

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

**Etude de faisabilité du radiomarquage et du
préciblage de liposomes pour la
radioimmunothérapie**

THÈSE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale CHIMIE BIOLOGIQUE

Mention Sciences de la Vie et de la Santé

Discipline : Pharmacie

Spécialité : Radiopharmacie

Présentée

et soutenue publiquement par

Marie MOUGIN-DEGRAEF

le 6 Juillet 2005, devant le jury ci-dessous

Président

Rapporteurs:

M. GUILLOTEAU Denis. PU-PH. Faculté de Pharmacie de Tours

M. BENOIT Jean-Pierre. PU-PH. Faculté de Pharmacie d'Angers

Examineurs:

M. BARBET Jacques. Directeur de Recherche CNRS. U601 Nantes

M. TRUCHAUD Alain. PU. Faculté de pharmacie de Nantes

Directeur de thèse **M. FAIVRE-CHAUVET Alain.** MCU.

Faculté de Pharmacie de Nantes

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES	
I. LA RADIOIMMUNOTHERAPIE (RIT)	5
I.1. Introduction	5
I.2. Le vecteur et sa cible	6
I.2.1. Structure et caractéristiques des immunoglobulines	7
I.2.2. Les anticorps utilisés en RIT	9
I.2.3. La cible antigénique	14
I.2.4. Nature de la cible tumorale	15
I.3. Choix du radionucléide	17
I.3.1. Critères physico-chimiques	17
I.3.2. Les radionucléides utilisés en RIT	20
I.3.3. Mode de production	23
I.3.4. Modalités de couplage	24
I.3.5. Influence de la pathologie	25
I.4. Applications cliniques	26
I.4.1. Les conditions de succès de la RIT	26
I.4.2. Résultats dans les tumeurs solides	34
I.4.3. Orientations futures de la RIT	39
I.4.4. Limites de la RIT et intérêt des liposomes	40
II. LES LIPOSOMES	42
II.1. Généralités	42
II.1.1. Historique	42
II.1.2. Définition	43
II.1.3. Morphologie des liposomes	44
II.1.4. Composition	45
II.1.5. Formulation et stabilisation des liposomes	50
II.1.6. Classification	51
II.2. Préparation des liposomes	56
II.2.1. Méthodes mécaniques de dispersion des phospholipides	57
II.2.2. Méthodes basées sur l'élimination du solvant organique	63
II.2.3. Méthodes basées sur l'utilisation de détergents	65
II.2.4. Méthodes utilisant des liposomes pré-formés	65
II.3. Encapsulation de substances dans les liposomes	67

<i>II.3.1. Facteurs influençant la capacité d'encapsulation des liposomes</i>	67
<i>II.3.2. Principaux modes d'encapsulation</i>	70
<i>II.3.3. Stabilité et efficacité d'encapsulation</i>	73
II.4. Devenir in vivo des liposomes	77
<i>II.4.1. Stabilité des liposomes dans le sang</i>	78
<i>II.4.2. Mécanismes d'interactions liposomes-cellules</i>	82
<i>II.4.3. Distribution des liposomes après injection I.V.</i>	84
<i>II.4.4. Modification de la pharmacocinétique des liposomes</i>	88
II.5. Les applications des liposomes	101
<i>II.5.1. Formes liposomales commercialisées</i>	105
<i>II.5.2. Place des liposomes radiomarqués</i>	108
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE	110

CHAPITRE II : DONNÉES EXPÉRIMENTALES

I. PRÉPARATION DES LIPOSOMES	116
I.1. Introduction	116
I.2. Formulation des liposomes	117
I.3. Matériels et Méthodes	119
<i>I.3.1. Matières premières</i>	119
<i>I.3.2. Protocoles expérimentaux</i>	119
<i>I.3.3. Contrôles réalisés sur les liposomes</i>	122
I.4. Résultats	123
<i>I.4.1. Purification des liposomes</i>	123
<i>I.4.2. Contrôle de la concentration lipidique</i>	124
<i>I.4.3. Contrôle de la taille des liposomes</i>	124
I.5. Discussion	125
II. RADIOMARQUAGE DES LIPOSOMES	126
II.1. Radiomarquage de la paroi	126
<i>II.1.1. Introduction</i>	126
<i>II.1.2. Matériels et Méthodes</i>	126
<i>II.1.3. Résultats</i>	128
<i>II.1.4. Discussion</i>	130
II.2. Radiomarquage par encapsulation active	132
<i>II.2.1. Introduction</i>	132
<i>II.2.2. Matériels et Méthodes</i>	134
<i>II.2.3. Résultats</i>	138
<i>II.2.4. Discussion</i>	148
II.3. Double marquage	150

II.3.1. Introduction	150
II.3.2. Protocoles expérimentaux.....	150
II.3.3. Résultats.....	152
II.3.4. Discussion.....	152
III. TESTS IN VITRO.....	154
III.1. Tests de stabilité.....	154
III.1.1. Introduction	154
III.1.2. Protocole expérimental.....	155
III.1.3. Résultats des tests de stabilité	155
III.1.4. Discussion.....	159
III.2. Tests d'immunoréactivité	161
III.2.1. Introduction	161
III.2.2. Matériel et méthode.....	161
III.2.3. Résultats des tests d'immunoréactivité	162
III.2.4. Discussion.....	163
III.3. Test d'activation du complément	164
III.3.1. Introduction	164
III.3.2. Matériel et Méthode.....	165
III.3.3. Résultats du test d'activation du complément	168
III.3.4. Discussion.....	169
IV. ETUDE CHEZ L'ANIMAL.....	171
IV.1. Introduction	171
IV.2. Matériels et méthodes	172
IV.2.1. Matières premières	172
IV.2.2. Protocoles expérimentaux.....	173
IV.2.3. Expression et traitement des résultats.....	175
IV.3. Résultats	176
IV.3.1. Etude préliminaire de préciblage in vivo.....	176
IV.3.2. Pharmacocinétique sanguine des liposomes radiomarqués	178
IV.3.3. Biodistribution des liposomes radiomarqués.....	180
IV.4. Discussion	184
 CHAPITRE III : DISCUSSION GÉNÉRALE	
I. RADIOMARQUAGE DES LIPOSOMES	189
II. CIBLAGE DES LIPOSOMES RADIOMARQUÉS	201
III. PERSPECTIVES.....	216
 CONCLUSION.....	 219

<i>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	222
<i>ANNEXE 1 : Synthèse des phospholipides modifiés</i>	242
<i>I. Partie théorique</i>	243
<i>I.1. Synthèse du DMPE-DTPA</i>	243
<i>I.2. Synthèse du DMPE-DNP</i>	244
<i>II. Partie expérimentale</i>	245
<i>II.1. Généralités</i>	245
<i>II.2. Modes opératoires</i>	246
<i>ANNEXE 2 : Tampons et réactifs du test du CH50</i>	251
<i>INDEX des figures et tableaux</i>	253

LISTE DES ABBREVIATIONS ET SYMBOLES

ACE	Antigène carcino-embryonnaire
AcOEt	Acétate d'éthyle
Ac	Anticorps
Ag	Antigène
AcM	Anticorps monoclonaux
AES	"Affinity Enhancement System"
BH	Bolton-Hunter
Bq	Symbole du Becquerel
BSA	"Bovine serum albumin"
ce	capture électronique
CHCl₃	Chloroforme
Chol	Cholestérol
Ci	Symbole du Curie
CMT	Cancer médullaire de la thyroïde
CPM	Coups par minute
CT	Chloramine T
DI	Dose injectée
DMFa	Diméthylformamide anhydre
DMPC	Dimyristoyl phosphatidylcholine
DMPE	Dimyristoyl phosphatidyléthanolamine
DNP	Acide 2,4-dinitrophénylaminocaproïque
DOX	Doxorubicine
DOTA	Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-N,N',N'',N'''-tétraacétique
DTPA	Acide diéthylènetriaminepentaacétique
EtOH	Ethanol
EPC	"Egg phosphatidylcholine"
GM1	Monosialoganglioside
HACA	"Human anti-chimeric antibody"

HAHA "Human anti-human antibody"
HAMA "Human anti-mouse antibody"
HMPAO Hexaméthylpropylèneamine oxime
HYNIC Hydrazinonicotinamide
IgG Immunoglobuline
LMNH Lymphome malin non-Hodgkinien
LUV "Large unilamellar vesicle"
MeOH Méthanol
MLV "Multilamellar vesicle"
NHS N-hydroxysuccinimide
PBS "Phosphate buffer saline"
PE Phosphatidyléthanolamine
PEG Polyéthylène glycol
RES "Reticulo-endothelial System"
RIT Radioimmunothérapie
SPM Système des phagocytes mononucléés
SUV "Small unilamellar vesicle"
TE Taux d'encapsulation
TEL Transfert d'énergie linéique
Tm Température de transition de phase
§ Paragraphe

INTRODUCTION

GÉNÉRALE

La radioimmunothérapie (RIT) est une forme de radiothérapie interne vectorisée qui utilise des anticorps monoclonaux (AcM) radiomarqués capables de reconnaître de façon spécifique les antigènes exprimés par les cellules tumorales. Son efficacité a été démontrée, en terme de survie, pour les tumeurs hématologiques et plus particulièrement dans le traitement des lymphomes malins non hodgkiniens. Par contre, les quelques essais cliniques réalisés sur des tumeurs solides n'ont pas été aussi encourageants. Ces résultats s'expliquent en partie par l'importance des masses tumorales traitées et par l'utilisation d'AcM directement radiomarqués. En effet, la fixation tumorale de l'AcM est faible, ce qui conduit à un contraste insuffisant pour délivrer à la tumeur solide une dose tumoricide tout en maintenant une irradiation acceptable des tissus sains (Chatal *et al.* 2001).

Des résultats plus encourageants ont récemment été rapportés avec des systèmes de ciblage en plusieurs étapes, appelés systèmes de préciblage, qui permettent de réduire la fixation non spécifique (Barbet *et al.* 1999).

L' A.E.S. (Affinity Enhancement System), technique de ciblage en deux temps, a démontré un effet positif en terme de réduction de l'irradiation des tissus sains, donc de la toxicité principalement hématologique, mais sans accroître la fixation tumorale par rapport au ciblage direct (Gautherot *et al.* 2000). La quantité de radioactivité que l'on peut vectoriser constitue donc le facteur limitant de ce système. C'est pourquoi nos efforts se sont portés sur une étude qui permettrait d'augmenter l'activité spécifique des molécules vectrices. Différents thèmes ont été abordés dont la fonctionnalisation et le radiomarquage de liposomes immunospécifiques.

Ce travail s'articule en deux grandes parties. Le chapitre I présente le principe de la RIT, ses applications cliniques et ses principales limites ainsi

que différents aspects pharmaceutiques, techniques et comportementaux concernant les liposomes, aussi bien *in vitro* qu' *in vivo*.

Le chapitre II est consacré au travail expérimental réalisé au sein des unités INSERM 601 de Nantes et 646 d'Angers. Il a pour but de présenter différentes techniques de radiomarquage permettant d'optimiser l'activité spécifique des liposomes, et d'étudier leur stabilité chez l'animal. L'objectif principal de ce projet étant la mise au point d'une nouvelle stratégie thérapeutique anti-tumorale basée sur l'utilisation de liposomes radiomarqués et immunovectorisés.

Chapitre I

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

I. LA RADIOIMMUNOTHERAPIE (RIT)

I.1. Introduction

La RIT est une forme de radiothérapie interne utilisant comme vecteur un anticorps monoclonal (AcM) radiomarqué capable de reconnaître les antigènes (Ag) exprimés par les cellules tumorales. Son efficacité provient essentiellement des rayonnements particuliers émis par les radionucléides fixés sur le vecteur. Ces rayonnements transfèrent de l'énergie à la matière sur toute la distance qu'ils parcourent (TEL ou Transfert Linéique d'Énergie). Selon leur nature, le TEL est variable et généralement plus fort en fin de parcours.

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". (Chatal et Hoefnagel, 1999). Les dépôts d'énergie vont provoquer des radicaux libres et des peroxydes dans la matière, qui eux-mêmes vont provoquer 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. Il faut noter que les Ac par eux-mêmes peuvent contribuer à l'effet tumoricide, comme c'est le cas dans le traitement des lymphomes (Dillman 2002, Scheidhauer *et al.* 2002).

Compte tenu des faibles parcours dans les tissus des rayonnements particuliers, les cibles idéales pour la RIT sont les tumeurs de petite taille, voire la maladie résiduelle, qui sont disséminées dans l'organisme et qui

sont peu ou pas accessibles à une irradiation externe ou à la chirurgie (Chatal et Hoefnagel 1999, Pèlerin *et al.* 2000). L'efficacité de la RIT repose sur quatre éléments. Deux d'entre eux font intervenir les propriétés du radioimmunoconjugué, avec les caractéristiques de l'Ac (spécificité, affinité, dose, immunoréactivité) et celles du radionucléide (période, type d'émission, énergie). Les deux autres éléments concernent la cible : propriétés de l'Ag tumoral (localisation, densité, expression) et nature de la cible tumorale (radiosensibilité, taille, vascularisation, taux de prolifération).

Dans ce chapitre seront exposées les caractéristiques des radioimmunoconjugués (AcM-radionucléide) à travers les composantes d'une part, de reconnaissance de l'Ag, et d'autre part du radionucléide. Nous verrons les principales utilisations cliniques actuellement à l'étude ainsi que les limites de la RIT.

I.2. Le vecteur et sa cible

Pour présenter un intérêt thérapeutique, le radioimmunoconjugué doit posséder deux caractéristiques principales. Il doit d'abord atteindre sa cible, que ce soit à l'échelle de l'organe, du tissu ou de la cellule. Une fois la cible atteinte, il doit y exercer une action thérapeutique. Cette action est généralement apportée par le radionucléide associé à l'AcM. Celui-ci, en se désintégrant, provoque des ionisations, des radicaux libres et des peroxydes toxiques pour les cellules.

La molécule vectrice utilisée en RIT est le plus souvent un AcM (Köhler et Milstein, 1975). Tout d'abord des Ac entiers, d'origine murine, ont été utilisés. La pharmacocinétique de l'immunoconjugué dépendant en grande partie de la taille de la molécule, l'intérêt de pouvoir modifier celle des Ac a très vite été suggéré. La connaissance de la structure des Ac et les techniques d'ingénierie des protéines ont permis une évolution progressive

des Ac entiers vers des fragments d'Ac, ainsi que l'évolution des Ac murins vers des Ac chimériques ou humanisés.

I.2.1. Structure et caractéristiques des immunoglobulines

Les Ac naturels sont des molécules d'immunoglobulines (Ig), synthétisées et secrétées par les lymphocytes B en réponse à une stimulation antigénique. Malgré leur très grande diversité, les Ig sont toutes constituées par des chaînes lourdes (H) de 50 kDa et légères (L) de 25 kDa, comprenant chacune des domaines variables (V) et constants (C). Les chaînes H et L sont liées entre elles par des ponts disulfures dits "intercaténaires", dont la réduction chimique n'altère généralement ni l'organisation de la molécule ni son activité. Il en est tout autrement des ponts "intracaténaires", internes à chaque chaîne, extrêmement difficiles à réduire, mais essentiels au repliement et à l'activité des Ig (*figure 1*).

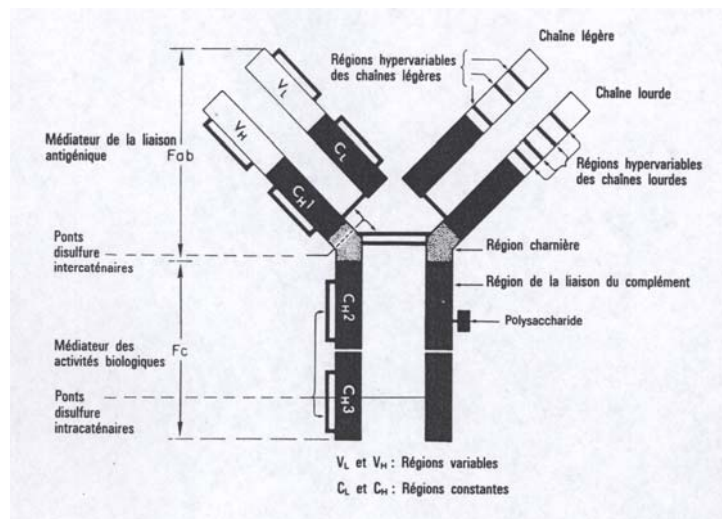


Figure 1 : Topologie et architecture fonctionnelle d'une immunoglobuline humaine (Bach J.F. 1993).

Trois segments de la région variable VL et trois segments de la région VH présentent une bien plus grande variabilité que d'autres résidus des régions variables. Ces "segments hypervariables" forment le site de liaison à l'Ag et la spécificité de l'Ac est déterminée par la nature de leurs résidus aminoacides. Les régions hypervariables sont appelées aussi régions déterminant la complémentarité (CDR), car elles déterminent la spécificité des Ac.

Il existe cinq types d'immunoglobulines (*tableau 1*) selon le type de chaîne lourde : γ pour les IgG, α pour les IgA, μ pour les IgM, δ pour les IgD et ϵ pour les IgE. Les chaînes légères sont identiques pour toutes les classes, et peuvent être soit de type kappa soit de type lambda. Par ailleurs, on distingue parmi les IgG quatre sous-types (numérotés de 1 à 4) qui diffèrent par leur structure de la zone charnière, mais aussi par leurs propriétés de fixation du complément, de transfert placentaire ou encore de fixation tumorale.

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
<i>Poids moléculaire (Da)</i>	155 000	170 000	900 000	175 000	195 000
<i>1/2 vie plasmatique (j)</i>	24	6	5	3	2,3

Tableau 1 : Caractéristiques des différentes classes d'immunoglobulines.

Les premiers Ac ont été extraits de sérums de mammifères immunisés. Les Ac ainsi produits étaient dirigés contre différents épitopes de l'Ag à l'origine de l'immunisation. Ils étaient donc composés d'une population hétérogène d'anticorps (Ac polyclonaux) dont l'affinité et la spécificité pouvaient varier de façon significative d'une source à l'autre. Depuis la découverte de la technique des hybridomes, la production sur lignées cellulaires permet d'obtenir des Ac monoclonaux (AcM). Ces AcM

sont homogènes car ils sont synthétisés par une population de cellules identiques (un clone). Chaque population est la descendance d'une seule cellule d'hybridome formée par la fusion entre un lymphocyte B sain préalablement immunisé et un lymphocyte B cancéreux qui a la possibilité de proliférer de façon illimitée (Köhler et Milstein, 1975).

I.2.2. Les anticorps utilisés en RIT

L'affinité, la spécificité et la forme de l'AcM déterminent en partie sa biodistribution. L'affinité conditionne la solidité de la liaison Ag-Ac et la rétention de l'immunoconjugué dans la cible. C'est pourquoi elle doit être suffisamment importante. Toutefois, il a été démontré dans un modèle *in vitro* de sphéroïdes multicellulaires tumoraux qu'un AcM de faible affinité pénétrait plus profondément qu'un AcM de haute affinité (Langmuir *et al.* 1992). En effet, l'AcM très affin se fixe dès qu'il rencontre l'Ag et sature les sites superficiels sans qu'il y ait de diffusion. Le consensus général est néanmoins d'utiliser des AcM de haute affinité afin d'améliorer le ciblage.

La spécificité de l'AcM est également très importante car elle conditionne en partie la distribution dans les tissus et donc les effets secondaires.

I.2.2.1. Les fragments d'anticorps

La forme de l'AcM, immunoglobuline (IgG) entière ou fragmentée, modifie également son comportement dans l'organisme et son accès à la tumeur. Afin d'augmenter leur clairance, plusieurs fragments et sous-fragments d'Ac radiomarqués ont été envisagés (*figure 2*). Les fragments bivalents F(ab')₂ et monovalents Fab' (pour "antigen binding"), obtenus par action de la pepsine sur un Ac entier IgG, ont une excellente pénétration tumorale et ont donné de bons résultats chez l'animal, bien que leur temps

de résidence dans la tumeur soit inférieur à celui d'une IgG entière (Stein *et al.* 1994). Ces fragments peuvent néanmoins fixer deux molécules d'Ag et leurs poids moléculaires de l'ordre de 50 kDa permettent une rapide élimination rénale (Milenic 2000). L'isolement du fragment scFv (constitué des domaines variables VH et VL) et sa stabilisation par des peptides de liaison très court, a permis ensuite de construire différentes molécules: scFv (pour "single chain" Fv), bi-scFv ou "diabodies", "triabodies", "tetrabodies", représentés *figure 2*.

Figure 2 Représentation schématisée des différents types de molécules par dig

Le d'Ac
sont resur résulte
d'un con éduire
l'irradiati onale
maximale tion
des différi niques
(Schott *et les, la*
fixation tu entière
qu'avec l' ultés à
atteindre s ne des
IgG est pl fique,
en particu

Digitized by Google

	IgG	F(ab ^o)	Fab ^o	Diabody	ScFv
Poids moléculaire (kDa)	150	100	50	50	25
1/2 vie plasmatique	2-3 j	1-2 j	3 h	3 h	3 h
Voie d'élimination principale	Foie	Foie	Rein	Rein	Rein
Intensité de la capture tumorale (1 = plus élevée, 4 = plus faible)	1	2	3	3	4
Durée de la capture tumorale (1 = plus longue, 4 = plus courte)	1	2	3	3	4

Tableau 2: Propriétés pharmacocinétiques des Ac et des fragments (d'après Sharkey et al. 2005).

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, leur utilisation présente des inconvénients. Le temps de résidence tumoral, qui est primordial pour délivrer une dose d'irradiation thérapeutique, décroît avec la taille du fragment d'immunoglobuline. De plus, on retrouve après administration intra-veineuse de fragments Fab^o ou scFv, une fixation rénale précoce importante.

1.2.2.2. Les anticorps humanisés

Les premiers AcM développés étaient entièrement murins. Le principal inconvénient en clinique, après injection d'AcM murins, est l'apparition chez le patient d'Ac anti-souris HAMA ("Human Anti-Mouse Antibodies"). Ces HAMA apparaissent surtout en cas d'injection de quantité d'Ac supérieure au mg ou d'injections répétées. La présence de HAMA modifie la pharmacocinétique des AcM radiomarqués et réduit leur disponibilité pour la cible tumorale en entraînant la formation de complexe

AcM-HAMA rapidement éliminé. Cette réponse immunitaire limite le nombre d'injections que l'on peut réaliser chez un même patient. (Pèlerin *et al.* 2000). Depuis la technique des hybridomes permettant de produire des AcM, il y a 25 ans, beaucoup de progrès ont été réalisés dans le développement des Ac d'origine murine.

La première évolution a été la création d'Ac dits **chimériques** dans lesquels seuls les domaines variables sont murins, ce qui représente encore 33 % de la totalité de la protéine. Les domaines constants sont humains (*figure 3*). Les Ac chimériques ont une immunogénicité variable et n'ont qu'en partie résolu le problème des HAMA. Plusieurs équipes ont ensuite tenté de réduire encore l'immunogénicité en ne conservant que les régions hypervariables de l'Ac murin.

On obtient alors des Ac **humanisés** dont la fraction de protéine murine est réduite au minimum (10 %). Néanmoins, il peut en résulter une perte d'affinité par rapport à l'Ac murin initial. La biodistribution des AcM humanisés et chimériques diffère de celle des AcM murins et est donc à ré-évaluer dans chaque cas. Chez l'homme, par exemple, la demi-vie plasmatique des Ac humanisés est plus longue que celle des Ac murins. Phénomène qui s'explique probablement par une différence d'affinité des récepteurs exprimés à la surface des cellules humaines pour les immunoglobulines murines et humanisées.

Figure 3 : Représentation schématique d'une IgG et des Ac chimériques et humanisés (Sharkey et al. 2005).

I.2.2.3. Anticorps monoclonaux bispécifiques

Les AcM bispécifiques sont des immunoglobulines de synthèse qui possèdent deux spécificités sur deux sites distincts. Ils peuvent être obtenus de trois manières différentes (Cao et Suresh, 1998).

Le **couplage chimique** de deux Ac ou de deux fragments utilise des agents couplants qui réagissent sur les groupements amines des Ac ou les groupements thiols provenant de la réduction des ponts disulfures. Le principal inconvénient de cette méthode est la dénaturation des protéines qui peut conduire à une perte d'immunoréactivité.

La méthode par **hybridation somatique** implique la fusion de deux hybridomes. Leur purification par chromatographie est délicate.

Ces Ac peuvent également être produits par **génie génétique** sous la forme de "diabodies".

En RIT, les AcM bispécifiques sont utilisés dans les techniques de ciblage comportant plusieurs étapes qui seront développées plus loin (*cf* § I.4.3).

I.2.3. La cible antigénique

Idéalement, l'Ag ciblé doit être non sécrété, exprimé fortement, de façon constante et homogène à la surface des cellules cancéreuses, à l'exclusion d'autres tissus. En fait, les Ag, sauf exceptions, ne sont pas spécifiques d'une tumeur. Ils peuvent 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.

Différentes classes d'Ag tumoraux ont été étudiés pour la RIT :

- des Ag oncofœtaux comme l'Ag carcino-embryonnaire (ACE) ou l'alphafœtoprotéine (AFP) ,
- des récepteurs de facteurs de croissance comme HER2/neu,
- des marqueurs de différenciation des carcinomes comme MUC-1,
- des marqueurs de différenciation des leucocytes comme le CD20 ou le CD22... la liste n'est pas exhaustive.

La localisation de l'Ag doit être prise en considération, notamment pour le choix du radionucléide. En effet, s'il se situe au niveau du noyau cellulaire, un émetteur avec un petit parcours est adapté pour obtenir un dépôt d'énergie maximal au niveau du noyau. Mais, dans ce cas, se pose le problème de l'accessibilité de l'Ag. Au contraire, si l'Ag est exprimé sur la membrane cellulaire, un émetteur avec un parcours plus long semble préférable. La quantité d'Ag présente dans la circulation peut aussi théoriquement modifier le comportement pharmacocinétique de l'AcM et l'efficacité de la RIT.

La capacité du complexe Ag-AcM à induire une endocytose est également à prendre en compte. Les AcM internalisés sont dégradés en petits peptides ou en acides aminés qui sont sécrétés par la cellule. Mais au cours de cette dégradation les métaux et les radionucléides chargés restent piégés dans le milieu intra-cellulaire (cas de l'yttrium-90, du lutétium-177, de l'actinium-225...). Ce n'est pas le cas de l'iode qui est sécrété sous forme d'iodo-tyrosine et qui subit une déshalogénéation *in vivo*. Le temps de rétention et la dose dans la tumeur sont alors moindres. Ainsi, un AcM marqué à l'yttrium-90 subira une dégradation enzymatique intra-cellulaire, mais contrairement à l'iode, il restera dans la cellule.

I.2.4. Nature de la cible tumorale

Il est important de considérer différents paramètres concernant la tumeur qui vont conditionner la biodistribution du radioimmunoconjugué, et plus généralement la réponse tumorale aux rayonnements ionisants. L'efficacité thérapeutique va dépendre en effet de la capacité des radioimmunoconjugués d'atteindre leur cible tumorale et en quantité suffisante. Malgré la perméabilité vasculaire importante des tissus tumoraux, l'AcM ou ses fragments ne se distribuent pas de façon homogène dans les tumeurs.

De nombreuses barrières s'opposent au transport de l'immunoconjugué du compartiment vasculaire vers le compartiment interstitiel puis vers le compartiment cellulaire, notamment dans les tumeurs volumineuses (Jain et Baxter 1988). Contrairement à la vascularisation des tissus normaux, la vascularisation tumorale est très hétérogène et anarchique, les vaisseaux dilatés et tortueux. L'espace vasculaire varie de 1 à 20 % en fonction de la nature et de la taille de la tumeur. Le flux sanguin tumoral est inférieur à celui des tissus normaux et il diminue encore et devient très hétérogène lorsque la taille de la tumeur augmente. La zone centrale nécrotique n'est pas vascularisée et donc peu accessible aux AcM contrairement à la zone périphérique.

Quand l'AcM arrive au niveau capillaire, il doit traverser la paroi vasculaire avant d'atteindre sa cible antigénique tumorale. 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,

caractérisée par l'absence de membrane basale et la présence de nombreux espaces entre les cellules endothéliales (*cf II 4.3 figure 18*).

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 hydrostatique et osmotique entre les compartiments vasculaire et interstitiel. Il a été démontré que, du fait de l'absence de vaisseaux lymphatiques, la pression interstitielle dans les tumeurs est supérieure à celle des tissus normaux, principalement au centre de la tumeur (Jain et Baxter 1988). Ce phénomène diminue l'extravasation des AcM et est d'autant plus important que la tumeur est volumineuse.

Enfin, la perfusion tumorale, insuffisante quand la tumeur grossit et atteint quelques grammes, n'autorise qu'une fixation faible et hétérogène des AcM. Elle provoque également une hypoxie des cellules qui majore leur radiorésistance (Jain *et al.* 1988, Chatal *et al.* 1998).

Pour améliorer la biodistribution des radioimmunoconjugués, des approches visent à diminuer la pression interstitielle dans la tumeur. C'est le principe d'action de certaines enzymes comme la hyaluronidase ou le TNF ("Tumor Necrosis Factor"). On peut aussi améliorer le transport interstitiel des macromolécules de radioimmunoconjugués en diminuant leur taille et en utilisant les fragments décrits précédemment (F(ab)₂ et Fab').

I.3. Choix du radionucléide

Les effets de la RIT, comme de toutes les formes de radiothérapie interne, dépendent aussi des propriétés physiques (nature du rayonnement, énergie, parcours, période physique), de la structure chimique et du comportement biologique du radionucléide. Ces paramètres modifient la biodistribution et déterminent les doses d'irradiation (quantités d'énergie

déposées par gramme de tissu). Le choix du radionucléide est donc primordial et il peut se faire aussi bien en fonction des caractères physico-chimiques, du mode production ou des paramètres biologiques relatifs à l'utilisation. Les AcM peuvent être marqués, au lieu d'émetteurs γ utilisés pour le diagnostic, par des émetteurs β^- ou d'électrons Auger (et dans l'avenir des émetteurs α). Bien que beaucoup de radionucléides potentiellement intéressants pour la RIT aient été testés cliniquement (*tableau 3*), très peu sont utilisés à ce jour, car il faut également prendre en compte leur disponibilité et leur coût. On s'oriente pourtant vers l'utilisation de nouveaux radionucléides (lutétium-177, cuivre-67...) et vers l'utilisation d'émetteurs α très prometteurs.

I.3.1. Critères physico-chimiques

I.3.1.1. Période physique

La demi-vie du radionucléide doit être adaptée à la cinétique de fixation et de rétention du vecteur utilisé. Elle doit être suffisamment longue pour délivrer une dose élevée à la tumeur. En effet, une période trop courte entraînera un nombre élevé de désintégrations à l'extérieur de la cible, avant que le vecteur radiomarqué n'ait pu se fixer sur sa cible (Bardiès et Faivre-Chauvet, 1998). En pratique, une période physique supérieure à la demi-vie de distribution mais inférieure ou égale à la demi-vie d'élimination du vecteur semble appropriée.

I.3.1.2. Type d'émission

Les atomes radioactifs utilisés en RIT sont essentiellement des **émetteurs β^-** ayant un TEL faible. Leur parcours est plus long que celui des émetteurs α de même énergie (de 100 μm à quelques mm). Ils offrent la

possibilité de "tirs croisés" permettant la destruction des cellules non directement ciblées par le vecteur radiomarqué. Ce phénomène dit du "feu croisé" permet d'augmenter l'efficacité d'un traitement, puisqu'il n'est pas nécessaire de cibler l'ensemble des cellules à détruire, mais seulement un nombre suffisant de cellules dans la zone à détruire (Bardiès et Faivre-Chauvet, 1998). Les émetteurs β de différentes énergies peuvent être classés en trois catégories selon le parcours moyen des particules β qu'ils émettent:

- émetteurs β de faible énergie : parcours moyen $< 200 \mu\text{m}$,
- émetteurs β de moyenne énergie : $200 \mu\text{m} < \text{parcours moyen} < 1 \text{ mm}$,
- émetteurs β de forte énergie : parcours moyen $> 1 \text{ mm}$.

La diversité des radionucléides β disponibles permet alors d'orienter le choix en fonction des caractéristiques de la tumeur, et en particulier de sa taille.

Les émetteurs d'**électrons AUGER** (provenant de radionucléides qui se désintègrent par capture électronique ou conversion interne) ont un TEL élevé sur les premiers nanomètres de leur trajectoire. La dose délivrée peut être suffisante pour détruire des cellules si le vecteur est internalisé dans la cellule, à proximité de l'ADN nucléaire, ce qui n'est généralement pas le cas quand le vecteur est un Ac. A distance du point d'émission, le comportement des émetteurs d'électrons AUGER rejoint celui des émetteurs β , à faible TEL.

L'intérêt des **émetteurs α** est la grande quantité d'énergie qu'ils peuvent déposer sur une faible de distance (TEL élevé). Ce sont d'excellents candidats pour la RIT qui sont évalués depuis quelques années en recherche, mais dont l'efficacité clinique n'est pas encore démontrée. Leur faible parcours entraîne de fortes variations de la dose délivrée à la cible, principalement dans le cas d'une distribution hétérogène du vecteur. Leur

TEL est près de 400 fois supérieur aux émetteurs β (80 keV/ μ m versus 0,2 keV/ μ m). Ils parcourent dans les tissus de 50 à 100 μ m, ce qui correspond au diamètre des tumeurs de petite taille comme les micrométastases, la maladie résiduelle ou les cellules circulantes dans les maladies hématologiques (Chatal et Hoefnagel 1999). L'efficacité des émissions à TEL élevé est par ailleurs peu dépendante du niveau d'oxygénation de la tumeur. En effet, leur action anti-tumorale est essentiellement due à des lésions directes de l'ADN et non à la radiolyse de l'eau et aux radicaux libres (Vuillez 2000).

Les AcM liés avec des émetteurs α pourraient permettre de cibler les cellules tumorales de petite taille en limitant l'irradiation des cellules saines. Mais leur toxicité est importante et le radiomarquage des Ac avec des émetteurs α est délicat, la quantité d'énergie émise lors de leur désintégration pouvant entraîner la radiolyse du radio-immunoconjugué. Pour ces raisons, seuls quelques émetteurs α ont été proposés comme candidats pour la RIT et leur utilisation est encore au stade de la recherche (Couturier *et al.* 2005).

Les radionucléides potentiellement intéressants pour la RIT sont présentés dans le tableau suivant :

Radionucléides	T1/2	Emission (thérapie)	Emax (MeV)	Parcours moyen ds les tissus (mm)	Modes de production
Iode-131	8,02 j	β^-	0,61	2	$^{235}\text{U}(n,f)$
Lutétium-177	6,71 j	β^-	0,49	1,5	$^{176}\text{Lu}(n,\gamma)^{177}\text{Lu}$
Yttrium-90	2,67 j	β^-	2,28	12	$\text{U}(n,f)^{90}\text{S} \rightarrow \text{Y}$
Cuivre-67	2,58 j	β^-	0,58	1,8	$^{67}\text{Zn}(n,p)^{67}\text{Cu}$
Rhénium-186	3,78 j	β^-	1,08	5	$^{185}\text{Re}(n,\gamma)^{186}\text{Re}$
Rhénium-188	17 h	β^-	2,12	11	$^{187}\text{W}(n,\gamma)^{188}\text{W} \rightarrow \text{Re}$
Astate-211	7,2 h	α	7,45	0,09	$^{209}\text{Bi}(\alpha,2n)^{211}\text{At}$
Actinium-225	10 j	α	8,78		$\text{U}(n,f)^{229}\text{Th} \rightarrow \text{Ac}$
Bismuth-213	47 mn	α	> 6	0,08	Générateur ($^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$)

Tableau 3: Propriétés physiques des radioéléments présentant un intérêt pour la RIT.

I.3.2. Les radionucléides utilisés en RIT

Les deux radionucléides les plus largement utilisés en RIT sont l'iode-131 et l'yttrium-90.

L'**iode-131** est le premier radionucléide à avoir été utilisé en RIT et jusqu'à des temps assez récents, était le seul candidat disponible. Il émet des particules β^- d'énergie $E_{\beta\text{max}}$ 606 keV (89,9 %) avec une période physique de 8 jours. Il présente de nombreux avantages : il est disponible facilement et à faible coût, sa liaison chimique aux protéines est aisée. Le principal inconvénient est l'émission de photons γ très énergétiques à 284 keV (6,2 %), 364 keV (81,6 %) et 637 keV (7,1 %) qui entraîne le dépôt des deux tiers de l'énergie à distance du point d'émission (Bardiès et Faivre-Chauvet, 1998) et oblige les patients à être soumis à des règles de radioprotection strictes. Le marquage des Ac à l'iode-131 est le plus souvent réalisé de façon directe mais il pose des problèmes de désiodation *in vivo*, à l'origine d'une irradiation tumorale insuffisante lorsque l'Ag cible est internalisé.

En comparaison, l'**yttrium-90** est un émetteur β - pur de forte énergie ($E_{\beta_{\max}}$ 2,2 MeV) qui implique moins de contraintes pour le patient et l'environnement. Il décroît en zirconium-90 avec une période de 2,7 jours. Son énergie est plus élevée que celle de l'iode-131 et 90 % de l'énergie est absorbée dans une sphère de 5,3 mm de rayon (Wagner *et al.* 2002). Ce parcours correspond à 100-200 diamètres cellulaires, ce qui permet à l'yttrium-90 d'atteindre les cellules non directement ciblées par un phénomène de "feu-croisé". La liaison de l'yttrium-90 à l'Ac doit être solide car l'yttrium libre se fixe au niveau osseux avec une forte affinité, pouvant entraîner une toxicité médullaire (Bao *et al.* 2003).

Le marquage est effectué de façon indirecte par l'intermédiaire d'un agent chélatant bifonctionnel. En fonction de l'agent chélatant, le relargage du métal et les phénomènes de trans-chélation vers des composants physiologiques du sérum sont plus ou moins importants. Différents auteurs ont montré que le DOTA (acide 1,4,7,10-tétraazacyclododecane-*N,N',N'',N'''*-tétraacétique) était l'agent chélatant macrocyclique qui permettait d'obtenir les chélates les plus stables *in vitro* et *in vivo* avec l'yttrium-90, comparativement au DTPA (acide diéthylènetriamine pentaacétique) ou à ses dérivés (Griffiths *et al.* 2003).

D'autres émetteurs β ont été testés cliniquement en RIT, notamment le **lutétium-177** et le **cuivre-67**. La production du cuivre-67 à haute activité spécifique pose problème. Cependant, par rapport à d'autres radiométaux, il présente l'avantage de ne pas se localiser dans les os, les reins ou le foie. Quant au lutétium-177, si sa chimie se rapproche de celle de l'yttrium-90, sa période physique (6,71 jours) est plus proche de celle de l'iode-131. Comme toutes les terres rares, il a tendance à se localiser dans l'os quand il est relargé dans la circulation (Brouwers *et al.* 2002).

Deux isotopes du rhénium (^{186}Re et ^{188}Re) ont également été testés en RIT. Ils présentent chacun des avantages et des inconvénients. Le

rhénium-186 est caractérisé par une énergie β moyennement élevée ($E_{\beta\max}$ 1,08 MeV) et une composante γ de 137 keV. Sa période de 3,8 jours est adaptée à la RIT. Son principal inconvénient est son mode de production par réaction (n, γ) , comme pour le lutétium-177, qui impose un flux de neutrons important pour aboutir à une bonne activité spécifique. Le **rhénium-188** peut être produit à partir d'un générateur ($^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$), ce qui permet d'obtenir des activités spécifiques élevées. C'est un émetteur β de forte énergie ($E_{\beta\max}$ 2,12 MeV) qui possède également une émission γ à 155 keV permettant l'imagerie. Sa période relativement courte (17 h) limite cependant son utilisation à des applications où la fixation du vecteur radiomarqué peut être réalisée rapidement.

Enfin, le **samarium-153**, utilisé actuellement dans le cadre des traitements palliatifs de métastases osseuses, pourrait aussi être utilisé en RIT. C'est un émetteur β/γ dont l'énergie β est comparable à celle de l'iode-131, mais dont la composante γ , moins énergétique (103 keV) peut permettre l'imagerie. Le samarium-153 est une terre rare, qui peut être facilement complexée, mais la stabilité *in vivo* des complexes n'est pas suffisante, ce qui entraîne une fixation non spécifique du samarium sur l'os, à proximité de la moelle osseuse (Bardiès et Faivre-Chauvet, 1998).

La thérapie avec des émetteurs α requiert une attention particulière car ils font l'objet de nombreuses recherches et sont prometteurs pour l'avenir (Mulford *et al.* 2005). Pourtant, peu de radionucléides émetteurs α ont été proposés pour la RIT car leur désintégration conduit rarement à un noyau fils stable. Des essais ont été effectués avec deux isotopes du bismuth, le **bismuth-212** ($E_{\beta\max}$ 8,78 MeV) et le **bismuth-213** ($E_{\beta\max}$ 6 MeV) obtenus respectivement à partir d'un générateur de thorium-228 et d'actinium-225. Leur principal inconvénient est leur période physique très courte ainsi que l'émission d'un rayonnement γ énergétique qui nécessite un blindage important du générateur. L'**astate-211**, produit de cyclotron, a

également été testé en RIT (Zalutsky 2005). Une procédure de conjugaison aux Ac en 2 étapes par l'intermédiaire du *N*-succinimidyl-3-(²¹¹At)astatobenzoate a été décrite (Zalutsky *et al.* 2001). Ces radionucléides ont des énergies de plusieurs MeV, avec de fort TEL (~ 100 keV/μm), contre 0,2 keV/μm pour les émetteurs β (Goldenberg 2002)

Enfin, certains chercheurs proposent de radiomarquer les Ac avec des **émetteurs β+**, afin de pouvoir apprécier le préciblage tumoral et estimer à la fois les doses d'irradiation reçues par la tumeur et les tissus sains à l'aide d'une caméra TEP (Tomographie à Emission de Positons). L'immuno-TEP permettrait de quantifier plus précisément le radio-immunoconjugué et de pouvoir ainsi ajuster précisément les doses efficaces pour la RIT (Verel *et al.* 2005). Des études pré-cliniques et cliniques ont été réalisées avec le gallium-68, le cuivre-64, l'yttrium-86, le brome-76, le zirconium-89 et l'iode-124, dont les demi-vies sont comprises entre 1,13 h pour le gallium-68 et 100,3 h pour l'iode-124.

I.3.3. Mode de production

Les caractéristiques reliées à la production déterminent la disponibilité en routine, à un coût raisonnable, d'activités importantes de radionucléides. Les modes de production des radionucléides intéressants pour la RIT sont indiqués dans le *tableau 3*.

Le mode de production définira bien souvent l'activité spécifique du radionucléide (MBq/mg). Les réactions (n,p) et (n,α) sont initiées par des neutrons rapides. Le radionucléide produit est différent de l'élément cible et peut être obtenu avec une très haute activité spécifique. Les réactions (n,γ) donnent un radionucléide qui est un isotope de celui qui constitue la cible. S'il n'est pas possible d'isoler ces différents isotopes, on obtiendra un

produit avec entraîneur dont l'activité spécifique est faible. Si la réaction est suivie d'une décroissance, le radionucléide recherché est le fils de celui obtenu par irradiation. Dans ce cas, ce radionucléide n'est plus un isotope de celui de la cible et peut de ce fait être obtenu sans entraîneur, c'est-à-dire avec une très haute activité spécifique. La production par générateur présente l'avantage d'une grande disponibilité avec en général une activité spécifique élevée.

I.3.4. Modalités de couplage

Pour leur utilisation pratique, les radionucléides doivent être facilement couplés aux vecteurs, directement ou par l'intermédiaire d'agents chélatants. La plupart des émetteurs α ayant des périodes courtes, ceci impose des méthodes de conjugaison aux Ac qui doivent être rapides. De plus, la liaison entre le radionucléide et le vecteur doit être la plus solide possible car l'effet de recul qui accompagne la désintégration peut conduire à la rupture trop prématurée de cette liaison. Le radionucléide peut alors se redistribuer librement dans l'organisme, augmentant ainsi la dose non spécifique. La quantité d'énergie émise lors d'une désintégration α par exemple, peut conduire à la radiolyse du vecteur, notamment lors des phases de marquage ainsi qu'à la production de radioéléments fils de période assez longue (cas de l'actinium-225). Il faut donc étudier la stabilité du radioimmunoconjugué pour chaque radionucléide et chaque technique de marquage. De plus, le radiomarquage ne doit pas influencer notablement sur les propriétés pharmacocinétiques du vecteur. Au final, il faut rechercher la possibilité d'une technique de marquage simple, efficace, reproductible permettant d'obtenir une forte activité spécifique ainsi que la meilleure stabilité du radioimmunoconjugué *in vitro* mais surtout *in vivo*.

I.3.5. Influence de la pathologie

La diversité des radionucléides disponibles permet d'orienter le choix en fonction des caractéristiques de la tumeur, et en particulier de sa taille et de sa nature.

Les tumeurs radiosensibles et facilement accessibles pourront être traitées avec des émetteurs β , voire α selon leur taille. Pour des tumeurs dont le diamètre est compris entre 1 mm et 1 cm, le choix d'un émetteur β pourra se faire en fonction de son énergie et du parcours des électrons. Le but étant d'obtenir la meilleure efficacité pour le moins d'effets secondaires possibles. Par exemple, l'yttrium-90, avec un parcours moyen dans les tissus de l'ordre de 12 mm, sera employé pour des tumeurs plus importantes que l'iode-131, pour lequel le parcours maximum n'est que 2 mm. Il faut également tenir compte de la fixation généralement hétérogène du vecteur. Ceci limite le potentiel des émetteurs α aux cibles de très petites tailles, voire aux cellules isolées (cancers hématologiques), à condition dans ce cas que l'on soit capable de cibler l'ensemble des cellules à détruire (Chatal et Hoefnagel 1999, Pèlerin *et al.* 2000).

Les tumeurs radiorésistantes et peu accessibles seront traitées avec des émetteurs β si leur taille est supérieure au millimètre et avec des émetteurs α dans le cas contraire. Dans le cas où des tumeurs de différentes tailles coexistent (par exemple, une tumeur et des métastases), la possibilité de combiner un émetteur de forte énergie avec un émetteur d'énergie plus faible (par exemple un émetteur β avec un α) a été avancée (O'Donoghue *et al.* 1995).

I.4. Applications cliniques

I.4.1. Les conditions de succès de la RIT

Compte tenu des considérations dosimétriques, radiobiologiques, ainsi que de l'hétérogénéité de distribution de l'Ac radiomarqué dans la tumeur en fonction de sa taille, de sa nature, de sa vascularisation et de l'expression variable de l'Ag cible, on comprend que les premières tentatives de RIT sur des tumeurs solides, qui s'adressaient à des tumeurs évoluées de grande taille, volontiers nécrotiques, aient été un échec (Chatal *et al.* 1992). La cible appropriée est constituée de tumeurs plutôt de petite taille, radiosensibles et accessibles, comme le montrent les résultats obtenus pour les tumeurs hématologiques, et en particulier les lymphomes malins non hodgkiniens (LMNH). La RIT a donc trouvé comme traitement de référence des cancers hématologiques, en association avec les autres modalités de traitement. Elle est en cours d'évaluation clinique pour le traitement de certaines tumeurs solides radiosensibles, comme les cancers bronchiques à petites cellules, ou à forte expression antigénique comme le cancer médullaire de la thyroïde. Enfin, des études pré-cliniques sont également en cours pour étudier l'efficacité de la RIT lorsqu'une administration locale est possible, comme la voie intrapéritonéale dans les cancers de l'ovaire ou la voie intrathécale dans les méningites carcinomateuses.

I.4.1.1. Efficacité en hématologie

Plusieurs Ac radiomarqués et différentes stratégies de traitement ont été étudiées pour les tumeurs hématologiques et la plupart ont montré une efficacité, notamment pour le traitement des LMNH. Par exemple, des Ac dirigés contre des Ag CD19, CD20, CD22, CD37 et HLA-DR ont été testés

avec de l'iode-131 ou de l'yttrium-90 ou, plus rarement, avec d'autres radionucléides comme le rhénium-186 ou le cuivre-67 (Ma *et al.* 2002, DeNardo *et al.* 1999). La plupart des études ont montré une efficacité sur les formes indolentes de LMNH et, plus récemment, sur le LMNH agressif.

1.4.1.2. Résultats dans les lymphomes malins non hodgkiniens

Le LMNH est une indication particulièrement pertinente de la RIT en raison de l'expression d'Ag de différenciation bien caractérisés et d'une radiosensibilité élevée. La maladie répond à l'immunothérapie passive avec des AcM non radiomarqués et elle est développée chez des patients immunodéprimés chez qui les injections peuvent être répétées.

Traditionnellement, la RIT repose sur le ciblage direct de l'Ag, c'est-à-dire que l'Ac est directement couplé au radionucléide, pour former le radioimmunocongué qui est administré en une seule étape. ¹³¹I-tositumomab (**Bexxar[®]**) et ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan (**Zevalin[®]**) sont actuellement les seuls Ac radiomarqués ayant obtenus l'AMM pour le traitement des cancers. Ils sont indiqués dans les formes réfractaires et résistantes de LNH folliculaires de bas grade et utilisent un Ac murin anti-CD20, Ag exprimé fortement à la surface des lymphocytes B, normaux et malins.

Bexxar[®] utilise une IgG2a murine froide (non radiomarquée) associée au même Ac marqué à l'iode-131 par couplage direct du radionucléide à une tyrosine de l'immunoglobuline. Après administration, la déshalogénéation de l'Ac a pour conséquence une concentration d'iode libre au niveau thyroïdien et gastrique, puis son élimination par voie urinaire. Ces phénomènes étant soumis à une grande variabilité inter-individuelle, l'utilisation de **Bexxar[®]** nécessite une étude dosimétrique préalable spécifique pour chaque patient, effectuée avec 185 à 370 MBq d'¹³¹I-tositumomab (Dillman *et al.* 2002).

Zevalin[®], est un Ac murin radiomarqué à l'yttrium-90 utilisé en association avec un Ac chimérique froid, le rituximab (Mabthera[®]). Contrairement au premier, le marquage de l'Ac est réalisé par l'intermédiaire d'un agent chélatant, le tiuxetan (dérivé du benzyl-DTPA), lié de façon stable par des ponts thiourées au fragment Fc de l'Ac. Très peu d'activité se retrouve dans les urines (Dillman *et al.* 2002). La vérification de la biodistribution de l'Ac peut-être effectuée avant traitement par l'Ac marqué à l'indium-111, mais il n'y a pas d'étude dosimétrique préalable pour le Zevalin[®], qui est administré sur la base du poids du patient (Krasner et Joyce 2001, Wiseman *et al.* 2001).

Les deux spécialités requièrent l'injection préalable au traitement de l'Ac froid correspondant afin d'améliorer le ciblage tumoral par saturation des sites non tumoraux : perfusion pendant 1h de 450 mg de tositumomab froid pour le Bexxar[®], alors que Zevalin[®] requiert une perfusion de 4 à 6 h de 250 mg/m² de rituximab. Cette perfusion a pour effet d'éliminer les lymphocytes B CD20+ circulants, qui sont opsonisés et captés par le système réticulo-endothélial. Une seconde perfusion d'Ac froid réalisée juste avant la dose thérapeutique a pour but de saturer les sites de liaison en périphérie de la tumeur, afin que l'Ac radiomarqué pénètre dans la tumeur.

Concernant l'efficacité de ces deux Ac radiomarqués, chez des patients atteints de lymphomes folliculaires de bas grade ou de lymphomes transformés résistants à la chimiothérapie, le Bexxar[®] a donné des taux de réponse globale de 65 à 71 % (versus 28 % pour la chimiothérapie antérieure) avec des activités non-myéloablatives, et de 86 % avec des activités myéloablatives nécessitant une greffe autologue de cellules souches (kaminski *et al.* 2000). Les taux de réponse complète sont de 30 à 34 % avec une durée médiane de rémission atteignant 5 ans.

Pour le Zevalin[®], l'injection 15 MBq/kg (0,4 mCi/kg) dans une étude randomisée de phase III comparant le Zevalin[®] et le rituximab (375 mg/m² x 4), a donné un taux de réponse objective de 80 % pour le Zevalin[®] versus 56 % avec le rituximab seul, et un taux de réponse complète de 30 % versus 16 %. Si l'efficacité de l'Ac radiomarqué par rapport à l'Ac froid montre une différence significative en termes de taux de réponse, curieusement, elle n'est pas significativement différente en termes de durée de réponse (Witzig *et al.* 2002).

Une étude similaire pour le Bexxar[®] et l'Ac murin froid correspondant a été réalisée. Des réponses ont déjà été observées chez des patients ayant reçu la dose nécessaire à l'étude dosimétrique, préalable au traitement par ¹³¹I-tositumomab. L'Ac froid lui-même a donc une action thérapeutique et contribue à la réponse anti-tumorale dans le traitement des LNH par certains Ac radiomarqués (Kaminski *et al.* 2000, Sharkey *et al.* 2005). Néanmoins, les résultats obtenus après injection d'Ac radiomarqués montrent le rôle thérapeutique supplémentaire apporté par l'irradiation à faible débit de dose.

Parallèlement, des études sont en cours pour évaluer l'efficacité du ¹³¹I-tositumomab en traitement de première intention dans les lymphomes de bas grade à un stade avancé. Les résultats sont très encourageants, non seulement en termes de réponse au traitement, mais aussi en termes d'apparition des effets secondaires, qui sont moindres qu'après chimiothérapie. Quant au Zevalin[®], des études cliniques sont en cours pour évaluer son efficacité dans les récurrences de lymphomes de haut grade (LMNH agressif) ainsi qu' en première ligne, en consolidation du traitement de référence, pour les bas grades. Il est également en cours d'évaluation pour le conditionnement à la greffe de moelle osseuse. Enfin, un essai clinique de phase II est actuellement réalisé, avec l'¹³¹I-rituximab (forme chimérique de l'Ac utilisé dans le Zevalin[®]). Des réponses objectives de 71 % ont été rapportées chez 35 patients, incluant 54 % de réponses complètes, avec une

durée de réponse de 20 mois. Les taux de réponse sont similaires à ceux rapportés avec ^{131}I -tositumomab et ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan, mais le traitement semble mieux toléré (Turner *et al.* 2003).

Les résultats de la RIT sur le LMNH, évoqués jusqu'à présent, concernent une seule injection d'Ac radiomarké. Une étude reporte les résultats obtenus après réinjection du ^{131}I -tositumomab : 9 des 16 patients réinjectés après rechute du traitement, répondent à la deuxième injection, dont 5 sont en réponse complète (Kaminski *et al.* 2000). D'autres reportent l'efficacité de la chimiothérapie ou de la radiothérapie après un traitement non myéloablatif par un Ac radiomarké (Zevalin[®]), sans l'apparition d'effets secondaires supplémentaires (Ansell *et al.* 2002, Schilder *et al.* 2004).

D'autres AcM sont en cours d'évaluation pour le traitement du LMNH et sont dignes d'intérêt. L'**épratuzumab (ou hLL2)** est un Ac humanisé anti-CD22 marqué à l'yttrium-90 ou à l'iode-131 (Sharkey *et al.* 2003). Du fait, de sa rapide internalisation dans les cellules, de faibles doses seraient efficaces. Contrairement aux autres Ac radiomarkés (Bexxar[®] et Zevalin[®]), la forme humanisée de l'hLL2 permettrait des injections répétées avec un risque immunogène atténué (Griffiths *et al.* 2003). L'**Oncolym** ou **Lym-1** est un Ac murin, marqué au cuivre-67 ou à l'iode-131, qui reconnaît l'Ag HLA-DR10 largement exprimé à la surface de la plupart des lymphocytes B malins. L' ^{131}I -Lym-1 a donné une réponse durable chez 57 % des patients traités, incluant 7 réponses complètes sur 21 (DeNardo *et al.* 1999).

Au total, dans les LMNH, les différents essais de RIT montrent une réponse élevée et durable, même après rechute, supérieure à celle obtenue avec les Ac froids. De faibles doses peuvent être efficaces, même si les fortes doses suivies d'une greffe de cellules souches semblent plus efficaces que les doses non myéloablatives. Les patients présentant des tumeurs peu

importantes, un faible envahissement médullaire et une absence de splénomégalie répondent mieux. L'yttrium-90 apporte une dosimétrie plus favorable que l'iode-131, même s'il n'est pas le radionucléide idéal pour les tumeurs hématologiques. Il a été montré qu'avec des radionucléides moins énergétiques, comme le cuivre-67 ou le samarium-153, la RIT pourrait étendre ses indications aux leucémies et autres tumeurs hématologiques envahissant la moelle osseuse. Dans cette optique, les émetteurs α , notamment le bismuth-213, sont les candidats les plus appropriés et plusieurs études sont en cours dans le traitement par exemple de la leucémie myéloïde (Jurcic 2001).

1.4.1.3. Effets indésirables

a/ La toxicité

Bexxar[®] et Zevalin[®] ont une toxicité dose-dépendante, principalement au niveau de la moelle osseuse, entraînant une sévère myélosuppression, généralement réversible. Une thrombocytopénie, une granulocytopénie et plus rarement une anémie peuvent apparaître, généralement plus prononcées après un traitement par ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan que par ¹³¹I-tositumomab (Dillman *et al.* 2002). Le nadir est généralement 7 à 8 semaines après l'injection de Zevalin[®]. La plupart des patients traités par Bexxar[®] et Zevalin[®] doivent donc subir une transfusion de plaquettes (respectivement 22 % et 15 %), de filgrastim (respectivement 13 % et 12 %), d'érythropoïétine (respectivement 8 % et 7 %). Le statut initial de la moelle osseuse du patient est un facteur important pour la tolérance du traitement. Lorsque des doses myéloablatives sont utilisées, des greffes de moelle osseuse ou de cellules souches périphériques doivent être pratiquées.

Comme pour la chimiothérapie, les effets secondaires de la RIT peuvent apparaître à long terme. Sur 5 études cliniques effectuées avec le

Zevalin[®], 349 patients au total, 3 cas de leucémie myéloïde ont été rapportés ainsi que 2 cas ayant un syndrome myélodysplasique. Avec le Bexxar[®], 32 syndromes myélodysplasiques ont été rapportés sur 995 patients traités, après un temps moyen d'apparition de 27 mois. La probabilité de développer une leucémie myéloïde et/ou un syndrome myélodysplasique chez des patients atteints de LMNH et traités avec des doses myéloablatives d'Ac radiomarqués anti-CD20 (n=27) est de 0,076 à 8 ans. Elle est de 0,086 à 7 ans pour ceux ayant reçu une chimiothérapie à forte dose (n=98). Ces résultats montrent que le risque de développer un cancer secondaire à long terme n'est pas supérieur après la RIT qu'après une chimiothérapie (Gopal *et al.* 2003). De plus, il est difficile d'attribuer à la RIT tous les cas de myélodysplasie dans la mesure où les patients ont en général été traités par chimiothérapie préalable.

Avec Bexxar[®], la toxicité dose-dépendante non hématologique peut se manifester par une insuffisance cardio-pulmonaire. De plus, en raison de la déshalogénéation observée avec le ¹³¹I-tositumomab, les patients doivent bénéficier d'un blocage thyroïdien 1 jour avant traitement au Bexxar[®] et jusqu'à 15 jours après. On peut voir apparaître malgré tout une hypothyroïdie faible à modérée, avec une augmentation de la TSH dans 60 % des cas.

En dehors de la toxicité hématologique, les effets secondaires rapportés suite à l'administration de Zevalin[®] sont faibles à modérés incluant asthénie, nausées, infections, frissons, fièvres et douleurs abdominales (Wagner *et al.* 2002).

