



HAL
open science

Développement de nanoparticules polymères pour le ciblage des macrophages et la modulation des leurs fonctions physiologiques

Eyad Almouazen

► **To cite this version:**

Eyad Almouazen. Développement de nanoparticules polymères pour le ciblage des macrophages et la modulation des leurs fonctions physiologiques. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10121 . tel-00945306

HAL Id: tel-00945306

<https://theses.hal.science/tel-00945306>

Submitted on 12 Feb 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISSPLINAIRE SCIENCE SANTE (ED 205)

DIPLOME DE DOCTORAT

SPÉCIALITÉ: PHARMACOTECHNIE

(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 18 JUILLET 2013

Par

M. Eyad AL MOUAZEN

TITRE :

DEVELOPPEMENT DE NANOPARTICULES POLYMERES
POUR LE CIBLAGE DES MACROPHAGES ET LA
MODULATION DE LEURS FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES

Directeur de thèse : Pr. Stéphanie BRIANÇON

Co-directeur de thèse : Dr. Sandrine BOURGEOIS

JURY :

Monsieur Eric ALLEMANN

Madame Valérie HOFFART

Madame Sandrine BOURGEOIS

Monsieur Alf LAMPRECHT (Rapporteur)

Madame Stéphanie BRIANÇON

Madame Christine VAUTHIER (Rapporteur)

Monsieur Hatem FESSI (Président du jury)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Département GEP

Directeur : M. N. SIAUVE

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : Mme S. FLECK

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. COLLIGNON

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Administrateur provisoire : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP-UMR CNRS 5007) dans le département de Génie Pharmaceutique à la Faculté de Pharmacie de l'Université Claude Bernard Lyon 1

J'adresse mes remerciements les plus sincères,

A Monsieur Hatem Fessi, Professeur à l'Université Claude Bernard Lyon 1, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour ses conseils et sa gentillesse durant les années de ma thèse et de me faire l'honneur d'être membre du jury de ma thèse.

A Madame Stéphanie Briançon, Professeur à l'Université Claude Bernard Lyon 1, mon directeur de thèse, pour son encadrement, ses conseils, son apport scientifique et son soutien permanents durant mon Master de recherche, mon Stage, et ma thèse. Un merci pour la confiance qu'elle a toujours sue m'accorder et pour l'encouragement qu'elle m'a donné durant ces années.

A Madame Sandrine Bourgeois, Maître de Conférences à l'Université Claude Bernard Lyon 1, mon co-encadrant de thèse, de m'avoir guidé, soutenu, encouragé et conseillé tout au long de la réalisation de ce travail ainsi que pour le temps qu'elle a consacré aux corrections de ce manuscrit. Un merci pour sa grande disponibilité, sa gentillesse ainsi que pour toutes les discussions, les conseils et les remarques scientifiques et personnelles qui m'ont tellement aidé à améliorer la qualité de mon travail en recherche et en enseignement.

A Madame Christine Vauthier, Directeur de Recherche au CNRS UMR 8612, et Monsieur Alf Lamprecht, Professeur à l'Université de Franche Comté, de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse et d'avoir pris le temps de l'examiner.

A Monsieur Eric Allémann, Professeur à l'Université de Genève, de m'avoir fait l'honneur d'être membre du jury de ma thèse et d'avoir pris le temps de l'examiner.

A Madame Valérie Hoffart, Maître de Conférences à l'Université d'Auvergne, de m'avoir fait l'honneur d'être membre du jury de ma thèse. Un merci pour le soutien et les encouragements qu'elle m'a donnés ainsi que pour toutes les discussions que nous avons pu échanger.

A Monsieur Yves Chevalier, Directeur de Recherche au CNRS UMR 5007, et Madame Marie-Alexandrine Bolzinger, Maître de Conférences à l'Université Claude Bernard Lyon 1, pour leur soutien, leurs conseils et tous leurs encouragements.

Au Ministère de l'Enseignement et de la Recherche d'avoir financé cette thèse.

Je tiens à remercier également les laboratoires de l'Université Claude Bernard qui ont contribué au travail de ma thèse et j'adresse mes remerciements,

A Monsieur le Professeur Jérôme HONNORAT, de m'avoir accueilli dans son laboratoire «Neuro-Oncologie et Neuro-Inflammation, CRNL Inserm U1028 - CNRS UMR 5292».

A Monsieur le professeur Serge Nataf, pour sa contribution, ses divers conseils et son aide. Je remercie également Monsieur Ali Boussaid pour son aide, son investissement, sa disponibilité ainsi que pour son amitié. Un merci pour tous le personnel de l'équipe et notamment Madame Céline Malleval pour son aide lors des expérimentations animales.

A Monsieur le Professeur Charles Dumontet, de m'avoir accueilli dans son laboratoire «Anticorps-Anticancer, CRCL UMR Inserm 1052 CNRS 5286 ».

A Monsieur le Dr. Lars Petter Jordheim, pour sa contribution, son aide et tous ses précieux conseils.

Je tiens à remercier spécialement,

Jocelyne Pelletier, notre ingénieur de recherche et notre amie, pour sa gentillesse, son aide, ses conseils et pour tout son soutien durant ces années. Tu étais toujours disponible pour m'aider, m'écouter et me motiver. Merci également pour ton amitié...

Geneviève Conod-Nardi, pour sa gentillesse, son aide et sa disponibilité.

Matthias, mon tout premier collègue au site Rockefeller, pour tout son soutien, les discussions et les moments que nous avons partagés au cours ma première année.

Raphaël, mon collègue de bureau, l'ami qui m'a motivé et encouragé tout au long de ma rédaction. Je te souhaite le meilleur pour ta thèse et pour l'avenir.

Tharwa, de m'avoir motivé, aidé et pour les sympathiques discussions que nous avons échangées dans la salle conviviale. Merci pour ton amitié...

Zouaoui et Faiza pour votre amitié, je vous souhaite le meilleur pour l'avenir.

Emmanuelle, ma première collègue de bureau, en souvenir de nos discussions et les surveillances du samedis matin à l'IUT. Je te souhaite le meilleur pour ta dernière année de thèse et pour l'avenir.

Guillaume, mon unique stagiaire, je te souhaite le meilleur pour ton avenir en cosmétologie.

Uruguaysito, pour ta présence et pour toutes les discussions scientifiques que nous avons échangées, j'ai tellement appris de toi et de tes expériences.

Cécile, Pauline, Sébastien et François, pour votre amitié et votre aide, nous avons commencé la thèse ensemble et nous avons partagé de bons moments durant ces années.

Charlotte, Angèle, Chiraz, Wafa, Julia, Delphine et Audrey pour votre amitié, votre soutien et les nombreuses discussions que nous avons échangées.

Je tiens à remercier également Amine Achachi, mon ami et mon co-encadrant de stage, pour son aide et son soutien. Tu m'as fait découvrir le monde de l'immunologie et tu m'as appris de nombreuses techniques. Merci pour tout.

Merci à tous les doctorants, les stagiaires et les post-docs que j'ai pu rencontrer au cours de cette thèse : Ines, Nader, Abdallah, Ahmed, Naveed, Géraldine, Audrey, Marie-Hélène, Sara, Youlia, Saruth.

Tous les membres du LAGEP, particulièrement Madame Nadia Chapel et Monsieur Jean-Pierre Valour pour leur aide et leur gentillesse.

Toute l'équipe d'enseignement à la Faculté de Pharmacie de Lyon, pour leurs conseils et leur aide durant ces années et en particulier Plamen, Wael et Pierre.

Enfin ma famille et mes proches....

Un énorme merci à la femme qui m'a soutenu sans faille, qui a supporté mes absences et mes mauvaises humeurs durant ces années. Merci pour tes encouragements, ta patience et tes sacrifices. Manal ma chérie, ma moitié, énorme merci pour l'amour que tu m'apportes, pour ton écoute et ton réconfort. En souvenir de tout ton soutien, de tes attentes chaque soir, de tes sentiments à mon égard et tous les bons et difficiles moments que nous avons vécus ensemble, je te remercie mon amour, cette thèse est pour toi...

Un grand merci à mes parents pour leur aide et leurs encouragements qui m'ont permis de poursuivre mes études et de réussir dans ma vie. J'espère que cette thèse traduit toute la reconnaissance que j'ai pour vous. Maman, Dr. Sallama, merci pour tes sentiments et tes sacrifices. Tu as consacré ta vie pour nous et pour que nous soyons les meilleurs. Papa, Professeur Fouad, merci de m'avoir guidé et dirigé vers le monde de recherche ainsi pour tous tes précieux conseils.

Merci à mon Frère Louay, mes sœurs Samar et Lamis, mes beaux frère Eze-Aldin et Ihab pour vos encouragements et pour tous les bons moments et les humeurs que nous partageons. Merci à mes petites nièces et mon neveu, je vous souhaite un avenir meilleur.

Merci à ma belle-famille pour votre gentillesse, votre bonne humeur et votre soutien. Je suis sincèrement heureux d'avoir été accueilli dans une famille aussi chaleureuse que la vôtre.

Merci à Fadi, tu es un vrai ami. Merci pour ton soutien et ton écoute. Je te souhaite le meilleur pour la fin de ta thèse.

Merci à mes amis Hadi, Khaldoun, Alaa, Zaher, Ghiath, Husam et Fadi, de m'avoir soutenu et encouragé au cours de ces années.

Enfin, Merci pour le sourire qui m'a encouragé, motivé, et qui m'a fait oublier toute la fatigue, mon fils Jad. Je t'aime tellement et j'ai hâte de lire ta thèse...

RESUME

Les macrophages représentent une population de cellules immunes très présente dans certaines tumeurs malignes au sein desquelles ils vont jouer un rôle marqué dans la progression tumorale. Les macrophages représentent donc une cible thérapeutique intéressante dans le traitement de ces tumeurs infiltrées. Ce ciblage des macrophages peut être envisagé grâce à des vecteurs comme les systèmes d'encapsulation nanoparticulaires connus pour être facilement phagocytés par les macrophages après une administration locale ou parentérale. L'objectif de ces travaux de thèse a donc été de développer des nanoparticules polymères (NP) capable de cibler les macrophages infiltrés dans la tumeur et de libérer *in situ* un principe actif encapsulé au sein de ces NP. Les NP pourraient ainsi modifier les fonctions des macrophages ou encore permettre l'utilisation des macrophages comme une réserve d'actif anticancéreux. Après une étude de formulation, des NP à base d'acide poly(D,L)lactique de taille de 200 nm ont été sélectionnées. Ces NP présentent une bonne internalisation par les macrophages *in vitro* et un ciblage spécifique des macrophages infiltrés dans une tumeur de gliome humain, implantée chez des souris nudes, suite à une injection intra-tumorale de NP. Le premier actif modèle encapsulé est l'acide tout-*trans* rétinolique (RA), molécule immuno-modulatrice pouvant modifier les fonctions macrophagiques. Les NP-RA peuvent encapsuler environ 90% d'actif et présentent un profil de libération prolongée du RA pendant 4 jours combiné à une amélioration de sa stabilité. De plus, ces NP-RA ont montré qu'elles pouvaient engendrer *in vitro*, une modification de l'expression de certains gènes des macrophages. Le deuxième type d'actif encapsulé lors de ces travaux est la vitamine D₃ et ses dérivés (25-OH-vitamine D₃ et 1,25-(OH)₂-vitamine D₃) possédant des propriétés anticancéreuses mais à l'origine de nombreux effets secondaires dus à un manque de spécificité d'action. L'objectif serait alors de mieux cibler les cellules tumorales grâce aux macrophages infiltrant ces tumeurs et d'éviter ainsi les hypercalcémies secondaires dues à l'administration de fortes doses de vitamine D₃. Une étude *in vitro* sur une lignée cellulaire de cancer de sein (MCF-7) a permis de montrer l'avantage des NP pour prolonger et intensifier l'action antiproliférative des dérivés de vitamine D₃.

MOTS-CLES

Nanoparticules polymères, Macrophages, Tumeur, Rétinoïdes, Vitamine D, Encapsulation, Ciblage

ABSTRACT

Title: Polymeric nanoparticle development for targeting and modulating macrophage functions

Macrophages are the major leukocyte population present in tumors, so-called tumor-associated macrophages (TAM), promoting tumor growth. These macrophages could be an interesting therapeutic target for nanoparticulate delivery systems known to be easily recognized and phagocytosed by macrophages after local or parenteral administration. The aim of this work was to develop polymeric nanoparticles (NP) for targeting TAM. NP could modulate macrophage functions or use them as storage of anticancer drugs. After a formulation study, the 200 nm NP of poly(D, L) lactic acid were selected. These NP showed a good internalization by macrophages *in vitro* and specific targeting of TAM in human glioma tumor implanted in nude mice after intratumoral injection of NP. All-*trans* retinoic acid (RA, immuno-modulator) was first encapsulated with an encapsulation efficiency of 90%. RA-NP have a sustained release profile for 4 days and enhance stability of the RA. Changes in gene expression of RA-NP treated macrophages were observed *in vitro*. Secondly, active-metabolites of vitamin D₃ (25-OH-vitamin D₃ and 1,25-(OH)₂-vitamin D₃) were encapsulated for their anticancer properties. The aim was to target the tumor cells via TAM avoiding the hypercalcemia produced by high doses of vitamin D₃. *In vitro* evaluations on breast cancer cell line (MCF-7) highlighted NP advantages to extend and enhance the antiproliferative

KEY-WORDS

Polymeric nanoparticles, Macrophages, Tumor, Retinoids, Vitamin D, Encapsulation, Targeting, Drug delivery

Sommaire

<i>Remerciements</i>	<i>ii</i>
<i>RESUME</i>	<i>v</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>vi</i>
<i>Sommaire</i>	<i>- 1 -</i>
<i>Liste des Figures</i>	<i>- 4 -</i>
<i>Liste des Tableaux</i>	<i>- 6 -</i>
<i>Abréviations</i>	<i>- 7 -</i>
<i>Introduction Générale</i>	<i>- 1 -</i>
<i>Partie Bibliographique</i>	<i>- 5 -</i>
Chapitre I. Vectorisation ciblant les Macrophages	- 7 -
I.1. Fonctions biologiques des macrophages	- 7 -
I.2. Interaction nanoparticules-macrophages	- 9 -
I.2.1. Phagocytose des nanoparticules	- 9 -
I.2.2. Propriétés des nanoparticules pouvant influencer leur phagocytose	- 11 -
I.2.3. Les récepteurs des macrophages impliqués dans la phagocytose	- 13 -
I.3. Applications thérapeutiques	- 15 -
I.3.1. Applications anti-tumorales	- 15 -
I.3.2. Applications aux maladies infectieuses	- 20 -
I.3.3. Les macrophages comme vecteurs	- 22 -
I.4. Conclusion.....	- 24 -
I.5. Références	- 26 -
Chapitre II. Vitamine A : nouvelles applications par vectorisation	- 35 -
II.1. Généralités	- 35 -
II.2. Fonctions biologiques et utilités thérapeutiques des rétinoïdes	- 37 -
II.2.1. Rétinoïdes et Cancer	- 37 -
II.2.2. Rétinoïdes comme immunomodulateurs	- 38 -
II.2.3. Applications topiques des rétinoïdes	- 40 -
II.3. Encapsulation des rétinoïdes	- 40 -
II.3.1. Liposomes	- 41 -
II.3.2. Niosomes	- 44 -
II.3.3. Nanoparticules lipidiques solides	- 45 -
II.3.4. Systèmes polymères	- 47 -

II.3.5. Autres types de vecteur.....	- 52 -
II.4. Conclusion	- 52 -
II.5. Références.....	- 53 -
Chapitre III. Vitamine D son rôle biologique et ses intérêts thérapeutiques.....	- 61 -
III.1. Généralités, structure chimique et métabolisme de la vitamine D	- 61 -
III.1.1. Structure et propriétés physico-chimiques de la vitamine D	- 61 -
III.1.2. Synthèse et métabolisme de la vitamine D.....	- 63 -
III.2. Fonctions biologiques de la vitamine D.....	- 65 -
III.2.1. Voie de signalisation de la vitamine D.....	- 67 -
III.3. Vitamine D : un actif anti-cancéreux	- 68 -
III.3.1. Cancer et vitamine D.....	- 68 -
III.3.2. Métabolisme de la vitamine D dans les cellules cancéreuses	- 69 -
III.3.3. Mécanisme de l'activité anticancéreuse de la vitamine D.....	- 70 -
III.3.4. Les effets du calcitriol sur les cellules cancéreuses.....	- 70 -
III.3.5. Etudes d'associations thérapeutiques	- 72 -
III.3.6. Essais cliniques de l'utilisation du calcitriol dans le traitement du cancer	- 73 -
III.3.7. Analogues anticancéreux du calcitriol	- 77 -
III.3.8. Calcidiol : un potentiel anti-cancéreux.....	- 79 -
III.3.9. Perspectives de l'utilité anticancéreuse du calcitriol	- 79 -
III.4. Encapsulation de la vitamine D	- 80 -
III.5. Références.....	- 83 -
Partie Expérimentale.....	- 91 -
Objectifs du travail de thèse.....	- 94 -
Chapitre IV. Développement de nanoparticules d'acide rétinoïque pour le ciblage de macrophages	- 97 -
IV.1. Introduction	- 97 -
IV.2. Formulation des NP polymères	- 98 -
IV.2.1. Préparation des nanoparticules et formulations étudiées.....	- 98 -
IV.2.2. Influence du polymère sur les caractéristiques des nanoparticules	- 99 -
IV.2.3. Effet du tensioactif sur les propriétés des nanoparticules	- 100 -
IV.2.4. Sélection du ratio polymère:huile pour la formulation des nanocapsules	- 101 -
IV.2.5. Formule retenue	- 101 -
IV.3. Développement de la méthode de dosage de l'acide rétinoïque	- 102 -
IV.3.1. Méthode de dosage sélective.....	- 102 -
IV.3.2. Méthode de dosage sensible.....	- 104 -
IV.4. Stabilité de l'atRA encapsulé : étude d'isomérisation de l'atRA.....	- 105 -
IV.5. Cinétiques de libération <i>in vitro</i> de l'acide rétinoïque (RA) : étude du choix du milieu de dissolution	- 108 -
IV.6. Développement de nanoparticules d'acide rétinoïque et étude de leur internalisation par les macrophages	- 109 -

IV.7. Publication	- 113 -
IV.7.1. Abstract	- 114 -
IV.7.2. Introduction.....	- 115 -
IV.7.3. Materials and methods	- 117 -
IV.7.4. Results.....	- 122 -
IV.7.5. Discussion	- 129 -
IV.7.6. Conclusion	- 132 -
IV.8. Références	- 133 -
Chapitre V. Vectorisation des métabolites actifs de la vitamine D₃.....	- 137 -
V.1. Introduction.....	- 137 -
V.2. Nano-encapsulation des métabolites actifs de la vitamine D en vue d'une application en chimiothérapie	- 138 -
V.3. Etude <i>in vitro</i> de l'activité anticancéreuse des nanoparticules de vitamine D ₃ sur un modèle de gliome	- 142 -
V.4. Publication	- 145 -
V.4.1. Abstract	- 146 -
V.5. Références.....	- 147 -
<i>Discussion Générale</i>.....	- 170 -
Développement des nanoparticules d'acide rétinoïque	- 173 -
Etude de l'internalisation des nanoparticules par les macrophages	- 176 -
Vectorisation des métabolites actifs de la vitamine D ₃	- 179 -
Références.....	- 185 -
<i>Conclusion et Perspectives</i>.....	- 189 -

Liste des Figures

Figure 1 : Génération des macrophages à partir des cellules souches hématopoïétiques depuis la moelle osseuse jusqu'aux tissus ; présentation des différents types de macrophages selon les tissus (2).	- 8 -
Figure 2 : Activation des macrophages conduisant aux différents phénotypes en réponse aux cytokines sécrétées par les cellules immunitaires ou autres stimulations (2).....	- 9 -
Figure 3 : Internalisation des NP par opsonisation et phagocytose (6).	- 10 -
Figure 4 : Images de l'interaction des macrophages avec des particules prises en microscopie électronique à balayage (A-C) et en microscopie à fond clair couplée en fluorescence après la fixation de l'actine polymérisée en rhodamine rouge (D-F). Le macrophage réussit à internaliser l'ellipsoïde par le coté pointu (A et D) ainsi que la particule sphérique (C et F). Le contact du macrophage avec l'ellipsoïde par la région plate ne conduit pas à l'internalisation (B et E). Les barres d'échelles sont 10 µm pour A,D,E et F et 5µm pour B et C (26).....	- 13 -
Figure 5 : Fonctions des macrophages infiltrés dans la tumeur (TAM) ; chaque fonction est attribuée à une sous-population de TAM localisée à des endroits spécifiques de la tumeur (39).....	- 16 -
Figure 6 : Etude quantitative de l'internalisation des NP de cyclodextrines sur un modèle de gliome en comparant deux voies d'administration, intraveineuse (IV) et intratumorale (IT). (A, B) : pourcentage de chaque type cellulaire par rapport au total des cellules rhodamine-positives (contenant des NP). (C, D) : proportions de cellules rhodamine-positives par rapport au total des cellules analysées divisées par type (47).	- 18 -
Figure 7 : Distribution d'indinavir dans les tissus (rate, ganglions, foie, poumons, reins), le sérum et l'urine chez des souris recevant une seule dose IV d'une solution d'indinavir (B), de NP d'indinavir (C) ou de macrophages chargés de nanocristaux d'indinavir (D et E) (73).	- 23 -
Figure 8 : Concept d'utilisation des macrophages comme transporteur de NP (or-silice) pour le ciblage de tumeurs cérébrales par l'application d'un traitement photothermique (75). ..	- 24 -
Figure 9 : Métabolisme et mécanisme d'action de l'acide rétinoïque (2).....	- 35 -
Figure 10 : Formule chimique des rétinoïdes naturelles.....	- 36 -
Figure 11 : Action des rétinoïdes sur différents stades de tumorigénèse (6). a : blocage l'étape d'initiation (cancérogénèse chimique), b : induction d'une différenciation, c : blocage du cycle cellulaire en G1, d : action apoptotique sur cellules matures (cellules myéloïdes), e : action apoptotique sur cellules prématurées, f : effet synergique avec une chimiothérapie.	- 37 -
Figure 12: Structures chimiques des différentes formes de vitamine D (Pharmacopée Européen 7.7).....	- 62 -
Figure 13 : Réaction photochimique de synthèse de la vitamine D3 dans la peau(5).....	- 64 -
Figure 14 : Représentation schématique du métabolisme de la vitamine D3 et les enzymes impliquées (6)	- 65 -
Figure 15 : Les voies de signalisation de calcitriol : une action génomique par VDR qui affecte principalement l'expression des gènes soit en activant la transcription (a et b) ou en	

la désactivant (c). L'action non génomique (d) passe via memVDR ou d'autres récepteurs membranaires et module le passage de Ca ²⁺ (21).	- 68 -
Figure 16 : Effets du calcitriol sur la prolifération cellulaire de lignée MCF-7. (A) 72 h après le traitement avec des concentrations croissantes de calcitriol, la prolifération est évaluée par l'incorporation de [3H]Thymidine. (B) Dénombrement sur 72 h des cellules MCF-7 traitées avec 500 nM de calcitriol (64).....	- 71 -
Figure 17 : Nouvelle formulation de calcitriol (DN-101) possédant une pharmacocinétique améliorée et adaptée au traitement du cancer. Suivi des concentrations plasmatiques en calcitriol après administration hebdomadaire de DN-101 versus administration quotidienne d'une formulation classique (96).	- 76 -
Figure 18 : Chromatogramme montrant la séparation des trois isomères de l'acide rétinoïque. ..	- 103 -
Figure 19 : Chromatogramme de l'acide rétinoïque à une concentration de 0,01 µg/mL (rouge), 0,025 µg/mL (vert) et 0,05 µg/mL (bleu).....	- 105 -
Figure 20 : Stabilité de l'atRA dans les NP dans différentes conditions de stockage. Les résultats sont présentés en concentration de trois isomères (µg/mL).	- 106 -
Figure 21 : Stabilité du RA libre ou encapsulé dans les deux milieux de libération.	- 108 -
Figure 22 : Polymeric nanoparticles (A: Scanning electron microscopy image) were prepared to target and modulate the function of macrophages by local administration. The uptake of fluorescent labeled nanoparticles was studied on bone marrow derived macrophages <i>in vitro</i> (B).....	- 114 -
Figure 23 : (A) <i>In vitro</i> E2 (PCL-NC) and E4 (PLA-NC) release profile assessed by dialysis method. Free-RA solution was used as control. (B) Results of stability study of encapsulated RA in the cell culture conditions for 7 days. Free RA was used as control. E2 or E4 were dispersed into 10ml of IMDM and incubated at 37°C	- 123 -
Figure 24 : Scanning electron microscopy (SEM) images. SEM showed the morphology of blank-NC (A) and blank-NC-PBS (B).....	- 124 -
Figure 25 : <i>In vitro</i> uptake study of NR-NC by BMM. (A and B) Confocal microscopy images of blank-NC (A) or NR-NC (B) treated BMM (bar = 50 µm). (C) fluorescent microscopy images in red channel of NR-NC treated BMM at 24h, 72h and 7 days (bar = 50 µm).....	- 125 -
Figure 26 : <i>In vitro</i> uptake of NR labeled NC performed by flow cytometry. Non-treated BMM was used as control. Histograms show the mean of fluorescence intensity in FL2 channel (A and B), and the mean of side scattering channel intensity (C and D).....	- 126 -
Figure 27 : <i>In vivo</i> NR-NC uptake by tumor infiltrated macrophages after 48 hours of NC intratumorally injection. Nanoparticles were labeled by Nile Red (red), macrophages were immunolabeled by Anti-Iba1 monoclonal antibody (green) and DAPI (blue) was used for staining the nucleus. NR-NC were localized within the macrophages at the edge of tumor (A), inside the tumor (B) and around the vessel (C) (bar = 50 µm) -	- 127 -
Figure 28 : <i>In vitro</i> gene expression changes of RA-NC treated macrophages evaluated by RT ² Profiler™ PCR Array in duplicate. The Bmp-2 gene expression was three times higher in RA-NC treated BMM than blank-NC treated BMM calculated by Ct method	- 128 -
Figure 29 : Analyse Western Blot des lysés des tumeurs de gliome humain.....	- 143 -
Figure 30 : Evaluation <i>in vitro</i> des activités antiprolifératives du calcidiol/calcitriol sur la lignée SF767 de gliome humain.	- 144 -

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques des différentes formes de vitamine D3.....	- 63 -
Tableau 2 : Effet du type de PCL et de sa concentration sur la taille et la polydispersité (PdI) des NP.....	- 99 -
Tableau 3 : Influence de la nature du polymère, PLA ou PCL, sur la taille des particules NS ou NC	- 100 -
Tableau 4 : Effet du tensioactif sur la taille et la polydispersité (PdI) des NP.....	- 100 -
Tableau 5 : Propriétés des courbes d'étalonnage des trois isomères.....	- 103 -
Tableau 6 : Stabilité d'atRA dans les NP dans différentes conditions de stockage. A chaque temps et pour chaque condition le pourcentage total est le contenu de l'ensemble de l'acide rétinoïque par rapport au temps t0. Le pourcentage de chaque isomère est calculé à chaque fois par rapport au total au même temps. (Tamb = température ambiante, L = lumière, SL = sans lumière).	- 107 -
Table 7 : Physicochemical characteristics of RA-loaded nanoparticles.....	- 122 -
Table 8 : Physicochemical characteristics of nanoparticles for <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> uptake studies.....	- 123 -

Abréviations

BMM : Bone marrow-derived macrophages, Macrophages générés de moelle osseuse

BMP-2 : Bone morphogenetic protein 2, Protéines morphogénétiques osseuses 2

EE : Encapsulation efficiency, Efficacité d'encapsulation

MFI : Mean fluorescence intensity, Moyenne de l'intensité de fluorescence

Mw : Molecular weight, Poids moléculaire

NC : Nanocapsules

NP : Nanoparticules

NR : Rouge Nile

NS : Nanosphères

PACA : Poly(alkylcyanoacrylate)

PBS : Phosphate buffered saline, Tampon phosphate salin

PCL : Poly(ϵ -caprolactone)

PLA : Acide poly(D,L) lactique

PLGA : Acid poly(lactique-co-glycolique)

RA : Retinoic acid, Acide rétinoïque

atRA : Acide tout-*trans* rétinoïque

13-*cis* RA : Acide 13-*cis* rétinoïque

9-*cis* RA : Acide 9-*cis* rétinoïque

SSC : Side scattering channel, diffusion de la lumière incidente

TAM : Tumor associated macrophages, Macrophages infiltrant la tumeur

Introduction Générale

Introduction Générale

Les macrophages sont des cellules immunitaires connus pour jouer un rôle important dans les maladies infectieuses, auto-immunes ainsi que dans certains cancers. Il a d'ailleurs été démontré que les macrophages étaient la population immunitaire la plus présente dans les tumeurs malignes. Ces macrophages infiltrés dans les tumeurs (TAM « Tumor Associated Macrophages ») interviennent de façon importante sur la progression, l'angiogenèse et l'invasion des plusieurs types de tumeurs. De plus, leur présence dans ces tumeurs est souvent signe d'un mauvais pronostic (1). Du fait de leur implication pathologique et de leur large présence, les macrophages font l'objet de beaucoup d'attention pour l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les stratégies de vectorisation ciblant les macrophages ont fait l'objet de nombreuses études ces dernières années se basant sur leur capacité phagocytaire qui permet l'internalisation de vecteurs. Ces travaux visent à améliorer l'administration, cibler l'action et prolonger l'activité de principes actifs soit directement sur les macrophages en modifiant leurs fonctions, soit par l'intermédiaire des macrophages utilisés en profitant de leur infiltration. Plusieurs études ont notamment mis en valeur l'avantage de ces systèmes vectorisés dans le ciblage des macrophages *in vitro* et *in vivo* sur des modèles animaux. Cependant, la transposition de ces résultats positifs pour des applications cliniques concrètes n'a pas abouti et nécessite des investigations plus approfondies afin de déterminer les paramètres clé de ces stratégies et de les maîtriser (2). Par ailleurs, le ciblage des macrophages infiltrés dans les tumeurs (hors ceux du système foie/rate) est peu décrit dans la littérature et plus particulièrement le ciblage impliquant des nanoparticules polymères. Cette approche pourrait être exploitée en vue d'améliorer la performance des immunothérapies ou des chimiothérapies ou pour initier de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les systèmes de vectorisation nanoparticulaires de 1^{ère} génération sont décrits comme étant facilement reconnus et phagocytés par les macrophages après une administration locale ou parentérale. Ces nanoparticules, notamment les polymères, permettent la vectorisation d'une grande variété de principes actifs en améliorant leur stabilité, leur efficacité ainsi que leur spécificité, en prolongeant le profil de libération et en assurant un maintien de l'activité. De plus, ces nanoparticules polymères présentent plusieurs avantages pharmacotechniques

comme la stabilité des suspensions ou leur faisabilité à grande échelle selon les procédés de fabrication (3).

L'objectif des travaux de recherche décrits dans ce manuscrit a donc été d'établir une nouvelle stratégie thérapeutique en développant un système de vectorisation facilement internalisé par les macrophages en vue de délivrer au sein de ces derniers une molécule d'intérêt thérapeutique. Ce système présente une alternative intéressante au traitement des pathologies où les macrophages jouent un rôle marqué comme certains cancers ou certaines maladies auto-immunes. Dans cette perspective, nous avons développé des nanoparticules polymères capables de cibler les macrophages infiltrés dans la tumeur après une administration intratumorale. Les nanoparticules pourraient modifier les fonctions des macrophages ou encore utiliser les macrophages comme réservoir de principe actif (ex. anticancéreux). Nous avons choisi au cours de ce travail de thèse deux principes actifs ayant des activités immunomodulatrice et anticancéreuse en vue de bien spécifier et prolonger leur action sur l'environnement tumoral.

Le premier principe actif retenu est l'acide tout-*trans* rétinoïque (atRA, forme active de la vitamine A) utilisé dans la prise en charge de leucémies aiguës promyélocyaires sous forme orale ou dans le traitement des troubles cutanées en application topique. Toutefois ses utilisations thérapeutiques sont confrontées à quelques limites comme une très faible hydrosolubilité, une forte instabilité de l'atRA et surtout la survenue d'effets secondaires (4). Les travaux de vectorisation de l'atRA sont majoritairement focalisés sur l'élaboration de formes injectables plus efficaces dans le traitement de cancers ou sur l'amélioration de sa biodisponibilité cutanée (5). L'atRA est aussi capable de moduler les fonctions des cellules immunitaires (6) mais la vectorisation de l'atRA comme agent immunomodulateur est peu décrite.

Le deuxième type de principe actif retenu pour l'encapsulation est la vitamine D₃ et ses dérivés. Ils sont généralement utilisés dans le traitement de pathologies liées à un défaut d'absorption et d'assimilation du calcium mais aussi dans la prise en charge du psoriasis. De plus, les dérivés de vitamine D possèdent des activités anticancéreuses largement décrites dans la littérature mais les résultats des essais cliniques restent modestes. La survenue d'hypercalcémies secondaires lors d'une administration systémique limite la dose utilisée et donc restreint considérablement son efficacité (7). La vectorisation ciblée de ces dérivés

pourrait donc apporter une amélioration majeure de leur efficacité en supprimant les effets secondaires systémiques. Néanmoins cette approche est très peu étudiée.

Par conséquent, l'objectif de ce travail était de formuler des nanoparticules polymères capables de prolonger la libération et d'améliorer la stabilité du principe actif encapsulé. Ces NP, ciblant les TAM après une administration intratumorale, permettent de maintenir l'activité modulatrice de l'acide tout-*trans* rétinolique ou de prolonger l'action anticancéreuse des dérivés de la vitamine D₃.

Le présent manuscrit est constitué de deux grandes parties : une première consacrée aux travaux antérieurs réalisés dans le domaine et une seconde partie présentant les travaux expérimentaux réalisés au cours de cette thèse.

La première partie présente une étude bibliographique des travaux antérieurs portant sur trois aspects :

- Dans le chapitre I, les fonctions biologiques des macrophages seront abordées ainsi que les interactions existantes entre les macrophages et les nanovecteurs notamment les nanoparticules polymères. Les stratégies de vectorisation développées en ciblant les macrophages seront décrites en précisant les applications anti-cancéreuses.
- Dans le chapitre II, la vitamine A (rétinoïdes), ses propriétés, son rôle biologique et ses intérêts thérapeutiques seront présentés. Seront notamment détaillées les études d'encapsulation des rétinoïdes et leurs avantages thérapeutiques.
- Dans le chapitre III, les propriétés de la vitamine D₃ et de ses dérivés et leurs rôles biologiques seront décrits. Les travaux de recherche et les essais cliniques conduits sur l'activité anticancéreuse de la vitamine D seront présentés en soulignant les intérêts de la vectorisation.

La deuxième partie de ce manuscrit aura pour objet de présenter les travaux expérimentaux réalisés au cours de la thèse. Ils sont divisés en deux chapitres présentés sous forme d'articles scientifiques avec les résultats complémentaires non publiés :

- Dans le chapitre IV seront présentés les travaux de formulation et de caractérisation des nanoparticules encapsulant l'atRA. Ces nanoparticules polymères d'atRA ont aussi été étudiées pour leur internalisation par les macrophages *in vitro* et par les

macrophages infiltrés dans une xénogreffe de gliome humain. La capacité de ces nanoparticules d'atRA de moduler les fonctions physiologiques des macrophages sera aussi présentée. Une partie des résultats présentés dans ce chapitre a fait l'objet d'un article scientifique intitulé « *Development of a nanoparticle-based system for the delivery of retinoic acid into macrophages* » publié dans *International Journal of Pharmaceutics* (2012;430(1-2):207-215).

- Le chapitre V présentera la deuxième application thérapeutique de notre stratégie ciblant les macrophages de tumeurs à l'aide de nanoparticules de dérivés de vitamine D. Une étude de formulation et caractérisation des nanoparticules pour l'encapsulation de la vitamine D₃ et de ses métabolites actifs sera présentée. Le test *in vitro* de l'efficacité anticancéreuse de ces nanoparticules sera ensuite abordé. Les résultats de ce chapitre ont fait l'objet d'un article scientifique intitulé « *Nano-encapsulation of vitamin D3 active metabolites for application in chemotherapy: formulation study and in vitro evaluation* » publié dans *Pharmaceutical Research* (2013;30(4):1137-46).

Enfin, ce manuscrit se terminera par une discussion générale sur les travaux expérimentaux suivie d'une conclusion générale et des perspectives de ce travail.

Références

1. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013;496:445–55.
2. Chellat F, Merhi Y, Moreau A, Yahia L. Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting. *Biomaterials*. 2005;26:7260–75.
3. Mahapatro A, Singh DK. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J. Nanobiotechnology*. 2011;9:55.
4. Bushue N, Wan Y-JY. Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010;62:1285–98.
5. Trapasso E, Cosco D, Celia C, Fresta M, Paolino D. Retinoids: new use by innovative drug-delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2009;6:465–83.
6. Pino-Lagos K, Benson MJ, Noelle RJ. Retinoic acid in the immune system. *Ann N Acad Sci.* 2008;1143:170–87.
7. Woloszynska-Read A, Johnson CS, Trump DL. Vitamin D and cancer: clinical aspects. *Best Pr. Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25:605–15.

Partie Bibliographique

Chapitre I

Vectorisation ciblant les macrophages

Chapitre I. Vectorisation ciblant les Macrophages

La vectorisation des actifs thérapeutiques présente un intérêt majeur en vue de l'amélioration de leur solubilité, de leur stabilité et de leur efficacité en renforçant leur spécificité d'action et en diminuant leurs effets secondaires et cytotoxiques. Plusieurs types de vecteur ont été développés comme les liposomes, niosomes, micro/nanoparticules polymères, nanoparticules lipidiques etc. L'utilisation thérapeutique des vecteurs dits de première génération est relativement limitée du fait de leur reconnaissance par les cellules du système réticulo-endothélial (RES) notamment les macrophages et de leur élimination rapide par l'organisme. Pour s'en affranchir et limiter la reconnaissance des vecteurs par le RES, la modification de leur surface a été envisagée (vecteurs de deuxième génération). Enfin les vecteurs de troisième génération ont été décrits afin d'améliorer leur spécificité en les conjuguant à un ligand de ciblage.

Toutefois en tenant compte de la capacité qu'a le RES et ses macrophages à reconnaître et phagocyter rapidement les vecteurs de première génération et de la forte localisation et implication de ces macrophages dans différentes pathologies, la vectorisation via les macrophages offrirait une ouverture intéressante vers de nouvelles stratégies thérapeutiques. Afin de mieux comprendre et cerner cette possible stratégie il est important dans un 1^{er} temps de bien connaître la physiologie et les fonctions biologiques des macrophages. Ces aspects feront l'objet de la première partie de ce chapitre. Nous nous intéresserons ensuite aux interactions existant entre les vecteurs et les macrophages, plus particulièrement entre nanoparticules et macrophages et aux mécanismes d'internalisation des nanoparticules. Enfin, seront développés les intérêts thérapeutiques du ciblage des macrophages notamment par les nanoparticules polymères.

I.1. Fonctions biologiques des macrophages

Les macrophages sont des cellules phagocytaires présentes dans les tissus. Ils sont issus de la différenciation des monocytes après migration vers les tissus que ce soit en condition normale ou en réponse inflammatoire. Les monocytes sont développés à partir des cellules myéloïdes progénitrices dans la moelle osseuse puis libérés dans la circulation sanguine. Les monocytes migrent ensuite vers les tissus où ils se différencient en macrophages résidents spécifiques des tissus comme l'os (ostéoclastes), les poumons (alvéolaires), le système

nerveux central (microglies), les tissus conjonctifs (histiocytes), le foie (cellules de Kupffer), la rate et le péritoine (Figure 1) (1)

Figure 1 : Génération des macrophages à partir des cellules souches hématopoïétiques depuis la moelle osseuse jusqu'aux tissus ; présentation des différents types de macrophages selon les tissus (2).

Grâce à leur propriété de phagocytose, les macrophages attaquent et éliminent les substances étrangères, les microorganismes exogènes, les cellules cancéreuses ainsi que les débris cellulaires par un mécanisme d'ingestion-destruction. Les macrophages jouent un rôle important dans l'immunité innée et dans l'initiation de l'immunité acquise spécifique. L'activation des macrophages, schématisée en Figure 2, est un processus immunitaire critique strictement régulé et son dysfonctionnement peut être à l'origine de pathologies. L'activation conduit à l'apparition de différentes populations de macrophages (phénotypes) classées en général en deux phénotypes : les macrophages pro-inflammatoires (M1), activés classiquement, et les macrophages régulateurs (M2) activés alternativement. Un troisième type d'activation est proposé sous le terme Wound healing macrophages concernant des macrophages M2 participants à la cicatrisation des tissus (2).

L'activation classique des macrophages (M1) est provoquée par l'association de deux signaux, l'interféron- γ (IFN γ) et le facteur de nécrose tumorale (TNF), augmentant la résistance des macrophages aux infections. De leur côté, les macrophages M1 sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme les interleukines 1, 6 et 23 (IL-1, IL-6 et IL-23) activant la prolifération des lymphocytes T effecteurs (Th1 et Th17) (3). L'activation des macrophages M1 est essentielle dans la défense contre les pathogènes mais peut aussi être la cause d'immunopathologies comme la polyarthrite rhumatoïde et certaines pathologies inflammatoires du tube digestif(4).

Sous l'effet de glucocorticoïdes ou lors de l'étape finale de la réponse immunitaire, les macrophages sont activés en M2 afin de diminuer la réponse immunitaire et limiter l'inflammation. Les macrophages régulateurs M2 sécrètent des cytokines régulatrices notamment l'IL-10 qui oriente la réponse des lymphocytes T en Th2 et favorise le développement des lymphocytes régulateurs. Néanmoins, ces macrophages M2 peuvent être mis en cause dans la prolifération de certains pathogènes (ex : Leishmania) et aussi participer à la progression tumorale (2).

Figure 2 : Activation des macrophages conduisant aux différents phénotypes en réponse aux cytokines sécrétées par les cellules immunitaires ou autres stimulations (2)

Plusieurs études supposent que les macrophages activés, suite à une altération du microenvironnement, peuvent changer de phénotype (5). Cette propriété, décrite sous le terme de plasticité, renforce l'intérêt de cibler les macrophages et de moduler leurs fonctions en vue d'une application thérapeutique sur les pathologies macrophage-dépendantes.

I.2. Interaction nanoparticules-macrophages

La compréhension des mécanismes d'interactions entre nanoparticules et cellules est un point clé dans le développement de vecteurs pour le ciblage cellulaire ou intracellulaire. Ces interactions comprennent notamment les mécanismes d'internalisation des nanoparticules et d'identification du récepteur à cibler. Les propriétés physico-chimiques des nanoparticules (NP) et le type de cellules ciblées sont les deux facteurs critiques de l'internalisation intracellulaire (6). Les nombreuses études conduites pour comprendre les mécanismes de capture des NP par les cellules ont mis en évidence deux voies principales d'internalisation : soit par phagocytose proprement dite soit par d'autres types d'endocytose (clathrine et calveoline-dépendantes ou macropinocytose). La connaissance de la voie d'internalisation des nanoparticules est importante en vue du développement d'une technique de ciblage. Dans le cas des macrophages, l'internalisation des NP se fait majoritairement par phagocytose avec une possibilité de macropinocytose.

I.2.1. Phagocytose des nanoparticules

La phagocytose des NP peut être décrite en trois étapes : reconnaissance des NP dans le sang par opsonisation, adhésion de ces particules aux macrophages, ingestion des particules. La phagosome formée contenant les nanoparticules fusionne avec des lysosomes pour donner une phagolysosome plus acidifiée, riche en enzymes et capable de dégrader les NP (Figure 3).

L'opsonisation est un processus important qui survient avant la phagocytose et qui consiste en l'adsorption de protéines sériques, les opsonines, à la surface des NP pour les rendre « visibles » par les macrophages. Les opsonines sont majoritairement composées d'immunoglobulines (IgG et IgM) et de protéines du système du complément (C3, C4, C5) ainsi que d'autres protéines sériques comme la laminine, la fibronectine, la protéine C réactive

et le collagène de type 1. L'opsonisation a lieu dans le sang rapidement après l'administration des NP par voie intraveineuse. L'adhésion des opsonines sur les nanoparticules se fait par différentes forces comme des forces de Van der Waals, des interactions électrostatiques, ioniques ou hydrophobe/hydrophile (7).

Figure 3 : Internalisation des NP par opsonisation et phagocytose (6).

Du fait de cette opsonisation, les macrophages reconnaissent les NP comme corps étranger et se lient aux NP via les opsonines adsorbées. En revanche, si aucune protéine ne s'adsorbe en surface des NP, les macrophages sont incapables de reconnaître les NP. Le premier mécanisme de reconnaissance envisagé serait dû à une altération et une activation des opsonines adsorbées ; leur forme active serait alors reconnue comme corps étranger par des récepteurs spécifiques des macrophages. Le deuxième mécanisme décrit serait l'adhésion non-spécifique des macrophages à la surface des protéines adsorbées. Enfin, la troisième hypothèse mise en avant serait l'activation de la phagocytose par les protéines du système du complément via des récepteurs spécifiques (8).

Après opsonisation et reconnaissance des NP par les macrophages, celles-ci vont être internalisées par un mécanisme d'endocytose. La vésicule formée par endocytose rentre dans le cytoplasme où elle subit des séries de fusion notamment avec des lysosomes pour donner des phagolysosomes acidifiés, riches en enzymes (estérases et protéases) et réactifs d'oxydation (9). Ce milieu réactif est un point clé pour la formulation des nanoparticules à base de polymères synthétiques notamment pour la biodégradation du polymère, requise dans les applications pharmaceutiques, afin d'éviter les accumulations de polymère pouvant engendrer des effets toxiques. De ce fait les polymères biodégradables sont très largement utilisés pour la formulation des NP polymères car ils seront dégradés au sein des phagolysosomes par des réactions d'hydrolyse (10). Cette biodégradabilité contribue aussi à la libération de l'actif encapsulé mais présente une limite majeure dans le cas particulier des actifs sensibles à l'activité des phagolysosomes comme les protéines ou les acides nucléiques. Pour ce type de principes actifs, une stratégie d'échappement des phagolysosomes est nécessaire pour assurer l'efficacité thérapeutique, elle peut se faire en déstabilisant la membrane de la phagolysosome (11).

I.2.2. Propriétés des nanoparticules pouvant influencer leur phagocytose

Il est connu que les nanoparticules sont rapidement éliminées de la circulation par les macrophages de façon indépendante de leur composition. Cependant, plusieurs études ont réussi à identifier et affiner les caractéristiques des nanoparticules jouant sur leur phagocytose. Ces études ont montré les possibilités de cibler les macrophages ainsi que de développer des nanoparticules "furtifs" capables de séjourner plus longtemps dans la circulation.

I.2.2.1. Taille de nanoparticules

Les macrophages sont des cellules phagocytaires capables d'internaliser des particules de différentes tailles (12). En 1967, Korn *et al.* ont utilisé des particules de polystyrène de 250 nm à 3 µm confirmant la phagocytose des particules des différentes tailles mais avec une phagocytose favorisée pour les particules de grande taille (13). Tabata *et al.* ont aussi comparé la phagocytose des microsphères de différentes tailles (0,2 à 2 µm) en montrant que la phagocytose était maximale pour les particules de taille entre 1 et 2 µm (14). Des observations similaires ont été démontrées pour les liposomes par Harashima *et al.* (15).

Vonarbourg *et al.* ont tenté d'étudier l'influence de la taille des particules sur la phagocytose en se focalisant sur les interactions entre des nanoparticules lipidiques et des protéines du système du complément. Ils ont supposé que les petites particules disposent d'une surface plus courbe donc moins efficace pour l'adhésion des protéines (16). Les macrophages semblent donc internaliser les NP en fonction de l'opsonisation et non pas directement en fonction de leur taille. Toutefois, le degré d'opsonisation augmente avec la taille des NP (17). La taille des particules doit en revanche être aussi adaptée avec la voie d'administration ; des particules de taille d'environ 200 nm seraient les plus adaptées pour l'administration intraveineuse sans risque d'embolisation (6).

I.2.2.2. Propriétés de surface des nanoparticules

La composition des NP déterminent leurs propriétés de surface qui jouent un rôle important dans l'opsonisation ainsi que dans l'interaction avec les macrophages. L'adsorption d'opsonines à la surface se fait en général via des interactions ioniques ou hydrophobes (18).

La capture des NP par les macrophages sera donc influencée par leur charge (potentiel Zeta) et leur hydrophobicité.

La phagocytose des NP préparées à base des polymères hydrophobes (PCL, PLA, PLGA et PACA) est bien documentée par des expérimentations *in vitro* et *in vivo*, confirmant l'implication de l'hydrophobicité du polymère dans l'opsonisation. Cette influence de l'hydrophobicité peut être due à la mise en jeu de forces d'interactions type Van der Waals (19). Blunk *et al.* ont conduit une étude en modifiant l'hydrophobicité des particules de polystyrène par adsorption de copolymères d'hydrophilie variable (poloxamers 184, 188 et 407). Les auteurs ont montré que plus les particules étaient hydrophobes, plus il y avait des protéines adsorbées à leur surface (20). Des observations similaires ont été trouvées sur des particules de latex des différentes hydrophobicités par Gessner *et al.* (21).

Roser *et al.* ont montré une faible internalisation des NP ayant un potentiel Zeta proche de zéro (22). De plus, Tabata *et al.* n'ont pas trouvé de différence significative entre les particules chargées positivement ou négativement (14). D'autres auteurs ont montré en étudiant la phagocytose de microparticules de polystyrène, qu'une relation linéaire entre la valeur absolue de potentiel Zeta et la phagocytose existait (23). Les NP chargées peuvent interagir avec la surface des macrophages. Les macrophages présentent un résidu d'acide sialique, donc des charges négatives, participant à la liaison de particules positives. Ce concept a été mis en évidence en évaluant l'internalisation de nanoparticules inorganiques par des macrophages alvéolaires bloquée par un traitement avec des ligands spécifiques de l'acide sialique (24). Concernant les particules négatives, une interaction non-spécifique via des forces électrostatiques est plutôt proposée (25).

La modification de surface des NP fait l'objet des stratégies d'échappement des macrophages rendant les NP furtives. L'ajout de poly(éthylèneglycol) (PEG) par exemple à la surface des NP par adsorption ou par intégration comme copolymère est largement utilisé pour prolonger la durée de vie des NP dans la circulation. La « pegylation » des NP diminue leur charge et leur hydrophobicité de surface selon la longueur et la densité des chaînes de PEG utilisées (17).

I.2.2.3. Forme des nanoparticules

Les NP utilisées en application thérapeutique ont généralement une forme sphérique, mais il est intéressant d'élaborer des NP de formes variées afin d'évaluer leur impact sur la

phagocytose. Champion *et al.* ont préparé des microparticules de polystyrène de diverses formes (ellipsoïdes, disques, rectangulaires et ovnis) et évalué leur internalisation par des macrophages alvéolaires. Ils ont montré que la forme locale de la particule au point de contact détermine si le macrophage va initier une phagocytose ou simplement s'étaler sur la particule. Par exemple, un macrophage attaché à une particule ellipsoïde à l'extrémité pointue va l'internaliser en quelques minutes, tandis qu'un macrophage relié à une partie plate de la même particule ne l'internalise pas même après 2 heures (Figure 4). Ces observations peuvent s'expliquer par la complexité de la structure de l'actine et la nécessité de former un anneau d'actine autour de la particule pour initier l'internalisation (26).

Lin *et al.* ont préparé des nanoparticules à base poly(éthylèneglycol)-poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-histidine)-PLA sous deux formes, sphérique et hexagonale. Aucune différence de phagocytose n'a été observée entre les deux formes ayant des diamètres moyens de 70 nm. Cependant, les particules hexagonales de 120 nm ont été moins internalisées par les macrophages *in vitro* et avaient *in vivo* une demi-vie plus longue dans la circulation (27). La maîtrise de la forme des nanoparticules semble donc être un nouveau moyen pour contrôler leur phagocytose.

Figure 4 : Images de l'interaction des macrophages avec des particules prises en microscopie électronique à balayage (A-C) et en microscopie à fond clair couplée en fluorescence après la fixation de l'actine polymérisée en rhodamine rouge (D-F). Le macrophage réussit à internaliser l'ellipsoïde par le côté pointu (A et D) ainsi que la particule sphérique (C et F). Le contact du macrophage avec l'ellipsoïde par la région plate ne conduit pas à l'internalisation (B et E). Les barres d'échelles sont 10 μm pour A,D,E et F et 5 μm pour B et C (26).

I.2.3. Les récepteurs des macrophages impliqués dans la phagocytose

Plusieurs récepteurs des macrophages sont impliqués dans la reconnaissance et la phagocytose des NP (Figure 3). Les récepteurs les plus étudiés sont les récepteurs Fc, se liant au fragment d'immunoglobuline adsorbé, ainsi que les récepteurs du système du complément qui reconnaissent les fragments de C3. Ces récepteurs sont bien impliqués dans la phagocytose des NP après opsonisation mais ne présentent pas d'intérêt particulier pour le

ciblage des macrophages car ils ne sont pas spécifiques de ces derniers (expression sur d'autres cellules immunitaires) et participent à l'activation de la réponse inflammatoire.

Le récepteur au mannose est un récepteur transmembranaire, de la famille des récepteurs aux glycoprotéines, exprimé principalement par les macrophages et impliqué dans la reconnaissance du motif de certains pathogènes. Ce récepteur est capable de contrôler la phagocytose de particules enrobées par des saccharides ainsi que la pinocytose des glycomolécules solubles (28). Ce récepteur a une spectre unique de ligands saccharidiques : le mannose et le fructose ont la plus forte affinité comparé à la N-acytelglucosamine et le glucose qui ont une faible affinité (29). Cette présence d'un récepteur au mannose a été exploitée dans le développement de NP pour cibler les macrophages. Cui *et al.* ont montré que l'enrobage des NP par des mannanes permettait de doubler l'attachement et l'internalisation des NP par une lignée des macrophages de souris (J-774E). En revanche, cet effet est supprimé en saturant les récepteurs par préincubation avec des mannanes libres (30). Des résultats similaires ont été obtenus avec des liposomes-protamine-ADN où l'enrobage par des mannanes augmentait l'internalisation et améliorait l'activation des macrophages et des cellules dendritiques (31).

