

**MEMOIRE DU DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES**  
*de Pharmacie Spécialisée*

Soutenu devant le Jury interrégional

le 30 Avril 2004

par **Marie MOUGIN-DEGRAEF**

Conformément aux disposition de l'Arrêté du 6 Mai 1987 tient lieu de

**THESE**

pour le **DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Les liposomes : aspects technologiques et pharmaceutiques.**  
**Radiomarquage des liposomes pour le ciblage**  
**en radioimmunothérapie.**

*Président :* M. Alain PINEAU. Professeur de Toxicologie

**Membres du Jury:** M. Alain FAIVRE-CHAUVET. Maître de Conférences de  
Biophysique

M<sup>me</sup> Catherine PASSIRANI. Maître de Conférences de Pharmacotechnie

M<sup>me</sup> Isabelle FURIC. Praticien Hospitalier en Pharmacie Hospitalière

M. Jean-François GESTIN. Directeur de Recherche INSERM

Quelques figures sont manquantes dans cette thèse électronique ;  
 Pour les consulter, voir la thèse papier.

## TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1	
PREMIERE PARTIE		
Les liposomes : aspects technologiques, pharmaceutiques et comportement in vivo		
I. GENERALITES.....		
I.1.Historique.....	4	<b>4</b>
I.2. Définitions.....	4	<b>4</b>
I.3. Propriétés.....	5	<b>4</b>
I.4. Structure et matières premières.....	6	<b>4</b>
I.4.1. Morphologie des liposomes.....	6	<b>5</b>
I.4.2. Composition des liposomes.....	8	<b>6</b>
4.2.1. Les phospholipides.....	8	6
4.2.2. Les stéroïdes.....	12	6
I.4.3. Formulation et stabilisation des liposomes.....	12	8
I.5. Classifications des liposomes.....	13	8
I.5.1. Selon leurs critères morphologiques.....	13	12
I.5.2. Selon leur composition et leurs applications in vivo.....	15	12
5.2.1. Liposomes conventionnels.....	15	<b>13</b>
5.2.2. Liposomes furtifs.....	15	13
5.2.3. Immunoliposomes.....	16	15
5.2.4. Liposomes cationiques.....	17	15
I.5.3. Selon des critères technologiques.....	17	15
II. PREPARATION DES LIPOSOMES.....		
II.1. Méthodes mécaniques de dispersion des phospholipides.....	18	17
II.1.1. Hydratation d'un film lipidique.....	19	17
Mécanisme de formation des vésicules.....	19	
		<b>18</b>
		<b>18</b>

Préparation d'un film phospholipidique.....	20	
La phase aqueuse.....	20	
II.1.2. Sonication.....	21	
II.1.3. Extrusion.....	22	
1.3.1. Membranes de polycarbonate.....	22	
1.3.2. Presse de French.....	23	
II.1.4. Microfluidisation.....	24	
II.2. Méthodes basées sur l'élimination d'un solvant organique.....	24	
II.2.1. Evaporation en phase inverse.....	24	
II.2.2. Injection d'une solution éthanolique de phospholipides / Infusion d'éther.....	25	<b>25</b>
II.3. Méthodes basées sur l'utilisation de détergents : dispersion demicelles mixtes.....	26	<b>26</b>
II.4. Méthodes utilisant des liposomes pré-formés.....	26	<b>26</b>
II.4.1. Congélation-décongélation (« Freeze-thaw method »).....	26	<b>26</b>
II.4.2. Lyophilisation-réhydratation (« Freeze-drying method »).....	27	26
		27
III. ENCAPSULATION DE SUBSTANCES DANS LES LIPOSOMES.....	28	
III.1. Mesure de l'efficacité d'encapsulation.....	28	<b>28</b>
III.1.1. Pourcentage d'encapsulation (ou taux d'encapsulation).....	28	<b>28</b>
III.1.2. Encapsulation pondérée.....	29	28
III.1.3. Volume aqueux encapsulé.....	29	
III.2. Facteurs influençant la capacité d'encapsulation des liposomes....	30	29
III.2.1. Type de substances à encapsuler.....	30	29
III.2.2. Type de liposomes.....	31	<b>30</b>
III.3. Principaux modes d'encapsulation.....	32	30
III.3.1. Encapsulation passive.....	32	31
III.3.2. Encapsulation active (« Active loading »).....	33	<b>32</b>
3.2.1. Formation d'un gradient de pH.....	33	
3.2.2. Formation d'un gradient de potentiel.....	36	32
3.2.3. Utilisation d'un détergent.....	36	33
III.4. Stabilité des préparations liposomiales (in vitro).....	37	33
III.4.1. Composition phospholipidique (qualitative et quantitative).....	37	36
III.4.2. Méthode d'encapsulation.....	38	36
		<b>37</b>
		37
		38

III.4.3. Ratio PA/Lipide.....	38	
III.4.4. Effet de l'osmolarité.....	39	
III.5. Séparation des substances non encapsulées.....	39	
IV. DEVENIR IN VIVO DES LIPOSOMES.....	41	
IV.1. Stabilité des liposomes dans le sang.....	41	
IV.1.1. Interaction des liposomes avec les cellules du système phagocytaire mononucléée (ou système réticulo-endothélial).....	41	
La phagocytose.....	42	
L'opsonisation.....	43	
IV.1.2. Interaction des liposomes avec les lipoprotéines plasmatiques....	44	
IV.1.3. Interaction des liposomes avec les cellules sanguines.....	44	
IV.2. Mécanismes d'interactions liposomes-cellules.....	46	
IV.3. Biodistribution.....	48	
IV.3.1. Situation physiologique.....	48	
IV.3.2. Situation pathologique.....	50	
IV.4. Pharmacocinétique.....	51	
IV.4.1. Comment améliorer la durée de vie plasmatique des liposomes ?	52	<b>51</b>
Augmentation de la dose.....	52	52
Diminution de la taille.....	52	52
Influence de la composition.....	53	52
Influence de la charge et de l'hydrophilie de surface.....	53	53
IV.4.2. Les liposomes « furtifs ».....	54	53
		54
V. LES IMMUNOLIPOSOMES.....	56	
V.1. Différents principes de ciblage spécifique des liposomes.....	57	<b>57</b>
V.2. Différents types d'immunoliposomes.....	58	<b>58</b>
V.3. Différentes techniques de couplage liposomes-anticorps (Ac).....	60	<b>59</b>
V.3.1. Techniques de couplage covalent.....	60	<b>59</b>
3.1.1. Couplage d'Ac-SH à des liposomes pré-formés.....	60	<b>61</b>
3.1.2. Techniques de thiolation.....	64	61
3.1.3. Couplage d'Ac-NH <sub>2</sub> à des liposomes pré-formés.....	65	61
3.1.4. Couplage d'Ac-maléimide à des liposomes pré-formés.....	65	65
		66
		66
		67

V.3.2. Formation de complexes non covalents stables entre liposomes et anticorps.....	
3.2.1. Complexe protéine A-anticorps.....	66
3.2.2. Complexe avidine-biotine.....	66
V.3.3. Couplage Ac-liposomes par interactions hydrophobes.....	67
V.3.4. Couplage des Ac au polyéthylène-glycol (PEG).....	68
V.3.5. Méthodes de « post-insertion ».....	70
VI. APPLICATIONS THERAPEUTIQUES DES LIPOSOMES.....	72
VI.1. Généralités.....	72
VI.1.1. Liposomes conventionnels : maladies infectieuses et vaccination.	74
VI.1.2. Liposomes furtifs : formes à libération prolongée et ciblage passif.....	75
VI.1.3. Immunoliposomes : ciblage spécifique.....	75
VI.1.4. Liposomes cationiques : thérapie génique.....	76
VI.2. Formes liposomales commercialisées.....	77
VI.2.1. En cancérologie.....	77
VI.2.2. En infectiologie.....	78
VI.3. Perspectives .....	80

## DEUXIEME PARTIE

### Radiomarquage des liposomes pour le ciblage en radioimmunothérapie

I. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....	82	<b>82</b>
I. 1. Présentation de la radioimmunothérapie.....	82	<b>82</b>
I. 2. Intérêt des liposomes en RIT.....	85	<b>86</b>
II. MATERIEL ET METHODE.....	86	<b>87</b>
II. 1. Couplage des agents chélatants et haptènes aux lipides.....	86	<b>87</b>
II. 1.1. Matières premières.....	86	<b>87</b>
II. 1.2. Couplage du DMPE au DTPA.....	87	<b>87</b>
II. 1.3. Couplage du DMPE au DNP-cap en 2 étapes.....	89	<b>88</b>
1.3.1. Synthèse du NHS-DNP-cap.....	89	<b>90</b>
1.3.2. Couplage du DMPE au NHS-DNP-cap.....	89	<b>90</b>

II. 2. Préparation des liposomes.....	91	
II. 2.1. Matières premières.....	91	
II. 2.2. Formulation et synthèse.....	91	
2.2.1. Formulation .....	91	
2.2.2. Préparation du film lipidique.....	92	
2.2.3. Préparation de la phase aqueuse.....	92	
II. 2.3. Extrusion.....	94	
II. 2.4. Formation d'un gradient de pH et purification.....	94	
II. 2.5. Contrôle et stabilité.....	95	
II. 3. Résistance des liposomes aux rayonnements ionisants.....	96	
II. 4. Radiomarquage des liposomes.....	96	
II. 4.1. Matières premières.....	96	
II. 4.2. Marquage de la paroi des liposomes à l'indium-111 .....	97	
II. 4.3. Encapsulation active du réactif de Bolton-Hunter radiomarqué.....	98	
4.3.1. Radiomarquage du réactif de Bolton-Hunter (BH).....	99	
4.3.2. Encapsulation active du BH marqué à l'iode.....	100	
II. 4.4. Tests de stabilité.....	100	
II. 4.5. Tests d'immunoréactivité.....	101	
III. RESULTATS.....	102	
III. 1. Purification et contrôle des liposomes.....	102	
III. 1.1. Purification par HPLC et PD10.....	102	
III. 1.2. Contrôle de la concentration en lipides après PD10.....	103	
III. 1.3. Contrôle de la taille des liposomes.....	103	
III. 2. Résistance des liposomes aux rayonnements ionisants.....	103	<b>104</b>
III. 3. Marquage de la paroi des liposomes.....	107	<b>108</b>
III. 4. Marquage par encapsulation active.....	108	<b>108</b>
III. 4.1. Radiomarquage du réactif de Bolton-Hunter.....	108	<b>109</b>
III. 4.2. Encapsulation active (EA) dans les liposomes.....	110	109
4.2.1. Premiers essais d'encapsulation active.....	110	111
4.2.2. Amélioration des quantités de réactif encapsulées.....	111	111
4.2.3. Influence de la composition liposomale sur les taux d'encapsulation .....	114	112
4.2.4. Encapsulation active de fortes activités de réactif marqué		115

à l'iode-131.....	114
III. 5. Tests de stabilité et immunoréactivité in vitro.....	114
IV. DISCUSSION.....	117
IV. 1. Radiomarquage des liposomes.....	117
IV. 1.1. Marquage de la paroi des liposomes.....	117
IV. 1.2. Marquage par encapsulation active.....	119
IV. 2. Liposomes et radioimmunothérapie.....	121
IV. 2.1. Choix du radionucléide.....	121
IV. 2.2. Liposomes et ciblage tumoral passif.....	124
IV. 2.3. Liposomes et ciblage tumoral actif (immunociblage).....	125
IV. 3. Perspectives.....	126
CONCLUSION.....	129
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	130
Figures et tableaux de la PARTIE I.....	146
Figures et tableaux de la PARTIE II.....	148

## LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

<b>ACE</b>	Antigène carcino-embryonnaire
<b>Ac</b>	Anticorps
<b>AcM</b>	Anticorps monoclonaux
<b>AES</b>	Affinity Enhancement System
<b>BH</b>	Réactif de Bolton-Hunter
<b>Bq</b>	Symbole du Becquerel
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Chloroforme
<b>Chol</b>	Cholestérol
<b>Ce</b>	capture électronique
<b>Ci</b>	Symbole du Curie
<b>CF</b>	Carboxyfluorescéine
<b>CPM</b>	Coups par minute
<b>CT</b>	Chloramine T
<b>DI</b>	Dose injectée
<b>DMFa</b>	Diméthylformamide anhydre
<b>DMPC</b>	Dimyristoyl phosphatidylcholine
<b>DMPE</b>	Dimyristoyl phosphatidyléthanolamine
<b>DNP</b>	Acide 2,4-dinitrophénylaminocaproïque
<b>DOX</b>	Doxorubicine
<b>DOTA</b>	Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-N,N',N'',N'''-tétraacétique
<b>DTPA</b>	Acide diéthylènetriaminepentaacétique
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>EPC</b>	Egg phosphatidylcholine
<b>G<sub>M1</sub></b>	Monosialoganglioside
<b>HMPAO</b>	Hexaméthylpropylèneamine oxime



<b>HYNIC</b>	Hydrazinonicotinamide
<b>LUV</b>	Large unilamellar vesicle
<b>MeOH</b>	Méthanol
<b>MLV</b>	Multilamellar vesicle
<b>NHS</b>	N-hydroxysuccinimide
<b>PA</b>	Principe actif
<b>PBS</b>	Phosphate buffer saline
<b>PE</b>	Phosphatidyléthanolamine
<b>PEG</b>	Polyéthylène glycol
<b>RES</b>	Reticulo-endothelial System
<b>RIT</b>	Radioimmunothérapie
<b>SMPB</b>	N-succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrate
<b>SPDP</b>	N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate
<b>SPM</b>	Système des phagocytes mononucléés
<b>SUV</b>	Small unilamellar vesicle
<b>TE</b>	Taux d'encapsulation
<b>TEL</b>	Transfert d'énergie linéique
<b>T<sub>m</sub></b>	Température de transition de phase
<b>§</b>	Chapitre

## INTRODUCTION

Utilisés en clinique depuis une dizaine d'années, les liposomes sont un des rares cas de systèmes médicamenteux expérimentés pour la voie parentérale présentant une structure vésiculaire. Cette vectorisation médicamenteuse rendue possible par une formulation à base de lipides biodégradables et atoxiques, confère au principe actif encapsulé une pharmacocinétique et une biodistribution guidées par les caractéristiques du liposome lui-même. En effet, les facteurs essentiels qui guident alors leur comportement *in vivo* sont la taille, la charge de surface des liposomes et enfin la fluidité de la paroi, et l'on devine ici toute l'importance de la formulation des liposomes qui est complexe et qui doit prendre en compte les caractéristiques des substances que l'on veut encapsuler. Le mécanisme d'action dépend ensuite des propriétés de la cible elle-même : interaction liposome - cellule cible et du mécanisme de dégradation des liposomes *in vivo* dans le but de libérer le principe actif sur le site d'action désiré.

La première partie de ce mémoire présente différents aspects pharmaceutiques (structure, propriétés, formulation), techniques (modes de préparation et d'encapsulation de substances actives) ainsi que le comportement *in vivo* des liposomes. De nombreuses études pré-cliniques démontrent leur intérêt en thérapeutique, mais la réalité clinique des liposomes résulte avant tout des progrès réalisés au niveau galénique et technique. L'efficacité clinique des liposomes est démontrée en chimiothérapie anticancéreuse et dans le traitement des infections fongiques, mais les liposomes semblent prometteurs dans de nombreux domaines comme l'immunologie, plus particulièrement dans le développement de nouveaux vaccins, en imagerie médicale ou en thérapie génique, pour ne citer que les principaux.

Le développement de liposomes à demi-vie prolongée (liposomes « furtifs ») ou vectorisés spécifiquement à l'aide d'anticorps (immunoliposomes), a considérablement étendu les perspectives d'utilisation des liposomes en clinique comme vecteurs de principes actifs. L'utilisation des immunoliposomes pour cibler et traiter de façon spécifique des cellules tumorales est en effet un modèle thérapeutique tout à fait attractif, et le fait de les radiomarquer avec de fortes activités pourrait faire de ces liposomes un outil thérapeutique très prometteur pour une application en radioimmunothérapie.

La deuxième partie de ce mémoire est consacrée à l'étude expérimentale réalisée au sein de l'unité INSERM 601 de Nantes. Elle a pour but d'optimiser le radiomarquage de liposomes et d'évaluer leur efficacité pour l'immunociblage des tumeurs. Si l'efficacité de la radioimmunothérapie (RIT) a été démontrée dans le traitement des tumeurs hématologiques, elle reste à démontrer pour les tumeurs solides. En effet, pour les tumeurs solides, l'efficacité thérapeutique de la RIT est limitée en partie par la faible activité spécifique obtenue en utilisant des anticorps ou des peptides radiomarqués. L'utilisation de liposomes radiomarqués pourrait être une des voies possibles d'optimisation de la RIT. Dans ce contexte, quelle amélioration les liposomes peuvent-ils apporter et quelles sont les limites d'une telle application ?

# PREMIERE PARTIE

Les liposomes : aspects technologiques,  
pharmaceutiques et comportement *in vivo*.

# I. GENERALITES SUR LES LIPOSOMES

## I. 1. Historique

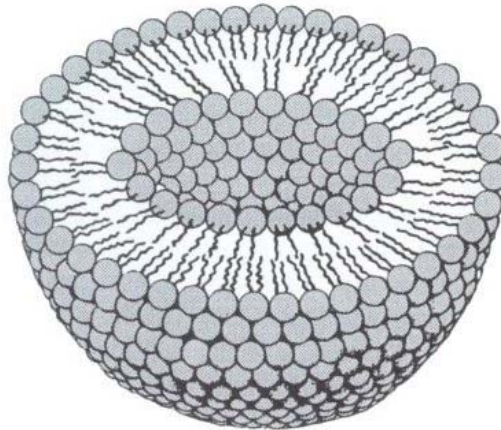
L'introduction récente des liposomes dans l'arsenal thérapeutique, en cancérologie et en infectiologie, représente l'aboutissement d'efforts considérables déployés en recherche et développement. Les liposomes ont été décrits par Bangham, il y a plus de trente ans, et les premières recherches sur l'encapsulation 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.

A présent, il existe plusieurs sociétés de biotechnologies qui travaillent exclusivement avec des liposomes pour le développement de plusieurs traitements antibiotiques, anti-tumoraux, anti-asthmatiques, enzymatiques, mais aussi en thérapie génique ou en vaccination.

## I. 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 1*). Leur intérêt réside principalement sur la possibilité de vectoriser des substances, soit par inclusion dans la membrane lipidique, soit par encapsulation dans l'espace interne. Il est donc possible d'y encapsuler 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.



*Fig.1 : Structure d'un liposome formé  
d'une bicouche de phospholipides (<http://dadairs.com>)*

### **I. 3. Propriétés**

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 le principal 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. D'autre part, plusieurs avantages sont liés à l'encapsulation d'un principe actif (PA) dans des liposomes (Storm et Crommelin, 1998) :

**1. Libération programmée dans le temps** en fonction de la fluidité de la paroi liposomiale. Si une réponse pharmacologique rapide est souhaitée, on peut utiliser des liposomes « fragiles » ayant une bicouche lipidique fluide.

**2. Maintien de l'intégrité du PA** grâce au confinement dans les liposomes évitant les dégradations possibles dans la circulation sanguine.

**3. Diminution de la toxicité du PA :** C'est un des avantages essentiels des liposomes du fait de leur faible capture dans des tissus comme le rein, le cœur ou le tractus gastro-intestinal. Le liposome peut être un moyen de protéger le patient contre les effets toxiques des principes actifs encapsulés. Par exemple, l'encapsulation de doxorubicine dans les liposomes permet de diminuer fortement la toxicité cardiaque observée avec les

anthracyclines. Il en est de même pour la néphrotoxicité de l'amphotéricine B. Ils permettent également d'éviter l'apparition d'effets secondaires au moment de l'administration sous-cutanée, intra-dermique ou intra-musculaire, que l'on observe avec certains principes actifs irritants.

**4. Ciblage du PA :** L'élimination des liposomes s'effectue par capture par les cellules du système phagocytaire mononucléé (SPM) (*cf* § IV.1). Leur endocytose augmente la concentration du PA au niveau cellulaire (lysosomes) ce qui confère un intérêt dans le traitement d'infections parasitaires ou microbiennes. Par contre, le ciblage de tissus différents du SPM relève de la mise au point de nouvelles formulations de liposomes permettant la libération du PA sur le site d'action.

**5. Solubilisation de PA peu solubles dans l'eau :** Le liposome peut s'avérer intéressant pour pouvoir injecter par voie intra-veineuse des composés lipophiles ou très peu solubles dans l'eau. C'est le cas de l'amphotéricine B qui est un PA lipophile dont il existe différentes formulations lipidiques sous forme de micelles (Fungizone<sup>®</sup>), de complexe lipidique (Amphotec<sup>®</sup>) ou de liposomes (AmBisome<sup>®</sup>).

## I. 4. Structure et matières premières

### I. 4.1. Morphologie des liposomes

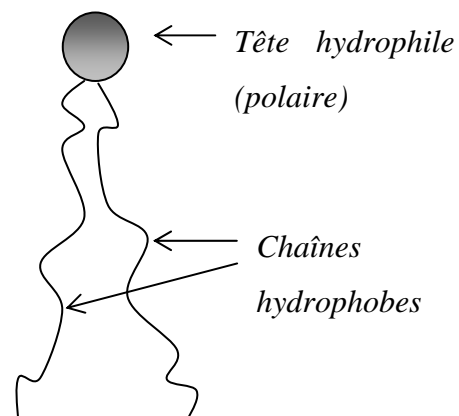
Les liposomes sont des systèmes constitués de molécules amphiphiles bicaténaires (deux chaînes hydrocarbonées et une tête polaire) dont la représentation schématique est présentée ci-dessous.

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 :

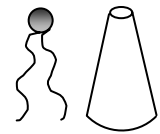
**V** : volume de la partie hydrophobe



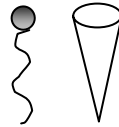
$L_c$  : longueur de la chaîne hydrophobe

$a$  : surface occupée par la tête polaire

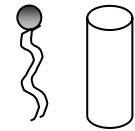
Lorsque  $PP \gg 1$  : on obtient des phases hexagonales ou micelles inverse,



$PP \ll 1$  : micelles,

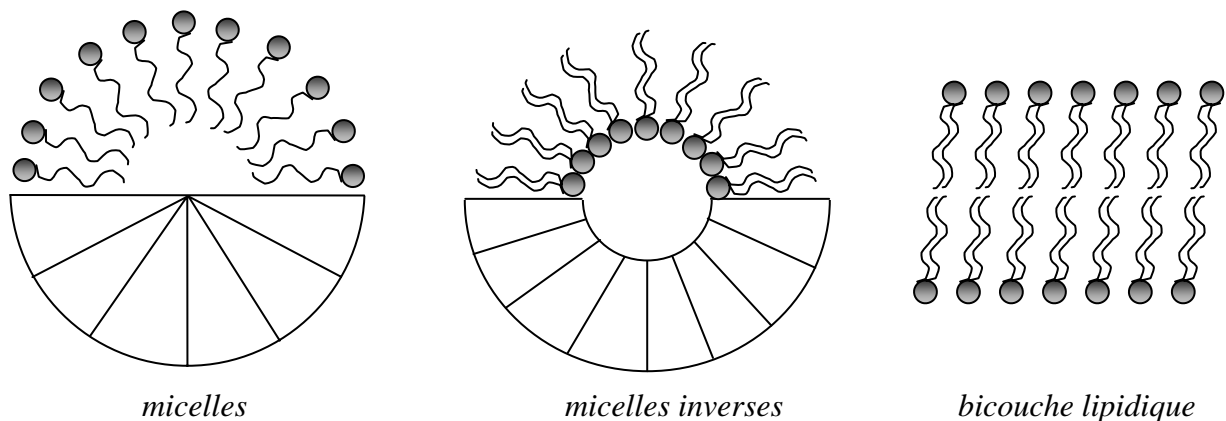


$PP = 1$  : les molécules amphiphiles vont former des bicouches.



La formation de bicouches est caractéristique des molécules lipidiques 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 2*).

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  $PP \gg 1$ .



*Fig. 2 : Représentation schématique des différents assemblages possibles de phospholipides.*

Avec les molécules amphiphiles, il est possible de former des systèmes autres que les liposomes, comme les nanoparticules (nanocapsules et nanosphères) qui sont des particules colloïdales solides de nature polymérique, ou encore, les



nanoémulsions constituées d'une monocouche de phospholipides limitant un espace interne huileux (Devoisselle 1997).

## **I. 4.2. Composition des liposomes**

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. Par contre, ils ont l'avantage d'être atoxiques et facilement dégradés, car ils font partie des constituants naturels des membranes biologiques.

Lors de la préparation des liposomes, il est indispensable de fixer au préalable différents paramètres comme le rapport molaire des différents constituants lipidiques, la concentration finale en lipides dans la suspension, ainsi que le volume final de la suspension. Ces paramètres permettent, connaissant le poids moléculaire de chacun des composés, de calculer les quantités de lipides à utiliser pour la préparation.

ex : EPC/Cholestérol/ phosphatidylglycérol 7/2/1, 20 mM, 2 ml

### ***4.2.1. Les phospholipides***

Les phospholipides les plus employés (*figure 3*) sont des glycérophospholipides d'origine naturelle (lécithines de soja ou de jaune d'œuf) ou synthétique (phosphatidylcholines, phosphatidylsérines, phosphatidylglycérols et phosphatidyléthanolamines) et des sphingolipides (sphingomyélines) . Les phospholipides naturels sont disponibles à différents degrés de pureté. Ils sont hétérogènes (longueur des chaînes lipidiques, degré d'insaturation) et leur utilisation peut être limitée par des problèmes de stabilité chimique (peroxydation, dégradation enzymatique). Les dérivés synthétiques sont d'une grande pureté, stables et définis selon leur composition. Les phospholipides pouvant former des bicouches ont deux chaînes hydrocarbonées (généralement de 14 à 18 atomes de carbone) qui peuvent être de même longueur ou, dans les phospholipides dits mixtes, de longueur différente (Weinstein et Leserman, 1984).

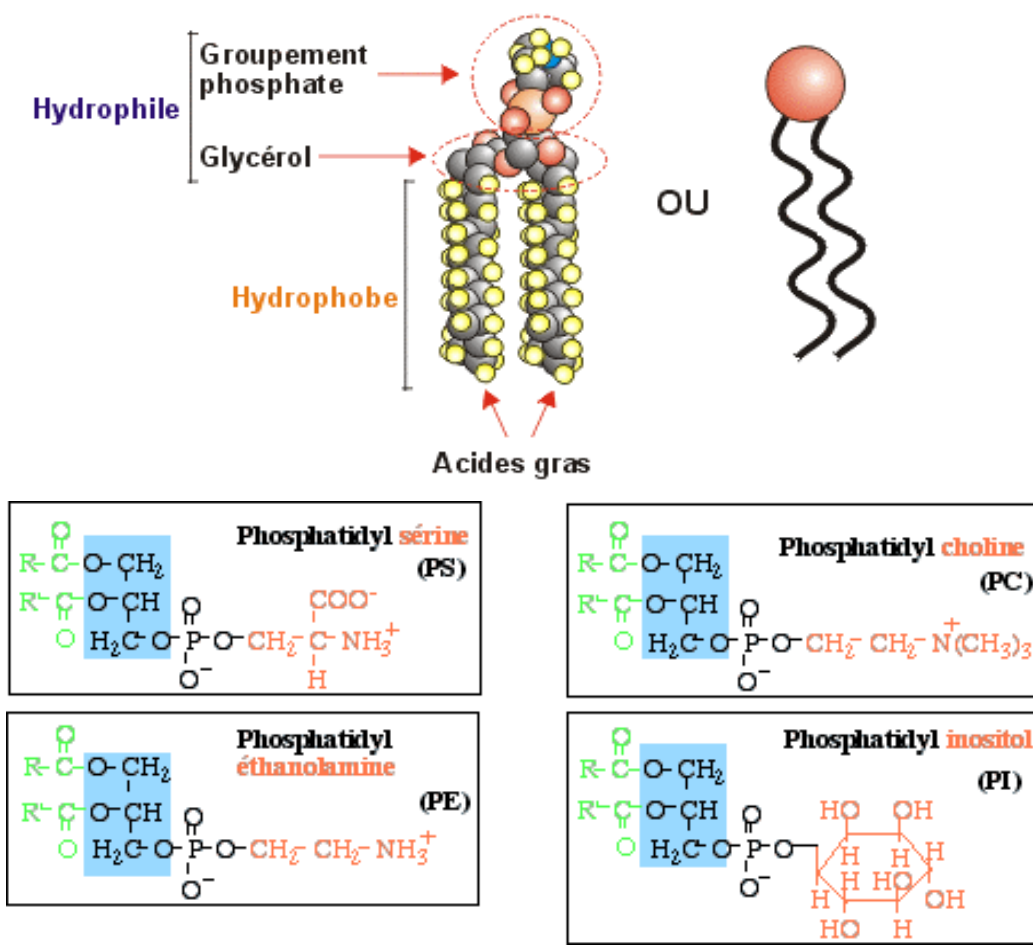


Fig. 3 : Structure des phospholipides (<http://www.snv.jussieu.fr>)

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 1*).

L'addition de phospholipides chargés négativement ou positivement (10 à 20 moles %) 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. On peut rendre le liposome chargé négativement en incorporant dans la bicouche de la phosphatidylsérine, phosphatidylinositol, phosphatidylglycérol ou de l'acide phosphatidique. La charge positive est généralement apportée par la stéarylamine (Weinstein et Leserman, 1984).

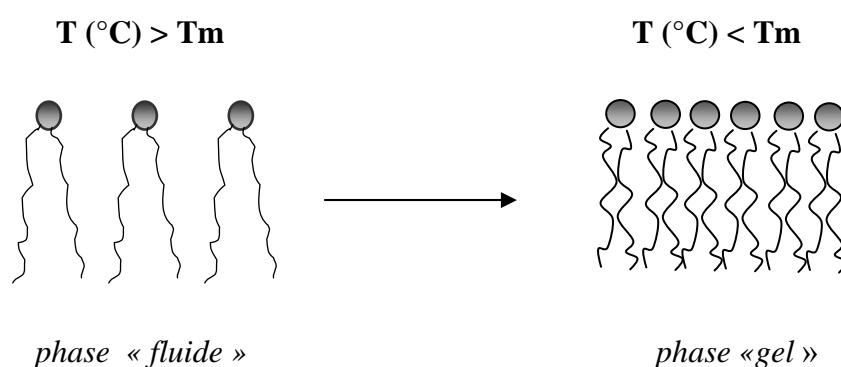
Lipides	Abréviation	carbones / saturation	Charge à pH 7,4	Tm (°C)
<b>Lipides naturels neutres</b>				
Phosphatidylcholine de jaune d'oeuf	EPC (egg PC)		0	-15 à -7
Phosphatidylcholine de soja	SPC		0	-15 à -7
<b>Lipides synthétiques neutres</b>				
Dilauryloyl phosphatidylcholine	DLPC	12 :0	0	-1
Dimyristoyl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

di-Oleoyloxytriméthylamoniopropane	DOTAP	18 :1	+1	-
------------------------------------	-------	-------	----	---

Tableau 1 : Principaux phospholipides utilisés dans la formulation des liposomes  
(Avanti<sup>®</sup> 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 (Tm)**, qui doit être prise en compte lors de la préparation des liposomes et qui influence leur comportement *in vivo* (tableau 1). 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 température de transition de phase, 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 »)



Tm augmente plus la longueur de la chaîne carbonée des phospholipides augmente et Tm diminue plus elles sont insaturées.