Il faut également tenir compte de la toxicité due aux perfusions d'Ac froids qui, en éliminant les lymphocytes B, entraînent la libération de cytokines. On peut alors observer plusieurs effets indésirables, fréquents à la première perfusion (70 % des cas): nausées, frissons, tachycardie, bouffées de chaleur, hypotension, rash cutané, prurit et diarrhées. Ils peuvent apparaître 30 minutes à 2 heures après le début de la perfusion.

b/ Le problème des HAMA

Avec les AcM d'origine murine, l'incidence de l'apparition chez les patients d'Ac anti-immunoglobuline de souris, les HAMA (*cf* § I.1.2.2.), n'est jamais nulle et peut dépasser 50 %. Ce taux varie en fonction des Ac (murins, chimériques ou humanisés), de leur forme (Ac entiers ou fragments) et du nombre d'injections. Ces HAMA apparaissent surtout en cas d'injections supérieures au mg ou d'injections répétées, principalement chez les patients naïfs de traitement, les chimiothérapies successives entraînant souvent une immunodépression.

Si la présence des HAMA dans le sérum n'a jamais à ce jour entraîné de manifestations cliniques décelables, elle a cependant trois inconvénients. D'une part, elle peut interférer dans les dosages immunologiques permettant le suivi du patient. D'autre part, elle entraîne une modification de la biodistribution et du ciblage de l'Ac radiomarqué, rendant très incertain l'efficacité thérapeutique du traitement. Enfin, elle limite fortement le succès d'une nouvelle injection d'Ac radiomarqués (Vuillez 2000). Certains auteurs ont montré que l'association du Bexxar[®] à la fludarabine en première ligne dans le LMNH folliculaire ou transformé, entraîne moins d'effets indésirables, aussi bien au niveau de la toxicité hématologique que pour l'apparition des HAMA (Goldenberg 2002). Concernant les études avec Lym-1, Ac d'origine murine, une étude a montré que la médiane de survie est supérieure chez les patients HAMA-positifs (18 mois) par rapport à ceux qui n'ont pas développé de HAMA (9 mois). Les auteurs suggèrent une éventuelle contribution des HAMA dans la réponse anti-tumorale (De Nardo *et al.* 1999).

Les Ac chimériques réduisent la fréquence des HAMA mais n'empêchent pas l'apparition d'Ac anti-Fv. De même, il faut souligner la possibilité d'une immunisation contre les séquences CDR des Ac humanisés. On parle alors de HACA (Human Anti-Chimérique Antibodies)

et de HAAA (Human Anti-Human Antibodies) dirigés contre la partie murine de ces Ac. A l'avenir, le développement d'Ac totalement humains produits *in vitro* à partir de bibliothèques de phages permettra sans doute de s'affranchir de ces problèmes d'immunogénicité.

I.4.2. Résultats dans les tumeurs solides

Bien que la RIT ait montré tout son intérêt dans le traitement des lymphomes, elle reste à améliorer en ce qui concerne le traitement des tumeurs solides. Cliniquement, différentes tentatives ont été réalisées sur les pathologies suivantes : cancers colorectaux, ovariens, pulmonaires à petites cellules, cancer médullaire de la thyroïde (CMT), adénomes prostatiques et cancers cérébraux. Plusieurs radionucléides, formes d'Ac, méthodes permettant d'améliorer le ciblage ou la pénétration tumorale ont été testés et certaines approches s'avèrent prometteuses. Mais actuellement aucun Ac radiomarqué n'a montré une efficacité suffisante pour traiter les tumeurs solides ou leurs métastases à un stade avancé. Ces résultats s'expliquent probablement en partie par la taille importante des masses tumorales traitées et la radiorésistance élevée de ces tumeurs.

I.4.2.1. Immunociblage direct

Toutes les études de biodistribution, réalisées après l'injection I.V. de nombreux AcM directement radiomarqués, ont montré des valeurs de fixation tumorale faibles ou très faibles (inférieures à 0,02 % de l'activité injectée est retrouvée par gramme de tumeur (Chatal 1998). Cette faible fixation tumorale est en partie expliquée par les caractéristiques physiologiques des tumeurs solides qui les rendent résistantes au traitement : taille importante, faible radiosensibilité, vascularisation anormale, expression antigénique variable, pression interstitielle élevée

etc... (Jain et Baxter 1988). Jusqu'à présent, la fréquence des réponses objectives ne dépassait pas 5 % dans les différentes études de phase I/II rapportées dans la littérature utilisant des AcM variés marqués à l'iode-131 ou à l'yttrium-90 (Goldenberg 2002). La population des patients traités était cependant difficile en termes de réponse thérapeutique puisque la majorité des essais ont été pratiqués chez patients dont la maladie était avancée et qui avaient rechuté, parfois plusieurs fois, après traitement par chimiothérapie.

Dans le cancer colorectal métastatique, les résultats ont été longtemps décevants, sans doute en raison du caractère souvent nécrotique et mal vascularisé de ces tumeurs. Il semble néanmoins que des résultats encourageants puissent être obtenus sur les formes micrométastatiques exprimant l'ACE (Ag carcino-embryonnaire) ou le TAG-72 (Tumor Associated Glycoprotein).

Les cancers du système nerveux central, et notamment les glioblastomes, sont une autre cible potentielle de la RIT compte tenu de l'impasse thérapeutique dans laquelle se trouvent rapidement les patients. Les injections sont réalisées par voie locorégionale, avec un Ac anti-ténascine marqué à l'iode 131, directement dans le site tumoral par l'intermédiaire des cavités créées par la chirurgie de résection. Parmi 74 cas de glioblastomes, le taux de réponses n'a été que de 17,8 % pour les tumeurs volumineuses, avec une médiane de 17 mois, mais de 66,6 % pour les petites lésions avec une médiane de survie de 25 mois. Aucune toxicité sérieuse n'a été déplorée. La même équipe a mené une étude pilote avec le même Ac marqué à l'yttrium 90 (Riva *et al.* 1999).

D'autres traitements locorégionaux ont été envisagés par voie intrapéritonéale pour le cancer de l'ovaire. Des essais de phase I-II ont montré des résultats tout à faits variables. Mais dans tous les cas, ce sont là encore les micrométastases qui représentent la cible potentiellement intéressante.

D'autres études sont en cours dans le cancer du rein métastatique, le cancer du sein, le neuroblastome, les hépatocarcinomes et les cholangiocarcinomes, ainsi que dans le mélanome et le cancer de la prostate (Vuillez 2000).

1.4.2.2. Immunociblage indirect

Avec les difficultés rencontrées pour le ciblage direct, le challenge de traiter les tumeurs solides a suscité plusieurs approches originales visant à augmenter la dose délivrée à la tumeur pour atteindre des doses tumoricides tout en épargnant les tissus sains. Les techniques de préciblage tentent de diminuer la radioactivité circulante en améliorant la clairance des AcM radiomarqués et en séparant la phase de reconnaissance de l'Ag de celle du ciblage du radionucléide (Goodwin *et al.* 1988). Différentes approches en 2 ou 3 étapes ont été développées utilisant le système avidine-biotine, des AcM bispécifiques (système A.E.S.), des oligonucléotides... pour ne citer que les principaux (Gruaz-Guyon et Barbet 2005).

a/ Système avidine-biotine

Le préciblage semble prometteur avec des systèmes de haute affinité comme le système de reconnaissance avidine ou streptavidine-biotine. Plusieurs schémas ont été envisagés (*figure 4*):

a) Une première possibilité consiste à injecter un Ac biotinylé suivi de la streptavidine marquée. Cette technique améliore significativement les rapports tumeurs/tissus sains mais elle n'est pas optimale car la streptavidine marquée est rapidement catabolisée et excrétée.

b) Une autre possibilité consiste à injecter successivement un complexe Ac-avidine et la biotine marquée. Cette technique a rapidement été améliorée par une étape de chasse avec de l'albumine biotinylée permettant d'éliminer rapidement les complexes Ac-avidine circulants. Ce schéma en 3 temps a été expérimenté avec l'Ac NR-LU-10 dans le cancer colorectal et dans le cancer de la prostate. Des activités élevées de biotine

marquée à l'yttrium-90 ont été injectées, allant jusqu'à 5,18 GBq/m², sans avoir recours à la greffe de moelle, mais une toxicité intestinale et rénale importante a été observée (*Breitz 2000*).

c) Un troisième schéma utilise un Ac biotinylé suivi de l'injection d'avidine qui supprime l'excès d'Ac du fait de sa clairance rénale rapide. La streptavidine est injectée dans un 3^{ème} temps pour venir se fixer sur l'Ac biotinylé préciblé. La dernière étape est l'injection de la biotine marquée. Cette technique a été testée chez des patients atteints de gliome de haut grade avec de l'⁹⁰Y-DOTA-biotine et un Ac anti-ténascine biotinylé en injection locorégionale (*Paganelli et al. 1999*). Le taux de réponse objective est de 25 % après 2 traitements, sans toxicité hématologique mais une neurotoxicité dose-dépendante a été observée. Au final, les rapports tumeur/tissus sains sont satisfaisants mais l'optimisation des différentes étapes peut s'avérer difficiles (*Paganelli et al. 2003*).

Figure 4 : Représentation schématique de techniques de préciblage en 2 et 3 étapes utilisant le système avidine-biotine (Sharkey et al. 2005).

b/ Système A.E.S.

La technique A.E.S. (Affinity Enhancement System) dont le principe est représenté sur la *figure 5*, est une technique de préciblage qui a atteint un stade avancé de développement clinique. Elle repose sur l'utilisation d'un haptène bivalent radiomarqué et d'un AcM bispécifique dont un bras

reconnaît un Ag exprimé par les cellules tumorales et l'autre une molécule de bas poids moléculaire (haptène). Dans un premier temps, l'AcM est injecté et se fixe sur la cible par son site de liaison anti-Ag tumoral. Après un délai suffisant pour que les AcM non fixés soient éliminés de la circulation sanguine et des tissus sains, le haptène radiomarqué est injecté. Du fait de sa petite taille, il va circuler rapidement vers sa cible, c'est-à-dire, l'AcM prélocalisé sur la tumeur avant d'être éliminée de la circulation. La bivalence de l'haptène lui permet de se fixer sur deux AcM prélocalisés, ce qui augmente la stabilité du complexe (Le Doussal *et al.* 1989).

Quin
d'acromies
sont réservés pour

Figure 5 : Représentation schématique d'une technique de préciblage en 2 étapes utilisant un AcM bispécifique et un haptène bivalent radiomarqué par l'intermédiaire d'un agent chélatant, le DOTA (Sharkey et al. 2005).

Plusieurs études ont été réalisées avec le système en 2 temps proposé par Immunotech, principalement dans le cancer pulmonaire à petites cellules et dans le CMT. Il utilise l'injection séquentielle d'un Ac bispécifique anti-ACE x anti-DTPA-indium (F6 x 734) et d'un haptène bivalent di-DTPA-tyrosine-lysine marqué à l'indium-111 pour le diagnostic et à l'iode-131 en thérapie (Barbet *et al.* 1999, Vuillez *et al.* 1999, Kraeber-Bodéré *et al.* 1999).

Les résultats de ces deux essais sont suffisamment encourageants pour justifier la poursuite des études cliniques, tant dans le CMT que dans le cancer bronchique à petites cellules. Dans les essais actuels sur le CMT, pour des doses de 1,2 GBq/m², la toxicité est essentiellement hématologique et surtout liée à l'envahissement médullaire. L'efficacité est en cours d'évaluation mais l'on observe déjà une stabilisation des marqueurs biologiques et de la croissance tumorale.

I.4.3. Orientations futures de la RIT

Les indications, nous l'avons vu, sont les localisations diffuses et microscopiques (principalement la maladie résiduelle) de tumeurs de petite taille très radiosensibles et pour lesquelles la chimiothérapie est soit inopérante, soit contre-indiquée. Mais la RIT n'est pas pour autant exclusive des autres approches. Son utilisation en association avec d'autres modalités de traitement comme la chimiothérapie ou la radiothérapie externe pourrait au contraire potentialiser son efficacité sur les tumeurs solides. L'utilisation d'agents radiosensibilisants, comme le paclitaxel, a été évoquée (Kraeber-Bodéré *et al.* 2002). D'autres substances encore au stade pré-clinique, comme les anti-angiogéniques, permettraient de modifier les parties hypoxiques des tumeurs et leur accessibilité vis-à-vis de l'AcM radiomarqué (Thorpe 2004). L'association de la RIT à la chimiothérapie fait l'objet d'études, en particulier avec le 5FU, mais aussi avec l'interféron qui augmenterait l'expression de l'Ag cible. Certaines études expérimentales sont également en faveur d'un effet synergique de la RIT et de la radiothérapie externe en complément, dirigée sur les sites macroscopiques (Vuillez 2000).

Enfin, le marquage par des émetteurs α , dont nous avons vu les avantages liés à leur haut pouvoir d'ionisation dans la matière biologique,

paraît devoir être sérieusement envisagé à moyen terme (Zalutski *et al.* 2001, Mulford *et al.* 2005).

Outre les progrès de la technique elle-même, évoqués avec les méthodes de préciblage (Barbet *et al.* 1999, Breitz *et al.* 2000), il paraît clair que la RIT, pour s'imposer en cancérologie, devra d'une part trouver des indications bien définies et d'autre part s'intégrer à des schémas thérapeutiques multi-modalités. Les schémas proposés actuellement concernent essentiellement des administrations uniques de fortes activités, mais, une fois résolu le problème de l'immunogénicité, l'avenir passe certainement par un fractionnement et des injections répétées (O'Donoghue *et al.* 2000).

En ce qui concerne le traitement des tumeurs solides, après des premiers résultats décevants, la RIT apparaît néanmoins comme une modalité intéressante dès lors qu'on se limite aux cibles de petite taille. Les techniques de préciblage comme l'A.E.S. ont démontré un effet positif en termes de réduction de l'irradiation des tissus sains, donc de la toxicité principalement hématologique, mais sans accroître la fixation tumorale par rapport au ciblage direct (Gautherot *et al.* 2000).

I.4.4. Limites de la RIT pour les tumeurs solides et intérêt des liposomes

La quantité de radioactivité que l'on peut fixer par haptène (activité spécifique) constitue un des facteurs limitants du système A.E.S. Actuellement, les haptènes développés et les radionucléides disponibles ne permettent pas d'obtenir des activités spécifiques supérieures à 70 MBq/nmol. Le développement de la RIT passe 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 performante est essentielle et semble réalisable avec l'utilisation de liposomes radiomarqués.

L'intérêt des liposomes est de pouvoir vectoriser de plus fortes activités que ne peuvent le faire les AcM ou les haptènes radiomarqués, soit par inclusion de radionucléides dans la membrane lipidique soit par encapsulation dans l'espace interne. Si l'inclusion de radionucléides au sein de liposomes a été décrite, essentiellement à des fins diagnostiques (Proffitt *et al.* 1983, Phillips 1999), il est tout à fait envisageable d'utiliser des radionucléides à visée thérapeutique et d'imaginer un système de ciblage en deux temps analogue à celui utilisé dans l'A.E.S. (Cao et Suresh 2000). Des liposomes porteurs de radioactivité peuvent être dirigés spécifiquement vers des cellules cibles en liant de façon covalente un haptène aux lipides, et en utilisant des AcM bispécifiques. Les objectifs 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 le liposome. Dans ce contexte, les liposomes, qui jusque-là étaient spécialement développés pour le ciblage de médicaments, vont-ils pouvoir représenter une modalité de radiothérapie nouvelle et originale des cancers ?

II. LES LIPOSOMES

II.1. Généralités

II.1.1. Historique

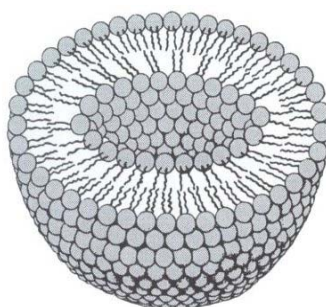
L'introduction des liposomes dans l'arsenal thérapeutique, en cancérologie et en infectiologie, représente l'aboutissement d'efforts considérables déployés en recherche et développement. Les liposomes ont été décrits par Bangham, il y a plus de trente ans, et les premières recherches sur l'encapsulation de principes actifs et leur administration datent de plus de vingt ans. Un tel décalage dans le temps rend bien compte des difficultés scientifiques et techniques rencontrées pour qu'un concept thérapeutique aussi simple puisse devenir une réalité en clinique humaine.

Les liposomes ont d'abord été un outil d'étude précieux pour les physiciens et les physico-chimistes dans la compréhension du comportement des composés amphiphiles en solution. Ils furent ensuite utilisés par les biologistes comme modèles pour l'étude de la perméabilité cellulaire avant d'être proposés, par la suite, comme vecteurs intracellulaires de substances médicamenteuses. Les applications des liposomes sont maintenant très variées dans des secteurs aussi différents que l'agro-alimentaire, la cosmétique et la pharmacie.

Il existe plusieurs sociétés de biotechnologies qui travaillent exclusivement avec des liposomes pour le développement de plusieurs traitements: antibiotiques, anti-tumoraux, anti-asthmatiques, thérapie génique, vaccination...

II.1.2.Définition

Les liposomes sont de petites vésicules sphériques dont la paroi est formée d'une ou plusieurs bicouches, le plus souvent de nature phospholipidique, renfermant un espace interne aqueux (*figure 6*). Leur intérêt réside principalement sur la possibilité de transporter des substances, soit par inclusion dans la membrane lipidique, soit par encapsulation dans l'espace interne. Il est donc possible, grâce aux liposomes, de vectoriser des principes actifs de solubilité très différente (hydrophile, amphiphile ou lipophile). La connaissance de leur comportement *in vivo* a permis ensuite leur utilisation dans le traitement de certaines pathologies.



*Figure 6 : Structure d'un liposome formé
d'une bicouche de phospholipides (<http://dadairs.com>)*

Le liposome n'est pas une simple solution à un problème galénique (solubilité, stabilité...) mais un système de délivrance qui va déterminer le devenir *in vivo* du principe actif qu'il véhicule. Ils ont l'avantage d'être à la fois non toxiques et biodégradables, du fait de leur composition en phospholipides qui sont des constituants naturels des membranes biologiques.

II.1.3. Morphologie des liposomes

Les liposomes sont des systèmes constitués de molécules amphiphiles bicaténaires (deux chaînes hydrocarbonées et une tête polaire) dont la représentation schématique est présentée ci-dessous. Les molécules lipidiques s'organisent selon une certaine conformation dans l'espace. Une équation permet de rendre compte de l'arrangement et de prédire la formation d'agrégats en milieu aqueux (Lasic 1998).

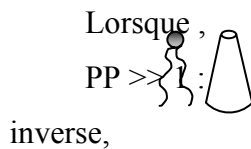
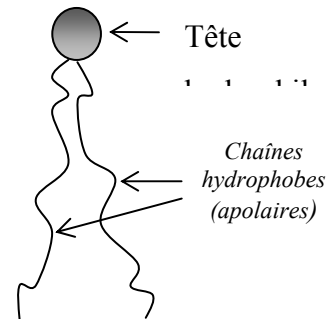
« Packing parameter » $PP = V / (aLc)$

Trois paramètres sont à prendre en compte :

V : volume de la partie hydrophobe

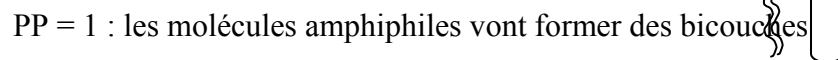
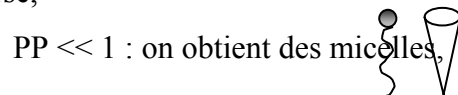
Lc : longueur de la chaîne hydrophobe

a : surface occupée par la tête polaire



on obtient des phases hexagonales ou micelles

inverse,



La formation de bicouches est caractéristique des molécules amphiphiles avec un équilibre entre les têtes hydrophiles et les queues hydrophobes. Quand il y a une prépondérance de têtes hydrophiles, il y a formation de structures micellaires dans lesquelles les chaînes hydrocarbonées s'orientent vers l'intérieur et les têtes polaires vers

l'extérieur. A l'inverse, une prépondérance de queues hydrophobes entraîne la formation de micelles inverses (*figure 7*).

L'organisation supra moléculaire la plus intéressante correspond à $PP = 1$, formation des liposomes. Mais la variation de certains paramètres (pH, température du milieu) peut entraîner un changement de conformation vers $PP \gg 1$.

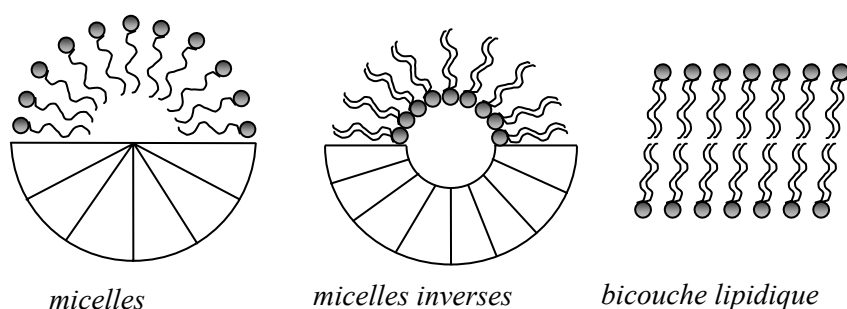


Figure 7: Représentation schématique des différents assemblages possibles de phospholipides.

II.1.4. Composition

La matière première des liposomes comprend généralement un ou plusieurs phospholipides, éventuellement un stérol et une substance ionique lorsque les liposomes souhaités doivent avoir une charge positive ou négative. Les caractéristiques des liposomes dépendent de leur mode de fabrication et du choix des composants de la bicouche, notamment des phospholipides, qui influencent fortement la rigidité (ou la fluidité) ainsi que la charge de la bicouche. Ils ont l'avantage d'être atoxiques et facilement dégradés, car ils font partie des constituants naturels des membranes biologiques.

Des phospholipides saturés à longue chaîne comme le dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) forment une bicouche rigide et donc imperméable. A l'inverse, les phospholipides insaturés d'origine naturelle (comme les phosphatidylcholine de soja ou du jaune d'œuf) forment des bicouches plus perméables mais aussi moins stables (*tableau 4*).

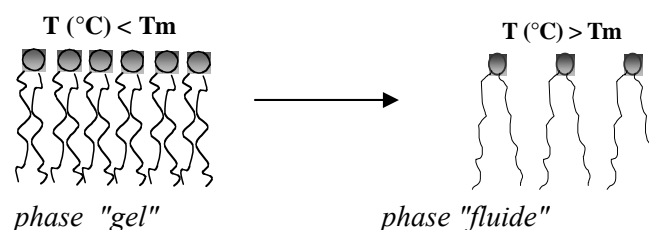
L'addition de phospholipides chargés négativement ou positivement (10 à 20 % de la composition molaire ou "mol %") permet de diminuer les phénomènes d'agrégation des vésicules entre elles. En effet, l'addition de telles substances anioniques ou cationiques confère aux feuillettes une charge électrique qui tend à les faire se repousser. Il en résulte un accroissement des espaces interlamellaires avec pour conséquence un pouvoir de captation plus grand pour les substances hydrophiles. Il est possible de charger les liposomes négativement en incorporant dans la bicouche de la phosphatidylsérine, du phosphatidylinositol, du phosphatidylglycérol ou de l'acide phosphatidique. La charge positive est généralement apportée par la stéarylamine (Weinstein et Leserman, 1984).

<i>Lipides</i>	<i>Abréviation</i>	<i>carbones /saturation</i>	<i>Charge pH 7,4</i>	<i>Tm (C)</i>
Lipides naturels neutres				
<i>Phosphatidylcholine de jaune d'œuf</i>	<i>EPC(egg PC)</i>		0	-15 ± 7
<i>Phosphatidylcholine de soja</i>	<i>SPC</i>		0	-15 ± 7
Lipides synthétiques neutres				
<i>Dilauryloyl phosphatidylcholine</i>	<i>DLPC</i>	12:0	0	-1
<i>Dimyristoyl phosphatidylcholine</i>	<i>DMPC</i>	14:0	0	23
<i>Dipalmitoyl phosphatidylcholine</i>	<i>DPPC</i>	16:0	0	41
<i>Distéaroyl phosphatidylcholine</i>	<i>DSPC</i>	18:0	0	55
<i>Dioleoyl phosphatidylcholine</i>	<i>DOPC</i>	18:1	0	-20
<i>Dimyristoyl phosphatidylthanolamine</i>	<i>DMPE</i>	14:0	0	50
<i>Dipalmitoyl phosphatidylthanolamine</i>	<i>DPPE</i>	16:0	0	63
<i>Distéaroyl phosphatidylthanolamine</i>	<i>DSPE</i>	18:0	0	74
<i>Dioleoyl phosphatidylthanolamine</i>	<i>DOPE</i>	18:1	0	-16
Lipides synthétiques chargés				
négativement				
<i>Dilauryloyl phosphatidylglycérol</i>	<i>DLPG</i>	12:0	-1	4
<i>Dimyristoyl phosphatidylglycérol</i>	<i>DMPG</i>	14:0	-1	23
<i>Dipalmitoyl phosphatidylglycérol</i>	<i>DPPG</i>	16:0	-1	41
<i>Distéaroyl phosphatidylglycérol</i>	<i>DSPG</i>	18:0	-1	55
<i>Dioleoyl phosphatidylglycérol</i>	<i>DOPG</i>	18:1	-1	-18
<i>Dimyristoyl acide phosphatidique, pH 6</i>	<i>DMPA</i>	14:0	-1	51
<i>Dimyristoyl acide phosphatidique, pH 9</i>	<i>DMPA</i>	14:0	-2	45
<i>Dipalmitoyl acide phosphatidique, pH 6</i>	<i>DPPA</i>	16:0	-1	67
<i>Dipalmitoyl acide phosphatidique, pH 9</i>	<i>DPPA</i>	16:0	-2	58
<i>Dipalmitoyl phosphatidylsérine</i>	<i>DPPS</i>	16:0	-1	51
Lipides chargés positivement				
<i>Stéarylamine</i>	<i>SA</i>	18:0	+1	-
<i>di-Oleoyloxytriméthylammonio propane</i>	<i>DOTAP</i>	18:1	+1	-

Tableau 4 : Principaux phospholipides utilisés dans la formulation des liposomes (Avanti® Polar Lipids / Fattal et al. 1993).

La fluidité de la bicouche lipidique varie avec la température. Les phospholipides sont caractérisés par leur **température de transition de phase (T_m)**, qui doit être prise en compte lors de la préparation des liposomes et qui influence leur comportement *in vivo* (tableau 4). En effet, la température de transition de phase des phospholipides détermine leur fluidité membranaire et influe notablement sur la stabilité des liposomes durant leur stockage et au sein des liquides biologiques.

En dessous de la T_m, les molécules de phospholipides s'arrangent suivant une configuration solide (phase "gel") où les chaînes lipidiques sont ordonnées, parallèles entre elles et peu mobiles. Au-dessus de cette température de transition de phase, l'état devient plus désordonné et les chaînes hydrophobes sont animées de mouvements plus ou moins pendulaires (phase "fluide").



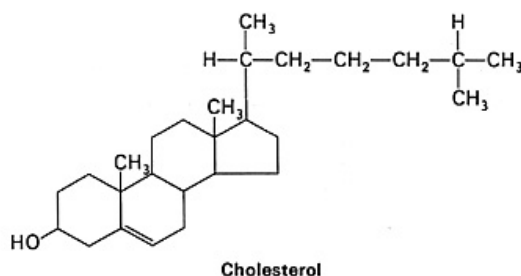
La T_m augmente avec la longueur des chaînes carbonées des phospholipides et diminue plus elles sont insaturées.

Phospholipides	T _m (C)
DMPC (14:0)	23
DPPC (16:0)	41
DSPC (18:0)	55
DOPE (18:1)	-16

Les liposomes ne se forment que si la proportion d'eau est suffisante et si la température de cette eau est supérieure à la T_m des phospholipides utilisés. En cas de mélange de phospholipides, la température de la phase aqueuse doit être supérieure à la T_m la plus élevée.

II.1.4.2. Les stéroïdes

Le stérol le plus employé est le cholestérol (ajouté généralement à raison de 30 % dans la composition lipidique). Il diminue la fluidité de la bicouche lipidique car la structure rigide du stéroïde limite les mouvements des chaînes des acides gras. Il diminue ainsi la perméabilité membranaire pour les molécules hydrosolubles et favorise ainsi la stabilité en milieu sérique (Kirby *et al.* 1980, Vemuri *et al.* 1995). Les liposomes sans cholestérol ont tendance à interagir avec les protéines du sang comme l'albumine, la transferrine ou les macroglobulines.



II.1.5. Formulation et stabilisation des liposomes

La stabilisation de la paroi peut être obtenue de différentes façons. L'utilisation de lipides synthétiques possédant une T_m élevée permet de diminuer considérablement la perméabilité des liposomes à 37°C. La formulation de liposomes possédant des lipides chargés permet d'obtenir des vésicules possédant une charge de surface limitant ainsi les phénomènes d'agrégation et de fusion des liposomes par répulsion électrostatique. Comme nous venons de le voir, l'incorporation de cholestérol confère une stabilité accrue par augmentation de la rigidité de la paroi des liposomes (Kirby *et al.* 1980, Vemuri *et al.* 1995, Fattal *et al.* 1993)

Le greffage de polymères à la surface des liposomes permet de diminuer les interactions avec le milieu environnant par répulsion stérique. Le polymère joue alors un rôle protecteur en se déployant et en balayant la surface des liposomes empêchant alors les contacts inter-particulaires et la fixation de molécules à sa surface. La liaison covalente de polyéthylène glycols (PEG) par exemple à la surface des liposomes leur confère une certaine hydrophilie qui améliore nettement leur pharmacocinétique *in vivo* (Woodle 1995, Srinath et Diwan 1994).

Enfin, lorsque les liposomes doivent subir une lyophilisation, les agents cryoprotecteurs, comme le saccharose, jouent un rôle majeur dans la stabilisation physique des liposomes limitant les phénomènes d'agrégation, de fusion et de perméabilité. Indépendamment de la formulation, la stabilité physique des liposomes dépend aussi de la structure de la paroi, de la taille des liposomes et enfin du procédé de préparation (Fattal *et al.* 1993).

II.1.6. Classification

Il existe différentes classes de liposomes. Leur classification et leur dénomination se fait le plus souvent selon des critères structuraux (taille, lamellarité), mais on peut aussi les classer selon des critères plus fonctionnels (composition et leur application *in vivo*) ou même, selon leur méthode de préparation.

II.1.6.1. Classification selon des critères morphologiques

Les différents liposomes se distinguent selon leur taille mais aussi selon leur nombre de bicouches lipidiques ou lamellarité (*tableau 5*). Plusieurs abréviations sont utilisées pour les désigner d'après ces deux critères :

MLV	Multilamellar Large Vesicle	> 0,5 μm
OLV	Oligolamellar vesicle	0,1-1 μm
SUV	Small Unilamellar Vesicle	20-100 nm
LUV	Large Unilamellar Vesicle	> 100 nm
GUV	Giant Unilamellar Vesicle	> 1 μm
MVV	Multi Vesicular Vesicle	généralement > 1 μm

- **Les liposomes multilamellaires** sont des liposomes comportant soit plusieurs bicouches concentriques (**O.L.V.** pour "oligolamellar vesicles" qui ont environ 5 bicouches, **M.L.V.** pour "multilamellar vesicles" qui ont entre 5 et 20 bicouches), soit plusieurs bicouches non concentriques délimitant plusieurs compartiments aqueux (**M.V.V.** pour "multivesicular vesicles"). Leur diamètre total, suivant le nombre de lamelles, est compris entre 400 à 3500 nm.

- **Les liposomes unilamellaires** ne comportent qu'une seule paroi et une seule cavité aqueuse. Ils peuvent être de grande taille (**L.U.V.** ou "large unilamellar vesicles") avec un diamètre moyen allant de 100 nm à 1 μm , ou de petite taille (**S.U.V.** pour "small unilamellar vesicles") avec un diamètre moyen variant de 20 à 100 nm.





<i>Structure</i>	<i>SUV</i>	<i>LUV</i>	<i>MLV et OLV</i>	<i>MVV</i>
<i>Représentation</i>				
<i>Taille</i>	20-100 nm	100-1000 nm	Taille très hétérogène	> 1 µm
<i>Capacité</i>	Contient peu de principe actif	Contient beaucoup de principe actif	Capacité intermédiaire <input type="checkbox"/> celle des SUV et LUV.	peu utilisés
<i>Encapsulation %</i>	0,5-1	35-60	5-15	
<i>Stabilité</i>	Plus le rayon de courbure est grand, plus faible est la tension de surface γ $MLV > LUV > SUV$ La stabilité est maximale entre 80 et 200 nm.			

Tableau 5 : Classification des liposomes selon Papadopoulos (1977).

II.1.6.2. Classification selon leur composition et leur application *in vivo*

a/ Liposomes conventionnels

Ils peuvent être définis comme les liposomes typiquement composés de phospholipides (neutres ou chargés négativement) et/ou de cholestérol. La plupart des liposomes utilisés comme vecteurs de médicaments sont des liposomes conventionnels. Ils sont caractérisés par un temps de circulation sanguine relativement court. En effet, après administration *in vivo* (par voie parentérale le plus souvent), on observe une capture rapide de ces liposomes par les cellules phagocytaires (macrophages) du système réticulo-endothélial. Ils s'accumulent alors dans le foie et la rate principalement. La capture naturelle des liposomes par les macrophages permet leur utilisation pour cibler et délivrer des agents antimicrobiens à un certain nombre de microorganismes infectieux. Plusieurs vaccins sont également élaborés, et même commercialisés (en Suisse), à partir de ces liposomes conventionnels.

b/ Liposomes furtifs

L'élimination rapide des liposomes conventionnels de la circulation sanguine, par les macrophages du foie et de la rate, a sérieusement compromis leur application pour un grand nombre de traitements concernant les affections d'autres tissus (Senior *et al.* 1991). A la fin des années 80, la découverte de liposomes dits furtifs, a élargi les potentialités thérapeutiques des liposomes, grâce à l'amélioration de leurs temps de circulation dans l'organisme (*cf* § II.4.4.2).

Le principe de ces liposomes est de réduire les interactions avec les protéines plasmatiques et d'échapper à la phagocytose par les cellules du système réticulo-endothélial, en modifiant leur membrane (Srinath et Diwan 1994, Woodle 1995). Pour cela, il est possible de greffer des résidus sialiques (gangliosides ou sphingomyéline) ou de créer une barrière stérique tout autour de la bicouche lipidique grâce à des polymères hydrophiles (polyéthylène glycols ou PEG) couplés de façon covalente aux phospholipides membranaires (Zalipsky 1995).

c/ Immunoliposomes

Ce sont des liposomes qui portent à leur surface des Ac ou des fragments d'Ac spécifiques d'une cible antigénique et pouvant contenir différents composés à activité biologique. Grâce à ce système de vectorisation et de protection des molécules encapsulées, il est possible de fixer spécifiquement ces liposomes à la surface des cellules cibles (tumorales par exemple) et d'y relarguer leur contenu (Barbet 1995).

Plusieurs études ont été réalisées où les immunoliposomes sont également rendus furtifs afin de prolonger leur demi-vie dans l'organisme et de favoriser leur passage vers les tissus ciblés. Les différentes possibilités de couplage Ac-liposomes et les applications thérapeutiques des immunoliposomes seront développées plus loin.

d/ Liposomes cationiques

Les liposomes cationiques sont utilisés dans une nouvelle technique de transfection cellulaire appelée Lipofection. Du fait de leur nature lipidique et de leurs propriétés d'encapsulation de grosses molécules, les liposomes cationiques sont des candidats potentiels au transfert de gènes et font l'objet, depuis une vingtaine d'années, d'études intensives comme véhicules d'ADN. Ces liposomes sont composés d'un lipide cationique synthétique, comme le DOTMA (*Dioleoyloxypropyltrimethylammonium*) en association avec le DOPE (*dioleoylphosphatidylethanolamine*) (1:1). Les liposomes cationiques et l'ADN interagissent spontanément par interaction de charges pour former un complexe de grande taille (environ 500 nm), chargé positivement. Certains auteurs ont proposé comme mécanisme d'action probable de la transfection, une fusion des lipides DOTMA/DOPE avec la membrane plasmique cellulaire et/ou les vésicules intracellulaires suivie de la libération de l'ADN dans le cytoplasme (Legendre et Szoka 1993).

Conventionnels

PEGylés

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (LZW)
sont requis pour visionner cette image.

Cationique

Immunoliposome

Figure 9 : Représentation schématique des 4 principaux types de liposomes
(Storm et Crommelin, 1998)

II.1.6.3. Classification selon des critères technologiques

Il existe une grande diversité de procédés de préparation des liposomes qui seront largement détaillés dans le paragraphe suivant. Chaque procédé génère des liposomes de caractéristiques données : lamellarité et diamètre en particulier. Mais ils peuvent également être choisis en fonction de critères tels que le taux d'encapsulation et des conditions de préparation respectant l'intégrité chimique des constituants de la formule.

Plusieurs abréviations sont utilisées pour désigner un type de liposomes selon son mode de préparation :

REV	vésicules obtenues par évaporation en phase inverse (SUV ou LUV)
MLV-REV	MLV obtenues par évaporation en phase inverse
VET	vésicules obtenues par extrusion
LUVET	LUV obtenues par extrusion
FPV	vésicules produites par une presse de French
FTV	vésicules obtenues par congélation-décongélation
DRV	vésicules obtenues par déshydratation-réhydratation
EIV	vésicules obtenues par la méthode d'injection d'ether

II.2. Préparation des liposomes

Historiquement, les industries cosmétiques ont été les premières à produire des liposomes en grande quantité. Dans le cadre pharmaceutique, les différentes opérations et les qualités du produit final doivent répondre aux exigences requises dans la fabrication de produits injectables. L'essentiel des opérations consiste à obtenir des lipides hydratés puis des liposomes du diamètre souhaité.

De nombreuses méthodes de préparation des liposomes ont été développées mais seules quelques unes permettent d'encapsuler des quantités suffisantes de composés hydrosolubles. La plupart des médicaments hydrosolubles sont incorporés dans les liposomes par la technique d'évaporation en phase inverse (Szoka et Papahadjopoulos 1978),

par infusion d'éther (Deamer et Bangham 1976) ou par la méthode de congélation-décongélation (Pick 1981) pour n'en citer que trois. Ces techniques permettent d'obtenir des LUV mais généralement toutes les méthodes de préparation des liposomes produisent un mélange hétérogène de vésicules de différentes tailles. La réduction et l'homogénéisation de la taille est effectuée par sonication ou extrusion. Les liposomes ainsi formés sont ensuite séparés du produit non encapsulé resté libre en solution par des méthodes conventionnelles.

Rongen *et al.* (1997) propose une classification de ces méthodes de fabrication en quatre groupes :

- Le premier groupe comprend les méthodes « classiques » faisant intervenir une étape mécanique, comme l'agitation et l'extrusion.
- Le deuxième groupe correspond aux méthodes basées sur l'élimination du solvant organique à partir d'une émulsion (évaporation en phase inverse). On y trouve aussi la méthode par injection d'une solution éthanolique de phospholipides et la méthode par infusion d'éther qui sont plutôt des méthodes adaptées à la production industrielle.
- Les méthodes du troisième groupe reposent sur l'élimination d'un détergent à partir d'une solution de micelles mixtes, ce qui permet des conditions d'encapsulation douces mais faibles et avec un procédé assez long.
- Enfin, le quatrième groupe inclut les méthodes basées sur la transformation de liposomes pré-formés, comme la lyophilisation/réhydratation ou la congélation/décongélation, procédés simples permettant d'obtenir des taux d'encapsulation élevés.

II.2.1.Méthodes mécaniques de dispersion des phospholipides

II.2.1.1. Hydratation d'un film lipidique

a/ Mécanisme de formation des vésicules

En 1965, Bangham *et al.* ont décrit la formation de vésicules lipidiques par hydratation d'un film phospholipidique. Au contact d'une solution aqueuse, plusieurs bicouches lipidiques superposées, s'hydratent, deviennent fluides, gonflent puis se décollent des parois du ballon pour former spontanément des vésicules. Ce procédé permet d'obtenir des vésicules multilamellaires de grande taille (de l'ordre du micromètre). La distribution de la taille est par ailleurs très hétérogène. Cette méthode originale décrite par Bangham est simple et largement employée mais son utilisation est limitée par la faible capacité d'encapsulation des liposomes formés.

b/ Préparation du film phospholipidique

Quelque soit le mélange de lipides utilisés (espèces cationiques, anioniques, neutres), la méthode de préparation du film phospholipidique est la même. Les différents lipides sont d'abord mélangés et dissous dans un solvant organique afin d'obtenir un mélange de lipides homogène.

Généralement, on utilise du chloroforme ou un mélange chloroforme/méthanol pour dissoudre les lipides. La solution organique de phospholipides est ensuite évaporée dans un ballon pour obtenir un film lipidique. L'évaporation est effectuée à l'aide d'un évaporateur rotatif, à faible température, et sous agitation afin d'augmenter la surface d'évaporation sur les parois du ballon. Le ballon peut ensuite être placé sous vide tout une nuit pour éliminer les traces de solvant organique résiduelles.

c/ La phase aqueuse

L'hydratation du film lipidique est effectuée simplement en ajoutant une solution aqueuse (pouvant contenir un PA ou un radionucléide) et en agitant (*figure 10*). La température de la phase aqueuse doit toujours être supérieure à la température de transition de phase (T_m) des phospholipides utilisés dans la préparation. Pour les lipides ayant une T_m élevée, le ballon peut-être placé sur un évaporateur rotatif, sans vide, dans un bain-marie à la température désirée ce qui permet d'obtenir une hydratation des lipides dans leur phase fluide avec une agitation adéquat.

Le taux d'encapsulation et la taille des liposomes MLV varient en fonction de la durée d'hydratation et des conditions d'agitation pour une même composition en lipides. La présence de lipides chargés négativement comme la phosphatidylsérine (PS) ou le phosphatidylinositol (PI), ou chargés positivement comme la stearylamine, ont la propriété d'augmenter les espaces interlamellaires et de favoriser la capacité d'encapsulation.

La population des liposomes MLV, obtenue par cette méthode, peut être rendue homogène par l'utilisation de différentes techniques telles que les ultrasons, l'extrusion ou la microfluidisation.

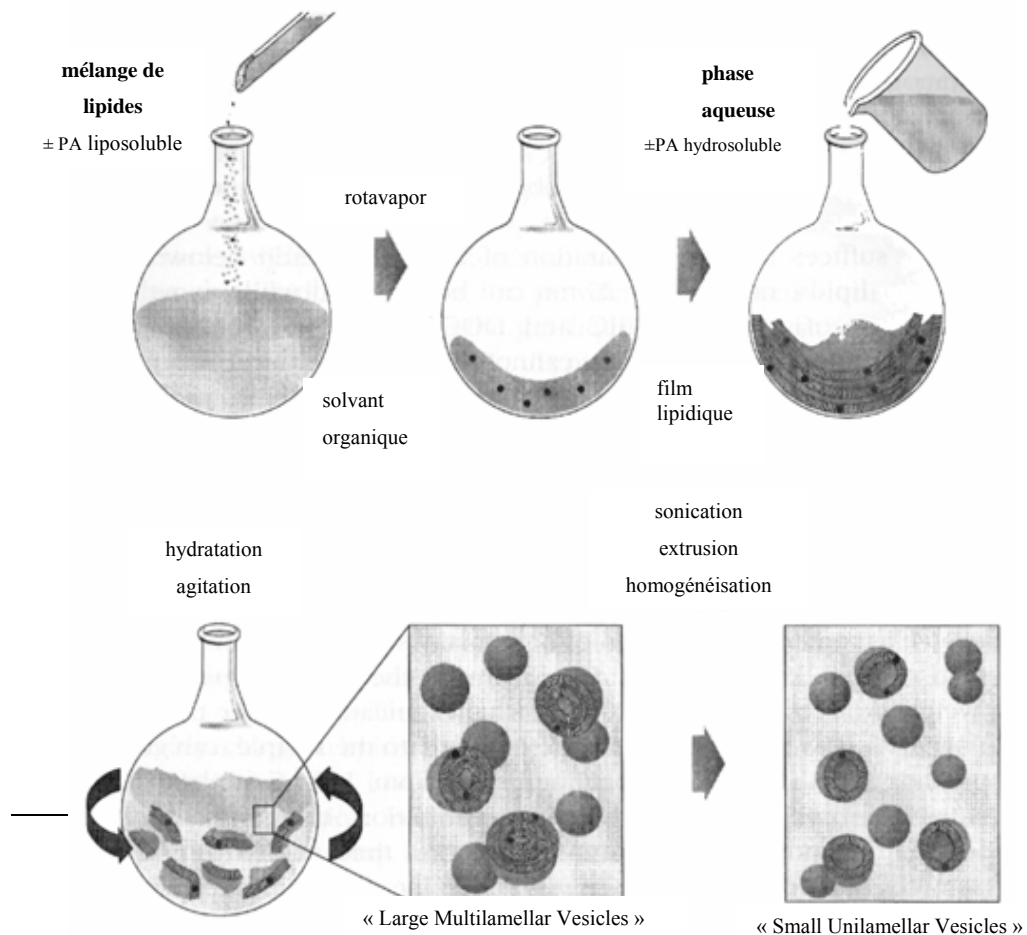


Figure 10: Préparation des liposomes par hydratation d'un film lipidique (<http://www.avanti.lipids.com>).

II.2.1.2. Sonication

Saunders *et al.* en 1962 propose l'utilisation des ultrasons afin de réduire le diamètre des liposomes MLV dont nous venons de voir la préparation. Les vésicules formées sont des SUV unilamellaires de petite taille ayant un diamètre compris entre 15 à 50 nm selon la composition en lipides. Généralement, on utilise un bain à ultrasons ou une sonde. Les sondes à ultrasons sont plus efficaces pour réduire la taille des liposomes car elles délivrent une forte énergie à la suspension liposomiale. L'inconvénient de cette technique est qu'elle peut conduire à une destruction des liposomes ainsi qu'une libération, par la sonde, de particules métalliques.

Pour ces raisons, l'utilisation d'un bain à ultrasons est conseillée pendant 5 à 10 minutes à une température supérieure au T_m des lipides. La suspension de lipides obtenue se clarifie mais reste légèrement opalescente. Ce trouble est dû à la dispersion de la lumière provoquée par les liposomes MLV qui contaminent la suspension. Selon Barenholz (1977), il est possible de les éliminer par une centrifugation à grande vitesse et de récupérer une solution limpide de SUV dans le surnageant.

Le volume encapsulé par ces liposomes est très faible (de l'ordre de 0,2 à 1,5 $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$ de lipides) selon la composition lipidique et le temps de sonication (Fattal *et al.* 1993). La taille moyenne des SUV et leur distribution sont influencés par la composition et la concentration en lipides,

la durée, la température ainsi que la puissance de sonication. Comme il est difficile de reproduire exactement les conditions de sonication, il est fréquent d'obtenir une variation de la taille des liposomes entre différents lots. De plus, compte tenu du degré de courbure élevé des membranes des SUV, ces liposomes sont souvent instables et forment spontanément des vésicules de taille supérieure quand ils sont stockés à une température supérieure à leur T_m .

II.2.1.3. Extrusion

a/ Membranes de polycarbonate

Cette technique consiste à forcer une suspension de liposomes à travers un filtre de polycarbonate ayant une taille de pores bien définie (*figure 11*) afin d'obtenir des liposomes d'un diamètre proche de la taille des pores du filtre utilisé (Mayer *et al.* 1986, Hope 1985, MacDonald *et al.* 1991, Olson *et al.* 1979).

QuickTime™ et un décompresseur
Photo - JPEG sont requis pour visualiser
cette image.

QuickTime™ et un décompresseur
Photo - JPEG sont requis pour visualiser
cette image.

*Figure 11 : Technique d'extrusion sur membranes de polycarbonate
grâce au mini-extruder™ (Avanti® Polar Lipids)*

Les suspensions de MLV peuvent dans un premier temps être pré-filtrées sur des membranes dont la taille des pores est supérieure à celle désirée (200 à 1000 nm). Cette méthode évite la destruction des membranes de polycarbonate et augmente l'homogénéité de la taille des liposomes dans la suspension finale. L'extrusion doit également être effectuée à une

température supérieure au T_m des lipides pour éviter là encore la destruction du filtre par des liposomes trop rigides qui ne passeraient pas les pores.

La taille moyenne des vésicules dépend de la composition en phospholipides mais elle est très reproductible d'un échantillon à l'autre. Plus de 10 passages sur des filtres de 100 nm permettent d'obtenir des LUV, encore appelés LUVET pour 'Large Unilamellar Vesicles by Extrusion Techniques', ayant un diamètre moyen de 120 à 140 nm (Mayer *et al.* 1986). Le volume aqueux encapsulé est assez faible (1 à 3 $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$ de lipides) mais peut-être amélioré en augmentant la concentration lipidique (Jousma *et al.* 1987). L'avantage de cette technique est sa rapidité (< 10 minutes) et la possibilité d'utiliser des concentrations en lipides élevées (jusqu'à 300 $\mu\text{mol}/\text{ml}$). D'après Hope (1985), l'efficacité d'encapsulation peut être supérieure à 30 %.

b/ Presse de French

L'extrusion des liposomes peut également s'effectuer sur une presse de French décrite par Hamilton en 1980. Cette méthode utilise des pressions beaucoup plus élevées que celles utilisées sur les membranes de polycarbonate. Une suspension aqueuse de lipides est placée dans une cellule de French et est rapidement extrudée à l'aide d'un piston sous une pression de 20 000 psi à travers un petit orifice. On observe alors une fragmentation des liposomes due à des forces de cisaillement ainsi qu'une diminution du nombre des lamelles des vésicules (Jousma *et al.* 1987). Au bout de 4 à 5 passages, on obtient 95 % de SUV avec un diamètre qui varie de 30 à 50 nm. Cette méthode permet d'utiliser de fortes concentrations en lipides et d'obtenir des taux d'encapsulation acceptables (5 à 25 %) malgré un faible volume d'encapsulation (Hamilton *et al.* 1980).

II.2.1.4. Microfluidisation

La microfluidisation permet également d'homogénéiser les suspensions de liposomes MLV. Elle consiste à forcer à haute pression (10000 psi) une suspension de liposomes à travers un filtre de 5 μm (Microfluidizer™). Ensuite la suspension est séparée en deux canaux qui se rejoignent dans une chambre d'interaction où les vésicules vont s'entrechoquer avec une grande vitesse pour former de petites vésicules de taille homogène. Plus on augmente le nombre de passages, plus le diamètre des liposomes diminue et plus leur bicouche tend à devenir unilamellaire. Après dix passages, on obtient des SUV avec un diamètre allant de 60 à 80 nm. Cette technique permet d'encapsuler des molécules hydrophiles avec des taux pouvant atteindre 70 % (Vemuri 1995 et Hope 1985).

II.2.2.Méthodes basées sur l'élimination du solvant organique

II.2.2.1. Evaporation en phase inverse

Les liposomes obtenus par cette méthode sont des LUV constitués d'une grande cavité aqueuse (également appelés R.E.V. pour "reverse phase evaporation vesicles"). Le principe de cette méthode est de dissoudre les phospholipides dans un solvant ou un mélange de solvants organiques (éther propylique/chloroforme 1/1 par exemple) et d'y ajouter la phase aqueuse dans un rapport phase aqueuse/phase organique allant de 1/3 à 1/6. A ce stade, les phospholipides se placent à l'interface entre les deux phases non

miscibles. Après action des ultrasons pendant quelques minutes, il se forme une émulsion eau/huile (E/H) dans laquelle les phospholipides s'organisent sous forme de micelles inverses entourant des compartiments aqueux (*figure 12*).

L'élimination du solvant organique par évaporation sous pression réduite entraîne un rapprochement des micelles inverses puis la formation d'un gel. Au cours de l'étape suivante, la pression est réduite davantage pour favoriser l'évaporation totale de l'éther et entraîner la rupture de la phase gel. A ce moment, selon Szoka *et al.* (1980), les monocouches de phospholipides se rapprochent pour former les bicouches des liposomes.

Les vésicules ainsi obtenues ont un volume d'encapsulation 4 fois supérieur à celui des MLV obtenues par hydratation d'un film lipidique et jusqu'à 30 fois supérieur à celui des SUV obtenues par sonication. Cette méthode reste toutefois complexe et est inadaptée à la production industrielle.

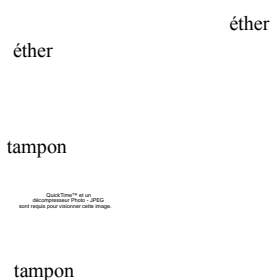


Figure 12 : Formation de liposomes REV par la technique d' évaporation en phase inverse (Weinstein 1981, d'après une figure de Szoka et Papahadjopoulos 1978).

II.2.2.2. Injection d'une solution éthanolique de phospholipides/infusion d'éther

D'autres méthodes, qui elles sont utilisées dans l'industrie, sont fondées également sur la dispersion d'une solution organique de phospholipides. L'une consiste à injecter une solution éthanolique de phospholipides dans une phase aqueuse et l'autre une infusion d'éther. Dans le premier cas, les lipides secs sont dissous dans de l'éthanol et la solution est alors injectée, à l'aide d'une seringue en verre, dans une solution aqueuse soumise à agitation. On obtient des liposomes unilamellaires dont le diamètre dépend de la vitesse d'injection, de la vitesse d'agitation et de la concentration en phospholipides dans l'éthanol.

Deamer et Bangham en 1976, ont décrit la méthode de préparation de LUV par vaporisation d'une solution de différents lipides dissous dans l'éther, vers une solution aqueuse à 55-65°C. Ils obtiennent des vésicules ayant un volume d'encapsulation 10 fois supérieur à celui des liposomes obtenus par sonication mais les taux d'encapsulation restent faibles (2 %).

II.2.3.Méthodes basées sur l'utilisation de détergents : Dispersion de micelles mixtes

Dans cette méthode, les phospholipides sont d'abord solubilisés, en milieu aqueux, à l'aide d'un détergent (Tween 20[®], Triton[®] x100). Il se forme alors des micelles mixtes. Ensuite, le détergent est éliminé et les micelles s'enrichissent peu à peu en phospholipides pour former finalement des vésicules unilamellaires de type SUV ou LUV. L'élimination du détergent peut se faire par dialyse, par chromatographie d'exclusion-diffusion ou par adsorption sur des résines hydrophobes. Ce sont des méthodes souvent longues et offrant un taux d'encapsulation généralement bas.

II.2.4.Méthodes utilisant des liposomes pré-formés

II.2.4.1. Congélation - décongélation ("Freeze - thaw method")

A partir d'une suspension de SUV, cette méthode consiste à répéter très rapidement plusieurs cycles de congélation (dans l'azote liquide) - décongélation (dans l'eau tiède). On obtient des LUV avec des taux d'encapsulation élevé (30 %) qui se forment par fusion des SUV de départ (Hope *et al.* 1986, Pick 1981). Cette technique peut aussi s'appliquer aux liposomes MLV obtenus par hydratation d'un film lipidique. Pour de fortes concentrations en lipides (400 mg/ml), Mayer *et al.* (1986) ont montré que l'on pouvait obtenir des taux d'encapsulation très élevés, pouvant atteindre 80 %, avec des volumes d'encapsulation multipliés par 5 par rapport aux liposomes MLV initiaux.

II.2.4.2. Lyophilisation - réhydratation ("Freeze - drying method")

Kirby et Gregoriadis (1984) proposent une technique de dispersion des lipides à partir d'une solution de SUV, préalablement lyophilisés, directement hydratée par la phase aqueuse. Au moment de l'hydratation du lyophilisat, les membranes des SUV fusionnent pour former des vésicules multilamellaires avec un volume d'encapsulation important. C'est également le principe des "pro-liposomes" décrits par Payne en 1986 où les lipides sont séchés grâce à des particules de chlorure de sodium ou de sorbitol, avant d'être réhydratés. Cette technique permet une bonne conservation des liposomes. Elle est très employée pour encapsuler des

substances médicamenteuses peu stables en phase aqueuse. On lyophilise alors à la fois les liposomes et la substance à encapsuler.

Quelque soit la méthode de préparation des liposomes, un certain nombre de critères doivent être pris en compte. La composition et la structure des liposomes (uni ou multilamellaires) ainsi que leur taille doivent être choisis en fonction des critères de stabilité et du devenir *in vivo*. Le volume d'encapsulation doit être élevé si on veut encapsuler des macromolécules. En outre, plus le taux d'encapsulation est élevé, moins les volumes à administrer en clinique sont importants. La méthode de préparation ne doit pas être agressive vis-à-vis des substances à encapsuler, elle doit également être simple et rapide.

II.3. Encapsulation de substances dans les liposomes

L'encapsulation efficace et stable de molécules dans les liposomes est l'un des challenges de l'industrie pharmaceutique depuis plus de 10 ans. L'encapsulation d'une molécule dépend beaucoup de ses propriétés physico-chimiques (taille, charge, hydrophobicité...) mais aussi des caractéristiques du liposome lui-même (taille, type, composition et concentration en lipides...).

Dans toutes les méthodes de préparation des liposomes, on peut incorporer des substances dans la phase aqueuse ou dans la phase organique selon leur polarité. Le principe actif est ajouté avec la phase organique quand il est lipophile ou la phase aqueuse lorsqu'il est hydrophile. On peut alors très schématiquement définir deux types d'association des molécules à l'intérieur des vésicules : dans le compartiment aqueux (ou les espaces inter lamellaires) pour les substances hydrosolubles, et dans les bicouches lipidiques pour les substances liposolubles.

D'autre part, l'encapsulation des substances peut se faire de façon passive au cours de leur préparation, ou de façon dite active, en introduisant les substances à encapsuler dans des liposomes pré-formés.

II.3.1. Facteurs influençant la capacité d'encapsulation des liposomes

II.3.1.1. Type de substances à encapsuler

Le principal caractère qui détermine l'efficacité de l'encapsulation est lié à l'hydrophobicité du composé (*figure 13*). La plupart des molécules

peuvent être classées en trois catégories selon leurs propriétés hydrophiles, lipophiles ou amphiphiles (Thoma *et al.* 1995).

a/ Les substances hydrophiles sont les plus faciles à encapsuler. On peut les dissoudre directement dans la phase aqueuse constituée d'eau ou de tampons. C'est d'autant plus intéressant que les composés essentiellement hydrophiles pénètrent souvent mal dans les cellules et c'est donc eux qui sont généralement destinés à être encapsulés. Il faut néanmoins tenir compte de la charge de ces composés hydrophiles qui peut influencer notamment l'efficacité de l'encapsulation mais aussi sa stabilité dans le temps.

exemples : sucre, Cefadroxyl, Gentamycine, Salbutamol.

b/ Les substances hydrophobes ont un comportement différent. Les produits insolubles dans l'eau et les solvants organiques seront très difficiles à encapsuler. Parmi les produits solubles dans le méthanol ou le chloroforme, ils seront partiellement ou totalement fixés dans la membrane (selon la concentration). Le liposome s'avère intéressant pour pouvoir injecter par voie I.V. des composés lipophiles ou très peu solubles dans l'eau.

exemples : Rifamicine, Diclofénac, Amphotéricine, Indométacine.

c/ Les substances amphiphiles sont très difficiles à encapsuler quel que soit le type de liposome. Ces composés passent à travers la membrane et peuvent se distribuer dans la bicouche lipidique comme dans la phase aqueuse. Ils ne peuvent être encapsulés que par encapsulation active (*cf* § II.3.2) mais ils s'échappent rapidement des liposomes. Pour ces substances, il est intéressant d'étudier leur coefficient de partage entre deux phases (octanol/eau ou butanol/eau) en faisant varier le pH pour connaître la polarité des molécules en milieu acide ou basique, ce qui permet d'en déduire leur répartition dans les liposomes (Cullis *et al.* 1997).

exemples : Josamycine, Doxycycline, Doxorubicine.

