



**LES TRANSVERSALES SANTÉ**  
de Paris Technopole  
en association avec Medicen Paris Region

## SYNTHESE

---

### → Les nanovecteurs, un avenir radieux ?

Mardi 10 juillet 2007  
18h30 - 20h30

Le sponsor de cette édition



**Intervenants** : Patrick COUVREUR, Florence GAZEAU, David CARRIERE, Francois TREUSSART

**GRAND TÉMOIN** : Claude BOCCARA

*Issues de la physique, les nanosciences et les nanotechnologies se développent à grands pas dans le domaine du vivant et de la santé. Cette Transversale a illustré différents types de « nanovecteurs ». Ces complexes moléculaires, sphères ou vésicules nanométriques, susceptibles de s'introduire dans des cellules cibles, pourraient se révéler des alliés de taille pour deux grands types d'applications médicales : l'imagerie cellulaire et tissulaire et la thérapie.*

## → Les apports des nanotechnologies à la mise au point de nouveaux médicaments

**Patrick Couvreur,**

*Directeur du laboratoire « Physico-chimie, pharmacotechnie, biopharmacie », Faculté de pharmacie, Université Paris-Sud, UMR CNRS 8612, Châtenay-Malabry  
patrick.couvreur@u-psud.fr*

Voilà une vingtaine d'années on enseignait qu'il était hors de question d'administrer par voie intraveineuse des particules en suspension dans une phase aqueuse. L'injection d'une suspension relativement grossière aurait provoqué une thromboembolie mortelle. Les nanotechnologies ont ouvert des perspectives considérables pour la conception de nouveaux médicaments en permettant de développer des systèmes suffisamment petits, de l'ordre de 0,1 à 0,3 micron, pour être administrés dans le sang sans induire de phénomène thromboembolique.

### **Première génération**

On dispose aujourd'hui d'un choix relativement vaste de nanovecteurs de première génération (non décorés par des groupements chimiques). Les plus connus sont les liposomes, formés de bicouches de phospholipides encapsulant des compartiments aqueux. D'autres vecteurs sont constitués de lipides comme le squalène, une innovation développée récemment à la faculté de Châtenay-Malabry et qui a donné lieu à la création de la start-up Medsqual, incubée à Paris Biotech. Son objectif : développer des solutions de contournement des résistances aux anticancéreux et aux antiviraux. En effet, le couplage du squalène à des analogues nucléosidiques (« squalénisation ») produit des molécules plus actives et qui s'auto-assemblent spontanément en milieu aqueux sous forme de nanoparticules. Ces nanosystèmes ont été utilisés pour tester deux analogues nucléosidiques à activité anticancéreuse (la gemcitabine et l'Ara-C) et des analogues nucléosidiques à activité antivirale (le ddI, le ddC et l'AZT).

Il existe aussi des nanovecteurs, plus anciens, à base de polymères biodégradables et métabolisables, par exemple les polyalkylcyanoacrylates. En fonction des conditions de préparation, on obtient des particules de type matriciel (le médicament est dispersé dans une nanomatrice et libéré au fur et à mesure de la bioérosion du système) ou une polymérisation interfaciale donnant une « nanocapsule » : un système réservoir dans lequel le polymère piège une nanogouttelette d'eau contenant des médicaments hydrophiles (peptides, protéines, acides nucléiques) ou une nanogouttelette lipidique.

### **Une cible privilégiée : le foie**

Malgré cette diversité, tous ces vecteurs de première génération, administrés en intraveineuse, se concentrent au niveau du système réticulo-endothélial : notamment dans les macrophages du foie, ou cellules de Kupfer. Pourquoi ? Ces nanoparticules présentent une surface spécifique considérable et toute une série de protéines plasmatiques s'adsorbent à leur surface. Parmi elles, les opsonines, reconnues par les récepteurs des macrophages.