Phospholipides	Tm (°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 sa température est supérieure à la température de transition de phase des phospholipides utilisés. En cas de mélange de phospholipides, la température de la phase aqueuse doit être supérieure à la  $T_m$  du phospholipide ayant la plus élevée.

#### 4.2.2. Les stéroïdes

Le stérol le plus employé est le cholestérol (ajouté généralement à raison de 30 % dans la composition lipidique). Il a une grande influence sur la fluidité de la paroi et sur la stabilité des liposomes dans le sang après leur administration. Le cholestérol (*figure 4*) 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 enfin, il augmente la rigidité de la bicouche favorisant ainsi sa stabilité en milieu sérique (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 (*cf § IV.1*).

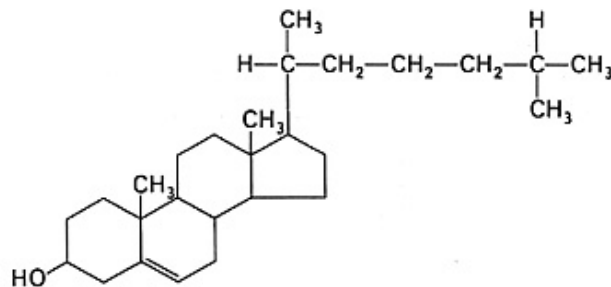


Fig.4 : Formule du cholestérol

#### I. 4.3. Formulation et stabilisation des liposomes

La stabilisation de la paroi peut être obtenue de différentes façons. L'utilisation de lipides synthétiques possédant une température de transition élevée permet de diminuer considérablement la perméabilité des liposomes à 37°C (Senior et Gregoriadis, 1982).

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.

L'incorporation de cholestérol confère une stabilité accrue par augmentation de la rigidité de la paroi des liposomes.

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).

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.

## **I. 5. 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

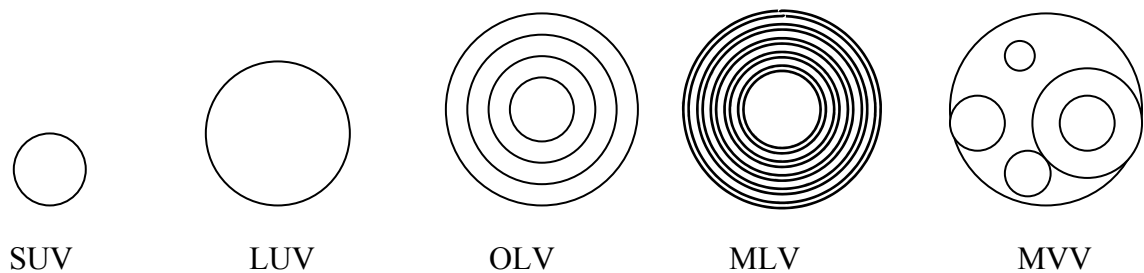
### **I. 5.1. Classification de liposomes selon leurs critères morphologiques**

Les différents liposomes se distinguent selon leur taille mais aussi selon leur nombre de bicouches lipidiques ou lamellarité (*figure 5 et tableau 2*). Plusieurs abréviations sont utilisées pour les désigner d'après ces deux critères :

<b>MLV</b>	Multilamellar Large Vesicle	> 0,5 $\mu\text{m}$
<b>OLV</b>	Oligolamellar vesicle	0,1-1 $\mu\text{m}$
<b>SUV</b>	Small Unilamellar Vesicle	20-100 nm
<b>LUV</b>	Large Unilamellar Vesicle	> 100 nm
<b>GUV</b>	Giant Unilamellar Vesicle	> 1 $\mu\text{m}$
<b>MVV</b>	Multi Vesicular Vesicle	généralement > 1 $\mu\text{m}$

- **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  $\mu\text{m}$ , ou de petite taille (**S.U.V.** pour « small unilamellar vesicles ») avec un diamètre moyen variant de 20 à 100 nm.



*Fig.5 : Représentation schématique des différents types de liposomes*

(Rongen *et al.* 1997)




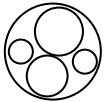
Structure	SUV	LUV	MLV et OLV	MVV
<b>Représentation</b>				
<b>Taille</b>	20-100 nm	100-1000 nm	Taille très hétérogène	> 1 $\mu$ m
<b>Capacité</b>	Contient peu de principe actif	Contient beaucoup de principe actif	Capacité intermédiaire à celle de SUV et LUV.	peu utilisés
<b>% d'encapsulation</b>	0,5-1	35-60	5-15	
<b>Stabilité</b>	Plus le rayon de courbure est grand, plus faible est la tension de surface : MLV > LUV > SUV La stabilité est maximale entre 80 et 200 nm.			

Tableau 2 : Classification des liposomes selon Papadopoulos (1977).

## I. 5.2. Classification selon leur composition et leur application *in vivo*

### 5.2.1. 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 captation 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.



### ***5.2.2. 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 l'affection 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.

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). Pour cela, la création d'une barrière stérique tout autour de la bicouche lipidique est réalisée avec des résidus sialiques (gangliosides ou sphingomyéline) ou grâce à des polymères hydrophiles (polyéthylène glycols ou PEG) couplés de façon covalente aux phospholipides membranaires (Zalipsky 1995a). Les liposomes ainsi obtenus se caractérisent par une grande stabilité en milieu biologique (fuite limitée du contenu) et conduisent à des résultats pharmacocinétiques ou pharmacologiques prometteurs qui seront détaillés au chapitre IV.4.2.

### ***5.2.3. Immunoliposomes***

Ce sont des liposomes qui portent à leur surface des anticorps ou des fragments d'anticorps 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 (tumoraux 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 anticorps-liposomes et les applications thérapeutiques des immunoliposomes seront développées plus loin (*cf* § V).

**conventionnels**

**furtifs**

*Fig.6 : Représentation schématique des 4 principaux types de liposomes  
(Storm et Crommelin, 1998)*

#### **5.2.4. 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, le DOTMA (Dioleoyloxypropyl-trimethylammonium) 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) et 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 (revue de Legendre et Szoka 1993).

### I. 5.3. Classification selon des critères technologiques

Il existe une grande diversité de procédés de préparation des liposomes qui seront largement détaillées 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 :

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

## II. PREPARATION 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 produisant 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 :

1. Le premier groupe comprend les méthodes « classiques » faisant intervenir une étape mécanique, comme l'agitation et l'extrusion.

2. 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.

3. 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.

4. 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. 1. Méthodes mécaniques de dispersion des phospholipides**

### **II. 1.1. Hydratation d'un film lipidique**

#### ***1.1.1. 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 (*figure 7*). 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.

QuickTime™ et un décompresseur  
GIF sont requis pour visualiser  
cette image.

*Fig.7 : Mécanisme de formation des vésicules lipidiques selon Lasic (1995).*

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.

### ***1.1.2. 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.

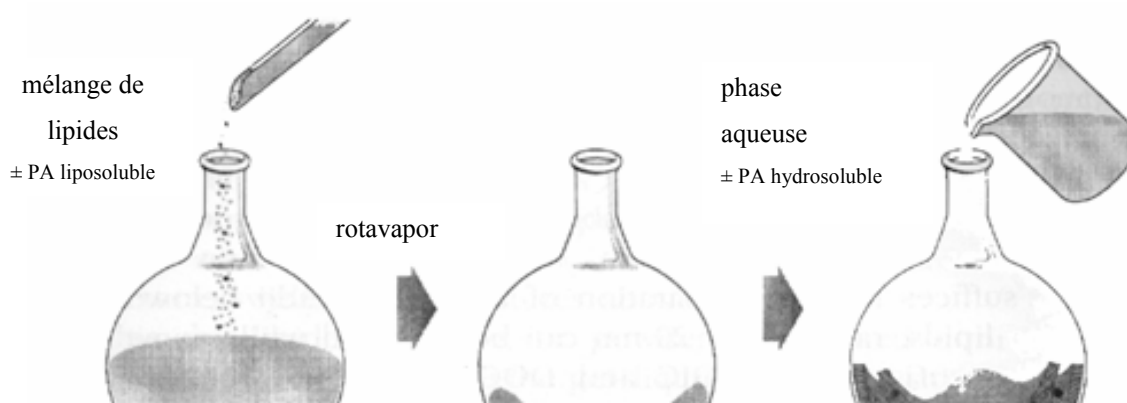
Généralement, on utilise du chloroforme ou un mélange chloroforme / méthanol pour dissoudre les lipides. La solution organique de phospholipides est ensuite évaporée dans un ballon pour obtenir un film lipidique. L'évaporation est effectuée à l'aide d'un évaporateur rotatif, à faible température, et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

### ***1.1.3. La phase aqueuse***

L'hydratation du film lipidique est effectuée simplement en ajoutant une solution aqueuse (pouvant contenir un PA) et en agitant (*figure 8*). 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.



## **II. 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. 1.3. Extrusion

### 1.3.1. Membranes de polycarbonate

Cette technique consiste à forcer une suspension de liposomes à travers un filtre de polycarbonate ayant une taille de pores bien définies (*figure 9*) afin d'obtenir des liposomes d'un diamètre proche de la taille des pores du filtre utilisé (Mayer *et al.* 1986a, 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.

*Fig.9 : 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.* 1986a). 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 %.

### ***1.3.2. 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, contrairement à l'extrusion à travers les membranes où il n'y a pas de rupture vésiculaire mais simplement 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. Elle est intéressante pour encapsuler des petites molécules de bas poids moléculaire puisque la concentration en lipides et en soluté peuvent être relativement élevées (Hamilton *et al.* 1980).

## **II. 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  $\mu\text{m}$  (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, 1990 et Hope 1985).

## **II. 2. Méthodes basées sur l'élimination du solvant organique**

### **II. 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 10*).

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.

*Fig. 10 : Formation de liposomes REV par la technique d' évaporation en phase inverse (Weinstein 1981, d'après une figure de Szoka et Papahadjopoulos de 1978).*

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. On peut obtenir une encapsulation maximale de 65 % de la phase aqueuse (pour des solutions de faible force ionique) permettant d'encapsuler un grand choix de macromolécules hydrosolubles avec une grande efficacité. Cette méthode reste toutefois complexe et est inadaptée à la production industrielle.

## **II. 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 dix fois supérieur à celui des liposomes obtenus par sonication. Pourtant, les taux d'encapsulation restent faibles (2 %) en raison de la faible solubilité des lipides dans l'éther qui s'ajoute aux risques d'oxydation des lipides.

## **II. 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<sup>®</sup>, Triton<sup>®</sup> 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. 4. Méthodes utilisant des liposomes pré-formés**

### **II. 4.1. Congélation-décongélation (« Freeze-thaw method »)**

A partir d'une suspension de liposomes 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.* (1986a) 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. 4.2. Lyophilisation-réhydratation (« Freeze-drying method »)

Waibler a décrit une technique de dispersion des lipides, sous forme de poudre lyophilisée, directement hydratée par la phase aqueuse, suivi d'une extrusion et d'une étape de filtration stérile. Au moment de l'hydratation du lyophilisat, on obtient des MLV 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.

Kirby et Gregoriadis (1984) proposent le même principe en partant d'une solution de SUV, préalablement lyophilisés, puis dispersés dans une solution aqueuse. Au moment de l'hydratation du lyophilisat, les membranes des SUV fusionnent pour former des vésicules multilamellaires avec un volume d'encapsulation important.

Cette technique est très employée pour incorporer des substances médicamenteuses dans les liposomes, surtout quand elles ne sont pas 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.

### **III. ENCAPSULATION DE SUBSTANCES DANS LES LIPOSOMES**

L'encapsulation efficace et stable de substances médicamenteuses dans les liposomes est l'un des principal challenge 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 espace 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. Différents paramètres permettent d'évaluer l'efficacité de l'encapsulation après élimination des substances non encapsulées.

#### **III. 1. Mesure de l'efficacité d'encapsulation**

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. Différents paramètres servent à quantifier le contenu interne liposomal.

##### **III. 1.1. Pourcentage d'encapsulation (ou taux d'encapsulation)**

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.

### III. 1.2. Encapsulation pondérée

L'encapsulation pondérée correspond à la quantité de molécule encapsulée rapportée à la quantité de lipides (en  $\mu\text{g}/\text{mol}$  ou en  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ).

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.

Dans le cas d'une molécule hydrosoluble, qui n'interagit pas avec les bicouches lipidiques, on peut déduire une autre expression de l'encapsulation pondérée qui définit plus la vésicule elle-même que son contenu : **le volume aqueux interne**. Pour cela, il faut bien sûr considérer que le marqueur (ou la molécule à encapsuler) a la même concentration dans la phase aqueuse de la vésicule que dans la solution aqueuse initiale. Le marqueur doit donc se répartir uniquement dans l'espace aqueux des liposomes et ne pas subir de fuite lors de l'étape d'élimination de la substance non encapsulée.

### III. 1.3. Volume aqueux encapsulé

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 compris généralement entre  $0,5 \mu\text{l}/\mu\text{mol}$ , pour les MLV et les SUV, et  $30 \mu\text{l}/\mu\text{mol}$  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 ( $^{22}\text{Na}$  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 qualité de routine en laboratoire.

## **III. 2. Facteurs influençant la capacité d'encapsulation des liposomes**

### **III. 2.1. Type de substances à encapsuler**

Le principal caractère qui détermine l'efficacité de l'encapsulation est lié à l'hydrophobicité du composé (*figure 11*). La plupart des molécules peuvent être classées en trois catégories selon leurs propriétés hydrophiles, lipophiles ou amphiphiles (Thoma *et al.* 1985).

- **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.*

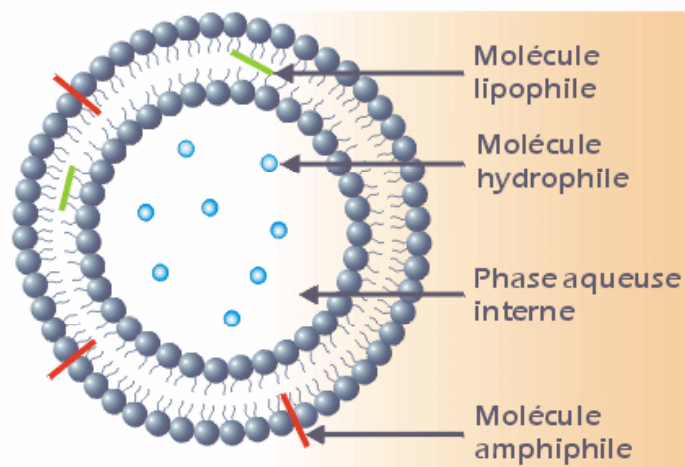


- **Les substances hydrophobes** ont un comportement différent. Les produits insolubles dans l'eau et les solvants organiques seront très difficiles à encapsuler. Parmi les produits solubles dans le méthanol ou le chloroforme, certains seront partiellement ou totalement fixés dans la membrane (selon la concentration) et d'autre non.

*exemples : Rifamicine, Diclofénac, Trimetoprim, Indométacine.*

- **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 peuvent être encapsulés que par encapsulation active (cf § III.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.*



*Fig.11 : Schéma d'un liposome unilamellaire avec la localisation des molécules encapsulées en fonction de leur solubilité (Devoisselle 1997).*

### III. 2.2. 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) ont observé une différence de perméabilité de la bicouche des liposomes avec ou sans lipides pégylés pour différents types de molécules.

### **III. 3. Principaux modes d'encapsulation**

#### **III. 3.1. 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.

Colletier *et al.* (2002) ont étudié les effets de différents paramètres sur l'efficacité d'encapsulation des protéines et des enzymes dans les liposomes. Le choix de la technique de préparation des liposomes est primordial mais limité si l'on veut éviter la dégradation du produit à encapsuler (les protéines sont dénaturées dans les solvants organiques et les

détergeants). Ils ont choisi d'optimiser la méthode d'hydratation d'un film lipidique en faisant varier la concentration lipidique, le nombre d'extrusions ou de cycles de congélation-décongélation, la composition des tampons et la co-encapsulation d'agents stabilisants. Dans tous les cas, l'efficacité d'encapsulation est liée à la qualité de l'interaction entre les protéines et la bicouche lipidique, d'où l'intérêt de favoriser la concentration et la composition en lipides dans le but de favoriser les interactions électrostatiques entre produit à encapsuler et phospholipides.

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 (1 mg/ml à 4°C ou 2 mg/ml à 37°C). L'hydratation du film lipidique se fait à 65°C en présence de Cisplatine pour obtenir une meilleure solubilité (8 mg/ml) (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.

### **III. 3.2. Encapsulation active (ou « Active loading »)**

Les différentes méthodes de préparation des liposomes se font souvent dans des conditions rigoureuses, avec des solvants organiques, des agitations, sonications et hautes températures qui peuvent conduire à la destruction, l'inactivation ou la perte d'activité de la substance que l'on veut encapsuler, particulièrement des peptides. D'où l'intérêt d'utiliser une autre technique d'encapsulation que celle qui a été citée précédemment (Mayer *et al.* 1986b).

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 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.

### 3.2.1. 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 (2 à 4 unités de pH, avec le milieu acide à l'intérieur). 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 12*).

L'encapsulation la plus efficace est obtenue en piégeant des bases faibles grâce à un gradient de protons (pH acide à l'intérieur) ou à un gradient de sulfate d'ammonium. De même, les acides faibles peuvent être encapsulés par l'intermédiaire d'un gradient de protons (milieu alcalin à l'intérieur) ou d'un gradient de bicarbonate de sodium (Lasic D. 1998, Maurer-Spujer *et al.* 1999, Cullis *et al.* 1999). Des gradients calcium-acétate peuvent aussi être utilisés pour les acides faibles (Clerc et Barenholz 1995). Ils génèrent des pH très élevés dans le milieu intraliposomal et il faut alors tenir compte de la stabilité des principes actifs dans ces conditions.

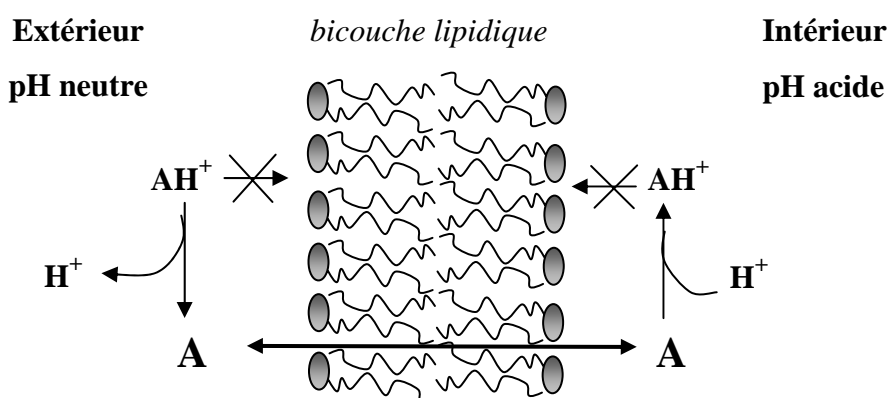


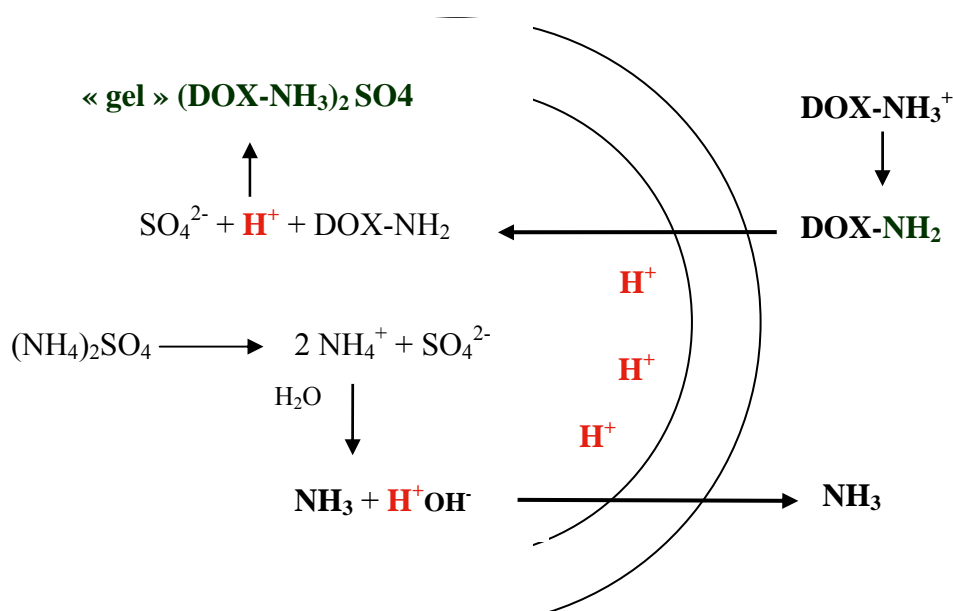
Fig. 12 : Modèle d'encapsulation d'une base faible dans un liposome unilamellaire grâce à un gradient de protons.

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 différents gradients de calcium-acétate, bicarbonate de sodium ou de sulfate d'ammonium.

La doxorubicine (DOX) est un exemple de substance qui, comme de nombreuses autres bases faibles, peut être incorporée efficacement dans les liposomes par l'intermédiaire d'un gradient, mais de sulfate d'ammonium (Li *et al.* 1999, Ceh *et al.* 1997). Le principe de cette encapsulation active est représenté *figure 13*.

Un film lipidique est hydraté avec une solution de sulfate d'ammonium (250 mM). Le sulfate d'ammonium non encapsulé est éliminé sur une colonne de chromatographie d'exclusion, et la substance active à encapsuler est ajoutée aux liposomes pré-formés. Le sulfate d'ammonium se dissocie en deux cations ammonium et un anion sulfate. L'ammoniaque sous sa forme neutre ( $NH_3$ ,  $H_2O$ ) passe facilement les membranes formant ainsi le gradient de pH alors que le sulfate reste dans la cavité intraliposomiale. La doxorubicine non ionisée peut alors traverser la bicouche liposomiale, s'ioniser en milieu acide et précipiter avec les anions sulfates pour former un gel stable à l'intérieur du liposome. La illustre le principe de l'encapsulation de la doxorubicine (DOX) par l'intermédiaire d'un gradient de sulfate d'ammonium.



*Fig. 13 : Encapsulation active de bases faibles (exemple de la Doxorubicine)  
par l'intermédiaire d'un gradient de sulfate d'ammonium  
(Drummond 1999)*

Ces travaux se sont rapidement étendus à un grand nombre d'acides faibles et de bases faibles d'intérêt biologique, comprenant différentes drogues, lipides et peptides (Cullis *et al.* 1997). 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 1986c).

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 naladixique était possible (Hwang 1999). Néanmoins, 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.

### **3.2.2. 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 de  $K^+$  ou de  $H^+$ . 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 la forme protonée de la dopamine.

### ***3.2.3. 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

## **III. 4. Stabilité des préparations liposomiales (*in vitro*)**

Pour les substances amphiphiles en particulier, qui traversent facilement la bicouche lipidique, de nombreux facteurs peuvent influencer la stabilité des formulations liposomiales, comme la composition lipidique des liposomes ou les méthodes d'encapsulation.

### **III. 4.1. Composition phospholipidique (qualitative et quantitative)**

La présence d'une molécule active encapsulée est prise en compte dans le choix des composants de la paroi. Dans le cas d'une molécule lipophile, c'est-à-dire située dans la bicouche phospholipidique, la formulation de la membrane est choisie afin de faciliter la solubilisation de celle-ci, voire d'établir des liaisons en utilisant des lipides de charge opposée. De même, des complexations peuvent être réalisées entre principes actifs et lipides de la paroi. Dans le cas d'un principe actif hydrosoluble, les constituants de la paroi seront choisis afin de la confiner et la retenir pendant une période de temps prolongée.

Comme nous l'avons vu précédemment, la présence de cholestérol et de phospholipides saturés apparaît comme le facteur le plus important pour réduire la perméabilité membranaire de ces substances. L'utilisation de phospholipides ayant une

température de transition de phase élevée permet également de diminuer la perméabilité des liposomes à 37°C. Mais si la constitution du liposome peut permettre de limiter la fuite des substances encapsulées, elle risque, malheureusement, d'entraver aussi l'efficacité de l'encapsulation.

La présence de PEG-DSPE peut diminuer la stabilité et la perméabilité de certaines formulations médicamenteuses liposomiales (Silvander *et al.* 1998). Mayer *et al.* (1985) ont montré que 5 à 6 mol% de PEG-DSPE pouvait non seulement réduire la stabilité mais diminuer l'encapsulation de vinorelbine dans les liposomes. L'efficacité d'encapsulation est améliorée si l'on diminue la PEG-DSPE à 3 mol% mais la pharmacocinétique des liposomes *in vivo* est également modifiée.

### **III. 4.2. Méthode d'encapsulation**

Les différentes méthodes d'encapsulation ont également leur importance dans la stabilisation des préparations. Plusieurs études ont montré la différence de stabilité entre des liposomes contenant de la doxorubicine, encapsulée par gradient de pH (Mayer *et al.* 1986c) et par la méthode du sulfate d'ammonium. Dans la seconde méthode, la doxorubicine forme des sels de sulfate stables qui précipitent dans le liposome (*cf § III. 3.2.1*) et qui augmentent la stabilité comparativement à la méthode de Mayer. Par contre, une augmentation de la stabilité n'est pas toujours désirable si elle agit comme une limite à la biodisponibilité du principe actif dans la tumeur (Drummond *et al.* 1999).

### **III. 4.3. Ratio PA / lipide**

Bien sûr le ratio entre les quantités de principe actif (PA) et la quantité de lipides doit être optimisé pour atteindre la tumeur avec une dose suffisante sans pour autant compromettre la stabilité des liposomes. La quantité maximale de principe actif que peuvent transporter les liposomes dépend de la méthode d'encapsulation, de la taille des vésicules, de la charge des liposomes. Comme les deux derniers facteurs sont généralement



associés à des effets négatifs sur les paramètres pharmacocinétiques, il ne reste plus que la méthode d'encapsulation qui soit réellement « ajustable ».

Principe actif PA	Spécialité	Composition lipidique	PA/lipides µg /µg
Daunorubicine	DAUNOXOME <sup>®</sup>	DSPC/chol (2 :1)	0,079
Doxorubicine`	CAELYX <sup>®</sup> /DOXIL <sup>®</sup>	HSPC/chol/DSPE-PEG	0,125
Doxorubicine	MYOCET <sup>®</sup>	(56 :39 :5) EPC/chol (55 :45)	0,250

*Tableau 3 : Exemples de variations du ratio PA / lipides selon la technique d'encapsulation et la composition en lipides des liposomes.*

*(Drummond et al. 1999)*

Par exemple, l'encapsulation passive de daunorubicine dans des liposomes conventionnels donne une concentration de 0,079 µg de principe actif/µg de lipides. L'encapsulation active de doxorubicine donne des concentrations différentes selon l'utilisation d'un simple gradient de pH (0,250 µg /µg de lipides) ou par gradient de sulfate d'ammonium (0,125 µg /µg de lipides).

### **III. 4.4. Effets de l'osmolarité**

Plusieurs études ont montré l'influence de l'osmolarité sur la stabilité des liposomes. Un équilibre doit en effet exister entre la concentration osmotique du liposome, le gradient de pH résiduel après encapsulation (chaque molécule neutre qui traverse la bicouche consomme un H<sup>+</sup>) et la formation de précipités dans l'espace intraliposomal. Pour la méthode d'encapsulation par gradient de pH, une grande capacité en tampon est nécessaire à l'intérieur du liposome pour maintenir un gradient de pH raisonnable et pour pouvoir encapsuler des quantités de substances suffisantes (Cullis *et al.* 1997).

### III. 5. Séparation des substances non encapsulées

La rétention des substances encapsulées varie selon la nature des liposomes (MLV > LUV > SUV). Elle est aussi fonction de la température (4°C > 25°C > 37°C) et de la composition en phospholipides (saturés de T<sub>m</sub> 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, dosées et à libération contrôlée, il est important d'éliminer toute trace de principe actif qui ne serait pas encapsulé. Avec certaines techniques d'« active loading », cette étape n'est pas nécessaire ainsi qu'avec certains PA hydrophobes qui sont souvent totalement associés aux lipides. Dans le cas contraire, plusieurs approches ont été suggérées dans différents laboratoires.

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 donc utiliser des techniques fondées sur la différence de taille des composés à séparer comme la centrifugation, la chromatographie d'exclusion-diffusion, la dialyse. Vemuri et Rhodes (1995) proposent une technique d'ultra-filtration pour les drogues hydrosolubles dont la plupart des systèmes sont commerciaux.

En résumé, la formulation des liposomes est complexe et doit prendre en compte les caractéristiques de la molécule active encapsulée. Elle doit également être adaptée aux exigences d'une application thérapeutique tout en répondant aux critères réglementaires et aux contraintes galéniques liées au principe actif et aux technologies retenues. L'amélioration de la stabilité des vésicules *in vitro* mais aussi *in vivo* passe par la mise au point de nouvelles formulations et de nouveaux procédés permettant la libération des PA sur le site d'action désiré.

## **IV. 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 essentiellement du milieu biologique auquel il va être confronté (stabilité au contact des liquides biologiques, franchissement des barrières physiologiques, interactions avec les cellules...). En effet, avant d'atteindre leur cible, les liposomes et leur contenu vont avoir à affronter un certain nombre d'interactions et à franchir un certain nombre d'obstacles. 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 intra-veineuse 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 moëlle 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 liposomales.

## **VI. 1. Stabilité des liposomes dans le sang**

### **IV. 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 moëlle 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).

### ***1.1.1. 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 antigènes aux cellules immunocompétentes.

### ***1.1.2. 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.

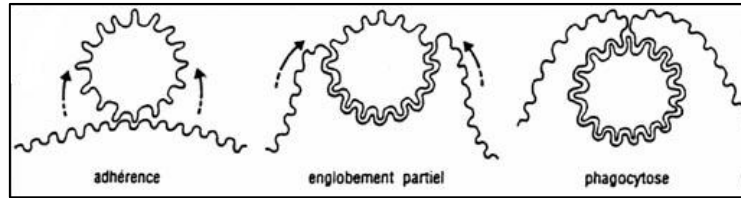


Fig. 14 : Représentation schématique de la phagocytose d'une particule.

(<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).

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 mais aucune purification et identification n'a encore été publiée.

#### **IV. 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 15*) 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.* 1990, Allen *et al.* 1981, Kirby et Gregoriadis 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.