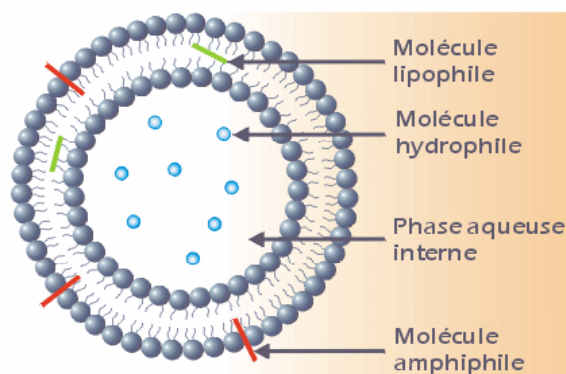


Figure 13: Schéma d'un liposome unilamellaire représentant la localisation des molécules encapsulées en fonction de leur solubilité (Devoisselle 1997).

II.3.1.2. Type de liposomes

La capacité à transporter les molécules est différente selon le type de liposomes : LUV > MLV > SUV. En effet, plus la taille des liposomes est importante, plus la capacité d'encapsulation sera grande. De nombreuses techniques permettent de déterminer la taille mais aussi la distribution de la taille des liposomes. Ce sont par exemple la microscopie électronique, les techniques de chromatographie, et la mesure dynamique de la diffusion de la lumière (dynamic light scattering) (Mayer *et al.* 1985, Mehnert *et al.* 2001, Jousma *et al.* 1987).

La concentration en lipides est importante également car il y a bien sûr une relation directe entre le nombre de liposomes formés et la capacité d'encapsulation. De plus, plus la concentration en lipides augmente, plus le nombre de lamelles augmente et plus on augmente le volume de l'espace inter lamellaire. Enfin la composition en lipides influe sur l'encapsulation des molécules dans les liposomes mais surtout sur leur relargage dans le temps (Silvander *et al.* 1998).

II.3.2.Principaux modes d'encapsulation

II.3.2.1. Encapsulation passive

L'encapsulation passive a lieu lors de la synthèse des liposomes en hydratant le film lipidique directement avec une solution aqueuse contenant la molécule hydrophile à encapsuler. Elle est également possible avec des principes actifs lipophiles. Il suffit de les ajouter à la phase organique contenant les phospholipides et ils sont intégrés à la bicouche des liposomes au cours de leur préparation. Néanmoins, il faut tenir compte du fait que l'incorporation de substances lipophiles dans la membrane liposomiale ne peut pas être supérieure à 5 mol % de la composition en lipides des liposomes. Généralement, on obtient seulement 1 à 2 % d'incorporation, ce qui représente souvent une très faible quantité de principe actif. De plus, les liposomes obtenus sont très instables car ils ne doivent pas contenir de cholestérol, sa présence diminuant encore le taux de captation du principe actif dans la bicouche.

Un exemple d'encapsulation passive est celui du Cisplatine (SPI-077) sur des liposomes furtifs. La plus grande difficulté provient de la faible solubilité du principe actif dans la phase aqueuse. L'hydratation du film lipidique se fait à 65°C en présence de Cisplatine pour obtenir une meilleure solubilité (Barenholz 2001). *In vitro*, le cisplatine est très peu relargué des liposomes (moins de 10 %) et la cytotoxicité du SPI-077 apparaît jusqu'à présent comme bien inférieure à celle du Cisplatine seul.

II.3.2.2. Encapsulation active

L'encapsulation active consiste à introduire les substances à encapsuler dans des liposomes pré-formés. Les molécules non chargées et suffisamment lipophiles diffusent à travers la bicouche lipidique et se

retrouvent dans la phase aqueuse des liposomes. Elles peuvent alors s'y trouver piégées comme elles peuvent aussi en ressortir rapidement. Plusieurs méthodes d'encapsulation active ont été décrites, utilisant des gradients de pH ou des différences de potentiel de part et d'autre de la membrane liposomiale, permettant de remédier à ce problème et d'obtenir une encapsulation à la fois efficace et stable.

a/ Formation d'un gradient de pH

La forme neutre des acides faibles et des bases faibles peut diffuser à travers les bicouches lipidiques plus rapidement et plus efficacement que la forme ionisée. Cette étude a d'abord été effectuée sur les membranes des chloroplastes et des mitochondries dans les années 70, avec la forme neutre d'acides carboxyliques, comme l'acétate, et sur des amines, comme l'ammoniaque. Deamer *et al.* ont ensuite étendu ces recherches à la membrane liposomiale à l'aide d'amines fluorescentes (9- aminoacridine ou 9-AA) en créant un gradient de pH de chaque côté de la bicouche. Le gradient de pH permet d'obtenir un milieu intraliposomal acide alors que le milieu extraliposomal conserve un pH neutre. Toute substance non ionisée diffuse à travers la membrane puis s'ionise à pH acide (exemple des bases faibles) et est alors piégée dans la cavité aqueuse (*figure 14*).

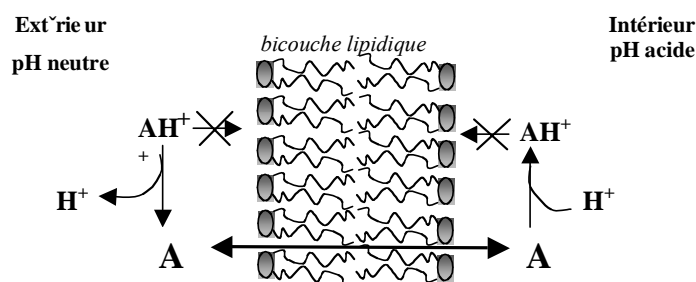


Figure 14 : Modèle d'encapsulation d'une base faible dans un liposome unilamellaire grâce à un gradient de protons. La forme non protonée A diffuse à travers la membrane jusqu'à ce que les concentrations à l'intérieur et à l'extérieur du liposome soient égales. En milieu acide, la forme protonée AH^+ est piégée à l'intérieur (Cullis 1997).

Le gradient de protons n'est pas toujours idéal. La différence de concentration en ions hydroxydes de part et d'autre de la membrane n'est pas assez importante et peut diminuer au cours du temps par diffusion des ions. D'où l'intérêt de créer des différences de pH par des gradients de différents ions (acétates, citrates, bicarbonates, sulfates...).

Les bases faibles sont particulièrement adaptées à ce type de transport. Les agents anti-cancéreux de la famille des antracyclines, en particulier la doxorubicine et la daunorubicine, se sont révélés d'excellents agents pour ce type d'encapsulation active (Mayer *et al.* 1985 et 1986, Gabizon *et al.* 1998). L'encapsulation de la doxorubicine (DOX) a été largement décrite dans la littérature. Comme de nombreuses autres bases faibles, elle peut être incorporée efficacement et de façon stable dans les liposomes par l'intermédiaire d'un gradient de sulfate d'ammonium (Li *et al.* 1999, Ceh *et al.* 1997). Sa caractéristique est de précipiter avec les anions sulfates pour former un gel stable à l'intérieur des liposomes.

De même, les acides faibles peuvent être encapsulés par l'intermédiaire d'un gradient de protons (milieu alcalin à l'intérieur), d'un gradient de bicarbonate de sodium (Lasic 1998, Maurer-Spujer *et al.* 1999, Cullis *et al.* 1999) ou de gradients calcium-acétate (Clerc et Barenholz 1995). Néanmoins, les publications concernant les acides faibles ne sont pas aussi nombreuses que pour les bases faibles. Il a été montré que l'encapsulation de divers acides comme le diclofénac ou l'acide nalidixique était possible (Hwang *et al.* 1999) mais la stabilité est généralement moins bonne que celle obtenue avec les bases faibles car les acides faibles précipitent moins bien dans la phase aqueuse et ont tendance à ressortir des liposomes (Barbet *et al.* 1984).

Ces techniques se sont rapidement étendues à un grand nombre d'acides faibles et de bases faibles d'intérêt biologique, comprenant différentes drogues, lipides et peptides (Lasic 1995, Cullis *et al.* 1997, Madden *et al.* 1998, Drummond 1999, Fenske et Cullis 2005).

b/ Formation d'un gradient de potentiel

Une autre technique consiste à créer un gradient de potentiel en encapsulant dans les liposomes des ions K^+ et en introduisant dans la membrane un ionophore sélectif pour le K^+ , la valinomycine. L'efflux de K^+ à travers l'ionophore s'effectue ensuite en échange d'un cation (Mayer *et al.* 1985). Selon ce principe, Bally *et al.* (1988) ont comparé l'encapsulation de dopamine dans des LUV par gradients d'ions K^+ ou H^+ . Les taux d'encapsulation sont analogues entre les deux méthodes. Ils ont montré néanmoins que l'accumulation d'anions à l'intérieur des LUV (ATP et citrate) permettait d'obtenir des concentrations intraliposomiales de dopamine bien supérieure par complexation de ces anions à la forme protonée de la dopamine.

c/ Utilisation d'un détergent

Une autre méthode d'encapsulation active a été décrite par Schubert *et al.* en 1991. Elle consiste à incorporer, pendant quelques minutes un détergent dans la membrane (le cholate de sodium ou l'octylglucopyranoside) capable de former des pores transitoires laissant diffuser les substances du milieu extérieur vers la cavité aqueuse. Cette méthode peut-être appliquée à de petites molécules, des carbohydrates, protéines (insuline ou hémoglobine) et acides nucléiques.

II.3.3. Stabilité et efficacité d'encapsulation

La rétention des substances encapsulées varie selon la nature des liposomes (MLV > LUV > SUV). Elle est aussi fonction de la température ($4^{\circ}C > 25^{\circ}C > 37^{\circ}C$) et de la composition en phospholipides (saturés de T_m élevée > insaturés). Enfin, la rétention dépend également des propriétés

physico-chimiques des produits encapsulés (lipophiles > hydrophiles ionisées > hydrophiles non ionisées) (Fattal *et al.* 1993).

Dans tous les cas, pour utiliser les liposomes comme vecteurs de substances pharmaceutiques ou de radioactivité, il est important d'éliminer toutes les molécules qui ne seraient pas encapsulées. Avec certaines techniques d'encapsulation active cette étape n'est pas nécessaire (cas de la DOX) ainsi qu'avec certaines molécules hydrophobes qui sont souvent totalement associés aux lipides. Dans le cas contraire, plusieurs approches ont été suggérées. Certains ont proposé la chromatographie échangeuse d'ions pour des médicaments ayant une charge nettement différente des liposomes. Mais généralement, les liposomes ont une taille beaucoup plus grande que les molécules que l'on veut encapsuler. La séparation des substances non encapsulées peut alors utiliser des techniques fondées sur la différence de taille des composés à séparer comme la centrifugation, la chromatographie d'exclusion-diffusion, la dialyse.

Différents paramètres permettent d'évaluer l'efficacité de l'encapsulation après élimination des substances non encapsulées. Car quelle que soit l'application envisagée, les effets observés sont généralement dépendants de la dose utilisée et il convient donc de déterminer au préalable, la quantité de molécules encapsulées dans les vésicules.

a/ Le pourcentage d'encapsulation est défini par la proportion de molécule associée aux vésicules par rapport à la quantité initialement présente. Cette mesure n'est effectuée qu'après élimination des molécules non encapsulées. Elle peut s'appliquer pour les substances liposolubles comme pour les substances hydrosolubles. Dans la mesure du possible, il est préférable de rapporter le pourcentage d'encapsulation à la quantité de lipides.

b/ L'encapsulation pondérée correspond à la quantité de molécule encapsulée rapportée à la quantité de lipides. Il y a plusieurs possibilités pour quantifier l'encapsulation d'une molécule dans les vésicules. On peut utiliser un analogue radiomarqué de la molécule et compter la radioactivité des liposomes. On peut également doser l'activité biologique d'une molécule après lyse des vésicules par un détergent ou mesurer l'absorbance d'un composé après dissolution des liposomes par un solvant.

c/ Le volume aqueux encapsulé correspond au volume de phase aqueuse encapsulée dans les vésicules par la quantité de lipides ($\mu\text{l}/\mu\text{mol}$). Il est évalué pour les molécules hydrosolubles, qui n'interagissent pas avec les bicouches lipidiques. Il est compris généralement entre $0,5 \mu\text{l}/\mu\text{mol}$, pour les MLV et les SUV, et jusqu'à $30 \mu\text{l}/\mu\text{mol}$ pour les LUV. Ce volume encapsulé varie néanmoins selon les techniques de préparation des liposomes et leur composition en lipides. Il peut être significativement amélioré en augmentant la concentration en lipides.

Pour déterminer le volume encapsulé, Hope (1985) et Mayer (1985) proposent de préparer des liposomes en incorporant une substance radioactive dans la phase aqueuse qui ne passe pas facilement la bicouche lipidique (^{22}Na ou $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ inuline). On peut également utiliser des marqueurs fluorescents comme la calcéine ou la carboxy-fluorescéine dont les processus d'encapsulation et de purification ont été largement décrits (Weinstein *et al.* 1977, Barbet 1982). Le traceur, non encapsulé est ensuite séparé des liposomes par chromatographie de gel-filtration sur une colonne de Sephadex-G50. L'efficacité d'encapsulation est calculée en rapportant l'activité des liposomes après gel-filtration à l'activité initiale. Bien que ces méthodes soient efficaces pour déterminer le volume encapsulé dans les liposomes, leur utilisation est limitée à la recherche et n'est pas facilement applicable à un contrôle de qualité de routine en laboratoire.

II.4. Devenir *in vivo* des liposomes

Le devenir dans l'organisme des liposomes et du principe actif encapsulé ne dépend plus uniquement des propriétés physico-chimiques et structurales du vecteur, mais aussi du milieu biologique auquel il va être confronté (stabilité au contact des liquides biologiques, franchissement des barrières physiologiques, interactions avec les cellules...). Le potentiel thérapeutique de ces formulations sera directement lié à leur comportement et leur stabilité *in vivo*, c'est pourquoi il est indispensable de connaître la biodistribution et la pharmacocinétique des liposomes après leur administration par voie parentérale (cette voie faisant l'objet des travaux les plus documentés).

Le principal obstacle rencontré par les liposomes après injection intraveineuse (I.V.) est la capture par le système des phagocytes mononucléés (SPM). Les liposomes sont alors rapidement éliminés de la circulation sanguine pour se retrouver principalement dans les macrophages du foie, de la rate, des poumons et de la moelle osseuse.

Des expériences montrent que des liposomes ne sont pas capturés lors d'un passage au travers d'un foie perfusé en l'absence de composants plasmatiques prouvant ainsi que certaines protéines provoquent la capture des liposomes par les cellules hépatiques. La nature de ces protéines est diverse. Le système du complément joue un rôle essentiel dans cette capture en induisant à la fois l'opsonisation des particules et une activation des cellules phagocytaires. Plusieurs stratégies ont été envisagées pour prolonger la circulation des liposomes dans l'organisme, en modifiant leur taille, leur structure, leur charge tout en essayant de préserver la stabilité des formulations liposomiales.

II.4.1. Stabilité des liposomes dans le sang

II.4.1.1. *Interactions des liposomes avec les cellules du système phagocytaire mononucléé (système réticulo-endothélial)*

Le système réticulo-endothélial (RES) est un large système de cellules comprenant des cellules endothéliales, fibroblastes, histiocytes et monocytes. Les cellules phagocytaires de ce système composent, ce qu'on appelle plus récemment, le système phagocytaire mononucléé (SPM) qui comprend l'ensemble des cellules de la lignée monocyttaire: les monoblastes et pro-monocytes de la moelle osseuse, les monocytes circulants et tous les macrophages. Les monocytes et leurs précurseurs ne sont pas responsables de la capture des liposomes. Ils se répartissent dans les tissus où ils se différencient en macrophages, adoptant parfois des caractéristiques spécifiques de lieu où ils se trouvent :

- cellules de Küpffer du foie (responsables de plus de 80 % de la phagocytose),
- macrophages fixes ou libres de la rate ou des ganglions,
- macrophages alvéolaires et interstitiels des poumons,
- ostéoclastes de l'os,
- cellules de Langherans de la peau etc..

La capture et l'élimination des liposomes par les macrophages est un phénomène très rapide, qui se compte en minutes, après administration de doses non saturantes. Elle se fait principalement dans le foie, puis au niveau splénique et médullaire, quand des doses importantes de liposomes ont entraîné une saturation hépatique (Woodle 1995).

a/ La phagocytose

Les cellules de Küpffer sont situées à la surface des cellules endothéliales du foie et leur activité physiologique principale est d'éliminer, principalement par phagocytose, les particules étrangères (virus,

endotoxines bactériennes, micro-organismes), les cellules endommagées et les immuns-complexes. Elles contiennent de grosses granulations cytoplasmiques, les lysosomes, dans lesquelles ces particules sont digérées par de nombreuses enzymes. En plus de cette fonction de phagocytose, les macrophages sécrètent, surtout quand ils sont activés, de très nombreuses protéines dont les protéines du complément, impliquées dans l'opsonisation des particules. Ils participent également à l'immunité spécifique en présentant des Ag aux cellules immunocompétentes.

b/ L'opsonisation

Le plus souvent, les particules étrangères de grande taille ne sont pas phagocytées directement, mais elles sont recouvertes par les opsonines, protéines plasmatiques qui facilitent la phagocytose (protéine C-réactive, fibronectine, facteur du complément C3b, immunoglobulines) et pour lesquelles les macrophages disposent de récepteurs (Patel *et al.* 1992, Bonté *et al.* 1986, Liu 1997). Les particules étrangères chargées négativement sont rapidement reconnues par les macrophages à l'aide de ces récepteurs membranaires spécifiques :

- pour le fragment C3b du complément,
- pour les fragments Fc des IgG, IgA et IgE (faible affinité),
- pour l'interféron
- pour le galactose, le mannose...

La particule opsonisée est entourée progressivement par des pseudopodes dans un processus d'adhérence (modèle de la "fermeture-éclair") et se trouve finalement englobée dans une vacuole isolée, le phagosome, où elle sera digérée.

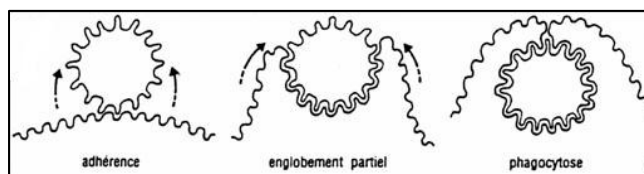


Figure 15: Représentation schématique de la phagocytose d'une particule (<http://anne.decoستر.free.fr>)

Une caractéristique fondamentale de la fixation des protéines sur les liposomes est la réversibilité du processus en fonction de l'abondance et de l'affinité de ces protéines plasmatiques. En raison de sa concentration plasmatique élevée et de son affinité pour les acides gras, l'albumine est la première protéine adsorbée sur les liposomes. Mais d'après Bonté (1986), elle n'intervient pas dans les processus de reconnaissance par les macrophages (c'est une dysopsonine) et sa liaison aux liposomes est faible. Elle est donc rapidement remplacée par des protéines moins abondantes mais plus fortement liées, qui elles, favoriseront la phagocytose du liposome (fibronectine ou IgG).

Les LUVs interagissent principalement avec l'albumine et mineurairement avec la β 2-microglobuline, les IgG et le C3 du complément. Pourtant ces dernières jouent un rôle primordial sur la clairance des liposomes. Il a été décrit que la fixation de ces protéines à la surface des vésicules atteignait une limite quand on augmentait la quantité de liposomes, phénomène se répercutant directement sur le temps de circulation des vésicules dans le sang.

D'autres types de protéines favorisent l'adhérence des liposomes aux membranes cellulaires. Cependant leur association et le mécanisme par lequel elles augmentent l'élimination des liposomes *in vivo* restent peu clairs. A titre d'exemple, on peut citer l'alpha-2-macroglobuline, les apolipoprotéines A-I, A-II, A-IV, B et C. De plus, il existerait des opsonines spécifiques d'un organe du système phagocytant mononucléé qui augmenterait la reconnaissance des liposomes par les macrophages de celui-ci. Les dysopsonines, elles, posséderaient la propriété de limiter les interactions liposomes-cellules. Selon certains auteurs, l'élimination des liposomes par les macrophages serait au final régulée par l'équilibre existant entre opsonines et dysopsonines (Moghimi *et al.* 2003).

II.4.1.2. Interactions des liposomes avec les lipoprotéines plasmatiques

Les interactions avec les protéines plasmatiques sont diverses et complexes, et peuvent modifier terriblement la stabilité et le devenir *in vivo* des liposomes. Inversement, les phospholipides peuvent aussi modifier les activités biologiques des protéines.

La destabilisation des liposomes dans le sang (*figure 16*) a été attribuée aux lipoprotéines de haute densité (HDL) avec lesquelles il y a transfert des phospholipides "médié" par des protéines, du liposome vers les HDL avec fuite plus ou moins rapide du principe actif (Vemuri *et al.* 1995, Allen *et al.* 1981). Scherphof *et al.* (1997), ont montré qu'il pouvait aussi s'effectuer une insertion de l'apoprotéine-E, venant des HDL, dans la bicouche, entraînant ensuite une désorganisation des liposomes en structures micellaires. Leurs travaux ont été confirmés en ajoutant de la lactoferrine, inhibiteur des lipoprotéines contenant l'apoE, qui semble effectivement pouvoir ralentir la clairance sanguine des liposomes.

II.4.1.3. Interactions des liposomes avec les cellules sanguines

Plusieurs études ont montré que les liposomes pouvaient interagir avec la membrane plasmique des cellules du sang principalement par des mécanismes de fusion ou de transfert de phospholipides. Ces phénomènes, conditionnés par la nature des phospholipides qui les constituent, peuvent être à l'origine d'une destabilisation des vésicules (Düzgünes *et al.* 1999). En raison de leur abondance numérique, les érythrocytes et les plaquettes semblent les plus concernés par ces phénomènes. Les monocytes et les neutrophiles ont également une activité phagocytaire mais sont beaucoup moins représentés. Du point de vue physiologique, les cellules ayant endocyté des liposomes sont considérées comme sénéscentes et sont alors éliminées par les cellules du SPM. Parallèlement, les cellules ayant fixés

superficiellement ou ayant internalisé des liposomes peuvent, en fonction de leur capacité à quitter le lit vasculaire, véhiculer ces liposomes et leur contenu vers des sites extravasculaires (Devissaguet et Puisieux, 1993).

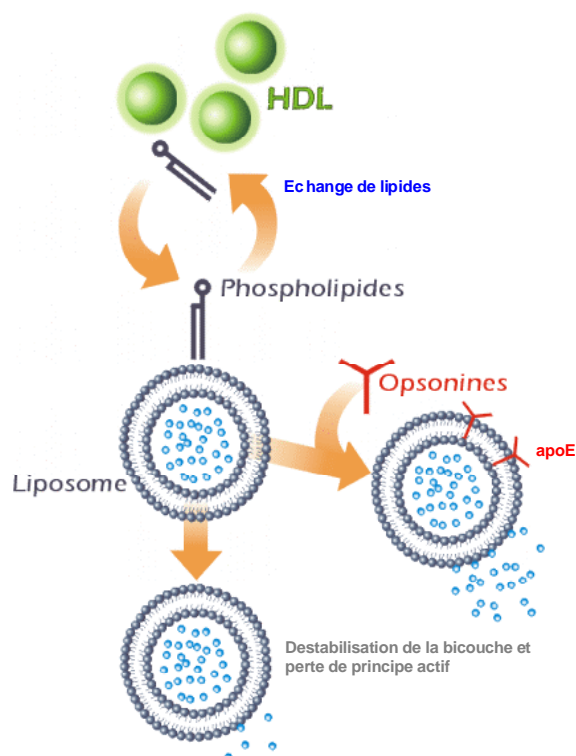


Figure 16 : Interactions des liposomes avec les lipoprotéines plasmatiques (<http://www.univ-montp1.fr> d'après Devoisselle et Soulié-Bégu, 2001).

II.4.2. Mécanismes d'interactions liposomes-cellules

Dès la sortie du lit vasculaire et suivant la nature du tissu et la physiopathologie concernée, les liposomes s'accumulent à proximité du vaisseau dans le tissu interstitiel. Dès lors, deux mécanismes peuvent se produire. Soit les liposomes ainsi piégés commencent à libérer leur contenu et la molécule active doit alors atteindre les cellules cibles pour agir (la

formulation des liposomes étant alors essentielle dans le contrôle de cette cinétique de libération), soit les liposomes interagissent avec les cellules avoisinantes.

In vitro, la plupart des mécanismes d'interactions liposomes-cellules ont pu être élucidés ainsi que le devenir des molécules encapsulées, grâce à différentes techniques d'encapsulation de marqueurs fluorescents (Weinstein *et al.* 1977, Szoka *et al.* 1989) ou par microscopie électronique (Szoka *et al.* 1980). Cependant les difficultés méthodologiques liées au suivi des liposomes *in vivo* limitent l'interprétation de nombreux résultats scientifiques. L'utilisation de méthodes non invasives comme celle des produits radiopharmaceutiques, l'exploitation de la fluorescence naturelle de certains principes actifs doit permettre de mieux préciser ce comportement *in vivo*.

Les liposomes peuvent interagir avec les cellules (*figure 17*) selon les mécanismes suivants :

- adsorption sur la membrane cellulaire (spécifique ou non spécifique) ,
- échange de lipides entre liposomes et cellules,
- fusion membranaire,
- pénétration intracellulaire par endocytose et dégradation intracellulaire.

L'adsorption par les cellules phagocytaires est normalement suivie par une endocytose ou rarement, une fusion. Quand la membrane du liposome fusionne avec celle des cellules, son contenu est directement transféré dans le cytoplasme. Au cours de l'endocytose, différentes étapes plus complexes se succèdent avec englobement de la particule dans une vacuole isolée, le phagosome, qui fusionne avec des granules lysosomiaux intracytoplasmiques pour former un phagolysosome. La digestion de la paroi liposomiale par de nombreuses enzymes libère son contenu qui diffuse ensuite à travers la paroi des phagolysosomes.

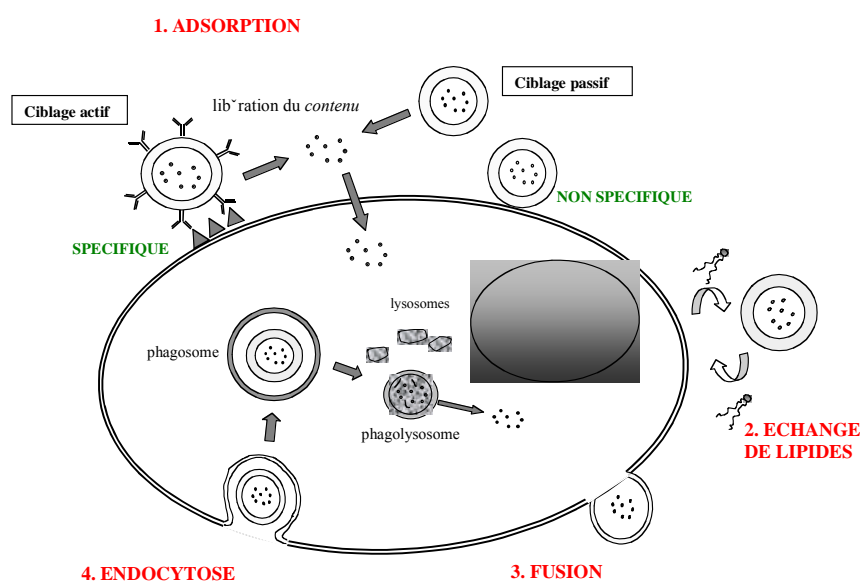


Figure 17: Différents types d'interactions entre cellules et liposomes (d'après Weinstein et Leserman, 1984)

Certains auteurs jugent que la fusion membranaire est peu probable et que dans la plupart des cas, on observe des transferts de lipides (liposomes-HDL) ou une internalisation des liposomes par endocytose. Ce phénomène dépend ensuite de la nature des liposomes, de leur taille mais aussi des caractéristiques de la cellule cible (Weinstein et Leserman, 1984) et du milieu environnant.

II.4.3. Distribution des liposomes après injection I.V.

II.4.3.1. Situation physiologique

Le passage du secteur sanguin vers le secteur tissulaire constitue la condition nécessaire, mais non suffisante, d'un ciblage spécifique des liposomes vers des cellules cibles. La paroi des artères, veines et artérioles constitue une barrière infranchissable pour les liposomes. La seule

extravasation envisageable se situe au niveau des capillaires dont la paroi endothéliale, formée d'une monocouche de cellules, autorise les échanges entre le sang et les tissus (Forssen 1997).

Les liposomes étant des particules dont le diamètre se situe dans un intervalle de 20 nm à 1 μm , un des critères majeurs de capture est la structure histologique des capillaires (continus, fenestrés, discontinus ou sinusoïdaux) représentée sur la *figure 18*. Une sortie du torrent circulatoire ne peut s'envisager que pour des capillaires dont la discontinuité forme un pore dont le diamètre est supérieur à celui des liposomes. Ainsi, les travaux de Poste *et al.* (1982) ont démontré l'incapacité des liposomes à quitter le lit vasculaire dans les organes ou tissus irrigués par des capillaires continus ou fenestrés. Cependant, des SUV de petites taille ont été retrouvés au niveau de l'intestin et des reins (capillaires fenestrés) sans qu'on ait pu toutefois donner la preuve que les liposomes franchissaient la membrane basale. Il n'a pas été montré non plus que les liposomes atteignaient intacts le compartiment extravasculaire (Hwang *et al.* 1987).

Toujours est-il que les seuls organes qui permettent un tel passage, en situation physiologique, sont ceux possédant des endothéliums capillaires de type discontinu. Leur structure, caractérisée par l'absence de membrane basale et de toute jonction inter-cellulaire (présence de multiples pores dont la taille peut atteindre 1 μm), permet l'accumulation des liposomes dans les organes du SPM (foie, rate, moelle osseuse).

Les capillaires sinusoïdaux du foie possèdent des pores de 100 nm de diamètre. Des liposomes différents par leur taille (< 100 nm ou > 100 nm) ne présentent pas le même type de capture. Ceux de petite taille peuvent soit être capturés par les cellules de Kupffer dont une partie du cytoplasme déborde dans le compartiment vasculaire, soit franchir les pores, pénétrant ainsi dans l'espace de Disse pour interagir enfin avec les hépatocytes. Les

liposomes dont le diamètre moyen est supérieur à 200 nm seront majoritairement capturés par les cellules de Kupffer.

➤ **Structure d'un endothélium capillaire de type continu**



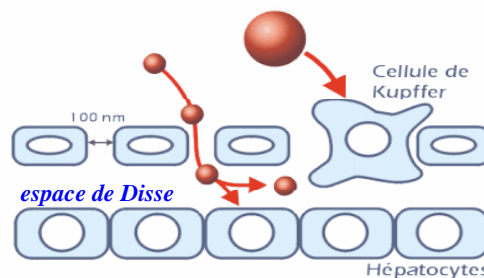
Capillaires de la très grande majorité des tissus (muscles lisses et striés, squelette, peau et tissu sous-cutané, cœur, cerveau, poumon) composés d'une monocouche de cellules endothéliales jointives et d'une membrane basale fibreuse s'opposant au transfert passif des liposomes et des macromolécules.

➤ **Structure d'un endothélium capillaire de type fenestré**



Structure voisine des capillaires continus mais absence totale de jonction entre certaines cellules (pores de 40 à 60 nm). Retrouvés dans le rein, l'intestin grêle et les glandes endocrines. Le mécanisme reste à préciser mais la membrane basale fibreuse ne paraît pas s'opposer au passage de particules dont le diamètre est inférieur 50 nm.

➤ **Structure d'un endothélium capillaire de type discontinu**



Caractérisés par l'absence de jonctions intercellulaires et de membrane basale (multiples pores dont la taille est comprise entre 100 et 1 μm). Rencontrés dans le foie (capillaires sinusoides), la rate et la moelle osseuse.

Figures 18 : Représentation schématique de la structure des endothéliums capillaires (Deviessaguet et Puisieux, 1993 d'après un schéma de Hwang K.J.).

II.4.3.2. Situation pathologique

La distribution extra-vasculaire des liposomes par filtration passive paraît, en situation physiologique, limitée aux endothéliums discontinus, mais toute altération, par exemple pathologique, peut modifier leur capacité à diffuser dans les tissus. C'est le cas des tissus inflammatoires et tumoraux qui semblent présenter une perméabilité élevée, notamment aux liposomes de petite taille (incluant les SUV). Ce phénomène a été exploité en imagerie médicale, à l'aide de liposomes radiomarqués pour mettre en évidence des sites infectieux, inflammatoires ou tumoraux (Forssen 1997).

Quelques auteurs ont démontré l'accessibilité de certaines tumeurs particulièrement pour des liposomes de petite taille (< 100 nm), ayant des temps de circulation prolongés, grâce à un phénomène qu'ils ont appelé "EPR-effect" pour "Enhanced Permeability and Retention" (Massing *et al.* 2000, Maeda *et al.* 2000). Les liposomes peuvent s'extravaser de la circulation générale, grâce à l'augmentation de la perméabilité microvasculaire au niveau des tumeurs, caractérisée par l'absence de membrane basale et la présence d'espaces entre les cellules endothéliales. De plus, l'absence de vaisseaux lymphatiques au niveau des tumeurs favorise ensuite l'accumulation des liposomes dans le milieu interstitiel, ce qui constitue la deuxième caractéristique de l' "EPR-effect" (Delattre 1993, Gabizon *et al.* 1995 et 1997).

Quelques publications décrivent l'extravasation des liposomes au niveau de la microcirculation tumorale (Liu *et al.* 1992, Gabizon *et al.* 1995, Mastrobattista *et al.* 1999, Maruyama *et al.* 1999). On peut supposer que les régions irriguées par les capillaires discontinus et par les canaux sinusoïdaux sont accessibles aux liposomes. Cependant, l'importance des

capillaires discontinus au sein d'une même tumeur n'est pas connue et varie certainement selon le type de tumeur (Gabizon *et al.* 1997). La pression interstitielle élevée présente dans la plupart des tumeurs peut également limiter l'accessibilité des liposomes au centre de la tumeur (Jain *et al.* 1988, Andresen *et al.* 2005). Pourtant, plusieurs études montrent la faisabilité du ciblage tumoral passif et quelques résultats prometteurs concernant l'immunociblage des liposomes ont été décrits (Ahmad *et al.* 1993, Maruyama *et al.* 1999, Park *et al.* 2001). Une approche indirecte pour détruire les cellules tumorales a également été décrite à l'aide de liposomes pouvant cibler spécifiquement la néovascularisation tumorale. Les cellules endothéliales de ces vaisseaux sont directement accessibles aux liposomes et la destruction d'un petit nombre seulement de ces cellules peut former un thrombus qui entraîne directement une diminution de la perfusion puis une nécrose tumorale (Mastrobattista *et al.* 1999, Dass 2003).

II.4.4. Modification de la pharmacocinétique des liposomes

Le principal problème rencontré avec les liposomes est qu'ils vont s'accumuler très rapidement dans les organes du SPM, avant d'atteindre leurs cibles extra, et peut-être même intravasculaires. Ainsi, si l'on veut cibler des tissus tumoraux ou des cellules localisées en dehors du SPM, il faut disposer de systèmes vecteurs dont la durée de vie plasmatique est prolongée.

II.4.4.1. Comment améliorer la durée de vie plasmatique des liposomes ?

Certains auteurs ont montré que la reconnaissance des liposomes par les macrophages est directement liée à leurs caractéristiques physico-chimiques et structurales dont la taille, la composition, leurs propriétés de surface (charge, caractère hydrophile ou hydrophobe), mais aussi à la dose à laquelle ils sont administrés (Allen *et al.* 1995, Düzgünes *et al.* 1999). En modifiant ces paramètres, on peut réduire significativement les interactions avec les protéines plasmatiques et échapper à la capture par les macrophages de SPM afin de prolonger significativement le temps de circulation des liposomes dans l'organisme.

a/ Augmentation de la dose

Un paramètre constant, valable quel que soit le type de liposome, est la dose administrée. Une forte dose, en dépassant les capacités de phagocytose des liposomes par les macrophages, conduit à une réduction de leur clairance et à un potentiel de distribution extravasculaire plus large (Hwang *et al.* 1987, Allen *et al.* 1995). Dans ce sens, certains auteurs ont montré qu'augmenter la dose de liposomes entraînait une diminution de la quantité de protéines du sang fixées par vésicule et augmentait leur temps de circulation *in vivo*.

Le phénomène de "saturation" des macrophages pour de grandes quantités de liposomes serait plutôt attribué à une plus grande consommation des opsonines dont le stock utilisé pour se fixer sur les liposomes semble non seulement limité mais aussi spécifique de la composition lipidique (Oja *et al.* 1996).

b/ Diminution de la taille

Les liposomes de petites tailles (SUV) sont moins vulnérables au phénomène d'opsonisation par les protéines sériques, en particulier par le système du complément (Maruyama *et al.* 1992, Liu 1997), d'où une moins bonne reconnaissance par les macrophages du SPM. Richards *et al.* (1986) ont montré qu'il en est de même que ce soit des liposomes uni ou multilamellaires et que d'une manière générale, l'épuration plasmatique des liposomes est toujours plus lente quand ils sont petits (de 80 à 200 nm, $T_{1/2} = 1,5h$ et > 200 nm, $T_{1/2} = 0,2h$). Un diamètre inférieur à 100 nm leur permet également de prolonger leur circulation par extravasation du système vasculaire.

c/ Influence de la composition

La présence de cholestérol dans la formulation liposomiale permet de diminuer les interactions avec les protéines du sang, comme l'albumine, la transferrine ou les macroglobulines, qui ont tendance à destabiliser les liposomes. L'inclusion de phospholipides ayant une température de transition de phase élevée (*cf tableau 4*) permet d'augmenter la rigidité de la paroi des liposomes *in vivo* et limite également le relargage des molécules encapsulées. La membrane liposomiale est alors plus stable et les échanges de lipides avec les lipoprotéines plasmatiques sont largement diminués. Ainsi, des liposomes conventionnels de petite taille (DSPC/Chol < 100 nm), ont une demi-vie dans l'organisme d'environ une heure, comparativement à des gros liposomes de composition fluide (EPC/Chol) qui ne peuvent circuler que quelques minutes (Boerman *et al.* 2000).

d/ Influence de la charge et de l'hydrophilie de surface

La charge de surface des liposomes, qui peut-être mesurée par la mesure du potentiel zéta, conditionne les interactions avec les protéines plasmatiques (comme les opsonines) puisqu'elles sont de nature électrostatique (interactions de Van der Waals). D'une manière générale, l'absence de groupes chargés à la surface des liposomes permet de réduire

ces interactions. De plus, il a été montré que des liposomes neutres ou chargés positivement acquièrent une charge négative dans la circulation, probablement par adsorption de protéines plasmatiques (comme les α 2-macroglobulines). Sans tenir compte de la charge acquise au contact du plasma, les liposomes chargés négativement sont en général éliminés plus rapidement de la circulation que les vésicules neutres ou positives (Gabizon et Papahadjopoulos 1992, Swapna *et al.* 1998).

De même, l'adsorption des opsonines à la surface des liposomes augmente en fonction de leur caractère hydrophobe (Patel *et al.* 1992). Ainsi, la stabilité colloïdale et biologique des liposomes est nettement améliorée en recouvrant les liposomes de polymères hydrophiles inertes qui stabilisent les liposomes stériquement (*Stealth*[®]-liposomes, *Liposome Technology Inc, USA*) et qui permettent de diminuer les interactions des liposomes avec les protéines circulantes (Ceh *et al.* 1997, Senior *et al.* 1991).

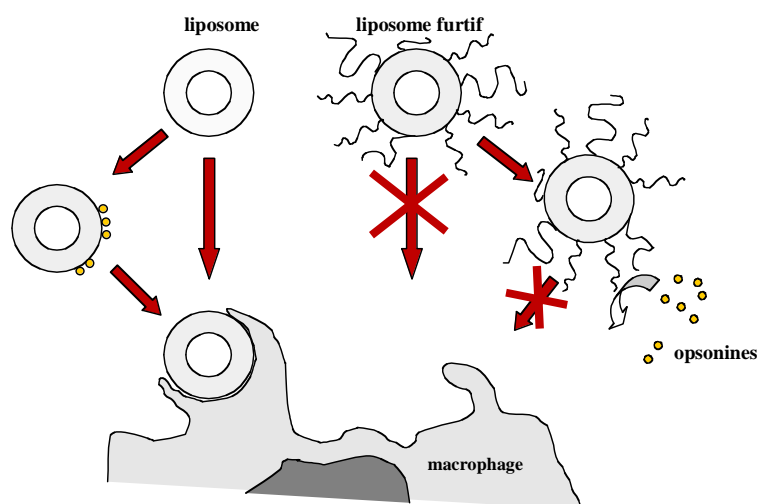


Figure 19 : L'interaction des liposomes furtifs avec les protéines plasmatiques (opsonines) est réduite, limitant ainsi la captation par les macrophages du SPM.

II.4.4.2. Les liposomes "furtifs"

A partir de l'observation de plusieurs cellules biologiques qui évitent la capture des macrophages, comme les hématies ou certaines bactéries pathogènes, différents systèmes biomimétiques, utilisant des dextrans, des polysaccharides ou des acides sialiques, ont été développés dont le principe consiste à réduire ou inhiber l'activation du complément.

A la fin des années 80, deux formulations principales de liposomes ont été proposées : l'une à base de résidus sialiques comme les monosialogangliosides (G_{M1}), l'autre à base de polymères hydrophiles, non ioniques et flexibles, comme les polyéthylène glycols (PEG) (Gabizon et Papahadjopoulos 1991, Mori *et al.* 1991, Bedu-Addo et Huang 1995, Senior *et al.* 1991). Les PEG forment une brosse hydrophile suffisamment dense, tout autour de la bicouche lipidique, qui empêche l'adsorption des opsonines favorables à l'activation du complément. Ces liposomes dits "furtifs" évitent alors la capture par le SPM (*figure 19*). L'effet dysopsonique est plus ou moins accentué en fonction du poids moléculaire des chaînes de PEG, de leur conformation et de leur densité à la surface des liposomes (Price *et al.* 2001, Passirani et Benoît, 2005).

Les liposomes pégylés sont de loin les plus utilisés. Ils sont obtenus par couplage covalent entre des chaînes de PEG et des phospholipides membranaires comme la phosphatidyléthanolamine (Maruyama *et al.* 1992, Zalipsky, 1995) et/ou du cholestérol (Carrion *et al.* 2001), afin d'éviter une perte des chaînes de polymères *in vivo*.

Les travaux de Mori *et al.* (1991) ainsi que ceux de Maruyama *et al.* (1992) ont montré que la répulsion stérique était directement proportionnelle à la longueur des chaînes de PEG (PEG 12000 = PEG 5000 > PEG 2000 > PEG 750...). En effet, l'estimation de la demi-vie des liposomes dans la circulation augmente de 0,5h à 0,7h, 1,7h, 6,2h et 3,4h après inclusion dans la composition lipidique de respectivement, PE-PEG 750, PE-PEG 2000,

PE-PEG 5000 et G_{MI} . En moyenne, les expériences ont montré que la stabilité optimale était obtenue pour environ 5 mol % de lipides pégylés avec des chaînes courtes (PEG < 3000). Mais ces résultats dépendent beaucoup de la composition en phospholipides du liposome. Des membranes fluides composées de phospholipides naturels (EPC/Chol) nécessiteront des dérivés pégylés de plus haut poids moléculaire (PE-PEG 5000 ou 12000) pour avoir un temps de circulation significativement prolongé. Pour liposomes plus rigides (DSPC/Chol ou DPPC/Chol) qui sont plus stables dans la circulation, des chaînes de polymères trop longues ne sont pas nécessaires (Maruyama *et al.* 1992, Lasic 1995). La longueur des chaînes de PEG mais aussi la composition lipidique sont donc tout aussi importantes à prendre en compte pour avoir la meilleure stabilité des liposomes *in vivo*.

L'augmentation de la distribution de liposomes pégylés par simple ciblage passif a été observée dans de nombreux modèles tumoraux (carcinome du colon, lymphomes, tumeurs mammaires et ovariennes...). Des mesures de l'extravasation (coefficient de perméabilité au niveau des tumeurs) ont montré que la perméabilité microvasculaire tumorale était deux fois plus importante pour des liposomes pégylés que pour des liposomes conventionnels, sans que ce phénomène soit clairement expliqué. En fait, les liposomes conventionnels ne circulent souvent pas assez longtemps pour bénéficier de ce mécanisme (Allen *et al.* 1995, Gabizon *et al.* 1995 et 1997). Pour atteindre des cibles peu accessibles (exemple des tumeurs), une forte barrière stérique semble recommandée, néanmoins, les chaînes de PEG peuvent ensuite avoir une influence sur le ciblage spécifique des liposomes (Klibanov *et al.* 1991). Comme nous allons le voir au paragraphe suivant, leur compatibilité avec les immunoliposomes a donc été largement étudiée.

II.4.4.3. Les immunoliposomes

Avec les nouvelles formulations destinées à augmenter le temps de circulation des liposomes, un regain d'intérêt se manifeste concernant le ciblage des liposomes. Ce ciblage peut reposer soit sur l'action d'un agent physique (température, lumière, pH), soit en conférant aux liposomes une spécificité vers un récepteur par incorporation ou greffage d'un ligand. Ces ligands peuvent être des lectines, glycoprotéines, enzymes, hormones mais aussi de petites molécules comme les peptides. Parmi les ligands les plus utilisés, on compte les AcM qui peuvent reconnaître des Ag exprimés de façon spécifique à la surface des cellules tumorales. En effet, le fait de coupler de façon covalente des AcM à la paroi des liposomes (immunoliposomes) pour cibler et traiter de façon spécifique des cellules tumorales est un modèle thérapeutique tout à fait attractif.

a/ Ciblage spécifique des liposomes

Le ciblage peut se faire de façon directe, quand le ligand à la surface du liposome reconnaît directement sa molécule complémentaire à la surface de la cellule cible, ou de façon indirecte. Le ciblage indirect fait intervenir une molécule supplémentaire qui reconnaît des sites similaires sur le liposome et sur la cellule cible ((strept)avidine ou biotine), ou des sites différents si elle possède deux spécificités distinctes (exemple des Ac bispécifiques qui reconnaissent un haptène fixé sur le liposome et un Ag spécifique d'une cible tumorale).

Plusieurs approches ont été envisagées pour le ciblage des liposomes vers des cellules spécifiques en utilisant des AcM (Barbet, 1995). Elles sont représentées dans la figure suivante

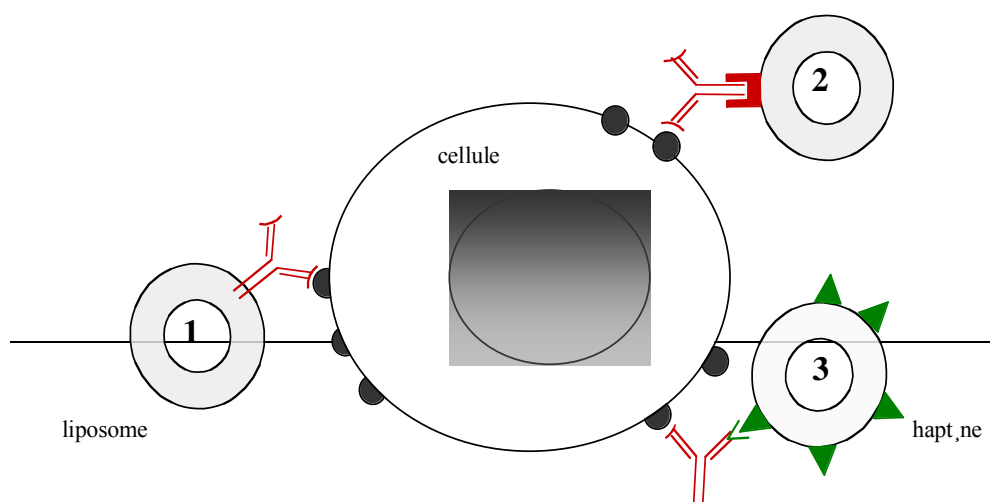


Figure 20 : Différents types de ciblage des liposomes.

1. **Immunoliposomes "classiques"** : vectorisés par l'intermédiaire d'un AcM capable de reconnaître un Ag exprimé de manière spécifique à la surface de la cellule cible. L'AcM est couplé aux lipides de façon covalente avant ou après la formation des liposomes.

2. Principe du **ciblage indirect** par l'intermédiaire de la protéine A ou du système avidine-biotine. La protéine A ou l'avidine sont couplées au liposome et l'Ac (natif ou biotinylé) est ajouté ensuite à la préparation. Cette technique permet d'utiliser des Ac de spécificités variées avec une même préparation de liposomes.

3. Utilisation d'**AcM bispécifiques** pour vectoriser des liposomes sur lesquels on a greffé une petite molécule appelée haptène. L'AcM bispécifique reconnaît d'un côté l'haptène et de l'autre les Ag de la cellule tumorale ciblée.

b/ Différents types d'immunoliposomes

Au cours du temps, les immunoliposomes ont dû évoluer pour permettre d'obtenir un système de vectorisation stable permettant à la fois une bonne biodistribution dans l'organisme et une reconnaissance antigénique efficace et spécifique. Ainsi, plusieurs sortes d'immunoliposomes sont apparus toujours dans l'optique de trouver le meilleur compromis entre ciblage et spécificité. En principe, on distingue trois types d'immunoliposomes qui sont représentés dans la figure suivante :

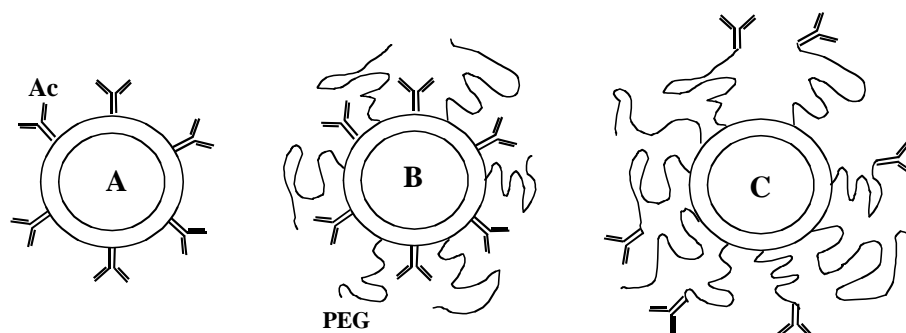


Figure 21 : Représentation schématique des trois types de base d'immunoliposomes (Koning 2002)

Type A : Immunoliposomes avec l'Ac fixé, de façon covalente le plus souvent, sur la membrane liposomiale. **Type B** : PEG-liposomes avec l'Ac fixé directement sur la membrane liposomiale. **Type C** : PEG-liposomes avec l'Ac fixé sur la partie terminale des chaînes de PEG. A et B représentent des immunoliposomes, pégylés ou non, dans lesquels l'Ac est couplé à la membrane, le plus souvent par une liaison thio-éther (Hansen). B : La présence des chaînes de PEG est reconnue pour gêner à la fois le couplage des Ac et la reconnaissance antigénique. Pour cette raison, certaines stratégies proposent de coupler les Ac sur les parties terminales des chaînes de PEG. Dans cette position, l'Ac peut soit être fixé dans une orientation quelconque ou spécifiquement via le fragment Fc.

De nombreux travaux ont montré que les liposomes conventionnels recouverts d'AcM (*Type A*) sont rapidement éliminés de la circulation par le SPM. D'autre part, l'efficacité de leur immunociblage dépend fortement de la quantité d'Ac à leur surface (Maruyama *et al.* 1990), ce qui limite leur utilisation thérapeutique.

Mori *et al.* (1991) ont montré que les immunoliposomes pouvaient aussi être furtifs (*Type B*). Mais, autant l'incorporation de G_{M1} améliore le ciblage en prolongeant leur temps de circulation, autant la longueur des chaînes de PEG peut l'inhiber. La présence de G_{M1} sur la surface liposomiale offre une barrière stérique plus faible que le PEG mais qui semble suffisante pour prévenir leur captation par les macrophages, tout en préservant la qualité de l'interaction Ag-Ac. Pourtant, le PEG est plus intéressant en terme de préparation, de coût et de choix de techniques de couplage avec les lipides.

Malheureusement, des essais chez la souris, ont montré que les PEG 5000 empêchaient la reconnaissance Ag-Ac (Klibanov *et al.* 1991). Des longueurs de chaînes moins importantes, comme le PEG 2000, permettent

de garder un ciblage tumoral sélectif avec un temps de circulation suffisamment prolongé pour pouvoir atteindre des cibles facilement accessibles, comme les cellules endothéliales vasculaires. Mais pour des cibles moins accessibles, comme les antigènes de surface des tumeurs solides, ces liposomes ne présentent pas une barrière stérique suffisante pour circuler assez longtemps et atteindre leur cible.

Klibanov *et al.* (1991), ainsi que Maruyama *et al.* (1995 et 1999), ont alors proposé d'utiliser le PEG d'une façon un peu différente, en couplant les Ac tout au bout de des chaînes de PEG (Type C) facilitant ainsi leur présentation à l'Ag, tout en préservant leur qualité de polymères hydrophiles. Depuis, de nombreuses techniques de couplage permettent une liaison ligands-PEG par l'intermédiaire de PEG fonctionnalisés et ancrés dans la paroi dans les liposomes par couplage avec la phosphatidyléthanolamine (Allen *et al.* 1995, Bendas *et al.* 1999, Hansen *et al.* 1995, Maruyama *et al.* 1995).

c/ Techniques de couplage des Ac aux chaînes de PEG

De nombreux auteurs ont proposés de nouvelles stratégies pour permettre le couplage covalent de l'Ac à l'extrémité des chaînes de PEG (*tableau 6*). Elles reposent au départ sur la fonctionnalisation des lipides pégylés pour qu'ils puissent réagir ensuite suivant trois réactions chimiques principales:

(i) réaction entre un groupe dithiopyridine et une fonction thiol pour former un pont disulfure : Le couplage peut être réalisée grâce à des réactifs bifonctionnels comme le SPDP (*N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate*, Barbet *et al.* 1981) pour former le PE-PEG-PDP sur lequel on fait réagir un dérivé thiolé de l'Ac (Ac-SH) (Allen *et al.* 1995, Mercadal *et al.* 1999).

(ii) réaction entre une fonction maléimide et une fonction thiol pour former une liaison thioéther : Maruyama *et al.* (1995) décrivent l'utilisation

d'un réactif, le SMPB (*N-succinimidyl-4-(p-maléimidophényl)butyrate*, Martin et Papahadjopoulos 1982) pour former un dérivé maléimide du PEG (PE-PEG-MPB), capable de réagir avec un Ac thiolé (Ac-SH)

(iii) réaction entre un acide activé et une amine (Ac-NH₂) pour former une liaison amidique (Maruyama *et al.* 1997).

D'autres méthodes sont proposées comme celle de l'équipe de Zalipsky (1993) par exemple, qui utilise un groupement hydrazide (Hz) en bout de chaîne de PEG pour réagir avec un groupement aldéhyde obtenu par oxydation du fragment Fc de l'Ac. Bendas *et al.* (1999) proposent une autre technique de conjugaison par fonctionnalisation du PEG avec du dichlorotriazine (PE-PEG-N₃). D'autres approches utilisent des liaisons carbamates par réaction entre une fonction amine de l'Ac et le PEG fonctionnalisé par un groupe p-nitrophényl-carbonyl (PE-PEG-NP) (Torchilin *et al.* 2005).

Enfin, une technique de "post-insertion" est décrite par l'équipe de Allen (2002). Elle consiste à coupler l'Ac à des micelles de PEG, fonctionnalisé par un groupement maléimide, avant de les intégrer dans la bicouche des liposomes par une simple étape d'incubation.

PEG fonctionnalisés	modification de l'anticorps	Auteurs
PE-PEG-PDP	maléimide (MPB-Ac)	Allen <i>et al.</i> 1995
PE-PEG-MPB	thiol (PDP-Ac)	Maruyama <i>et al.</i> 1995
PE-PEG-Hz	aldéhyde	Zalipsky <i>et al.</i> 1993 Harding <i>et al.</i> 1997
PE-PEG-COOH	aucune	Maruyama <i>et al.</i> 1997
PE-PEG-N ₃	aucune	Bendas <i>et al.</i> 1999

Tableau 6: Différents groupements chimiques utilisés pour le couplage Ac / PEG. Les méthodes de couplage entre PEG et Ac ainsi que la synthèse des différents PEG fonctionnalisés sont détaillées par Zalipsky *et al.* (1993, 1995).

L'efficacité de couplage PEG / Ac varie selon la technique utilisée. La méthode du PE-PEG-Hz a l'avantage d'être simple, de ne pas modifier les sites de fixation antigénique et de maintenir l'orientation des Ac à la surface des vésicules. Mais la liaison hydrazone est moins stable que la liaison thioéther (PE-PEG-PDP) qui offre les meilleures efficacités de couplage (jusqu'à 90 %) et qui est généralement la plus employée (Hansen *et al.* 1995).

Dans tous les cas, si l'on se base sur un poids moléculaire moyen de 2000 pour le PEG (4 à 8 mol % de la composition en lipides), et de 30 à 35 molécules d'Ac par vésicules, l'efficacité de ciblage des trois types d'immunoliposomes A (non pégylés), B (pégylés) et C (pégylés avec Ac en bout de PEG) est bien différente. La fixation des immunoliposomes de Type B sur leur cible est diminuée de moitié par rapport au Type A et l'on s'aperçoit qu'une grande quantité de Type B reste dans la circulation, ce qui prouve bien que les chaînes de PEG réduisent non seulement la captation par les cellules du SPM mais aussi la reconnaissance immunospécifique entre Ag et Ac. Le degré de fixation des Type C est 1,3 à 1,8 fois supérieur à celui des Type A (pour respectivement la méthode PE-PEG-COOH et PE-PEG-cyanure) d'où l'intérêt de fixer les Ac sur la partie terminale des PEG, favorisant non seulement leur biodistribution mais aussi la présentation de l'Ac vers sa cible antigénique. Ces effets varient ensuite selon la longueur des chaînes de PEG, leur concentration, le nombre d'Ac fixés à la surface des vésicules et l'accessibilité de l'Ag.

Dans les tumeurs solides, où cette dernière est réduite, la nécessité d'une circulation prolongée des liposomes impose une barrière stérique plus forte tout en maintenant une bonne efficacité de couplage des Ac sur les liposomes. Pour cela, certains auteurs (Mercadal *et al.* 1999) ont préparé des liposomes en mélangeant des chaînes courtes (PEG 2000) pour la furtivité, à des PEG fonctionnalisés plus long (PE-PEG3400-PDP) dans le but de minimiser les interférences entre les chaînes de polymère au moment des

réactions de conjugaison et de pouvoir fixer un plus grand nombre d'Ac. Les résultats semblent satisfaisants *in vitro*. Maruyama *et al.* (1997 et 1999) ont démontré l'amélioration apportée par des immunoliposomes Fab'-Type C de petite taille (< 100 nm), *in vivo*, dans le traitement des tumeurs solides exprimant l'ACE. Chez des souris xéno greffées, ils montrent 24 h après injection I.V. de liposomes conventionnels ou d'immunoliposomes pégylés que l'on retrouve respectivement 7 et 20 % de la dose injectée par gramme de tumeur. La littérature rapporte aussi l'amélioration de l'efficacité anti-tumorale obtenue avec des immunoliposomes pégylés contenant de la doxorubicine, par rapport à des liposomes pégylés non immunospécifiques (Ahmad *et al.* 1993). Park *et al.* (2001) ont également montré l'efficacité anti-tumorale de leurs immunoliposomes pégylés chargés en DOX pour le ciblage spécifique des cellules exprimant l'Ag HER2. Dans cette étude, le fragment d'Ac (Fab' F5 anti-HER2) est couplé en bout de chaîne de PEG. Ils confirment aussi les résultats de plusieurs publications démontrant que le couplage d'une Ig entière entraîne une élimination plus rapide des immunoliposomes par le SPM qu'avec des fragments d'Ac (Fab' ou scFv) (Patel 1992, Mastrobattista *et al.* 1999). En effet, des immunoliposomes pégylés sur lesquels on a couplé environ 51 molécules d'IgG à la partie distale du PEG sont rapidement éliminés de la circulation (60 % à 1 h). Les mêmes immunoliposomes pégylés portant une moyenne de 517 fragments Fab' dérivant du même AcM, montrent un temps de circulation 6 fois plus long.

