées pour chaque formulation de liposomes. Et chaque formulation est testée par deux anticorps monoclonaux, l'immunoglobuline G (IgG) "734" anti-DTPA-In (bivalent) et le fragment  $\text{F(ab}')_2$  bispécifique "hMN14-734" anti-DTPA-In/anti-ACE (monovalent pour le DTPA-In).

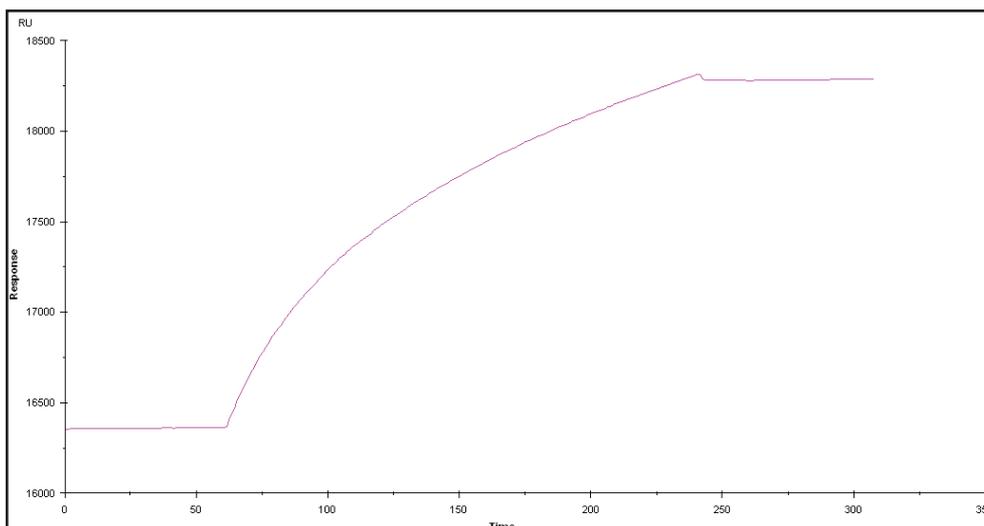
### **I.2.5. Analyse des résultats**

Pour chaque formulation de liposomes, l'analyse cinétique est ajustée à la meilleure gamme de concentration, par « fitting » avec des modèles mathématiques intégrés au logiciel BIAeval4.1, qui analyse également les sensorgrammes. Les sensorgrammes sont au préalable normalisés par la soustraction du signal obtenu en condition « tampon seul ».

## **I.3. Résultats**

### **I.3.1. Immobilisation des liposomes sur le biocapteur**

Lors de l'injection des liposomes en cinétique via le système microfluidique du BIAcore<sup>®</sup>, un signal de résonance est obtenu, témoin de la fixation des liposomes sur le biocapteur. A la fin de l'injection et après lavage par la solution de NaOH, ce signal reste constant signifiant que les liposomes restent bien immobilisés sur la L1 chip (*Figure 28*).

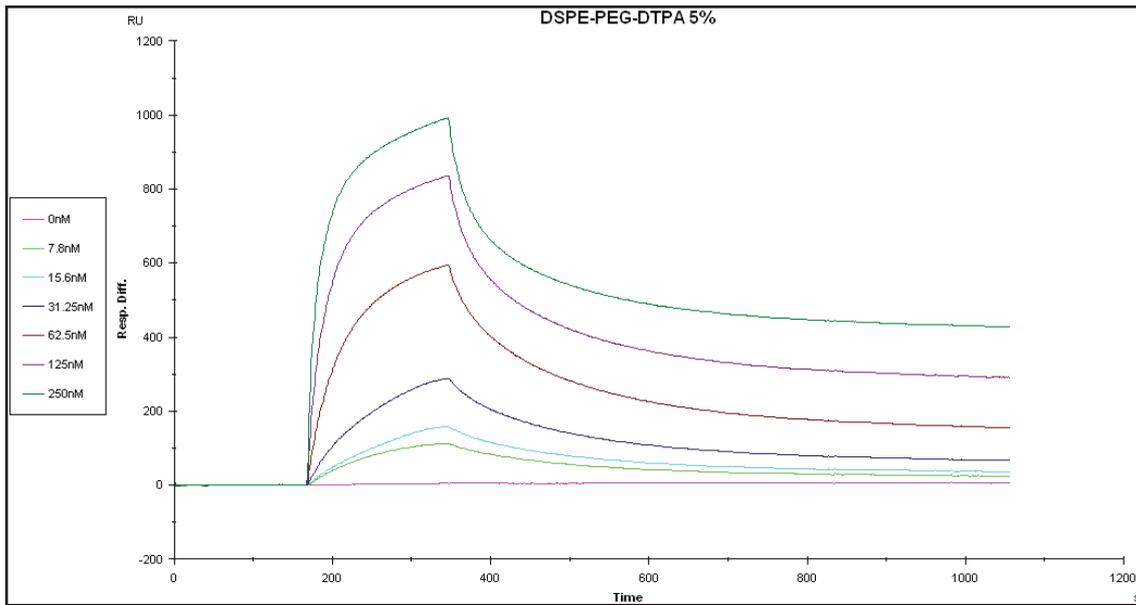


**Figure 28** : Signal obtenu au BIAcore<sup>®</sup> lors de l'immobilisation de liposomes sur la L1 chip suivi d'un lavage par NaOH ("PEG<sub>2000</sub> 5,0%")

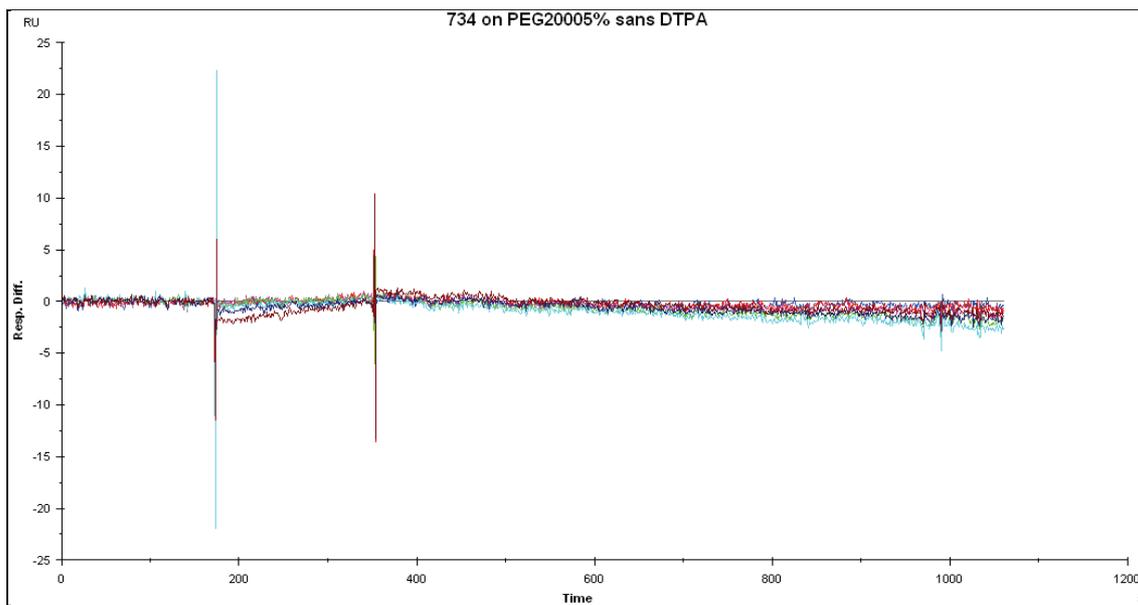
### I.3.2. Injection de l'anticorps en cinétique

L'injection en cinétique d'un anticorps anti-DTPA-In, sur les liposomes immobilisés sur la L1 chip, conduit à l'obtention d'un signal. Ce signal brut est analysé grâce au logiciel BIAeval4.1 permettant d'obtenir l'ajustement des courbes expérimentales en sensorgrammes théoriques. Le score du  $\chi^2$  est inférieur à 5 ce qui permet de valider le fait que les sensorgrammes obtenus corréleront bien avec les courbes expérimentales. L'analyse au BIAcore<sup>®</sup> de toutes les formulations de liposomes conduit à l'obtention de sensorgrammes classiques avec une phase d'association et une phase de dissociation (*Figure 29*), excepté pour la formulation témoin "PEG<sub>2000</sub> 5,0% sans DTPA", donc sans haptène (*Figure 30*). L'absence de signal pour le témoin sans DTPA permet ainsi d'écarter une fixation non spécifique de l'anticorps.

En fonction des différentes formulations de liposomes testées, une concentration plus ou moins importante d'anticorps est nécessaire pour obtenir un signal suffisant et atteindre l'équilibre, ce qui se traduit également par des constantes cinétiques d'association différentes.



**Figure 29** : Sensorgrammes obtenus au BIAcore® après injection de l'anticorps bispécifique hMN14x734 (7,8 à 250 nM) sur les liposomes "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%" préalablement immobilisés sur la L1 chip



**Figure 30** : Résultats obtenus au BIAcore® après injection de l'anticorps 734 sur les liposomes témoins "PEG<sub>2000</sub> 5,0% sans DTPA"

### I.3.3. Constantes cinétiques et constante apparente de dissociation

#### I.3.3.1. Etude avec l'anticorps IgG 734

L'étude de l'affinité entre les liposomes et un anticorps anti-DTPA-In a tout d'abord été menée avec une IgG divalente pour l'haptène. Les constantes cinétiques d'association ( $k_a$ ) et de dissociation ( $k_d$ ) ainsi que la constante apparente de dissociation ( $K_D$ ) obtenues avec cet anticorps sont présentées dans le *Tableau 12*.

Formulations	$k_a$ (M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$K_D$ (M)
Conventionnels	$5,08 \cdot 10^5$	$8,03 \cdot 10^{-4}$	$1,58 \cdot 10^{-9}$
PEG <sub>1000</sub> 2,5%	$1,30 \cdot 10^5$	$8,00 \cdot 10^{-4}$	$6,15 \cdot 10^{-9}$
PEG <sub>1000</sub> 6%	$1,49 \cdot 10^4$	$7,60 \cdot 10^{-4}$	$5,10 \cdot 10^{-8}$
PEG <sub>2000</sub> 1,5%	$7,18 \cdot 10^4$	$1,00 \cdot 10^{-3}$	$1,39 \cdot 10^{-8}$
PEG <sub>2000</sub> 2,5%	$3,57 \cdot 10^4$	$1,10 \cdot 10^{-3}$	$3,00 \cdot 10^{-8}$
PEG <sub>2000</sub> 5%	$8,10 \cdot 10^3$	$9,00 \cdot 10^{-4}$	$1,11 \cdot 10^{-7}$
DTPA-PEG <sub>2000</sub> 5%	$2,59 \cdot 10^5$	$2,97 \cdot 10^{-4}$	$1,15 \cdot 10^{-9}$
PEG <sub>2000</sub> 5% sans DTPA	/	/	/

**Tableau 12 :** Constantes cinétiques d'association ( $k_a$ ) et de dissociation ( $k_d$ ) et constante apparente de dissociation ( $K_D$ ) obtenues avec l'IgG 734 sur les différentes formulations de liposomes

Pour le témoin négatif "PEG<sub>2000</sub> 5% sans DTPA", l'absence de sensorgramme explique l'absence de valeur. En effet, aucune association n'a eu lieu entre l'anticorps et cette formulation de liposomes.

Pour les autres formulations présentant l'haptène à leur surface, des  $K_D$  ont pu être calculés, de l'ordre 1 à 100 nM. La meilleure affinité est observée pour les liposomes avec l'haptène à l'extrémité des chaînes de PEG, avec un  $K_D$  de 1,15 nM, très proche du  $K_D$  des liposomes conventionnels qui est de 1,58 nM. En revanche, l'affinité la plus faible est observée pour les liposomes "PEG<sub>2000</sub> 5%" avec un  $K_D$  de 111 nM.

Si l'on s'intéresse aux liposomes portant l'haptène directement sur la bicouche lipidique (via la DSPE-DTPA), ces résultats montrent par ailleurs que l'affinité de l'anticorps pour les liposomes pégylés est plus faible que pour les "Conventionnels" et ce, proportionnellement à la densité et à la taille des chaînes de PEG à la surface des liposomes (respectivement *Tableau 13* et *Tableau 14*).

Formulations	$K_D$ (M)
PEG <sub>2000</sub> 1,5%	$1,39 \cdot 10^{-8}$
PEG <sub>2000</sub> 2,5%	$3,00 \cdot 10^{-8}$
PEG <sub>2000</sub> 5%	$1,11 \cdot 10^{-7}$

**Tableau 13** : Influence de la densité des chaînes de PEG sur l'affinité Ac-liposomes

Formulations	$K_D$ (M)
PEG <sub>1000</sub> 2,5%	$6,15 \cdot 10^{-9}$
PEG <sub>2000</sub> 2,5%	$3,00 \cdot 10^{-8}$

**Tableau 14** : Influence de la longueur des chaînes de PEG sur l'affinité Ac-liposomes

Si l'on définit un degré de pégylation (noté d° PEG) comme étant le produit de la longueur de la chaîne de PEG et de son pourcentage molaire, il apparaît alors que la variation des  $K_D$  suit le même sens de variation que le degré de pégylation (Tableau 15).

Formulations	d° PEG	$K_D$ (nM)
Conventionnels	0	1,6
PEG <sub>1000</sub> 2,5%	25	6,2
PEG <sub>2000</sub> 1,5%	30	14
PEG <sub>2000</sub> 2,5%	50	31
PEG <sub>1000</sub> 6%	60	51
PEG <sub>2000</sub> 5%	100	111

**Tableau 15** : Variation du  $K_D$  (nM) en fonction du degré de pégylation des liposomes (d° PEG) défini comme le produit de la longueur et du pourcentage molaire des chaînes de PEG

On peut également remarquer que les  $k_d$  de toutes les formulations sont relativement proches avec une moyenne de  $8 \cdot 10^{-4}$  M, contrairement au  $k_a$  qui varie d'une formulation à l'autre. Le complexe anticorps-haptène se dissocie donc quasiment à la même vitesse quelle que soit la formulation. L'affinité est ainsi majoritairement conditionnée par le  $k_a$ .

### I.3.3.2. Etude avec l'anticorps bispécifique hMN14x734

Une deuxième étude a été réalisée pour évaluer cette fois-ci l'affinité des liposomes fonctionnalisés avec l'anticorps bispécifique hMN14x734 (anti-ACE / anti-DTPA-In), utilisé pour le ciblage des liposomes *in vivo*. Les résultats obtenus sont reportés dans le Tableau 16. Les résultats sont concordants avec ceux obtenus pour l'anticorps 734 et varient de la même manière en fonction de la pégylation des liposomes.

Formulations	$k_a$ (M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	$k_d$ (s <sup>-1</sup> )	$K_D$ (M)
Conventionnels	$2,73 \cdot 10^4$	$6,80 \cdot 10^{-4}$	$2,49 \cdot 10^{-8}$
PEG <sub>1000</sub> 2,5%	$7,06 \cdot 10^4$	$3,00 \cdot 10^{-3}$	$4,25 \cdot 10^{-8}$
PEG <sub>1000</sub> 6%	$2,11 \cdot 10^4$	$3,57 \cdot 10^{-3}$	$1,69 \cdot 10^{-7}$
PEG <sub>2000</sub> 1,5%	$4,55 \cdot 10^4$	$3,03 \cdot 10^{-3}$	$6,66 \cdot 10^{-8}$
PEG <sub>2000</sub> 2,5%	$1,33 \cdot 10^4$	$2,48 \cdot 10^{-3}$	$1,86 \cdot 10^{-7}$
PEG <sub>2000</sub> 5%	$1,53 \cdot 10^4$	$3,93 \cdot 10^{-3}$	$2,57 \cdot 10^{-7}$
DTPA-PEG <sub>2000</sub> 5%	$1,16 \cdot 10^5$	$7,31 \cdot 10^{-4}$	$6,30 \cdot 10^{-9}$
PEG <sub>2000</sub> 5% sans DTPA	/	/	/

**Tableau 16 :** Constantes cinétiques d'association ( $k_a$ ) et de dissociation ( $k_d$ ) et constante apparente de dissociation ( $K_D$ ) obtenues avec le fragment  $F(ab')_2$  bispécifique hMN14x734 sur les différentes formulations de liposomes

On observe néanmoins une diminution globale de l'affinité, avec une perte moyenne d'environ  $\frac{1}{2}$  Log, soit un  $K_D$  divisé en moyenne par 5 pour toutes les formulations pégylées. Cette baisse de l'affinité est en partie liée à une baisse, bien que minime, de la vitesse d'association, en moyenne 1,5 fois plus lente. Mais elle est majoritairement due à une augmentation de la vitesse de dissociation, en moyenne 3,5 fois plus rapide.

La formulation de liposomes présentant la meilleure affinité pour l'anticorps demeure néanmoins les "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%" avec un  $K_D$  de 6,3 nM et l'affinité la plus faible avec un  $K_D$  de 257 nM est encore obtenue pour les liposomes "PEG<sub>2000</sub> 5%".

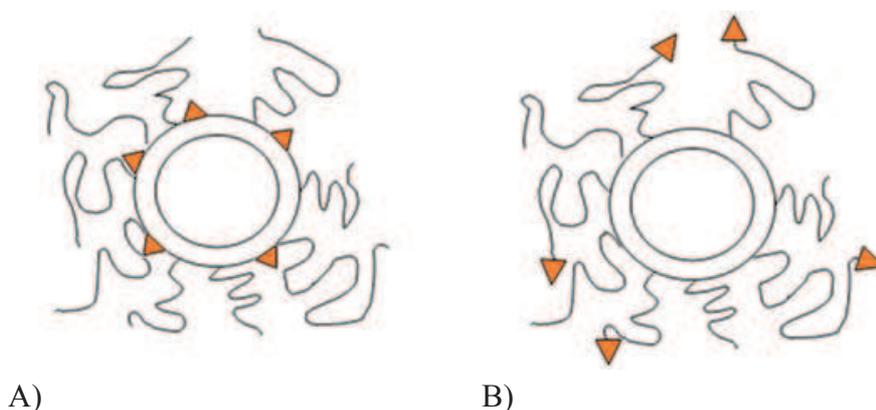
## I.4. Discussion

Pour chaque formulation, les sensorgrammes obtenus lors de la première étape d'immobilisation, nous permettent tout d'abord de valider que les liposomes sont bien retenus sur les L1 chip. L'absence de signal observé avec le témoin négatif "PEG<sub>2000</sub> 5,0% sans DTPA", qui ne porte donc pas l'haptène, nous permet ensuite d'attester que les phénomènes d'association observés avec les autres formulations sont bien immunospécifiques.

Les études d'affinité entre les liposomes et l'anticorps ont tout d'abord été réalisées avec l'IgG 734 divalente pour l'haptène DTPA-In. En fonction des formulations de liposomes, le  $K_D$  obtenu varie de 1 à 110 nM. La liaison de l'IgG 734 au complexe soluble DTPA-In a par ailleurs été caractérisée avec un  $K_D$  de 0,3 nM (215). Les résultats obtenus avec les différentes formulations de liposomes montrent donc une affinité inférieure des liposomes par rapport à l'haptène soluble, puisque les  $K_D$  obtenus sont supérieurs. Néanmoins, les liposomes avec l'haptène à l'extrémité des chaînes de PEG ("DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%") ou sans PEG ("Conventionnels") s'en rapprochent. Ces résultats confirment

donc bien le rôle et l'influence des chaînes de PEG quant à la reconnaissance de l'haptène par l'anticorps. En effet, plus le degré de pégylation augmente, plus l'affinité diminue.

Cette interférence des chaînes de PEG sur la reconnaissance de l'haptène peut être analysée plus en détail. Les résultats montrent que les différents  $k_d$  sont très proches et que ce n'est donc pas la vitesse de dissociation qui influence l'affinité globale. Par contre, nous avons mis en évidence que l'affinité était conditionnée par la constante cinétique d'association  $k_a$ . En effet cette association est réalisée d'autant plus lentement que les liposomes sont pégylés. La vitesse d'association semble en effet dépendre de la densité et de la longueur des chaînes de PEG à la surface des liposomes. Cela peut facilement s'expliquer par une moins bonne diffusion de l'anticorps jusqu'à l'haptène due à l'encombrement stérique à la surface des liposomes fortement pégylés. Le résultat obtenu pour les liposomes présentant l'haptène à l'extrémité des chaînes de PEG renforce cette hypothèse puisqu'en s'affranchissant de l'encombrement stérique (*Figure 31*), une très bonne affinité, équivalente aux liposomes conventionnels, est retrouvée.



**Figure 31** : Représentation schématique de liposomes portant l'haptène directement sur la bicouche lipidique (A) ou à l'extrémité des chaînes de PEG (B)

Après cette première étude menée avec l'Ac divalent 734, nous avons procédé à l'analyse de l'affinité des liposomes fonctionnalisés avec l'Ac bispécifique hMN14x734 (anti-ACE / anti-DTPA-In) utilisé pour le ciblage des liposomes *in vivo*. Cette deuxième étude permet d'aboutir aux mêmes conclusions concernant l'encombrement stérique généré par les PEG puisque les résultats sont concordants et varient dans le même sens que la première étude.

On observe cependant une diminution générale de l'affinité avec cet anticorps. Ce constat est facilement expliqué par la différence majeure entre les deux anticorps testés : le premier, divalent, forme un complexe avec l'haptène bien plus stable que le second, monovalent pour l'haptène. On peut donc s'attendre à ce que le complexe formé par l'Ac hMN14x734 avec l'haptène se dissocie plus facilement. C'est ce que l'on a en effet pu vérifier avec les résultats obtenus au BIAcore<sup>®</sup> qui montrent que si l'Ac bispécifique s'associe légèrement moins vite que l'Ac 734 (1,5 fois moins vite), il se

dissocie surtout beaucoup plus rapidement, avec un  $k_d$  multiplié en moyenne par 3,5 par rapport à l'Ac 734.

Cette diminution de l'affinité avec l'anticorps bispécifique ne devrait cependant pas avoir de répercussion *in vivo*. En effet, le protocole de RIT en deux temps consiste à injecter les Ac en premier, leur permettant de cibler préalablement la tumeur. Les liposomes injectés dans un deuxième temps, peuvent ainsi se lier à plusieurs Ac prélocalisés au niveau tumoral, grâce à la multitude d'haptènes présents à leur surface. Cela doit en effet permettre de stabiliser l'ensemble de la structure cellule-anticorps-liposome et de retrouver les affinités observées pour l'Ac divalent.

Cette étude au BIAcore<sup>®</sup> a permis de mettre en évidence et de quantifier précisément l'influence de la pégylation sur la reconnaissance spécifique entre l'anticorps et les liposomes fonctionnalisés. La pégylation des liposomes est indispensable pour obtenir des temps de circulation prolongés *in vivo* et nous avons montré comment contourner les problèmes d'encombrement stérique qui en résultent, en positionnant l'haptène à l'extrémité des chaînes de PEG. Cependant, en fonction de la molécule utilisée pour le ciblage spécifique, cette alternative n'est pas toujours efficace comme le montre l'étude de Lehtinen (216). Après échec du ciblage de liposomes par un nouveau peptide positionné à l'extrémité des chaînes de PEG, les auteurs ont montré que ce peptide était relativement hydrophobe et qu'il se repliait à l'intérieur de la couche formée par les chaînes de PEG, ne pouvant plus interagir avec son ligand. Dans ce cas précis une analyse par une méthode telle que le BIAcore<sup>®</sup> aurait pu prédire l'échec de ce ciblage. Cette méthode développée au BIAcore<sup>®</sup> peut en effet permettre d'analyser et de quantifier les interactions de liposomes immunospécifiques avec leur ligand, constituant un outil précieux pour sélectionner les formulations qui devraient donner les meilleurs résultats *in vivo*.

## II. ETUDE DES PARAMETRES PHARMACOCINETIQUES

Préalablement à ces études de pharmacocinétique sanguine, des études de stabilité sérique du radiomarquage *in vitro*, ainsi que des études préliminaires *in vivo*, avaient déjà été réalisées au sein du laboratoire avec des liposomes conventionnels et des liposomes pégylés ("PEG<sub>2000</sub> 5,0%"). Ces études avaient montré une stabilité du radiomarquage supérieure à 90 % jusqu'à six jours en sérum humain (177).

### II.1. Matériels et méthodes

Les liposomes utilisés pour les études *in vivo* ont été préparés selon la technique précédemment décrite (cf § I.1.3, p.82), purifiés sur colonne Superdex<sup>®</sup> G200 couplé à un système HPLC, et doublement radiomarqués selon le protocole décrit au paragraphe II.1.4 page 97.

La totalité des liposomes injectés aux souris n'est pas entièrement radiomarquée. En effet, seule une fraction d'environ 100 nmol de lipides est doublement radiomarquée. A cette fraction de liposomes dits « chauds » est ajoutée une quantité de liposomes « froids », de même formulation, de façon à obtenir une dose totale de 500 nmol de lipides par souris, nécessaire à la saturation du système réticulo-endothélial (217).

Les études de pharmacocinétique sanguine ont été effectuées sur des souris BALB/c femelles saines fournies par le laboratoire Janvier (France).

Pour chaque formulation, des groupes de trois à quatre souris ont reçu 500 nmol de lipides (volume total de 100 µL) injectés dans la veine de la queue. A différents temps après injection (5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h et 24 h), un échantillon sanguin a été prélevé par ponction veineuse au niveau du sinus oculaire. Chaque échantillon a été pesé puis l'activité en <sup>111</sup>In et en <sup>125</sup>I (après décroissance de l'<sup>111</sup>In) a été mesurée au compteur gamma. L'analyse de ces données à l'aide d'un logiciel de pharmacocinétique développé au sein du laboratoire (Pharmacokinetics, complément Microsoft Office Excel, J. Barbet) a permis de déterminer l'ensemble des paramètres pharmacocinétiques pour chaque souris. Les valeurs moyennes ont ensuite été calculées pour chaque formulation de liposomes.

## II.2. Résultats

Les différents paramètres pharmacocinétiques ont été déterminés par le logiciel Pharmacokinetics selon un modèle mono-exponentiel pour les liposomes conventionnels et bi-exponentiel pour les liposomes pégylés. Ces données sont rassemblées dans le *Tableau 17* ci-dessous.

Formulation	n	Radionucléide	T <sub>1/2</sub> α (h)	T <sub>1/2</sub> β (h)	Clairance (mL/h)
Conventionnels	3	<sup>125</sup> I	1,25 ± 0,03		1,68 ± 0,42
		<sup>111</sup> In	1,44 ± 0,03		1,52 ± 0,37
PEG <sub>1000</sub> 2,5%	4	<sup>125</sup> I	0,46 ± 0,16	8,86 ± 0,96	0,22 ± 0,04
		<sup>111</sup> In	0,28 ± 0,07	9,49 ± 0,57	0,31 ± 0,04
PEG <sub>1000</sub> 6%	3	<sup>125</sup> I	0,85 ± 0,14	14,48 ± 0,92	0,14 ± 0,01
		<sup>111</sup> In	0,41 ± 0,04	13,39 ± 0,39	0,27 ± 0,01
PEG <sub>2000</sub> 1,5%	4	<sup>125</sup> I	0,51 ± 0,16	8,30 ± 0,51	0,25 ± 0,03
		<sup>111</sup> In	0,34 ± 0,05	9,00 ± 0,37	0,25 ± 0,01
PEG <sub>2000</sub> 2,5%	3	<sup>125</sup> I	0,72 ± 0,70	13,21 ± 1,11	0,20 ± 0,05
		<sup>111</sup> In	0,55 ± 0,20	12,02 ± 0,40	0,28 ± 0,06
PEG <sub>2000</sub> 5%	3	<sup>125</sup> I	0,99 ± 0,06	14,95 ± 0,36	0,15 ± 0,01
		<sup>111</sup> In	0,70 ± 0,16	13,02 ± 1,35	0,17 ± 0,02
DTPA-PEG <sub>2000</sub> 5%	4	<sup>125</sup> I	0,84 ± 0,19	14,32 ± 1,77	0,15 ± 0,02
		<sup>111</sup> In	0,58 ± 0,13	10,75 ± 0,98	0,17 ± 0,01

**Tableau 17 :** Demi-vies (T<sub>1/2</sub>) et clairances sanguines obtenues pour chaque formulation, en <sup>125</sup>I et en <sup>111</sup>In, après analyse des données expérimentales par le logiciel Pharmacokinetics (moy ± ET)

De manière globale, les demi-vies sanguines obtenues avec l'<sup>125</sup>I, ont tendance à être légèrement plus lentes qu'avec l'<sup>111</sup>In, mais la comparaison statistique réalisée pour chaque formulation, ne permet pas de mettre en évidence de différence significative entre les paramètres pharmacocinétiques obtenus avec les 2 radionucléides (0,125 < p < 0,25 ; test non paramétrique de Wilcoxon sur séries appariées). En l'absence de différence significative, les paramètres pharmacocinétiques moyens ont été calculés pour chaque formulation indépendamment du traceur radioactif. Ces résultats sont reportés dans le *Tableau 18*.

Formulation	n	T <sub>1/2</sub> α (h)	T <sub>1/2</sub> β (h)	Clairance (mL/h)
Conventionnels	6	1,35 ± 0,11		1,60 ± 0,36
PEG <sub>1000</sub> 2,5%	8	0,37 ± 0,15	9,17 ± 0,80	0,26 ± 0,06
PEG <sub>1000</sub> 6%	6	0,63 ± 0,26	13,94 ± 0,87	0,20 ± 0,07
PEG <sub>2000</sub> 1,5%	8	0,43 ± 0,14	8,65 ± 0,56	0,25 ± 0,02
PEG <sub>2000</sub> 2,5%	6	0,64 ± 0,18	12,62 ± 0,99	0,24 ± 0,06
PEG <sub>2000</sub> 5%	6	0,84 ± 0,19	13,98 ± 1,38	0,16 ± 0,01
DTPA-PEG <sub>2000</sub> 5%	8	0,71 ± 0,20	12,54 ± 2,35	0,16 ± 0,02

**Tableau 18 :** Demi-vies (T<sub>1/2</sub>) et clairances sanguines moyennes obtenues pour chaque formulation, après analyse des données expérimentales par le logiciel Pharmacokinetics (moy ± ET).

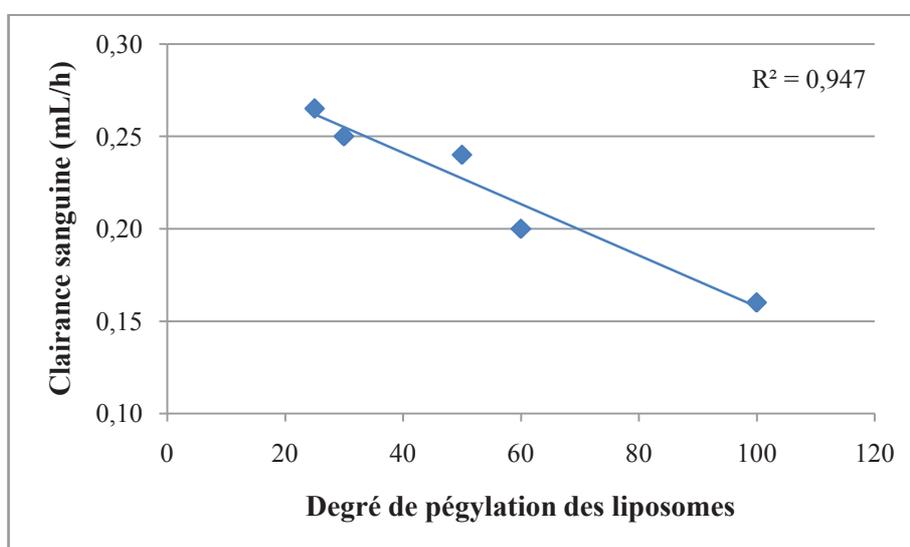
L'analyse de ces données montre une grande différence entre les liposomes pégylés et non pégylés. Les liposomes "Conventionnels" sont éliminés très rapidement avec une clairance moyenne de 1,60 mL/h, alors que la clairance sanguine moyenne pour l'ensemble des liposomes pégylés est de 0,21 ± 0,06 mL/h soit huit fois plus lente.

Contrairement aux liposomes conventionnels caractérisés par une demi-vie d'élimination sanguine globale de 1,35 h de moyenne, les liposomes pégylés présentent deux types de demi-vies : une demi-vie de distribution (T<sub>1/2</sub> α) de 36 ± 13 min de moyenne, et une demi-vie d'élimination (T<sub>1/2</sub> β) de 11,8 ± 2,4 h de moyenne. En fonction des formulations de liposomes considérées, la demi-vie d'élimination des liposomes pégylés varie de 9 à 14 h.

Les résultats observés montrent également une bonne corrélation entre l'élimination plasmatique des liposomes et leur degré de pégylation (d° PEG défini au § I.3.3.1 p.114). Le *Tableau 19* révèle en effet que la clairance plasmatique varie de manière inversement proportionnelle au degré de pégylation des liposomes. La droite de régression linéaire obtenue avec ces données permet d'obtenir une bonne corrélation avec un coefficient de corrélation linéaire de 0,95 comme le montre la *Figure 32*.

Formulation	d° PEG	Clairance (mL/h)	T½ (h)
Conventionnels	0	1,60	1,4
PEG <sub>1000</sub> 2,5%	25	0,27	9,2
PEG <sub>2000</sub> 1,5%	30	0,25	8,7
PEG <sub>2000</sub> 2,5%	50	0,24	12,6
PEG <sub>1000</sub> 6%	60	0,20	13,9
PEG <sub>2000</sub> 5%	100	0,16	14,0
DTPA-PEG <sub>2000</sub> 5%	100	0,16	12,5

**Tableau 19 :** Variation de la clairance sanguine des liposomes (mL/h) en fonction du degré de pégylation des liposomes (d° PEG) défini comme le produit de la longueur et du pourcentage molaire des chaînes de PEG



**Figure 32 :** Clairance sanguine des liposomes (mL/h) en fonction du degré de pégylation des liposomes

Par ailleurs, pour des degrés de pégylation similaires, les paramètres pharmacocinétiques obtenus sont similaires. Le *Tableau 20* présente en effet, les demi-vies et clairances sanguines des liposomes en fonction de leur pégylation (groupes de pégylation : faible, moyenne ou forte), ainsi que les degrés de significativité (p) obtenus (test non paramétrique de Wilcoxon sur séries non appariées). Aucune différence significative n'apparaît pour deux formulations appartenant au même groupe de pégylation ( $p > 0,05$ ).