#### **IV. 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).

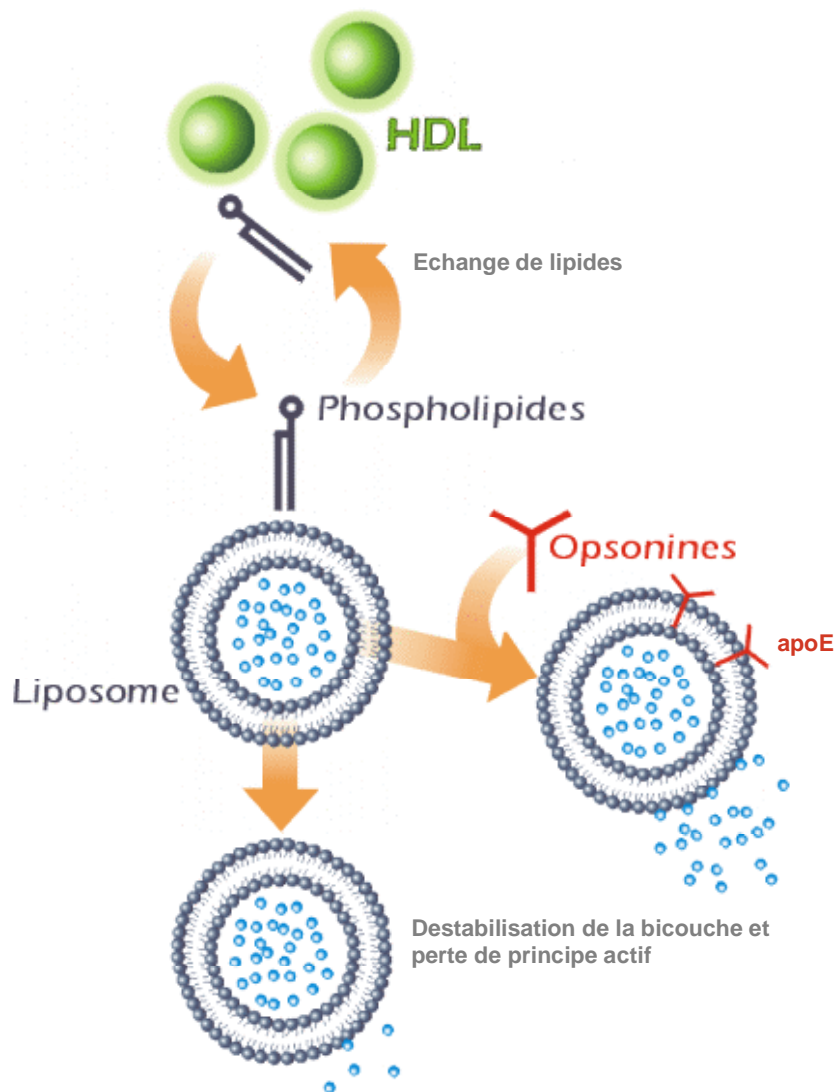


Fig. 15 : Interactions des liposomes avec les lipoprotéines plasmatiques

(<http://www.univ-montp1.fr> d'après Devoisselle et Soulié-Bégu, 2001).

## IV. 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 est alors essentielle dans le contrôle de cette cinétique de libération, soit les liposomes interagissent avec les cellules avoisinantes.

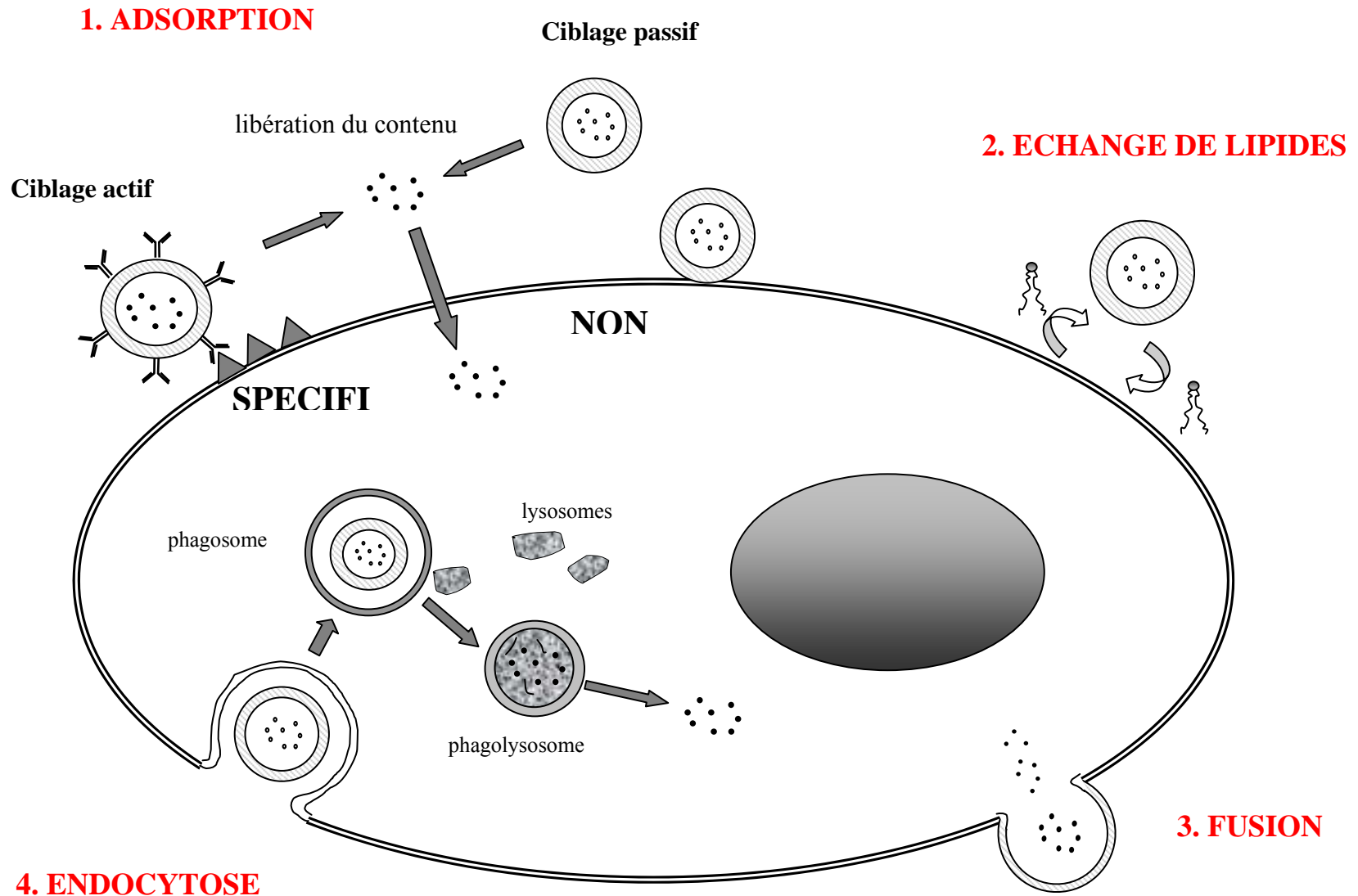
*In vitro*, la plupart des mécanismes d'interactions liposomes-cellules ont pu être élucidés ainsi que le devenir des molécules encapsulées, grâce à différentes techniques d'encapsulation de marqueurs fluorescents (Weinstein *et al.* 1977, Szoka *et al.* 1989) ou par microscopie électronique (Szoka *et 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 16*) 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.

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.



*Fig. 16 : Différents types d'interactions entre cellules et liposomes  
(Weinstein et Leserman, 1984)*

## IV. 3. Biodistribution

### IV. 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 extravation 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 (Forsen 1997).

Les liposomes étant des particules dont le diamètre se situe dans un intervalle de 20 nm à un micron, un des critères majeurs de capture est la structure histologique des capillaires (continus, fenestrés, discontinus ou sinusoidaux) représentée sur la *figure 17*. 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. Les seuls organes qui permettent un tel passage, en situation physiologique, sont ceux du SPM d'où l'accumulation des liposomes conventionnels dans le foie, la rate ou la moelle osseuse).

Les organes n'appartenant pas au SPM ne capturent pas les liposomes, ceux-ci étant incapables par ailleurs de s'évader du compartiment sanguin du fait de la continuité de l'endothélium vasculaire.

#### *a. Structure d'un endothélium capillaire des 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.

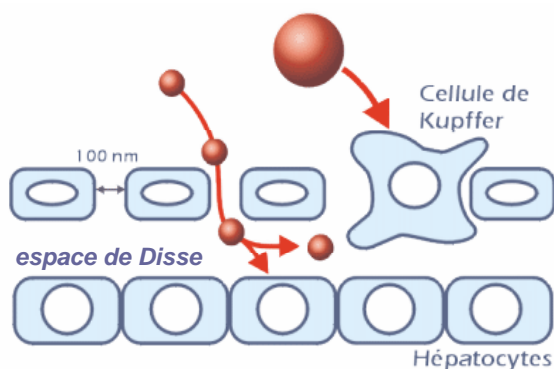
**b. Structure d'un endothélium capillaire de type fenestré**



Structure voisine des capillaires continus, mais absence totale de jonction entre certaines cellules (pores de 40 à 60 nm) permettant le passage de SUV d'un diamètre < 60 nm.

Retrouvés dans le rein, l'intestin grêle et les glandes endocrines.

**c. Structure d'un endothélium capillaire de type discontinu**



Caractérisé par l'absence de jonctions intercellulaires et de membrane basale (multiples pores dont la taille est comprise entre 100 et 500 nm).

**Rencontrés dans le foie (capillaires sinusoides), la rate et la moelle osseuse.**

Fig. 17 : Représentation schématique de la structure des trois types d'endothéliums

(Devissaguet et Puisieux, 1993 d'après un schéma de Hwang K.J.).

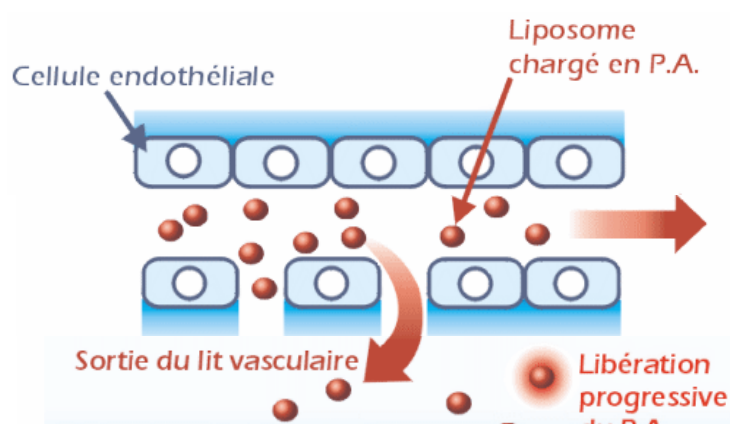
Les capillaires sinusoidaux du foie possèdent des pores de 100 nm de diamètre. Des liposomes différents par leur taille (< 100 nm ou > 100 nm) ne présentent pas le même type de capture. Ceux de petite taille sont capables soit d'être capturés par les cellules de Kupffer dont une partie du cytoplasme déborde dans le compartiment vasculaire, soit de 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 100 nm ne pourront être capturés que par les cellules de Kupffer.

### IV. 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 ayant des temps de circulation prolongée, 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. Ils s'accumulent ensuite dans le compartiment interstitiel, d'autant mieux que les cellules tumorales se caractérisent par un drainage lymphatique diminué par rapport aux tissus sains.

Néanmoins, il existe peu d'informations au sujet de l'extravation des liposomes au niveau de la microcirculation des tumeurs. 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). De plus, la vascularisation tumorale est souvent diminuée, hétérogène, anarchique entraînant une nécrose de certaines zones tumorales. Un très grand nombre de cellules tumorales restent donc inaccessibles aux liposomes injectés par voie intra-veineuse.



*Fig. 18 : Mécanismes de pénétration des liposomes et de libération du PA dans les tumeurs solides (<http://www.univ-montpl.fr> d'après Devoisselle et Soulié-Bégu, 2001).*

## **IV. 4. Pharmacocinétique**

L'association d'un principe actif (PA) avec un système vecteur comme les liposomes modifie le profil pharmacocinétique à la fois du liposome et PA. Jusqu'alors, il n'a pas été question du principe actif. Pourtant, une particularité importante des liposomes (comme d'autres systèmes particuliers) est que le devenir du PA est étroitement associé au devenir du vecteur lui-même, ainsi qu'à ces capacités de libération et à sa dégradation. Ainsi, les études pharmacocinétiques prennent en compte d'emblée le complexe liposome-PA et ses caractéristiques. La molécule ne peut cependant être active que sous sa forme libre. Dès sa libération, elle suivra donc son propre comportement dicté par ses caractéristiques physico-chimiques. En général, cette association au liposome :

- retarde l'absorption du médicament,
- altère et réduit sa biodistribution,
- diminue son volume de distribution,
- augmente sa clairance,
- retarde son métabolisme.

En fait, les potentialités thérapeutiques du PA encapsulé ou associé aux liposomes dépendront essentiellement de la distribution tissulaire et de la clairance. Comme nous venons de le voir, 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 ou des cellules localisées en dehors du SPM (par exemple, des tumeurs), il faut disposer de systèmes vecteurs dont la durée de vie plasmatique est prolongée.

#### **IV. 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.

##### ***4.1.1. Augmentation de la dose***

Un paramètre constant, valable quel que soit le type de liposome, est la dose administrée. Une forte dose, 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).

##### ***4.1.2. 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.

### ***4.1.3. Influence de la composition***

La présence de cholestérol dans la formulation liposomale 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 1*) 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 de plusieurs heures comparativement à des gros liposomes de composition fluide (EPC/Chol.) qui ne peuvent circuler que quelques minutes (Boerman *et al.* 2000).

### ***4.1.4. 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 électrostatiques (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  $\alpha 2$ -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 (Swapna *et al.* 1998).

De même, l'adsorption des opsonines à la surface des liposomes augmente en fonction de leur caractère hydrophobe. Ainsi, la stabilité colloïdale et biologique des liposomes est nettement améliorée en coatant les liposomes de polymères hydrophiles inertes qui stabilisent les liposomes stériquement (*Stealth*<sup>®</sup>-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).

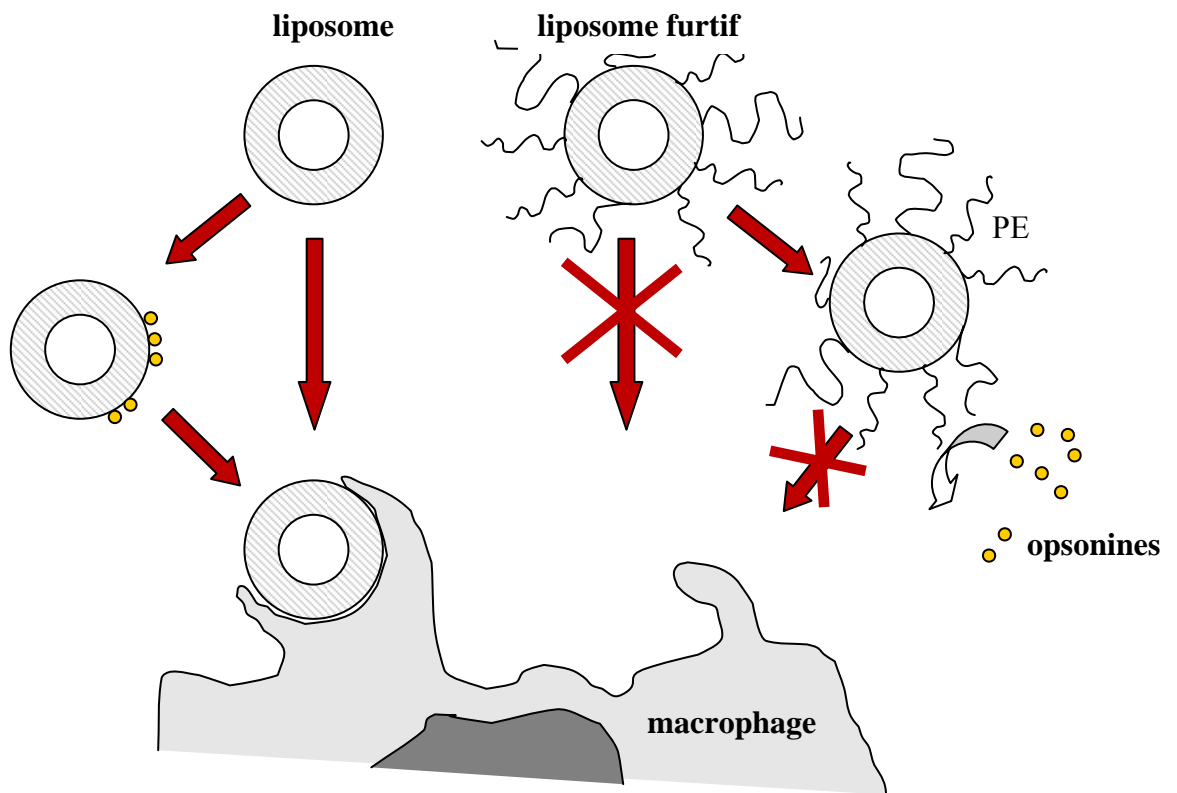


Fig. 19 : L'interaction liposomes furtifs avec les protéines plasmatiques (opsonines) est réduite, limitant ainsi la captation par les macrophages du SPM.

#### IV. 4.2. Les liposomes « furtifs »

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). Dans les deux cas, il est possible de réduire l'absorption des opsonines plasmatiques par un effet de répulsion stérique tout autour de la bicouche lipidique, les liposomes dits « furtifs » ne sont alors pas reconnus par le SPM. Cet effet disopsonique semble légèrement plus faible avec les  $G_{M1}$ . Pour les PEG, il dépend de leur densité à la surface des liposomes, ainsi que l'épaisseur de la couche de PEG (degré de polymérisation).

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, 1995a) 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 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  $G_{M1}$ .

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 ne 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).

L'apparition des liposomes furtifs a donc nettement amélioré la biodistribution et la pharmacocinétique des liposomes, offrant de nouvelles perspectives pour leur utilisation thérapeutique. 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 chapitre suivant, leur compatibilité avec les immunoliposomes a donc été largement étudiée.

## V. LES IMMUNOLIPOSOMES

Le ciblage spécifique des liposomes contenant un principe actif ou de la radioactivité peut être largement amélioré par l'intermédiaire d'un anticorps monoclonal couplé à la paroi du liposome (immunoliposome). L'utilisation des immunoliposomes pour cibler et traiter de façon spécifique des cellules tumorales est un modèle thérapeutique tout à fait attractif. La littérature est abondante sur ce sujet mais les résultats ont été longtemps décevants. Avec l'avènement de 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. En effet, une approche fructueuse a consisté à greffer, à la périphérie des liposomes, des ligands reconnus par des récepteurs présents à la surface des cellules cibles. Ces ligands peuvent être des lectines, glycoprotéines, enzymes, hormones mais aussi et de petites molécules comme les peptides.

Parmi les ligands les plus utilisés, on compte les anticorps monoclonaux qui peuvent reconnaître des antigènes exprimés de façon spécifique à la surface des cellules tumorales. Nous ne détaillerons ici que les principes de ciblage mettant en jeu les anticorps monoclonaux et les différentes techniques de couplage entre les liposomes et ces anticorps

<b>Ligands</b>	<b>Molécules cibles</b>
biotine	avidine / streptavidine
avidine / streptavidine	biotine
haptènes	anticorps
glycoconjugués	lectines
hormones, effecteurs, toxines...	récepteurs
ARN/ADN	acides nucléiques, gènes....
sucres, acides aminés	protéines de transport

*Tableau 4 : Exemples de ligands pouvant être conjugués aux liposomes.*

## V. 1. Différents principes de 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 anticorps bispécifiques qui reconnaissent un haptène fixé sur le liposome et un antigène spécifique d'une cible tumorale).

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

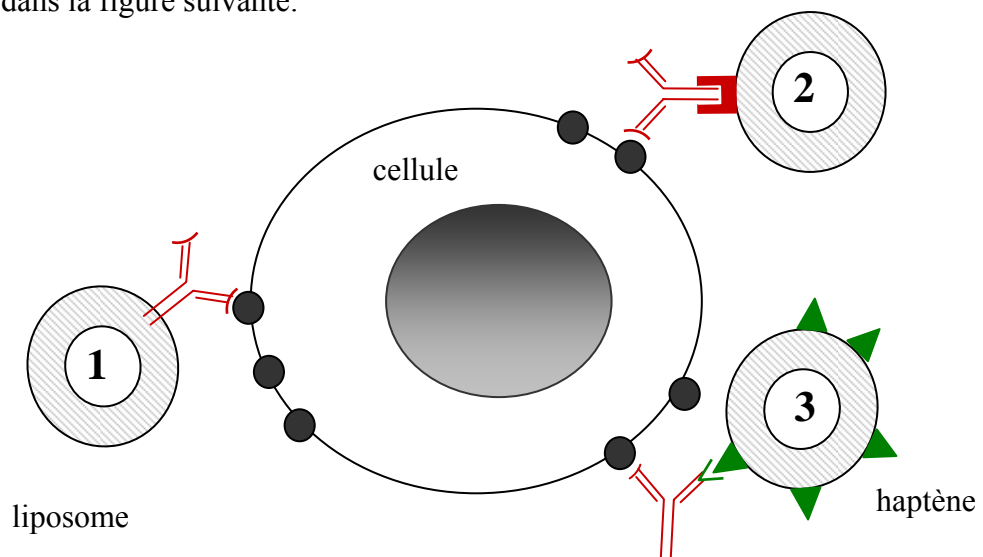


Fig.20 : Différents types de ciblage des liposomes.

1. Les immunoliposomes « classiques » sont vectorisés par l'intermédiaire d'un anticorps monoclonal directement vers un antigène exprimé de manière spécifique à la surface de la cellule cible. L'anticorps est couplé aux lipides de façon covalente avant ou après la formation des liposomes. Les différentes techniques de couplage liposome/Ac seront développées au paragraphe suivant.

2. Le schéma n° 2 illustre le 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'anticorps (natif ou biotinylé) est ajouté ensuite à la préparation. Cette technique permet d'utiliser des anticorps 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 antigènes de la cellule tumorale ciblée.

## V. 2. Différents types d'immunoliposomes

Au cours du temps, les immunoliposomes ont du 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 de 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 :

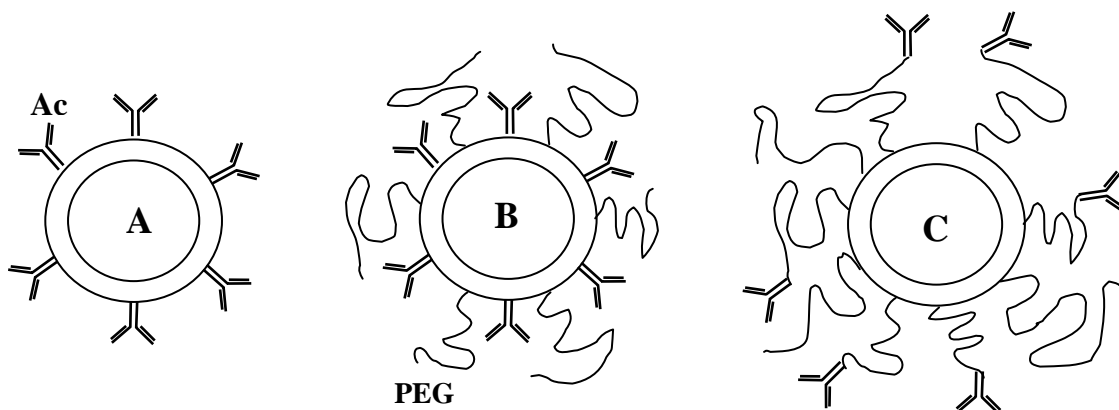


Fig. 21 : Représentation schématique des trois types de base d'immunoliposomes (Koning 2002)

**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 anticorps 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'anticorps monoclonaux (*Type A*) sont rapidement éliminés de la circulation par le RES. D'autre part, l'efficacité de leur immunociblage dépend fortement de la quantité de mAb à leur surface (Maruyama *et al.* 1990), ce qui limite leur utilisation thérapeutique. Récemment, de nouvelles formulations de liposomes incorporant dans leur membrane soit des gangliosides ( $G_{M1}$ ), soit des polyéthylèneglycols (PEG), ont permis d'améliorer leur demi-vie dans l'organisme en échappant au RES.

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 et donc de couplage, 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 antigène-anticorps. 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 antigène-anticorps (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 leurs cibles.

Klibanov *et al.* (1991), ainsi que Maruyama *et al.* (1995), ont alors proposé d'utiliser le PEG d'une façon un peu différente, en couplant les anticorps tout au bout de des chaînes de PEG (*Type C*) facilitant ainsi leur présentation à l'antigène, 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).

### **V. 3. Différentes techniques de couplage liposome / anticorps**

Les anticorps peuvent être couplés directement à des liposomes pré-formés. L'anticorps peut être couplé directement, de façon covalente, à un phospholipide de la membrane rendu chimiquement réactif vis-à-vis des fonctions présentes ou introduites préalablement sur l'anticorps. Il est également possible de créer un complexe non-covalent mais stable, entre l'anticorps et une molécule liée de manière covalente à la surface du liposome pré-formé. Enfin, les anticorps peuvent également être couplés aux liposomes au cours de leur fabrication, par différentes techniques de post-insertion.

#### **V. 3.1. Techniques de couplage covalent**

Ces techniques reposent sur la réaction entre un phospholipide de la bicouche liposomiale (généralement la phosphatidyléthanolamine) et une fonction de l'anticorps. Ces techniques sont néanmoins applicables à la plupart des protéines.

Au début des années 80, quelques auteurs ont proposé des agents réactifs de liaison comme le glutaraldehyde (Torchilin *et al.* 1979), le tolylène-2,4-diisocyanate (Endoh *et al.* 1980) ou le carbodiimide (Endoh *et al.* 1981). Ces réactions conduisaient dans bien des cas à des mélanges complexes et mal définis (polymères). En 1980, Leserman *et al.*, proposent d'introduire des réactifs hétéro-bifonctionnels, beaucoup plus intéressants, permettant de réagir avec un résidu thiol porté par le fragment Fab' des immunoglobulines.



### 3.1.1. Couplage d'Ac-SH à des liposomes pré-formés

Deux types de dérivés de la PE ont été préparés, en milieu organique, par réaction entre la fonction amine du phospholipide et la fonction ester activée par le N-hydroxysuccinimide (NHS) d'un réactif hétéro-bifonctionnel comme le SPDP ou le SMPB.

- **la PE-PDP** (*N*-[3-(2-pyridyldithio)propionyl]phosphatidyléthanolamine, *figure 22*) qui possède un groupe dithiopyridine se prêtant bien à une réaction d'échange avec un ligand-SH pour former un couplage avec un pont disulfure (Barbet *et al.* 1981).

- **la PE-MPB** (*N*-[4-(*p*-maléimidophényl)butyryl]phosphatidyléthanolamine, *figure 23*) qui possède un autre groupe réactif avec des thiols, le maléimide (Martin 1982).

Ces PE modifiées peuvent être incorporées dans le mélange lipidique au moment de la préparation des liposomes (généralement 1 à 5 mol% des lipides totaux). Ils porteront alors à leur surface des fonctions chimiques susceptibles de réagir rapidement avec des fonctions thiols, dans des conditions douces (milieu aqueux, pH 6,5) compatibles avec le respect de l'intégrité des liposomes et des anticorps. La fonction thiol libre peut être générée à partir d'une IgG entière, après digestion pepsique en F(ab')<sub>2</sub> puis réduction par la cystéamine, pour donner un fragment en Fab'. Elle peut également être introduite par l'intermédiaire d'un agent de thiolation (*cf.* § V. 3.1.2).

La réaction de couplage Ac-SH avec PE-PDP forme une liaison disulfure moins stable *in vivo* que ne peut l'être la liaison thioéther, beaucoup plus stable, formée entre le groupement maléimide du PE-MPB et une fonction thiol. L'utilisation de ces réactifs permet, par ailleurs, d'introduire un bras espaceur entre le liposome et l'anticorps qui peut favoriser la formation du complexe de reconnaissance, surtout si l'antigène est peu accessible, ou permettre une meilleure présentation à l'anticorps dans le cas d'haptènes couplés à la bicouche phospholipidique.

La technique a été reprise très souvent, améliorée et appliquée à d'autres types de protéines, comme la protéine A (*cf.* § V. 3.2.1). Hashimoto *et al.* (1983) appliquent cette méthode en utilisant une IgM monoclonal préalablement réduite par la cystéamine et reconnaissant spécifiquement des antigènes d'une lignée cellulaire de tumeurs mammaires de souris. Les résultats sont tout à fait significatifs en ce qui concerne l'efficacité de l'immunociblage aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Hansen *et al.* (1995) comparent le DOPE-MPB et le DOPE-PDP sur des liposomes rendus furtifs par le mPEG-DSPE, et étudient

leur influence sur l'encapsulation de doxorubicine. Pour une concentration en DOPE-MPB allant de 0 à 1 mol %, l'encapsulation de la doxorubicine peut varier de 40 à plus de 95 %. Une concentration supérieure à 2,5 mol% augmente considérablement la fuite de la molécule encapsulée. De plus, les ligands greffés à la surface des liposomes peuvent influencer leur stabilité selon leur nombre mais aussi leur nature. Il est donc indispensable de vérifier non seulement l'intégrité des liposomes après ces techniques de couplage, mais aussi celle des ligands. Dans ce sens, Barbet *et al.* (1981) ont montré par radioimmunoanalyse, que le couplage ne diminuait pas l'efficacité de liaison de l'anticorps pour sa cible antigénique et que les liposomes ne perdaient pas leur contenu après encapsulation de carboxyfluorescéine.



### 3.1.2. Techniques de thiolation

Schwendener *et al.* (1990) ont comparé deux réactifs pour la thiolation d'anticorps en vue de la préparation d'immunoliposomes. Les anticorps, et autres protéines, peuvent être modifiés pour obtenir des résidus thiols extrinsèques. Pour cela, on utilise des agents de thiolation, comme le SPDP ou le SATA (*N*-succinimidyl *S*-acetyl-thioacetate) qui réagissent par leur fonction ester activé sur des amines (par exemple sur la fonction  $\square$ -NH<sub>2</sub> d'une lysine de l'anticorps). On obtient des dérivés amides possédant à l'extrémité du bras espaceur une fonction thiol facilement libérée, après réduction avec le DTT (*dithiothreitol*) pour le SPDP, ou par action d'un excès d'hydroxylamine pour le SATA.