De ce fait, ces nanovecteurs constituent des navettes extraordinaires pour apporter des principes actifs au niveau du foie. Ainsi, des nanosphères biodégradables à base de polyalkylcyanoacrylates dans lesquelles était dispersée de la doxorubicine, un anticancéreux cardiotoxique, se sont révélées plus efficaces et beaucoup moins toxiques à la même dose que la forme libre de la doxorubicine. Ces travaux ont donné naissance à BioAlliance Pharma en 1997 et à sa technologie Transdrug®.

Le sponsor de cette édition



entrée fin 2006 en phase III d'essais cliniques pour le traitement du cancer primitif du foie.

### **Vecteurs PEG et vecteurs « adressés »**

Cependant, pour cibler d'autres territoires que le foie, il faut absolument empêcher l'opsonisation. Un concept de pure physico-chimie, la « pégylation », a permis de lever ce verrou. On greffe à la surface des nanoparticules des polymères hydrophiles et flexibles, dont le polyéthylène glycol (PEG) est le principal représentant. Par répulsion stérique, les phénomènes d'opsonisation sont éliminés. Les vecteurs pégylés, dits de deuxième génération, peuvent diffuser sélectivement au niveau des tumeurs, où l'endothélium continu des capillaires sanguins est perméable, mais ils ne pénètrent pas forcément dans les cellules tumorales. Ce concept peut être appliqué à des tumeurs d'accès difficile (gliomes, gliosarcomes).

Comment faire mieux ? Les vecteurs de troisième génération sont des vecteurs pégylés sur lesquels un ligand est greffé afin de reconnaître un récepteur. On découvre tous les jours des marqueurs de tumeurs qui peuvent être des cibles potentielles. L'équipe de Châtenay-Malabry s'est particulièrement intéressée, en collaboration avec l'équipe d'Etienne Duguet à l'Université de Bordeaux, aux récepteurs de l'acide folique, souvent hyperexprimés dans les cancers, et que l'on peut donc cibler en greffant de l'acide folique sur les nanovecteurs.

*Pour en savoir plus* \_\_\_\_\_

<http://www.UMR-CNRS8612.u-psud.fr>

« BioAlliance, la pharma de spécialités », In Dossier Infectiologie, avril 2007, Paris Développement

[http://www.parisdeveloppement.com/fileadmin/user\\_upload/pole/bio/Actualit\\_s/Infectiologie/Dossier\\_infectio\\_Vimprimable.pdf](http://www.parisdeveloppement.com/fileadmin/user_upload/pole/bio/Actualit_s/Infectiologie/Dossier_infectio_Vimprimable.pdf)

### **➔ Des nano-aimants pour le diagnostic et la thérapie**

#### **Florence Gazeau,**

*Chargée de Recherche au CNRS, Laboratoire Matière et systèmes complexes, UMR CNRS 7057, Groupe Physique du vivant, Université Paris-Diderot, Paris  
florence.gazeau@univ-paris-diderot.fr*

Certains animaux sont sensibles au champ magnétique terrestre grâce à la présence dans certains tissus de petits aimants. Inversement, on peut artificiellement introduire des « nano-aimants » dans l'organisme à des fins d'imagerie et de thérapie.

Il est possible de synthétiser chimiquement des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer de 5 à 30 nm de diamètre. Ces nanoparticules sont maintenues en suspension colloïdale. Mises au contact de cellules en culture, elles sont absorbées par endocytose. D'abord se produit une adsorption non spécifique de nature électrostatique (les particules sont chargées négativement en surface) ; puis les nanoparticules sont internalisées dans les endosomes. Au bout d'une heure, une seule cellule peut contenir de 1 à 10 millions de nanoparticules magnétiques.

On peut ainsi marquer la plupart des types cellulaires. D'après les expériences réalisées jusqu'à présent, la viabilité et la fonctionnalité de la cellule ne sont pas affectées. Ainsi des cellules musculaires souches chargées en nanoparticules magnétiques se différencient normalement en cellules musculaires.