A l'inverse, pour des formulations avec des degrés de pégylation très différents, les paramètres pharmacocinétiques sont également significativement différents. La comparaison des demi-vies et clairance sanguines des liposomes "PEG<sub>1000</sub> 2,5%" (d° PEG = 25) et "PEG<sub>2000</sub> 5,0%" (d° PEG = 100) donne par exemple un degré de significativité très faible :  $p \leq 0,001$ .

Formulation	Péglylation faible			Péglylation moyenne			Péglylation forte		
	PEG <sub>1000</sub> 2,5%	PEG <sub>2000</sub> 1,5%	<i>p</i>	PEG <sub>1000</sub> 6,0%	PEG <sub>2000</sub> 2,5%	<i>p</i>	PEG <sub>2000</sub> 5,0%	PEG <sub>2000</sub> DTPA	<i>p</i>
d° PEG	25	30		60	50		100	100	
T <sub>1/2</sub> α	0,37	0,43	<b>0,29</b>	0,63	0,64	<b>1</b>	0,84	0,71	<b>0,23</b>
T <sub>1/2</sub> β	9,17	8,65	<b>0,13</b>	13,94	12,62	<b>0,065</b>	13,98	12,54	<b>0,23</b>
Clairance	0,26	0,25	<b>0,72</b>	0,20	0,24	<b>0,39</b>	0,16	0,16	<b>1</b>

**Tableau 20 :** Paramètres pharmacocinétiques en fonction de la péglylation des liposomes, *p* correspondant au degré de significativité obtenu lors de la comparaison statistique des deux formulations de chaque groupe (test de Wilcoxon sur séries non appariées)

### II.3. Discussion

L'absence de différence significative entre les paramètres pharmacocinétiques calculés à partir des données pour l'<sup>111</sup>In (traceur de la bicouche lipidique) et pour l'<sup>125</sup>I (traceur de la phase aqueuse) permet tout d'abord de démontrer l'intégrité des liposomes dans le compartiment sanguin. Les longues demi-vies d'élimination observées permettent également de montrer leur stabilité *in vivo*. La composition des liposomes et le choix du double marquage présentés dans le chapitre précédent montrent ici tout leur intérêt.

Les données de pharmacocinétique montrent une grande différence entre les liposomes conventionnels et les liposomes pégylés concernant leur élimination. Le mode d'élimination même est différent, selon qu'il s'agisse de liposomes conventionnels ou de liposomes pégylés. En effet les liposomes conventionnels sont éliminés très rapidement selon un modèle pharmacocinétique non linéaire saturable (175,218). Les liposomes pégylés suivent quant à eux un profil pharmacocinétique bi-exponentiel régi par une équation de type :  $C = A.e^{-\alpha t} + B.e^{-\beta t}$ . Ce modèle présente une phase de distribution très rapide caractérisée par une demi-vie de distribution (T<sub>1/2</sub> α) d'environ 30 min, en moyenne, et une phase d'élimination plus lente caractérisée par une demi-vie d'élimination (T<sub>1/2</sub> β) d'environ 12 h, en moyenne. Nos résultats sont comparables à ce qu'a pu obtenir Harrington, avec des liposomes composés de phosphatidylcholine de soja hydrogéné, de cholestérol et de DSPE-PEG<sub>2000</sub> (56,2:38,3:5,3), formulation relativement proche de la nôtre. Nos résultats sont tout à fait concordants avec ce qui est décrit dans la littérature, puisque les données pharmacocinétiques de cette étude montrent une demi-vie de distribution de 1,1 h et une demi-vie d'élimination de 10,3 h (219).

Par ailleurs, nous avons déterminé une clairance sanguine moyenne des liposomes pégylés de 0,21 mL/min, soit 8 fois plus lente que pour les liposomes conventionnels. Nous avons également pu mettre en évidence un lien étroit entre la clairance sanguine des liposomes et leur degré de péglylation,

en tenant compte à la fois de la longueur et de la densité des chaînes de PEG à la surface des liposomes. Nous avons donc pu vérifier toutes les données de la littérature qui rapportent une augmentation des temps de circulation et une diminution de la clairance plasmatique avec les liposomes pégylés (appelés « stealth liposomes » ou « liposomes furtifs ») par rapport aux liposomes non pégylés (58,60,218,220). Nous avons également pu démontrer statistiquement qu'il n'y avait pas de différence significative des paramètres pharmacocinétiques entre deux formulations ayant des degrés de pégylation proches, malgré des longueurs de chaînes de PEG différentes. Des longueurs de chaînes de PEG plus courtes peuvent ainsi être compensées par des quantités de PEG plus importantes. Il est également très intéressant de constater que la présence de DTPA à l'extrémité des chaînes de PEG n'influence que très peu les paramètres pharmacocinétiques. En effet, malgré une  $T_{1/2\beta}$  légèrement inférieure (12,54 h vs 13,98 h), aucune différence significative n'est retrouvée entre les liposomes "PEG<sub>2000</sub> 5%" et "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5%", leurs clairances sanguines en particulier sont identiques (0,16 mL/h).

Les résultats des études de pharmacocinétique ne sont pas inattendus puisque les conséquences de la pégylation sur le devenir *in vivo* des liposomes ont déjà été très documentées. Le principal intérêt de ces études est de trouver le meilleur compromis entre les demi-vies plasmatiques *in vivo* des liposomes et leurs constantes d'affinité *in vitro*, afin d'optimiser le ciblage tumoral. D'un côté, la pégylation permet effectivement de prolonger la circulation des liposomes favorisant l'accumulation tumorale par l'effet EPR, de l'autre, elle peut entraver la reconnaissance spécifique entre les liposomes et l'anticorps prélocalisé au niveau tumoral. Le principal objectif de ce travail de thèse est alors de trouver la meilleure formulation dans le but d'optimiser le ciblage immunospécifique de nos liposomes.

### **III. ETUDE DE L'INTERACTION CELLULAIRE DES LIPOSOMES PAR MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE**

Toujours dans l'objectif final de ciblage tumoral spécifique, nous avons poursuivi les caractérisations *in vitro* des liposomes fonctionnalisés, en étudiant leurs interactions avec les cellules. Des études *in vitro* par microscopie ont alors été menées afin d'évaluer l'immunospecificité du système de ciblage en deux temps, ainsi que l'éventuelle internalisation des liposomes dans les cellules.

#### **III.1. Matériels et méthodes**

##### **III.1.1. Matières premières**

La lignée cellulaire utilisée pour cette expérimentation *in vitro* est la même que celle utilisée pour le modèle animal des études *in vivo*. Il s'agit de la lignée LS174T provenant de l'*American Type Culture Collection* (USA), lignée d'adénocarcinome colique humain exprimant fortement l'ACE à la surface des cellules. Les cellules ont été cultivées en milieu RPMI 1640 (Gibco®) supplémenté ou non en glutamine 2 mM (Invitrogen, France) et en sérum de veau fœtal (SVF) 10 % (Laboratoire PAA, France). Le paraformaldéhyde utilisé pour la fixation des cellules provient du laboratoire Electron Microscopy Sciences, Washington.

L'anticorps bispécifique utilisé : l'hMN14x734 (anti-DTPA-In/anti-ACE) a été fourni par IBC Pharmaceuticals, New Jersey, USA.

Les liposomes utilisés pour cette étude de microscopie, sont les liposomes doublement fluorescents préparés selon la technique précédemment décrite (formulation DSPC/Chol/DSPE-PEG<sub>2000</sub>/DSPE-PEG<sub>2000</sub>-DTPA/DPPE-rho 64,0 : 30,5 : 3,5 : 1,5 : 0,5). Ces liposomes fluorescents n'ont pas été radiomarqués mais ont tout de même été saturés avec de l'indium froid de manière à présenter l'haptène à l'extrémité des chaînes de PEG, comme dans les expériences *in vivo*. Cette saturation est réalisée dans les mêmes conditions que le marquage des liposomes à l'<sup>111</sup>In (cf. § II.1.2.2 p.93) à la seule exception que seul de l'indium froid est utilisé, avec un rapport molaire de 10 équivalents par rapport au DTPA.

### III.1.2. Appareillage

Ces études de microscopie confocale ont été réalisées au niveau de la plateforme Picell, SFR Santé François Bonamy avec le microscope Nikon A1 Rsi piloté par le logiciel NIS Element (Nikon) et équipé d'un objectif Plan Apo x60/1,4 et Plan Apo x20/0,75. Ce microscope est adapté à l'imagerie confocale en système fixé ou vivant (contrôle de la température, du taux de CO<sub>2</sub>).

Les images des cellules sont obtenues classiquement par microscopie à fond clair, tandis que les signaux fluorescents de la FITC et de la rhodamine sont obtenus après excitation par un laser à argon et par un laser à diode respectivement de 488 nm et 561 nm. La fluorescence émise en retour est collectée respectivement à 525 nm pour la FITC et 595 nm pour la fluorescéine. Les images sont acquises à une taille de 512 x 512 pixels par champ.

### III.1.3. Culture cellulaire

Les cellules ont étéensemencées la veille en chambre de culture LAB-TEK 8 puits, à raison de 100 000 cellules par puits dans 300 µL de milieu de culture RPMI 1640, additionné ou non de glutamine 2 mM et SVF 10 %. Les cultures cellulaires sont réalisées dans un incubateur à 37°C avec une pression partielle en CO<sub>2</sub> de 5%. Toutes les manipulations de culture cellulaires sont faites en conditions stériles.

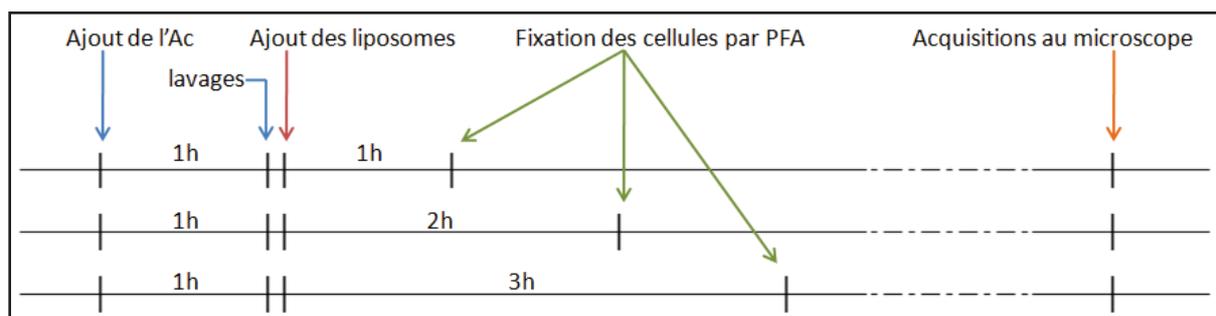
Le jour de l'expérimentation sous microscope, les cellules ont été lavées une fois avant de remplacer le milieu de culture par 300 µL d'une solution de l'anticorps dilué à 10 µg/mL (ou 0 µg/mL pour les puits sans Ac) en RPMI 1640 (± glutamine et SVF). Après 1 h d'incubation, les cellules ont ensuite été lavées trois fois par 300 µL de milieu de culture.

#### III.1.3.1. Cellules fixées

Les premières expérimentations ont été faites sur cellules fixées, permettant l'observation au microscope de façon différée, selon le plan d'expérience présenté *Figure 33*.

Dans ce cas, les liposomes ont été ajoutés aux cellules en remplaçant le milieu de culture par 300 µL d'une suspension de liposomes à 50 nmol/mL de lipides en milieu RPMI 1640, soit 15 nmol de lipides par puits, ce qui correspond environ à 1,5 million de liposomes par cellule.

Après 1 h, 2 h et 3 h d'incubation avec les liposomes, les cellules ont été fixées par l'ajout de 10 µL de PFA à 32% (paraformaldéhyde), soit 1 % final de PFA dans chaque puits.



**Figure 33** : Plan d'expérience suivi pour l'observation au microscope des cellules fixées en présence de liposomes fluorescents

### III.1.3.2. Cellules vivantes

Les autres expérimentations ont ensuite été réalisées sur cellules vivantes, notamment pour suivre la cinétique des interactions liposomes/cellules en temps réel (acquisition time-lapse). Pour cela les liposomes ont été ajoutés aux cellules, un quart d'heure avant ou simultanément au lancement de l'acquisition time-lapse, en remplaçant le milieu par une suspension de liposomes dilués (cf. § III.1.3.1 ci-dessus). Pour comparer le ciblage actif et passif, une quantification de la fluorescence fixée a été réalisée. Les cellules ont dans ce cas été incubées pendant 2 à 3 h avec les liposomes, puis lavées avant l'acquisition au microscope.

Dans le but d'essayer de diminuer la quantité de liposomes mis en présence des cellules par rapport à la première expérience, plusieurs dilutions de liposomes ont été préparées de manière à avoir 15 000, 75 000, 150 000 ou 750 000 liposomes par cellule.

### III.1.4. Traitement des images

Les images ont été traitées et analysées par le logiciel Fiji (221) et le logiciel NIS Element (Nikon). Le protocole suivant a été suivi avec le logiciel Fiji afin de quantifier et comparer le signal de fluorescence entre différentes acquisitions.

Le signal de fluorescence a tout d'abord été compilé pour les différentes coupes en "z" en projetant sur une nouvelle image, la somme du signal des différentes coupes. Un filtre médian (radius 2) a été appliqué pour réduire le bruit de fond. Le signal de fluorescence a ensuite été seuillé en utilisant l'algorithme "Otsu", ce qui a permis de quantifier la surface du champ d'observation couverte par des particules fluorescentes.

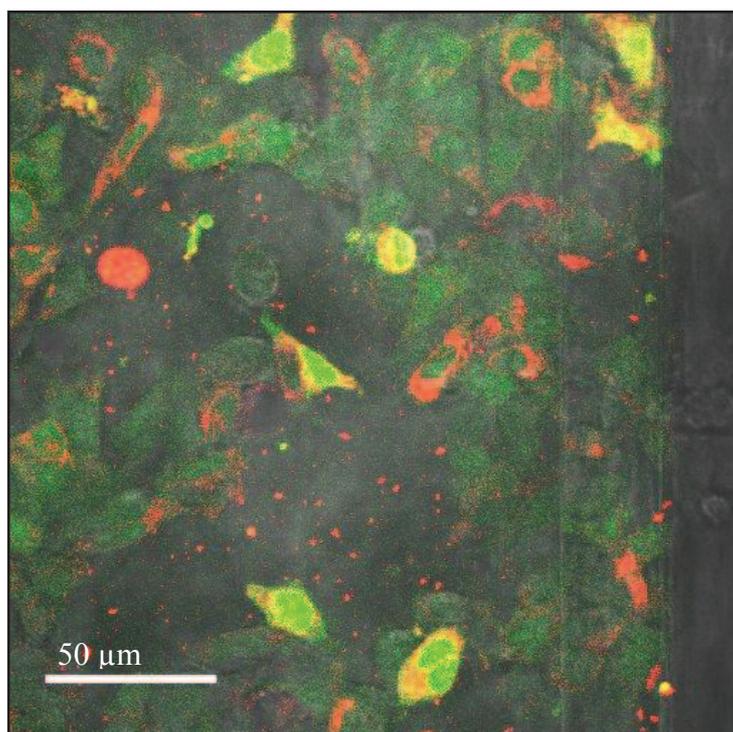
Aucun algorithme n'a permis de quantifier de manière automatique le nombre de cellules présentes dans les champs analysés. Afin de pouvoir estimer le nombre moyen de particules fluorescentes par cellules, les cellules ont été dénombrées sur quelques champs à l'aide d'un compteur manuel par deux personnes différentes.

## III.2. Résultats

### III.2.1. Résultats sur cellules fixées

Les premières expérimentations de microscopie ont été réalisées sur cellules fixées par du PFA, et en milieu RPMI 1640 non supplémenté, afin de n'ajouter aucun artefact potentiel pour l'acquisition du signal au microscope.

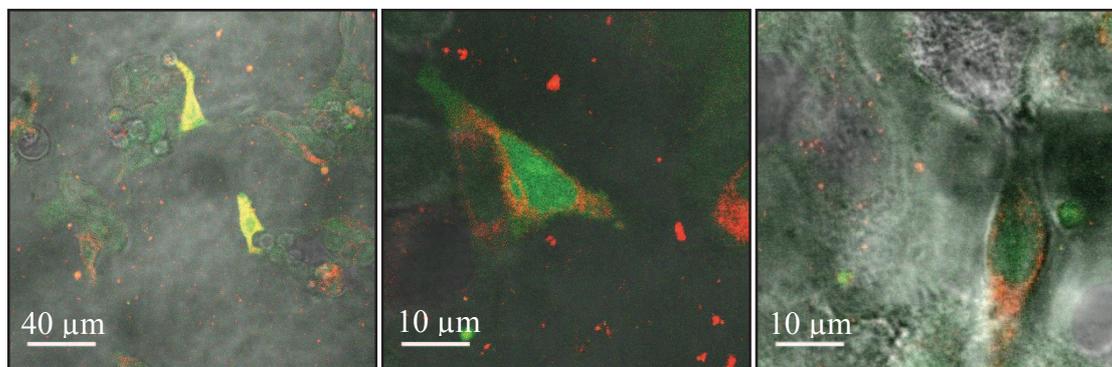
La *Figure 34* a été acquise lors de l'observation des cellules fixées deux heures après le début d'incubation avec les liposomes, en ciblage actif (c'est-à-dire avec une incubation préalable de l'Ac). Ce champ acquis à l'objectif x60 correspond à la fusion des 3 modes d'acquisition utilisés. Les cellules observées en fond clair sont représentées en niveau de gris. Le rouge correspond au signal fluorescent de la rhodamine recueilli à 595 nm après excitation à 561 nm (ex/em 561/595 nm). Le vert correspond au signal fluorescent de la fluorescéine recueilli à 525 nm après excitation à 488 nm (ex/em 488/525 nm).



**Figure 34** : Cellules fixées après 2 h d'incubation avec les liposomes (en ciblage actif), observées à l'objectif x60 sur 1 champ (212x212 microns) avec fusion du fond clair (gris), du signal d'ex/em 561/595 nm (rouge) et d'ex/em 488/525 nm (vert)

Cette image obtenue après 2 h d'incubation avec les liposomes montrent très nettement une accumulation de rhodamine au niveau des membranes cellulaires, et potentiellement du cytoplasme, ainsi qu'une internalisation plus ou moins importante de la FITC à l'intérieur des cellules, que ce soit au niveau du cytoplasme ou du noyau. Ce phénomène est également observé à 1 h ou 3 h d'incubation,

comme le montre la *Figure 35*. Aucune quantification n'a été réalisée sur ces images, mais le signal en FITC intracellulaire paraît visuellement de moins en moins intense lorsque l'on passe de 1 h à 3 h d'incubation avec les liposomes. Par ailleurs, il ne semble pas y avoir visuellement de différence entre le ciblage actif et le ciblage passif pour lequel des images similaires ont été obtenues.



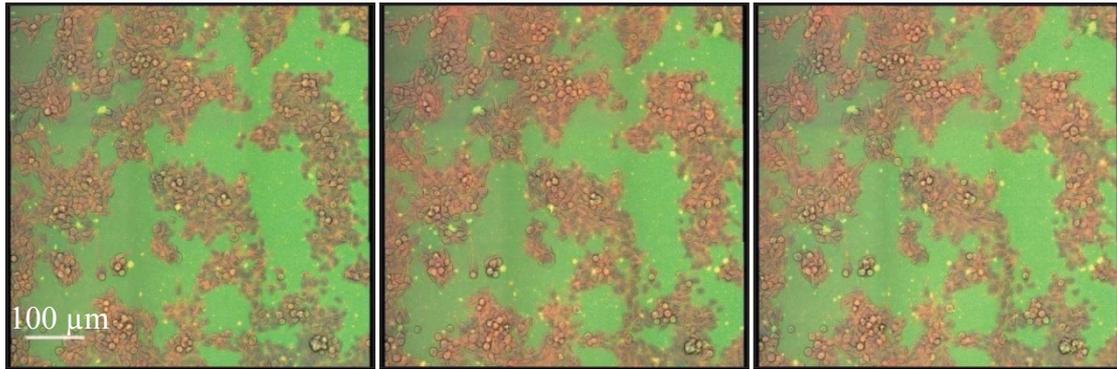
**Figure 35** : De gauche à droite, cellules après 1 h, 2 h ou 3 h d'incubation avec les liposomes, observées à l'objectif x60 zoom 1 pour le temps 1 h (212x212 microns) et zoom 4 pour les temps 2 et 3 h (53x53 microns), avec fusion du fond clair en niveau de gris (cellules), du signal d'ex/em 561/595 nm en rouge (rhodamine) et d'ex/em 488/525 nm en vert (fluorescéine)

## III.2.2. Résultats sur cellules vivantes

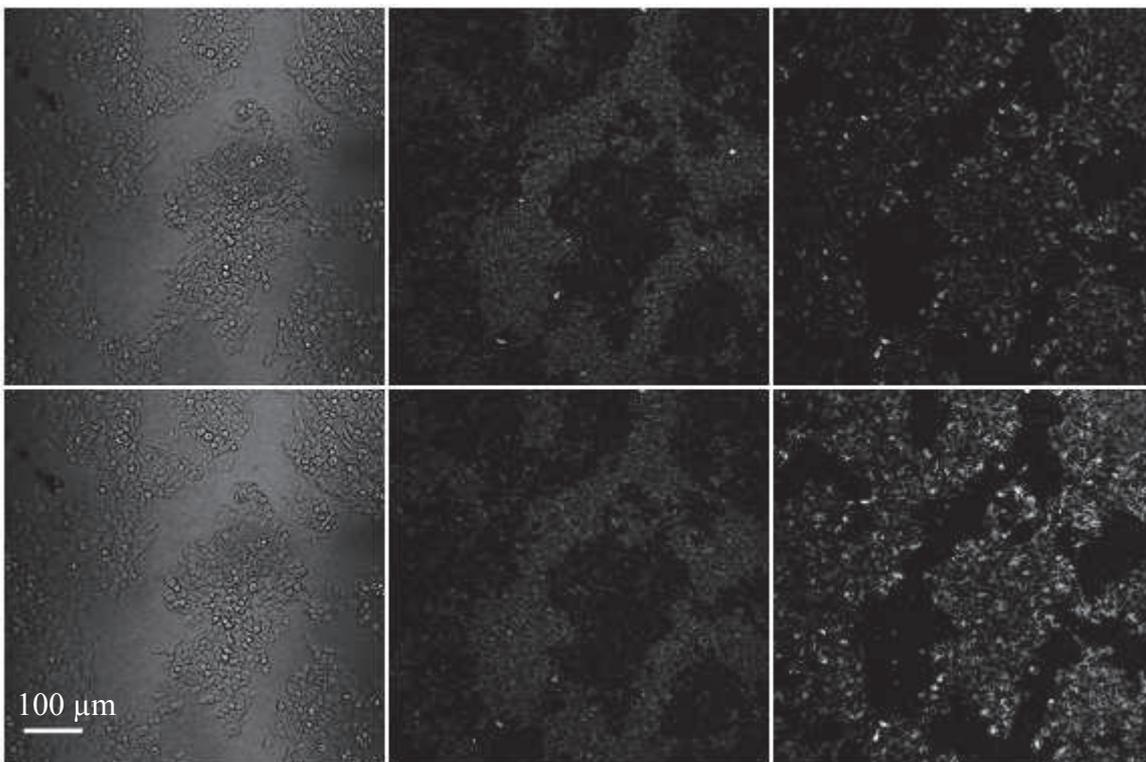
### III.2.2.1. Interactions liposomes/cellules

Pour confirmer les résultats obtenus sur cellules fixées et observer la cinétique de ces phénomènes d'internalisation, puis potentiellement de relargage du contenu des liposomes, les expérimentations suivantes ont été réalisées sur cellules vivantes en time lapse.

La *Figure 36* présente trois images d'une acquisition time-lapse sur 6 h débutée 15 min après l'ajout de liposomes sur les cellules ( $\approx 1,5$  million de liposomes par cellule). Les images ont été acquises à l'objectif x20 et reconstruites à partir de 3 x 3 champs. Dès la première image, soit 15 min après le début d'incubation, une fixation intense de la rhodamine est observée sur les membranes cellulaires alors qu'aucune internalisation de la FITC n'est observée en intracellulaire. Aucune différence n'est ensuite observée par rapport à cette première image et ce, pendant 6 h. Les phénomènes de fixation cellulaire semblent donc être très précoces et très stables dans le temps, mais la FITC semble elle, relarguée dans le milieu extracellulaire plutôt qu'internalisée.



**Figure 36 :** Ciblage actif de liposomes 15 min, 2h50 et 5h50 après l'ajout des liposomes sur les cellules (de gauche à droite), observé à l'objectif x20 sur 3x3 champs (620x620 microns), avec fusion du fond clair en gris (cellules), du signal d'ex/em 561/595 nm en rouge (rhodamine) et d'ex/em 488/525 nm en vert (fluorescéine)



**Figure 37 :** Représentation en niveau de gris, de gauche à droite, des cellules en fond clair, du signal fluorescent de la fluorescéine (ex/em 488/525 nm) et de la rhodamine (ex/em 561/595 nm) de la première image (en haut) et de la dernière image (en bas) d'une acquisition time lapse sur quinze minutes, après l'ajout des liposomes sur les cellules (objectif x20, 640x640microns).

Pour observer ce qui se passe plus précocement, des images ont ensuite été acquises juste après l'ajout de liposomes sur les cellules (dans les mêmes conditions que précédemment) avec une acquisition time lapse sur 15 min. La *Figure 37* présente la première image ainsi que la dernière image de ce time-lapse, avec les 3 modes d'acquisition séparément (cellules en fond clair, signal de la fluorescéine et signal de la rhodamine). Le film obtenu montre encore une fois une fixation très

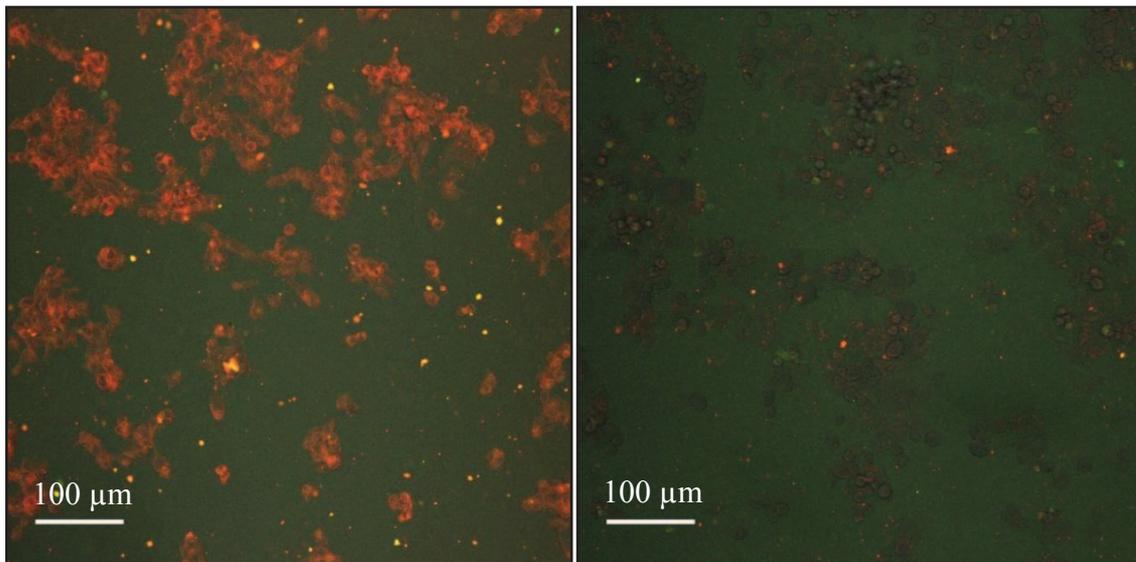
précoce des liposomes aux cellules (< 5 min), avec la présence de rhodamine sur les membranes cellulaires dès la première image. Le signal de la rhodamine s'intensifie ensuite au cours du temps, toujours au niveau des membranes cellulaires, jusqu'à quinze minutes, alors qu'à l'inverse, le signal de la fluorescéine n'est visible qu'au niveau du milieu extracellulaire, dès le début, et sans modification visible au cours du temps.

### III.2.2.2. Immunospécificité de l'interaction liposomes/cellules

#### a. Diminution de la fixation non spécifique

Afin de pouvoir mettre en évidence la fixation spécifique ou non des liposomes sur les cellules, nous avons tout d'abord essayé de diminuer une éventuelle fixation non spécifique en réduisant la quantité de liposomes mise en présence des cellules. Nous n'avons cependant pu diviser cette quantité que par deux, en passant de 1,5 million à 750 000 liposomes par cellule. En effet, des quantités inférieures n'ont pas permis d'acquérir suffisamment de signal de fluorescence pour analyser les images, la limite de détection du microscope étant atteinte. Toutes les expérimentations ont donc ensuite été effectuées avec 750 000 liposomes par cellule.

Toujours dans l'objectif de s'affranchir du risque de fixation non spécifique nous avons également supplémenté le milieu de culture en glutamine et SVF afin de saturer les sites de fixation non spécifiques des liposomes.



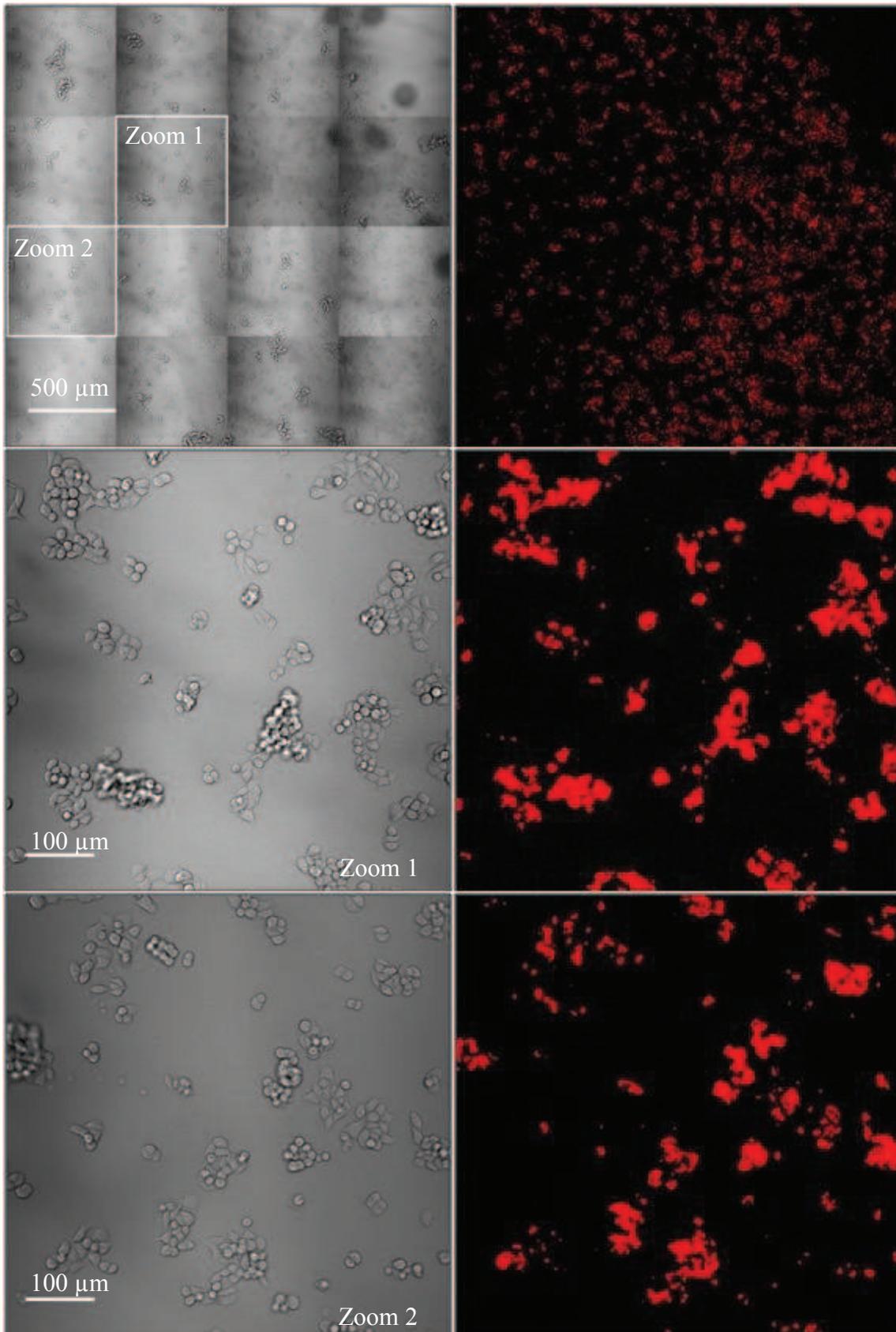
**Figure 38:** Comparaison de la fixation cellulaire des liposomes après 2h30 d'incubation, sans supplémentation du milieu de culture (à gauche) et avec supplémentation en glutamine 2 mM et SVF 10 % (à droite), à l'objectif x20 (640x640 µm), avec fusion du fond clair en gris (cellules), du signal d'ex/em 561/595 nm en rouge (rhodamine) et d'ex/em 488/525 nm en vert (fluorescéine)

La *Figure 38* atteste bien de cette diminution de fixation non spécifique en montrant un signal en rhodamine sur les membranes cellulaires bien plus faible lorsque le milieu de culture est supplémenté en grosses protéines que lorsqu'il ne l'est pas. Dans les deux cas, la fluorescéine n'est, par contre, toujours visualisée que dans le milieu extracellulaire.