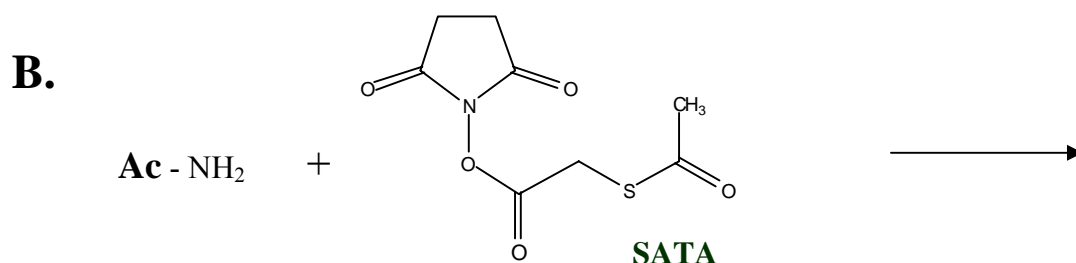
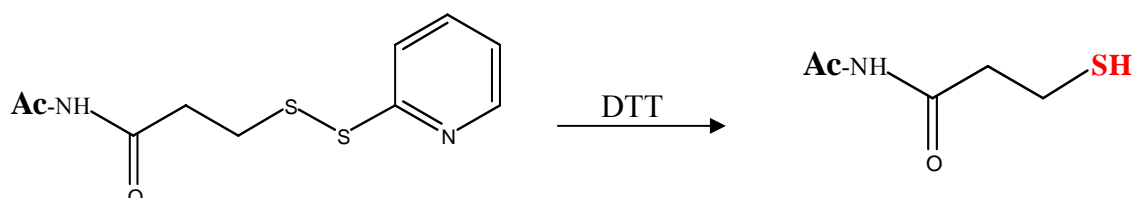
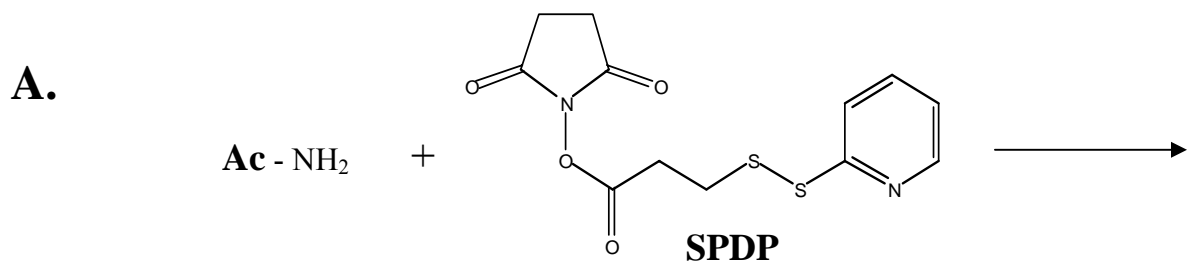


fig.22 : Réactions de thiolation d'Ac-NH<sub>2</sub> par l'intermédiaire du SPDP (A) ou du SATA (B). La fonction SH est générée après réduction du pont dithiopyridine par le DTT (A) ou par réaction du groupe thioacétate avec de l'hydroxylamine (B) (Revue de Schuber, 1993).

### 3.1.3. Couplage d'Ac-NH<sub>2</sub> à des liposomes pré-formés

La phosphatidyléthanolamine peut également être activée sous forme d'ester par le N-hydroxysuccinimide. Après incorporation dans les liposomes, l'ester peut alors réagir avec une fonction amine du ligand. Cette technique est moins employée à cause de la labilité de la fonction ester activé en milieu aqueux.

### 3.1.4. Couplage d'Ac-maléimide à des liposomes pré-formés

A l'inverse de la technique décrite au § 3.1.1, des anticorps portant une fonction maléimide peuvent réagir sur des liposomes contenant des lipides thiolatés. Pour cela, on fait réagir l'anticorps avec du SMPB (Hansen *et al.* 1995) ou du SMCC (*N*-succinimidyl-4-(*p*-maleimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate) (Schwendener *et al.* 1990).

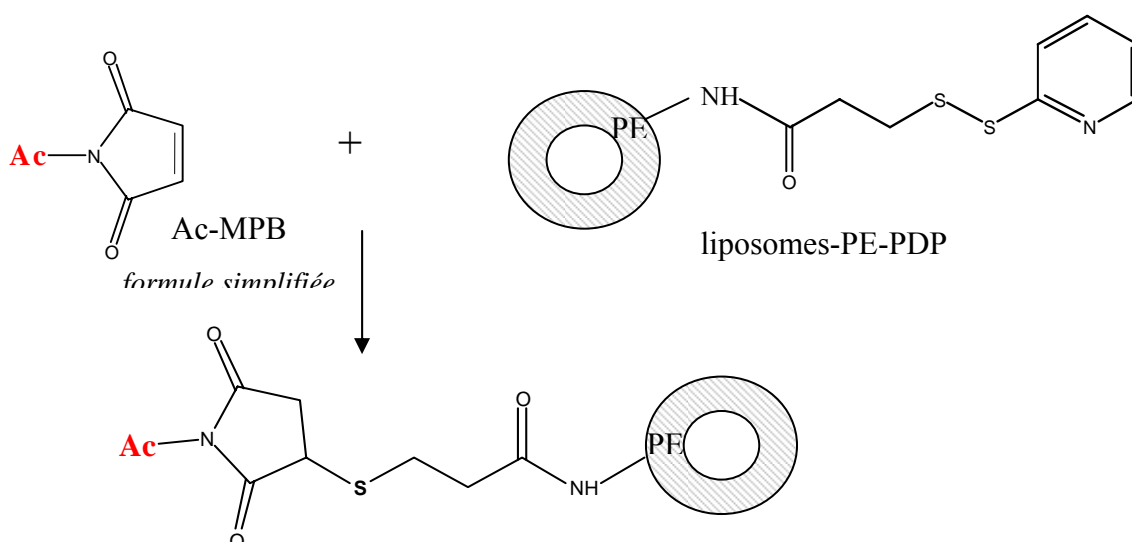
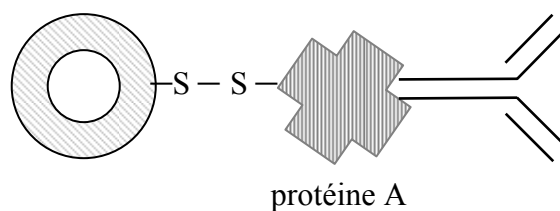


Fig.23 : Couplage covalent d'un anticorps-maléimide  
à un liposome préformé contenant de la PE-PDP (Hansen et al. 1995)

## V. 3.2. Formation de complexes non-covalents stables entre liposomes et anticorps

### 3.2.1. Complexe protéine A / anticorps

Des anticorps ont été couplés à des liposomes, indirectement, par l'intermédiaire de la protéine A de *Staphylococcus aureus*. La protéine a la faculté de se lier, avec d'excellentes affinités ( $K_a = 4 \cdot 20 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) aux fragments Fc de certaines immunoglobulines sans diminuer leur reconnaissance antigénique. En greffant la protéine A, qui possède 4 sites de liaison, à la surface de liposomes, Leserman *et al.*, (1980) ont montré qu'il était possible de préparer des « liposomes universels » sur lesquels on peut coupler la plupart des IgG par leur fragment Fc. L'intérêt de la protéine A est qu'elle n'affecte pas les propriétés de reconnaissance de l'anticorps pour l'antigène. La protéine A est thiolée à l'aide de la technique vue précédemment avec le SPDP, avant d'être greffée sur des liposomes préformés contenant de la PDP-PE comme le montre le schéma suivant :

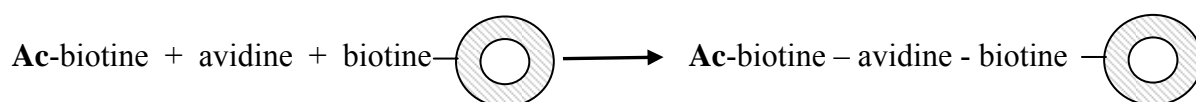


Les cellules *in vitro* peuvent être pré-incubées avec l'anticorps et, après élimination de l'anticorps non fixé, incubées avec les liposomes portant la protéine A. Le couplage des cellules dépend en priorité de la fixation des anticorps à leur surface et le nombre de liposomes liés est proportionnel au nombre de molécules à leur surface reconnaissant l'anticorps (Barbet et Leserman, 1981). L'avantage principal de cette méthode la possibilité d'utiliser des anticorps différents pour une même préparation de liposomes.

### 3.2.2. Complexe avidine-biotine

Le complexe de forte affinité (strep)avidine / biotine ( $K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$ ), offre différents schémas possibles d'utilisation applicables au ciblage des liposomes.

La biotine peut être couplée de manière covalente à la surface des liposomes et de l'anticorps par simple activation sous forme d'ester, à l'aide de NHS, puis réaction avec une fonction amine de la PE ou d'une lysine d'un anticorps. Le complexe non-covalent (de type « sandwich ») est alors réalisé par pontage à l'aide de la (strep)avidine (Loughrey *et al.* 1987, Rivney *et al.* 1987, Cao et Suresh 2000) entre le liposome biotinylé et un anticorps biotinylé également, comme le montre le schéma suivant :



La streptavidine, préalablement thiolée avec du SPDP, peut également être couplée à des liposomes contenant de la PE-MPB avant de réagir avec un anticorps biotinylé. Ou à l'inverse, la biotine est couplée de façon covalente aux liposomes et c'est l'anticorps que l'on conjugue à la (strep)avidine.

L'association (strep)avidine-biotine est très rapide (< 5 min.) et l'on peut fixer jusqu'à 40 molécules de streptavidine sur des liposomes biotinylés de 100 nm (Loughrey *et al.* 1987). Le problème est que chaque molécule de (strep)avidine possède quatre sites de fixation de la biotine et l'on peut rapidement observer des couplages inter-vésicules, associés à des effets d'aggrégation ou de précipitation.

### V. 3.3. Couplage Ac / liposomes par interactions hydrophobes

Au lieu de coupler l'anticorps sur la membrane de liposomes pré-formés, il est possible de les lier chimiquement à des molécules hydrophobes (acides gras, cholestérol, phospholipides...) puis de les incorporer au mélange phospholipidique qui servira à préparer les liposomes (Huang *et al.* 1980). Pour cela, on fait réagir un groupement amine de la protéine avec un dérivé acylant d'acide gras (anhydrides, chlorures d'acide ou esters activés) pour former une liaison amide stable. On peut alors ancrer ce dérivé hydrophobe

dans la bicouche par l'intermédiaire des chaînes grasses, généralement par la technique de dialyse en présence de détergent (comme l'octylglucoside par exemple).

Ho *et al.* (1986) utilisent un anticorps dont le fragment Fc est acylé par un ester NHS de l'acide palmitique (palmitoyl-IgG). Ils ajoutent cet anticorps modifié à la phase aqueuse, ainsi qu'un marqueur fluorescent, au cours de la préparation des liposomes composés uniquement de PE. Les immunoliposomes obtenus s'avèrent non seulement spécifiques des cellules ciblées, mais également plus stables que les mêmes liposomes sans ancrage de l'anticorps.

Il est également possible de modifier la PE-NH<sub>2</sub> avec de l'anhydride glutarique (Klibanov *et al.* 1991). Le dérivé PE-COOH obtenu (NGPE pour *N-glutaryl phosphatidyléthanolamine*) possède une fonction acide, à la différence des méthodes proposées jusqu'ici, qui lui permet de se coupler directement à des fonctions amines des protéines en présence de carbodiimide. L'anticorps couplé au NGPE est alors mélangé aux autres lipides et solubilisé dans l'octylglucoside.

### **V. 3.4. Couplage Ac / PEG**

Comme nous l'avons vu précédemment, le fait de rendre les immunoliposomes furtifs est essentiel. Les premiers travaux visant à coupler des anticorps sur des liposomes déjà pégylés sont décevants. Les chaînes de PEG (surtout celles de haut poids moléculaire) empêchent non seulement la reconnaissance de l'antigène ciblé mais bien souvent, la fixation de l'anticorps elle-même sur le liposome. Pour ces raisons, de nombreux auteurs ont proposés de nouvelles stratégies pour permettant le couplage de l'anticorps à l'extrémité des chaînes de PEG.

Les méthodes de couplage se font généralement par fonctionnalisation des lipides pégylés grâce au SPDP sur lesquels on fait réagir un dérivé maléimide de l'anticorps (Allen *et al.* 1995, Maruyama *et al.* 1995, Mercadal *et al.* 1999). Pour coupler des anticorps thiolés, il est possible d'utiliser des fonctions bromoacétamide (BA) ou maléimide (MPB).

Zalipsky *et al.* (1993) utilisent un groupement hydrazide en bout de chaîne de PEG pour réagir avec un groupement aldéhyde obtenu par oxydation de carbohydrates dans le fragment Fc de l'anticorps par du périodate de sodium. Maruyama *et al.* (1997) décrivent



le couplage de protéines par réaction avec une fonction carboxyl en bout de PEG et en utilisant deux agents d'activation. Enfin, Bendas *et al.* (1999) proposent une autre technique de conjugaison par fonctionnalisation du PEG avec du chlorure de cyanure. Les anticorps peuvent alors être couplés sans activation préalable dans des conditions basiques (pH = 8,8).

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-BA	thiol	Zalipsky <i>et al.</i> 1995a
PE-PEG-Hz	aldéhyde	Zalipsky <i>et al.</i> 1993 Harding <i>et al.</i> 1997
PE-PEG-COOH	-	Maruyama <i>et al.</i> 1997
PE-PEG-cyanure	aucune	Bendas <i>et al.</i> 1999

*Tableau 5 : Différents groupements chimiques utilisés pour le couplage Ac / PEG.*

*Rq : Les méthodes de couplage entre les phospholipides et le PEG ainsi que la synthèse des différents PEG fonctionnalisés sont détaillées par Zalipsky *et al.* (1993, 1995a, 1995b).*

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 anticorps 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 (de 4 à 8 mol %), et de 30 à 35 molécules d'anticorps 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 RES mais aussi la reconnaissance immunospécifique entre antigènes et anticorps. 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 anticorps sur la partie terminale des PEG, favorisant non seulement leur biodistribution mais aussi la présentation de l'anticorps vers sa cible antigénique. Ces effets varient ensuite selon la longueur des

chaînes de PEG, leur concentration dans la composition lipidique des liposomes, le nombre d'anticorps fixés à la surface des vésicules et l'accessibilité de l'antigène.

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 anticorps 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'anticorps. Les résultats semblent satisfaisants *in vitro* vis-à-vis de cellules CD34+. Maruyama *et al.* (1997) 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 (antigène carcinoembryonnaire).

### **V. 3.5. Méthode de « post-insertion »**

Une nouvelle technique est décrite par l'équipe de Allen pour la fixation de ligands sur des immunoliposomes qui peut être applicable à tous les anticorps, fragments d'anticorps, peptides et autres ligands. Les ligands sont couplés à des micelles de polyéthylène glycol et transférés dans la bicouche de liposomes pré-formés par une simple étape d'incubation.

Une de leur étude décrit le couplage de fragments Fab' thiolés anti-CD19 sur des micelles composées de DSPE-PEG-maléimide pendant une nuit à température ambiante. Puis les micelles sont filtrées et mélangées à des liposomes pré-formés contenant soit de la doxorubicine, soit de la vincristine, pendant 1 heure à 60-65°C. La biodistribution de ces liposomes est effectuée chez des souris greffées par des cellules B de lymphome CD19+ d'origine humaine. Le greffage des anticorps sur les liposomes ne semble pas accélérer le relargage des PA. L'immunospecificité et cytotoxicité est comparable à des liposomes préparés par la méthode conventionnelle (PE-PEG-MPB). Cette méthode est simple, rapide et adaptable à plusieurs ligands. (Iden *et al.* 2001, Moreira *et al.* 2002, Allen *et al.* 2002).

Certains critères semblent essentiels à respecter pour obtenir un immunoliposome « idéal ». Tout d'abord, les méthodes de couplage Ac-liposomes doivent être simples et rapides, produisant une liaison stable et non-toxique. La surface du liposome doit présenter une quantité suffisamment importante d'Ac afin d'optimiser le ciblage de l'immunoliposome vers les cellules cibles. De plus, la conjugaison de l'Ac au liposome ne doit pas diminuer la reconnaissance antigénique de l'Ac, ni altérer l'intégrité structurale du liposome.

Les autres critères essentiels concernant l'utilisation des immunoliposomes furtifs pour vectoriser des substances médicamenteuses (anthracyclines, vinorelbine, taxanes...). Les principes actifs, notamment les antinéoplasiques, doivent pouvoir être encapsulés efficacement afin d'obtenir une dose suffisante au moment du relargage au niveau des cellules tumorales. Tout en sachant que la reconnaissance de l'immunoliposome pour sa cible ne doit pas être diminuée, ni par l'encapsulation du PA, ni par la présence des chaînes de PEG sur la surface membranaire. Souvent, on rencontre des incompatibilités entre la chimie de couplage et l'encapsulation de PA, pour lesquels il faut parfois des conditions de pH différentes.

L'utilisation des immunoliposomes *in vivo* est très compliquée et pose de nombreux problèmes, dont certains, nous l'avons vu, ont pu être résolus, et d'autres subsistent. Quoiqu'il en soit, les techniques de préparation des immunoliposomes sont de plus en plus performantes, l'encapsulation des principes actifs est efficace et stable, et selon l'accessibilité des tumeurs, les résultats sont encourageants.

## **VI. APPLICATIONS THERAPEUTIQUES 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 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 ?? liste les produits sous forme liposomale sur le marché ou en cours d'essais cliniques.

## **V. 1. Généralités**

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.

<b>Principes actifs</b>	<b>Spécialités</b>	<b>Avancée thérapeutique</b>	<b>Laboratoires pharmaceutiques</b>
<b>Anticancéreux</b>			
Daunorubicine	<b>Daunoxome<sup>®</sup></b>	AMM depuis 1996	NeXtar (USA)
Doxorubicine	<b>Doxil<sup>®</sup></b> / <b>Caelyx<sup>®</sup></b> <b>Myocet<sup>®</sup> (TLC D99)</b>	AMM depuis 1995 (USA) et 1996 (Europe) AMM	Sequus (USA) / Schering (Europe) The liposome Company, Elan (USA)
Annamycine	-	Phase II	Aronex (USA)
Cisplatine	<b>Platar<sup>®</sup></b> <b>Spy 07</b>	Phase III Phase I	Aronex (USA) Sequus (USA)
Acide rétinoïque	<b>Atragen<sup>®</sup></b>	Pase II	Aronex (USA)
Edelfosine	<b>TLC ELL-12</b>	Phase I	The liposome Company, Elan(USA)
Vincristine	-	Phase I	Inex (Canada)
<b>Antinfectieux</b>			
Amphotéricine B	<b>Ambisome<sup>®</sup></b> <b>Abelcet<sup>®</sup></b> <b>Amphocil<sup>®</sup></b>	AMM depuis 1989 (USA) et 1990 (Europe) AMM AMM	NeXtar (USA) The liposome Company, Elan (USA) Sequus (USA)
Nystatine	<b>Nyotran<sup>®</sup></b>	Phase III	Aronex (USA)
Amikacine	<b>Mikasome<sup>®</sup></b>	Phase II / III	Sequus (USA)

---

<b>Vaccins</b>			
anti-hépatite A	<b>Epaxal<sup>®</sup></b>	AMM depuis 1994 en Suisse	Swiss Serum Institute (Suisse)
anti-hépatite A et B	-	Phase I	Swiss Serum Institute (Suisse)
Diphtérie-tétanos-hépatite A	-	Phase I	Swiss Serum Institute (Suisse)
Diphtérie-tétanos-grippe-hépatite A	-	Phase I	Swiss Serum Institute (Suisse)
<b>Autres</b>			
Lidocaïne	<b>ELA-Max<sup>®</sup></b>	AMM depuis 1998 aux USA	Biozone (USA)
Prostaglandine E2	<b>Ventus<sup>®</sup></b>	Phase III (échec)	The liposome Company, Elan (USA)

---

*Tableau 6 : Formulations liposomiales commercialisées ou en phase d'évaluation clinique (Barratt, 2000).*

## 1.1. Pour les liposomes conventionnels : maladies infectieuses/vaccination

Les liposomes conventionnels sont utilisés pour cibler et délivrer des agents anti-infectieux aux macrophages infectés (*cf. paragraphe VI .2.1*).

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.

Pour amplifier la réponse immunitaire, on peut avoir recours à des adjuvants. Allison en 1974 a mis en évidence le pouvoir adjuvant des liposomes et depuis, de nombreux travaux ont exploité cette propriété des liposomes (Alving, 1991). Ils peuvent donc servir à la fois de transporteurs d'antigènes (protéines, peptides ou haptènes), d'adjuvants (lipide A, muramyl-dipeptide...) et/ou d'immunomodulateurs (cytokines, lymphokines...) et offrent de nombreux avantages (*tableau 6*).

Enfin, les liposomes conventionnels peuvent améliorer la présentation et le processus antigénique. En effet, certaines molécules immunogènes (haptènes) ne peuvent induire de réponse immunitaire sans être fixées à de plus grosses molécules. Ils sont donc très utiles pour induire une immunité *in vivo* et ont été employés à ce titre pour le développement des vaccins. Plusieurs vaccins sous forme de liposomes ont été testés chez l'Homme et certains ont eu l'AMM en Suisse (vaccin contre l'hépatite A, Epaxal®).

---

### Avantages de l'utilisation de liposomes comme vecteurs d'antigènes

---

1. Biodégradables et immunologiquement inertes quand ils sont composés des PC et de cholestérol
  2. Amplification de l'immunogénicité de substances peu ou pas immunogènes (haptènes, peptides)
  3. Association d'antigènes possédant une certaine hydrophobicité
  4. De petites quantités d'antigènes sont suffisantes ( $\square$ g/ml)
  5. Association de plusieurs antigènes au même liposome
  6. Association d'adjuvants ou d'immunomodulateurs au même liposome que l'antigène
  7. Diminution de la toxicité de certains antigènes ou adjuvants
  8. Obtention d'une production importante et durable d'anticorps
-



## **VI. 1.2. Pour les liposomes furtifs : Formes à libération prolongées / Ciblage passif**

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 d'inflammatoires, l'endothélium est plus perméable et permet une extravasation des petits liposomes (*cf.* « *EPR Effect* » au chapitre IV. 3.2). Il en résulte une accumulation des liposomes sur ces sites qui peut être mise à profit en cancérologie (exemple du Caelyx<sup>®</sup>) 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 <sup>99m</sup>Tc ou à l'<sup>111</sup>In pour la détection de sites infectieux ou inflammatoires comme les abcès ou la polyarthrite rhumatoïde (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 l'arthrite rhumatoïde, les liposomes ont été utilisés comme vecteur de corticostéroïdes dans le but de réduire, après administration intraarticulaire, la toxicité systémique de ces produits.

## **VI. 1.3. Pour les immunoliposomes : Ciblage spécifique**

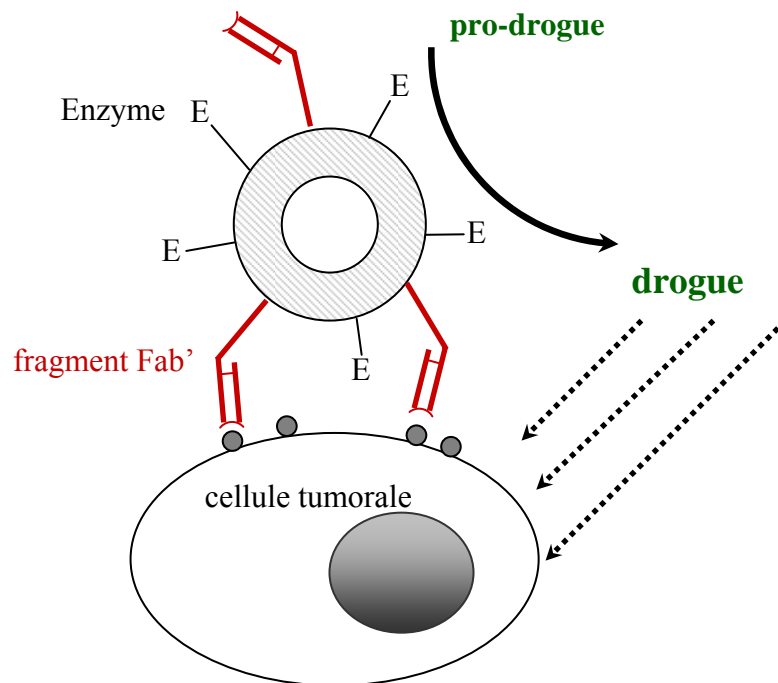
Le ciblage passif comme nous venons de le voir avec les liposomes furtifs est à un stade de développement légèrement plus avancé que l'utilisation des liposomes pour le ciblage actif. Il n'y a pas encore de spécialités sur le marché avec les immunoliposomes. Plusieurs obstacles existent encore concernant l'efficacité des thérapeutiques extra-vasculaires. L'exemple le plus avancé est celui des immunoliposomes de Doxil<sup>®</sup> qui ciblent le HER2 sur les cellules de cancer du sein (Park *et al.* 2001).

Après injection intra-veineuse, 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 avec des immunoliposomes anti-hématies de souris contenant de la chloroquine, injectée par voie intra-veineuse chez des rats et des souris infectés par des hématies parasitées avec *Plasmodium berghei* (*malaria*).

Le principe du système ADEPT pour « Antibody-directed enzyme product therapy », 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 anticorps. 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 anticorps-enzyme (*figure 24*).

Ce principe a été appliqué *in vitro* avec des immuno-enzymosomes transportant la B-glucuronidase capable d'activer des prodrogues d'anthracycline-glucuronide.



*Fig. 24 : 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).*

#### **VI. 1.4. Pour les liposomes cationiques : Thérapie génique**

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 (Barenholz, 2001). 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).

## **VI. 2. Formes liposomales commercialisées (tableau 7)**

### **VI. 2.1. 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. En effet, les essais démontrent que la cardiotoxicité de ces agents est significativement diminuée lorsque ceux-ci sont administrés par voie intraveineuse sous forme de liposomes. Nausées, vomissements et alopecie sont également moindres avec la forme liposomale, ainsi qu'une disparition des nécroses cutanées en cas d'extravasation du produit au moment de l'injection.

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. En effet, des études expérimentales montrent que les liposomes s'accumulent avec un maximum à 8 heures après injection dans des tumeurs solides et que le pic de libération de daunorubicine est de 24 heures à 32 heures traduisant une libération lente de l'actif au sein de la tumeur (Forssen *et al.* 1997).

Caelyx<sup>®</sup> (doxorubine) et Daunoxome<sup>®</sup> (daunorubicine) font partie des liposomes ayant des temps de circulation prolongés (*tableau 8*). Les liposomes de Doxil<sup>®</sup> sont furtifs parce qu'ils sont pégylés et les liposomes de Daunoxome<sup>®</sup> 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). Elles ont d'abord eu l'AMM pour le traitement du sarcome de Kaposi en 1995 aux Etats-Unis puis en 1996 en Europe. A la fin des années 90, des essais de phase III ont montré l'intérêt du Doxil<sup>®</sup> pour le traitement du cancer de l'ovaire avancé, en 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> ligne. Il reçoit l'AMM pour cette indication puis pour le traitement du cancer du sein métastatique (Swenson *et al.* 2003).

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

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

De nombreuses études sont en cours pour élargir ces indications (tumeurs cérébrales, pulmonaires, leucémies, lymphomes...), notamment pour le traitement du myélome multiple (Lopes de Menezes, 2000). Certaines formulations proposent en effet des immunoliposomes furtifs contenant de la doxorubicine et reconnaissant l'antigène CD19 présent sur les cellules de myélome multiple. D'autres auteurs proposent aussi, dans des essais de phase I/II, d'associer le Myocet<sup>®</sup> au cyclophosphamide, à la vincristine et à la prednisone pour traiter des lymphomes non-hogkiniens 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.

## VI. 2.2. 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 les antimonies (leishmanioses), pour plusieurs antibiotiques comme la nystatine, la gentamicine, l'amikacine, l'ampicilline et l'amphotéricine-B (infections bactériennes et fongiques) et 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<sup>®</sup>). C'est une formulation lyophilisée d'amphotéricine-B (Adler-Moore *et al.* 1993) incorporée dans de petits liposomes chargés négativement (SUV composé 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. D'autres spécialités ressemblantes actuellement sur le marché, comme l'Amphotec<sup>®</sup> ou l'Albecet<sup>®</sup>, ne sont pas des liposomes mais respectivement des micelles mixtes ou des microémulsions de lipides de d'amphotéricine-B. Leur composition et leurs propriétés physico-chimiques ne sont pas du tout les mêmes, et pourtant, toutes ces formulations d'amphotéricine-B permettent de réduire significativement la toxicité du principe actif.

L'intérêt de ces formulations est donc principalement de pouvoir traiter, avec une meilleure tolérance, les mycoses systémiques et profondes que l'on retrouve particulièrement chez les sujets immunodéprimés (candidoses, aspergilloses, cryptococcoses, histioplasmoses...) et qui sont d'évolution rapidement fatale. Utilisé depuis plus de 30 ans, le traitement le plus efficace consiste en une injection IV d'amphotéricine-B, qui malheureusement est à l'origine de nombreux effets secondaires (fièvre, frissons, hypotension...) et surtout une forte toxicité rénale pouvant imposer l'arrêt du traitement. L'encapsulation de l'amphotéricine-B dans les liposomes a permis de diminuer la néphrotoxicité et d'améliorer l'efficacité du principe actif 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). Les mécanismes d'action proposés mettent en jeu le passage des liposomes au travers des capillaires endommagés et l'augmentation de leur pénétration dans les macrophages pouvant favoriser le traitement intra-cellulaire de l'infection. On observe également l'augmentation et la prolongation des taux sériques de l'antifongique quand il est sous forme de liposomes.

### **VI. 3. Perspectives**

L'utilisation thérapeutique des liposomes offre de nombreuses perspectives et dans des domaines extrêmement variés (thérapeutique médicamenteuse mais aussi imagerie médicale et diagnostic, vaccination, radioimmunothérapie...). Les résultats obtenus jusqu'à présent montrent que les liposomes constituent des vecteurs médicamenteux particulièrement bien tolérés et capables de réduire la toxicité aiguë et chronique des principes actifs.

L'amélioration de l'efficacité thérapeutique reste à confirmer dans plusieurs applications mais de nombreux travaux de recherche sont en cours, notamment pour le traitement des maladies enzymatiques congénitales, de la polyarthrite rhumatoïde et aussi en thérapie génique (Couvreur, 1993). Les liposomes paraissent aussi avoir des potentialités susceptibles d'être exploitées par d'autres voies d'administration que la voie

intra-veineuse (intra-cavitaire, cutanée, pulmonaire, ophtalmique...). Certains auteurs proposent des liposomes en aérosols pour administrer des immunosuppresseurs ou des anti-inflammatoires (Waldrep et al, 1997), ou des administrations d'insuline en sous-cutanée. D'autres part, il se développe de nouveaux types de liposomes à libération spécifique : liposomes thermo-sensibles, pH-sensibles ou fusogènes. En cancérologie, des immunoliposomes peuvent être envisagés pour transporter de la radioactivité spécifiquement vers des cellules tumorales afin de les détruire. C'est le principe de la radioimmunothérapie pour laquelle un chapitre est développé afin d'évaluer les potentialités des liposomes tout particulièrement dans cette application.

## **DEUXIEME PARTIE**

### **Radiomarquage des liposomes pour le ciblage en radioimmunothérapie**



# I. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

## I. 1. Présentation de la radioimmunothérapie

La radioimmunothérapie (RIT) est une forme de radiothérapie interne dont le principe consiste à vectoriser des radioéléments sur des cellules tumorales afin de les détruire. L'agent de vectorisation utilisé dans cette technique est un anticorps monoclonal (AcM) reconnaissant de façon spécifique les antigènes exprimés par les cellules tumorales. 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 d'une part l'anticorps (spécificité, affinité, dose, immunoréactivité) et d'autre part le radionucléide (période, type d'émission, pureté). Les deux autres éléments concernent la cible : propriétés de l'antigène tumoral (localisation, densité, expression) et nature de la cible tumorale (radiosensibilité, taille, vascularisation, taux de prolifération).