Une participation des récepteurs dits « éboueurs » (*scavenger receptors*) des macrophages à l'adhésion des NP a également été décrite. Cette voie, indépendante de l'opsonisation participerait également à la phagocytose des NP (32). Ces récepteurs sont connus pour lier les macromolécules polyanioniques comme les lipopolysaccharides des bactéries à Gram-négatif, l'acide lipotéichoïque des bactéries à Gram-positif et les protéines et lipoprotéines chimiquement modifiés ou oxydées (33). L'implication de ces récepteurs dans l'internalisation des NP a été démontrée par une étude conduite sur des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer. En réalisant une expérience de compétition entre les nanoparticules et des ligands des récepteurs éboueurs, une inhibition de l'internalisation des nanoparticules par les macrophages péritonéaux de souris a été observée (34).

I.3. Applications thérapeutiques

La large présence des macrophages dans les tissus et leur implication dans différentes pathologies témoignent du potentiel prometteur des stratégies thérapeutiques médiées par les macrophages. L'utilisation des nanovecteurs ciblant les macrophages a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche afin de proposer des traitements innovants pour les maladies infectieuses et auto-immunes ainsi que le cancer.

Pour cibler les macrophages deux stratégies peuvent être utilisées : un ciblage passif par des vecteurs de première génération après administration *in situ*, ou un ciblage actif en utilisant des ligands des récepteurs spécifiques des macrophages voire spécifiques d'une population donnée de macrophages. Des exemples de stratégies développées pour le ciblage des macrophages notamment par des nanoparticules polymères sont présentés ci-dessous en fonction de leurs applications thérapeutiques potentielles.

I.3.1. Applications anti-tumorales

I.3.1.1. Macrophages associés aux tumeurs

Les macrophages sont les cellules immunitaires les plus présentes dans les tumeurs connus sous le terme de « Tumor Associated Macrophages » (TAM). Contrairement au postulat indiquant que ces macrophages contribuent à la défense de l'organisme contre les tumeurs, les données cliniques et expérimentales ont montré que les macrophages favorisaient l'initiation, la progression et la métastase de certaines tumeurs. Plusieurs études ont montré une corrélation entre la densité des macrophages au sein des tumeurs et le pronostic vital des patients atteints de cancer (35). Ces macrophages font donc l'objet de beaucoup d'attention pour mieux comprendre leur intervention dans la progression tumorale et évaluer leur intérêt comme cible potentielle dans le développement de traitements innovants contre le cancer.

Au cours d'une infection persistante ou d'une irritation chronique, les macrophages sécrètent des cytokines inflammatoires (IFN γ , TNF α et IL-6) provoquant, avec d'autres cellules immunitaires, une inflammation chronique pouvant être mise en cause dans l'initiation d'un développement tumoral (36). Après l'établissement d'une tumeur, plusieurs molécules chimiotactiques produites par la tumeur participent au recrutement des monocytes vers le site tumoral, notamment via le facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF) et les chimiokines CC (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 et CCL8) (37). Le

microenvironnement tumoral induit la différenciation des macrophages infiltrés en phénotype similaire aux M2 immunosuppresseurs participant à la progression tumorale.

Le phénotype des TAM varie selon les modèles tumoraux et selon la localisation dans la tumeur. Par exemple, dans le cancer du poumon les macrophages péri-tumoraux présentent un phénotype pro-inflammatoire alors que les macrophages au centre de la tumeur ont un profil immunosuppresseur. Les TAM peuvent donc être classés en plusieurs sous-populations avec une fonction spécifique pour chacune (38). En sécrétant différents facteurs et cytokines, les TAM favorisent la croissance et l'angiogenèse tumorale. L'échange entre les TAM et les cellules tumorales induit la sécrétion par les TAM de cytokines stimulant la migration, l'invasion et l'intravasation des cellules tumorales ainsi que l'implantation de métastases. Le profil immunosuppresseur des TAM assure une immunotolérance contre la tumeur par l'inhibition des lymphocytes T cytotoxiques et un recrutement des lymphocytes T régulateurs (39). Les différentes fonctions des TAM dans la progression tumorale sont présentées en Figure 5.

Figure 5 : Fonctions des macrophages infiltrés dans la tumeur (TAM) ; chaque fonction est attribuée à une sous-population de TAM localisée à des endroits spécifiques de la tumeur (39)

La variété et l'importance des fonctions des TAM dans la progression tumorale donnent lieu aux différentes approches de thérapie anticancéreuse basées sur le ciblage des TAM. Les stratégies thérapeutiques développées peuvent être classées comme suit (40) :

- 1- Stopper le recrutement des macrophages en utilisant des inhibiteurs de M-CSF, CCL2 ou d'autres molécules chimiotactiques
- 2- Induire la mort des TAM en utilisant des agents chimiques (biphosphonates, dasatinib), des anticorps conjugués à une immunotoxine, ou des agents stimulant les lymphocytes contre les TAM.
- 3- Utiliser des agonistes de la voie M1 afin d'augmenter l'activité M1 anti-tumorale des TAM.
- 4- Utiliser des inhibiteurs de l'activité M2 des TAM.

I.3.1.2. Vectorisation ciblant les TAM

Plusieurs études ont été conduites sur la possibilité de cibler les TAM par des nanovecteurs en vue de les dépler, de moduler leurs activités ou de les utiliser comme un stockage de principes actifs anti-cancéreux. Parmi ces études, les nanovecteurs utilisés étaient soit sans modification de surface ciblant les TAM passivement, soit fonctionnalisés avec des ligands spécifiques des macrophages en général ou des TAM en particulier. Ces vecteurs étaient administrés selon deux voies d'administration, soit en intraveineuse soit en intratumorale.

En se basant sur la capacité d'élimination rapide des NP par les macrophages présents dans le foie après leur administration intraveineuse, des agents cytotoxiques ont été encapsulés dans les NP pour le traitement des cancers du foie via les cellules de Kupffer. Les travaux de Couvreur et coll. qui ont encapsulé la doxorubicine dans des NP à base polyisohexylcyanoacrylate d'une taille de 200 à 300 nm en sont un bon exemple. Ils ont montré une efficacité supérieure de la forme encapsulée comparée à la forme libre de doxorubicine et une diminution de sa toxicité cardiaque sur un modèle de métastases hépatiques de réticulosarcome. Après administration IV, les NP ont été retrouvées dans les cellules de Kupffer servant de réservoir pour le contrôle de la diffusion de doxorubicine vers les cellules tumorales (41). La tolérance de ces NP a été testée par une étude clinique de phase I sur 21 patients ; la dose de 75 mg/m² a été retenue (42). Des essais de phase II sur les NP de doxorubicine, sous le nom Livatag[®], ont été conduits pour le traitement d'hépatocarcinomes par administration intra-artérielle des NP. Des résultats encourageants sur la survie des patients ont été obtenus et ces NP ont fait l'objet d'une étude de phase III (43).

Kateb *et al.* ont étudié l'internalisation de nanotubes de carbone par les microglies afin de développer une immunothérapie contre des tumeurs cérébrales. L'internalisation a été conduite sur une lignée de microglies (BV2) et une lignée de gliome (GL261) séparément et en co-culture montrant que les nanotubes ont été majoritairement captés par les microglies : 82% des cellules BV2 versus 50% des cellules GL26 ont internalisé des nanotubes (44). L'étude a été poursuivie *in vivo* sur un modèle intracrânien de gliome (GL261) en administrant 5 µg des nanotubes fluorescents en injection intratumorale. L'internalisation a été évaluée par cytométrie en flux après un marquage des CD45 et CD11b permettant de classer les cellules de la tumeur en macrophages (CD45⁺⁺⁺/CD11b⁺⁺⁺), microglies (CD45⁺/CD11b⁺⁺⁺), lymphocytes (CD45⁺/CD11b⁻) et cellules tumorales (CD45⁻/CD11b⁻).

24h après l'injection, 30% des cellules isolées contenaient des nanotubes et ce pourcentage était seulement de 10% après 7 jours. Les nanotubes ont été internalisés principalement par les macrophages (~75% des cellules ciblées à 24h) (45). Une application thérapeutique de ces nanotubes a été testée en leur conjuguant des CpG-oligodéoxynucleotides, un immunostimulant dont l'action sur les TAM est bien documentée. L'administration intratumorale des CpG-nanotubes sur le modèle de gliome a montré une amélioration de l'activité de CpG sur les TAM et une stimulation immunitaire anti-tumorale (46). Les nanotubes sont donc des vecteurs intéressants pour moduler les fonctions des macrophages intra-tumoraux.

D'autres études portant sur le ciblage des TAM de gliome ont été menées par Alizadeh *et al.* Ils ont préparé des NP à base de polymère de β -cyclodextrines d'une taille entre 10 et 100 nm, de charge neutre et encapsulant la rhodamine comme marqueur fluorescent. L'incubation des NP en co-culture des microglies (BV2) et des gliomes (GL261) a montré une internalisation rapide (en 2h) et supérieure par les microglies. L'investigation *in vivo* a été conduite sur un modèle intracrânien de gliome chez des souris en administrant 100 mg/kg de NP en intraveineuse ou 1 mg/kg en intratumorale deux semaines après l'implantation de la tumeur (n = 3). Indépendamment de la voie d'administration, les NP ont été internalisées principalement (60 à 80%) par les TAM (macrophages et microglies). Toutefois, l'internalisation était plus efficace lors de l'injection intratumorale avec une présence de la rhodamine maintenue sur les 4 jours de l'étude (Figure 6). De plus, une migration des macrophages chargés de NP depuis et vers la tumeur a été observée. Ils ont conclu que les TAM seraient une cible potentielle des NP de cyclodextrines permettant le traitement de tumeurs du cerveau (47). Ces résultats présentent une confirmation de la possibilité de cibler les TAM après une injection intratumorale et montrent que les macrophages sont capables de vectoriser les NP aux tumeurs après administration intraveineuse mais un manque d'étude de biodistribution ne permet pas de déterminer la quantité de NP atteignant la tumeur.

Figure 6 : Etude quantitative de l'internalisation des NP de cyclodextrines sur un modèle de gliome en comparant deux voies d'administration, intraveineuse (IV) et intratumorale (IT). (A, B) : pourcentage de chaque type cellulaire par rapport au total des cellules rhodamine-positives (contenant des NP). (C, D) : proportions de cellules rhodamine-positives par rapport au total des cellules analysées divisées par type (47).

En outre, le clodronate est une molécule de la famille des bisphosphonates capable d'induire une apoptose des TAM en inhibant leur métabolisme cellulaire. Les bisphosphonates sont utilisés en clinique dans la prévention des métastases osseuses et l'inhibition de la résorption osseuse ainsi que dans le traitement de maladies inflammatoires (48). Les bisphosphonates sont relativement sélectives des phagocytes du fait de leur faible hydrophobicité et de leur charge qui empêchent le passage de la membrane cellulaire. Le clodronate a été encapsulé dans des liposomes (clodrolip[®]) et testée *in vivo* sur des modèles murins de tératocarcinome, mélanome, cancer de la prostate et de métastases osseuses et musculaires de cancer du poumon. Ces liposomes de clodronate ont montré une inhibition significative de la croissance et l'angiogenèse tumorale (49–51).

Toutefois, une limite de ces liposomes serait les effets secondaires venant de la non-spécificité aux TAM et donc de la déplétion des monocytes et des autres macrophages (dans le foie et la rate) non concernés par la tumeur. En vue de cibler l'activité du clodronate aux TAM, Sharma *et al.* ont encapsulé le clodronate dans des NP fonctionnalisées de PEG-PLGA (180 nm) en utilisant la technique de double-émulsion (52). La fonctionnalisation a été faite par la fixation de LyP-1 (tumor homing peptide) un ligand spécifique du récepteur p32 surexprimé par les cellules tumorales et les TAM notamment dans la zone hypoxique de la tumeur (53). Sharma *et al.* ont montré que l'administration IV des LyP-1-NP provoquait une forte accumulation dans la tumeur et une diminution du nombre de TAM. Cette stratégie de ciblage des TAM a été brevetée pour les nanoparticules polymères et les liposomes encapsulant un dérivé de bisphosphonates (54). La fonctionnalisation par le ligand LyP-1 a aussi été testée sur des liposomes de doxorubicine et des micelles polymères d'artémisinine en vue de cibler des métastases lymphatiques (55,56).

Par ailleurs, le récepteur au mannose (CD206) bien exprimé sur les TAM a été utilisé comme cible dans le développement de nanovecteurs afin de délivrer des immunostimulants aux TAM (57). Kim *et al.* ont préparé des NP de chitosane conjugué à du mannose en vue d'administrer spécifiquement le gène d'une cytokine stimulante (IL-12) à des cellules dendritiques associées à une tumeur. L'ajout de mannose permet d'améliorer le transfert du gène aux cellules dendritiques *in vitro* et la suppression de la croissance et de l'angiogenèse après une injection locale dans une xénogreffe de carcinome CT-26 (58). D'autres récepteurs ont été utilisés pour cibler les TAM comme ICAM-1 (molécule d'adhésion intercellulaire) (59) et le récepteur « éboueur » CD163 (60).

En conclusion, les TAM présentent une cible thérapeutique potentielle pour l'établissement de traitements anti-tumoraux innovants via l'administration de systèmes de vectorisation comme les NP. Néanmoins, les NP ciblant les TAM doivent pouvoir échapper aux autres populations de macrophages notamment ceux du RES pour atteindre spécifiquement les TAM. Le choix de la voie d'administration et la fonctionnalisation des particules pour le ciblage spécifique sont des facteurs essentiels dans le développement des vecteurs ciblant les TAM. Plus d'études sont donc nécessaires afin d'identifier des ligands uniques aux TAM et de bien évaluer la biodistribution des nanovecteurs après administration. Enfin, l'utilisation de techniques d'imagerie des TAM sont nécessaires afin d'examiner la présence des TAM dans les tumeurs recevant un traitement contre les TAM ainsi que pour évaluer l'efficacité et la durée des traitements.

I.3.2. Applications aux maladies infectieuses

Les macrophages peuvent être un hôte cellulaire de différents parasites et microorganismes intervenant dans la sévérité et la résistance aux traitements de certaines infections. Plusieurs études ont proposé l'utilisation de systèmes nanoparticulaires pour la vectorisation de principes actifs anti-infectieux permettant leur persistance à l'intérieur des macrophages (61).

I.3.2.1. Infections parasitaire et fongique

Le *Leishmania*, un parasite infectant des organes viscéraux, peut être localisé dans les lysosomes des macrophages du RES et échapper ainsi aux traitements. Le traitement de la leishmaniose viscérale représente donc un bon exemple de traitement pouvant bénéficier de la vectorisation médiée par les macrophages afin d'améliorer l'efficacité des antiparasitaires et diminuer leurs effets secondaires.

La vectorisation d'amphotéricine B a notamment été conduite avec succès avec la mise sur le marché de trois médicaments : AmBisome[®] sous forme de liposomes d'amphotéricine B de 60 à 80 nm permet de diminuer jusqu'à 70 fois la toxicité rénale de l'amphotéricine B tout en augmentant la dose (jusqu'à 5 fois). Des améliorations similaires ont été obtenues avec les autres formulations comme Fungizone[®] (dispersion micellaire), Abelcet[®] (structure lipidique) et Amphotec[®] (nanodisk) (62).

Des formulations de NP polymères ont aussi été développées avec succès. Des nanosphères de poly(isohexylcyanoacrylate) encapsulant la primaquine ont permis d'améliorer l'efficacité du traitement contre le *Leishmania* intracellulaire *in vitro* de 21 fois par rapport à la référence (63). Des NP d'acide poly-lactique (PLA) encapsulant la primaquine ont également été étudiées contre *Leishmania donovani* montrant une efficacité plus élevée que la forme libre et une toxicité réduite *in vitro* et *in vivo* (64).

I.3.2.2. Infections bactériennes

Des NP ont été développées pour délivrer des antibactériens à des macrophages infectés. En effet, de nombreux micro-organismes sont capables de survivre dans les macrophages qui les protègent contre les systèmes de défense de l'hôte et de certains antibiotiques ayant une faible pénétration dans ces cellules.

Salem *et al.* ont par exemple développé des liposomes pour l'encapsulation de divers antibiotiques et ont montré une bonne efficacité antibactérienne sur les macrophages *in vitro* et sur des modèles de *Mycobacterium avium complex in vivo* (65). D'autres auteurs ont encapsulé la rifampicine dans des NP de polybutylcyanoacrylate afin de traiter des macrophages alvéolaires infectés par *Staphylococcus aureus* ou *Mycobacterium avium*. Les NP ont permis une délivrance intracellulaire effective de la rifampicine où sa concentration a été triplée à l'intérieur des macrophages comparé à la forme libre de rifampicine. *In vivo*, l'administration des NP de rifampicine à des souris atteintes de salmonellose a engendré 80% de survie versus 10% pour les souris traitées avec la forme libre (66). De même, des NP de polyisohexylcyanoacrylate ont montré une amélioration de l'efficacité de l'ampicilline contre *Salmonella typhimurium* infectant des macrophages grâce au ciblage des bactéries par les NP dans les phagosomes au niveau intracellulaire (67).

I.3.2.3. Infections virales : exemple du VIH

Les macrophages sont les premières cellules infectées par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) hébergeant leur réplication intracellulaire et protégeant le virus de l'effet des traitements antiviraux. Les traitements anti-VIH présentent notamment des limites en raison de leur faible pénétration dans les macrophages, la faible biodisponibilité, la résistance développée et la possible toxicité. L'utilisation de vecteurs permettrait d'améliorer

l'efficacité et de diminuer les doses administrées sachant que les macrophages infectés ont une activité de phagocytose élevée (68).

L'encapsulation d'azidothymidine (inhibiteur de la transcriptase inverse) dans des NP de polyhexylcyanoacrylate a montré une bonne efficacité *in vitro* sur la protection des macrophages contre l'infection (69). L'administration IV chez les rats de NP contenant de l'azidothymidine marquée au carbone 14 (^{14}C - azidothymidine) a montré une accumulation dans les organes du RES avec des concentrations 18 fois supérieures à la forme libre, indiquant la possibilité de diminuer la dose et donc de diminuer la toxicité (70). Des résultats similaires ont été obtenus par administration orale avec une augmentation de la biodisponibilité d'azidothymidine dans le sang (71).

Les inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse doivent être phosphorylés en 5'-triphosphate par des kinases cellulaires pour être actifs. L'administration de la forme phosphorylée hydrophile n'est pas possible en raison de la faible perméabilité de la membrane cellulaire aux nucléotides. Hillaireau *et al.* ont démontré la possibilité d'encapsuler azidothymidine-triphosphate dans des NP de polyisobutylcyanoacrylate en ajoutant un polymère cationique la poly-éthylèneimine pour augmenter l'efficacité d'encapsulation. Les NP obtenues ont permis d'augmenter la concentration intracellulaire dans les macrophages de 30 fois en comparaison avec la forme libre (72).

Cependant, la corrélation entre les résultats *in vitro* et *in vivo* reste complexe et la vectorisation des antibiotiques et des antiviraux vers les macrophages nécessite plus de travaux avant d'atteindre des applications cliniques sachant que l'accessibilité limitée aux modèles animaux ralentit l'avancement dans ce domaine (61).

I.3.3. Les macrophages comme vecteurs

Une stratégie proposée pour contrecarrer les limites de la délivrance spécifique des NP notamment au cerveau est l'utilisation des macrophages comme vecteurs de nanoparticules (« Cheval de Troie »), utilisant la migration des macrophages aux tissus cibles.

Dou *et al.* ont initié le concept d'utilisation des macrophages générés de moelle osseuse pour délivrer des antirétroviraux dans le traitement du VIH-1. Les macrophages comme vecteurs sont capables de prolonger la libération du principe actif et de concentrer son activité dans les tissus infectés comme le foie et la rate. Pour tester ce concept, des macrophages ont

été incubés *ex vivo* avec des nanocristaux d'indinavir (1,6 μm) stabilisés par des phospholipides. Ces macrophages renfermant le principe actif présentent un profil de libération prolongée de l'indinavir sur 6 jours. Le suivi, après administration IV, du devenir des macrophages contenant des molécules radio-marquées a montré une première accumulation dans les poumons et après 24 heures une forte accumulation dans le foie et la rate maintenue pendant 7 jours. Des concentrations constantes et élevées d'indinavir ont été détectées dans les tissus et le sérum pendant 15 jours indiquant l'avantage des macrophages par rapport à la forme libre ou des NP d'indinavir (Figure 7). L'efficacité *in vivo* a ensuite été démontrée sur un modèle de VIH-1 chez des souris NOD/SCID portant une greffe de lymphocytes humains (73).

Les mêmes auteurs ont aussi testé l'utilité des macrophages pour remédier au franchissement limitée des antirétroviraux de la barrière hémato-encéphalique. Ils ont utilisé un modèle de souris atteintes d'encéphalite à VIH-1 auxquelles ils ont administré des macrophages chargés d'antirétroviraux en IV. Les macrophages ont été rapidement retrouvés dans le cerveau proche du site d'infection. Cette migration rapide et spécifique est due à la neuroinflammation provoquée par l'infection. Un taux constant d'indinavir dans la région infectée du cerveau a pu être maintenu grâce à l'administration de ces macrophages permettant de diminuer la réplication virale (74).

Figure 7 : Distribution d'indinavir dans les tissus (rate, ganglions, foie, poumons, reins), le sérum et l'urine chez des souris recevant une seule dose IV d'une solution d'indinavir (B), de NP d'indinavir (C) ou de macrophages chargés de nanocristaux d'indinavir (D et E) (73).

Par ailleurs, Madsen *et al.* ont révisé le concept d'utiliser les macrophages pour vectoriser des NP composées d'un cœur de silice et d'une coque d'or en vue d'un traitement photothermique de gliomes (75). Le concept de cette étude est schématisé sur la Figure 8. Les NP d'or sont capables de transformer l'énergie photonique (proche infra-rouge) en énergie thermique induisant la mort cellulaire. Les tests *in vitro* ont montré que les NP étaient bien internalisées et s'agrégeaient dans les vésicules des macrophages après 24h d'incubation, sans effet toxique sur les macrophages. L'efficacité de ces NP a été testée *in vitro* sur un modèle de gliome cultivé sous forme de sphéroïdes où les macrophages chargés de NP ont été incubés

avec le sphéroïde. A la suite de l'infiltration des macrophages dans le sphéroïde de gliome, une exposition au laser proche infra-rouge est effectuée pour induire une élévation de température conduisant à la mort des cellules tumorales. Une suppression de la croissance tumorale a été observée dans les sphéroïdes contenant plus de 10% de macrophages (76). Après une administration IV, les NP sont éliminées rapidement par le foie et la rate avec une faible partie (<5%) observée dans la tumeur (77). Cependant les macrophages sont capables de franchir la barrière hémato encéphalique dans le cas de gliomes et donc d'atteindre la tumeur, démontrant l'intérêt d'utiliser les macrophages comme vecteurs de NP. Il est donc préférable de charger les macrophages avec les NP *ex vivo* puis d'injecter les macrophages chargés. Toutefois, cette technique nécessite l'utilisation d'une méthode permettant d'améliorer la migration de ces macrophages injectés vers la tumeur cérébrale pour assurer une bonne accumulation des macrophages injectés dans la tumeur et non pas dans le RES (75).

Figure 8 : Concept d'utilisation des macrophages comme transporteur de NP (or-silice) pour le ciblage de tumeurs cérébrales par l'application d'un traitement photothermique (75).

Choi *et al.* ont évalué la biodistribution de macrophages chargés par des microsphère fluorescentes (FluoSpheres® NeutrAvidin®, 0,04µm) après une injection IV chez des souris portant une métastase cérébrale de cancer du sein. Ce modèle est basé sur l'idée que la sécrétion des molécules chimiotactiques par les cellules métastatiques favorise la migration des macrophages vers le cerveau pour entourer les métastases. Après l'injection IV, les macrophages ont été retrouvés dans les poumons, le foie et la rate ainsi que dans les métastases cérébrales. Cependant, sans quantification du pourcentage trouvé dans le cerveau, il est difficile de juger de l'efficacité de ce concept (78).

I.4. Conclusion

Du fait de la forte implication et de la localisation des macrophages dans de nombreuses pathologies, ces derniers apparaissent comme une cible thérapeutique d'intérêt notamment pour les nanovecteurs. Plusieurs études ont été conduites sur la vectorisation de principes actifs pour le ciblage des macrophages se basant sur leur capacité d'internaliser facilement les

vecteurs. Toutefois, le transfert des approches étudiées en applications cliniques nécessite plus d'investigations afin de mieux comprendre les interactions nanovecteurs-macrophages *in vivo*, le devenir des vecteurs après capture par les macrophages et la biodistribution des vecteurs après administration. Le ciblage passif des macrophages par les nanovecteurs non-décorés reste l'approche la plus simple et concrète pouvant donner lieu à plusieurs applications thérapeutiques et permettre ainsi de cibler une sous-population spécifique de macrophages par une administration locale. L'administration systémique des nanovecteurs décorés permet un ciblage actif des macrophages mais nécessite la mise en place d'une stratégie d'échappement des macrophages non ciblés et le choix de ligands nettement spécifiques pour les populations ciblées. De plus, Les macrophages sont impliqués dans de nombreuses maladies auto-immunes, y compris l'athérosclérose, la sclérose en plaques, les troubles inflammatoires de l'intestin, la polyarthrite rhumatoïde. Plusieurs études ont été conduites sur le ciblage des macrophages dans ces pathologies en vue d'un diagnostic. Néanmoins, le ciblage des macrophages inflammatoires pour une application thérapeutique est moins décrit et limité sur la vectorisation des corticoïdes. Cette approche nécessite plus d'investigation afin d'utiliser les macrophages pour moduler la réponse inflammatoire. Par ailleurs, l'utilisation de macrophages comme vecteurs de vecteurs émerge comme une approche en devenir nécessitant la mise en place d'études approfondies. Enfin, la vectorisation ciblant les macrophages, notamment pour moduler leurs activités, doit être poursuivie et approfondie en vue de nouvelles stratégies thérapeutiques.

I.5. Références

1. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 2005;5:953–64.
2. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8:958–69.
3. O’Shea JJ, Murray PJ. Cytokine Signaling Modules in Inflammatory Responses. *Immunity.* 2008;28:477–87.
4. Szekanecz Z, Koch AE. Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2007;19:289–95.
5. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J. Immunol.* 2005;175:342–9.
6. Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers’ entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009;66:2873–96.
7. Owens DE, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2006;307:93–102.
8. Frank MM, Fries LF. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol. Today.* 1991;12:322–6.
9. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 1999;17:593–623.
10. Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug Delivery Rev.* 1997;28:5–24.
11. Panyam J, Zhou W-Z, Prabha S, Sahoo SK, Labhasetwar V. Rapid endo-lysosomal escape of poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *FASEB J.* 2002;16:1217–26.
12. Aderem A. How to eat something bigger than your head. *Cell.* 2002;110:5–8.
13. Korn ED, Weisman RA. Phagocytosis of latex beads by *Acanthamoeba*. II. Electron microscopic study of the initial events. *J. Cell Biol.* 1967;34:219–27.
14. Tabata Y, Ikada Y. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. *Biomaterials.* 1988;9:356–62.
15. Harashima H, Sakata K, Funato K, Kiwada H. Enhanced Hepatic Uptake of Liposomes Through Complement Activation Depending on the Size of Liposomes. *Pharm. Res.* 1994;11:402–6.
16. Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Simard P, Leroux JC, Benoit JP. Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2006;78:620–8.
17. Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Benoit J-P. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials.* 2006;27:4356–73.
18. Claesson PM, Blomberg E, Fröberg JC, Nylander T, Arnebrant T. Protein interactions at solid surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* 1995;57:161–227.
19. Oss CJ van, Absolom DR, Neumann AW. The “hydrophobic effect”: Essentially a van der Waals interaction. *Colloid. Polym. Sci.* 1980;258:424–7.

20. Blunk T, Hochstrasser DF, Sanchez J-C, Müller BW, Müller RH. Colloidal carriers for intravenous drug targeting: Plasma protein adsorption patterns on surface-modified latex particles evaluated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 1993;14:1382–7.
21. Gessner A, Waicz R, Lieske A, Paulke B, Mader K, Muller RH. Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption. *Int. J. Pharm.* 2000;196:245–9.
22. Roser M, Fischer D, Kissel T. Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1998;46:255–63.
23. Gbadamosi J., Hunter A., Moghimi S. PEGylation of microspheres generates a heterogeneous population of particles with differential surface characteristics and biological performance. *FEBS Lett.* 2002;532:338–44.
24. Gallagher JE, George G, Brody AR. Sialic acid mediates the initial binding of positively charged inorganic particles to alveolar macrophage membranes. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987;135:1345–52.
25. Rigotti A, Acton SL, Krieger M. The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J. Biol. Chem.* 1995;270:16221–4.
26. Champion JA, Mitragotri S. Role of target geometry in phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103:4930–4.
27. Lin S-Y, Hsu W-H, Lo J-M, Tsai H-C, Hsiue G-H. Novel geometry type of nanocarriers mitigated the phagocytosis for drug delivery. *J. Control. Release.* 2011;154:84–92.
28. Warr GA. A macrophage receptor for (mannose/glucosamine)-glycoproteins of potential importance in phagocytic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980;93:737–45.
29. Largent BL, Walton KM, Hoppe CA, Lee YC, Schnaar RL. Carbohydrate-specific adhesion of alveolar macrophages to mannose-derivatized surfaces. *J. Biol. Chem.* 1984;259:1764–9.
30. Cui Z, Hsu C-H, Mumper RJ. Physical characterization and macrophage cell uptake of mannan-coated nanoparticles. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2003;29:689–700.
31. Cui Z, Han S-J, Huang L. Coating of Mannan on LPD Particles Containing HPV E7 Peptide Significantly Enhances Immunity Against HPV-Positive Tumor. *Pharm. Res.* 2004;21:1018–25.
32. Kobzik L. Lung macrophage uptake of unopsonized environmental particulates. Role of scavenger-type receptors. *J. Immunol.* 1995;155:367–76.
33. Peiser L, Gordon S. The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes Infect.* 2001;3:149–59.
34. Raynal I, Prigent P, Peyramaure S, Najid A, Rebuzzi C, Corot C. Macrophage endocytosis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: mechanisms and comparison of ferumoxides and ferumoxtran-10. *Invest. Radiol.* 2004;39:56–63.
35. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 2013;496:445–55.
36. Balkwill FR, Mantovani A. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. *Semin. Cancer Biol.* 2012;22:33–40.
37. Graves DT, Jiang YL, Williamson MJ, Valente AJ. Identification of monocyte chemotactic activity produced by malignant cells. *Science.* 1989;245:1490–3.

38. Wu Y, Zheng L. Dynamic Education of Macrophages in Different Areas of Human Tumors. *Cancer Microenviron.* 2012;5:195–201.
39. Qian B-Z, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 2010;141:39–51.
40. Tang X, Mo C, Wang Y, Wei D, Xiao H. Anti-tumour strategies aiming to target tumour-associated macrophages. *Immunology.* 2013;138:93–104.
41. Chiannikulchai N, Ammoury N, Caillou B, Devissaguet JP, Couvreur P. Hepatic tissue distribution of doxorubicin-loaded nanoparticles after i.v. administration in reticulosarcoma M 5076 metastasis-bearing mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1990;26:122–6.
42. Kattan J, Droz JP, Couvreur P, Marino JP, Boutan-Laroze A, Rougier P, et al. Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of doxorubicin carried by polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles. *Invest. New Drugs.* 1992;10:191–9.
43. Reddy LH, Couvreur P. Nanotechnology for therapy and imaging of liver diseases. *J. Hepatol.* 2011;55:1461–6.
44. Kateb B, Van Handel M, Zhang L, Bronikowski MJ, Manohara H, Badie B. Internalization of MWCNTs by microglia: Possible application in immunotherapy of brain tumors. *Neuroimage.* 2007;37, Supplement 1:S9–S17.
45. VanHandel M, Alizadeh D, Zhang L, Kateb B, Bronikowski M, Manohara H, et al. Selective uptake of multi-walled carbon nanotubes by tumor macrophages in a murine glioma model. *J. Neuroimmunol.* 2009;208:3–9.
46. Zhao D, Alizadeh D, Zhang L, Liu W, Farrukh O, Manuel E, et al. Carbon Nanotubes Enhance CpG Uptake and Potentiate Anti-Glioma Immunity. *Clin. Cancer Res.* 2011;17:771–82.
47. Alizadeh D, Zhang L, Hwang J, Schluep T, Badie B. Tumor-associated macrophages are predominant carriers of cyclodextrin-based nanoparticles into gliomas. *Nanomedicine.* 2010;6:382–90.
48. Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer.* 2000;88:2961–78.
49. Gazzaniga S, Bravo AI, Guglielmotti A, van Rooijen N, Maschi F, Vecchi A, et al. Targeting tumor-associated macrophages and inhibition of MCP-1 reduce angiogenesis and tumor growth in a human melanoma xenograft. *J. Invest. Dermatol.* 2007;127:2031–41.
50. Hiraoka K, Zenmyo M, Watari K, Iguchi H, Fotovati A, Kimura YN, et al. Inhibition of bone and muscle metastases of lung cancer cells by a decrease in the number of monocytes/macrophages. *Cancer Sci.* 2008;99:1595–602.
51. Zeisberger SM, Odermatt B, Marty C, Zehnder-Fjällman AHM, Ballmer-Hofer K, Schwendener RA. Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach. *Br. J. Cancer.* 2006;95:272–81.
52. Sharma G, Karmali P, Ramirez M, Xie H, Ruoslahti E, Smith J. Targeting tumor associated macrophages using clodronate-loaded PLGA nanoparticles. *Nanotechnology. NSTI;* 2010. p. 382–5.
53. Fogal V, Zhang L, Krajewski S, Ruoslahti E. Mitochondrial/cell-surface protein p32/gC1qR as a molecular target in tumor cells and tumor stroma. *Cancer Res.* 2008;68:7210–8.
54. Smith J, Sharma G. TARGETING TUMOR ASSOCIATED MACROPHAGES USING BISPHOSPHONATE-LOADED PARTICLES [Internet]. 2011 [cited 2013 May 3]. Available from: <http://www.freepatentsonline.com/y2011/0311616.html>

55. Wang Z, Yu Y, Ma J, Zhang H, Zhang H, Wang X, et al. LyP-1 modification to enhance delivery of artemisinin or fluorescent probe loaded polymeric micelles to highly metastatic tumor and its lymphatics. *Mol. Pharm.* 2012;9:2646–57.
56. Yan Z, Wang F, Wen Z, Zhan C, Feng L, Liu Y, et al. LyP-1-conjugated PEGylated liposomes: a carrier system for targeted therapy of lymphatic metastatic tumor. *J. Control. Release.* 2012;157:118–25.
57. Luo Y, Zhou H, Krueger J, Kaplan C, Lee S-H, Dolman C, et al. Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer. *J. Clin. Invest.* 2006;116:2132–41.
58. Kim TH, Jin H, Kim HW, Cho M-H, Cho CS. Mannosylated chitosan nanoparticle-based cytokine gene therapy suppressed cancer growth in BALB/c mice bearing CT-26 carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.* 2006;5:1723–32.
59. Park S, Kang S, Chen X, Kim EJ, Kim J, Kim N, et al. Tumor suppression via paclitaxel-loaded drug carriers that target inflammation marker upregulated in tumor vasculature and macrophages. *Biomaterials.* 2013;34:598–605.
60. Etzerodt A, Maniecki MB, Graversen JH, Møller HJ, Torchilin VP, Moestrup SK. Efficient intracellular drug-targeting of macrophages using stealth liposomes directed to the hemoglobin scavenger receptor CD163. *J. Control. Release.* 2012;160:72–80.
61. Briones E, Isabel Colino C, Lanao JM. Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells. *J. Control. Release.* 2008;125:210–27.
62. Torrado J, Espada R, Ballesteros M p., Torrado-Santiago S. Amphotericin B formulations and drug targeting. *J. Pharm. Sci.* 2008;97:2405–25.
63. Gaspar R, Opperdoes FR, Pr eat V, Roland M. Drug targeting with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: in vitro activity of primaquine-loaded nanoparticles against intracellular *Leishmania donovani*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1992;86:41–9.
64. Rodrigues JM Jr, Croft SL, Fessi H, Bories C, Devissaguet JP. The activity and ultrastructural localization of primaquine-loaded poly (d,l-lactide) nanoparticles in *Leishmania donovani* infected mice. *Trop. Med. Parasitol.* 1994;45:223–8.
65. Salem II, Flasher DL, D uzg neş N. Liposome-encapsulated antibiotics. *Meth. Enzymol.* 2005;391:261–91.
66. Skidan IN, Gel'perina SE, Severin SE, Guliaev AE. [Enhanced activity of rifampicin loaded with polybutyl cyanoacrylate nanoparticles in relation to intracellularly localized bacteria]. *Antibiot. Khimioter.* 2003;48:23–6.
67. Pinto-Alphandary H, Balland O, Laurent M, Andremont A, Puisieux F, Couvreur P. Intracellular visualization of ampicillin-loaded nanoparticles in peritoneal macrophages infected in vitro with *Salmonella typhimurium*. *Pharm. Res.* 1994;11:38–46.
68. Sch afer V, von Briesen H, Andreesen R, Steffan AM, Royer C, Tr oster S, et al. Phagocytosis of nanoparticles by human immunodeficiency virus (HIV)-infected macrophages: a possibility for antiviral drug targeting. *Pharm. Res.* 1992;9:541–6.
69. Bender A, Schfer V, Steffan AM, Royer C, Kreuter J, R ubsamen-Waigmann H, et al. Inhibition of HIV in vitro by antiviral drug-targeting using nanoparticles. *Res. Virol.* 1994;145:215–20.
70. L obenberg R, Araujo L, von Briesen H, Rodgers E, Kreuter J. Body distribution of azidothymidine bound to hexyl-cyanoacrylate nanoparticles after i.v. injection to rats. *J. Control. Release.* 1998;50:21–30.
71. L obenberg R, Kreuter J. Macrophage targeting of azidothymidine: a promising strategy for AIDS therapy. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 1996;12:1709–15.

72. Hillaireau H, Le Doan T, Appel M, Couvreur P. Hybrid polymer nanocapsules enhance in vitro delivery of azidothymidine-triphosphate to macrophages. *J. Control. Release.* 2006;116:346–52.
73. Dou H, Destache CJ, Morehead JR, Mosley RL, Boska MD, Kingsley J, et al. Development of a macrophage-based nanoparticle platform for antiretroviral drug delivery. *Blood.* 2006;108:2827–35.
74. Dou H, Grotepas CB, McMillan JM, Destache CJ, Chaubal M, Werling J, et al. Macrophage delivery of nanoformulated antiretroviral drug to the brain in a murine model of neuroAIDS. *J. Immunol.* 2009;183:661–9.
75. Madsen SJ, Baek S-K, Makkouk AR, Krasieva T, Hirschberg H. Macrophages as cell-based delivery systems for nanoshells in photothermal therapy. *Ann. Biomed. Eng.* 2012;40:507–15.
76. Baek S-K, Makkouk AR, Krasieva T, Sun C-H, Madsen SJ, Hirschberg H. Photothermal treatment of glioma; an in vitro study of macrophage-mediated delivery of gold nanoshells. *J. Neurooncol.* 2011;104:439–48.
77. James WD, Hirsch LR, West JL, O’Neal PD, Payne JD. Application of INAA to the build-up and clearance of gold nanoshells in clinical studies in mice. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 2007;271:455–9.
78. Choi M-R, Bardhan R, Stanton-Maxey KJ, Badve S, Nakshatri H, Stantz KM, et al. Delivery of nanoparticles to brain metastases of breast cancer using a cellular Trojan horse. *Cancer Nanotechnol.* 2012;3:47–54.

Chapitre II :
Vitamine A : nouvelles applications
par vectorisation

Chapitre II. Vitamine A : nouvelles applications par vectorisation

La vitamine A et ses dérivés, rassemblés sous le terme de rétinoïdes (en référence à l'action au niveau de la rétine), sont des éléments nutritionnels importants. Ils jouent des rôles significatifs dans de nombreux processus (vision, mémoire, reproduction, etc...) et assurent un bon fonctionnement du système immunitaire ainsi que la prolifération et la différenciation cellulaire. De nombreuses études reportées dans la littérature démontrent l'intérêt thérapeutique des rétinoïdes avec toutefois des limites dans leur utilisation liées à la survenue d'effets secondaires et à leur forte instabilité. Dans ce chapitre, seront décrites les fonctions biologiques des rétinoïdes ainsi que leurs utilisations thérapeutiques. L'optimisation de l'efficacité thérapeutique des rétinoïdes via l'utilisation de la vectorisation sera ensuite détaillée.

II.1. Généralités

La vitamine A est une vitamine liposoluble représentée par plus de 4000 molécules naturelles et synthétiques rassemblées sous le terme de *rétinoïdes*. La seule source de vitamine A est l'alimentation où elle est présente sous forme de rétinol (R-OH), d'esters de rétinol et de β -carotènes (provitamine A). Après l'absorption intestinale, la forme alcool (rétinol) dans le sang se lie aux protéines porteuses (RBP Retinol Binding Protein) et est stockée dans le foie, le rein et les tissus adipeux sous forme d'esters. En cas de besoin, une hydrolyse des esters de rétinol stockés libérera de nouveau le rétinol. Le rétinol libéré dans la circulation sanguine pénètre dans les cellules où une oxydation par l'alcool déshydrogénase (ADH) transforme le rétinol en rétinal (RAL). La deuxième oxydation, irréversible, est catalysée par la rétinaldéhyde déshydrogénase (RALD) pour donner l'acide *tout-trans* rétinoïque (atRA) qui est un ligand des récepteurs à l'acide rétinoïque (Figure 9). Une isomérisation enzymatique donne d'autres rétinoïdes naturels (*9-cis*, *13-cis*, *11-cis*) (1).

Figure 9 : Métabolisme et mécanisme d'action de l'acide rétinoïque (2).

La structure chimique des rétinoïdes se compose d'un groupement cyclique et d'un groupement polaire séparés par une chaîne isoprénique. Cette chaîne isoprénique donne aux rétinoïdes leur caractère lipophile, leur couleur (orange, jaune et rouge) et leur faible stabilité.

La structure particulière de chaque molécule est liée à la fonction du groupe polaire (alcool, aldéhyde ou acide) et à la configuration des doubles liaisons (*cis* ou *trans*) ce qui détermine une certaine spécificité d'activité. En considérant la structure chimique, les rétinoïdes sont classées en trois générations : i) rétinol, rétinol, acide *tout-trans* rétinol (trétinoïne, atRA), acide-13-*cis* rétinol (isotrétinoïne) et acide-9-*cis* rétinol (alitrétinoïne) (Figure 10) ; ii) étrétinate et acitrétine ; et iii) tazarotène, bexarotène et adapalène. La première et la seconde générations peuvent activer tous les récepteurs des rétinoïdes contrairement à la troisième génération qui possède une activité sélective (3).

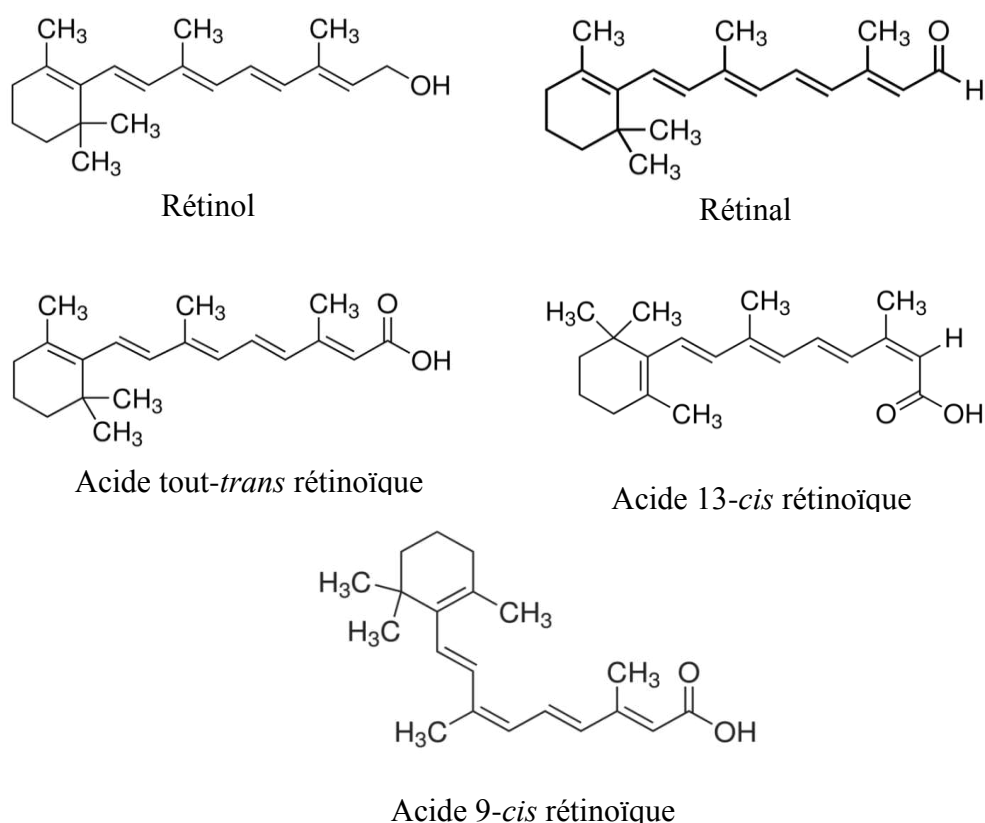


Figure 10 : Formule chimique des rétinoïdes naturels

Dans les conditions physiologiques normales, l'acide rétinol (RA) est présent en faible concentration dans le sang. Le RA formé au niveau intracellulaire se lie dans le cytoplasme à des récepteurs protéiques (CRABP). Ces récepteurs cytoplasmiques contrôlent le transport du RA au noyau et maintiennent l'équilibre entre RA libre et lié. Dans le noyau, deux types de récepteurs nucléaires sont spécifiques du RA : le récepteur à l'acide rétinol (RAR) qui est activé par l'atRA et le 9-*cis* RA, le récepteur-X rétinol (RXR) qui est

uniquement activé par le 9-*cis* RA. Les récepteurs nucléaires aux rétinoïdes appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires stéroïdiens/hormones thyroïdiennes/vitamine D. Les deux types de récepteur possèdent trois sous-types α , β et γ avec une distribution tissulaire différente. Ils agissent sous forme d'hétérodimère RAR-RXR ou homodimère RXR-RXR se fixant sur l'ADN au niveau les éléments de réponse RARE ou RXRE et activant des séquences promotrices des gènes cibles.(4). Tous les rétinoïdes de synthèse peuvent se lier aux CRABP, avec une affinité plus au moins grande ainsi qu'aux récepteurs nucléaires, ce qui leur permettent d'influencer leur propre activité (3).

II.2. Fonctions biologiques et utilités thérapeutiques des rétinoïdes

La présence des récepteurs à l'acide rétinoïque dans les différents tissus indique leur importance dans plusieurs processus biologiques. Les rétinoïdes sont utilisés dans le traitement de différentes maladies comme les cancers, certaines maladies inflammatoires ou maladies auto-immunes.

II.2.1. Rétinoïdes et Cancer

Le potentiel chimiothérapeutique ou chimiopréventif des rétinoïdes est largement décrit dans la bibliographie. La voie de signalisation via RAR régule l'expression de gènes cibles responsables de la différenciation, de la prolifération, de l'apoptose et de l'oxydation de différents types cellulaires (5). Des études ont montré qu'une altération de l'expression de RAR ou RXR peut être associée à une transformation maligne chez l'animal. De plus, il a été rapporté qu'un manque d'expression de RAR β était impliqué dans certaines hémopathies malignes et dans la progression des tumeurs solides (6). Un déficit en vitamine A est souvent associé avec un haut risque de cancer. De plus, la suppression de carcinogénèse par les rétinoïdes est bien documentée chez des animaux porteurs de différents modèles tumoraux (peau, poumon, sein, ovarien et prostate) (7). Les actions anticancéreuses des rétinoïdes sont présentées en Figure 11.

Figure 11 : Action des rétinoïdes sur différents stades de tumorigénèse (6). a : blocage l'étape d'initiation (cancérogénèse chimique), b : induction d'une différenciation, c : blocage du cycle cellulaire en G1, d : action apoptotique sur cellules matures (cellules myéloïdes), e : action apoptotique sur cellules prématurées, f : effet synergique avec une chimiothérapie.

L'acide *tout-trans* rétinoïque (atRA) est utilisé dans plusieurs études cliniques pour le traitement de lymphomes, leucémies, mélanomes, cancers du poumon, cancers du rein, neuroblastomes et glioblastomes (7). Des bons résultats ont été obtenus dans le traitement de la leucémie promyélocytaire aiguë (APL) où les cellules sont caractérisées par une surexpression des protéines de fusion contenant un ligand de RAR α qui inhibe ainsi son action (8). En 1995, la FDA a approuvé le traitement d'APL par 45 mg/m²/jour d'atRA pour sa capacité d'induire une différenciation et d'inhiber la prolifération cellulaire (9). Plusieurs effets secondaires critiques pouvant mettre le pronostic vital des patients ont été observés pendant le traitement comme des dyspnées, de la fièvre, des hypotensions et des infiltrations pulmonaires avec hyperleucocytose. Ces effets sont spécifiques du traitement des APL et sont connus sous le terme de syndrome de l'acide rétinoïque (ou RAS). Une administration de dexaméthasone et l'arrêt temporaire de l'atRA peuvent améliorer la situation du patient (10).

Le 9-*cis* RA a aussi été approuvé par la FDA pour le traitement de tumeurs cutanées (syndrome de Kaposi) (11). Il a de plus montré un effet sur l'apoptose de cellules malignes de cancer du foie (12). Le 13-*cis* RA présente aussi un intérêt clinique notamment dans le traitement des tumeurs de la thyroïde comme agent de différenciation (13) ainsi que dans le traitement de neuroblastomes (14).

Des rétinoïdes synthétiques ont été développés pour améliorer leur efficacité et leur spécificité anticancéreuses. La N-(4-hydroxyphenyl) rétinamide (Fenrétinide), un dérivé prometteur, inhibe l'angiogenèse et induit l'apoptose en générant un dérivé réactif de l'oxygène. Ses propriétés chimiopréventives et chimiothérapeutiques ont été bien étudiées sur des modèles animaux. Des essais cliniques ont aussi été conduits, notamment sur des patients atteints de cancers de la prostate, du sein et de l'ovaire (15). D'autres rétinoïdes de troisième génération comme le Bexarotène et le Tazarotène possèdent aussi une activité sur différents cancers (7).

II.2.2. Rétinoïdes comme immunomodulateurs

Les rétinoïdes jouent un rôle important au sein du système immunitaire et peuvent interagir dans plusieurs processus immunitaires. Ce rôle est le résultat de plusieurs observations. Des études ont montré que les taux de vitamine A sont fréquemment élevés chez les centenaires en bonne santé, ce qui suggère un rôle protecteur dans le système immunitaire des rétinoïdes (16). Il a été prouvé que la supplémentation en vitamine A

augmentait la résistance du corps humain contre les maladies infectieuses où le rôle des lymphocytes T et B est crucial. Un grand nombre d'études expérimentales ont aussi permis d'identifier plusieurs mécanismes moléculaires qui gèrent les effets bénéfiques des rétinoïdes dans les troubles du système immunitaire (17).

Les effets du RA sur l'activation et la fonction des monocytes/macrophages sont bien étudiés. Le RA inhibe la production de cytokines responsables d'une réponse inflammatoire comme le facteur de nécrose tumorale (TNF), l'Interleukine-12 (IL-12) et le monoxyde d'azote (NO) dans les macrophages activés. De plus, le RA favorise la sécrétion par les macrophages de cytokines tolérogènes comme l'IL-10 (18). Le RA est donc capable de moduler la réponse des macrophages activés dans un microenvironnement pour réorienter la réponse immunitaire du type Th1 (lymphocytes T auxiliaires 1) inflammatoire vers un type Th2 régulateur (19)

Les effets des rétinoïdes sur les cellules dendritiques (DC) ont été aussi étudiés et présentent une variance selon les conditions expérimentales et le type de DC. Le RA en présence de cytokines inflammatoires augmente l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH II) et de molécule de co-stimulation CD86 sur les DC dérivées des monocytes. Le RA participe ainsi avec d'autres signaux inflammatoires à l'amélioration de la présentation d'antigènes par les DC. Ses effets sont exercés via la signalisation RAR α /RXR (20).

L'action du RA sur la migration des DC a aussi été étudiée par Darmanin *et al.* montrant que le RA provoque la migration des DC du site tumoral vers les ganglions lymphatiques, favorisant la présentation d'antigènes et l'initiation d'une réponse immunitaire contre la tumeur (21). De plus, en se basant sur des observations chez des patients atteints de cancer traités par le RA, des auteurs ont supposé qu'il était possible que le RA module les fonctions des DC pour induire une réponse Th1 contre le cancer (22). Néanmoins des études complémentaires sont nécessaires pour clarifier la complexité des interactions existant entre le RA et les DC.

Le rôle du RA sur les lymphocytes T est d'améliorer la prolifération des lymphocytes T régulateurs et d'inhiber la différenciation de Th17 (impliqué dans les maladies auto-immunes) (23). Un déficit en RA favorise la réponse Th1/Th17 alors qu'un taux normal en RA engendre le développement de lymphocytes T régulateurs et prévient ainsi les maladies auto-immunes (17).

L'activité immunomodulatrice de la vitamine A a été largement décrite dans plusieurs maladies inflammatoires et auto-immunes. Le RA a été utilisé avec succès chez des patients souffrant de néphropathie lupique (24). De plus, des études épidémiologiques suggèrent que la vitamine A ou D peut être bénéfique dans la prévention de diabète type 1 chez les personnes présentant un risque élevé (25,26). Enfin l'utilisation potentielle du RA dans le traitement de la sclérose en plaques est en cours d'investigation. Un tel traitement serait basé sur la capacité du RA à générer une réponse Th2 contre la protéine basique de la myéline reconnu comme auto-antigène impliqué dans la réaction auto-immune de la sclérose en plaques (27).