L'utilisation d'immunoliposomes *in vivo* est très compliquée et pose de nombreux problèmes bien que leurs techniques de préparation soient de plus en plus performantes. En revanche, l'intérêt des liposomes furtifs couplé à la possibilité d'obtenir un ciblage tumoral sélectif par l'intermédiaire d'un AcM, laisse entrevoir des perspectives thérapeutiques très intéressantes.

II.5. Les applications des liposomes

Les liposomes ont été envisagés comme outil thérapeutique il y a bientôt 30 ans. Dans certains domaines, comme la cancérologie et l'infectiologie, les liposomes comme vecteurs médicamenteux ont été couronnés de succès. Depuis, peu de nouveaux médicaments ont vu le jour sur le marché, mais la recherche continue à développer cette forme thérapeutique car elle offre en principe de nombreux avantages. Les liposomes sont composés de molécules lipidiques naturelles, biodégradables, non toxiques et non immunogènes. De plus, ils permettent d'améliorer la solubilité de certaines substances comme l'amphotéricine-B ou le minoxidil, et surtout de diminuer significativement la toxicité des principes actifs pour certains tissus particulièrement sensibles (comme reins, cœur, cerveau pour l'amphotéricine-B ou la doxorubicine).

De nombreux progrès ont été effectués au niveau galénique et technique : études physico-chimiques rigoureuses, stabilité des liposomes et production en grande quantité. Reste à démontrer leur efficacité clinique dans de nouveaux domaines. Quelques études proposent d'utiliser les liposomes en thérapie génique, en imagerie médicale, en immunologie pour le développement de nouveaux vaccins, ainsi que des applications potentielles dans le traitement des infections bactériennes, virales et parasitaires. Le *tableau 7* liste les produits sous forme liposomale sur le marché ou en cours d'essais cliniques.

Les avantages et les limites des liposomes comme vecteurs d'agents thérapeutiques dépendent principalement des interactions qu'ils vont avoir avec les cellules et donc de leur devenir *in vivo* après administration, et comme nous l'avons vu, la biodistribution des liposomes varie selon leur composition et leur structure. A partir de là, on peut trouver une grande diversité d'applications thérapeutiques, déjà utilisés ou en cours de développement, selon le type de liposomes utilisés.

Principes actifs	Spécialités	Avancée thérapeutique	Laboratoires pharmaceutiques
Anticancéreux			
Daunorubicine	Daunoxome⁰	AMM depuis 1996	NeXtar (USA)
Doxorubicine	Doxil⁰/Caelyx⁰	AMM depuis 1995 (USA) et 1996 (CEE)	Sequus (USA) / Schering (Europe)
	Myocet⁰	AMM	The liposome Company, Elan (USA)
Annamycine	-	Phase II	Aronex (USA)
Cisplatine	Platar⁰	Phase III	Aronex (USA)
	Spy 07	Phase I	Sequus (USA)
Acide r-tinoïque	Atragen⁰	Phase II	Aronex (USA)
Edelfosine	TLC ELL-12	Phase I	The liposome Company, Elan(USA)
Vincristine	-	Phase I	Inex (Canada)
Antinfectieux			
Amphotéricine B	Ambisome⁰	AMM depuis 1989 (USA) et 1990 (CEE)	NeXtar (USA)
	Abelcet⁰	AMM	The liposome Company, Elan (USA)
	Amphocil⁰	AMM	Sequus (USA)
Nystatine	Nyotran⁰	Phase III	Aronex (USA)
Amikacine	Mikasome⁰	Phase II / III	Sequus (USA)
Vaccins			
anti-hépatite A	Epaxal⁰	AMM depuis 1994 en Suisse	Swiss Serum Institute (Suisse)
anti-hépatite A et B	-	Phase I	Swiss Serum Institute (Suisse)
Diphthérie-tétanos-hépatite A	-	Phase I	Swiss Serum Institute (Suisse)
Diphthérie-tétanos-grippe-hépatite A	-	Phase I	Swiss Serum Institute (Suisse)
Autres			
Lidocaïne	ELA-Max⁰	AMM depuis 1998 aux USA	Biozone (USA)
Prostaglandine E2	Ventus⁰	Phase III (chec)	The liposome Company, Elan (USA)

Tableau 7 : Formulations liposomales commercialisées ou en cours d'évaluation clinique (Barrat 2000).

Les liposomes conventionnels sont utilisés pour cibler et délivrer des agents anti-infectieux aux macrophages infectés. Le ciblage passif des macrophages peut également servir à délivrer des immunomodulateurs permettant d'augmenter la faculté des macrophages à détruire les cellules néoplasiques et d'améliorer la résistance aux microorganismes infectieux. De nombreux travaux ont exploité la particularité des liposomes qui est de pouvoir servir de transporteurs d'Ag (protéines, peptides ou haptènes),

d'adjuvants (lipide A, muramyldipeptide...) et/ou d'immunomodulateurs (cytokines, lymphokines...) (Torchilin 2005).

Enfin, les liposomes conventionnels peuvent améliorer la présentation antigénique. En effet, certaines molécules ne peuvent induire de réponse immunitaire sans être fixées à de plus grosses molécules. Les liposomes, que l'on peut associer à des adjuvants, sont alors très utiles pour induire une immunité *in vivo* et ont été employés à ce titre pour le développement des vaccins (exemple de l'Epaxal[®], vaccin contre l'hépatite A).

Les liposomes furtifs ont la possibilité d'échapper à la capture par les macrophages et de passer, pour les plus petits d'entre eux, hors de la circulation. Dans de nombreuses tumeurs solides et sites inflammatoires, l'endothélium est plus perméable et permet une extravasation des petits liposomes (*cf "EPR Effect" § II 4.3.2*). Il en résulte une accumulation des liposomes sur ces sites qui peut être mise à profit en cancérologie (exemple du Caelyx[®]) mais aussi dans d'autres domaines. Une étude a montré l'utilité des liposomes en imagerie scintigraphique à l'aide de liposomes furtifs marqués au ^{99m}Tc ou à l'¹¹¹In pour la détection de sites infectieux ou inflammatoires (Boerman 2000 et 2001). Ces liposomes furtifs peuvent également être utilisés comme "réservoirs" pour une délivrance prolongée de principes actifs (exemple avec la vasopressine, Woodle 1995). Dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, les liposomes ont été utilisés comme vecteur de corticostéroïdes dans le but de réduire, après administration intra-articulaire, la toxicité systémique de ces produits.

Il n'y a pas encore de spécialités sur le marché avec les **immunoliposomes**. Plusieurs obstacles existent encore concernant l'efficacité des thérapeutiques extra-vasculaires. L'exemple le plus avancé est celui des immunoliposomes de Doxil[®] qui ciblent le HER2 sur les cellules de cancer du sein (Park *et al.* 2001). Après injection I.V., les immunoliposomes localisent rapidement les cibles accessibles qui sont dans

les compartiments sanguins (cellules du sang, cellules endothéliales). Il est intéressant d'utiliser les immunoliposomes pour cibler certaines cellules infectées de la circulation sanguine afin de les rendre étrangères à l'organisme et de favoriser leur élimination par les macrophages. Peeters *et al.* (1989) proposent une application *in vivo* de ce modèle thérapeutique. Ils injectent en I.V. des immunoliposomes anti-hématies de souris contenant de la chloroquine, pour traiter des rats dont les hématies sont parasitées avec *Plasmodium berghei* (*malaria*).

Une autre utilisation des immunoliposomes concerne le système ADEPT pour "Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy". Ce système consiste à transformer une prodrogue en un agent cytotoxique, à proximité d'une cellule tumorale afin de la détruire, par l'intermédiaire d'une enzyme et d'un Ac. Une amélioration du système peut être apportée par l'utilisation d'immunoliposomes transportant l'enzyme activatrice (immuno-enzymosomes) en plus grande quantité que ne le permet initialement le complexe Ac-enzyme (*figure 22*). Ce principe a été appliqué *in vitro* avec des immuno-enzymosomes transportant la B-glucuronidase capable d'activer des prodrogues d'anthracycline-glucuronide.

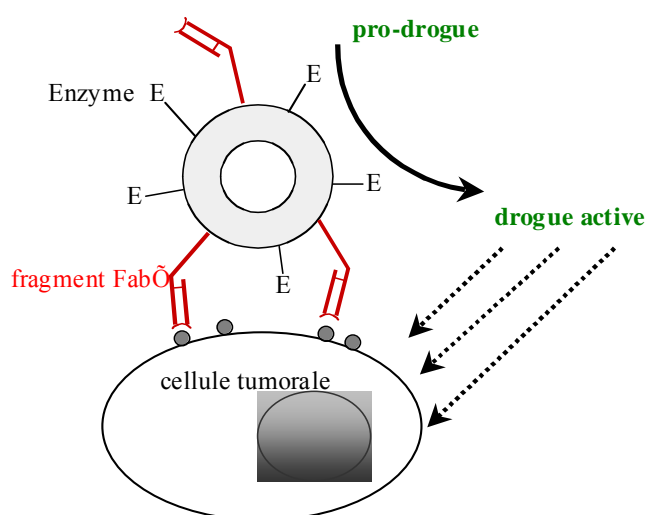


Figure 22 : Représentation schématique du concept ADEPT (Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy) avec des immuno-enzymosomes. Quand la prodrogue est injectée, elle est activée par les enzymes pré-localisées sur la surface de la cellule tumorale grâce aux immunoliposomes. Elle peut alors agir et détruire la cellule (Lasic, 1998).

Une nouvelle technique de transfection cellulaire appelée Lipofection utilise des **liposomes cationiques**. Du fait de leur nature lipidique et de leurs propriétés d'encapsulation de larges molécules, les liposomes constituent des candidats potentiels pour le transfert de gènes. Les Lipoplexes sont définis comme les complexes formés entre les liposomes cationiques et les acides nucléiques (revue de Legendre et Szoka, 1993). Depuis une vingtaine d'années, ils font l'objet d'études intensives comme véhicules d'ADN ou pour la thérapie antisens à l'aide d'oligodéoxynucléotides (ODN).

II.5.1. Formes liposomales commercialisées

II.5.1.1. En infectiologie

L'administration intraveineuse des liposomes peut permettre une concentration de principes actifs dans les macrophages. Ces macrophages sont naturellement le lieu d'une accumulation anormale d'agents infectieux comme :

- des champignons (*Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*),
- des bactéries (*Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Legionella pneumophila*),
- des protozoaires (*leishmanias*, *trypanosomes*, *toxoplasmes*),
- des virus (*Herpes virus*, *Morbillivirus*, *Vesiculovirus*), ou
- des rickettsies (*Rickettsia rickettsii*).

De nombreux travaux ont montré l'intérêt d'encapsuler des agents anti-infectieux dans les liposomes. Une efficacité a été démontrée pour plusieurs antibiotiques: nystatine, gentamicine, amikacine, ampicilline, amphotéricine-B (infections bactériennes et fongiques) et pour certains antiviraux comme la ribavirine ou l'AZT (Lasic 1995). D'une manière

générale, on observe une meilleure pénétration intra-cellulaire de l'agent anti-infectieux ainsi qu'une réduction de sa toxicité sur l'organisme.

Le principal agent anti-infectieux commercialisé sous forme de liposomes est l'amphotéricine-B (Ambisome[®]). C'est une formulation lyophilisée d'amphotéricine-B (Adler-Moore *et al.* 1993) incorporée dans de petits liposomes chargés négativement (SUV composés de HSPC/cholestérol/DSPG/ampho-B avec un ratio molaire de 2:1:0,8:0,4). Le principe actif possède une partie hydrophobe qui lui permet de s'intégrer dans la bicouche lipidique.

L'intérêt de cette formulation est principalement de pouvoir traiter, avec une meilleure tolérance, les mycoses systémiques profondes que l'on retrouve particulièrement chez les sujets immunodéprimés (candidoses, aspergilloses, cryptococcoses, histioplasmoses...) et qui sont d'évolution rapidement fatale. En effet, l'amphotéricine-B sous forme de liposomes a permis de diminuer la néphrotoxicité du principe actif et d'améliorer son efficacité en augmentant les doses administrées. D'autant plus que la distribution tissulaire des liposomes concerne le foie, la rate et les poumons qui sont riches en macrophages et qui constituent justement la cible tissulaire la plus fréquente des infections fongiques systémiques (Couvreur 1993).

II.5.1.2. En cancérologie

En thérapeutique anticancéreuse, ce sont les anthracyclines qui ont fait l'objet de la majorité des études cliniques (doxorubicine et daunorubicine) et d'une façon générale, la doxorubicine est très employée pour étudier l'efficacité d'encapsulation et la stabilité des liposomes (Li *et al.* 1998, Drummond *et al.* 1999, Barenholz *et al.* 2001).

En adoptant une formulation liposomale, on a pu utiliser des doses plus importantes d'anthracyclines tout en limitant l'apparition d'effets

secondaires, principalement leur cardiotoxicité. Néanmoins, une supériorité de l'activité antitumorale n'est pas encore démontrée. Cependant les cinétiques de libération mettent en évidence l'avantage de ce système réservoir qui délivre peu à peu la molécule active au niveau tumoral (Forssen *et al.* 1997).

Caelyx[®] ou Doxil[®] (doxorubine) et Daunoxome[®] (daunorubicine) font partie des liposomes ayant des temps de circulation prolongés (*tableau 8*). Les liposomes de Doxil[®] sont furtifs parce qu'ils sont pégylés et les liposomes de Daunoxome[®] grâce à leur très petite taille et leur composition qui leur procure une membrane particulièrement rigide. Les deux spécialités permettent d'obtenir de fortes concentrations d'anthracyclines au niveau des tumeurs (Gabizon, 1995) par un phénomène de ciblage passif au cours duquel les liposomes sont transférés au travers de la barrière vasculaire vers les tissus tumoraux, relativement perméables (Massing *et al.* 2000, Maeda *et al.* 2000). De nombreuses études sont en cours pour élargir les indications actuelles pour lesquelles ces produits ont l'AMM (*tableau 8*).

Spécialités	Principe actif PA	Taille (nm)	Composition lipidique	Indications
DAUNOXOME[®]	Daunorubicine	45	DSPC/Chol	sarcome de Kaposi
CAELYX[®] (DOXIL[®] - USA)	Doxorubicine	< 100	HSPC/Chol/DSPE-PEG	sarcome de Kaposi cancer de l'ovaire
MYOCET[®] (EVACET[®] - USA)	Doxorubicine	150	EPC/Chol	cancer du sein métastatique

1 *Tableau 8 : Indications des formulations liposomales d'anthracyclines commercialisées (Drummond et al. 1999).*

Certaines formulations proposent en effet des immunoliposomes furtifs contenant de la doxorubicine et reconnaissant l'Ag CD19 présent sur les cellules de myélome multiple (Lopes de Menezes 2000). D'autres auteurs proposent aussi, dans des essais de phase I/II, d'associer le Myocet[®]

au cyclophosphamide, à la vincristine et à la prednisone pour traiter des LMNH de haut grade (Levine *et al.* 2000). Pour le moment, il n'y a pas assez patients traités et il est encore trop tôt pour pouvoir discuter objectivement ces résultats. De nombreux anti-cancéreux sont également en cours d'essais sous forme de liposomes et il y a des raisons d'espérer que plusieurs d'entre eux pourront bientôt améliorer la situation de certains patients.

II.5.2. Place des liposomes radiomarqués

Les liposomes ont été jusqu'à présent utilisés pour transporter des radioéléments à des fins diagnostiques. Il y a beaucoup d'études décrivant le radiomarquage des liposomes au technétium-99m, à l'indium-111 ou au gallium-67, pour l'imagerie qui ont démontré un bon tropisme in vivo des liposomes pour les tumeurs, les sites infectieux et inflammatoires (Espinola *et al.* 1979, Proffitt *et al.* 1983, Phillips *et al.* 1992, Woodle 1993, Oku 1999, Boerman *et al.* 2001). Plusieurs applications avec des liposomes radiomarqués sont également citées comme la lymphoscintigraphie, l'évaluation du volume sanguin et même l'imagerie des tissus ischémiés myocardiques (Phillips et Goins, 1995)

Kostarelos et Emfietzoglou (2000) ont radiomarqué différents types de liposomes (MLV, SUV, recouverts ou non de G_{MI} ou de PEG) avec des émetteurs β (^{67}Cu , ^{188}Re , ^{90}Y , ^{131}I) et un émetteur α (^{211}At), pour effectuer un ciblage tumoral passif (sans l'utilisation d'Ac) chez l'animal xéno greffé au niveau du foie et du muscle avec des cellules tumorales humaines. Les doses absorbées au niveau tumoral ainsi que les ratios tumeur/organe sain ont été calculés pour chaque combinaison liposome-radionucléide. Les moins bons résultats sont obtenus avec les MLV, rapidement éliminés de la circulation. Les radionucléides de demi-vie courte (^{188}Re et ^{211}At) délivrent

de plus fortes doses au niveau du muscle sous forme de liposomes furtifs (G_{MI} en particulier) par rapport aux SUV. C'est l'inverse pour les radionucléides de longue demi-vie (^{67}Cu , ^{90}Y , ^{131}I). Ce qui indique que l'efficacité dépend non seulement de l'énergie des radionucléides mais aussi de leur période physique qui doit être corrélée au temps de biodistribution de chaque type de liposomes. Au final, leur étude dosimétrique montre que si les SUV pégylés, composés de phospholipides saturés et de cholestérol, étaient radiomarqués avec des radionucléides d'intérêt en thérapeutique, ils pourraient délivrer des doses efficaces aux tumeurs en épargnant la moelle osseuse et en gardant une dosimétrie tout à fait acceptable pour le foie et la rate .

Mais, dans la littérature, très peu de liposomes ont été radiomarqués avec des radionucléides d'intérêt en thérapeutique. Les différents radiomarquages de liposomes effectués jusqu'à présent, dans le but d'une application thérapeutique, ont été réalisés par encapsulation active de radionucléide, comme l'yttrium-90 (Utkhede *et al.* 1994) ou les rhénium-186/188 (Hafeli *et al.* 1990, Bao *et al.* 2003) à l'aide d'un gradient transmembranaire. Henriksen *et al.* (2004) ont également radiomarqués les liposomes avec des émetteurs α (actinium-225, radium-223 et 224). Ces techniques ont permis de radiomarquer les liposomes avec des radionucléides intéressants mais l'activité spécifique (MBq/ μ mol de lipides) reste relativement faible.

Pourtant, l'immunociblage des tumeurs par des liposomes radiomarqués connaît un regain d'intérêt même s'il reste un domaine peu exploré. Le couplage d'Ac à la surface des liposomes (immunoliposomes) a été décrit il y a déjà plusieurs années (Connor *et al.* 1985, Hansen *et al.* 1991) et plusieurs techniques de préciblage utilisant, soit des AcM bispécifiques (Cao et Suresh 2000), soit le système avidine-biotine (Xia *et*

al. 2002), ont été testées avec des liposomes radiomarqués. Quelques travaux *in vitro* ont été réalisés sur des cellules de carcinomes ovariens avec des liposomes biotinylés contenant du rhénium-188, puis chez la souris sur des cellules humaines de tumeurs gastriques (Maruyama *et al.* 1997, Xiao *et al.* 2002). En 2000, Cao *et al.* ont montré la faisabilité d'un ciblage tumoral sélectif, quatre fois supérieur avec des liposomes biotinylés radiomarqués et l'utilisation d'AcM bispécifiques (anti-biotine x anti-Ag tumoral). Mais jusqu'à présent, aucune publication ne mentionne une activité spécifique suffisante des liposomes pour envisager une application thérapeutique.

OBJECTIFS
DU TRAVAIL DE THÈSE

L'objectif principal de ce travail de thèse est la mise au point d'une nouvelle stratégie thérapeutique anti-tumorale, basée sur l'utilisation de liposomes radiomarqués et capables de cibler les cellules tumorales de façon spécifique.

La RIT a montré son efficacité dans le traitement des lymphomes. Par contre, pour les tumeurs solides, son efficacité est en partie limitée par la faible activité que peuvent délivrer les AcM radiomarqués aux cellules tumorales. Pour résoudre ce problème, nous avons envisagé l'utilisation de liposomes immunospécifiques radiomarqués dans une technique de préciblage. Le but est d'augmenter la quantité de radioactivité susceptible d'être fixée sur les tumeurs, sans perdre de spécificité par rapport aux techniques de préciblage déjà validées.

Les liposomes sont en principe capables de répondre à cette attente car ils sont susceptibles de délivrer de plus fortes activités que les AcM ou les haptènes radiomarqués. En effet, ils peuvent transporter un plus grand nombre de noyaux radioactifs, soit par inclusion des radionucléides dans la membrane lipidique, soit par encapsulation dans l'espace interne. Après radiomarquage, la spécificité du ciblage tumoral est assurée par un haptène couplé de façon covalente à un phospholipide membranaire, et par l'utilisation d'un AcM bispécifique, c'est-à-dire anti-haptène et anti-Ag tumoral (*figure 23*).

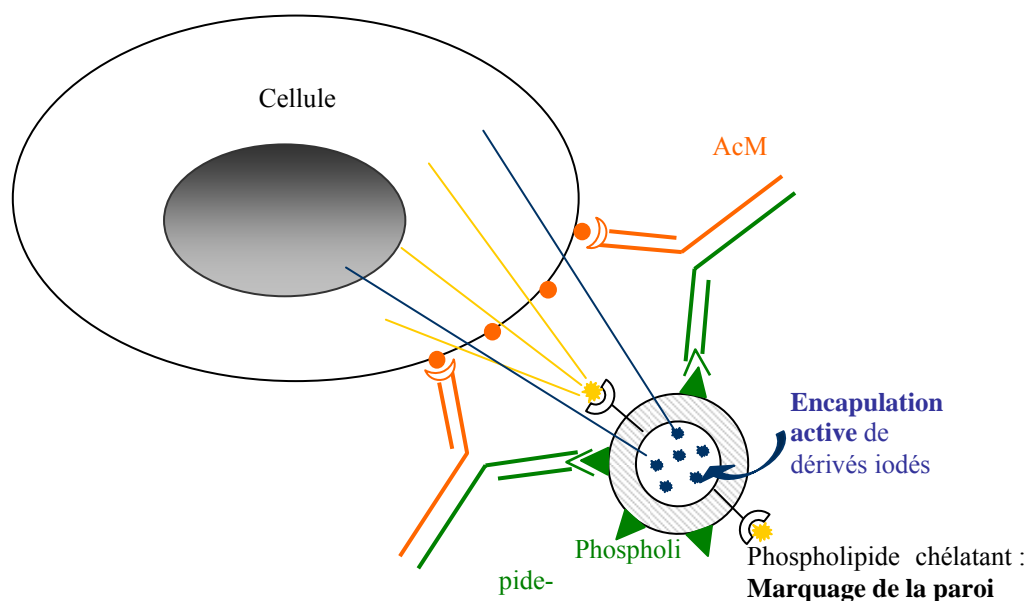


Figure 23 : Préciblage de liposomes radiomarqués.

Ce travail s'articule en quatre parties dont les principaux objectifs sont les suivants :

1. **Préparer des liposomes** stables qui pourront être radiomarqués selon plusieurs techniques de marquage. Pour cela, nous avons cherché à :
 - Optimiser leur formulation et leur calibration pour obtenir une bonne stabilité *in vitro* mais surtout *in vivo*.
 - Trouver le meilleur compromis entre la formulation des liposomes et les possibilités de radiomarquage.
2. **Radiomarquer les liposomes** en mettant au point des méthodes de marquage simples, rapides et efficaces, sur des liposomes pré-formés. Le but de cette partie est d'optimiser l'activité spécifique des liposomes tout en limitant les risques liés à la manipulation des rayonnements ionisants. Le radiomarquage des liposomes a été envisagé de deux manières différentes. La première consiste à

marquer la paroi des liposomes à l'indium-111 par l'intermédiaire d'un agent chélatant, l'acide diéthylènetriamine pentaacétique (DTPA) couplé de façon covalente à un phospholipide membranaire. La seconde consiste à incorporer différents réactifs radio-iodés à l'intérieur des liposomes par une technique d'encapsulation active, utilisant un gradient de pH ou de concentration.

3. **Tester *in vitro*** les différentes formulations de liposomes avant d'envisager leur utilisation chez l'animal. Dans ce but, nous avons mis au point:
 - **Des tests de stabilité sérique** pour connaître l'intégrité des liposomes et la "longévité" des radiomarquages une fois en contact avec un milieu biologique (sérum humain à 37°C).
 - **Des tests d'immunoréactivité** pour évaluer la capacité de reconnaissance des AcM vis-à-vis d'un haptène couplé à la paroi des liposomes, afin de pouvoir envisager un ciblage tumoral sélectif selon le choix des AcM.
 - **Un test d'activation du complément** afin d'observer l'influence de la pégylation sur l'activation des protéines du complément et de déterminer la formulation "idéale" pour obtenir théoriquement une bonne furtivité des liposomes *in vivo*.

4. **Etudier ce système sur un modèle animal.** L'objectif ici est de connaître la pharmacocinétique et la biodistribution des liposomes radiomarqués afin d'optimiser leur ciblage *in vivo*. Dans cette partie, nous utiliserons les formulations de liposomes optimisées lors des tests *in vitro* et les techniques de marquage utilisant l'indium-111 et l'iode-125.

Ce projet est assez complexe car il réunit différentes disciplines: chimie, galénique, radiopharmacie, immunologie, médecine nucléaire, chacune ayant ses propres problèmes, subtilités et limites. C'est pourquoi chaque partie a été traitée séparément sous la forme "introduction, matériel et méthodes, résultats, discussion" pour permettre de resituer chaque partie dans son contexte. Une discussion générale effectue ensuite la synthèse des résultats obtenus dans chaque domaine, en comparaison avec les résultats observés dans la littérature.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de recherche de l'unité INSERM 601 à Nantes, pour la mise au point des radiomarquages, la chimie et les études pharmacocinétiques, et en collaboration avec l'équipe INSERM U646 d'Angers, pour les contrôles concernant les liposomes, les tests d'activation du complément et une partie des études chez l'animal.

Chapitre II

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

I. PRÉPARATION DES LIPOSOMES

I.1. Introduction

Les liposomes sont préparés selon la technique de Bangham *et al.* décrite au chapitre I (§ II.2.1), par hydratation d'un film phospholipidique. Ils sont ensuite calibrés par la méthode d'extrusion sur des membranes de polycarbonate.

Différentes formulations de liposomes ont été préparées et comparées en respectant une proportion entre les différents rapports molaires phospholipides-cholestérol qui assure une bonne stabilité des vésicules aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Afin d'améliorer leur temps de circulation dans l'organisme, nous avons préparé des liposomes pégylés, grâce à un phospholipide couplé au polyéthylène glycol (DMPE-PEG2000).

Pour permettre le radiomarquage de la paroi des liposomes, nous avons inclus dans la formulation un phospholipide couplé à un agent chélatant (exemple du DTPA). De même, pour permettre leur vectorisation, nous avons synthétisé des phospholipides couplés à un haptène (exemple du DNP) capable d'être reconnu spécifiquement par un AcM. La synthèse chimique de ces phospholipides "modifiés" est réalisée avant la préparation des liposomes. Pour la clarté du document, leur synthèse est détaillée en *annexe 1*.

Selon l'application ou le type de radiomarquage envisagés, la formulation des liposomes, tant dans la composition lipidique que dans celle de la phase aqueuse, sera donc légèrement différente. Chaque variante sera détaillée dans le paragraphe correspondant mais le principe de la préparation des liposomes, présenté juste après, sera conservé tout au long de ce travail.

I.2. Formulation des liposomes

Quelques règles de base sont à respecter concernant la formulation des liposomes (*cf chap.I § II.1.5*):

- Le cholestérol doit toujours représenter au moins 30 % du rapport molaire dans la formulation, car sa structure rigide diminue la fluidité de la bicouche et permet d'obtenir une bonne stabilité des liposomes. Les 70 % restants sont généralement représentés par les phospholipides (Kirby *et al.* 1980).

- Les premiers liposomes que nous avons préparés sont à base de phospholipides insaturés d'origine naturelle (lécithines de jaune d'œuf ou EPC) puis nous les avons remplacés par des phospholipides saturés, d'origine synthétique, qui permettent d'obtenir une bicouche plus rigide (DMPC ou DSPC). Par contre, pour ces phospholipides synthétiques, les températures de transition de phase, plus élevées que pour les lécithines, doivent être prises en compte au moment de la préparation (23°C et 55°C pour DMPC et DSPC respectivement) (Fattal *et al.* 1993).

- La DMPE, utilisée pour coupler le PEG, le DTPA ou le DNP, doit représenter moins de 5 % dans la composition lipidique car elle a une forme cylindrique et forme des bicouches planes.

- Les concentrations en PEG doivent être inférieures à 10 % de la composition lipidique totale (nous avons utilisé 1 à 5 % de DMPE-PEG2000) car si la densité des chaînes de polymère permet de diminuer l'activation des protéines du complément, elle peut aussi destabiliser les liposomes et limiter l'efficacité d'encapsulation (Maruyama *et al.* 1992, Srinath et Diwan 1994, Silvander *et al.* 1998).

- Enfin, il faut essayer d'homogénéiser les longueurs de chaînes d'acides gras entre les différents phospholipides (DMPC avec DMPE-PEG et DSPC avec DSPE-PEG) pour que les vésicules soient régulières (Maruyama *et al.* 1992, Bedu-Addo et Huang 1995).

Il est indispensable de fixer au préalable un certain nombre de paramètres comme : le rapport molaire des différents constituants lipidiques, la concentration finale en lipides ainsi que le volume final de la suspension.

Exemple de formulation : EPC/Chol, rapport molaire 66:34, 20 $\mu\text{mol/ml}$, 1 ml.

Ces paramètres permettent, connaissant le poids moléculaire de chacun des composés, de calculer les quantités de lipides nécessaires à la préparation.

Ici, les liposomes EPC/Chol (66:34) seront composés de 20 μmol x 66 % soit 13,2 μmol d'EPC ($M_m = 760$), et 20 μmol x 34 % soit 6,8 μmol de cholestérol ($M_m = 386,7$). Ils seront préparés avec 1 ml de phase aqueuse pour obtenir une solution de liposomes dont la concentration lipidique finale est égale à 20 $\mu\text{mol/ml}$.

Voici quelques exemples de formulations lipidiques que nous avons utilisées :

- **Liposomes "conventionnels"** : EPC/Chol (66:34) ou DMPC/Chol (66:34)
- **Liposomes "pégylés"** : DMPC/Chol/DMPE-PEG2000 (64:33:3) ou DSPC/Chol/DSPE-PEG2000 (65:30:5)
- **Liposomes composés de phospholipides "modifiés"** pour vectoriser et/ou radiomarquer la paroi des liposomes:
 - DMPC/Chol/DMPE-DNP (66:33:1)
 - DMPC/Chol/DMPE-DNP/DMPE-PEG 2000 (66:30:1:3)
 - DMPC/Chol/DMPE-DTPA/DMPE-DNP (67:30:1,5:1,5)
 - DMPC/Chol/DMPE-DTPA/DMPE-DNP/DMPE-PEG2000 (64:30:1,5:1,5:3)

I.3. Matériels et Méthodes

I.3.1. Matières premières

La phosphatidylcholine de jaune d'œuf (EPC), le cholestérol (Chol), la dimyristoyl phosphatidyléthanolamine (DMPE) ainsi que les phospholipides synthétiques : dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) et distéaroyl phosphatidylcholine (DSPC) sont fournis par le laboratoire Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne) avec 99 % de pureté. La dimyristoyl phosphatidyléthanolamine couplée au polyéthylène glycol (DMPE-PEG 2000) est un produit Avanti[®] Polar Lipids de pureté > 99 % (Canada).

I.3.2. Protocoles expérimentaux

I.3.2.1. Préparation du film lipidique

Les différents lipides sont pesés puis dissous dans un mélange CHCl₃/MeOH (9:1). On obtient ainsi des solutions mères de lipides de concentration connue. Pour chaque formulation, le rapport molaire des différents constituants est respecté en prélevant un volume précis de solution mère, afin d'obtenir une quantité finale de lipides égale à 20 µmol (pour 1 ml de phase aqueuse).

Les lipides en solution sont prélevés à l'aide d'une pipette en verre et mélangés dans un ballon de 10 ml. Le solvant organique est évaporé sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapor[®], Buchi) pendant 30 minutes de façon à éliminer toute trace de solvant. Il est nécessaire de vérifier que le film lipidique soit fin et bien homogène sur les parois du ballon.

1.3.2.2. Préparation de la phase aqueuse

Comme nous le verrons par la suite, la composition de la phase aqueuse peut varier selon l'application envisagée. Par exemple, pour radiomarquer les liposomes, nous utiliserons différentes phases aqueuses (tampons, sels, acides aminés), à différents pH, afin de réaliser des gradients de pH ou de concentration.

Dans tous les cas, une osmolarité proche de celle des milieux physiologiques doit être respectée (osmolarité ≈ 300 mosmol). En effet, nous avons pu vérifier qu'une phase aqueuse dont la concentration osmolaire est trop élevée entraîne une instabilité des liposomes.

La formation des liposomes s'effectue lorsqu'on ajoute la phase aqueuse dans le ballon contenant le film lipidique. A ce moment-là, la température du milieu doit être supérieure à la température de transition de phase (T_m) du phospholipide ayant la plus haute T_m , soit 50°C si la formulation contient de la DMPE, 74°C pour la DSPE (*cf tableau p 48*). Pour obtenir un meilleur volume d'encapsulation, cette température doit être maintenue pendant toute la durée de l'hydratation du film lipidique. Pour cela, le ballon est mis sous agitation sur un évaporateur rotatif sans vide avec un bain-marie à la température désirée pendant une durée de 2 heures. On obtient ainsi une solution de MLV dont la concentration lipidique finale est de 20 mM (20 μmol de lipides pour 1 ml de phase aqueuse).

1.3.2.3. Extrusion

L'extrusion va permettre d'obtenir des LUV de taille homogène (*cf chap. I § II.2.1.3*) en forçant la suspension de liposomes à travers un filtre de polycarbonate ayant une taille de pores bien définie. Elle doit également se faire à une température supérieure à la T_m des phospholipides choisis.

Pour cela, le mini-extruder[®] (Avanti[®] Polar Lipids), qui est le support du filtre, est placé sur une plaque chauffante avec un thermomètre

pour contrôler la température. Les solutions de liposomes sont prélevées dans des seringues de verre de 1 ml puis filtrés sur des membranes de polycarbonate de 100 nm. Les liposomes trop rigides (contenant du DSPC) ou pégylés peuvent être filtrés préalablement sur des membranes de 200 nm avant d'utiliser celles de 100 nm, pour éviter la destruction du filtre. Après 20 passages sur le filtre, la taille des liposomes est homogène et les solutions doivent être translucides.

1.3.2.4. Purification par gel-filtration

La séparation des substances non encapsulées de celles incluses dans les liposomes, est réalisée par une technique de chromatographie d'exclusion-diffusion, à l'aide d'une colonne Superdex[®] G200 (24 ml, 10 x 300 mm, Amersham Pharmacia Biotech, France) branchée sur un système de chromatographie liquide haute performance (HPLC). La phase mobile est composée de tampon phosphate 0,15 M, pH 5,6. Pour un débit de 0,7 ml/min, le temps nécessaire à la réalisation d'une purification est de 30 minutes.

Une technique d'exclusion-diffusion plus simple a également été utilisée pour changer les liposomes de tampon (pour les marquages à l'indium-111 par exemple) ou après un radiomarquage afin de séparer la radioactivité libre de celle associée aux liposomes. Elle consiste en une chromatographie par gravité basée sur l'utilisation d'une colonne Sephadex[®] G25 (PD10, Amersham Pharmacia Biotech, France). Pour cela 0,5 ml de la solution de liposomes sont déposés au sommet de la colonne préalablement saturée avec 15 ml de PBS/BSA 0,5 % puis équilibrée avec 20 ml de tampon d'élution. L'élution est réalisée par fractions de 0,5 ml de tampon, en laissant s'écouler 1,5 ml dans le tube n°1 (soit 2 ml en comptant le dépôt de 0,5 ml de liposomes). La présence de liposomes est évaluée par légère opalescence des fractions d'élution, qui sont réunies et conservées à 4°C.

I.3.3. Contrôles réalisés sur les liposomes

I.3.3.1. Contrôle de la concentration

La concentration lipidique des liposomes contenant du DNP peut être contrôlée en dosant la proportion de DMPE-DNP par spectrométrie (UV-160A recording spectrophotometer, Shimadzu, Japon). On mesure l'absorbance à 345 nm, dans une cuve de quartz, de la solution de liposomes après destruction par du Triton 10X. Les mesures d'absorbance doivent corrélérer avec la courbe d'étalonnage du DMPE-DNP ($\epsilon = 8700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 345 nm) dans le même tampon. Malgré les problèmes de dispersion de la lumière observés avec les liposomes, on a pu montrer qu'il existe une relation linéaire entre la concentration de DMPE-DNP et l'absorbance à 345 nm, pour une solution homogène de liposomes ($\epsilon = 17800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Ce test, non destructif, par rapport au précédent a donc été utilisé par la suite pour contrôler les préparations sans avoir à détruire les liposomes.

I.3.3.2. Contrôle de la taille

Le contrôle de la taille (diamètre moyen) et de l'homogénéité des liposomes a été effectué dans le laboratoire INSERM U646 à Angers, par spectroscopie à corrélation photonique (Malvern Autosizer[®] 4700, Malvern Instrument S.A., UK). Le principe de la mesure repose sur l'irradiation de la solution de liposomes par un laser à 488 nm. La lumière diffusée est recueillie par un photomultiplicateur situé à 90° de la source et son intensité peut alors être analysée par différents modèles mathématiques (méthode Contin) qui aboutissent à une évaluation du diamètre des particules (calcul automatique propre au logiciel fourni avec l'appareil). Grâce à cet appareil la granulométrie des particules ainsi que l'index de polydispersité ont été déterminés sur des liposomes préparés le jour même (J0) et d'autres datant de 1 à 8 semaines. Chaque mesure a été effectuée trois fois.

I.4. Résultats

I.4.1. Purification des liposomes

Les liposomes purifiés par HPLC à l'aide d'une colonne Superdex[®] G200 ont des temps de rétention compris entre 8 et 10 minutes, correspondant à un volume de rétention compris entre 5,6 et 7 ml. En injectant 500 µl de liposomes (10 µmol de lipides), on récupère des solutions de liposomes dont la concentration en lipides est comprise entre 5,8 et 7,1 µmol/ml.

Les liposomes purifiés par gel-filtration (*figure 1*) à l'aide d'une colonne Sephadex[®] G25 (PD10) apparaissent dans un volume de rétention de 3 ml. Le pic chromatographique correspond à un volume de 1,5 ml (tubes 4, 5, 6), lorsque le dépôt est de 0,5 ml, ce qui correspond à une dilution au tiers de la concentration initiale en lipides.

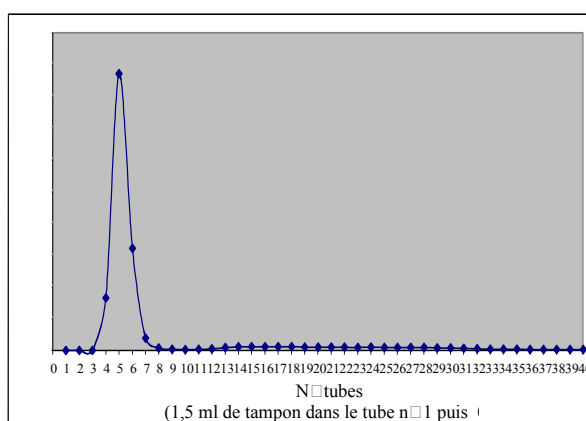


Figure 1: Exemple d'un profil d'éluion d'une solution de liposomes radiomarqués purifiés par gel-filtration (colonne PD10 ayant un seuil d'exclusion de 10000).

I.4.2. Contrôle de la concentration lipidique

La mesure de la concentration en DNP ($\epsilon_{\text{molaire}} = 17\,800$ à 345 nm) dans le pic d'éluion contenant les liposomes (tubes 4, 5, 6) permet de vérifier la reproductibilité des préparations de liposomes contenant du DMPE-DNP. Elle permet aussi de calculer le rendement d'une purification par PD10 dont le résultat est toujours supérieur à 95 %. Par la suite, on ne tiendra pas compte de cette perte de liposomes (< 5 %) au cours d'une purification par gel-filtration et le calcul de la concentration des liposomes se fera en considérant le nombre initial de moles de lipides déposées sur la colonne.

I.4.3. Contrôle de la taille des liposomes

Le diamètre moyen des liposomes "conventionnels" après extrusion, mesuré par spectroscopie à corrélation photonique, est de $101 \text{ nm} \pm 2$ avec un index de polydispersité inférieur à 0,1. Pour les liposomes pégylés avec 5 % de PEG 2000, il est de $167 \text{ nm} \pm 3$ avec un index de polydispersité inférieur à 0,1. Ces résultats montrent l'intégrité des liposomes et l'homogénéité de leur taille après extrusion. Il n'y a pas de différence significative entre les liposomes préparés le jour même et ceux préparés jusqu'à 8 semaines avant le contrôle.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (LZW)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 2: Mesure du diamètre des liposomes conventionnels par spectroscopie à corrélation photonique. Chaque mesure est réalisée 3 fois et donne le diamètre moyen des vésicules (98,5; 103,5 et 101,1 nm) et les index de polydispersité correspondants (0,0622; 0,0743 et 0,0643).

I.5. Discussion

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 simple, rapide et reproductible permettant d'obtenir des liposomes SUV d'environ 100 nm. Cette taille étant la plus appropriée pour envisager une application *in vivo*. 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 l'utilisation des liposomes, afin d'éviter une modification de la composition interne des liposomes par échange de substances diffusibles à travers la paroi.

II. RADIOMARQUAGE DES LIPOSOMES

II.1. Radiomarquage de la paroi

II.1.1.Introduction

Les premiers essais de radiomarquage des liposomes ont consisté à fixer sur la paroi des vésicules de l'indium-111, par l'intermédiaire d'un phospholipide chélatant. Pour cela, l'agent chélatant est incorporé à la membrane liposomale sous la forme d'un conjugué phosphatidyléthanolamine – agent chélatant (exemple du DMPE-DTPA), la partie phospholipidique de cette molécule s'insérant dans la bicouche. Le DTPA (acide diéthylènetriaminepentaacétique) a été utilisé en premier car il présente un bon pouvoir complexant pour les métaux trivalents, comme l'indium-111 et il semble être un bon modèle pour l'utilisation des ligands semi-rigides développés à Nantes. De plus, le complexe DTPA-¹¹¹In est reconnu spécifiquement par l'AcM 734, disponible au laboratoire.

Comme nous allons le voir, cette technique nous a permis non seulement de radiomarquer les liposomes de façon stable, mais aussi de pouvoir se servir du DTPA-¹¹¹In comme haptène pour vectoriser les liposomes.

II.1.2.Matériels et Méthodes

II.1.2.1. Matières premières

L'indium-111 (^{111}In , ce, $T_{1/2} = 2,8$ j) a été fourni par le laboratoire Mallinckrodt sous forme de chlorure d'indium en solution chlorhydrique 0,05N. L'activité spécifique est de 370 MBq/ μg (ou 41 MBq/nmol) à calibration et l'activité volumique est de 370 MBq/ml.

Le DMPE-DTPA a été synthétisé dans le laboratoire de chimie de l'INSERM U601. La synthèse de ce composé est décrite en *annexe 1*.

II.1.2.2. Protocole de marquage

Le radiomarquage s'effectue en milieu légèrement acide (pH compris entre 5 et 6) pour éviter la formation d'hydroxydes insolubles et pour permettre la complexation. Pour cela, 0,5 ml de liposomes (20 $\mu\text{mol/ml}$) ont été passés sur une colonne de gel-filtration (PD10). La colonne est équilibrée et éluée avec un tampon citrate/acétate 10 mM/170 mM pH 5,3, préalablement traité par une résine échangeuse de cations, type chélex, afin d'éliminer les traces métalliques di et trivalentes. Ce tampon permet de respecter le pH nécessaire au marquage et une osmolarité intra et extra-liposomale d'environ 300 milliosmoles. La chélex est une résine permettant de complexer les métaux "contaminants" du milieu de marquage.

Les liposomes sont récupérés sous un volume de 1,5 ml à une concentration de 6,7 $\mu\text{mole/ml}$.

Les premiers tests ont été réalisés avec des liposomes EPC/Chol/DMPE-DTPA (66:33:1). Une quantité de 670 nmol de lipides (soit 6,7 nmol de DMPE-DTPA) sous un volume de 100 μl de tampon citrate /acétate est incubée à température ambiante en présence de 5,2 MBq (0,12 nmol) d'indium-111 (soit un ratio de 7,8 kBq/nmol de lipides). Des fractions de la solution de marquage sont prélevées après 2 h et 1 nuit d'incubation, pour être purifiées par gel-filtration avec 20 x 0,5 ml de tampon citrate/acétate. La radioactivité de 10 μl de chaque fraction d'éluion

est comptée à l'aide d'un compteur gamma (Wizard 3''480. WALLAC). Le taux de marquage est donné par le rapport de l'activité fixée par les liposomes sur l'activité totale.

Le taux de marquage est déterminé de la même façon avec des liposomes DMPC/Chol/DMPE-DTPA (66:33:1) et des quantités croissantes d'indium-111 (0,18 à 2,3 nmol) avec un ratio de 11,1 à 177,6 kBq/nmol de lipides.

Différents tests ont ensuite été réalisés, en tenant compte des résultats des expériences précédentes, en utilisant des liposomes composés de DMPC/Chol et de 1, 3 ou 5 mol % de DMPE-DTPA (66:33:1, 65:32:3, 64:31:5) et une quantité constante d'indium-111.

II.1.3. Résultats

La *figure 3* représente les profils d'élution sur Sephadex® G25 d'une solution d'indium-111 témoin et d'une solution de liposomes radiomarqués en tampon citrate/acétate. La radioactivité est détectée essentiellement dans les tubes 4, 5 et 6, ce qui concorde avec l'opalescence de ces fractions.

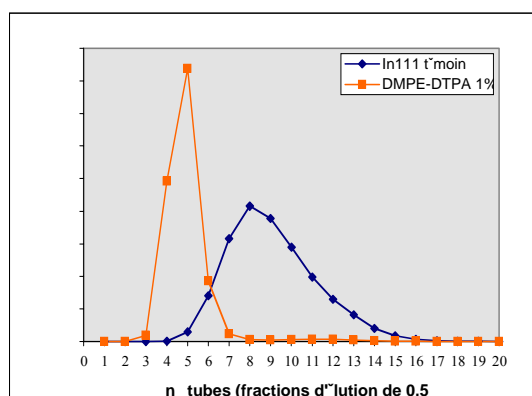


Figure 3: Profils d'élution sur Sephadex® G25 d'une solution d'indium-111 témoin et d'une solution de liposomes EPC/Chol/DMPE-DTPA (66:33:1) marqués à l'indium-111. L'élution est réalisée en tampon citrate/acétate.

Les taux de marquage des liposomes EPC/Chol/DMPE-DTPA (66:33:1) marqués à l'indium-111 (7,8 kBq/nmol de lipides) sont respectivement de 73 % et de 92 % après 2 h ou une nuit d'incubation à température ambiante.

Après une nuit d'incubation à température ambiante, la figure 4 montre que les liposomes DMPC/Chol/DMPE-DTPA (66:33:1) ont pu être marqué efficacement (taux de marquage > 75 %) jusqu'à 44 kBq/nmol de lipides (soit 1 pmol d'indium pour 10 pmol de DMPE-DTPA).

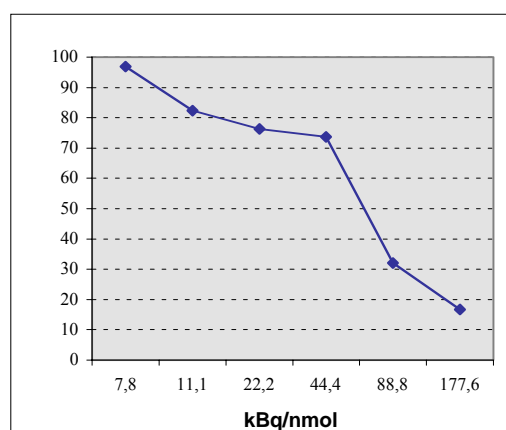


Figure 4: taux de marquage des liposomes DMPC/Chol/DMPE-DTPA (66:33:1) en fonction de l'activité d'indium-111 en kBq utilisée par nmol de lipides.

En faisant varier la proportion de DMPE-DTPA dans la formulation liposomale (1, 3 et 5 %) pour une quantité fixe d¹¹¹In (7,8 kBq/nmol de lipides), on peut confirmer qu'il faut au moins 10 équivalents de DTPA par rapport à l¹¹¹In pour avoir un taux de marquage optimal (> 80 %) (figure 5).

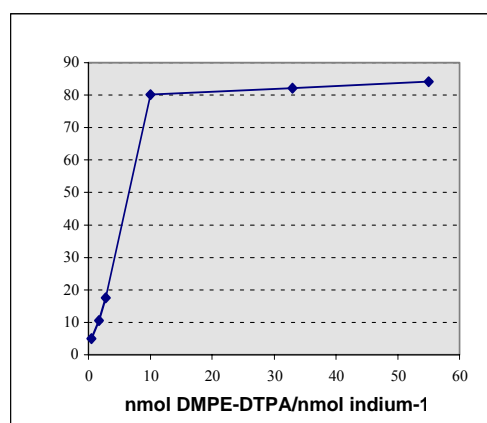


Figure 5: Taux de marquage des liposomes DMPC/CholDMPE-DTPA en fonction du nombre d'équivalents de DTPA par rapport à l'indium-111, après 2 h d'incubation à température ambiante.

II.1.4. Discussion

Les liposomes ont pu être marqués efficacement en utilisant un agent chélatant couplé à un phospholipide de la paroi. Ce marquage est simple à réaliser et son principe peut être repris avec différents agents chélatants, comme le DOTA ou le CHXA-DTPA, afin de réaliser des marquages avec d'autres radionucléides.

Il présente néanmoins quelques inconvénients. Comme le montrent les résultats, il faut au moins 10 équivalents de DTPA par rapport à l'indium-111 pour obtenir de bons rendements de marquage et ce, quelle que soit la quantité de DMPE-DTPA (1, 3 ou 5 %) dans la formulation lipidique des liposomes. On ne peut donc pas espérer améliorer le marquage en augmentant simplement la quantité de DMPE couplée à l'agent chélatant. Ce résultat peut s'expliquer de différentes façons. Il est possible que la quantité de DMPE-DTPA greffée au sein de la paroi des liposomes au cours de leur préparation soit surestimée. De plus, le DTPA peut se tourner aussi bien

vers la phase aqueuse que vers l'extérieur de la paroi. Il est donc très probable qu'une molécule de DTPA sur deux ne soit pas accessible au radionucléide. Enfin, le DTPA est susceptible de chélater d'autres métaux "contaminants" présents dans le milieu de marquage, même si la présence de chélex (résine complexante) limite ce phénomène. Le DTPA-¹¹¹In pouvant également servir de haptène vis-à-vis de l'AcM 734, la présence de métaux "contaminants" entraînerait une diminution de la réactivité vis-à-vis de l'Ac. *In vivo*, le DTPA-¹¹¹In ne serait donc pas le haptène "idéal" pour l'immunovectorisation des liposomes, d'où l'intérêt d'utiliser d'autres molécules, comme le DNP, qui ne servirait pas à la fois de haptène et d'agent chélatant.

Parallèlement, nous avons donc développé d'autres techniques de radiomarquage, indépendamment du système de vectorisation des liposomes. *In vivo*, le radiomarquage de la paroi restera cependant très utile car une bonne corrélation entre la radioactivité associée à la paroi et celle contenue dans les liposomes peut permettre d'affirmer l'intégrité des vésicules.

II.2. Radiomarquage par encapsulation active

II.2.1. Introduction

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. Dans un milieu de pH adapté, une base faible ou un acide faible sous sa forme non ionisée, mis en présence de liposomes diffuse à travers les membranes. Si le pH du milieu préalablement encapsulé a été correctement choisi, la molécule s'ionise et, ne pouvant ressortir, s'accumule dans ce milieu (Barbet *et al.* 1984, Mayer *et al.* 1986, Madden *et al.* 1990, Cullis *et al.* 1997).

Plusieurs voies de marquage ont été envisagées. Tout d'abord, une étude a été réalisée avec un acide faible (l'*acide 3-(4-hydroxyphényl)propanoïque*, HPPA) marqué à l'iode-125. La différence de pH entre les milieux extra et intra-liposomaux a été obtenue par acidification ou alcalinisation du milieu extérieur ou par création d'un gradient d'ions acétates. Mais pour pallier une éventuelle fuite de cet acide faible, par un mécanisme identique à celui permettant le gradient d'ions acétates, une deuxième méthode a été testée. Nous avons tenté d'encapsuler un réactif susceptible de traverser la bicouche facilement et surtout de rester dans la phase aqueuse des liposomes. Pour cela nous avons imaginé un couplage chimique entre la molécule radiomarquée et un acide aminé pré-encapsulé dans les liposomes afin de limiter le relargage de la radioactivité.

Dans ce but, nous avons encapsulé au cours de la préparation des liposomes, une base faible susceptible de réagir avec des esters activés

liposolubles. Après différents essais, l'étude a été réalisée avec de l'arginine car cette base présente l'avantage de rester ionisée tout en gardant une fonction amine réactive quand le milieu intra-liposomal est basique. La méthode a été optimisée en utilisant un ester lipophile, le réactif de Bolton-Hunter (BH) marqué à l'iode-125 ou à l'iode-131 (*figure 6*). Le but est de réaliser un couplage de l'ester activé avec les fonctions amines de l'arginine dans la phase aqueuse des liposomes et d'obtenir un produit chargé positivement de façon quasi-indépendante du pH.

Pour valiser cette hypothèse, des marquages "témoins" ont été réalisés par encapsulation active de la forme hydrolysée et de la forme hydrosoluble du réactif. Ces deux réactifs marqués à l'iode-125, n'étant théoriquement pas assez lipophiles pour passer la bicouche, ont servi de tests négatifs. Des tests ont également été réalisés sur des liposomes ne contenant pas d'arginine afin de démontrer notre théorie d'un couplage intra-liposomal permettant la stabilité du marquage. Nous avons dans ce sens, suivi la réaction au sein de la phase aqueuse par chromatographie sur gel de silice, pour contrôler le couplage entre les réactifs.

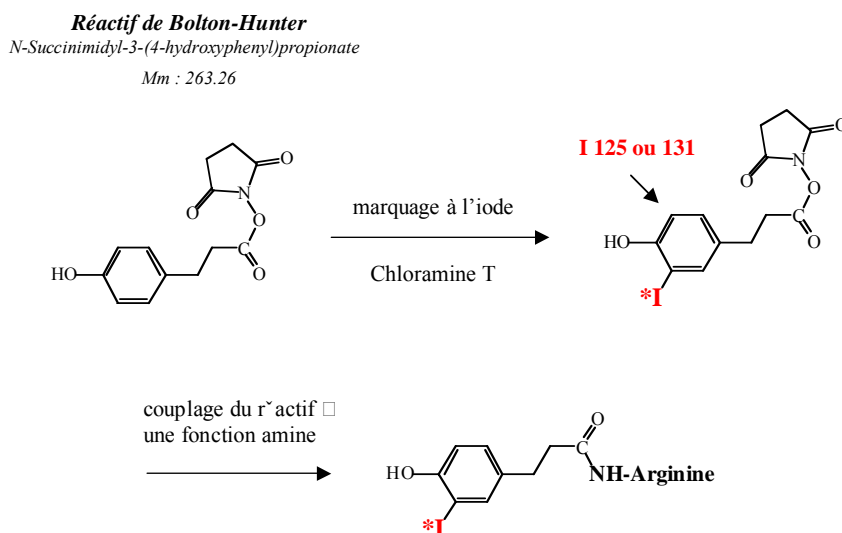


Figure 6: Principe du radiomarquage par encapsulation du réactif de Bolton-Hunter marqué à l'iode dans des liposomes contenant de l'arginine.

II.2.2. Matériels et Méthodes

II.2.2.1. Matières premières

Radionucléides

L'iode-125 (laboratoire Perkin-Elmer) est utilisé sous forme d'iodure de sodium en solution NaOH 0,05N avec une activité spécifique de 643 GBq/mg et une activité volumique de 3,7 GBq/ml.

L'iode-131 (laboratoire Nordion MDS) est livré avec une activité spécifique de 1988 GBq/mg et une activité volumique de 37 GBq/ml.

Produits chimiques

La chloramine T (oxydant utilisé pour les marquages à l'iode) et l'acide 3-(4-hydroxyphényl)-propanoïque (HPPA) sont des produits Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne).

Le métabisulfite de sodium, la lysine, l'arginine et l'iodure de sodium sont des produits Sigma-Aldrich.

Le réactif de Bolton-Hunter (BH) (*N-succinimidyl-3-(4-hydroxyphényl)propionate*) et le réactif de Bolton-Hunter hydrosoluble (SBH) (*N-Sulfo-succinimidyl-3-(4-hydroxyphényl)propionate*) sont des produits commercialisés par Pierce Chemical Co. (Rockford, USA).

II.2.2.2. Iodation des différents réactifs

a/ Le réactif de Bolton-Hunter hydrosoluble (SBH) et l'acide hydroxyphénylpropanoïque (HPPA) sont marqués à l'iode-125 en présence de chloramine T. Un volume de 10 µl d'une solution extemporanée des réactifs (0,1 mg/ml en DMSO) est incubée avec, dans l'ordre et sans

attendre : 3,7 à 37 MBq (0,1 à 1 mCi) d'iode-125, 10 µl de chloramine T (4 mg/ml en tampon phosphate 0,1M pH 7,4) et 10 µl de métabisulfite de sodium (12 mg/ml en tampon phosphate 0,1M pH 7,4). Les réactifs radiomarqués sont séparés de l'iode libre par chromatographie en phase inverse à l'aide d'une colonne Sep Pak (C18, Millipore, France).

Le rendement de marquage est calculé à l'aide d'un compteur approprié, en rapportant l'activité éluee en méthanol (réactif radio-iodé), à l'activité totale déposée sur la SepPak.

La pureté radiochimique est évaluée par chromatographie couche mine (CCM) sur gel de silice (Silica gel 60 F₂₅₄, Merk, Allemagne) en chloroforme/acétate d'éthyle (1:1 v/v). Les plaques sont révélées au phosphor-imager (445SI Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech, France).

b/ Le radiomarquage du réactif de Bolton-Hunter est effectué avec de l'iode-125 ou de l'iode-131, dans les mêmes conditions. Une solution de 0,5 mg/ml (soit 1.9 µmol/ml) du réactif de BH est préparée en dioxane anhydre. Pour éviter l'hydrolyse du réactif, le marquage doit se faire rapidement (moins de 40 secondes) et la solution de BH doit être renouvelée à chaque fois. Le marquage s'effectue dans un tube de verre de 5 ml dans lequel on introduit 50 µl de tampon phosphate 0,1M pH 7,4 et 50 µl d'une solution de chloramine T à 4 mg/ml (soit 880 nmol). On ajoute 3,7 MBq (100 µCi) d'iode-131 ou d'iode-125 (soit 0,06 nmol, 1 éq.) et en dernier 2 µl de BH (soit 3,8 nmol, 63 éq.). Après 20 secondes environ, on ajoute 400 µl de tampon phosphate 0,1M pH 7,4 et on extrait le BH marqué à l'iode avec 500 µl de toluène anhydre, par retournement.