Les applications thérapeutiques en cours d'évaluation clinique sont représentées surtout par les hémopathies, avec principalement les lymphomes non hodgkiniens. Les hémopathies présentent des caractéristiques qui en font des cibles idéales pour la RIT. Ce sont des tumeurs radiosensibles, se présentant sous forme d'amas, exprimant des antigènes bien caractérisés, et développées chez des patients immunodéprimés chez qui les injections peuvent être répétées avec un risque réduit d'immunisation. En 1994, l'évaluation clinique de l'AcM anti-CD20 marqué à l'iode-131 ( $^{131}\text{I}$ -tositumomab, Bexxar<sup>®</sup>) a été initiée, dans les formes réfractaires et résistantes de lymphomes malins nonhodgkiniens. Des taux de réponse élevés ont été rapportés, de 71 % avec des activités non-myéloablatives et de 86 % avec des activités myéloablatives (Kaminski *et al.* 2000). En France, l'AcM murin anti-CD20 marqué à l'yttrium-90 ( $^{90}\text{Y}$ -ibritumomab tiuxetan, Zevalin<sup>®</sup>) est en cours d'AMM et l'Ac humanisé anti-CD22, ( $^{90}\text{Y}$ -hLL2 ou épratuzumab) est en cours d'évaluation clinique pour le traitement de lymphomes malins non-hodgkiniens de bas grade, récidivants ou réfractaires à la chimiothérapie (Lewis *et al.* 1995, Dillman 2002). Au total, ces différents

essais montrent une réponse élevée et durable, supérieure à celle obtenue avec des AcM non radiomarqués (même Ac murin froid pour Bexxar<sup>®</sup>, rituximab pour Zevalin<sup>®</sup>).

Si l'intérêt thérapeutique de la RIT a été établi pour les tumeurs hématologiques, et en particulier les lymphomes malins non hodgkiniens, il reste encore à démontrer pour les tumeurs solides. Les quelques essais cliniques réalisés sur des tumeurs solides n'ont pas été aussi encourageants que pour les hémopathies principalement en raison de leur taille, de leur moindre accessibilité et de leur relative radiorésistance qui impose bien souvent des doses importantes délivrées à la tumeur (Chatal *et al.* 2001).

Jusqu'à ces dernières années, 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. Ces résultats s'expliquaient probablement en partie par l'importance des masses tumorales traitées et par l'utilisation d'AcM directement radiomarqués dont la fixation tumorale est faible (0,001 à 0,01 % de la dose injectée par gramme de tumeur), conduisant à un contraste insuffisant pour délivrer à la tumeur solide une dose tumoricide tout en maintenant une irradiation acceptable des tissus sains.

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

La technique A.E.S. (Affinity Enhancement System) dont le principe est représenté sur la *figure 1*, 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 anticorps monoclonal bispécifique dont un bras reconnaît un antigène 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).

Cette 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 fixer par haptène (activité spécifique) constitue donc le facteur limitant de ce système. En effet, actuellement, les haptènes développés et les radionucléides disponibles ne permettent pas d'obtenir des activités spécifiques supérieures à 70 MBq/nmol.

C'est pourquoi nos efforts se sont portés sur des études qui permettraient d'augmenter l'activité spécifique des molécules vectrices. Différents thèmes ont été abordés dont la fonctionnalisation et le radiomarquage de liposomes immunospécifiques.

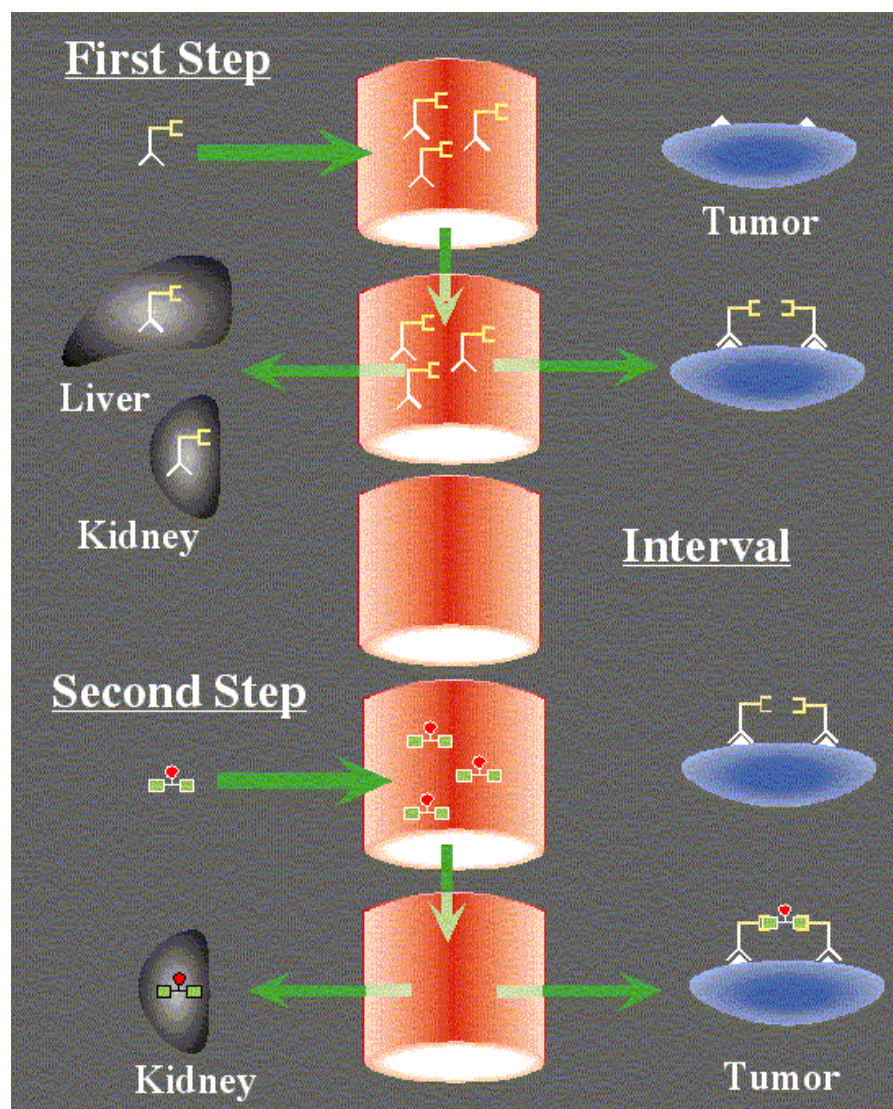


Fig. 1 :Principe du système A.E.S.

## I. 2. Intérêt des liposomes en RIT

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.

L'inclusion de radionucléides au sein de liposomes a été décrite, essentiellement à des fins diagnostiques (Proffitt *et al.* 1983, Phillips 1999), mais il est envisageable d'utiliser des radioisotopes à visée thérapeutique et d'imaginer un système de ciblage en deux temps analogue à celui utilisé dans l'AES (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 anticorps bispécifiques (dirigés d'une part contre l'haptène et d'autre part contre la tumeur). Les deux buts recherchés 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.

L'objectif principal de ce projet est la mise au point d'une nouvelle stratégie thérapeutique anti-tumorale basée sur l'utilisation de liposomes radiomarqués et vectorisés. Pour cela, nous avons tout d'abord testé la résistance de la paroi des liposomes aux rayonnements ionisants. Différents types de liposomes ont ensuite été préparés en couplant un agent chélatant (pour le marquage) ou un haptène (pour la reconnaissance d'un anticorps) à un phospholipide de la bicouche. Le radiomarquage des liposomes a été envisagé de deux manières différentes. La première vise à marquer la paroi des liposomes par l'intermédiaire d'un agent chélatant et la seconde consiste à incorporer un réactif radiomarqué à l'intérieur des liposomes par une technique d'encapsulation active. La stabilité sérique des liposomes après marquage a été vérifiée et des tests d'immunoréactivité ont permis d'évaluer l'affinité des anticorps reconnaissant spécifiquement le DTPA-<sup>111</sup>In (Ac 734) ou le DNP (Ac 265.5) incorporés dans la paroi des liposomes.

## II. MATERIEL ET METHODE

### II. 1. Couplage des agents chélatants et haptènes aux lipides

*Les premiers travaux effectués au sein du laboratoire, ont montré qu'il est possible de radiomarquer facilement la paroi des liposomes avec des rendements élevés et une bonne stabilité. Ce marquage en surface peut se faire par l'intermédiaire d'agents chélatants capables de lier des différents radionucléides (bismuth-213, actinium-225, yttrium-90, indium-111...). Pour cela, l'agent chélatant est incorporé à la membrane liposomale sous la forme d'un conjugué phosphatidyléthanolamine – agent chélatant (exemple du PE-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-<sup>111</sup>In est reconnu spécifiquement par l'anticorps monoclonal 734.*

Des haptènes, comme le DNP (acide 2,4-dinitrophénylaminocaproïque) peuvent également être couplés au dimiristoylphosphatidyléthanolamine (DMPE) avant d'être incorporés dans la bicouche des liposomes au cours de leur préparation. Il existe également un anticorps monoclonal spécifique pour le DNP, non couvert par un brevet, contrairement à l'Ac 734.

#### II. 1.1. Matières premières

*Le dimiristoylphosphatidyléthanolamine (DMPE) est un produit commercialisé par le laboratoire Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne) avec 99 % de pureté, ainsi que l'acide N-2,4-dinitrophényl-ε-amino-caproïque (DNP-cap).*

*Le dianhydride de diéthylènetriaminepentaacétique (DTPA-DA) à été obtenu chez Pierce (Rockford, USA).*

## II. 1.2. Couplage du DMPE au DTPA

Le PE-DTPA a été synthétisé au sein de l'unité INSERM 601 par couplage de la fonction amine du DMPE à la fonction dianhydride du DTPA, en excès de 2 équivalents (éq.) par rapport au DMPE. 10,5 mg de DMPE (16,5  $\mu\text{mol}$ ) sont solubilisés à chaud en chloroforme, en présence de 1,5 éq. de triéthylamine. Puis on ajoute 11,8 mg de DTPA-DA (33  $\mu\text{mol}$ ) solubilisés en DMF anhydre. La réaction se fait sous agitation, en milieu anhydre et à température ambiante pendant 24 h.

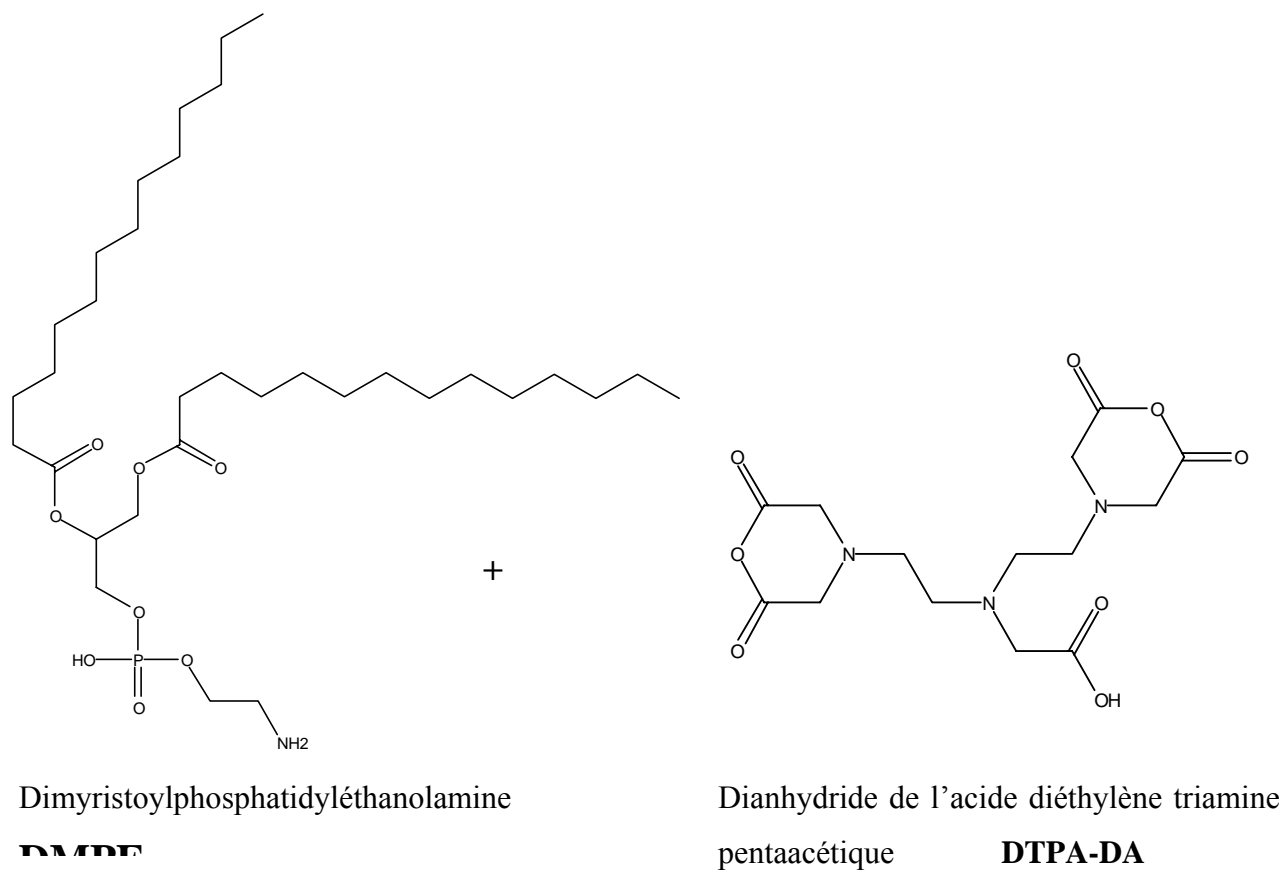
Le suivi de la réaction s'effectue par chromatographie (CCM) sur plaque de silice (ITLC-SG, Pall Life Sciences) en  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (65:35) révélée à l'iode. Le DTPA apparaît sous la forme d'un spot de  $R_f = 0$ , le DMPE apparaît sous la forme d'un spot de  $R_f = 0,9$  et le PE-DTPA sous la forme d'une flamme chromatographique dont le  $R_f$  est compris de 0,2 à 0,3. Le produit de la réaction (PE-DTPA) est purifié par extraction dans des tubes de verre en présence de NaCl saturé. La phase chloroformique, contenant le produit, est séparée de la phase aqueuse par centrifugation 10 minutes à 400 g (3 fois).

Une CCM révélée par pulvérisation d'une solution éthanolique de ninhydrine (10 mg/ml en EtOH) permet d'indiquer la présence de fonctions amines libres. Dans ce cas, on observe l'apparition d'une coloration rose après chauffage de la plaque (test positif).

La phase chloroformique est évaporée sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapor<sup>®</sup>, Buchi) et analysée par spectrométrie de masse (SM ( $H+1$ ) = 1011).

Le rendement de la réaction est de 90 % (masse de produit obtenu = 14,9 mg).

Le résidu sec est repris par du  $\text{CHCl}_3$  pour obtenir une solution à 10 mg/ml qui sera conservée à  $-20^\circ\text{C}$  avant d'être utilisée pour la préparation des liposomes.



1. DMPE en  $\text{CHCl}_3$  +  $\text{Et}_3\text{N}$  1,5 éq.
2. DTPA-DA en DMFa (2éq.)
3. Extraction en  $\text{CHCl}_3$  / NaCl saturé

**PE-DTPA**

$\text{C}_{47}\text{H}_{87}\text{N}_4\text{O}_{17}\text{P}$   
 Exact Mass: 1010,58  
 Mol. Wt.: 1011,18  
 C, 55,83; H, 8,67; N, 5,54; O, 26,90; P, 3,06

Fig. 2 : Synthèse du PE-DTPA : couplage du dimyristoylphosphatidyléthanolamine (DMPE) avec un agent chélatant, le dianhydride de l'acide diéthylène triamine pentaacétique (DTPA-DA).

## II. 1.3. Couplage du DMPE au DNP-cap en 2 étapes

### *1.3.1. Synthèse du N-Hydroxysuccinimide 2,4-dinitrophénylaminocaproate (NHS-DNP-cap)*

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. On ajoute directement 1,1 éq. de N-hydroxysuccinimide ou NHS (213 mg soit 1,85 mmol) solubilisés dans 6 ml d'acétate d'éthyle (AcOOEt). Le N,N'-dicyclohexylcarbodiimide ou DCC (346 mg soit 1,68 mmol, 1 éq.) est solubilisé dans 15 ml de dioxane anhydre et ajoutée goutte à goutte au mélange réactionnel à l'aide d'une ampoule à brome. Le mélange est agité pendant 2 heures, sous azote et à température ambiante.

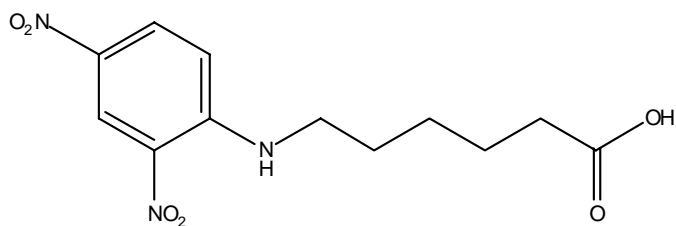
Le précipité de dicyclohexylurée ou DCHU formé au cours de la réaction est filtré et la solution est évaporée à sec au Rotavapor<sup>®</sup>. Le résidu sec est repris par un minimum d'éthanol chaud et le NHS-DNP-cap est obtenu par recristallisation de la solution. Les paillettes jaunes de l'ester sont filtrées, lavées en EtOH puis séchées sous vide au Rotavapor<sup>®</sup>. Une CCM sur plaque de silice en CHCl<sub>3</sub>/AcOOEt (1 :1) révèle un spot de R<sub>f</sub> = 0,8 et un contrôle est effectué par spectrométrie de masse (SM(H+1) = 394). Le rendement de la réaction est de 60 % (masse récupérée = 390 mg).

### *1.3.2. Couplage du DMPE au NHS-DNP-cap*

Le DMPE (10 mg soit 15,7 μmol) est solubilisé dans 2 ml de CHCl<sub>3</sub> à chaud et en présence de 1,5 éq. de triéthylamine. Le DNP-cap-NHS (12,4 mg soit 31,4 μmol, 2éq.) solubilisé dans 2 ml de CHCl<sub>3</sub> est ajouté et le mélange est mis sous agitation une nuit à température ambiante. Le PE-DNP obtenu est purifié sur colonne de silice en CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9 :1). Une CCM sur plaque de silice en CHCl<sub>3</sub>/MeOH (8 :2) donne une flamme chromatographique de R<sub>f</sub> compris entre 0,3 et 0,4. Le test à la ninhydrine est négatif (pas de fonctions amines libres) et un contrôle est effectué par spectrométrie de



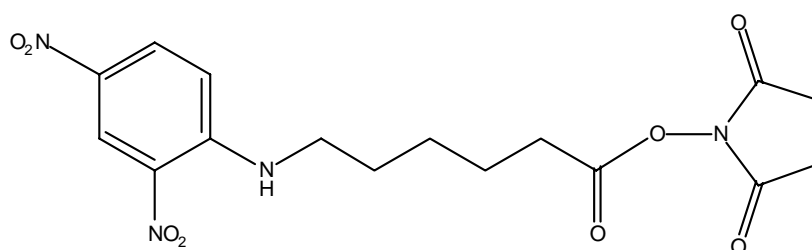
masse ( $SM(H-1) = 913$ ). Le rendement de la réaction est de 95 % (masse obtenue = 13,7 mg).



acide N-2,4-dinitrophényl-amino caproïque

**DNP-cap**

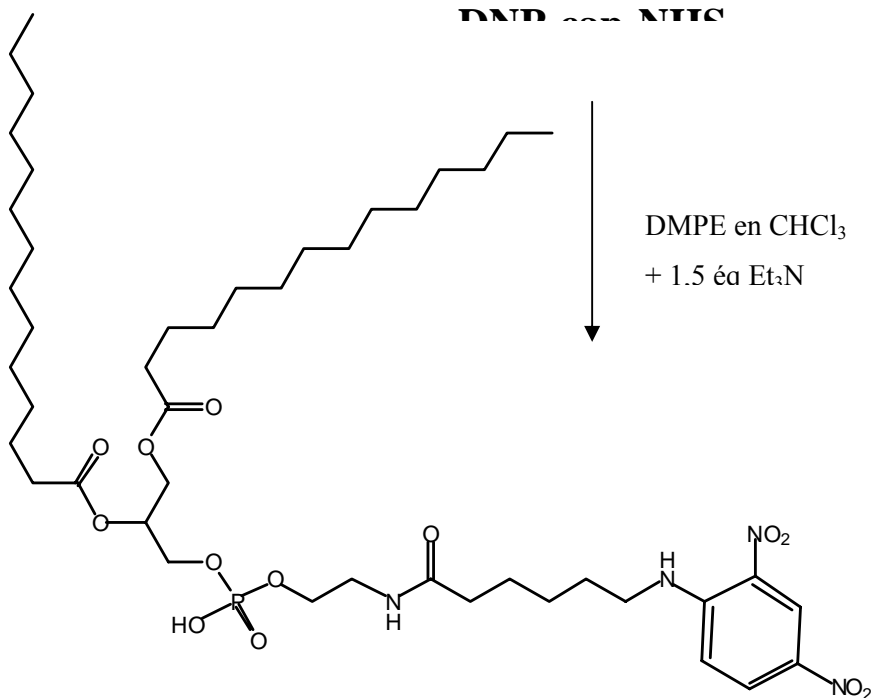
DCC/NHS  
en dioxane



acide N-Hydroxysuccinimide 2,4-dinitrophényl-amino caproïque

**DNP-cap NHS**

DMPE en  $\text{CHCl}_3$   
+ 1.5 éq  $\text{Et}_3\text{N}$



**PE-DNP**

$\text{C}_{45}\text{H}_{79}\text{N}_4\text{O}_{13}\text{P}$   
Exact Mass: 914,54  
Mol. Wt.: 915,10  
C, 59,06; H, 8,70; N, 6,12; O, 22,73; P, 3,38

Fig. 3 : Synthèse du PE-DNP par activation de l'acide N-2,4-dinitrophényl-amino caproïque (DNP-cap) en ester NHS puis couplage à la DMPE.

## II. 2. Préparation des liposomes

### II. 2.1. Matières premières

Les liposomes sont préparés selon la technique de Bangham *et al.* (cf IV 1.1-1<sup>ère</sup> partie), par hydratation d'un film lipidique puis extrusion sur membranes de polycarbonate

La phosphatidylcholine de jaune d'œuf (EPC), le cholestérol (Chol), le dimiristoylphosphatyléthanolamine (DMPE) ainsi que le dimiristoylphosphatylcholine (DMPC) sont fournis par le laboratoire Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne) ayant 99 % de pureté. Le dimiristoylphosphatyléthanolamine pégylé (DMPE-PEG 2000) est un produit Avanti<sup>®</sup> Polar Lipids de pureté > 99 % (Canada). L'arginine est un produit Sigma-Aldrich.

### II. 2.2. Formulation et synthèse

Le cholestérol doit toujours représenter au moins 30 % dans la formulation pour une bonne stabilité des liposomes. La PE 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 % (en général, on utilise 1 à 5 %). Il faut essayer d'homogénéiser les longueurs de chaînes d'acides gras entre les différents phospholipides (DMPC avec DMPE).

#### 2.2.1. Formulation

Différentes formulations de liposomes ont été préparées en faisant varier les phospholipides utilisés ou leur rapport molaire, en ajoutant également un agent chélatant (DTPA), un haptène (DNP) et/ou des chaînes de polymères (PEG 2000):

1. EPC/Chol (66:34) : formule de base utilisée par de nombreux auteurs.
2. EPC/Chol/PE-DTPA (66:33:1 ou 66:32:2 ou 66:31:3)
3. DMPC/Chol/DMPE-DNP (66:33:1)

4. DMPC/Chol/DMPE-**DNP**/DMPE-**PEG 2000** (66:30:1:3)
5. DMPC/Chol/DMPE-**DTPA**/DMPE-**DNP** (67:30:1,5:1,5)
6. DMPC/Chol/DMPE-**DTPA**/DMPE-**DNP**/DMPE-**PEG2000** (64:30:1,5:1,5:3)

### ***2.2.2. Préparation du film lipidique***

Les différents lipides sont pesés puis dissous dans un mélange CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9:1) pour obtenir des solutions de concentration égale à 10 mg/ml. Pour chaque formulation, le rapport molaire des différents constituants permet de calculer le volume nécessaire de chaque lipide, afin d'obtenir une quantité finale de lipides égale à 20 µmol (pour 1 ml de phase aqueuse).

Par exemple des liposomes EPC/Chol (66/34) seront composés de 20 µmol x 66 % soit 13,2 µmol d'EPC, et 20 µmol x 34 % soit 6,8 µmol de cholestérol ( $M_m = 386,7$ ). Ce qui correspondrait pour une solution de cholestérol à 10 mg/ml à un volume 263 µl. Un exemple de fiche de préparation des liposomes est présenté page suivante.

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<sup>®</sup>, 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.

### ***2.2.3. Préparation de la phase aqueuse***

La phase aqueuse des liposomes doit contenir un acide aminé basique afin d'avoir des fonctions NH<sub>2</sub> sur lesquelles va pouvoir venir se fixer un ester activé radiomarqué. La lysine a tout d'abord été utilisée puis l'arginine dans le but d'avoir un plus grand nombre de fonctions amines et également pour des raisons de purification.

La phase aqueuse contient de l'arginine 80 mM en tampon hepes 80 mM, pH 8 (osmolarité ≈ 300 mosmol.). Au moment d'ajouter la phase aqueuse, la température de la celle-ci doit être supérieure à la température de transition de phase (T<sub>m</sub>) du phospholipide ayant la plus haute T<sub>m</sub>, soit 50°C si la formulation contient de la DMPE.

<b>DMPC</b>	$T_m = 23\text{ }^\circ\text{C}$
<b>DMPE</b>	$T_m = 50\text{ }^\circ\text{C}$

Fiche de PREPARATION DES LIPOSOMES

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 rotavapor<sup>®</sup> 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 finale est de 20 mM (20  $\mu$ mol de lipides pour 1 ml de phase aqueuse).

### **II. 2.3. Extrusion**

L'extrusion va permettre d'obtenir des LUV de taille homogène (*cf* § II. 1.3.1). Elle doit également se faire à une température supérieure au  $T_m$  des phospholipides choisis. Pour cela, le mini-extruder<sup>®</sup> (Avanti<sup>®</sup> Polar Lipids) 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 (DMPC) 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.

### **II. 2.4. Formation d'un gradient de pH et purification**

Un gradient de pH transmembranaire est réalisé tout en conservant la même osmolarité à l'intérieur et à l'extérieur des liposomes. Pour cela, les liposomes contenant de l'arginine en tampon hepes, sont purifiés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec une colonne Superdex<sup>®</sup> G200 en tampon phosphate 0,15 M, pH 5,6 sur une durée de 20 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).

## II. 2.5. Contrôle et stabilité

- Après purification par HPLC, les liposomes contenant de l'arginine se conservent plusieurs semaines, mais il est nécessaire de contrôler le pH de la solution dans laquelle ils se trouvent (pH = 5,6) avant chaque utilisation car l'arginine peut ressortir des liposomes au cours du temps.

Pour éliminer l'arginine libre ou pour changer les liposomes de tampon (pour le marquage à l'indium par exemple), les liposomes peuvent être purifiés par gel-filtration sur Sephadex<sup>®</sup> G25 (colonnes 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'éluion. L'éluion est réalisée par 10 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 l'opalescence des fractions d'éluion, qui sont réunies et conservées entre 2 et 8°C.

- La concentration lipidique des liposomes contenant du DNP peut être contrôlée en dosant la proportion de PE-DNP par spectrométrie. On mesure la DO à 345 nm de la solution de liposomes, dans une cuve de quartz, sachant que le coefficient d'extinction molaire du DNP à cette longueur d'onde est de 17800.

- Le contrôle de la taille (diamètre moyen) et de l'homogénéité des liposomes a été effectué dans le laboratoire INSERM ERIT-M 0104 à Angers, par spectroscopie à corrélation photonique (Malvern Autosizer<sup>®</sup> 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 pendant 8 semaines précédant l'analyse. Chaque mesure a été effectuée trois fois.

### **II. 3. Résistance des liposomes aux rayonnements ionisants**

*Avant d'envisager leur radiomarquage, nous avons testé la résistance de la paroi des liposomes en présence de différents radionucléides.*

Pour cela, une première série de manipulations a été réalisée en employant des liposomes fournis par l'équipe de L. Leserman (CNRS GDR2352, Marseille) et chargés avec de la carboxy-fluorescéine (CF). Le plan de manipulation a été de mettre en présence des dilutions à 25 et 50  $\mu\text{M}$  de liposomes CF avec des solutions radioactives de samarium-153 ( $^{153}\text{Sm}$ ,  $\beta$ -/ $\gamma$ ,  $T_{1/2} = 1,95$  j) et d'iode-131 ( $^{131}\text{I}$ ,  $\beta$ -/ $\gamma$ ,  $T_{1/2} = 8,04$  j), d'activités variables, comprises entre 1 et 80  $\mu\text{Ci}$  (37 kBq à 2,9 MBq), ce qui correspondait à des activités volumiques comprises entre 0,005 et 0,4 mCi/ml. En parallèle la même manipulation a été réalisée avec de la CF seule. Les résultats obtenus, ont montré que la CF n'était pas un bon candidat pour cette étude, car, en présence de radioactivité, il y avait une perte de fluorescence proportionnelle à la radioactivité ajoutée, et ceci en l'absence de liposomes et dès les plus faibles concentrations radioactives.

Nous avons donc choisi de réaliser la même étude sur des liposomes chargés avec une enzyme, la peroxydase de Raiford (HRP). Dans cette deuxième série de manipulations, nous avons utilisé une seule concentration en liposomes (20 ng/ml en RPO) qui correspondait à environ  $1,6 \cdot 10^8$  liposomes pour 100  $\mu\text{l}$  (volume de remplissage d'un puits de plaque de répartition). Compte tenu des quantités de radioactivité ajoutées, les rapports entre liposomes et quantité de noyaux radioactifs étaient compris entre 200 et 18000 pour l'iode-131 et entre 50 et 4500 pour le samarium-153.

### **II. 4. Radiomarquage des liposomes**



## II. 4.1. Matières premières

L'indium-111 ( $^{111}\text{In}$ , ce,  $T_{1/2} = 2,8$  j, laboratoire Mallinckrodt) est sous forme de chlorure d'indium en solution HCl 0,05N et avec une activité spécifique de 370 MBq/ $\mu\text{g}$  (ou 40 MBq/nmol) à calibration et une activité volumique de 370 MBq/ml.

L'iode-125 ( $^{125}\text{I}$ ,  $\alpha/\gamma$ ,  $T_{1/2} = 60,0$  j, laboratoire Perkin-Elmer) est 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 ( $^{131}\text{I}$ ,  $\beta/\gamma$ ,  $T_{1/2} = 8,04$  j, laboratoire Nordion MDS) est livré avec une activité spécifique de 1988 GBq/mg et une activité volumique de 37 GBq/ml.*

Le réactif de Bolton-Hunter (*N-succinimidyl-3-(4-hydroxyphényl)propionate*) est un produit commercialisé par Pierce.

La chloramine T est un produit commercialisé par Sigma-Aldrich.