II.2.3. Applications topiques des rétinoïdes

Les rétinoïdes sont largement utilisées par voie topique dans le traitement de différents troubles cutanés tels que l'acné, le psoriasis, le cancer de la peau et le photovieillessement (28). L'atRA présente de nombreuses activités épidermiques comme la modulation de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes. Des effets dermiques ont aussi été décrits comme la stimulation des fibroblastes et de la collagénosynthèse (28). Dans le traitement de l'acné, l'atRA augmente la prolifération et modifie la différenciation et la desquamation des cellules épithéliales du follicule pilosébacé (29).

Du fait du très faible passage systémique des rétinoïdes après une application topique, leur utilisation n'engendre pas de toxicité systémique (30). Néanmoins, l'utilisation topique de l'atRA est suivie d'une forte incidence d'effets secondaires tels que l'irritation cutanée et la photosensibilité. De plus, la forte instabilité de l'atRA en présence d'O₂, de la lumière et de la chaleur rend la dose appliquée inactive (29).

II.3. Encapsulation des rétinoïdes

Les intérêts thérapeutiques des rétinoïdes sont nombreux et leurs utilisations dans le traitement de différentes pathologies sont en développement. Cependant, les propriétés physico-chimiques et le profil pharmacocinétique, notamment pour les rétinoïdes naturels, limitent leur utilisation thérapeutique. La plupart des rétinoïdes sont des molécules insolubles ou très peu solubles dans l'eau (31). Du fait de la présence d'une chaîne isoprénique, ils sont sensibles à l'oxydation, à la chaleur ainsi qu'à la photoisomérisation (32). L'instabilité des rétinoïdes naturels a notamment été démontrée lors d'études de différenciation cellulaire *in*

vitro par une diminution de leur concentration au cours du temps et une isomérisation *cis-trans* (33). De plus, l'utilisation clinique des rétinoïdes est associée avec une diminution rapide de leurs taux sériques après administration par voies orale ou intraveineuse (34) et plusieurs effets secondaires comme des phénomènes d'irritation cutanée et le syndrome d'acide rétinoïque sont fréquemment observés (10).

Le développement de formulations galéniques innovantes pour l'administration des rétinoïdes a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années. Ces travaux visent à réduire les effets secondaires liés aux traitements par les rétinoïdes et à améliorer leur activité thérapeutique. Des systèmes innovants comme les nanoparticules, les liposomes, les cyclodextrines et les niosomes ont été décrits dans la littérature pour l'administration d'acide rétinoïque afin d'améliorer sa stabilité chimique, sa solubilité voire son efficacité (35,36). Ces différents travaux de recherche portant sur l'encapsulation des rétinoïdes et notamment de l'acide rétinoïque sont présentés ci-dessous.

II.3.1. Liposomes

En 1990, Nastruzzi *et al.* ont préparé des liposomes d'atRA afin d'améliorer son utilisation en thérapie anticancéreuse. Les liposomes à base de lécithine d'œuf présentent une efficacité d'encapsulation en atRA de 95% et une activité antiproliférative sur des cellules K562 leucémiques 350 fois supérieure que l'atRA non-encapsulé (37). D'autres liposomes d'atRA ont été testés sur des lignées de mélanome sans observer de différences au niveau dose-réponse mais les liposomes présentaient une réponse plus stable que la solution d'atRA de référence dans le DMSO (38). Le même type d'observation a été fait sur un modèle de carcinomes épidermoïdes (39).

Afin d'améliorer l'utilisation d'atRA dans le traitement de leucémies promyélocyaires aiguës (APL), Drach *et al.* ont développé des liposomes d'atRA afin de proposer une forme injectable d'atRA peut remplacer la forme orale déjà utilisée. Les liposomes testés sur des lignées de leucémies promyélocyaires (HL-60, KG-1 et THP-1) ont montré une activité similaire sur la différenciation cellulaire sur chaque lignée (40). De plus, une étude préclinique sur des rats visant à comparer l'effet des liposomes au traitement oral a montré que les liposomes permettaient de prolonger les effets de l'atRA grâce à la diminution de sa métabolisation hépatique (41). Enfin une étude clinique phase I sur 48 patients a été réalisée pour comparer les pharmacocinétiques des deux formes montrant qu'une administration IV de

15 mg/m² d'atRA sous forme de liposomes donnait une aire sous la courbe (AUC area under the curve) plus élevée qu'une administration de 45 mg/m² d'atRA par voie orale. Cette étude a testé différentes doses d'atRA (15 à 175 mg/m²) sous forme de liposomes et la dose de 140 mg/m² a été considérée comme la dose maximale tolérée (42). Une étude de phase II réalisée sur 69 patients en utilisant une dose de 90 mg/m² de liposomes d'atRA (ATRAGEN®, Aronex Pharmaceuticals), a montré une rémission complète de 87% des patients nouvellement diagnostiqués (43). Cette formulation a été testée en phase II pour le traitement de tumeurs cutanées (syndrome de Kaposi) chez 76 patients immunodéprimés avec une ou trois doses hebdomadaires de 60, 90 ou 120 mg/m². Ce traitement a permis de stabiliser l'évolution de la tumeur, toutefois une meilleure efficacité a été démontrée avec l'administration de trois doses par semaine (44).

Des liposomes d'atRA chargés positivement (dipalmitoylphosphatidylcholine et stéarylamine) ont été formulés en aérosol (diamètre moyen ~300 nm) pour le traitement des cancers du poumon. Ces liposomes ont été testés *in vivo* sur des souris. Les liposomes ont permis le maintien d'une concentration efficace en atRA dans les poumons des souris avec aucune trace dans le sang ou de toxicité pulmonaire (45). D'autres types de liposomes cationiques d'atRA ont été proposés afin de traiter les carcinomes du poumon non à petites cellules présentant une résistance à l'atRA. Kawakami *et al.* ont notamment développé des liposomes de DOTAP (1,2 dioleoyl-3-triméthylammonium propane)/cholestérol d'une taille de 130 nm, avec un potentiel zeta de +50 mV et une efficacité d'encapsulation en atRA de 95%. L'amélioration du ciblage intracellulaire des liposomes cationiques a été mise en évidence *in vitro* sur la lignée A549 grâce à l'utilisation d'atRA tritié. Sur cette lignée, une réduction de la viabilité cellulaire a pu être observée en administrant 1 µM d'atRA encapsulé dans les liposomes cationiques alors qu'aucun ou un très faible impact de l'atRA libre ou encapsulé dans des liposomes neutres a été mis en évidence (46). De plus, l'injection intraveineuse de ces liposomes cationiques (0,585 mg/kg d'atRA) a montré une bonne accumulation dans les poumons. Ces liposomes ont ensuite été testés sur un modèle de métastase pulmonaire chez la souris montrant une diminution significative du nombre de nodules tumoraux (47).

De nombreuses études ont notamment été décrites sur l'utilisation des liposomes d'atRA en application cutanée en vue de prolonger son effet ou d'améliorer sa stabilité. En 1993, une première étude a montré que les liposomes étaient capables de concentrer l'atRA dans l'épiderme et le derme en évitant son absorption systémique (48). En 2001, Brisaert *et al*

ont étudié l'influence des paramètres de formulation sur les caractéristiques de liposomes d'atRA en vue d'une application topique pour le traitement de l'acné. La formule retenue contenait 300 mg phosphatidylecholine/cholestérol (72/28) encapsulant 2 mg d'atRA. L'atRA encapsulé est resté stable chimiquement pendant au moins 3 mois à 25°C en présence d'antioxydant (α -Tocophérol). L'étude de la photostabilité de l'atRA sous lampe à xénon a montré que les liposomes permettaient une protection de l'atRA plus efficace que l'huile de ricin (49). D'autres études de photostabilité ont permis de confirmer ces résultats avec des liposomes d'atRA et de 13-*cis* RA. Ioele *et al* ont effectivement comparé ces deux formulations liposomales à des solutions éthanoliques d'atRA et 13-*cis* RA. Les liposomes ont augmenté la stabilité d'atRA d'environ douze fois en comparaison avec sa solution éthanolique, sous une puissance lumineuse de 250 W/m². L'efficacité photoprotectrice des liposomes sur le 13-*cis* RA s'est avérée moins bonne, probablement à cause de sa faible inclusion dans les liposomes en raison de sa structure non linéaire (50).

L'influence de paramètres de formulation sur l'encapsulation et la pénétration d'atRA a été testée par Sinico *et al.* (51) en variant la composition, la taille, la lamellarité et la charge des liposomes. Des liposomes multilamellaires (MLV) et unilamellaires (ULV) ont été préparés en utilisant deux types commerciaux de phosphatidylcholine de soja, hydrogéné (P90H) et non hydrogéné (P90) pour étudier l'effet de la température de transition de phase des liposomes. Pour modifier la charge de surface des liposomes, de la stéarylamine (SA) et du dicétylphosphate (DCP) ont été ajoutés aux phospholipides afin d'obtenir des liposomes cationiques et anioniques, respectivement. Les DCP-MLV présentaient une meilleure encapsulation de l'atRA que les SA-MLV, cependant l'inverse a pu être constaté pour les ULV. Cela peut s'expliquer par un besoin plus important d'énergie pour la formation des SA-MLV. Les liposomes négatifs libèrent atRA plus rapidement en raison de l'ionisation d'atRA à pH 7, la forme ionisée a donc plus d'affinité pour les liposomes chargés positivement. Les tests de pénétration cutanée sur cellules de Franz ont montré que les liposomes positifs accélèrent la pénétration, que les liposomes négatifs améliorent fortement la rétention dans la peau et qu'il n'y avait pas d'effet de la taille ou de la lamellarité sur la pénétration de l'atRA (51). Par ailleurs, Kitagawa *et al.* ont montré au cours d'une autre étude que les liposomes cationiques composés de DOTAP/phosphatidylcholine/atRA (2:2:1) augmentaient l'incorporation dans la peau 3,7 fois comparés à des liposomes neutres, en soulignant l'importance de la charge de surface sur la pénétration cutanée d'atRA (52).

L'idée d'utiliser les liposomes d'atRA comme agent immunomodulateur a été proposée et testée sur un modèle d'asthme (53) ou en adjuvant de vaccination (54). Ces études n'ont néanmoins pas donné de résultats probants et nécessitent plus d'investigations afin de démontrer le potentiel immunomodulateur de cette forme.

II.3.2. Niosomes

Les niosomes sont des structures vésiculaires composés de bicouches de tensioactifs nonioniques contenant éventuellement du cholestérol. Ils peuvent être sous forme unilamellaires ou multilamellaires. Les niosomes présenteraient une meilleure stabilité que les liposomes ainsi qu'un moindre coût (55). L'encapsulation d'atRA dans les niosomes a été étudiée par l'équipe de Fadda en vue d'une application cutanée (55–57). Ils ont notamment réalisé une étude de formulation détaillée en utilisant plusieurs types de surfactants (sorbitan monopalmitate, sorbitan monostéarate, polyoxyéthylène(4)lauryl éther et alkylpolyglucoside), du cholestérol et du dicétylphosphate comme stabilisants ainsi que différentes techniques de formation des niosomes (méthode du film, sonication et extrusion). L'incorporation d'atRA au sein des niosomes, quelle que soit leur composition, provoque une diminution significative de leur taille par rapport aux niosomes non chargés. L'efficacité d'encapsulation en atRA est élevée, d'environ 91 à 99% pour les niosomes multilamellaires. Les études de libération sur les cellules de diffusion de Franz ont montré une libération plus rapide de l'atRA à partir des niosomes qu'à partir d'une solution méthanolique (55).

Les auteurs ont par la suite mené des études complémentaires afin de déterminer l'effet des niosomes sur la photostabilité de l'atRA en comparaison avec une solution méthanolique d'atRA et de liposomes. Après une irradiation UV, une bonne protection de l'atRA par les niosomes a été observée mais celle-ci dépend de la structure et de la composition des niosomes. Les niosomes préparés avec polyoxyéthylène(4) lauryl éther ou alkylpolyglucoside diminuent la photodégradation de l'atRA de façon significative (56).

L'influence de l'encapsulation dans des niosomes de l'atRA sur sa pénétration cutanée a aussi été évaluée en utilisant des niosomes à base d'alkylpolyglucosides. Pour modifier la charge de surface des liposomes, de la stéarylamine (SA) et du dicétylphosphate (DCP) ont été ajoutés afin d'obtenir des niosomes cationiques et anioniques, respectivement. En accord avec ce qui a été observé pour les liposomes, les niosomes cationiques augmentent la pénétration cutanée de l'atRA alors que les niosomes anioniques entraînent une accumulation

d'atRA (57). Les niosomes apparaissent donc comme un vecteur intéressant d'atRA pour une application cutanée.

Une autre approche, initiée par Desai *et al.*, serait d'administrer des niosomes d'atRA sous forme d'aérosol afin de cibler le cancer du poumon. Différents agents tensio-actifs non ioniques ont été testés pour optimiser l'encapsulation et l'efficacité de la nébulisation. Les deux meilleures formulations étaient une combinaison Span[®]20/Tween[®]80 et une combinaison Span[®]60/Tween[®]80 avec 1 mg/ml d'atRA. L'efficacité de capture des niosomes après nébulisation était effectivement bien supérieure à 50% pour ces deux formulations. Ces résultats montrent ainsi le potentiel des aérosols de niosomes pour l'administration pulmonaire d'atRA (58).

II.3.3. Nanoparticules lipidiques solides

Les nanoparticules lipidiques solides (SLN) sont des systèmes d'encapsulation composés d'une matrice lipidique stabilisée par des tensioactifs. Du fait de leur nature chimique, les SLN présentent un intérêt pour l'encapsulation de principes actifs lipophiles comme par exemple les rétinoïdes.

Jenning *et al.* ont préparé des SLN à base de glyceryl behenate pour l'encapsulation de rétinol en vue d'une application topique. Le rétinol en application cutanée est à l'origine d'effets secondaires type irritations et intolérance cutanée ; la mise d'une forme encapsulée de rétinol à libération prolongée permettrait ainsi de limiter ces effets indésirables. Les auteurs ont montré que la libération du rétinol était lente pendant les 6 premières heures puis rapide entre 12 et 24h. L'incorporation des SLN de rétinol dans un gel ou une crème permet d'obtenir une libération contrôlée jusqu'à 18 h. Par ailleurs, l'influence de la transition polymorphique des lipides sur le profil de libération du principe actif a été étudiée, montrant que la diminution de la forme amorphe augmentait la libération (59). Une étude de pénétration cutanée du rétinol encapsulé dans les SLN a été réalisée sur une peau de porc en cellule de Franz. Après 6 h le rétinol s'est accumulé dans les couches superficielles de la peau. Cette accumulation a diminué après 24 h, ceci est dû à la transition polymorphique des lipides et à la libération du rétinol des SLN (60). Pour mieux comprendre l'influence des paramètres de formulation sur l'incorporation des dérivés de la vitamine A dans les SLN, différents lipides et trois rétinoïdes ont été testés. Le glyceryl behenate a permis une encapsulation supérieure à celle du tripalmitate, du cetyl palmitate ou de la paraffine. De plus,

l'encapsulation augmente avec la diminution de la polarité de la molécule (trétinoïne < rétinol < rétinol palmitate). Enfin les essais de diffraction des rayons X ont révélé qu'une bonne encapsulation pouvait être corrélée avec un faible degré de cristallinité des lipides (61).

Patravale *et al.* ont utilisé la méthode d'émulsification-diffusion de solvant pour la préparation de SLN d'atRA en testant différents lipides. Les SLN de glycéryl monostéarate ont été sélectionnées du fait la bonne solubilité de l'atRA dans glycéryl monostéarate. L'efficacité d'encapsulation était modérée (50%) à cause de la partition de l'atRA entre les lipides et le solvant utilisé (benzyle alcool). L'encapsulation de l'atRA a amélioré significativement sa photostabilité par rapport à la solution méthanolique. Le gel préparé avec ces SLN d'atRA est nettement moins irritant pour la peau par rapport à la crème commercialisée (Retino-A cream) sans différence notable sur la pénétration cutanée (62).

Castro *et al.* ont encapsulé l'atRA dans des SLN de glycéryl behenate avec un faible pourcentage de tensioactifs. Ces SLN présentent une taille moyenne proche de 500 nm et une charge d'atRA de 1%. L'ajout d'un co-surfactant aminé (stéarylamine) améliore l'efficacité d'encapsulation jusqu'à 93 % en formant un couple avec l'atRA. (63). Cette formulation présente une stabilité améliorée, une diminution d'irritation cutanée (64) et une bonne efficacité comédolytique (65).

En outre, les SLN d'atRA ont aussi été utilisées en vue une application anticancéreuse. Lim *et al.* ont étudié l'influence des paramètres de formulation sur les propriétés physicochimiques de SLN de tricaprin (tricaprate glycerol) chargés en atRA. Ils ont notamment étudié l'influence des tensioactifs utilisés sur les propriétés des SLN. Ils ont constaté que la taille moyenne des particules diminuait en mélangeant la phosphatidylcholine (PC) et Tween[®] 80 et en augmentant la quantité totale de tensioactifs. Une petite taille (154,9 nm) a été obtenue avec 5% du mélange de tensioactifs contenant 54:46 de PC:Tween80. De plus, l'ajout de distearoylphosphatidylethanolamine-N-poly(éthylène glycol) 2000 (DSPE-PEG) dans le mélange de tensioactifs augmentait le potentiel zêta des SLN. L'incorporation de 2,4% d'atRA dans les SLN n'a pas d'influence sur la stabilité physico-chimique des SLN (66). La lyophilisation des atRA-SLN augmente légèrement la taille et la polydispersité sans modifier leur potentiel zêta ou dénaturer l'atRA encapsulé. En effet, après 3 mois de stockage, plus de 90% d'atRA est retrouvé dans la poudre de SLN lyophilisées. L'encapsulation au sein SLN et la conservation de celles-ci sous forme lyophilisée permet donc d'améliorer considérablement la stabilité chimique de l'atRA. Par ailleurs, les auteurs ont étudié les effets

antiprolifératifs des atRA-SLN sur différentes lignées cellulaires cancéreuses mais n'ont pas pu conclure à une différence significative d'efficacité par rapport à l'atRA libre. En revanche, une réduction significative du potentiel hémolytique de l'atRA a été observée (67). Enfin, la même équipe a testé différentes formulations de SLN pour l'encapsulation du rétinol et a montré que la présence d'antioxydants (butylate hydroxyanisol et butylate hydroxytoluène) permettait d'améliorer nettement la stabilité du rétinol (68).

II.3.4. Systèmes polymères

L'encapsulation des rétinoïdes dans un système polymère a donné le lieu à beaucoup de travaux afin d'améliorer la performance des rétinoïdes dans le traitement de cancer ou en application topique. Différents systèmes sont développés comme des nanoparticules (NP), des microparticules (MP) et des micelles de polymères.

II.3.4.1. Nanoparticules polymères

Jeong *et al.* ont développé des nanoparticules polymères à base d'un copolymère poly(ϵ -caprolactone)/poly(éthylène glycol) (PCL-PEG) encapsulant l'atRA en vue du traitement de tumeurs cérébrales. Selon les conditions utilisées différentes NP ont été obtenues par nanoprécipitation avec une taille variant entre 270 et 458 nm, une charge en atRA encapsulé de 2,2 à 10,5% pour une efficacité d'encapsulation de 68 à 97%. La meilleure efficacité d'encapsulation a été obtenue dans les conditions suivantes : introduction d'une quantité élevée d'atRA, utilisation de l'acétone comme solvant et d'un ratio PCL:PEG élevé dans le copolymère. Le profil de libération de l'atRA a été évalué par la méthode de dialyse dans du PBS renouvelé régulièrement pour assurer les conditions sink. Une libération rapide a eu lieu pour les nanoparticules à base du copolymère de plus bas poids moléculaire et ayant la charge en atRA la plus faible. La cytotoxicité de l'atRA encapsulé contre des lignées cellulaires de gliome (U87MG, U251MG et U343MG) a été évaluée *in vitro* par un test de viabilité cellulaire MTT. Les résultats ont montré que la cytotoxicité était nettement augmentée avec les nanoparticules d'atRA comparativement à la forme libre d'atRA (69).

Cho *et al.* ont développé des nanoparticules d'atRA à base de l'acide poly(L)lactique (PLA). Ces nanoparticules ont ensuite été enrobées par du galactose afin de favoriser le ciblage d'hépatocytes. Les NP de taille 280 nm, encapsulant environ 20% atRA ont présenté *in vitro* une efficacité supérieure à la forme libre (70).

D'autres études ont porté sur le développement de nanoparticules de chitosane de faible poids moléculaire, soluble dans l'eau pour l'encapsulation d'atRA et de rétinol. La formation d'un complexe ionique entre le chitosane et le rétinol, ou l'atRA, a été confirmée par FTIR et RMN. Les nanoparticules ont une taille variant entre 100 et 250 nm selon la quantité de principe actif encapsulé. Le ratio chitosane/principe actif varie entre 50/2 et 50/20 et l'efficacité d'encapsulation entre 60 et 75 % (71,72). Récemment, cette équipe a développé des nanoparticules à base de glycol-chitosane contenant 9,5% d'atRA avec 84% d'efficacité d'encapsulation. Ils ont ainsi montré une nette amélioration de l'efficacité antiproliférative des nanoparticules d'atRA sur un modèle de cholangiocarcinome *in vitro* (73).

Simon *et al.* ont développé des nanoparticules d'atRA à base de PLGA afin d'améliorer les propriétés antiprolifératives de l'atRA dans le traitement de leucémies aiguës myéloïdes. Les nanoparticules d'atRA obtenues ont un diamètre moyen de 200 nm. L'étude a montré que ces nanoparticules étaient efficace pour induire la différenciation et ainsi bloquer la prolifération de cellules de lignée HL-60 (74). De plus, du fait de cette meilleure efficacité, la forme encapsulée peut permettre de diminuer la dose d'atRA à administrer tout en maintenant l'effet thérapeutique.

D'autres formulations de nanoparticules d'atRA ont été développées pour le même type d'application anticancéreuse sur LAM. Des copolymères de PCL/PEG ou PLA/PEG ont notamment été testés pour l'encapsulation d'atRA. Ces nanoparticules ont permis d'améliorer la photostabilité de l'atRA par rapport à la forme libre et aussi d'obtenir une libération contrôlée. En revanche, l'efficacité d'encapsulation de l'atRA demeure relativement faible comparativement aux autres études (30%). L'activité thérapeutique des NP a été testée en évaluant la différenciation cellulaire de la ligné HL-60 montrant une efficacité comparable à celle de l'atRA libre (75).

Narvekar *et al.* ont développé des nanoparticules hybride huile-polymère d'atRA en réalisant une solubilisation préalable de l'atRA dans une huile puis en dispersant cette solution huileuse dans une matrice de l'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA). Ces nanoparticules présentent l'avantage d'améliorer considérablement l'efficacité d'encapsulation en atRA et de ralentir sa libération par rapport aux nanosphères de PLGA (76). De plus ces nanoparticules présentent une meilleure efficacité anticancéreuse de l'atRA que les nanosphères sur une lignée cellulaire de cancer de la prostate.

Récemment d'autres équipes ont développé des nanoparticules d'atRA en vue d'application thérapeutique de maladies neurodégénératives. La polyéthylèneimine a notamment été utilisée en association au PLGA pour réaliser des nanoparticules polymères d'atRA chargées positivement. L'objectif de cette étude est d'améliorer la régénération neuronale en incorporant des nanoparticules encapsulant l'atRA au sein de cellules souches neuronales. Cette étude a permis de montrer une internalisation rapide des nanoparticules au sein des cellules souches *in vitro* tout en échappant à leur activité endosomale ou lysosomale. Cette internalisation a entraîné une nette amélioration de la régénération neuronale montrant ainsi un potentiel d'application de ces nanoparticules d'atRA dans le traitement de maladies neurodégénératives (77).

Ourique *et al.* ont travaillé sur l'encapsulation d'atRA ou 13*cis* RA en vue d'applications topique. Des nanocapsules à base de poly(ϵ -caprolactone) (PCL), d'huile de tournesol ou de triglycérides ont été préparées par nanoprecipitation. Les nanocapsules obtenues avaient une taille d'environ 200 nm avec une très bonne efficacité d'encapsulation >99% pour un charge d'encapsulation d'atRA au sein des particules de 1%. La photodégradation de l'atRA en solution dans du méthanol, sous forme de nanoémulsion ou sous forme de nanocapsules a été évaluée sous radiation UV (30 W) pendant 1 heure. L'encapsulation de l'atRA au sein des nanoparticules a amélioré sa stabilité et prolongé sa demi vie jusqu'à 88 à 95 min contre 40 min pour l'atRA en solution ou 70 à 80 min en nanoémulsion (78). L'incorporation des nanocapsules dans un gel aqueux diminue encore la photodégradation et augmente l'accumulation d'atRA à la surface de la peau (79). Un gel contenant des nanocapsules de 13*cis* RA a présenté des résultats similaires au niveau stabilité et pénétration cutanée (80).

II.3.4.2. Microparticules polymères

Des microsphères d'atRA à base de PLGA sont aussi décrites dans la littérature pour le traitement de gliomes en administration intratumorale (86). Ces microsphères sont préparées par la méthode d'évaporation de solvant. L'influence des différents paramètres de formulation sur la taille, l'efficacité d'encapsulation, et le profil de libération de l'atRA a été étudiée. L'utilisation de 2% d'alcool polyvinylique comme stabilisant est nécessaire pour obtenir des particules sphériques et lisses. La taille varie entre 10 et 100 μ m et l'efficacité d'encapsulation est d'environ 50%. Les microsphères présentent un profil de libération prolongé de l'atRA jusqu'à 30 jours. De plus, l'augmentation de la quantité d'atRA au sein

des particules retarde sa libération du fait de sa recristallisation à l'intérieur des particules (81).

Cirpanli *et al* ont aussi formulé des microsphères d'atRA de 1 à 2 μm de diamètre avec une efficacité d'encapsulation améliorée de 70%. Le profil de libération de l'atRA est caractérisé par une phase rapide durant les 5 premières heures suivie d'une libération plus lente pendant 11 à 13 jours. Cette libération est influencée par la concentration en PVA mais en revanche peu d'influence de la concentration ou du poids moléculaire du polymère a été constaté (82).

II.3.4.3. Micelles polymères

L'atRA a été aussi formulé en micelles polymères afin d'améliorer sa performance et proposer une forme injectable. Kawakami *et al* ont comparé la biodistribution d'atRA encapsulé dans des liposomes (distearoylphosphatidylcholine/cholesterol) à celle d'atRA incorporée dans des micelles polymères (poly(ethylene glycol)/poly(aspartic acid)), montrant que les micelles présentent une plus grande AUC et une faible élimination hépatique. Les micelles polymères ont une taille de 19 nm et une charge de 10% d'atRA avec une efficacité d'encapsulation de 96% et permettent d'obtenir un profil de libération prolongée avec 50% d'atRA libéré après 20 h (83). L'efficacité de ces micelles d'atRA a été évaluée *in vivo* sur un modèle tumoral de cancer du côlon chez la souris. Les micelles favorisent l'accumulation de l'atRA au sein des tumeurs et permettent une forte inhibition de la croissance tumorale (84). Quatre polymères, différant par le groupe fonctionnel de l'acide aspartique (nonyl, benzyl, heptyl et phenylpropyl), ont ensuite été testés pour l'encapsulation de fenrétinide (rétinoïde synthétique). 72% de substitution avec le groupe benzyl est nécessaire pour bien encapsuler la fenrétinide et pour augmenter son taux sanguin après injection IV (85). Les micelles de fenrétinide présentent une nette amélioration de l'activité anti-tumorale après une administration dans un modèle de xénotransgreffe de mélanome (86). En utilisant les mêmes micelles, d'autres rétinoïdes synthétiques (Am80 et LE540) ont été encapsulés. LE540 présente un bon rendement d'encapsulation avec une libération prolongée sur 24h. Pour améliorer l'encapsulation d'Am80, l'ajout d'alkylamine hydrophobe (N,N-dimethyldodecylamine) a été nécessaire afin de faire un couplage avec l'Am80 et d'augmenter son hydrophobicité (87).

Zuccari *et al* ont préparé des micelles de polyvinylalcool-oleyl amine par atomisation d'une solution hydro-alcoolique. Ces micelles d'une taille de 200 à 400 nm, permettent d'améliorer la solubilité d'atRA, notamment pour un ratio atRA:polymère de 1:5 (600 µg/ml atRA) et de contrôler la libération de l'atRA. De plus, l'activité anticancéreuse contre le neuroblastome a été améliorée par les micelles (88). Une autre modification sur l'alcool polyvinylique par une estérification avec un groupement nicotinoyl a été apportée afin d'optimiser la charge d'encapsulation en atRA par complexion dans les micelles. Une corrélation entre le degré de substitution du PVA et la quantité d'atRA encapsulée a été observée (charge en atRA de 4,76% pour 15,3% de substitution). Ces micelles permettent d'augmenter la solubilité de l'atRA jusqu'à 1,2 mg/ml dans l'eau et d'améliorer son activité antiproliférative contre le neuroblastome (89). L'équipe a aussi testé un autre copolymère pour la formation des micelles de fenrétinide. Il s'agit de l'alkyl-polyethylene glycol formant des micelles dans l'eau de 50 à 137 nm selon la concentration en polymère et pouvant encapsuler jusqu'à 2% de fenrétinide. Le profil de libération obtenu est très lent puisque seuls 20% de fenrétidine sont libérés après 50 h. Le traitement des cellules de neuroblastome par les micelles indique un retard de la métabolisation de la fenrétinide encapsulée due à sa libération prolongée (90).

Jeong *et al.* ont développé des micelles d'atRA à base d'un copolymère poly(ethylene glycol)/chitosane. L'encapsulation de l'atRA serait alors due à des interactions ioniques entre l'atRA et le chitosane. Les micelles obtenus avaient une taille de 50 à 200 nm, présentaient une efficacité d'encapsulation supérieure à 80 % et une charge d'atRA de 3 à 14 %. De plus, ces micelles d'atRA ont démontré une efficacité importante sur l'inhibition d'invasion de lignée de gliome U87MG (91). Dans une étude complémentaire la même équipe a mis au point une formule optimisée des micelles d'atRA présentant une activité apoptotique *in vitro* supérieure sur des cellules de carcinome du colon (CT-26) que les micelles sans atRA (92).

Enfin, un autre copolymère, le N-phthaloylchitosane-poly(ethylene glycol) a été utilisé pour réaliser des micelles d'atRA avec une taille de 80 à 160 nm. Il est intéressant de noter que l'augmentation du degré de déacétylation du chitosane améliore l'incorporation d'atRA. Avec 95% de degré de déacétylation, une efficacité d'encapsulation de 98% a été obtenue pour une charge en atRA de 5% dans les micelles. La libération obtenue est lente : 50% d'atRA libéré après 96h (93).

II.3.5. Autres types de vecteur

D'autres types de vecteurs ou des méthodes plus innovantes ont été employées pour formuler les rétinoïdes sous forme vectorisée. 13-*cis* RA a été complexé à l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine en vue d'augmenter sa solubilité. Le complexe présente aussi une meilleure photostabilité (94). Une autre formulation nanoparticulaire d'atRA décrite dans la littérature est constitué de micelles d'atRA recouvertes de particules minérales (CaCO_3) afin d'obtenir des micelles plus stables *in vivo* et plus efficaces notamment dans le traitement de lésions cutanées (95).

Des travaux ont aussi décrit la conjugaison de l'atRA à l'acide hyaluronique pour faire des nanovecteurs capables d'encapsuler le paclitaxel et donc d'améliorer le ciblage et l'efficacité antitumorale par action synergique des deux principes actifs. Des nanoparticules d'une taille de 150 nm avec 29% de charge en paclitaxel ont été obtenues. Ces nanoparticules présentent une bonne cytotoxicité *in vitro* et une accumulation tumorale *in vivo* (96). L'atRA en conjugaison avec l'héparine a aussi été testé pour la même application (97).

II.4. Conclusion

Les rétinoïdes sont des molécules douées d'un intérêt thérapeutique majeur dans diverses pathologies comme les cancers, des pathologies cutanées ou encore certaines maladies neurodégénératives. Toutefois leur utilisation thérapeutique est confrontée à quelques limites comme une très mauvaise hydrosolubilité, une forte instabilité et la survenue d'effets secondaires. La vectorisation des rétinoïdes présente donc un potentiel prometteur notamment pour améliorer le ciblage et l'efficacité thérapeutique des rétinoïdes ou encore pour améliorer leur photostabilité. Nous avons pu voir dans ce chapitre que de nombreux systèmes de vectorisation des rétinoïdes sont décrits dans la littérature. Les liposomes présentent un intérêt pour les applications topiques et parentérales. Les SLN présentent l'avantage de pouvoir encapsuler des grandes quantités de rétinoïdes. Les nanoparticules polymères font elles aussi l'objet de nombreux travaux et peuvent permettre une bonne encapsulation des rétinoïdes ainsi qu'une amélioration de leur efficacité antitumorale. Toutefois, des études complémentaires restent nécessaires afin de démontrer l'avantage des particules polymères et de leurs applications thérapeutiques. Enfin, les micelles polymères émergent comme une forme en devenir pour la vectorisation des rétinoïdes.

II.5. Références

1. Boehm MF, Heyman RA, Patel S, Stein RB, Nagpal S. Section Review: Retinoids: Biological Function and Use in the Treatment of Dermatological Diseases: Pulmonary-Allergy, Dermatological, Gastrointestinal & Arthritis. *Expert. Opin. Investig. Drugs*. 1995;4:593–612.
2. Rhinn M, Dollé P. Retinoic acid signalling during development. *Development*. 2012;139:843–58.
3. Fields AL, Soprano DR, Soprano KJ. Retinoids in biological control and cancer. *J. Cell. Biochem*. 2007;102:886–98.
4. Kastner P, Mark M, Ghyselinck N, Krezel W, Dupé V, Grondona JM, et al. Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development*. 1997;124:313–26.
5. Evans T. Regulation of hematopoiesis by retinoid signaling. *Exp. Hematol*. 2005;33:1055–61.
6. Altucci L, Gronemeyer H. The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2001;1:181–93.
7. Bushue N, Wan Y-JY. Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv. Drug Delivery Rev*. 2010;62:1285–98.
8. De Thé H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature*. 1990;347:558–61.
9. Yoshida H, Kitamura K, Tanaka K, Omura S, Miyazaki T, Hachiya T, et al. Accelerated degradation of PML-retinoic acid receptor alpha (PML-RARA) oncoprotein by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: possible role of the proteasome pathway. *Cancer Res*. 1996;56:2945–8.
10. Patatanian E, Thompson DF. Retinoic acid syndrome: a review. *J. Clin. Pharm. Ther*. 2008;33:331–8.
11. Baumann L, Vujevich J, Halem M, Martin LK, Kerdel F, Lazarus M, et al. Open-label pilot study of alitretinoin gel 0.1% in the treatment of photoaging. *Cutis*. 2005;76:69–73.
12. Wan YJ, Cai Y, Cowan C, Magee TR. Fatty acyl-CoAs inhibit retinoic acid-induced apoptosis in Hep3B cells. *Cancer Lett*. 2000;154:19–27.
13. Schmutzler C, Koehrlé J. Innovative strategies for the treatment of thyroid cancer. *Eur. J. Endocrinol*. 2000;143:15–24.
14. Matthay KK, Reynolds CP, Seeger RC, Shimada H, Adkins ES, Haas-Kogan D, et al. Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study. *J. Clin. Oncol*. 2009;27:1007–13.
15. Sogno I, Venè R, Ferrari N, De Censi A, Imperatori A, Noonan DM, et al. Angioprevention with fenretinide: targeting angiogenesis in prevention and therapeutic strategies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. 2010;75:2–14.
16. Polidori MC, Mariani E, Baggio G, Deiana L, Carru C, Pes GM, et al. Different antioxidant profiles in Italian centenarians: the Sardinian peculiarity. *Eur. J. Clin. Nutr*. 2007;61:922–4.
17. Pino-Lagos K, Benson MJ, Noelle RJ. Retinoic acid in the immune system. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2008;1143:170–87.

18. Mehta K, McQueen T, Tucker S, Pandita R, Aggarwal BB. Inhibition by all-trans-retinoic acid of tumor necrosis factor and nitric oxide production by peritoneal macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 1994;55:336–42.
19. Kang SG, Lim HW, Andrisani OM, Broxmeyer HE, Kim CH. Vitamin A metabolites induce gut-homing FoxP3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2007;179:3724–33.
20. Geissmann F, Revy P, Brousse N, Lepelletier Y, Folli C, Durandy A, et al. Retinoids regulate survival and antigen presentation by immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2003;198:623–34.
21. Darmanin S, Chen J, Zhao S, Cui H, Shirkoohi R, Kubo N, et al. All-trans retinoic acid enhances murine dendritic cell migration to draining lymph nodes via the balance of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *J. Immunol.* 2007;179:4616–25.
22. Bronte V, Serafini P, Apolloni E, Zanovello P. Tumor-induced immune dysfunctions caused by myeloid suppressor cells. *J. Immunother.* 2001;24:431–46.
23. Mucida D, Park Y, Cheroutre H. From the diet to the nucleus: vitamin A and TGF-beta join efforts at the mucosal interface of the intestine. *Semin. Immunol.* 2009;21:14–21.
24. Kinoshita K, Kishimoto K, Shimazu H, Nozaki Y, Sugiyama M, Ikoma S, et al. Successful Treatment With Retinoids in Patients With Lupus Nephritis. *Am. J. Kidney Dis.* 2010;55:344–7.
25. Wasserfall C, Atkinson MA. Taking a daily vitamin to prevent type 1 diabetes? *Diabetes.* 2009;58:24–5.
26. Van Y-H, Lee W-H, Ortiz S, Lee M-H, Qin H-J, Liu C-P. All-trans retinoic acid inhibits type 1 diabetes by T regulatory (Treg)-dependent suppression of interferon-gamma-producing T-cells without affecting Th17 cells. *Diabetes.* 2009;58:146–55.
27. Lovett-Racke AE, Racke MK. Retinoic acid promotes the development of Th2-like human myelin basic protein-reactive T cells. *Cell. Immunol.* 2002;215:54–60.
28. Orfanos CE, Zouboulis CC, Almond-Roesler B, Geilen CC. Current use and future potential role of retinoids in dermatology. *Drugs.* 1997;53:358–88.
29. Webster GF. Topical tretinoin in acne therapy. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1998;39:S38–44.
30. Buchan P, Eckhoff C, Caron D, Nau H, Shroot B, Schaefer H. Repeated topical administration of all-trans-retinoic acid and plasma levels of retinoic acids in humans. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1994;30:428–34.
31. Szuts EZ, Harosi FI. Solubility of retinoids in water. *Arch. Biochem. Biophys.* 1991;287:297–304.
32. Brisaert M., Everaerts I, Plaizier-Vercammen J. Chemical stability of tretinoin in dermatological preparations. *Pharm. Acta. Helv.* 1995;70:161–6.
33. Christie VB, Barnard JH, Batsanov AS, Bridgens CE, Cartmell EB, Collings JC, et al. Synthesis and evaluation of synthetic retinoid derivatives as inducers of stem cell differentiation. *Org. Biomol. Chem.* 2008;6:3497–507.
34. Achkar CC, Bentel JM, Boylan JF, Scher HI, Gudas LJ, Miller WH. Differences in the pharmacokinetic properties of orally administered all-trans-retinoic acid and 9-cis-retinoic acid in the plasma of nude mice. *Drug Metab. Dispos.* 1994;22:451–8.
35. Trapasso E, Cosco D, Celia C, Fresta M, Paolino D. Retinoids: new use by innovative drug-delivery systems. *Expert. Opin. Drug. Deliv.* 2009;6:465–83.
36. Gonnet M, Lethuaut L, Boury F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *J. Control. Release.* 2010;146:276–90.

37. Nastruzzi C, Walde P, Menegatti E, Gambari R. Liposome-associated retinoic acid: Increased in vitro antiproliferative effects on neoplastic cells. *FEBS Lett.* 1990;259:293–6.
38. Tarasiuk A. Sensitivity of human melanoma cells in vitro to retinoic acid incorporated in liposomes. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 1991;39:279–84.
39. Sacks PG, Oke V, Mehta K. Antiproliferative effects of free and liposome-encapsulated retinoic acid in a squamous carcinoma model: monolayer cells and multicellular tumor spheroids. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1992;118:490–6.
40. Drach J, Lopez-Berestein G, McQueen T, Andreeff M, Mehta K. Induction of differentiation in myeloid leukemia cell lines and acute promyelocytic leukemia cells by liposomal all-trans-retinoic acid. *Cancer Res.* 1993;53:2100–4.
41. Mehta K, Sadeghi T, McQueen T, Lopez-Berestein G. Liposome encapsulation circumvents the hepatic clearance mechanisms of all-trans-retinoic acid. *Leuk. Res.* 1994;18:587–96.
42. Estey E, Thall PF, Mehta K, Rosenblum M, Brewer TJ, Simmons V, et al. Alterations in tretinoin pharmacokinetics following administration of liposomal all-trans retinoic acid. *Blood.* 1996;87:3650–4.
43. Douer D, Estey E, Santillana S, Bennett JM, Lopez-Berestein G, Boehm K, et al. Treatment of newly diagnosed and relapsed acute promyelocytic leukemia with intravenous liposomal all-trans retinoic acid. *Blood.* 2001;97:73–80.
44. Bernstein ZP, Chanan-Khan A, Miller KC, Northfelt DW, Lopez-Berestein G, Gill PS. A multicenter phase II study of the intravenous administration of liposomal tretinoin in patients with acquired immunodeficiency syndrome-associated Kaposi's sarcoma. *Cancer.* 2002;95:2555–61.
45. Parthasarathy R, Gilbert B, Mehta K. Aerosol delivery of liposomal all-trans-retinoic acid to the lungs. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1999;43:277–83.
46. Kawakami S, Suzuki S, Yamashita F, Hashida M. Induction of apoptosis in A549 human lung cancer cells by all-trans retinoic acid incorporated in DOTAP/cholesterol liposomes. *J. Control. Release.* 2006;110:514–21.
47. Suzuki S, Kawakami S, Chansri N, Yamashita F, Hashida M. Inhibition of pulmonary metastasis in mice by all-trans retinoic acid incorporated in cationic liposomes. *J. Control. Release.* 2006;116:58–63.
48. Masini V, Bonte F, Meybeck A, Wepierre J. Cutaneous bioavailability in hairless rats of tretinoin in liposomes or gel. *J. Pharm. Sci.* 1993;82:17–21.
49. Brisaert M, Gabriëls M, Matthijs V, Plaizier-Vercammen J. Liposomes with tretinoin: a physical and chemical evaluation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001;26:909–17.
50. Ioele G, Cione E, Risoli A, Genchi G, Ragno G. Accelerated photostability study of tretinoin and isotretinoin in liposome formulations. *Int. J. Pharm.* 2005;293:251–60.
51. Sinico C, Manconi M, Peppi M, Lai F, Valenti D, Fadda AM. Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: in vitro evaluation of drug permeation and vesicle–skin interaction. *J. Control. Release.* 2005;103:123–36.
52. Kitagawa S, Kasamaki M. Enhanced delivery of retinoic acid to skin by cationic liposomes. *Chem. Pharm. Bull.* 2006;54:242–4.
53. Maret M, Ruffie C, Periquet B, Campo A-M, Menevret M, Phelep A, et al. Liposomal retinoic acids modulate asthma manifestations in mice. *J. Nutr.* 2007;137:2730–6.

54. Watson DS, Huang Z, Szoka FC Jr. All-trans retinoic acid potentiates the antibody response in mice to a lipopeptide antigen adjuvanted with liposomal lipid A. *Immunol. Cell Biol.* 2009;87:630–3.
55. Manconi M, Sinico C, Valenti D, Loy G, Fadda AM. Niosomes as carriers for tretinoin. I. Preparation and properties. *Int. J. Pharm.* 2002;234:237–48.
56. Manconi M, Valenti D, Sinico C, Lai F, Loy G, Fadda AM. Niosomes as carriers for tretinoin. II. Influence of vesicular incorporation on tretinoin photostability. *Int. J. Pharm.* 2003;260:261–72.
57. Manconi M, Sinico C, Valenti D, Lai F, Fadda AM. Niosomes as carriers for tretinoin. III. A study into the in vitro cutaneous delivery of vesicle-incorporated tretinoin. *Int. J. Pharm.* 2006;311:11–9.
58. Desai TR, Finlay WH. Nebulization of niosomal all-trans-retinoic acid: an inexpensive alternative to conventional liposomes. *Int. J. Pharm.* 2002;241:311–7.
59. Jenning V, Schäfer-Korting M, Gohla S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. *J. Control. Release.* 2000;66:115–26.
60. Jenning V, Gysler A, Schäfer-Korting M, Gohla SH. Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000;49:211–8.
61. Jenning V, Gohla SH. Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN). *J. Microencapsul.* 2001;18:149–58.
62. Shah KA, Date AA, Joshi MD, Patravale VB. Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: potential in topical delivery. *Int. J. Pharm.* 2007;345:163–71.
63. Castro GA, Oréfice RL, Vilela JMC, Andrade MS, Ferreira LAM. Development of a new solid lipid nanoparticle formulation containing retinoic acid for topical treatment of acne. *J. Microencapsul.* 2007;24:395–407.
64. Castro GA, Coelho ALLR, Oliveira CA, Mahecha GAB, Oréfice RL, Ferreira LAM. Formation of ion pairing as an alternative to improve encapsulation and stability and to reduce skin irritation of retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2009;381:77–83.
65. Castro GA, Oliveira CA, Mahecha GAB, Ferreira LAM. Comedolytic effect and reduced skin irritation of a new formulation of all-trans retinoic acid-loaded solid lipid nanoparticles for topical treatment of acne. *Arch. Dermatol. Res.* 2011;303:513–20.
66. Lim S-J, Kim C-K. Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid. *Int. J. Pharm.* 2002;243:135–46.
67. Lim S-J, Lee M-K, Kim C-K. Altered chemical and biological activities of all-trans retinoic acid incorporated in solid lipid nanoparticle powders. *J. Control. Release.* 2004;100:53–61.
68. Jee J-P, Lim S-J, Park J-S, Kim C-K. Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2006;63:134–9.
69. Jeong Y-I, Kang M-K, Sun H-S, Kang S-S, Kim H-W, Moon K-S, et al. All-trans-retinoic acid release from core-shell type nanoparticles of poly(ϵ -caprolactone)/poly(ethylene glycol) diblock copolymer. *Int. J. Pharm.* 2004;273:95–107.
70. Cho CS, Cho KY, Park IK, Kim SH, Sasagawa T, Uchiyama M, et al. Receptor-mediated delivery of all trans-retinoic acid to hepatocyte using poly(L-lactic acid) nanoparticles coated with galactose-carrying polystyrene. *J. Control. Release.* 2001;77:7–15.

71. Kim D-G, Choi C, Jeong Y-I, Jang M-K, Nah J-W, Kang S-K, et al. All-trans retinoic acid-associated low molecular weight water-soluble chitosan nanoparticles based on ion complex. *Macromol. Res.* 2006;14:66–72.
72. Kim D-G, Jeong Y-I, Choi C, Roh S-H, Kang S-K, Jang M-K, et al. Retinol-encapsulated low molecular weight water-soluble chitosan nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2006;319:130–8.
73. Chung K-D, Jeong Y-I, Chung C-W, Kim DH, Kang DH. Anti-tumor activity of all-trans retinoic acid-incorporated glycol chitosan nanoparticles against HuCC-T1 human cholangiocarcinoma cells. *Int. J. Pharm.* 2012;422:454–61.
74. Simon AM, Jagadeeshan S, Abraham E, Akhilandeshwaran A, Pillai JJ, Kumar NA, et al. Poly (D,L-lactic-co-glycolide) nanoparticles for the improved therapeutic efficacy of all-trans-retinoic acid: a study of acute myeloid leukemia (AML) cell differentiation in vitro. *Med. Chem.* 2012;8:805–10.
75. Tiwari MD, Mehra S, Jadhav S, Bellare JR. All-trans retinoic acid loaded block copolymer nanoparticles efficiently induce cellular differentiation in HL-60 cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011;44:643–52.
76. Narvekar M, Xue HY, Wong HL. A novel hybrid delivery system: Polymer-oil nanostructured carrier for controlled delivery of highly lipophilic drug all-trans-retinoic acid (ATRA). *Int. J. Pharm.* 2012;436:721–31.
77. Maia J, Santos T, Aday S, Agasse F, Cortes L, Malva JO, et al. Controlling the neuronal differentiation of stem cells by the intracellular delivery of retinoic acid-loaded nanoparticles. *ACS Nano.* 2011;5:97–106.
78. Ourique AF, Pohlmann AR, Guterres SS, Beck RC. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *Int. J. Pharm.* 2008;352:1–4.
79. Ourique AF, Melerio A, Silva C de B da, Schaefer UF, Pohlmann AR, Guterres SS, et al. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: Development of a semisolid nanomedicine. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011;79:95–101.
80. Bettoni CC, Felippi CC, de Andrade C, Raffin RP, Jager A, Guterres SS, et al. Isotretinoin-loaded nanocapsules: stability and cutaneous penetration by tape stripping in human and pig skin. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2012;8:258–71.
81. Jeong Y-I, Song J-G, Kang S-S, Ryu H-H, Lee Y-H, Choi C, et al. Preparation of poly(dl-lactide-co-glycolide) microspheres encapsulating all-trans retinoic acid. *Int. J. Pharm.* 2003;259:79–91.
82. Çirpanlı Y, ünlü N, Çalış S, Atilla Hincal A. Formulation and in-vitro characterization of retinoic acid loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres. *J. Microencapsul.* 2005;22:877–89.
83. Kawakami S, Opanasopit P, Yokoyama M, Chansri N, Yamamoto T, Okano T, et al. Biodistribution characteristics of all-trans retinoic acid incorporated in liposomes and polymeric micelles following intravenous administration. *J. Pharm. Sci.* 2005;94:2606–15.
84. Chansri N, Kawakami S, Yokoyama M, Yamamoto T, Charoensit P, Hashida M. Anti-tumor effect of all-trans retinoic acid loaded polymeric micelles in solid tumor bearing mice. *Pharm. Res.* 2008;25:428–34.
85. Okuda T, Kawakami S, Yokoyama M, Yamamoto T, Yamashita F, Hashida M. Block copolymer design for stable encapsulation of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide into polymeric micelles in mice. *Int. J. Pharm.* 2008;357:318–22.

86. Okuda T, Kawakami S, Higuchi Y, Satoh T, Oka Y, Yokoyama M, et al. Enhanced in vivo antitumor efficacy of fenretinide encapsulated in polymeric micelles. *Int. J. Pharm.* 2009;373:100–6.
87. Satoh T, Higuchi Y, Kawakami S, Hashida M, Kagechika H, Shudo K, et al. Encapsulation of the synthetic retinoids Am80 and LE540 into polymeric micelles and the retinoids' release control. *J. Control. Release.* 2009;136:187–95.
88. Zuccari G, Carosio R, Fini A, Montaldo PG, Orienti I. Modified polyvinylalcohol for encapsulation of all-trans-retinoic acid in polymeric micelles. *J. Control. Release.* 2005;103:369–80.
89. Zuccari G, Bergamante V, Carosio R, Gotti R, Montaldo PG, Orienti I. Micellar complexes of all-trans retinoic acid with polyvinylalcohol-nicotinoyl esters as new parenteral formulations in neuroblastoma. *Drug Deliv.* 2009;16:189–95.
90. Orienti I, Zuccari G, Falconi M, Teti G, Illingworth NA, Veal GJ. Novel micelles based on amphiphilic branched PEG as carriers for fenretinide. *Nanomedicine.* 2012;8:880–90.
91. Jeong Y-I, Kim S-H, Jung T-Y, Kim I-Y, Kang S-S, Jin Y-H, et al. Polyion complex micelles composed of all-trans retinoic acid and poly (ethylene glycol)-grafted-chitosan. *J. Pharm. Sci.* 2006;95:2348–60.
92. Park J-S, Koh Y-S, Bang J-Y, Jeong Y-I, Lee J-J. Antitumor effect of all-trans retinoic acid-encapsulated nanoparticles of methoxy poly(ethylene glycol)-conjugated chitosan against CT-26 colon carcinoma in vitro. *J. Pharm. Sci.* 2008;97:4011–9.
93. Opanasopit P, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Choochottiros C, Chirachanchai S. N-phthaloylchitosan-g-mPEG design for all-trans retinoic acid-loaded polymeric micelles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2007;30:424–31.
94. Yap KL, Liu X, Thenmozhiyal JC, Ho PC. Characterization of the 13-cis-retinoic acid/cyclodextrin inclusion complexes by phase solubility, photostability, physicochemical and computational analysis. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2005;25:49–56.
95. Yamaguchi Y, Nagasawa T, Nakamura N, Takenaga M, Mizoguchi M, Kawai S-I, et al. Successful treatment of photo-damaged skin of nano-scale atRA particles using a novel transdermal delivery. *J. Control. Release.* 2005;104:29–40.
96. Yao J, Zhang L, Zhou J, Liu H, Zhang Q. Efficient simultaneous tumor targeting delivery of all-trans retinoid Acid and Paclitaxel based on hyaluronic Acid-based multifunctional nanocarrier. *Mol. Pharm.* 2013;10:1080–91.
97. Hou L, Yao J, Zhou J, Zhang Q. Pharmacokinetics of a paclitaxel-loaded low molecular weight heparin-all-trans-retinoid acid conjugate ternary nanoparticulate drug delivery system. *Biomaterials.* 2012;33:5431–40.

Chapitre III

Vitamine D son rôle biologique et ses intérêts thérapeutiques

Chapitre III. Vitamine D son rôle biologique et ses intérêts thérapeutiques

La vitamine D est une hormone liposoluble dont la fonction physiologique principale est de réguler l'absorption et le métabolisme calcique. Elle est notamment utilisée dans le traitement et la prévention du rachitisme. Outre ses fonctions sur la régulation de la calcémie, la vitamine D intervient aussi dans la régularisation de la prolifération cellulaire et dans la réponse immunitaire. Dans ce chapitre seront décrits les propriétés de la vitamine D, son rôle biologique et ses utilisations thérapeutiques.