Le sponsor de cette édition



### **Suivre des cellules à la trace**

La première application des nano-aimants est l'IRM (imagerie par résonance magnétique). La cellule magnétique crée une inhomogénéité de champ magnétique qui perturbe les protons environnants, d'où un hyposignal noir ponctuel. Les cellules magnétiques peuvent ainsi être suivies « à la trace » dans un organisme. Une technique fort intéressante pour les spécialistes de la thérapie cellulaire.

Deuxième application : la « vectorisation magnétique ». Il s'agit d'utiliser la force magnétique pour conduire un vecteur thérapeutique jusqu'à sa cible. On utilise des liposomes magnétiques pégylés encapsulant des nanoparticules magnétiques. In vivo, chez la souris porteuse de tumeurs, en présence d'un aimant placé sur l'une des tumeurs, les liposomes s'accumulent uniquement dans la tumeur aimantée. De même, sur un modèle développé à l'hôpital Lariboisière pour visualiser in vivo la microcirculation cérébrale, on constate que les liposomes magnétiques peuvent s'accumuler dans la circulation cérébrale sous l'influence d'une force magnétique. Certaines équipes développent des stents magnétiques capables d'attirer des vecteurs magnétiques de médicaments ou des cellules magnétisées d'intérêt thérapeutique.

### **Vecteurs hybrides**

Le laboratoire Matière et systèmes complexes développe de nouveaux nanovecteurs magnétiques possédant une membrane biologique sécrétée par des cellules comme *Dictyostelium discoideum*, un microorganisme eucaryote primitif. Ces cellules, cultivées en présence de nanoparticules magnétiques et d'une molécule anticancéreuse, sécrètent par exocytose des microvésicules magnétiques et thérapeutiques, que l'on peut isoler. Grâce à leur origine biologique, ces vésicules pourraient fusionner avec la membrane des cellules cibles.

### **Hyperthermie induite par des nano-aimants**

Troisième aspect appliqué des nano-aimants : l'hyperthermie. Les nanoparticules magnétiques chauffent en effet en présence d'un champ magnétique alternatif en raison de fluctuations du moment magnétique d'origine interne (dynamique de Néel) ou externe (dynamique de Brown). Cette capacité de chauffage dépend du diamètre des nanoparticules. Des essais cliniques sont en cours en Allemagne sous l'impulsion de la start-up MagForce Nanotechnologies (<http://www.magforce.de/>) : on injecte directement des nanoparticules magnétiques dans des tumeurs cérébrales ou prostatiques. Les voies de recherche dans ce domaine consistent à mettre au point des vecteurs magnétiques capables de cibler des tumeurs impossibles à atteindre par une simple injection.

*Pour en savoir plus* \_\_\_\_\_

<http://www.msc.univ-paris7.fr/pages-perso/cellmag/>

« Nanobiotix : des nanoparticules activables contre le cancer », in Dossier Cancérologie, mai 2006, Paris Développement

[http://www.parisdeveloppement.com/fileadmin/user\\_upload/pole/bio/Actualites/cancer/pdf\\_final\\_cancero2.pdf](http://www.parisdeveloppement.com/fileadmin/user_upload/pole/bio/Actualites/cancer/pdf_final_cancero2.pdf)

Le sponsor de cette édition



## Questions de l'assistance

*Faut-il forcément faire appel à des nanoparticules de troisième génération ?*

### **Patrick Couvreur**

« Pas nécessairement. Tout dépend du principe actif que l'on vectorise. S'il diffuse bien à travers les barrières biologiques, un vecteur pégylé suffit. En revanche, quand la molécule thérapeutique ne pénètre pas spontanément dans les cellules, il faut viser des cibles cellulaires pertinentes, afin qu'elles soient internalisées une fois leur ligand reconnu et que les médicaments soient distribués dans le bon compartiment cellulaire. L'apport des biologistes moléculaires est tout à fait nécessaire de ce point de vue. Dans la voie de l'acide folique, on peut développer des vecteurs qui échappent à la compartimentalisation intracellulaire et délivrer le principe actif dans le cytoplasme ou même le noyau, comme l'a montré l'équipe de Jean-Paul Behr et sa société Polyplus-transfection (Ilkirch) avec des systèmes à base de polyéthylèneimine permettant un 'adressage' nucléaire. »