## II. 4.2. Marquage de la paroi des liposomes à l'indium-111

Le radiomarquage à l'indium s'effectue sur la paroi des liposomes grâce à un agent chélatant, le DTPA couplé à la phosphatidyléthanolamine. L'indium-111 est un bon modèle pour l'utilisation de l'yttrium-90 ( $^{90}\text{Y}$ ,  $\beta^-$ ,  $T_{1/2} = 2,67$  j), qui est un radionucléide d'intérêt pour la RIT.

Le radiomarquage s'effectue en milieu acide pour éviter la formation d'hydroxydes insolubles et pour permettre la complexation. Il est essentiel d'optimiser les conditions de marquage mais aussi la stabilité des liposomes. Pour cela, 0,5 ml de liposomes (20  $\mu\text{mole/ml}$  en lipides) sont passés sur une colonne de gel-filtration (PD10) préalablement équilibrée en tampon citrate/acétate 10 mM/170 mM pH 5,3. Ce tampon permet de respecter le pH acide nécessaire au marquage et l'osmolarité intra et extra-liposomale d'environ 300 milliosmoles. Les liposomes sont récupérés sous un volume de 1,5 ml à une concentration de 6,7  $\mu\text{mole/ml}$ .

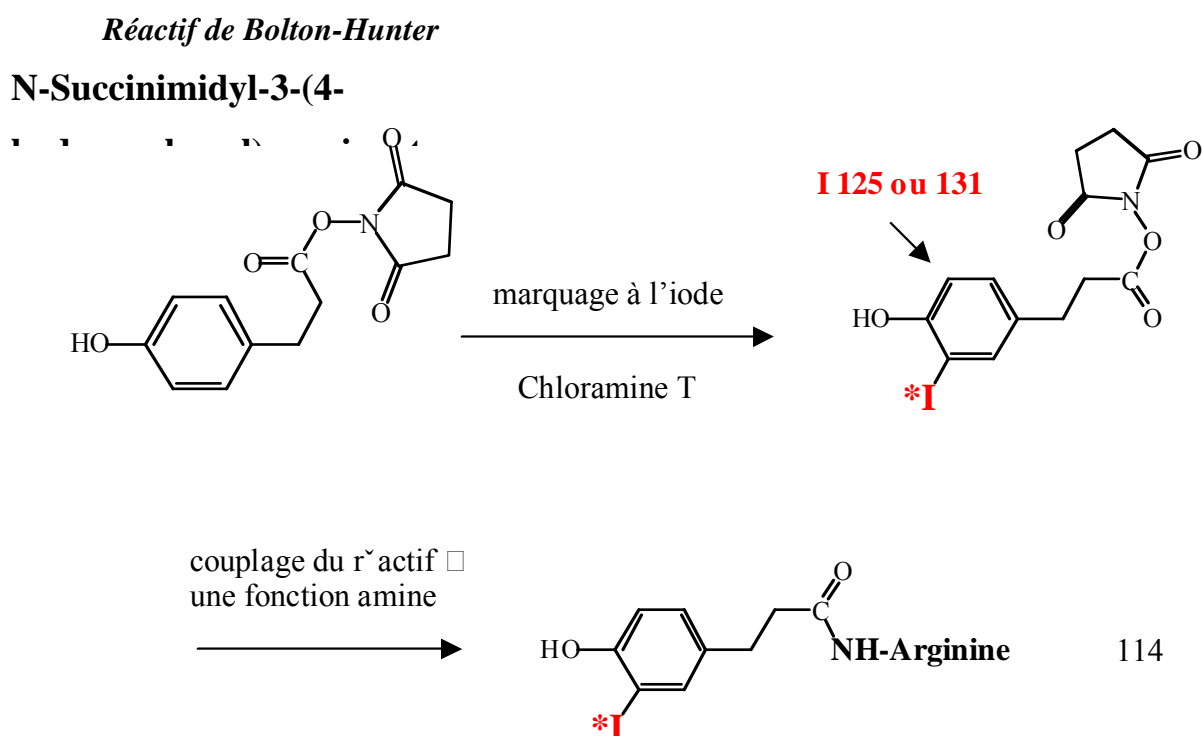
Une quantité de 670 nmol, soit 100  $\mu\text{l}$  de liposomes en tampon citrate /acétate, est incubée à température ambiante en présence de 5,2 MBq d'indium-111 (soit 7,8 kBq/nmol de lipides). Différents tests ont été effectués avec des liposomes composés d'EPC/Chol et

de 1, 3 ou 5% de PE-DTPA (66:33:1, 66:32:2, 66:31:3). Des fractions de la solution de marquage sont prélevées après 2h et 1 nuit d'incubation et 50 µl d'une solution d' $\text{InCl}_3$  stable, 1 mM en HCl 0,02 N, sont ajoutés et incubés pendant 5 min pour saturer les sites de liaison. Le mélange est purifié par gel-filtration par 20 x 0,5 ml de tampon citrate/acétate. La radioactivité de 10 µl de chaque fraction d'élution est comptée à l'aide d'un compteur gamma. Le taux de marquage est donné par le rapport de l'activité fixée par les liposomes sur l'activité totale.

## II. 4.3. Encapsulation active du réactif de Bolton-Hunter radiomarqué

Dans le but d'augmenter encore la quantité de radioactivité transportée par les liposomes, différents esters activés ont été encapsulés dans des liposomes contenant de la lysine ou de l'arginine. Le couplage de ces esters activés avec les fonctions amines dans la phase aqueuse des liposomes, a permis de limiter la fuite des molécules encapsulées et d'obtenir une bonne stabilité du marquage.

Le réactif de Bolton-Hunter a été choisi pour la plupart des essais d'encapsulation active car c'est un produit commercial, déjà activé sous forme de NHS, qui peut être marqué facilement à l'iode par la méthode à la chloramine T, avec une activité spécifique satisfaisante. C'est également un produit assez lipophile pour traverser la bicouche des liposomes et pouvoir réagir avec les fonctions amines de l'arginine préalablement encapsulée dans la phase aqueuse



### ***4.3.1. Radiomarquage du réactif de Bolton-Hunter (BH)***

Le radiomarquage du réactif de Bolton Hunter est effectué avec de l'iode-125 ou de l'iode-131, dans les mêmes conditions, par la méthode à la chloramine T. Le réactif de Bolton-Hunter est solubilisé en dioxane anhydre (C= 0,5 mg/ml soit 1.9  $\mu$ mol/ml). Pour éviter l'hydrolyse du réactif, le marquage doit se faire rapidement (moins de 40 secondes) 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  $\mu$ l de tampon phosphate 0,1M pH 7,4 et 50  $\mu$ l d'une solution de chloramine T à 4 mg/ml (soit 880 nmol). On ajoute 3,7 MBq (100  $\mu$ Ci) d'iode-131 ou d'iode-125 (soit 0,06 nmol) et en dernier 2  $\mu$ l de BH (soit 3,8 nmol, 63  $\mu$ g par rapport à l'iode). En moins de 20 secondes, ajouter 400  $\mu$ l de tampon et extraire le BH marqué à l'iode avec 500  $\mu$ l d'un mélange toluène/DMFa (20 :1).

**Le rendement de marquage est calculé en rapportant l'activité de la phase organique déterminée à l'activimètre sur l'activité totale utilisée pour faire le marquage (phase aqueuse + phase organique). Une chromatographie sur plaque de silice en chloroforme/acétate d'éthyle (1/1) 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).**

**Remarque : En faisant varier la quantité de BH et/ou la quantité de chloramine T, on peut obtenir un mélange de réactif mono ou diiodé dans des proportions variables pouvant atteindre 100 % de monoiodé ou 100 % de diiodé.**

**Pour radiomarquer les liposomes, il faut prélever le volume de phase organique correspondant à l'activité voulue et le transférer dans un tube en verre. Le solvant organique est évaporé au bain- marie à sec à 70 °C, dans l'enceinte protégée de la boîte à gants, jusqu'à ce qu'il n' y ait plus de trace de solvant.**

**Pour déterminer l'activité spécifique maximale du réactif, différents marquages ont été effectués à l'iode-125 puis à l'iode-131 avec de plus fortes activités que précédemment. 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), en présence de 50 µl de CT (880 nmol).**

Les rendements de marquage ont été calculés (activité de la phase organique rapporté à l'activité totale) ainsi que les activités spécifiques (activité de la phase organique rapporté aux nombres de moles de BH).

### ***4.3.2. Encapsulation active du BH marqué à l'iode***

La solution de liposomes en tampon phosphate 0,15 M pH 5,6 est mise en incubation avec le réactif de Bolton-Hunter marqué à l'iode, pendant 30 minutes au bain-marie à 55°C dans un tube en verre. Puis, 10 µl de la solution de marquage sont comptés à l'aide d'un compteur gamma (Wizard 3'480. WALLAC, efficacité de comptage = 60 %) afin de connaître l'activité totale déposée sur les liposomes. Enfin, cette solution est déposée sur une colonne PD10 équilibrée en tampon phosphate 0,15 M. 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.

En multipliant le taux d'encapsulation avec le nombre de moles de réactif mise en contact avec les liposomes, on connaît le nombre de moles de réactif encapsulé dans les liposomes.

Les premiers tests d'encapsulation active ont été effectués avec de faibles activités d'iode-125 (< 370 kBq) pour 0,5 ml de liposomes EPC/Chol/PE-DTPA (66 :33 :1) (environ 3 µmol de lipides). Puis, nous avons augmenté les quantités de réactif pour déterminer le nombre maximum de moles de BH qu'il est possible d'encapsuler dans des liposomes de 100 nm et de différentes compositions. Pour cela, nous avons utilisé une faible quantité de réactif marqué (moins de 0,6 nmol. et moins de 370 kBq) associé à une quantité croissante de réactif froid (jusqu'à 100 µmol.). Une fois que l'on a déterminé le nombre de moles de BH maximum qu'il est possible d'encapsuler, nous avons alors augmenté l'activité spécifique du réactif en ne travaillant qu'avec des molécules

radiomarqués, sans ajouter de réactif froid. Ces manipulations ont été effectuées à l'iode-125 puis à l'iode-131 (jusqu'à 200 MBq soit 5,4 mCi).

#### **II. 4.4. Tests de stabilité**

Que ce soit par marquage de la paroi ou par encapsulation active, les études de stabilité du marquage ont été réalisées de la même façon. 100 µl de liposomes radiomarqués sont prélevés et mélangés à T0 avec soit 1,5 ml de tampon phosphate, soit 1,5 ml de sérum humain. Les solutions obtenues sont incubées à 37°C sous agitation. Des prélèvements de 0,5 ml ont été effectués à 2h ou 24h après T0 et traités par gel-filtration. Le pourcentage de l'activité associé au pic d'intérêt correspondant aux liposomes a été calculé pour chaque temps.

#### **II. 4.5. Tests d'immunoréactivité**

L'immunoréactivité des liposomes marqués est testée à l'aide de tubes (IMMUNO MAXISORP 5 ml, VWR) préalablement recouverts d'anticorps de la façon suivante : l'IgG 734 (anti-DTPA-<sup>111</sup>In) ou 265.5 (anti-DNP) est mise en solution à 10 µg/ml dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7,2. On dépose ensuite 500 µl de cette solution d'anticorps (= 5 µg) 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. Le surnageant est à nouveau aspiré puis stockés avec 500 µl de PBS-BSA 0,5 % entre 2 et 8°C jusqu'à leur utilisation.

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 (0,04 à 3,33 nmol) de liposomes marqués sont mises à incuber dans 500 µl de PBS/BSA 0,5 % pendant 1 h à 37°C. 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.

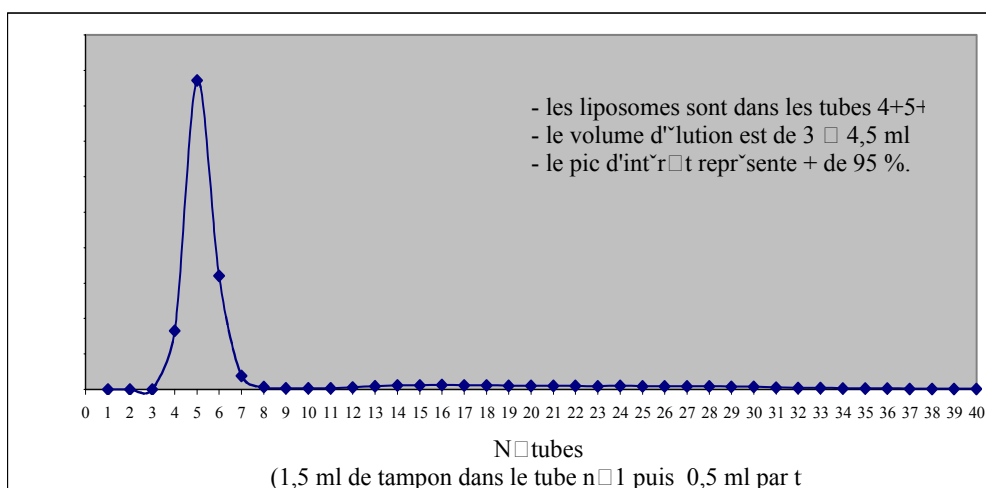
## **III. RESULTATS**

### **III. 1. Purification et contrôle des liposomes**

#### **III. 1.1. Purification par HPLC et PD10**

Les liposomes purifiés par HPLC à l'aide d'une colonne Superdex<sup>®</sup> G200 ont des temps de rétention compris entre 8 et 10 minutes (débit de 0,7 ml/min). 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 4*) à l'aide d'une colonne Sephadex<sup>®</sup> G25 (PD10) apparaissent dans les tubes n° 4, 5, 6 (en comptant 500 µl de liposomes + 1,5 ml de tampon dans le tube n°1) qui sont réunies sous 1,5 ml. Ces fractions correspondent à un volume d'éluion de 3 à 4,5 ml. Pour chaque PD10, en déposant 500 µl de liposomes, on effectue une dilution au tiers de leur concentration initiale.



**Fig.4 : Profil d'élution d'une solution de liposomes par gel-filtration (colonnes PD10 ayant un seuil d'exclusion de 10000).**

### III. 1.2. Contrôle de la concentration en lipides après PD10

La mesure de la concentration en DNP ( $\epsilon_{molaire} = 17\ 800$  à  $345\text{ nm}$ ) dans le pic d'élution contenant les liposomes (tubes 4, 5, 6) permet de calculer le rendement d'une purification par PD10. Le résultat est 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.

### III. 1.3. Contrôle de la taille des liposomes

Le diamètre moyen des liposomes après extrusion, mesuré par spectroscopie à corrélation photonique, est de  $101\text{ nm} \pm 2$  avec un index de polydispersité inférieur à 0,1. Ces résultats, présentés page suivante, montrent l'intégrité des liposomes et l'homogénéité de leur taille après extrusion.

Les solutions de liposomes doivent rester translucides sans apparition d'agrégats ni d'opacité. L'intégrité des liposomes est alors conservée pendant 2 mois après leur préparation et une conservation au réfrigérateur ( $+2$  à  $+8\text{ °C}$ ).

### **III. 2. Résistance des liposomes aux rayonnements ionisants**

Les résultats, présentés sur *les figures 5 et 6*, montrent que la membrane des liposomes n'est pas altérée sur un temps compris entre 5 et 24 h, en présence de solutions tamponnées radioactives d'iode-131 et de samarium-153, ceci sur une large gamme d'activité volumique. Au delà de 24 h, l'activité peroxydase a été altérée dans les conditions utilisées, et l'on ne peut pas affirmer que l'intégrité des membranes liposomales soit conservée.





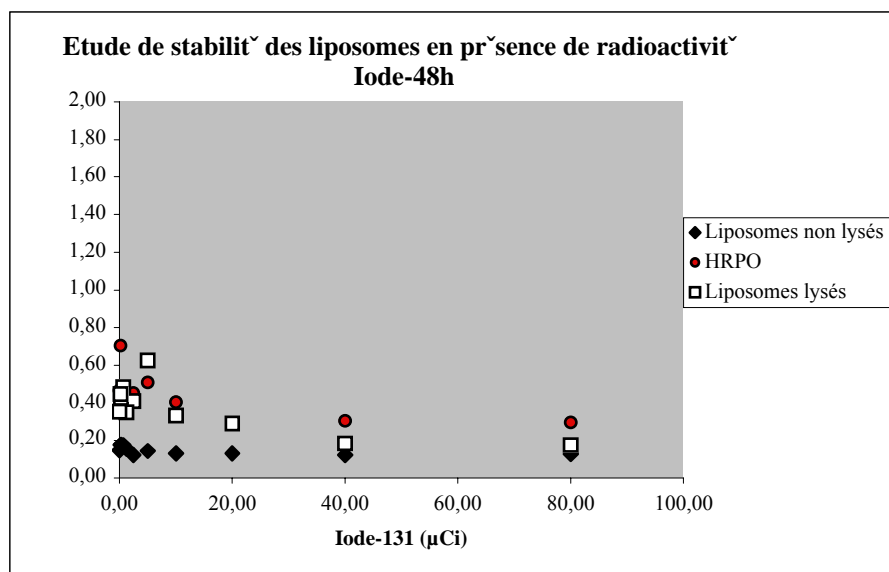
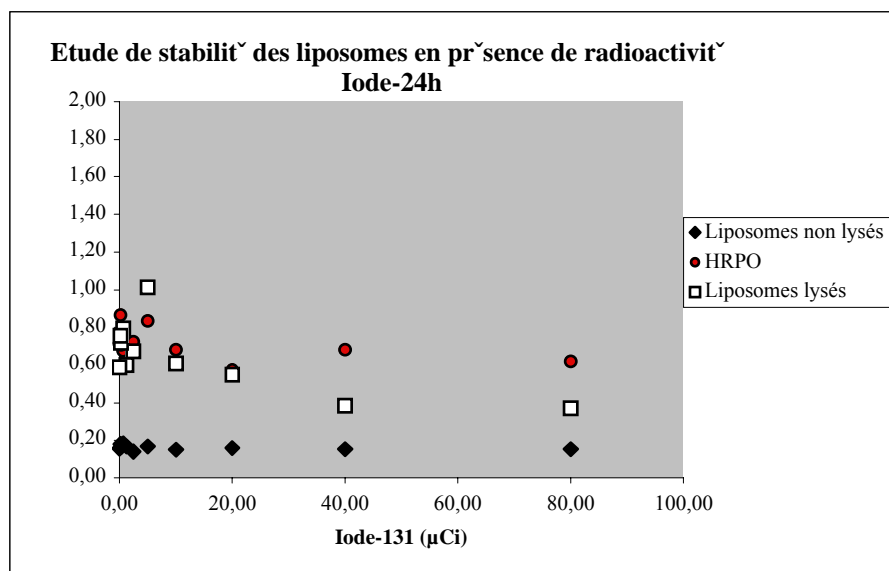
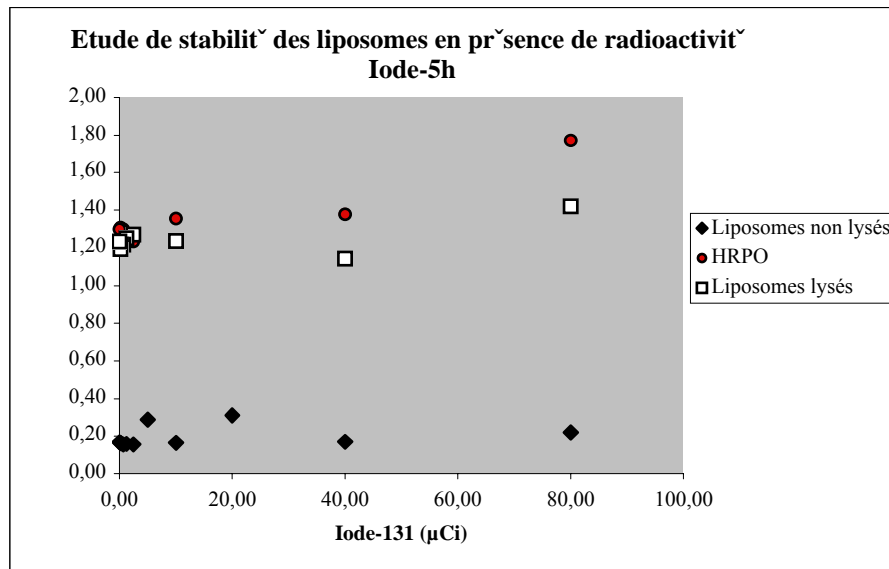


Fig.5: Etude de la stabilité des liposomes en présence d'iode-131 à 5h, 24h et 48h.

(jusqu'à 80 µCi pour 100 µl de liposomes)

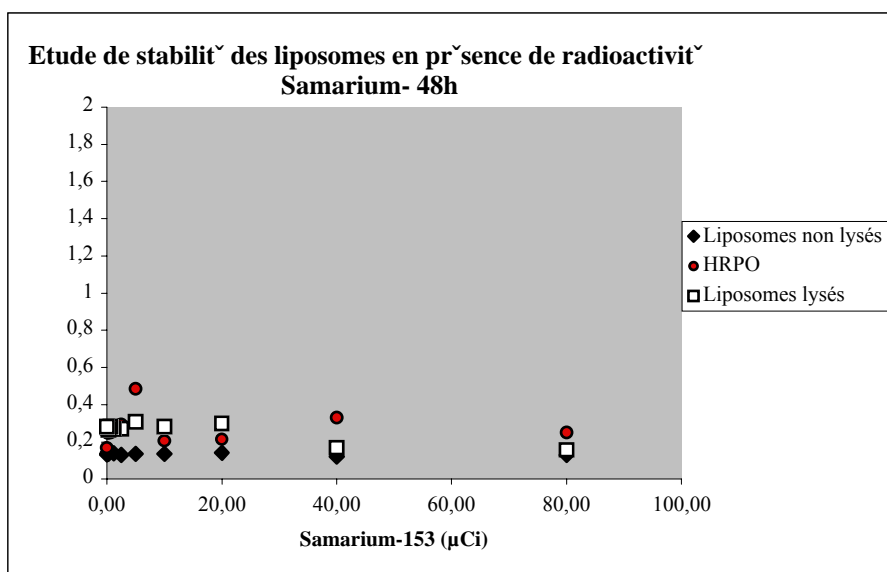
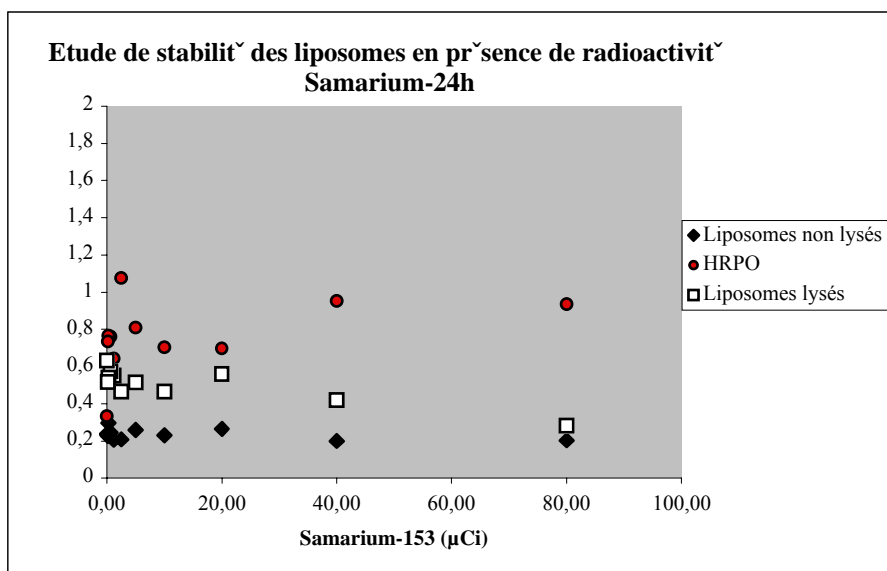
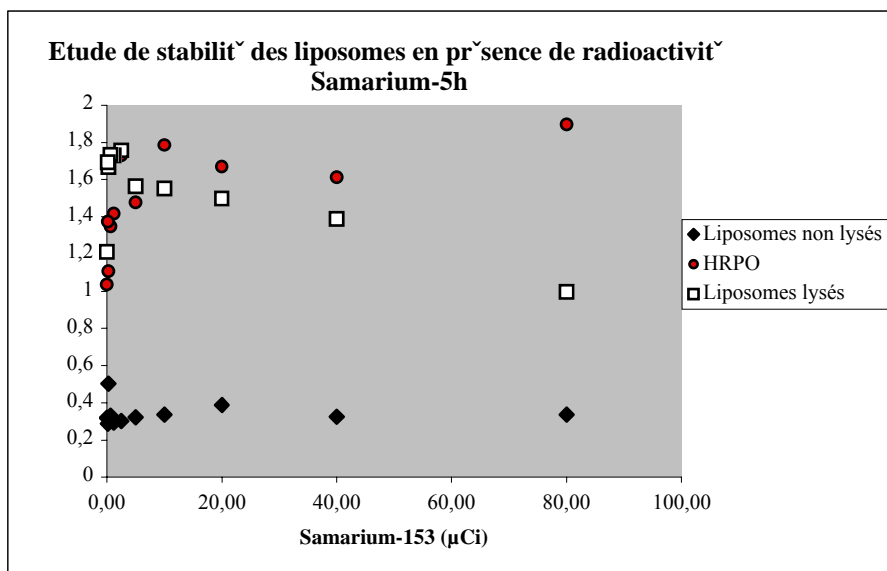
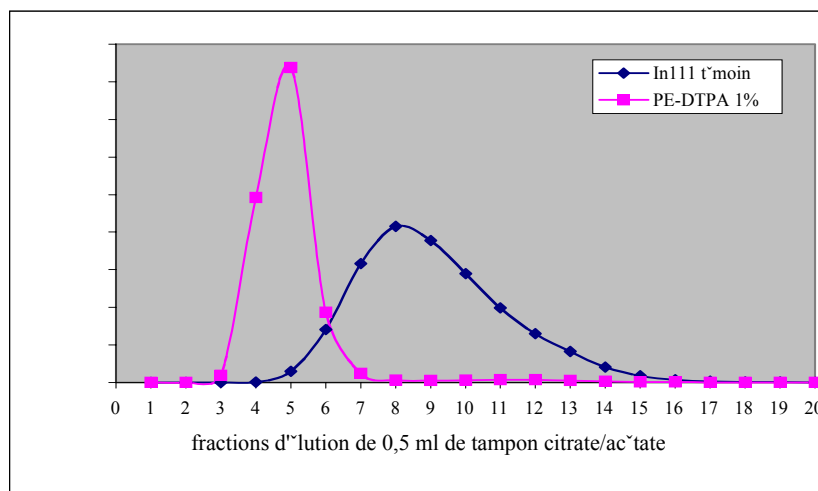


Fig.6: Etude de la stabilité des liposomes en présence de samarium-153 à 5h, 24h et 48h.

(jusqu'à 80 µCi pour 100 µl de liposomes)

### III. 3. Marquage de la paroi des liposomes

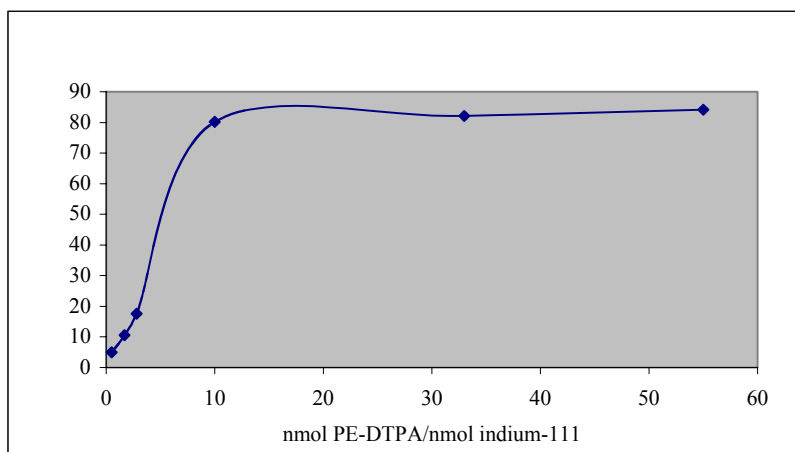
La *figure 7* représente les profils d'éluion sur Sephadex<sup>®</sup> G25 d'une solution d'indium-111 témoin et d'une solution de liposomes radiomarqués en tampon citrate/acétate. La radioactivité est détectée essentiellement dans les tubes 4, 5 et 6, ce qui concorde avec la turbidité de ces fractions.



*Fig.7: Profils d'éluion sur Sephadex<sup>®</sup> G25 d'une solution d'indium-111 témoin et d'une solution de liposomes EPC/Chol/PE-DTPA 1% marqués à l'indium-111.*

Les taux de marquage des liposomes EPC/Chol/PE-DTPA marqués à l'indium-111 (7,8 kBq/nmol de lipides) sont respectivement de 53 % et de 92 % après 2h ou une nuit d'incubation à température ambiante. Les liposomes DMPC/Chol/PE-DTPA 1 % ont pu être marqué efficacement (taux de marquage > 75 %) jusqu'à 44 kBq/nmol de lipides.

En faisant varier la proportion de PE-DTPA dans la formulation liposomale (1, 3 et 5%) par rapport à la quantité d'<sup>111</sup>In (*figure 8*), on peut déterminer qu'il faut au moins 10 équivalents de DTPA par rapport à <sup>111</sup>In pour avoir un taux de marquage optimal (> 80 %).

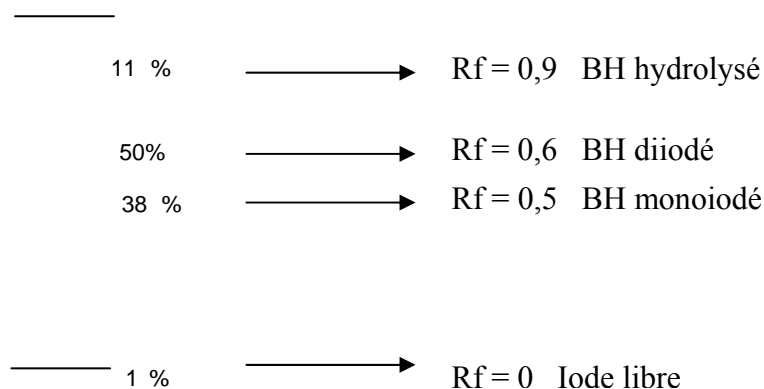


**Fig. 8: Taux de marquage des liposomes EPC/Chol/PE-DTPA en fonction du nombre d'équivalents de DTPA par rapport à l'indium-111, après 2h d'incubation à température ambiante.**

### III. 4. Marquage par encapsulation active

#### III. 4.1. Radiomarquage du réactif de Bolton-Hunter

Les rendements de marquage du réactif de BH sont en moyenne de 60 % après extraction en toluène/DMFa (20 :1). Une chromatographie sur plaque de silice en CHCl<sub>3</sub>/AcOOEt (1:1) révèle deux spots correspondant respectivement au monoiodo-BH (Rf = 0,5) et au diiodo-BH (Rf = 0,6) et déterminés en faisant varier la quantité d'iode. L'apparition d'un troisième spot de Rf = 0,9, signifie que le réactif de BH est hydrolysé.



En faisant varier la quantité de BH pour une même quantité d'iode-125 (0,05 nmol) et 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 mono ou diiodé dans des proportions variables (*tableau 1*). Un excès d'iode par rapport à la quantité de réactif permet d'obtenir plus de 90 % de diiodoBH.