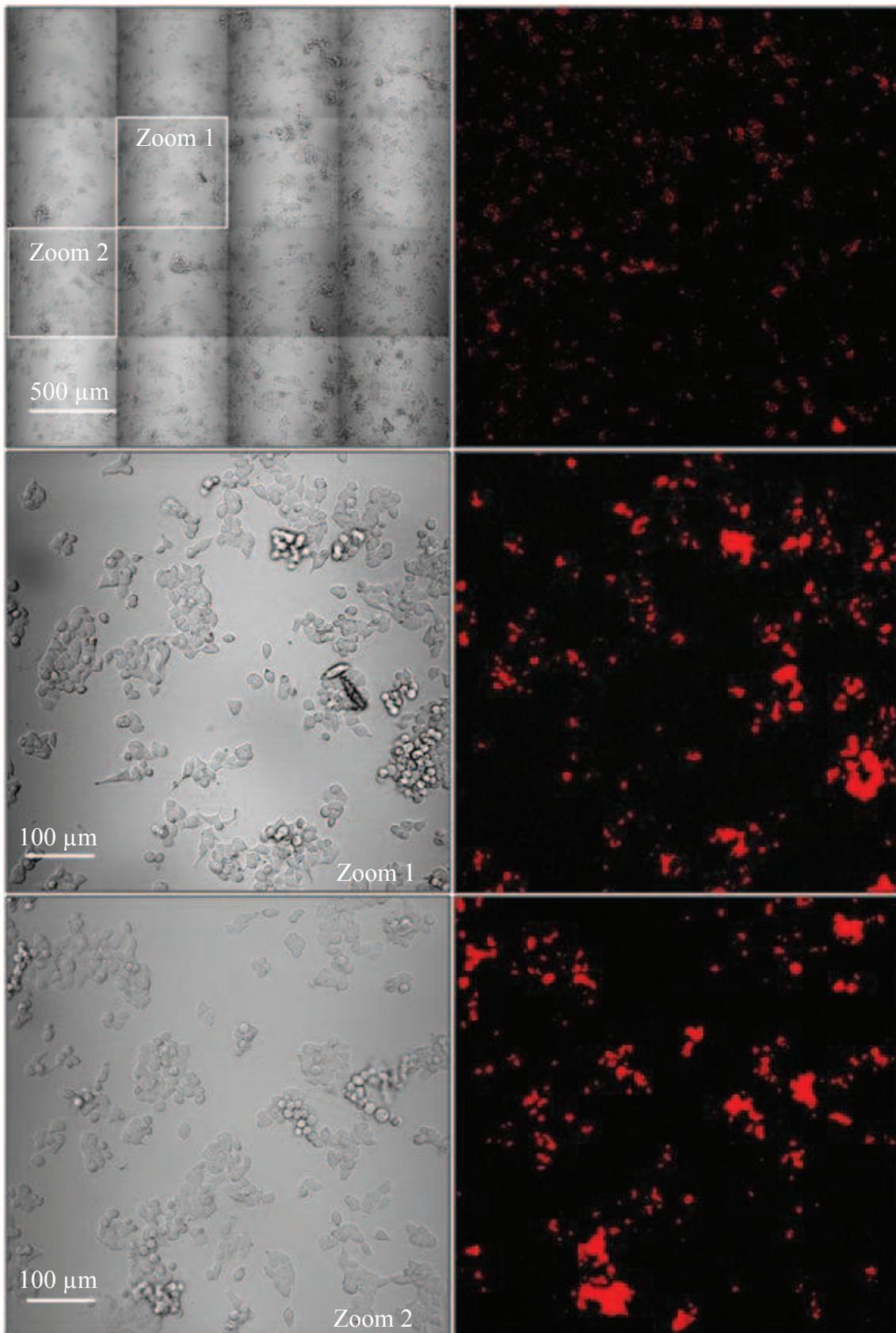
### *b. Mise en évidence de la fixation spécifique*

La mise en évidence de l'immunospecificité du ciblage des liposomes a été réalisée en comparant le signal en rhodamine fixé aux cellules, avec ou sans l'incubation préalable des cellules avec l'anticorps bispécifique. Afin d'éliminer les liposomes non fixés aux cellules, un lavage a été effectué par remplacement du milieu de culture après 3 h d'incubation avec les liposomes.

Les *Figure 39* et *Figure 40* représentent respectivement le ciblage actif (avec anticorps) et passif (sans anticorps) des liposomes, avec à gauche les cellules en fond clair et à droite le signal obtenu pour la rhodamine. Ces images représentent la somme du signal de fluorescence de 5 plans focaux consécutifs acquis suivant l'axe Z et espacés de 2 $\mu$ m. Pour quantifier le signal de fluorescence celui-ci a été seuillé par l'algorithme Otsu. Le signal de la fluorescéine n'est pas représenté ici car après lavage, plus aucun signal n'était détecté. Pour les deux figures, la première ligne d'images représente un champ large avec une acquisition de 16 champs à l'objectif x20, et les deux lignes suivantes présentent un seul des 16 champs comme indiqué par la légende "Zoom 1" et "Zoom 2". Le seuillage du signal par l'algorithme a permis de quantifier la fluorescence, et pour rapporter ce signal au nombre de cellules, celles-ci ont été dénombrées manuellement pour les zooms 1 et 2.



**Figure 39 :** Ciblage actif de liposomes, à l'objectif  $x20$  sur 16 champs ( $2545 \times 2545 \mu\text{m}$ ) pour la première ligne et sur 1 champ ( $640 \times 640 \mu\text{m}$ ) pour les Zoom 1 et 2, avec à gauche les cellules en fond clair et à droite, le signal de la rhodamine en rouge (ex/em 561/595) seuillé par l'algorithme "Otsu"



**Figure 40** : Ciblage passif de liposomes, à l'objectif x20 sur 16 champs (2545x2545 μm) pour la première ligne et sur 1 champ (640x640 μm) pour les Zoom 1 et 2, avec à gauche les cellules en fond clair et à droite, le signal de la rhodamine en rouge (ex/em 561/595) seuillé par l'algorithme "Otsu"

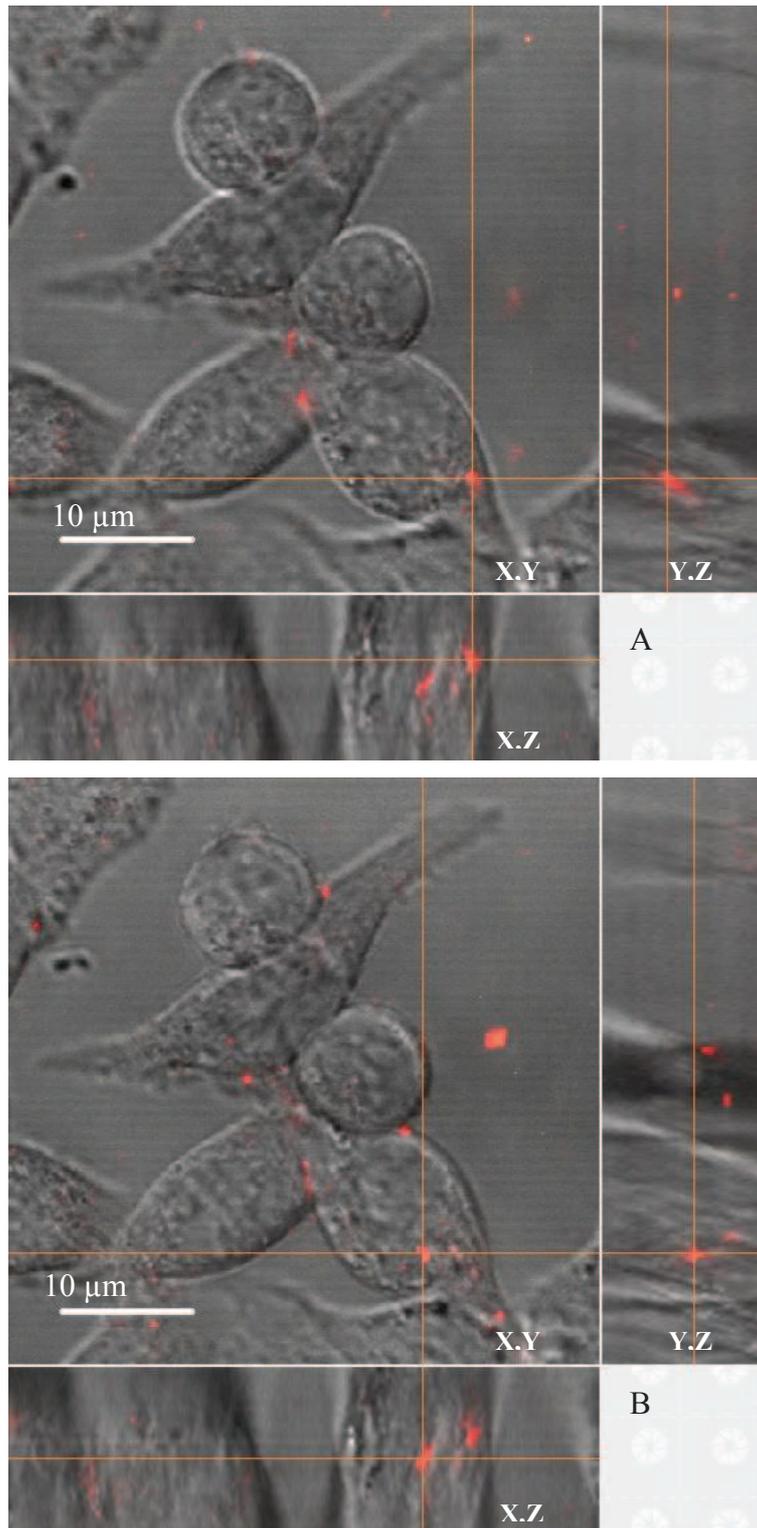
Les résultats obtenus après l'analyse de ces deux figures sont présentés dans le *Tableau 21* ci-dessous :

Type de ciblage	16 champs	Zoom 1			Zoom 2		
	Fluorescence (pixels)	Cellules	Fluorescence (pixels)	Pixels par cellules	Cellules	Fluorescence (pixels)	Pixels par cellules
<b>Actif (CA)</b>	331 454	424	43881	103	343	22646	66
<b>Passif (CP)</b>	107 498	622	17929	29	583	17929	31
<b>Rapport CA/CP</b>	3,1	-	-	3,6	-	-	2,1

**Tableau 21** : Tableau récapitulatif de l'analyse des Figure 39 (ciblage actif) et Figure 40 (ciblage passif) en terme de fluorescence (quantifiée en pixels par image) et en nombre de cellules par image

Visuellement, le signal de fluorescence en rhodamine apparaît bien plus faible dans le cas du ciblage passif de liposomes que du ciblage actif. La quantification du signal confirme cette impression visuelle puisque un rapport de 3,1 a été calculé entre les deux, pour l'analyse de l'image globale (16 champs). Ce résultat ne tient compte que du signal en fluorescence brut non pondéré par la quantité de cellules. Le nombre de cellules peut cependant être considéré comme équivalent au vu de leur répartition homogène dans les deux cas, résultant de l'ensemencement initial du même nombre de cellules. La sélection de 2 champs (Zoom 1 et Zoom 2) avec le dénombrement des cellules a permis de confirmer ces résultats avec toujours une supériorité pour le ciblage actif. Pour le Zoom 1, le signal fluorescent moyen a été calculé à 103 pixels par cellule pour le ciblage actif contre 29 pixels par cellule pour le ciblage passif, soit 3,6 fois plus important en ciblage actif. Pour le Zoom 2, le signal fluorescent moyen a été calculé à 66 et 31 pixels par cellule respectivement pour le ciblage actif et passif, avec un rapport de 2,1 en faveur du ciblage actif.

Il est difficile de juger de l'internalisation ou non de la rhodamine dans les cellules, mais la *Figure 41* tend à montrer une internalisation intracytoplasmique. Ces images acquises selon l'axe Z sur 30 plans focaux consécutifs avec un pas de 0,5  $\mu\text{m}$  (soit sur environ 15  $\mu\text{m}$  d'épaisseur), montrent respectivement l'image sur le plan X,Y obtenue au 12<sup>ème</sup> et au 17<sup>ème</sup> plan focal avec à chaque fois une coupe selon le plan X,Z et Y,Z selon les lignes rouges de l'image principale. Il est ainsi possible de visualiser l'épaisseur des cellules, et si une particule fluorescente se trouve a priori à l'intérieur de la cellule ou à sa surface. Pour les deux exemples montrés ici, il semblerait que chaque particule se situant à l'intersection des plans de coupes, se trouverait bien à l'intérieur de la cellule considérée ce qui serait en faveur d'une internalisation des liposomes. Il convient toutefois de rester prudent, car l'observation des contours cellulaires en lumière transmise reste imprécise.



**Figure 41** : Images obtenues lors de l'acquisition de 30 plans focaux consécutifs selon l'axe Z (avec un pas de  $0,5 \mu\text{m}$ ) à l'objectif x60 sur 1 champ ( $50 \times 50 \mu\text{m}$ ) : 12<sup>ème</sup> plan focal (A) et 17<sup>ème</sup> plan focal (B) avec des coupes sur les plans X,Z et Y,Z selon les lignes rouges de l'image principale en X,Y. Cellules en niveau de gris (fond clair) et signal fluorescent de la rhodamine en rouge (ex/em 561/595).

### III.3. Discussion

La microscopie de fluorescence peut fournir des informations importantes concernant les interactions entre les médicaments nanoparticulaires, tels que les liposomes, avec des cellules cibles, ainsi que leur devenir intracellulaire. De nombreux exemples existent dans la littérature afin d'évaluer notamment le ciblage spécifique de cellules cancéreuses par des nanoparticules immunospécifiques (222). Des études *in vitro* par microscopie ont été menées au cours de cette thèse afin d'évaluer l'immunospécificité du système de ciblage en deux temps ainsi que l'éventuelle internalisation des liposomes dans les cellules.

#### III.3.1. Justification des traceurs fluorescents utilisés

Les traceurs fluorescents et la méthode de marquage des liposomes ont été choisis de façon à être comparables aux traceurs radioactifs utilisés *in vivo*. Le traceur fluorescent de la bicouche est ainsi couplé de façon covalente à un phospholipide : la DPPE couplée à la rhodamine, en analogie à la DSPE ou à la DSPE-PEG sur lesquels est couplé le DTPA-<sup>111</sup>In. Pour la phase aqueuse, de la même façon que l'<sup>125</sup>I a été couplé à l'arginine via le réactif de Bolton-Hunter, la fluorescéine a également été couplée à l'arginine. La seule différence pour le traceur de la phase aqueuse réside dans la méthode d'encapsulation qui est active pour l'<sup>125</sup>I (encapsulation sur des liposomes pré-formés), *versus* passive pour la fluorescéine (encapsulation du fluorochrome préalablement couplé à l'arginine, au cours de la phase d'hydratation des liposomes).

Les traceurs utilisés et les méthodes de marquage sont comparables à ce qui est décrit dans la littérature, où l'on retrouve majoritairement un marquage de la bicouche avec de la DPPE-rhodamine à hauteur de 0,3 à 1 mol% (223–225). Lorsqu'un marquage de la phase aqueuse est également réalisé, la fluorescéine est le traceur fluorescent classiquement retrouvé, par exemple sous forme de carboxyfluorescéine ou de FITC-dextran, encapsulé également de façon passive lors de l'hydratation des liposomes.

Certains auteurs n'utilisent qu'un traceur de la bicouche lipidique, mais il nous paraissait important dans ce travail de pouvoir suivre les liposomes dans leur intégralité, avec un traceur de la bicouche lipidique et de la phase aqueuse, comme cela est également réalisé dans les études de biodistribution *in vivo*.

#### III.3.2. Expérimentations sur cellules fixées

Les premières observations de microscopie de fluorescence ont été réalisées sur cellules fixées par du paraformaldéhyde (PFA), ajouté dans le milieu à hauteur de 1 % au bout d'1 h, 2 h ou 3 h d'incubation des liposomes avec les cellules. Les résultats obtenus lors de ces premières

expérimentations ont montré un signal important à la fois pour la fluorescéine et la rhodamine à l'intérieur des cellules, ce qui a conduit à conclure à une internalisation des liposomes. Par ailleurs, le signal observé pour la fluorescéine étant de moins en moins intense lors des observations après 1 h à 3 h d'incubation, nous avons supposé qu'il y avait un relargage secondaire des liposomes au cours du temps.

Ces premières observations et conclusions n'étaient en réalité qu'un biais lié à l'utilisation du PFA pour fixer les cellules. En effet, les observations suivantes réalisées sur cellules non fixées sont complètement différentes et ne montrent au contraire aucune internalisation de la fluorescéine à l'intérieur des cellules. Ce biais a pu être vérifié en observant l'interaction liposomes-cellules juste avant l'ajout de PFA et 3 h après.

L'hypothèse d'un éventuel relargage du contenu des liposomes au cours du temps, était également une interprétation erronée. Les cellules qui ont été incubées avec les liposomes pendant 1 h, sont finalement restées en présence de PFA plus longtemps que les cellules incubées 3 h (cf *Figure 33*, p.127). L'internalisation de la fluorescéine est en fait proportionnelle au temps d'incubation des cellules avec le PFA.

Le PFA augmente en effet la porosité des cellules et peut ainsi augmenter la vitesse d'internalisation de colorants comme les fluorochromes (226). Pour des cellules non fixées au PFA, une accumulation importante de fluorescéine et de rhodamine a également pu être observée dans des cellules mortes, facilement identifiables morphologiquement (les cellules mortes s'arrondissent). Les cellules mortes deviennent perméables et ont tendance à accumuler les colorants. Les cellules fixées au PFA doivent certainement mourir progressivement et devenir perméables ce qui explique l'accumulation des traceurs fluorescents. L'accumulation observée dans les cellules n'est pas spécifique mais uniquement liée à la présence de PFA, il est donc normal qu'aucune différence n'ait été observée entre le ciblage passif ou actif.

Ces observations montrent alors qu'il faut se méfier de l'utilisation de PFA pour les études d'internalisation. De nombreux articles utilisent pourtant le paraformaldéhyde comme fixateur pour de telles études. Dans ce cas, le PFA est alors ajouté après lavage des cellules à hauteur de 4 % en PBS pendant 10 min (224,227,228) ou 1 h (223), à 4°C ou à température ambiante, suivi d'un autre lavage des cellules avant observation au microscope. Dans ces conditions, les différents auteurs ont généralement observé une fixation non spécifique pour les témoins négatifs, bien qu'elle soit plus faible que pour le ciblage spécifique.

### **III.3.3. Expérimentations sur cellules vivantes**

Les premières observations sur cellules fixées ont montré un signal en rhodamine intense très rapidement après l'ajout des liposomes, laissant penser à une fixation en partie non spécifique. Afin de

diminuer cette fixation non spécifique, l'optimisation du système a consisté à diminuer la quantité de liposomes mis en présence des cellules, et également à saturer les sites de fixation non spécifiques, en supplémentant le milieu en grosses protéines avec du SVF. La quantité de liposomes mise en présence des cellules n'est que rarement précisée dans la littérature, ne permettant pas de comparer parfaitement les résultats obtenus. Lors de ces expérimentations, nous avons été limités par la sensibilité de détection de la fluorescence du microscope, qui ne nous a pas permis de réduire considérablement la quantité de liposomes mis en présence des cellules. L'utilisation de SVF a cependant permis de réduire la fixation des liposomes aux cellules de façon importante, permettant ainsi d'éliminer une grande part de la fixation non spécifique. Cette pratique n'est pourtant pas systématique puisque certains auteurs ne travaillent qu'en milieu sans sérum. Les cellules sont alors préalablement cultivées en milieu de culture avec ou sans supplémentation en SVF, puis rincées en PBS avant l'ajout des liposomes en milieu sans sérum (223–225,228). Pour la plupart des auteurs, une fixation non spécifique (bien que faible) est retrouvée avec les témoins négatifs (sur des cellules témoins ou avec des liposomes non fonctionnalisés). Il est plus rare dans ces conditions sans sérum de ne pas observer de fixation non spécifique, comme le montrent Koren *et al.*, qui n'obtiennent une fixation cellulaire qu'avec des liposomes fonctionnalisés (225). De notre côté, nous avons choisi au cours des premières expérimentations de travailler également sans sérum ni aucun additifs, afin d'éviter tout risque d'artefact.

Dans ce travail, malgré une diminution importante de la fixation non spécifique par la supplémentation du milieu en SVF (10 %) ; nous observons toujours une fixation non spécifique avec les liposomes en ciblage passif. Deissler *et al.* observent également une fixation non spécifique des liposomes sur des fibroblastes en milieu supplémenté en sérum. Ces liposomes sont cependant non pégylés, ce qui peut favoriser les interactions cellulaires (227). Pour Rangger *et al.* qui utilisent également du SVF, aucune fixation non spécifique n'est retrouvée que ce soit avec des liposomes non fonctionnalisés, ou sur des cellules témoins non porteuses de la cible, mais au final, le ciblage spécifique observé est également relativement faible (229).

Malgré un ciblage non spécifique des liposomes en ciblage passif, nous pouvons tout de même mettre en évidence l'immunospécificité du ciblage de nos liposomes par un système en deux temps utilisant des anticorps bispécifiques. L'immunospécificité de cette fixation a en effet pu être démontrée en quantifiant le signal fluorescent de la rhodamine restant fixée aux cellules après lavage, avec ou sans traitement préalable des cellules par l'anticorps bispécifique. Le ciblage actif a alors montré une fixation jusqu'à trois fois plus importante que le ciblage passif.

Si l'immunospécificité du ciblage est démontrée et que la fixation des liposomes aux cellules est évidente, l'internalisation des liposomes est moins tranchée. Certaines images semblent montrer assez clairement la présence des liposomes à l'intérieur des cellules, avec des acquisitions en « Z-séries ». Le signal fluorescent de la rhodamine semble dans ce cas bien être observé à l'intérieur de la

cellule, mais le contour des cellules observées uniquement en lumière transmise ne permet pas d'être assez précis pour affirmer définitivement cette hypothèse. Par ailleurs, si la bicouche lipidique des liposomes paraît être internalisée, le contenu des liposomes ne l'est pas. La phase aqueuse semble au contraire être relarguée dans le milieu extracellulaire. En effet, après incubation des cellules avec les liposomes et avant lavage, alors que la rhodamine est clairement visualisée sur les cellules, la fluorescéine n'est quant à elle présente que dans le milieu environnant. Après lavage des cellules, la rhodamine est toujours observée sur les cellules, mais la fluorescéine n'est plus détectée, ni à l'extérieur, ni à l'intérieur des cellules. Ces observations montrent bien l'intérêt d'utiliser deux traceurs fluorescents, pour la bicouche lipidique et pour la phase aqueuse. Un simple traceur de la bicouche lipidique ne nous aurait pas permis de faire ces conclusions ni de visualiser l'apparente fuite de la phase aqueuse dans le milieu extracellulaire. Une potentielle explication, serait une déstabilisation de la bicouche lipidique des liposomes lors de leur fixation aux cellules, par fusion membranaire ou échange de lipides par exemple, provoquant une fuite du contenu des liposomes vers l'extérieur. Nous avons en effet pu observer sur une acquisition en temps réel, l'approche vers une cellule, d'un amas de liposomes doublement fluorescents. Lorsque cet amas s'est fixé à la membrane cellulaire, le signal en rhodamine a perduré sur la cellule alors que la fluorescéine a petit à petit disparu (en se diluant certainement dans le milieu extracellulaire). Ces observations sont contradictoires avec la littérature où lorsqu'une double fluorescence est utilisée, une colocalisation des deux traceurs est visualisée. Torchilin *et al*, montrent en effet la colocalisation des deux traceurs dans le cytoplasme des cellules (223). Cependant la FITC couplée à une très grosse molécule colloïdale comme le sont les dextrans est peut-être moins à même de fuir à travers la bicouche lipidique. Par ailleurs le mode d'internalisation est assez particulier puisqu'ils utilisent le peptide TAT (trans-activating transcriptional) : un peptide du virus HIV capable de pénétrer dans les cellules par un mécanisme particulier, garantissant peut-être l'intégrité des liposomes au moment de leur internalisation. Castelli *et al*. montrent également une bonne correspondance entre le signal fluorescent de la rhodamine et de la carboxyfluorescéine dans le cytoplasme des cellules (224). Le système de ciblage est encore une fois différent puisque, dans cette étude, les liposomes sont fonctionnalisés avec de la glutamine pour cibler les cellules sur-exprimant les récepteurs de la glutamine. Le mode de ciblage étant différent, les interactions cellulaires des liposomes le sont certainement aussi. Par ailleurs, notre système de ciblage est basé sur la reconnaissance de l'antigène ACE, largement connu pour être non-internalisant, ce qui n'est pas pour favoriser l'endocytose de nos liposomes (230,231). Certaines études ont au contraire montré une lente endocytose d'anticorps ou de fragments d'anticorps avec l'ACE (232), mais il a été également suggéré que contrairement aux autres antigènes plus rapidement internalisés, le faible taux d'internalisation de l'ACE était peut-être plus lié au turnover de la membrane plutôt qu'à une endocytose active (233). Les caractéristiques de l'ACE expliqueraient alors pourquoi nos liposomes ne semblent pas ou très peu internalisés.

## **Chapitre III :**

# **BIODISTRIBUTIONS ET CIBLAGE TUMORAL**

---

Les premiers objectifs de ce travail de thèse ont été de déterminer les meilleures formulations de liposomes en termes d'affinité vis à vis de l'Ac *in vitro* (grâce au BIAcore®) et de paramètres pharmacocinétiques grâce à des études *in vivo*. L'immunospécificité du ciblage cellulaire a également été démontrée *in vitro* par microscopie.

Des études de biodistribution sur un modèle murin ont ensuite été réalisées, sur les formulations sélectionnées à partir des différentes études de caractérisation, afin d'évaluer la biodistribution générale des liposomes, la faisabilité du ciblage tumoral *in vivo* ainsi que son immunospécificité. Dans l'objectif de déterminer la formulation la plus favorable pour une utilisation en RIT, les résultats de biodistribution ont été exploités au maximum dans une étude statistique ainsi que dans une étude de dosimétrie.

## **I. ETUDES DE BIODISTRIBUTION**

Sur la base des résultats des études de pharmacocinétique et d'affinité, trois formulations ont été choisies pour ces études de biodistribution *in vivo*. Les deux formulations qui ont été étudiées dans un premier temps sont les "PEG<sub>1000</sub> 2,5%" qui présentaient la meilleure affinité ( $K_D = 42$  nM,  $T_{1/2} = 9$  h) et les "PEG<sub>2000</sub> 5,0%" qui présentaient la meilleure demi-vie sanguine ( $T_{1/2} = 14$  h,  $K_D = 260$  nM). La dernière formulation testée est celle des "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%" préparés à la suite des premiers résultats observés, et qui ont permis d'obtenir le meilleur compromis affinité/demi-vie ( $K_D = 6$  nM,  $T_{1/2} = 13$  h).

## I.1. Matériels et méthodes

### I.1.1. Matières premières

Les liposomes utilisés pour ces études de biodistribution ont été préparés selon la technique précédemment décrite (cf § I.1.3, p.82), purifiés sur colonne Superdex<sup>®</sup> G200 couplée à un système HPLC, et doublement radiomarqués (cf § II.1.4, p.97).

Le ciblage spécifique des liposomes a été réalisé à l'aide d'un anticorps bispécifique (hMN14x734, fourni par IBC Pharmaceuticals, New Jersey, USA) comme dans le système AES, et utilisé précédemment dans les études de caractérisation *in vitro*.

Les expériences de biodistribution pour l'étude du ciblage tumoral ont été effectuées sur un modèle tumoral animal décrit au laboratoire et déjà validé pour la RIT (234). Ce modèle est obtenu par l'injection en sous-cutané (SC), au niveau du flanc, de 5 millions de cellules LS174T à des souris nude NMRI-nu. Ces souris nude femelles sont fournies par le laboratoire Janvier (France). La lignée LS174T provenant de l'*American Type Culture Collection* (USA), est une lignée d'adénocarcinome colique humain exprimant fortement l'ACE à la surface des cellules. Ce modèle permet l'obtention, une dizaine de jours après la xénogreffe, d'une tumeur solide vascularisée de 3 à 8 mm de diamètre, d'environ 200 mg. Les masses moyennes des tumeurs obtenues sont présentées dans le *Tableau 22*. La masse moyenne générale pour les trois lots de souris est de  $234 \pm 131$  mg. Une variabilité de l'ordre de 50 % est observée au sein de chaque lot, mais les lots restent homogènes entre eux puisque aucune différence significative n'a été mise en évidence ( $p > 0,5$  ; test de Wilcoxon).

	PEG <sub>1000</sub> 2,5%	PEG <sub>2000</sub> 5,0%	DTPA-PEG <sub>2000</sub> 5,0%
<b>Moy</b>	295	211	200
<b>ET</b>	166	104	111
<b>CV</b>	56%	49%	55%

**Tableau 22 :** Masses moyennes des tumeurs (Moy) exprimées en mg, avec l'écart-type (ET) et le coefficient de variation (CV) pour chaque formulation

### I.1.2. Protocole expérimental

Les études de préciblage *in vivo* ont été menées sur le modèle tumoral animal précédemment décrit, soit dix jours après la xénogreffe en SC de cellules LS174T à des souris nude. Afin d'évaluer l'immunospécificité du ciblage tumoral, les études de biodistribution ont été réalisées, pour chaque formulation testée, sur 20 animaux divisés en deux lots : un lot souris témoin, « ciblage passif » (CP), n'ayant pas eu d'injection préalable d'anticorps et un lot de souris, « ciblage actif » (CA), ayant reçu une injection préalable d'anticorps.

Le « ciblage actif » est un préciblage effectué en 2 étapes. La première étape consiste en l'injection intraveineuse dans la veine caudale de 130 µg (1,3 nmol) d'Ac hMN14x734 en tampon phosphate 0,1 M pH 7,2 sous un volume de 100 µL. Les liposomes sont ensuite injectés de la même manière 24 heures après l'injection de l'Ac. La demi-vie sanguine de l'Ac chez la souris étant de 24h, plus que 0,66 nmol d'Ac circulent encore au moment d'injecter les liposomes. La quantité de liposomes a été calculée de façon à être approximativement à l'équivalence Ac/haptène, ce qui correspond à environ 100 nmol de lipides doublement radiomarqués par souris. A ces liposomes « chauds », sont ajoutés des liposomes « froids » de façon à injecter au final 500 nmol de lipides par souris, pour saturer le SRE. Le volume de la solution finale de liposomes a été ajusté de façon à injecter la quantité nécessaire de liposomes sous un volume de 100 à 150 µL maximum.

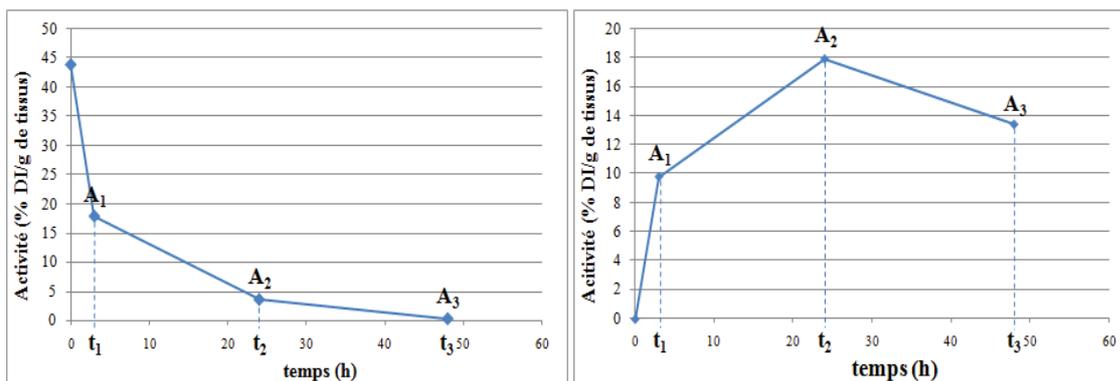
Pour le ciblage actif, 4 à 6 souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale aux temps suivants : 3 h, 24 h et 48 h après l'injection des liposomes. Pour le ciblage passif, 4 souris ont été sacrifiées au temps 24 h. Un échantillon sanguin a été prélevé au niveau du sinus oculaire puis les animaux ont été disséqués afin de prélever les différents organes sains (foie, rate, reins, poumons, cœur, cerveau, muscle, fragment d'intestin, estomac, fragment de peau, os plat du crâne, queue) ainsi que la tumeur sous-cutanée. Chaque prélèvement a été pesé puis compté à l'aide d'un compteur gamma pour chaque isotope,  $^{111}\text{In}$  et  $^{125}\text{I}$  (après décroissance de l' $^{111}\text{In}$ ).

Trois standards correspondant à l'activité injectée aux souris ont été préparés et dilués. Ces standards ont été mesurés au compteur gamma en même temps que les échantillons, permettant de rapporter l'activité de chaque prélèvement à l'activité théorique injectée, tout en s'affranchissant des phénomènes de décroissance. Pour chaque souris, l'activité résiduelle dans la queue a également été mesurée et soustraite de l'activité théorique injectée.

### **I.1.3. Expression des résultats**

Les résultats sont classiquement exprimés en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissus ou de sang (% DI/g) pour chaque organe prélevé et à chaque temps de la biodistribution (3 h, 24 h et 48 h). Il a également paru intéressant de prendre en compte l'ensemble des résultats de la biodistribution en calculant une aire sous la courbe (AUC en % DI/g.h) qui intègre en une seule donnée les activités obtenues à 3 h, 24 h et 48 h pour chaque organe.

Ces AUC ont été calculées pour les principaux organes d'intérêt : le foie, la rate et les reins, ainsi que la tumeur et le sang. Le calcul des AUC a été réalisé par la méthode des trapèzes qui consiste à déterminer l'aire de chaque trapèze dessiné par les différents points expérimentaux comme le montre la *Figure 42*. Pour la tumeur et les organes sains, l'activité à  $t_0$  est égale à 0, mais pour le compartiment sanguin celle-ci correspond à la totalité de l'activité injectée soit  $A_0 = 100\%$  DI divisée par le poids total du volume sanguin. Le masse représentée par le volume sanguin est considérée comme égale à 7 % du poids de la souris (235).