III.1. Généralités, structure chimique et métabolisme de la vitamine D

La vitamine D a été initialement classée parmi les vitamines liposolubles et identifiée comme une substance préventive du rachitisme pour la première fois par McCollum *et al.* en 1922 (1). Des recherches intensives ont ensuite permis d'identifier sa structure chimique, ses métabolites actifs ainsi que ses différentes fonctions biologiques, ce qui a finalement conduit à classer la vitamine D comme une hormone plutôt qu'une vitamine. La vitamine D est issue pour 90% de la synthèse au niveau cutané et pour 10% des apports nutritionnels. L'apport journalier recommandé est d'environ 5 µg (200 UI) et augmente à 15 µg (600 UI) en cas d'absence d'exposition au soleil (2).

III.1.1. Structure et propriétés physico-chimiques de la vitamine D

D'un point de vue chimique, la vitamine D est un 9,10-sécostéroïde comportant trois doubles liaisons et une fonction hydroxyle en C3β (Figure 12). La vitamine D existe sous deux formes biologiquement inactives, la vitamine D₃ (cholécalférol) et la vitamine D₂ (ergocalciférol). Ce sont des molécules hydrophobes, pratiquement insolubles dans l'eau, solubles dans l'éthanol et les huiles. La forme la plus répandue dans le sang est la 25-hydroxyvitamine D₃ (caldiol ou calcifédiol) contenant une fonction hydroxyle en plus sur le carbone C25. La forme active de la vitamine D₃ est la 1α,25-dihydroxyvitamine D₃ (calcitriol) avec deux fonctions hydroxyle en C1α et C25. Les structures chimiques de ces différentes molécules ainsi que leurs propriétés physico-chimiques sont présentées respectivement en Figure 12 et Tableau 1. Les calculs théoriques via ALOPGS (3) de leurs solubilités dans l'eau ou de leurs coefficients de partage octanol/eau (LogP) permettent de classer ces molécules en fonction d'hydrophobicité comme suit : cholécalférol > caldiol > calcitriol.

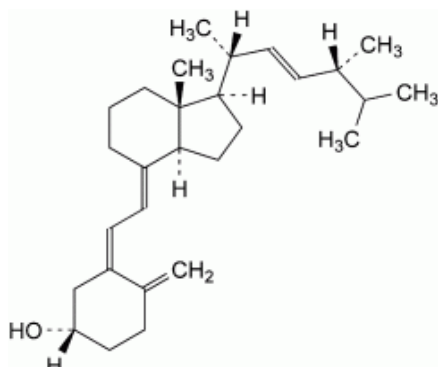
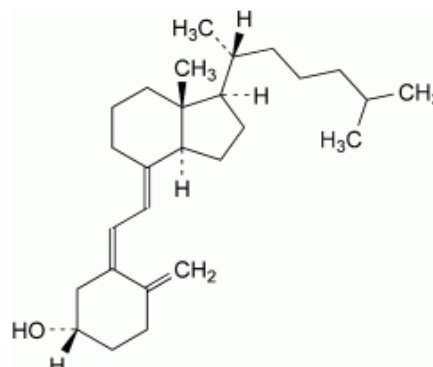
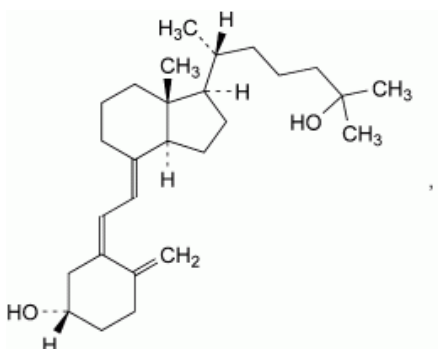
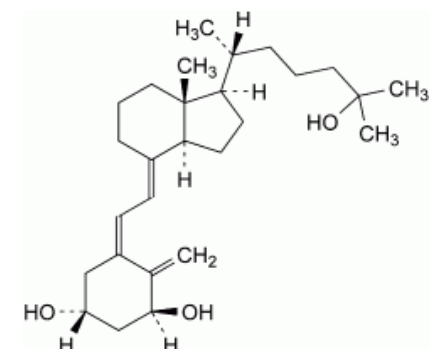
**Ergocalciférol**Vitamine D₂(5Z,7E,22E)-9,10-sécoergosta
5,7,10(19),22-tétraén-3β-ol**Cholécalciférol**Vitamine D₃(5Z,7E)-9,10-Sécocholesta-5,7,10(19)-
trièn-3β-ol**Calcidiol**25-hydroxyvitamine D₃(5Z,7E)-9,10-Sécocholesta-5,7,10(19)-
triène-3β,25-diol**Calcitriol**1α,25-dihydroxyvitamine D₃(5Z,7E)-9,10-Sécocholesta-5,7,10(19)-triène-
1α,3β,25-triol

Figure 12: Structures chimiques des différentes formes de vitamine D (Pharmacopée Européen 7.7)

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques des différentes formes de vitamine D₃

Propriétés	Cholécalciférol	Calcidiol	Calcitriol
N° CAS	67-97-0	19356-17-3	32222-06-3
Formule brute	C ₂₇ H ₄₄ O	C ₂₇ H ₄₄ O ₂	C ₂₇ H ₄₄ O ₃
Masse molaire (g/mol)	384,6	400,6	416,6
Aspect	cristaux blancs	cristaux blancs	cristaux blancs
Solubilité	Éthanol 96°, huiles	Éthanol 96°, huiles	Éthanol 96°, huiles
Solubilité dans l'eau (calculé par ALOGPS(3))	0,3 µg/mL	2,2 µg/mL	6,6 µg/mL
LogP (calculé par ALOGPS(3))	7,9	6,7	5,5

III.1.2. Synthèse et métabolisme de la vitamine D

III.1.2.1. Ressources et synthèse

La vitamine D peut être issue de 2 sources distinctes : de ressources nutritionnelles ou de la synthèse dans la peau.

La vitamine D issue de la nutrition se trouve sous deux formes selon son origine; la vitamine D₃ d'origine animale et la vitamine D₂ d'origine végétale.

La synthèse de la vitamine D₃ dans la peau est une réaction photochimique dont le spectre d'efficacité est situé entre 260 et 315 nm et atteint un optimum après 30 min d'exposition aux rayons UVB. La réaction commence par une isomérisation d'un stérol cutané (7-déshydrocholestérol, provitamine D₃) provoquant l'ouverture du cycle B et formant le 9,10-seco-stérol (prévitamine D₃). Ensuite une isomérisation non-enzymatique, induite par la chaleur, transforme la prévitamine D₃ en vitamine D₃ (cholécalférol) (4). Le schéma complet de la synthèse de la vitamine D₃ est présenté en Figure 13.

Figure 13 : Réaction photochimique de synthèse de la vitamine D₃ dans la peau(5)

III.1.2.2. Métabolisme

Le métabolisme et le catabolisme de la vitamine D₃ sont présentés comme décrit par Prosser et Jones (6) (Figure 14). Après absorption intestinale de la vitamine D₂ et la vitamine D₃ ou synthèse de la vitamine D₃ dans la peau, les molécules biologiquement inactives se retrouvent dans la circulation sanguine où elles vont se lier à des protéines plasmatiques (Vitamin D Binding Proteins, DBP). Au niveau hépatique, une première étape de métabolisation de la vitamine D se produit par hydroxylation enzymatique pour former la 25-hydroxyvitamine D₃ (calcidiol ou calcifédiol). Cette hydroxylation est catalysée par une enzyme microsomale cytochrome P450 (CYP2R1) ou par une enzyme mitochondriale cytochrome P450 (CYP27A1) (6). Une fois dans la circulation sanguine, la 25-hydroxyvitamine D₃ se lie aux DBP. Les concentrations plasmatiques physiologiques en 25-hydroxyvitamine D₃ varient entre 25 – 200 nmol/L et sa demi-vie est d'environ 15 jours. Toutefois, plusieurs études ont établi qu'une concentration de 30 ng/mL (75 nmol/L) serait un taux sérique optimal pour la santé (7). La 25-hydroxylation hépatique est une étape de métabolisation incontrôlée et dépendant principalement de la disponibilité du substrat cholécalférol (8).

Une deuxième métabolisation a ensuite lieu au niveau rénal. Sous l'action d'une enzyme cytochrome P450 appelée 25-hydroxyvitamine-D-1 α -hydroxylase (encodée par *CYP27B1*), la 25-hydroxyvitamine D₃ est hydroxylée en position C1 α pour donner le métabolite actif de la vitamine D₃, la 1 α ,25-dihydroxyvitamine D₃ ou calcitriol. Comme les métabolites précédents, le calcitriol dans le sang est transporté par les DBP. Son taux sérique varie entre 75 et 200 pmol/L et sa demi-vie est de 10 à 24 heures (9).

Le catabolisme de la vitamine D₃ se fait par une réaction d'oxydation sur le carbone C-24. La 24-hydroxylase (CYP24A1), une enzyme de cytochrome, transforme la 25-hydroxyvitamine D₃ en 24,25-dihydroxyvitamine D₃ et la 1 α ,25-dihydroxyvitamine D₃ en 1 α ,24,25-trihydroxyvitamine D₃ puis en acide calcitroïque. La 24-hydroxylase peut aussi catalyser une hydroxylation en C-23 et produire la 1 α ,25-dihydroxyvitamine D₃-26,23-lactone. L'expression de la 24-hydroxylase subit une régulation positive par le calcitriol au niveau rénal et dans les cellules cibles (10).

Figure 14 : Représentation schématique du métabolisme de la vitamine D₃ et les enzymes impliquées (6)

III.1.2.3. Régulation de la 1 α -hydroxylase

Compte-tenu du rôle primordial du calcitriol dans l'homéostasie calcique, la 1 α -hydroxylation rénale est un processus strictement contrôlé et régulé, principalement par le calcitriol lui-même ainsi que par l'hormone parathyroïdienne ou parathormone (PTH). D'autres facteurs comme le facteur 1 de croissance insulinique, l'insuline, la calcitonine et le facteur 23 de croissance fibroblastique peuvent aussi interagir (11). Par exemple, une faible concentration sanguine en ions calciques (Ca²⁺) et phosphates (PO₄³⁻) provoque la sécrétion de PTH qui ensuite active l'expression du gène *CYP27B1* codant pour la synthèse de la 1 α -hydroxylase. En revanche, un excès de calcitriol entraîne une régulation négative de la 1 α -hydroxylase ainsi que de l'expression de la PTH (12). Par ailleurs, la 1 α -hydroxylase possède un mécanisme d'autorégulation.

Depuis une dizaine d'années, avec la découverte de sa localisation extrarénale, la 1 α -hydroxylase fait l'objet de nombreuses études. En effet, une activité de la 1 α -hydroxylase a pu être localisée au niveau des kératinocytes, des poumons, du colon et des macrophages montrant qu'il y a une métabolisation locale du calcidiol en calcitriol. Plusieurs études ont ainsi démontré l'implication extrarénale de la 1 α -hydroxylase dans des processus physiologiques (homéostasie calcique et différenciation cellulaire) et dans certains cas pathologiques (13).

III.2. Fonctions biologiques de la vitamine D

La vitamine D sous sa forme active exerce plusieurs fonctions biologiques : une activité classique sur l'homéostasie calcique et la minéralisation osseuse et d'autres fonctions non classiques sur la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire ainsi que la modulation du système immunitaire. La vitamine D, de par ses activités biologiques multiples, présente donc un intérêt majeur en thérapeutique.

D'après Lieben *et al.*, (14) une calcémie normale, essentielle au maintien de certaines fonctions physiologiques, dépend de la coordination de plusieurs organes et tissus notamment l'intestin (site d'absorption), le rein (site de sécrétion) et l'os (site de stockage). Le calcitriol

est une hormone hypercalcémiant ciblant ces différents tissus afin de maintenir le taux sérique en Ca^{2+} . Une baisse de la calcémie active la sécrétion de PTH puis l'hydroxylation du calcidiol en calcitriol pour restaurer sa concentration sanguine et donc accentuer sa fonction hypercalcémiant (§III.1.2.3).

La ressource principale en calcium est l'alimentation. L'absorption intestinale en calcium se fait par voie passive paracellulaire, dépendante de la concentration, et par voie active transcellulaire régulée par le calcitriol. Il a été montré que l'absorption intestinale de Ca^{2+} diminue de 40% chez des souris transgéniques sans le récepteur de la vitamine D ($\text{VDR}^{-/-}$) et qu'un supplément en calcitriol l'augmente chez les souris saintes. L'action du calcitriol sur les cellules intestinales peut être expliquée par l'augmentation de l'expression des gènes codant pour les transporteurs apicaux de calcium (TRPV6) et de Calbindine- $\text{D}_{9\text{k}}$ (protéine de liaison au calcium) (15). Récemment, une hypothèse alternative a été avancée dans laquelle le calcitriol agirait au niveau du transport paracellulaire du calcium par interaction avec d'autres transporteurs comme Claudine 2 et 12 (16).

Au niveau rénal, la réabsorption du calcium est partiellement régulée par le calcitriol. Il agit au niveau des tubules rénaux sur des protéines comme TRPV5, Calbindine- $\text{D}_{9\text{k}}$ et Calbindine- $\text{D}_{28\text{k}}$ en vue d'augmenter la réabsorption de Ca^{2+} , toutefois son mécanisme d'action n'est pas encore entièrement élucidé et nécessite des études supplémentaires (17).

Au niveau osseux, le calcitriol participe au cycle de formation et de résorption de l'os. Il stimule la différenciation des ostéoblastes et la minéralisation des os. L'action du calcitriol sur la résorption osseuse et la différenciation des ostéoclastes est médiée par les ostéoblastes. En cas d'hypocalcémie, le calcitriol favorise la résorption osseuse pour ajuster le taux sérique de Ca^{2+} (14). Le rachitisme et l'ostéomalacie sont des pathologies osseuses liées à un déficit en calcitriol. Son rôle dans ces maladies est critique notamment dans le cas de déficits alimentaires en minéraux.

De plus, la présence de récepteurs à la vitamine D (VDR) dans d'autres tissus non impliqués dans l'homéostasie calcique confirme que la vitamine D possède d'autres fonctions biologiques. Les études conduites sur des souris « knockout » n'exprimant pas les VDR ont révélé l'implication de la vitamine D dans des processus physiologiques de croissance tissulaires notamment au niveau du côlon descendant, de l'épiderme, de la prostate, etc. Le rôle de vitamine D dans la différenciation cellulaire notamment sur les cellules hématopoïétiques a aussi été décrit (18).

Par ailleurs, des effets de la vitamine D sur le système immunitaire ont été décrits. L'expression de VDR dans les lymphocytes, les macrophages et les cellules dendritiques montre que le calcitriol serait capable de jouer un rôle sur l'immunité innée et acquise (19). De plus, les cellules immunitaires sont capables de synthétiser la forme active de la vitamine D. L'activation de VDR induit des effets antiprolifératifs, pro-différenciatifs et immunomodulateurs. Ce lien est renforcé par l'observation qu'un manque en vitamine D est souvent associé avec une sensibilité aux infections et aux maladies auto-immunes (19). Le calcitriol présente aussi un effet stimulant sur les cellules bêta des îlots de Langerhans pour la synthèse d'insuline, avec une application thérapeutique potentielle dans la prévention et le traitement du diabète (20).

III.2.1. Voie de signalisation de la vitamine D

Comme décrit par Deeb *et al.* (21), le mécanisme d'action physiologique de la vitamine D est très complexe et nécessite encore de nombreuses études pour totalement l'élucider. Néanmoins, deux voies différentes de signalisation sont proposées dans la littérature (Figure 15).

III.2.1.1. Action génomique

Le calcitriol est capable d'activer ou d'inhiber la transcription de certains gènes cibles. Après avoir franchi la membrane plasmique des cellules, le calcitriol se fixe à un récepteur intracellulaire (nucléaire) spécifique (Vitamin D receptor, VDR). VDR est un récepteur de la superfamille des récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdiennes et régule l'expression des gènes de manière ligand dépendante. L'activité du complexe calcitriol-VDR est modulée par la fixation et la dimérisation avec le récepteur X de l'acide rétinoïque (RXR). Ce complexe actif se fixe spécifiquement sur les éléments de réponse à la vitamine D (VDRE) dans la région promoteur des gènes cibles. Il régule ainsi la transcription d'ARN messenger aidé par des protéines co-répresseurs et co-activateurs (22).

III.2.1.2. Action non génomique

Le calcitriol peut aussi exercer une action rapide et non génomique bien connue pour son effet sur l'absorption intestinale de Ca^{2+} . Cette action non génomique induit l'activation d'une cascade de signalisation (protéines kinases A et C, phospholipase C et MAP kinases)

puis l'ouverture rapide des canaux calciques augmentant ainsi la concentration intracellulaire en Ca^{2+} (23). La voie non génomique est encore mal identifiée, toutefois une hypothèse a été avancée sur la présence d'un récepteur membranaire de calcitriol (memVDR) au sein de cavéoles (24). De plus, cette voie peut aussi dans certains cas affecter la transcription de gènes de façon indirecte via MAP kinase.

Figure 15 : Les voies de signalisation de calcitriol : une action génomique par VDR qui affecte principalement l'expression des gènes soit en activant la transcription (a et b) ou en la désactivant (c). L'action non génomique (d) passe via memVDR ou d'autres récepteurs membranaires et module le passage de Ca^{2+} (21).

III.3. Vitamine D : un actif anti-cancéreux

III.3.1. Cancer et vitamine D

La présence du récepteur de vitamine D (VDR) et de la CYP27B1 dans différents tissus, ainsi que l'activité régulatrice du calcitriol sur la prolifération et la différenciation cellulaire suggèrent le lien logique qui peut être établi entre la vitamine D et le cancer (18). Des VDR ont été identifiés dans les cellules tumorales avec des caractéristiques (masse molaire, propriétés de fixation) identiques à celles des cellules normales (25). Différents polymorphismes du gène codant pour VDR ont été décrits dans la littérature et reliés à l'expression de certaines tumeurs comme des mélanomes, des cancers de la prostate et du sein (26,27)

De nombreuses études épidémiologiques ont été conduites montrant le lien entre la vitamine D et certains cancers. En 1980, Garland *et al.* ont montré qu'il existait une différence de risques de cancers colorectaux entre les populations des états du nord des Etats-Unis et ceux du sud et de l'ouest des Etats-Unis. Cette différence peut être reliée à la variation des expositions au soleil et donc de synthèse de vitamine D (28). Ces travaux préliminaires ont été suivis de plusieurs études ayant montré une relation entre le taux sérique de la 25-hydroxyvitamine D (comme un indice du statut de la vitamine D) et le risque de cancer colorectal (29), du sein (30) et de la prostate (31). De plus, Giovannucci *et al.* ont constaté un lien entre l'indice de mortalité des sujets atteints d'un cancer (51529 cas analysés sur 20 ans)

et le statut de la vitamine D en déduisant de cette étude qu' une concentration élevée en calcidiol était associée avec une diminution du risque de cancer ou de son indice de mortalité (32).

III.3.2. Métabolisme de la vitamine D dans les cellules cancéreuses

L'identification de CYP27B1 dans les tissus normaux signifie que la production locale de calcitriol agit par des manières autocrine et paracrine afin de réguler la prolifération et protéger de la transformation maligne. Au sein des tissus normaux, le calcidiol est activé par CYP27B1 et désactivé par CYP24A1 avec un équilibre favorisant la production de calcitriol (33). Ce qui explique qu'un faible taux sérique de calcidiol s'associe avec un risque plus élevé de cancer (34).

Une modification de l'expression de VDR, CYP27B1 ou CYP24A1 peut être à l'origine de la résistance des cellules tumorales à la vitamine D aux concentrations physiologiques. Dans le cancer de sein, l'expression des VDR diminue dans les lignées invasives ne possédant pas de récepteur aux œstrogènes (non hormono-dépendantes) comparé avec les lignées bien différenciées possédant un récepteur aux œstrogènes (hormono-dépendantes) (35). CYP27B1 reste présent dans les cellules tumorales mais son expression diminue dans les cellules agressives et dans quelques modèles une altération est documentée. De plus, une augmentation de l'expression et de l'activité de CYP24A1 ont été observées spécialement après l'exposition au calcitriol (36). Les mêmes observations sont documentées sur les cellules du cancer de la prostate où l'activité de CYP27B1 est nettement diminuée (37). Des épissages alternatifs qui modulent l'activité de CYP27B1 sont identifiés dans différents modèles de glioblastome (38). Nous pouvons conclure que les expressions de VDR, de CYP27B1 et de CYP24A1 sont modulées par les cellules cancéreuses de façon à assurer la protection et l'échappement vis-à-vis de l'action régulatrice de vitamine D.

Il faut signaler que ces analyses sur les cellules cancéreuses *in vitro* ne peuvent pas refléter la situation réelle d'une tumeur *in vivo*. Les tumeurs présentent effectivement une composition hétérogène avec une infiltration par des cellules immunitaires notamment les macrophages. L'expression de CYP27B1 dans les macrophages infiltrés reste à étudier mais certains travaux ont montré une augmentation excessive de son activité dans des modèles tumoraux de lymphome B ou de dysgerminome. L'implication de CYP27B1 dans

l'interaction tumeur – immunité est donc importante et nécessite des études approfondies (39).

III.3.3. Mécanisme de l'activité anticancéreuse de la vitamine D

D'après Beer *et al* (40), les mécanismes de l'activité antinéoplasique du calcitriol diffèrent selon le modèle tumoral et les conditions expérimentales. L'inhibition de la prolifération et l'induction de la différenciation sont les mécanismes les plus étudiés sur différents modèles tumoraux de leucémie, mélanome, cancer de la prostate, cancer du sein et de carcinome épidermoïde. Le calcitriol inhibe la prolifération cellulaire par un arrêt du cycle cellulaire en phase G₁ entraînant une diminution du nombre de cellules en phase S et leur accumulation en phase G₀-G₁ (41). Une action apoptotique a aussi été observée dans des carcinomes de sein, du colon et de la prostate, des myélomes ou encore des leucémies lymphoïdes (40). Le calcitriol est capable dans quelques modèles de diminuer le risque de métastase (42) ou d'inhiber l'angiogenèse (43). Récemment un nouveau mécanisme a été identifié sur un modèle de cancer de la prostate. Le calcitriol aurait des propriétés anti-inflammatoires via une inhibition de la synthèse des prostaglandines (44).

III.3.4. Les effets du calcitriol sur les cellules cancéreuses

En 1981, une première étude faite par Colston *et al.* a montré qu'une concentration nanomolaire de calcitriol avait un effet inhibiteur sur la croissance des cellules malignes de mélanome *in vitro* (45). Plusieurs investigations *in vitro* et *in vivo* ont par la suite été conduites sur différents types de cancer confirmant et encourageant l'utilisation de la vitamine D dans le traitement ou la prévention du cancer. Ces études soulignaient notamment que l'activité antinéoplasique du calcitriol apparaissait à une concentration supraphysiologique (>10⁻⁹ M) présentant un risque important d'hypercalcémie chez l'Homme (46). Les modèles les plus étudiés de cancer sensibles à l'activité du calcitriol sont présentés ci-dessous.

III.3.4.1. Leucémie

En 1981, Abe *et al* ont montré l'effet de 10 nM de calcitriol sur la différenciation et la maturation de cellules leucémiques myéloïdes en macrophages en utilisant des cellules murines (47) et humaines (HL-60) (48). La même équipe a validé cet effet sur des souris nude

en administrant 12,5 à 50 pmol par jour (49). De plus, un analogues du calcitriol (EB1089) a été testé sur leucémie lymphoïde B montrant une activité apoptotique (50).

III.3.4.2. Cancer de la prostate

Les récepteurs VDR ont bien été identifiés et caractérisés dans des lignées cellulaires humaines de carcinome prostatique LNCaP (51) ainsi que dans des lignées DU-145 et PC-3 par l'équipe de Feldman (52). La même équipe a notamment montré un effet du calcitriol à une concentration de 1nM sur la prolifération de culture primaire des cellules prostatiques (53). De plus, Schwartz *et al* ont montré une activité anticancéreuse des analogues du calcitriol *in vitro* (54) sur les lignées de cancer de la prostate (LNCaP, PC-3 et DU 145) et *in vivo* sur un modèle de xénogreffe de PC-3 chez des souris nues (55). Une potentielle anti-invasion tumorale a été aussi documentée par Schwartz *et al* sur des lignées cellulaires (56). Une action apoptotique et une régulation des antigènes spécifiques de la prostate (PSA) ont été observées sur les cellules LNCaP traitées par 10 nM de calcitriol (57).

III.3.4.3. Cancer du sein

En 1980, Eisman *et al.* ont signalé la présence de VDR dans des tissus normaux et anormaux du sein ainsi que dans les lignées de cancer du sein MCF-7, T 47D, BT 20, MDA 157 et MDA 231 (58,59). L'action antiproliférative du calcitriol a été étudiée sur des lignées d'adénocarcinome du sein (MCF-7 et BT-20) en utilisant des concentrations supérieures à 10 nM et une interférence entre la faible concentration de calcitriol et le sérum dans le milieu de culture a été signalée (60). Une étude conduite *in vitro* sur la lignée MCF-7 a démontré l'action apoptotique du calcitriol à une concentration de 100 nM (61). Cette action a été confirmée *in vivo* en utilisant un analogue du calcitriol (EB1089) sur un modèle xénogreffe de MCF-7 (62). Il est important de signaler que le calcitriol n'est actif que sur les cellules possédant un récepteur aux œstrogènes (hormono-dépendantes). Les cellules ne possédant pas de récepteur aux œstrogènes (non hormono-dépendantes) comme la lignée MDA-MB231 sont résistantes au calcitriol (63).

Figure 16 : Effets du calcitriol sur la prolifération cellulaire de lignée MCF-7. (A) 72 h après le traitement avec des concentrations croissantes de calcitriol, la prolifération est évaluée par l'incorporation de [³H]Thymidine. (B) Dénombrement sur 72 h des cellules MCF-7 traitées avec 500 nM de calcitriol (64).

III.3.4.4. Gliome

En 1992, la présence de VDR dans des astrocytomes et glioblastomes humains a été décrite (65). Les effets cytotoxiques du calcitriol sur le gliome ont été mis en évidence à des concentrations en calcitriol de 10nM sur des lignées humaines et de rat (C6) (66). Cette étude a été confirmée en utilisant différents analogues du calcitriol (67) et en montrant l'effet apoptotique du calcitriol (68). Récemment, Diesel *et al.* ont montré une variabilité de la réponse des lignées de glioblastome selon la concentration en calcitriol utilisée et la lignée.(38)

III.3.5. Etudes d'associations thérapeutiques

D'après Beer *et al* (40), les effets antinéoplasiques de la vitamine D ont suscité un intérêt pour une association avec d'autres principes actifs. Des effets synergiques ou additifs ont notamment été observés pour un certain nombre de ces associations et peuvent s'expliquer par différents effets comme l'amélioration de la signalisation des VDR, le ciblage d'autres composants de la même voie ou le ciblage de différentes voies en même temps.

III.3.5.1. Stéroïdes

Des améliorations *in vitro* et *in vivo* de l'activité anti tumorale du calcitriol sont obtenues par association avec de la dexaméthasone. Dans le cas du carcinome épidermoïde, la dexaméthasone augmente l'expression des récepteurs VDR et leur capacité de fixation. De plus, des études sur une lignée de cancer de la prostate (PC-3) ont montré que l'activité apoptotique de la vitamine D était favorisée par la dexaméthasone (69).

III.3.5.2. Autres actifs cytotoxiques

Des études *in vitro* sur des lignées de cancer de la prostate ont montré l'intérêt synergique de l'association du calcitriol à des agents cytotoxiques comme le docetaxel (70), le paclitaxel (71) et la mitoxantrone (72). Ces interactions ont aussi été observées sur le cancer de sein (73), le carcinome épidermoïde de la peau (74) et la leucémie myéloïde (75).

Par ailleurs, Abe-Hashimoto *et al* ont montré qu'une association de tamoxifène avec des analogues du calcitriol améliore l'activité anti tumorale sur les cellules MCF-7 du cancer de sein *in vitro* et *in vivo* (76).

III.3.5.3. Rétinoïdes

La voie génomique de signalisation de la vitamine D passe par une dimérisation de VDR avec le récepteur de l'acide rétinoïque (RXR) (§ III.2.1.1), donc un effet synergique entre vitamine D et rétinoïdes est attendu. L'association du calcitriol avec l'acide rétinoïque favorise l'activité anti proliférative (77), l'inhibition de l'angiogenèse (78) et l'induction de l'apoptose (79).

III.3.5.4. Ketoconazole

Le ketoconazole, un inhibiteur du cytochrome P450, est capable d'inhiber la 24-hydroxylase qui catabolise et désactive le calcitriol. Une administration de calcitriol en présence de ketoconazole sur des cellules cancéreuses de la prostate a montré une augmentation de l'activité anti proliférative (80).

III.3.5.5. Radiation

Le calcitriol peut aussi présenter une action radiosensibilisante. Des études ont notamment montrées un effet synergique du calcitriol avec des radiations ionisantes sur des cellules prostatiques (LNCaP) (81) ainsi que sur des cellules MCF-7 de cancer du sein (82).

III.3.6. Essais cliniques de l'utilisation du calcitriol dans le traitement du cancer

Les investigations précliniques encouragent l'utilisation du calcitriol comme anticancéreux à dose élevée avec ou sans combinaison. Plusieurs études ont essayé de reproduire ces résultats chez l'humain notamment chez des sujets atteints d'un cancer de la prostate. Dans ce paragraphe seront présentées quelques études majeures utilisant le calcitriol seul ou en combinaison comme décrit par Woloszynska-Read *et al* (83).

III.3.6.1. Les formes pharmaceutiques de calcitriol commercialisées

Deux formes pharmaceutiques de calcitriol sont commercialisées mais elles ne sont pas adaptées au traitement du cancer :

- Rocaltrol[®] (Roche) sous forme orale présentée en gélule contenant 0,25 ou 0,5 µg de calcitriol ou en solution de 1 µg/mL.
- Calcijex[®] (Abbott) sous forme injectable intraveineuse contenant 1 µg/mL de calcitriol.

Munidi *et al.* ont montré que le Rocaltrol[®] n'était pas adapté pour une administration de calcitriol en doses élevées puisque le patient devrait alors prendre 80 gélules par jour. De plus, les auteurs ont montré que le taux sérique en calcitriol n'augmente pas avec la dose administrée (84). Beer *et al.* ont aussi observé une saturation de l'absorption du calcitriol à 0,48 µg/kg (85). Le développement d'une nouvelle formulation de calcitriol adaptée aux traitements anticancéreux est donc nécessaire.

III.3.6.2. Dose journalière ou intermittente

Les premiers essais cliniques basés sur l'administration orale d'une dose de 1,5 à 2 µg de calcitriol par jour chez des patients atteints de leucémie aigüe ont montré une faible réponse antitumorale avec une hypercalcémie marquée chez 30% des patients (86). Dans une autre étude, conduite par l'équipe de Feldman sur des patients atteints d'un cancer de la prostate, une dose journalière de 0,5 à 2,5 µg de calcitriol a été administrée. Pendant le traitement, une stabilisation ou une diminution de l'augmentation du taux de PSA a été observée chez certains patients, indiquant une progression plus lente de la maladie. Toutefois, une calciurie dose-dépendante (1,5 – 2,5 µg de calcitriol) a été observée limitant l'utilisation en thérapie anticancéreuse du calcitriol (87).

Comme tous les agents anticancéreux, l'utilisation thérapeutique du calcitriol nécessite la mise en place d'un protocole d'administration précis afin d'éviter la survenue des effets toxiques. Afin de déterminer la dose maximale tolérée de calcitriol, Smith *et al.* ont réalisé une étude de phase 1 sur 36 patients en administrant 2 à 10 µg de calcitriol chaque deux jour par voie sous-cutanée. Les études pharmacocinétiques ont alors révélé que le taux sérique en calcitriol était maintenu dans une zone thérapeutique pendant au moins 8 h après l'injection. Les auteurs ont de plus montré qu'il était possible d'administrer par voie sous-cutanée une dose élevée de calcitriol sans apparition de réactions toxiques non acceptables (88). Une autre étude de phase I a été conduite par Beer *et al.* en administrant chaque semaine une dose croissante de calcitriol par voie orale. Ils ont ainsi montré qu'une dose très élevée de 2,8 µg/kg pouvait être totalement tolérée sans effets secondaires. Néanmoins, une saturation de l'absorption orale du calcitriol apparaît à partir de 0,48 µg/kg (85). Cette étude a donc permis de constater qu'une administration hebdomadaire d'une dose élevée de calcitriol par voie orale était envisageable. Beer *et al.* ont poursuivi cette étude en phase II sur 22 patients atteints d'un cancer de la prostate recevant une dose hebdomadaire de 0,5 µg/kg pendant 10 mois. Aucune toxicité significative n'a été observée durant l'étude. Cette dose s'est avérée

suffisante pour atteindre des concentrations plasmatiques efficaces supérieures à 1 nM. Toutefois, contrairement aux effets escomptés, 50% de réduction des taux de PSA dans le sang n'a pas été atteint (89). Afin d'améliorer l'efficacité du calcitriol, des études ont été conduites en administrant une dose orale élevée (8 à 12 µg) trois fois par semaine. Cette administration provoque une hypercalcémie qui demeure transitoire et permet ainsi d'obtenir un taux sérique efficace plus élevé de calcitriol (90).

III.3.6.3. Calcitriol en association

De nombreuses études pré-cliniques ont montré que l'efficacité du calcitriol peut être améliorée en l'administrant en combinaison avec d'autres agents anticancéreux. Plusieurs combinaisons ont été testées en phases I et II, ayant notamment montré l'intérêt thérapeutique majeure de l'association docetaxel-calcitriol (83). Beer *et al.* ont notamment conduit ce type d'essais en utilisant une combinaison de calcitriol et docetaxel chez 11 patients atteints d'un cancer de la prostate résistant à la castration. Les patients ont reçu chaque semaine une administration de 0,5 µg/kg par voie orale de calcitriol suivie le lendemain de 36 mg/m² de docetaxel par voie intraveineuse pendant six semaines consécutives. Après six semaines de traitement, 5 patients sur 11 qui avaient terminé tous les cycles présentaient une réduction des taux sanguins de PSA de plus de 50 %. Ce traitement a été globalement bien toléré ; seul un patient a présenté des signes réversibles de toxicité grade trois (91). La même équipe a observé des résultats similaires en appliquant le même protocole de traitement dans un essai de phase II chez 37 patients atteints d'un cancer métastatique de la prostate. Un taux de réussite plus élevé que l'étude précédente a été obtenu puisque 30 patients sur 37 (81%) ont vu leur taux de PSA réduire de plus de 50% (70).

D'autres associations du calcitriol avec des principes actifs non-cytotoxiques ont aussi été étudiées. Par exemple, l'association avec la dexaméthasone diminue l'hypercalcémie et permet l'utilisation d'une plus forte dose de calcitriol. Trump *et al.* ont notamment mené une étude de phase II sur des patients atteints de cancer de la prostate résistant à la castration en administrant 74 µg de calcitriol par voie intraveineuse par semaine et 4 mg de dexaméthasone 2 fois par semaine. Cette étude n'a pas montré de modification de l'activité anti-tumorale du calcitriol mais a permis de montrer qu'en présence de dexaméthasone une dose élevée de calcitriol était bien tolérée (92). De plus, Fakih *et al.* ont conduit une étude de phase I pour déterminer la dose maximale tolérée (MTD) de calcitriol par voie intraveineuse en combinaison avec la dexaméthasone et gefitinib (principe actif inhibiteur des récepteurs à

l'EGF utilisé dans le traitement de certains cancers). La dose maximale tolérée était de 125 µg par semaine avec une concentration sérique maximale (C_{\max}) de calcitriol de $11,17 \pm 2,62$ ng/mL et une aire sous la courbe (AUC_{0-72}) de 53,30 ng.h/mL. Ces études pharmacocinétiques indiquent la possibilité d'obtenir des concentrations nécessaires pour une activité anti-tumorale proches de celle utilisées dans les études précliniques (93).

III.3.6.4. DN-101, Nouvelle formulation de calcitriol adaptée au traitement anticancéreux

Une nouvelle formulation de calcitriol, DN-101, plus adaptée au traitement du cancer, a été développée par Novacea Pharmaceutical (Figure 17). DN-101 est une formulation orale contenant une concentration élevée en calcitriol disponible en 15 ou 45 µg/gélule. Une étude de phase I a montré l'innocuité de cette formulation. Les taux plasmatiques en calcitriol sont proportionnels à la dose administrée jusqu'à 165 µg. En administrant 165 µg, la C_{\max} est égale à 6,21 ng/mL avec une AUC_{0-24} de 41,3 ng.h/mL et $T_{1/2}$ de 16,2 heures (94). Finalement, une dose de 45 µg par semaine a été considérée comme optimale pour la poursuite des études en phase II (95).

Figure 17 : Nouvelle formulation de calcitriol (DN-101) possédant une pharmacocinétique améliorée et adaptée au traitement du cancer. Suivi des concentrations plasmatiques en calcitriol après administration hebdomadaire de DN-101 versus administration quotidienne d'une formulation classique (96).

Par la suite, une étude clinique de phase II (Androgen-Independent Prostate Cancer Study of Calcitriol Enhancing Taxotere (ASCENT-1)) a été réalisée chez 250 patients atteints d'un cancer de la prostate métastatique et progressif. 2 groupes ont été constitués : un groupe recevant le placebo et un groupe recevant 45 µg de calcitriol sous forme DN-101 en combinaison avec du docetaxel (36 mg/m^2) une fois par semaine avec une semaine de repos par mois. Le critère d'évaluation était la fréquence de 50% des réductions du taux de PSA dans les six mois suivants le début du traitement. Bien que la réponse PSA n'était pas significativement différente entre les 2 groupes (63% pour DN-101 vs 52 % pour le placebo), une amélioration du temps de survie a été constatée (24,5 mois pour DN-101 vs 16,4 mois pour le placebo), ainsi qu'une diminution des effets indésirables (97). Toutefois, malgré ces

observations encourageantes, le temps de survie ne faisait pas partie des critères d'évaluation retenus pour l'essai. Une autre étude est donc nécessaire afin de confirmer ces résultats.

Pour évaluer l'efficacité de DN-101 sur le temps de survie des patients, une étude randomisée, ASCENT-2, a été effectuée chez 953 patients présentant un cancer de la prostate métastatique résistant à la castration. L'objectif principal de l'étude était de quantifier la durée de survie des patients et les critères d'évaluation secondaires étaient la survenue des effets indésirables qui semblaient réduits lors de la 1^{ère} étude ASCENT-1. Les patients ont été randomisés en double aveugle et répartis en 2 groupes : i) un groupe expérimental traité sur un cycle de 28 jours avec 45 µg de DN-101, 36 mg/m² de docétaxel et 24 mg de dexaméthasone une fois par semaine avec une semaine de repos des trois médicaments toutes les 3 semaines de traitement. ii) un groupe contrôle traité par 10 mg prednisone par jour et 75 mg/m² de docetaxel et 24 mg de dexaméthasone toutes les 3 semaines. L'analyse intérimaire a montré que la survie moyenne était inférieure dans le groupe expérimental (17,8 mois) comparé au groupe contrôle (20,2 mois) et l'étude a été interrompue (98). La durée de survie inférieure dans le groupe traité par le calcitriol est surprenante et signifie une diminution de l'activité du calcitriol en présence de docétaxel. Toutefois, deux points doivent être considérés ; i) la dose de docetaxel employée dans le groupe expérimental est inférieure à celle du groupe contrôle, ii) la dose de calcitriol utilisée était 3 fois plus basse que la dose maximale tolérée de calcitriol lorsqu'il est associé à la dexaméthasone. Enfin, il n'y a pas d'explication claire de la faible survie observée dans ASCENT-2 vs ASCENT-1 sachant que les deux traitements étaient identiques (83).

III.3.7. Analogues anticancéreux du calcitriol

Les activités anticancéreuses du calcitriol sont toujours liées à des hypercalcémies qui limitent ses utilisations thérapeutiques. Le développement de nouveaux analogues du calcitriol en conservant l'activité anticancéreuse et en éliminant ou diminuant l'effet calcique a donc été envisagé. Des centaines d'analogues ont été synthétisés avec une différence d'effet sur la régulation calcique selon leur affinité pour VDR, leur métabolisme ou leur fixation aux protéines. Dans certains cas, des études précliniques ont suggéré l'utilité de nouveaux analogues mais pour le moment les études cliniques n'ont pas réussi à confirmer leur effet anti-cancéreux.

Le Seocalcitol (EB 1089) est un analogue prometteur synthétisé par Leo Pharmaceutical en modifiant la chaîne latérale par deux groupements méthyle en carbone 26 et 27 et deux doubles liaisons. Les études *in vitro* ont montré que EB 1089 était plus efficace que le calcitriol sur la régulation de la prolifération cellulaire et la différenciation du cancer et permettait de réduire les effets hypercalcémiantes *in vivo* de 50% (99). Colston *et al.* sont les premiers à avoir étudié l'efficacité du seocalcitol *in vivo* sur un modèle de tumeur mammaire chez le rat. Ils ont ainsi montré qu'une dose orale journalière de 0,5 µg/kg d'EB 1089 inhibait la progression tumorale sans provoquer d'hypercalcémie en comparaison de la même dose de calcitriol (100). Des investigations *in vivo* ont aussi démontré son activité anti-tumorale sur d'autres modèles comme les cancers de la prostate, du colon et du pancréas. Le premier essai clinique réalisé chez des sujets sains a permis d'établir qu'une dose de 5 à 20 µg/jour était bien tolérée (99). Une étude de phase I a été réalisée chez 36 patients atteints d'un cancer du sein ou d'un cancer colorectal afin d'évaluer le profil pharmacocinétique et la toxicité d'EB 1089. L'effet anti-tumoral n'a pas clairement été démontré mais une stabilisation de la maladie pendant trois mois a été observée chez 6 patients (101). D'autres études de phase II menées chez des patients atteints d'un cancer du pancréas ou d'un hépatocarcinome n'ont pas fourni de données suffisantes pour prouver l'activité anti-tumorale de seocalcitol (102,103). Plus d'essais sur d'autres modèles ou en combinaison avec d'autres principes actifs sont nécessaires avant de conclure sur l'intérêt du seocalcitol dans le traitement de cancer.

Le Paricalcitol (19-nor-1,25-dihydroxyvitamine D₂) est un analogue du calcitriol présentant un potentiel thérapeutique intéressant. Des études cliniques de phase I et II chez des patients souffrants d'un cancer avancé de la prostate ont été menées par Schwartz *et al.* afin d'évaluer l'innocuité et l'efficacité de cet analogue. Bien que le paricalcitol ait été généralement bien toléré par les patients aux doses intraveineuses de 3 à 15 µg/m², aucune réponse significative sur la diminution de PSA n'a été observée (104).

Un autre dérivé de vitamine D, la 1α-hydroxyvitamine D₂ a aussi été testé chez des patients atteints d'un cancer de prostate. 12,5 µg par jour du dérivé ont été administrés à 26 patients. Aucune évolution significative de la durée de survie n'a été constatée, toutefois une stabilisation de maladie a été observée (105).

Ces diverses études sur les dérivés du calcitriol ont montré que la plupart des analogues avaient tendance à induire moins d'hypercalcémies que le calcitriol mais ils ont généralement une plus faible affinité pour VDR et des propriétés anticancéreuses réduites. Néanmoins, de

nouveaux analogues sont en cours de développement et d'autres essais cliniques plus pertinents seront mis en place afin d'évaluer le potentiel de ces analogues.

III.3.8. Calcidiol : un potentiel anti-cancéreux

Le calcidiol (25-hydroxyvitamine D₃) est le dérivé de vitamine D le plus présent dans le sang (25 à 200 nmol/L). Il est transformé par le cytochrome CYP27B1 en calcitriol soit au niveau du rein, soit dans les tissus cibles. Le calcidiol est considéré comme une pro-hormone à cause de sa faible affinité au VDR et il ne possède pas d'activité calcique (106). Récemment, de nombreuses études ont porté sur l'évaluation du potentiel anti-tumoral du calcidiol soit directement soit via la formation de calcitriol. Barreto *et al.* ont rapporté des effets antiprolifératifs du calcidiol sur des cellules épithéliales de prostate à une concentration de 100 nM (107). De plus, Lou *et al.* ont montré des régulations génétiques directes dues au calcidiol sur les cellules knock-out de CYP27B1 ainsi que des effets antiprolifératifs sur les cellules cancéreuses de prostate (LNCaP) en utilisant une concentration 50 fois supérieure à la concentration efficace de calcitriol (108).

Une concentration physiologique de calcidiol est totalement suffisante pour réguler la prolifération des cellules normales. Toutefois, dans le cas de cancer, les modifications du métabolisme de la vitamine D (§ III.3.2) provoque une résistance à la concentration physiologique de calcidiol. Il est possible qu'une concentration importante en calcidiol (500 à 1000 nM) soit capable d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses sans provoquer d'hypercalcémie, mais des études précliniques sont nécessaires pour justifier l'intérêt du calcidiol dans le traitement ou la prévention de cancers.

III.3.9. Perspectives de l'utilité anticancéreuse du calcitriol

Beaucoup de données suggèrent qu'il existe un rôle de la vitamine D dans la prévention et le traitement du cancer. Bien que les données précliniques et épidémiologiques soient convaincantes, les résultats des essais cliniques restent modestes. L'utilisation du calcitriol ou de ses analogues demande une mise au point optimale des essais cliniques comprenant la définition de la dose maximale tolérée (MTD), de la dose optimale et le choix des contrôles appropriés (109). De plus, une formulation plus adaptée au traitement du cancer pourrait améliorer les résultats cliniques. La vectorisation de calcitriol ou ces analogues afin de cibler le tissu cancéreux est aussi une approche envisageable faisant l'objet de très peu d'études.

III.4. Encapsulation de la vitamine D

La plus part des études concernant l'encapsulation de la vitamine D est faite en utilisant la forme nutritionnelle (cholécalférol) soit comme modèle de principe actif hydrophobe, soit comme supplément alimentaire.

En 1992, Pavanetto *et al.* ont préparé des microparticules de cholécalférol en comparant trois méthodes ; évaporation de solvant, extraction de solvant et atomisation. Dans cette étude, le cholécalférol est utilisé comme un modèle de principe actif hydrophobe encapsulé dans des microparticules biodégradables à base d'acide polylactique (Mw 109 000). L'efficacité d'encapsulation maximale est obtenue par la méthode d'atomisation (58,3 %) dans le cas d'un ratio actif/polymère de 4,7%. Les microparticules présentent un profil de libération prolongée sur plus de 96h. Néanmoins des profils légèrement différents sont obtenus selon la méthode d'encapsulation utilisée. En effet, les microparticules préparées avec les méthodes d'atomisation et d'évaporation de solvant présentent un temps de latence avant la libération du cholécalférol contrairement aux autres microparticules qui libèrent 32% de cholécalférol au cours des 4 premières heures (110).

Une étude d'encapsulation de la vitamine D₂ comme modèle nutritionnel absorbé dans l'intestin a été faite par Shi et Tan en faisant des microparticules de chitosane enrobées par d'éthylcellulose (111). L'enrobage d'éthylcellulose limite la libération en milieu gastrique et prolonge la libération en milieu intestinal. De plus, le profil de libération de la vitamine D₂ est influencé par le pourcentage de chitosane, son poids moléculaire et la charge en vitamine D₂.

Récemment des nanoparticules de vitamine D₂ et D₃ ont été développées en vue d'une utilisation nutritionnelle. Des nanoparticules lipidiques de tripalmitine ont été utilisées pour l'encapsulation de vitamine D₂ à différents taux (5 à 20 %). Les auteurs ont notamment montré au cours de cette étude qu'il existait une relation entre la taille des nanoparticules et le pourcentage de vitamine D₂ encapsulée, plus on augmente la quantité de vitamine D₂, plus la taille est petite (125 à 65 nm), ceci est due à la baisse de viscosité (112). Un manque d'informations sur l'efficacité d'encapsulation, la libération et la stabilité montre le besoin de plus d'études afin de juger de l'avantage de ces nanoparticules comme complément alimentaire.

Une équipe chinoise a utilisé un dérivé hydrophobe d'alginate afin de prolonger la libération de la vitamine D₃. Ces nanoparticules présentent un auto-assemblage dans l'eau

avec une taille de 300 à 500 nm et une libération prolongée en milieu intestinal (113). La pharmacocinétique de ces nanoparticules *in vivo* sur des souris saines montre une amélioration de biodisponibilité remarquable (+ 44% en AUC). En utilisant des rats souffrant de rachitisme, l'efficacité pharmacologique a été prouvée (114). D'autres études ont portées sur l'élaboration de nanoparticules protéiques pour l'encapsulation de la vitamine D (115,116).

Pour son rôle antioxydant et ses effets sur les cellules de Langerhans, le cholécalciférol a été encapsulée dans des microsphères d'acétate de cellulose. Ces microsphères ont été incorporées avec des cellules de Langerhans dans des microcapsules d'alginate (117). Les microsphères de vitamine D₃ améliorent la viabilité et les fonctions des cellules Langerhans pendant l'implantation chez les patients diabétiques. Ces microsphères présentent une bonne efficacité d'encapsulation (>95%) et un profil de libération lent pendant 5 jours. De plus, une augmentation de la sécrétion d'insuline a été démontrée *in vitro*.

Une application de l'encapsulation du calcitriol dans le traitement du cancer a été montrée par Nguyen *et al* (118). Des microparticules (35 µm) de poly(vinyle néodécanoate – éthylèneglycol diméthacrylate) ont été préparées par polymérisation afin de prolonger la libération du calcitriol sur plusieurs mois (> 1% après 40 jours) tout en libérant une dose journalière suffisante. Une administration locale dans le foie a été proposée pour utiliser ces microparticules dans le traitement du carcinome hépatocellulaire. Pour la même application, Persons *et al* ont développé des liposomes contenant le 1,25-dihydroxyvitamine D₃-3β-bromoacétate (analogue du calcitriol) et ont testé leur efficacité sur des cellules du cancer de la prostate (LNCaP, PC-3 et DU-145) (119). Une forte activité antiproliférative a été trouvée pour les liposomes chargés comparé à la forme libre ce qui favorise le potentiel thérapeutique. Cependant, dans cette étude, le calcitriol qui a été utilisé comme contrôle positif, n'a présenté aucune activité même à une forte concentration (10⁻⁶ M).

L'équipe de Sternberg a étudié l'incorporation des dérivés de vitamine D₃ dans des liposomes pour une application topique dans le traitement du psoriasis (120). Ces liposomes ont été testés *in vitro* pour leur action antiproliférative sur les kératinocytes mais aucune amélioration d'activité n'a été observée. (121)

Les travaux d'encapsulation de la vitamine D restent en cours de développement. Il est bien clair que son caractère hydrophobe facilite et encourage l'encapsulation. L'encapsulation de la vitamine D présente notamment un intérêt majeur en nutrition pour lutter contre les problèmes de rachitisme. Elle permet notamment de protéger et de prolonger l'activité de la

vitamine D en utilisant des matériaux conformes à la réglementation alimentaire. De plus, l'encapsulation et la vectorisation de la vitamine D présente un intérêt thérapeutique majeur afin de cibler l'action de la vitamine D tout en limitant ses effets secondaires et les risques d'hypercalcémie. Toutefois de nombreuses études sont encore nécessaires afin de démontrer le potentiel thérapeutique de la vitamine D et l'intérêt de sa vectorisation.

III.5. Références

1. McCollum EV, Simmonds N, Becker JE, Shipley PG. Studies on Experimental Rickets Xxi. an Experimental Demonstration of the Existence of a Vitamin Which Promotes Calcium Deposition. *J. Biol. Chem.* 1922;53:293–312.
2. Holick MF. McCollum Award Lecture, 1994: vitamin D--new horizons for the 21st century. *Am. J. Clin. Nutr.* 1994;60:619–30.
3. Tetko IV, Bruneau P. Application of ALOGPS to predict 1-octanol/water distribution coefficients, logP, and logD, of AstraZeneca in-house database. *J. Pharm. Sci.* 2004;93:3103–10.
4. MacLaughlin JA, Anderson RR, Holick MF. Spectral Character of Sunlight Modulates Photosynthesis of Previtamin D3 and Its Photoisomers in Human Skin. *Science.* 1982;216:1001–3.
5. Lehmann B, Meurer M. Vitamin D metabolism. *Dermatol. Ther.* 2010;23:2–12.
6. Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends. Biochem. Sci.* 2004;29:664–73.
7. Tuohimaa P, Lou Y-R. Optimal Serum Calcidiol Concentration for Cancer Prevention. *Anticancer Res.* 2012;32:373–81.
8. Heaney RP, Armas LA, Shary JR, Bell NH, Binkley N, Hollis BW. 25-Hydroxylation of vitamin D3: relation to circulating vitamin D3 under various input conditions. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008;87:1738–42.
9. Levine BS, Singer FR, Bryce GF, Mallon JP, Miller ON, Coburn JW. Pharmacokinetics and biologic effects of calcitriol in normal humans. *J. Lab. Clin. Med.* 1985;105:239–46.
10. Reddy GS, Tserng KY. Calcitroic acid, end product of renal metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 through the C-24 oxidation pathway. *Biochemistry.* 1989;28:1763–9.
11. Hewison M, Zehnder D, Bland R, Stewart PM. 1 α -Hydroxylase and the action of vitamin D. *J. Mol. Endocrinol.* 2000;25:141–8.
12. Armbrecht HJ, Boltz MA, Hodam TL. PTH increases renal 25(OH)D3-1 α -hydroxylase (CYP1 α) mRNA but not renal 1,25(OH)2D3 production in adult rats. *Am. J. Physiol.-Renal.* 2003;53:F1032–F1036.
13. Hewison M, Zehnder D, Chakraverty R, Adams JS. Vitamin D and barrier function: a novel role for extra-renal 1 α -hydroxylase. *Mol. Cell Endocrinol.* 2004;215:31–8.
14. Lieben L, Carmeliet G, Masuyama R. Calcemic actions of vitamin D: Effects on the intestine, kidney and bone. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011;25:561–72.
15. Cromphaut SJV, Dewerchin M, Hoenderop JGJ, Stockmans I, Herck EV, Kato S, et al. Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor–knockout mice: Functional and molecular aspects. *PNAS.* 2001;98:13324–9.
16. Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, Maeda T, Osanai M, Uchiyama Y, et al. Tight Junction Proteins Claudin-2 and -12 Are Critical for Vitamin D-dependent Ca²⁺ Absorption between Enterocytes. *Mol. Biol. Cell.* 2008;19:1912–21.
17. Hoenderop JGJ, Dardenne O, Abel MV, Kemp AWCMVD, Os CHV, St.-Arnaud R, et al. Modulation of renal Ca²⁺ transport protein genes by dietary Ca²⁺ and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase knockout mice. *FASEB J.* 2002;16:1398–406.