*Est-on suffisamment avancé pour contrôler le devenir des médicaments contenus dans les microvésicules sécrétées par exocytose ? Comment l'évaluer ?*

### **Florence Gazeau**

« La recherche en est seulement à son début. Fait intéressant, le processus d'exocytose observé avec *Dictyostelium discoideum* ressemble beaucoup à la sécrétion de microvésicules de type exosomes par les cellules dendritiques utilisées comme vaccins antitumeurs. Les vésicules qui ont une membrane biologique à propriétés fusiogéniques auront donc peut-être des applications dans ce domaine. En ce qui concerne la compartimentalisation dans les endosomes, des vecteurs thermosensibles ou sensibles au pH sont développés qui peuvent s'ouvrir en présence de chaleur ou dans un milieu acide. »

**Claude Boccara** (directeur scientifique de l'Ecole supérieure de physique et de chimie industrielles (ESPCI))

« Dans les expériences sur la microcirculation cérébrale, celle-ci ne risque-telle pas d'être bloquée par l'accumulation de nanoparticules ? »

### **Florence Gazeau**

« D'après nos mesures, non, la microcirculation n'est pas affectée. »

*Les nanoparticules se dégradent-elles et sont-elles éliminées ?*

### **Patrick Couvreur**

« On imagine mal que l'on puisse mettre sur le marché un médicament vectorisé contenu dans un système non biodégradable. Tout le problème est de savoir quelle doit être la vitesse de biodégradabilité. Or cela dépend du schéma thérapeutique. Concernant les nanoparticules d'oxyde de fer, non biodégradables, les études de toxicologie montre que ces particules sont métabolisables sur le long terme, au bout

de plusieurs mois. Pour des applications thérapeutiques, elles paraissent difficilement utilisables sans un dossier toxicologique extrêmement solide, mais en imagerie, avec une application annuelle – par exemple l'Endorem de la société Guerbet est utilisé pour le diagnostic précoce de métastases hépatiques – l'oxyde de fer est éliminé et le fer rejoint le pool de fer de l'organisme sans causer de toxicité.

En cancérologie, on peut avoir l'impression que le monde biotechnologique et le monde réglementaire ont du mal à s'adapter aux enjeux. Alors que l'on assiste à une véritable explosion des thérapeutiques ciblées, pourquoi les approches de nanovectorisation n'émergent-elles pas plus rapidement en préclinique ? »

### **Patrick Couvreur**

« L'industrie pharmaceutique n'était pas préparée à développer ce type d'outils, c'est-à-dire à faire de l'innovation galénique. Culturellement, elle était surtout préparée à l'innovation en chimie. D'où le fait que la plupart des médicaments ciblés actuellement sur le marché sont issus de start-ups. Cependant, le drug delivery et les nanomédicaments sont en train de monter en puissance et les grandes entreprises s'y intéressent désormais. »

*Dans les systèmes de marquage magnétique, les marqueurs se transmettent-ils au fil des générations ?*

### **Florence Gazeau**

« Les nanoparticules magnétiques se répartissent entre les cellules filles, et le marquage se dilue donc. Néanmoins l'IRM étant très sensible, on détecte sans problème des cellules qui se sont divisées plusieurs fois. »

*Pourquoi fabriquer des petites particules magnétiques contenues dans des liposomes ? En produisant des particules plus grosses, on n'aurait plus besoin de liposomes...*

### **Florence Gazeau**

« On ne sait pas faire des grosses particules (150 nm) qui soient des monodomains magnétiques, sans perdre en magnétisme. D'où la stratégie consistant à enfermer les nanoparticules magnétiques dans des liposomes pour la vectorisation magnétique. »

## → Les boîtes catanioniques

**David Carrière,**

*Chercheur CEA, Laboratoire Interdisciplinaire sur l'Organisation Nanométrique et Supramoléculaire (LIONS), Service de Chimie moléculaire, Centre d'études de Saclay, Gif-sur-Yvette  
david.carriere@cea.fr*

Le domaine des boîtes catanioniques a été amorcé au sein du LIONS par Monique Dubois et Thomas Zemb dans les années 1990. Les catanioniques sont issus du mélange de tensioactifs cationiques et de tensioactifs anioniques en milieu aqueux. Les molécules interagissent alors très fortement et constituent spontanément des agrégats.