**Figure 42 :** Principe du calcul des aires sous la courbe (AUC) par la méthode des trapèzes à partir des données expérimentales, pour le compartiment sanguin (à gauche) et pour les autres organes (à droite)

L'AUC est alors calculée par la formule suivante :  $AUC = 1/2 \times [(A_0 + A_1) \times (t_1 - t_0) + (A_1 + A_2) \times (t_2 - t_1) + (A_2 + A_3) \times (t_3 - t_2)]$ . L'AUC correspond donc à l'aire sous la courbe jusqu'au temps  $t_3$  mais aucune extrapolation n'est réalisée pour calculer l'activité résiduelle de  $t_3$  à l'infini. Le calcul des AUC est réalisé à partir des données expérimentales de 12 à 15 souris au total pour chaque formulation. Cependant l'AUC n'est calculée qu'à partir de 3 valeurs : les moyennes obtenues pour chaque formulation aux temps 3 h, 24 h et 48 h, permettant au final d'obtenir une AUC moyenne globale.

### I.1.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel de statistique R, en accès libre et gratuit (236). Du fait de la petite taille des échantillons, les comparaisons de moyennes ont été effectuées par un test de rang dit de Wilcoxon, avec un seuil de significativité  $\alpha = 0,05$ . Le test de Wilcoxon est l'équivalent non paramétrique du test t de Student. Selon les cas, les analyses ont été effectuées sur séries appariées ou non.

## I.2. Résultats

### I.2.1. Biodistributions globales

Les *Tableau 23*, *Tableau 24* et *Tableau 25* présentent respectivement les résultats de biodistribution des liposomes "PEG<sub>1000</sub> 2,5%", "PEG<sub>2000</sub> 5,0%" et "DTPA- PEG<sub>2000</sub> 5,0%" en ciblage actif à 3 h, 24 h et 48 h après l'injection des liposomes. Les tableaux distinguent les résultats obtenus pour chaque radionucléide (<sup>111</sup>In et <sup>125</sup>I).

% ID/g	Marquage externe ( <sup>111</sup> In)			Marquage interne ( <sup>125</sup> I)		
	3h (n=4)	24h (n=4)	48h (n=4)	3h (n=4)	24h (n=4)	48h (n=4)
Tumeur	2,2 ± 0,4	4,1 ± 0,7	3,0 ± 0,7	2,4 ± 0,5	2,3 ± 0,8	0,8 ± 0,3
Sang	21,1 ± 1,9	1,0 ± 0,3	0,16 ± 0,03	26,1 ± 2,3	1,0 ± 0,4	0,02 ± 0,01
Foie	9,3 ± 1,7	16,6 ± 2,7	12,6 ± 1,0	8,1 ± 1,5	3,8 ± 1,2	0,4 ± 0,1
Reins	5,5 ± 1,0	5,0 ± 0,6	4,3 ± 0,9	5,5 ± 0,7	1,1 ± 0,3	0,5 ± 0,2
Intestin	2,2 ± 1,3	2,7 ± 0,3	2,5 ± 0,9	2,6 ± 1,5	1,1 ± 0,2	0,32 ± 0,08
Poumons	6,4 ± 1,2	1,3 ± 0,3	0,7 ± 0,2	7,5 ± 1,7	0,6 ± 0,2	0,12 ± 0,03
Muscle	0,4 ± 0,1	0,19 ± 0,03	0,19 ± 0,07	0,4 ± 0,2	0,06 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Rate	16,8 ± 2,4	29,6 ± 4,0	18,6 ± 5,6	12,6 ± 2,1	12,6 ± 1,7	2,7 ± 0,2
Peau	1,55 ± 0,4	2,4 ± 0,4	1,8 ± 0,5	1,7 ± 0,5	0,9 ± 0,2	0,22 ± 0,06
Cerveau	1,0 ± 0,3	0,07 ± 0,03	0,03 ± 0,01	1,3 ± 0,3	0,05 ± 0,02	0,004 ± 0,002
Cœur	4,3 ± 0,4	1,5 ± 0,2	1,2 ± 0,4	5,2 ± 0,5	0,8 ± 0,2	0,25 ± 0,09
Os plat	2,6 ± 0,4	0,87 ± 0,06	0,69 ± 0,07	3,0 ± 0,5	0,19 ± 0,03	0,05 ± 0,02
Estomac	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,3	1,2 ± 0,09	0,6 ± 0,1	0,19 ± 0,08

**Tableau 23 :** Biodistribution des liposomes "PEG<sub>1000</sub> 2,5%" doublement radiomarqués à 3 h, 24 h et 48 h après injection de 500 nmol de lipides à des souris ayant reçu l'anticorps bispécifique 24 h avant les liposomes (ciblage actif). Les résultats sont exprimés en pourcentage de dose injectée par gramme de tissus (% DI/g, moy ± ET).

% ID/g	Marquage externe ( $^{111}\text{In}$ )			Marquage interne ( $^{125}\text{I}$ )		
	3h (n=6)	24h (n=5)	48h (n=4)	3h (n=6)	24h (n=5)	48h (n=4)
Tumeur	4,3 ± 2,0	7,5 ± 2,6	5,5 ± 2,1	5,2 ± 2,6	5,9 ± 2,7	2,8 ± 0,7
Sang	18,0 ± 2,3	3,7 ± 1,0	0,4 ± 0,1	22,0 ± 3,5	5,5 ± 1,7	0,4 ± 0,2
Foie	9,8 ± 1,1	17,9 ± 0,9	13,4 ± 1,5	10,5 ± 1,5	9,4 ± 0,9	2,1 ± 0,3
Reins	4,6 ± 1,3	8,9 ± 2,5	7,7 ± 2,1	4,6 ± 1,8	4,5 ± 1,8	2,1 ± 0,6
Intestin	2,7 ± 1,1	2,9 ± 0,6	2,2 ± 0,4	3,4 ± 1,4	2,3 ± 0,4	0,9 ± 0,1
Poumons	5,0 ± 1,6	2,6 ± 0,9	1,0 ± 0,3	6,0 ± 2,1	2,2 ± 0,7	0,5 ± 0,2
Muscle	0,3 ± 0,1	0,7 ± 0,3	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1	1,0 ± 1,1	0,12 ± 0,05
Rate	17,9 ± 1,7	31,6 ± 10,0	23,4 ± 10,3	14,2 ± 2,2	13,9 ± 4,7	3,7 ± 1,4
Peau	1,3 ± 0,7	4,8 ± 1,7	3,1 ± 2,0	1,5 ± 0,9	3,1 ± 1,2	1,0 ± 0,6
Cerveau	0,8 ± 0,6	0,18 ± 0,04	0,05 ± 0,02	1,1 ± 0,8	0,23 ± 0,05	0,03 ± 0,02
Cœur	5,7 ± 2,5	2,1 ± 0,5	1,1 ± 0,4	6,8 ± 3,0	2,1 ± 0,5	0,6 ± 0,2
Os plat	2,5 ± 1,2	2,0 ± 0,7	1,1 ± 0,2	2,9 ± 1,5	1,4 ± 0,3	0,24 ± 0,02
Estomac	0,6 ± 0,3	1,1 ± 0,5	0,5 ± 0,2	0,9 ± 0,5	0,9 ± 0,3	0,3 ± 0,1

**Tableau 24 :** Biodistribution des liposomes "PEG<sub>2000</sub> 5,0%" doublement radiomarqués à 3 h, 24 h et 48 h après injection de 500 nmol de lipides à des souris ayant reçu l'anticorps bispécifique 24 h avant les liposomes (ciblage actif). Les résultats sont exprimés en pourcentage de dose injectée par gramme de tissus (% DI/g, moy ± ET).

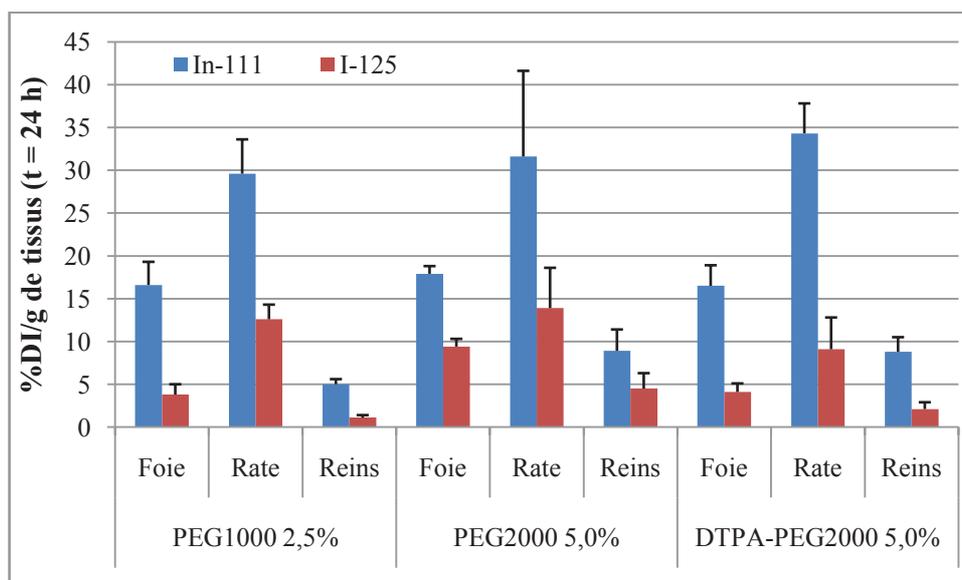
% ID/g	Marquage externe ( $^{111}\text{In}$ )			Marquage interne ( $^{125}\text{I}$ )		
	3h (n=4)	24h (n=4)	48h (n=4)	3h (n=4)	24h (n=4)	48h (n=4)
Tumeur	3,6 ± 0,2	7,5 ± 2,4	5,6 ± 1,1	2,5 ± 1,0	5,1 ± 2,5	1,2 ± 0,3
Sang	25,3 ± 6,5	2,9 ± 1,0	0,5 ± 0,2	18,0 ± 3,5	2,1 ± 0,6	0,3 ± 0,1
Foie	11,4 ± 1,1	16,5 ± 2,4	15,3 ± 2,0	6,7 ± 1,3	4,1 ± 1,0	0,5 ± 0,1
Reins	6,9 ± 1,0	8,8 ± 1,7	7,6 ± 2,4	3,5 ± 0,7	2,1 ± 0,8	1,1 ± 0,3
Intestin	2,8 ± 1,0	2,7 ± 1,5	3,0 ± 0,6	2,0 ± 0,6	1,4 ± 0,7	0,5 ± 0,2
Poumons	7,0 ± 1,1	2,0 ± 0,7	1,3 ± 0,3	5,1 ± 1,4	1,4 ± 0,6	0,25 ± 0,08
Muscle	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,42 ± 0,09	0,35 ± 0,07	0,16 ± 0,05	0,04 ± 0,01
Rate	21,2 ± 1,9	34,3 ± 3,5	29,4 ± 2,4	8,7 ± 0,3	9,1 ± 3,7	4,3 ± 2,2
Peau	1,8 ± 0,4	4,2 ± 1,6	4,1 ± 0,5	1,0 ± 0,3	1,6 ± 0,9	0,6 ± 0,1
Cerveau	1,1 ± 0,4	0,16 ± 0,04	0,08 ± 0,01	0,8 ± 0,3	0,12 ± 0,04	0,014 ± 0,003
Cœur	4,8 ± 2,2	2,2 ± 0,7	2,0 ± 0,4	4,8 ± 1,8	1,3 ± 0,4	0,6 ± 0,2
Os plat	3,4 ± 0,7	2,0 ± 0,6	1,6 ± 0,2	2,3 ± 0,5	0,6 ± 0,3	0,13 ± 0,04
Estomac	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,5	0,6 ± 0,4	0,66 ± 0,09	0,5 ± 0,3	0,18 ± 0,09

**Tableau 25 :** Biodistribution des liposomes "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%" doublement radiomarqués à 3 h, 24 h et 48 h après injection de 500 nmol de lipides à des souris ayant reçu l'anticorps bispécifique 24 h avant les liposomes (ciblage actif). Les résultats sont exprimés en pourcentage de dose injectée par gramme de tissus (% DI/g, moy ± ET).

Pour ces trois formulations, les activités sanguines en  $^{111}\text{In}$  sont équivalentes aux activités sanguines en  $^{125}\text{I}$  tout au long de la biodistribution, ce qui confirme l'intégrité des liposomes. Les principaux organes d'accumulation des liposomes sont la rate, le foie et les reins, avec un maximum à

24 h pour l' $^{111}\text{In}$ . S'il n'y avait que très peu de différence entre les deux radionucléides pour l'activité sanguine, ce n'est plus le cas pour ces organes de métabolisation, où une discordance est observée à partir de 24 h, s'intensifiant à 48 h. Les taux observés en  $^{125}\text{I}$  sont en effet bien plus faibles que les taux en  $^{111}\text{In}$ . Par exemple, pour les "PEG<sub>2000</sub> 5,0%" à 24 h, les taux hépatiques, spléniques et rénaux sont respectivement de  $17,9 \pm 0,9 / 31,6 \pm 10,0 / 8,9 \pm 2,5$  % DI/g en  $^{111}\text{In}$  et de  $9,4 \pm 0,9 / 13,9 \pm 4,7 / 4,5 \pm 1,8$  % DI/g en  $^{125}\text{I}$ . Les deux autres formulations présentent des résultats similaires comme le montre la *Figure 43*. Pour les trois formulations, la différence observée entre le marquage externe ( $^{111}\text{In}$ ) et le marquage interne ( $^{125}\text{I}$ ) est significative ( $p \leq 0,03$  – tes de Wilcoxon).

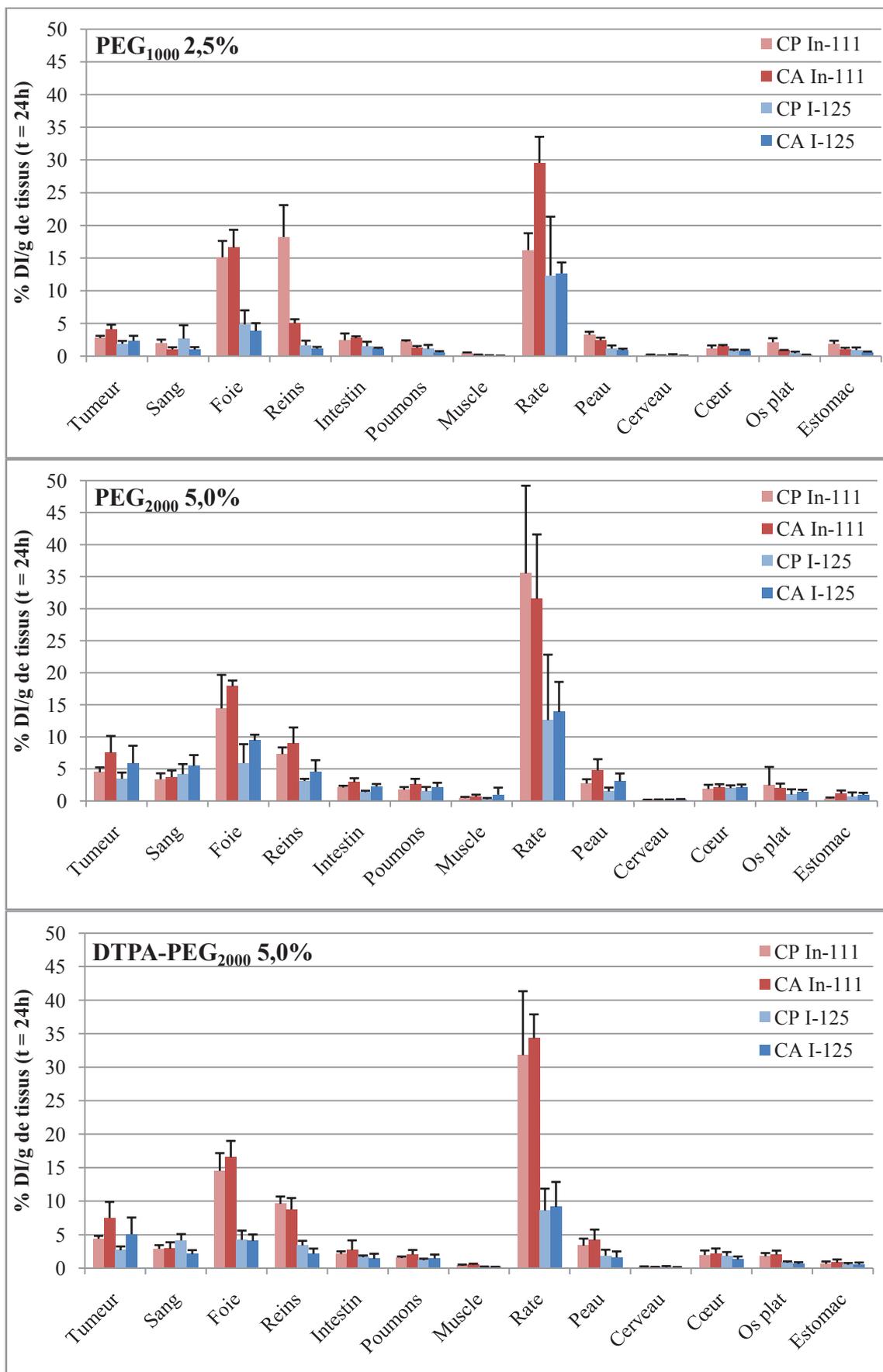
L'ensemble des autres organes montrent une captation relativement faible mis à part pour le cœur et les poumons avec des taux d'un peu plus de 5 % DI/g à 3 h, mais qui diminuent ensuite au cours du temps. L'activité retrouvée dans ces organes très vascularisés s'explique plus par la présence importante de sang plutôt qu'une réelle captation des liposomes. L'activité pulmonaire et cardiaque suit donc en partie l'activité sanguine.



**Figure 43 :** Comparaison des taux en  $^{111}\text{In}$  et en  $^{125}\text{I}$  à 24 h dans les trois principaux organes de captation des liposomes pour chaque formulation. Les résultats sont exprimés en pourcentage de dose injectée par gramme de tissu (% DI/g, moy  $\pm$  ET).

### I.2.2. Comparaison ciblage actif/ciblage passif à 24 h

La *Figure 44* présente les résultats de biodistribution en ciblage passif (CP) à 24 h en comparaison au ciblage actif (CA) pour chaque formulation.



**Figure 44** : Comparaison du ciblage passif (CP) et du ciblage actif (CA) en <sup>111</sup>In et en <sup>125</sup>I à 24 h pour les trois formulations de liposomes. Les résultats sont exprimés % DI/g (moy ± ET).

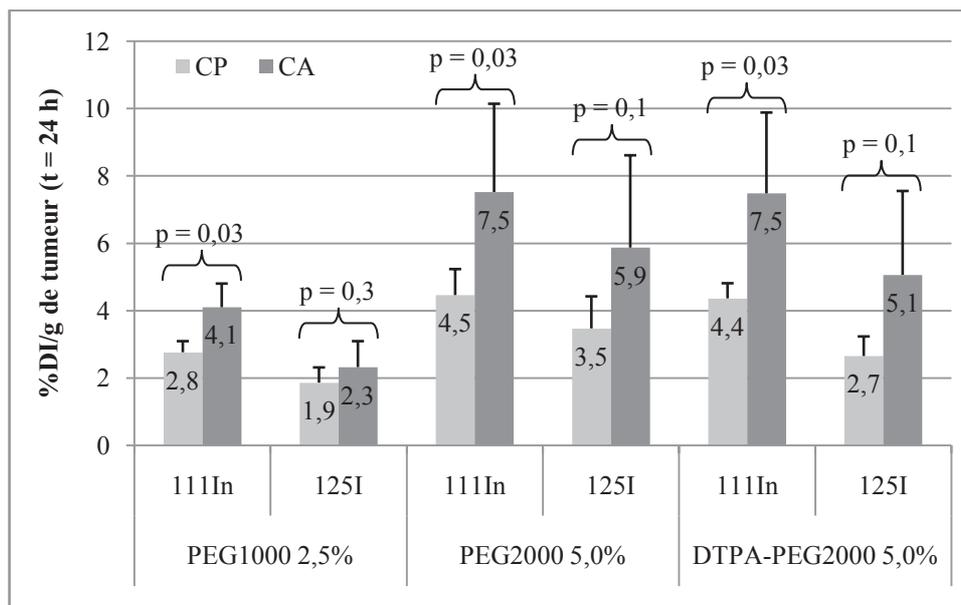
Ces histogrammes montrent que le CA est similaire au CP pour l'ensemble des organes sains sur les trois formulations, excepté pour les "PEG<sub>1000</sub> 2,5%" qui révèlent une différence pour les reins et la rate en <sup>111</sup>In (traceur de la bicouche lipidique). Les captations rénales et spléniques sont en effet de  $18,2 \pm 4,9$  pour les reins et  $16,2 \pm 2,6$  % DI/g pour la rate en CP alors qu'ils sont respectivement de  $5,0 \pm 0,6$  et  $29,6 \pm 4,0$  % DI/g en CA. Nous pouvons cependant constater que la somme des taux retrouvés pour ces deux organes est identique pour le CP et CA, respectivement de 34,4 % et 34,6 % DI/g. Nous pouvons alors supposer qu'une partie des liposomes qui auraient dû être captés par la rate, ont été captés par les reins dans le cas du CP. Cela pourrait s'expliquer par une désintégration de la bicouche des liposomes en petits fragments qui resteraient piégés par les capillaires sinusoidaux rénaux, la rate captant préférentiellement des particules de grosse taille. Pour le reste des organes sains et pour les trois formulations, aucune autre différence n'est à constater entre le CP et CA.

Les analyses statistiques réalisées afin de comparer le CP et CA pour le foie, la rate, les reins et le sang, confirment en effet toutes ces observations. Aucune différence significative n'est retrouvée pour les "PEG<sub>2000</sub> 5,0%" et "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%" ( $p > 0,05$  – test non paramétrique de Wilcoxon). A l'inverse pour les "PEG<sub>1000</sub> 2,5%", les différences sont bien significatives pour la rate, les reins et le sang ( $p = 0,03$ ), mais pas pour le foie ( $p = 0,5$ ).

### **I.2.3. Ciblage tumoral**

Concernant le ciblage tumoral, les résultats obtenus à 24 h pour chaque formulation en ciblage passif (CP) et actif (CA) sont présentés dans la *Figure 45*. Cet histogramme présente également les degrés de significativité ( $p$ ) pour l'analyse statistique comparant le CP et le CA.

Ces résultats montrent tout d'abord un ciblage passif relativement important des liposomes notamment pour le traceur de la bicouche lipidique, avec 3 à 4,5 % DI/g de tumeur selon la formulation. Malgré ce CP déjà important, ces résultats mettent en évidence un CA presque deux fois plus important que le CP. Pour les "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%", par exemple, les taux en <sup>111</sup>In sont de  $4,4 \pm 1,2$  % DI/g pour le CP *versus*  $7,5 \pm 2,4$  % DI/g pour le CA. Cela confirme l'immunospécificité du ciblage des liposomes déjà mis en évidence *in vitro*. Les différences observées pour chaque formulations sont bien significatives en <sup>111</sup>In ( $p = 0,03$ ) mais ne sont plus démontrées statistiquement pour l'<sup>125</sup>I ( $p = 0,1$  à  $0,3$ ), certainement de part les trop grands écart-types observés.



**Figure 45 :** Influence de la formulation de liposomes sur le ciblage tumoral et comparaison du ciblage passif (CP) et actif (CA) 24 h après l'injection des liposomes. Les résultats sont exprimés % DI/g (moy ± ET). Le degré de significativité (p) a été déterminé par le test non paramétrique de Wilcoxon.

Concernant les différences observées entre les taux en  $^{111}\text{In}$  et les taux en  $^{125}\text{I}$ , comme pour les organes sains (foie, rate, reins), des taux plus faibles sont observés pour le traceur interne, mais aucune différence significative ne peut être mise en évidence par un test non paramétrique ( $p = 0,1$  – test de Wilcoxon sur séries appariées).

Si l'on compare maintenant les formulations entre elles, il apparaît que les "PEG<sub>1000</sub> 2,5%" présentent un ciblage tumoral statistiquement inférieur aux deux autres formulations, pour les taux en  $^{111}\text{In}$  ( $p = 0,016$ ) et inférieur aux "PEG<sub>2000</sub> 5,0%" pour les taux en  $^{125}\text{I}$  ( $p = 0,029$ ). Par contre, aucune différence significative n'apparaît entre les résultats obtenus pour les "PEG<sub>2000</sub> 5,0%" et les "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%" ( $p = 1$  et  $p = 0,7$  respectivement pour les taux en  $^{111}\text{In}$  et  $^{125}\text{I}$ ).

#### I.2.4. Résultats cumulés en AUC

Les premiers résultats présentés ont permis de décrire la biodistribution générale des liposomes puis se sont centrés sur le temps 24 h, qui est le temps le plus représentatif de la biodistribution, la captation tumorale étant maximale. Il est cependant plus intéressant encore de prendre en compte l'ensemble des résultats de la biodistribution en calculant l'aire sous la courbe (AUC) qui intègre les activités à 3 h, 24 h et 48 h. Les AUC ainsi que les ratios tumeur/organes (T/O) sont présentés dans le *Tableau 26*.

Comme précédemment décrit, les valeurs d'AUC moyennes obtenues dans ce tableau ont été calculées par la méthode des trapèzes en prenant les activités moyennes pour chaque temps de la

biodistribution. Il est cependant impossible de connaître les valeurs unitaires qui composent cette moyenne, ni l'écart-type sur cette moyenne, ce qui empêche toute analyse statistique.

	PEG <sub>1000</sub> 2,5%				PEG <sub>2000</sub> 5,0%				DTPA-PEG <sub>2000</sub> 5,0%			
	Externe		Interne		Externe		Interne		Externe		Interne	
	AUC	T/O	AUC	T/O	AUC	T/O	AUC	T/O	AUC	T/O	AUC	T/O
Tumeur	154	1,0	90	1,0	288	1,0	229	1,0	278	1,0	158	1,0
Sang	343	0,4	401	0,2	305	1,0	392	0,6	437	0,6	329	0,5
Foie	636	0,2	188	0,5	681	0,4	363	0,6	692	0,4	178	0,9
Reins	230	0,7	97	0,9	348	0,8	183	1,3	371	0,7	103	1,5
Rate	1089	0,1	469	0,2	1205	0,2	528	0,4	1379	0,2	361	0,4

**Tableau 26 :** Tableau récapitulatif des aires sous la courbe (AUC) calculées pour les principaux organes (en % DI/g.h) pour le marquage externe (<sup>111</sup>In) et le marquage interne (<sup>125</sup>I). Les ratios tumeur/organes (T/O) sont également calculés.

Si nous comparons pour chaque formulation, les résultats obtenus en <sup>111</sup>In (marquage externe) et en <sup>125</sup>I (marquage interne), nous pouvons toutefois remarquer que pour les organes sains, les AUC sont 2 à 4 fois plus importantes pour le marquage externe que pour le marquage interne. Les AUC tumorales sont également plus importantes pour le marquage externe mais dans une moindre mesure. La différence observée est encore plus faible pour le compartiment sanguin. Les ratios tumeur/organes, montrent en conséquence des résultats plus favorables pour le marquage interne de 1,5 à 2 fois supérieurs aux ratios obtenus pour le marquage externe.

La comparaison des formulations entre elles montrent encore une fois que les "PEG<sub>1000</sub> 2,5%" sont bien moins intéressants que les deux autres formulations avec des AUC tumorales bien inférieures et des ratios T/O moins favorables. Les résultats obtenus pour les "PEG<sub>2000</sub> 5,0%" et les "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%" sont par contre comparables pour le marquage externe, que ce soit pour les AUC ou les ratios T/O. Pour le marquage interne, l'AUC tumorale semble par contre être inférieure pour les "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%" mais inversement, avec cette dernière formulation, les ratios T/O semblent être légèrement plus favorables notamment pour le foie et les reins, dû à des AUC relativement faibles dans ces organes.

### I.3. Discussion

Les profils de distribution obtenus avec nos liposomes ne sont pas surprenants puisque les liposomes sont majoritairement retrouvés au niveau du foie et de la rate, ce qui est largement décrit dans la littérature (78,174,219,237) et expliqué par l'accumulation dans les organes du SRE. Les liposomes s'accumulent en effet selon deux mécanismes dans le foie et la rate, à la fois par extravasation à travers les capillaires discontinus dont ils sont pourvus, et en même temps par accumulation après capture par les macrophages du SRE où ils sont dégradés et métabolisés. L'accumulation des liposomes dans les reins peut s'expliquer, quant à elle, par simple extravasation de petits liposomes ou de fragments de bicouche lipidique à travers les endothéliums fenestrés au niveau rénal (68). L'accumulation des liposomes dans ces trois organes, est particulièrement observée avec le marquage à l' $^{111}\text{In}$ , traceur externe de la bicouche lipidique, mais dans une moindre mesure avec l' $^{125}\text{I}$  traceur interne de la phase aqueuse. Après captation par les macrophages et les organes du SRE, les liposomes sont en effet métabolisés et dégradés provoquant la fuite du contenu de la phase aqueuse et de l'arginine couplé au Bolton-Hunter radioiodé. Comme attendu, cette molécule hydrosoluble marquée à l' $^{125}\text{I}$  est très rapidement éliminée au niveau urinaire après métabolisation des liposomes. Ce phénomène était en effet attendu mais également recherché. En effet, cette stratégie d'encapsulation d'une molécule radiomarquée hydrosoluble, éliminée rapidement après métabolisation des liposomes, devait conduire à une faible irradiation des tissus sains, nécessaire à des applications en RIT (177). A l'inverse, l' $^{111}\text{In}$  couplé aux phospholipides, va être éliminé beaucoup plus lentement en suivant le métabolisme des lipides au niveau du foie et de la rate. Cette différence de métabolisation explique les différences observées entre les biodistributions des deux radionucléides, avec une diminution très rapide des % DI/g de tissus pour l' $^{125}\text{I}$  par rapport à l' $^{111}\text{In}$ .

Les biodistributions générales de chaque formulation dans des conditions de ciblage passif sont comparables aux biodistributions obtenues dans les conditions de ciblage actif (pour ce qui concerne les tissus sains). Aucune différence significative n'a été retrouvée pour les principaux organes d'intérêt (foie, rate, reins et sang) pour les "PEG<sub>2000</sub> 5,0%" et les "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%". Les différences observées pour les "PEG<sub>1000</sub> 2,5%" entre le CP et le CA sont certainement liées à un problème au niveau des liposomes lors de la manip de CP elle-même. Au final, l'injection préalable de l'anticorps bispécifique ne semble donc pas influencer la biodistribution générale des liposomes.

Le ciblage immunospcifique de liposomes est généralement assez difficile à mettre en évidence de manière significative. En effet, de par leur nature, les liposomes pégylés ayant une longue circulation sanguine, présentent une accumulation tumorale importante par simple ciblage passif expliqué par l'effet EPR (70). Les liposomes profitent en effet de la néovascularisation tumorale très

importante avec des endothéliums discontinus pour s'extravaser de la circulation sanguine et s'accumuler ainsi dans les tumeurs. La taille des pores des vaisseaux tumoraux a été mesurée pour les tumeurs d'adénocarcinome colique humain (cellules LS147T utilisées dans notre modèle tumoral) par Yuan *et al* comme pouvant aller jusqu'à 400 nm de diamètre (238). Il est donc facile d'expliquer pourquoi des liposomes de 100 nm présentent un ciblage tumoral passif non négligeable (de 3 à 4 % DI/g de tumeur).

Cependant, malgré ce ciblage passif déjà important, ces études de biodistribution démontrent l'immunospecificité du ciblage de liposomes fonctionnalisés, réalisé en deux temps grâce à l'anticorps bispécifique injecté 24 h avant les liposomes. Lorsque l'on considère le marquage externe des liposomes, les différences observées entre le CP et le CA sont en effet significatives pour les trois formulations de liposomes ( $p = 0,03$  – test de Wilcoxon). Pour le marquage interne, la différence n'est plus statistiquement significative (certainement dû aux grands écart-types observés sur de petits échantillons), mais le CA est toujours bien supérieur au CP.

Lors de l'analyse de ces résultats, il a également paru intéressant d'exprimer les résultats de biodistribution obtenus aux 3 temps en une seule donnée, avec l'AUC, qui intègre le pourcentage de dose injectée par gramme de tissus cumulé au cours du temps (% DI/g.h). Précisons qu'il ne s'agit pas ici de dosimétrie avec le calcul d'une activité cumulée ( $\tilde{A}$ ), mais bien d'une simple AUC. Les données de biodistribution exprimées en % DI/g de tissus sont en effet corrigées de toute décroissance puisque les comptages sont toujours réalisés avec les standards auxquels les activités de chaque prélèvement sont rapportées. Cela permet ainsi de comparer les deux types de marquages, externe et interne, indépendamment du radionucléide choisi sans l'effet de la demi-vie physique. En effet les deux radionucléides utilisés ayant des demi-vies physiques complètement différentes (2,8 j pour l' $^{111}\text{In}$  et 59,4 j pour l' $^{125}\text{I}$ ), ils ne sont donc pas directement comparables (239). Il serait par ailleurs inapproprié de réaliser une étude de dosimétrie avec ces deux radionucléides, inadaptés à de la thérapie, et qui ne servent ici que de preuve de concept pour comparer le marquage externe des liposomes au marquage interne. L'AUC représente donc ici une quantité cumulée de liposomes au cours du temps (représentés soit par leur bicouche lipidique soit par leur compartiment interne), sans être représentative de la radioactivité qui décroît au cours du temps. Comme il le sera présenté par la suite, pour déterminer des  $\tilde{A}$  et réaliser une étude de dosimétrie, une décroissance radioactive devra tout d'abord être appliquée à chaque résultat avant de calculer l'AUC, qui correspondra cette fois-ci à une activité cumulée.