18. Samuel S, Sitrin MD. Vitamin D's role in cell proliferation and differentiation. *Nutr. Rev.* 2008;66:S116–S124.
19. Di Rosa M, Malaguarnera M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Vitamin D3: a helpful immunomodulator. *Immunology.* 2011;134:123–39.
20. Takiishi T, Gysemans C, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D and Diabetes. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2010;39:419–46.
21. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat. Rev. Cancer.* 2007;7:684–700.
22. Carlberg C, Bendik I, Wyss A, Meier E, Sturzenbecker LJ, Grippo JF, et al. Two nuclear signalling pathways for vitamin D. *Nature.* 1993;361:657–60.
23. Morelli S, Buitrago C, Boland R, de Boland AR. The stimulation of MAP kinase by 1,25(OH)(2)-vitamin D(3) in skeletal muscle cells is mediated by protein kinase C and calcium. *Mol. Cell Endocrinol.* 2001;173:41–52.
24. Huhtakangas JA, Olivera CJ, Bishop JE, Zanello LP, Norman AW. The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds 1 alpha,25(OH)2-vitamin D3 in vivo and in vitro. *Mol. Endocrinol.* 2004;18:2660–71.
25. Vandewalle B, Adenis A, Hornez L, Revillion F, Lefebvre J. 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in normal and malignant human colorectal tissues. *Cancer Lett.* 1994;86:67–73.
26. Lundin AC, Söderkvist P, Eriksson B, Bergman-Jungeström M, Wingren S. Association of breast cancer progression with a vitamin D receptor gene polymorphism. South-East Sweden Breast Cancer Group. *Cancer Res.* 1999;59:2332–4.
27. Taylor JA, Hirvonen A, Watson M, Pittman G, Mohler JL, Bell DA. Association of prostate cancer with vitamin D receptor gene polymorphism. *Cancer Res.* 1996;56:4108–10.
28. Garland CF, Garland FC. Do Sunlight and Vitamin D Reduce the Likelihood of Colon Cancer? *Int. J. Epidemiol.* 1980;9:227–31.
29. Garland CF, Comstock GW, Garland FC, Helsing KJ, Shaw EK, Gorham ED. Serum 25-hydroxyvitamin D and colon cancer: eight-year prospective study. *Lancet.* 1989;2:1176–8.
30. Bertone-Johnson ER, Chen WY, Holick MF, Hollis BW, Colditz GA, Willett WC, et al. Plasma 25-Hydroxyvitamin D and 1,25-Dihydroxyvitamin D and Risk of Breast Cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005;14:1991–7.
31. Ahonen MH, Tenkanen L, Teppo L, Hakama M, Tuohimaa P. Prostate cancer risk and prediagnostic serum 25-hydroxyvitamin D levels (Finland). *Cancer Causes Control.* 2000;11:847–52.
32. Giovannucci E, Liu Y, Rimm EB, Hollis BW, Fuchs CS, Stampfer MJ, et al. Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. *J. Natl. Cancer Inst.* 2006;98:451–9.
33. Kemmis CM, Salvador SM, Smith KM, Welsh J. Human mammary epithelial cells express CYP27B1 and are growth inhibited by 25-hydroxyvitamin D-3, the major circulating form of vitamin D-3. *J. Nutr.* 2006;136:887–92.
34. Chen P, Hu P, Xie D, Qin Y, Wang F, Wang H. Meta-analysis of vitamin D, calcium and the prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2009;121:469–77.
35. Buras RR, Schumaker LM, Davoodi F, Brenner RV, Shabahang M, Nauta RJ, et al. Vitamin D receptors in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 1994;31:191–202.

36. Welsh J. Vitamin D metabolism in mammary gland and breast cancer. *Mol. Cell Endocrinol.* 2011;347:55–60.
37. Hsu JY, Feldman D, McNeal JE, Peehl DM. Reduced 1 α -hydroxylase activity in human prostate cancer cells correlates with decreased susceptibility to 25-hydroxyvitamin D₃-induced growth inhibition. *Cancer Res.* 2001;61:2852–6.
38. Diesel B, Radermacher J, Bureik M, Bernhardt R, Seifert M, Reichrath J, et al. Vitamin D(3) metabolism in human glioblastoma multiforme: functionality of CYP27B1 splice variants, metabolism of calcidiol, and effect of calcitriol. *Clin. Cancer Res.* 2005;11:5370–80.
39. Townsend K, Evans KN, Campbell MJ, Colston KW, Adams JS, Hewison M. Biological actions of extra-renal 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase and implications for chemoprevention and treatment. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2005;97:103–9.
40. Beer TM, Myrthue A. Calcitriol in cancer treatment: from the lab to the clinic. *Mol. Cancer Ther.* 2004;3:373–81.
41. Blutt SE, Allegretto EA, Pike JW, Weigel NL. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and 9-cis-retinoic acid act synergistically to inhibit the growth of LNCaP prostate cells and cause accumulation of cells in G₁. *Endocrinology.* 1997;138:1491–7.
42. Hansen CM, Frandsen TL, Br nner N, Binderup L. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits the invasive potential of human breast cancer cells in vitro. *Clin. Exp. Metastas.* 1994;12:195–202.
43. Majewski S, Skopinska M, Marczak M, Szmurlo A, Bollag W, Jablonska S. Vitamin D₃ is a potent inhibitor of tumor cell-induced angiogenesis. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 1996;1:97–101.
44. Krishnan AV, Moreno J, Nonn L, Malloy P, Swami S, Peng L, et al. Novel pathways that contribute to the anti-proliferative and chemopreventive activities of calcitriol in prostate cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2007;103:694–702.
45. Colston K, Colston MJ, Feldman D. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and malignant melanoma: the presence of receptors and inhibition of cell growth in culture. *Endocrinology.* 1981;108:1083–6.
46. Hansen CM, Binderup L, Hamberg KJ, Carlberg C. Vitamin D and cancer: effects of 1,25(OH)₂D₃ and its analogs on growth control and tumorigenesis. *Front. Biosci.* 2001;6:D820–848.
47. Abe E, Miyaura C, Sakagami H, Takeda M, Konno K, Yamazaki T, et al. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *PNAS.* 1981;78:4990–4.
48. Miyaura C, Abe E, Kuribayashi T, Tanaka H, Konno K, Nishii Y, et al. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces differentiation of human myeloid leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981;102:937–43.
49. Honma Y, Hozumi M, Abe E, Konno K, Fukushima M, Hata S, et al. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ and 1 α -hydroxyvitamin D₃ prolong survival time of mice inoculated with myeloid leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983;80:201–4.
50. Pepper C, Thomas A, Hoy T, Milligan D, Bentley P, Fegan C. The vitamin D₃ analog EB1089 induces apoptosis via a p53-independent mechanism involving p38 MAP kinase activation and suppression of ERK activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *Blood.* 2003;101:2454–60.
51. Miller GJ, Stapleton GE, Ferrara JA, Lucia MS, Pfister S, Hedlund TE, et al. The Human Prostatic Carcinoma Cell Line LNCaP Expresses Biologically Active, Specific Receptors for 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃. *Cancer Res.* 1992;52:515–20.

52. Skowronski RJ, Peehl DM, Feldman D. Vitamin D and prostate cancer: 1,25 dihydroxyvitamin D3 receptors and actions in human prostate cancer cell lines. *Endocrinology*. 1993;132:1952–60.
53. Peehl DM, Skowronski RJ, Leung GK, Wong ST, Stamey TA, Feldman D. Antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on primary cultures of human prostatic cells. *Cancer Res*. 1994;54:805–10.
54. Schwartz GG, Oeler TA, Uskoković MR, Bahnson RR. Human prostate cancer cells: inhibition of proliferation by vitamin D analogs. *Anticancer Res*. 1994;14:1077–81.
55. Schwartz GG, Hill CC, Oeler TA, Becich MJ, Bahnson RR. 1,25-Dihydroxy-16-ene-23-yne-vitamin D3 and prostate cancer cell proliferation in vivo. *Urology*. 1995;46:365–9.
56. Schwartz GG, Wang MH, Zang M, Singh RK, Siegal GP. 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D (calcitriol) inhibits the invasiveness of human prostate cancer cells. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 1997;6:727–32.
57. Hsieh T, Wu JM. Induction of apoptosis and altered nuclear/cytoplasmic distribution of the androgen receptor and prostate-specific antigen by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in androgen-responsive LNCaP cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1997;235:539–44.
58. Eisman JA, Martin TJ, MacIntyre I. Presence of 1,25-dihydroxy vitamin D receptor in normal and abnormal breast tissue. *Prog. Biochem. Pharmacol*. 1980;17:143–50.
59. Findlay DM, Michelangeli VP, Eisman JA, Frampton RJ, Moseley JM, MacIntyre I, et al. Calcitonin and 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human breast cancer cell lines. *Cancer Res*. 1980;40:4764–7.
60. Chouvet C, Vicard E, Devonec M, Saez S. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibitory effect on the growth of two human breast cancer cell lines (MCF-7, BT-20). *J. Steroid Biochem*. 1986;24:373–6.
61. Welsh J. Induction of apoptosis in breast cancer cells in response to vitamin D and antiestrogens. *Biochem. Cell Biol*. 1994;72:537–45.
62. VanWeelden K, Flanagan L, Binderup L, Tenniswood M, Welsh J. Apoptotic regression of MCF-7 xenografts in nude mice treated with the vitamin D3 analog, EB1089. *Endocrinology*. 1998;139:2102–10.
63. Peng X, Jhaveri P, Hussain-Hakimjee EA, Mehta RG. Overexpression of ER and VDR is not sufficient to make ER-negative MDA-MB231 breast cancer cells responsive to 1alpha-hydroxyvitamin D5. *Carcinogenesis*. 2007;28:1000–7.
64. Verlinden L, Verstuyf A, Convents R, Marcelis S, Van Camp M, Bouillon R. Action of 1,25(OH)2D3 on the cell cycle genes, cyclin D1, p21 and p27 in MCF-7 cells. *Mol. Cell Endocrinol*. 1998;142:57–65.
65. Magrassi L, Bono F, Milanesi G, Butti G. Vitamin D receptor expression in human brain tumors. *J. Neurosurg. Sci*. 1992;36:27–30.
66. Naveilhan P, Berger F, Haddad K, Barbot N, Benabid AL, Brachet P, et al. Induction of glioma cell death by 1,25(OH)2 vitamin D3: towards an endocrine therapy of brain tumors? *J. Neurosci. Res*. 1994;37:271–7.
67. Baudet C, Chevalier G, Naveilhan P, Binderup L, Brachet P, Wion D. Cytotoxic effects of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and synthetic vitamin D3 analogues on a glioma cell line. *Cancer Lett*. 1996;100:3–10.

68. Baudet C, Chevalier G, Chassevent A, Canova C, Filmon R, Larra F, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces programmed cell death in a rat glioma cell line. *J. Neurosci. Res.* 1996;46:540–50.
69. Yu W, Yu W, Yu W, Yu W, Smith DC, Smith DC, et al. Enhancement of 1,25-Dihydroxyvitamin D3-Mediated Antitumor Activity With Dexamethasone. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998;90:134–41.
70. Beer TM, Eilers KM, Garzotto M, Egorin MJ, Lowe BA, Henner WD. Weekly High-Dose Calcitriol and Docetaxel in Metastatic Androgen-Independent Prostate Cancer. *J Clin. Oncol.* 2003;21:123–8.
71. Hershberger PA, Yu W-D, Modzelewski RA, Rueger RM, Johnson CS, Trump DL. Calcitriol (1,25-Dihydroxycholecalciferol) Enhances Paclitaxel Antitumor Activity in Vitro and in Vivo and Accelerates Paclitaxel-induced Apoptosis. *Clin. Cancer Res.* 2001;7:1043–51.
72. Ahmed S, Johnson CS, Rueger RM, Trump DL. Calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) potentiates activity of mitoxantrone/dexamethasone in an androgen independent prostate cancer model. *J. Urol.* 2002;168:756–61.
73. Sundaram S, Chaudhry M, Reardon D, Gupta M, Gewirtz DA. The vitamin D3 analog EB 1089 enhances the antiproliferative and apoptotic effects of adriamycin in MCF-7 breast tumor cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 2000;63:1–10.
74. Light BW, Yu W-D, McElwain MC, Russell DM, Trump DL, Johnson CS. Potentiation of Cisplatin Antitumor Activity Using a Vitamin D Analogue in a Murine Squamous Cell Carcinoma Model System. *Cancer Res.* 1997;57:3759–64.
75. Torres R, Calle C, Aller P, Mata F. Etoposide stimulates 1,25-dihydroxyvitamin D3 differentiation activity, hormone binding and hormone receptor expression in HL-60 human promyelocytic cells. *Mol. Cell Biochem.* 2000;208:157–62.
76. Abe-Hashimoto J, Kikuchi T, Matsumoto T, Nishii Y, Ogata E, Ikeda K. Antitumor Effect of 22-Oxa-calcitriol, a Noncalcemic Analogue of Calcitriol, in Athymic Mice Implanted with Human Breast Carcinoma and Its Synergism with Tamoxifen. *Cancer Res.* 1993;53:2534–7.
77. Koga M, Sutherland RL. Retinoic acid acts synergistically with 1,25-dihydroxyvitamin D3 or antioestrogen to inhibit T-47D human breast cancer cell proliferation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1991;39:455–60.
78. Majewski S, Szmurlo A, Marczak M, Jablonska S, Bollag W. Inhibition of tumor cell-induced angiogenesis by retinoids, 1,25-dihydroxyvitamin D3 and their combination. *Cancer Lett.* 1993;75:35–9.
79. Güzey M, Sattler C, DeLuca HF. Combinational effects of vitamin D3 and retinoic acid (all trans and 9 cis) on proliferation, differentiation, and programmed cell death in two small cell lung carcinoma cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998;249:735–44.
80. Peehl DM, Seto E, Hsu J-Y, Feldman D. Preclinical activity of ketoconazole in combination with calcitriol or the vitamin D analogue EB 1089 in prostate cancer cells. *J. Urol.* 2002;168:1583–8.
81. Dunlap N, Schwartz GG, Eads D, Cramer SD, Sherk AB, John V, et al. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) (calcitriol) and its analogue, 19-nor-1alpha,25(OH)(2)D(2), potentiate the effects of ionising radiation on human prostate cancer cells. *Br. J. Cancer.* 2003;89:746–53.
82. Polar MK, Gennings C, Park M, Gupta MS, Gewirtz DA. Effect of the vitamin D3 analog ILX 23-7553 on apoptosis and sensitivity to fractionated radiation in breast tumor cells and normal human fibroblasts. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2003;51:415–21.

83. Woloszynska-Read A, Johnson CS, Trump DL. Vitamin D and cancer: clinical aspects. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011;25:605–15.
84. Muindi JR, Potter DM, Peng Y, Johnson CS, Trump DL. Pharmacokinetics of liquid calcitriol formulation in advanced solid tumor patients: comparison with caplet formulation. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2005;56:492–6.
85. Beer TM, Munar M, Henner WD. A Phase I trial of pulse calcitriol in patients with refractory malignancies: pulse dosing permits substantial dose escalation. *Cancer.* 2001;91:2431–9.
86. Slapak CA, Desforges JF, Fogaren T, Miller KB. Treatment of acute myeloid leukemia in the elderly with low-dose cytarabine, hydroxyurea, and calcitriol. *Am. J. Hematol.* 1992;41:178–83.
87. Gross C, Stamey T, Hancock S, Feldman D. Treatment of early recurrent prostate cancer with 1,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol). *J. Urol.* 1998;159:2035–9.
88. Smith DC, Johnson CS, Freeman CC, Muindi J, Wilson JW, Trump DL. A Phase I trial of calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) in patients with advanced malignancy. *Clin. Cancer Res.* 1999;5:1339–45.
89. Beer TM, Lemmon D, Lowe BA, Henner WD. High-dose weekly oral calcitriol in patients with a rising PSA after prostatectomy or radiation for prostate carcinoma. *Cancer.* 2003;97:1217–24.
90. Trump DL, Potter DM, Muindi J, Brufsky A, Johnson CS. Phase II trial of high-dose, intermittent calcitriol (1,25 dihydroxyvitamin D3) and dexamethasone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer.* 2006;106:2136–42.
91. Beer TM, Hough KM, Garzotto M, Lowe BA, Henner WD. Weekly high-dose calcitriol and docetaxel in advanced prostate cancer. *Semin. Oncol.* 2001;28, Supplement 15:49–55.
92. Chadha MK, Tian L, Mashtare T, Payne V, Silliman C, Levine E, et al. Phase 2 trial of weekly intravenous 1,25 dihydroxy cholecalciferol (Calcitriol) in combination with dexamethasone for castration-resistant prostate cancer. *Cancer.* 2010;116:2132–9.
93. Muindi JR, Johnson CS, Trump DL, Christy R, Engler KL, Fakhri MG. A phase I and pharmacokinetics study of intravenous calcitriol in combination with oral dexamethasone and gefitinib in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2009;65:33–40.
94. Beer TM, Javle M, Lam GN, Henner WD, Wong A, Trump DL. Pharmacokinetics and Tolerability of a Single Dose of DN-101, a New Formulation of Calcitriol, in Patients with Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2005;11:7794–9.
95. Beer TM, Javle MM, Ryan CW, Garzotto M, Lam GN, Wong A, et al. Phase I study of weekly DN-101, a new formulation of calcitriol, in patients with cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2006;59:581–7.
96. Brawer MK. Recent Progress in the Treatment of Advanced Prostate Cancer With Intermittent Dose-Intense Calcitriol (DN-101). *Rev. Urol.* 2007;9:1–8.
97. Beer TM, Ryan CW, Venner PM, Petrylak DP, Chatta GS, Ruether JD, et al. Double-Blinded Randomized Study of High-Dose Calcitriol Plus Docetaxel Compared With Placebo Plus Docetaxel in Androgen-Independent Prostate Cancer: A Report From the ASCENT Investigators. *J Clin. Oncol.* 2007;25:669–74.
98. Scher HI, Jia X, Chi K, de Wit R, Berry WR, Albers P, et al. Randomized, open-label phase III trial of docetaxel plus high-dose calcitriol versus docetaxel plus prednisone for patients with castration-resistant prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* 2011;29:2191–8.

99. Hansen CM, Hamberg KJ, Binderup E, Binderup L. Seocalcitol (EB 1089): a vitamin D analogue of anti-cancer potential. Background, design, synthesis, pre-clinical and clinical evaluation. *Curr. Pharm. Des.* 2000;6:803–28.
100. Colston KW, Mackay AG, James SY, Binderup L, Chander S, Coombes RC. EB1089: a new vitamin D analogue that inhibits the growth of breast cancer cells in vivo and in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 1992;44:2273–80.
101. Gulliford T, English J, Colston KW, Menday P, Moller S, Coombes RC. A phase I study of the vitamin D analogue EB 1089 in patients with advanced breast and colorectal cancer. *Br. J. Cancer.* 1998;78:6–13.
102. Dalhoff K, Dancey J, Astrup L, Skovsgaard T, Hamberg KJ, Lofts FJ, et al. A phase II study of the vitamin D analogue Seocalcitol in patients with inoperable hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer.* 2003;89:252–7.
103. Evans TRJ, Colston KW, Lofts FJ, Cunningham D, Anthoney DA, Gogas H, et al. A phase II trial of the vitamin D analogue Seocalcitol (EB1089) in patients with inoperable pancreatic cancer. *Br. J. Cancer.* 2002;86:680–5.
104. Schwartz GG, Hall MC, Stindt D, Patton S, Lovato J, Torti FM. Phase I/II study of 19-nor-1alpha-25-dihydroxyvitamin D₂ (paricalcitol) in advanced, androgen-insensitive prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 2005;11:8680–5.
105. Liu G, Wilding G, Staab MJ, Horvath D, Miller K, Dresen A, et al. Phase II study of 1alpha-hydroxyvitamin D₂ in the treatment of advanced androgen-independent prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 2003;9:4077–83.
106. Hughes MR, Baylink DJ, Jones PG, Haussler MR. Radioligand receptor assay for 25-hydroxyvitamin D₂/D₃ and 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D₂/D₃. *J. Clin. Invest.* 1976;58:61–70.
107. Barreto AM, Schwartz GG, Woodruff R, Cramer SD. 25-Hydroxyvitamin D₃, the prohormone of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, inhibits the proliferation of primary prostatic epithelial cells. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2000;9:265–70.
108. Lou YR, Molnar F, Perakyla M, Qiao S, Kalueff AV, St-Arnaud R, et al. 25-Hydroxyvitamin D₃ is an agonistic vitamin D receptor ligand. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2010;118:162–70.
109. Krishnan AV, Trump DL, Johnson CS, Feldman D. The role of vitamin D in cancer prevention and treatment. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2010;39:401–418, table of contents.
110. Pavanetto F, Conti B, Genta I, Giunchedi P. Solvent evaporation, solvent extraction and spray drying for polylactide microsphere preparation. *Int. J. Pharm.* 1992;84:151–9.
111. Shi X-Y, Tan T-W. Preparation of chitosan/ethylcellulose complex microcapsule and its application in controlled release of Vitamin D₂. *Biomaterials.* 2002;23:4469–73.
112. Patel MR, San Martin-Gonzalez MF. Characterization of Ergocalciferol Loaded Solid Lipid Nanoparticles. *J. Food Sci.* 2012;77:N8–N13.
113. Li Q, Liu CG, Huang ZH, Xue FF. Preparation and characterization of nanoparticles based on hydrophobic alginate derivative as carriers for sustained release of vitamin D₃. *J. Agr. Food Chem.* 2011;59:1962–7.
114. Sun F, Ju C, Chen J, Liu S, Liu N, Wang K, et al. Nanoparticles based on hydrophobic alginate derivative as nutraceutical delivery vehicle: vitamin D₃ loading. *Artif. Cell Blood Sub.* 2012;40:113–9.

115. Haham M, Ish-Shalom S, Nodelman M, Duek I, Segal E, Kustanovich M, et al. Stability and bioavailability of vitamin D nanoencapsulated in casein micelles. *Food Funct.* 2012;3:737–44.
116. Luo Y, Teng Z, Wang Q. Development of Zein Nanoparticles Coated with Carboxymethyl Chitosan for Encapsulation and Controlled Release of Vitamin D3. *J. Agric. Food Chem.* 2012;60:836–43.
117. Luca G, Basta G, Calafiore R, Rossi C, Giovagnoli S, Esposito E, et al. Multifunctional microcapsules for pancreatic islet cell entrapment: design, preparation and in vitro characterization. *Biomaterials.* 2003;24:3101–14.
118. Nguyen TLU, Tey SY, Pourgholami MH, Morris DL, Davis TP, Barner-Kowollik C, et al. Synthesis of semi-biodegradable crosslinked microspheres for the delivery of 1,25 dihydroxyvitamin D3 for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Eur. Polym. J.* 2007;43:1754–67.
119. Persons KS, Hareesh S, J. Eddy V, Ray R. Liposomal 1,25-dihydroxyvitamin D3-3 β -bromoacetate is a Stronger Growth-inhibiting Agent than its un-encapsulated Counterpart in Prostate Cancer Cells. *J. Ster. Horm. Sci.* 2010;01.
120. Merz K, Sternberg B. Incorporation of Vitamin D3-Derivatives in Liposomes of Different Lipid Types. *J. Drug Target.* 1994;2:411–7.
121. Prüfer K, Merz K, Barth A, Wollina U, Sternberg B. Interaction of Liposomal Incorporated Vitamin D3-Analogues and Human Keratinocytes. *J. Drug Target.* 1994;2:419–29.

Partie Expérimentale

Objectifs du travail de thèse

Lors d'une administration systémique ou locale, les nanoparticules polymères non modifiées en surface sont soumises à une reconnaissance et une élimination par les cellules phagocytes mononucléés dont les macrophages. Cette capture des nanoparticules par les macrophages pourrait présenter un outil efficace pour le ciblage passif des macrophages en délivrant spécifiquement une substance active au sein de ces derniers. Ces nanoparticules offriraient ainsi une nouvelle stratégie thérapeutique dans des pathologies où l'intervention des macrophages est majeure comme des maladies auto-immunes, infectieuses ou certains cancers. Les macrophages sont effectivement la population immunitaire la plus présente dans certaines tumeurs et jouent un rôle important sur le caractère invasif de ces tumeurs et leur évolution.

L'objectif de ce travail de recherche est de mettre au point des nanoparticules polymères capable de cibler les macrophages infiltrés dans la tumeur et de libérer *in situ* un principe actif encapsulé au sein de ces nanoparticules. Les nanoparticules pourraient ainsi modifier les fonctions des macrophages ou encore permettre l'utilisation des macrophages comme une réserve de principe actif anticancéreux. Les travaux expérimentaux s'articulent autour trois axes :

- Formulation et caractérisation de nanoparticules d'acide tout-*trans* rétinoïque (atRA) en vue de moduler les fonctions des macrophages
- Mise en évidence de la capture des nanoparticules développées par les macrophages et de leur persistance *in vitro* ainsi que du ciblage des macrophages infiltrant les tumeurs *in vivo*.
- Evaluation de l'efficacité de notre système sur la vectorisation de dérivés de la vitamine D comme principes actifs anticancéreux.

Dans un premier temps, les travaux expérimentaux ont porté sur une étude de préformulation des nanoparticules à base de polymères biodégradables, ces nanoparticules devant avoir une taille proche de 200 nm avec une faible dispersion. Les formules retenues ont été utilisées pour l'encapsulation de l'acide tout-*trans* rétinoïque (atRA) comme modulateur des fonctions macrophagiques. Nous avons décrit dans le Chapitre II que l'instabilité, l'insolubilité, la faible biodisponibilité et les effets secondaires de l'atRA sont les

limites principales à son utilisation thérapeutique, faisant de cette molécule un candidat d'intérêt à la vectorisation. La vectorisation d'atRA comme agent immunomodulateur est très peu documentée dans la littérature, de même, très peu de travaux portent sur son encapsulation dans des nanoparticules polymères. L'objectif est d'obtenir des nanoparticules présentant des rendements d'encapsulation en atRA importants, un profil de libération prolongée et permettant d'améliorer la stabilité de l'atRA.

Dans un deuxième temps, le Rouge Nile (NR), marqueur fluorescent, a été encapsulé pour visualiser et quantifier l'internalisation des nanoparticules par les macrophages. Pour l'étude de phagocytose *in vitro*, des macrophages générés à partir de moelle osseuse de souris ont été utilisés. La phagocytose a été visualisée par microscopie à fluorescence et microscopie confocale et quantifiée par cytométrie en flux. Ensuite, le potentiel des NP à cibler les macrophages infiltrés dans la tumeur a été vérifié. Pour cela, un modèle tumoral de xénogreffe de gliome humain sur des souris immunodéprimées a été utilisé et les nanoparticules ont été administrées par injection intra-tumorale.

Dans un troisième temps, ces nanoparticules ont été employées pour une deuxième application thérapeutique. Les propriétés anticancéreuses des dérivés de la vitamine D présentées dans le Chapitre III montrent que la vectorisation peut être une solution aux échecs actuels des essais cliniques. Par conséquent, notre système nanoparticulaire, capable de cibler les macrophages de tumeurs, pourrait permettre l'administration d'une dose efficace, plus élevée que dans les essais traditionnels, et concentrée sur la tumeur sans engendrer les hypercalcémies secondaires. Une étude de formulation et de caractérisation a été conduite sur l'encapsulation des dérivés de la vitamine D₃. Les activités anticancéreuses des nanoparticules obtenues ont ensuite été évaluées *in vitro* sur des cellules de gliome (lignée SF767) ainsi que sur des cellules de cancer du sein (lignée MCF-7).

Les travaux expérimentaux concernant l'étude de l'internalisation *in vitro* et *in vivo* ainsi que les études d'efficacité sur les macrophages et les gliomes ont été réalisés en collaboration avec le Pr. Serge Nataf de l'équipe « Neuro-Oncologie et Neuro-Inflammation » du Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon Inserm U1028 - CNRS UMR5292.

L'évaluation de l'activité anticancéreuse des nanoparticules, encapsulant des dérivés de la vitamine D, a été faite en collaboration avec le Dr. Lars Jordheim dans l'équipe « Anticorps-Anticancer » du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (UMR Inserm 1052 CNRS 5286).

Chapitre IV

Développement de nanoparticules polymères d'acide rétinoïque pour le ciblage de macrophages

Chapitre IV. Développement de nanoparticules d'acide rétinoïque pour le ciblage de macrophages

IV.1. Introduction

Dans ce chapitre seront présentés les travaux concernant la formulation des nanoparticules polymères encapsulant l'atRA comme modulateur des fonctions macrophagiques. L'objectif de l'étude est d'obtenir des NP monodisperses d'une taille proche de 200 nm, présentant des rendements d'encapsulation en atRA importants ainsi qu'une action prolongée sur les macrophages en améliorant la stabilité de l'atRA et en contrôlant sa libération. Après l'optimisation de la formulation des NP, le Rouge Nile (NR), marqueur fluorescent, a été encapsulé pour visualiser et quantifier l'internalisation des NP par les macrophages. L'internalisation des NP a été étudiée *in vitro* sur des macrophages générés à partir de moelle osseuse de souris. Ensuite, une étude d'internalisation *in vivo* a été réalisée sur un modèle tumoral de xélogreffe de gliome humain chez souris immunodéprimées connu pour être infiltré par les macrophages. Enfin nous avons essayé de mettre en évidence les propriétés modulatrices de l'atRA encapsulé en explorant son activité sur la régulation de certains gènes des macrophages par RT-PCR. Certains résultats de ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans *International Journal of Pharmaceutics* en 2012.

Avant de présenter les travaux publiés, nous aborderons dans un premier temps les étapes de formulation des NP (nanosphères, nanocapsules, choix du polymère...). Dans un second temps, le développement de la méthode de dosage de l'atRA qui est importante pour étudier l'efficacité d'encapsulation, le profil de libération mais aussi la stabilité, avec notamment les problèmes d'isomérisation. Un point sur la stabilité de l'acide rétinoïque après l'encapsulation est abordé. Le développement de la méthode d'étude de la libération est discuté car le choix des milieux et du protocole est également très important pour bien caractériser nos NP.

IV.2. Formulation des NP polymères

Une étude de formulation a été réalisée afin de sélectionner une formule conduisant à des NP d'une taille proche de 200 nm avec une distribution granulométrique étroite. Cette limite de taille des NP est fixée afin d'assurer leur diffusion au niveau du site d'injection et de faciliter leur phagocytose par les macrophages mais aussi en vue de permettre leur stérilisation par filtration. Les nanoparticules sont préparées par nanoprécipitation car il s'agit d'une méthode rapide, simple à mettre en œuvre et facilement transposable à grande échelle. De plus cette méthode se prête particulièrement à l'encapsulation de principes actifs hydrophobes comme l'acide rétinoïque (1).

IV.2.1. Préparation des nanoparticules et formulations étudiées

La technique de nanoprécipitation a été choisie pour préparer les NP en proposant deux formes, des nanosphères (NS) et des nanocapsules (NC). Nous avons testé deux types de polymères biocompatibles et biodégradables de la famille des polyesters: la Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) et l'acide poly(D,L)lactique (PLA), approuvés par la FDA pour l'utilisation pharmaceutique et s'hydrolysant dans les conditions physiologiques en formant des composants non toxiques (2). Nous avons varié leur concentration et leur poids moléculaire. Dans le cas des NC, une huile a été ajoutée pour former le coeur des NC. Différents ratios polymère:huile ont été testés. La première partie de l'optimisation de la formulation a été faite sur des NP sans principe actif (NP blanches). Les compositions des formules de NP étudiées sont les suivantes :

Phase organique :

- Solvant : 25 mL d'acétone
- Polymère : 0,5 à 2,5 % (m/m)
 - o Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) dont Mw 14000 – 65000 – 80000 g/mol(Sigma-Aldrich)
 - o Acide poly(D,L)lactique (PLA, Mw 20000 g/mol, Evonik)
- Huile : 0 à 2,5 % de Miglyol[®]829 (caprylic, capric, succinic triglycerides, Sasol)

Phase aqueuse :

- 50 mL d'eau déminéralisée
- Tensioactif : 0,05 à 0,1% de Polysorbate 80 (Montanox[®] 80 VG, Seppic)

La phase organique est ajoutée à la phase aqueuse sous agitation modérée provoquant la diffusion de l'acétone dans l'eau et la formation des NP par insolubilisation du polymère. Le solvant organique est éliminé et la suspension de NP est concentrée par évaporation sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor R-205 : P = 35 mbars, T = 40°C, 100 tour/min) afin d'obtenir un volume final compris entre 10 et 25 mL. La suspension des NP est conservée à 4°C.

La taille moyenne des nanoparticules est mesurée par spectroscopie à corrélation de photons avec un Zetasizer®Nano-serie (Malvern Instruments) après dilution dans l'eau distillée. La distribution de taille est présentée en courbe logarithmique et quantifiée par l'indice de polydispersité (PdI). La charge de surface des NP est mesurée par le même appareil en déterminant le potentiel Zeta.

IV.2.2. Influence du polymère sur les caractéristiques des nanoparticules

Une première série de NP a été faite pour étudier l'impact de la concentration et du poids moléculaire du polymère sur la taille des NP. En utilisant trois types de PCL à trois concentrations différentes, neuf formules de NS et neuf formules de NC (contenant 1,25% d'huile) ont été étudiées en fixant la concentration en polysorbate 80 à 0,1%.

Tableau 2 : Effet du type de PCL et de sa concentration sur la taille et la polydispersité (PdI) des NP

Polymère		NS			NC		
Mw	Concentration		Taille (nm)	PdI		Taille (nm)	PdI
80000	2,5%	NS1	589	0.07	NC1	816	0.23
80000	1,25%	NS2	362	0.35	NC2	787	0.23
80000	0.625%	NS3	200	0.14	NC3	377	0.22
65000	2,5%	NS4	545	0.32	NC4	507	0.15
65000	1,25%	NS5	327	0.23	NC5	348	0.14
65000	0.625%	NS6	267	0.19	NC6	322	0.21
14000	2,5%	NS7	277	0.21	NC7	485	0.16
14000	1,25%	NS8	261	0.15	NC8	386	0.25
14000	0.625%	NS9	157	0.10	NC9	270	0.19

Le poids moléculaire et la concentration en polymère ont une influence marquée sur la taille de NS et NC mais moins sur la polydispersité (Tableau 2). La taille de NP diminue avec l'utilisation d'un polymère de faible poids moléculaire et à faible concentration. La plus petite taille de NP est obtenue avec 0,625%, de PCL 14000(NS9 et NC9).

L'effet de la nature du polymère a aussi été étudié en comparant deux polymères, PLA et PCL, de faible poids moléculaire à la même concentration de 2,5% (Tableau 3). Le changement de polymère n'influence pas les NS mais des NC plus petites ont été obtenues avec le PLA.

Tableau 3 : Influence de la nature du polymère, PLA ou PCL, sur la taille des particules NS ou NC

Polymère		NS			NC		
Mw	Concentration	Taille (nm)		PdI	Taille (nm)		PdI
PCL 14000	2,5%	NS7	277	0.21	NC7	485	0.16
PLA 20000	2.5%	NS10	286	0.11	NC10	359	0.18

IV.2.3. Effet du tensioactif sur les propriétés des nanoparticules

Pour voir l'influence de la concentration en polysorbate 80 dans la phase aqueuse sur la taille des NP, trois concentrations ont été testées 0,1 ; 0,5 et 1 %. En utilisant 2,5% de PCL 80000, 3 formules de NS et 3 autres de NC (avec 1,25% d'huile) ont été réalisées (Tableau 4).

L'augmentation de la concentration en tensioactif diminue la taille des NS de façon significative. En revanche avec les NC, il faut une concentration minimale de 1% de tensioactif pour observer une diminution de taille qui est accompagnée d'une augmentation de polydispersité.

Tableau 4 : Effet du tensioactif sur la taille et la polydispersité (PdI) des NP

Concentration de Montanox®80	NS			NC		
		Taille (nm)	PdI		Taille (nm)	PdI
0.1%	NS1	589	0.07	NC1	816	0.23
0.5%	NS11	384	0.35	NC11	812	0.38
1%	NS12	316	0.10	NC12	360	0.37

IV.2.4. Sélection du ratio polymère:huile pour la formulation des nanocapsules

Différents ratio polymère:huile ont été utilisés afin d'optimiser la quantité d'huile à ajouter dans la formulation des NC9 (PCL 14000 à 0,625%). Les ratios testés étaient de 2:1 ; 1:1 ; 1:1.5 et 1:2 correspondant respectivement à des concentrations en Miglyol[®] 829 de 0,312 ; 0,625 ; 0,937 et 1,25%. Le ratio 1:1,5 a été retenu pour la suite des études du fait de la préparation des NC sans problème de précipitation.

IV.2.5. Formule retenue

Suite aux résultats précédents les paramètres de formulation des NP ont été fixés afin d'obtenir des nanoparticules (NS ou NC) proches de 200 nm avec une distribution de taille monodisperse. Afin d'atteindre ces objectifs nous avons vu qu'il était donc préférable d'utiliser un polymère de faible poids moléculaire et à faible concentration. Le ratio polymère:huile a été fixé à 1:1,5 pour les NC. Le tensioactif n'a pas une grande influence sur la taille des particules donc la concentration minimale de 0,05% a été choisie pour les NS et les NC. La formulation définitive a ensuite été obtenue en ajustant légèrement les concentrations tout en gardant le même ratio polymère:huile de façon à diminuer encore un peu la taille des nanoparticules pour faciliter la filtration stérilisante. La formule retenue est la suivante :

- 0,5% de polymère (PCL 14000 ou PLA 20000)
- 0,75% d'huile dans les NC (Miglyol[®]829)
- 0,05% de tensioactif (Montanox[®]80)

Cette formule a été ensuite utilisée pour encapsuler l'acide rétinoïque (atRA) ou le Rouge Nile. Cette partie de l'étude fera l'objet du §IV.7.4.1 et §IV.7.4.2. Toutefois l'encapsulation de l'atRA au sein des nanoparticules a nécessité la mise au point d'une méthode de dosage chromatographique de l'atRA fiable qui est présentée dans le paragraphe suivant.

IV.3. Développement de la méthode de dosage de l'acide rétinoïque

Au cours la formulation et de la caractérisation des NP d'atRA, une méthode de dosage précise, sensible et capable de détecter les isomères de l'atRA est nécessaire. L'atRA par une réaction de photoisomérisation, se transforme rapidement en 13-*cis* RA, 9-*cis* RA et 11-*cis* RA Nous avons utilisé la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC, Waters 600 Controller et Waters 717 Auto sampler) couplée avec un détecteur spectrophotométrie UV-visible (Waters 2996) afin de développer deux méthodes de dosage de l'atRA. La première méthode développée est une méthode longue, sélective, capable de bien séparer les isomères ; elle sera utile pour déterminer précisément les taux d'encapsulation en atRA et pour les études de stabilité. En revanche, la seconde méthode est plus rapide, plus sensible (capable de quantifier des faibles concentrations de l'atRA) mais peu sélective des différents isomères. Elle sera utilisée pour la quantification de l'atRA lors des études de libération.

IV.3.1. Méthode de dosage sélective

Cette méthode a été développée afin de séparer les trois isomères principaux de l'acide rétinoïque, le 13-*cis* RA, le 9-*cis* RA et l'atRA. A partir de la méthode développée par Kane *et al.* (3) et en testant différents paramètres et phases mobiles la méthode retenue est une méthode isocratique en phase inverse dont les détails sont mentionnés ci-après :

- Phase stationnaire : colonne C18 Kinetex[®] core-shell (Phenomenex), granulométrie 2,6 μm , dimensions 4,6 mm * 100 mm, sélectionner pour sa capacité de réduire le temps de séparation. La température de la colonne est maintenue à 50°C.
- Phase mobile : 30% de méthanol + 35% d'acétonitrile + 30% de solution aqueuse d'acide acétique à 0,5% (pH 2,9) avec un débit 1,4 mL/min
- Volume injecté : 10 μL
- Détection : absorbance à $\lambda=356$ nm

La Figure 18 montre que les trois isomères sont bien séparés sur un cycle de 23 min. Les temps de rétention respectifs sont 17,0 min, 18,5 min et 19,3 min pour le 13-*cis* RA, le 9-*cis* RA et l'atRA. La gamme d'étalonnage a été réalisée avec un mélange dans l'acétonitrile de trois isomères achetés chez Sigma-Aldrich et dont la pureté est de 99%. Le mélange contenait des quantités égales de 13-*cis* RA et atRA et 10 fois moins de 9-*cis* RA car dans la

pratique cet isomère est présent en très faible proportion. Trois courbes d'étalonnage ont été établies afin de quantifier l'atRA et le 13-*cis* RA entre 0,5 et 20 µg/mL et le 9-*cis* RA entre 0,05 et 2 µg/mL. Les propriétés de ces courbes d'étalonnage sont présentées dans le Tableau 5. La variabilité inter-journalière sur 6 jours du dosage d'atRA, représentée par le coefficient de variation (CV), était égale à 2,6 %.

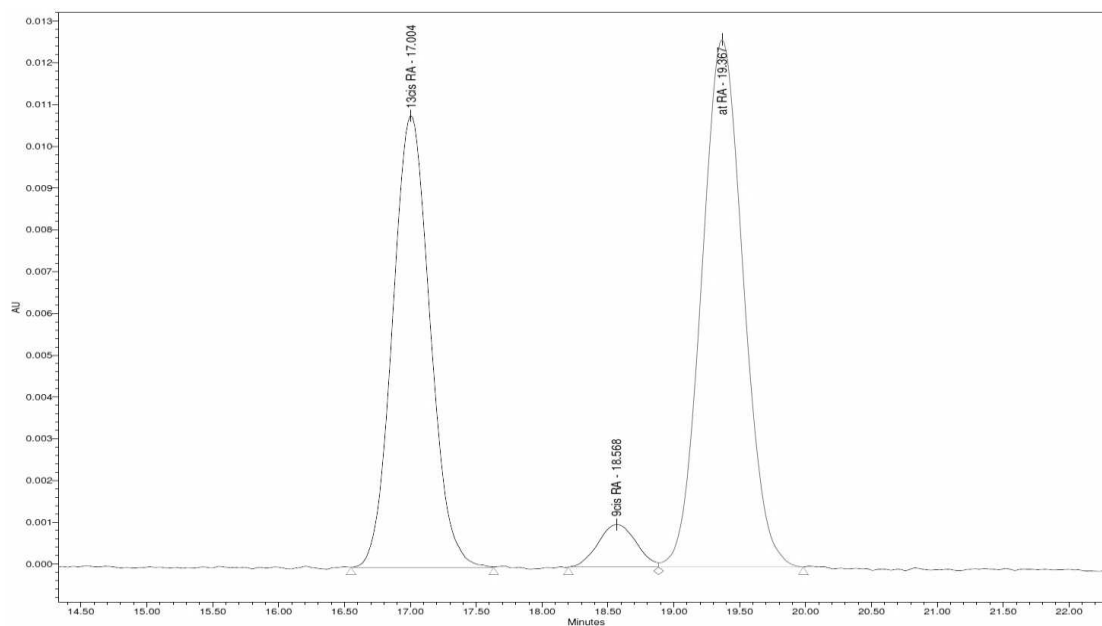


Figure 18 : Chromatogramme montrant la séparation des trois isomères de l'acide rétinoïque.

Tableau 5 : Propriétés des courbes d'étalonnage des trois isomères

Courbe d'étalonnage	atRA	13- <i>cis</i> -RA	9- <i>cis</i> -RA
Pente de la droite = A	5,5563E+04	4,2688E+04	4,5054E+04
Ordonnée à l'origine de la droite = B	1,5859E+03	2,2870E+03	-3,9709E+02
Erreur pour la pente	7,6093E+02	5,0256E+02	8,7867E+02
Erreur pour l'ordonnée à l'origine	7,1263E+03	4,7067E+03	8,2290E+02
Coefficient de régression linéaire R ²	0,9993	0,9994	0,9985

IV.3.2. Méthode de dosage sensible

La limite de la méthode précédente est la difficulté de quantifier de faibles concentrations en atRA. Du fait de la faible granulométrie de la colonne, l'augmentation du volume d'injection provoque un élargissement asymétrique des pics rendant le chromatogramme inexploitable. Pour les études de libération *in vitro* nécessitant la quantification parfois de très faibles quantités de principe actif, une méthode plus rapide et plus sensible a été développée. Cette méthode ne permet notamment pas la séparation totale des 9-*cis* RA et atRA, mais compte-tenu de la faible concentration en 9-*cis* RA potentiellement formée pendant l'étude de libération, ce manque de sélectivité ne s'avérait pas problématique. La méthode obtenue est isocratique en phase inverse dont les détails sont mentionnés ci-après :

- Phase stationnaire : colonne C18 X-Terra®MS (Waters), granulométrie 5 μm , dimensions 4,6 mm * 250 mm, maintenue à une température de 25°C.
- Phase mobile : 80% de méthanol + 10% d'acétonitrile + 10% de solution aqueuse d'acide acétique à 0,5% (pH 2,9) avec un débit de 1 mL/min
- Volume injecté : 100 μL
- Détection : absorbance à $\lambda = 356 \text{ nm}$

Une très bonne sensibilité a été obtenue avec une limite de détection de 1 ng (0,01 $\mu\text{g/mL}$) et une limite de quantification de 2,5 ng (0,025 $\mu\text{g/mL}$) (Figure 19). Dans un cycle de 12 min, le temps de rétention pour l'atRA était de 9,8 min. La gamme d'étalonnage a été réalisée avec une solution d'atRA dans l'acétonitrile. Nous avons obtenu une droite d'étalonnage d'atRA entre 0,025 et 5 $\mu\text{g/mL}$ avec un coefficient de régression $R^2 > 0,999$ et un coefficient de variation CV égal à 3,3 %.

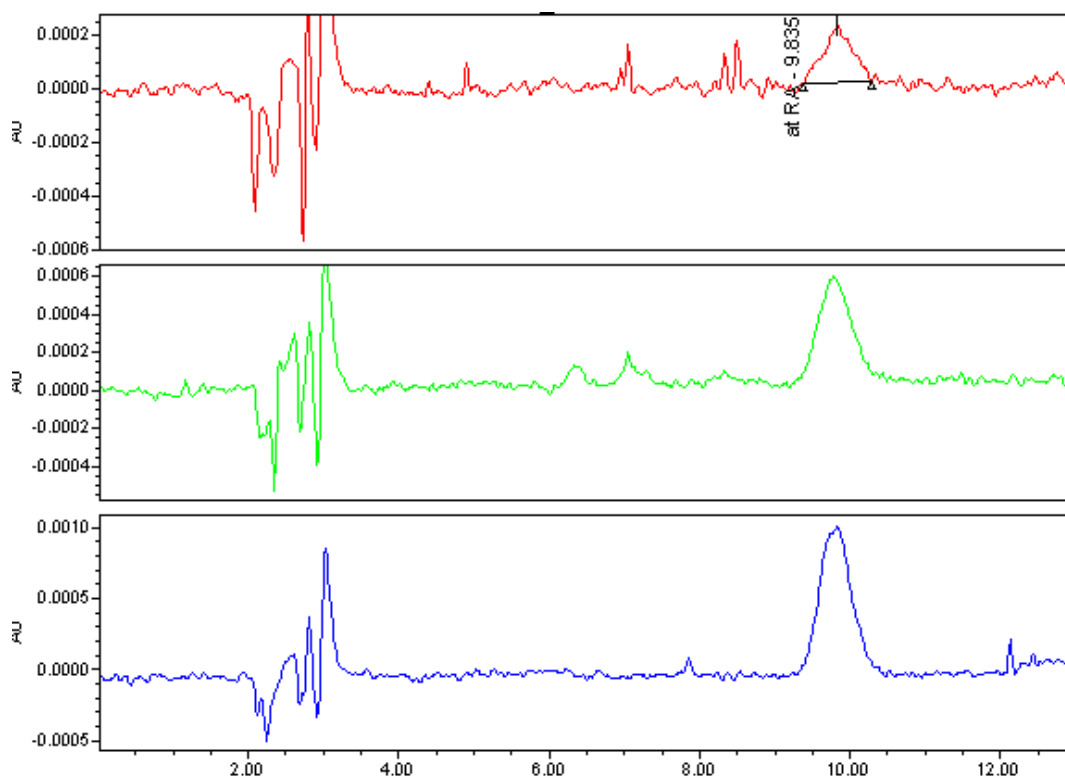


Figure 19 : Chromatogramme de l'acide rétinoïque à une concentration de 0,01 µg/mL (rouge), 0,025 µg/mL (vert) et 0,05 µg/mL (bleu).

IV.4. Stabilité de l'atRA encapsulé : étude d'isomérisation de l'atRA

Lors des études de préformulation des nanoparticules d'atRA (atRA-NP), la stabilité de l'atRA notamment son isomérisation pendant et après l'encapsulation présente un point important à maîtriser. Des NP d'atRA (99% de pureté) ont été préparées et stockées dans différentes conditions : 4°C à l'abri de lumière, température ambiante (T_{amb}) à l'abri de lumière et à la lumière. L'acide rétinoïque contenu dans les NP a été dosé en différenciant les trois isomères directement après l'encapsulation (t_0) ou 7 jours et 30 jours après. Les résultats des dosages sont présentés en Figure 20 (en concentration (µg/mL) et dans le Tableau 6 (en pourcentage).

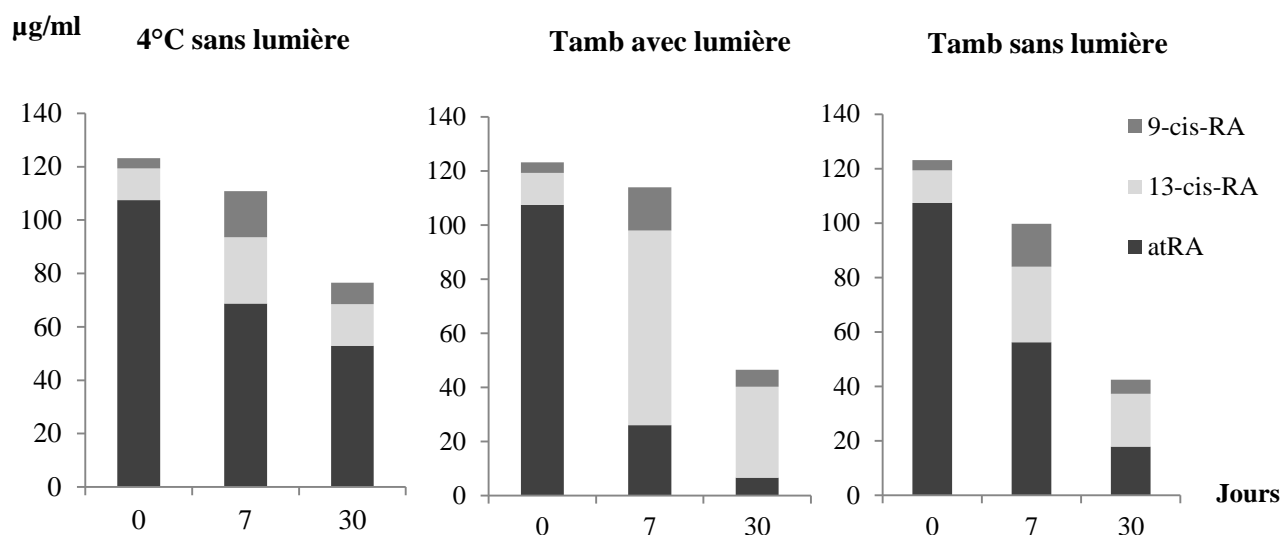


Figure 20 : Stabilité de l'atRA dans les NP dans différentes conditions de stockage. Les résultats sont présentés en concentration de trois isomères ($\mu\text{g/mL}$).

Directement après l'encapsulation, une isomérisation d'atRA peut être détectée conduisant à la formation de 9,7% de 13-cis RA et 3,1% de 9-cis RA. Cela signifie que le procédé d'encapsulation (température, lumière...) provoque une première isomérisation. L'encapsulation de l'atRA doit donc se faire le maximum à l'abri de la lumière en évitant toute élévation de température.

La dégradation du RA totale est d'environ 10% après 7 jours et peut atteindre jusqu'à 65% pour les NP stockées à température ambiante. Il est difficile de différencier la dégradation de l'isomérisation car les deux processus sont simultanés. Toutefois nous pouvons considérer que les trois isomères se dégradent pendant le stockage et afin de s'affranchir de la dégradation et de n'étudier que l'isomérisation, les pourcentages des isomères par rapport au total non-dégradé ont été calculés (Tableau 6).

Les résultats nous montrent que l'isomérisation est principalement provoquée par la lumière et aussi par la température. La température n'entraîne une forte isomérisation qu'après 30 jours où environ 40% de 13-cis-RA ont été détectés. Cependant, la lumière a induit une isomérisation en 13-cis RA très marquée dès 7 jours avec 63,2% de 13-cis RA à 7 jours puis 72,3% après 30 jours. L'isomérisation en 9-cis RA reste d'environ 10 à 15 % durant toute l'étude.

Tableau 6 : Stabilité d'atRA dans les NP dans différentes conditions de stockage. A chaque temps et pour chaque condition le pourcentage total est le contenu de l'ensemble de l'acide rétinoïque par rapport au temps t0. Le pourcentage de chaque isomère est calculé à chaque fois par rapport au total au même temps. (Tamb = température ambiante, L = lumière, SL = sans lumière).