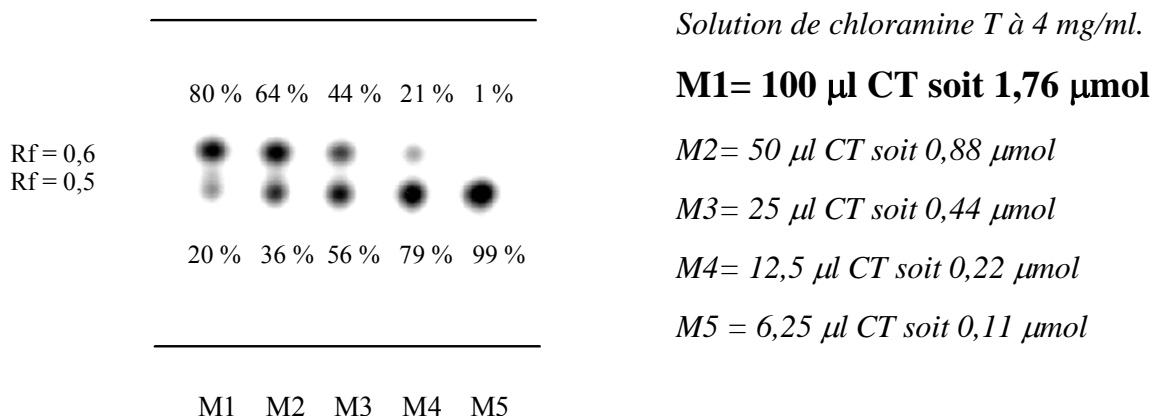
nmol BH	nmol iode	rapport BH/iode	Rendement de marquage %	% monoiodo BH	% diiodo BH
38	0,06	633	63	90	10
19	0,06	317	60	50	50
7,6	0,06	127	55	50	50
3,8	0,06	63	57	30	70
3,8	8	0,5	50	10	90

**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).**

Pour obtenir le BH avec seulement un atome d'iode, il faut faire varier la quantité de chloramine T (1,76 µmol à 0,11 µmol). On peut alors obtenir jusqu' à 100 % de BH monoiodé. La *figure 9* représente les proportions de réactif mono ou diiodé obtenues en faisant varier la quantité de chloramine T (CT).

*Marquage d'une quantité constante de BH (3,8 nmol) avec 100 µCi d'iode-125 (0,06 nmol) soit 63 éq. de BH par rapport à l'iode.*

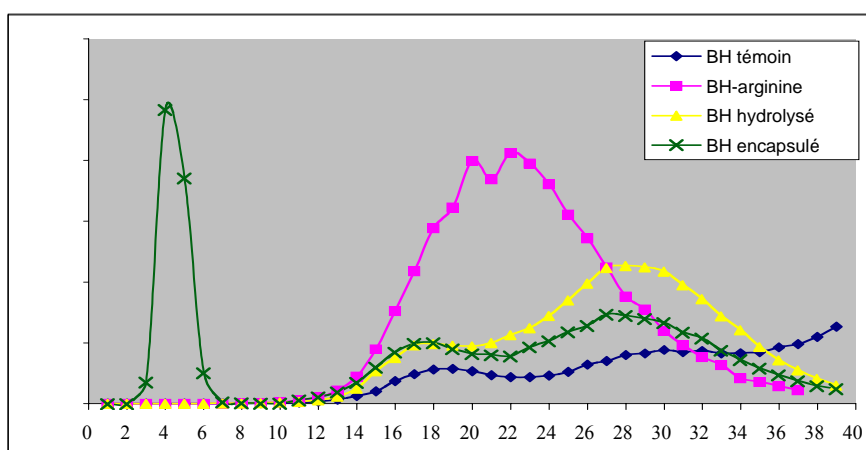


**Fig. 9: Influence de la quantité de Chloramine T sur la formation de Bolton-Hunter mono ou diiodé.**

Les marquages du BH (3,8 nmol et 2,2 éq. par rapport à l'iode) ont ensuite été effectués avec de plus fortes activités 444 MBq (12 mCi) d'iode (1,7 nmol). Ils ont été réalisés à l'iode-125 puis à l'iode-131. Les rendements obtenus sont en moyenne est de 70 % avec formation de 60 % de réactif diiodé. Les activités spécifiques obtenues sont comprises entre 1,3 et 1,7 mCi/nmol de BH.

### III. 4.2. Encapsulation active (EA) dans les liposomes

La *figure 10* représente les profils d'élution sur Sephadex<sup>®</sup> G25 du réactif de BH marqué à l'iode-125, couplé à l'arginine, ou après hydrolyse de la fonction NHS en milieu aqueux, ainsi qu' une solution de liposomes après encapsulation du BH radiomarqué. Les liposomes radiomarqués sont élués en tampon phosphate 0,15 M dans les tubes n° 4, 5 et 6 sous 1,5 ml (volume d'élution de 3 à 4,5 ml).



*Fig.10 : Profils d'élution sur Sephadex<sup>®</sup> 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).*

#### 4.2.1. Premiers essais d'encapsulation active

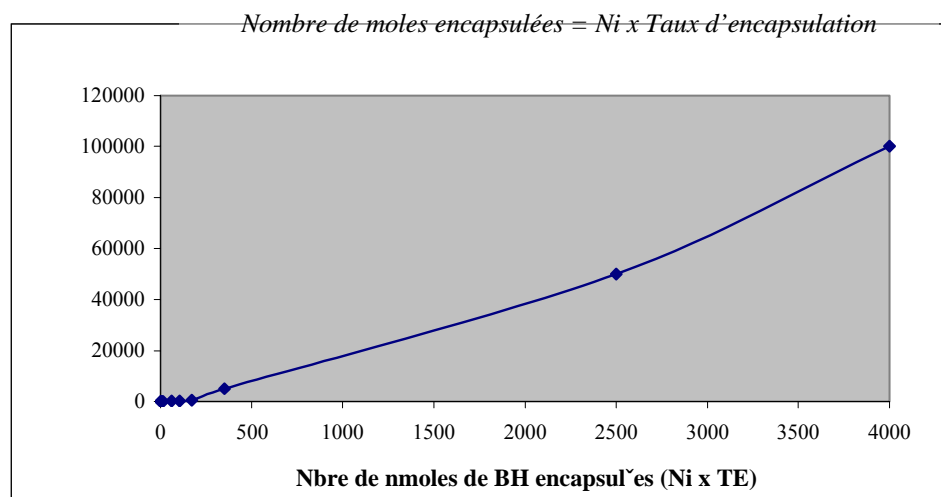
Le *tableau 2* présente les différents taux d'encapsulation du réactif de BH marqué à l'iode-125 (< 10  $\mu$ Ci) dans des liposomes EPC/Chol/PE-DTPA. En moyenne, on obtient 60 % d'encapsulation pour de faibles quantités de réactif (< 0,3 nmol) BH avec une stabilité sérique moyenne de 83 % à 24h. Les quantités de réactif encapsulées sont rapportées à la quantité de lipides présente au moment de l'encapsulation, afin de

s'affranchir de la variabilité des concentrations lipidiques obtenues après purification des liposomes.

#### 4.2.2. Amélioration des quantités de réactif encapsulées

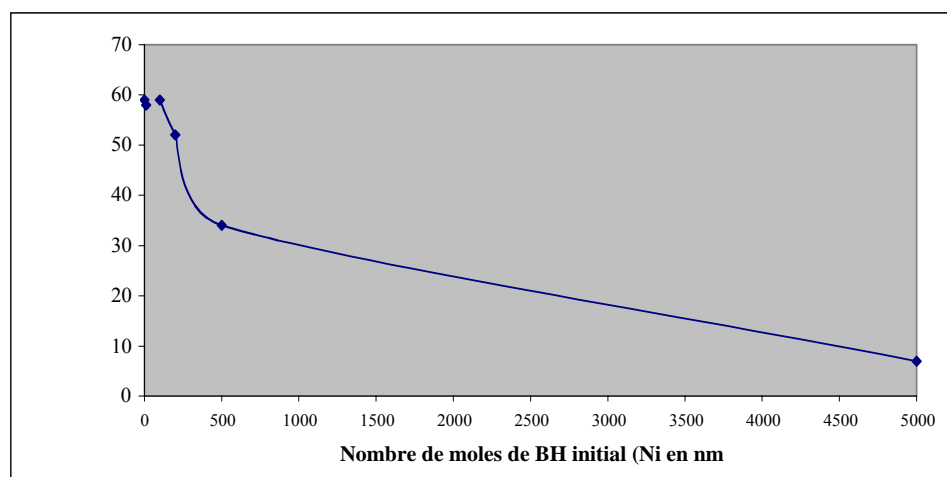
L'augmentation des quantités de réactifs encapsulées, grâce à l'incorporation de BH froid, montre que les taux d'encapsulation sont en moyenne de 50 % lorsqu'on utilise jusqu'à 500 nmol de BH (*tableau 3*). Ainsi, il est possible d'encapsuler efficacement jusqu'à 180 nmol de BH avec une stabilité sérique moyenne de 88 % à 24h (48 nmol de BH/  $\mu$ mol de lipides). Ensuite, si l'on augmente encore la quantité de réactif à encapsuler, les taux d'encapsulation chutent à moins de 10 % et les valeurs concernant le nombre de moles de réactif encapsulées ne sont plus significatives (*figures 11 et 12*).

**Fig.11 : Nombre de nmol. de BH encapsulées en fonction de la quantité initiale (Ni) de**



**réactif mise en présence des liposomes (1 à  $10^5$  nmol. de BH pour 3,5 mol. de lipides).**





*Fig. 12 : Evolution du taux d'encapsulation en fonction de la quantité de BH initiale en nmol. TE est inférieur à 10 % à partir de 5000 nmol. de BH.*

*Tableau 2 : Taux d'encapsulation du réactif de Bolton-Hunter marqué à l'iode-125 (< 10  $\mu$ Ci) dans des liposomes EPC/Chol/PE-DTPA (66 :33 :1) après 30 minutes d'incubation à 55°C. Stabilité après 2h et 24h dans du sérum à 37 °C.*

*Tableau 3 : Taux d'encapsulation obtenus pour des quantités croissantes de Bolton-Hunter.*

### ***4.2.3. Influence de la composition liposomale sur les taux d'encapsulation***

L'influence de la formulation des liposomes et en particulier de la présence de chaînes de polymères (3 mol % de PEG 2000) est présentée dans le *tableau 4*. Pour des quantités encapsulées de 500 nmol de BH, le taux d'encapsulation est en moyenne de 32 % avec des liposomes composés de DMPC/Chol/PE-DTPA/PE-DNP. Ce taux est de 34 % pour des liposomes « classiques » EPC/Chol (66 :34) (*tableau 3*). Le nombre de molécules de BH encapsulées est en moyenne 167 nmol pour les liposomes non pégylés et de 152 nmol pour les liposomes pégylés. Il est de 170 pour des liposomes « classiques ».

### ***4.2.4. Encapsulation active de fortes activités de réactif marqué à l'iode-131***

Pour les marquages du BH à l'iode-131, l'activité spécifique obtenue est en moyenne de 1,5 mCi/nmol (*cf § III. 4.1*). Les tests d'encapsulation active (*tableau 5*), dans des liposomes EPC/Chol/PE-DTPA (66 :33 :1), ont été effectués « à chaud », c'est-à-dire sans ajout de réactif froid, pour des quantités de BH inférieures à 4,1 nmol mais avec des activités allant jusqu'à 200 MBq (5,4 mCi). Le taux d'encapsulation est en moyenne de 30 % et la quantité de réactif encapsulée augmente en même temps que l'activité.

### **III. 5. Tests de stabilité et immunoréactivité *in vitro***

Les stabilités sériques obtenues après encapsulation active sont présentées dans les *tableaux 2 et 3*. Après 24 h d'incubation à 37°C, les solutions de liposomes radiomarqués sont traitées par gel-filtration pour éliminer le réactif iodé qui serait ressortit des vésicules. L'activité correspondante aux liposomes est en moyenne de 83 % pour les liposomes composés d' EPC/Chol/PE-DTPA et de 88,2 % pour les liposomes composés uniquement d'EPC/Chol.

Pour les marquages à l'indium-111, la stabilité sérique est supérieure à 90 % à 24 h aussi bien en tampon citrate/acétate que dans le sérum à 37°C.

L'immunoréactivité des liposomes EPC/Chol/PE-DTPA (66/33/1) marqués à l'indium obtenue vis-à-vis de l'anticorps 734 (anti-DTPA-<sup>111</sup>In) est en moyenne de 68 %.

*Tableau 4: Influence de la composition lipidique et du PEG 2000 (3 mol %) sur l'encapsulation active du réactif de Bolton-Hunter marqué à l'iode-125.*

*Tableau 5: Taux d'encapsulation du réactif de Bolton-Hunter radiomarqué à l'iode-131 (jusqu'à 5,4 mCi) dans des liposomes EPC/Chol/PE-DTPA (66 :33 :1) après 30 minutes d'incubation à 55°C et Fig. 13 : Nombre de molécules de Bolton-Hunter encapsulées dans les liposomes (en nmol) en fonction de l'activité en iode-131 (en mCi).*

## **IV. DISCUSSION**

### **IV. 1. Radiomarquage des liposomes**

Les liposomes ont été jusqu'à présent utilisés pour transporter des radioéléments à des fins diagnostiques. Les méthodes de marquage (passif ou actif) ainsi que les rendements sont différents selon le type de radionucléide utilisé. Parmi ceux-ci, on trouve principalement le technétium-99m, l'indium-111 et le gallium-67.

Dans le marquage passif, les liposomes sont radiomarqués simplement en introduisant un radionucléide dans la phase aqueuse avant hydratation du film lipidique (*cf III 3.1-1<sup>ère</sup> partie*). Cette approche a été utilisée pour marquer des liposomes au technétium-99m, à l'indium-111 (sous forme d'<sup>111</sup>In-oxine) et même au fluor-18 (Oku, 1999). Mais elle ne convient pas pour une application clinique à cause de deux principaux inconvénients : l'efficacité de radiomarquage est très faible (< 30 % pour des MLV et < 5 % pour des LUV) car l'encapsulation passive n'offre qu'une faible capacité d'encapsulation, d'autre part, il faut refaire une préparation de liposomes pour chaque expérience, multipliant l'exposition du manipulateur aux rayonnements ionisants (Ahkong *et al.* 1992, Oku *et al.* 1993).

Le marquage actif consiste à radiomarquer 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. Ce sont ces deux dernières méthodes qui ont été utilisées dans le travail expérimental.

#### **IV. 1.1. Marquage de la paroi des liposomes**

Le marquage direct de la paroi de liposomes préformés a été envisagé par différents auteurs. Par rapport à l'encapsulation passive, il a l'avantage d'utiliser des liposomes déjà préparés que l'on va pouvoir marquer extemporanément. Le radiomarquage s'effectue par simple liaison électrostatique entre un radionucléide chargé et la paroi liposomale. Cette méthode a été utilisée sur des liposomes incubés avec du  $^{99m}\text{Tc}$  en présence de chlorure stanneux comme agent réducteur. Le technétium 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 IV. 1.2-1<sup>ère</sup> partie*). Le technétium 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  $^{99m}\text{Tc}$ . Cette méthode, loin d'être complètement satisfaisante, nécessite de nombreux lavages pour éliminer le pertechnétate libre.

Le radiomarquage de la paroi a été 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 PE (Hnatowitch *et al.* 1981, Grant *et al.* 1988, Ahkong *et al.* 1992). Ainsi le  $^{99m}\text{Tc}$  peut être fixé à la paroi des liposomes contenant 2% PE-DTPA avec des rendements allant de 76 à 91 % et une activité spécifique maximale de 2 kBq/nmol. On remarque toutefois une instabilité des radiomarquages au  $^{99m}\text{Tc}$  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  $^{99m}\text{Tc}$  en 15 minutes avec de bons rendements (> 90 %), une meilleure stabilité (48h dans le sérum à 37°C) et une activité spécifique de 9,5 kBq/nmol (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. Les liposomes DMPC/Chol/PE-DTPA 1 % ont pu être marqué efficacement (taux de marquage > 75 %) jusqu'à 44 kBq/nmol de

lipides. La réaction de couplage de l'agent chélatant (DTPA-DA) avec la PE s'effectue facilement et donne un rendement de 90 %. Le PE-DTPA a ensuite été inclus dans les liposomes au taux de 1, 3 ou 5 % molaire. Dans les trois cas, les taux de marquage sont satisfaisants (> 80 %) à partir de 10 équivalents de PE-DTPA par rapport à la quantité d'indium-111. On pourrait supposer améliorer encore les marquages en augmentant la proportion de PE-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 favorise l'élimination hépatique des liposomes (Senior *et al.* 1991, Patel 1992).

Outre l'activité spécifique relativement élevée, les marquages de la paroi lipidique réalisés avec l'indium-111 sur le PE-DTPA présentent d'autres 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. C'est surtout un bon exemple pour l'utilisation d'autres agents chélatants capables de lier des émetteurs alpha ou bêta, plus intéressants en thérapeutique.

#### **IV. 1.2. Marquage par encapsulation active**

La méthode de radiomarquage la plus récente consiste à incorporer le radionucléide dans des liposomes préformés par encapsulation active (*cf chap. III. 3.2-1<sup>ère</sup> partie*). 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'oxine d'indium. L'encapsulation préalable à l'intérieur des liposomes d'un chélatant hydrophile comme la deferoxamine 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 kBq/nmol 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 sa forme  $^{111}\text{In}^{3+}$ . On obtient ainsi une activité spécifique pouvant atteindre 8 kBq/nmol (Proffit 1983) mais



cette technique a l'inconvénient de devoir chauffer les liposomes pour obtenir de bons rendements de marquage.

Une approche similaire est proposée par Phillips *et al.* (1992 et 1999) pour radiomarquer des liposomes pré-formés avec du  $^{99m}\text{Tc}$ . Cette méthode est basée sur le principe que l'on utilise pour marquer les leucocytes. Elle utilise un chélatant lipophile du  $^{99m}\text{Tc}$ , l'hexaméthylpropylène-amine-oxime ou HMPAO (Ceretek<sup>®</sup>) lui permettant, après incubation avec des liposomes préformés et contenant du glutathion, de s'accumuler et de rester dans la phase aqueuse. Pour cela, le glutathion complexe l'HMPAO -  $^{99m}\text{Tc}$  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 0,7 kBq/nmol.

Pour une utilisation thérapeutique, ces résultats décrits dans la littérature ne sont pas suffisants. On considère généralement qu'il faut pouvoir injecter un vecteur radiomarqué dont l'activité est au moins égale à 1,8 GBq (soit environ 50 mCi) par traitement.

Lors de travaux antérieurs, nous avons tenté d'employer une technique d'encapsulation active à l'aide d'un gradient de pH comme cela se pratique pour les anthracyclines en encapsulant soit un tampon acide, soit un tampon basique (Gabizon *et al.* 1998). L'étude a été menée avec une base faible (la tyramine) et un acide faible (l'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 à été correctement choisi, la molécule s'ionise et, ne pouvant ressortir, s'accumule dans ce milieu. Les résultats n'ont pas été très encourageants car le taux d'encapsulation était trop faible (cas de la tyramine) ou parce que l'encapsulation n'était pas stable (cas de l'HPPA). Ces travaux préliminaires, nous ont conduit à chercher des substances suffisamment lipophiles pour traverser la bicouche, que l'on peut radiomarquer facilement et qui peuvent être encapsulées de façon stable à l'intérieur des liposomes.

Dans ce but, différents esters activés ont été encapsulés dans des liposomes contenant de la lysine ou de l'arginine. Le couplage de ces esters activés avec les fonctions amines dans la phase aqueuse des liposomes, a permis de limiter la fuite des molécules encapsulées et d'améliorer nettement la stabilité du marquage. Le réactif de Bolton-Hunter a été choisi car c'est un ester activé commercial (sous forme NHS), suffisamment lipophile pour traverser la bicouche lipidique et qui est facile à radiomarquer avec de l'iode par la méthode à la Chloramine T. Les différents tests effectués avec le réactif de Bolton-Hunter ont montré une stabilité des liposomes de plus de 80 % à 24 h quelle que soit leur composition. De plus, on peut encapsuler de façon efficace (taux d'encapsulation > 50 %) jusqu'à 180 nmol de Bolton-Hunter radiomarqué. Pour une plus grande quantité de réactif, les taux d'encapsulation chutent à moins de 10 %.

Les radiomarquages du Bolton-Hunter à l'iode-131 (activité spécifique de 1,7 mCi/nmol de réactif) ont donné des résultats tout à fait comparables à ceux obtenus avec l'iode-125, ce qui laisse présumer qu'en théorie, pour 180 nmol de réactif, les liposomes seraient en mesure de transporter jusqu'à 8,3 GBq (environ 300 mCi) ce qui correspond à une activité spécifique de 2,7 MBq/nmol de lipides. Ces techniques de marquage sont bien maîtrisées et permettent d'obtenir des activités bien supérieures à celles décrites dans la littérature. Les liposomes semblent donc très intéressants pour envisager une application thérapeutique en radioimmunothérapie.

## **IV. 2. Liposomes et radioimmunothérapie**

### **IV. 2.1. Choix du radionucléide**

Les effets de la RIT, comme pour toutes les formes de radiothérapie interne, dépendent fortement des propriétés physiques (nature, énergie, parcours, période physique), de la structure chimique et du comportement biologique des radionucléides, puisqu'ils modifient la biodistribution et déterminent les doses d'irradiation.

Le radiomarquage des liposomes pour une application thérapeutique a été jusqu'à présent assez négligé, excepté peut-être pour la boronothérapie (Bohl Kullberg 2003).

Les atomes radioactifs utilisés en RIT sont essentiellement des émetteurs  $\beta^-$ , qui présentent un parcours de quelques millimètres dans la matière. Des émetteurs  $\alpha$ , beaucoup

plus cytotoxiques sont évalués depuis quelques années en recherche mais leur efficacité clinique n'est pas encore démontrée. Les radionucléides potentiellement intéressants pour la radioimmunothérapie sont présentés dans le tableau suivant :

Radionucléide (symbole)	Période physique (h)	Type d'émission	Energie maximale (keV)	Parcours moyen dans les tissus (mm)
Iode-131 ( $^{131}\text{I}$ )	193	$\beta$	610	2
Lutétium-177 ( $^{177}\text{Lu}$ )	161	$\beta$	496	1,5
Yttrium-90 ( $^{90}\text{Y}$ )	64	$\beta$	2280	12
Cuivre-67 ( $^{67}\text{Cu}$ )	62	$\beta$	577	1,8
Rhénium-186 ( $^{186}\text{Re}$ )	91	$\beta$	1080	5
Rhénium-188 ( $^{188}\text{Re}$ )	17	$\beta$	2120	11
Astate-211 ( $^{211}\text{At}$ )	7,2	$\alpha$	7450	0,09
Bismuth-212 ( $^{212}\text{Bi}$ )	1	$\alpha$	8780	< 0,1
Bismuth-213 ( $^{213}\text{Bi}$ )	0,77	$\alpha$	> 6000	0,08

**Tableau 6: Propriétés physiques des radioéléments présentant un intérêt pour la RIT (Bardiès et Faivre-Chauvet, 1998).**

Les émetteurs  $\beta$  de différentes énergies peuvent être classés en trois catégories selon le parcours moyen des particules  $\beta$  qu'ils émettent:

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

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

Kostarelos et Emfietzoglou (2000) ont radiomarqué différents types de liposomes (MLV, SUV, coatés ou non avec  $\text{GM}_1$  ou PEG) avec des émetteurs  $\beta$  ( $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{131}\text{I}$ ) et un émetteur  $\alpha$  ( $^{211}\text{At}$ ), pour effectuer un ciblage tumoral passif (sans l'utilisation d'anticorps) 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. Le ciblage tumoral est nettement amélioré par la présence de  $G_{M1}$  dans la composition des liposomes. Les radionucléides de demi-vie courte ( $^{188}\text{Re}$  et  $^{211}\text{At}$ ) délivrent de plus fortes doses au niveau du muscle sous forme de liposomes furtifs ( $G_{M1}$  en particulier) par rapport aux SUV. C'est l'inverse pour les radionucléides de longue demi-vie ( $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{131}\text{I}$ ). 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. Entre les deux émetteurs  $\beta$  les plus utilisés ( $^{90}\text{Y}$  et  $^{131}\text{I}$ ), les liposomes marqués à l'iode-131 donnent les plus faibles ratios tumeur/corps entier quelque soit le type de liposomes. Le  $^{188}\text{Re}$  donne les meilleurs ratios tumeur/corps entier quelque soit le type de liposome. Enfin, les meilleurs résultats sont observés pour la combinaison  $^{211}\text{At}$ -liposomes  $G_{M1}$ .

L'intérêt des émetteurs  $\alpha$  est la grande quantité d'énergie qu'ils peuvent déposer sur une faible distance (transfert linéique d'énergie ou TEL). Leur TEL est près de 400 fois supérieur aux émetteurs  $\beta$  (80 keV/ $\mu\text{m}$  versus 0,2 keV/ $\mu\text{m}$ ). Ils parcourent dans les tissus de 50 à 100  $\mu\text{m}$ , 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). Les émetteurs  $\alpha$  pourraient permettre de les cibler en limitant l'irradiation des cellules saines.

Pourtant, seuls quelques émetteurs  $\alpha$  ont été proposés comme candidats intéressants pour la RIT. Ceci est dû principalement au faible nombre de ces émetteurs dont la désintégration conduit à un noyau fils stable. Ce dernier peut alors par sa propre désintégration entraîner la rupture de la liaison vecteur-radioélément et se redistribuer librement dans l'organisme, augmentant ainsi la dose non-spécifique. De plus, la quantité d'énergie émise lors d'une désintégration  $\alpha$  peut conduire à la radiolyse du vecteur, notamment lors des phases de marquage.

Sofou *et al.* (2004) ont incorporé de l'actinium-225 dans des liposomes par encapsulation passive (taux d'encapsulation = 10 %) puis étudié leur stabilité dans le temps. L' $^{225}\text{Ac}$  ( $T_{1/2} = 10\text{j}$ ) est hautement toxique car il décroît en produisant trois autres émetteurs  $\alpha$  dont le dernier est le bismuth-213 ( $T_{1/2} = 47\text{ min}$ ). 10 à 40 atomes d' $^{225}\text{Ac}$  (11 à 37 MBq/ml) ont pu être encapsulés sous forme de complexes (DOTA ou DTPA- $^{225}\text{Ac}$ ) dans des liposomes EPC/Chol pégylés à 6 % 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' $^{225}\text{Ac}$  et des éléments fils, seulement ces liposomes sont rapidement éliminés de la circulation sanguine.

#### **IV. 2.2. Liposomes et ciblage tumoral passif**

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  $37^\circ\text{C}$ . La  $T_m$  du DMPC utilisé dans nos liposomes est de  $23^\circ\text{C}$ . Il est envisageable de modifier la composition lipidique, en utilisant par exemple le distéaroyl phosphatidyléthanolamine (DSPC) dont la  $T_m$  est de  $55^\circ\text{C}$ . Ensuite, la présence de cholestérol (minimum 30 %) est indispensable pour minimiser la perméabilité membranaire et les échanges de lipides. Les liposomes doivent également avoir une charge de surface neutre. Dans notre étude, l'utilisation du DTPA pour le marquage apporte inévitablement des charges négatives dans la membrane par ailleurs constituée de lipides neutres. Un diamètre inférieur à 100 nm est également souhaitable pour leur permettre une distribution extravasculaire et l'accessibilité au niveau des tumeurs (*cf IV 3.2-1<sup>ère</sup> partie*), d'où le choix de préparer les liposomes par extrusion sur des membranes de polycarbonate de 100 nm. Enfin, plusieurs auteurs ont montré l'augmentation de la perméabilité des cellules tumorales aux liposomes de petite taille mais particulièrement aux liposomes furtifs. Seuls les liposomes ayant un temps de circulation prolongé ont une chance d'atteindre efficacement leur cible tumorale, d'où la nécessité de pégyler les liposomes pour une application *in vivo*.

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. L'aptitude des liposomes conventionnels (en particulier les SUV ayant une paroi rigide comme DSPC/Chol.) pour l'imagerie des tumeurs chez l'animal et chez l'Homme, est bien documentée (Phillips *et al.* 1992, Cao *et al.* 1998, Boerman *et al.* 2000, Belhaj-Tayeb *et al.* 2003). Pour les liposomes furtifs, l'amélioration du ciblage passif des tumeurs

solides suggère encore de meilleurs résultats pour l'imagerie. En thérapie, 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). Il est donc nécessaire d'optimiser le ciblage des liposomes radiomarqués pour envisager une application en radiothérapie interne.

#### **IV. 2.3. Liposomes et ciblage tumoral actif (immunociblage)**

*Les études de biodistribution des liposomes sont nombreuses et l'utilisation des immunoliposomes a été largement décrite (cf V-1<sup>ère</sup> partie). Le ciblage tumoral par des AcM radiomarqués est également une technique connue, notamment pour le traitement des lymphomes (cf I.1-2<sup>ème</sup> partie). En revanche l'immunociblage de tumeurs par des liposomes radiomarqués reste un domaine peu exploré.*

*Dans le cas des tumeurs solides, l'immunociblage direct se heurte à la difficulté de concilier une captation tumorale élevée et stable, avec une élimination rapide de la radioactivité présente dans les tissus sains et la circulation sanguine. Afin de modifier les propriétés pharmacocinétiques du radioimmunoconjugué, des techniques comportant plusieurs étapes ont été imaginées, dans lesquelles la reconnaissance de l'antigène est dissociée du ciblage du radionucléide. Différentes approches en deux ou trois étapes ont été développées.*

*Le système avidine-biotine en est un exemple. Il a été utilisé avec des liposomes avec des résultats intéressants mais des étapes de chasse sont nécessaires car c'est un système de haute affinité. Quelques travaux ont été fait 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. utilisent 50 µg d'un Ac monoclonal 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 <sup>99m</sup>Tc (5 Ci pour 0,1 ml) et biotinylés sont injectés. Les biodistributions 6 h après ont donné un résultat exprimé en pourcentage de la dose injectée par gramme de tumeur (% DI/g) égale à 3,6 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 sélectif.*

La technique AES (Affinity Enhancement system) mise au point par la société Immunotech (Marseille) est une technique en deux étapes qui a déjà fait ses preuves dans des études cliniques de phase I/II utilisant des Ac bispécifiques anti-ACE x anti-DTPA et un haptène marqué à l'iode-131 chez des patients porteurs de tumeurs exprimant l'ACE (antigène carcino-embryonnaire) (Kraeber-Bodéré *et al.* 1999).