Comme nous l'avons vu, le calcul de ces AUC à partir des moyennes obtenues à chaque temps (3 h, 24 h et 48 h), ne permet d'obtenir qu'une AUC moyenne sans écart-type et sans connaître les valeurs unitaires la composant, empêchant donc la réalisation de toute analyse statistique. Malgré l'absence d'analyse statistique, les valeurs obtenues tendent à montrer que si le marquage externe des liposomes permet d'obtenir de meilleurs taux à la tumeur, les ratios tumeurs/organes sont quant à eux plus favorables pour le marquage interne des liposomes grâce à une élimination rapide de l'arginine,

couplée au Bolton-Hunter radiodé, au niveau urinaire. L'effet escompté pour limiter l'irradiation aux tissus sains semble donc avoir été atteint. Ces résultats montrent par ailleurs que la formulation "PEG<sub>1000</sub> 2,5%" est la moins favorable de toutes avec des taux tumoraux et ratios T/O plus faibles. Si l'on ne s'intéresse qu'au marquage interne, les "PEG<sub>2000</sub> 5,0%" sont plus intéressants au niveau du ciblage tumoral, mais les "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%" ont tendance à montrer de meilleurs ratios tumeurs/organes. Pour y voir plus clair, nous avons proposé une méthode alternative d'analyse statistique permettant la comparaison des AUC obtenues au cours de ces études de biodistribution.

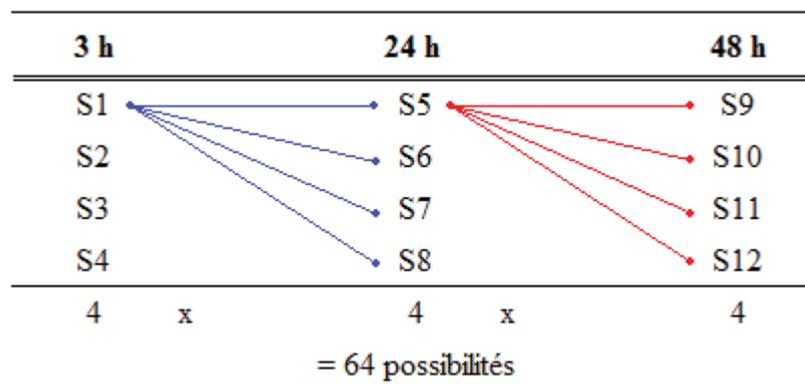
## II.COMPARAISON STATISTIQUE DES AUC

L'objectif de cette partie a été de développer une méthodologie permettant la comparaison statistique des AUC calculées précédemment ; c'est-à-dire déterminer quelles sont les valeurs unitaires composant chaque AUC moyenne et permettant de calculer l'écart-type sur la moyenne. Le but étant au final, de déterminer si il y a une différence significative entre les différentes formulations de liposomes testées *in vivo* et ce, sur l'ensemble de leurs biodistributions pendant 48 h.

### II.1. Matériels et méthodes

Pour obtenir les valeurs unitaires de l'AUC moyenne, il faudrait associer une souris sacrifiée à 3 h, à une souris sacrifiée à 24 h et à une troisième sacrifiée à 48 h, afin de calculer l'AUC résultante et répéter cette opération pour chaque souris. Cependant, les souris investiguées à chaque temps sont des lots de souris bien distinctes puisque sacrifiées à chaque fois et il ne serait pas exact d'associer arbitrairement la 1<sup>ère</sup> souris du temps 3 h à la 1<sup>ère</sup> souris du temps 24 h et du temps 48 h, et ainsi de suite de façon à obtenir au final 4 AUC.

Pour 3 lots de 4 souris, il existe en effet 64 combinaisons possibles comme le montre la *Figure 46* ci-dessous (cas des "PEG<sub>1000</sub> 2,5%" et "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%"). Pour 15 souris, réparties en 3 lots de 6, 5 et 4 souris par temps, il existe  $6 \times 5 \times 4 = 120$  combinaisons possibles (cas des "PEG<sub>2000</sub> 5,0%").



*Figure 46* : 64 possibilités d'association pour 3 x 4 souris par biodistribution

Il a alors été décidé de déterminer ces 64 à 120 AUC, et de calculer l'AUC moyenne avec son écart-type à partir de ces 64 ou 120 valeurs afin de pouvoir réaliser des études statistiques. Comme

pour les résultats présentés au § I.2.4 p.150, ces calculs n'ont été effectués que pour les principaux organes d'intérêt : tumeur, sang, foie, reins et rate. Malgré la taille des échantillons plus importante, le test non paramétrique de Wilcoxon a été encore une fois utilisé pour réaliser les comparaisons.

## II.2. Résultats

Les résultats obtenus sont présentés dans le *Tableau 27* ci-dessous.

AUC (% DI/g.h)	Marquage externe					
	PEG <sub>1000</sub> 2,5% (n=64)		PEG <sub>2000</sub> 5,0% (n=120)		DTPA-PEG <sub>2000</sub> 5,0% (n = 64)	
	AUC ± ET	T/O ± ET	AUC ± ET	T/O ± ET	AUC ± ET	T/O ± ET
Tumeur	154 ± 16	-	288 ± 61	-	278 ± 49	-
Sang	343 ± 21	0,45 ± 0,06	305 ± 33	0,96 ± 0,25	437 ± 70	0,65 ± 0,15
Foie	636 ± 57	0,24 ± 0,02	681 ± 27	0,42 ± 0,10	692 ± 54	0,41 ± 0,09
Reins	230 ± 19	0,67 ± 0,08	348 ± 57	0,85 ± 0,27	371 ± 43	0,76 ± 0,17
Rate	1089 ± 101	0,14 ± 0,01	1205 ± 230	0,24 ± 0,06	1379 ± 77	0,20 ± 0,05

AUC (% DI/g.h)	Marquage interne					
	PEG <sub>1000</sub> 2,5% (n=64)		PEG <sub>2000</sub> 5,0% (n=120)		DTPA-PEG <sub>2000</sub> 5,0% (n = 64)	
	AUC ± ET	T/O ± ET	AUC ± ET	T/O ± ET	AUC ± ET	T/O ± ET
Tumeur	90 ± 16	-	229 ± 63	-	158 ± 50	-
Sang	401 ± 25	0,23 ± 0,05	392 ± 51	0,60 ± 0,21	329 ± 39	0,49 ± 0,17
Foie	188 ± 28	0,49 ± 0,08	363 ± 25	0,64 ± 0,18	178 ± 23	0,90 ± 0,28
Reins	97 ± 9	0,94 ± 0,21	183 ± 42	1,34 ± 0,58	103 ± 18	1,59 ± 0,60
Rate	469 ± 39	0,19 ± 0,03	528 ± 99	0,45 ± 0,14	361 ± 77	0,43 ± 0,08

**Tableau 27 :** AUC moyennes et écart-types (AUC ± ET) avec calcul des ratios tumeurs/organes moyens et écart-types associés (T/O ± ET) obtenus par extrapolation à partir de 64 valeurs pour les "PEG<sub>1000</sub> 2,5%" et les "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%" et de 120 valeurs pour les "PEG<sub>2000</sub> 5,0%"

La première constatation qu'il est possible de faire est que la méthodologie employée permet de retrouver exactement les mêmes valeurs d'AUC moyennes que celle obtenues par la première méthode décrite au § I.2.4 p.150 (*Tableau 26* p.151), ce qui était par ailleurs attendu.

Les comparaisons effectuées entre les résultats obtenus pour le marquage externe et le marquage interne ont permis d'obtenir dans tous les cas des différences très significatives ( $p \leq 3,6 \cdot 10^{-12}$ ; test de Wilcoxon en séries appariées). Les taux à la tumeur sont donc toujours significativement plus importants pour le marquage externe, tout comme les taux aux organes sains (foie, reins et rate) comme nous avons déjà pu le démontrer sur les valeurs obtenues à 24 h (cf § I.2.1 p.145). Par contre,

les ratios tumeurs/organes sont à l'inverse toujours significativement plus favorables pour le marquage interne (mis à part pour les ratios tumeur/sang où le phénomène inverse est observé).

La comparaison des formulations entre elles confirme que les liposomes "PEG<sub>1000</sub> 2,5%" sont les moins favorables avec des taux tumoraux et des ratios T/O toujours significativement plus faibles par rapport aux deux autres formulations ( $p \leq 2,3 \cdot 10^{-8}$  ; test de Wilcoxon).

Les conclusions sont par contre plus contrastées pour ce qui concerne la comparaison des "PEG<sub>2000</sub> 5,0%" et des "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%".

Si l'on considère le marquage externe, il n'y a pas de différence significative pour les taux tumoraux ( $288 \pm 61$  vs  $278 \pm 49$  % DI/g ;  $p = 0,4$ ), les ratios tumeur/foie ( $0,42 \pm 0,10$  vs  $0,41 \pm 0,09$  ;  $p = 0,2$ ) et les ratios tumeur/reins ( $0,85 \pm 0,27$  vs  $0,76 \pm 0,17$  ;  $p = 0,1$ ). Par contre malgré les très faibles différences, les ratios tumeur/rate et tumeur/sang sont statistiquement en faveur des "PEG<sub>2000</sub> 5,0%" avec respectivement  $0,24 \pm 0,06$  vs  $0,20 \pm 0,05$  ( $p = 7 \cdot 10^{-6}$ ) et  $0,96 \pm 0,25$  vs  $0,65 \pm 0,15$  ( $p = 4 \cdot 10^{-5}$ ).

Si l'on considère maintenant le marquage interne, une différence significative est observée sur les taux à la tumeur ( $229 \pm 63$  vs  $158 \pm 50$  % DI/g ;  $p = 4 \cdot 10^{-11}$ ) et le ratio tumeur/sang ( $0,60 \pm 0,21$  vs  $0,49 \pm 0,17$  ;  $p = 0,001$ ) en faveur des "PEG<sub>2000</sub> 5,0%" alors que les ratios tumeur/foie et tumeur/reins sont par contre en faveur des "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%" avec respectivement  $0,64 \pm 0,18$  vs  $0,90 \pm 0,28$  ( $p = 2 \cdot 10^{-12}$ ) et  $1,34 \pm 0,58$  vs  $1,59 \pm 0,60$  ( $p = 0,04$ ). Aucune différence significative n'est par contre constatée sur les ratios tumeur/rate ( $0,45 \pm 0,14$  vs  $0,43 \pm 0,08$  ;  $p = 0,9$ ).

### II.3. Discussion

Cette analyse statistique confirme donc les conclusions déjà établies précédemment avec notamment une supériorité bien établie des deux dernières formulations par rapport à la première. L'intérêt du marquage interne par rapport au marquage externe est également confirmé puisqu'il permet d'obtenir des ratios tumeur/organes significativement plus favorables, ce qui était tout l'intérêt de la mise au point de ce marquage de phase aqueuse (177). Par contre il est toujours assez difficile de trancher sur la supériorité de l'une ou l'autre des deux dernières formulations. En effet si l'on se concentre sur le marquage interne, malgré un ciblage tumoral plus faible pour les "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%" les ratios tumeurs/organes obtenus avec cette dernière formulation sont globalement plus favorables.

Il convient toutefois de rester prudent avec les résultats de cette étude statistique notamment sur les degrés de significativité ( $p$ ) obtenus. En effet bien que cette méthodologie repose entièrement sur les valeurs expérimentales obtenues, les résultats sont biaisés par le gonflement artificiel des effectifs, rendant des résultats qui pouvaient être non significatifs avec 4 souris à très significatifs sur 64 à 120 valeurs. Cette méthodologie n'est donc valable qu'en admettant l'hypothèse qu'avec des lots de souris

bien plus importants nous aurions forcément les mêmes résultats expérimentaux qu'avec notre échantillon réduit. La méthode employée repose également sur l'hypothèse qu'une souris sacrifiée au temps 3 h aurait effectivement donnée à 24 h le même résultat que l'une des 4 souris sacrifiées au temps 24 h, et aurait donné à 48 h le même résultat que l'une des 4 souris sacrifiées au temps 48 h, etc... Ces résultats basés uniquement sur les données expérimentales restent donc en partie « fabriqués », il faut en conséquence les interpréter avec précaution.

### III. DOSIMETRIE

Cette étude de dosimétrie consiste à déterminer les doses absorbées dans chaque organe et pour chaque formulation, avec des radionucléides d'intérêt pour la RIT. La dose absorbée (D) reflète la quantité d'énergie absorbée par unité de matière au cours du temps.

Les calculs de dosimétrie sont généralement effectués selon le formalisme du MIRD (Medical Internal Radiation Dose) qui repose sur des modèles anthropomorphiques (240). Il permet de calculer la dose absorbée moyenne dans une région cible (k) à partir d'une irradiation provenant d'une région source (h) selon la formule suivante :

$$D_{(k \leftarrow h)} = \frac{1}{m_k} \tilde{A}_h \times \sum_i \Delta_i \phi_{i(k \leftarrow h)}$$

avec : - D : la dose absorbée dans le volume cible (en Gy, 1 Gy = 1 J.kg<sup>-1</sup>)

- m<sub>k</sub> : la masse du volume cible (en kg)

-  $\tilde{A}_h$  : l'activité cumulée dans le volume source (en MBq.s)

-  $\Delta_i$  : l'énergie par désintégration (en J.MBq<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>)

-  $\phi_{i(k \leftarrow h)}$  : la fraction d'énergie émise par la source qui est absorbée par la cible

Cette formule peut être simplifiée en  $D_{(k \leftarrow h)} = \tilde{A}_h \times S$ , le facteur S prenant en compte la masse de la cible, l'énergie moyenne par désintégration et la fraction absorbée. Ce facteur S est alors propre à un couple source/cible pour une anatomie donnée et une particule donnée.

#### III.1. Matériels et Méthodes

Pour le marquage de la paroi des liposomes (marquage externe), les radionucléides choisis sont l'<sup>90</sup>Y et le <sup>177</sup>Lu. Le radionucléide choisi pour le marquage de la phase aqueuse (marquage interne) est l'<sup>131</sup>I.

En première approche, nous considérerons que les rayons émis dans une région donnée de l'espace sont absorbés dans la même région et donc que la source et la cible sont confondues. Cette simplification nous affranchit de l'utilisation des facteurs S. Dans ce cas, la dose absorbée (D) est directement proportionnelle à l'activité cumulée par unité de matière ( $\tilde{A}/m$ ) et à l'énergie moyenne par désintégration ( $\Delta$ ). Le calcul utilisé pour la dose absorbée est alors :  $D = \tilde{A}/m \times \Delta$ .

Les énergies moyennes par désintégration ( $\Delta$ ) utilisées pour les calculs sont celles retrouvées sur la base de données NuDat 2.6 (National Nuclear Data Center), accessibles librement sur internet (239) et reportées dans le *Tableau 28*. Les activités cumulées par unité massique ( $\tilde{A}/m$ ) sont déterminées grâce aux données expérimentales des études de biodistribution présentées précédemment

(cf § I.2.1 p.145 : *Tableau 23, Tableau 24 et Tableau 25*). Ces résultats de biodistribution étant corrigés de toute décroissance, ils représentent donc la biodistribution du vecteur uniquement. Afin d'obtenir la biodistribution réel de chaque radionucléide, une décroissance radioactive a été appliquée à chaque résultat de ces tableaux de biodistribution, en fonction de la demi-vie d'élimination de chaque radionucléide (*Tableau 28*) et du temps  $t$  de la biodistribution (3 h, 24 h et 48 h). Les aires sous la courbe (AUC) de 0 à 48 h ont été calculées à partir de ces nouvelles données selon la méthode des trapèzes (cf § I.1.3 p.143). Les AUC de 48 h à l'infini ont également été calculées par extrapolation selon l'hypothèse d'une élimination terminale mono-exponentielle, avec la même demi-vie d'élimination effective que celle observée entre les points à 24 et 48 h.

<b>Radionucléide</b>	<sup>90</sup> <b>Y</b>	<sup>177</sup> <b>Lu</b>	<sup>131</sup> <b>I</b>
Demi-vie physique (T <sub>1/2</sub> phys) en h	64,0	159,5	192,6
Energie moyenne par désintégration ( $\Delta$ ) en MeV.MBq <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup>	933,6	134,2	182,0

**Tableau 28** : Demi-vie physique en h et énergie moyenne par désintégration en MeV.MBq<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> des trois radionucléides choisis pour l'étude de dosimétrie (239)

Afin de pouvoir comparer plus facilement les données obtenues en mGy/MBq, nous avons ensuite converti ces résultats en Gy, pour des activités maximales théoriques injectées nous permettant de ne pas dépasser 1,5 Gy à la moelle osseuse (organe généralement limitant en RIT). La dose à la moelle, que nous ne connaissons pas directement, a été extrapolée d'après la dose au sang selon le ratio moelle/sang de 0,36 établi par Sgouros *et al.* pour des anticorps (241).

Les doses aux autres organes sains ont ensuite été comparées aux « Doses de tolérances des organes à risques et des tissus sains », recommandées par l'Institut National du Cancer, d'après le Guide des Procédures de Radiothérapie Externe 2007 (242). Les doses de tolérance existant pour les organes d'intérêt de notre étude sont présentées dans le *Tableau 29*.

<b>OAR</b>	<b>Dose de tolérance</b>
Foie	26 Gy
Rein	20 Gy
Thyroïde	40 Gy
Intestin	50 Gy
Cerveau	50 Gy
Cœur	35 Gy
Estomac	45 Gy

**Tableau 29** : Doses de tolérance des principaux organes à risque (OAR)

## III.2. Résultats

Les *Tableau 30*, *Tableau 31* et *Tableau 32* ci-dessous présentent les résultats de dosimétrie obtenus pour les trois formulations étudiées jusqu'à présent ("PEG<sub>1000</sub> 1,5%", "PEG<sub>2000</sub> 5,0%" et "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%" respectivement) en ciblage actif, avec une simulation du radiomarquage externe par de l'<sup>90</sup>Y ou du <sup>177</sup>Lu, et un radiomarquage interne par de l'<sup>131</sup>I.

PEG <sub>1000</sub> 1,5%	Marquage externe				Marquage interne	
	<sup>90</sup> Y		<sup>177</sup> Lu		<sup>131</sup> I	
Tissus	D (mGy/MBq)	T/O	D (mGy/MBq)	T/O	D (mGy/MBq)	T/O
Tumeur	1,02	1,0	0,21	1,0	0,10	1,0
Sang	1,78	0,6	0,26	0,8	0,41	0,2
Moelle osseuse	0,64	1,6	0,09	2,2	0,15	0,7
Foie	4,42	0,2	0,94	0,2	0,19	0,5
Reins	1,75	0,6	0,40	0,5	0,11	0,9
Intestin	1,02	1,0	0,26	0,8	0,07	1,6
Poumons	0,61	1,7	0,10	2,1	0,11	0,9
Muscle	0,11	9,1	0,04	5,3	0,01	13,0
Rate	6,49	0,2	1,25	0,2	0,49	0,2
Peau	0,64	1,6	0,13	1,6	0,05	2,2
Cerveau	0,07	13,9	0,01	19,0	0,02	6,0
Cœur	0,63	1,6	0,12	1,7	0,09	1,2
Os plat	0,38	2,7	0,07	2,9	0,04	2,4
Estomac	0,39	2,6	0,10	2,2	0,03	3,2

**Tableau 30 :** Simulation des doses absorbées (mGy/MBq) et des ratios tumeur/organe (T/O) pour les "PEG<sub>1000</sub> 1,5%" avec un radiomarquage externe par de l'<sup>90</sup>Y ou du <sup>177</sup>Lu et un radiomarquage interne par de l'<sup>131</sup>I

PEG <sub>2000</sub> 5,0%	Marquage externe				Marquage interne	
	<sup>90</sup> Y		<sup>177</sup> Lu		<sup>131</sup> I	
	D (mGy/MBq)	T/O	D (mGy/MBq)	T/O	D (mGy/MBq)	T/O
Tissus						
Tumeur	1,93	1,0	0,40	1,0	0,30	1,0
Sang	1,85	1,0	0,28	1,4	0,47	0,6
Moelle osseuse	0,67	2,9	0,10	4,0	0,17	1,8
Foie	4,67	0,4	0,98	0,4	0,38	0,8
Reins	2,83	0,7	0,69	0,6	0,23	1,3
Intestin	0,82	2,3	0,17	2,4	0,12	2,5
Poumons	0,66	2,9	0,11	3,7	0,13	2,2
Muscle	0,14	13,6	0,03	14,4	0,03	10,9
Rate	8,17	0,2	1,71	0,2	0,57	0,5
Peau	0,98	2,0	0,19	2,1	0,11	2,6
Cerveau	0,07	26,0	0,01	34,7	0,02	15,7
Cœur	0,69	2,8	0,12	3,4	0,15	2,0
Os plat	0,49	4,0	0,09	4,6	0,07	4,1
Estomac	0,19	10,0	0,03	11,8	0,04	7,5

**Tableau 31 :** Simulation des doses absorbées (mGy/MBq) et des ratios tumeur/organe (T/O) pour les "PEG<sub>2000</sub> 5,0%" avec un radiomarquage externe par de l'<sup>90</sup>Y ou du <sup>177</sup>Lu et un radiomarquage interne par de l'<sup>131</sup>I

DTPA- PEG <sub>2000</sub> 5,0%	Marquage externe				Marquage interne	
	<sup>90</sup> Y		<sup>177</sup> Lu		<sup>131</sup> I	
	D (mGy/MBq)	T/O	D (mGy/MBq)	T/O	D (mGy/MBq)	T/O
Tissus						
Tumeur	1,90	1,0	0,40	1,0	0,17	1,0
Sang	2,24	0,8	0,34	1,2	0,34	0,5
Moelle osseuse	0,81	2,4	0,12	3,3	0,12	1,4
Foie	6,30	0,3	1,74	0,2	0,18	0,9
Reins	3,00	0,6	0,73	0,6	0,13	1,3
Intestin	2,10	0,9	0,61	0,7	0,07	2,4
Poumons	0,83	2,3	0,14	2,8	0,10	1,7
Muscle	0,17	11,2	0,04	11,2	0,01	19,2
Rate	11,08	0,2	2,66	0,2	0,46	0,4
Peau	1,87	1,0	0,69	0,6	0,06	2,6
Cerveau	0,10	19,8	0,02	26,4	0,01	12,8
Cœur	1,05	1,8	0,27	1,5	0,11	1,6
Os plat	0,72	2,6	0,15	2,7	0,05	3,7
Estomac	0,24	7,8	0,05	7,8	0,02	6,8

**Tableau 32 :** Simulation des doses absorbées (mGy/MBq) et des ratios tumeur/organe (T/O) pour les "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%" avec un radiomarquage externe par de l'<sup>90</sup>Y ou du <sup>177</sup>Lu et un radiomarquage interne par de l'<sup>131</sup>I

L'analyse de ces premiers tableaux nous permet d'observer dans un premier temps que les organes recevant les doses les plus importantes sont la rate, le foie et les reins, ainsi que dans le cas du

marquage de la phase aqueuse à l' $^{131}\text{I}$ , le compartiment sanguin. Pour le marquage externe, il existe par ailleurs un facteur allant de 3 à 7, en fonction des organes, entre les doses apportées par l' $^{90}\text{Y}$  ou le  $^{177}\text{Lu}$ . Les doses absorbées à la tumeur sont de la même manière 5 fois plus importantes, pour l' $^{90}\text{Y}$  que pour le  $^{177}\text{Lu}$ . Pour l' $^{131}\text{I}$ , la dose à la tumeur est globalement 10 et 2 fois plus faible en comparaison à l' $^{90}\text{Y}$  et au  $^{177}\text{Lu}$ , excepté pour les "PEG<sub>2000</sub> 5,0%" où l'écart est plus faible (respectivement 6,4 et 1,3 fois plus faible). Cependant, pour les trois principaux organes d'accumulation les ratios tumeur/organes sont plus favorables (d'un facteur 2), pour le marquage interne.

Afin de pouvoir comparer plus facilement les données de dosimétrie obtenues dans les précédents tableaux, nous nous sommes ensuite placés pour chaque formulation et chaque radionucléide à la dose absorbée maximale de 1,5 Gy à la moelle osseuse. Le *Tableau 33* présente ainsi les données de doses absorbées en Gy pour chaque organe ainsi que l'activité en GBq correspondante.

Doses absorbées (Gy)	PEG <sub>1000</sub> 1,5%			PEG <sub>2000</sub> 5,0%			DTPA-PEG <sub>2000</sub> 5,0%		
	$^{90}\text{Y}$	$^{177}\text{Lu}$	$^{131}\text{I}$	$^{90}\text{Y}$	$^{177}\text{Lu}$	$^{131}\text{I}$	$^{90}\text{Y}$	$^{177}\text{Lu}$	$^{131}\text{I}$
Tumeur	2,4	3,3	1,0	4,3	6,0	2,6	3,5	5,0	2,1
Sang	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
<b>Moelle</b>	<b>1,5</b>	<b>1,5</b>	<b>1,5</b>	<b>1,5</b>	<b>1,5</b>	<b>1,5</b>	<b>1,5</b>	<b>1,5</b>	<b>1,5</b>
Foie	10,4	14,9	1,9	10,5	14,7	3,4	11,7	21,6	2,2
Reins	4,1	6,4	1,1	6,4	10,2	2,0	5,6	9,0	1,6
Intestin	2,4	4,2	0,7	1,9	2,5	1,1	3,9	7,6	0,9
Poumons	1,4	1,6	1,1	1,5	1,6	1,2	1,5	1,8	1,2
Muscle	0,3	0,6	0,1	0,3	0,4	0,2	0,3	0,4	0,1
Rate	15,2	19,9	5,0	18,4	25,5	5,1	20,6	33,0	5,6
Peau	1,5	2,1	0,5	2,2	2,9	1,0	3,5	8,6	0,8
Cerveau	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Cœur	1,5	1,9	0,9	1,6	1,7	1,3	2,0	3,3	1,3
Os plat	0,9	1,2	0,4	1,1	1,3	0,6	1,3	1,9	0,6
Estomac	0,9	1,5	0,3	0,4	0,5	0,4	0,5	0,6	0,3
<b>Activité (GBq)</b>	2,3	15,9	10,1	2,3	14,9	8,9	1,9	12,4	12,2

**Tableau 33 :** Simulation de la dose absorbée à chaque organe (Gy) pour une activité injectée (GBq) calculée de façon à se placer à une dose de 1,5 Gy à la moelle osseuse

Ce tableau montre tout d'abord qu'aucune dose de tolérance recommandée (cf § *Tableau 29* p.160) n'est dépassée pour aucun des organes sains.

Sans dépasser aucune dose de tolérance, et pour une dose limite à la moelle osseuse de 1,5 Gy, il semble donc en théorie possible d'injecter des activités en  $^{177}\text{Lu}$  environ 6,5 fois plus importantes

qu'en  $^{90}\text{Y}$  (avec par exemple 14,9 vs 2,3 GBq pour les "PEG<sub>2000</sub> 5,0%"). Cependant le gain à la tumeur ne serait alors que d'un facteur 1,4 (6,0 vs 4,3 Gy) et avec également des doses aux organes sains multipliées par 1,4. C'est cependant en théorie le radionucléide pour lequel il serait possible d'obtenir la dose la plus élevée à la tumeur.

De la même manière, il semble théoriquement possible d'injecter des activités en  $^{131}\text{I}$ , 4 à 5 fois supérieures à  $^{90}\text{Y}$  (9 à 12 GBq en fonction de la formulation). Avec ces activités, les doses aux organes sains sont, de plus, bien inférieures à celles obtenues avec les deux autres traceurs. Cependant, les doses apportées à la tumeur sont dans tous les cas 2 à 3 fois plus faibles.

Le meilleur compromis dans le choix du radionucléide semble alors être  $^{90}\text{Y}$  qui permet d'apporter une dose à la tumeur non négligeable, pour des doses aux organes sains satisfaisantes, et surtout, avec une activité injectée qui est la plus cohérente avec les pratiques cliniques en RIT.

Concernant le choix de la formulation, les liposomes les plus intéressants sont les "PEG<sub>2000</sub> 5,0%" avec lesquels la dose apportée à la tumeur est la plus importante (4,3 Gy vs 2,4 et 3,5 Gy pour les "PEG<sub>1000</sub> 2,5%" et les "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%")

### III.3. Discussion

Ces simulations dosimétriques reposent sur le choix préalable de radionucléides de substitution à  $^{111}\text{In}$  et à  $^{125}\text{I}$ , ayant un intérêt pour des applications en RIT et pour lesquels la procédure de radiomarquage puisse être facilement transposée.

L' $^{131}\text{I}$ , émetteur  $\beta^-$ , est l'isotope thérapeutique de choix qui s'impose de lui-même en substitution à  $^{125}\text{I}$  (émetteur  $\gamma$  et X). S'agissant de deux isotopes de l'iode, aucune différence ne doit être observée ni sur l'efficacité de marquage, ni sur la biodistribution *in vivo* de l'arginine couplée au Bolton-Hunter radioiodé, après métabolisation des liposomes.

L' $^{90}\text{Y}$  et le  $^{177}\text{Lu}$ , sont deux autres radionucléides émetteurs  $\beta^-$  ayant des propriétés de complexation proches de celles de  $^{111}\text{In}$  et qui se substituent classiquement à cet émetteur  $\gamma$  dans des études de RIT. Deux études cliniques de RIT en cours à Nantes utilisent en effet  $^{111}\text{In}$  au cours d'une phase d'imagerie pré-thérapeutique pour évaluer la faisabilité de la RIT au  $^{177}\text{Lu}$  et à  $^{90}\text{Y}$  et réaliser des études de dosimétrie ; respectivement pour un essai clinique dans le cancer du poumon à petites cellules et dans le carcinome colorectal (41,243). Bien d'autres exemples utilisent de la même manière les couples  $^{111}\text{In}/^{177}\text{Lu}$  et  $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}$  avec  $^{111}\text{In}$  utilisé comme outil pré-thérapeutique pour la détection des lésions initiales et dans un but de projection dosimétrique (244–246). Cependant ces études montrent également qu'il faut rester prudent quant à l'extrapolation dosimétrique pour le  $^{177}\text{Lu}$  et  $^{90}\text{Y}$  à partir des résultats obtenus avec  $^{111}\text{In}$ . Il ne s'agit en effet plus du même atome, et parfois, plus non plus du même agent complexant, ce qui peut modifier la biodistribution. Pan *et al.* utilisent par

exemple l'anticorps 7E11 pour cibler le PSMA (antigène membranaire spécifique de la prostate), marqué à  $^{111}\text{In}$  ou au  $^{177}\text{Lu}$  : 7E11-DTPA-In et 7E11-DOTA-Lu. Cette étude a montré que l'accumulation tumorale de l'anticorps marqué à  $^{111}\text{In}$  apparaît être similaire à celle de l'anticorps marqué au  $^{177}\text{Lu}$ , confortant son utilisation comme outil pré-thérapeutique pour prédire la captation tumorale de l'anticorps marqué au  $^{177}\text{Lu}$ . Par contre, une différence d'accumulation dans le foie empêche l'utilisation de l'anticorps marqué à  $^{111}\text{In}$  comme véritable outil de dosimétrie pour la RIT (245). De la même manière une étude réalisée dans le lymphome non hodgkinien avec l'anticorps anti-CD20 ibritumomab-tiuxétan, marqué soit à  $^{111}\text{In}$  soit à  $^{90}\text{Y}$ , montre que  $^{111}\text{In}$  peut prédire la dose absorbée en  $^{90}\text{Y}$  pour la plupart des organes, sauf pour la rate, où la dose absorbée apparaît plus faible que prévue (244). Il semble alors raisonnable de rester prudent sur les chiffres obtenus dans cette étude qui ne restent que des simulations, d'autant plus que la substitution de  $^{111}\text{In}$  par le  $^{177}\text{Lu}$  ou  $^{90}\text{Y}$  nécessiterait également la substitution de l'agent chélatant DTPA par le DOTA, plus favorable pour la stabilité du complexe avec le  $^{177}\text{Lu}$  ou  $^{90}\text{Y}$ .

Les autres limitations à prendre également en compte sont les simplifications de calculs utilisées dans cette étude. La première simplification est de n'avoir considéré que la composante  $\beta$ - de chaque radionucléide sans tenir compte des émissions de photons pour estimer la dose absorbée. Cette simplification est toutefois légitime car la contribution à la dose absorbée due aux rayonnements pénétrants est négligeable dans le cas où les organes sont sources et cibles à la fois. En corolaire, cela induit que l'on néglige la dose absorbée issue des sources situées à proximité de la cible. Cette deuxième simplification repose sur le fait que les émetteurs  $\beta$ - sont caractérisés par de faibles parcours dans la matière. Les parcours moyens de  $^{131}\text{I}$ , du  $^{177}\text{Lu}$  et de  $^{90}\text{Y}$  dans les tissus sont respectivement de 0,4 mm, 0,3 mm et 4,2 mm. A l'échelle tissulaire, cette simplification est tout à fait valide, mis à part éventuellement pour  $^{90}\text{Y}$  qui a un parcours plus élevé.

Par ailleurs notre étude de biodistribution, ne comporte que trois points, et les accumulations maximales ont peut-être lieu plus tôt que celles que nous avons pu observer à 24 h. En effet l'étude de Chang *et al.* montre une activité maximale aux organes sains à 4 h avec des liposomes de formulation comparable aux nôtres et marqués au  $^{188}\text{Re}$  (247).