Temps	condition	Total (%)	atRA (%)	9-cis-RA (%)	13-cis-RA (%)
t0		100,0	87,2	3,1	9,7
t7j	4°C SL	89,9	62,1	15,5	22,4
	Tamb L	92,5	22,8	14,0	63,2
	Tamb SL	81,0	56,3	15,8	27,9
t30j	4°C SL	62,1	69,2	10,5	20,4
	Tamb L	37,7	14,4	13,3	72,3
	Tamb SL	34,5	42,1	12,2	45,6

Nous constatons toutefois que la température est plutôt une source de dégradation du RA sous ses trois formes isomériques et que la lumière est essentiellement responsable des phénomènes d'isomérisation. Dans cette expérience, l'effet protecteur proprement dit des NP n'a pas été évalué, le but étant principalement ici de déterminer la durée et les conditions de conservation des NP-atRA ou encore les précautions à prendre lors de la mise sous forme galénique de l'atRA. Une comparaison entre la forme encapsulée et libre a été faite dans les conditions de culture cellulaire et est présentée en §- 122 -IV.7.4.1.

En faisant d'autres essais d'encapsulation, nous avons réussi à limiter la photo-isomérisation à moins de 10% en travaillant à l'abri de lumière et en abaissant la température d'évaporation à 30°C. La limite de 10% a donc été sélectionnée comme critère d'acceptabilité de la stabilité de l'atRA. Les NP ont été stockées à 4°C et à l'abri de lumière pendant 7 jours maximum, délai après lequel 90% de l'atRA reste stable. Pour la suite de notre étude l'isomérisation ne sera plus considérée et les résultats seront exprimés en valeur totale d'acide rétinoïque (RA). En effet, dans le cadre de notre application les différents dérivés de RA sont susceptibles de présenter une action biologique directe ou indirecte.

IV.5. Cinétiques de libération *in vitro* de l'acide rétinéique (RA) : étude du choix du milieu de dissolution

Le profil de libération du RA est un caractère important pour évaluer le potentiel des NP à permettre une libération prolongée et ainsi prolonger l'action du RA. Pour étudier le profil de libération, il faut bien sélectionner la méthode et le milieu qui assurent les conditions sink (concentration maximale d'actif dissous trois fois inférieure à sa concentration de saturation) (4).

Le tampon phosphate salin (PBS, 0,01M, pH 7,4) est un milieu largement utilisé car il simule l'osmolarité et le pH des fluides biologiques. Le RA présente une mauvaise solubilité dans l'eau (0,063 µg/mL (5)) donc l'utilisation d'un solubilisant est nécessaire. Nous avons choisi le Montanox[®]80 (polysorbate 80) qui est un bon solubilisant déjà utilisé comme stabilisant pour la préparation des NP. L'éthanol a été aussi testé comme un co-solvant n'ayant pas de pouvoir solubilisant sur le polymère des NP.

La solubilité du RA dans le PBS avec différentes concentration de Montanox[®]80 ou dans le PBS:éthanol à différents ratios a été déterminée. Un excès de RA a été ajouté et mélangé au milieu pendant 24h puis la partie non dissoute a été éliminée par centrifugation et la quantité solubilisée a été mesurée par HPLC. Deux milieux ont été retenus : le PBS avec 0.05% de Montanox[®]80 et un mélange PBS:éthanol (8:2, V:V). La solubilité de l'atRA dans ces deux milieux est d'environ 10 µg/mL. Une étude de stabilité du RA dans ces deux milieux a montré une forte dégradation dans le milieu contenant le Montanox[®]80 contrairement au milieu avec l'éthanol qui a été donc retenu pour la suite des études de libération *in vitro* (Figure 21).

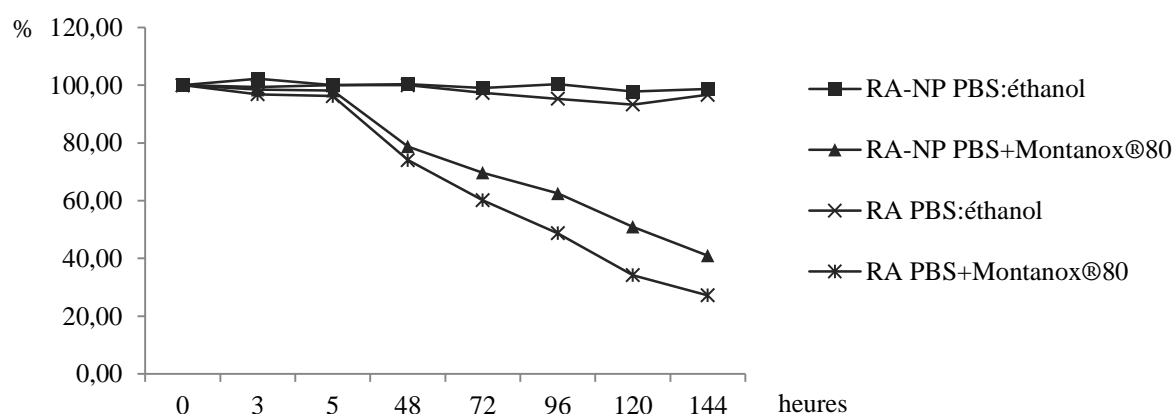


Figure 21 : Stabilité du RA libre ou encapsulé dans les deux milieux de libération.

IV.6. Développement de nanoparticules d'acide rétinolique et étude de leur internalisation par les macrophages

Les études présentées ci-dessous ont fait l'objet d'une publication dans *International Journal of Pharmaceutics* en 2012 (Vol 430(1-2), p 207-215) intitulée « Development of a nanoparticle-based system for the delivery of retinoic acid into macrophages »

L'objectif des travaux présentés dans ce paragraphe est de formuler des nanoparticules de RA capables d'être internalisées par les macrophages et d'agir sur leurs fonctions physiologiques en libérant l'actif *in situ*. Pour cela la formulation des nanoparticules a été dans un premier temps optimisée pour assurer une bonne encapsulation, une meilleure stabilité et une libération contrôlée du RA mais aussi pour permettre une capture efficace des NP par les macrophages. Les études de phagocytose ont été conduites *in vitro* sur des macrophages murins avec des NP encapsulant un marqueur fluorescent, le rouge Nile. Par la suite des études de capture macrophagique des NP *in vivo* ont été menées sur un modèle tumoral de gliome après injection intratumorale des NP. Enfin une évaluation des effets des NP-RA sur les fonctions de macrophages murins a été conduite *in vitro*.

Les études de préliminaires présentées précédemment ont permis de retenir une formulation de nanoparticules (§IV.2.5) préparées à partir de 0,50% de polymère, 0,01% de RA et 0,75% huile (dans le cas des NC). La concentration retenue en polysorbate 80 était de 0,05%. Deux types de polymères ont été testés pour l'encapsulation du RA : la Poly(ϵ -caprolactone) (PCL, Mw 14000) et l'acide poly(D,L)lactique (PLA, Mw 20000). A partir de ces deux polymères, ont été formulées soit des nanosphères (NS) (RA dispersé dans la matrice polymère) soit des nanocapsules (NC) (RA dissous dans un cœur huileux protégé par une enveloppe polymère). L'huile retenue pour la formation des NC est un caprylic/capric/succinic triglycéride, le Miglyol[®] 829, bon solubilisant du RA, compatible pour une administration parentérale et permettant une bonne séparation des NC de la phase dispersante aqueuse par centrifugation.

Quatre formules de NP ont été étudiées (NS, NC de PCL et NS, NC de PLA) au cours de l'étape d'optimisation de la formulation. Les NP obtenues sont toutes chargées négativement et présentent une distribution granulométrique monodisperse avec un diamètre moyen variant entre 150 et 230 nm (Table 7). L'efficacité d'encapsulation en RA dans les NP est nettement supérieure avec les NC que les NS : 10% et 56 % respectivement pour les PCL-

NS et PLA-NS contre 85 et 90% pour les PCL-NC et PLA-NC. Le cœur huileux des NC permet une très bonne solubilisation du RA qui améliore considérablement l'efficacité d'encapsulation. Les PCL-NC et PLA-NC ont donc été retenues pour la suite de l'étude (formulations E2 et E4).

Le profil de libération du RA et sa stabilité au sein des PCL-NC (formulation E2) ou PLA-NC (formulation E4) ont été ensuite étudiés en comparaison avec une solution éthanolique de RA. (Figure 23). Le profil de libération de RA *in vitro* dans un milieu éthanol/PSB pH 7,4 (§IV.5) se compose de deux phases : une première, relativement rapide, avec 50% de principe actif libéré après 24h, puis une seconde phase plus lente aboutissant à la libération de 80% de RA après 4 jours. Les deux formulations présentent des profils similaires. Les études de stabilité *in vitro* dans le milieu de culture cellulaire montrent que les NC améliorent fortement la stabilité du RA. Après 7 jours, 66% du RA encapsulé dans les PCL-NC est resté stable, environ 50% pour les PLA-NC et seulement 6% pour la solution.

Les deux types de NC présentent donc de bonnes caractéristiques pour la vectorisation du RA puisqu'elles sont capables de prolonger sa libération et d'améliorer sa stabilité donc elles sont potentiellement adaptées pour notre application thérapeutique sur les macrophages. Les PLA-NC ont finalement été retenues pour la suite de l'étude car, malgré une stabilité du RA légèrement plus faible qu'avec les PCL-NC, elles présentent la meilleure efficacité d'encapsulation (90%) et une distribution de taille plus étroite avec un diamètre moyen inférieur à 200 nm.

Pour exercer une activité ciblée, les NC doivent être internalisées par les macrophages. Un marqueur fluorescent, le Rouge Nile (NR), a été encapsulé dans les PLA-NC afin de suivre leur capture par les macrophages *in vitro* et *in vivo*. Cette étude d'internalisation a été réalisée sur les PLA-NC contenant Rouge Nile (NR-NC) comparativement à un contrôle de PLA-NC non fluorescentes (blank-NC). Pour réaliser l'étude *in vivo* les NC préparées ont été centrifugées et redispersées dans un tampon phosphate salin (PBS, 0.1M et pH 7,4) afin d'avoir un pH et une osmolarité similaires aux conditions physiologiques. Les caractéristiques des NC avant et après redispersion dans le PBS sont présentées en Table 8. La redispersion dans PBS n'a pas d'influence sur la distribution de taille mais induit une légère diminution du potentiel Zeta probablement due à l'augmentation de pH et donc à la déprotonation des groupements carboxyliques du polymère. Les blank-NC ont été aussi caractérisées par

microscopie électronique à balayage avant et après redispersion dans le PBS. Dans les deux cas les particules ont une forme sphérique, une surface régulière, non poreuse (Figure 24).

L'étude de l'internalisation des NC *in vitro* a été conduite sur des macrophages générés à partir de moelle osseuse de souris (C57Bl/6). Ces macrophages ont été incubés avec NR-NC, blank-NC et le NR non-encapsulé pendant 24 h. L'observation des macrophages par microscopie confocale montre de nombreuses zones de fluorescence rouge punctiforme intense à l'intérieur de macrophages incubés avec les NR-NC. Cela permet de confirmer la capture efficace des NC par les macrophages. Les images de microscopie à fluorescence prises à 24h, 72h et 7 jours indiquent un maintien de la fluorescence concentrée au sein des macrophages jusqu'à 7 jours confirmant la persistance des NR-NC à l'intérieur des macrophages (Figure 25).

Afin d'avoir une idée de l'internalisation des NC dans les macrophages plus quantitative, les cellules sont analysées en cytométrie en flux à 24h, 72h et 7 jours de culture après incubation avec les NC. Les intensités de fluorescence mesurées pour les macrophages contrôles (non traitées), incubés avec le NR non-encapsulé ou blank-NC sont comparables et demeurent faibles. Les macrophages traités avec les NR-NC ont une intensité 4 fois supérieure à celle du contrôle à 24h et cette intensité reste élevée pendant 7 jours (Figure 26 A et B). De plus, un changement de granularité est mis en évidence pour les macrophages traités avec les NR-NC et les blank-NC en mesurant les moyennes de la diffusion de la lumière incidente (side scattering channel (SSC)). Ce changement de granularité témoigne notamment de la présence des nanoparticules au sein des cellules. Cette augmentation de granularité est maintenue sur la période de 7 jours indiquant que, suite à la phagocytose, les NC ne sont pas entièrement dégradées après 7 jours et restent à l'intérieur des macrophages (Figure 26 C et D).

Pour la suite de l'étude, des essais de phagocytose *in vivo* ont été conduites sur un modèle de tumeur infiltrée par des macrophages. L'objectif était d'observer le devenir des NC après injection intratumorale et notamment d'illustrer la capacité des NC à cibler les macrophages infiltrés. L'étude *in vivo* a été conduite sur un modèle de xénogreffe de gliome humain chez des souris immunodéprimées (nude). Les NR-NC ou blank-NC, dispersées dans le PBS, ont été injectées dans la tumeur. Après 48h les souris ont été euthanasiées, les tumeurs prélevées et préparées pour les analyses de microscopie à fluorescence. Les observations microscopiques des coupes de tumeurs (Figure 27) montrent une large

distribution des NR-NC dans la tumeur mais leur localisation reste exclusivement liée aux macrophages marqués par l'anticorps Iba1 (vert). Cela indique que les NC ont été internalisées sélectivement par les macrophages et non par les cellules de gliome. Cette étude confirme donc la capacité de cibler les macrophages par les NC lors d'une injection locale.

Enfin, les effets des nanocapsules chargées en acide rétinoïque (RA-NC) sur les macrophages ont été évalués *in vitro*. Une analyse RT²-PCR a été réalisée sur l'ARN extrait des macrophages ayant préalablement été incubés avec les RA-NC. Cette analyse a pour but de mettre en évidence des modifications éventuelles de l'expression des gènes de certaines cytokines sous l'effet du RA encapsulé (Figure 28). En éliminant tous les gènes faiblement détectés ou modifiés, seul celui codant pour la protéine morphogénétique osseuse 2 (BMP-2) a été surexprimé dans les macrophages traités par RA-NC (3,37 fois plus en moyenne). Cette protéine présente notamment un intérêt dans le traitement des cancers de système nerveux central notamment le médulloblastome (6). Malgré la faible étendue de l'activité du RA encapsulé sur l'expression du génome macrophagique montré dans cette expérience, cette dernière a permis de démontrer que le RA reste actif après l'encapsulation et capable de moduler certaines fonctions des macrophages. Des études complémentaires pourraient donc s'avérer très intéressante afin d'identifier et de caractériser les effets des RA-NC sur les macrophages.

L'ensemble de cette étude nous permet donc de conclure qu'il est possible de formuler des nanoparticules polymères de RA avec de bons rendements d'encapsulation, améliorant significativement la stabilité du RA et présentant un profil de libération prolongée sur plusieurs jours. De plus ces NP sont facilement phagocytées par les macrophages *in vitro* et *in vivo* (en injection intratumorale) et le RA encapsulé peut être libéré au sein des macrophages pour exercer son activité. Ces nanoparticules se présentent donc comme un bon système de vectorisation du RA, capable de le délivrer aux macrophages infiltrés dans les tumeurs et ouvrent ainsi la perspective d'une nouvelle stratégie dans le traitement des tumeurs.

IV.7. Publication

Development of a nanoparticle-based system for the delivery of retinoic acid into macrophages

International Journal of Pharmaceutics

Volume 430, Issues 1-2, 1 July 2012, Pages 207-215

Eyad Almouazen^{a, b}, Sandrine Bourgeois^{a, b, *}, Ali Boussaïd^c, Pascale Valot^{a, b}, Celine Malleval^c, Hatem Fessi^{a, b}, Serge Nataf^{c, 1}, Stephanie Briançon^{a, b, 1}

^a University Lyon, University Claude Bernard Lyon 1, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés, LAGEP UMR CNRS 5007, F-69622, Villeurbanne, France

^b University Lyon 1, ISPB, School of Pharmacy, F 69008 Lyon, France

^c University Lyon, University Claude Bernard Lyon 1, Faculty of Medicine Laennec, Neuroscience Research Center INSERM U1028, UMR CNRS 5292, Neuro-Oncology and Neuro-Inflammation Team, F-69372 Lyon, France

* Corresponding author at: University Claude Bernard Lyon 1, LAGEP, CPE-308G, 43 bd. 11 Nov.1918, F-69622, Villeurbanne, France. Tel: +33 4 78 77 72 35. Fax: +334 78 77 75 84.

E-mail address: bourgeois@lagep.univ-lyon1.fr (S. Bourgeois).

¹ Equal contribution.

IV.7.1. Abstract

The aim of the present work is to prepare nanoparticulate systems that can target and modulate the functions of mononuclear phagocytes by local administration. All-trans retinoic acid (RA) was chosen as an immunomodulator to be encapsulated in biodegradable nanoparticles (NP). Different formulations were prepared by the nanoprecipitation method and poly(D,L)lactic acid based nanocapsules (NC) were selected to continue the study. RA-NC demonstrated a sustained release profile and an enhanced stability for 7 days. The uptake of fluorescent (NileRed) labeled NP was conducted on bone marrow derived macrophages (BMM) *in vitro* and xenograft glioma nude mice *in vivo*. Fluorescent microscopy observations and flow cytometry analysis demonstrated that NR-NC were engulfed by BMM *in vitro* and lasted inside over 7 days. The intratumoral injection of NR-NC confirmed that NC were efficiently uptaken by infiltrated macrophages. The effects of RA loaded NC on BMM were also evaluated by RT²-PCR array. Our results suggest that polymeric nanoparticles are suitable carriers to deliver RA into macrophages and can offer a new strategy in tumor macrophage-based treatment.

Graphical Abstract

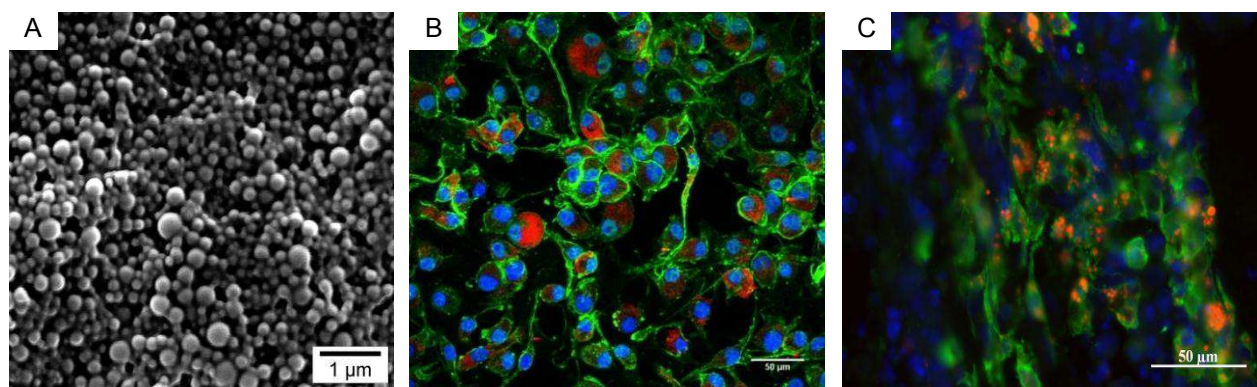


Figure 22 : Polymeric nanoparticles (A: Scanning electron microscopy image) were prepared to target and modulate the function of macrophages by local administration. The uptake of fluorescent labeled nanoparticles was studied on bone marrow derived macrophages *in vitro* (B)

Keywords

Biodegradable polymeric nanoparticles, Retinoic acid, macrophages, immunomodulation, drug delivery

IV.7.2. Introduction

Macrophages are innate immune cells that play a major role in the physio-pathology of numerous disorders that involve primary or secondary immune mechanisms. In particular, macrophages are crucial to the processes of tissue repair and form an important line of defense against infectious agents. On the other hand, macrophages are considered as playing detrimental functions under several conditions including chronic inflammatory diseases and tumors. Thus, in chronically inflamed tissue, infiltrating macrophages release cytokines/chemokines that lead to a sustained recruitment and activation of immune cells (7). In malignant tumors, the so-called tumor associated macrophages (TAM) are thought to support both tumor progression and metastatic invasion (8). Owing to their plasticity and involvement in a large range of pathologies, macrophages are thus considered as potential target in the design of innovative therapies (9,10).

Biodegradable polymeric nanoparticles (NP) are highlighted areas of drug delivery research. They are used to modify the release and distribution profile of active compounds allowing effective delivery to be improved and toxic effects to be lowered (1). Moreover, polymeric nanoparticles increase intracellular drug delivery and its therapeutic effects via enhanced stability and sustained release especially for the drug that act via intracytoplasmic receptors. For example, Sahoo and Labhasetwar (11) reported that NP enhanced paclitaxel efficacy on breast cancer cell line via sustained intracellular delivery. Bernardi et al. (12) also presented the improvement of indomethacin cytotoxic effects on glioma cell line when it was nano-encapsulated. Besides, nanoparticle-based delivery system can be designed to target specific tissues, cells and/or intracellular compartments (13). In this view, it has been long-lastly documented that polymeric nanoparticles without surface modification were preferentially taken up by macrophages following systemic or local administration. The adsorption of serum protein on polymeric-nanoparticle surface (opsonization) is an important factor which allows macrophages to recognize and internalize these particles. The opsonization and phagocytosis of NP are influenced largely by the NP physiochemical properties, in particularly the opsonization is increased with the augmented charge (14) and hydrophobicity (15) of NP surface. It was proved that decoration of NP surface with non-ionic and/or hydrophilic groups can decrease opsonization and hence limits phagocytosis (16). As a consequence polymeric nanoparticles without surface modification are considered as ideal shuttles to deliver active drugs specifically into macrophages (7,9). Such a strategy was

applied to deliver anti-leishmanial agents into infected macrophages where nanoparticles allow specific delivery and maintenance of higher drug level inside macrophages (17).

All-trans retinoic acid (RA), one of the active derivatives of vitamin A, is a ligand of the retinoic acid intracytoplasmic receptors (RAR, RXR) and is known to influence the functions of macrophages. RA can inhibit the macrophage production of inflammatory cytokines and can enhance the secretion of suppressive cytokines as well (18). It was proven also that RA altered the balance of TH1/TH2 type T cells through its impact on macrophages (19). Besides, RA has an influence on macrophages and dendritic cells in tumor. Such, RA inhibit the secretion of the angiogenic factors like VEGF and IL-8 by tumor-activated macrophages (20). Darmanin et al. (21) suggested that RA can improve dendritic cell migration from the tumor to draining lymph nodes and may be boost the antitumor immunity. Poor water solubility and low stability of RA represent the main drawbacks in its dosage form formulations (5). The clinical use of RA was almost associated with rapid decrease of its serum concentration after continuous oral administration or intravenous injection (22).

It was documented that the encapsulation of RA can overcome these limitations and therefore offers more advantageous pharmaceutical forms. Ourique et al. (23) showed that using nanocapsules enhanced RA photostability twofold than RA methanolic solution. Besides, Cirpanli et al. (24) reported that RA-microspheres had a long chemical stability up to 4 months at 4°C and lasted release profile over 11 days.

Intratumoral administration appears as an effective method for cancer chemotherapy and immunotherapy that allow to achieve ideal drug concentration in tumors and to limit systemic side effects (25). Previous reports have demonstrated that nanoparticle intratumoral delivery improves the anti-tumor efficacy. For example, Farokhzad et al. (26) showed the advantage to use functionalized poly (D,L-lactic-co-glycolic acid)-block-poly(ethyleneglycol) NP in the intratumoral delivery of docetaxel to prostate cancer. Another team reported the enhancement of antitumor efficiency by using methoxy poly(ethylene glycol)-polycaprolactone core-shell NP for the intratumoral administration of cisplatin (27) and docetaxel (28). Moreover, the use of hyaluronan NP or poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) NP for the intratumoral delivery of paclitaxel was also reported (29,30). Among these studies, non-modified surface or poly-ethyleneglycol (PEG) coated polymeric NP were used to target tumor cells. The PEG chains was utilized to avoid the uptake of intratumoral injected PEG-coated NP by non-tumoral cells. But in the case of polymeric NP without surface

modification the uptake of polymeric NP by tumor associated macrophages (TAM) has not been investigated. It was well documented that non-modified surface NP were preferentially taken up by macrophages after opsonization *in vivo* (16). So, it can be postulated that following intratumoral injection the polymeric NP could be taken up by TAM.

However, to the best of our knowledge, there is yet no study that attempted to design a NP-based system to deliver an immunologically active molecule into macrophages and, in particular, tumor-associated macrophages. Since in tumors, macrophages are continuously instructed by extracellular signals that shape their behavior, the goal of such a NP-based system would be to support a sustained deviation of macrophage functions that would counterbalance the effects of the macrophage microenvironment.

In this context, our goal was to design NP that meet the following criteria: (i) to be phagocytized by macrophages *in vitro*, (ii) to be phagocytized by tumor-associated macrophages *in vivo*, (iii) to efficiently encapsulate retinoic acid (RA) and (iv) to be biodegradable over a time-period of at least one week.

To achieve these aims, firstly nanospheres (NS) and nanocapsules (NC) formed with different biodegradable polymers (poly(D,L)lactic acid (PLA) and poly(ϵ -caprolactone) (PCL)) were compared regarding their ability to encapsulate RA. The selected nanoparticle formulation was then labeled by a fluorescent hydrophobic probe, Nile Red (NR) to check the ability of such NP to be uptaken *in vitro* by primary cultures of bone marrow derived macrophages (BMM). Afterwards, an *in vivo* model of glioma was chosen to investigate the uptake of locally injected NP by TAM. Finally, the ability of nano-encapsulated RA to deviate the cytokine mRNA profile in bone marrow macrophages was verified.

IV.7.3. Materials and methods

IV.7.3.1. Materials

The biodegradable polymers used for NP formulation were poly(D,L)lactic acid (PLA, Mw 20,000 g/mol, Surmodics biomaterial, USA) and poly(ϵ -caprolactone) (PCL, Mw 14,000 g/mol, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Nile Red and all-trans retinoic acid were purchased from Sigma-Aldrich. Montanox[®] VG 80 and Miglyol[®] 829 were purchased respectively from Seppic and Condea, France. C57Bl/6 mice (Charles River Laboratories,

France) were used as BMM donors. For the tumor xenograft model, Athymic Nude- *Foxn1^{nu}* mice purchased from Harlan (Gannat, France) were used.

IV.7.3.2. Preparation of NP

Retinoic acid loaded nanoparticles were prepared by using the nanoprecipitation technique (31). Briefly polymer and RA were dissolved in acetone at a concentration of 0.50% and 0.010% (w/w) respectively. To form the core of nanocapsules, organic oil (miglyol[®] 829 at 0.75%) was added to the solution previously described. This organic phase was then poured into an aqueous phase containing 0.05% of Montanox[®] VG 80 as surfactant. Nanoparticles (NS or NC) were instantaneously formed by the rapid solvent diffusion inducing polymer precipitation. The nanoparticle suspension was stirred moderately at room temperature for 20min. Acetone and a part of the water were removed under vacuum using a rotary evaporator (Rotavapor[®] RE-140, Büchi, Switzerland). Fluorescence labeled NP were prepared in the same way by incorporating Nile Red in the organic solution at a concentration of 0.005%. Similar formulas without any active compounds were prepared as controls (blank-NP). The nanoparticle suspensions were stored at 4°C in hermetically closed vials. Before the *in vivo* application, the NP suspension was centrifuged at 18,000 x g for 20 min and the particles were redispersed in a solution of phosphate buffered saline (PBS, 0.1M, pH 7.4) containing 0.1% of Montanox[®] VG 80 to obtain a stable suspension with physiological values of pH and osmolarity. The obtained suspension was then sterilized by filtration through 0.2µm syringe filter (Minisart[®], Sartorius, France). All formulations were made in triplicate.

IV.7.3.3. Characterization of NP

The particle size, size distribution and zeta-potential were measured using photon correlation spectroscopy (Malvern[®] Zetasizer nano-series) using nanoparticle suspension diluted in deionized water at room temperature. The results were recorded as the average of three measurements. The size distribution is given by polydispersity index (PdI). Formulations with PdI smaller than 0.2 were accepted. Surface morphology of blank-NP before and after the dispersion in PBS was observed using a scanning electron microscope (SEM, Hitachi S800) at an accelerating voltage of 15 kV after coating the nanoparticle surface with gold-palladium layer under vacuum with a cathodic pulverizer technics Hummer II (6 V, 10 mA).

IV.7.3.4. Encapsulation efficiency

The total drug (RA or NR) content in NP suspension was determined by dissolving 100 μ l of NP suspension in acetonitrile to form a solution which was then filtered through a 0.45 μ m syringe filter (Minisart[®] NY15, Sartorius, France) and analyzed by RP-HPLC. Non-encapsulated active (free) was determined in the supernatant after ultracentrifugation at 18,000 x g for 20 min of the NP suspension. Encapsulation efficiency (%) was calculated by the difference between the total and free drug concentrations divided by the theoretical-calculated total drug concentration.

RA was analyzed by RP-HPLC validated method using Waters 600 Controller and Waters 717 Auto sampler (Waters, France) on a Kinetex C18 column (2.6 μ m, 4.6 mm x100 mm). An isocratic mobile phase consisting of 35% of acetonitrile, 30% of methanol and 35% of 0.5% acetic acid solution was used with a flow rate of 1.4 ml/min. The photodiode-array detector (Waters 2996) was adjusted at $\lambda = 356$ nm. A 10 μ l aliquot sample was injected. The calibration curve for the quantification of RA was linear over the range of concentrations used, from 0.5 μ g/ml to 10 μ g/ml ($r^2=0.999$). The determination of NR was also performed by the Waters RP-HPLC using a X-Terra MS C18 column (5 μ m, 4.6 mm x150 mm) and an isocratic mobile phase consisting of methanol/water (80:20). This method was modified from Lamprecht and Benoit (32).

IV.7.3.5. *In vitro* RA-NP release studies

A dialysis method was used under Sink conditions to evaluate the release profile of RA loaded NP. 1 ml of RA-loaded NP suspension was filled into a dialysis tube (MWCO 6000-8000, Cellu-Sep[®]) and incubated in 100 ml of ethanol: phosphate buffer solution (PBS, pH 7.4) (2:8) under moderate magnetic stirring (150 rpm) at 37°C. At predetermined intervals of times, samples of 0.5 ml were withdrawn, replaced by 0.5 ml of fresh medium and the drug released from NP was quantified by RP-HPLC. Three experiments were conducted and free-RA solution was used as control to estimate the RA diffusion rate through the membrane.

IV.7.3.6. RA-NP stability test

To study the stability of encapsulated RA in cell culture conditions, RA loaded NP were suspended in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM, Invitrogen, France)

supplemented with penicillin-streptomycin (1µg/ml, Invitrogen, France) in order to obtain a RA concentration of 10µg/ml. Free RA was used as control at the same concentration. All samples were incubated at 37°C for 7 days. Each day, 0.5 ml was taken and was analyzed by RP-HPLC to determine the remained quantity of RA. The study was achieved in triplicate.

IV.7.3.7. Generation of murine bone marrow macrophage (BMM)

Bone-marrow-derived macrophages (BMM) were cultured as previously described (33). Briefly, bone marrow cells were flushed from the femur and tibia of 2-5 month-old female C57Bl/6 mice and cultured for 7 days at a density of 5×10^5 cells/ml in IMDM supplemented with 15% Fetal Clone II (Perbio-science, France), penicillin-streptomycin (1 µg/ml), and 10 ng/ml macrophage-colony stimulating factor (M-CSF, Tebu-bio, France).

IV.7.3.8. *In vitro* cellular uptake of NP

BMM were incubated with NR-labeled NP, blank-NP and free NR at a final concentration corresponding to 0.4µg/ml of NR in the culture medium. After 24h of incubation the media was replaced by serum-free Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen, France) supplemented with B-27 and N-2 (Invitrogen, France). The phagocytosis of NP was assessed by fluorescence microscopy (Zeiss, Axio-Imager. Z1) at 24h, 72h and 7 days and by confocal laser microscopy at 24h (Leica TCS SP2). BMM were fixed in 4% paraformaldehyde (Invitrogen, France) for 10 min at room temperature and washed three times in PBS. Cells were incubated for 30 min at room temperature with a blocking solution consisting of 4% bovine serum albumin (BSA, Invitrogen, France) diluted in PBS and supplemented with 10% normal goat serum (Invitrogen, France). Cells were then incubated overnight at 4°C with a rat anti-mouse F4/80 monoclonal antibody (Abcys, France) at 1:50 dilution in blocking solution. Cells were then rinsed three times in PBS and incubated with a biotinylated goat anti-rat antibody (Invitrogen, France) for 1 hour at room temperature. After three washes, cells were finally incubated with streptavidin Alexa Fluor 488 (Invitrogen, France) diluted 1:100 in PBS. 4',6'-diamidino-2-phenylidole (DAPI, Invitrogen, France) staining of nuclei was performed and slides were mounted using Fluoroprep (Bio-Mérieux, France). A quantitative analysis of phagocytosis was made by flow cytometry (488 nm argon ion laser, BD FACSCantoII™) at 24h, 72h and 7 days. BMM were detached by trypsin treatment and fixed in 1% paraformaldehyde. The fluorescence intensity was measured in FL2 and the intensity of side scattering channel (SSC) was also observed.

IV.7.3.9. Intratumoral injections of NP in a xenograft glioma model

To investigate *in vivo* the phagocytosis of NP by tumor-infiltrating macrophages, a human xenograft glioma model developed by Taillandier et al. (34) was used in accordance with French animal care guidelines and with the approval of the animal ethical committee CREEA of Lyon. Briefly, a glioblastoma multiforme (10mm³ fragment) was subcutaneously implanted in the right posterior inguinal pit of nude mice. When tumors had an average volume of 1cm³ (about 3 weeks after inoculation), mice were divided in two groups of three to be given either NR-labeled NP or blank-NP dispersed in PBS by intratumorally injection of 200µl containing 2.5mg of nanoparticles (100mg of NP/kg). Mice were euthanized 48 hours post NP injection and tumors were collected for histological analysis. Tumor tissues were fixed with 4% paraformaldehyde, cryoprotected in sucrose, frozen and sectioned into 10 µm slides. Slides were incubated with a blocking solution consisting of 4% BSA diluted in PBS and supplemented with 10% normal goat serum. Then, they were incubated overnight at 4°C with a rabbit anti-mouse Iba-1 monoclonal antibody (Wako, Japan) at 1:1000 dilutions in the blocking solution. Biotinylated goat anti-rabbit antibody (Invitrogen, France) was applied as the second antibody for 1h at room temperature. After three washes, slides were incubated with streptavidin Alexa Fluor 488 diluted 1:100 in PBS. DAPI staining of nuclei was performed and slides were mounted using Fluoroprep. The observation was assessed by fluorescence microscopy (Zeiss, Axio-Imager. Z1).

IV.7.3.10. Evaluation of RA-loaded NP effects on BMM (RT²-PCR array)

BMM were cultured at 5x10⁵/ml and incubated with RA-NP (dilution 1/100) for 24h followed by media changing. Blank-NP were used as control. We evaluated the modifications of BMM cytokine gene expression 24h after media changing by Mouse Common Cytokines RT² Profiler™ PCR Array (PAMM-021, SABiosciences Corporation®) which profiles the expression of 84 important cytokines. Total RNA was isolated from two independent cultures of BMM and reverse transcribed according to the manufacture specifications. Complementary DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) for 40 cycles after an initial denaturation cycle of 10 min at 95°C. Each amplification cycle consisted of denaturation for 15s at 95°C, annealing and extension for 1min at 60°C. The results were normalized with 5 housekeeping genes (Gusb, Hprt1, Hsp90ab1, Gapdh and Actb). Fold change between RA-loaded NP treated BMM and blank-NP treated BMM was determined using the manufacturer

software according to the comparative Ct method. Data from genes with Ct value >30 or fold change <2 were considered as non-significant.

IV.7.4. Results

IV.7.4.1. Development of RA loaded nanoparticles

Four nanoparticle formulations were prepared in triplicate and characterized by their mean size, their size distribution, their zeta potential and their encapsulation efficiency as presented in Table 7. All formulations had a negative charge due to the presence of polymeric terminal carboxylic groups on the NP surface. Nanospheres E1 and E3 showed a small particle size (177.7 ± 1.7 and 153.6 ± 2.9 nm, respectively) compared to the nanocapsules E2 and E4 (229.8 ± 5.6 and 192.7 ± 7.3 nm, respectively) due to the presence of oil in NC contrarily to NS. Moreover, nanocapsules presented higher encapsulation efficiency than nanospheres. Therefore, nanocapsules (E2 and E4) were selected to continue our study

Table 7 : Physicochemical characteristics of RA-loaded nanoparticles

Sample	Polymer	Form	Particle mean size (nm)	Polydispersity Index	Zeta potential (mV)	Encapsulation efficiency %
E1	PCL14000	NS	177.7 ± 1.7	0.08 ± 0.02	-18.5 ± 0.4	55.6 ± 9.3
E2	PCL14000	NC	229.8 ± 5.6	0.16 ± 0.01	-29.4 ± 0.6	84.9 ± 1.3
E3	PLA20000	NS	153.6 ± 2.9	0.14 ± 0.02	-10.4 ± 1.0	10.4 ± 1.3
E4	PLA20000	NC	192.7 ± 7.3	0.09 ± 0.01	-21.6 ± 5.4	90.2 ± 0.8

The *in vitro* release and the stability of RA were evaluated and the behavior of PCL-NC (E2), PLA-NC (E4) and RA ethanolic solution was compared. The results of *in vitro* release are shown in Figure 23A. RA in ethanolic solution passed through the membrane rapidly and totally during the first 9 hours which refer to the RA diffusion rate through the membrane. Encapsulated RA release pattern showed a rapid release of $50 \pm 3\%$ and $55 \pm 2\%$ of initial RA content in E2 and E4 respectively during the first 24h and a sustained release profile up to 80% over 4 days (Figure 23A). No significant difference was observed between the release profile of PCL-NC (E2) and PLA-NC (E4).

The stability of free and encapsulated RA in cell culture conditions is shown in Figure 23B. A rapid degradation (40%) of free RA was observed after 24h and only $16 \pm 6\%$ of free RA remained in the IMDM after 96h. In contrast, encapsulated RA degraded slower with only 10% degradation after 24h. At the end of the study (7 days) PCL-NC (E2) showed higher RA stability than PLA-NC (E4). About $48 \pm 4\%$ of RA remained in E4 after 7 days compared to $66 \pm 2\%$ for E2. However, based on the encapsulation efficiency and the size distribution, we selected PLA-NC (E4) to continue our study.

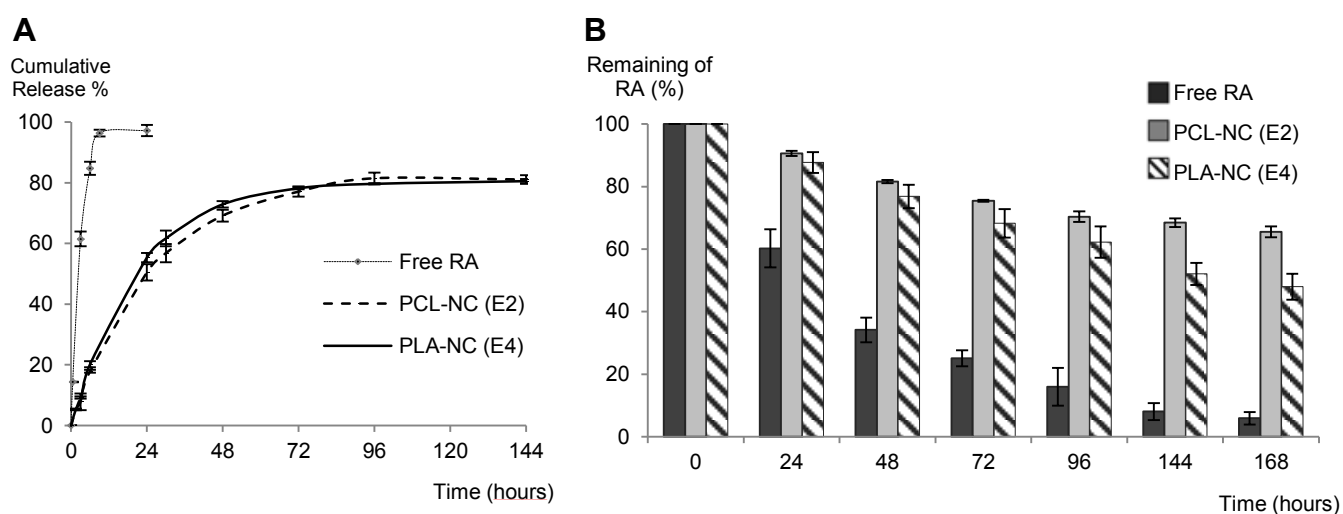


Figure 23 : (A) *In vitro* E2 (PCL-NC) and E4 (PLA-NC) release profile assessed by dialysis method. Free-RA solution was used as control. (B) Results of stability study of encapsulated RA in the cell culture conditions for 7 days. Free RA was used as control. E2 or E4 were dispersed into 10ml of IMDM and incubated at 37°C

Table 8 : Physicochemical characteristics of nanoparticles for *in vitro* and *in vivo* uptake studies

Sample	Particle mean size (nm)	Polydispersity Index	Zeta potential (mV)	pH	Entrapment efficiency (%)
blank-NC	187.7 ± 6.2	0.08 ± 0.03	-15.4 ± 2.1	3.29 ± 0.10	-
blank-NC-PBS	181.9 ± 0.4	0.06 ± 0.04	-25.3 ± 1.4	6.95 ± 0.01	-
NR-NC	198.1 ± 11.4	0.11 ± 0.02	-20.9 ± 2.8	3.24 ± 0.11	91.2 ± 3.7
NR-NC-PBS	188.8 ± 1.5	0.05 ± 0.02	-27.4 ± 2.3	6.93 ± 0.02	80.3 ± 1.5

IV.7.4.2. NP preparation for the uptake study

Based on the selected formulation (E4), unloaded nanocapsules (blank-NC) and Nile Red labeled nanocapsules (NR-NC) were prepared and characterized. NC properties are presented in Table 8. The mean size of blank-NC was 187.7 ± 6.2 nm with a narrow size distribution and a polydispersity index of 0.08 ± 0.03 . The surface of NC was negatively charged with a zeta potential value of -15.4 ± 2.1 mV. When blank-NC were redispersed in PBS (blank-NC-PBS) no significant changes on particle size or polydispersity were observed. The NC zeta potential decreased to -25.3 ± 1.4 mV while the pH changed from 3.29 to 6.95 due to the buffer properties of PBS (pH 7.4). The pH increase caused the deprotonation of carboxylate groups and the decrease of zeta potential as already mentioned by Trimaille et al. (35). Moreover, the SEM observations of blank-NC, illustrated in Figure 24, revealed that all nanocapsules were spherical with no large pores. In accordance with data obtained by the dynamic light scattering instrument the SEM images of blank-NC showed that NC had monodispersed size near to 200 nm. The redispersion in PBS had no substantial effects on the morphological aspect of NC but the picture quality was decreased probably due to the precipitation of PBS salts during the sample preparation.

NR-labeled NC had the same size distribution with a mean size of 198.1 ± 11.4 nm. The same zeta potential change of NR-NC was noticed after redispersion in PBS. The encapsulation efficiency of NR was $91.2 \pm 3.7\%$ and $80.3 \pm 1.5\%$ before and after redispersion in PBS, respectively.

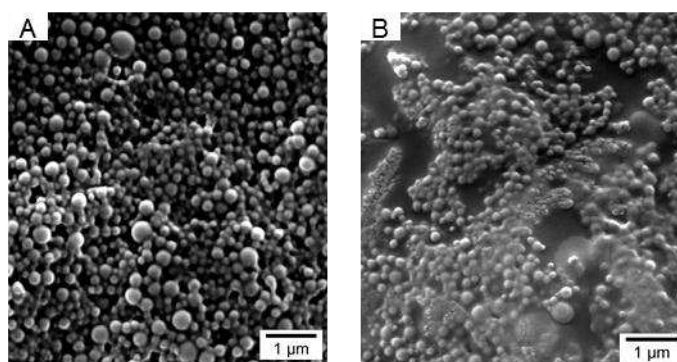


Figure 24 : Scanning electron microscopy (SEM) images. SEM showed the morphology of blank-NC (A) and blank-NC-PBS (B)

IV.7.4.3. *In vitro* NR-NC uptake

Bone-marrow-derived macrophages were incubated with NR-labeled NC, blank-NC and free NR for 24h followed by media changing. The uptake study of NP was assessed by fluorescence microscopy at 24h, 72h and 7 days and by confocal laser microscopy at 24h while no toxic effects were observed on BMM. It can be observed that no fluorescence was detected in BMM treated by blank-NC (Figure 25A). For NR-NC treated BMM confocal microscopy pictures confirmed the intracellular localization of NR-NC as shown in Figure 25B. Fluorescence microscopy images at 24h, 72h or day 7 post-treatment showed that the intracytoplasmic granular fluorescence remained in BMM for 7 days (Figure 25C).

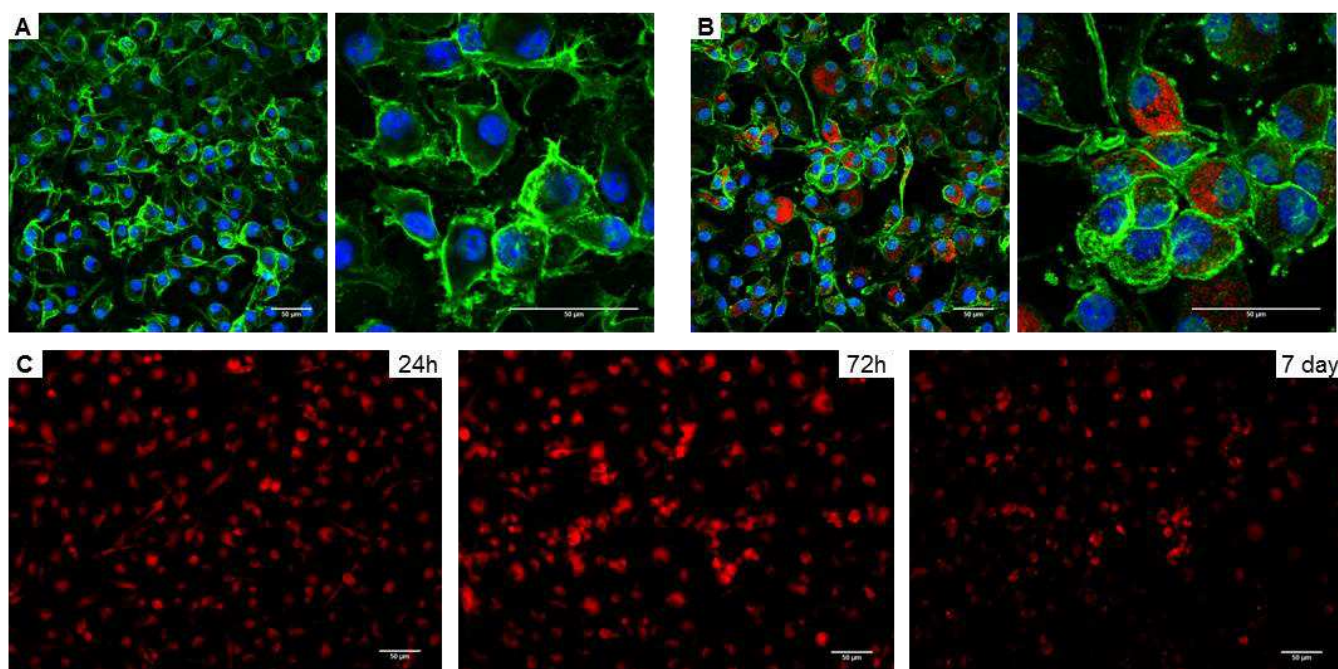


Figure 25 : *In vitro* uptake study of NR-NC by BMM. (A and B) Confocal microscopy images of blank-NC (A) or NR-NC (B) treated BMM (bar = 50 μ m). (C) fluorescent microscopy images in red channel of NR-NC treated BMM at 24h, 72h and 7 days (bar = 50 μ m)

To confirm these data, a flow cytometry analysis was conducted on BMM incubated with free-NR, blank-NC or NR-NC. Results of the fluorescence intensity measurement in FL2 (Figure 26 A and B) were in accordance with microscopy observations. Free-NR treated BMM showed low fluorescent intensity after 24h with mean fluorescence intensity (MFI) of 207 compared to 172 for the non-treated ones (control), probably due to the rapid elimination of NR from macrophages. In contrast, after 24h, MFI of NR-NC treated BMM was 4 fold

higher than control ones and this higher fluorescence intensity lasted over 7 days with MFI = 752 and 406 at 24h and 7days respectively. Blank-NC treated BMM showed the same fluorescence intensity level than control. So there were no significant changes in the case of free-NR or blank-NC and only NR-NC increased the macrophage MFI significantly.

Moreover, in NR-NC or blank-NC treated BMM, changes in BMM granularity were observed as assessed by the mean values in side scattering channel (SSC) intensity (Figure 26C and D). Such an increased granularity was maintained over a period of 7 days indicating that, following phagocytosis, NC were not fully degraded in the next 7 days and remained in the endosomal compartment of macrophages.

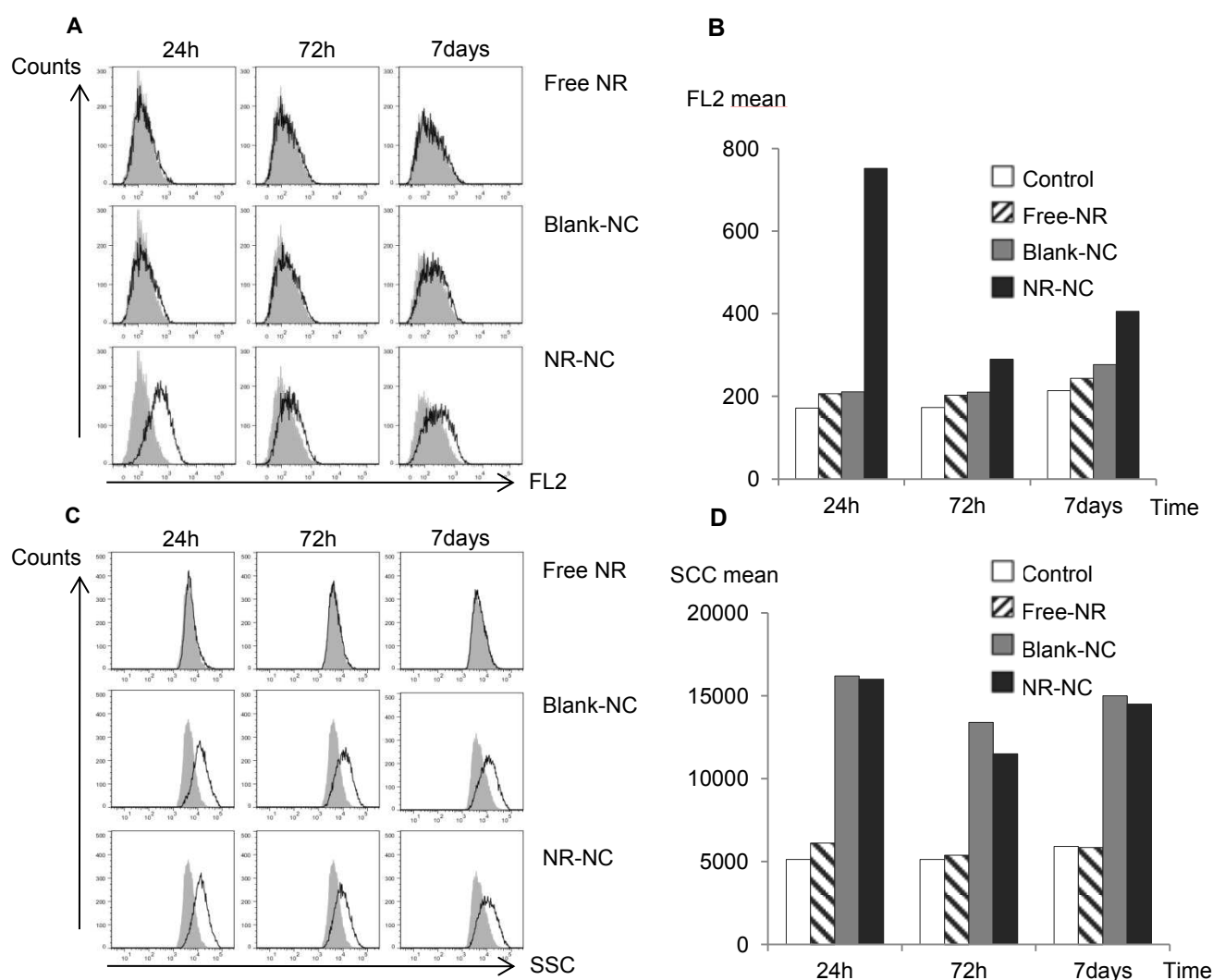


Figure 26 : In vitro uptake of NR labeled NC performed by flow cytometry. Non-treated BMM was used as control. Histograms show the mean of fluorescence intensity in FL2 channel (A and B), and the mean of side scattering channel intensity (C and D)

IV.7.4.4. *In vivo* NR-NC uptake

To assess PLA based NC uptake by macrophages *in vivo* NR-NC or blank-NC dispersed in PBS were injected intratumorally in nude mice bearing xenograft glioma. Observations under fluorescence microscopy (Figure 27) showed that in tumors injected with NR-NCs, fluorescent granular material could be detected and was localized exclusively within Iba1-labelled macrophages. No fluorescence could be observed in tumors injected with blank-NC (data not shown).