Dans une étude préliminaire, nous avons tenté d'appliquer le principe du système AES à des liposomes porteurs de radioactivité (DMPC/Chol/PE-DTPA-<sup>111</sup>In). L'immunoréactivité des liposomes marqués ayant été vérifiée *in vitro* avec des Ac anti-DTPA-<sup>111</sup>In, nous avons pu montrer la faisabilité d'un ciblage tumoral *in vivo* chez la souris NUDE grâce à l'utilisation d'un anticorps bispécifique et de liposomes marqués en surface par le DTPA-<sup>111</sup>In. Les souris ont été xénotreffées en sous-cutané avec une lignée d'adénocarcinome colique humain (LS174T) qui exprime l'ACE. L'anticorps monoclonal bispécifique hMN14 x 734 est constitué d'un fragment anti-ACE et d'un fragment anti-DTPA-In. 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'anticorps *versus* 0,3 pour les souris témoins. Les rapports tumeur/organe confirment également la faisabilité d'un ciblage spécifique. Mais l'étude des biodistributions montrent une forte capture des liposomes par le foie et la rate, ce qui est un frein à leur diffusion. Ce modèle animal sera donc utilisé comme référence mais de quelques modifications, concernant aussi bien la formulation des liposomes que le choix des anticorps et des agents chélatants, doivent être apportées pour améliorer ce système.

### IV. 3. Perspectives

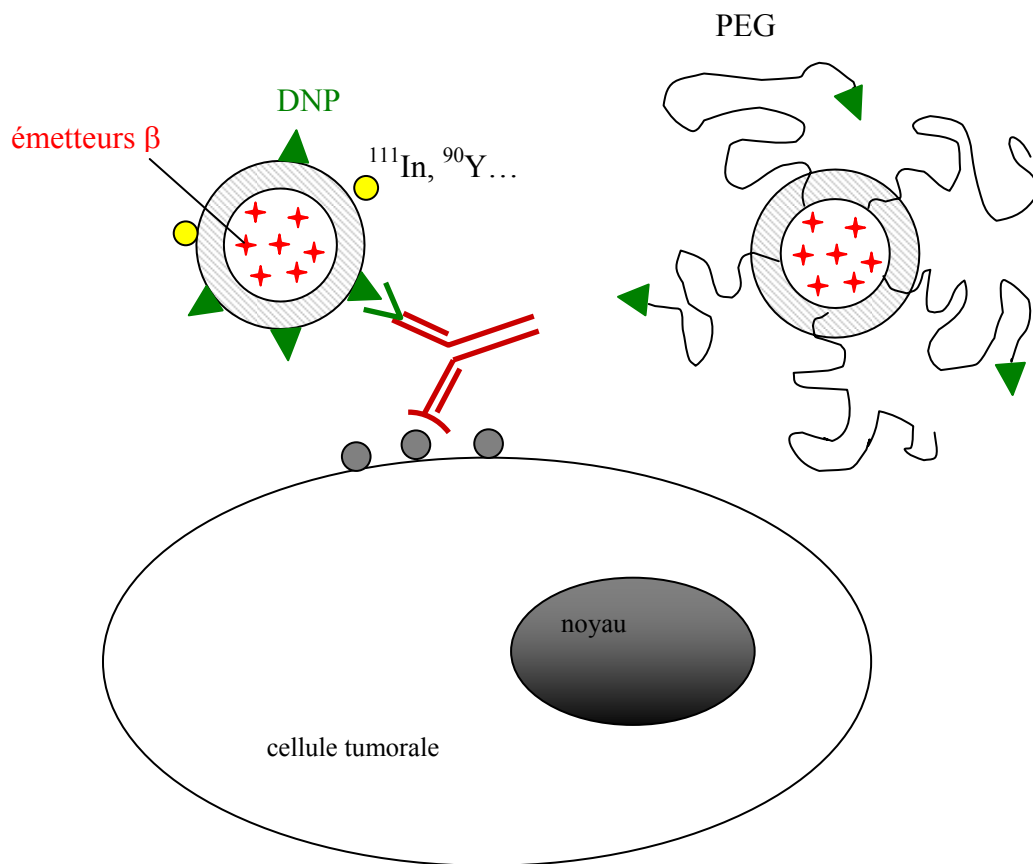
Les techniques de préparation des liposomes et des anticorps sont bien maîtrisées au sein de notre laboratoire. Il reste à mettre au point une meilleure formulation de liposomes pour une bonne distribution *in vivo* et un choix judicieux d'Ac pour produire des Ac bispécifiques de haute affinité. Ces recherches sont en cours et font l'objet d'une Thèse d'Université.

Tout d'abord, la formulation des liposomes doit être modifiée en incluant des chaînes pégyliées, de différentes longueurs et en concentration variable dans la composition lipidique. La meilleure formulation sera déterminée par des tests d'activation du complément (CH50) qui seront effectués à l'INSERM ERIT-M0104 d'Angers et qui permettront de déterminer quels sont les liposomes qui échappent le mieux à la phagocytose. La pégylation des liposomes va permettre d'améliorer non seulement la biodistribution *in vivo* mais aussi la présentation de l'haptène et donc la reconnaissance immunospécifique. Pour cela, un haptène (DNP) va être greffé en bout de chaîne de PEG afin d'optimiser l'accessibilité pour l'anticorps bispécifique (anti-DNP x anti-ACE). Ces travaux seront également effectués, en collaboration avec l'équipe d'Angers, sur des nanocapsules. L'avantage d'un tel système est d'augmenter la spécificité du ciblage, d'abord *in vitro* puis *in vivo*. Différents tests ont été effectués *in vitro* sur des cultures cellulaires de lignées LS174T exprimant l'ACE avec des anticorps bispécifiques (anti-DNP x anti-ACE ou anti-DTPA-In x anti-ACE). Ils méritent d'être approfondis avec différents types de liposomes pégylés, fluorescents ou radioactifs.

Pour ce qui est du radiomarquage, les premiers tests d'encapsulation active du réactif Bolton-Hunter sur les liposomes pégylés semblent satisfaisants. Il faut néanmoins augmenter encore l'activité spécifique puis tester la stabilité de ces marquages avec 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, afin de permettre l'utilisation de différents radionucléides comme l'yttrium-90, l'astate-211 ou l'iode-131 utilisables en thérapeutique. De plus, un double marquage, de la paroi et de l'espace interne des liposomes, a déjà été réalisé et devrait être exploité pour augmenter l'activité spécifique des liposomes ou pour encapsuler un radionucléide d'intérêt tout en se servant du PE-DTPA-In pour la vectorisation.



Enfin, après les tests d'immunociblage *in vitro* et l'optimisation du radiomarquage, nous pourrions envisager une étude de biodistribution chez l'animal. Le modèle animal a été validé au cours d'une étude préliminaire et va permettre d'optimiser le ciblage des liposomes radiomarqués (doses, délais d'injection, augmentation de l'activité spécifique...) afin d'évaluer leur efficacité sur les tumeurs solides.



**Fig. 14: Utilisation de liposomes radiomarqués dans l'AES. Représentation schématique du ciblage immunospcifique d'une cellule tumorale par l'intermédiaire d'un anticorps bispécifique reconnaissant d'une part, un antigène exprimé à la surface de la cellule et d'autre part, un haptène couplé à la bicouche lipidique**

*ou à une chaîne de PEG d'un liposome radiomarqué, en surface  
ou dans la phase aqueuse.*

## **V. 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 d'être particulièrement bien tolérés et de pouvoir transporter de fortes activités.

La radioimmunothérapie est maintenant une réalité clinique, principalement pour le traitement des lymphomes malins non hodgkiniens, avec le Bexxar<sup>®</sup> et le Zevalin<sup>®</sup>. Pour les tumeurs solides, les cibles privilégiées sont les micrométastases voire la maladie résiduelle. Dans ce cas, l'efficacité de la radioimmunothérapie est souvent 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 afin de les cibler vers des tumeurs à l'aide d'anticorps bispécifiques, reconnaissant à la fois des antigènes tumoraux et des haptènes couplés à la membrane liposomale. L'optimisation du ciblage par des techniques en plusieurs étapes comme l'AES 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 liposomiale. 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 a montré 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.

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

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. **Ahkong Q.F, Tilcock C.** Attachment of  $^{99m}\text{Tc}$  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. **Alafandy M, Goffinet G, Umbrain V, D'Haese J, Camu F, Legros F.**  $^{99m}\text{Tc}$ -stannous oxinate as marker of liposome formulations. *Nuclear Medicine and Biology* 23 (1996) 881-887.
4. **Allen T.M, Hansen C.B, Lopes de Menezes D.E.** Pharmacokinetics of long-circulating liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews* 16 (1995) 267-284.
5. **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..
6. **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.

7. **Alving C.R.** Liposomes as carriers of antigens and adjuvants. *Journal of Immunological Methods* 140 (1991) 1-13.
8. **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  $^{99m}\text{Tc}$  – labeled liposomes. *Nuclear Medicine and Biology* 29 (2002) 185-190.
9. **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.
10. 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.
11. **Barbet J.** Traceurs fluorescents des liposomes. In: *Méthodologie des liposomes*, Leserman L.D, Barbet J. Ed., *Séminaires technologiques de l'INSERM*, vol. 107 (1982).
12. **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.
13. **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.
14. **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.
15. **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.
16. **Barenholz Y.** Liposome application : problems and prospects. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 6 (2001) 66-77.

17. **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.

18. **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 <sup>99m</sup>Tc-MIBI encapsulated in PEG-liposomes: a promising radiotracer for tumor imaging. *European Journal of Nuclear Medicine* 30 n°4 (2003) 502-509.

19. **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.

20. **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.

21. **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.

22. **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.

23. **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.

24. **Bonte F, Juliano R.L.** **Interactions of liposomes with serum proteins.** *Chemistry and Physics of Lipids* 40 (1986) 359-372.

25. **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.

26. **Cao Y, Suresh M.R.** Bispecific Mab aided liposomal drug delivery. *Journal of Drug Targeting* 8 n°4 (2000) 257-266.
27. **Cao Y, Suresh M.R.** A simple and efficient method for radiolabeling of preformed liposomes. *Journal of Pharmaceuticals Sciences I* (1998) 31-37.
28. **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.
29. **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.
30. **Chatal J.F, Hoefnagel C.A.** Radionuclide therapy. *The Lancet* 354 (1999) 931-935.
31. **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.
32. **Chrai S.S, Murari R, Ahmad I.** Liposomes: Drug Delivery Systems. *Pharmaceutical Technology Europe* (2003) 53-56.
33. **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.
34. **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.
35. **Connor J, Sullivan S, Huang L.** Monoclonal antibody and liposomes. *Pharmacology and Therapeutics* 28 (1985) 341-365.
36. **Couvreur P.** Liposomes en clinique humaine: Le point sur les résultats thérapeutiques. In: *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.*

37. **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.*

38. 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.*

39. Deamer D, Bangham A.D. **Large volume liposomes by an ether vaporization method.** *Biochimica and Biophysica Acta 443 (1976) 629-634.*

40. 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.*

41. Devoisselle J .M. **Les liposomes: aspects pharmaceutiques, comportement *in vivo* et réalités cliniques.** *La lettre du Pharmacologue 11 n°10 (1997) 203-209.*

42. Dillman R. **Radiolabeled anti-CD20 monoclonal antibodies or the treatment of B-cell lymphoma.** *Journal of Clinical Oncology 20 n°16 (2002) 3545-3557.*

43. 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.*

44. **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.*

45. **Düzgünes N, Shlomo N.** Mechanisms and kinetics of liposome - cell interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews* 40 (1999) 3-18.

46. **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.*

47. **Freund O.** Biodistribution and gastrointestinal drug delivery of new lipidic multilamellar vesicles.. *Advanced Drug Delivery Reviews* 8 (2001) 239-244.

48. **Gabizon A.** Liposome circulation time and tumor targeting : implications for cancer chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 16 (1995) 285-294.

49. **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.

50. **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.

51. **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 <sup>131</sup>I-labeled bivalent hapten. *Journal of Nuclear Medicine* 41 n°3 (2000) 480-7.

52. **Grant C.W, Karlik S, Florio E.** A liposomal MRI contrast agent : phosphatidylethanolamine - DTPA. *Magnetic Resonance in Medecine* 11 (1989) 236-243.

53. **Gregoriadis G, Meehan A.** **Interaction of antibody – bearing small unilamellar liposomes with antigen – coated cells .** *Journal of Biochemistry* 200 (1981) 211-216.

54. **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.

55. 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.
56. Harashima H, Kiwada H. The pharmacokinetics of liposomes in tumor targeting. *Advanced Drug Delivery Reviews* 40 (1999) 1-2.
57. Harrington K.J, Rowlinson-Busza G, Syrigos K.N, Uster P.S, Vile R.G, Peters A.M, Stewart S.W. **The effect of irradiation on the distribution of radiolabeled pegylated liposomes.** *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics Special Issues* 50 n°3 (2001) 809-820.
58. Harrington K.J, Rowlinson-Busza G, Uster P.S, Vile R.G, Peters A.M, Stewart S.W. **Single – fraction irradiation has no effect on uptake of radiolabeled pegylated liposomes in a tumor xenograft model.** *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics Special Issues* 49 n°4 (2001) 1141-1148.
59. 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.
60. 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.
61. Ho R.J, Rouse B.T, Huang L. **Target – sensitive immunoliposomes : preparation and characterization.** *Biochemistry* 25 (1986) 5500-5506.
62. 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 .
63. 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.

64. Hwang K.J. **Encapsulation with high efficiency of radioactive metal ions in liposomes.** *Biochimica and Biophysica Acta* 716 (1982) 101-109.
65. 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.
66. 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.
67. Iden D.L, Allen T.M. **In vitro and in vivo comparison of immunoliposomes made by conventional coupling techniques with those made by a new post-insertion approach.** *Biochimica and Biophysica Acta* 1513 (2001) 207-216.
68. 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.
69. 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.
70. 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 <sup>131</sup>I-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.
71. Kirby C, Gregoriadis G. **Dehydration-rehydration vesicles: A simple method for high yield drug entrapment in liposomes.** *Biotechnology* (1984) 979-984.
72. 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.

73. **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

74. Kostarelou K, Emfietzoglou D. **Tissue dosimetry of liposome – radionuclide complexes for internal radiotherapy : Toward liposome – targeted therapeutic radiopharmaceuticals.** *Anticancer Research* 20 (2000) 3339-3346.

75. 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. **Radioimmunotherapy 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.

76. Lasic D.D. **Mechanism of liposomes formation.** *Journal of Liposomes Research* 5 (1995) 431.

77. Lasic D.D. **Applications of liposomes.** in: *Lipowsky R, Sackmann E. Handbook of Biological Physics, chapitre 10* (1995) 491-519.

78. Lasic D.D. **Novel applications of liposomes.** *Ibtech* 16 (1998)307-321.

79. **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.

80. **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.

81. **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.

82. **Leserman L.D, Barbet J, Kourilsky F, Weinstein J.N.** Targeting to cells of fluorescent liposomes covalently coupled with monoclonal antibody or protein A. *Nature* 288 n°11 (1980) 602-604.
83. **Leserman L.D, Machy P, Barbet J.** Cell-specific drug transfer from liposomes bearing monoclonal antibodies. *Nature* 293 (1981) 226-228.
84. **Leserman L.D, Machy P, Leonetti J-P, Milhaud P.G, Degols G, Lebleu B.** Targeted liposomes and intra-cellular delivery of macromolecules. *Biotechnology* (1990) 95-102.
85. **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.
86. **Lewis J.P, Denardo G.L, Denardo S.J.** Radioimmunotherapy of lymphoma. *Hybridoma* 14 n°2 (1995) 115-120.
87. **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.
88. **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 Medicine and Biology* 25 (1998) 659-665.
89. **Liu D.** Biological factors involved in blood clearance of liposomes by liver. *Advanced Drug Delivery Reviews* 24 (1997) 201-213.
90. **Loughrey H, Bally M.B, Cullis P.R.** A non-covalent method of attaching antibodies to liposomes. *Biochimica and Biophysica Acta* 901 (1987) 157-160.
91. **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.

92. **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.
93. **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.
94. **Martin F.J, Papahadjopoulos D.** Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles. *The Journal of Biological Chemistry* 257 n°1 (1982) 286-288.
95. **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.
96. **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.
97. **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.
98. **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.
99. **Massing U, Fuxius S.** Liposomal formulations of anticancer drugs : selectivity and effectiveness. *Drug Resistance Uptake* 3 (2003) 171-177.
100. **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.

101. 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.
102. Mayer L.D, Hope M.J, Cullis P.R. **Vesicles of variable produced by a rapid extrusion procedure.** *Biochimica and Biophysica Acta* 858 (1986a) 161-168.
103. Mayer L.D, Bally M.B, Hope M.J, Cullis P.R. **Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes.** *Chemistry and Physics of Lipids* 40 (1986b) 333-345.
104. 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 (1986c) 123-126.
105. **Mehnert W, Mäder K.** Solid lipid nanoparticles, production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 47 (2001) 165-196.
106. **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.
107. Moreira J.N, Ishida T, Gaspar R, Allen T.M. **Use of the post-insertion technique to insert peptide ligands into pre-formed stealth liposomes with retention of binding activity and cytotoxicity.** *Pharmaceutical Research* 19 n°3 (2002) 265-269.
108. **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.
109. Niculescu-Duvaz I, Springer C.J. **Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): a review.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 26 (1997) 151-172.
110. **Oku N.** Delivery of contrast agents for positron emission tomography imaging by liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews* 37 (1999) 53-61.



111. **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.
112. **Patel H.M.** Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9 n°1 (1992) 39-90.
113. **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.
114. **Pèlegrin 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.
115. **Phillips W.T.** Delivery of gamma - imaging agents by liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews* 37 (1999) 13-32.
116. **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 Medecine Biology* 19 n°5 (1992) 539-547.
117. **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.
118. **Presant C.A, Crossley R, Ksionski G, Proffitt R.** Design of liposome clinical trials. *Liposome Technology volume II* (1993) 307-317.
119. **Proffit R.T, Williams L.E, Presant C.A.** **Tumor-imaing potential of liposomes loaded with In-111-NTA: biodistribution in mice.** *Journal of Nuclear Medicine* 24 n°1 (1983) 45-51.
120. **Puisieux F.** Les liposomes. *Annales pharmaceutiques françaises* 41 n°1 (1983) 3-13.

121. **Puisieux F, Benita S.** Towards a new galenic dosage form, the liposomes ?. *Biomedecine*. 36 (1982) 4-13.
122. **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.
123. **Rongen H.A, Bult A, van Bennekom W.P.** Liposomes and immunoassays. *Journal of Immunologicals Methods* 204 (1997) 105-133.
124. **Saunders L, Perrin J, Gammack D.B.** Aqueous dispersion of phospholipids by ultrasonic radiations. *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology* 14 (1962) 567-572.
125. **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.
126. **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.
127. **Schroit A.J, Madsen J, Nayar R.** Liposome-cell interactions: *In vitro* discrimination of uptake mechanism and *in vivo* targeting strategies to mononuclear phagocytes. *Chemistry and Physisc of Lipids* 40 (1986) 373-393.
128. **Schwendener R.A, Trüb T, Schott H, Langhals H, Barth R.F, Groscurth P, Hengartner H.** Comparative studies of the preparation of immunoliposomes with the use of two bifunctionnal coupling agents and investigation of the *in vitro* immunoliposome-target cell binding by cytofluorometry and electron microscopy. *Biochimica and Biophysica Acta* 1026 (1990) 69-79.
129. **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.

130. 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.
131. 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.
132. Sofou S, Thomas J.L, Lin H, McDevitt M.R, Scheinberg D.A, Sgouros G. Engineered liposomes for potential  $\alpha$ -particle therapy of metastatic cancer. *Journal of Nuclear Medicine* 45 (2004) 253-260.
133. Srinath P, Diwan P.V. **Stealth liposomes, an overview.** *Indian Journal of Pharmacology* 26 (1994) 179-184.
134. 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 (1) (1994) 641-666.
135. Storm G, Crommelin D.J.A. Liposomes : Quo vadis? *Pharmaceutical Science and Technology Today* 1 (1998) 19-31.
136. Swapna J, Nabar G.D. Effect of size and charge of liposomes on biodistribution of encapsulated  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA in rats. *Indian Journal of Pharmacology* 30 (1998) 199-202.
137. 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.

138. **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  $\mu\text{m}$ ) by a combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes. *Biochimica and Biophysica Acta* 601 (1980) 559-571.
139. **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.
140. **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.
141. **Thies R.L, Cowens D.W, Cullis P.R, Bally M.B, Mayer L.D.** Method for rapid separation of liposome associated Doxorubicin from free Doxorubicin in plasma. *Analytical Biochemistry* 188 (1990) 65-71.
142. **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.
143. **Torchilin V.P, Rammohan R, Weissig V, Levchenko T.S.** TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 n°15 (2001) 8786-8791.
144. **Trubetskaya O.V, Trubetskoy V.S, Domogatsky S.P, Rudin A.V, Popov N.V, Danilov S.M, Nikolayeva M.N, Klibanov A.L, Torchilin V.P.** Monoclonal antibody to human endothelial cell surface internalization and liposome delivery in cell culture. *FEBS Letters* 228 (1988) 131-134.
145. **Verumi S, Rhodes C.T.** Préparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helveticae* 70 (1995) 95-111.
146. **Vuillez J.P.** Le radio-immunociblage : aspects diagnostiques et thérapeutiques. *Bulletin du Cancer* 87 n°11 (2000) 813-827.

147. 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.
148. **Weinstein J.N.** Liposomes as targeted drug carriers; A physical chemical perspective. *Pure and application Chemistry* 53 (1981) 2241-2254.
149. **Weinstein J.N, Leserman L.D.** Liposomes as drug carriers in cancer chemotherapy. *Pharmacology therap.* 24 (1984) 207-233.
150. **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.
151. **Wen X, Wu Q-P, Ke S, Ellis L, Charnsangavej C, Delpassand A.S, Wallace S, Li C.** Conjugation with  $^{111}\text{In}$  – DTPA - poly(ethyleneglycol) improves imaging of anti-EGF receptor antibody C225. *Journal of Nuclear Medicine* 42 n°10 (2001) 1530-1537.
152. **Wilbur D.S, Hadley S.W, Hyalarides 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. *Journal of Nuclear Medicine* 30 (1989) 216-226.
153. **Woodle M.C.**  $^{67}\text{Ga}$ -labeled liposomes with prolonged circulation. *Nuclear Medicine and Biology* 20 n°2 (1993) 149-155.
154. **Woodle M.C.** Sterically stabilized liposome therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 16 (1995) 249-265.
155. **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.
156. **Zalipsky S.** Synthesis of end-group functionalized polyethylene glycol-lipid conjugate for preparation of polymer-grafted liposomes. *Bioconjugate chemistry* 4 (1993) 296-299.

157. **Zalipsky S.** Polyethylene glycol-lipid conjugates. *in: Lasic D, Martin F. Stealth Liposomes, CRC Press Inc (1995a) 93-102.*

158. **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 (1995b) 705-708.*

## Figures de la Partie Bibliographique

<b>Fig. 1 :</b>	Structure d'un liposome formé d'une bicouche de phospholipides.....	5
<b>Fig. 2 :</b>	Représentation schématique des différents assemblages possibles de phospholipides.....	7
<b>Fig. 3 :</b>	Structure des phospholipides.....	9
<b>Fig. 4 :</b>	Formule du cholestérol.....	12
<b>Fig. 5 :</b>	Représentation schématique des différents types de liposomes.....	14
<b>Fig. 6 :</b>	Représentation schématique des 4 principaux types de liposomes selon Storm et Crommelin (1998).....	16
<b>Fig. 7 :</b>	Mécanisme de formation des vésicules lipidiques selon Lasic (1995).....	19
<b>Fig. 8 :</b>	Préparation des liposomes par hydratation d'un film lipidique.....	21
<b>Fig. 9 :</b>	Technique d'extrusion sur membranes de polycarbonate grâce au mini-extruder <sup>®</sup> (Avanti Polar Lipids).....	22
<b>Fig. 10 :</b>	Technique d'évaporation en phase inverse selon Szoka et Papahadjopoulos (1998).....	25
<b>Fig. 11 :</b>	Schéma d'un liposome unilamellaire avec la localisation des molécules encapsulées en fonction de leur solubilité (Devoiselle, 1997).....	31
<b>Fig. 12 :</b>	Modèle d'encapsulation d'une base faible dans un liposome unilamellaire grâce à un gradient de protons (Cullis, 1997).....	34
<b>Fig. 13 :</b>	Encapsulation active de bases faibles par l'intermédiaire d'un gradient de sulfate d'ammonium (Drummond, 1999).....	35
<b>Fig. 14 :</b>	Représentation schématique de la phagocytose d'une particule.....	43
<b>Fig. 15 :</b>	Interactions des liposomes avec les lipoprotéines plasmatiques	

(Devoiselle, 1999).....	45
<b>Fig. 16</b> : Différents types d'interactions entre cellules et liposomes.....	
47	
<b>Fig. 17</b> : Représentation schématique de la structure des endothéliums capillaires (Devissaguet et Puisieux, 1993, d'après un schéma de Hwang K.J.).....	49
<b>Fig. 18</b> : Mécanismes de pénétration des liposomes et de libération du PA dans les tumeurs solides (Devoisselle et Soulié-Begu, 2001).....	51
<b>Fig. 19</b> : Interaction des liposomes furtifs avec les protéines plasmatiques (opsonines)	54
<b>Fig. 20</b> : Différents types de ciblage des liposomes.....	
58	
<b>Fig. 21</b> : Représentation schématique des trois types de base d'immunoliposomes (Koning, 2002).....	59
<b>Fig. 22</b> : Couplage covalent d'un fragment Fab' à un liposome préformé contenant de la PE-PDP (revue de Schuber, 1993).....	63
<b>Fig. 23</b> : Couplage covalent d'un fragment Fab' à un liposome préformé contenant de la PE-MPB (revue de Schuber, 1993).....	64
<b>Fig. 24</b> : Réactions de thiolation d'Ac-NH <sub>2</sub> par l'intermédiaire du SPDP (A) ou du SATA (B) (revue de Schuber, 1993).....	65
<b>Fig. 25</b> : Couplage covalent d'un Ac-maléimide à un liposome préformé contenant de la PE-PDP (Hansen et al. 1995).....	66
<b>Fig. 26</b> : Représentation schématique du concept ADEPT.....	
77	



## Tableaux de la partie bibliographique

Tabl. 1 : Principaux phospholipides utilisés dans la formulation des liposomes.....	10
Tabl. 2 : Classification des liposomes selon Papadjopoulos (1977).....	14
Tabl. 3 : Exemples de variations du ratio PA/lipides selon la technique d'encapsulation et la composition en lipides des liposomes (Drummond et al. 1999)...	38
Tabl. 4 : Exemples de ligands pouvant être conjugués aux liposomes.....	57
Tabl. 5 : Différents groupements chimiques utilisés pour le couplage Ac/PEG.....	70
Tabl. 6 : Formulations liposomiales commercialisées ou en phase d'évaluation clinique (Barratt, 2000) .....	74
Tabl. 7 : Avantages de l'utilisation des liposomes comme vecteurs d'antigènes (Perrin, 1996).....	75
Tabl. 8 : Indications des formulations liposomiales d'anthracyclines commercialisées (Drummond et al. 1999).....	79

## *Figures de la partie expérimentale*

<b>Fig.1</b> : Principe du système A.E.S.....	85
<b>Fig.2</b> : Synthèse du PE-DTPA.....	89
<b>Fig.3</b> : Synthèse du PE-DNP.....	91
<b>Fig.4</b> : Profil d'élution d'une solution de liposomes par gel-filtration.....	103
<b>Fig.5</b> : Etude de la stabilité des liposomes en présence d'iode-131 à 5h, 24h et 48h .....	106
<b>Fig.6</b> : Etude de la stabilité des liposomes en présence de Samarium-153 à 5h, 24h et 48h .....	107
<b>Fig.7</b> : Profils d'élution sur Sephadex <sup>®</sup> G25 d'une solution d'indium-111 témoin et d'une solution de liposomes EPC/Chol/PE-DTPA 1% marqués à l'indium-111.....	108
<b>Fig.8</b> : Taux de marquage des liposomes EPC/Chol/PE-DTPA en fonction du nombre d'équivalents de DTPA par rapport à l'indium-111 .....	109
<b>Fig.9</b> : Influence de la quantité de Chloramine T sur la formation de Bolton-Hunter mono ou diiodé.....	110
<b>Fig.10</b> : Profils d'élution sur Sephadex <sup>®</sup> 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). .....	111
<b>Fig.11</b> : Nombre de nmol. de BH encapsulées en fonction de la quantité initiale (Ni) de réactif mise en présence des liposomes .....	112
<b>Fig.12</b> : Evolution du taux d'encapsulation en fonction de la quantité de BH initiale. ....	112
<b>Fig.13</b> : Nombre de molécules de Bolton-Hunter encapsulées dans les liposomes (en nmol) en fonction de l'activité en iode-131 (en mCi).....	117
<b>Fig.14</b> : Utilisation de liposomes radiomarqués dans l'A.E.S.....	129

## *Tableaux de la partie expérimentale*

<b>Tableau 1:</b> Proportion de réactif monoiodé ou diiodé obtenu en fonction du nombre initial de moles de réactif marquées avec 0,06 nmol d'iode-125.....	110
<b>Tableau 2 :</b> Taux d'encapsulation du réactif de BH marqué à l'iode-125 dans des liposomes EPC/Chol/PE-DTPA (66 :33 :1). Stabilités sériques à 2h et 24h .....	113
<b>Tableau 3 :</b> Taux d'encapsulation obtenus pour des quantités croissantes de BH .....	114
<b>Tableau 4:</b> Influence de la composition lipidique et du PEG 2000 (3 mol %) sur l'encapsulation active du réactif de Bolton-Hunter marqué à l'iode-125.....	116
<b>Tableau 5:</b> Taux d'encapsulation du réactif de Bolton-Hunter radiomarqué à l'iode-131 (jusqu'à 5,4 mCi) dans des liposomes EPC/Chol/PE-DTPA (66 :33 :1) .....	117

---

**Nom-Prénom :** MOUGIN-DEGRAEF Marie

**Titre de la Thèse :** Les liposomes : aspects technologiques et pharmaceutiques. Radiomarquage des liposomes pour le ciblage en radioimmunothérapie.

---

Résumé de la Thèse :

**La première partie de ce mémoire présente différents aspects pharmaceutiques (structure, propriétés, formulation), techniques (modes de préparation et d'encapsulation de substances actives) ainsi que le comportement *in vivo* des liposomes. Le développement de liposomes à demi-vie prolongée ou vectorisés spécifiquement à l'aide d'anticorps (immunoliposomes), a rendu possible leur utilisation en clinique. Leurs applications sont nombreuses, tant en diagnostic qu'en thérapie.**

**La partie expérimentale de ce mémoire a pour but d'évaluer l'efficacité des liposomes dans l'immunociblage des tumeurs. Si l'intérêt de la radioimmunothérapie (RIT) a été démontré dans le traitement des tumeurs hématologiques, il reste à démontrer pour les tumeurs solides, où son efficacité 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, reconnaissant à la fois des antigènes tumoraux et des haptènes couplés à la membrane liposomale. Deux approches ont été testées : le marquage en surface avec l'indium-111 couplé à un agent chélatant (DTPA) et le marquage de la phase interne des liposomes à l'aide de composés marqués à l'iode-125 ou à l'iode-131. Des tests d'immunoréactivité et de stabilité ont été réalisés sur différentes formulations de liposomes. Les résultats sont prometteurs et l'optimisation du préciblage *in vivo* des liposomes radiomarqués devrait permettre leur utilisation thérapeutique.**

---

**Mots clés :** Liposomes. Radioimmunothérapie. Radionucléides. Anticorps Monoclonaux. Immunoliposomes. Ciblage tumoral.