Si cette étude n'est pas totalement prédictive notamment d'un point de vue quantitatif, elle permet néanmoins d'établir des ordres de grandeur et de se faire une idée globale des doses absorbées obtenues avec de tels radionucléides. Ces résultats paraissent par ailleurs cohérents y6885(t)5.83107(é)-4Lc8(ux )-7ép











calibration (soit 79 MBq/nmol d' $^{125}\text{I}$ ) doit permettre d'atteindre une activité spécifique de Bolton-Hunter (BH) radioiodé de 79 MBq/nmol dans le cas où il est mono-iodé. Dans les conditions de marquage optimales permettant d'encapsuler environ 50 nmol du réactif de BH par  $\mu\text{mol}$  de lipides, il est alors en théorie possible d'atteindre une activité spécifique de 3,9 GBq/ $\mu\text{mol}$  de lipides. Des essais de radiomarquage avec de  $^{131}\text{I}$  ont permis d'obtenir réellement un marquage du BH à 55,5 MBq/nmol, permettant alors en théorie d'obtenir une AS de 2,8 GBq/ $\mu\text{mol}$  de lipides (pour l'encapsulation de 50 nmol de BH) (176). Cette activité spécifique correspond alors cette fois-ci à 140 GBq/nmol de liposomes (environ 215 atomes d' $^{131}\text{I}$  par liposomes) ou encore à environ 420 MBq/nmol d'haptènes, ce qui est alors bien supérieur aux activités spécifiques connues ne dépassant pas les 100 à 150 MBq/nmol d'haptène, en général, pour les études de RIT préciblée. L'activité spécifique de l'haptène  $^{131}\text{I}$ -di-DTPA-In, utilisé dans un essai de phase I de RIT préciblée par l'anticorps hMN14x734, était par exemple comprise entre 40 et 60 MBq/nmol (265).

Le marquage de la phase aqueuse présente également un autre intérêt majeur. En effet, après captation et métabolisation par les organes du SRE, l'arginine couplée au BH, hydrosoluble est rapidement relarguée pour être éliminée au niveau urinaire tandis que les lipides radiomarqués restent accumulés principalement dans le foie et la rate (177). Cette diminution significative de l'activité absorbée dans les organes de catabolisme des liposomes (essentiellement le foie et la rate), est un avantage considérable pour des applications thérapeutiques en réduisant la dose absorbée aux tissus sains.

Les études de biodistribution et les études statistiques ont en effet pu mettre en évidence une différence significative en faveur du marquage interne en comparant les ratios tumeurs/organes obtenus. Sur la base des AUC de 0 à 48 h, les "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%", ont permis, par exemple, d'obtenir des ratios tumeur/rate, tumeur/foie et tumeur/reins respectivement de 0,20, 0,41 et 0,76 pour le marquage externe et de 0,43, 0,90 et 1,59 pour le marquage interne.

De la même manière, les ratios tumeurs/organes calculés lors de l'étude de dosimétrie montrent également des résultats similaires. Par ailleurs, les simulations effectuées avec de  $^{90}\text{Y}$  et du  $^{177}\text{Lu}$  pour le marquage de paroi des liposomes montrent des doses absorbées aux organes sains bien supérieures à celles obtenues pour une simulation du marquage interne par de  $^{131}\text{I}$ . La dose absorbée au foie avec les "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%" est par exemple de 6,30 et 1,74 mGy/MBq pour  $^{90}\text{Y}$  et le  $^{177}\text{Lu}$  (en marquage externe) *versus* 0,18 mGy/MBq pour le marquage interne en  $^{131}\text{I}$ . Ces doses absorbées sont certes, dépendantes des caractéristiques physiques du radionucléide utilisé, mais également de la biodistribution du vecteur, propre à la bicouche lipidique pour le marquage externe ou au compartiment aqueux pour le marquage interne.

### I.3. Caractérisation et choix des liposomes pour le ciblage tumoral

Les études de caractérisation des liposomes ont tout d'abord permis de confirmer l'influence de la pégylation sur l'affinité liposomes/anticorps grâce au BIAcore®, par résonance plasmonique de surface. L'affinité est en effet inversement proportionnelle au degré de pégylation (conditionné à la fois par la densité et la longueur des chaînes de PEG à la surface des liposomes). Cette affinité, caractérisée par la constante apparente de dissociation  $K_D$ , dépend principalement de la constante cinétique d'association  $k_a$ . Cela permet alors d'expliquer la baisse d'affinité principalement due à la gêne stérique induite par les chaînes de PEG, avec une moindre diffusion de l'anticorps vers l'haptène. Le positionnement de l'haptène à l'extrémité des chaînes de PEG permet par ailleurs de contourner ce problème.

Par ailleurs, l'influence de la pégylation sur les demi-vies d'élimination sanguine a également pu être mise en évidence avec une bonne corrélation entre la clairance sanguine et le degré de pégylation des liposomes. Plus les liposomes sont pégylés, et plus la clairance sanguine est ralentie et les demi-vies sanguines allongées.

L'ensemble des résultats obtenus par ces études d'affinité et de pharmacocinétique (présentés dans le *Tableau 34*) ont alors permis de définir les formulations à retenir pour les études de ciblage tumoral.

Formulations	Conventionnels	PEG <sub>1000</sub> 2,5%	PEG <sub>1000</sub> 6,0%	PEG <sub>2000</sub> 1,5%	PEG <sub>2000</sub> 2,5%	PEG <sub>2000</sub> 5,0%	DTPA- PEG <sub>2000</sub> 5,0%
$K_D$ (nM)	25	42	170	67	190	260	6,3
$T_{1/2}$ (h)	1,35	9,2	13,9	8,65	12,6	14,0	12,5

**Tableau 34 :** Résultats des études d'affinité avec l'anticorps bispécifique hMN14x734 ( $K_D$ ) et de pharmacocinétique ( $T_{1/2}$ ) pour chaque formulation

Malgré une très bonne affinité des liposomes conventionnels pour l'anticorps ( $K_D = 25$  nM), la demi-vie sanguine extrêmement courte (1,35 h) n'est pas en faveur d'une bonne accumulation tumorale. Une première étude de biodistribution préalablement réalisée au laboratoire, avait en effet montré un ciblage actif des liposomes "Conventionnels" de seulement  $1,3 \pm 0,5$  % DI/g de tumeur (175,266), servant de référence par rapport aux autres formulations qui sont toutes pégylées.

Afin d'y voir plus clair entre l'importance de l'affinité et des temps de circulation sur l'efficacité du ciblage tumoral, nous avons sélectionné les liposomes pégylés présentant la meilleure affinité, et ceux avec la meilleure demi-vie d'élimination. Parmi les liposomes présentant l'haptène directement sur la bicouche lipidique, le choix s'est alors porté sur les liposomes les moins pégylés ("PEG<sub>1000</sub> 2,5%") avec un  $K_D$  de 42 nM et une demi-vie de seulement 9,2 h et sur les liposomes les plus pégylés ("PEG<sub>2000</sub> 5,0%") avec une demi-vie sanguine de 14,0 h, mais avec cette fois l'affinité la plus faible ( $K_D = 260$  nM). Les biodistributions réalisées en ciblage actif avec ces deux formulations ont permis d'obtenir des ciblage tumoraux de 4,1 et 2,3 % DI/g de tumeur respectivement en <sup>111</sup>In et <sup>125</sup>I pour les "PEG<sub>1000</sub> 2,5%" et de 7,5 et 5,9 % DI/g de tumeur pour les "PEG<sub>2000</sub> 5,0%".

Au vu de ces résultats, il est apparu que les temps de circulation pourraient avoir un rôle plus important que l'affinité sur l'efficacité du ciblage tumoral. Il ne paraissait cependant pas envisageable d'augmenter encore le pourcentage de chaînes de PEG à la surface des liposomes. En effet, une étude précédente de pharmacocinétique avait montré que 8 % de PEG<sub>2000</sub> n'augmentait pas les demi-vies sanguines par rapport à 5 % de PEG<sub>2000</sub> (avec une  $T_{1/2}$  moyenne de 13,6 h vs 14,2 h) (177).

Afin d'optimiser le ciblage tumoral, nous avons alors envisagé de préparer des liposomes dont l'haptène ne serait pas directement greffé sur la bicouche lipidique (via la DSPE-DTPA) mais à l'extrémité des chaînes de PEG (via la DSPE-PEG-DTPA). Avec de tels lipides, il devenait alors théoriquement possible de conserver des temps de circulation relativement longs, grâce à un degré de pégylation élevé, sans entraver l'accessibilité de l'haptène pour l'Ac. L'accessibilité de l'haptène a en effet pu être vérifiée par les études d'affinité au BIAcore® avec un  $K_D$  de 6,3 nM pour l'Ac hMN14x734. Ces nouveaux liposomes "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%", présentaient ainsi la meilleure affinité pour l'Ac par rapport aux autres liposomes pégylés. Leur temps de circulation a également été vérifié par une étude de pharmacocinétique et bien qu'étant inférieure (différence non significative) à la  $T_{1/2}$  des liposomes "PEG<sub>2000</sub> 5,0%", la  $T_{1/2}$  de ces nouveaux liposomes reste tout de même dans les plus élevées, avec 12,5 h en moyenne. Comme nous l'avons précédemment évoqué, cette légère diminution du temps de circulation peut s'expliquer par les charges négatives du complexe DTPA-In, exposées à l'extrémité des chaînes de PEG, diminuant la furtivité des liposomes. Malheureusement, cette dernière formulation n'a pas permis d'améliorer le ciblage tumoral, puisque les taux à la tumeur sont de 7,5 et 5,1 % %DI/g respectivement en <sup>111</sup>In et <sup>125</sup>I, soit équivalents aux "PEG<sub>2000</sub> 5,0%".

## II.CIBLAGE TUMORAL ET BIODISTRIBUTION

### II.1. Choix du système de ciblage

Le principe du ciblage que nous avons choisi est un système de préciblage en deux temps inspiré du système AES, mis au point pour l'optimisation de la RIT des tumeurs solides (31). Ce système consiste en l'injection dans un premier temps d'anticorps bispécifiques anti-Ag/anti-haptène qui vont se fixer sur les Ag tumoraux. Les liposomes porteurs de l'haptène sont injectés dans un deuxième temps pour aller se lier aux Ac prélocalisés sur la tumeur.

Un système de ciblage par Ac en une étape existe avec l'utilisation d'immunoliposomes, largement décrits dans la littérature (79). De nombreux exemples sont notamment rapportés avec des immunoliposomes anti-HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2) (267–269). A l'inverse, très peu de ciblage spécifiques indirects ou en plusieurs étapes ont été décrits. Quelques exemples seulement sont retrouvés avec une étude utilisant un anticorps bispécifique anti-biotine reconnaissant des liposomes biotinylés (270), un système de préciblage en trois étapes reposant sur le système avidine-biotine (271), un système utilisant un anticorps biotinylé et des liposomes porteur de streptavidine (272) ou encore un système reposant sur un anticorps couplé à de la neuravidine et des liposomes biotinylés (273).

Le préciblage en deux temps des liposomes présente différents avantages par rapport aux immunoliposomes. Ce système permet tout d'abord de s'affranchir de la préparation des immunoliposomes qui requiert des étapes et des techniques supplémentaires pour le couplage des anticorps sur les liposomes. Par ailleurs, la préparation et le marquage de ces immunoliposomes peut entraîner une perte d'immunoréactivité des anticorps couplés (79). Enfin, ces immunoliposomes ne sont pas très stables dans le temps et présentent généralement des temps de circulation *in vivo* plus courts que les liposomes simples. Les immunoliposomes sont en effet facilement reconnus par les macrophages via le fragment Fc des anticorps, ce qui a conduit certains auteurs à n'utiliser que des fragments d'Ac (76,77,264). Les immunoliposomes peuvent également conduire à des problèmes d'immunogénicité (274).

Pour toutes ces raisons notre choix s'est alors porté sur un ciblage en deux temps développé au sein du laboratoire, avec un anticorps bispécifique déjà utilisé en clinique (265,275) capable de reconnaître l'Ag ACE exprimé par de nombreuses cellules cancéreuses et l'haptène DTPA-In facilement présenté à la surface des liposomes.

## **II.2. Immunospécificité du ciblage *in vitro* évalué par microscopie et corrélation avec les résultats *in vivo***

La dernière étude de caractérisation *in vitro*, par microscopie de fluorescence, avait pour but d'évaluer l'immunospécificité du système de ciblage en deux temps, ainsi que l'éventuelle internalisation des liposomes dans les cellules. Le choix des liposomes utilisés pour cette étude a alors porté sur les "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%" pour lesquels l'affinité avec l'anticorps était la plus forte. Cette étude met encore une fois en évidence l'importance d'utiliser deux traceurs fluorescents différents pour la bicouche lipidique (DPPE-rhodamine) et pour la phase aqueuse (fluorescéine couplée à l'arginine). En effet, une différence a été observée pour ces deux compartiments, ce qui n'aurait pu être mis en évidence avec le marquage unique de la paroi des liposomes, comme cela est souvent retrouvé dans la littérature. Cette discordance, entre le devenir de la bicouche lipidique et de la phase aqueuse, n'était pas souhaitée puisqu'au niveau tumoral il serait plus avantageux que les liposomes restent intègres. Cependant, toutes ces observations *in vitro* corrélaient parfaitement avec ce qui est observé *in vivo*. En effet, la fuite de la phase aqueuse dans le milieu extracellulaire corréla bien avec la différence de captation tumorale observée lors des études de biodistribution entre l'<sup>111</sup>In et l'<sup>125</sup>I. Les résultats sont toujours plus faibles pour l'<sup>125</sup>I, qui doit être de la même manière que la fluorescéine, relargué dans le milieu extracellulaire, pour ensuite être rapidement éliminé par voie rénale. Les observations *in vitro* permettent ainsi de mieux comprendre les résultats obtenus par la suite *in vivo*.

Le point majeur de ces résultats de microscopie reste cependant l'immunospécificité du ciblage tumoral, obtenue par cette technique en deux temps, avec un ciblage actif deux à trois fois supérieur au ciblage passif. Cela corréla également avec les résultats *in vivo* où le ciblage actif est environ deux fois supérieur au ciblage passif. Pour autant, dans la littérature, les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas toujours prédictifs de ce que l'on peut obtenir *in vivo*. En effet les travaux de Castelli *et al.* travaillant par exemple avec des liposomes fonctionnalisés par de la glutamine, pour cibler des cellules de neuroblastome, montrent de très bons résultats *in vitro* avec un ciblage spécifique, mais *in vivo* il n'y a plus de différence entre le ciblage spécifique ou non spécifique (224). Rangger *et al.* travaillant avec des liposomes fonctionnalisés par le peptide RGD (arginine-glycine-acide aspartique) ou le peptide de la substance P, obtiennent également un ciblage cellulaire *in vitro* spécifique et qui corréla avec le niveau d'expression de la cible. Cependant *in vivo* le ciblage tumoral reste très faible et non clairement visualisé en acquisition SPECT/CT avec des liposomes radiomarqués (229). A l'inverse de ces exemples de la littérature, les résultats que nous avons observés *in vivo* correspondent particulièrement à ce qui a pu être observé *in vitro*, avec notamment l'immunospécificité du ciblage tumoral qui a pu être clairement démontré. Pour terminer sur ces études de microscopie, la très faible et seulement probable internalisation de la bicouche lipidique, peut s'expliquer par le choix de l'antigène ciblé, l'ACE, connu comme non internalisant (230,231). Il est alors envisageable qu'avec

une autre cible connue pour être internalisée, les liposomes le soient aussi, ce qui favoriserait la rétention de la radioactivité. Cette hypothèse n'est cependant pas vraie dans le cas particulier de l'iode, qui après avoir été métabolisé sous forme d'iodo-tyrosine est excrétée à l'extérieur des cellules, alors qu'après internalisation, les métaux restent piégés dans les cellules (22).

### II.3. Ciblage tumoral *in vivo*

Si le ciblage spécifique de liposomes fonctionnalisés est largement décrit *in vitro* par des études de microscopie (224,225,229,237), *in vivo*, la plupart des ciblage spécifiques décrits dans la littérature ne montrent pas de différences significatives par rapport à un ciblage passif. C'est effectivement le cas de Petersen *et al.*, qui dans un modèle de tumeur neuroendocrine, obtiennent un ciblage tumoral de  $5,2 \pm 0,5$  % DI/g avec des liposomes fonctionnalisés par un analogue de la somatostatine (TATE) *versus*  $5,5 \pm 0,3$  % DI/g avec des liposomes témoins (237). De la même manière, aucune différence sur l'accumulation tumorale n'est obtenue pour Gabizon *et al.* qui utilisent des liposomes fonctionnalisés par des folates pour cibler différentes tumeurs sur-exprimant les récepteurs aux folates (276). Dans ce cas particulier, il a pu être montré que malgré une meilleure affinité des liposomes spécifiques pour les cellules tumorales, l'accumulation tumorale n'était pas améliorée, car en contrepartie, ces liposomes fonctionnalisés étaient éliminés plus rapidement par le foie.

Le ciblage des liposomes *in vivo* n'est donc pas simple, et comme il l'a déjà été évoqué, un ciblage spécifique est difficile à mettre en évidence de part leur nature à s'accumuler dans les tumeurs de façon passive grâce à l'effet EPR (70). Une autre étude, utilisant cette fois-ci des immunoliposomes fonctionnalisés par un fragment Fab' ou scFv d'un Ac anti-HER2, montre encore une fois qu'il n'y a pas de différence entre le ciblage actif ou passif. Les taux à la tumeur sont en effet de 7 à 8 % DI/g que ce soit pour des tumeurs exprimant l'Ag HER2 ou non, et avec des immunoliposomes ou des liposomes contrôles (277). Il a cependant pu être mis en évidence dans cette étude, que si le ciblage spécifique ne permettait pas d'augmenter l'accumulation tumorale elle permettait néanmoins d'augmenter l'internalisation des liposomes d'un facteur 6. La conclusion des auteurs est alors que les immunoliposomes ne permettent pas d'augmenter le ciblage tumoral qui est essentiellement obtenu par l'effet EPR, mais qu'en revanche ces immunoliposomes permettent ensuite d'augmenter les interactions avec les cellules. Ces interactions favorisent ainsi les phénomènes d'endocytose et de libération des molécules transportées dans le milieu intracellulaire conduisant pour certains auteurs à une efficacité thérapeutique accrue (79,278). C'est en effet le cas pour l'étude de Mamot *et al.* qui utilise des immunoliposomes ciblant l'EGFR (Epidermal growth factor receptor) pour vectoriser différents agents anticancéreux (278).

En effet, pour de nombreuses molécules et notamment les chimiothérapies, il est important de pouvoir transporter les substances actives jusqu'à l'intérieur des cellules et même jusqu'au noyau où elles joueront leur rôle cytotoxique. Cependant, si la libération des molécules actives dans le milieu intracellulaire est primordiale pour les anticancéreux, cela l'est beaucoup moins pour des liposomes vecteurs de radioactivité. En effet, les radionucléides ne nécessitent pas d'être incorporés dans le milieu intracellulaire pour exercer leur pouvoir ionisant. Les rayonnements  $\beta$ - classiquement utilisés en thérapie, sont en effet capables de délivrer leur énergie sur quelques millimètres pouvant alors atteindre une centaine de cellules. La problématique pourrait cependant se poser pour des émetteurs  $\alpha$  qui ont un parcours dans la matière bien plus faible de l'ordre d'une à trois cellules environ.

Dans notre étude, nous n'avons pas pu clairement montrer l'internalisation de nos liposomes. Il est toutefois intéressant de noter que les phénomènes d'internalisation reportés par Kipportin *et al.* avec l'antigène HER2, ou Mamot *et al.* avec l'antigène EGFR, sont deux cas d'antigènes internalisants, contrairement à l'ACE. Cependant si les liposomes ne sont pas internalisés dans notre modèle, nous avons par contre pu mettre en évidence, à la différence de ce qui est décrit dans la littérature, l'immunospecificité de notre système de ciblage. Une différence significative a en effet pu être observée entre le ciblage passif (CP) et le ciblage actif (CA), que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. La différence significative que nous avons pu mettre en évidence est peut-être liée au système de ciblage en deux étapes, qui montre alors un intérêt supplémentaire. Une comparaison à la littérature montre que Cao *et al.* qui utilisent aussi une technique de préciblage avec un anticorps bispécifique anti-Ag/anti-biotine et des liposomes biotinylés, observent également une différence significative entre le CA et le CP des liposomes, avec des taux à la tumeur respectivement de 3,61 et 0,89 % DI/g à 6 h (270). Pan *et al.* observent également un ciblage spécifique avec une technique de préciblage par un anticorps biotinylé et des liposomes porteur de streptavidine, par contre ils n'observent pas de différence significative entre le ciblage en deux temps et des liposomes directement fonctionnalisés par le même anticorps (272). Enfin à l'inverse, aucune différence significative n'est mise en évidence par Lehtinen *et al.*, entre un CP de liposomes et un CA soit par des immunoliposomes ou via un préciblage (avec un anticorps-neuravidine avant l'injection de liposomes biotinylés) (273). Cependant dans cette dernière étude, l'antigène ciblé est l'EGFR, internalisant, ce qui peut expliquer l'absence de différence significative. Il est en effet très probable que l'anticorps préciblé soit en partie internalisé avant la fixation des liposomes, expliquant alors l'absence d'amélioration par la technique de préciblage. Concernant le CA par les immunoliposomes, ils sont quant à eux certainement éliminés plus rapidement que les liposomes simples ce qui ne permet pas non plus de mettre en évidence une amélioration de l'accumulation tumorale.

L'ensemble de ces études montre alors que le ciblage de liposomes est relativement complexe et que de nombreux paramètres doivent être pris en compte. Notre système en deux temps ciblant un antigène non internalisant semble être alors un système très intéressant pour augmenter le ciblage tumoral *in vivo* par rapport à des liposomes non spécifiques.

## II.4. Considérations pour l'utilisation des liposomes en RIT

Si le ciblage spécifique de nos liposomes a été démontré, il n'est pas le seul élément à prendre en compte pour envisager de les utiliser dans des applications thérapeutiques. En effet, l'objectif à atteindre est effectivement d'obtenir une dose absorbée à la tumeur la plus élevée possible, mais tout en limitant le plus possible celle aux tissus sains.

Les premières conclusions des études de biodistribution favorisaient largement le marquage interne des liposomes, avec des ratios tumeur/organes sains bien plus favorables, par rapport au marquage externe des liposomes. Dans ce sens, la formulation qui semblait être la plus intéressante était les "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%" avec par exemple un ratio tumeur/foie de  $0,90 \pm 0,28$  versus  $0,64 \pm 0,18$  et  $0,49 \pm 0,08$  respectivement pour les "PEG<sub>2000</sub> 5,0%" et les "PEG<sub>1000</sub> 2,5%" ( $p < 0,05$  ; test de Wilcoxon). Cependant, l'exploitation des résultats de biodistribution dans l'étude de dosimétrie ne conduit pas aux mêmes conclusions. En effet, si les doses apportées aux tissus sains, sont bien plus faibles avec le marquage interne, la dose apportée à la tumeur l'est également et apparaît trop faible pour être efficace. L'objectif d'une élimination rapide de la radioactivité dans les tissus sains a pu être atteint grâce au marquage d'une petite molécule hydrophile encapsulée dans les liposomes et rapidement éliminée après leur métabolisation. Malheureusement, comme nous avons pu l'observer également *in vitro*, le contenu des liposomes semble également relargué dans le milieu extracellulaire après interaction des liposomes avec les cellules tumorales. Or, il est certes important de limiter les doses aux tissus sains, mais il faut également être en mesure d'apporter des doses suffisamment importantes à la tumeur pour être efficace. C'est pourquoi, les conclusions des études de dosimétrie tendent plutôt à montrer un intérêt du marquage externe par rapport au marquage interne, et préférentiellement avec la formulation "PEG<sub>2000</sub> 5,0%", qui permet d'atteindre des doses à la tumeur supérieures tout en limitant les doses aux tissus sains. Dans les conditions définies dans le chapitre de dosimétrie, les "PEG<sub>2000</sub> 5,0%" permettraient en théorie d'atteindre des doses de 4,3 et 6,0 Gy respectivement avec de  $^{90}\text{Y}$  et du  $^{177}\text{Lu}$  versus 3,5 et 5,0 Gy pour les "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%". Ces doses restent plus faibles que les doses considérées comme tumoricides en radiothérapie externe, cependant des études de toxicité et d'efficacité mériteraient d'être menées avec les "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%" marqués au niveau de leur bicouche lipidique.

Dans la littérature, plusieurs études sur modèles animaux ont déjà montré une certaine efficacité dans le traitement de tumeurs solides par des liposomes radiomarqués injectés par voie intraveineuse (172–174).

En 2004, Li *et al.* ont par exemple utilisé des liposomes radiomarqués à  $^{90}\text{Y}$  (marquage de surface via le DTPA) dans des modèles murins de mélanome et d'adénocarcinome colique. Ces liposomes étaient fonctionnalisés soit par un agoniste de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  ("AI-lipos") soit par un Ac monoclonal anti EGFR ("Ac-lipos"). L'efficacité thérapeutique des liposomes a pu être démontrée par

l'allongement du temps de croissance des tumeurs. Les temps nécessaire pour multiplier la taille des tumeurs de mélanome par 4 est par exemple passé de 5,5 j pour le groupe non traité à 16,5 j pour le groupe traité par les "AI-lipos-<sup>90</sup>Y" et de 6 à 13 j pour le groupe traité par les "Ac-lipos-<sup>90</sup>Y" (172). A chaque fois, le traitement par liposomes fonctionnalisés marqués à l'<sup>90</sup>Y s'est également avéré plus efficace que le traitement par l'antagoniste de l'intégrine seul, l'anticorps seul, l'anticorps marqué, les "AI-lipos" non marqués ou les liposomes marqués mais non fonctionnalisés.

En 2010, une étude de RIT par des immunoliposomes, anti-HER2, marqués au <sup>213</sup>Bi (émetteur  $\alpha$ ) a été menée dans un modèle murin de carcinome mammaire métastatique par Lingappa *et al.* Ces liposomes sont marqués au niveau de la bicouche lipidique, via l'agent chélatant CHX-A"-DTPA. La dose administrée de 19,2 MBq en IV a été définie comme la dose maximale n'entraînant pas la mort des animaux et une perte de poids maximale de 15 %. Dans cette étude, une efficacité a encore une fois été démontrée par le passage de la survie médiane des animaux de 29 jours (sans traitement) à 38 jours avec les <sup>213</sup>Bi-immunoliposomes. En revanche, aucune différence significative n'a pu être montrée entre les <sup>213</sup>Bi-immunoliposomes et l'anticorps anti-HER2 directement marqué (survie médiane de 39 jours).

La dernière étude, menée par Chang *et al.* en 2010, utilise cette fois-ci des liposomes non immunospécifiques radiomarqués par encapsulation active du <sup>188</sup>Re (émetteur  $\gamma$  à 155 keV et  $\beta^-$  à 2,12 MeV max) contenant également de la doxorubicine, sur un modèle murin de carcinome colorectal. La dose administrée de 22,2 MBq en IV a été définie comme la dose maximale n'entraînant pas la mort des animaux et une perte de poids maximale de 20 %. L'efficacité a pu être démontrée par le passage de la survie médiane de 31 jours pour le groupe non traité, à 38 jours pour le groupe traité par des liposomes contenant de la doxorubicine seule (DXR-lipos), 60 jours pour le groupe traité par les liposomes marqués au <sup>188</sup>Re seul (<sup>188</sup>Re-lipos) et 74 jours pour le groupe traité par les liposomes contenant à la fois l'agent anticancéreux et le <sup>188</sup>Re (<sup>188</sup>Re-DXR-lipos). La survie des animaux est également corrélée à l'inhibition de la croissance tumorale par rapport au groupe non-traité (évalué à 26 jours post-traitement) d'un facteur 0,413 pour le groupe "DXR-lipos", 0,134 pour le groupe "<sup>188</sup>Re-lipos" et 0,048 pour le groupe "<sup>188</sup>Re-DXR-lipos". A 120 jours post-traitement, 2 souris sur 8, du groupe "<sup>188</sup>Re-DXR-lipos" ont été complètement guéries, sans tumeur visible par scintigraphie. Cette étude révèle par ailleurs, l'effet synergique entre la chimiothérapie et la radiothérapie et l'intérêt des liposomes qui est ici de pouvoir véhiculer les deux ensemble.

Ces différents travaux démontrent l'intérêt des liposomes radiomarqués à visée thérapeutique par voie systémique et sont très encourageants sur le potentiel que peut présenter nos liposomes préciblés par un anticorps bispécifique.

## II.5. Voies d'optimisation et perspectives

Au vu des résultats de l'étude de dosimétrie, si les liposomes "PEG<sub>2000</sub> 5,0%" radiomarqués au niveau de la bicouche lipidique semblent être actuellement le meilleur compromis, nous pensons que la meilleure stratégie reste néanmoins l'encapsulation de la radioactivité de façon à limiter au maximum l'exposition des tissus sains. Cependant, l'encapsulation d'une molécule d'arginine couplée au réactif de BH radioiodé ne semble pas être la meilleure option. Une perspective intéressante serait alors d'encapsuler une molécule qui serait toujours rapidement éliminée, après dégradation des liposomes dans le foie et la rate, mais qui serait capable d'être retenue au niveau de la tumeur. Dans ce sens, l'idée d'encapsuler un haptène radiomarqué paraît être une excellente perspective. Ainsi, une fois les liposomes accumulés au sein de la tumeur, même si une libération de leur contenu se produit, l'haptène pourrait être en mesure de se lier aux anticorps bispécifiques, permettant ainsi sa rétention. La dose absorbée à la tumeur serait augmentée et les ratios tumeurs sur organes sains seraient encore améliorés. Cette perspective nécessite cependant d'encapsuler un haptène radiomarqué de façon efficace, ce qui sous-entend une nouvelle mise au point de marquage par encapsulation d'un haptène.

Il serait néanmoins ainsi possible de cumuler les avantages de tous les systèmes avec un temps de circulation suffisamment long de liposomes, capables de s'accumuler dans les tumeurs, mais circulant tout de même moins longtemps qu'un anticorps entier, permettant de limiter l'irradiation à la moelle. La dosimétrie serait également favorisée par les temps de circulation courts de l'haptène, qui serait éliminé rapidement après dégradation des liposomes.

Outre l'encapsulation d'un haptène radiomarqué, d'autres voies d'optimisation sont envisagées pour améliorer le ciblage tumoral et notamment les ratios tumeur sur tissus sains. Un paramètre qu'il serait intéressant de tester serait la quantité finale de lipides injectés (279) et éventuellement la multiplicité des injections de liposomes dans le but de saturer le SRE et limiter la captation de liposomes radioactifs par la rate et le foie. Quelques auteurs ont en effet pensé multiplier les injections de liposomes pour saturer le pool d'opsonines plasmatiques avec une dose importante de lipides avant d'envisager une seconde injection de liposomes qui circuleraient librement. Mais si la clairance plasmatique peut en effet être fortement diminuée lors d'une deuxième injection, elle peut aussi être augmentée pour des intervalles d'injections compris entre 7 et 21 jours par le phénomène ABC (Accelerated Blood Clearance) (280). Il est toutefois envisageable d'injecter une « dose de charge » de liposomes froids non fonctionnalisés en même temps que l'anticorps bispécifique c'est-à-dire 24 h avant l'injection des liposomes radiomarqués.

D'autres voies d'optimisation sont également envisagées concernant le délai d'injection entre l'Ac bispécifique et les liposomes. Il serait en effet intéressant de faire varier ce délai de 0 h (co-injection) à 72 h par exemple afin de déterminer le délai optimal.

L'étude de la variation du rapport molaire Ac/haptène est également une voie à explorer. Différents rapports molaires peuvent en effet être envisagés, par rapport à une quantité fixe d'anticorps, soit en modulant la quantité d'haptènes à la surface des liposomes (0,5-1-3-5%), soit en modulant la quantité de liposomes fonctionnalisés injectés. Le meilleur rapport molaire Ac/haptène, obtenu après avoir optimisé ces différentes variables, sera celui permettant d'obtenir le meilleur rapport entre la captation tumorale et les taux circulants.

Enfin, si l'injection systémique des liposomes ne permet pas de concilier des doses suffisamment importantes à la tumeur et des ratios tumeur/organes favorables, d'autres voies d'injection peuvent être envisagées avec l'injection intra-tumorale ou intra-cavitaire. En 2010, French *et al.* proposent l'utilisation de liposomes radiomarqués par du  $^{186}\text{Re}$  (émetteur  $\beta^-$ , encapsulé sous forme de  $^{186}\text{Re}$ -BMEDA) pour de la radiothérapie interventionnelle dans un modèle de cancer de la langue chez le rat. Après injection intra-tumorale, de très bons résultats ont été observés avec les liposomes radiomarqués induisant une réduction des masses tumorales sans induire de toxicité systémique (203). Les groupes contrôles traités par des liposomes non radiomarqués, du  $^{186}\text{Re}$  libre, ou complexé à l'agent chélatant BMEDA n'ont pas permis d'obtenir de réduction des masses tumorales qui ont au contraire vu leur volume augmenter. L'injection intrapéritonéale de liposomes a également déjà été proposée avec de bons résultats pour le traitement des carcinomes péritonéaux dans le cancer de l'ovaire. Lehtinen *et al.* montrent notamment avec des immunoliposomes ou des liposomes préciblés, une accumulation tumorale accrue et des ratios tumeurs/sang plus élevés par rapport à l'injection intraveineuse (273). Les liposomes constituent une bonne stratégie pour le traitement de micrométastases péritonéales, puisqu'ils sont en effet moins à même de s'extravaser de la cavité abdominale par rapport à un simple anticorps, limitant ainsi les toxicités systémiques. McQuarrie *et al.* proposent également une étude de RIT intrapéritonéale avec un préciblage en deux temps utilisant un anticorps bispécifique anti-Ag/anti-biotine et des liposomes biotinylés marqués à  $^{90}\text{Y}$ . Les résultats montrent alors un ralentissement de la vitesse de croissance tumorale par rapport au groupe contrôle non traité et un confinement de la radioactivité au sein du péritoine (204).

Une autre perspective potentielle pour ces liposomes, serait d'utiliser des « cocktails » de radionucléides différents, ou de radionucléides associés à des molécules de chimiothérapie, afin d'optimiser l'efficacité thérapeutique. Les liposomes ont en effet cet avantage de pouvoir transporter plusieurs molécules différentes. Ils peuvent également être utilisés pour des approches multimodalités avec par exemple l'encapsulation de radionucléides et d'agents de contraste comme le gadolinium pour l'imagerie IRM.