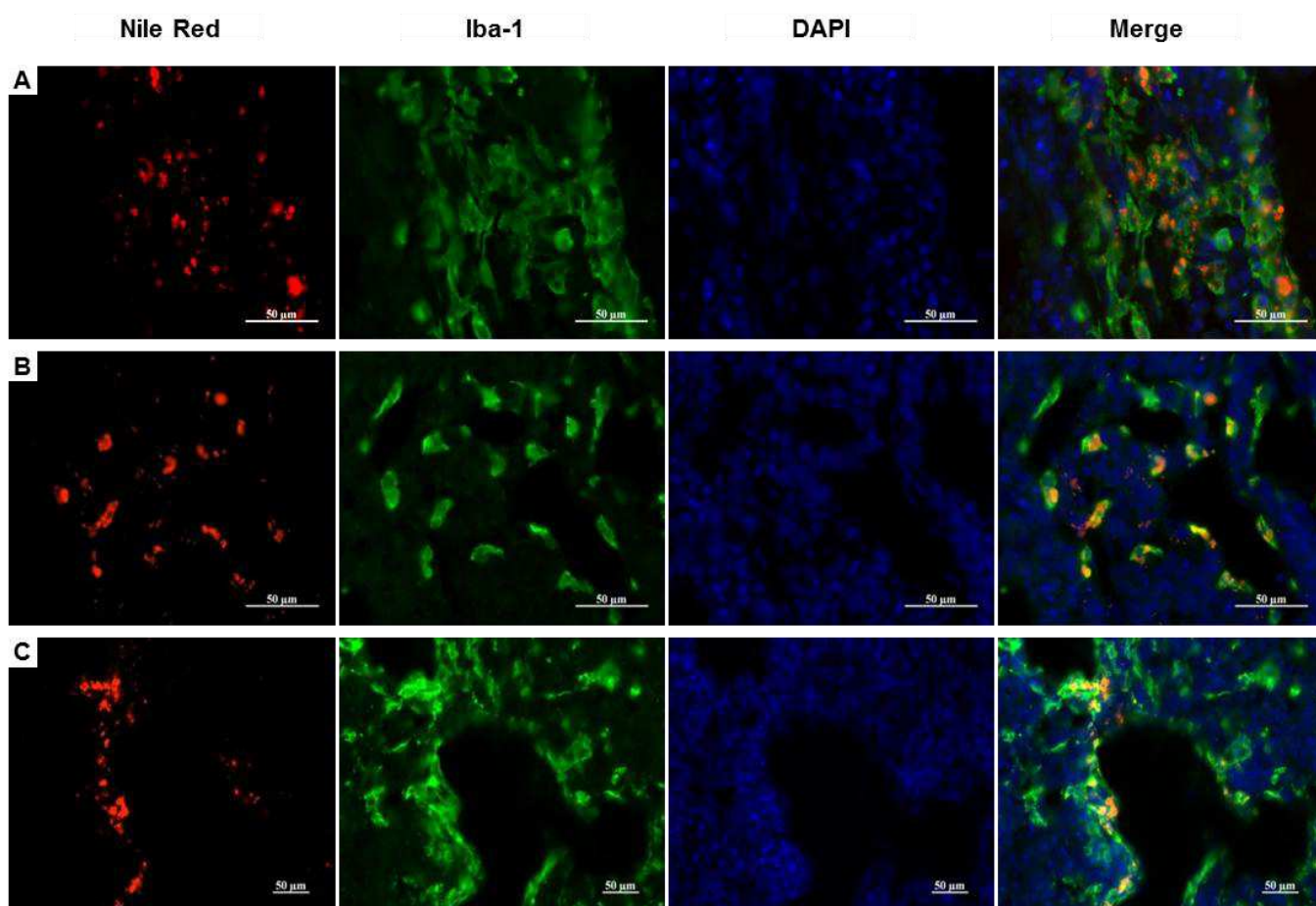


Figure 27 : *In vivo* NR-NC uptake by tumor infiltrated macrophages after 48 hours of NC intratumorally injection. Nanoparticles were labeled by Nile Red (red), macrophages were immunolabeled by Anti-Iba1 monoclonal antibody (green) and DAPI (blue) was used for staining the nucleus. NR-NC were localized within the macrophages at the edge of tumor (A), inside the tumor (B) and around the vessel (C) (bar = 50 µm)

These results indicated that NR-NC were efficiently internalized by macrophages but not by glioma cells or tumor-associated vessels. Interestingly, NR-NC containing macrophages were localized far away from the injection site, notably in perivascular locations, in the outer margins of the tumor (Figure 27A and C) or, occasionally within the tumor parenchyma itself (Figure 27B).

IV.7.4.5. RA-NC modulate cytokine gene expression of cultured BMM

To investigate the effects of RA-NC on macrophage functions *in vitro*, a quantitative RT² Profiler™ PCR cytokine array was used, allowing alterations of cytokine gene expression to be assessed in RA-NC treated BMM as compared to blank-NC treated BMM. Results were filtered so that only genes showing a robust expression (detectable below 30 cycles) and an expression fold change of at least 2 were considered as significant. Under these experimental conditions, we found that Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) gene expression was increased by a mean factor of 3.37 in RA-NC treated BMM as compared to blank-NC treated BMM (Figure 28). This result indicates that RA-NC phagocytized by BMM were able to bias the cytokine profile of macrophages.

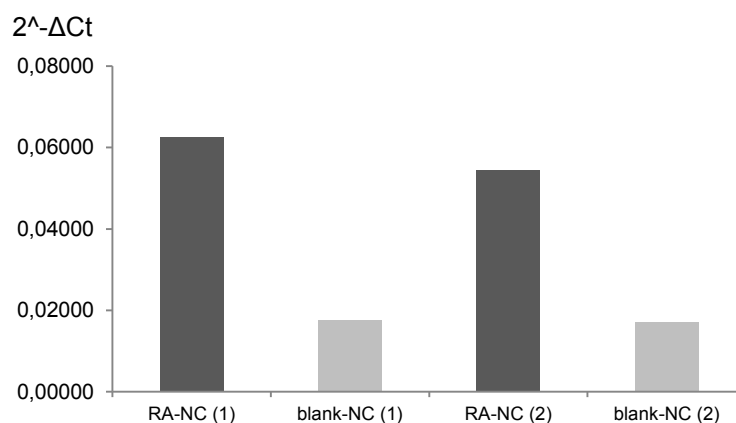


Figure 28 : *In vitro* gene expression changes of RA-NC treated macrophages evaluated by RT² Profiler™ PCR Array in duplicate. The Bmp-2 gene expression was three times higher in RA-NC treated BMM than blank-NC treated BMM calculated by Ct method

IV.7.5. Discussion

Biodegradable polymeric nanoparticles are a promising strategy in the drug delivery development since they can offer more stability, modified release and specific delivery of drug. In our study a nanoprecipitation technique was used to encapsulate RA in nanoparticles with two different internal structures: nanospheres (NS), which are matrix systems and nanocapsules (NC), vesicular systems in which the oily cavity is surrounded by a thin polymeric membrane. Differences in size, encapsulation efficiency and release profile were expected from these two forms. Moreover two polymers were also used in this study; poly(ϵ -caprolactone) (PCL, Mw 14,000) and poly(_{D,L})lactic acid (PLA, Mw 20,000). Both are synthetic polyester polymers approved by the Food and Drug Administration (FDA) with unique properties of biocompatibility and biodegradability. Indeed, they are hydrolyzed to nontoxic metabolites in physiological conditions. However, they differ by their degradation rates, their hydrophobicity and their crystalline states (2).

The encapsulation of RA was successfully achieved and nanocapsules showed higher encapsulation efficiency than nanospheres. This could be explained by the role of NC lipophilic core (Miglyol[®] 829) that increased the quantity of RA dissolved and then improved its entrapment (36). PCL-NC (E2) and PLA-NC (E4) presented similar release profiles of encapsulated RA. These release profiles were composed of a rapid phase due to the non-encapsulated RA and the release of surface-adsorbed RA (20% during 6h) followed by a sustained release phase over 4 days (Figure 23A).

The incomplete release (80% of RA released after 7 days) could be attributed to RA deeply entrapped in the polymeric network which needs more polymer erosion to diffuse outside nanoparticles. The incomplete release of encapsulated RA was also reported by Jeong et al. (37) for RA core-shell nanoparticles of poly(ϵ -caprolactone)/poly(ethylene glycol) diblock copolymer where 80% of RA was released after 16 days. An outstanding result is that the encapsulation of RA considerably improved its stability in the cell culture conditions (Figure 23B) and this give the possibility that NC could maintain RA effects on the macrophages for a longer period. Moreover, it was shown that PCL-NC were more stable than PLA-NC probably because of the difference in degradation profile and hydrophobicity between the two polymers, PCL being more hydrophobic and having a lower degradation rate. For example, Leroueil-Le Verger et al. (38) have previously investigated the degradation of biodegradable polymer-based nanoparticles during *in vitro* release studies and have

observed a higher degradation rate for PLA than for PCL (molecular weight loss of 10% and 3% for PLA and PCL, respectively).

From all the results above, PCL and PLA based NC were considered as good carriers for RA. The sustained release profile and the relatively good stability of encapsulated RA appeared as suitable for a potential therapeutic application on macrophages. The E4 (PLA-NC) was selected to continue the study because it displayed the highest encapsulation efficiency (90.2%) and a narrow size distribution, with a mean size smaller than 200nm which is adapted to a sterilization process by filtration.

Our goal was to develop a NP-based system to deliver an immunologically active molecule into macrophages and, in particular, tumor-associated macrophages. In this scheme, to achieve therapeutic effects, NP have first to be phagocytized by macrophages and secondly must release the biologically active molecule that can trigger macrophage activation. In this view, *in vitro* investigations of NR-labeled NC provided important data about the uptake of NC by macrophages. BMM were incubated with NR-NC or blank-NC for 24h and labeled as described in the materials and methods part. 24h of incubation was chosen to obtain a maximal internalization as documented by other groups (39). We postulated that the hydrophobic properties of PLA-NC surface could enhance the internalization of particles by macrophages via serum adsorption (7). Thanks to NC-properties the NR release was sustained and its degradation was limited inside the macrophages. Indeed, the fluorescence microscopy pictures (Figure 25C) proved the internalization of NR-NC by macrophages and their stability inside them over 7 days. Moreover, the flow cytometry measurements confirmed microscopy observations and allowed to quantify both the fluorescence intensity and the macrophage granularity. The increase of SSC intensity mean for NC-treated macrophages gave another proof of phagocytosis or, at least, internalization of NC by macrophages. Similar shifts of cell granularity were previously described by Xia et al. (40) who studied the internalization of magnetic nanoparticles by hepatoma cells, and by Coester et al. (41) about the uptake of gelatin-NP by dendritic cells. Kanchan and Panda (39) also recognized the enlargement of cell size after incubation of murine macrophage cell line J774 with PLA nanoparticles. Therefore, these studies along with our results indicate that PLA-based NC are suited carriers for drug delivery to macrophages and they are able to sustain drug effects on macrophages.

We selected glioma (the most frequent brain tumor) as a tumor model to study NP uptake by TAM *in vivo*. The infiltration of glioma by macrophages is well documented (42)

and it was proven that TAM conserve their phagocytosis capacity (43). Thus; TAM represent a potentially valuable target in glioma for therapeutic applications (44).

In this context, we found that NR-NC injected *in situ* were efficiently phagocytized by glioma-infiltrating macrophages but not by glioma cells (Figure 27). These results are reminiscent of those described with cyclodextrin-based nanoparticles injected in glioma-bearing mice (44). Interestingly, in that study and ours, NP accumulated in the periphery of glioma tumor but not in tumor peri-necrotic area as reported in the case of intravenous injection of poly (L-glutamic acid)-macromolecules (45). Our findings suggest that the intratumoral injection of non-modified surface polymeric NP is a promising way to target TAM and may allow the development of anti-tumor treatment based on modulation of TAM functions.

To further assess this strategy, the ability of RA-NC to modulate macrophage functions *in vitro* was investigated by a RT² Profiler™ PCR cytokine array (Figure 28). The results showed that bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) gene was over-expressed in BMM treated with RA-NC. BMP-2 is a member of the transforming growth factor b (TGF-b) superfamily (46) and plays an important role in the pro-apoptotic activity of retinoids in tumors (47). Hallahan et al. (6) reported the mediated role of BMP2 in the medulloblastoma cell apoptosis induced by retinoids and demonstrated that secreted BMP-2 might induce apoptosis in retinoid-resistant medulloblastoma cells. It can be postulated that after RA-NC intratumoral injection, these NC will be phagocytized by TAM and the intracellular release of RA may enhance the BMP-2 secretion and allow apoptosis induction of tumor cells. Future studies have to be developed to verify the possibility of BMP-2 secretion from RA-NC treated macrophages in tumor microenvironment.

On the other hand, it is known that retinoic acid acts as an anti-tumoral agent in different tumors like gliomas (48), medulloblastoma (6), and others (49). Moreover, Dou et al. (50) demonstrated that after NP internalization, the nano-encapsulated drug can be released from macrophages into extracellular space. Soma et al. (51) demonstrated also the anti-tumor efficacy of nano-encapsulated doxorubicine after the uptake by macrophages. For these reasons, we may also suggest that besides immunomodularity effects exerted on macrophages, RA released from TAM into the tumor environment may exert long-lasting anticancer effects that would not be achieved following injection of either free RA or RA-loaded NC that do not target macrophages.

IV.7.6. Conclusion

Retinoic acid was successfully encapsulated in polymeric nanoparticles allowing an increase of its stability and the specific targeting of macrophages. PLA based NC were highly taken up and maintained inside the macrophages *in vitro* at least 7 days. *In vivo* study confirmed that intratumoral-injected NC were preferentially engulfed and maintained inside TAM 48 hours after injection. Moreover, NC had a sustained RA-release profile over 4 days and enhanced RA-stability. Thus, PLA based NC are a suitable form to deliver RA into macrophages and can offer a new strategy in tumor treatment where macrophages are known to play a major role.

Acknowledgements

This work benefits from the financial support for young researcher of the French National Agency for Research (ANR). We thank L. Taillandier for providing the glioblastoma multiforme model.

IV.8. Références

1. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.* 2010;385:113–42.
2. Holland SJ, Tighe BJ, Gould PL. Polymers for biodegradable medical devices. 1. The potential of polyesters as controlled macromolecular release systems. *J. Control. Release.* 1986;4:155–80.
3. Kane MA, Chen N, Sparks S, Napoli JL. Quantification of endogenous retinoic acid in limited biological samples by LC/MS/MS. *Biochem. J.* 2005;388:363–9.
4. Washington C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. *Int. J. Pharm.* 1990;58:1–12.
5. Szuts EZ, Harosi FI. Solubility of retinoids in water. *Arch. Biochem. Biophys.* 1991;287:297–304.
6. Hallahan AR, Pritchard JI, Chandraratna RA, Ellenbogen RG, Geyer JR, Overland RP, et al. BMP-2 mediates retinoid-induced apoptosis in medulloblastoma cells through a paracrine effect. *Nat. Med.* 2003;9:1033–8.
7. Chellat F, Merhi Y, Moreau A, Yahia L. Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting. *Biomaterials.* 2005;26:7260–75.
8. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420:860–7.
9. Ulbrich W, Lamprecht A. Targeted drug-delivery approaches by nanoparticulate carriers in the therapy of inflammatory diseases. *J. R. Soc. Interface.* 2010;7 Suppl 1:S55–66.
10. Watters JJ, Schartner JM, Badie B. Microglia function in brain tumors. *J. Neurosci. Res.* 2005;81:447–55.
11. Sahoo SK, Labhasetwar V. Enhanced antiproliferative activity of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles is mediated via sustained intracellular drug retention. *Mol. Pharm.* 2005;2:373–83.
12. Bernardi A, Frozza RL, Jager E, Figueiro F, Bavaresco L, Salbego C, et al. Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: an in vitro study. *Eur. J. Pharmacol.* 2008;586:24–34.
13. Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009;66:2873–96.
14. Gessner A, Lieske A, Paulke B, Muller R. Influence of surface charge density on protein adsorption on polymeric nanoparticles: analysis by two-dimensional electrophoresis. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2002;54:165–70.
15. Gessner A, Waicz R, Lieske A, Paulke B, Mader K, Muller RH. Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption. *Int. J. Pharm.* 2000;196:245–9.
16. Owens DE, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2006;307:93–102.
17. Basu MK, Lala S. Macrophage specific drug delivery in experimental leishmaniasis. *Curr. Mol. Med.* 2004;4:681–9.
18. Pino-Lagos K, Benson MJ, Noelle RJ. Retinoic acid in the immune system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008;1143:170–87.

19. Kang SG, Lim HW, Andrisani OM, Broxmeyer HE, Kim CH. Vitamin A metabolites induce gut-homing FoxP3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2007;179:3724–33.
20. Liss C, Fekete MJ, Hasina R, Lingen MW. Retinoic acid modulates the ability of macrophages to participate in the induction of the angiogenic phenotype in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer.* 2002;100:283–9.
21. Darmanin S, Chen J, Zhao S, Cui H, Shirkoohi R, Kubo N, et al. All-trans retinoic acid enhances murine dendritic cell migration to draining lymph nodes via the balance of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *J. Immunol.* 2007;179:4616–25.
22. Achkar CC, Bentel JM, Boylan JF, Scher HI, Gudas LJ, Miller WH. Differences in the pharmacokinetic properties of orally administered all-trans-retinoic acid and 9-cis-retinoic acid in the plasma of nude mice. *Drug Metab. Dispos.* 1994;22:451–8.
23. Ourique AF, Pohlmann AR, Guterres SS, Beck RC. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *Int. J. Pharm.* 2008;352:1–4.
24. Çirpanlı Y, ünlü N, Çalış S, Atilla Hincal A. Formulation and in-vitro characterization of retinoic acid loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres. *J. Microencapsul.* 2005;22:877–89.
25. Goldberg EP, Hadba AR, Almond BA, Marotta JS. Intratumoral cancer chemotherapy and immunotherapy: opportunities for nonsystemic preoperative drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 2002;54:159–80.
26. Farokhzad OC, Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Jon S, Kantoff PW, et al. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103:6315–20.
27. Li X, Li R, Qian X, Ding Y, Tu Y, Guo R, et al. Superior antitumor efficiency of cisplatin-loaded nanoparticles by intratumoral delivery with decreased tumor metabolism rate. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008;70:726–34.
28. Zheng D, Li D, Lu X, Feng Z. Enhanced antitumor efficiency of docetaxel-loaded nanoparticles in a human ovarian xenograft model with lower systemic toxicities by intratumoral delivery. *Oncol. Rep.* 2010;23:717–24.
29. Al-Ghananeem AM, Malkawi AH, Muammer YM, Balko JM, Black EP, Mourad W, et al. Intratumoral delivery of Paclitaxel in solid tumor from biodegradable hyaluronan nanoparticle formulations. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 2009;10:410–7.
30. Sahoo SK, Ma W, Labhasetwar V. Efficacy of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles in a murine model of prostate cancer. *Int. J. Cancer.* 2004;112:335–40.
31. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. *Int. J. Pharm.* 1989;55:R1–R4.
32. Lamprecht A, Benoit JP. Simple liquid-chromatographic method for Nile Red quantification in cell culture in spite of photobleaching. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2003;787:415–9.
33. Davoust N, Vuaillet C, Cavillon G, Domenget C, Hatterer E, Bernard A, et al. Bone marrow CD34+/B220+ progenitors target the inflamed brain and display in vitro differentiation potential toward microglia. *FASEB. J.* 2006;20:2081–92.
34. Taillandier L, Antunes L, Angioi-Duprez KS. Models for neuro-oncological preclinical studies: solid orthotopic and heterotopic grafts of human gliomas into nude mice. *J. Neurosci. Methods.* 2003;125:147–57.

35. Trimaille T, Pichot C, Elaissari A, Fessi H, Briancon S, Delair T. Poly(D,L-lactic acid) nanoparticle preparation and colloidal characterization. *Colloid. Polym. Sci.* 2003;281:1184–90.
36. Couvreur P, Barratt G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C. Nanocapsule technology: a review. *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.* 2002;19:99–134.
37. Jeong YI, Kang MK, Sun HS, Kang SS, Kim HW, Moon KS, et al. All-trans-retinoic acid release from core-shell type nanoparticles of poly(epsilon-caprolactone)/poly(ethylene glycol) diblock copolymer. *Int. J. Pharm.* 2004;273:95–107.
38. Leroueil-Le Verger M, Fluckiger L, Kim YI, Hoffman M, Maincent P. Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1998;46:137–43.
39. Kanchan V, Panda AK. Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response. *Biomaterials.* 2007;28:5344–57.
40. Xia J, Zhang S, Zhang Y, Ma M, Xu K, Tang M, et al. The relationship between internalization of magnetic nanoparticles and changes of cellular optical scatter signal. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2008;8:6310–5.
41. Coester C, Nayyar P, Samuel J. In vitro uptake of gelatin nanoparticles by murine dendritic cells and their intracellular localisation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2006;62:306–14.
42. Badie B, Schartner JM. Flow cytometric characterization of tumor-associated macrophages in experimental gliomas. *Neurosurgery.* 2000;46:957–61; discussion 961–2.
43. Nickles D, Abschuetz A, Zimmer H, Kees T, Geibig R, Spiess E, et al. End-stage dying glioma cells are engulfed by mouse microglia with a strain-dependent efficacy. *J. Neuroimmunol.* 2008;197:10–20.
44. Alizadeh D, Zhang L, Hwang J, Schluep T, Badie B. Tumor-associated macrophages are predominant carriers of cyclodextrin-based nanoparticles into gliomas. *Nanomedicine.* 2010;6:382–90.
45. Melancon MP, Lu W, Huang Q, Thapa P, Zhou D, Ng C, et al. Targeted imaging of tumor-associated M2 macrophages using a macromolecular contrast agent PG-Gd-NIR813. *Biomaterials.* 2010;31:6567–73.
46. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes. Dev.* 1996;10:1580–94.
47. Merino R, Hurlé JM. The molecular basis of retinoid action in tumors. *Trends. Mol. Med.* 2003;9:509–11.
48. Defer GL, Adle-Biassette H, Ricolfi F, Martin L, Authier FJ, Chomienne C, et al. All-trans retinoic acid in relapsing malignant gliomas: clinical and radiological stabilization associated with the appearance of intratumoral calcifications. *J. Neurooncol.* 1997;34:169–77.
49. Sun SY, Lotan R. Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2002;41:41–55.
50. Dou H, Morehead J, Destache CJ, Kingsley JD, Shlyakhtenko L, Zhou Y, et al. Laboratory investigations for the morphologic, pharmacokinetic, and anti-retroviral properties of indinavir nanoparticles in human monocyte-derived macrophages. *Virology.* 2007;358:148–58.
51. Soma CE, Dubernet C, Barratt G, Nemati F, Appel M, Benita S, et al. Ability of doxorubicin-loaded nanoparticles to overcome multidrug resistance of tumor cells after their capture by macrophages. *Pharm. Res.* 1999;16:1710–6.

Chapitre V
Vectorisation des métabolites actifs
de la vitamine D₃

Chapitre V. Vectorisation des métabolites actifs de la vitamine D₃

V.1. Introduction

Après avoir validé le ciblage des macrophages infiltrant les tumeurs par les nanoparticules de PLA et proposé une application pour la vectorisation de l'acide rétinoïque, nous avons souhaité développer une deuxième application thérapeutique de notre système nanoparticulaire en encapsulant les métabolites actifs de la vitamine D₃ qui présentent des propriétés anticancéreuses. Comme décrit en Chapitre III, la vitamine D₃ (cholécalférol) est une hormone stéroïdienne synthétisée dans la peau ou issue de l'alimentation. Le métabolisme de la vitamine D₃ commence dans le foie où elle est hydroxylée en 25-hydroxyvitamine D₃ (calcidiol) suivie d'une seconde hydroxylation dans le rein en 1,25-dihydroxyvitamine D₃ (calcitriol) qui est la forme active (1). Les propriétés anticancéreuses de ces métabolites sont de mieux en mieux documentées dans la littérature mais les résultats des essais cliniques restent modestes. Le calcitriol présente une activité anti-tumorale en dose supraphysiologique ($> 10^{-9}$ M) associée à un risque élevé d'hypercalcémie. La survenue d'hypercalcémies secondaires lors d'une administration systémique limite la dose de calcitriol utilisée et donc restreint considérablement son efficacité (2). De plus, un potentiel d'activité anticancéreuse du calcidiol peut être supposé (3). En effet, le calcidiol, principal métabolite de la vitamine D₃ présent dans la circulation, peut être converti dans les tissus en calcitriol par une 1α -hydroxylase extrarénale. La vectorisation de ces métabolites peut donc être une solution aux échecs actuels des essais cliniques.

L'objectif de l'étude présentée dans ce chapitre est d'élaborer des nanoparticules de PLA encapsulant le calcitriol ou le calcidiol et utilisant les TAM comme réservoir de ces nanoparticules. L'injection intratumorale des nanoparticules va permettre l'administration d'une dose efficace, plus élevée que dans les essais traditionnels, et concentrée au niveau de la tumeur sans engendrer d'hypercalcémies secondaires. En raison du coût du calcidiol et du calcitriol, la forme inactive de la vitamine D₃ (cholécalférol) a été utilisée pour les essais de préformulation-formulation. Différentes formulations de NP de cholécalférol ont été préparées et caractérisées en termes de taille moyenne, de rendement d'encapsulation et de profil de libération. La formulation sélectionnée a ensuite été chargée par le calcitriol ou le calcidiol pour évaluer son efficacité anticancéreuse potentielle en comparaison avec la forme non encapsulée.

Dans un premier temps, l'efficacité anticancéreuse des nanoparticules obtenues a été évaluée *in vitro* sur des cellules de gliome. Des recherches concernant la présence des récepteurs de la vitamine D et de l'enzyme 1 α -hydroxylase ont été conduites sur différents modèles de gliomes et ont permis la sélection de la lignée SF767 pour le test d'efficacité. Toutefois, le test de prolifération cellulaire des formes libres et encapsulées de calcidiol/calcitriol n'a pas permis d'observer d'actions antiprolifératives de ces dérivés. En effet, il est décrit dans la littérature que les réponses des cellules de gliome au calcitriol peuvent être très variables (4). Pour cela, l'évaluation *in vitro* de l'activité anticancéreuse des nanoparticules chargées en calcidiol/calcitriol a été dans un second temps conduite sur une lignée de cellules humaines de cancer du sein (MCF-7), connue pour sa sensibilité au calcitriol (5).

Dans ce chapitre seront présentés les résultats concernant la formulation et l'évaluation *in vitro* des nanoparticules des métabolites de la vitamine D₃, publiés dans *Pharmaceutical Research* en 2013. Les investigations portant sur l'étude de l'efficacité des nanoparticules de vitamine D₃ sur la prolifération de cellules de gliome seront décrites par la suite.

V.2. Nano-encapsulation des métabolites actifs de la vitamine D en vue d'une application en chimiothérapie

Les études présentées ci-dessous ont fait l'objet d'une publication dans *Pharmaceutical Research* en 2013 (Vol 30(4), p 1137-1146) intitulée « Nano-encapsulation of vitamin D₃ active metabolites for application in chemotherapy: formulation study and *in vitro* evaluation » (§V.4).

Tout d'abord une étude de préformulation a été réalisée sur l'encapsulation du cholécalciférol par la technique de nanopréciipitation. L'objectif était de sélectionner la formulation de NP ayant une taille moyenne proche de 200 nm avec un rendement d'encapsulation important et un profil de la libération prolongée. La composition des formules de NP étudiées sont les suivantes :

Phase organique :

- Solvant : 25 mL d'acétone
- Polymère : 0,5 à 1,5 % (m/m) d'acide poly(D,L)lactique (PLA, Mw 20000 g/mol, Evonik)

- Huile : 0 à 2 % de Miglyol[®]829 (caprylic, capric, succinic triglycerides, Sasol)
- Principe actif : 0,025% de cholécalciférol

Phase aqueuse :

- 50 mL d'eau déminéralisée
- Tensioactif : 0,05 à 0,1% de Polysorbate 80 (Montanox[®] 80 VG, Seppic)

Au cours cette étape, six formulations de NP ont été préparées en triplicat avec un ratio polymère:huile variable, comme présenté en **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** (p **Erreur ! Signet non défini.**), comprenant une formule de nanosphères (NP1) et cinq formules de nanocapsules (NP 2 à 6). Les NP obtenues ont un diamètre moyen variant entre 170 et 280 nm avec un indice de polydispersité (PdI) inférieur à 0.2 (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). La cinétique de libération du cholécalciférol a été évaluée *in vitro* par la méthode de centrifugation dans du tampon phosphate salin (PBS 0,01 M, pH 7,4) contenant 0,01% de dodécylsulfate de sodium (SDS) pour assurer les conditions sink. Le profil de libération du cholécalciférol peut être divisé en trois phases : une libération initiale rapide pendant la première heure, une phase de libération contrôlée plus lente pendant 23 h et une phase de libération lente entre 24h et 168h (**Erreur ! Source du renvoi introuvable., pErreur ! Signet non défini.**).

Les nanosphères (NP1) présentent une faible efficacité d'encapsulation en cholécalciférol ($69,8 \pm 2,4\%$) et une libération initiale élevée (60% dans la première heure). En revanche, avec les nanocapsules (NP2, ratio polymère:huile de 1:1), 92% du cholécalciférol a été encapsulé et un profil de libération prolongée a été obtenu (25,9% après 1 h et 40,7% après 168 h). En augmentant la proportion d'huile (NP3 et NP4, ratios polymère:huile respectifs de 1:2 et 1:4), la quantité de cholécalciférol encapsulée atteint 94,3% pour NP3 et 97,2%, pour NP4. De plus, la libération du cholécalciférol est plus lente qu'avec la formulation NP2 (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.A**): la libération initiale au cours de la première heure pour NP3 et NP4 est respectivement de 17,4% et 10,3% et le pourcentage libéré après 168 h atteint 29,2% et 21,2%. L'étude de l'influence de la concentration en polymère sur les propriétés des NP de cholécalciférol (NP4 et NP5, 0,5% d'huile et ratio polymère:huile de 2:1 et 3:1) n'a pas montré de modifications majeures de l'efficacité d'encapsulation ou des profils de libération. (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.B**). La proportion d'huile dans les NP apparaît donc comme le paramètre de

formulation ayant le plus d'influence sur les caractéristiques d'encapsulation et de libération du cholécalciférol.

Une étude de répartition du cholécalciférol entre l'huile et le polymère a été conduite afin de comprendre le rôle avantageux de l'huile et la différence entre les formulations préparées. Des solutions d'acétone contenant le cholécalciférol, le polymère et l'huile aux mêmes ratios que ceux utilisés dans les formulations NP2 à NP6 ont été préparées. Après évaporation de l'acétone, deux phases distinctes ont été obtenues: une phase supérieure huileuse et une phase inférieure polymère. En mesurant la teneur en cholécalciférol dans la phase huileuse, le pourcentage de cholécalciférol dissous dans l'huile a été calculé ainsi que sa répartition entre l'huile et le polymère (**Erreur ! Source du renvoi introuvable., pErreur ! Signet non défini.**). Lorsque des quantités égales d'huile et de polymère sont utilisées, $84,1 \pm 3,4\%$ du cholécalciférol est retrouvé dans l'huile. Avec les ratios polymère:huile de 1:2 et 1:4, ces pourcentages augmentent significativement avec $92,0 \pm 2,5\%$ dans l'huile pour le ratio 1:2 et $98,8 \pm 2,9\%$ dans l'huile pour le ratio 1:4. Dans le cas des ratios 2:1 et 3:1, la concentration et le pourcentage en cholécalciférol dans l'huile sont légèrement diminués.

Par conséquent, les nanocapsules semblent plus adaptées pour l'encapsulation de la vitamine D₃ et l'augmentation de la quantité de l'huile présente un avantage sur le rendement d'encapsulation ainsi que sur le contrôle de la libération. La formulation NP4 présente des caractéristiques adéquates pour une application thérapeutique car elle présente le taux d'encapsulation en cholécalciférol le plus important et le profil de libération prolongée le plus lent, néanmoins cette formulation présente un limite concernant la taille moyenne des nanoparticules (280 nm). Une formulation définitive a donc été développée pour obtenir des particules de 200 nm en diminuant les concentrations en polymère (0,25%) et en huile (1%) tout en gardant le même ratio polymère:huile de 1:4. Cette formulation a ensuite été retenue pour l'encapsulation du cholécalciférol (cholécalciférol-NP), du calcidiol (calcidiol-NP) et du calcitriol (calcitriol-NP).

Les trois types de NP (NP de cholécalciférol, calcidiol et calcitriol) présentent une distribution granulométrique monodisperse ($PdI < 0.1$) avec une taille moyenne proche de 200 nm sans différence significative entre les trois. Du fait de la différence d'hydrophobicité entre les trois molécules, une variabilité de l'efficacité d'encapsulation a été observée: les calcitriol-NP présentent effectivement une encapsulation légèrement plus faible ($87,8 \pm 0,6\%$) que les cholécalciférol-NP ($91,9 \pm 0,7\%$) ou que les calcidiol-NP ($93,7 \pm 0,9\%$) (**Erreur !**

Source du renvoi introuvable.) Les cinétiques de libération *in vitro* ont été menées selon la méthode décrite précédemment mais en renouvelant chaque jour le milieu de dissolution pour maintenir les conditions sink à l'infini. Les profils de libération obtenus présentés en **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** montrent une libération continue pendant 7 jours pour les trois types de NP. Le pourcentage de calcidiol libéré est de 27% après 24 h et de 80% après 168 h. Pour le calcitriol, 64% ont été libérés après 24h et 87% après 96 h. Les Calcitriol-NP ont un profil de libération très rapide du fait de la forte solubilité du calcitriol dans le milieu de dissolution utilisé.

Les études de stabilité des formes encapsulées versus les formes libres des trois molécules ont été conduites *in vitro* dans un milieu de culture cellulaire, plus proche des conditions physiologiques. Les résultats présentés en **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** montrent une dégradation rapide des dérivés de vitamine D₃ sous forme libre. En revanche, l'encapsulation permet d'améliorer fortement la stabilité du cholécalférol et du calcidiol et plus modérément celle du calcitriol. Sous forme encapsulée, 41,4% du cholécalférol et 51,9% du calcidiol sont retrouvés après 168h. En revanche, bien que la stabilité du calcitriol soit améliorée grâce à l'encapsulation, seulement 79,8% du calcitriol sont conservés après 24 h et 18,6% après 168h.

Les NP de PLA présentent donc de bonnes caractéristiques pour la vectorisation des métabolites de la vitamine D₃ puisqu'elles sont capables de bien les encapsuler, de prolonger leur libération et d'améliorer leur stabilité.

L'activité antiproliférative des calcidiol-NP et calcitriol-NP a été évaluée *in vitro* sur des cellules de cancer du sein de lignée MCF-7 en testant trois concentrations en principe actif (10^{-8} , 10^{-7} et 10^{-6} M) en comparaison à des solutions éthanoliques de calcidiol et calcitriol (concentration finale d'éthanol dans le milieu de culture de 0,1%). Des NP formulées sans principe actif (blank-NP) ainsi que l'éthanol (0,1%) ont été utilisés comme témoins négatifs. L'évaluation a été réalisée en trois expérimentations séparées par un test MTT de viabilité cellulaire à 4, 7 et 10 jours après le début du traitement. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la densité cellulaire par rapport au témoin correspondant (**Erreur ! Source du renvoi introuvable., pErreur ! Signet non défini.**).

Aucun changement significatif de la viabilité cellulaire n'a été observé sur les cellules exposées aux blank-NP ou à l'éthanol au cours de l'étude (données non présentées). Les évaluations au 4^{ème} jour montrent qu'avec 10^{-6} M de calcidiol, libre ou encapsulé, la densité

cellulaire a diminué jusqu'à 53% ($p < 0,01$ par rapport aux témoins correspondants) prouvant l'efficacité antiproliférative du calcidiol. Cet effet reste marqué pour le calcidiol libre pendant 7 jours. Les calcidiol-NP ont permis de diminuer encore la prolifération cellulaire jusqu'à 31% de densité cellulaire au 7^{ème} jour et de maintenir cet effet sur les 10 jours de l'étude (65%, $p < 0,05$). Le calcitriol (libre et encapsulé) présente une activité plus efficace que le calcidiol puisque une action antiproliférative se produit aux concentrations de 10^{-6} M et 10^{-7} M. La concentration de 10^{-7} M en calcitriol permet de maintenir une activité antiproliférative sur 7 jours. Avec une concentration plus élevée en calcitriol (10^{-6} M) l'action antiproliférative peut être observée pendant 10 jours au bout desquels la densité cellulaire est de 28% en présence de calcitriol libre et de 15% avec les calcitriol-NP. Les nanoparticules permettent donc de préserver l'activité antiproliférative *in vitro* du calcidiol et du calcitriol sur les cellules MCF-7. Les calcidiol-NP et les calcitriol-NP exercent une action antiproliférative plus efficace après 7 et 10 jours, en particulier, les calcidiol-NP à une concentration de 10^{-6} M ont une activité significativement plus forte que le calcidiol libre ($p < 0,05$).

Enfin, une étude d'internalisation *in vitro* des NP par les cellules MCF-7 a été réalisée afin de comprendre le rôle des NP dans l'amélioration de l'efficacité antiproliférative des métabolites de la vitamine D₃. L'internalisation par les MCF-7 a été évaluée en observant le devenir des NP fluorescentes à base de Rouge Nile (NR) en microscopie à fluorescence. Après 4 jours d'incubation, plus de zones de fluorescence ont été détectées à l'intérieur des cellules exposées aux NP de Rouge Nile (NR-NP) que dans les cellules exposées au NR libre (**Erreur ! Source du renvoi introuvable., pErreur ! Signet non défini.**). En outre, dans le cas des NP, certains points fluorescents sont restés détectables après 7 voire 10 jours. Ces résultats indiquent que les NP sont capables d'améliorer l'administration intracellulaire de l'actif encapsulé.

En conclusion, cette étude a permis de formuler des nanoparticules polymères pour l'encapsulation des métabolites actifs de la vitamine D₃. Ces NP présentent de très bons rendements d'encapsulation, proches de 90%, un profil de libération prolongée sur plusieurs jours ainsi qu'une amélioration de la stabilité des trois molécules encapsulées. L'évaluation *in vitro* sur la lignée MCF-7 montre la capacité de ces NP de maintenir les activités antiprolifératives pendant 10 jours. La vectorisation des métabolites actifs de la vitamine D₃ se présente donc comme une nouvelle stratégie d'administration qui surmonte leurs limitations actuelles dans le traitement du cancer.

V.3. Etude *in vitro* de l'activité anticancéreuse des nanoparticules de vitamine D₃ sur un modèle de gliome

Après l'obtention des calcidiol-NP et calcitriol-NP, nous avons envisagé de tester *in vitro* l'activité anticancéreuse de ces NP sur le même modèle tumoral (gliome) que celui utilisé dans l'étude d'internalisation *in vivo*. Pour cela, une étude préliminaire pour la sélection du modèle tumoral a été conduite afin de mettre en évidence la présence des récepteurs de la vitamine D (VDR) et de l'enzyme 1 α -hydroxylase (CYP27B1) dans les modèles de gliomes développés par l'unité Inserm U1028 - CNRS UMR5292 avec laquelle nous avons collaboré. Ensuite un test de prolifération cellulaire a été réalisé sur une culture cellulaire du modèle choisi.

Plusieurs modèles de tumeurs de gliomes humains greffés sur des souris immunodéprimées ont été testés: trois xénogreffes de gliome humain issues de patients (Glio 1, 2 et 3) ; une xénogreffe de neurosphères END ; trois xénogreffes des lignées humaines commerciales (U87, SF767 et CB193). Une analyse Western Blot a été réalisée sur les lysés des tumeurs issues des xénogreffes. Après migration des protéines, la révélation a été faite en utilisant des anticorps primaires contre le VDR (VDR-H-81, Rabbit polyclonal IgG antibody, Santa Cruz) et la CYP27B1 (CYP27B1-H-90, Rabbit polyclonal IgG antibody, Santa Cruz). La lyse cellulaire de la lignée SK-BR-3 et l'extrait tissulaire de rein murin ont été utilisés comme témoins positifs fournis par Santa Cruz.

Les résultats du Western Blot présentés en Figure 29 montrent la bande à 51kD du VDR détectée dans les tumeurs Glio1 et SF767. La CYP27B1 a été détectée dans toutes les tumeurs testées sous forme associée à 67kD. Des conditions de réduction plus fortes sont nécessaires afin de détecter la forme active du CYP27B1 à 56kD. Du fait de la forte présence de VDR dans la tumeur SF767, cette lignée a été choisie pour la suite de l'étude.

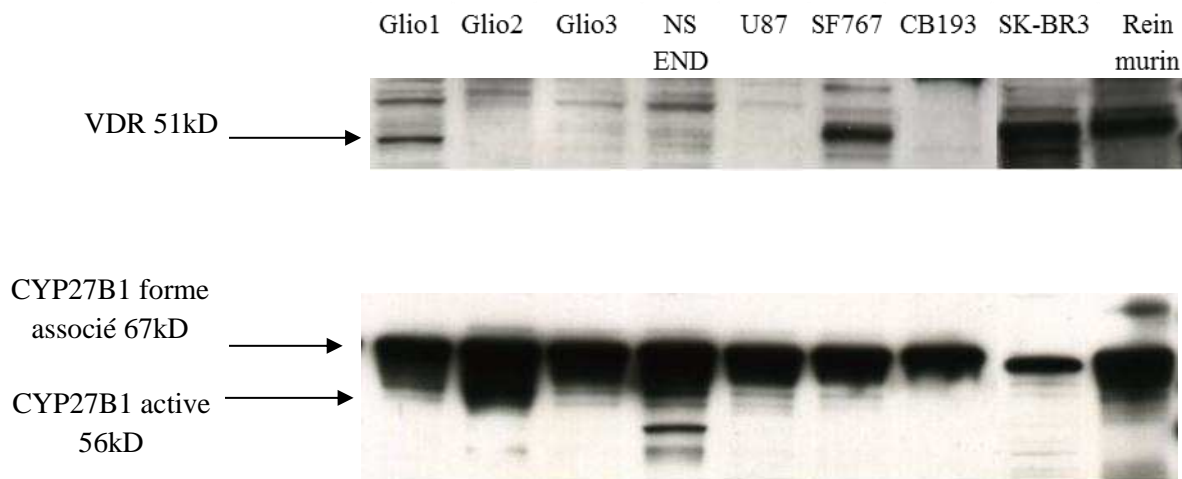


Figure 29 : Analyse Western Blot des lysés des tumeurs de gliome humain.

Une évaluation de l'action antiproliférative des calcidiol-NP et calcitriol-NP a ensuite été conduite *in vitro* sur les cellules de lignée SF767 retenue. Trois concentrations (10^{-8} , 10^{-7} et 10^{-6} M) ont été testées en comparaison aux solutions éthanoliques du calcidiol et du calcitriol. Des NP formulées sans actif (blank-NP) et l'éthanol (0,1%) ont été utilisés comme témoins négatifs. L'évaluation a été réalisée par un test de viabilité cellulaire (WST-1, Roche) à 3 et 7 jours après le début du traitement. Les résultats sont exprimés en pourcentage de densité cellulaire par rapport au témoin correspondant.

Les résultats présentés en Figure 30 montrent un effet prolifératif inattendu du calcidiol et du calcitriol. En effet, les évaluations après trois jours d'incubation montrent une augmentation de la densité cellulaire (jusqu'à 300%) lorsque les cellules ont été traitées avec le calcidiol libre et le calcitriol libre et encapsulé. Cet effet est moins marqué après 7 jours du fait de la prolifération des cellules témoins. Malgré la présence de VDR dans les cellules SF767, ces cellules présentent une réponse inexplicée à la vitamine D₃. D'autres éléments impliqués dans l'action antiproliférative de la vitamine D₃ semblent altérés dans cette lignée favorisant la prolifération cellulaire. Il aurait donc été nécessaire d'approfondir la caractérisation des cellules de gliome et de tester d'autres conditions de culture avant de tester l'action de la vitamine D₃.

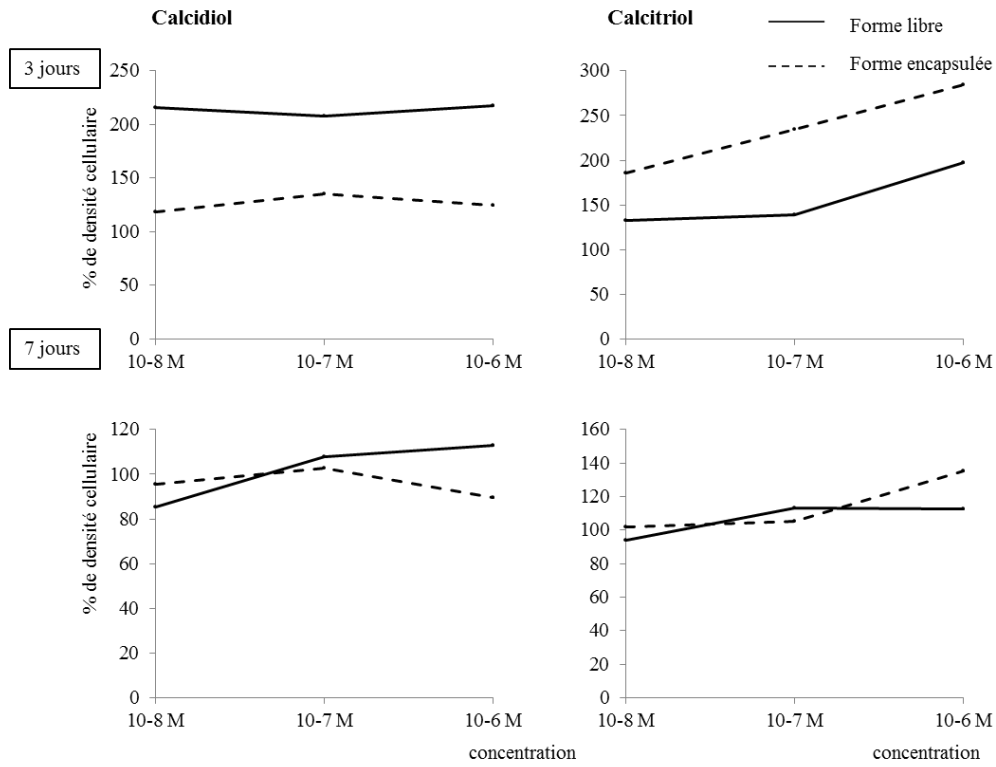


Figure 30 : Evaluation *in vitro* des activités antiprolifératives du calcidiol/calcitriol sur la lignée SF767 de gliome humain.

V.4. Publication

Nano-encapsulation of vitamin D₃ active metabolites for application in chemotherapy: formulation study and *in vitro* evaluation

Running head: Vitamin D₃ nanoparticles for anti-cancer treatment

Pharmaceutical Research

Volume 30, Issues 4, April 2013, Pages 1137-1146

Eyad Almouazen¹, Sandrine Bourgeois^{1,3*}, Lars Petter Jordheim^{2,3}, Hatem Fessi^{1,3}, Stephanie Briançon^{1,3}

¹ University Lyon, University Claude Bernard Lyon 1, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés, LAGEP UMR CNRS 5007, F-69622, Villeurbanne, France

² Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, UMR INSERM U1052, CNRS 5286, F-69000 Lyon, France

³ University Lyon 1, ISPB-School of Pharmacy, F 69008 Lyon, France

*Corresponding author: University Claude Bernard Lyon 1, LAGEP, CPE-308G, 43 bd. 11 Nov.1918, F-69622, Villeurbanne, France Tel: +334 78 77 72 35. Fax: +334 78 77 75 84.

E-mail address: bourgeois@lagep.univ-lyon1.fr

V.4.1. Abstract

Purpose Calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D₃), the active metabolite of vitamin D₃, is a potential anticancer agent but with high risk of hypercalcemia which limits the achievement of effective serum concentrations. Thus, calcitriol targeting delivery by nanoparticles may present a good solution.

Methods Vitamin D₃ active metabolites were encapsulated into polymeric nanoparticles and different formulation parameters were tested. The growth inhibitory efficiency of these nanoparticles was carried out *in vitro* on human breast adenocarcinoma cells (MCF-7).

Results Using cholecalciferol (the inactive metabolite), different polymer and oil ratios were compared to select nanoparticles presenting high encapsulation efficiency and sustained release profile. Calcidiol/calcitriol loaded nanoparticles had good encapsulation efficiencies (around 90%) associated with sustained releases over 7 days and enhanced stability. Moreover, loaded nanoparticles showed similar growth inhibition to non-encapsulated metabolites of vitamin D₃ on day 4 and higher activities on days 7 and 10 after treatment initiation.

Conclusion The nano-encapsulation of vitamin D₃ active metabolites may offer a new and potentially effective strategy for vitamin D₃-based chemotherapy overcoming its actual limitations. The targeting delivery of vitamin D₃ metabolites should be encouraged.

Key words

Biodegradable polymeric nanoparticles, vitamin D₃, tumor, MCF-7 cell line, drug delivery

Cet article n'est pas disponible dans la version en ligne, merci d'utiliser le lien suivant pour le consulter <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11095-012-0949-4>

V.5. Références

1. Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends. Biochem. Sci.* 2004;29:664–73.
2. Woloszynska-Read A, Johnson CS, Trump DL. Vitamin D and cancer: clinical aspects. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011;25:605–15.
3. Lou YR, Molnar F, Perakyla M, Qiao S, Kalueff AV, St-Arnaud R, et al. 25-Hydroxyvitamin D(3) is an agonistic vitamin D receptor ligand. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2010;118:162–70.
4. Diesel B, Radermacher J, Bureik M, Bernhardt R, Seifert M, Reichrath J, et al. Vitamin D(3) metabolism in human glioblastoma multiforme: functionality of CYP27B1 splice variants, metabolism of calcidiol, and effect of calcitriol. *Clin. Cancer Res.* 2005;11:5370–80.
5. Colston KW, Hansen CM. Mechanisms implicated in the growth regulatory effects of vitamin D in breast cancer. *Endocr-Relat. Cancer.* 2002;9:45–59.
6. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat. Rev. Cancer.* 2007;7:684–700.
7. Beer TM, Myrthue A. Calcitriol in cancer treatment: from the lab to the clinic. *Mol. Cancer Ther.* 2004;3:373–81.
8. Gross C, Stamey T, Hancock S, Feldman D. Treatment of early recurrent prostate cancer with 1,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol). *J. Urol.* 1998;159:2035–9.
9. Beer TM, Munar M, Henner WD. A Phase I trial of pulse calcitriol in patients with refractory malignancies: pulse dosing permits substantial dose escalation. *Cancer.* 2001;91:2431–9.
10. Scher HI, Jia X, Chi K, de Wit R, Berry WR, Albers P, et al. Randomized, open-label phase III trial of docetaxel plus high-dose calcitriol versus docetaxel plus prednisone for patients with castration-resistant prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* 2011;29:2191–8.
11. Hughes MR, Baylink DJ, Jones PG, Haussler MR. Radioligand receptor assay for 25-hydroxyvitamin D2/D3 and 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D2/D3. *J. Clin. Invest.* 1976;58:61–70.
12. Townsend K, Evans KN, Campbell MJ, Colston KW, Adams JS, Hewison M. Biological actions of extra-renal 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase and implications for chemoprevention and treatment. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2005;97:103–9.
13. Barreto AM, Schwartz GG, Woodruff R, Cramer SD. 25-Hydroxyvitamin D3, the prohormone of 1,25-dihydroxyvitamin D3, inhibits the proliferation of primary prostatic epithelial cells. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2000;9:265–70.
14. Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2008;66:1–9.
15. Overbergh L, Decallonne B, Valckx D, Verstuyf A, Depovere J, Laureys J, et al. Identification and immune regulation of 25-hydroxyvitamin D-1-alpha-hydroxylase in murine macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 2000;120:139–46.
16. Yokomura K, Suda T, Sasaki S, Inui N, Chida K, Nakamura H. Increased expression of the 25-hydroxyvitamin D(3)-1alpha-hydroxylase gene in alveolar macrophages of patients with lung cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003;88:5704–9.
17. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.* 2010;385:113–42.

18. Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009;66:2873–96.
19. Loomis K, McNeeley K, Bellamkonda RV. Nanoparticles with targeting, triggered release, and imaging functionality for cancer applications. *Soft Matter.* 2011;7:839–56.
20. Pavanetto F, Conti B, Genta I, Giunchedi P. Solvent evaporation, solvent extraction and spray drying for polylactide microsphere preparation. *Int. J. Pharm.* 1992;84:151–9.
21. Luca G, Basta G, Calafiore R, Rossi C, Giovagnoli S, Esposito E, et al. Multifunctional microcapsules for pancreatic islet cell entrapment: design, preparation and in vitro characterization. *Biomaterials.* 2003;24:3101–14.
22. Nguyen TLU, Tey SY, Pourgholami MH, Morris DL, Davis TP, Barner-Kowollik C, et al. Synthesis of semi-biodegradable crosslinked microspheres for the delivery of 1,25 dihydroxyvitamin D3 for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Eur. Polym. J.* 2007;43:1754–67.
23. Sun F, Ju C, Chen J, Liu S, Liu N, Wang K, et al. Nanoparticles based on hydrophobic alginate derivative as nutraceutical delivery vehicle: vitamin D3 loading. *Artif. Cell Blood Sub.* 2012;40:113–9.
24. Li Q, Liu CG, Huang ZH, Xue FF. Preparation and characterization of nanoparticles based on hydrophobic alginate derivative as carriers for sustained release of vitamin D3. *J. Agr. Food Chem.* 2011;59:1962–7.
25. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. *Int. J. Pharm.* 1989;55:R1–R4.
26. Jordheim LP, Guittet O, Lepoivre M, Galmarini CM, Dumontet C. Increased expression of the large subunit of ribonucleotide reductase is involved in resistance to gemcitabine in human mammary adenocarcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.* 2005;4:1268–76.
27. Holland SJ, Tighe BJ, Gould PL. Polymers for biodegradable medical devices. 1. The potential of polyesters as controlled macromolecular release systems. *J. Control. Release.* 1986;4:155–80.
28. Teixeira M, Alonso MJ, Pinto MMM, Barbosa CM. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005;59:491–500.
29. Washington C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. *Int. J. Pharm.* 1990;58:1–12.
30. Calvo P, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *J. Pharm. Sci.* 1996;85:530–6.
31. Segersten U, Holm PK, Björklund P, Hessman O, Nordgren H, Binderup L, et al. 25-Hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase expression in breast cancer and use of non-1alpha-hydroxylated vitamin D analogue. *Breast Cancer Res.* 2005;7:R980–986.
32. Jin C, Bai L, Wu H, Song W, Guo G, Dou K. Cytotoxicity of Paclitaxel Incorporated in PLGA Nanoparticles on Hypoxic Human Tumor Cells. *Pharm. Res.* 2009;26:1776–84.
33. Goldberg EP, Hadba AR, Almond BA, Marotta JS. Intratumoral cancer chemotherapy and immunotherapy: opportunities for nonsystemic preoperative drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 2002;54:159–80.
34. Al-Ghananeem AM, Malkawi AH, Muammer YM, Balko JM, Black EP, Mourad W, et al. Intratumoral delivery of Paclitaxel in solid tumor from biodegradable hyaluronan nanoparticle formulations. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 2009;10:410–7.