Le rendement de marquage est calculé en rapportant l'activité de la phase organique sur l'activité totale utilisée pour faire le marquage (phase aqueuse + phase organique). Une CCM sur plaque de silice en

chloroforme/acétate d'éthyle (1:1 v/v) permet de déterminer la proportion d'iode libre, de réactif marqué avec un seul atome d'iode (monoiodé) ou avec deux atomes d'iode (diiodé).

II.2.2.3. Encapsulation active des réactifs marqués à l'iode

Dans l'optique de radiomarquer les liposomes, quelque soit le réactif radio-iodé, il faut prélever le volume de phase organique correspondant à l'activité voulue et le transférer dans un tube en verre (MeOH pour SBH et HPPA, toluène pour BH). Le solvant organique est évaporé sous un courant d'azote. La moindre trace de solvant organique risque de détruire les liposomes au moment du marquage.

a/ Encapsulation dans des liposomes avec un gradient de protons ou d'ions acétates (¹²⁵I-HPPA)

Un gradient transmembranaire est utilisé pour l'encapsulation de l'¹²⁵I-HPPA dans les liposomes. Les liposomes sont préparés comme décrit précédemment (§ I.3.2) mais le film lipidique (20 µmol de lipides) est hydraté avec 1 ml de tampon TRIS (pH 11), ou 1 ml d'une solution d'acétate de sodium (150 mM, pH 8,5 et pH 11), ou 1 ml d'une solution d'acétate de magnésium (120 mM pH 8,5). Dans le but de créer un gradient de pH, les liposomes formés en TRIS sont purifiés par gel-filtration en PBS (pH 6,3) et en sulfate de sodium (120 mM pH 6,5) pour les autres. Les solutions de liposomes (0,5 à 1 µmol) sont incubées avec 1,25 à 5 nmol d'¹²⁵I-HPPA. Après 10 à 60 minutes d'incubation à 37 ou 55°C, l'¹²⁵I-HPPA non encapsulé est séparé des liposomes radiomarqués par gel-filtration en PBS. Le taux d'encapsulation (TE) est donné par l'activité correspondante aux liposomes sur l'activité totale déposée sur la colonne.

b/ Encapsulation des différents réactifs iodés dans des liposomes contenant de l'arginine ($^{125}\text{I-BH}$, $^{125}\text{I-SBH}$, $^{125}\text{I-HPPA}$)

L'autre voie d'encapsulation active a été réalisée avec des liposomes contenant de l'arginine. Pour cela, le film lipidique (20 μmol de lipides) est hydraté avec 1ml d'une solution d'arginine 80 mM en tampon HEPES 80 mM (pH 8). Les liposomes sont ensuite purifiés par exclusion-diffusion à l'aide d'une colonne Superdex[®] G200 en tampon phosphate 150 mM (pH 5,6) sur une durée de 40 minutes (débit = 0,7 ml/min). Les liposomes obtenus ont alors un pH basique à l'intérieur (pH 8) et acide à l'extérieur (pH 5,6).

La solution de liposomes est mise à incuber au bain-marie avec les différents réactifs iodés ($^{125}\text{I-BH}$, $^{125}\text{I-SBH}$ ou $^{125}\text{I-HPPA}$), pendant 5 à 60 minutes à différentes températures (37 ou 55°C selon la composition des liposomes), dans un tube en verre.

A la fin de l'incubation, 10 μl de la solution de marquage sont comptés à l'aide du compteur gamma (Wizard 3''480. WALLAC) afin de connaître l'activité totale déposée sur les liposomes. Enfin, cette solution est déposée sur une colonne PD10 équilibrée en tampon phosphate 150 mM. Le taux d'encapsulation (TE en %) est donné par le rapport de l'activité fixée sur les liposomes sur l'activité totale déposée sur la colonne.

Des contrôles sont effectués par CCM sur gel de silice en chloroforme/acétate d'éthyle (1:1 v/v) pour suivre la réaction dans le milieu intra-liposomal entre l'arginine et les différents réactifs iodés. 1 μl des solutions de liposomes radiomarqués sont déposés sur la plaque de CCM avant et après 30 minutes d'incubation avec du Triton 10X (1:1 v/v), détergent permettant de détruire les vésicules. L'acidification du milieu à pH 2 avec une solution d'HCl permet de faire migrer la forme acide du BH hydrolysé.

II.2.3. Résultats

II.2.3.1. Iodation des différents réactifs

Les rendements de marquage des différents réactifs iodés sont déterminés à l'activimètre. Les rendements de marquage obtenus pour les deux premiers réactifs iodés, ^{125}I -SBH et ^{125}I -HPPA, après purification sur Sep Pak, sont supérieurs à 95 %.

Le rendement de marquage du ^{125}I -BH, après extraction en toluène, est compris entre 50 et 65 %. Ce résultat s'explique par la difficulté de prélever la totalité de la phase organique après une extraction qui semble-t-il n'est pas totale.

La pureté radiochimique des différents réactifs iodés, évaluée par CCM sur gel de silice et révélée au phosphor-imager (*figure 7*), est supérieure à 99 % ($R_f = 0,5-0,6$; 0,3 et 0 pour respectivement ^{125}I -BH, ^{125}I -HPPA et le ^{125}I -SBH).

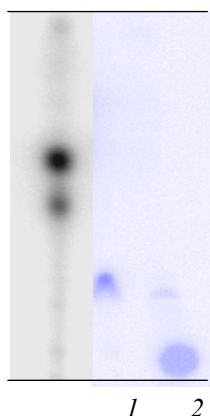


Figure 7: CCM sur gel de silice révélée par le phosphor-imager, représentant la migration des différents réactifs iodés en chloroforme/acétate d'éthyle (1:1 v/v). 1: ^{125}I -BH monoiodé ($R_f = 0,5$) et diiodé ($R_f = 0,6$)

2: ^{125}I -HPPA ($R_f = 0,3$)

3: ^{125}I -SBH ($R_f = 0$).

II.2.3.2. Mise au point du radiomarquage du BH

Les rendements de marquage du réactif de BH sont en moyenne de 60 % après extraction en toluène. La CCM sur gel de silice en $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (1:1 v/v) révèle deux spots correspondant respectivement au monoiodo-BH ($R_f = 0,5$) et au diiodo-BH ($R_f = 0,6$) (figure 7). Ces références ont été déterminées par comparaison avec le réactif de BH monoiodé commercial (Amersham) et/ou en faisant varier la quantité d'iode comme décrit ci-dessous.

En faisant varier le rapport BH/iode (de 0,5 à 633 éq.) pour une quantité de chloramine T constante (50 μl d'une solution à 4 mg/ml soit 0,88 μmol), on peut obtenir un mélange de réactif ayant fixé un ou deux atomes d'iode (mono ou diiodé) (tableau 1). Un excès d'iode par rapport à la quantité de réactif permet d'obtenir plus de 90 % de diiodoBH.

<i>nmol BH</i>	<i>nmol iode</i>	<i>rapport BH/iode</i>	<i>Rdt de marquage %</i>	<i>% monoiodo BH</i>	<i>% diiodo BH</i>
38	0,06	633	63	90	10
19	0,06	317	60	60	40
7,6	0,06	127	55	50	50
3,8	0,06	63	57	30	70
3,8	8	0,5	50	5	95

Tableau 1: Proportion de réactif monoiodé ou diiodé obtenu en fonction du nombre initial de moles de réactif marquées avec 0,06 nmol d'iode-125. L'excès d'iode est obtenu en ajoutant de l'iodure de sodium froid (8 nmol).

L'influence de la quantité de chloramine T sur le marquage du BH a également été testée. En faisant varier la quantité de chloramine T (0,11 μmol à 1,76 μmol), le marquage d'une quantité constante de BH (3,8 nmol, 63 éq.) avec 3,7 MBq (100 μCi) d'iode-125 (0,06 nmol, 1 éq.) permet d'obtenir le BH avec seulement un atome d'iode (100 % de BH monoiodé).

Dans tous les cas, les rendements de marquage sont toujours compris entre 50 et 60 %.

La figure 8 représente les proportions de réactif mono ou diiodé obtenues en faisant varier la quantité de chloramine T (CT).

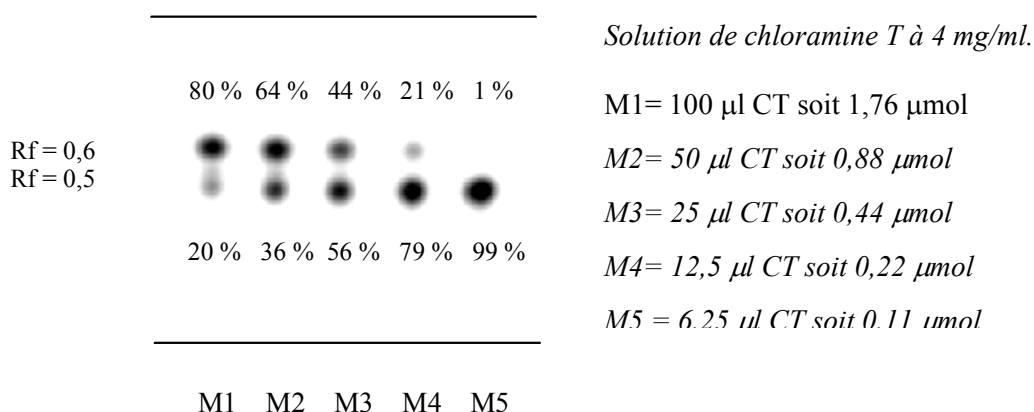


Figure 8: Influence de la quantité de Chloramine T sur la formation de Bolton-Hunter mono ou diiodé.

Un transfert de la méthode de marquage de l'iode-125 à l'iode-131 a été réalisé et a montré que les résultats étaient similaires avec les deux isotopes.

Ensuite, l'optimisation de l'activité spécifique du réactif a été effectuée à l'iode-131. Le marquage de 3,8 nmol de Bolton-Hunter (2,2 éq.) a été réalisé en utilisant jusqu'à 444 MBq soit 12 mCi d'iode-131 (1,7 nmol, 1 éq.) en présence de 50 µl de CT (880 nmol).

Les rendements obtenus sont en moyenne de 70 % avec formation de 60 % de réactif diiodé. Les activités spécifiques obtenues (activité de la phase organique rapportée au nombre de moles de BH) sont en moyenne de $55,5 \pm 7,4$ MBq/nmol (soit $1,5 \pm 0,2$ mCi/nmol de BH).

II.2.3.3. Encapsulation des réactifs iodés dans les liposomes

a/ Liposomes avec un gradient de protons ou d'ions acétates

Avec un gradient de protons, les différentes encapsulations réalisées avec 1^{125}I -HPPA sur des liposomes contenant du TRIS (pH 11) ont donné de très faibles TE, compris entre 0 et 1,5 %, quelque soit la température d'incubation.

Avec le gradient d'ions acétates, les TE augmentent jusqu'à 30-40 % pour les liposomes contenant l'acétate de sodium (pH 12) et jusqu'à 69 % pour ceux contenant l'acétate de magnésium (pH 8,5). Mais ce taux correspond seulement à 7,6 nmol d'HPPA/ μmol de lipides.

b/ Liposomes contenant de l'arginine

La séparation des liposomes radiomarqués et des réactifs iodés non encapsulés a été réalisée par gel-filtration sur sephadex[®] G25. La figure 9 représente les profils d'élution obtenus pour le réactif de BH. Les liposomes radiomarqués sont élués dans le volume mort sous 1,5 ml (volume d'élution de 3 à 4,5 ml). Le réactif de BH marqué à l'iode apparaît sous un profil différent selon qu'il est libre (forme ester), couplé à l'arginine, ou après hydrolyse de la fonction NHS en milieu aqueux (la forme acide correspondant à l'HPPA).

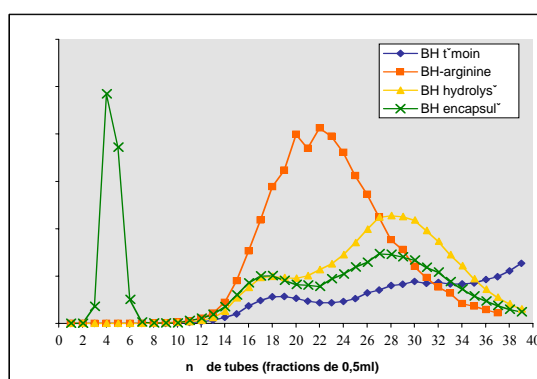


Figure 9 : Profils d'élution sur Sephadex® G25 du réactif de Bolton-Hunter marqué à l'iode-125 (BH témoin), hydrolysé (BH hydrolysé), couplé à l'arginine (BH arginine) ou encapsulé dans des liposomes contenant de l'arginine (BH encapsulé).

Nous décrivons tout d'abord les résultats obtenus pour l'encapsulation du réactif de Bolton-Hunter.

Après quelques tests d'encapsulation du ^{125}I -BH, nous avons rapidement essayé d'encapsuler le réactif de BH radiomarké à l'iode-131, avec la plus forte activité spécifique obtenue. Les résultats concernant les taux d'encapsulation ainsi que la stabilité du marquage étant comparables, nous avons continué avec le réactif marqué à l'iode-125.

➤ Encapsulation du réactif de BH marqué à l'iode-131 (test préliminaire)

Les tests d'encapsulation du BH marqué à l'iode-131 (activité spécifique de 55,5 MBq/nmol soit 1,5 mCi/nmol de réactif) ont été réalisés sur 1 μmol de liposomes EPC/Chol/DMPE-DTPA (66 :33 :1), avec de faibles quantités de BH (4 nmol soit 222 MBq ou 6 mCi). Les taux d'encapsulation obtenus sont en moyenne de 40 %. Les liposomes ont donc été radiomarkés à l'iode-131 avec une activité spécifique de 88,8 MBq/ μmol de lipides (2,4 mCi/ μmol), activité correspondant seulement à 1,6 nmol de réactif.

A partir de ces résultats, nous avons essayé d'optimiser le taux d'encapsulation et le nombre de moles de réactif encapsulées. Nous avons dans un premier temps testé les conditions d'encapsulation (température, temps, quantité de lipides...) puis l'influence de la formulation sur le taux d'encapsulation. Ensuite nous avons augmenté les quantités de réactif. Le comportement physico-chimique du réactif de BH (froid) et du BH marqué à l'iode (chaud) étant proches, l'optimisation des marquages a été réalisée avec un mélange de réactif froid et chaud. En multipliant le taux d'encapsulation avec le nombre de moles de réactif mise en contact avec les

liposomes (de concentration lipidique connue), on connaît le nombre de moles de réactif encapsulé pour une certaine quantité de lipides. Les résultats seront donc exprimés en nmol BH/ μ mol de lipides.

➤ Influence de la température et du temps d'incubation

L'influence de la température (37 ou 55 °C) et du temps d'incubation (5 à 60 minutes) a été testée sur des liposomes pégylés. La présence de 5 % de DMPE-PEG2000 augmente la température de transition de phase des lipides à 50°C par rapport aux liposomes conventionnels (DMPC = 23°C). Nous avons testé l'efficacité d'encapsulation à 37°C pour être en dessous de la température de transition de phase et à 55°C pour être au dessus, ce qui est censé augmenter la fluidité des bicouches et améliorer le taux d'encapsulation.

Les meilleurs taux d'encapsulation, 64 ± 2 % (N=5) ont été obtenus après 30 minutes d'incubation quelque soit la température. Ce résultat correspond à 43 ± 12 nmol BH/ μ mol de lipides (*figure 10*). A 5 minutes d'incubation et après 45 minutes, les taux d'encapsulation sont inférieurs à 40 %. Dans l'ensemble, les quantités de réactif encapsulées sont comprises entre 20 et 40 nmol/ μ mol de lipides. La température ne semble pas modifier significativement les résultats.

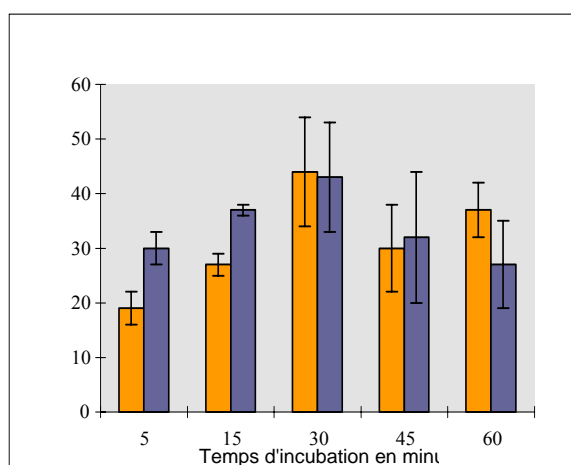


Figure 10: Influence de la température et du temps d'incubation sur l'encapsulation du ^{125}I -BH dans des liposomes DMPC/Chol/DMPE-PEG2000 (65 :30 :5). L'histogramme représente le nombre de moles de réactif encapsulées dans les liposomes à 55°C ou à 37°C en fonction du temps d'incubation, compris entre 5 et 60 minutes (N=5).

Les tests suivants ont donc été réalisés en incubant les liposomes, en présence du réactif iodé, 30 minutes à une température de 37°C.

➤ Influence de la concentration et de la formulation lipidique

Afin de déterminer l'influence de la formulation et de la concentration lipidique sur le taux d'encapsulation, deux sortes de liposomes ont été testés : conventionnels (DMPC/Chol) ou pégylés avec 5 mol % de PEG2000. 0,5 ml de solutions de liposomes de concentrations lipidiques croissantes (de 2 à 7 $\mu\text{mol/ml}$) sont mis en présence d'une quantité fixe de réactif iodé (500 nmol de ^{125}I -BH).

L'influence de la concentration lipidique sur le taux d'encapsulation, est représentée figure 11 pour les deux formulations de liposomes: conventionnels (N=12) et pégylés (N=10). On observe un taux d'encapsulation proportionnel à la quantité de lipides : 10,9 % pour 1 μmol , 19,3 % pour 2 μmol , 35 % pour 3 μmol ... (coefficient de linéarité = 0,93). Dans tous les cas, la quantité de réactif encapsulée est constante, de l'ordre de $51,4 \pm 5,5$ nmol BH/ μmol de lipides, quelque soit la formulation.

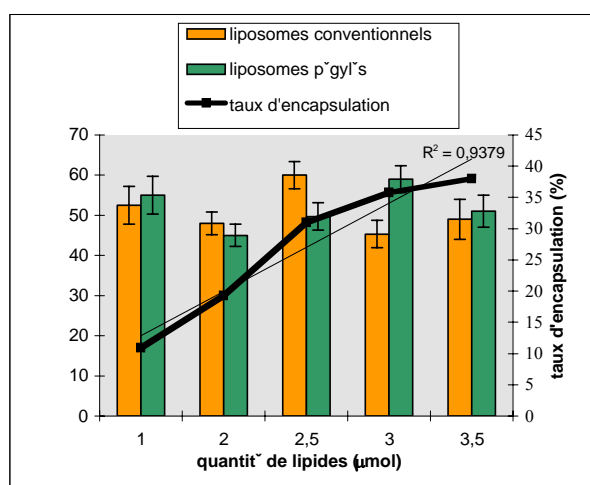


Figure 11 : Influence de la concentration lipidique et de la formulation sur le taux d'encapsulation du ^{125}I -BH. Des solutions de liposomes conventionnels ($N=12$) et pégylés ($N=10$) de concentrations croissantes ont été incubées 30 minutes à 37°C avec 500 nmol de ^{125}I -BH. La figure représente les taux d'encapsulation obtenus (courbe) ainsi que les quantités de réactif encapsulées (histogrammes).

➤ Optimisation du taux d'encapsulation et de la quantité de réactif encapsulée

Nous avons ensuite utilisé des quantités croissantes de ^{125}I -BH associé à du BH froid pour déterminer le nombre de moles maximum de réactif qu'il était possible d'encapsuler dans la phase aqueuse des liposomes.

Pour cela, 0,5 ml d'une concentration constante de liposomes ($2\ \mu\text{mol}/\text{ml}$) ont été incubés 30 minutes à 37°C avec des quantités croissantes de ^{125}I -BH (9 à 1500 nmol). La figure 12 montre que le TE est supérieur à 60 % jusqu'à 30 nmol de BH, 52 % pour 57 nmol de BH et inférieur à 30 % au delà de 143 nmol de BH. Ce qui correspond à une quantité de réactif encapsulé de 48 nmol BH/ μmol de lipides. Si l'on augmente encore la quantité de réactif (au-delà de 1250 nmol de BH), le TE chute à 7 % puis reste constant.

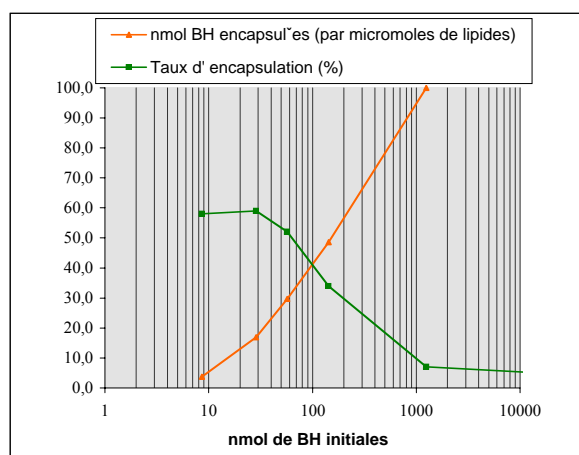


Figure 12 : Taux d'encapsulation du ^{125}I -BH en fonction de la quantité initiale de réactif. La courbe représente le nombre de moles de réactif encapsulées (en orange) et les taux d'encapsulation obtenus (en vert) après 30 minutes d'incubation à 55°C , de liposomes conventionnels ($1\ \mu\text{mol}$ de lipides) avec 9 à 1500 nmol du réactif iodé.

A partir de ces résultats, les taux d'encapsulation ont été optimisés à $62,2 \pm 2 \%$ (N=7), ce qui correspond à 56 nmol BH/ μ mol de lipides. Les expériences à suivre ont donc été réalisées de manière à obtenir ce résultat de référence, par incubation de 90 nmol de réactif par μ mol de lipides.

Comme nous l'avons constaté précédemment, les résultats sont indépendants de la concentration lipidique. Ainsi, nous avons pu vérifier que les taux d'encapsulation étaient identiques pour 180 nmol de BH en présence de 2 μ mol de lipides ou 270 nmol BH pour 3 μ mol de lipides etc...

➤ Contrôles

Les taux d'encapsulation du ^{125}I -SBH (réactif de BH hydrosoluble) et du ^{125}I -HPPA (réactif de BH hydrolysé) dans des liposomes contenant de l'arginine sont très faibles, respectivement 8 et 1 %.

Des tests d'encapsulation du ^{125}I -BH ont été réalisés en remplaçant l'arginine par du NaCl 80 mM en HEPES 80 mM (pH 8) afin de servir de témoin négatif. Les taux d'encapsulation obtenus sont très faibles (TE = $6 \pm 1 \%$).

La réaction entre la fonction NHS du réactif de BH et le groupement amine primaire de l'arginine, au sein des liposomes, peut être suivie par CCM sur gel de silice en $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (1 : 1 v/v) (*figures 13 et 14*). Après 30 minutes d'incubation, 62 % de la radioactivité est associée à l'arginine et 12 % du réactif de BH a été hydrolysé dans le milieu d'incubation. Après purification sur une colonne Sephadex[®] G25 (colonne PD10), 100 % de la radioactivité est associée à l'arginine et le calcul du taux d'encapsulation est de 62 %. On ne retrouve aucune trace de BH hydrolysé.

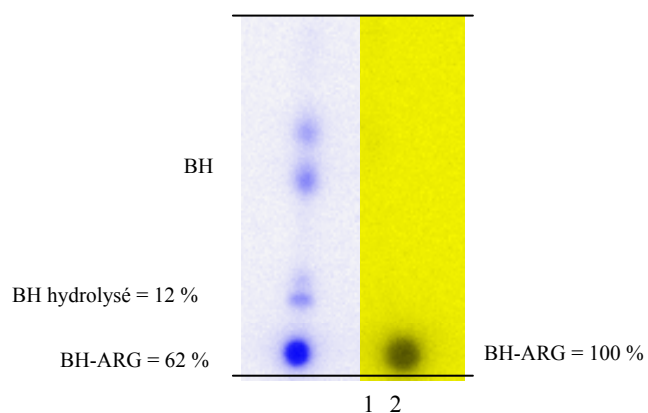
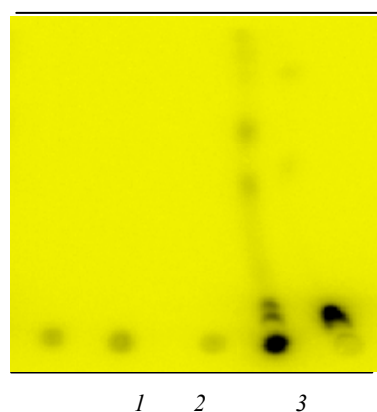


Figure 13: CCM sur gel de Silice révélée au phosphor-imager après migration des réactifs en $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (1 :1 v/v).

1 : Encapsulation du ^{125}I -BH dans des liposomes contenant de l'arginine après 30 minutes d'incubation.

2 : Après purification sur une colonne PD-10, le taux d'encapsulation est de 62 % et 100 % du réactif est couplé à l'arginine.



1 = Liposomes après PD10 à +15h

2 = 2 acidifiés à pH 2

3 = 2 acidifié à pH 2 + Triton 10X

4 = BH-Arginine témoin à pH 2 réalisé avec un excès de BH par rapport à l'arginine.

5 = ^{125}I -HPPA témoin à pH 2

Figure 14: CCM sur gel de Silice en $CHCl_3/AcOEt$ (1 :1 v/v) des liposomes contenant de l'arginine radiomarqués avec le ^{125}I -BH après 15 h en tampon phosphate à 4°C.

II.2.4. Discussion

Les premiers tests d'encapsulation active ont consisté à incorporer un acide faible, l' ^{125}I -HPPA, à l'intérieur des liposomes à l'aide d'un gradient transmembranaire. La différence de pH de part et d'autre de la membrane a d'abord été créée en formant les liposomes dans un tampon à pH11 et en acidifiant le milieu extérieur. Les taux d'encapsulation n'ont pas dépassé 1,5 %. D'après Clerc *et al.* cette méthode n'est pas idéale car la différence de concentration en ions hydroxydes n'est pas assez importante et peut diminuer au cours du temps par diffusion des ions.

La différence de pH a ensuite été obtenue de manière différente, en créant un gradient d'ions acétates qui diffusent rapidement à travers la membrane. Les taux d'encapsulation ont pu atteindre 69 % avec un gradient d'acétate de magnésium, mais nous allons voir après que la molécule marquée encapsulée subit un relargage rapide qui exclut à ce stade tout essai *in vivo*.

Nous avons alors envisagé le couplage, d'une molécule suffisamment lipophile pour traverser la bicouche lipidique, avec un acide aminé pré-encapsulé dans les liposomes. Après plusieurs essais, le Bolton-Hunter a été choisi car c'est une substance commerciale, lipophile, facilement marquée à l'iode. L'optimisation des taux d'encapsulation de cette molécule a été réalisée en modifiant le temps et la température d'incubation et en ajustant le ratio nmol de réactif/ μ mol de lipides. Nous nous sommes vite aperçu qu'il était possible d'obtenir une encapsulation stable d'une quantité de réactif susceptible d'être marquée avec une activité importante.

La purification des liposomes sur PD10 assure l'élimination du réactif de BH non couplé à l'arginine mais aussi du réactif éventuellement hydrolysé dans le milieu de marquage. Nous pouvons en effet affirmer par CCM que la totalité du réactif encapsulé dans les liposomes est couplé à l'arginine et que la part de réactif hydrolysé est ressortit. Ce que confirme le test consistant à encapsuler l' ^{125}I -HPPA, pour lequel les taux d'encapsulation ne dépassent pas 1%, ce qui sous-entend que ce réactif ne pénètre pas ou peu dans les liposomes ou alors qu'il pénètre pour ressortir très rapidement limitant de ce fait son incorporation. Avec l'encapsulation de la forme estérifiée de ce réactif (correspondant au ^{125}I -BH) dans des liposomes contenant de l'arginine, nous pouvons affirmer qu'il existe non seulement un couplage dans la phase aqueuse des liposomes, mais que le produit formé y reste encapsulé.

Nous n'avons pas été en mesure de démontrer un rôle important de la température sur les taux d'encapsulation, ni une influence importante du temps d'incubation. Nous avons donc réalisé la totalité des expériences à 37°C avec le temps d'incubation optimal de 30 minutes. Le nombre de moles de réactif encapsulées est limitée en partie par la quantité d'arginine contenue dans les liposomes. Cette concentration intra-liposomale a été calculée de manière à respecter une concentration iso-osmolaire afin d'obtenir une stabilité maximale des liposomes *in vivo*. Il est par contre envisageable d'augmenter le volume de phase aqueuse encapsulé en modifiant la méthode de préparation des liposomes. Il a été démontré par exemple que le volume aqueux encapsulé pouvait être amélioré avec des techniques de congélation-décongélation ou en augmentant la concentration lipidique des liposomes (*cf chap. I § II.2*).

II.3. Double marquage

II.3.1.Introduction

Les liposomes ont été radiomarqués à la fois sur la paroi par l'indium-111 et dans la phase aqueuse par encapsulation du ^{125}I -BH (double marquage). Comme nous l'avons vu, les deux types de radiomarquage nécessitent des conditions précises aussi bien pour le milieu de marquage (concentration, pH) que pour les conditions d'incubation. Pour essayer de trouver le meilleur compromis, plusieurs hypothèses ont été envisagées :

1. Effectuer une encapsulation active du ^{125}I -BH puis changer le milieu extérieur des liposomes pour pouvoir réaliser le marquage à l'indium-111.
2. A l'inverse, radiomarquer les liposomes à l'indium-111 en tampon citrate/acétate puis changer le milieu extérieur pour pouvoir encapsuler le ^{125}I -BH.
3. Réaliser le double marquage en une seule étape.

II.3.2.Protocoles expérimentaux

Les doubles marquages effectués en 2 étapes ont été réalisés sur des liposomes dont la formulation est EPC/Chol/DMPE-DTPA (66 :33 :1) contenant de l'arginine.

1. Les radiomarquages à l'indium-111 ont été réalisés en tampon citrate/acétate (10 mM/170mM, pH 5,3) comme décrit précédemment. Après une nuit d'incubation à 37°C, les liposomes sont passés sur PD10 préalablement équilibrée en tampon phosphate 150 mM pH 5,6. Le taux de

marquage à l'indium est alors calculé comme décrit précédemment. Les liposomes sont alors mis à incuber 30 minutes à 37°C avec le ^{125}I -BH (90 nmol de réactif pour 1 μmol de lipides). A la fin de l'incubation, le taux d'encapsulation du ^{125}I -BH est calculé.

2. L'encapsulation du ^{125}I -BH dans un premier temps est réalisé sur des liposomes en tampon phosphate 150 mM comme décrit précédemment. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, les liposomes sont passés sur une PD10 préalablement équilibrée en tampon citrate/acétate (10 mM/170mM, pH 5,3) et le taux d'encapsulation du réactif iodé est calculé. On ajoute alors la solution de chlorure d'indium-111 (44 kBq/nmol de lipides) pendant une nuit à 37°C. Le lendemain, le taux de marquage à l'indium-111 est calculé.

3. Le double marquage en 1 étape a été réalisé sur des liposomes pégylés DMPC/Chol/DMPE-DTPA/DMPE-PEG2000 (64:30:1:5) contenant de l'arginine. 90 nmol de ^{125}I -BH sont évaporées à sec sous courant d'azote dans un tube de verre. Le radiomarquage est effectué avec 0,5 ml de liposomes (1 μmol de lipides) en tampon phosphate 150 mM pH 5,6 et 50 μl de tampon citrate 100 mM pH 5 sont ajoutés, de manière à obtenir après addition de 10 μl de la solution de chlorure d'indium (44 kBq/nmol de lipides), une concentration finale en citrate de 10 mM et un pH compris entre 5 et 6. Le temps d'incubation est de 30 minutes à 37°C.

Les différents comptages sont effectués en double isotope à l'aide d'un compteur gamma préalablement étalonné en iode-125 et en indium-111. Les comptages à l'iode-125 ont également être réalisés une fois que l'indium-111 a suffisamment décru pour ne plus parasiter la fenêtre d'énergie de l'iode (après environ 10 périodes soit 28 jours).

II.3.3. Résultats

Les différents résultats obtenus pour les trois méthodes sont rapportés dans le tableau suivant :

Méthodes	Taux de marquage (^{111}In)	Taux d'encapsulation ($^{125}\text{I-BH}$)	Taux de marquage (^{111}In)
1) ^{111}In puis ^{125}I	87,3 % (n°1)	17,3 % (n°2)	-
2) ^{125}I puis ^{111}In	-	55,7 % (n°1)	64,8 % (n°2)
3) ^{125}I et ^{111}In en 1 étape	79,6 %	52,5 %	-

Après une nuit d'incubation en tampon citrate/acétate, le taux de marquage en ^{111}In (n°1) est satisfaisant, mais l'encapsulation du $^{125}\text{I-BH}$ est faible (n°2). Le taux de marquage en ^{111}In diminue (n°2) quand le marquage à l' ^{111}In est effectué sur des liposomes déjà marqués à l'iode-125 (n°1). Le marquage en 1 étape permet d'obtenir un taux de marquage à l' ^{111}In et un taux d'encapsulation du $^{125}\text{I-BH}$ du même ordre que ceux décrits pour un simple marquage.

II.3.4. Discussion

La première méthode qui consiste à marquer les liposomes à l'indium 111 puis à encapsuler le $^{125}\text{I-BH}$ n'est pas satisfaisante. En effet, pour obtenir le rendement de marquage optimal en indium-111, il faut laisser les liposomes incuber une nuit à 37°C. Non seulement cette méthode est longue mais le fait de laisser les liposomes si longtemps en tampon citrate-acétate modifie la phase aqueuse par échanges ioniques. Le passage transmembranaire des ions acétates doit certainement modifier le pH et la concentration intra-liposomale, ce qui se répercute sur le marquage à l'iode-

125. On obtient alors de très faibles taux d'encapsulation du ^{125}I -BH. Pour ces raisons, cette méthode a très vite été abandonnée.

La seconde méthode permet d'obtenir un taux d'encapsulation du ^{125}I -BH satisfaisant, mais il faut là encore changer les liposomes de tampon pour pouvoir les marquer à l'indium-111. De plus, le problème de la durée d'incubation est toujours présent et les rendements de marquage à l'indium-111 sont inférieurs à ce qu'ils pourraient être. Une explication possible peut être l'apport d'impuretés métalliques par le marquage préalable à l'iode-125.

Enfin, la troisième méthode nous a permis de trouver un compromis entre les différentes conditions nécessaires pour réaliser un bon radiomarquage avec les deux radionucléides. Le marquage est rapide puisqu'il est réalisé en 30 minutes et ne nécessite qu'une seule purification pour éliminer la radioactivité libre de celle associée aux liposomes. Les taux de marquage sont satisfaisants aussi bien pour le marquage de la paroi que de la phase aqueuse.

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. Comme nous le verrons dans les chapitres suivants, le double marquage peut permettre de suivre les liposomes aussi bien pour les tests *in vitro* que les tests *in vivo*. 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.

III. TESTS IN VITRO

III.1. Tests de stabilité

III.1.1. Introduction

Comme nous l'avons évoqué au chapitre I (§ II.2), la stabilité des liposomes est directement dépendante de leur formulation, qui elle-même définira les propriétés des liposomes aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. La composition lipidique va conférer à la membrane liposomale des caractéristiques propres telles que son état de fluidité ou sa charge en surface, qui vont elles-mêmes influencer l'efficacité d'encapsulation, la perméabilité des composés encapsulés, la stabilité des liposomes dans le compartiment sanguin, leurs interactions avec les cellules etc...

Nous avons testé l'influence de la composition phospholipidique, et particulièrement la présence de phospholipides pégylés, sur la stabilité des radiomarquages en fonction du temps. En effet, la présence de phospholipides ayant une T_m élevée (DMPE ou DSPC par exemple) permet de diminuer la perméabilité des liposomes à 37°C. Cette caractéristique, qui peut être considérée comme un inconvénient pour l'efficacité d'encapsulation, peut néanmoins permettre de limiter la fuite des substances encapsulées, notamment *in vivo* à 37°C.

Pour cela, nous avons testé l'influence de la température pour chaque technique de radiomarquage étudiée, en tampon phosphate (0,15M pH5,6) à 4°C mais aussi dans du sérum humain à 37°C pour se rapprocher des conditions *in vivo*. Les tests ont été réalisés pour le marquage de la paroi à l'indium-111, pour l'encapsulation de l'¹²⁵I-HPPA, puis pour l'encapsulation du ¹²⁵I-BH dans des liposomes contenant de l'arginine ou du

NaCl. Ils nous ont permis de conclure quant à la stabilité des liposomes radiomarqués en fonction de la température, de la composition phospholipidique, de la présence du PEG et de l'influence du sérum.

III.1.2. Protocole expérimental

Que ce soit pour le marquage de la paroi ou pour l'encapsulation active de réactifs iodés, les études de stabilité du marquage ont été réalisées de la même façon. Un échantillon entre 100 et 500 μ l de liposomes radiomarqués est prélevé à T0 et mis à incuber à différentes températures dans le tampon utilisé pour le marquage ou en sérum humain. Les stabilités sériques ont été réalisées à 37°C de façon à reproduire les conditions physiologiques, avec une concentration lipidique de 1 μ mol par ml. A différents intervalles, compris entre 1 et 144 h, les liposomes radiomarqués sont séparés de la radioactivité non fixée par gel-filtration sur une colonne PD10, éluée en PBS. Le pourcentage d'activité associé au pic d'intérêt correspondant aux liposomes a été calculé pour chaque temps.

III.1.3. Résultats des tests de stabilité

III.1.3.1. Marquage de la paroi à l'indium-111

L'évolution du taux de marquage après 1 h, 3 h, 8 h et 24 h en tampon citrate/acétate ou en milieu sérique est représenté figure 15.

Le marquage de la paroi à l'indium-111 est stable dans le temps. Plus de 90 % de la radioactivité est encore associée aux liposomes après 24 h d'incubation aussi bien en tampon à 4°C que dans du sérum à 37°C.

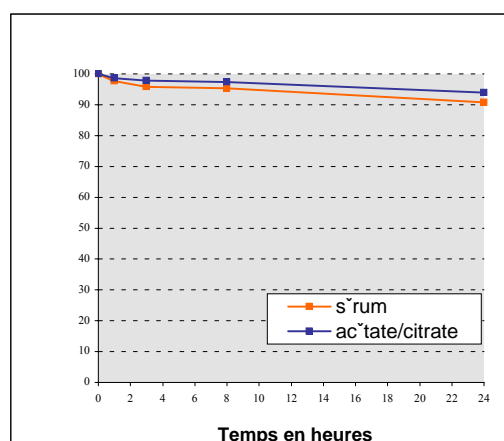


Figure 15: Stabilité des liposomes DMPC/Chol/DMPE-DTPA (66 :33 :1) marqués à l'indium-111 (7,4 kBq/nmol). Evolution du taux de marquage en tampon citrate/acétate (10mM/170mM, pH 5,3) à 4°C et en milieu sérique à 37°C.

III.1.3.2. Marquage par encapsulation active de réactifs iodés

L'encapsulation de l' ^{125}I -HPPA par un gradient de pH transmembranaire est suivie d'un très rapide relargage de la radioactivité hors des liposomes (figure 16). A 8 h en tampon, il ne reste que 25 à 35 % de la radioactivité initiale associée aux liposomes (pour une température d'incubation de respectivement 25 et 4°C). A 37°C, on observe moins de 20 % de la radioactivité encore associée aux liposomes après 1 h d'incubation.

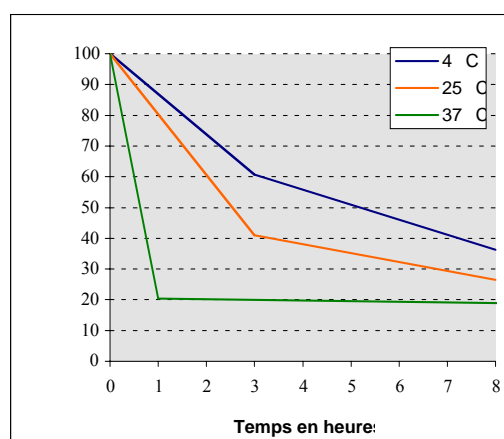


Figure 16: Evolution dans le temps du taux d'encapsulation du ^{125}I -HPPA dans des liposomes DMPC/Chol (66 :34) en fonction de la température.

Nous avons ensuite encapsulé le ^{125}I -BH dans des liposomes contenant de l'arginine. Les tests de stabilité ont été réalisés avec des liposomes conventionnels (DMPC/Chol) ou pégylés (DMPC/Chol/DMPE-PEG2000) dans du tampon à 4°C ou du sérum à 37°C (*figure 17*).

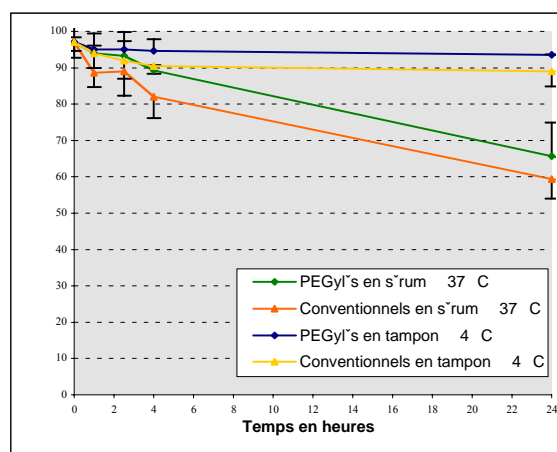


Figure 17 : Stabilité du ^{125}I -BH encapsulé dans des liposomes conventionnels ou pégylés contenant de l'arginine, incubés à 37°C en sérum ou à 4°C en tampon phosphate 150 mM (pH 5,6).

Plus de 90 % de la radioactivité est associé aux liposomes après 6 jours (144 h) en tampon à 4°C, pour les deux formulations de liposomes. Dans le sérum à 37°C, la stabilité est de 94 % à 1 h pour les liposomes pégylés, *versus* 88 % pour les liposomes conventionnels. Après 24 h, on observe 66 % du ^{125}I -BH est retenu dans les liposomes pégylés, et 60 % dans les conventionnels. Après 6 jours, l'étude de stabilité sérique montre que 40 % de la radioactivité est encore associée aux liposomes quelque soit leur formulation.

De façon surprenante, la très faible fraction de ^{125}I -BH encapsulée dans des liposomes contenant du NaCl à la place de l'arginine (TE=6 %), reste associée aux liposomes pendant au moins 24 h (80 % en tampon à 4°C et 70 % en sérum à 37°C).

Selon la composition lipidique des liposomes, les stabilités varient. Nous avons comparé la stabilité sérique à 37°C de liposomes composés de 30 à 33 % de cholestérol, avec une composition phospholipidique variée. Deux séries sont à base de phosphatidylcholine de jaune d'oeuf (EPC) dont la T_m est très faible. Les autres sont composés de phospholipides synthétiques (DMPC, $T_m=23^\circ\text{C}$) et d'une proportion de DMPE ($T_m=50^\circ\text{C}$) couplée au DNP ou au PEG2000 allant de 1 à 8 % du ratio molaire.

La *figure 18* montre qu'au temps 1 h, aucune différence significative n'est observée entre les différentes formulations. Après 2 h à 37°C, les liposomes composés d'EPC relargent 30 à 40 % de la radioactivité alors que ceux constitués de DMPC ont une stabilité supérieure à 90 %. A 24 h, les stabilités s'étalent entre 30 et 56 % selon la composition en phospholipides et notamment en fonction du pourcentage croissant de DMPE (1, 3 et 8 %).

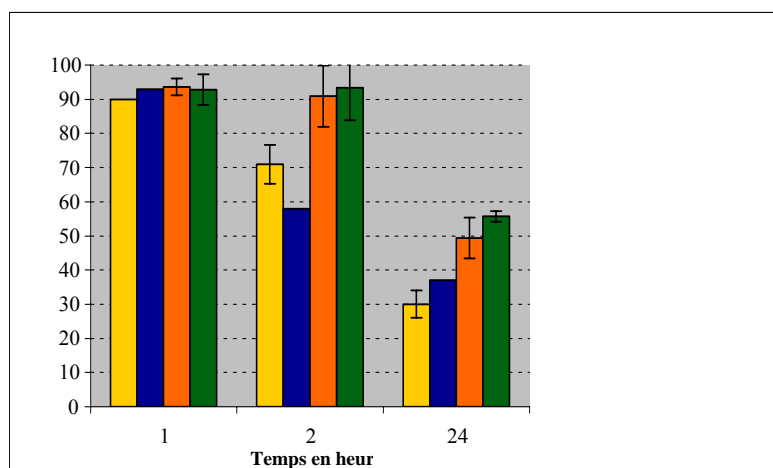


Figure 18: Influence de la composition lipidique des liposomes sur la stabilité sérique d'un marquage par encapsulation du ^{125}I -BH. L'histogramme montre le pourcentage de radioactivité encore associé aux liposomes après 1h, 2h et 24h d'incubation en sérum à 37°C, pour quatre formulations différentes.

III.1.4. Discussion

Les stabilités aussi bien en tampon qu'en sérum sont le facteur déterminant de la validité d'une technique de marquage. Principalement pour les marquages réalisés par encapsulation active d'ester iodés, les résultats des études de stabilité ont été le fil directeur dans le cheminement de la mise au point des marquages et le choix de la formulation des liposomes utilisés. Selon leur composition, les liposomes ont la particularité d'être plus ou moins instables en fonction de la température et du milieu.

Les premières études de stabilité ont été réalisées avec des liposomes composés d'EPC, phospholipide naturel dont la T_m est très basse. Indépendamment des taux d'encapsulation, les stabilités obtenues avec ces liposomes étaient satisfaisantes à 4°C puis diminuaient dans le sérum à 37°C. La figure 18 montre que, passée la première heure, les stabilités sériques obtenues avec les liposomes composés d'EPC sont nettement inférieures à ceux composés de DMPC. En utilisant des phospholipides dont la T_m est supérieure à 37°C (DSPC, DMPE) nous avons pu améliorer les stabilités du marquage.

L'osmolarité intra et extra-liposomal est également primordial pour la stabilité des liposomes radiomarqués, principalement *in vivo*. Un équilibre doit en effet exister entre la concentration osmotique du liposome et le milieu physiologique. Des essais préliminaires, non décrits dans ce travail, l'ont montré de façon flagrante avec des liposomes contenant de la lysine. Pour augmenter les quantités de BH encapsulées, nous avons concentré la lysine encapsulée dans les liposomes (de 10 à 25 puis à 100 mM en HEPES 0,1M). Les taux d'encapsulation atteignaient 52 % mais pour de fortes concentrations de lysine (correspondantes à une osmolarité de plus de 400 mosm), les études de stabilité sérique montraient un relargage presque total de la radioactivité. Nous avons alors calculé puis vérifié l'osmolarité du milieu intraliposomal sur des hématies. Pour améliorer l'efficacité du marquage la lysine a été remplacée par l'arginine. Sa concentration a été

ajustée à 80 mM en HEPES 80 mM (310 mosm) pour la phase aqueuse des liposomes et 150 mM de tampon phosphate (306 mosm) pour le milieu extérieur.

Dans le sérum, les lipoprotéines et plus particulièrement HDL, exercent une forte activité destabilisante vis-à-vis des liposomes (*cf chap.I § II.4.1*). La dilution du milieu sérique peut donc avoir une influence sur la stabilité des liposomes. Pour cela, nous avons réalisé les tests de stabilité sérique avec une concentration constante de 1 μmol de lipides/ml de sérum, concentration visée par la suite pour les études chez l'animal.

Enfin, la stabilité du radiomarquage des liposomes pégylés semble comparable à celle obtenue pour des liposomes conventionnels composés de DMPC. La présence des chaînes de PEG ne destabilise donc pas nos liposomes, ce qui est essentiel pour envisager des tests *in vivo*.

III.2. Tests d'immunoréactivité

III.2.1. Introduction

L'immunoréactivité reflète la capacité pour un AcM de reconnaître l'antigène correspondant. Le test d'immunoréactivité est réalisé généralement en fixant l'antigène sur une phase solide (tubes de plastique) et en ajoutant un défaut de l'AcM correspondant. La phase solide permet de séparer plus aisément les complexes antigène-anticorps, en retirant simplement le surnageant après lavages. C'est l'inverse qui a été effectué pour tester l'immunoréactivité des liposomes radiomarqués. L'AcM a été fixé sur la phase solide et un défaut de haptène couplé à la paroi des liposomes a été ajouté. Les tests ont été réalisés avec des liposomes contenant soit du DMPE-DTPA-¹¹¹In soit du DMPE-DNP (*cf annexe 1*), reconnus de façon spécifique par, respectivement, l'AcM 734 et l'AcM 265.5. Nous avons également vérifié l'accessibilité de l'AcM 734 au DTPA-¹¹¹In en présence de chaînes de polymères (3 mol % de PEG2000).

III.2.2. Matériel et méthode

L'immunoréactivité des liposomes marqués est testée à l'aide de tubes (IMMUNO MAXISORP 5 ml, VWR) préalablement recouverts d'anticorps par adsorption passive. Les tubes ont été préparés de la façon suivante : 500 µl d'une solution d'IgG 734 (anti-DTPA-¹¹¹In) ou 265.5 (anti-DNP) à 10 µg/ml en tampon phosphate 0,1M pH 7,2 sont déposés par tube. Après une nuit d'incubation à 37°C sous agitation douce, le surnageant est aspiré. Les tubes sont incubés 3 h à 37°C avec 500 µl d'une solution de

sérum albumine bovine (BSA) à 0,5 % dans le PBS, dont le rôle est de saturer les sites de fixation non spécifique de l'antigène. Le surnageant est à nouveau aspiré et les tubes sont conservés à 4°C avec 500 µl de PBS-BSA 0,5 %.

Juste avant d'effectuer le test d'immunoréactivité, le surnageant est aspiré. Les tubes sont lavés avec 2 x 1 ml de PBS/BSA 0,5 %. Des quantités croissantes de liposomes marqués (0,1 à 2,4 nmol de lipides) sont mises à incuber dans 500 µl de PBS/BSA 0,5 % pendant 1 h sous agitation à 37°C. Pour le marquage à l'indium-111, on ajoute aux liposomes avant l'incubation 50 µl d'une solution de chlorure d'indium (1 mM) afin de saturer tous les sites de fixation. L'activité de chaque tube est comptée au compteur γ puis le surnageant est aspiré. Après lavage par 2 x 0,5 ml de PBS/BSA 0,5 %, la radioactivité est à nouveau comptée. Le taux d'immunoréactivité est donné par le rapport du nombre de coups par minute (CPM) avant lavage sur le nombre de CPM après lavage.

III.2.3. Résultats des tests d'immunoréactivité

L'immunoréactivité des liposomes EPC/Chol/DMPE-DTPA (66 :33 :1) marqués à l'indium-111 obtenue vis-à-vis de l'AcM 734 (anti-DTPA-¹¹¹In) est en moyenne de 70 %. Elle est de 30 % pour les liposomes DMPC/Chol/DMPE-DTPA/DMPE-DNP (67 :31 :1 :1) marqués à l'iode-125 vis-à-vis de l'AcM 265.5 (anti-DNP).

Pour des liposomes doublement marqués, les tests d'immunoréactivité réalisés avec les deux AcM nous permettent non seulement de vérifier leur capacité à reconnaître leurs cibles antigéniques mais aussi de vérifier l'intégrité des liposomes. En effet, le fait d'observer une bonne corrélation des tests d'immunoréactivité pour les deux AcM nous permet d'affirmer que le marquage de paroi et celui de la phase aqueuse correspondent à une seule population de liposomes.

De plus, les résultats des tests d'immunoréactivité sont identiques pour les liposomes pégylés et non pégylés. Les chaînes de PEG2000 (3 mol % de la composition lipidique) ne semblent donc pas empêcher la reconnaissance antigène-anticorps pour ce test *in vitro*.

III.2.4. Discussion

Les tests d'immunoréactivité réalisés *in vitro* sont très importants pour vérifier qu'il existe toujours une bonne reconnaissance de l'AcM pour l'haptène, après la préparation et le radiomarquage des liposomes, et pour pouvoir envisager leur vectorisation *in vivo*.

Il faut prendre en compte l'incubation d'une heure à 37°C dans le PBS-BSA 5%, milieu se rapprochant du sérum. Comme nous l'avons indiqué au paragraphe précédent, la stabilité des liposomes après 1h en sérum à 37°C est de 94 % pour les liposomes pégylés et de 90 % pour les conventionnels. Il y a donc une perte de 6 à 10 % de la radioactivité initiale due au milieu et à la température. L'immunoréactivité est donc légèrement sous-estimée et serait en moyenne de 75 à 78 % pour l'AcM 734.

Nous avons cherché une explication en ce qui concerne les résultats obtenus avec l'AcM 265.5. Une étude isotypique de l'Ac réalisée avec un kit de bandelettes isoSrip (Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit, Roche) nous a permis de constater que le 265.5 n'était pas un Ac monoclonal mais était constitué au contraire d'un mélange de deux isotypes. Il est majoritairement constitué d'IgG1 et en en plus faible proportion d'IgG3. Cette observation pourrait expliquer pourquoi les tests d'immunoréactivité réalisés dans ces conditions avec cet Ac ont donné de plus faibles résultats qu'avec l'AcM 734, mais ce n'est sans doute pas la seule explication possible.

III.3. Test d'activation du complément

III.3.1. Introduction

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre I (§ II.4.1), après injection par voie parentérale chez l'animal, les liposomes sont rapidement éliminés de la circulation sanguine par les macrophages du SPM. L'activation du complément joue un rôle majeur dans le processus d'opsonisation, en induisant à la fois le recouvrement des particules par les protéines du complément (C3, C3b et ses produits de dégradation) et l'activation des cellules phagocytaires. La fixation d'une quantité suffisante de PEG, polymère hydrophile et flexible, à la surface des liposomes permet de réduire partiellement l'adsorption des protéines du sang (opsonines).

Nous avons choisi de tester l'influence de la densité et de la longueur des chaînes de PEG sur l'activation du complément en utilisant la technique du CH50 ("complément hémolytique 50 %") adaptée aux nanoparticules (Passirani *et al.* 1998). Le but est d'évaluer le pourcentage de consommation des protéines du complément d'un sérum humain normal (SHN) lors de sa mise en contact avec des liposomes conventionnels et des liposomes pégylés ayant différentes concentrations de PEG2000 (3 et 5 mol % de la composition lipidique). Des nanoparticules de poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) de 100 nm ont servi de témoin positif.

Le principe du test CH50 consiste à évaluer la quantité de sérum nécessaire pour lyser 50 % d'un nombre fixé d'érythrocytes de mouton, après avoir été en contact avec les nanoparticules. Cette lyse se dose par spectrophotométrie à 415 nm. Ce dosage va ainsi permettre de quantifier les protéines du sérum non consommées par les nanoparticules. En effet, plus les nanoparticules sont activatrices, plus elles consomment du complément

et moins il reste de protéines disponibles pour lyser les érythrocytes. La densité optique mesurée sera d'autant plus faible.

III.3.2. Matériel et Méthode

III.3.2.1. Matières premières

- Le sérum humain normal (SNH) provient de l'Etablissement Français du Sang d'Angers. Il est réparti en tubes de 350 µl et il est conservé 6 mois maximum, au congélateur à - 80°C.
- Les érythrocytes ou hématies de mouton sont commandés chez Eurobio. Ils se conservent 3 ou 4 semaines à 4°C.
- Les Ac de lapin anti-érythrocytes de mouton (hémolysine) qui servent à sensibiliser les hématies de mouton, sont commandés chez Eurobio.
- La préparation des différents tampons et réactifs est détaillée en annexe 2.

III.3.2.2. Préparation des échantillons

a/ Dilution du SNH et mise en contact avec les liposomes.

Après décongélation, le SHN est dilué au quart dans du tampon VBS, contenant 0,15 mM de Ca^{2+} et 0,5 mM de Mg^{2+} (VBS^{2+}). A 150 µl de SHN dilué, on ajoute des quantités croissantes de liposomes (0,2 à 1,5 µmol) en VBS^{2+} , de manière à obtenir un volume final de 600 µl ($C=1,3$ à 10 µmol/ml). Les tubes sont incubés 1h à 37°C, et c'est au cours de cette incubation que s'effectue la consommation des protéines du complément par les liposomes.

On prépare en parallèle deux témoins sans liposomes dont un est maintenu dans la glace ("T" constituera le titre du sérum = consommation normale à 4°C) et l'autre (appelé "CS ": consommation spontanée) est placé

à 37°C pendant 1 h avec les autres tubes. Ce dernier correspond à la consommation spontanée des protéines du complément (dégradation des protéines du complément sous l'action de la température).

b/ Préparation des érythrocytes de mouton sensibilisés (EA)

Les érythrocytes de mouton sont sensibilisés par des Ac de lapin afin de former des immuns complexes qui activent fortement le système du complément.

Pendant l'heure d'incubation, on prélève 0,7 ml d'érythrocytes que l'on suspend dans 10 ml de VBS²⁺, avant de les centrifuger 10 min à 2000 rpm et 4°C. Le surnageant est éliminé par aspiration sous vide et l'opération est renouvelée tant que le surnageant reste rouge. Le culot est repris avec un volume de VBS²⁺ tel que la concentration cellulaire soit de 2.10^8 cellules par ml (DO de $0,286 \pm 0,06$ à 414 nm pour 0,1 ml de suspension dans 2,9 ml d'eau distillée). Enfin, le même volume d'hémolysine est préparé à la dilution 1/400 dans le VBS²⁺ puis les deux préparations sont mélangées. On obtient 1.10^8 cellules par ml.

c/ Dilution du SHN au 1/96, ajout des EA, incubation et arrêt de la réaction par NaCl.

Après l'heure d'incubation, on ajoute une quantité fixe d'érythrocytes (0,2 ml) aux différents échantillons de sérum contenant les liposomes, dilués au 1/96 (375 µl de chaque échantillon dans 8,625 ml de VBS²⁺). On laisse alors incuber 45 min à 37°C pour permettre aux protéines non adsorbées sur les liposomes de lyser les érythrocytes de mouton. Ensuite, 2 ml de NaCl 0,15M sont ajoutés dans chaque tube pour mettre fin à la réaction.

Les échantillons sont ensuite centrifugés 10 min à 3000 rpm à 4°C et la DO des surnageants est lue à 415 nm.

III.3.2.3. Calcul des résultats

Pour chaque tube, la DO lue à 415 nm est proportionnelle à la quantité d'hémoglobine libérée par la lyse des EA. On calcule pour chaque tube le pourcentage des hématies lysées Y, par le rapport :

$$Y = (\text{DO mesurée} - \text{DO de T0}) / (\text{DO de T100} - \text{DO de T0})$$

- T0 représente le témoin négatif (blanc)
- T100 représente le témoin de lyse totale (= hématies dans l'eau)

Ensuite on trace la courbe : volume de sérum en fonction de $\log(Y/1-Y)$. Pour connaître le volume de sérum permettant d'obtenir une lyse de 50 % des hématies (1 unité de CH50), on cherche $Y = 0,5$ (c'est à dire $(Y/1-Y) = 1$ et $\log(Y/1-Y) = 0$), ce qui correspond donc à l'ordonnée à l'origine de la courbe.