Enfin, une dernière perspective pouvant être proposée pour les liposomes en radioimmunothérapie serait l'encapsulation de radionucléides avec filiation radioactive pour proposer des générateurs *in vivo*. L' $^{225}\text{Ac}$  par exemple, décroît par désintégration  $\alpha$  avec la génération de 3 autres émetteurs alpha fils, conduisant à l'émission de 4 particules alpha. L'importante énergie de recul associée à ces désintégrations peut entraîner la dissociation du complexe formé avec l'agent chélatant. L'encapsulation de tels radionucléides dans des liposomes pourrait alors constituer un réel avantage (208).

## CONCLUSION

---

Les liposomes sont des vecteurs médicamenteux dont les méthodes de préparation ont fait l'objet de nombreux développements et ils représentent à présent une réalité clinique dans plusieurs champs d'application, notamment pour la vectorisation de cytotoxiques en cancérologie. Le domaine que nous avons envisagé dans ce travail de recherche est celui de la radiopharmacie pour une utilisation des liposomes dans le traitement des tumeurs solides par radioimmunothérapie.

L'objectif principal de ce travail est de montrer l'intérêt que peuvent avoir des liposomes radiomarqués pour augmenter l'activité délivrée à la tumeur, grâce à leur activité spécifique élevée, tout en garantissant de bons ratios tumeur/tissus sains. Pour cela, nous avons envisagé le ciblage tumoral de liposomes radiomarqués selon une technique en deux étapes, inspiré du système AES, qui consiste à réaliser un préciblage, par injection préalable d'un anticorps bispécifique reconnaissant à la fois un antigène tumoral et un haptène couplé à la surface des liposomes.

Après avoir préparé et caractérisé différentes formulations de liposomes variant par leur degré de pégylation et la position de l'haptène par rapport aux chaînes de PEG, des études de biodistribution ont été réalisées sur trois formulations afin d'évaluer le ciblage tumoral et les ratios tumeur/tissus sains. Les trois formulations retenues pour cette étude ont été les liposomes les moins pégylés (avec la meilleure affinité pour l'anticorps :  $K_D = 42$  nM,  $T_{1/2} = 9,2$  h), les plus pégylés (avec la meilleure demi-vie plasmatique :  $T_{1/2} = 14,0$  h,  $K_D = 260$  nM) et une dernière formulation où l'haptène est présenté à l'extrémité des chaînes de PEG, ces derniers présentant une affinité encore accrue avec une demi-vie plasmatique relativement longue ( $K_D = 6,3$  nM,  $T_{1/2} = 12,5$  h).

Cette étude a tout d'abord permis de démontrer l'immunospecificité du ciblage de nos liposomes par cette technique en deux temps, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, avec une différence significative entre le ciblage passif et le ciblage actif des liposomes. Par ailleurs, les résultats de ciblage tumoral, bien meilleurs pour les liposomes très pégylés, montrent que le temps de circulation des liposomes semble prévaloir sur leur affinité pour l'anticorps. La dernière formulation ("DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%") alliant à la fois une bonne  $T_{1/2}$  et une excellente affinité pour l'anticorps n'a malheureusement pas permis d'augmenter le ciblage tumoral restant équivalent à celui des "PEG<sub>2000</sub> 5,0%" avec 7,5 % DI/g de tumeur pour le ciblage externe à  $^{111}\text{In}$ . Les études statistiques basées sur la comparaison des AUC de 0 à 48 h, ont cependant montré que si le ciblage tumoral était supérieur avec le marquage de surface des liposomes, le marquage de la phase aqueuse permettait au contraire d'obtenir les meilleurs ratios tumeur sur tissus sains. Dans ce contexte, les liposomes "DTPA-PEG<sub>2000</sub> 5,0%" semblaient statistiquement supérieurs aux "PEG<sub>2000</sub> 5,0%" notamment pour les ratios tumeur/foie. L'étude de dosimétrie a néanmoins mis en évidence, que si le marquage interne permettait en effet d'obtenir de très bons ratios tumeur/tissus sains, la dose délivrée à la tumeur était

plus faible que celle obtenue avec le marquage externe, et qu'elle risquait peut-être d'être trop faible pour permettre une action thérapeutique. En effet, si la petite molécule hydrosoluble radioiodée est rapidement éliminée par voie rénale après métabolisation des liposomes dans les organes sains, elle est également moins retenue au niveau tumoral que les phospholipides marqués à l'<sup>111</sup>In. Une voie d'optimisation proposée pour palier à ce problème serait l'encapsulation d'un haptène radiomarqué dans les liposomes. Cela permettrait en effet, une fois le contenu liposomal relargué, une meilleure rétention de l'activité dans la tumeur, tout en permettant une élimination rapide des tissus sains.

Ces résultats sont très encourageants et ce système de ciblage par des liposomes mérite d'être optimisé afin d'évaluer l'efficacité et la toxicité des liposomes radiomarqués avec des radionucléides d'intérêt pour la RIT des tumeurs solides. Les liposomes représentent en effet un outil thérapeutique intéressant pour l'optimisation de la RIT. Ce système peut en effet être adapté à de nombreux modèles tumoraux et les liposomes offrent la possibilité de transporter divers radionucléides, seuls ou en association. Cette étude expérimentale laisse donc entrevoir un avenir prometteur pour les liposomes radiomarqués et vectorisés par une technique de ciblage en deux temps.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Barbet J, Bardiès M, Bourgeois M, Chatal J-F, Chérel M, Davodeau F, et al. Radiolabeled antibodies for cancer imaging and therapy. *Methods Mol Biol.* 2012;907:681-97.
2. Pouget J-P, Navarro-Teulon I, Bardiès M, Chouin N, Cartron G, Pèlerin A, et al. Clinical radioimmunotherapy—the role of radiobiology. *Nature Reviews Clinical Oncology.* 2011;8(12):720-34.
3. Demaria S, Ng B, Devitt ML, Babb JS, Kawashima N, Liebes L, et al. Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;58(3):862-70.
4. Chatal JF, Hoefnagel CA. Radionuclide therapy. *Lancet.* 1999;354(9182):931-5.
5. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. *J Immunol.* 2005;174(5):2453-5.
6. Koprowski H, Steplewski Z, Herlyn D, Herlyn M. Study of antibodies against human melanoma produced by somatic cell hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978;75(7):3405-9.
7. Herlyn M, Steplewski Z, Herlyn D, Koprowski H. Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76(3):1438-42.
8. Press OW, Leonard JP, Coiffier B, Levy R, Timmerman J. Immunotherapy of Non-Hodgkin's lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2001;221-40.
9. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001;344(11):783-92.
10. ChamCarthy MR, Williams SC, Moadel RM. Radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma: from the «magic bullets» to «radioactive magic bullets». *Yale J Biol Med.* 2011;84(4):391-407.
11. Kraeber-Bodéré F, Bodet-Milin C, Rousseau C, Eugène T, Pallardy A, Frampas E, et al. Radioimmunoconjugates for the treatment of cancer. *Semin Oncol.* 2014;41(5):613-22.
12. Jain RK, Baxter LT. Mechanisms of heterogeneous distribution of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors: significance of elevated interstitial pressure. *Cancer Res.* 1988;48(24 Pt 1):7022-32.
13. Goldsby R, Kindt C, Osborne B. *Immunologie: Le Cours de Janis Kuby avec questions de révision.* Paris: Dunod; 2001. 660 p.
14. Little M, Kipriyanov SM, Le Gall F, Moldenhauer G. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Immunol Today.* 2000;21(8):364-70.
15. Watier ppp lyon 2013 [Internet]. 22:04:36 UTC. Disponible sur: <http://fr.slideshare.net/GroupeIMT/watier-ppp-lyon-2013>
16. Sharkey RM, Goldenberg DM. Perspectives on cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies. *J Nucl Med.* 2005;46 Suppl 1:115S - 27S.
17. Goldenberg DM, Chang C-H, Rossi EA, J W, McBride, Sharkey RM. Pretargeted Molecular Imaging and Radioimmunotherapy. *Theranostics.* 2012;2(5):523-40.

18. Sharkey RM, Rossi EA, McBride WJ, Chang C-H, Goldenberg DM. Recombinant Bispecific Monoclonal Antibodies Prepared by the Dock-and-Lock Strategy for Pretargeted Radioimmunotherapy. *Semin Nucl Med.* 2010;40(3):190-203.
19. Wittrup KD, Thurber GM, Schmidt MM, Rhoden JJ. Practical theoretic guidance for the design of tumor-targeting agents. *Meth Enzymol.* 2012;503:255-68.
20. Stein R, Blumenthal R, Sharkey RM, Goldenberg DM. Comparative biodistribution and radioimmunotherapy of monoclonal antibody RS7 and its F(ab')<sub>2</sub> in nude mice bearing human tumor xenografts. *Cancer.* 1994;73(3 Suppl):816-23.
21. Fujimori K, Covell DG, Fletcher JE, Weinstein JN. A modeling analysis of monoclonal antibody percolation through tumors: a binding-site barrier. *J Nucl Med.* 1990;31(7):1191-8.
22. Kraeber-Bodéré F, Rousseau C, Bodet-Milin C, Mathieu C, Guérard F, Frampas E, et al. Tumor Immunotargeting Using Innovative Radionuclides. *International Journal of Molecular Sciences.* 2015;16(2):3932-54.
23. Brechbiel MW. Bifunctional chelates for metal nuclides. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2008;52(2):166-73.
24. Larson SM, Carrasquillo JA, Cheung N-KV, Press OW. Radioimmunotherapy of human tumours. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(6):347-60.
25. Kaminski MS, Zelenetz AD, Press OW, Saleh M, Leonard J, Fehrenbacher L, et al. Pivotal study of iodine I 131 tositumomab for chemotherapy-refractory low-grade or transformed low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol.* 2001;19(19):3918-28.
26. Witzig TE, Flinn IW, Gordon LI, Emmanouilides C, Czuczman MS, Saleh MN, et al. Treatment with ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy in patients with rituximab-refractory follicular non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2002;20(15):3262-9.
27. Gopal AK, Gooley TA, Maloney DG, Petersdorf SH, Eary JF, Rajendran JG, et al. High-dose radioimmunotherapy versus conventional high-dose therapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation for relapsed follicular non-Hodgkin lymphoma: a multivariable cohort analysis. *Blood.* 2003;102(7):2351-7.
28. Shimoni A, Avivi I, Rowe JM, Yeshurun M, Levi I, Or R, et al. A randomized study comparing yttrium-90 ibritumomab tiuxetan (Zevalin) and high-dose BEAM chemotherapy versus BEAM alone as the conditioning regimen before autologous stem cell transplantation in patients with aggressive lymphoma. *Cancer.* 2012;118(19):4706-14.
29. Liersch T, Meller J, Kulle B, Behr TM, Markus P, Langer C, et al. Phase II trial of carcinoembryonic antigen radioimmunotherapy with <sup>131</sup>I-labetuzumab after salvage resection of colorectal metastases in the liver: five-year safety and efficacy results. *J Clin Oncol.* 2005;23(27):6763-70.
30. Ocean AJ, Pennington KL, Guarino MJ, Sheikh A, Bekaii-Saab T, Serafini AN, et al. Fractionated radioimmunotherapy with (90)Y-clivatuzumab tetraxetan and low-dose gemcitabine is active in advanced pancreatic cancer: A phase I trial. *Cancer.* 2012;118(22):5497-506.
31. Barbet J, Kraeber-Bodéré F, Vuillez JP, Gautherot E, Rouvier E, Chatal JF. Pretargeting with the affinity enhancement system for radioimmunotherapy. *Cancer Biother Radiopharm.* 1999;14(3):153-66.

32. Breitz HB, Weiden PL, Beaumier PL, Axworthy DB, Seiler C, Su FM, et al. Clinical optimization of pretargeted radioimmunotherapy with antibody-streptavidin conjugate and 90Y-DOTA-biotin. *J Nucl Med.* 2000;41(1):131-40.
33. Barbet J, Kraeber-Bodéré F, Faivre-Chauvet A, Gestin J-F, Bardiès M, Campion L, et al. La radio-immunothérapie préciblée des tumeurs solides : une démarche pluridisciplinaire. *Médecine Nucléaire.* 2007;31(9):498-505.
34. Doussal J-ML, Gruaz-Guyon A, Martin M, Gautherot E, Delaage M, Barbet J. Targeting of Indium 111-labeled Bivalent Hapten to Human Melanoma Mediated by Bispecific Monoclonal Antibody Conjugates: Imaging of Tumors Hosted in Nude Mice. *Cancer Res.* 1990;50(11):3445-52.
35. Vuillez JP, Moro D, Brichon PY, Rouvier E, Brambilla E, Barbet J, et al. Two-step immunoscintigraphy for non-small-cell lung cancer staging using a bispecific anti-CEA/anti-indium-DTPA antibody and an indium-111-labeled DTPA dimer. *J Nucl Med.* 1997;38(4):507-11.
36. Peltier P, Curtet C, Chatal JF, Le Doussal JM, Daniel G, Aillet G, et al. Radioimmunodetection of medullary thyroid cancer using a bispecific anti-CEA/anti-indium-DTPA antibody and an indium-111-labeled DTPA dimer. *J Nucl Med.* 1993;34(8):1267-73.
37. Vuillez JP, Kraeber-Bodéré F, Moro D, Bardiès M, Douillard JY, Gautherot E, et al. Radioimmunotherapy of small cell lung carcinoma with the two-step method using a bispecific anti-carcinoembryonic antigen/anti-diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA) antibody and iodine-131 Di-DTPA hapten: results of a phase I/II trial. *Clin Cancer Res.* 1999;5(10 Suppl):3259s - 3267s.
38. Salaun P-Y, Campion L, Bournaud C, Faivre-Chauvet A, Vuillez J-P, Taieb D, et al. Phase II trial of anticarcinoembryonic antigen pretargeted radioimmunotherapy in progressive metastatic medullary thyroid carcinoma: biomarker response and survival improvement. *J Nucl Med.* 2012;53(8):1185-92.
39. Schoffelen R, Boerman OC, Goldenberg DM, Sharkey RM, van Herpen CML, Franssen GM, et al. Development of an imaging-guided CEA-pretargeted radionuclide treatment of advanced colorectal cancer: first clinical results. *Br J Cancer.* 2013;109(4):934-42.
40. TF2- Small Cell Lung Cancer Radio Immunotherapy [Internet]. Disponible sur: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01221675?term=bod%C3%A9r%C3%A9&rank=6>
41. Pretargeted Radioimmunotherapy in Metastatic Colorectal Cancer : A Multicentric Phase I/II Study of Fractionated TF2 Plus 90Y-IMP288 (RITCOLON) [Internet]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02300922?term=Tf2&rank=6>
42. Frampas E, Maurel C, Remaud-Le Saëc P, Mauxion T, Faivre-Chauvet A, Davodeau F, et al. Pretargeted radioimmunotherapy of colorectal cancer metastases: models and pharmacokinetics predict influence of the physical and radiochemical properties of the radionuclide. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging.* 2011;38(12):2153-64.
43. Schoffelen R, Graaf WTA van der, Franssen G, Sharkey RM, Goldenberg DM, McBride WJ, et al. Pretargeted 177Lu Radioimmunotherapy of Carcinoembryonic Antigen-Expressing Human Colonic Tumors in Mice. *J Nucl Med.* 2010;51(11):1780-7.

44. Bangham AD, Horne RW. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology*. 1964;8(5):660-IN10.
45. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol*. 1965;13(1):238-52.
46. Lorin A, Flore C, Thomas A, Brasseur R. Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*. 8(3):163-76.
47. Gregoriadis G. The carrier potential of liposomes in biology and medicine (first of two parts). *N Engl J Med*. 1976;295(13):704-10.
48. Reza Mozafari M, Johnson C, Hatziantoniou S, Demetzos C. Nanoliposomes and Their Applications in Food Nanotechnology. *Journal of Liposome Research*. 2008;18(4):309-27.
49. Barani H, Montazer M. A review on applications of liposomes in textile processing. *J Liposome Res*. 2008;18(3):249-62.
50. Elizondo E, Moreno E, Cabrera I, Córdoba A, Sala S, Veciana J, et al. Liposomes and other vesicular systems: structural characteristics, methods of preparation, and use in nanomedicine. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2011;104:1-52.
51. Mougin-Degraef M, Faivre-Chauvet A, Université de Nantes. Unité de Formation et de Recherche de Sciences Pharmaceutiques. Les liposomes : aspects technologiques et pharmaceutiques. Radiomarquage des liposomes pour le ciblage en radioimmunothérapie. Nantes; 2004.
52. Vemuri S, Rhodes C. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 1995;70(2):95-111.
53. Fattal E, Couvreur P, Puiseux F. Méthodes de préparation des liposomes. Les liposomes, aspects technologiques biologiques et pharmacologiques. Les éditions INSERM. 1993. p. 43-62.
54. Lasic DD. The mechanism of vesicle formation. *Biochem J*. 1988;256(1):1-11.
55. Szoka F Jr, Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978;75(9):4194-8.
56. Gregoriadis G, Davis C. Stability of liposomes *in vivo* and *in vitro* is promoted by their cholesterol content and the presence of blood cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1979;89(4):1287-93.
57. Lesoin L. Formation de liposomes par un procédé innovant utilisant les fluides supercritiques [Internet]. Aix Marseille 3; 2011. Disponible sur: <http://www.theses.fr/2011AIX30005>
58. Maruyama K, Yuda T, Okamoto A, Kojima S, Suginaka A, Iwatsuru M. Prolonged circulation time *in vivo* of large unilamellar liposomes composed of distearoyl phosphatidylcholine and cholesterol containing amphipathic poly(ethylene glycol). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*. 1992;1128(1):44-9.
59. Carrion C, Domingo JC, de Madariaga MA. Preparation of long-circulating immunoliposomes using PEG-cholesterol conjugates: effect of the spacer arm between PEG and cholesterol on liposomal characteristics. *Chem Phys Lipids*. 2001;113(1-2):97-110.

60. Milla P, Dosio F, Cattel L. PEGylation of proteins and liposomes: a powerful and flexible strategy to improve the drug delivery. *Curr Drug Metab.* janv 2012;13(1):105-19.
61. Harris JM, Martin NE, Modi M. Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.* 2001;40(7):539-51.
62. Woodle MC. Liposomes with enhanced circulation time [Internet]. 1991. Disponible sur: <http://www.google.com/patents/US5013556>
63. Woodle MC. Sterically stabilized liposome therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 1995;16(2-3):249-65.
64. Liu D, Mori A, Huang L. Large liposomes containing ganglioside GM1 accumulate effectively in spleen. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1066(2):159-65.
65. Juliano RL, Stamp D. The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1975;63(3):651-8.
66. Immordino ML, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine.* 2006;1(3):297-315.
67. Allen TM, Hansen C, Martin F, Redemann C, Yau-Young A. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1066(1):29-36.
68. Delattre J. Liposomes et barrières endothéliales. Les liposomes, aspects technologiques biologiques et pharmacologiques. Les éditions INSERM. 1993. p. 167-78.
69. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 1986;46(12 Pt 1):6387-92.
70. Maeda H, Bharate GY, Daruwalla J. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;71(3):409-19.
71. Davis ME, Chen ZG, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(9):771-82.
72. Koning GA, Morselt HW, Velinova MJ, Donga J, Gorter A, Allen TM, et al. Selective transfer of a lipophilic prodrug of 5-fluorodeoxyuridine from immunoliposomes to colon cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1420(1-2):153-67.
73. Kamps JA, Scherphof GL. Liposomes in biological systems. *Liposomes : a practical approach.* 2003.
74. Kaneda Y. Virosome: a novel vector to enable multi-modal strategies for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(8):730-8.
75. Kirpotin D, Park JW, Hong K, Zalipsky S, Li W-L, Carter P, et al. Sterically Stabilized Anti-HER2 Immunoliposomes: Design and Targeting to Human Breast Cancer Cells in Vitro†. *Biochemistry.* 1997;36(1):66-75.

76. Cheng W, Allen T. The use of single chain Fv as targeting agents for immunoliposomes: an update on immunoliposomal drugs for cancer treatment. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2010;7(4):461-78.
77. Maruyama K, Takahashi N, Tagawa T, Nagaike K, Iwatsuru M. Immunoliposomes bearing polyethyleneglycol-coupled Fab' fragment show prolonged circulation time and high extravasation into targeted solid tumors in vivo. *FEBS Letters*. 1997;413(1):177-80.
78. Rangger C, Helbok A, von Guggenberg E, Sosabowski J, Radolf T, Prassl R, et al. Influence of PEGylation and RGD loading on the targeting properties of radiolabeled liposomal nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:5889-900.
79. Sofou S, Sgouros G. Antibody-targeted liposomes in cancer therapy and imaging. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2008;5(2):189-204.
80. Kremer JM, Esker MW, Pathmamanoharan C, Wiersema PH. Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. *Biochemistry*. 1977;16(17):3932-5.
81. Deamer D, Bangham AD. Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochim Biophys Acta*. 1976;443(3):629-34.
82. Meure LA, Foster NR, Dehghani F. Conventional and Dense Gas Techniques for the Production of Liposomes: A Review. *AAPS PharmSciTech*. 2008;9(3):798-809.
83. Woodbury DJ, Richardson ES, Grigg AW, Welling RD, Knudson BH. Reducing liposome size with ultrasound: bimodal size distributions. *J Liposome Res*. 2006;16(1):57-80.
84. Hope MJ, Bally MB, Webb G, Cullis PR. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure: characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim Biophys Acta*. 1985;812(1):55-65.
85. Talsma H, Özer AY, Bloois L van, Crommelin DJA. The Size Reduction of Liposomes with a High Pressure Homogenizer (Microfluidizer™). Characterization of Prepared Dispersions and Comparison with Conventional Methods. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1989;15(2):197-207.
86. Kirby C, Gregoriadis G. Dehydration-Rehydration Vesicles: A Simple Method for High Yield Drug Entrapment in Liposomes. *Nature Biotechnology*. 1984;2(11):979-84.
87. Mayer LD, Bally MB, Hope MJ, Cullis PR. Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes. *Chem Phys Lipids*. 1986;40(2-4):333-45.
88. Mozafari MR. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cell Mol Biol Lett*. 2005;10(4):711-9.
89. Li C, Deng Y. A novel method for the preparation of liposomes: freeze drying of monophasic solutions. *J Pharm Sci*. 2004;93(6):1403-14.
90. Jahn A, Vreeland WN, DeVoe DL, Locascio LE, Gaitan M. Microfluidic directed formation of liposomes of controlled size. *Langmuir*. 2007;23(11):6289-93.
91. Mozafari MR, Reed CJ, Rostron C, Kocum C, Piskin E. Construction of stable anionic liposome-plasmid particles using the heating method: a preliminary investigation. *Cell Mol Biol Lett*. 2002;7(3):923-7.

92. Castor TP. Methods and apparatus for making liposomes [Internet]. 5554382, 1996. Disponible sur: <http://www.google.com/patents/US5554382>
93. Castor TP, Chu L. Methods and apparatus for making liposomes containing hydrophobic drugs [Internet]. 5776486, 1998 . Disponible sur: <http://www.google.com/patents/US5776486>
94. Frederiksen L, Anton K, van Hoogevest P, Keller HR, Leuenberger H. Preparation of liposomes encapsulating water-soluble compounds using supercritical carbon dioxide. *J Pharm Sci.* 1997;86(8):921-8.
95. Otake K, Imura T, Sakai H, Abe M. Development of a New Preparation Method of Liposomes Using Supercritical Carbon Dioxide. *Langmuir.* 2001;17(13):3898-901.
96. Otake K, Shimomura T, Goto T, Imura T, Furuya T, Yoda S, et al. Preparation of Liposomes Using an Improved Supercritical Reverse Phase Evaporation Method. *Langmuir.* 2006;22(6):2543-50.
97. Wen Z, Liu B, Zheng Z, You X, Pu Y, Li Q. Preparation of liposomes entrapping essential oil from *Atractylodes macrocephala* Koidz by modified RESS technique. *Chemical Engineering Research and Design.* 2010;88(8):1102-7.
98. Magnan C, Badens E, Commenges N, Charbit G. Soy lecithin micronization by precipitation with a compressed fluid antisolvent — influence of process parameters. *The Journal of Supercritical Fluids.* 2000;19(1):69-77.
99. Badens E, Magnan C, Charbit G. Microparticles of soy lecithin formed by supercritical processes. *Biotechnol Bioeng.* 2001;72(2):194-204.
100. Naik S, Patel D, Surti N, Misra A. Preparation of PEGylated liposomes of docetaxel using supercritical fluid technology. *The Journal of Supercritical Fluids.* 2010;54(1):110-9.
101. Kunastitchai S, Pichert L, Sarisuta N, Müller BW. Application of aerosol solvent extraction system (ASES) process for preparation of liposomes in a dry and reconstitutable form. *Int J Pharm.* 2006;316(1-2):93-101.
102. Kadimi US, Balasubramanian DR, Ganni UR, Balaraman M, Govindarajulu V. In vitro studies on liposomal amphotericin B obtained by supercritical carbon dioxide-mediated process. *Nanomedicine.* 2007;3(4):273-80.
103. ClinicalTrials.gov [Internet]. Disponible sur: <http://clinicaltrials.gov/ct2/results/details?term=liposome>
104. Chang H-I, Yeh M-K. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:49-60.
105. Rahman AM, Yusuf SW, Ewer MS. Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. *Int J Nanomedicine.* 2007;2(4):567-83.
106. Barenholz Y (Chezy). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release.* 2012;160(2):117-34.
107. DOXIL® (doxorubicin HCl liposome injection) - Product Information [Internet]. 2012. Disponible sur: [http://www.doxil.com/assets/DOXIL\\_PI\\_Booklet.pdf](http://www.doxil.com/assets/DOXIL_PI_Booklet.pdf)

108. CAELYX 2MG/ML SUSP INJ FL 10ML - Monographie Spécialité [Internet]. 2008. Disponible sur: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=10439>
109. Barenholz Y (Chezy), Haran G. Method of amphiphatic drug loading in liposomes by ammonium ion gradient [Internet]. 1994 . Disponible sur: <http://www.google.com/patents/US5316771>
110. MYOCET 50MG PDR INJ FL - Monographie Spécialité [Internet]. 2012. Disponible sur: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=14168>
111. Gardikis K, Tsimplouli C, Dimas K, Micha-Screttas M, Demetzos C. New chimeric advanced Drug Delivery nano Systems (chi-aDDnSs) as doxorubicin carriers. *Int J Pharm.* 2010;402(1-2):231-7.
112. Myocet, INN-doxorubicine - EMEA 2005 RAPPORT SCIENTIFIC [Internet]. 2005. Disponible sur: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Scientific\\_Discussion/human/000297/WC500031808.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000297/WC500031808.pdf)
113. Fenske DB, Maurer N, Cullis PR. Encapsulation of drugs within large unilamellar vesicles. *Liposomes : a practical approach.* 2003.
114. Harris L, Batist G, Belt R, Rovira D, Navari R, Azarnia N, et al. Liposome-encapsulated doxorubicin compared with conventional doxorubicin in a randomized multicenter trial as first-line therapy of metastatic breast carcinoma. *Cancer.* 2002;94(1):25-36.
115. O'Brien MER, Wigler N, Inbar M, Rosso R, Grischke E, Santoro A, et al. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann Oncol.* 2004;15(3):440-9.
116. ClinicalTrials.gov. Phase 3 Study of ThermoDox With Radiofrequency Ablation (RFA) in Treatment of Hepatocellular Carcinoma (HCC) [Internet]. Disponible sur: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00617981?term=thermodox&rank=4>
117. May JP, Li S-D. Hyperthermia-induced drug targeting. *Expert Opin Drug Deliv.* 2013;
118. DAUNOXOME 2MG/ML LIPOSOME INJ 50ML - Monographie Spécialité [Internet]. Disponible sur: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=9965>
119. DaunoXome® (daunorubicin citrate liposome injection) [Internet]. Disponible sur: <http://www.drugs.com/pro/daunoxome.html>
120. Forssen EA. Multiple step entrapment/loading procedure for preparing lipophilic drug ... [Internet]. 4946683, 1990. Disponible sur: <http://www.google.com/patents/US4946683>
121. Latagliata R, Breccia M, Fazi P, Iacobelli S, Martinelli G, Di Raimondo F, et al. Liposomal daunorubicin versus standard daunorubicin: long term follow-up of the GIMEMA GSI 103 AMLE randomized trial in patients older than 60 years with acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 2008;143(5):681-9.
122. DEPOCYTE 50MG/5ML SUSP INJ FL - Monographie Spécialité [Internet]. Disponible sur: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=16964>
123. DEPOCYT (cytarabine injection, lipid complex) - Prescribing Information [Internet]. Disponible sur: <http://www.depocyt.com/pdf/2011-09-14-DepoCyt-PI-clean.pdf>

124. Angst MS, Drover DR. Pharmacology of drugs formulated with DepoFoam: a sustained release drug delivery system for parenteral administration using multivesicular liposome technology. *Clin Pharmacokinet.* 2006;45(12):1153-76.
125. Phuphanich S, Maria B, Braeckman R, Chamberlain M. A pharmacokinetic study of intra-CSF administered encapsulated cytarabine (DepoCyt) for the treatment of neoplastic meningitis in patients with leukemia, lymphoma, or solid tumors as part of a phase III study. *J Neurooncol.* 2007;81(2):201-8.
126. Glantz MJ, LaFollette S, Jaeckle KA, Shapiro W, Swinnen L, Rozental JR, et al. Randomized trial of a slow-release versus a standard formulation of cytarabine for the intrathecal treatment of lymphomatous meningitis. *J Clin Oncol.* 1999;17(10):3110-6.
127. Glantz MJ, Jaeckle KA, Chamberlain MC, Phuphanich S, Recht L, Swinnen LJ, et al. A randomized controlled trial comparing intrathecal sustained-release cytarabine (DepoCyt) to intrathecal methotrexate in patients with neoplastic meningitis from solid tumors. *Clin Cancer Res.* 1999;5(11):3394-402.
128. Marqibo® (vincristine sulfate liposomes injection) for the treatment of advanced relapsed and/or refractory philadelphia chromosome negative (Ph-) adult acute lymphoblastic leukemia – Sponsor briefing document – FDA oncologic drugs advisory committee meeting [Internet]. 2012. Disponible sur: <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/OncologicDrugsAdvisoryCommittee/UCM296424.pdf>
129. Talon Therapeutics, Marqibo [Internet]. Disponible sur: <http://www.talontx.com/pipeline.php?divid=marqibo>
130. Webb MS, Harasym TO, Masin D, Bally MB, Mayer LD. Sphingomyelin-cholesterol liposomes significantly enhance the pharmacokinetic and therapeutic properties of vincristine in murine and human tumour models. *Br J Cancer.* 1995;72(4):896-904.
131. Gelmon KA, Tolcher A, Diab AR, Bally MB, Embree L, Hudon N, et al. Phase I study of liposomal vincristine. *J Clin Oncol.* 1999;17(2):697-705.
132. Thomas DA, Sarris AH, Cortes J, Faderl S, O'Brien S, Giles FJ, et al. Phase II study of sphingosomal vincristine in patients with recurrent or refractory adult acute lymphocytic leukemia. *Cancer.* 2006;106(1):120-7.
133. Thomas DA, Kantarjian HM, Stock W, Heffner LT, Faderl S, Garcia-Manero G, et al. Phase 1 multicenter study of vincristine sulfate liposomes injection and dexamethasone in adults with relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia. *Cancer.* 2009;115(23):5490-8.
134. A Phase 3 Study to Evaluate Marqibo® in the Treatment of Subjects  $\geq$  60 Years Old With Newly Diagnosed ALL [Internet]. Disponible sur: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01439347?term=HALLMARQ&rank=1>
135. Fetterly GJ, Grasela TH, Sherman JW, Dul JL, Grahn A, Lecomte D, et al. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling and Simulation of Neutropenia during Phase I Development of Liposome-Entrapped Paclitaxel. *Clin Cancer Res.* 2008;14(18):5856-63.
136. Boulikas T. Clinical overview on Lipoplatin: a successful liposomal formulation of cisplatin. *Expert Opin Investig Drugs.* 2009;18(8):1197-218.

137. Stathopoulos GP, Boulikas T. Lipoplatin formulation review article. *J Drug Deliv.* 2012;2012:581363.
138. AmBisome (amphotericin B) liposome for injection - Prescribing Information [Internet]. Disponible sur: <http://www.astellas.us/docs/ambisome.pdf>
139. AMBISOME 50MG PDR INJ FL 15ML - Monographie Spécialité [Internet]. Disponible sur: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=15490>
140. Deroure B, Charpentier B, Saliba F, Dürrbach A. Néphrotoxicité de l'amphotéricine B : mise au point. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology.* 2006;16(2):82-6.
141. Proffitt RT, Adler-Moore J, Chiang S-M. Brevet US6770290 - Amphotericin B liposome preparation. 6770290.
142. Johnson PC, Wheat LJ, Cloud GA, Goldman M, Lancaster D, Bamberger DM, et al. Safety and efficacy of liposomal amphotericin B compared with conventional amphotericin B for induction therapy of histoplasmosis in patients with AIDS. *Ann Intern Med.* 2002;137(2):105-9.
143. Hamill RJ, Sobel JD, El-Sadr W, Johnson PC, Graybill JR, Javaly K, et al. Comparison of 2 doses of liposomal amphotericin B and conventional amphotericin B deoxycholate for treatment of AIDS-associated acute cryptococcal meningitis: a randomized, double-blind clinical trial of efficacy and safety. *Clin Infect Dis.* 2010;51(2):225-32.
144. Usonis V, Bakasėnas V, Valentelis R, Katiliene G, Vidzeniene D, Herzog C. Antibody titres after primary and booster vaccination of infants and young children with a virosomal hepatitis A vaccine (Epaxal). *Vaccine.* 2003;21(31):4588-92.
145. Glück R, Mischler R, Brantschen S, Just M, Althaus B, Cryz SJ. Immunopotentiating reconstituted influenza virus virosome vaccine delivery system for immunization against hepatitis A. *J Clin Invest.* 1992;90(6):2491-5.
146. Epaxal - Virosomal hepatitis A vaccine - Product Monograph [Internet]. Disponible sur: [http://www.baxter.at/downloads/aerzte\\_und\\_patienten/infomaterial/baxter\\_vaccines\\_epaxal\\_product\\_monograph.pdf](http://www.baxter.at/downloads/aerzte_und_patienten/infomaterial/baxter_vaccines_epaxal_product_monograph.pdf)
147. Herzog C, Hartmann K, Künzi V, Kürsteiner O, Mischler R, Lazar H, et al. Eleven years of Inflexal V-a virosomal adjuvanted influenza vaccine. *Vaccine.* 2009;27(33):4381-7.
148. Mischler R, Metcalfe IC. Inflexal V a trivalent virosome subunit influenza vaccine: production. *Vaccine.* 2002;20 Suppl 5:B17-23.
149. Kanra G, Marchisio P, Feiterna-Sperling C, Gaedicke G, Lazar H, Durrer P, et al. Comparison of immunogenicity and tolerability of a virosome-adjuvanted and a split influenza vaccine in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2004;23(4):300-6.
150. Vandepapelière P, Horsmans Y, Moris P, Van Mechelen M, Janssens M, Koutsoukos M, et al. Vaccine adjuvant systems containing monophosphoryl lipid A and QS21 induce strong and persistent humoral and T cell responses against hepatitis B surface antigen in healthy adult volunteers. *Vaccine.* 2008;26(10):1375-86.
151. Lell B, Agnandji S, von Glasenapp I, Haertle S, Oyakhiromen S, Issifou S, et al. A randomized trial assessing the safety and immunogenicity of AS01 and AS02 adjuvanted RTS,S malaria vaccine candidates in children in Gabon. *PLoS ONE.* 2009;4(10):e7611.