Une première propriété a trait à la courbure adoptée par ces agrégats. Un tensioactif seul forme des micelles sphériques dans l'eau. L'assemblage de tensioactifs de charges opposées produit quant à lui des membranes à courbure plus faible.

### **Des vésicules de formes et de tailles variées**

Un des ces types d'agrégats correspond à des vésicules. Leurs tailles et leurs formes peuvent être très variées en fonction des tensioactifs utilisés (longueur des chaînes, nombre de charges, etc.) : de 30 nm à plusieurs dizaines de microns de diamètre, elles peuvent être sphériques ou facettées.

Ces vésicules catanioniques pourraient-elles servir à la vectorisation ? Gros avantage, elles sont thermodynamiquement stables indéfiniment, contrairement aux liposomes qui ont besoin d'un apport d'énergie pour se former et qui se déstabilisent par la suite. Certains équipes ont réalisé des encapsulations et ont confirmé la stabilité de ces systèmes dans le temps.

Pourtant les tensioactifs peuvent être très solubles dans l'eau. On peut donc être surpris de la solidité des vésicules. Mais il existe un effet coopératif entre les tensioactifs qui empêche la destruction de la membrane formée. De plus, le LIONS a montré que l'on peut stabiliser ces systèmes dans différents milieux physiologiques.

### **Biocompatibilité ? Du pain sur la planche**

Le gros problème à résoudre est la biocompatibilité de ces systèmes. En effet, certains tensioactifs, comme les ammoniums quaternaires, sont très toxiques. L'équipe d'Isabelle Rico-Lattès, chimiste au Laboratoire « Interactions moléculaires et réactivité chimique et photochimique » de l'Université Paul Sabatier, à Toulouse, a réussi à synthétiser un tensioactif catanionique possédant une tête sucrée afin d'obtenir une meilleure biocompatibilité. Des tests in vitro contre le VIH on montré que le composé avait une toxicité acceptable.

Toutefois, si les boîtes catanioniques, issues du monde de la physique, ont fait leurs preuves dans des domaines fondamentaux ou appliqués de la physico-chimie, de gros progrès restent à faire pour en faire des vecteurs thérapeutiques potentiels, d'où l'intérêt des interactions des physiciens avec des biologistes et des pharmaciens.

*Pour en savoir plus* \_\_\_\_\_

<http://www-drecam.cea.fr/scm/lions/>

Le sponsor de cette édition



## → La lumière du diamant au cœur des cellules

**Francois Treussart,**

*Laboratoire de Photonique quantique et moléculaire, UMR CNRS 8537, Ecole Normale Supérieure de Cachan, Cachan  
treussar@physique.ens-cachan.fr*

es nanomarqueurs d'un nouveau type, des nanocristaux de diamant, produisent une photoluminescence parfaitement stable dans le temps. Ces nanodiamants sont au cœur du projet européen « Nano4Drugs » (<http://www.nano4drugs.com/>). Nano4Drugs est un programme ambitieux dont le coordinateur est Patrick Curmi, biologiste et directeur du laboratoire « Structure et reconnaissance des biomolécules », Université Evry-Val d'Essonne). Objectif du projet : développer et transporter des protéines médicaments pour cibler les microtubules de la cellule, dont les anomalies sont à l'origine de plusieurs pathologies, dont des cancers.