L'augmentation de ce volume par rapport au volume obtenu pour l'échantillon témoin (T) nous donnera le pourcentage de consommation des protéines du complément. Ce pourcentage, calculé initialement en fonction de la masse m de liposomes mise en contact avec le sérum, se transforme facilement en pourcentage de consommation par unité de surface de liposomes. Pour cela on calcule la surface des liposomes de la manière suivante :

$$S = n 4 \pi r^2 \quad \text{et} \quad V = n (4/3) \pi r^3$$

$$\text{d'où } S = 3 (V/r) = 3m/rd$$

avec :

- n: nombre de particules
- S : la surface en cm^2
- V : le volume en cm^3
- r : le rayon en cm
- ρ : la masse volumique en $\mu\text{g}/\text{cm}^3$
- m : la masse en μg

III.3.3. Résultats des tests d'activation du complément

La figure 19 représente le pourcentage de consommation du complément (CH50) en fonction de la surface de liposomes de différentes formulations.

Les nanoparticules de PMMA utilisées comme témoins positifs, activent fortement le complément. Les différentes formulations de liposomes activent très peu le complément, moins de 20 %. On ne peut pas mettre en évidence de différence entre les liposomes pégylés avec 5 ou 3 mol % de DMPE-PEG2000. A surfaces égales, les liposomes conventionnels consomment encore moins de complément puisque le CH50 reste inférieur à 10%.

Des résultats tout à fait comparables ont été obtenus avec des liposomes de formulation différente: DMPC/Chol/DMPE-DNP (66:31:3) et DMPC/Chol/DMPE-DNP/DMPE-PEG2000 (64:30:3:3 et 62:30:3:5).

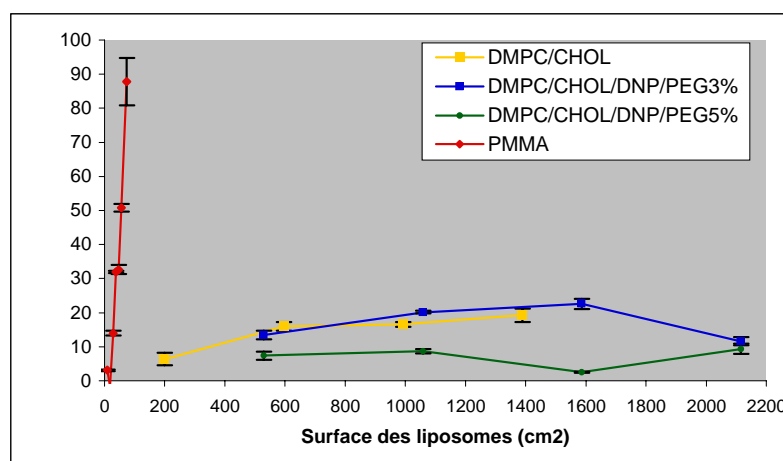


Figure 19: Consommation du complément (CH50 en %) en présence de liposomes conventionnels (DMPC/Chol 66:34) et de liposomes pégylés (DMPC/Chol/DMPE-PEG2000 65:30:5 ou 67:30:3) et de nanoparticules de PMMA, en fonction de leur surface en cm².

III.3.4. Discussion

Avec ce test, nous avons voulu déterminer principalement l'influence des chaînes de PEG à la surface des liposomes sur l'activation du complément. Pour cela des liposomes conventionnels, des liposomes pégylés et des nanoparticules de référence ont été testés par la technique du CH50. Les résultats sont exprimés en pourcentage de consommation du complément rapporté à la surface en cm^2 des liposomes, afin de pouvoir comparer des vésicules dont le diamètre peut être légèrement différent. En effet, indépendamment de la répulsion exercée par les chaînes de polymères sur les protéines du complément, il a été montré que la taille et donc le rayon de courbure des liposomes influait directement sur l'activation du complément. Les mesures de la taille des liposomes par spectroscopie à corrélation photonique montrent que les liposomes pégylés avaient un diamètre plus important que les liposomes conventionnels (160 nm *versus* 120 nm) ce qui peut expliquer la légère différence observée entre les liposomes conventionnels et pégylés. Le diamètre des nanoparticules de PMMA était égal à 134 nm. A taille égale, elles sont généralement plus activatrices que les liposomes, du fait principalement de leur nature synthétique et *in vivo* elles sont éliminées beaucoup plus rapidement. La figure 19 montre que les nanoparticules activent très fortement le complément et pour des quantités très faibles. A l'inverse, vu la très faible activation des liposomes, nous avons augmenté la quantité de lipides et donc la surface activatrice, ce qui explique le décalage entre la courbe témoin et celle des liposomes. Mais on voit, que là encore ils sont peu activateurs.

Nous souhaitons démontrer un effet de la pégylation afin d'orienter nos choix concernant la formulation des liposomes pour une étude chez l'animal. Les résultats montrent que nous n'avons pas pu mettre en évidence l'influence de 3 ou 5 mol % de PEG2000 pour inhiber l'activation du complément comme ont pu le faire certains auteurs (Bradley *et al.* 1998). Cette méthode, appliquée aux liposomes, ne semble donc pas suffisante

pour mettre en évidence la répulsion stérique qu'exercent les chaînes de PEG sur les protéines du sérum. Mais dans tous les cas, nos liposomes semblent peu activer le complément, ce qui est positif de toute façon pour envisager leur biodistribution *in vivo*. Néanmoins, il existe de nombreux facteurs pouvant influencer sur la furtivité des liposomes et d'après cette étude *in vitro*, il est très difficile de prévoir le comportement de nos liposomes après injection chez l'animal.

IV. ETUDE CHEZ L'ANIMAL

IV.1. Introduction

Après les tests réalisés *in vitro*, nous avons souhaité étudier le devenir des liposomes radiomarqués après injection chez la souris, avec pour objectif de valider les techniques de radiomarquage et d'améliorer les formulations selon les résultats obtenus. Cette étude *in vivo* est une étape essentielle pour envisager l'immunociblage des liposomes et leur application thérapeutique.

Avant d'aller plus loin, nous avons d'abord vérifié la faisabilité d'un ciblage tumoral chez la souris NUDE, à l'aide d'AcM bispécifiques et de liposomes radiomarqués à l'indium-111. Cette étude préliminaire a été réalisée sur un modèle animal exploité depuis longtemps au laboratoire et déjà validé pour la RIT (Vuillez *et al.* 1999, Gautherot *et al.* 2000). Les souris sont xéno greffées en sous-cutané avec une lignée d'adénocarcinome colique humain (LS174T) qui exprime l'ACE (antigène carcino-embryonnaire). Les liposomes ont été vectorisés par un AcM bispécifique hMN14 x 734, constitué d'un fragment anti-ACE (hMN14) et d'un fragment anti-DTPA-¹¹¹In (734). Les résultats ont montré la faisabilité d'un ciblage spécifique à l'aide des liposomes radiomarqués malgré la forte captation hépatique et splénique, largement décrite avec des liposomes conventionnels.

Dans un second temps, nous avons donc tenté d'améliorer la formulation des liposomes dans le but d'obtenir une meilleure biodistribution et des temps de circulation prolongés favorisant ainsi une majoration de la distribution vers la cible tumorale. Un autre modèle animal,

très ressemblant, a été utilisé pour des raisons de disponibilité et de coût. Des souris BALB C ont été injectées avec différentes formulations de liposomes radiomarqués aussi bien à l'indium-111 qu'à l'iode-125, par encapsulation du réactif de BH.

Une étude de la pharmacocinétique sanguine a été réalisée en premier pour confirmer la stabilité des liposomes observée *in vitro* et pour comparer les temps de circulation entre liposomes conventionnels et pégylés. Le réactif de Bolton-Hunter couplé à l'arginine a été injecté sans les liposomes à titre de témoin. L'influence des chaînes de PEG ayant été démontrée sur la clairance plasmatique des liposomes, nous avons alors travaillé avec des liposomes pégylés (5 mol % de PEG 2000) pour étudier la biodistribution.

Les deux types de marquage, sur la paroi et dans la phase aqueuse, nous ont permis de comparer le devenir des phospholipides marqués, DMPE-DTPA-¹¹¹In, et du contenu des liposomes, c'est-à-dire, le réactif de ¹²⁵I-BH couplé à l'arginine. La corrélation entre les résultats obtenus pour les deux types deux populations radiomarquées permettant de supposer que les liposomes sont intacts.

IV.2. Matériels et méthodes

IV.2.1. Matières premières

IV.2.1.1. Liposomes

Les liposomes ont été préparés selon la technique décrite précédemment (§ I). Les formulations qui ont montré les meilleurs résultats *in vitro* en matière d'encapsulation et de stabilité ont été reprises pour réaliser l'étude chez l'animal. Nous avons injecté *in vivo* des liposomes

conventionnels dont la formulation est DMPC/Chol/DMPE-DTPA (66:33:1) ou DSPC/Chol/DSPE-DTPA (66:33:1) et des liposomes **pégylés** dont la composition est DMPC/Chol/DMPE-DTPA/DMPE-PEG (64:30:1:5) ou DSPC/Chol/DSPE-DTPA/DMPE-PEG 2000 (64:30:1:5). Pour les marquages à l'indium-111, les liposomes contenaient 1 mol % de DMPE-DTPA.

IV.2.1.2. Anticorps monoclonaux

L'anticorps 734 est une IgG murine produite par Immunotech SA (France). L'anticorps bispécifique hMN14 x 734 a été fourni par IBC Pharmaceuticals (New Jersey, USA).

IV.2.1.3. Modèles animaux

L'étude préliminaire a été réalisée avec des souris NUDE femelles de plus de 10 semaines (laboratoire Janvier, France), greffées au niveau du flanc droit par injection sous-cutanée de 10 millions de cellules LS174T. Cette lignée d'adénocarcinome colique humain exprime fortement l'ACE sur sa membrane. En 8 à 10 jours, une tumeur solide et vascularisée de 3 à 8 mm de diamètre est obtenue. Les souris NUDE pèsent en moyenne 20 g.

Pour les études de stabilité *in vivo* des différentes formulations de liposomes, nous avons utilisé des souris BALB C femelles saines, dont les poids varient entre 20 et 30 g, provenant soit de l'animalerie Hospitalo-Universitaire d'Angers, soit du laboratoire Janvier (France).

IV.2.2. Protocoles expérimentaux

IV.2.2.1. *Etude préliminaire de préciblage in vivo*

Le ciblage est réalisé en deux étapes. Les injections sont effectuées par voie I.V. dans une veine de la queue. Dans un premier temps l'Ac bispécifique hMN14 x 734 est injecté à 12 souris. Deux doses sont testées : 20 et 100 µg (6 souris / dose). Un lot contrôle de 6 souris ne reçoit pas d'Ac. L'injection de 50 nmol de liposomes DMPC/Chol/DMPE-DTPA-¹¹¹In (66:33:1) a lieu 24 h après. Trois heures et 24 h après l'injection des liposomes, 3 souris par dose d'Ac ainsi que 3 souris témoins sont sacrifiées.

IV.2.2.2. *Etude de stabilité des formulations liposomales in vivo*

➤ Pharmacocinétique sanguine

Deux séries de 4 souris ont permis de réaliser une étude pharmacocinétique de liposomes conventionnels DMPC/Chol/DSPE-DTPA (66:33:1) et pégylés DMPC/Chol/DSPE-DTPA/DMPE-PEG 2000 (64:30:1:5) marqués à l'iode-125. 100 µl de liposomes radiomarqués (400 nmol/souris) sont injectés dans la veine de la queue. 4 souris témoins ont reçu le réactif ¹²⁵I-BH couplé à l'arginine (20 nmol/souris) sans les liposomes. Un prélèvement sanguin est réalisé sur chacune des souris dans le sinus oculaire, à différents temps (5, 15, 30 minutes et 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h et 30 h). Ces prélèvements sont pesés puis leur radioactivité est comptée au compteur γ.

➤ Biodistribution

Les premières études de biodistribution ont été réalisées avec des liposomes pégylés DMPC/Chol/DMPE-DTPA/DMPE-PEG2000 (64:30:1:5) marqués à l'iode-125 par encapsulation active du réactif de Bolton-Hunter. Ensuite, nous avons effectué une deuxième série de biodistributions avec des liposomes pégylés DMPC ou DSPC/Chol/DSPE-DTPA/DMPE-PEG2000 (64:30:1:5) marqués à l'indium-111. Avant injection, le tampon dans lequel se trouvaient les liposomes après marquage (citrate/acétate pour l'indium-111 ou phosphate 0,15M pour l'iode-125) a été remplacé par du PBS pH 7,4 à l'aide d'une colonne PD10 pour respecter le pH physiologique des souris.

Les souris ont été injectées dans une veine de la queue avec 100 µl de liposomes radiomarqués (500 à 600 nmol de lipides par souris). Les animaux (3 souris par temps) sont sacrifiés à différents temps (5, 10, 20, 30 minutes et 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 18 h, 24 h et 48 h).

Après sacrifice par dislocation cervicale, on prélève le sang et les différents organes (foie, rate, reins, cœur, poumons, cerveau, muscle, intestins, estomac, peau, os, queue). La tumeur sous-cutanée est également prélevée dans l'étude préliminaire. Les organes et les prélèvements sanguins sont pesés et leur radioactivité est mesurée au compteur γ .

La radioactivité retrouvée dans les urines a également été évaluée au cours des premières heures de cette étude de biodistribution.

IV.2.3. Expression et traitement des résultats

Une fraction de la suspension de liposomes marqués permet de connaître l'activité théorique injectée et sert de standard de décroissance. L'activité dans la queue est mesurée et soustraite de l'activité théorique injectée pour calculer la dose injectée.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu ou de sang (% DI/g). Le % DI/g de tumeur est rapporté au % DI/g des autres organes (rapport T / organe) pour l'étude préliminaire.

Les données ont été traitées et comparées à l'aide des logiciels "kinetics" et "pharmacokinetics".

IV.3. Résultats

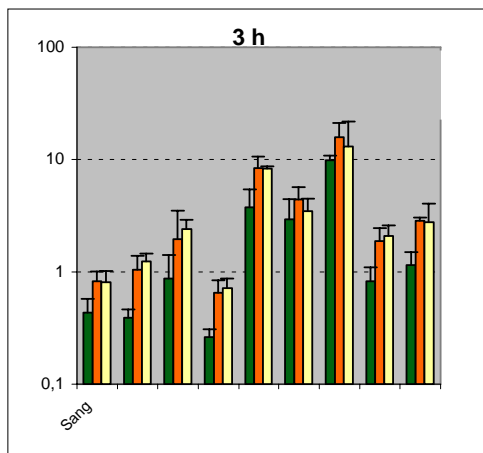
IV.3.1. Etude préliminaire de préciblage *in vivo*

Les résultats des biodistributions chez la souris après injection de 20 ou 100 μg d'Ac et 50 nmol de liposomes sont présentés dans les figures 20 à 25. Les moyennes et écarts-types ont été calculés sur des lots de 3 souris, sauf pour le lot 20 μg d'Ac au temps 24 h, pour lequel une souris n'avait pas de tumeur isolable lors de la dissection. Les figures 20 et 21 représentent les % DI/g de tissu à 3 h et à 24 h. Le foie et la rate, organes connus pour leur captation des liposomes, ont été présentés séparément des autres tissus (*figures 22 et 13*). Les figures 24 et 25 donnent les rapports T/organe pour les mêmes temps.

Au temps 3 h, les augmentations de % DI/g de tumeur et les augmentations des rapports T/organes ne sont pas significatives.

Au temps 24 h, les % DI/g de tumeur sont multipliés respectivement par 1,9 et 6,3 chez les souris ayant reçu 20 et 100 μg d'Ac par rapport aux souris témoins. La différence est significative pour la dose de 100 μg . Pour cette même dose, les rapports T/organes sont augmentés d'un facteur 3,1 à 6,2.

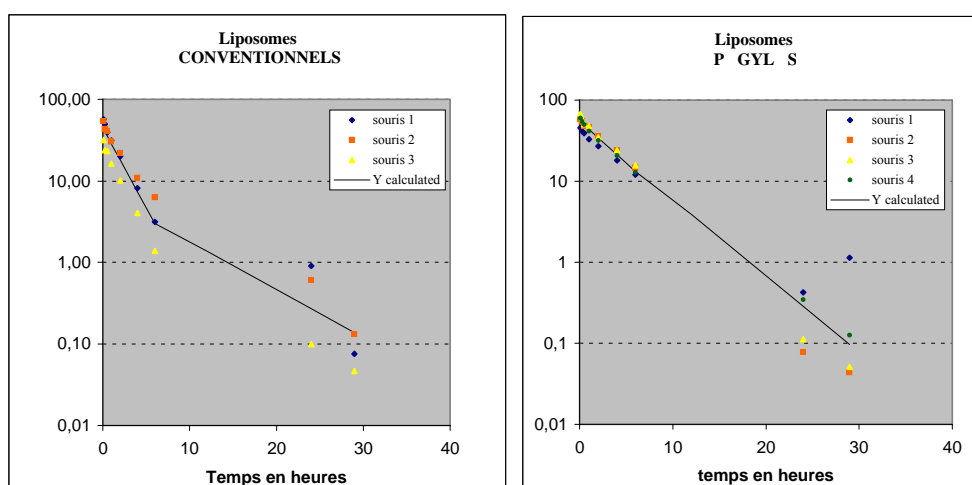
Enfin, on constate que les % DI/g de tumeur au temps 24 h augmentent avec la dose d'Ac (0,573 pour 20 μg *versus* 1,845 pour 100 μg).



IV.3.2. Pharmacocinétique sanguine des liposomes radiomarqués

Les pharmacocinétiques sanguines de liposomes conventionnels et de liposomes pégylés marqués avec le ^{125}I -BH ont été comparées afin d'évaluer l'influence du PEG2000 (à raison de 5 % de la composition lipidique) sur les temps de circulation des liposomes *in vivo*.

Les cinétiques sanguines sur 30 h, obtenues après l'injection de 100 μl de liposomes (400 nmol de lipides/souris), montrent un mécanisme d'élimination différent pour les deux séries de liposomes (*figures 26 et 27*). Les liposomes conventionnels sont éliminés avec une décroissance biexponentielle et une clairance sanguine de $1,01 \pm 0,05$ ml/min. L'élimination plasmatique des liposomes pégylés obéit à une cinétique d'ordre premier avec une clairance égale à $0,43 \pm 0,02$ ml/min.



Figures 26 et 27: Cinétiques sanguines représentées par le %DI/g de sang en fonction du temps, chez la souris des liposomes conventionnels (à gauche) et des liposomes pégylés (à droite) sur une période de 30 h.

Vu la faible activité des prélèvements sanguins ($< 0,1$ % DI/g) pour les temps tardifs (24 et 30 h), et les grandes variabilités inter-individuelles

observées, nous avons représenté les cinétiques sanguines au cours des 6 premières heures (*figure 28*). Les demi-vies ($T_{1/2 \alpha}$) obtenues pour les deux séries sont significativement différentes avec $1,54 \pm 0,10$ h pour les liposomes conventionnels et $2,91 \pm 0,16$ h pour les liposomes pégylés.

Les résultats de la cinétique sanguine concernant le réactif de BH couplé à l'arginine donnent une $T_{1/2 \alpha} = 0,28 \pm 0,01$ h et une clairance de $5,26 \pm 0,89$ ml/min.

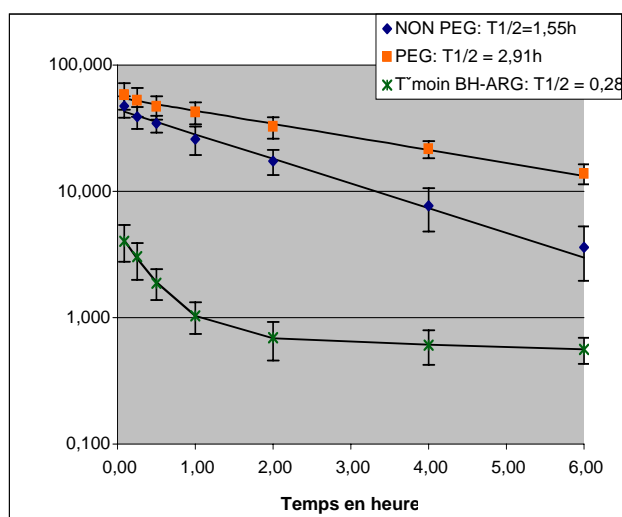


Figure 28: Comparaison des cinétiques sanguines chez la souris des liposomes conventionnels et pégylés (400 nmol) marqués à l'iode-125, sur 6h. Représentation semi-logarithmique des moyennes et écart-types des % DI/g obtenus pour les liposomes conventionnels (en bleu, n=3), les liposomes pégylés (en orange, n=4) et le réactif de BH couplé à l'arginine (n=4), ainsi que les valeurs calculées par le logiciel "pharmacokinetics" (-) aux temps 5, 15, 30 minutes et 1, 2, 4 et 6h.

Compte tenu de ces résultats, nous avons réalisé les études de biodistribution avec les liposomes pégylés puisque nous avons montré qu'ils circulaient deux fois plus longtemps que les conventionnels.

IV.3.3. Biodistribution des liposomes radiomarqués

IV.3.3.1. Comparaison entre les deux traceurs (iode-125 versus indium-111)

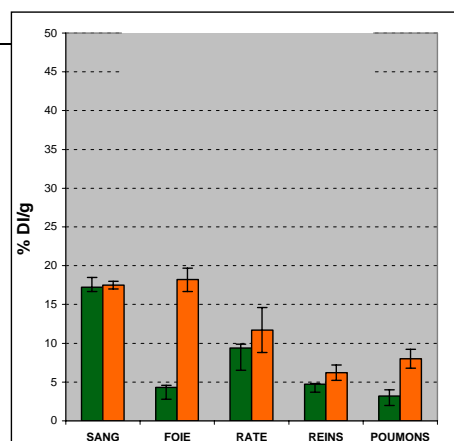
Les principaux résultats de l'étude de biodistribution chez la souris des liposomes pégylés radiomarqués aussi bien à l'indium-111 qu'à l'iode-125, sont présentés dans les figures 20 à 24. Nous avons choisi de présenter les résultats en % DI/g pour le sang et les organes les plus représentatifs (foie, rate, reins et poumons) ainsi que les % DI correspondants à l'élimination du traceur, c'est-à-dire la radioactivité retrouvée principalement dans le foie, la rate et les urines ainsi que la somme des trois (F+R+U). Ceci nous permet de pouvoir comparer non seulement la répartition de la radioactivité dans les différents organes (*figures 29 à 32*) mais aussi l'élimination totale correspondante à chaque traceur (*figure 33*).

Au temps 10 minutes, on retrouve dans le sang 32 % DI/g pour les liposomes marqués à l'iode-125 contre 23 % DI/g pour ceux marqués à l'indium-111. L'élimination plasmatique globale représente 15 et 13 % de la DI pour les liposomes marqués respectivement à l'iode-125 et à l'indium-111.

Au temps 1 h, les taux circulants des liposomes marqués à l'iode-125 sont exactement similaires à ceux des liposomes marqués à l'indium-111 (respectivement 17,2 et 17,5 % DI/g de sang). On observe une différence significative entre les deux traceurs au niveau du foie notamment avec 4 % DI/g pour l'iode-125 et 18 % DI/g pour l'indium-111. L'élimination urinaire des liposomes marqués à l'iode-125 est importante de l'ordre de 27 % de la DI, alors qu'elle est nulle pour l'indium-111. Mais au final, lorsque l'on compare les éliminations globales, en considérant la somme des activités retrouvées dans le foie, la rate et les urines, elle sont sensiblement équivalentes pour les deux traceurs.

Au temps 4 h, on peut faire exactement la même constatation concernant l'élimination globale des deux traceurs. Les taux circulants sont de 4,3 % DI/g pour les liposomes marqués à l'iode-125 contre 2,77 % DI/g pour ceux marqués à l'indium-111, et leur mode d'élimination est différent: 2,6 % DI/g de foie pour l'iode-125 contre 41,5 % pour l'indium-111.

24 h après l'injection des deux populations de liposomes, on observe dans le sang 0,6 % DI/g pour l'iode-125 et 0,2 % pour l'indium-111. Les % DI/g sont les sensiblement les mêmes au niveau de la rate alors qu'ils diffèrent très significativement au niveau du foie (0,8 % DI/g pour l'iode-125 *versus* 26,9 % DI/g pour l'indium-111). Les urines de 24 h n'ont pas été collectées.



Figures 29 à 32: Biodistribution chez la souris de liposomes pégylés DMPC/Chol/DMPE-DTPA/DMPE-PEG2000 (64:30:1:5) marqués l'iode-125 par encapsulation du ¹²⁵I-BH (en vert), ou à l'indium-111 (en orange), 10 minutes, 1h, 4h ou 24h, après injection de 500 à 600 nmol de lipides/souris. Moyennes et écart-types des % DI/g de tissus pour les principaux organes.

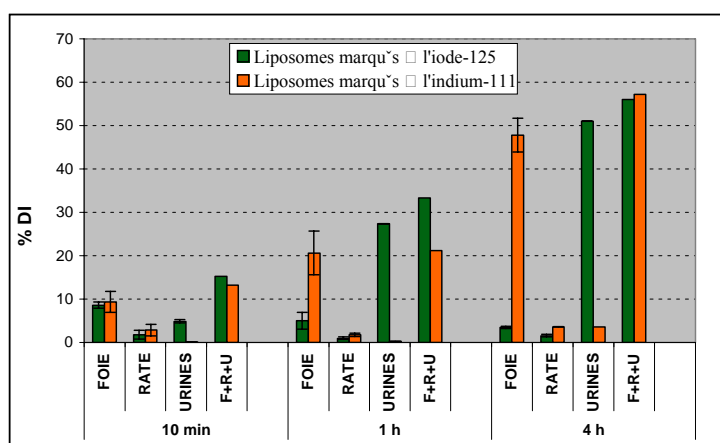
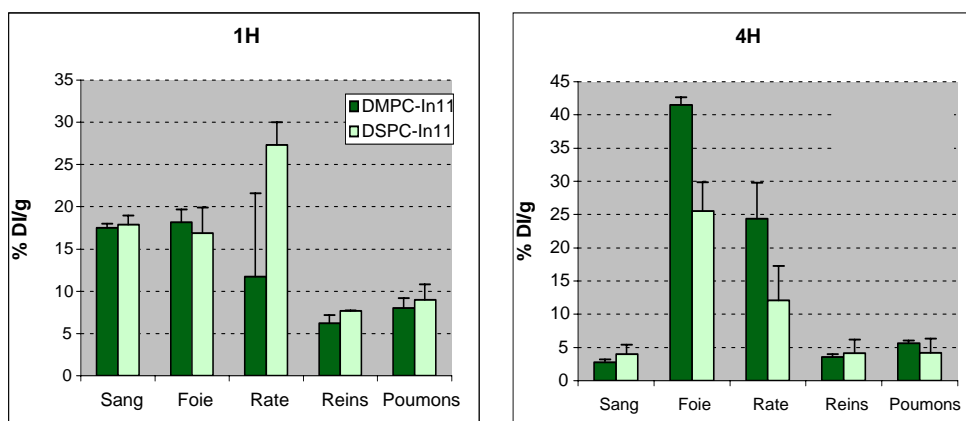


Figure 33: Elimination des liposomes marqués à l'iode-125 (en vert) ou à l'indium-111 (en orange) à 10 minutes, 1h et 4h. Moyennes et écart-types des % DI dans les urines, le foie, la rate et la somme des % DI des trois (U+F+R) représentant l'élimination globale.

IV.3.3.2. Comparaison entre deux formulations (DMPC versus DSPC)

Nous avons pensé qu'il pourrait être souhaitable de prolonger le temps de présence systémique de nos liposomes. Dans ce sens, la composition phospholipidique a été modifiée en remplaçant le DMPC par du DSPC pour obtenir des liposomes plus rigides à 37°C et tenter d'améliorer leur demi-vie plasmatique.

Les figures 34 et 35 représentent la biodistribution dans les principaux organes des liposomes pégylés composés de DMPC ou de DSPC marqués à l'indium-111, 1 h et 4 h après leur injection chez la souris.



Figures 34 et 35: Comparaison des biodistributions dans les principaux organes et le sang, à 1h et 4h, de liposomes pégylés marqués à l'indium-111, composés de DMPC/Chol/DSPE-DTPA/DMPE-PEG2000 (63:30:1:5) en vert foncé ou de DSPC/Chol/DSPE-DTPA/DMPE-PEG2000 (64:30:1:5) en vert clair.

On n'observe pas de différence significative entre les deux formulations pour les taux circulants à 1 h comme à 4 h (DMPC: 17,5 % DI/g versus DSPC: 17,9 % DI/g à 1 h, et 2,8 versus 3,9 à 4h).

A 4 h, les liposomes composés de DMPC se retrouvent avec 41,5 % DI/g dans le foie et 24,4 % DI/g dans la rate contre respectivement 25,5 et 12,1 pour les DSPC. On n'observe pas de différence significative entre les deux formulations pour les autres organes.

IV.4. Discussion

Au cours de l'étude préliminaire, nous avons souhaité vérifier la possibilité de réaliser un préciblage avec des liposomes porteurs de radioactivité (DMPC/Chol/DMPE-DTPA-¹¹¹In) sur un modèle animal validé au laboratoire. L'immunoréactivité des liposomes marqués ayant été vérifiée *in vitro* avec des Ac anti-DTPA-¹¹¹In, nous avons pu montrer la faisabilité d'un ciblage tumoral *in vivo* chez la souris NUDE grâce à l'utilisation d'un anticorps bispécifique hMN14 x 734. L'Ac hMN14 est la version humanisée d'un Ac murin anti-ACE. Par rapport à son homologue murin, il présente l'avantage d'une moindre immunogénicité lors de son administration à l'homme. Il possède également une grande affinité pour l'ACE qui est un antigène sur-exprimé par de nombreuses tumeurs (digestives, mammaires, bronchiques ou thyroïdiennes).

Dans notre étude, les valeurs obtenues à 24 h ont donné un % DI/g de tumeur de 1,8 chez les souris ayant reçu l'AcM *versus* 0,3 pour les souris témoins. Les rapports tumeur/organe augmentent également d'un facteur allant de 3,1 à 6,2. On peut donc affirmer qu'il existe une fixation tumorale spécifique, notamment après injection de 100 µg d'AcM. On observe aussi peu de fixation non spécifique au niveau de la tumeur, malgré une vascularisation souvent anormale des tissus pathologiques. Ceci est sûrement dû à l'élimination rapide qui caractérise les liposomes conventionnels. L'étude des biodistributions montre en effet une forte capture des liposomes par le foie et la rate, ce qui est un frein à leur diffusion. Cette étude a pu montrer la faisabilité d'un ciblage tumoral mais aussi la nécessité d'améliorer la furtivité des liposomes. Ce modèle animal sera donc utilisé comme référence tout en apportant quelques modifications concernant la formulation des liposomes pour améliorer ce système.

Les pharmacocinétiques sanguines de liposomes conventionnels et pégylés ont été comparées après injection I.V. chez des souris BALB C, pour déterminer l'influence du PEG2000 à la surface des liposomes sur clairance plasmatique. 100 µl de liposomes soit 400 nmol de lipides ont été injectés à chaque souris. En première approximation, le profil de la phase d'élimination des liposomes conventionnels correspond à un modèle bicompartimental ouvert avec une rapide distribution dans le SPM puis une lente phase d'élimination de la circulation sanguine. A contrario, celui des liposomes pégylés peut être décrit comme un modèle monocompartimental ouvert avec pour conséquence une élimination qui suit une décroissance monoexponentielle. D'après la littérature, cette différence entre liposomes conventionnels et pégylés a déjà été décrite (Allen *et al.* 1991 et 1995). Ce qui est plus surprenant sont les temps de circulation de nos liposomes. En effet, la durée de circulation des liposomes pégylés, avec 5 mol % de PEG2000, est souvent supérieure à celle que nous avons observée, bien que certains auteurs mentionnent aussi des valeurs inférieures ($T_{1/2} = 1,7$ à 20 h*, Allen *et al.* 1995). A l'inverse, nos liposomes conventionnels ont une furtivité plus importante que ce qui est généralement décrit dans la littérature ($T_{1/2} \leq 0,7$ h, *même dose, même formulation et même concentration lipidique) (Mori *et al.* 1991).

Malgré cette particularité, nous avons poursuivi l'étude chez l'animal en utilisant des liposomes pégylés dont nous avons montré que la demi-vie était le double des liposomes conventionnels.

La biodistribution de liposomes contenant 5 mol % de PEG2000 a été réalisée chez des souris BALB C. Le double marquage a permis d'étudier le devenir de nos liposomes *in vivo*, en suivant à la fois les phospholipides de la paroi (marqués à l'indium-111) et le contenu des vésicules, c'est-à-dire, le réactif de ^{125}I -BH couplé à l'arginine. La corrélation entre les résultats obtenus pour les deux traceurs permettant de supposer que les liposomes sont intacts. Cependant, le cas contraire ne permet pas de juger de l'intégrité

des liposomes, le contenu pouvant être aussi bien relargé de vésicules intactes, qu'éliminé après destruction des liposomes par les macrophages. La première hypothèse peut-être en partie écartée pour les temps précoces vu les résultats des stabilités sériques des quatre premières heures d'incubation (relargage inférieur à 10 % de la radioactivité initiale). A 24 h, cette perte n'est plus négligeable puisqu'elle représente, d'après les tests *in vitro*, 35 à 40 % de la radioactivité initiale.

La répartition de la radioactivité dans les principaux organes à 10 min, 1 h, 4 h et 24 h montre qu'il existe des voies élimination différentes pour les deux traceurs. Les phospholipides couplés à l'indium-111 sont séquestrés au niveau du foie et de la rate, tandis que le ^{125}I -BH couplé à l'arginine est rapidement éliminé au niveau des reins. Presque 30 % de la DI est retrouvé dans les urines à 1 h, ce qui concorde avec la clairance rapide observée pour ce traceur ($\text{Cl} = 5,26 \pm 0,89 \text{ ml/min}$).

Parallèlement, on retrouve une concordance parfaite en les taux sanguins des deux traceurs ce qui permet de conclure que les liposomes sont stables et circulent librement avant d'être captés par le SPM où ils sont détruits. Les liposomes restent au niveau du foie et de la rate tandis que le réactif de BH ressort pour être éliminé rapidement de l'organisme. Ce phénomène est tout à fait encourageant puisqu'il montre une fuite rapide de la radioactivité après séquestration des liposomes, ce qui peut permettre de diminuer le bruit de fond.

Ainsi, nous montrons par la similitude des pharmacocinétiques sanguines des deux traceurs, que d'une part, il n'y a pas de fuite exagérée du traceur soluble ($\text{Arg-}^{125}\text{I-BH}$) *in vivo*, pendant la phase de circulation des liposomes. D'autre part, une fois captés dans le foie et la rate, il n'y a pas de recirculation du $\text{DMPE-DTPA-}^{111}\text{In}$, ce qui valide notre étude préliminaire de préciblage tumoral.

Le radiomarquage des liposomes est stable *in vivo* et peut permettre d'envisager l'augmentation de leur activité spécifique pour une application thérapeutique. Néanmoins, nos liposomes pégylés circulent moins

longtemps que ceux décrits dans la littérature. Nous avons essayé de remédier à ce problème en modifiant la composition phospholipidique. Le DMPC a été remplacé par le DSPC pour augmenter la rigidité des vésicules et diminuer leur clairance plasmatique comme cela a été décrit par plusieurs auteurs (Maruyama *et al.* 1992, Allen *et al.* 1995). Pour notre part, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'influence de la composition lipidique mais les résultats confirment ceux obtenus pour la biodistribution des liposomes marqués à l'indium-111.

Chapitre III

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'objectif de ce travail a été de réaliser une étude de faisabilité de la RIT à l'aide de liposomes radiomarqués. Le but est de résoudre un problème majeur de ce type de traitement qui est représenté par la faible activité susceptible d'être délivrée aux tumeurs solides en utilisant des Ac et/ou des haptènes radiomarqués. L'étude expérimentale a été divisée en quatre parties distinctes:

- la préparation des liposomes,
- la mise au point des techniques de radiomarquage,
- les tests réalisés *in vitro*,
- les études chez l'animal.

Chaque partie a donné lieu à une discussion essayant d'expliquer les résultats obtenus. La discussion générale va permettre de reprendre les résultats essentiels de chaque partie et de les comparer à ceux décrits dans la littérature. Nous traiterons d'une part, les techniques de radiomarquage des liposomes et d'autre part, les différentes méthodes de ciblage *in vivo*.

I. RADIOMARQUAGE DES LIPOSOMES

Les principales publications parues à ce jour sur l'utilisation des liposomes radiomarqués, concernent des liposomes non immunospécifiques pour des applications diagnostiques. En effet, leur tropisme particulier pour les tumeurs, les sites infectieux et inflammatoires a été mis à profit avec des liposomes radiomarqués principalement au technétium-99m (^{99m}Tc), à l'indium-111 (^{111}In) ou au gallium-67 (^{67}Ga) (Espinola *et al.* 1979, Proffitt *et al.* 1983, Phillips *et al.* 1992 et 1995, Woodle 1993, Belhaj-Tayeb *et al.* 2003).

Les techniques de radiomarquage décrites dans ces travaux sont variées, mais dans tous les cas, les activités spécifiques sont insuffisantes

pour envisager une application thérapeutique. Pourtant, une étude dosimétrique de *Kostarelos (2000)* réalisée avec des liposomes radiomarqués par différents radionucléides (^{67}Cu , ^{188}Re , ^{211}At , ^{90}Y , ^{131}I) a montré que si les SUV pégylés étaient radiomarqués avec des radionucléides d'intérêt en thérapeutique, ils pourraient délivrer des doses efficaces aux tumeurs en épargnant la moelle osseuse et en gardant une dosimétrie tout à fait acceptable pour le foie et la rate.

Il est donc très intéressant d'essayer d'améliorer les méthodes de marquage des liposomes. D'autre part, d'autres radionucléides que ceux utilisés jusqu'à présent, comme les dérivés halogénés, pourraient permettre l'utilisation thérapeutique des liposomes. En effet, de façon surprenante, les liposomes ont rarement été radio-iodés alors que les isotopes de l'iode sont toujours attractifs. L'iode-125 et l'iode-131 sont facilement disponibles, et associés à l'iode-123 et l'iode-124, ils peuvent permettre aussi bien l'exploration diagnostique, en scintigraphie comme en TEP (Tomographie par Emission de Positons), que la thérapie et plus particulièrement la RIT.

Il existe trois principales méthodes pour radiomarquer les liposomes: La première est une encapsulation passive du radionucléide qui s'effectue au cours de la préparation des liposomes. Dans notre étude, nous n'avons pas exploré cette méthode qui, nous allons le voir, présente plusieurs inconvénients. Les deux autres méthodes consistent à radiomarquer des liposomes pré-formés soit en couplant le radionucléide à la paroi des liposomes, soit par encapsulation active. Ces techniques ont l'avantage de pouvoir radiomarquer les liposomes extemporanément.

Nous avons donc cherché à améliorer ces deux méthodes de marquage dans le but d'optimiser les activités spécifiques des liposomes, tout en préservant leur intégrité.

I.1. Marquage passif

Dans le **marquage passif**, les liposomes sont radiomarqués simplement en introduisant un radionucléide dans la phase aqueuse avant hydratation du film lipidique (*cf chap.I § II.2.1*). Cette approche a été utilisée pour marquer des liposomes au technétium-99m, à l'indium-111 (sous forme d'oxinate d'¹¹¹In) et même au fluor-18 (Oku, 1999), pour les explorations diagnostiques.

Quelques auteurs ont cependant utilisé des radionucléides intéressants pour la thérapie. Les liposomes ont été radiomarqués à l'iode, de façon passive, soit directement sous forme d'iodure de sodium (Hardy *et al.* 1980), soit en couplant le réactif de BH radio-iodé à un phospholipide membranaire (¹³¹I-phenylpropionylphosphatidylethanolamine). Les meilleurs rendements de marquage sont de 30 % et la technique pose des problèmes de purification et de caractérisation du produit obtenu (Shroit *et al.* 1982). Hafeli *et al.* (1991) ont réalisé plusieurs études avec les deux isotopes du rhénium (186 et 188) sous forme de complexes lipophiles. Les taux d'incorporation obtenus sont inférieurs à 10 %.

L'exemple le plus intéressant d'encapsulation passive est celui de Sofou *et al.* (2004). Ils ont incorporé de l'actinium-225 (²²⁵Ac) dans des liposomes (TE= 10 %) puis étudié leur stabilité dans le temps. L'²²⁵Ac (T_{1/2} = 10 j) est hautement toxique car il décroît en produisant trois autres émetteurs α dont le dernier est le bismuth-213 (T_{1/2} = 47 min). 10 à 40 atomes d'²²⁵Ac (11 à 37 MBq/ml) ont pu être encapsulés sous forme de complexes (DOTA ou DTPA-²²⁵Ac) dans des liposomes EPC/Chol pégylés de différentes tailles. La stabilité est de 50 % au bout de 30 jours mais elle est dépendante de la taille des liposomes. Seuls les liposomes d'un diamètre supérieur à 650 nm peuvent contenir à la fois les atomes d'²²⁵Ac et des éléments fils, cependant ces liposomes sont rapidement éliminés de la circulation sanguine.

L'ensemble de ces publications montrent que l'encapsulation passive des radionucléides ne convient pas pour une application clinique en RIT. D'une part, l'efficacité d'encapsulation est très faible (< 30 % pour des MLV, < 5 % pour des LUV et encore moins pour les SUV), ce qui impose l'utilisation de très fortes activités pour obtenir des liposomes ayant une activité spécifique suffisante pour la RIT. D'autre part, il faut refaire une préparation de liposomes pour chaque expérience, multipliant l'exposition du manipulateur aux rayonnements ionisants et limitant la caractérisation des liposomes (Ahkong *et al.* 1992, Oku *et al.* 1993).

I.2. Marquage de liposomes pré-formés

Nous avons donc choisi d'exploiter d'autres techniques de marquage, nettement plus attractives, qui présentent l'avantage de pouvoir être mises en œuvre sur des liposomes pré-formés. La première méthode consiste à marquer la paroi des vésicules, soit directement, soit par l'intermédiaire d'un agent chélatant, alors que la deuxième vise à marquer l'espace aqueux interne par encapsulation active de radionucléides.

Le **marquage direct de la paroi** de liposomes pré-formés a été envisagé par différents auteurs. Cette méthode a été largement utilisée notamment pour radiomarquer les liposomes au ^{99m}Tc en présence d'un agent réducteur comme le chlorure stanneux. Le ^{99m}Tc réduit vient alors se fixer sur la partie extérieure de la membrane liposomale, mais le rendement de marquage est faible et cette liaison est fragile. De nombreuses études ont montré l'instabilité de ces liposomes radiomarqués *in vivo* due à des échanges lipidiques avec les protéines plasmatiques (*cf chap.I § II.4.1*). Le ^{99m}Tc s'accumule alors dans la thyroïde, les reins et l'estomac (Ahkong *et al.* 1992, Cao *et al.* 1998). Alafandy *et al.* (1996) ont ensuite proposé une

méthode un peu dérivée, en incorporant des complexes de dioxinate d'étain (II) dans la bicouche des liposomes, avant de les incuber en présence de ^{99m}Tc . Cette méthode, loin d'être complètement satisfaisante, nécessite entre autres de nombreux lavages pour éliminer le pertechnétate libre.

Shimura *et al.* (2002) ont proposé de radiomarquer la paroi des liposomes à l'iode-125 en reprenant la technique de Shroit *et al.* décrite précédemment. Le réactif de Bolton-Hunter est couplé en premier à la DPPE et le marquage est réalisé après formation des liposomes par la méthode à la Chloramine T. Le rendement de marquage est de 44,8 % mais ni la stabilité, ni l'activité spécifique du marquage, ne sont précisées.

C'est pourquoi nous avons choisi dans notre étude d'explorer plus particulièrement le **radiomarquage indirect de la paroi**, par le biais d'un agent chélatant. En effet, plusieurs publications montrent que le radiomarquage de la paroi est nettement amélioré en incorporant un agent chélatant dans la paroi des liposomes au cours de leur préparation. Généralement, ces agents chélatants, comme le DTPA ou le HYNIC (hydroxysuccinimidyl-hydrazinonicotinamide) sont couplés à un phospholipide membranaire, comme la DMPE (Hnatowitch *et al.* 1981, Grant *et al.* 1988, Ahkong *et al.* 1992). Ainsi le ^{99m}Tc peut être fixé à la paroi des liposomes contenant 2 % DMPE-DTPA avec des rendements allant de 76 à 91 % et une activité spécifique maximale de 2 MBq/ μmol . On remarque toutefois une instabilité des radiomarquages au ^{99m}Tc avec en plus, une différence entre les stabilités *in vivo* et *in vitro*. Boerman *et al.* (2000) ont proposé l'utilisation de HYNIC couplé à la DSPE. Il permet des marquages au ^{99m}Tc en 15 minutes avec de bons rendements (> 90 %), une meilleure stabilité (48 h dans le sérum à 37°C) et une activité spécifique de 9,5 MBq/ μmol (Laverman *et al.* 2001, Dams *et al.* 1999).

Si ces techniques sont satisfaisantes pour l'imagerie, la thérapie requiert l'activité spécifique la plus élevée possible. Ce travail de thèse

montre la possibilité de réaliser le radiomarquage à l'indium-111 de liposomes présentant un agent chélatant à leur surface avec des activités spécifiques plus importantes que celles publiées jusqu'à présent. Les liposomes DMPC/Chol/DMPE-DTPA 1 % ont pu être marqué efficacement (taux de marquage > 75 %) jusqu'à 44 MBq/μmol de lipides. La réaction de couplage de l'agent chélatant (DTPA-DA) avec la DMPE s'effectue facilement et donne un rendement de 80 %. Le DMPE-DTPA a ensuite été inclus dans les liposomes à raison de 1, 3 ou 5 % molaire. Dans les trois cas, les taux de marquage sont satisfaisants (> 80 %) à partir de 10 équivalents de DMPE-DTPA par rapport à la quantité d'¹¹¹In. On pourrait supposer améliorer encore les marquages en augmentant la proportion de DMPE-DTPA à plus de 5 mol % de la composition lipidique, cependant, les limites semblent rapidement atteintes car l'apport de charges négatives par l'agent chélatant pourrait favoriser l'élimination hépatique des liposomes (Senior *et al.* 1991, Patel 1992).

Le radiomarquage de la paroi lipidique avec l'¹¹¹In nous a permis d'obtenir une activité spécifique relativement élevée. Il présente également plusieurs caractéristiques intéressantes : facilité de mise en œuvre, absence de produit coûteux, possibilité d'un marquage extemporané, stabilité *in vitro* avec un taux de marquage maintenu à plus de 90 % après 24 h dans du sérum humain à 37°C. De plus, l'indium-111 est un bon modèle pour l'utilisation de l'yttrium-90 et le DTPA est lui est bon complexant pour le cuivre-67. Avec cette méthode, il sera donc possible d'envisager des "variantes" en utilisant ces deux radionucléides, dont on ne peut pas disposer aussi facilement que ¹¹¹In, ainsi que d'autres agents chélatants comme le DOTA ou le CHXA"DTPA.

La deuxième voie explorée concerne une méthode de radiomarquage plus récente, qui consiste à incorporer le radionucléide dans des liposomes pré-formés, par **encapsulation active** (*cf chap.I § II.3.2*). Pour traverser la bicouche lipidique le radionucléide doit être sous forme lipophile ou couplé à un agent lipophile. Une fois dans la phase aqueuse, il est possible de le faire réagir avec une molécule encapsulée qui l'empêchera de ressortir du liposome.

Hwang *et al.* (1982) ont montré que l'indium-111 pouvait traverser la bicouche sous forme de complexe lipophile d'oxinate d'indium ou de complexe avec l'acétylacétone (Beaumier *et al.* 1982). L'encapsulation préalable à l'intérieur des liposomes d'un chélatant hydrophile comme la déféroxamine ou l'acide nitrilotriacétique permet de capturer irréversiblement le radionucléide. Le taux d'encapsulation atteint 50 % mais l'activité spécifique est généralement très faible (< 0,1 MBq/μmol de lipides) (Woodle 1993). Une technique voisine utilise en plus un ionophore (A23187) inclus dans la membrane lipidique et qui permet le passage de l'indium-111 à l'intérieur des liposomes sous forme $^{111}\text{In}^{3+}$. On obtient ainsi une activité spécifique pouvant atteindre 8 MBq/μmol (Proffit 1983) mais cette technique présente l'inconvénient de devoir chauffer les liposomes pour obtenir de bons rendements de marquage. Cette méthode a aussi été utilisée avec de l'yttrium-90 sur des liposomes chargés de DTPA (Utkhede *et al.* 2003). Avec cette technique, les taux d'encapsulation peuvent atteindre 95 % et une activité spécifique de 2,8 MBq/μmol de lipides.

Une approche similaire est proposée par Phillips *et al.* (1992 et 1999) pour radiomarquer des liposomes pré-formés avec du $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Cette méthode est basée sur le principe que l'on utilise pour marquer les leucocytes. Elle utilise un chélatant lipophile du $^{99\text{m}}\text{Tc}$, l'*hexaméthylpropylène-amine-oxime* ou HMPAO (Ceretek[®]) lui permettant, après incubation avec des liposomes pré-formés et contenant du glutathion, de s'accumuler et de rester dans la phase aqueuse. Pour cela, le glutathion

complexe l'HMPAO - ^{99m}Tc en un composé hydrophile qui sera retenu à l'intérieur des liposomes. Cette méthode permet d'obtenir des rendements de marquage de 85 %, une bonne stabilité *in vivo* des liposomes mais une activité spécifique de seulement 0,7 MBq/ μmol . Suresh et Cao (1998) ont utilisé un agent d'imagerie hépato-biliaire, le DISIDA (*acide diisopropyliminodiacétique*) pour réaliser le même genre de marquage. Ces liposomes ont largement été utilisés comme agents diagnostiques en imagerie pour la détection des foyers infectieux, inflammatoires, tumoraux, en lymphoscintigraphie et pour mesurer le volume sanguin (Phillips et Goins 1995, Phillips *et al.* 1999, Boerman *et al.* 2000, Andreopoulos *et al.* 2002).

Les différents radiomarquages effectués jusqu'à présent dans le but d'utiliser les liposomes pour une application thérapeutique ont été réalisés par encapsulation active des radionucléides à l'aide d'un gradient transmembranaire. Bao *et al.* 2003 ont utilisé cette technique avec des liposomes contenant de la cystéine ou du sulfate d'ammonium pour encapsuler efficacement des complexes lipophiles du rhénium. Une fois dans l'espace aqueux dont le pH est plus faible qu'à l'extérieur, ces complexes s'ionisent et deviennent hydrophiles. Grâce à ce système, ils décrivent une bonne stabilité de marquage (89 % après 24 h dans 50 % en sérum de veau fœtal à 37°C et 76 % après 96 h). Ils obtiennent des taux d'encapsulation compris entre 53 et 81 % et une activité de 1,8 GBq (50 mCi) pour 50 mg de DSPC, ce qui correspond dans les unités que nous avons employées jusqu'à présent à 37 MBq/ μmol de lipides.

C'est la plus forte activité spécifique décrite dans la littérature et elle est proche de celle que nous avons obtenue en optimisant le marquage en surface des liposomes (44 MBq/ μmol de lipides). Cette activité correspond au minimum de ce qui serait nécessaire pour envisager une utilisation thérapeutique.

Nous avons donc cherché là encore à optimiser les méthodes de marquages pour réussir à augmenter cette activité spécifique.

Nous avons d'abord tenté d'employer une technique d'encapsulation active à l'aide d'un gradient de pH comme cela se pratique pour diverses substances dont les anthracyclines, en encapsulant soit un tampon acide, soit un tampon basique (Mayer *et al.* 1986, Madden *et al.* 1990, Cullis *et al.* 1997, Gabizon *et al.* 1998, Hwang *et al.* 1999). L'étude a été menée avec un acide faible (*acide 3-(4-hydroxyphényl)-propanoïque*, HPPA) en partant du principe que dans un milieu de pH adapté, une base faible ou un acide faible sous sa forme non ionisée mis en présence de liposomes diffuse à travers les membranes. Si le pH du milieu préalablement encapsulé a été correctement choisi, la molécule s'ionise et, ne pouvant ressortir, s'accumule dans ce milieu (Barbet *et al.* 1984, Clerc *et al.* 1995). Les résultats n'ont pas été très encourageants. Effectivement, même si les taux d'encapsulation ont atteint 69 % avec un gradient d'ions acétates, ils correspondent à une quantité très faible de produit (7,6 nmol d'HPPA/ μ mol de lipides). De plus, nous avons souligné ensuite la fuite très rapide de l'acide hors des liposomes (80 % après 1 h en tampon à 37°C).

Compte tenu de ces résultats, nous avons cherché des substances suffisamment lipophiles pour traverser la bicouche, qui puissent être radiomarquées facilement et encapsulées de façon stable à l'intérieur des liposomes.

L'originalité de ce travail réside dans le fait d'avoir utilisé des liposomes contenant de fortes concentrations de lysine ou d'arginine pouvant réagir avec des esters activés radio-iodés dans la phase aqueuse des liposomes, dans le but de limiter la fuite des molécules encapsulées. Après plusieurs tentatives, nous avons choisi le réactif de Bolton-Hunter. C'est un ester activé commercial (ester de *N-Hydroxysuccinimide*), suffisamment lipophile pour traverser la bicouche lipidique et qui est facile à radiomarquer avec de l'iode. Le fait de savoir coupler deux atomes d'iode par molécule de BH (réactif diiodé) peut permettre d'augmenter l'activité spécifique du réactif. De plus, la réaction de cet ester activé avec l'arginine présente

l'avantage de former une espèce chimique chargée positivement, qui reste stockée dans la phase aqueuse des liposomes, indépendamment du gradient du pH.

Nous avons tout d'abord essayé d'optimiser les quantités de réactif (^{125}I -BH) que l'on pouvait encapsuler dans les liposomes. Pour cela, nous avons testé l'influence des conditions d'incubation, comme le temps ou la température. Comme nous n'avons pas pu montrer de réelle influence de la température, toutes les manipulations ont été réalisées à 37°C, après un temps d'incubation optimal de 30 minutes. Ensuite, l'influence de la concentration lipidique et de la formulation des liposomes sur le taux d'encapsulation ont été testées. Nous avons pu remarquer que les taux d'encapsulation étaient tout à fait proportionnels à la concentration en lipides, ce qui nous laisse la possibilité de préparer des solutions de liposomes beaucoup plus concentrées ($> 20 \mu\text{mol/ml}$) en vue d'augmenter d'autant les quantités encapsulées. L'étude a été réalisée parallèlement avec des liposomes pégylés pour observer l'influence du PEG sur l'efficacité du radiomarquage. Les tests d'encapsulation et de stabilité ont donc été réalisés avec des liposomes conventionnels, composés de phospholipides naturels ou synthétiques et d'un tiers de cholestérol, mais aussi après addition de DMPE-PEG2000 dans la formulation. Nous avons pu constater que la pégylation n'altérait pas la stabilité des liposomes. De plus, les quantités de réactif encapsulées sont rigoureusement les mêmes pour les liposomes pégylés que pour les liposomes conventionnels.

Ainsi, nous avons pu encapsuler le réactif de BH radio-iodé, avec des taux de $62 \pm 4 \%$, $56 \text{ nmol}/\mu\text{mol}$ de lipides. Le relargage de la radioactivité est très faible et nous avons pu garder les liposomes marqués au moins 6 jours à 4°C. Les stabilités sériques à 37°C sont de 50 % à 24 h quelque soit la formulation des liposomes, ce qui permet leur utilisation *in vivo*. Ce travail a été réalisé avec de faibles activités d'iode-125, mais le marquage préliminaire avec de fortes activités d'iode-131 a montré que les

résultats étaient comparables entre eux. Avec cette méthode, on peut donc encapsuler environ 50 nmol de réactif dont l'activité spécifique est de 55,5 MBq/nmol (soit 1,5 mCi/nmol de réactif). Il serait donc possible de radiomarquer 1 μ mol de liposomes avec 2,8 GBq (soit 75 mCi) d'iode-131. Ce résultat est nettement supérieur à tout ce qui est décrit dans la littérature jusqu'à présent (Proffitt *et al.* 1983, Phillips *et al.* 1992, Utkhede *et al.* 1994, Bao *et al.* 2003). Par contre, ces radiomarquages à haute activité ne sont pas simples à mettre en œuvre bien qu'ils soient, malgré tout, réalisables en radiopharmacie.

Pour conclure sur le radiomarquage des liposomes, nous avons pu, avec cette méthode originale d'encapsulation active, valider une technique intéressante pour plusieurs raisons :

- L'utilisation de liposomes pré-formés dont la conservation est de plusieurs mois à 4°C.
- L'obtention de bons rendements de marquage (> 60 %). En effet, ils sont le plus souvent compris entre 20 et 35 % pour les techniques de marquage par encapsulation active (Lasic 1998).
- La technique est simple, rapide et adaptable à tous les types de liposomes.
- Elle offre une possibilité de radiomarquer les liposomes avec différents isotopes de l'iode, ce qui a été peu décrit jusqu'à présent.
- Le marquage est stable *in vitro* et comme nous en parlerons après, également *in vivo* (même en présence de PEG2000). Les liposomes radiomarqués peuvent être conservés plus de 6 jours en tampon à 4°C.
- L'activité spécifique obtenue avec cette technique est importante et permet d'envisager une application thérapeutique en RIT.

Nous avons atteint un objectif mais il reste toutefois certains points à améliorer. Il faut par exemple essayer de réduire le relargage de la radioactivité quand les liposomes sont incubés dans le sérum à 37°C.

Certains auteurs décrivent en effet des stabilités sériques supérieures aux nôtres, de l'ordre de 80 % à 96 h (Bao *et al.* 2003). Il est également nécessaire d'évaluer la stabilité des liposomes chargés avec de fortes activités d'iode-131. Afin d'étudier la résistance de la paroi des liposomes aux rayonnements ionisants, nous avons déjà réalisé un test préliminaire en utilisant des liposomes chargés avec une enzyme, la peroxydase de Raiford, en présence d'activités croissantes de samarium-153 ou d'iode-131 (18,5 à 1500 MBq/ μ mol de lipides). Les résultats ont montré que la membrane des liposomes n'était pas altérée entre 5 et 24 h, ceci sur une large gamme d'activité volumique (0,2 à 14,8 MBq/ml). Au delà de 24 h, l'activité peroxydase a été altérée, dans les conditions utilisées, et on ne peut pas affirmer que l'intégrité des membranes liposomales soit conservée. Ces tests doivent donc être repris pour évaluer sur une plus longue période l'éventuelle radiolyse de liposomes chargés jusqu'à 2,8 GBq d'iode-131.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la stabilité de ces radiomarquages *in vivo* et à la capacité de nos liposomes de cibler les cellules tumorales.

II. LE CIBLAGE DES LIPOSOMES

II.1. Ciblage tumoral passif

Le comportement *in vivo* des liposomes n'a été envisagé qu'au travers de la voie parentérale. En effet, cette voie a fait l'objet de nombreux travaux, bien que le devenir des liposomes ait également été exploré pour d'autres voies d'administration. Pour pouvoir expliquer les résultats que nous avons obtenus, il faut d'abord comprendre le devenir *in vivo* des liposomes après injection I.V. et connaître les facteurs qui peuvent modifier ce devenir.

Or, la compréhension des mécanismes d'élimination et de capture des liposomes par les tissus cibles repose sur deux constatations :

- Après introduction dans le torrent circulatoire, le devenir des liposomes est intimement lié à leurs caractéristiques physiques (taille, formulation, charge...) et aux interactions qui se produisent à leur surface. Nous développerons donc ces différentes caractéristiques dans un premier temps.