152. Zollinger WD, Babcock JG, Moran EE, Brandt BL, Matyas GR, Wassef NM, et al. Phase I study of a *Neisseria meningitidis* liposomal vaccine containing purified outer membrane proteins and detoxified lipooligosaccharide. *Vaccine*. 2012;30(4):712-21.
153. Sangha R, North S. L-BLP25: a MUC1-targeted peptide vaccine therapy in prostate cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2007;7(11):1723-30.
154. Butts C, Maksymiuk A, Goss G, Soulières D, Marshall E, Cormier Y, et al. Updated survival analysis in patients with stage IIIB or IV non-small-cell lung cancer receiving BLP25 liposome vaccine (L-BLP25): phase IIB randomized, multicenter, open-label trial. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011;137(9):1337-42.
155. Carvalho B, Roland LM, Chu LF, Campitelli VA 3rd, Riley ET. Single-dose, extended-release epidural morphine (DepoDur) compared to conventional epidural morphine for post-cesarean pain. *Anesth Analg*. 2007;105(1):176-83.
156. Gambling D, Hughes T, Martin G, Horton W, Manvelian G. A comparison of Depodur, a novel, single-dose extended-release epidural morphine, with standard epidural morphine for pain relief after lower abdominal surgery. *Anesth Analg*. 2005;100(4):1065-74.
157. EXPAREL - Prescribing Information [Internet]. Disponible sur: [http://www.exparel.com/pdf/EXPAREL\\_Prescribing\\_Information.pdf](http://www.exparel.com/pdf/EXPAREL_Prescribing_Information.pdf)
158. VISUDYNE 15MG PDR INJ FL - Monographie Spécialité [Internet]. Disponible sur: <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=12634>
159. Bressler NM. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: two-year results of 2 randomized clinical trials-tap report 2. *Arch Ophthalmol*. 2001;119(2):198-207.
160. Chowdhary RK, Shariff I, Dolphin D. Drug release characteristics of lipid based benzoporphyrin derivative. *J Pharm Pharm Sci*. avr 2003;6(1):13-9.
161. Scott LJ, Goa KL. Verteporfin. *Drugs Aging*. févr 2000;16(2):139-46; discussion 147-8.
162. Jensen GM, Bunch TH. Conventional liposome performance and evaluation: lessons from the development of Vescan. *J Liposome Res*. 2007;17(3-4):121-37.
163. Kubo A, Nakamura K, Sammiya T, Katayama M, Hashimoto T, Hashimoto S, et al. Indium-111-labelled liposomes: dosimetry and tumour detection in patients with cancer. *Eur J Nucl Med*. 1993;20(2):107-13.
164. Presant CA, Proffitt RT, Turner AF, Williams LE, Winsor D, Werner JL, et al. Successful imaging of human cancer with indium-111-labeled phospholipid vesicles. *Cancer*. 1988;62(5):905-11.
165. Turner AF, Presant CA, Proffitt RT, Williams LE, Winsor DW, Werner JL. In-111-labeled liposomes: dosimetry and tumor depiction. *Radiology*. 1988;166(3):761-5.
166. Presant CA, Turner AF, Proffitt RT. Potential for improvement in clinical decision-making: tumor imaging with in-111 labeled liposomes results of a phase ii-iii study. *Journal of Liposome Research*. 1994;4(2):985-1008.

167. Harrington KJ, Mohammadtaghi S, Uster PS, Glass D, Peters AM, Vile RG, et al. Effective Targeting of Solid Tumors in Patients With Locally Advanced Cancers by Radiolabeled Pegylated Liposomes. *Clin Cancer Res.* 2001;7(2):243-54.
168. Tros de Ilarduya C, Sun Y, Düzgüneş N. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *Eur J Pharm Sci.* 14 juin 2010;40(3):159-70.
169. Silindir M, Özer AY, Erdoğan S. The use and importance of liposomes in positron emission tomography. *Drug Deliv.* 2012;19(1):68-80.
170. Mo R, Sun Q, Li N, Zhang C. Intracellular delivery and antitumor effects of pH-sensitive liposomes based on zwitterionic oligopeptide lipids. *Biomaterials.* 2013;
171. Jung SH, Na K, Lee SA, Cho SH, Seong H, Shin BC. Gd(III)-DOTA-modified sonosensitive liposomes for ultrasound-triggered release and MR imaging. *Nanoscale Res Lett.* 2012;7(1):462.
172. Li L, Wartchow CA, Danthi SN, Shen Z, Dechene N, Pease J, et al. A novel antiangiogenesis therapy using an integrin antagonist or anti-Flk-1 antibody coated 90Y-labeled nanoparticles. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;58(4):1215-27.
173. Lingappa M, Song H, Thompson S, Bruchertseifer F, Morgenstern A, Sgouros G. Immunoliposomal Delivery of <sup>213</sup>Bi for  $\alpha$ -Emitter Targeting of Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res.* 2010;70(17):6815-23.
174. Chang Y-J, Chang C-H, Yu C-Y, Chang T-J, Chen L-C, Chen M-H, et al. Therapeutic efficacy and microSPECT/CT imaging of <sup>188</sup>Re-DXR-liposome in a C26 murine colon carcinoma solid tumor model. *Nucl Med Biol.* 2010;37(1):95-104.
175. Mougin-Degraef M. Etude de faisabilité du radiomarquage et du préciblage de liposomes pour la radioimmunothérapie [Internet]. [Nantes]: Université de Nantes; 2005. Disponible sur: <http://archive.bu.univ-nantes.fr/pollux/show.action?id=41412a98-c8c3-445a-8eed-dd621b5b2dc0>
176. Mougin-Degraef M, Jestin E, Bruel D, Remaud-Le Saëc P, Morandeau L, Faivre-Chauvet A, et al. High-activity radio-iodine labeling of conventional and stealth liposomes. *J Liposome Res.* 2006;16(1):91-102.
177. Mougin-Degraef M, Bourdeau C, Jestin E, Saï-Maurel C, Bourgeois M, Saëc PR-L, et al. Doubly radiolabeled liposomes for pretargeted radioimmunotherapy. *Int J Pharm.* 2007;344(1-2):110-7.
178. W. M. Haynes. Properties of Amino Acids. CRC handbook of chemistry and physics. 91st (internet Version 2011). Boca Raton, Fla.; London: CRC Press; p. 7-1.
179. Hallett FR, Watton J, Krygsman P. Vesicle sizing. *Biophys J.* 1991;59(2):357-62.
180. Ruf H, Georgalis Y, Grell E. Dynamic laser light scattering to determine size distributions of vesicles. *Meth Enzymol.* 1989;172:364-90.
181. Nagayasu A, Uchiyama K, Kiwada H. The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 1999;40(1-2):75-87.
182. Woodle MC, Martin FJ, Yau-Young A, Redemann CT. Liposomes with enhanced circulation time [Internet]. 5013556, 1991. Disponible sur: <http://www.google.com/patents/US5013556>

183. Phillips WT, Goins BA, Bao A. Radioactive liposomes. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. 2009;1(1):69-83.
184. Helbok A, Decristoforo C, Dobrozemsky G, Rangger C, Diederer E, Stark B, et al. Radiolabeling of lipid-based nanoparticles for diagnostics and therapeutic applications: a comparison using different radiometals. Journal of Liposome Research. 2010;20(3):219-27.
185. Petersen AL, Hansen AE, Gabizon A, Andresen TL. Liposome imaging agents in personalized medicine. Adv Drug Deliv Rev. 2012;64(13):1417-35.
186. Holmberg E, Maruyama K, Litzinger DC, Wright S, Davis M, Kabalka GW, et al. Highly efficient immunoliposomes prepared with a method which is compatible with various lipid compositions. Biochem Biophys Res Commun. 1989;165(3):1272-8.
187. Ivanov P., Bontchev G., Bozhikov G., Filossofov D., Maslov O., Milanov M., et al. Study of the <sup>111</sup>In-DTPA complex by the electromigration method. Applied Radiation and Isotopes. 2003;58(1):1-4.
188. Résumé des Caractéristiques du Produit, Zevalin. 2009.
189. Martell A, Smith R. Critical stability constants. Plenum. New-York; 1977.
190. Mayer LD, Bally MB, Cullis PR. Uptake of adriamycin into large unilamellar vesicles in response to a pH gradient. Biochim Biophys Acta. 1986;857(1):123-6.
191. Cullis PR, Hope MJ, Bally MB, Madden TD, Mayer LD, Fenske DB. Influence of pH gradients on the transbilayer transport of drugs, lipids, peptides and metal ions into large unilamellar vesicles. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes. 1997;1331(2):187-211.
192. Bolton AE, Hunter WM. The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a <sup>125</sup>I-containing acylating agent. Application to the radioimmunoassay. Biochemical Journal. 1973;133(3):529.
193. Ardisson V, Mathieu JP, Ghezzi C, Fagret D. TEMP : les possibilités de marquage à l'iode 123 ou au technétium. Médecine nucléaire. 2005;29(4):168-78.
194. Seo JW, Zhang H, Kukis DL, Meares CF, Ferrara KW. A novel method to label preformed liposomes with <sup>64</sup>Cu for positron emission tomography (PET) imaging. Bioconjug Chem. 2008;19(12):2577-84.
195. Beaumier PL, Hwang KJ. An efficient method for loading indium-111 into liposomes using acetylacetone. J Nucl Med. 1982;23(9):810-5.
196. Gabizon A, Hliberty J, Straubinger RM, Price DC, Papahadjopoulos D. An Improved Method for in Vivo Tracing and Imaging of Liposomes Using a Gallium <sup>67</sup>-Deferoxamine Complex. Journal of Liposome Research. 1988;1(1):123-35.
197. Petersen AL, Binderup T, Rasmussen P, Henriksen JR, Elema DR, Kjær A, et al. <sup>64</sup>Cu loaded liposomes as positron emission tomography imaging agents. Biomaterials. 2011;32(9):2334-41.
198. Proffitt RT, Williams LE, Presant CA, Tin GW, Uliana JA, Gamble RC, et al. Tumor-imaging potential of liposomes loaded with In-111-NTA: biodistribution in mice. J Nucl Med. 1983;24(1):45-51.

199. Bao A, Goins B, Klipper R, Negrete G, Phillips WT. Direct <sup>99m</sup>Tc labeling of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) for pharmacokinetic and non-invasive imaging studies. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;308(2):419-25.
200. Laverman P, Boerman OC, Storm G. Radiolabeling of liposomes for scintigraphic imaging. *Meth Enzymol.* 2003;373:234-48.
201. BethA Goins, WilliamT Phillips. Methods for Tracking Radiolabeled Liposomes After Injection in the Body. *Liposome Technology, Volume III* [Internet]. Informa Healthcare; 2006 . p. 191-209. Disponible sur: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780849397288.ch11>
202. Phillips WT, Bao A, Brenner AJ, Goins BA. Image-guided interventional therapy for cancer with radiotherapeutic nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014;76:39-59.
203. French JT, Goins B, Saenz M, Li S, Garcia-Rojas X, Phillips WT, et al. Interventional Therapy of Head and Neck Cancer with Lipid Nanoparticle-carried Rhenium 186 Radionuclide. *Journal of Vascular and Interventional Radiology.* 1 2010;21(8):1271-9.
204. McQuarrie S, Mercer J, Syme A, Suresh M, Miller G. Preliminary results of nanopharmaceuticals used in the radioimmunotherapy of ovarian cancer. *J Pharm Pharm Sci.* 2005;7(4):29-34.
205. Jonasdottir TJ, Fisher DR, Borrebaek J, Bruland OS, Larsen RH. First in vivo evaluation of liposome-encapsulated <sup>223</sup>Ra as a potential alpha-particle-emitting cancer therapeutic agent. *Anticancer Res.* 2006;26(4B):2841-8.
206. Scheinberg DA, McDevitt MR. Actinium-225 in targeted alpha-particle therapeutic applications. *Curr Radiopharm.* 2011;4(4):306-20.
207. Bandekar A, Zhu C, Jindal R, Bruchertseifer F, Morgenstern A, Sofou S. Anti-Prostate-Specific Membrane Antigen Liposomes Loaded with <sup>225</sup>Ac for Potential Targeted Antivascular -Particle Therapy of Cancer. *Journal of Nuclear Medicine.* 2014;55(1):107-14.
208. Chang M-Y, Seideman J, Sofou S. Enhanced loading efficiency and retention of <sup>225</sup>Ac in rigid liposomes for potential targeted therapy of micrometastases. *Bioconjug Chem.* 2008;19(6):1274-82.
209. Subramanian KM, Wolf W. A New Radiochemical Method to Determine the Stability Constants of Metal Chelates Attached to a Protein. *Journal of Nuclear Medicine.* 1990;31(4):480-8.
210. Phizicky EM, Fields S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiological Reviews.* 1995;59(1):94.
211. Bergsdorf C, Ottl J. Affinity-based screening techniques: their impact and benefit to increase the number of high quality leads. *Expert Opin Drug Discov.* 2010;5(11):1095-107.
212. Liedberg B, Nylander C, Lundström I. Biosensing with surface plasmon resonance — how it all started. *Biosensors and Bioelectronics.* 1995;10(8):i - ix.
213. Stenberg E, Persson B, Roos H, Urbaniczky C. Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *Journal of colloid and interface science.* 1991;143(2):513-26.

214. Anderluh G, Besenicar M, Kladnik A, Lakey JH, Macek P. Properties of nonfused liposomes immobilized on an L1 Biacore chip and their permeabilization by a eukaryotic pore-forming toxin. *Analytical Biochemistry*. 2005;344(1):43-52.
215. Botosoa EP, Maillason M, Mougin-Degraef M, Remaud-Le Saëc P, Gestin J-F, Jacques Y, et al. Antibody-Hapten Recognition at the Surface of Functionalized Liposomes Studied by SPR: Steric Hindrance of Pegylated Phospholipids in Stealth Liposomes Prepared for Targeted Radionuclide Delivery. *Journal of Drug Delivery*. 2011;2011:1-9.
216. Lehtinen J, Magarkar A, Stepniowski M, Hakola S, Bergman M, Róg T, et al. Analysis of cause of failure of new targeting peptide in PEGylated liposome: Molecular modeling as rational design tool for nanomedicine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;46(3):121-30.
217. Oja CD, Semple SC, Chonn A, Cullis PR. Influence of dose on liposome clearance: critical role of blood proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1281(1):31-7.
218. Allen TM, Hansen C. Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. *Biochim Biophys Acta*. 30 sept 1991;1068(2):133-41.
219. Harrington KJ, Rowlinson-Busza G, Syrigos KN, Uster PS, Abra RM, Stewart JS. Biodistribution and pharmacokinetics of <sup>111</sup>In-DTPA-labelled pegylated liposomes in a human tumour xenograft model: implications for novel targeting strategies. *Br J Cancer*. 2000;83(2):232-8.
220. Lee C-M, Choi Y, Huh EJ, Lee KY, Song H-C, Sun MJ, et al. Polyethylene glycol (PEG) modified <sup>99m</sup>Tc-HMPAO-liposome for improving blood circulation and biodistribution: the effect of the extent of PEGylation. *Cancer Biother Radiopharm*. 2005;20(6):620-8.
221. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-82.
222. Torchilin V. Fluorescence microscopy to follow the targeting of liposomes and micelles to cells and their intracellular fate. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005;57(1):95-109.
223. Torchilin VP, Rammohan R, Weissig V, Levchenko TS. TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(15):8786-91.
224. Castelli DD, Terreno E, Cabella C, Chaabane L, Lanzardo S, Tei L, et al. Evidence for in vivo macrophage mediated tumor uptake of paramagnetic/fluorescent liposomes. *NMR Biomed*. 2009;22(10):1084-92.
225. Koren E, Apte A, Jani A, Torchilin VP. Multifunctional PEGylated 2C5-immunoliposomes containing pH-sensitive bonds and TAT peptide for enhanced tumor cell internalization and cytotoxicity. *J Control Release*. 2012;160(2):264-73.
226. Grégori G, Sussarellu R, Tarnowska K. Quelques mots sur la fixation – congélation des échantillons destinés à être analysés par cytométrie en flux. [Internet]. PRECYM : Plate-forme Régionale de Cytométrie pour la Microbiologie. Disponible sur: <https://precym.mio.univ-amu.fr/spip.php?article158>
227. Deissler V, Rüter R, Frank W, Fahr A, Kaiser WA, Hilger I. Fluorescent liposomes as contrast agents for in vivo optical imaging of edemas in mice. *Small*. 2008;4(8):1240-6.

228. Hirsjärvi S, Belloche C, Hindré F, Garcion E, Benoit J-P. Tumour targeting of lipid nanocapsules grafted with cRGD peptides. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. mai 2014;87(1):152-9.
229. Rangger C, Helbok A, Sosabowski J, Kremser C, Koehler G, Prassl R, et al. Tumor targeting and imaging with dual-peptide conjugated multifunctional liposomal nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:4659-71.
230. Bryan JN, Jia F, Mohsin H, Sivaguru G, Miller WH, Anderson CJ, et al. Comparative uptakes and biodistributions of internalizing vs. noninternalizing copper-64 radioimmunoconjugates in cell and animal models of colon cancer. *Nucl Med Biol*. 2005;32(8):851-8.
231. Boudousq V, Bobyk L, Busson M, Garambois V, Jarlier M, Charalambatou P, et al. Comparison between internalizing anti-HER2 mAbs and non-internalizing anti-CEA mAbs in alpha-radioimmunotherapy of small volume peritoneal carcinomatosis using 212Pb. *PLoS ONE*. 2013;8(7):e69613.
232. Schmidt MM, Thurber GM, Wittrup KD. Kinetics of anti-carcinoembryonic antigen antibody internalization: effects of affinity, bivalency, and stability. *Cancer Immunol Immunother*. 2008;57(12):1879-90.
233. Rudnick SI, Adams GP. Affinity and avidity in antibody-based tumor targeting. *Cancer Biother Radiopharm*. 2009;24(2):155-61.
234. Gautherot E, Rouvier E, Daniel L, Loucif E, Bouhou J, Manetti C, et al. Pretargeted Radioimmunotherapy of Human Colorectal Xenografts with Bispecific Antibody and 131I-Labeled Bivalent Hapten. *Journal of Nuclear Medicine*. 2000;41(3):480-7.
235. Wu MS, Robbins JC, Bugianesi RL, Ponpipom MM, Shen TY. Modified in vivo behavior of liposomes containing synthetic glycolipids. *Biochim Biophys Acta*. 17 avr 1981;674(1):19-29.
236. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2014. Disponible sur: <http://www.R-project.org/>
237. Petersen AL, Binderup T, Jølcck RI, Rasmussen P, Henriksen JR, Pfeifer AK, et al. Positron emission tomography evaluation of somatostatin receptor targeted 64Cu-TATE-liposomes in a human neuroendocrine carcinoma mouse model. *J Control Release*. 2012;160(2):254-63.
238. Yuan F, Dellian M, Fukumura D, Leunig M, Berk DA, Torchilin VP, et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res*. 1995;55(17):3752-6.
239. National Nuclear Data Center, Brookhaven National Laboratory [Internet]. Disponible sur: <http://www.nndc.bnl.gov/nudat2/>
240. Loevinger R, Berman M. MIRD pamphlet No.1: A schema for absorbed-dose calculations for biologically-distributed radionuclides. *J Nucl Med*. 1968;Suppl 1:9-14.
241. Sgouros G. Bone marrow dosimetry for radioimmunotherapy: theoretical considerations. *J Nucl Med*. 1993;34(4):689-94.
242. Société Française de Radiothérapie Oncologique. Guide des Procédures de Radiothérapie Externe 2007. Haute Autorité de Santé; 2007.

243. Prospective Multicentric Optimization and Phase I/II Study of Pretargeted Radioimmunotherapy (PRAIT) Using Anti-CEA x Anti-HSG TF2 Bispecific Antibody (bsMAb) and <sup>177</sup>Lu-IMP-288 Peptide in Patients With CEA-expressing Small Cell Lung Carcinoma (SCLC) or CEA-expressing Non Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC) [Internet]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/show/NCT01221675>
244. Ferrer L, Malek E, Bodet-Milin C, Legouill S, Prangère T, Robu D, et al. Comparisons of dosimetric approaches for fractionated radioimmunotherapy of non-Hodgkin lymphoma. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2012;56(6):529-37.
245. Pan M-H, Gao D-W, Feng J, He J, Seo Y, Tedesco J, et al. Biodistributions of <sup>177</sup>Lu- and <sup>111</sup>In-labeled 7E11 antibodies to prostate-specific membrane antigen in xenograft model of prostate cancer and potential use of <sup>111</sup>In-7E11 as a pre-therapeutic agent for <sup>177</sup>Lu-7E11 radioimmunotherapy. *Mol Imaging Biol*. 2009;11(3):159-66.
246. Pandit-Taskar N, O'Donoghue JA, Morris MJ, Wills EA, Schwartz LH, Gonen M, et al. Antibody mass escalation study in patients with castration-resistant prostate cancer using <sup>111</sup>In-J591: lesion detectability and dosimetric projections for <sup>90</sup>Y radioimmunotherapy. *J Nucl Med*. 2008;49(7):1066-74.
247. Chang C-H, Chang Y-J, Lee T-W, Ting G, Chang K-P. Dosimetric evaluation of nanotargeted (<sup>188</sup>Re)-liposome with the MIRDose3 and OLINDA/EXM programs. *Ann Nucl Med*. 2012;
248. Emfietzoglou D, Kostarelos K, Sgouros G. An Analytic Dosimetry Study for the Use of Radionuclide-Liposome Conjugates in Internal Radiotherapy. *J Nucl Med*. 2001;42(3):499-504.
249. Seregni E, Maccauro M, Chiesa C, Mariani L, Pascali C, Mazzaferro V, et al. Treatment with tandem [<sup>90</sup>Y]DOTA-TATE and [<sup>177</sup>Lu]DOTA-TATE of neuroendocrine tumours refractory to conventional therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014;41(2):223-30.
250. Frost SHL, Frayo SL, Miller BW, Orozco JJ, Booth GC, Hylarides MD, et al. Comparative efficacy of <sup>177</sup>Lu and <sup>90</sup>Y for anti-CD20 pretargeted radioimmunotherapy in murine lymphoma xenograft models. *PLoS ONE*. 2015;10(3):e0120561.
251. Vallabhajosula S, Goldsmith SJ, Hamacher KA, Kostakoglu L, Konishi S, Milowski MI, et al. Prediction of myelotoxicity based on bone marrow radiation-absorbed dose: radioimmunotherapy studies using <sup>90</sup>Y- and <sup>177</sup>Lu-labeled J591 antibodies specific for prostate-specific membrane antigen. *J Nucl Med*. 2005;46(5):850-8.
252. Sharkey RM, Brenner A, Burton J, Hajjar G, Toder SP, Alavi A, et al. Radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with <sup>90</sup>Y-DOTA humanized anti-CD22 IgG (90Y-Epratuzumab): do tumor targeting and dosimetry predict therapeutic response? *J Nucl Med*. 2003;44(12):2000-18.
253. Sharkey RM, Hajjar G, Yeldell D, Brenner A, Burton J, Rubin A, et al. A phase I trial combining high-dose <sup>90</sup>Y-labeled humanized anti-CEA monoclonal antibody with doxorubicin and peripheral blood stem cell rescue in advanced medullary thyroid cancer. *J Nucl Med*. 2005;46(4):620-33.
254. Drouet F, Lagrange J-L. Dose de tolérance à l'irradiation des tissus sains : la moelle osseuse. *Cancer/Radiothérapie*. 2010;14(4-5):392-404.
255. Loke KSH, Padhy AK, Ng DCE, Goh ASW, Divgi C. Dosimetric considerations in radioimmunotherapy and systemic radionuclide therapies: a review. *World J Nucl Med*. 2011;10(2):122-38.

256. Behr TM, Liersch T, Greiner-Bechert L, Griesinger F, Béhé M, Markus PM, et al. Radioimmunotherapy of small-volume disease of metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2002;94(4 Suppl):1373-81.
257. Pouget J-P, Lozza C, Deshayes E, Boudousq V, Navarro-Teulon I. Introduction to radiobiology of targeted radionuclide therapy. *Front Med (Lausanne)*. 2015;2:12.
258. Wessels BW, Vessella RL, Palme DF, Berkopec JM, Smith GK, Bradley EW. Radiobiological comparison of external beam irradiation and radioimmunotherapy in renal cell carcinoma xenografts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1989;17(6):1257-63.
259. Ning S, Knox SJ. G2/M-phase arrest and death by apoptosis of HL60 cells irradiated with exponentially decreasing low-dose-rate gamma radiation. *Radiat Res*. 1999;151(6):659-69.
260. Brady D, O'Sullivan JM, Prise KM. What is the Role of the Bystander Response in Radionuclide Therapies? *Front Oncol*. 2013;3:215.
261. Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, Huang L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Letters*. 1990;268(1):235-7.
262. Garbuzenko O, Barenholz Y, Priev A. Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer. *Chem Phys Lipids*. 2005;135(2):117-29.
263. Senior J, Delgado C, Fisher D, Tilcock C, Gregoriadis G. Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the circulation: studies with poly(ethylene glycol)-coated vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1062(1):77-82.
264. Patel HM. Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1992;9(1):39-90.
265. Kraeber-Bodéré F, Faivre-Chauvet A, Ferrer L, Vuillez J-P, Brard P-Y, Rousseau C, et al. Pharmacokinetics and dosimetry studies for optimization of anti-carcinoembryonic antigen x anti-hapten bispecific antibody-mediated pretargeting of Iodine-131-labeled hapten in a phase I radioimmunotherapy trial. *Clin Cancer Res*. 2003;9(10 Pt 2):3973S - 81S.
266. Mougin-Degraef M. Antibody-hapten recognition at the surface of functionalized and pegylated liposomes: Characterisation using SPR and in vivo correlation. *European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals*; 2010 avr 8; Edimbourg.
267. Hong K, Kirpotin DB, Park JW, Shao Y, Shalaby R, Colbern G, et al. Anti-HER2 immunoliposomes for targeted drug delivery. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;886:293-6.
268. Kikumori T, Kobayashi T, Sawaki M, Imai T. Anti-cancer effect of hyperthermia on breast cancer by magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;113(3):435-41.
269. Gao J, Zhong W, He J, Li H, Zhang H, Zhou G, et al. Tumor-targeted PE38KDEL delivery via PEGylated anti-HER2 immunoliposomes. *Int J Pharm*. 2009;374(1-2):145-52.
270. Cao Y, Suresh MR. Bispecific MAb aided liposomal drug delivery. *J Drug Target*. 2000;8(4):257-66.
271. Xiao Z, McQuarrie SA, Suresh MR, Mercer JR, Gupta S, Miller GG. A three-step strategy for targeting drug carriers to human ovarian carcinoma cells in vitro. *J Biotechnol*. 2002;94(2):171-84.

272. Pan H, Han L, Chen W, Yao M, Lu W. Targeting to tumor necrotic regions with biotinylated antibody and streptavidin modified liposomes. *J Control Release*. 2008;125(3):228-35.
273. Lehtinen J, Raki M, Bergström KA, Uutela P, Lehtinen K, Hiltunen A, et al. Pre-targeting and direct immunotargeting of liposomal drug carriers to ovarian carcinoma. *PLoS ONE*. 2012;7(7):e41410.
274. Harding JA, Engbers CM, Newman MS, Goldstein NI, Zalipsky S. Immunogenicity and pharmacokinetic attributes of poly(ethylene glycol)-grafted immunoliposomes. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1327(2):181-92.
275. Kraeber-Bodéré F, Rousseau C, Bodet-Milin C, Ferrer L, Faivre-Chauvet A, Campion L, et al. Targeting, toxicity, and efficacy of 2-step, pretargeted radioimmunotherapy using a chimeric bispecific antibody and <sup>131</sup>I-labeled bivalent hapten in a phase I optimization clinical trial. *J Nucl Med*. 2006;47(2):247-55.
276. Gabizon A, Horowitz AT, Goren D, Tzemach D, Shmeeda H, Zalipsky S. In vivo fate of folate-targeted polyethylene-glycol liposomes in tumor-bearing mice. *Clin Cancer Res*. 2003;9(17):6551-9.
277. Kirpotin DB, Drummond DC, Shao Y, Shalaby MR, Hong K, Nielsen UB, et al. Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer Res*. 2006;66(13):6732-40.
278. Mamot C, Drummond DC, Noble CO, Kallab V, Guo Z, Hong K, et al. Epidermal growth factor receptor-targeted immunoliposomes significantly enhance the efficacy of multiple anticancer drugs in vivo. *Cancer Res*. 2005;65(24):11631-8.
279. Laverman P, Brouwers AH, Dams ETM, Oyen WJG, Storm G, Rooijen N van, et al. Preclinical and Clinical Evidence for Disappearance of Long-Circulating Characteristics of Polyethylene Glycol Liposomes at Low Lipid Dose. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;293(3):996-1001.
280. Ishida T, Ichikawa T, Ichihara M, Sadzuka Y, Kiwada H. Effect of the physicochemical properties of initially injected liposomes on the clearance of subsequently injected PEGylated liposomes in mice. *Journal of Controlled Release*. 2004;95(3):403-12.

# Thèse de Doctorat

Aurore RAUSCHER

## Optimisation du ciblage tumoral avec des liposomes radiomarqués et vectorisés par une technique de préciblage en deux temps pour des applications en radioimmunothérapie

### Optimisation of tumor targeting using radiolabeled liposomes with a two-step pretargeting approach for radioimmunotherapy applications

#### Résumé

Les liposomes sont déjà utilisés en clinique avec une dizaine de spécialités déjà commercialisées et dont les exemples présentés dans ce manuscrit montrent le potentiel que peuvent présenter ces formulations. Les liposomes ont été choisis dans ce travail de Thèse comme outil de vectorisation pour la radioimmunothérapie (RIT). En effet, si l'intérêt de la RIT a été prouvée dans le traitement des tumeurs hématologiques, elle reste encore à démontrer et à optimiser pour les tumeurs solides. Une voie d'optimisation proposée à travers ce travail est l'immunociblage de liposomes par une technique en deux temps, basée sur l'utilisation d'anticorps bispécifiques. Ces liposomes ont été radiomarqués à la fois à l'indium-111 au niveau de la bicouche lipidique et à l'iode-125 au niveau de la phase aqueuse. Différentes formulations de liposomes ont été préparées et caractérisées. Des études *in vitro* au BIAcore® utilisant la résonance plasmonique de surface ont permis d'évaluer l'affinité des liposomes fonctionnalisés pour l'anticorps et des études de microscopie d'étudier les interactions cellulaires et de démontrer l'immunospecificité du ciblage. Les demi-vies d'élimination plasmatique ont également été déterminées par des études *in vivo* de pharmacocinétique. Ces caractérisations ont conduit à la sélection des formulations les plus favorables pour les études de biodistribution et de ciblage tumoral réalisées sur un modèle murin d'adénocarcinome colorectal. Les résultats sont prometteurs, confirment l'immunospecificité du ciblage et méritent d'être d'avantage investigués pour évaluer l'efficacité de ces formulations avec des radioéléments d'intérêt pour la RIT.

#### Mots clés

liposomes, radioimmunothérapie, ciblage tumoral, BIAcore, pharmacocinétique, microscopie de fluorescence, biodistribution, dosimétrie

#### Abstract

Liposomes are already used for clinical applications with a dozen of marketed specialties, and examples presented in this manuscript show the potential that can exhibit these formulations. Liposomes have been chosen in this work as a new tool for radioimmunotherapy (RIT). Indeed, whereas potential of RIT has been demonstrated in the treatment of hematological tumors, it remains to be optimized in the case of solid tumors. In this work is proposed a way of optimization using liposomes immunotargeting by a two-step technique, based on the use of bispecific antibodies. These liposomes were radiolabeled with both indium-111 in the lipid bilayer and iodine-125 in the aqueous phase. Different liposomal formulations were prepared and characterized. *In vitro* studies with BIAcore®, using surface plasmon resonance, were performed to assess the affinity of the antibody with functionalized liposomes and microscopy studies were performed to study cellular interactions and demonstrate the targeting immunospecificity. The plasmatic elimination half-lives were also determined by *in vivo* pharmacokinetic studies. These characterizations led to the selection of the most favorable formulations for biodistribution and tumor targeting studies in a mouse model of colorectal adenocarcinoma. The results are promising, confirming the targeting immunospecificity, and deserve to be further investigated to assess the effectiveness of these formulations with radionuclides of interest for RIT.

#### Key Words

liposomes, radioimmunotherapy, tumor targeting, BIAcore, pharmacokinetic, fluorescence microscopy, biodistribution, dosimetry