### **Mélange explosif**

Le laboratoire de Photonique quantique et moléculaire de Cachan utilise depuis des années des nanoparticules de diamant en cryptographie quantique, pour développer des systèmes de distribution quantique de clés de cryptage. Ces particules peuvent être issues de détonations : lors de l'explosion d'un mélange TNT hexogène, la partie carbone du mélange se transforme en nanodiamants sous l'action d'un pic de température et de pression. Les suies de détonation comportent une forte proportion de nanodiamants de 5 nm tout au plus. Une chimiste du projet est experte dans leur récupération et leur mise en suspension. Des nanoparticules de nanodiamant plus grosses peuvent être obtenues par synthèse industrielle (industrie du polissage) puis broyage.

Les particules obtenues par l'un ou l'autre procédé sont inertes chimiquement, ne se dégradent pas au cours du temps, un peu comme les nanotubes de carbone. Mais leur fonctionnalisation reste difficile. On a seulement testé des fonctions chimiques simples (COOH, ammonium, biotine) sur lesquelles on peut accrocher des molécules plus grosses de type protéines.

### **Une photoluminescence ultrastable**

Le diamant a la particularité d'émettre une luminescence lorsqu'il reçoit une excitation lumineuse. Cette photoluminescence est due à la présence, à côté des atomes d'azote, de lacunes dont on peut augmenter le nombre par irradiation et cuisson à haute température. La photoluminescence est d'une stabilité totale dans le temps.

Du point de vue de l'utilisation in vivo, on a pu montrer qu'un grand nombre de nanodiamants peuvent pénétrer dans les cellules. Aucune mortalité cellulaire n'a été observée ; reste à le vérifier sur le long terme. Il est probable que la toxicité potentielle soit liée à la dose de nanodiamants utilisée. Par ailleurs, l'optimisation de la photoluminescence in vivo reste à effectuer.

Quant à la vectorisation de molécules biologiques par nanodiamants, elle est encore embryonnaire : on a pu vérifier que le couplage de nanodiamants et de molécules d'ADN est possible mais les tests sur cellules restent préliminaires.

Actuellement, la principale application des nanodiamants est donc le marquage de biomolécules. Le projet Nano4Drugs repose sur des résultats solides obtenus à différents niveaux, notamment en physique. La difficulté du projet est de rassembler ces résultats afin d'optimiser toutes les étapes de développement : la

photoluminescence, mais aussi la dispersion et la fonctionnalisation des nanodiamants.

Pour en savoir plus \_\_\_\_\_

<http://www.lpqm.ens-cachan.fr/>

Applications en optique quantique

V. Jacques et al. (2007) Experimental realization of wheeler's delayed-choice gedanken experiment, Science 315: 966–068.

Applications en biologie

S.-J. Yu et al. (2006) J. Am. Chem. Soc. 127: 17604–17605.

C.-C. Fu et al. (2007) Characterization and applications of single fluorescent nanodiamonds as cellular biomarkers, Proc. Nat. Acad. Sci. 104: 727.

### Questions de l'assistance

*Quelles sont les perspectives et les applications en biologie des quantum dots (boîtes quantiques) ?*

#### **Claude Boccara**

« La principale application des quantum dots, qui sont des nanocristaux semi-conducteurs, est le marquage de molécules biologiques. Par rapport aux molécules fluorescentes organiques ou biologiques, ces nanocristaux sont beaucoup plus brillants et stables. Actuellement sont développés des quantum dots moins toxiques que les premières générations. Ils peuvent être inclus dans des enveloppes de phospholipides ou de polymères biodégradables qui seront éliminées au bout d'un certain temps. »

*Pourrait-on transformer les molécules de tensioactifs après la formation des boîtes cationiques ?*

#### **David Carrière**

« Le sujet a été abordé à l'occasion d'une thèse au CEA. C'est effectivement une piste de travail intéressante pour améliorer les propriétés des cationiques. »

---

## Le 2<sup>e</sup> semestre des Transversales Santé

- **Biologie intégrative** - 18 septembre 2007
- **Bioterrorisme** - 16 octobre 2007
- **Médicaments pédiatriques** - 13 novembre 2007
- **Allongement de la vie** - 11 décembre 2007



*Toute l'équipe des Transversales Santé vous donne rendez-vous le 18 septembre prochain !*

Le sponsor de cette édition