- Les liposomes sont des nanoparticules et ne pourront s'échapper du compartiment sanguin que dans la mesure où les parois endothéliales le permettent (*cf chap.I § II.6*). Un ciblage tumoral passif est possible pour les liposomes, les Ac et les macromolécules en général, du fait principalement de l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux tumoraux grâce à une membrane basale discontinue et de larges espaces très irréguliers entre les cellules endothéliales. Ce phénomène est observé dans la mesure où les liposomes circulent suffisamment longtemps. Nous discuterons de cette particularité dans un second temps avec les études de pharmacocinétique et de biodistribution.

II.1.1. Influence de la structure des liposomes

Tout d'abord, le choix des formulations a été établi en fonctions de différents critères mentionnés dans des travaux déjà publiés. D'après Forssen (1997), plusieurs paramètres concernant la composition des liposomes sont indispensables à prendre en compte pour une accumulation significative au niveau des tumeurs :

- Tout d'abord il préconise une **température de transition de phase (T_m)** des phospholipides supérieure à la température physiologique de 37°C. Nous avons testé différentes formulations *in vitro* et *in vivo*. Le remplacement de l'EPC par des phospholipides synthétiques (DMPC ou DSPC), dont la T_m est plus élevée, a effectivement montré une amélioration de la stabilité des radiomarquages *in vitro*. Nous avons donc utilisé ces derniers pour les études chez l'animal. Nous pensions au départ que le remplacement du DMPC (T_m= 23°C) par le DSPC (T_m= 55°C) pouvait améliorer les temps de circulation des liposomes, en rigidifiant leur paroi à 37°C. Les résultats ont montré que les taux circulants pour les deux formulations de liposomes étaient pratiquement identiques, à 1 h comme à 4 h. Ceci peut s'expliquer par la présence du cholestérol (environ 30 % de la composition molaire) qui diminue fortement les effets de transition de phase. *In vivo*, la présence de cholestérol est cependant indispensable pour minimiser la perméabilité membranaire et les phénomènes d'échanges lipidiques avec les protéines plasmatiques (Bedu-Addo et Huang 1995). Au final, nous avons toujours veillé à la présence d'au moins 30 % de cholestérol dans les formulations lipidiques, et nous avons très vite abandonné l'EPC pour les phospholipides synthétiques (DMPC et DSPC).

- Les liposomes doivent également avoir une **charge** de surface neutre. Effectivement, il est décrit que les liposomes composés de lipides chargés à pH 7,4, positivement (stéarylamine) et surtout négativement

(phosphatidylsérine, phosphatidylglycérol, acide phosphatidique...) peuvent être plus rapidement éliminés de la circulation sanguine (Allen *et al.* 1995, Scherphokf *et al.* 1997, Levchenko *et al.* 2002). Une des raisons évoquée est que ces phospholipides chargés interagissent fortement avec certaines opsonines comme le facteur C3 du complément (Gabizon et Papahadjopoulos 1991, Liu 1997), ce qui peut entraîner une accélération de leur clairance plasmatique. La présence de PEG peut limiter ce phénomène mais principalement avec des chaînes supérieures à 5000 et avec des phospholipides chargés positivement (Levchenko *et al.* 2002). Dans notre étude, l'utilisation du DTPA pour le marquage de la paroi apporte inévitablement des charges négatives dans la membrane par ailleurs constituée de lipides neutres. Comme nous le verrons plus loin, l'influence de cette particularité sur les clairances sanguines de nos liposomes, mériterait d'être approfondie.

- La clairance des liposomes circulants apparaît également dépendante de leur **taille**. En effet, il a été largement décrit que les gros liposomes étaient éliminés beaucoup plus rapidement que les petits et qu'ils étaient également plus sensibles aux phénomènes d'opsonisation (Senior *et al.* 1991, Scherphof *et al.* 1997). De plus, de façon schématique, on peut considérer que les liposomes multilamellaires (MLV) et les gros liposomes unilamellaires (LUV), dont le diamètre est nettement supérieur à 200 nm, ne vont pas pouvoir bénéficier d'une distribution extravasculaire. Au contraire, les LUV de petite taille et les SUV (< 100 nm) vont pouvoir franchir les parois des capillaires et particulièrement au niveau des capillaires fenestrés et sinusoidaux des régions tumorales (*cf chap.I § II.4.3*). Nous avons donc choisi de préparer les liposomes par extrusion sur des membranes de polycarbonate de 100 nm. Comme nous l'avons vu, la présence des chaînes de PEG augmente sensiblement le diamètre des liposomes mais ils restent dans une fourchette de taille acceptable.

- Enfin, plusieurs auteurs ont montré l'augmentation de l'accessibilité tumorale aux liposomes de petite taille et particulièrement aux **liposomes furtifs** (Allen *et al.* 1995, Mastrobattista *et al.* 1999). Seuls les liposomes ayant un temps de circulation prolongé ont une chance d'atteindre efficacement leur cible tumorale, d'où la nécessité de pégyliser les liposomes pour une application *in vivo*. Au préalable, nous avons montré que la présence de PEG n'influe pas sur l'efficacité du radiomarquage des liposomes par encapsulation du ^{125}I -BH, ni sur leur stabilité.

La pégylation des liposomes (concentration, masse molaire) est très dépendante de la composition phospholipidique. Nous avons choisi le PEG 2000 car les travaux de Maruyama *et al.* (1992, 1995 et 1997) ont montré que l'augmentation de la masse molaire du PEG à 5000 et 12000 entraîne une destabilisation des vésicules et la barrière stérique obtenue entrave fortement l'accessibilité d'un Ac pour un haptène couplé sur la paroi. A l'inverse, les PEG 750 ou 1000 ne semblent pas suffisants pour améliorer la furtivité de liposomes composés de DSPC/Chol (*cf chap.I § II.4.4*). La concentration de PEG des liposomes que nous avons injecté chez la souris est de 5 mol %. Elle pourrait éventuellement être augmentée jusqu'à 10 % de la composition lipidique pour essayer d'améliorer leur furtivité. Au delà de ce pourcentage, quelque soit la longueur des chaînes, il a été montré qu'il n'y a plus d'effet de la concentration de PEG sur la circulation sanguine (Maruyama *et al.* 1992).

II.1.2. Intervention du complément

De nombreux auteurs décrivent un temps de circulation des liposomes pégylés de plusieurs heures, mais il a été décrit quelques cas où l'on observait une importante quantité de liposomes pégylés captés dans le foie et la rate après seulement 2 ou 3 h (Devissaguet et Puisieux 1993, Allen *et al.* 1995). La question est : Pourquoi les liposomes pégylés sont-ils captés

par les macrophages du foie et de la rate, malgré la barrière protectrice qu'offrent les chaînes de PEG vis-à-vis des protéines plasmatiques ?

En fait, l'intervention des protéines du complément peut apporter un élément de réponse. L'activation du complément, entraînant l'opsonisation des liposomes, serait due au dépôt du facteur C3b à la surface des vésicules. Mais il apparaît que la pégylation ne supprime pas forcément ce phénomène. Pourtant des PEG de haut poids moléculaire seraient plus efficaces, même à de faibles concentrations, pour diminuer l'activation du complément. Cet effet serait expliqué par la conformation que prennent les chaînes de polymère à la surface des liposomes (en "brosse" ou en "boucle") et qui serait en mesure ou non d'empêcher le dépôt des C3 convertases, enzymes permettant l'activation et la cascade du complément (Passirani et Benoît 2005). Nous n'avons pas pu mettre en évidence l'influence de la pégylation des liposomes sur l'activation du complément par le Test du CH50. Le fait que nos liposomes, pégylés ou non, n'activent pas le complément *in vitro* est plutôt positif mais ne permet pas pour autant de définir leur devenir *in vivo*. Des tests complémentaires permettraient peut-être de pouvoir corrélérer ces résultats avec les études *in vitro*.

Plusieurs auteurs ont montré que d'autres facteurs étaient à prendre en compte, comme la concentration et la taille des liposomes, ce qui a été fait dans nos tests, mais aussi la présence de cholestérol, leur charge, la longueur et la saturation des chaînes d'acides gras des phospholipides...(Bradley *et al.* 1998). Chonn *et al.* (1991) ont démontré l'importance de la charge des liposomes sur l'activation du complément. Ils ont montré que les liposomes chargés négativement activaient principalement la voie classique alors que les liposomes chargés positivement activaient la voie alterne. Les liposomes neutres sont faiblement activateurs.

De toute évidence, une combinaison de plusieurs mécanismes intervient dans le prolongement de la circulation des liposomes *in vivo*.

L'activation ou la non activation des protéines du complément n'est sûrement pas le seul facteur responsable de l'élimination des liposomes par les macrophages. Un exemple intéressant est celui du Caelyx[®] (ou Doxil[®]), spécialité de liposomes pégylés dans lesquels a été encapsulée de la doxorubicine. Cette formulation a une cinétique sanguine chez l'homme, qui suit un modèle bicompartimental avec des demi-vies de distribution et d'élimination respectivement de 84 minutes et 46 h. Et pourtant, ces liposomes activent très fortement et très rapidement le complément. Price *et al.* (2001) suggèrent qu'un autre mécanisme que celui de répulsion des protéines plasmatiques est à l'origine de la circulation prolongée des liposomes pégylés. Selon eux, les chaînes de PEG interviendraient même directement sur la répulsion stérique entre liposomes et macrophages. Une hypothèse assez controversée est que les macrophages seraient donc en mesure d'internaliser rapidement des liposomes pégylés par des mécanismes indépendants de l'opsonisation (Moghimi et Szebeni, 2003).

L'intervention des macrophages dans l'élimination des liposomes pégylés est pourtant confirmée par de nombreux auteurs. Laverman *et al.* (2000) l'ont vérifié en constatant que l'injection de faibles doses de liposomes pégylés à des lapins déficients en macrophages n'était pas suivie de l'élimination rapide observée chez les lapins sains.

Toutefois, il n'y a pas de consensus quant au mécanisme d'élimination des liposomes pégylés par le SPM. Plusieurs auteurs ont suggéré la présence de plusieurs protéines du sang pouvant agir comme des opsonines (Oja *et al.* 1996). D'après la littérature ce pool d'opsonines serait saturable et limité dans le cas des liposomes pégylés. Dans cette hypothèse, de fortes doses de lipides correspondraient à de faibles quantités de protéines couplées par liposome et à une prolongation de leur circulation. Ce qui sous-entend que la "saturation" du SPM correspondrait plus à un

épuisement du stock d'opsonines sanguines qu'à une réelle saturation des macrophages. Certains auteurs l'ont vérifié avec des injections répétées de liposomes chez un même animal. La seconde injection (à faibles doses de lipides) montre une biodistribution "normale", après l'utilisation du pool de protéines plasmatiques due à la première injection (fortes doses de lipides) au cours de laquelle les liposomes sont rapidement éliminés (Laverman *et al.* 2000). Il apparaît donc une notion de dose de lipides injectés dont nous n'avons pas pris encore connaissance dans notre étude préliminaire chez l'animal. Comme nous allons le voir, elle mérite pourtant d'être prise en compte.

Des études ont montré qu'après injection de faibles doses (20 nmol/kg de poids), des liposomes couplés au PEG2000 étaient rapidement éliminés de la circulation sanguine (Laverman *et al.* 2000). En effet, nous avons vu que l'élimination des liposomes par les macrophages semble étroitement liée à une quantité disponible d'opsonines plasmatiques. L'augmentation de la durée de circulation de fortes doses de liposomes pégylés dépendrait directement de l'épuisement de ce pool d'opsonines.

Pourtant, certains auteurs ont montré que le temps de circulation des liposomes pégylés était totalement indépendant de la dose injectée (Woodle 1995). Mais cette conclusion est le fruit de plusieurs études réalisées dans le but de délivrer une dose thérapeutique par l'intermédiaire des liposomes. En général, ces applications sont envisagées pour des doses de lipides déjà élevées, de l'ordre de 10 à 400 μmol de lipides/kg (Allen et Hansen 1991). Au contraire, pour des applications en médecine nucléaire, les liposomes radiomarqués utilisés comme traceurs en imagerie ont été injectés à des doses très faibles, d'approximativement 0,5 μmol /kg (Boerman *et al.* 2000). Notre étude se situe dans un intervalle de doses intermédiaires (2,5 à 20 μmol /kg). Toutefois, le schéma proposé dans notre étude peut être optimisé car il est tout à fait possible que des doses plus importantes puissent permettre aux liposomes d'échapper à la phagocytose et de confirmer le caractère saturable de leur élimination plasmatique.

Un autre paramètre, que nous n'avons pas testé dans notre étude, concerne le renouvellement des injections de liposomes chez un même animal. Récemment quelques auteurs ont 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. En fait, la clairance plasmatique des liposomes lors de la deuxième injection peut être fortement diminuée ou au contraire, très significativement augmentée, en fonction des délais séparant les deux injections (Dams *et al.* 2000, Laverman *et al.* 2001, Ishida *et al.* 2002, Bendas *et al.* 2003). En effet, une accélération de l'élimination plasmatique des liposomes à la deuxième injection serait observée après un intervalle de temps, suivant la première injection, compris entre 7 et 21 jours.

II.1.3. Paramètres pharmacocinétiques

L'étude de la pharmacocinétique des liposomes radiomarqués nous a permis d'évaluer la demi-vie et la clairance des liposomes conventionnels et pégylés. Elle a également permis de mettre en évidence les différents profils pharmacocinétiques des liposomes et du traceur, le ^{125}I -BH.

La demi-vie correspondant à la phase de distribution ($T_{1/2\alpha}$) dans l'organisme peut être largement affectée en ce qui concerne les liposomes, et particulièrement les liposomes conventionnels de 100 nm, par leur capture par les macrophages du SPM. Allen *et al.* (1991) ont montré que les liposomes pégylés d'environ 100 nm injectés en I.V. à faible dose (environ 1 μmol de lipides/souris) avaient une clairance suivant une cinétique du premier ordre (log-linéaire) alors que les liposomes conventionnels suivaient une cinétique saturable et non linéaire. Nous avons pu confirmer cette observation et constater que nos deux formulations de liposomes avaient des temps de circulation dans l'organisme différents ($T_{1/2} = 1,5$ h pour les conventionnels et $T_{1/2} = 2,9$ h pour les pégylés). Leurs volumes de

distribution et leurs clairances sont respectivement de 2,8 ml et 1 ml/min pour les liposomes conventionnels *versus* 1,8 ml et 0,4 ml/min pour les pégylés.

Nous avons comparé ces paramètres pharmacocinétiques à ceux de la littérature. Il y est décrit que théoriquement, après une injection I.V., les liposomes sont rapidement éliminés du sang par les macrophages du SPM. Nous allons voir que cette notion de rapidité est très différente selon les différentes études réalisées et surtout, selon les caractéristiques des liposomes. Ainsi, les liposomes non pégylés peuvent être éliminés en quelques minutes, pour les MLV ou les liposomes dont la membrane est fluide (EPC, phospholipides insaturés et/ou T_m basse), et jusqu'à quelques heures pour les SUV ou des LUV de petite taille avec une membrane très rigide. C'est le cas des liposomes composés de DSPC/Chol qui peuvent circuler jusqu'à 12 h chez la souris (Senior *et al.* 1991). Les liposomes pégylés peuvent eux circuler plusieurs heures, de 2 à 24 h chez le rat ou la souris et jusqu'à 45 h chez l'homme (Allen *et al.* 1995, Gabizon 1995). On s'aperçoit également que les $T_{1/2}$ α ou β , ainsi que les clairances, sont rarement décrites dans toutes les études concernant la biodistribution des liposomes.

Si la demi-vie de nos liposomes conventionnels peut correspondre aux résultats de la littérature, il ressort que nos liposomes pégylés, eux, sont éliminés un peu trop rapidement de la circulation sanguine. Nous avons néanmoins peu d'explications à apporter à ce manque de furtivité. La charge négative apportée par le phospholipide chélatant aurait pu expliquer l'augmentation de la clairance des liposomes pégylés, mais cette hypothèse n'est pas recevable vu que les liposomes conventionnels étaient eux aussi composés de 1 mol % de DMPE-DTPA. Nous nous sommes aussi intéressés à la dose de lipides injectés. En effet, il a été montré que pour de faibles doses de lipides ($< 0,5 \mu\text{mol/souris}$), la dose injectée influencerait directement sur l'élimination des liposomes. Par exemple, Oja *et al* (1996) ont montré

que la demi-vie plasmatique de liposomes DSPC/Chol de 100 nm passait de 6 h à moins d' 1 h pour des doses injectées égales respectivement à 3 μmol et 0,3 μmol de lipides/souris (20 g). Pour des doses plus importantes (de 10 à 30 μmol /souris), la clairance plasmatique et les taux circulants à 24 h semblent constants (Allen *et al.* 1995, Laverman *et al.* 2000). Notre étude de pharmacocinétique a été réalisée après injection de 500 à 600 nmol de lipides/souris. La dose de lipides a été largement augmentée par rapport à l'étude préliminaire dans le but de saturer le système SPM. Néanmoins, elle doit être encore insuffisante pour obtenir un temps de circulation complètement indépendant de la dose injectée.

Cette étude a cependant confirmé les différences de modèles pharmacocinétiques décrites dans la littérature pour nos deux populations de liposomes. Nous avons également pu mettre en évidence un doublement du temps de circulation des liposomes pégylés par rapport aux conventionnels. Nous avons donc choisi de réaliser une étude de biodistribution chez la souris avec des liposomes pégylés (5 mol % de PEG2000) marqués soit à l'iode-125, soit à l'indium-111.

II.1.4. Biodistribution des liposomes radiomarqués

L'étude de biodistribution nous a permis d'évaluer la stabilité des radiomarquages *in vivo* et de comprendre les modes d'élimination des deux types de traceur (DMPE-DTPA- ^{111}In ou Arg- ^{125}I -BH). Tout d'abord, la similitude des taux circulants pour les liposomes radiomarqués avec ces deux traceurs a confirmé qu'il n'y avait pas de fuite exagérée du réactif iodé encapsulé. Les cinétiques plasmatiques sont en effet tout à fait comparables entre les deux traceurs, ce qui nous a permis de confirmer que les radiomarquages, aussi bien à l'indium-111 qu'à l'iode-125, sont stables non seulement *in vitro*, mais aussi *in vivo*. Les deux types de traceur seront donc

totale­ment dépendant du devenir des liposomes et leur élimination suit celle des vésicules jusqu'à leur destruction par le SPM. C'est à ce moment que les modes d'élimination de ces deux traceurs diffèrent. Une fois captés dans le foie et la rate, les liposomes sont détruits et l'indium-111 couplé au phospholipide chélatant reste séquestré au niveau hépatique principalement (40 % DI/g à 4h). Le réactif de BH couplé à l'arginine est lui rapidement éliminé au niveau rénal. On retrouve, en effet, 25 % de la DI dans les urines à 1 h et 52 % à 4 h. Ces résultats concordent avec ceux de l'étude pharmacocinétique du réactif seul qui montrent une clairance très rapide du BH couplé à l'arginine ($T_{1/2} = 0,28$ h, $Cl = 5,2$ ml/min). On observe néanmoins une activité ($< 0,8$ % DI/g) fixée aux protéines plasmatiques à partir de la deuxième heure après injection. Ce résultat montre qu'il existe une fixation du réactif iodé aux protéines du sang qui est faible, mais stable dans le temps.

Ce réactif présente cependant l'avantage d'être très vite éliminé, par rapport aux marquages de paroi où les lipides restent séquestrés au niveau hépatique. Cette caractéristique est très intéressante car elle permet d'envisager des marquages à haute activité afin d'obtenir une efficacité sur la cible, tout en s'assurant que la radioactivité sera éliminée très rapidement par les urines, préservant ainsi les tissus sains.

Ces premiers résultats sont essentiels pour passer à l'étape ultérieure qui consistera au préciblage d'une cible tumorale à l'aide d'anticorps bispécifiques et de liposomes furtifs radiomarqués.

II.2. Ciblage tumoral spécifique

Les études de biodistribution des liposomes sont nombreuses et l'utilisation des immunoliposomes a été largement décrite (*cf chap.I § II.4*). Le ciblage tumoral par des AcM radiomarqués est également une technique connue, notamment pour le traitement des lymphomes (*cf chap.I § I.2*). En revanche l'immunociblage de tumeurs par des liposomes radiomarqués reste un domaine peu exploré.

Actuellement, l'utilisation des immunoliposomes pour le ciblage tumoral *in vivo* a été envisagée principalement avec des liposomes chargés de doxorubicine. Nous ne parlerons que de l'administration I.V. des immunoliposomes et pour le ciblage des tumeurs solides, bien que plusieurs études très intéressantes montrent l'efficacité des immunoliposomes pour d'autres voies d'administration, ainsi que pour le ciblage spécifique des cellules tumorales circulantes (lymphomes, myélome multiple, leucémies) (Lopes de Menezes 2000, Levine *et al.* 2000).

Différentes études concernant le ciblage spécifique des tumeurs solides donnent des informations sur la clairance des immunoliposomes *in vivo*. La présence d'une immunoglobuline entière à la surface des liposomes favorise la phagocytose des immunoliposomes par interaction avec les récepteurs Fc présents à la surface de nombreuses cellules du SPM. L'amélioration de leur temps de circulation a été obtenu en pégylant les immunoliposomes et en utilisant des fragments d'AcM (Fab' ou scFv). De plus, pour une meilleure efficacité du ciblage, les fragments d'AcM doivent être couplés en bout de chaîne de PEG (*cf chap.I § II.4.4.3*). La clairance de ces liposomes est aussi dépendante de la quantité d'AcM présente à leur surface (Allen *et al.* 1995, Maruyama *et al.* 1997). Pour de faibles quantités d'AcM (< 50 µg d'IgG/µmol de lipides) les immunoliposomes pégylés présentent la même cinétique d'élimination que les liposomes pégylés, non

immunospécifiques. Au dessus de 100 μg d'AcM/ μmol de lipides, les immunoliposomes pégylés peuvent être éliminés en quelques minutes (60 % à 1 h). Par contre, en remplaçant les IgG par des fragments Fab', les temps de circulation peuvent être multipliés par 6 (Mastrobattista *et al.* 1999).

Ainsi, il a été décrit chez la souris que l'accumulation d'immunoliposomes Fab'-pégylés dirigés contre des cellules tumorales gastriques exprimant l'ACE était deux fois supérieure à celle obtenue avec des l'IgG entière (environ respectivement 10 et 20 % DI/g de tissu). Les résultats obtenus dans les mêmes conditions avec des liposomes simples (sans PEG ni AcM) sont de 7 % DI/g de tumeur (Maruyama *et al.* 1997).

Une amélioration du ciblage tumoral peut donc être apportée avec des immunoliposomes. Mais jusqu'à présent, ces études utilisent des liposomes chargés de doxorubicine avec des techniques d'immunociblage direct (AcM couplé de façon covalente aux liposomes) (Ahmad *et al.* 1993, Park *et al.* 2001).

L'intérêt d'un préciblage avec les liposomes est principalement justifié par la grande difficulté de formulation des immunoliposomes radiomarqués. Il est difficile en effet d'envisager la préparation et radiomarquage des liposomes tout en préservant l'immunoréactivité et la stabilité des AcM couplés à la paroi ou en bout de PEG. Un ciblage en deux étapes permettrait de préparer des liposomes stables, couplés à un haptène ou à de la biotine, que l'on pourra radiomarquer extemporanément; et en parallèle un AcM bispécifique ou un AcM couplé à l'avidine, stable également.

Quelques approches en deux ou trois étapes ont été développées avec des liposomes radiomarqués. Elles utilisent soit le système avidine-biotine, soit des AcM bispécifiques. Le système avidine-biotine utilisé avec des liposomes a donné des résultats intéressants mais des étapes de chasse sont nécessaires car c'est un système de haute affinité. Quelques travaux ont été réalisés *in vitro*, sur des cellules de carcinomes ovariens avec des liposomes biotinylés contenant du rhénium-188, puis chez la souris sur des cellules

humaines de tumeurs gastriques (Maruyama *et al.* 1997, Xiao *et al.* 2002). En 2000, Cao *et al.* ont utilisé 50 µg d'un AcM bispécifique dirigé d'une part contre une lignée de cellules cancéreuses épidermoïdes pulmonaires murines et d'autre part contre la biotine. Une étape de chasse est effectuée avec 50 nmol de gros liposomes MLV (400 nm) biotinylés qui permettent de capter les Ac restant dans la circulation avant d'être éliminés rapidement par les cellules du SPM. Le lendemain de l'injection des Ac et 1 h après l'étape de chasse, des liposomes furtifs marqués au ^{99m}Tc (5 µCi pour 0,1 ml) et biotinylés sont injectés. Les biodistributions 6 h après ont donné un résultat de 3,6 % DI/g de tumeur chez les souris ayant reçu l'Ac *versus* 0,9 pour les souris témoins qui n'ont pas reçu d'Ac. Ce système en trois étapes a donc permis un ciblage tumoral sélectif.

Dans notre étude préliminaire, nous avons réalisé un préciblage tumoral chez la souris à l'aide de liposomes DMPC/Chol/DMPE-DTPA- ^{111}In et d'un AcM bispécifique hMN14 x 734. L'immunoréactivité des liposomes marqués a été vérifiée *in vitro* avec un Ac anti-DTPA- ^{111}In . Les souris ont été xéno greffées en sous-cutané avec une lignée d'adénocarcinome colique humain (LS174T) qui exprime l'ACE. Les valeurs obtenues à 24 h ont donné un % DI/g de tumeur de 1,8 chez les souris ayant reçu l'anticorps *versus* 0,3 pour les souris témoins. Les rapports tumeur/organe confirment également la faisabilité d'un ciblage spécifique. Mais cette étude, réalisée avec des liposomes conventionnels, montre une forte capture des liposomes par le foie et la rate, ce qui est un frein à leur diffusion. En effet, dans l'étude de Cao *et al.* l'utilisation de liposomes pégylés prolonge leur temps de présence dans le sang (22 % DI/g à 6h *versus* 1 % DI/g à 3h dans notre étude). De plus, l'étape de chasse des Ac circulants à l'aide de gros liposomes biotinylés, 1 h avant l'injection des liposomes pégylés marqués, a pu largement améliorer leur cinétique.

Par contre, si l'on compare les résultats en % DI à 6 h au niveau du foie, on observe 19,7 % DI pour Cao *et al.* *versus* 40 % pour nos liposomes

pégylés marqués à l'indium-111 et 2,6 % DI pour ceux marqués à l'iode-125. Au temps 6 h, le réactif ^{125}I -BH a déjà été largement éliminé par voie urinaire. Même si nos liposomes ont rapidement captés par le SPM, le radiomarquage à l'iode-125 avec le ^{125}I -BH présente l'avantage de diminuer fortement l'accumulation hépatique de la radioactivité.

De plus, nous avons pu montrer la faisabilité d'un ciblage tumoral avec des liposomes conventionnels et nos résultats concernant le ciblage sont comparables à ceux obtenus par Cao *et al.* En effet, leur fixation tumorale est améliorée d'un facteur 4 après injection des Ac. Nous avons montré que les % de DI/g de tumeur étaient multipliés par 6,3 chez les souris ayant reçu 100 μg d'Ac par rapport aux souris témoins.

Compte tenu de ces résultats, notre expérience montre la possibilité d'un préciblage à l'aide d'AcM bispécifiques et de liposomes radiomarqués. De plus, la mise au point des radiomarquages a montré la faisabilité d'un marquage à haute activité spécifique. Ce modèle animal sera donc utilisé comme référence mais le préciblage des liposomes radiomarqués reste à optimiser. La cinétique plasmatique des liposomes pégylés peut également être améliorée. Néanmoins, selon le radionucléide véhiculé (énergie et période physique), l'augmentation des temps de circulation des liposomes peut avoir un effet catastrophique sur les cellules saines du sang et des vaisseaux (Kostarelos 2000). La longévité des liposomes radiomarqués dans la circulation devra donc être étroitement corrélée avec le ciblage et l'intérêt d'une élimination rapide du traceur après leur destruction demeure un grand avantage de notre technique de marquage.

Pour finir, afin d'améliorer le préciblage tumoral *in vivo*, de nombreuses perspectives sont à considérer concernant aussi bien le radiomarquage ou la formulation des liposomes que le choix des haptènes et de l'AcM.

III. PERSPECTIVES

En ce qui concerne le radiomarquage des liposomes, nous avons développé une nouvelle méthode, basée sur l'encapsulation active d'un réactif radio-iodé neutre, capable de traverser la bicouche lipidique pour réagir dans la phase aqueuse et former une espèce chargée qui restera piégée. Cette étude a été réalisée avec le réactif de Bolton-Hunter parce qu'il est commercial, suffisamment lipophile et facile à marquer à l'iode avec une bonne activité spécifique. Après injection chez l'animal, il présente l'avantage d'être éliminé très rapidement par voie urinaire. Néanmoins, nous avons constaté qu'une faible quantité de réactif se fixait aux protéines plasmatiques. Il serait peut-être judicieux de remplacer le réactif de BH par un autre ester activé qui ne présenterait pas cet inconvénient.

D'autres esters activés, synthétisés au laboratoire, ont été utilisés pour marquer les liposomes à l'iode-125 et ont donné de bons résultats. Parmi eux, des dérivés stanneux comme le *N-succinimidyl-méta-triméthylstannylbenzoate*, présentent l'intérêt de pouvoir être radiomarqués avec de l'astate-211. Ils pourraient donc être de bons candidats pour remplacer le réactif de BH mais ils n'ont pas encore été testés chez l'animal. Ils peuvent également réagir avec la lysine ou l'arginine préalablement encapsulées dans les liposomes, mais il serait également judicieux de remplacer ces acides aminés coûteux par des dérivés synthétiques.

D'autre part, les radiomarquages à haute activité sont à mettre en place avec de l'iode-131 et comme nous l'avons déjà évoqué, il faudra ensuite tester la résistance de la paroi liposomale à de fortes activités.

Le marquage de la paroi des liposomes peut également être effectué avec d'autres agents chélatants, comme le CHXA-DTPA et le DOTA couplé à un phospholipide membranaire. La synthèse de ces phospholipides modifiés a déjà été réalisée et devrait permettre l'utilisation de différents

radionucléides comme l'yttrium-90, l'astate-211 ou l'iode-131 utilisables en thérapeutique.

En ce qui concerne la formulation des liposomes, une perspective envisageable est de réaliser une pharmacocinétique sanguine avec des liposomes ne contenant pas de DTPA afin de connaître l'influence de l'agent chélatant sur la clairance des liposomes. En parallèle, il faut optimiser la quantité et/ou la longueur des chaînes de PEG pour obtenir une meilleure furtivité de nos liposomes. Il est tout à fait possible d'augmenter la proportion de PEG jusqu'à 10 mol % de la composition lipidique et d'utiliser du PEG5000 à la place du PEG2000. Cette dernière hypothèse est envisageable dans la mesure où le haptène est couplé en partie terminale des chaînes de PEG pour favoriser l'accessibilité de l'AcM. Ce travail fait l'objet d'une thèse de doctorat au sein du laboratoire dont l'aboutissement devrait notamment permettre d'obtenir du PE-PEG-DNP.

Toute modulation d'un ou plusieurs de ces paramètres liés aux caractéristiques des liposomes implique une parfaite maîtrise des techniques de fabrication et de contrôle de ceux-ci. La taille des liposomes et leur stabilité devront être contrôlées avant de réaliser leur radiomarquage.

En ce qui concerne le ciblage des liposomes, il est possible de réaliser des tests *in vitro* sur des lignées cellulaires exprimant l'ACE (LS174T ou TT). Des tests préliminaires ont déjà été réalisés avec des liposomes fluorescents et un AcM bispécifique anti-ACE x anti-DNP (F6 x 265.5). Ils ont permis de mettre en évidence une interaction cellules-AcM bispécifique-liposomes et de réaliser la mise au point de la détection par cytométrie de flux. L'optimisation de cette technique permettrait de mieux connaître les interactions cellulaires *in vitro* (internalisation de l'Ac, coopérativité), et l'utilisation de liposomes radiomarqués permettrait d'étudier la spécificité et l'affinité de l'AcM bispécifique vis-à-vis du haptène et des Ag tumoraux (tests de Scatchard et Lindmo).

En ce qui concerne la pharmacocinétique des liposomes, des améliorations sont à apporter pour obtenir des temps de circulation prolongés. La modification de la formulation des liposomes que nous venons d'évoquer pourrait répondre à ce problème. De plus, une analyse du sérum par HPLC sur une colonne Superdex G200, réalisée à différents temps après l'injection, pourrait confirmer l'intégrité des vésicules et permettre de comprendre pourquoi une faible quantité de ¹²⁵I-BH reste piégé dans la circulation.

Il serait également intéressant de tester l'influence de la dose de lipides injectée, ainsi que la multiplication des injections chez un même animal, sur la clairance plasmatique des liposomes. Enfin, pour améliorer le ciblage, il est envisageable d'injecter une forte quantité de liposomes vides et sans haptène, avant ou pendant l'administration de liposomes radiomarqués, afin de saturer le SPM.

En ce qui concerne l'optimisation de l'immunociblage *in vivo*, il sera nécessaire de choisir un AcM bispécifique de haute spécificité et de définir ses modalités d'administration (dose, délais d'injection) afin d'optimiser l'intensité et la spécificité du ciblage. L'avantage d'une injection en deux étapes comme nous l'avons décrite en RIT avec des AcM, reste à explorer pour les liposomes radiomarqués. Pour ces derniers, la justification d'une approche en deux temps est principalement la difficulté de préparer des immunoliposomes radiomarqués stables. Il est possible néanmoins d'envisager la co-injection des AcM bispécifiques et des liposomes radiomarqués de façon extemporanée.

Enfin, après avoir élucidé point par point les différents problèmes rencontrés, nous pourrons tester l'efficacité sur les tumeurs solides des liposomes furtifs, radiomarqués avec une haute activité spécifique, et vectorisés spécifiquement à l'aide d'AcM bispécifiques.

CONCLUSION

Les liposomes sont des vecteurs de médicaments prometteurs qui offrent de nombreuses perspectives avec des applications thérapeutiques dans des domaines très variés (cancérologie, immunologie, imagerie médicale ou thérapie génique...). Dans le domaine plus particulier des radiopharmaceutiques, des applications essentiellement diagnostiques ont été envisagées. En thérapeutique, l'intérêt des liposomes est qu'ils sont particulièrement bien tolérés et qu'ils peuvent transporter de fortes quantités de principe actif. Cette qualité a été mise à profit pour étudier la faisabilité d'une approche en RIT avec des liposomes radiomarqués et immunovectorisés par l'intermédiaire d'AcM bispécifiques. En effet, l'optimisation du ciblage tumoral en RIT, par des techniques en plusieurs étapes comme l'A.E.S., semble diminuer l'irradiation non spécifique et les liposomes radiomarqués sont des candidats intéressants pour augmenter la dose délivrée à la tumeur.

Ce travail montre qu'il est possible de radiomarquer facilement la paroi des liposomes avec des rendements élevés et une bonne stabilité de marquage par l'intermédiaire d'agents chélatants couplés préalablement aux phospholipides de la membrane liposomale.

Pour augmenter encore l'activité spécifique, les liposomes ont ensuite été marqués par une technique d'encapsulation active. Le radiomarquage de la phase aqueuse des liposomes par l'intermédiaire d'esters activés marqués à l'iode confirme que l'on peut obtenir des activités spécifiques nettement supérieures à celles décrites dans la littérature. De plus, le couplage de ces esters à des fonctions amines pré-encapsulées limite la fuite de la radioactivité hors des liposomes.

Les études menées chez l'animal ont démontré la stabilité des marquages *in vivo* et la faisabilité d'un ciblage tumoral spécifique chez la souris.

Cette étude expérimentale laisse ainsi entrevoir un avenir prometteur pour les liposomes radiomarqués et vectorisés en RIT, et l'optimisation du préciblage *in vivo* des liposomes radiomarqués devrait permettre leur utilisation thérapeutique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Ahkong Q.F, Tilcock C.** Attachment of ^{99m}Tc to lipid vesicles containing the lipophilic chelate dipalmitoylphosphatidylethanolamine-DTTA. *Nuclear Medicine and Biology* 19 (1992) 831-840.
2. **Adler-Moore J.P, Proffitt R.T.** Development, characterization, efficacy and mode of action of Ambisome, an unilamellar liposomal formulation of Amphotericin B. *Journal of Liposome Research* 3 (1993) 429-450.
3. **Ahmad I, Longenecker M, Samuel J, Allen T.M.** Antibody-targeted delivery of doxorubicin entrapped in sterically stabilized liposomes can eradicate lung cancer in mice. *Cancer research* 53 (1993) 1484-1488.
4. **Alafandy M, Goffinet G, Umbrain V, D'Haese J, Camu F, Legros F.** ^{99m}Tc -stannous oxinate as marker of liposome formulations. *Nuclear Medicine and Biology* 23 (1996) 881-887.
5. **Allen T.M, Hansen C.B.** Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. *Biochimica ant Biophysica Acta* 1068 (1991) 133-141.
6. **Allen T.M, Hansen C.B, Lopes de Menezes D.E.** Pharmacokinetics of long-circulating liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews* 16 (1995) 267-284.
7. **Allen T.M, Brandeis E, Hansen C.B, Kao G.Y, Zalipsky S.** A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells. *Biochimica ant Biophysica Acta* 1237 (1995) 99-108.
8. **Allen T.M, Sapra P, Moase E.** Use of the post-insertion method for the formation of ligand-coupled liposomes. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7 (2002) 889-894.
9. **Andresen T.L, Jensen S.S, Jorgensen K.** Advanced strategies in liposomal cancer therapy: problems and prospects of active and tumor specific drug release. *Progress in Lipids Research* 44 (2005) 68-97.
10. **Andreopoulos D, Kasi L.P, Asimacopoulos P.J, Jhingran S.G, Cole W, Yang D, Kim E.E** Selective in vitro labeling of white blood cells using ^{99m}Tc - labeled liposomes. *Nuclear Medicine and Biology* 29 (2002) 185-190.
11. **Ansell S.M, Ristow K.M, Habermann T.M, Wiseman G.A, Witzig T.E.** Subsequent chemotherapy regimens are well tolerated after radioimmunotherapy with yttrium-90 ibritumomab tiuxetan for non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 20 (2002) 3885-3890.
12. **Bach J.F.** Traité d'immunologie. Flammarion médecine-Sciences (1993).
13. **Bally M.B, Mayer L.D, Loughrey H, Redelmeier T, Maden T.D, Wong K, Harrigan R, Hope J.M, Cullis P.R.** Dopamine accumulation in large unilamellar vesicle systems induced by transmembrane ion gradients. *Chemistry and Physics of Lipids* 47 n°2 (1988) 97-107.

14. **Bangham A.D, Standish M.M, Watkins J.C.** Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* 13 (1965) 238-252.
15. **Bao A, Goins B, Klipper R, Negrete G, Mahindaratne M, Phillips W.T.** A novel liposome radiolabeling method using ^{99m}Tc -“SNS/S” complexes: In vitro and in vivo evaluation. *Journal of Pharmaceutical sciences* 92 n°9 (2003) 1893-1904.
16. **Bao A, Goins B, Klipper R, Negrete G, Phillips W.T.** ^{186}Re -liposome labelling using ^{186}Re -SNS/S complexes: In vitro stability, imaging, and biodistribution in rats. *The Journal of Nuclear Medicine* 44 n°12 (2003) 1992-1999.
17. **Barbet J, Machy P, Leserman L.D.** Monoclonal antibody covalently coupled to liposomes : specific targeting to cells. *Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry* 16 (1981) 243-258.
18. **Barbet J.** Traceurs fluorescents des liposomes. In: *Méthodologie des liposomes; Leserman L.D, Barbet J. Ed., Séminaires technologiques de l'INSERM, vol. 107* (1982).
19. **Barbet J, Machy P, Truneh A, Leserman LD.** Weak acid-induced release of liposome-encapsulated carboxyfluorescein. *Biochimica and Biophysica Acta* 777 n°3 (1984) 347-356.
20. **Barbet J.** Immunoliposomes. In: *Liposomes, New systems and new trends in their applications; Puisieux F, Couvreur P, Delattre J, Devissaguet J-P. Editions de Santé* (1995) 159-191.
21. **Barbet J, Kraeber-Bodéré F, Vuillez J.F, Gautherot E, Rouvier E, Chatal J.F.** Pretargeting with the Affinity Enhancement System for radioimmunotherapy. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 14 n°3 (1999) 153-166.
22. **Bardiès M, Faivre-Chauvet A.** Sélection des radioéléments pour la radiothérapie interne. In: *Radiopharmaceutiques: chimie des radiotraceurs et applications biologiques. Comet M. Vidal M. Presses Universitaires de Grenoble* (1998) 673-685.
23. **Barenholz Y, Gibbes D, Litman B.J, Goll T, Thompson T.E, Carlson R.D.** A simple method for the preparation of homogeneous phospholipid vesicles. *Biochemistry* 16 (1977) 2806-2810.
24. **Barenholz Y.** Liposome application : problems and prospects. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 6 (2001) 66-77.
25. **Beaumier P.L, Hwang K.J.** An efficient method for loading indium-111 into liposomes using acetylacetone. *The Journal of Nuclear Medicine* 23 (1982) 810-815.

26. **Bedu-Addo F.K, Huang L.** Interaction of PEG - phospholipid conjugates with phospholipid : implications in liposomal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 16 (1995) 235-247.
27. **Belhaj-Tayeb H, Briane D, Vergote J, Kothan S, Léger G, Bendada S-D, Tofighi M, Tamgac F, Cao A, Moretti J-L.** In vitro and in vivo study of ^{99m}Tc -MIBI encapsulated in PEG-liposomes: a promising radiotracer for tumor imaging. *European Journal of Nuclear Medicine* 30 n°4 (2003) 502-509.
28. **Bendas G, Krause A, Bakowsky U, Vogel J, Rothe U.** Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique. *International Journal of Pharmaceutics* 181 (1999) 79-93.
29. **Berthod A.** Mise au point. Structures physico-chimiques des milieux dispersés, micelles, émulsions et microémulsions. *Journal de chimie physique* 80 n°5 (1983) 408-424.
30. **Boerman O.C, Laverman P, Oyen W.J, Corstens F.H, Storm G.** Radiolabeled liposomes for scintigraphic imaging. *Progress in Lipid Research* 39 (2000) 461-475.
31. **Boerman O.C, Rennem H, Oyen W.J, Corsten F.H.** Radiopharmaceuticals to image infection and inflammation. *Seminars in Nuclear Medicine* 31 n°4 (2001) 286-295.
32. **Bohl Kullberg E.** Tumor cell targeting of stabilized liposomes conjugates Experimental studies using boronated DNA-binding agents. *Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Medicine* 1268 (2003) *Université d'Uppsala. Suède.*
33. **Bonte F, Juliano R.L.** Interactions of liposomes with serum proteins. *Chemistry and Physics of Lipids* 40 (1986) 359-372.
34. **Breitz H.B, Weiden P.L, Beaumier P.L. et al.** Clinical optimization of pretargeted radioimmunotherapy with antibody-streptavidin conjugate and ^{90}Y -DOTA-biotin. *The Journal of Nuclear Medicine* 41 (2000) 131-140.
35. **Brouwers A, Van Eerd J, Oosterwijk E, Oyen O, Corsten F, Boerman O.** Preparation, characterization and application of ^{131}I , ^{186}Re , ^{90}Y and ^{177}Lu -labelled CG250 for radioimmunotherapy of renal cell carcinoma. *The journal of Nuclear Medicine* 43 n°5 (2002) 268.
36. **Camera L, Kinuya S, Garmestani K, Wu C, Brechbiel M.W, Pai L.H, McCurry T.J, Gansow O.A, Pastan I, Paik C.H, Carrasquillo J.A.** Evaluation of the serum stability and in vivo biodistribution of CHX-DTPA and other ligands for Yttrium labeling of monoclonal antibodies. *The Journal of Nuclear Medicine* 34 (1994) 882-889.
37. **Cao Y, Suresh M.R.** Bispecific antibodies as novel bioconjugates. *Bioconjugate Chemistry* 9 (1998) 228-234.

38. **Cao Y, Suresh M.R.** Bispecific Mab aided liposomal drug delivery. *Journal of Drug Targeting* 8 n°4 (2000) 257-266.
39. **Carrion C, Domingo J.C, de Madariaga M.A.** Preparation of long-circulating immunoliposomes using PEG-cholestérol conjugates : effect of the spacer arm between PEG and cholesterol on liposomal characteristics. *Chemistry and Physics of Lipids* 113 (2001) 97-110.
40. **Ceh B, Winterhalter M, Frederik P.M, Vallner J.J, Lasic D.D.** Stealth liposomes: from theory to product. *Advanced Drug Delivery Reviews* 24 (1997) 165-177.
41. **Chatal J.F, Peltier P, Bardiès M, Chetanneau A, Thedrez P, Faivre-Chauvet A, et al.** Does immunoscintigraphy serve clinical needs effectively ? Is there a future for radioimmunotherapy ? *European Journal of Nuclear Medicine* 19 (1992) 205-213.
42. **Chatal J.F, Hoefnagel C.A.** Radionuclide therapy. *The Lancet* 354 (1999) 931-935.
43. **Chatal J.F.** Radioimmunothérapie. In: Radiopharmaceutiques: chimie des radiotraceurs et applications biologiques. Comet M. Vidal M. Presses Universitaires de Grenoble (1998) 711-717.
44. **Chatal J.F, Faivre-Chauvet A, Bardiès M, Kraeber-Bodéré F, Barbet J.** La radio-immunothérapie des tumeurs solides. *Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique* 25 n°11 (2001) 685-689.
45. **Chonn A, Cullis P.R, Devine D.V.** The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes. *The journal of Immunology* n°12 (1991) 4234-4241.
46. **Chrai S.S, Murari R, Ahmad I.** Liposomes: Drug Delivery Systems. *Pharmaceutical Technology Europe* (2003) 53-56.
47. **Clerc S, Barenholz Y.** Loading of amphipathic weak acids into liposomes in response to transmembrane calcium acetate gradients. *Biochimica ant Biophysica Acta* 1240 (1995) 257-265.
48. **Colletier J.F, Chaize B, Winterhalter M, Fournier D.** Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer. *BMC Biotechnology* 2 (2002) 9-19.
49. **Connor J, Sullivan S, Huang L.** Monoclonal antibody and liposomes. *Pharmacology and Therapeutics* 28 (1985) 341-365.
50. **Couturier O, Supiot S, Degraef-Mougin M, Faivre-Chauvet A, Carlier T, Chatal J-F, Davodeau F, Cherel M.** Cancer radioimmunotherapy with alpha-emitting nucleides. *European Journal of Nuclear Medicine and Biology* 20 (2005).

51. **Couvreur P.** Liposomes en clinique humaine: Le point sur les résultats thérapeutiques. In: Delattre J, Couvreur P, Puisieux F, Philippot J.R, Schuber F. *Les liposomes: Aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*. Paris: Les éditions INSERM (1993) 7-42.
52. **Crosasso P, Ceruti M, Brusa P, Arpicco S, Dosio F, Cattel L.** Preparation; characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes. *Journal of Controlled Release* 63 (2000) 19-30.
53. **Cullis P.R, Hope M.J, Bally M.B, Madden T.D, Mayer L.D, Fenske D.B.** Influence of pH gradients on the transbilayer transport of drugs, lipids, peptides and metal ions into large unilamellar vesicles. *Biochimica and Biophysica Acta* 1331 (1997) 187-211.
54. **Dams E.T, Laverman P, Oyen W.J, Storm G, Scherphof G.L, van der Meer J.W, Cortens F.H, Boerman O.C.** Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 292 n°3 (2000) 1071-1079.
55. **Dass C.R.** Improving anti-angiogenic therapy via selective delivery of cationic liposomes to tumor vasculature. *International Journal of Pharmaceutics* 267 (2003) 1-12.
56. **Deamer D, Bangham A.D.** Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochimica and Biophysica Acta* 443 (1976) 629-634.
57. **Delattre J.** Liposomes et barrières endothéliales. In: Delattre J, Couvreur P, Puisieux F, Philippot J.R, Schuber F. *Les liposomes: Aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*. Paris: Les éditions INSERM (1993) 167-178.
58. **DeNardo S.J, Koger L.A, MacKenzie M.R, Mirick G.R, Shen S, DeNardo G.L.** Prolonged survival associated with immune response in a patient treated with Lym-1 mouse monoclonal antibody. *Cancer Biotherapy Radiopharmaceutics* 13 (1998) 1-12.
59. **DeNardo G.L, Kukis D.L, Shen S, DeNardo D.A, Meares C.F, DeNardo S.J.** ⁶⁷Cu versus ¹³¹I-labeled Lym-1 antibody: Comparative pharmacokinetics and dosimetry in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Clinical Cancer Research* 5 (1999) 533-541.
60. **Devissaguet J-P, Puisieux F.** Pharmacocinétique et potentialités thérapeutiques des liposomes. In: Delattre J, Couvreur P, Puisieux F, Philippot J.R, Schuber F. *Les liposomes: Aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*. Paris: Les éditions INSERM (1993) 7-42.
61. **Devoisselle J.M.** Les liposomes: aspects pharmaceutiques, comportement in vivo et réalités cliniques. *La lettre du Pharmacologue* 11 n°10 (1997) 203-209.
62. **Dillman R.** Radiolabeled anti-CD20 monoclonal antibodies or the treatment of B-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 20 n°16 (2002) 3545-3557.

63. **Drummond D.C, Meyer O, Huong K, Kirpotin D.B, Papahadjopoulos D.** *Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors.* *Pharmacological Reviews* 51 n°4 (1999) 691-743.
64. **Ducan R, Dimitrijevic S, Evagorou E.G.** The role of polymer conjugates in the diagnosis and treatment of cancer. *STP Pharma Science* 6 n°4 (1996) 237-263.
65. **Düzgünes N, Shlomo N.** Mechanisms and kinetics of liposome - cell interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews* 40 (1999) 3-18.
66. **Espinola L.G, Beaucaire J, Gottschalk A, Caride V.J.** Radiolabeled liposomes as metabolic and scanning tracers in mice. II. In-111 oxine compared with Tc-99m DTPA, entrapped in multilamellar vesicles. *The Journal of Nuclear Medicine* 20 (1979) 434-440.
67. **Fattal E, Couvreur P, Puisieux F.** Méthodes de préparation des liposomes. In: *Delattre J, Couvreur P, Puisieux F, Philippot J.R, Schuber F. Les liposomes: Aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques.* Paris: Les éditions INSERM (1993) 7-42.
68. **Fenske D.B, Cullis P.R.** *Entrapment of small molecules and nucleic acid-based drugs in liposomes.* *Methods in enzymology* 391 (2005) 7-40.
69. **Freund O.** Biodistribution and gastrointestinal drug delivery of new lipidic multilamellar vesicles.. *Advanced Drug Delivery Reviews* 8 (2001) 239-244.
70. **Gabizon A, Papahadjopoulos D.** The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance *in vivo*. *Biochimica and Biophysica Acta* 1103 (1992) 94-100.
71. **Gabizon A.** Liposome circulation time and tumor targeting : implications for cancer chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 16 (1995) 285-294.
72. **Gabizon A, Goren D, Horowitz A.T, Tzemach D, Lossos A, Siegal T.** Long – circulating liposomes for drug delivery in cancer therapy : a review of biodistribution studies in tumor – bearing animals. *Advanced Drug Delivery Reviews* 24 (1997) 337-344.
73. **Gabizon A, Goren D, Cohen R, Barenholz Z.** Development of liposomal anthracyclines: from basics to clinical applications. *Journal of Controlled Release* 53 (1998) 275-279.
74. **Gautherot E, Rouvier E, Daniel L, Loucif E, Bouhou J, Manetti C, Martin M, Le Doussal JM, Barbet J.** Pretargeted radioimmunotherapy of human colorectal xenografts with bispecific antibody and 131I-labeled bivalent hapten. *Journal of Nuclear Medicine* 41 n°3 (2000) 480-487.

75. **Goldenberg D.M.** The role of radiolabeled antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: the coming of age of radioimmunotherapy. *Critical reviews in Oncology/Hematology* 39 (2002) 195-201.
76. **Goldenberg D.M.** Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies. *The Journal of Nuclear Medicine* 43 (2002) 693-713.
77. **Goodwin D.A, Meares C.F, Mac Call M.J, Mac Tighe M, Chaovapong W.** Pre-targeted immunoscintigraphy of murine tumors with indium-111 labeled bifunctional haptens. *Journal of Nuclear Medicine* 29 (1988) 226-234.
78. **Gopal A.K, Gooley T.A, Maloney D.G.** High-dose radioimmunotherapy versus conventional high-dose therapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation for relapsed follicular non-hodgkin's lymphoma: a multivariable cohort analysis. *Blood* 102 (2003) 2351-2357.
79. **Grant C.W, Karlik S, Florio E.** A liposomal MRI contrast agent : phosphatidylethanolamine - DTPA. *Magnetic Resonance in Medicine* 11 (1989) 236-243.
80. **Griffiths G.L, Govindan S.V, Sharkey R.M, Fisher D.R, Goldenberg D.M.** ⁹⁰Y-DOTA-hLL2: an agent for radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma. *The Journal of Nuclear Medicine* 44 (2003) 77-84.
81. **Hafeli U, Tiefenauer L.X, Schubiger P.A, Weder H.G.** A lipophilic complex with ¹⁸⁶Re/¹⁸⁸Re incorporated in liposomes suitable for radiotherapy. *Nuclear Medicine and Biology* 18 (1991) 449-454.
82. **Hamilton R.L, Goerke J, Guo L.S, Williams M.C, Havel R.J.** Unilamellar liposomes made with the French pressure cell: a simple preparative and semiquantitative technique. *Journal of Lipids Research* 21 (1980) 981-992.
83. **Hansen C.B, Kao G.Y, Moase E.H, Zalipsky S, Allen T.M.** Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling procedures. *Biochimica and Biophysica Acta* 1239 (1995) 133-144.
84. **Harashima H, Kiwada H.** The pharmacokinetics of liposomes in tumor targeting. *Advanced Drug Delivery Reviews* 40 (1999) 1-2.
85. **Hardy J.G, Kellaway IW, Rogers J, Wilson C.G.** The distribution and fate of ¹³¹I-labelled liposomes. *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology* 32 (1980) 309-313.
86. **Hashimoto Y, Sugawara M, Endoh H.** Coating of liposomes with subunits of monoclonal IgM antibody and targeting of the liposomes. *Journal of Immunology Methods* 62 (1983) 155-162.

87. **Henriksen G, Schoultz B.W, Michaelsen T.E, Bruland O.S, Larsen R.H.** Sterically stabilized liposomes as a carrier for α -emitting radium and actinium radionuclides. *Nuclear Medicine and Biology* 31 (2004) 441-449.
88. **Hnatowich D.J, Friedman B, Clancy B, Novak M.** Labeling of preformed liposomes with Ga-67 and Tc-99m by chelation. *Journal of Nuclear Medicine* 22 (1981) 810-814.
89. **Hope M.J, Bally M.B, Webb G, Cullis P.R.** Production of unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochimica et Biophysica Acta* 812 (1985) 55-65.
90. **Hope M.J, Bally M.B, Mayer L.D, Janoff A.S, Cullis P.R.** Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. *Chemistry and Physics of Lipids* 40 (1986) 89-107.
91. **Hwang K.J.** Encapsulation with high efficiency of radioactive metal ions in liposomes. *Biochimica and Biophysica Acta* 716 (1982) 101-109.
92. **Hwang K.J, Padki M.M, Chow D.D, Essien H.E, Lai J.Y, Beaumier P.L.** Uptake of small liposomes by non - reticuloendothelial tissues. *Biochimica and Biophysica Acta* 901 (1987) 88-96.
93. **Hwang S.H, Maitani Y, Qi X.R, Takayama K, Nagai T.** Remote loading of diclofenac, insulin and fluorescein isothiocyanate labeled insulin into liposomes by pH and acetate gradient methods. *International Journal of Pharmaceutics* 179 (1999) 85-95.
94. **Ishida T, Masuda K, Ichikawa T, Ichihara M, Irimura K, Kiwada H.** Accelerated clearance of a second injection of PEGylated liposomes in mice. *International Journal of Pharmaceutics* 255 (2003) 167-174.
95. **Jain R.K, Baxter L.T.** Mechanisms of heterogeneous distribution of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors: significance of elevated interstitial pressure. *Cancer Research* 48 (1988) 7022-7032.

96. **Jhanwar Y.S, Divgi C.** Current status of therapy of solid tumors. *The journal of Nuclear Medicine* 46 (2005) 141-150.
97. **Jousma H, Talsma H, Spoes F, Joosten J.G, Junginger H.E, Crommelin D.J.** Characterization of liposomes. The influence of extrusion of multilamellar vesicles through polycarbonate membranes on particle size, particule size distribution and number of bilayers. *International Journal of Pharmaceutics* 35 (1987) 263-274.
98. **Jurcic J.C.** Antibody therapy for residual disease in acute myelogenous leukaemia. *Critical reviews in Oncology/Hematology* 38 (2001) 37-45.
99. **Kaminski M.S, Estes J, Zasadny K.R, Francis I.R, Ross C.W, Milik A.W, Tuck M, Regan D, Fisher S, Gutierrez J, Kroll S, Stagg R, Tidmarsh G, Wahl R.L.** Radioimmunotherapy with ¹³¹I-tositumomab for relapsed or refractory B-cell non-hodgkin lymphoma : updated results and long-term follow-up of the university of Michigan experience. *Blood* 96 (2000) 1259-1266.
100. **Kirby C, Clarke J, Gregoriadis G.** Effect of cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Biochemistry* 186 (1980) 591-598.
101. **Kirby C, Gregoriadis G.** Dehydration-rehydration vesicles: A simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Biotechnology* (1984) 979-984.
102. **Klibanov A.L, Maruyama K, Beckerleg A.M, Torchilin V.P, Huang L.** Activity of amphiphatic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target. *Biochimica and Biophysica Acta* 1062 (1991) 142-148.
103. **Köhler G, Milstein C.** *Nature* 256 (1975) 495-497.
104. **Koning G.A, Kamps J.A, Scherphof G.L.** Efficient intracellular delivery of 5-fluorodeoxyuridine into colon cancer cells by targeted immunoliposomes. *Cancer Detection and Prevention* 26 (2002) 299-307
105. **Kostarelos K, Emfietzoglou D.** Tissue dosimetry of liposome – radionucleide complexes for internal radiotherapy : Toward liposome – targeted therapeutic radiopharmaceuticals. *Anticancer Research* 20 (2000) 3339-3346.
106. **Kraeber-Bodéré F, Bardet S, Hoefnagel C.A, Vieira M.R, Vuillez J.P, Murat A, Ferreira T.C, Bardiès M, Ferrer L, Resche I.** Radioimmuohterapy of medullary thyroid cancer using bispecific antibody and iodine-131 labeled bivalent hapten: preliminary results of phase I/II clinical trial. *Clinical Cancer Research* 5 (1999) 3190-3198.

107. **Kraeber-Bodéré F, Sai-Maurel C, Campion L, Faivre-Chauvet A, Mirallie E, Cherel M, Supiot S, Barbet J, Chatal J.F, Thedrez P.** Enhanced antitumor activity of combined pretargeted radioimmunotherapy and paclitaxel in medullary thyroid cancer xenograft. *Molecular Cancer Therapy* 1 n°4 (2002) 267-274.
108. **Krasner C, Joyce R.M.** Zevalin: Yttrium-90-labeled anti-CD20 (ibritumomab tiuxetan), a new treatment for non-Hodgkin's lymphoma. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2 (2001) 241-349.
109. **Langmuir V.K.** Radioimmunotherapy: Clinical Results and dosimetric considerations. *Nuclear Medicine and Biology* 19 (1992) 213-225.
110. **Lasic D.D.** Mechanism of liposomes formation. *Journal of Liposomes Research* 5 (1995) 431.
111. **Lasic D.D.** Applications of liposomes. in: *Lipowsky R, Sackmann E. Handbook of Biological Physics, chapitre 10* (1995) 491-519.
112. **Lasic D.D.** Novel applications of liposomes. *Ibtech* 16 (1998) 307-321.
113. **Laverman P, Brouwers A.H, Dams E.T, Oyen W.J, Storm G, Van Rooijen N, Corstens F.H, Boerman O.C.** Preclinical and clinical evidence for disappearance of long-circulating characteristics of polyethylene glycol liposomes at low lipid dose. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 293 n°3 (2000) 996-1001.
114. **Laverman P, Carstens M.G, Boerman O.C, Dams E.T, Oyen W.J, Van Rooijen N, Corstens F.H, Storm G.** Factors affecting the accelerated blood clearance of polyethylene glycol – liposomes upon repeated injection. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 298 n°2 (2001) 607-612.
115. **Le Doussal J.M, Martin M, Gautherot E, Delaage M, Barbet J.** In vitro and in vivo targeting of radiolabeled monovalent and divalent haptens with dual specificity monoclonal antibody conjugates : Enhanced divalent hapten affinity for cell-bound antibody conjugate. *Journal of Nuclear Medicine* 30 (1989) 1358-1366.
116. **Legendre J.Y, Szoka F.** Les liposomes pour le transfert de gènes dans les cellules de mammifères. In: *Delattre J, Couvreur P, Puisieux F, Philippot J.R, Schuber F. Les liposomes: Aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques. Paris: Les éditions INSERM* (1993) 7-42.
117. **Levchenko T.S, Rammohan R, Lukyanov A.N, Whiteman K.R, Torchilin V.P.** Liposomes clearance in mice: the effect of a separate and combined presence of surface charge and polymer coating. *International Journal of Pharmaceutics* 240 (2002) 95-102.
118. **Levine A, Tulpule A, Buchanan L, Africano M, Welles L.** Liposomal doxorubicine (TLC D99, Myocet) in combination with cyclophosphamide (C), vincristin (O) and prednisolone (P) for aggressive non-Hodgkins lymphomas (NHL). *Annals of Oncology* 11 (2000) 105.

119. **Lewis J.P, DeNardo G.L, DeNardo S.J.** Radioimmunotherapy of lymphoma. *Hybridoma* 14 n°2 (1995) 115-120.
120. **Li X, Hirsh D.J, Cabral-Lilly D, Zikel A, Gruner S.M, Janoff A.S, Perkins W.R.** Doxorubicin physical state in solution and inside liposomes loaded via a pH gradient. *Biochimica and Biophysica Acta* 1415 (1998) 23-40.
121. **Lindegren S, Skarnemark G, Jacobsson L, Karlsson B.** Chloramine-T in high-specific-activity radioiodination of antibodies using N – succinimidyl – 3 – (trimethylstannyl)benzoate as an intermediate. *Nuclear Medecine and Biology* 25 (1998) 659-665.
122. **Liu D, Mori A, Huang L.** Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM₁-containing liposomes. *Biochimica and Biophysica Acta* 1104 (1992) 95-101.
123. **Liu D.** Biological factors involved in blood clearance of liposomes by liver. *Advanced Drug Delivery Reviews* 24 (1997) 201-213.
124. **Lopes de Menezes D.E, Pilarski L.M, Belch A.R, Allen T.M.** Selective targeting of immunoliposomal doxorubicin against human multiple myeloma in vitro and ex vivo. *Biochimica and Biophysica Acta* 1466 (2000) 205-220.
125. **Ma D, Mc Devitt, Barendswaard E, Curcio M.J, Pellegrini V, Brechbiel M.W, Scheinberg D.A.** Radioimmunotherapy for model B cell malignancies using ⁹⁰Y-labeled anti-CD19 and anti-CD20 monoclonal antibodies. *Leukemia* 16 (2002) 60-66.
126. **MacDonald R.C, MacDonald R.I, Menco B.P, Takeshita K, Subbarao N.K, Hu L.H.** Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochimica and Biophysica Acta* 1061 (1991) 297-303.
127. **Madden T.D, Harrigan P.R, Tai L.C, Bally M.B, Mayer L.D, Redelmeier T.E, Loughrey H.C, Tilcock C.P, Reinish L.W, Cullis P.R.** The accumulation of drugs within large unilamellar vesicles exhibiting a proton gradient: a survey. *Chemistry and Physics of Lipids* 53 (1990) 37-46.
128. **Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K.** Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release* 65 (2000) 271-284.
129. **Martin F.J, Papahadjopoulos D.** Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles. *The Journal of Biological Chemistry* 257 n°1 (1982) 286-288.
130. **Maruyama K, Kennel S.J, Huang L.** Lipid composition is important for highly efficient target binding and retention of immunoliposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 5744-5748.
131. **Maruyama K, Yuda T, Okamoto A, Kojima S, Suginaka A, Iwatsuru M.** Prolonged circulation time in vivo of large unilamellar liposomes composed of

distearoylphosphatidylcholine and cholesterol containing amphipathic poly(ethylene)glycol. *Biochimica and Biophysica Acta* 1128 (1992) 44-49.

132. **Maruyama K, Takizawa T, Tsutomu Y, Kennel S.J, Huang L, Iwatsuru M.** Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipathic poly(ethylene)glycols conjugated at their terminals to monoclonal antibodies. *Biochimica and Biophysica Acta* 1134 (1995) 74-80.

133. **Maruyama K, Takizawa T, Takahashi N, Tagawa T, Nagaike K, Iwatsuru M.** Targeting efficiency of PEG-immunoliposomes-conjugated antibodies at PEG terminals. *Advanced Drug Delivery Reviews* 24 (1997) 235-242.

134. **Maruyama K, Ishida O, Takizawa T, Moribe K.** Possibility of active targeting to tumor tissues with liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews* 40 (1999) 89-102.

135. **Massing U, Fuxius S.** Liposomal formulations of anticancer drugs : selectivity and effectiveness. *Drug Resistance Uptake* 3 (2000) 171-177.

136. **Mastrobattista E, Koning G.A, Storm G.** Immunoliposomes for the targeted delivery of antitumor drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* 40 (1999) 103-127.

137. **Maurer-Spurej E, Wong K.F, Maurer N, Fenske D.B, Cullis P.R.** Factors influencing uptake and retention of amino-containing drugs in large unilamellar vesicles exhibiting transmembrane pH gradients. *Biochimica and Biophysica Acta* 1416 (1999) 1-10.

138. **Mayer L.D, Bally M.B, Hope M.J, Cullis P.R.** Uptake of antineoplastic agents into large unilamellar vesicles in response to a membrane potential. *Biochimica and Biophysica Acta* 816 (1985) 294-302.

139. **Mayer L.D, Hope M.J, Cullis P.R.** Vesicles of variable produced by a rapid extrusion procedure. *Biochimica and Biophysica Acta* 858 (1986) 161-168.

140. **Mayer L.D, Bally M.B, Cullis P.R.** Uptake of adriamycin into large unilamellar vesicles in response to a pH gradient. *Biochimica and Biophysica Acta* 857 (1986) 123-126.

141. **Mehnert W, Mäder K.** Solid lipid nanoparticles, production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 47 (2001) 165-196.

142. **Mercadal M, Domingo J.C, Petriz J, Garcia J, de Madariaga M.A.** Preparation of immunoliposomes bearing poly(ethyleneglycol)-coupled monoclonal antibody linked via a cleavable disulfide bond for ex vivo applications. *Biochimica and Biophysica Acta* 1509 (2000) 299-310.

143. **Milenic D.E.** Radioimmunotherapy: designer molecules to potentiate effective therapy. *Seminar Radiation Oncology* 10 (2000) 139-155.

144. **Moghimi S.M, Szebeni J.** Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: Critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Progress in Lipids Research* 42 (2003) 463-478.
145. **Mori A, Klibanov A.L, Torchilin V.P, Huang L.** Influence of the steric barrier activity of amphipathic poly(ethyleneglycol) and ganglioside GM on the circulation time of liposomes and on the target binding of immunoliposomes in vivo. *FEBS letters* 284 (1991) 263-266.
146. **Mulford D.A, Scheinberg D.A, Juscic J.C.** The promise of targeted nanoparticle therapy. *The Journal of Nuclear Medicine* 46 (2005) 1005-2045.
147. **Niculescu-Duvaz I, Springer C.J.** Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): a review. *Advanced Drug Delivery Reviews* 26 (1997) 151-172.
148. **O'Donoghue JA, Bardiès M, Weldon TE.** Relationships between tumor size and curability for uniformly targeted therapy with beta-emitting radionuclides. *The Journal of Nuclear Medicine* 36 (1995) 1902-1909.
149. **O'Donoghue JA, Sgouros G, Dvigi C.R, Humm J.L.** Single-dose versus fractionated radioimmunotherapy model comparisons for uniform tumor dosimetry. *The Journal of Nuclear Medicine* 41 (2000) 538-547.
150. **Oja C.D, Semple S.C, Chonn A, Cullis P.R.** Influence of dose on liposomes clearance: critical role of blood proteins. *Biochimica and Biophysica Acta* 1281 (1996) 31-37.
151. **Oku N, Namba Y, Takeda A, Okada S.** Tumor imaging with technétium-99m-DTPA encapsulated in RES-avoiding liposomes. *Nuclear Medicine and Biology* 20 n°4 (1993) 407-412.
152. **Oku N.** Delivery of contrast agents for positron emission tomography imaging by liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews* 37 (1999) 53-61.
153. **Olson F, Hunt C.A, Szoka F.C, Vail W.J, Papahadjopoulos D.** Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochimica and Biophysica Acta* 557 (1979) 9-23.
154. **Paganelli G, Grana C, Chinol M, Cremonesi M, de Cicco C, De Braud F. et al.** Antibody-guided three-step therapy for high grade glioma with yttrium-90 biotin. *European Journal of Nuclear Medicine* 26 (1999) 348-357.
155. **Paganelli G, Chinol M.** Radioimmunotherapy: is avidin-biotin pretargeting the preferred choice among pretargeting methods? *European Journal of Nuclear Medicine molecular Imaging* 30 (2003) 777-780.
156. **Park J.W, Kirpotin D.B, Hong K, Shalaby R, Shao Y, Nielsen U.B, Marks J.D, Papahadjopoulos D, Benz C.C.** Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes. *Journal of Controlled Release* 74 (2001) 95-113.

157. **Passirani C, Benoît J-P.** Complement activation by injectable colloidal drug carriers. In: *Biomaterials for delivery and targeting of proteins and nucleic acids*; Mahato R.I. CRC Press (2005) 187-230.
158. **Passirani C, Barratt G, Devissaguet J-P, Labarre D.** Interactions of nanoparticles bearing heparin or dextran covalently bound to poly(methylmethacrylate) with the complement system. *Life Science* 62 n°8 (1998) 775-785.
159. **Patel H.M.** Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9 n°1 (1992) 39-90.
160. **Peeters P.A.M, Brunink B.G, Eling W.M.C, Crommelin D.J.A.** Therapeutic effect of chloroquine(CQ)-containing immunoliposomes in rats infected with *Plasmodium berghei* parasitized mouse red blood cells: comparison with combinations of antibodies and CQ or liposomal CQ. *Biochimica and Biophysica Acta* 981 (1989) 269-276.
161. **Pèlegri A, Xavier F, Barbet J, Bartholeyns J, Baty D, Buchegger F, Chatal J.F.** Immunociblage des tumeurs : situation et perspectives en 2000. *Bulletin du Cancer* 87 n°11 (2000) 777-791.
162. **Phillips W.T.** Delivery of gamma - imaging agents by liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews* 37 (1999) 13-32.
163. **Phillips W.T, Goins B.** Targeting delivery of imaging agents by liposomes. In: Torchilin V.P. *Handbook of targeted delivery of imaging agents*, CRC Press, Inc (1995) 149-173.
164. **Phillips W.T, Rudolph A.S, Goins B, Timmons J.H, Klipper R, Blumhardt R.** A simple method for producing a Technetium-99m-labeled liposome which is stable in vivo. *Nuclear Medicine Biology* 19 n°5 (1992) 539-547.
165. **Pick U.** Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures. *Archives of Biochemistry and Physics* 212 n°1 (1981) 186-194.
166. **Photos P.J, Bakacova L, Discher B, Bates F.S, Discher D.E.** Polymer vesicles in vivo: Correlations with PEG molecular weight. *Journal of Controlled Release* 90 (2003) 323-334.
167. **Poste G, Bucana C, Raz A, Bugelski P, Kirsh R, Filder I.J.** Analysis of the fate of systemically administered liposomes and implications for their use in drug delivery. *Cancer research* 42 (1982) 1412-1422.
168. **Presant C.A, Crossley R, Ksionski G, Proffitt R.** Design of liposome clinical trials. *Liposome Technology volume II* (1993) 307-317.

169. **Price M.E, Cornelius R.M, Brash J.L.** Protein adsorption to polyethylene glycol modified liposomes from fibrinogen solution and from plasma. *Biochimica and Biophysica Acta* 1512 (2001) 191-205.
170. **Proffit R.T, Williams L.E, Presant C.A.** Tumor-imaging potential of liposomes loaded with In-111-NTA: biodistribution in mice. *The Journal of Nuclear Medicine* 24 n°1 (1983) 45-51.
171. **Puisieux F.** Les liposomes. *Annales pharmaceutiques françaises* 41 n°1 (1983) 3-13.
172. **Puisieux F, Benita S.** Towards a new galenic dosage form, the liposomes ? *Biomedecine.* 36 (1982) 4-13.
173. **Richards R.L, Habbersett R.C, Scher I, Janoff A.S, Schieren H.P, Mayer L.D, Cullis P.R, Alving C.R.** Influence of vesicle size on complement-dependent immune damage to liposomes. *Biochimica and Biophysica Acta* 855 (1986) 223-230.
174. **Rival P, Franceschi G, Fratarelli M, Riva N, Guidicci G, Cremonini A.M. et al.** ¹³¹I radioconjugated antibodies for the locoregional radioimmunotherapy of high-grade malignant glioma-phase I and II study. *Acta Oncology* 38 (1999) 351-359.
175. **Rongen H.A, Bult A, van Bennekom W.P.** Liposomes and immunoassays. *Journal of Immunologicals Methods* 204 (1997) 105-133.
176. **Roux E, Passirani C, Scheffold S, Benoît J-P, Leroux J-C.** Serum-stable and long-circulating, PEGylated, pH-sensitive liposomes. *Journal of Controlled Release* 94 (2004) 447-451.
177. **Saunders L, Perrin J, Gammack D.B.** Aqueous dispersion of phospholipids by ultrasonic radiations. *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology* 14 (1962) 567-572.
178. **Scheidhauer K, Wolf I, Schmidt.** Effect of preinfusion of cold antibody in radioimmunotherapy with rituximab. *The Journal of Nuclear Medicine* 43 n°5 (2002) 116.
179. **Scherphof G.L, Velinova M, Kamps J, Donga J, van der Want H, Kuipers F, Havekes L, Daemen T.** Modulation of pharmacokinetic behavior of liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews* 24 (1997) 179-191.
180. **Schilder R.J, Molina A, Gordon L.I, Emmanouilides C, Czuczman M.S, Wang H, Witzig T.E, Ansell S.M, White C.A.** Radioimmunotherapy with 90Y-ibritumomab tiuxetan (zevalin) does not preclude subsequent radiotherapy or other antilymphoma therapies: updated safety and efficacy data. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 60 (2004) 545-552.
181. **Schott M.F, Milenic D.E, Yokota T, Whitlow M, Wood J.F, Fordyce W.A, Cheng R.C, Schlom J.** Differential metabolic patterns of iodinated versus

radiometal-chelated anticarcinoma single chain Fv molecules. *Cancer research* 52 (1992) 6413-6417.

182. **Schubert R, Wolburg H, Schmidt K-H, Roth H.J.** Loading of preformed liposomes with high trapping efficiency by detergent-induced formation of transient membrane holes. *Chemistry and Physics of Lipids* 58 (1991) 121-129.

183. **Schroit A.J.** Synthesis and properties of a nonexchangeable radioiodinated phospholipid. *Biochemistry* 21 (1982) 5323-5328.

184. **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. *Biochimica et Biophysica Acta* 1062 (1991) 77-82.

185. **Sharkey R.M, Brenner A, Burton J, Hajjar G, Toder S.P, Alavi A et al.** Radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with ⁹⁰Y-DOTA humanized anti-CD22 IgG (⁹⁰Y-Epratuzumab): do tumor targeting and dosimetry predict therapeutic response? *Journal of Nuclear Medicine* 44 n°12 (2003) 2000-2018.

186. **Sharkey R.M, Goldenberg D.M.** Perspectives on cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies. *The Journal of Nuclear medicine* 46 (2005) 115-127.

187. **Shimura N, Sogawa Y, Kawakita Y, Ikekita M, Yamazaki N, Kojima S.** Radioiodination of glycoprotein – conjugated liposomes by using the Bolton – Hunter reagent and biodistribution in tumor – bearing mice. *Nuclear Medicine and Biology* 29 (2002) 491-496.

188. **Silvander M, Johnsson M, Edwards K.** Effects of PEG-lipids on permeability of phosphatidylcholine / cholesterol liposomes in buffer and in human serum. *Chemistry and Physics of Lipids* 97 (1998) 15-26.

189. **Sofou S, Thomas J.L, Lin H, McDevitt M.R, Scheinberg D.A, Sgouros G.** Engineered liposomes for potential α -particle therapy of metastatic cancer. *The Journal of Nuclear Medicine* 45 (2004) 253-260.

190. **Srinath P, Diwan P.V.** Stealth liposomes, an overview. *Indian Journal of Pharmacology* 26 (1994) 179-184.

191. **Stein R, Blumenthal R, Sharkey R.M, Goldenberg D.M.** Comparative biodistribution and radioimmunotherapy of monoclonal antibody RS7 and its F(ab')₂ in nude mice bearing human tumor xenografts. *Cancer* 73 (1994) 816-823.

192. **Storm G, Nässander U.K, Vingerhoeds M.H, Steerenberg P.A, Crommelin D.J.A.** Antibody-targeted liposomes to deliver doxorubicin to ovarian cancer cells. *Journal of Liposome Research* 4 n°1 (1994) 641-666.

193. **Storm G, Crommelin D.J.A.** Liposomes : Quo vadis? *Pharmaceutical Science and Technology Today 1* (1998) 19-31.
194. **Suresh M.R, Cao Y.** A simple and efficient method for radiolabeling of preformed liposomes. *Journal of Pharmaceuticals Sciences 1* (1998) 31-37.
195. **Swapna J, Nabar G.D.** Effect of size and charge of liposomes on biodistribution of encapsulated ^{99m}Tc-DTPA in rats. *Indian Journal of Pharmacology 30* (1998) 199-202.
196. **Swenson C.E, Bolcsak L.E, Batist G, Guthrie T.H, Tkaczuck K.H, Boxenbaum H, Welles L, Chow S.C, Bhamra R, Chaikin P.** Pharmacokinetics of doxorubicin administered i.v. as Myocet (TLC D-99; liposomes-encapsulated doxorubicin citrate) compared with conventional doxorubicin when given in combination with cyclophosphamide in patients with metastatic breast cancer. *Anticancer Drugs 14 n°3* (2003) 239-246.
197. **Syme A.M, McQuarrie S.A, Middleton J.W, Fallone B.G.** Dosimetric model for intraperitoneal targeted liposomal radioimmunotherapy of ovarian cancer micrometastase. *Physics medicine and biology 48 n°10* (2003) 1305-1320.
198. **Szoka F.C, Olson F, Heath T, Vail W.J, Mayhew E, Papahadjopoulos D.** Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0,1-0,2 μ m) by a combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes. *Biochimica and Biophysica Acta 601* (1980) 559-571.
199. **Szoka F.C, Jacobson K, Derzko Z, Papahadjopoulos D.** Fluorescence studies on the mechanism of liposome-cell interactions in vitro. *Biochimica and Biophysica Acta 600* (1980) 1-18.
200. **Szoka F.C, Jacobson K, Papahadjopoulos D.** The use of aqueous markers to determine the mechanism of interaction between phospholipid vesicles and cells. *Biochimica and Biophysica Acta 551* (1989) 295-303.
201. **Thoma K, Vetter O.** Pharmaceutical quality of liposomes, requirements for applicability. in: *Liposomes, New systems and new trend in their applications; Puisieux F, Couvreur P, Delattre J, Devissaguet J-P.* Editions de Santé (1995) 321-370.
202. **Thorpe P.E.** Vascular targeting agents as cancer therapeutics. *Clinical Cancer Research 10* (2004) 415-427.
203. **Torchilin V.P.** Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews/Drug Discovery 4* (2005) 145-160.
204. **Turner J.H, Martindale A.A, Boucek J, Claringbold P.G, Leahy M.F.** ¹³¹I-anti CD20 radioimmunotherapy of relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma: a phase II clinical trial of a non myeloablative dose regimen of chimeric rituximab radiolabeled in a hospital. *Cancer Biotherapy Radiopharmaceuticals 18* (2003) 513-524.

205. **Utkhede D, Yeh V, Szucs M, Tilcock C.** Uptake of yttrium-90 into lipids vesicles. *Journal of Liposomes research* 4 (1994) 1049-1061.
206. **Verel I, Visser G.W.M, van Dongen G.A.** The promise of immuno-PET in radioimmunotherapy. . *The journal of Nuclear Medicine* 46 (2005) 164-171.
207. **Vemuri S, Rhodes C.T.** Préparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 70 (1995) 95-111.
208. **Vuillez J.P.** Le radio-immunociblage: aspects diagnostiques et thérapeutiques. *Bulletin du Cancer* 87 n°11 (2000) 813-827.
209. **Vuillez, J.P, Kraeber-Bodéré F, Moro D, Bardès M., Douillard J.Y, Gautherot E, Rouvier E, Barbet J, Garban P, Moreau P, Chatal J.F.** Radioimmunotherapy of small-cell lung carcinoma with the two-step method using a bispecific anti-CEA/anti-DTPA antibody and iodine-131-di-DTPA hapten: results of a phase I/II trial. *Clinical Cancer Research* 5 (1999) 3259-3267.
210. **Wagner H.N, Wiseman G.A, Marcus C.S, Nabi H.A, Nagle C.E, Fink-Bennett D.M, Lamonica D.M, Conti P.S.** Administration guidelines for radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with ⁹⁰Y-labeled anti-CD20 monoclonal antibody. *The journal of Nuclear Medicine* 43 (2002) 267-272.
211. **Waldrep J.C, Arppe J, Jansa K.A, Knight V.** High dose cyclosporin A and budesonide-liposome aerosols. *International Journal of Pharmaceutics* 152 (1997) 27-36.
212. **Weinstein J.N.** Liposomes as targeted drug carriers ; A physical chemical perspective . *Pure and application Chemistry* 53 (1981) 2241-2254.
213. **Weinstein J.N, Leserman L.D.** Liposomes as drug carriers in cancer chemotherapy. *Pharmacology therapeutics* 24 (1984) 207-233.
214. **Weinstein J.N, Yoshikami S, Henkart P, Blumenthal R, Hagins W.A.** Liposome-cell interaction: Transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker. *Science* 195 (1977) 489-492.
215. **Wen X, Wu Q-P, Ke S, Ellis L, Charnsangavej C, Delpassand A.S, Wallace S, Li C.** Conjugation with ¹¹¹In – DTPA - poly(ethyleneglycol) improves imaging of anti-EGF receptor antibody C225. *The Journal of Nuclear Medicine* 42 n°10 (2001) 1530-1537.
216. **Wilbur D.S, Hadley S.W, Hylarides M.D, Abrams P.G, Beaumier P.A, Morgan A.C, Reno J.M, Fritzberg A.R.** Development of a stable radioiodinating reagent to label monoclonal antibodies for radiotherapy of cancer. *The Journal of Nuclear Medicine* 30 (1989) 216-226.
217. **Wiseman G.A, White C.A, Sparks R.B, Erwin W.D, Podoloff D.A, Lamonica D, Bartlett N.L, Parker J.A. et al.** Biodistribution and dosimetry results from a phase III prospectively randomized controlled trial of ZevalinTM

radioimmunotherapy for low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 39 (2001) 181-194.

218. **Witzig T.E, Gordon L.I, Cabanillas F, Czuczman M.S, Emmanouilides C, Joyce R, Pohlman B.L, Bartlett N.L, Wiseman G.A. et al.** Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 20 n°10 (2002) 2453-2463.

219. **Woodle M.C.** ⁶⁷Ga-labeled liposomes with prolonged circulation. *Nuclear Medicine and Biology* 20 n°2 (1993) 149-155.

220. **Woodle M.C.** Sterically stabilized liposome therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 16 (1995) 249-265.

221. **Xiao Z, McQuarrie S.A, Suresh M.R, Mercer J.R, Gupta S, Miller G.G.** A three-step strategy for targeting drug carriers to human ovarian carcinoma cells in vitro. *Journal of Biotechnology* 94 (2002) 171-18.

222. **Zalipsky S.** Synthesis of end-group functionalized polyethylene glycol-lipid conjugate for preparation of polymer-grafted liposomes. *Bioconjugate Chemistry* 4 (1993) 296-299.

223. **Zalipsky S.** Polyethylene glycol-lipid conjugates. in: *Lasic D, Martin F. Stealth Liposomes, CRC Press Inc (1995) 93-102.*

224. **Zalipsky S.** Peptide attachment to extremities of liposomal surface grafted PEG chains: Preparation of the long-circulating form of laminin pentapeptide, YIGSR. *Bioconjugate Chemistry* 6 (1995) 705-708.

225. **Zalutsky M.R, Zhao X.G, Alston K.L, Bigner D.** High-level production of α -particle-emitting ²¹¹At and preparation of ²¹¹At-labeled antibodies for clinical use. *The Journal of Nuclear Medicine* 42 n°10 (2001) 1508-1515.

226. **Zalutsky M.R.** Current status of solid tumors: brain tumor therapy. *The Journal of Nuclear Medicine* 46 (2005) 1515-1565.

Annexe 1

Synthèse des phospholipides modifiés

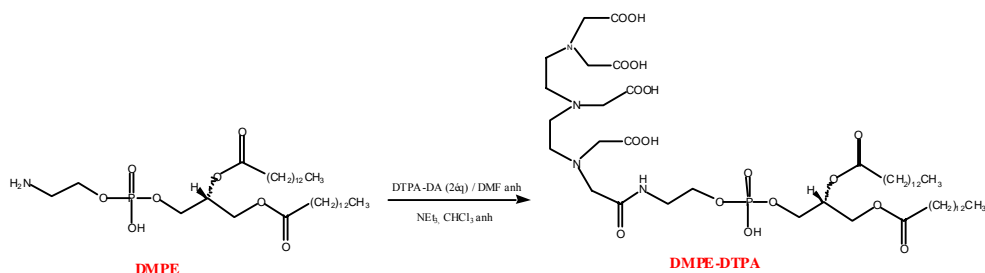
Cette partie a pour but de décrire la synthèse des phospholipides modifiés qui ont été utilisés pour la préparation des liposomes. Ces phospholipides modifiés ont servi soit au radiomarquage de la paroi des liposomes (DMPE-DTPA), soit à leur vectorisation par des AcM bispécifiques (DMPE-DTPA et DMPE-DNP).

Pour le radiomarquage de la paroi des liposomes, il est nécessaire d'utiliser un agent chélatant que l'on va coupler de façon covalente à un phospholipide. Nous allons décrire le couplage entre un agent chélatant comme le DTPA (acide diéthylènetriaminepentaacétique) et la dimyristoylphosphatidyléthanolamine (DMPE) dont la partie phospholipidique permet au DMPE-DTPA de s'insérer dans la bicouche. Le DTPA a été utilisé en premier car il présente un bon pouvoir complexant pour les métaux trivalents, comme l'indium-111 et il semble être un bon modèle pour l'utilisation des ligands semi-rigides développés à Nantes. De plus, le complexe DTPA-¹¹¹In est reconnu spécifiquement par l'AcM 734 et peut servir également à la vectorisation des liposomes.

Pour permettre la vectorisation des liposomes, nous avons également synthétisé un phospholipide couplé de façon covalente à un haptène, comme le DNP (acide 2,4-dinitrophénylaminocaproïque). Cet haptène est reconnu spécifiquement par l'AcM 265.5. La vectorisation immunospécifique est essentielle pour diriger spécifiquement les liposomes radiomarqués vers leur cible tumorale. Dans un système de préciblage comme l'A.E.S., les AcM utilisés sont bispécifiques et peuvent reconnaître à la fois le haptène couplé à la paroi des liposomes et un antigène tumoral.

I. Partie théorique

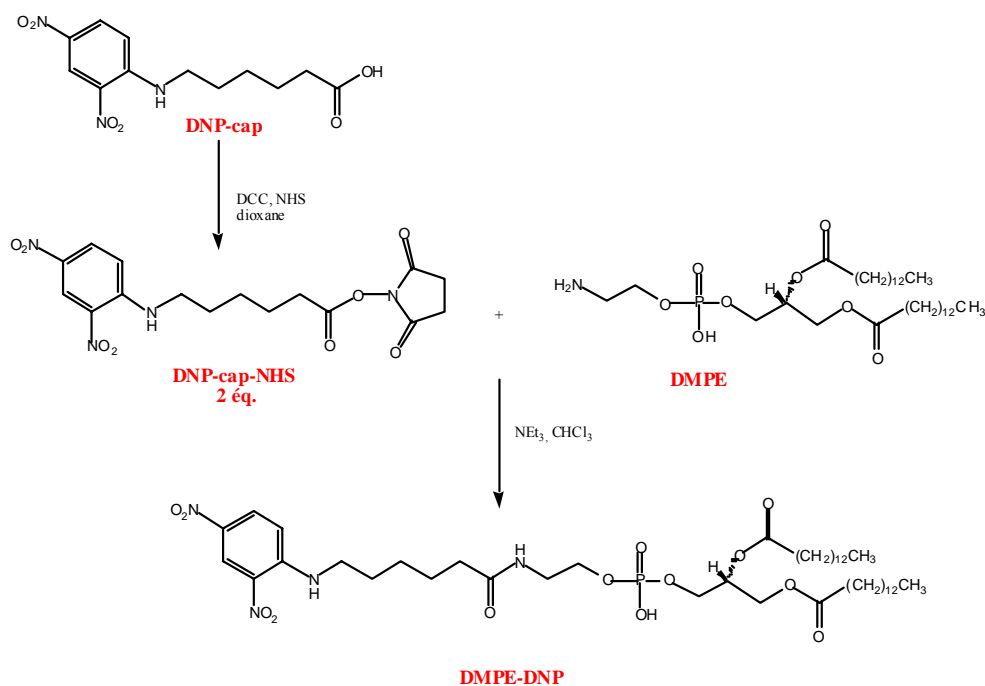
I.1. Synthèse du DMPE-DTPA



Synthèse du DMPE-DTPA

Le couplage amidique de la DMPE avec le DTPA est réalisé par la réaction de la fonction amine de la DMPE sur une fonction anhydride du DTPA-DA (dianhydride de diéthylènetriaminepentaacétique) en présence de triéthylamine. Celui-ci doit toujours être en excès par rapport à la DMPE afin d'éviter la réaction secondaire de deux molécules de DMPE sur les deux fonctions réactives du DTPA-DA. Pour cette raison, la DMPE est additionnée lentement sur le DTPA-DA. La présence de la base organique permet de renforcer la nucléophilie de la fonction amine. La réaction est réalisée en milieu anhydre afin d'éviter l'hydrolyse de l'acide dianhydrique.

I.2. Synthèse du DMPE-DNP



Synthèse du DMPE-DNP

Le DMPE-DNP est synthétisé en deux étapes à partir de l'acide 2,4-dinitrophénylaminocaproïque (DNP-cap). Ce couplage amidique est réalisé après activation de l'acide (DNP-cap) en ester de N-Hydroxysuccinimide (NHS) en présence de N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC). Après élimination de la DCHU formée, l'ester est isolé par recristallisation en éthanol. La réaction de couplage entre l'ester et la fonction amine de la DMPE a été réalisée en milieu anhydre afin d'éviter l'hydrolyse de l'ester activé. La présence d'une base organique, la triéthylamine, permet de renforcer la nucléophilie de la fonction amine.

II. Partie expérimentale

II.1. Généralités

II.1.1. La chromatographie

- les **chromatographies sur couche mince** (CCM) sont réalisées sur des plaques de silice Kieselgel 60 F 254 sur support plastique et révélées soit par lampe UV ($\lambda=254$ nm), soit par l'iode, soit par ninhydrine (pour les amines primaires).

Test à la ninhydrine (2,2-dihydroxy-1,3-indanedione):

Une CCM révélée par pulvérisation d'une solution éthanolique de ninhydrine (10 mg/ml en EtOH) permet d'indiquer l'absence de fonctions amines primaires libres. S'il reste des fonctions amines primaires n'ayant pas réagi, on observe l'apparition d'une coloration rose après chauffage de la plaque (test positif).

- les **chromatographies sur colonne** sont faites à l'aide de silice Kieselgel 60, 230-400 mesh (Carlo Erba), et poussées à l'air comprimé (chromatographie flash).

II.1.2. La RMN

Les **spectres RMN** ont été enregistrés sur un appareil à transformée de Fourier BRUKER AC (250,133 MHz pour la RMN¹H et 62,896 MHz pour les RMN¹³C). Les valeurs des déplacements chimiques sont exprimées en partie par million (ppm) et les constantes de couplages en Hertz (Hz). Le solvant utilisé pour les spectres ¹H et ¹³C est le chloroforme deutérié (CDCl₃, δ : 7,27 ppm (¹H) et 77 ppm (¹³C)). Dans la description des spectres, les multiplicités des signaux sont indiqués à l'aide des abréviations

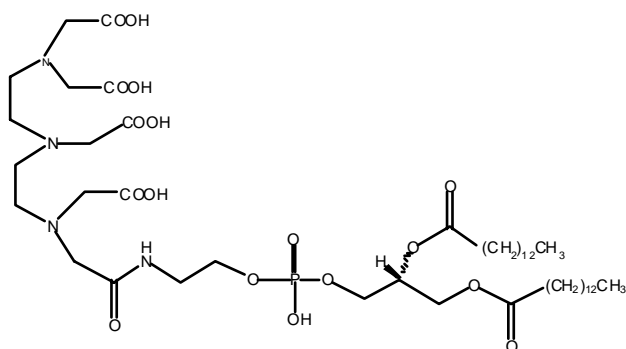
suivantes : s, d, dd, t, q, m signifiant respectivement singulet, doublet, doublet de doublet, triplet, quadruplet, multiplet.

II.1.3. La spectrométrie de masse

Les **spectres de masse** (SM) ont été réalisés sur un spectromètre de masse BRUKER Esquire LC avec ionisation par électrospray et doté d'un analyseur à trappe d'ions, en mode positif ou négatif.

II.2. Modes opératoires

II.2.1. Synthèse du DTPA-N-1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphatidyl éthanolamine (DMPE-DTPA)



2 équivalents de dianhydride de l'acide diéthylènetriaminepentaacétique (DTPA-DA) (67,3 mg ; 0,18 mmol) sont mis en solution dans 2 ml de DMF anhydre et chauffés à 40 °C à l'aide d'un bain d'huile et sous courant d'azote. Une solution de 30 ml de CHCl₃ anhydre contenant 1 équivalent de dimyristoylphosphatidyl éthanolamine (70,4 mg ; 0,09 mmoles) et 1,5 équivalents de NEt₃ (20 µl ; 0,14 mmoles)

est chauffée à 40 °C et est additionnée au milieu réactionnel au goutte-à-goutte à l'aide d'une ampoule à brome. La réaction se fait sous agitation en milieu anhydre, à une température de 40°C pendant 24 h. Le solvant est ensuite évaporé à sec. Le produit est obtenu après purification sur colonne chromatographique (éluant : CHCl₃/MeOH /NH₄OH (7:2,8:0,2)) avec un rendement de 76 %.

Le résidu sec est repris par du CHCl₃ pour obtenir une solution à 10 mg/ml qui sera conservée à -20°C avant d'être utilisée pour la préparation des liposomes.

Masse obtenue : 72,4 mg

[M+H]⁺ : 1011

Eluant : CHCl₃/ MeOH /NH₄OH (7:2,8:0,2)

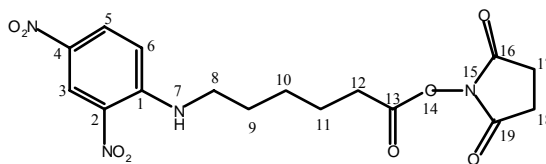
Rf : 0,2

Test ninhydrine : négatif

RMN¹H (CDCl₃) : 0,88 (t, 6H, 2× CH₃, ³J = 6,4 Hz) ; 1,25 (m, 40H) ; 1,57 (m, 4H, 2× CH₂-CH₂-C=O) ; 2,2-4,5 (m, 32H) ; 7,43 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (CDCl₃) : 14,1 (2×CH₃) ; 22,7 (2×CH₃-CH₂) ; 24,9 (2×CH₂-CH₂-C=O) ; 29,2 (2×CH₂-CH₂-CH₂-C=O) ; 29,7 (CH₂) ; 31,9 (2×CH₂-C=O) ; 38,7 (CH₂-NH) ; 50 (N-CH₂-CH₂-N-CH₂-CO-NH) 50,4 (N-CH₂-CH₂-N) ; 56,8 (N-CH₂-CO-NH) ; 57,9 (CH₂-COOH) ; 63,8 (CH-CH₂) 64,5 (CH₂-CH₂-NH / CH₂-O-P) ; 69,8 (CH) ; 170,8 (CO-NH) ; 173,1(2×O-CO) ; 173,2 (COOH).

II.2.2. Synthèse du *N*-Hydroxysuccinimide 2,4-dinitrophényl-amino caproate (DNP-cap-NHS)



L'acide 2,4-dinitrophénylaminocaproïque ou DNP-cap (500 mg soit 1,68 mmol) est solubilisé dans 5 ml de dioxane anhydre dans un ballon de 50 ml placé sous un courant d'azote. On ajoute directement 1,1 équivalents de *N*-hydroxysuccinimide ou NHS (213 mg soit 1,85 mmol) solubilisé dans 6 ml d'acétate d'éthyle (AcOEt). 1 équivalent de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide ou DCC (346 mg soit 1,68 mmol) est solubilisé dans 15 ml de dioxane anhydre et ajouté goutte-à-goutte au mélange réactionnel à l'aide d'une ampoule à brome. La réaction se fait sous agitation, en milieu anhydre et à température ambiante pendant 2 h.

Le précipité de dicyclohexylurée ou DCHU formé au cours de la réaction est filtré et la solution est évaporée. Le résidu sec est repris par un minimum d'éthanol chaud et le NHS-DNP-cap est obtenu par recristallisation de la solution. Les paillettes jaunes de l'ester sont filtrées, lavées avec de l'éthanol froid puis séchées sous vide au Rotavapor[®]. Le rendement de la réaction est de 60 %.

Masse obtenue : 390 mg

$[M+H]^+$: 394

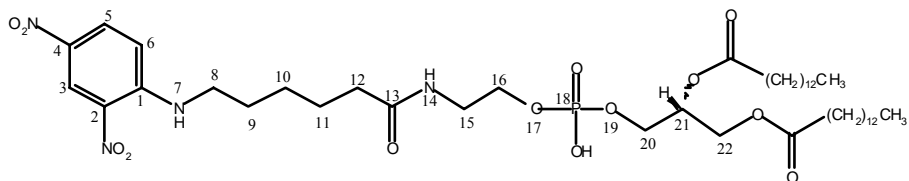
Eluant : CHCl₃/AcOEt (1:1)

Rf : 0,8

RMN¹H (CDCl₃) : 1,59 (q, 2H, CH₂ (10), ³J=7,025 Hz) ; 1,78 (m, 4H, CH₂ (9 & 11)) ; 2,69 (t, 2H, CH₂ (12), ³J = 7 Hz) ; 2,86 (s, 4H, CH₂ (17 & 18)) ; 3,44 (dd, 2H, CH₂ (8), ³J = 12,5 et 7,025 Hz) ; 6,93 (d, 1H, CH (6), ³J = 9,75 Hz) ; 8,28 (d, 1H, CH (5), ³J = 9,45 Hz et ⁴J = 2,75 Hz) ; 8,57 (s, 1H, NH) ; 9,16 (d, 1H, CH (3), ⁴J = 2,45 Hz).

RMN¹³C (CDCl₃) : 24,2 (17 & 18) ; 24,5 (11) ; 26,5 (10) ; 29,9 (9) ; 31 (12) ; 44,1 (8) ; 115,3 (6) ; 119,5 (3) ; 128 (5) ; 133,1 (2) ; 137,7 (4) ; 144,7 (1) ; 167,5 (13) ; 169 (2×C=O).

II.2.3. Synthèse du *N*-(6-(2,4-dinitrophénylamino)-caproyl)-1,2 dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidyléthanolamide (DMPE-DNP)



La dimyristoylphosphatidylethanolamine (10 mg soit 15,7 μ mol) est solubilisée dans 2 ml de CHCl₃ à chaud et en présence de 1,5 équivalents de triéthylamine (NEt₃). On ajoute 2 équivalents de DNP-cap-NHS (12,4 mg soit 31,4 μ mol) solubilisés dans 2 ml de CHCl₃ et le mélange est mis sous agitation une nuit à température ambiante. Le solvant organique est ensuite évaporé à sec. Le DMPE-DNP obtenu est purifié sur colonne chromatographique (éluant : CHCl₃/MeOH (9 :1)). Le rendement de la réaction est de 95 %.

Masse obtenue : 13,7 mg

[M-H]⁻ : 913

Eluant : CHCl₃/MeOH (8:2)

Rf : 0,3-0,4

Test ninhydrine : négatif

RMN¹H (CDCl₃) : 0,87 (t, 6H, 2×CH₃, ³J = 6,1 Hz) ; 1,31 (m, 48H, CH₂) ; 1,6 (m, 8H, CH₂ (22, 9, 10, 11)) ; 2,26 (m, 4H, CH₂ (12 et 2×CH₂-C=O)) ; 2,8 (s, 1H, OH) ; 3,45 (m, 4H, CH₂ (16, 20)) ; 3,91 (m, 4H, CH₂ (8, 15)) ; 4,4 (m, 1H, CH (21)) ; 5,2 (s, 1H, NH) ; 6,96 (d, 1H, CH(2), ³J = 9,48 Hz) ; 8,26 (dd, 1H, CH(5), ³J = 9,45 Hz et ⁴J = 2,45 Hz) ; 8,58 (s, 1H, NH) ; 9,08 (d, 1H, CH(3) ; ⁴J = 2,72 Hz).

RMN¹³C (CDCl₃) : 14,1 (2×CH₃) ; 22,7 (2× CH₂-CH₃) ; 24-36 (CH et CH₂) ; 43,3 (NH-CH₂ (8 et 15)) ; 114,1 (C₆) ; 124,2 (C₃) ; 130,2 (C₂ et C₅) ; 136 (C₄) ; 148,4 (C₁) ; 173,7 (3× C=O).

Annexe 2

Tampons et réactifs utilisés dans le Test du CH50

Les tampons utilisés pour réaliser le test du CH50 sont préparés le jour même à partir de solutions "stock" et conservés à 4°C. Les solutions "stock" sont conservées à 4°C pendant 3 semaines maximum.

Solutions STOCK

- **Solution "stock" VBS 5X (Veronal Buffer Saline)
concentrée 5X**

NaCl	42,5 g
Diéthylmalonylurée sodée (diethylbarbital sodium)	1,875 g
Diéthylmalonylurée (diethylbarbituric acid)	2,875 g
Azide de sodium (solution à 0,1 %)	10 ml
Eau distillée	qsp 1 l

Dissoudre l'acide barbiturique dans 600 ml d'eau distillée chaude. Ajouter 400 ml d'eau distillée contenant le diéthylbarbital, le NaCl et l'azide de sodium. Mélanger et laisser refroidir. Ajuster le pH de la solution à 7,4 .

- **Solution "stock" de CaCl₂ 0,03M**

CaCl ₂ (Mm=147,02)	0,441 g
Eau distillée	qsp 100 ml

- **Solution "stock" de MgCl₂ 0,1M**

MgCl ₂ (Mm=203,3)	2,033 g
Eau distillée	qsp 100 ml

- **Solution "stock" d'EDTA 86 mM (pH 7,5)**

EDTA (Mm=292,95)	12,6 g
NaOH 10N	12,5 ml
Eau distillée	qsp 500 ml

- **Solution "stock" de NaCl 0,15M**

NaCl (Mm=58,44)	8,8 g
Eau distillée	qsp 1 l

Solutions tampon

- **Tampon VBS²⁺**

solution CaCl ₂ stock	0,5 ml
solution MgCl ₂ stock	0,5 ml
VBS de la solution stock dilué 5 fois (VBS 1X)	qsp 100 ml

- **Tampon VBS-EDTA 0,04M**

VBS 1X	53,5 ml
Solution EDTA stock	46,5 ml

CHAPITRE I : Données Bibliographiques

Figure 1 : Topologie et architecture fonctionnelle d'une immunoglobuline humaine (Bach J.F. 1993).....	7
Figure 2 : Représentation schématique de différentes formes d'Ac préparés par digestion enzymatique ou par génie génétique (Sharkey et al. 2005).....	10
Figure 3 : Représentation schématique d'une IgG et des Ac chimériques et humanisés (Sharkey et al. 2005).....	13
Figure 4 : Représentation schématique de techniques de préciblage en 2 et 3 étapes utilisant le système avidine-biotine (Sharkey et al. 2005).....	37
Figure 5 : Représentation schématique d'une technique de préciblage en 2 étapes utilisant un AcM bispécifique et un haptène bivalent radiomarqué par l'intermédiaire d'un agent chélatant, le DOTA (Sharkey et al. 2005).....	38
Figure 6 : Structure d'un liposome formé..... d'une bicouche de phospholipides (http://dadairs.com).....	43
Figure 7 : Représentation schématique des différents assemblages possibles de phospholipides.....	45
Figure 8 : Structure des phospholipides (http://www.snv.jussieu.fr).....	46
Figure 9 : Représentation schématique des 4 principaux types de liposomes (Storm et Crommelin, 1998).....	55
Figure 10 : Préparation des liposomes par hydratation d'un film lipidique (http://www.avanti.lipids.com).....	59
Figure 11 : Technique d'extrusion sur membranes de polycarbonate grâce au mini-extruder™ (Avanti® Polar Lipids).....	61
Figure 12 : Formation de liposomes REV par la technique d'évaporation en phase inverse (Weinstein 1981, d'après une figure de Szoka et Papahadjopoulos 1978).....	64
Figure 13 : Schéma d'un liposome unilamellaire représentant la localisation des molécules encapsulées en fonction de leur solubilité (Devoisselle 1997).....	69
Figure 14 : Modèle d'encapsulation d'une base faible dans un liposome unilamellaire grâce à un gradient de protons. La forme non protonée A diffuse à travers la membrane jusqu'à ce que les concentrations à l'intérieur et à l'extérieur du liposome soient égales. En milieu acide, la forme protonée AH ⁺ est piégée à l'intérieur (Cullis 1997).....	71
Figure 15 : Représentation schématique de la phagocytose d'une particule (http://anne.decoaster.free.fr).....	78
Figure 16 : Interactions des liposomes avec les lipoprotéines plasmatiques (d'après Devoisselle et Soulié-Bégu, 2001).....	81
Figure 17 : Différents types d'interactions entre cellules et liposomes (Weinstein et Leserman, 1984).....	83

Figures 18 : Représentation schématique de la structure des endothéliums capillaires (Deviessaguet et Puisieux, 1993 d'après un schéma de Hwang K.J.).....	85
Figure 19 : L'interaction des liposomes furtifs avec les protéines plasmatiques (opsonines) est réduite, limitant ainsi la captation par les macrophages du SPM. .	90
Figure 20 : Différents types de ciblage des liposomes.....	93
Figure 21 : Représentation schématique des trois types de base d'immunoliposomes (Koning 2002).....	94
Figure 22 : Représentation schématique du concept ADEPT (Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy) avec des immuno-enzymosomes. Quand la prodrogue est injectée, elle est activée par les enzymes pré-localisées sur la surface de la cellule tumorale grâce aux immunoliposomes. Elle peut alors agir et détruire la cellule (Lasic, 1998).	103
Tableau 1 : Caractéristiques des différentes classes d'immunoglobulines.....	8
Tableau 2 : Propriétés pharmacocinétiques des Ac et des fragments (d'après Sharkey et al. 2005).	11
Tableau 3 : Propriétés physiques des radioéléments présentant un intérêt pour la RIT.	20
Tableau 4 : Principaux phospholipides utilisés dans la formulation des liposomes (Avanti® Polar Lipids / Fattal et al. 1993).	48
Tableau 5 : Classification des liposomes selon Papadopoulos (1977).	52
Tableau 6 : Différents groupements chimiques utilisés pour le couplage Ac / PEG. Les méthodes de couplage entre PEG et Ac ainsi que la synthèse des différents PEG fonctionnalisés sont détaillées par Zalipsky et al. (1993, 1995).....	97
Tableau 7 : Formulations liposomales commercialisées ou en cours d'évaluation clinique (Barrat 2000).....	100
Tableau 8 : Indications des formulations liposomales d'anthracyclines commercialisées (Drummond et al. 1999).	106

CHAPITRE II : Données expérimentales

- Figure 1:** Exemple d'un profil d'élution d'une solution de liposomes radiomarqués purifiés par gel-filtration (colonne PD10 ayant un seuil d'exclusion de 10000). . 123
- Figure 2:** Mesure du diamètre des liposomes conventionnels par spectroscopie à corrélation photonique. Chaque mesure est réalisée 3 fois et donne le diamètre moyen des vésicules (98,5; 103,5 et 101,1 nm) et les index de polydispersité correspondants (0,0622; 0,0743 et 0,0643)..... 125
- Figure 3:** Profils d'élution sur Sephadex G25 d'une solution d'indium-111 témoin et d'une solution de liposomes EPC/Chol/DMPE-DTPA (66:33:1) marqués à l'indium-111. L'élution est réalisée en tampon citrate/acétate. 128
- Figure 4:** taux de marquage des liposomes DMPC/Chol/DMPE-DTPA (66:33:1) en fonction de l'activité d'indium-111 en kBq utilisée par nmol de lipides. 129
- Figure 5:** Taux de marquage des liposomes DMPC/Chol/DMPE-DTPA en fonction du nombre d'équivalents de DTPA par rapport à l'indium-111, après 2 h d'incubation à température ambiante..... 130
- Figure 6:** Principe du radiomarquage par encapsulation du réactif de Bolton-Hunter marqué à l'iode dans des liposomes contenant de l'arginine..... 133
- Figure 7:** CCM sur gel de silice révélée par le phosphor-imager, représentant la migration des différents réactifs iodés en $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (1:1 v/v)..... 138
- Figure 8:** Influence de la quantité de Chloramine T sur la formation de Bolton-Hunter mono ou diiodé. 140
- Figure 9 :** Profils d'élution sur Sephadex® G25 du réactif de Bolton-Hunter marqué à l'iode-125 (BH témoin), hydrolysé (BH hydrolysé), couplé à l'arginine (BH arginine) ou encapsulé dans des liposomes contenant de l'arginine (BH encapsulé). 141
- Figure 10:** Influence de la température et du temps d'incubation sur l'encapsulation du ^{125}I -BH dans des liposomes DMPC/Chol/DMPE-PEG2000 (65 :30 :5). L'histogramme représente le nombre de moles de réactif encapsulées dans les liposomes à 55°C ou à 37°C en fonction du temps d'incubation, compris entre 5 et 60 minutes (N=5). 143
- Figure 11 :** Influence de la concentration lipidique et de la formulation sur le taux d'encapsulation du ^{125}I -BH. Des solutions de liposomes conventionnels (N=12) et pégylés (N=10) de concentrations croissantes ont été incubées 30 minutes à 37°C

avec 500 nmol de 125I-BH. La figure représente les taux d'encapsulation obtenus (courbe) ainsi que les quantités de réactif encapsulées (histogrammes)..... 144

Figure 12 : Taux d'encapsulation du 125I-BH en fonction de la quantité initiale de réactif. La courbe représente le nombre de moles de réactif encapsulées (en orange) et les taux d'encapsulation obtenus (en vert) après 30 minutes d'incubation à 55°C, de liposomes conventionnels (1 mmol de lipides) avec 9 à 1500 nmol du réactif iodé. 145

Figure 13: CCM sur gel de Silice révélée au phosphor-imager après migration des réactifs en CHCl₃/AcOEt (1 :1 v/v)..... 147

Figure 14: CCM sur gel de Silice en CHCl₃/AcOEt (1 :1 v/v) des liposomes contenant de l'arginine radiomarqués avec le 125I-BH après 15 h en tampon phosphate à 4°C. 147

Figure 15: Stabilité des liposomes DMPC/Chol/DMPE-DTPA (66 :33 :1) marqués à l'indium-111 (7,4 kBq/nmol). Evolution du taux de marquage en tampon citrate/acétate (10mM/170mM, pH 5,3) à 4°C et en milieu sérique à 37°C..... 156

Figure 16: Evolution dans le temps du taux d'encapsulation du 125I-HPPA dans des liposomes DMPC/Chol (66 :34) en fonction de la température. 156

Figure 17 : Stabilité du 125I-BH encapsulé dans des liposomes conventionnels ou pégylés contenant de l'arginine, incubés à 37°C en sérum ou à 4°C en tampon phosphate 150 mM (pH 5,6). 157

Figure 18: Influence de la composition lipidique des liposomes sur la stabilité sérique d'un marquage par encapsulation du 125I-BH. L'histogramme montre le pourcentage de radioactivité encore associé aux liposomes après 1h, 2h et 24h d'incubation en sérum à 37°C, pour quatre formulations différentes..... 158

Figure 19: Consommation du complément (CH50 en %) en présence de liposomes conventionnels (DMPC/Chol 66:34) et de liposomes pégylés (DMPC/Chol/DMPE-PEG2000 65:30:5 ou 67:30:3) et de nanoparticules de PMMA, en fonction de leur surface en cm². 168

Figures 20 et 21: Biodistribution chez la souris de liposomes DMPC/Chol/DMPE-DTPA marqués à l'indium-111, 24 h après injection de 0, 20 ou 100 µg d'Ac. Moyennes et écarts-types des % DI / g de tissu 3 h et 24 h après l'injection de 50 nmol de lipides/souris 177

Figures 22 et 23: Biodistribution chez la souris de liposomes DMPC/Chol/DMPE-DTPA marqués à l' indium-111, 24 h après injection de 0, 20 ou 100 µg d'Ac. Moyennes et écarts-types des % DI / g de foie et de rate 3 h et 24 h après l'injection de 50 nmol de lipides/souris. 177

Figures 24 et 25: Biodistribution chez la souris de liposomes DMPC/Chol/DMPE-DTPA marqués à l' indium-111 24 h après injection de 0, 20 ou 100 µg d'Ac. Moyennes et écarts-types des rapports tumeur / organe 3 h et 24 h après l'injection de 50 nmol de lipides/souris. 177

- Figures 26 et 27:** Cinétiques sanguines représentées par le %DI/g de sang en fonction du temps, chez la souris des liposomes conventionnels (à gauche) et des liposomes pégylés (à droite) sur une période de 30 h. 178
- Figure 28:** Comparaison des cinétiques sanguines chez la souris des liposomes conventionnels et pégylés (400 nmol) marqués à l'iode-125, sur 6h. Représentation semi-logarithmique des moyennes et écart-types des % DI/g obtenus pour les liposomes conventionnels (en bleu, n=3), les liposomes pégylés (en orange, n=4) et le réactif de BH couplé à l'arginine (n=4), ainsi que les valeurs calculées par le logiciel "pharmacokinetics" (-) aux temps 5, 15, 30 minutes et 1, 2, 4 et 6h. 179
- Figures 29 à 32:** Biodistribution chez la souris de liposomes pégylés DMPC/Chol/DMPE-DTPA/DMPE-PEG2000 (64:30:1:5) marqués l'iode-125 par encapsulation du 125I-BH (en vert), ou à l'indium-111 (en orange), 10 minutes, 1h, 4h ou 24h, après injection de 500 à 600 nmol de lipides/souris. Moyennes et écart-types des % DI/g de tissus pour les principaux organes. 182
- Figure 33:** Elimination des liposomes marqués à l'iode-125 (en vert) ou à l'indium-111 (en orange) à 10 minutes, 1h et 4h. Moyennes et écart-types des % DI dans les urines, le foie, la rate et la somme des % DI des trois (U+F+R) représentant l'élimination globale..... 182
- Figures 34 et 35:** Comparaison des biodistributions dans les principaux organes et le sang, à 1h et 4h, de liposomes pégylés marqués à l'indium-111, composés de DMPC/Chol/DSPE-DTPA/DMPE-PEG2000 (63:30:1:5) en vert foncé ou de DSPC/Chol/DSPE-DTPA/DMPE-PEG2000 (64:30:1:5) en vert clair..... 183
- Tableau 1:** Proportion de réactif monoiodé ou diiodé obtenu en fonction du nombre initial de moles de réactif marquées avec 0,06 nmol d'iode-125. L'excès d'iode est obtenu en ajoutant de l'iodure de sodium froid (8 nmol)..... 139

Etude de faisabilité du radiomarquage et du préciblage de liposomes pour la radioimmunothérapie.

RESUMÉ

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'efficacité de liposomes radiomarqués dans l'immunociblage des tumeurs. L'efficacité de la radioimmunothérapie est en partie limitée par la faible activité que peuvent délivrer les anticorps aux cellules tumorales. Pour résoudre ce problème, nous avons essayé d'encapsuler de la radioactivité dans des liposomes préformés puis de les cibler vers des tumeurs à l'aide d'anticorps bispécifiques capables de reconnaître à la fois un antigène tumoral et un haptène couplé à la paroi des liposomes. Deux approches ont été testées: le marquage en surface avec de l'indium-111 après couplage à un agent chélatant (DTPA) et le marquage de la phase interne des liposomes à l'aide de composés radio-iodés. Le radiomarquage de la phase aqueuse des liposomes par l'intermédiaire d'esters activés marqués à l'iode confirme que l'on peut obtenir des activités spécifiques nettement supérieures à celles décrites dans la littérature. L'originalité de ce travail est le couplage de ces esters à des fonctions amines pré-encapsulées, limitant ainsi la fuite de la radioactivité hors des liposomes. Une étude réalisée chez l'animal a permis d'optimiser la formulation des liposomes, de confirmer la stabilité des radiomarquages et de démontrer la faisabilité d'un ciblage tumoral spécifique chez la souris. Les résultats sont prometteurs et l'optimisation du préciblage *in vivo* des liposomes radiomarqués devrait permettre leur utilisation thérapeutique.

Mots clés: *Liposomes, Bolton-Hunter, radioimmunothérapie, préciblage, anticorps monoclonaux bispécifiques.*

Radiolabeled liposomes for pretargeted radioimmunotherapy.

ABSTRACT

The aim of this thesis consists in evaluating efficiency of radiolabeled liposomes for tumors pretargeting. Efficacy of radioimmunotherapy is often limited by the low radioactive doses delivered by the antibody to the tumor cells. One way to solve the problem is the targeting of encapsulated radionuclides. To validate this possibility we have developed methods to radiolabel preformed liposomes properties prior to target them to tumor cells by using bispecific antibodies (anti-antigen and anti-hapten associated to the liposome membrane. Liposomes were then labeled in surface using ¹¹¹In-DTPA complexe, and internally by active loading of radioiodinated compounds. The originality of the method consists in encapsulating activated esters that may be readily halogenated, and cross the liposome membrane prior to react with arginine inside the liposomes, increasing the stability of the radiolabeling. Animal studies have been initiated to demonstrate the in vivo stability of the radiolabeling and the capacity of these liposomes to specifically deliver therapeutic doses of radioactivity to tumor cells. Optimization of the pretargeting with this radiolabeled liposomes should permit therapeutic use.

Keywords: Liposomes, Bolton-Hunter, radioimmunotherapy, pretargeting, bispecific monoclonal antibodies.