35. Bernardi A, Braganhol E, Jäger E, Figueiró F, Edelweiss MI, Pohlmann AR, et al. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. *Cancer Lett.* 2009;281:53–63.
36. Almouazen E, Bourgeois S, Boussaïd A, Valot P, Malleval C, Fessi H, et al. Development of a nanoparticle-based system for the delivery of retinoic acid into macrophages. *Int. J. Pharm.* 2012;430:207–15.

Discussion et Conclusion Générales

Discussion Générale

L'objectif de ce travail de recherche était de mettre au point des nanoparticules polymères capables de cibler les macrophages infiltrés dans les tumeurs et de libérer *in situ* un principe actif encapsulé au sein de ces NP. Les NP pourraient ainsi modifier les fonctions des macrophages ou encore permettre l'utilisation des macrophages comme un réservoir de principe actif anticancéreux. Avant de discuter les résultats obtenus au cours de cette thèse, nous aborderons les points permettant de définir le périmètre de ce travail.

Les macrophages présentent une cible thérapeutique intéressante dans le traitement de différentes maladies comme des pathologies auto-immunes, infectieuses ou le cancer (1). Du fait leur propriété phagocytaire, les macrophages sont potentiellement capables d'internaliser les nanovecteurs. De plus, l'élimination des nanovecteurs par les macrophages du système réticuloendothélial après une administration systémique est bien décrite (2). Dans la littérature, différentes approches pour le ciblage des macrophages par les systèmes d'encapsulation nanoparticulaire ont été envisagées en vue d'applications thérapeutiques et diagnostiques variables. Le ciblage passif des macrophages par les nanovecteurs non modifiées en surface représente un moyen simple et efficace. Néanmoins, afin de restreindre l'action des nanovecteurs à une population spécifique de macrophages, hors du système réticuloendothélial, l'administration locale de nanovecteurs, ciblant passivement les macrophages, est une approche envisageable (3,4).

Il a été démontré que les macrophages représentaient la population immunitaire la plus présente dans les tumeurs malignes, ils sont connus sous le terme « Tumor Associated Macrophages » (TAM). Ces macrophages jouent un rôle majeur sur la progression, l'angiogenèse et l'invasion de plusieurs types de tumeurs. La présence de ces TAM est généralement signe d'un mauvais pronostic (5). De nombreuses études ont été conduites en développant des stratégies anticancéreuses visant les TAM et leurs fonctions. Cependant, l'application clinique de ces stratégies est confrontée à un problème pratique concernant le mode d'administration afin de ne viser que les TAM et d'éviter les macrophages des tissus sains (6). Par conséquent, la vectorisation ciblant les TAM offre de nouvelles possibilités thérapeutiques. Le ciblage des macrophages infiltrés dans la tumeur (hors du système foie/rate) est peu décrit dans les littératures et émerge comme une approche intéressante.

Pour cibler les TAM, nous avons choisi l'injection intratumorale (IT) comme voie d'administration des NP. L'injection intratumorale apparaît comme une méthode efficace pour la chimiothérapie et l'immunothérapie permettant d'avoir une concentration idéale dans la tumeur et de limiter les effets secondaires systémiques. Plusieurs investigations ont porté sur l'évaluation des administrations par voie IT mais elle n'a pas été établie comme une voie d'administration alternative à celles utilisées en clinique. En effet, en pratique cette voie demeure invasive, l'élimination du principe actif administré est rapide et le développement de toxicité dans les tissus entourant le site d'injection a été décrit (7). Toutefois, l'injection IT émerge comme une voie d'administration des différents systèmes nanoparticulaires comme les nanoparticules polymères (8–10), les liposomes (11) et les nanoparticules minérales (12). L'association entre l'administration IT et les systèmes vectorisés présente des avantages thérapeutiques notamment sur la biodistribution du principe actif vectorisé (libération contrôlée, élimination moins rapide, réduction des effets toxiques...). Toutefois, parmi ces études, l'internalisation des nanoparticules par les TAM ainsi que l'implication des TAM dans l'administration IT ne sont pas bien élucidés.

Après une administration locale, les NP doivent être reconnues et internalisées par les macrophages rapidement afin d'assurer un bon ciblage. L'opsonisation suivie de la phagocytose semblent constituer le mécanisme impliqué pour les NP non-modifiées en surface. Plusieurs études dans la littérature citées en Chapitre I ont permis d'identifier les paramètres favorisant l'opsonisation et la phagocytose des particules tels qu'une surface hydrophobe, une charge de surface non-neutre (négative ou positive), une forme sphérique et une taille grande (13). D'après ces critères, les NP polymères à base des polyesters, formulées sans modification de surface, sont de bons candidats du fait de leur surface hydrophobe chargée (14). L'augmentation de la taille (> 500 nm) des NP favorise l'opsonisation mais avec une limite concernant la distribution des NP au site d'injection. Cependant, une petite taille (< 150 nm) nm semble favorable pour assurer une bonne diffusion des NP dans la tumeur (15). Pour cela, nous avons choisi de préparer des NP de taille moyenne proche de 200 nm assurant l'internalisation et la diffusion des NP au site d'injection mais aussi une taille permettant la stérilisation des NP par filtration.

Une fois phagocytées, les NP se retrouvent dans les phagolysosomes des macrophages et commencent à libérer l'actif encapsulé *in situ*. Du fait de la longue durée de vie des macrophages (1 à 3 mois) ainsi que la plasticité de leur phénotype, de leur activation et de leur profil de sécrétion en réponse au microenvironnement (16), le développement de NP

ciblant les macrophages doit prendre en considération la persistance des particules au sein des macrophages en vue du maintien de l'activité visée. La biodégradabilité des NP est aussi un paramètre important pour éviter les effets toxiques causés par l'accumulation des NP. Les NP à base de polyesters (ex : PCL, PLA, PLGA) peuvent assurer une dégradation intracellulaire lente, une libération prolongée de l'actif encapsulé et donc une activité maintenue sur les macrophages sans produire de composants de dégradation toxiques (17). La dégradation des particules de polyester s'accélère après l'internalisation en raison de l'acidité et l'activité enzymatique des phagolysosomes. Des études sur la dégradation des microsphères de PLGA ont montré une dégradation complète après 7 jours (18). Pour ces travaux de thèse nous avons donc sélectionné les polymères PCL et PLA se dégradant moins vite que le PLGA (17) afin de viser un maintien d'activité jusqu'à 7 jours après l'administration. Les deux polymères sont approuvés par la FDA pour l'utilisation pharmaceutique

Trois types de molécules ont été encapsulés au cours de nos travaux de recherche : le Rouge Nile (NR) comme marqueur fluorescent, l'acide tout-*trans*-rétinoïque (atRA) comme modulateur des fonctions macrophagiques et les dérivés de la vitamine D₃ pour leurs propriétés anticancéreuses. Du fait leur caractère hydrophobe, la technique de nanopréciipitation « déplacement de solvant » semble bien adaptée. L'utilisation de la nanopréciipitation dans la préparation des NP à base des polymères biodégradables type polyesters est largement documentée. Cette technique permet l'encapsulation d'actif hydrophobe avec un rendement d'encapsulation élevé. Le taille des NP obtenues est généralement régulière et varie entre 100 et 500 nm en fonction des concentrations des différents composants et peut être ajustée aux environs de 200 nm. Cette technique est connue pour sa simplicité, sa rapidité ainsi que pour sa possible transposition à l'échelle industrielle (14).

Par conséquent, l'objectif de ce travail était de formuler des NP à base de polymères biodégradables comme la PCL et le PLA. Les NP présentent une distribution granulométrique monodisperse avec une taille moyenne proche de 200 nm. Les NP doivent être capables de prolonger la libération et d'améliorer la stabilité du principe actif encapsulé. Ces NP, ciblant les TAM passivement après une administration intratumorale, permettraient de contrôler l'action de l'actif encapsulé et donc de maintenir l'activité modulatrice de l'acide tout-*trans* rétinoïque ou de prolonger l'action anticancéreuse des dérivés de la vitamine D₃.

Développement des nanoparticules d'acide rétinoïque

L'acide tout-*trans* rétinoïque (forme active de la vitamine A) est notamment utilisé dans la prise en charge de leucémies aiguës promyélocyaires sous forme orale ou dans le traitement de troubles cutanés en application topique. L'instabilité, la très faible hydrosolubilité, la mauvaise biodisponibilité et les effets secondaires de l'atRA sont les principales limites à son utilisation thérapeutique. Cette molécule se présente donc comme un candidat d'intérêt à la vectorisation (19). Les travaux d'encapsulation de l'atRA décrits dans la littérature présentent son encapsulation comme un moyen d'améliorer sa stabilité chimique, sa solubilité voire son efficacité et de limiter sa toxicité. Les travaux d'encapsulation d'atRA sont généralement focalisés sur le développement d'une forme injectable plus efficace pour le traitement de cancers ou sur l'amélioration de son application cutanée. Toutefois, l'atRA est aussi capable de moduler les fonctions des cellules immunitaires mais la vectorisation de l'atRA comme agent immunomodulateur est très peu documentée dans la littérature. L'atRA présente une influence sur les macrophages et les cellules dendritiques présents dans les tumeurs. Il a été montré que l'atRA pouvait inhiber la sécrétion des facteurs d'angiogenèse par les TAM (20). De plus, l'atRA entre en jeu dans le mécanisme de migration des cellules dendritiques du site tumoral vers les ganglions lymphatiques, favorisant la présentation d'antigènes et l'initiation d'une réponse immunitaire contre la tumeur (21). La vectorisation de l'atRA pourrait donc présenter un intérêt majeur dans la modulation des fonctions macrophagiques au sein des TAM.

Au cours de nos travaux de recherche, une étude de préformulation des NP a tout d'abord été envisagée afin de déterminer les paramètres de formulation permettant d'avoir des NP monodisperse avec une taille moyenne proche de 200 nm. Plusieurs lots de NP ont été préparés sous forme de nanosphères (NS) et de nanocapsules à cœur huileux (NC). Différentes concentrations des composants (polymère, huile, tensioactif) ont été étudiées afin de déterminer leur influence sur la taille des NP. Le poids moléculaire et la concentration du polymère ont une influence significative sur la taille des NS et des NC et la taille la plus petite est obtenue avec le polymère de plus faible poids moléculaire à faible concentration. Ces observations sont en accord avec les résultats d'études similaires décrites dans la littérature comme celles portant sur la formulation de NP de PCL encapsulant la spironolactone (22) ou encore la primidone (23). Cette augmentation de la taille des NP est liée à l'augmentation de la viscosité de la phase organique lorsque le poids moléculaire ou la concentration du polymère sont plus importantes. Cette étude de préformulation a permis de fixer les

concentrations des différents excipients entrant dans la formulation : 0,5% de polymère (PCL 14000 ou PLA 20000), 0,75% d'huile dans les NC (Miglyol[®]829) et 0,05% de tensioactif (Montanox[®]80).

Durant des essais préliminaires d'encapsulation de l'atRA, la stabilité de l'atRA notamment son isomérisation pendant et après l'encapsulation a été étudiée. Nous avons constaté que la température est plutôt une source de dégradation du RA et que la lumière est essentiellement responsable des phénomènes d'isomérisation. Nos observations sont en accord avec certains résultats de la bibliographie décrits dans le Chapitre II, notamment sur les études de stabilité des préparations dermatologiques d'atRA (24). Brisaert *et al.* ont montré que les liposomes n'étaient capables de protéger l'atRA qu'en présence d'un antioxydant et que l'atRA encapsulé se dégradait néanmoins rapidement au cours des études de photostabilité accélérées (25). Ourique *et al.* ont préparé des nanoparticules capables de doubler la photostabilité de l'atRA par rapport à la forme libre (26). Des observations similaires ont été obtenues avec des niosomes d'atRA (27). Parmi ces études la dégradation et l'isomérisation n'ont pas été différenciées et dans les autres travaux d'encapsulation de l'atRA les résultats sont exprimés en valeur totale de l'acide rétinoïque. La limite de 10% d'isomérisation a donc été sélectionnée comme critère d'acceptabilité de la stabilité de l'atRA pour notre étude. Dans la suite, l'isomérisation n'est plus discutée et les résultats sont exprimés en valeur totale de l'acide rétinoïque (RA).

Ensuite, l'encapsulation du RA a été effectuée en utilisant deux polymères (PCL et PLA). A partir de ces deux polymères, ont été formulées soit des NS (RA dispersé dans la matrice polymère) soit des NC (RA dissous dans un cœur huileux protégé par une enveloppe polymère). L'huile retenue pour la formation des NC est un caprylic/capric/succinic triglycéride, le Miglyol[®] 829 car elle permet la solubilisation du RA, elle est compatible avec une administration parentérale et permet une bonne séparation des NC de la phase dispersante aqueuse par centrifugation. Les quatre formules obtenues (NS, NC de PCL et NS, NC de PLA) sont toutes chargées négativement avec un potentiel zêta variant entre -10 et -29 mV et présentent une distribution granulométrique monodisperse avec un diamètre moyen variant entre 150 et 230 nm. L'efficacité d'encapsulation en RA est nettement supérieure avec les nanocapsules qu'avec les nanosphères. Cela s'explique par la présence du cœur huileux des NC qui augmente la quantité du RA dissous donc améliore son encapsulation (28). Donc les PCL-NC et PLA-NC (formulations E2 et E4) ont été retenues pour la suite de l'étude.

Les cinétiques de libération *in vitro* du RA à partir des PCL-NC et PLA-NC ont été déterminées par la méthode de membrane de dialyse dans un milieu de PBS:éthanol (8:2) assurant les conditions Sink. Une solution éthanolique de RA a été utilisée pour estimer le temps de diffusion du RA à travers la membrane de dialyse. La totalité du RA en solution a diffusé à travers la membrane en 9 heures environ. Le profil de libération du RA à partir des NC se compose de deux phases : une première, relativement rapide avec 50% de principe actif libéré après 24h, puis une phase plus lente aboutissant à la libération de 80% de RA après 4 jours et sans poursuite de la libération entre 4 et 7 jours. Aucune différence significative n'a été observée entre les profils des PCL-NC (E2) et PLA-NC (E4). La première phase de libération plus rapide peut être en partie due au RA non-encapsulé au cœur des particules mais adsorbé à la surface des NC (20% libéré en 6h). De plus, la libération incomplète après 7 jours est due au fait que le polymère n'est que partiellement dégradé, en effet son érosion est un phénomène long nécessitant plus de 7 jours pour être totale. Le profil de libération obtenu ici est proche de certains décrits dans la littérature notamment de celui reporté par Simon *et al.* pour des NP de PLGA où 70% du RA a été libéré après 48 h, puis une étape de libération lente pendant 8 jours intervient (29). En revanche, le profil obtenu semble rapide comparé à d'autres études montrant une libération prolongée du RA jusqu'à 15 jours pour des NP formulées avec des copolymères PEG/PCL ou PEG/PLA mais dans ces études les conditions sink n'étaient pas respectées (30,31).

Plusieurs travaux d'encapsulation du RA ont montré l'amélioration de la photostabilité de ce dernier grâce à l'encapsulation en comparaison à une solution alcoolique du RA (19). Nous avons cherché à étudier la stabilité du RA encapsulé dans des conditions similaires à l'environnement physiologique. Pour cela, une étude de stabilité du RA *in vitro*, dans le milieu de culture cellulaire utilisé par la suite pour les études de phagocytose, a été effectuée sur les PCL-NC et PLA-NC. Cette étude a montré que les NC amélioraient fortement la stabilité du RA. Après 7 jours, 66% du RA encapsulé dans les PCL-NC et 50% de celui encapsulé dans les PLA-NC sont restés stables. En revanche seulement 6% du RA en solution a été retrouvé après 7 jours. Donc l'encapsulation du RA améliore considérablement sa stabilité dans les conditions de culture cellulaire, donnant la possibilité aux NC de maintenir les effets du RA sur les macrophages sur une longue période. Néanmoins, les PCL-NC étaient plus stables que les PLA-NC probablement à cause du caractère plus hydrophobe de la PCL et de sa dégradation plus lente (17).

Les deux types de NC présentent de bonnes caractéristiques pour la vectorisation du RA puisqu'elles sont capables de prolonger sa libération et d'améliorer sa stabilité. Elles sont donc potentiellement adaptées à une application thérapeutique sur les TAM. Les PLA-NC ont finalement été retenues pour la suite de l'étude car elles présentent la meilleure efficacité d'encapsulation (90%) et une distribution de taille plus étroite avec un diamètre moyen inférieur à 200 nm.

Enfin, la capacité des nanocapsules de PLA chargées en acide rétinoïque (RA-NC) de moduler les fonctions des macrophages *in vitro* a été étudiée par RT²-PCR cytokines array afin de déterminer quelles sont les cytokines dont la régulation des gènes peut être affectée par la présence des RA-NC. Les résultats ont montré que la protéine morphogénétique osseuse 2 (BMP-2) été surexprimée dans les macrophages traités avec RA-NC. La BMP-2 est un membre de la superfamille des facteurs de croissance de transformation β (TGF- β) et joue un rôle important dans l'activité pro-apoptotique de rétinoïdes dans les tumeurs notamment les médulloblastomes (32). Il peut donc être envisagé qu'après injection intratumorale des RA-NC, ces NC seront phagocytées par les TAM et la libération intracellulaire de RA pourrait activer la sécrétion de BMP-2 et permettre l'induction de l'apoptose des cellules tumorales. Ces résultats ont permis de démontrer que le RA reste actif après l'encapsulation et capable de moduler certaines fonctions des macrophages. Des études complémentaires pourraient donc s'avérer très intéressante afin de mettre en évidence d'autres effets des RA-NC sur les macrophages notamment dans le microenvironnement tumoral. De plus, le RA agit comme un agent anticancéreux sur différentes tumeurs telles que les gliomes, les médulloblastomes, etc. (33). Nous pouvons donc également suggérer qu'outre les effets immunomodulateurs exercés sur les TAM, le RA encapsulé peut se libérer dans l'environnement tumoral à partir des TAM et exercer des effets anticancéreux. L'internalisation des RA-NC par les TAM permettrait de prolonger ces effets anticancéreux.

Etude de l'internalisation des nanoparticules par les macrophages

Pour suivre l'internalisation des PLA-NC par les macrophages *in vitro* et *in vivo*, un marqueur fluorescent, le Rouge Nile (NR) a été utilisé. Cette étude d'internalisation a été réalisée sur les PLA-NC contenant le Rouge Nile (NR-NC) comparativement à un contrôle de PLA-NC non fluorescentes (blank-NC). Les deux type de NC présentent des caractéristiques similaires aux NC contenant l'acide rétinoïque, les résultats obtenus au cours de cette étude seront donc transposables aux RA-NC.

L'étude d'internalisation *in vitro* a été conduite sur des macrophages générés à partir de moelle osseuse de souris (BMM). Les BMM ont été incubées avec les NR-NC ou les blank-NC pendant 24h. La période de 24h d'incubation était nécessaire pour obtenir une internalisation maximale comme mentionné par Kanchan *et al.* dans une étude similaire de phagocytose de nanoparticules de PLA (34). Les observations microscopiques confirment l'internalisation et la persistance des NC au sein des BMM pendant 7 jours. Nous avons émis l'hypothèse que la surface hydrophobe des PLA-NC favorisait l'adsorption des protéines sériques présentes dans le milieu de culture et donc renforçait la phagocytose des NC par les macrophages (4). L'observation de la fluorescence à l'intérieur des macrophages après 7 jours indique la capacité qu'ont les NC de protéger et prolonger la libération de l'actif encapsulé et donc de résister à la dégradation par les enzymes intracellulaires.

De plus, les mesures de cytométrie en flux ont confirmé les observations microscopiques et ont permis de quantifier à la fois l'intensité de la fluorescence et la granularité des BMM. Les macrophages traités avec les NR-NC avaient une intensité de fluorescence 4 fois supérieure à celle des macrophages contrôles à 24h et cette intensité restait élevée pendant 7 jours. De plus, un changement de granularité a été mis en évidence pour les macrophages traités avec les NR-NC et les blank-NC en mesurant la diffusion de la lumière incidente (side scattering channel, (SSC)). Cette augmentation de granularité relative est maintenue sur la période de 7 jours indiquant que, suite à la phagocytose, les NC ne sont pas entièrement dégradées après 7 jours et restent à l'intérieur des macrophages. Des observations similaires de changement de la granularité cellulaire ont été décrites précédemment par Xia *et al.* (35) qui ont étudié l'internalisation des nanoparticules magnétiques par des carcinomes hépatocellulaires, ou encore par Coester *et al.* (36) avec des NP de gélatine internalisées par des cellules dendritiques. Kanchan *et al.* ont aussi observé l'élargissement de la taille des cellules après incubation de macrophages murins (lignée J774) avec des nanoparticules de PLA (34).

Dans l'objectif de cibler les TAM par les NP, une étude de l'internalisation *in vivo* est nécessaire afin de confirmer le concept, d'observer le devenir des NP après injection intratumorale et d'illustrer la capacité des NP à cibler les TAM. Nous avons choisi de réaliser cette étude sur un modèle de xéno greffe de gliome humain implanté chez des souris immunodéprimées (souris nude) (37). Le modèle de gliome a été retenu pour plusieurs raisons : i) car il s'agit d'une tumeur primitive cérébrale très fréquente et très agressive, ii) de plus, l'infiltration des gliomes par les macrophages a fait l'objet de nombreuses études et est

bien décrite dans la littérature(38), iii) enfin, il a été prouvé que les TAM conservent leur capacité de phagocytose dans les gliomes (39). Les coupes de tumeurs prélevées ont été marquées par des anticorps d'Iba1, une protéine de liaison au calcium, exprimée sélectivement par les macrophages (40).

48 heures après l'injection intratumorale des NR-NC, nous avons constaté que les NR-NC ont été effectivement phagocytées par les macrophages infiltrés, mais pas par les cellules de gliome. De plus, des NC ont été retrouvées loin du site d'injection indiquant la diffusion des NC dans le tissu tumoral. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits par Alizadeh *et al.* pour des nanoparticules de cyclodextrines injectées dans des souris porteuses de gliomes (10).

Les résultats de l'étude d'internalisation *in vivo* montrent l'avantage des nanoparticules polymères non modifiées en surface pour l'administration intratumorale. Contrairement à l'injection de principe actif libre ou encapsulé dans des NP furtives (non-phagocyté par les TAM), l'internalisation par les macrophages infiltrés va permettre la conservation des NP (non modifiées en surface) dans la tumeur et limiter leur diffusion dans la circulation et donc leurs effets secondaires systémiques. De plus, du fait que ces NP soient capables de contrôler la libération et de stabiliser l'actif encapsulé, une activité spécifique et prolongée sur la tumeur peut être supposée. Pour approfondir cet aspect, des études complémentaires sont nécessaires afin d'étudier la biodistribution des NP administrées et d'estimer la durée de vie de ces NP dans les TAM après l'injection intratumorale. De plus, les TAM présentent une variabilité dans leur phénotype ainsi que dans leur fonction selon leur localisation dans la tumeur (41). Il serait donc intéressant de rechercher quelles sous-populations sont ciblées par les NP en utilisant différents marqueurs spécifiques.

Par conséquent, nos résultats indiquent que les nanoparticules de PLA sont des vecteurs adaptés pour l'administration de principe actif au niveau des macrophages et le contrôle de leurs effets sur ces macrophages. Ces nanoparticules, par une injection intratumorale, présentent une approche prometteuse pour cibler les TAM et permettre le développement d'un traitement anti-tumoral basé sur la modulation des fonctions des TAM.

Vectorisation des métabolites actifs de la vitamine D₃

Au cours de ce travail de thèse, une deuxième application thérapeutique des nanoparticules de PLA a été envisagée en encapsulant les métabolites actifs de la vitamine D₃. Les NP de PLA, par leur capacité de cibler les TAM, présentent aussi la possibilité d'une vectorisation ciblée d'un agent anticancéreux. Ces TAM après capture des NP peuvent servir de réservoir du principe actif encapsulé comme une sorte de « vecteurs de vecteurs ». La libération extracellulaire de l'actif encapsulé dans les NP, internalisées par les macrophages, a été déjà démontrée *in vitro* par Dou *et al.*(42). Soma *et al.* (43) ont aussi montré *in vitro* l'efficacité anti-cancéreuse de NP de doxorubicine après l'internalisation par des macrophages. En effet, après une libération intracellulaire à partir des NP, l'agent anticancéreux encapsulé pourrait sortir des TAM vers le tissu tumoral et exercer son action sur les cellules tumorales.

Comme décrit dans le Chapitre III, les propriétés anticancéreuses du calcitriol (forme active de la vitamine D₃) ont été bien étudiées mais les résultats des essais cliniques sont peu concluants. Plusieurs études sur différents modèles tumoraux de leucémie, mélanome, cancer de la prostate, cancer du sein ou de carcinome épidermoïde, ont montré une activité anticancéreuse du calcitriol par l'inhibition de la prolifération et l'induction de la différenciation cellulaires (44). Ces études soulignaient notamment que l'activité anticancéreuse du calcitriol apparaissait à une concentration supraphysiologique ($>10^{-9}$ M) présentant un risque important d'hypercalcémie chez l'Homme (44). La survenue d'hypercalcémies secondaires lors d'une administration systémique limite la dose de calcitriol utilisée et donc restreint considérablement l'efficacité du traitement (45). Nous avons émis l'hypothèse que la vectorisation du calcitriol sous forme d'un système nanoparticulaire ciblant les TAM, pouvait permettre l'administration d'une dose efficace concentrée au niveau tumoral et diminuant ainsi les risques d'hypercalcémie secondaire.

Récemment, de nombreuses études ont porté sur l'évaluation du potentiel anticancéreux du calcidiol, autre dérivé de la vitamine D₃, soit directement soit via la formation de calcitriol. Le calcidiol est le métabolite de la vitamine D₃ le plus présent dans le sang (25 à 200 nmol/L), il ne possède pas d'activité directe sur l'homéostasie calcique et peut être converti en calcitriol dans les tissus sous l'action de la 1 α -hydroxylase extrarénale. Il a été montré *in vitro* qu'une concentration importante en calcidiol (500 à 1000 nM) était capable d'inhiber la prolifération de cellules de cancer de la prostate (46). De plus, plusieurs études ont confirmé l'expression de la 1 α -hydroxylase dans les macrophages. La présence de la 1 α -hydroxylase

dans les TAM reste à étudier mais certains travaux ont montré une augmentation excessive de son activité dans des modèles tumoraux de lymphome B ou de dysgerminome (47). La vectorisation du calcidiol en ciblant les TAM s'avère intéressante afin de maintenir une concentration élevée au niveau tumoral et de bénéficier de l'activité 1α -hydroxylase macrophagique.

Pour le développement des nanoparticules encapsulant le calcitriol et le calcidiol, des études de préformulation ont tout d'abord été menées afin d'identifier les paramètres de formulation clefs. Au cours de cette étape le cholécalférol, a été encapsulé en réalisant six formulations de nanoparticules (NP 1 à 6) avec un ratio polymère:huile variable (1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 2:1 et 3:1). Les NP obtenues diffèrent entre elles par leur diamètre moyen (entre 170 et 280 nm), l'efficacité d'encapsulation (entre 70% et 97%) ainsi que le profil de libération du cholécalférol. Les nanocapsules (NP 2 à 6) semblent plus adaptées que les nanosphères (NP1) en raison de la présence du cœur huileux qui permet de solubiliser le cholécalférol et d'améliorer ainsi son encapsulation (28). La formulation NP4 (ratio polymère:huile de 1:4) présente l'efficacité d'encapsulation la plus élevée ainsi qu'un profil de libération prolongée sur plusieurs jours. Cette étude a pu montrer que l'augmentation de la quantité d'huile améliore l'efficacité d'encapsulation en cholécalférol et prolonge sa libération. En revanche, la concentration en polymère n'a pas d'effet significatif sur l'encapsulation ou la libération du cholécalférol.

Les profils de libération de ces NP, évalués *in vitro* par la méthode de centrifugation, peuvent être divisés en trois phases. La libération initiale durant la première heure est relativement rapide. Elle consiste en la libération du cholécalférol probablement adsorbé à la surface des NP. La phase de libération contrôlée au cours des 23 heures suivantes peut être attribuée à la diffusion de cholécalférol depuis le cœur des NP vers le milieu de libération. Ensuite, un équilibre de diffusion du cholécalférol entre les NP et le milieu de dissolution a lieu provoquant une libération lente entre 24 h et 168 h. Cet équilibre est le résultat de la partition du cholécalférol entre le système colloïdal (NP) et la phase aqueuse externe (milieu de dissolution) comme discuté par Washington et al. (48).

Les différences entre les profils de libération pour les six formulations étudiées peuvent être discutée sachant qu'elles ont été diluées dans le même milieu de dissolution afin d'obtenir une concentration finale de cholécalférol constante de 4 $\mu\text{g/mL}$. La diminution de la libération initiale observée en incorporant plus d'huile dans la formulation (de 25,9% pour

NP2 à 10,3% pour NP4) reflète la réduction du cholécalciférol adsorbé à la surface des NP qui est une conséquence de l'augmentation de la quantité de cholécalciférol emprisonné dans le cœur huileux des nanoparticules et donc de l'efficacité de l'encapsulation. Inversement, l'ajout de plus de polymère dans la formulation (NP5 et NP6) augmente l'épaisseur de la coque des NP sans effet sur l'encapsulation du cholécalciférol ou sur sa libération. De plus, la quantité libérée au cours de la phase de libération contrôlée (pendant les 23 heures suivantes) diminue également lorsque la quantité d'huile augmente : pour les NP2, NP3 et NP4 environ 12%, 9% et 6% sont respectivement libérés. Dans ce cas, lors d'une progression de NP2 vers NP4, l'équilibre de diffusion est atteint pour des concentrations décroissantes de cholécalciférol dans le milieu de libération. En augmentant la quantité d'huile dans la formulation, la concentration en cholécalciférol au sein du cœur huileux des NP diminue et donc la partition du cholécalciférol entre les NP et le milieu de libération est en faveur des NP. Ces observations sont en accord avec les résultats d'études décrites dans la littérature concernant la libération d'un principe actif en fonction de sa partition entre les NP et le milieu de libération comme celles de Calvo *et al.* pour l'indométacine (49) ou encore par Teixeira *et al.* pour le 3-methoxyxanthone (50). Ces conclusions sont aussi en accord avec les résultats de notre étude de répartition du cholécalciférol à l'intérieur de NP. Lorsque le polymère et l'huile sont séparés en évaporant l'acétone, environ 84% du cholécalciférol est retrouvé dans la phase huileuse pour un ratio polymère:huile de 1:1. Dans le cas des ratios polymère:huile de 1:2 et 1:4, ce pourcentage est augmenté mais la concentration en cholécalciférol dans la phase huileuse diminue du fait de la plus forte proportion d'huile.

Ces étapes d'optimisation de la formulation des NP ont permis de sélectionner la formulation NP4 pour la poursuite des études. Toutefois, afin d'obtenir une distribution granulométrique adaptée et maîtrisée des NP (diamètre moyen ~ 200 nm) celles-ci ont été préparées en se basant sur les proportions de la formule NP4 mais dans des conditions diluées. Avec cette formulation définitive (cholécalciférol-NP), une augmentation de la libération initiale du cholécalciférol a été observée par rapport à l'ancienne formulation NP4 (20% vs 10%). Cette différence peut être due à l'augmentation de la surface spécifique des NP lorsque leur taille diminue et donc à une présence plus importante d'actif en surface des NP. Cette formulation a ensuite été appliquée à l'encapsulation du calcidiol ou du calcitriol. Une différence d'efficacité d'encapsulation a été observée selon la molécule encapsulée, celle-ci est effectivement légèrement plus faible pour le calcitriol. Les cinétiques de libération ont été conduites *in vitro* selon la même méthode que lors de l'étape de préformulation mais avec un

renouvellement quotidien du milieu de dissolution pour maintenir des conditions sink infinies et éviter d'atteindre l'équilibre de diffusion observé précédemment. Les cinétiques de libération obtenues dans le cas des trois dérivés présentent des profils de libération prolongée sur 7 jours. Après 7 jours la libération des principes actifs encapsulés est presque totale : environ 80% du cholécalférol et du calcidiol sont libérés et ce pourcentage atteint 90% pour le calcitriol, ce dernier présentant une solubilité plus importante dans le milieu de dissolution. De plus, l'encapsulation des métabolites de la vitamine D₃ améliorent leur stabilité dans les conditions de culture cellulaire. Les calculs théoriques de l'hydrosolubilité et des coefficients de partage octanol/eau (LogP) via ALOPGS (51) permettent de classer les trois molécules en fonction de leur hydrophobicité comme suit : cholécalférol > calcidiol > calcitriol. Par conséquent, il n'est pas surprenant que les calcitriol-NP aient une efficacité d'encapsulation plus modérée (87,8%) et un profil de libération plus rapide (64% libéré en 24h) que les deux autres types de NP. Les nanoparticules de PLA présentent donc de bonnes caractéristiques pour la vectorisation des métabolites de la vitamine D₃ puisqu'elles sont capables de bien les encapsuler, de prolonger leur libération et d'améliorer leur stabilité. Toutefois des études d'optimisation de la formulation des calcitriol-NP pourront être conduites afin d'obtenir des profils de libération plus prolongée et de diminuer la libération importante du calcitriol au cours des premières 24h.

Pour la suite des travaux expérimentaux, l'activité anticancéreuse des calcidiol-NP et calcitriol-NP a été étudiée *in vitro* sur un modèle de gliome (modèle utilisé précédemment pour l'étude de l'internalisation *in vivo*). Après une étude de sélection des lignées tumorales basée sur l'expression des récepteurs à la vitamine D (VDR) et la présence d'une activité 1 α -hydroxylase, la lignée cellulaire SF767 a été retenue pour les essais d'efficacité. Le test de viabilité cellulaire réalisé en traitant les cellules SF767 par du calcidiol ou du calcitriol sous formes libre et encapsulée n'a pas permis de mettre en évidence une action antiproliférative de ces métabolites mais a contrario un effet prolifératif inattendu a été observé. Malgré la présence des récepteurs VDR dans les cellules SF767, ces cellules présentaient une résistance au calcitriol. En effet, de nombreuses travaux décrits dans la littérature font état d'une grande variabilité de la réponse des cellules de gliome au calcitriol (52). De plus, d'autres éléments impliqués dans l'action antiproliférative de la vitamine D₃ peuvent être altérés dans cette lignée. Compte-tenu de ces résultats, il apparaît donc difficile de conclure sur l'intérêt du calcitriol dans le traitement du gliome et donc d'autant plus de l'intérêt du développement d'une forme vectorisée de calcitriol pour cette application.

Le cancer du sein, notamment la lignée de cellules d'adénocarcinome mammaire humain (MCF-7) se présentait comme un modèle alternatif intéressant pour étudier l'activité anticancéreuse des métabolites de la vitamine D₃ encapsulés. Le cancer du sein, cancer le plus fréquent chez la femme, est un modèle tumoral bien étudié et faisant partie des tumeurs infiltrées par les macrophages (53). De plus, la lignée MCF-7 est reconnue pour sa sensibilité au calcitriol à des concentrations nanomolaires (54) et possède aussi une activité 1 α -hydroxylase (55). L'activité antiproliférative des calcidiol-NP et calcitriol-NP ainsi que des formes libres de ces dérivés a été évalué *in vitro* sur les cellules de lignée MCF-7 par un test MTT de viabilité cellulaire à 4, 7 et 10 jours après le début du traitement. Les résultats de ce test ont montré que les effets antiprolifératifs du calcitriol et du calcidiol sont préservés sous forme encapsulée. En effet, quatre jours après le début du traitement, des réponses similaires ont été observées pour les formes libres et encapsulées. L'avantage des NP est particulièrement marqué dans le cas du calcidiol où les calcidiol-NP après 7 et 10 jours présentent une activité antiproliférative significativement plus efficace que le calcidiol libre ($p < 0,05$). Cette meilleure efficacité est due au profil de libération prolongé et au maintien de la stabilité du calcidiol lorsqu'il est encapsulé. Dans le cas du calcitriol, l'avantage des NP n'est pas réellement mis en évidence car les calcitriol-NP présentent une efficacité supérieure à la forme libre ($p < 0,1$) seulement après 10 jours. Cette absence de différence entre la forme libre et encapsulée pourrait s'expliquer par la meilleure stabilité du calcitriol libre que les autres métabolites dans les conditions de culture cellulaire mais aussi par le profil de libération plus rapide du calcitriol que du calcidiol à partir des NP. En effet, dans le cas du calcidiol, les NP permettent de prolonger la libération et de stabiliser le calcidiol (très instable sous forme libre) donc des concentrations efficaces peuvent être maintenues dans le milieu de culture cellulaire. Dans le cas du calcitriol sa bonne stabilité sous forme libre et sa forte activité antiproliférative permettent de maintenir une bonne efficacité après 7 jours. Néanmoins après 10 jours, l'élimination et la dégradation probable du calcitriol sous forme libre dans le milieu permet de marquer l'intérêt de l'encapsulation.

L'avantage des NP pourrait également s'expliquer par la capture de ces dernières par les cellules tumorales. L'étude d'internalisation *in vitro*, conduite sur une culture de la lignée MCF-7 en utilisant des NP marquées au Rouge Nile, indique une amélioration de l'administration intracellulaire du principe actif encapsulé par rapport à la forme libre. Bien que les cellules MCF-7 ne présentent pas une activité de phagocytose, la longue durée d'incubation (4 jours) avec les NP permettrait l'internalisation des NP par d'autres

mécanismes (13). Cette internalisation des NP par les cellules tumorales n'est pas réellement transposable *in vivo* car lors d'une administration intratumorale, les NP de PLA seraient rapidement internalisés par les TAM en raison de leur capacité de phagocytose et la capture par les cellules tumorales serait minime.

Le principal intérêt de la nano-encapsulation des métabolites de la vitamine D₃ doit maintenant être démontré par des études *in vivo*. Ces NP en ciblant les TAM permettraient une accumulation élevée du calcidiol/calcitriol au niveau tumoral ce qui ne serait pas le cas avec les formes libres. L'administration intratumorale de ces NP pourrait ainsi faciliter le ciblage des métabolites actifs de la vitamine D₃ et limiter leurs effets secondaires systémiques. Des études complémentaires s'avèrent donc nécessaires notamment des études *in vivo* permettant d'évaluer l'activité anticancéreuse des calcitriol-NP et des calcidiol-NP et d'observer l'impact de la nanoencapsulation sur la biodistribution de ces principes actifs ainsi que sur l'homéostasie calcique.

Références

1. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013;496:445–55.
2. Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Benoit J-P. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials*. 2006;27:4356–73.
3. Ulbrich W, Lamprecht A. Targeted drug-delivery approaches by nanoparticulate carriers in the therapy of inflammatory diseases. *J. R. Soc. Interface*. 2010;7 Suppl 1:S55–66.
4. Chellat F, Merhi Y, Moreau A, Yahia L. Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting. *Biomaterials*. 2005;26:7260–75.
5. Hao N-B, Lu M-H, Fan Y-H, Cao Y-L, Zhang Z-R, Yang S-M. Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors. *Clin. Dev. Immunol.* [Internet]. 2012 [cited 2013 Apr 29];2012. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3385963/>
6. Tang X, Mo C, Wang Y, Wei D, Xiao H. Anti-tumour strategies aiming to target tumour-associated macrophages. *Immunology*. 2013;138:93–104.
7. Goldberg EP, Hadba AR, Almond BA, Marotta JS. Intratumoral cancer chemotherapy and immunotherapy: opportunities for nonsystemic preoperative drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 2002;54:159–80.
8. Zheng D, Li D, Lu X, Feng Z. Enhanced antitumor efficiency of docetaxel-loaded nanoparticles in a human ovarian xenograft model with lower systemic toxicities by intratumoral delivery. *Oncol. Rep.* 2010;23:717–24.
9. Li X, Li R, Qian X, Ding Y, Tu Y, Guo R, et al. Superior antitumor efficiency of cisplatin-loaded nanoparticles by intratumoral delivery with decreased tumor metabolism rate. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008;70:726–34.
10. Alizadeh D, Zhang L, Hwang J, Schlupe T, Badie B. Tumor-associated macrophages are predominant carriers of cyclodextrin-based nanoparticles into gliomas. *Nanomedicine*. 2010;6:382–90.
11. Bao A, Phillips WT, Goins B, Zheng X, Sabour S, Natarajan M, et al. Potential use of drug carried-liposomes for cancer therapy via direct intratumoral injection. *Int. J. Pharm.* 2006;316:162–9.
12. Xie H, Goins B, Bao A, Wang ZJ, Phillips WT. Effect of intratumoral administration on biodistribution of ⁶⁴Cu-labeled nanoshells. *Int. J. Nanomedicine*. 2012;7:2227–38.
13. Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009;66:2873–96.
14. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.* 2010;385:113–42.
15. Davis ME, Chen Z (Georgia), Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008;7:771–82.
16. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8:958–69.
17. Mahapatro A, Singh DK. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J. Nanobiotechnology*. 2011;9:55.
18. Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug Delivery Rev.* 1997;28:5–24.

19. Trapasso E, Cosco D, Celia C, Fresta M, Paolino D. Retinoids: new use by innovative drug-delivery systems. *Expert. Opin. Drug. Deliv.* 2009;6:465–83.
20. Liss C, Fekete MJ, Hasina R, Lingen MW. Retinoic acid modulates the ability of macrophages to participate in the induction of the angiogenic phenotype in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer.* 2002;100:283–9.
21. Darmanin S, Chen J, Zhao S, Cui H, Shirkoohi R, Kubo N, et al. All-trans retinoic acid enhances murine dendritic cell migration to draining lymph nodes via the balance of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *J. Immunol.* 2007;179:4616–25.
22. Limayem Blouza I, Charcosset C, Sfar S, Fessi H. Preparation and characterization of spirinolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. *Int. J. Pharm.* 2006;325:124–31.
23. Ferranti V, Marchais H, Chabenat C, Orecchioni A., Lafont O. Primidone-loaded poly-ε-caprolactone nanocapsules: incorporation efficiency and in vitro release profiles. *Int. J. Pharm.* 1999;193:107–11.
24. Brisaert M., Everaerts I, Plaizier-Vercammen J. Chemical stability of tretinoin in dermatological preparations. *Pharm. Acta. Helv.* 1995;70:161–6.
25. Brisaert M, Gabriëls M, Matthijs V, Plaizier-Vercammen J. Liposomes with tretinoin: a physical and chemical evaluation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001;26:909–17.
26. Ourique AF, Melerio A, Silva C de B da, Schaefer UF, Pohlmann AR, Guterres SS, et al. Improved photostability and reduced skin permeation of tretinoin: Development of a semisolid nanomedicine. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011;79:95–101.
27. Manconi M, Valenti D, Sinico C, Lai F, Loy G, Fadda AM. Niosomes as carriers for tretinoin. II. Influence of vesicular incorporation on tretinoin photostability. *Int. J. Pharm.* 2003;260:261–72.
28. Couvreur P, Barratt G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C. Nanocapsule technology: a review. *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.* 2002;19:99–134.
29. Simon AM, Jagadeeshan S, Abraham E, Akhilandeshwaran A, Pillai JJ, Kumar NA, et al. Poly (D,L-lactic-co-glycolide) nanoparticles for the improved therapeutic efficacy of all-trans-retinoic acid: a study of acute myeloid leukemia (AML) cell differentiation in vitro. *Med. Chem.* 2012;8:805–10.
30. Jeong YI, Kang MK, Sun HS, Kang SS, Kim HW, Moon KS, et al. All-trans-retinoic acid release from core-shell type nanoparticles of poly(epsilon-caprolactone)/poly(ethylene glycol) diblock copolymer. *Int. J. Pharm.* 2004;273:95–107.
31. Tiwari MD, Mehra S, Jadhav S, Bellare JR. All-trans retinoic acid loaded block copolymer nanoparticles efficiently induce cellular differentiation in HL-60 cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011;44:643–52.
32. Merino R, Hurlle JM. The molecular basis of retinoid action in tumors. *Trends. Mol. Med.* 2003;9:509–11.
33. Sun SY, Lotan R. Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2002;41:41–55.
34. Kanchan V, Panda AK. Interactions of antigen-loaded polylactide particles with macrophages and their correlation with the immune response. *Biomaterials.* 2007;28:5344–57.
35. Xia J, Zhang S, Zhang Y, Ma M, Xu K, Tang M, et al. The relationship between internalization of magnetic nanoparticles and changes of cellular optical scatter signal. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2008;8:6310–5.

36. Coester C, Nayyar P, Samuel J. In vitro uptake of gelatin nanoparticles by murine dendritic cells and their intracellular localisation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2006;62:306–14.
37. Taillandier L, Antunes L, Angioi-Duprez KS. Models for neuro-oncological preclinical studies: solid orthotopic and heterotopic grafts of human gliomas into nude mice. *J. Neurosci. Methods.* 2003;125:147–57.
38. Badie B, Schartner JM. Flow cytometric characterization of tumor-associated macrophages in experimental gliomas. *Neurosurgery.* 2000;46:957–61; discussion 961–2.
39. Nickles D, Abschuetz A, Zimmer H, Kees T, Geibig R, Spiess E, et al. End-stage dying glioma cells are engulfed by mouse microglia with a strain-dependent efficacy. *J. Neuroimmunol.* 2008;197:10–20.
40. Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbriin and enhances its actin-bundling activity. *J. Neurochem.* 2004 Feb;88:844–56.
41. Wu Y, Zheng L. Dynamic Education of Macrophages in Different Areas of Human Tumors. *Cancer Microenviron.* 2012;5:195–201.
42. Dou H, Morehead J, Destache CJ, Kingsley JD, Shlyakhtenko L, Zhou Y, et al. Laboratory investigations for the morphologic, pharmacokinetic, and anti-retroviral properties of indinavir nanoparticles in human monocyte-derived macrophages. *Virology.* 2007;358:148–58.
43. Soma CE, Dubernet C, Barratt G, Nemati F, Appel M, Benita S, et al. Ability of doxorubicin-loaded nanoparticles to overcome multidrug resistance of tumor cells after their capture by macrophages. *Pharm. Res.* 1999;16:1710–6.
44. Beer TM, Myrthue A. Calcitriol in cancer treatment: from the lab to the clinic. *Mol. Cancer Ther.* 2004;3:373–81.
45. Woloszynska-Read A, Johnson CS, Trump DL. Vitamin D and cancer: clinical aspects. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011;25:605–15.
46. Lou YR, Molnar F, Perakyla M, Qiao S, Kalueff AV, St-Arnaud R, et al. 25-Hydroxyvitamin D(3) is an agonistic vitamin D receptor ligand. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2010;118:162–70.
47. Townsend K, Evans KN, Campbell MJ, Colston KW, Adams JS, Hewison M. Biological actions of extra-renal 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase and implications for chemoprevention and treatment. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2005;97:103–9.
48. Washington C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. *Int. J. Pharm.* 1990;58:1–12.
49. Calvo P, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *J. Pharm. Sci.* 1996;85:530–6.
50. Teixeira M, Alonso MJ, Pinto MMM, Barbosa CM. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005;59:491–500.
51. Tetko IV, Bruneau P. Application of ALOGPS to predict 1-octanol/water distribution coefficients, logP, and logD, of AstraZeneca in-house database. *J. Pharm. Sci.* 2004;93:3103–10.
52. Diesel B, Radermacher J, Bureik M, Bernhardt R, Seifert M, Reichrath J, et al. Vitamin D(3) metabolism in human glioblastoma multiforme: functionality of CYP27B1 splice variants, metabolism of calcidiol, and effect of calcitriol. *Clin. Cancer Res.* 2005;11:5370–80.

53. Mukhtar RA, Nseyo O, Campbell MJ, Esserman LJ. Tumor-associated macrophages in breast cancer as potential biomarkers for new treatments and diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2011;11:91–100.
54. Colston KW, Hansen CM. Mechanisms implicated in the growth regulatory effects of vitamin D in breast cancer. *Endocr-Relat. Cancer.* 2002;9:45–59.
55. Segersten U, Holm PK, Björklund P, Hessman O, Nordgren H, Binderup L, et al. 25-Hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase expression in breast cancer and use of non-1alpha-hydroxylated vitamin D analogue. *Breast Cancer Res.* 2005;7:R980–986.

Conclusion et Perspectives

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis d'élaborer des nanoparticules polymères capables de cibler les macrophages infiltrant la tumeur et de délivrer au sein de ces derniers une molécule d'intérêt thérapeutique. Ces nanoparticules présentent une ouverture intéressante vers l'application des nouvelles stratégies dans le traitement du cancer.

Lors de cette étude, des nanoparticules de l'acide poly(D,L)lactique avec une taille moyenne de 200 nm ont été développées et leur internalisation par les macrophages a été prouvée. Ces NP présentent *in vitro* une forte internalisation et une persistance au sein des macrophages pendant 7 jours. Les résultats obtenus *in vivo* sur une xéno greffe de gliome humain ont démontré la capacité des nanoparticules, par injection intratumorale, de cibler les macrophages infiltrant la tumeur. L'étude de formulation portant sur l'encapsulation dans des NP de deux catégories de principes actifs d'intérêt, l'acide tout-*trans* rétinolique et les dérivés de la vitamine D₃, a montré que l'encapsulation s'effectuait avec de bons rendements, améliorait significativement la stabilité des principes actifs et présentait un profil de libération prolongée sur plusieurs jours. Cette étude a mis en évidence la capacité des NP de l'acide rétinolique à moduler les fonctions macrophagiques. De plus, nous avons pu montrer que la vectorisation des métabolites actifs de la vitamine D₃ était capable de maintenir leurs activités antiprolifératives pendant 10 jours *in vitro* sur des cellules de cancer du sein MCF-7.

En résumé, le système nanoparticulaire développé est bien adapté pour une administration ciblée de principe actif au niveau des macrophages et pour contrôler les effets de ce principe actif sur les macrophages. Les NP de PLA peuvent donc être exploitées dans le développement d'un traitement anti-tumoral basé sur la modulation des fonctions des macrophages infiltrant la tumeur ou sur l'utilisation de ces dernières pour stocker un principe actif anticancéreux par exemple.

Au terme de cette étude, plusieurs perspectives s'avèrent intéressantes afin de valider la totalité de notre concept. Il est nécessaire d'approfondir le ciblage des TAM par les NP en évaluant la biodistribution des NP après l'injection intratumorale et la durée de vie des NP au sein des TAM *in vivo*. Il serait aussi intéressant de chercher les sous-populations des TAM ciblées par les NP et de tester d'autres modèles tumoraux notamment sur des animaux immunocompétents.

Concernant l'évaluation de l'activité biologique des NP chargées sur les macrophages, l'étude sur un modèle de culture de macrophages activés comme les TAM ou sur un modèle de co-culture de macrophages et de cellules tumorales serait nécessaire afin de mimer l'environnement tumoral et d'intégrer les interactions entre les macrophages et les cellules tumorales. En utilisant ces modèles, un screening *in vitro* des activités immunomodulatrices d'autres principes actifs encapsulés pourra être envisagé.

Par ailleurs, la vectorisation des dérivés de la vitamine D₃ semble une approche prometteuse nécessitant, pour valoriser son intérêt thérapeutique, une validation *in vivo* sur des modèles animaux afin d'évaluer la biodistribution des nanoparticules et l'effet d'une forme vectorisée sur les hypercalcémies secondaires. De plus, du fait des propriétés immunomodulatrices de ces dérivés, il est nécessaire d'étudier leur action sur les TAM afin de comprendre l'ensemble de l'activité anticancéreuse où une réponse immunitaire est impliquée.

Enfin, les deux types de principes actifs encapsulés au cours de cette étude présentent des activités immunosuppressives, dans le cas d'inflammation, il pourrait donc être envisageable d'élargir l'application de notre système nanoparticulaire au traitement de pathologies inflammatoires et auto-immunes dans lesquelles les macrophages ont un rôle primordial.

RESUME

Les macrophages représentent une population de cellules immunes très présente dans certaines tumeurs malignes au sein desquelles ils vont jouer un rôle marqué dans la progression tumorale. Les macrophages représentent donc une cible thérapeutique intéressante dans le traitement de ces tumeurs infiltrées. Ce ciblage des macrophages peut être envisagé grâce à des vecteurs comme les systèmes d'encapsulation nanoparticulaires connus pour être facilement phagocytés par les macrophages après une administration locale ou parentérale. L'objectif de ces travaux de thèse a donc été de développer des nanoparticules polymères (NP) capable de cibler les macrophages infiltrés dans la tumeur et de libérer *in situ* un principe actif encapsulé au sein de ces NP. Les NP pourraient ainsi modifier les fonctions des macrophages ou encore permettre l'utilisation des macrophages comme une réserve d'actif anticancéreux. Après une étude de formulation, des NP à base d'acide poly(D,L)lactique de taille de 200 nm ont été sélectionnées. Ces NP présentent une bonne internalisation par les macrophages *in vitro* et un ciblage spécifique des macrophages infiltrés dans une tumeur de gliome humain, implantée chez des souris nues, suite à une injection intratumorale de NP. Le premier actif modèle encapsulé est l'acide tout-*trans* rétinolique (RA), molécule immuno-modulatrice pouvant modifier les fonctions macrophagiques. Les NP-RA peuvent encapsuler environ 90% d'actif et présentent un profil de libération prolongée du RA pendant 4 jours combiné à une amélioration de sa stabilité. De plus, ces NP-RA ont montré qu'elles pouvaient engendrer *in vitro*, une modification de l'expression de certains gènes des macrophages. Le deuxième type d'actif encapsulé lors de ces travaux est la vitamine D₃ et ses dérivés (25-OH-vitamine D₃ et 1,25-(OH)₂-vitamine D₃) possédant des propriétés anticancéreuses mais à l'origine de nombreux effets secondaires dus à un manque de spécificité d'action. L'objectif serait alors de mieux cibler les cellules tumorales grâce aux macrophages infiltrant ces tumeurs et d'éviter ainsi les hypercalcémies secondaires dues à l'administration de fortes doses de vitamine D₃. Une étude *in vitro* sur une lignée cellulaire de cancer de sein (MCF-7) a permis de montrer l'avantage des NP pour prolonger et intensifier l'action antiproliférative des dérivés de vitamine D₃.

Polymeric nanoparticle development for targeting and modulating macrophage functions

ABSTRACT

Macrophages are the major leukocyte population present in tumors, so-called tumor-associated macrophages (TAM), promoting tumor growth. These macrophages could be an interesting therapeutic target for nanoparticle delivery systems known to be easily recognized and phagocytosed by macrophages after local or parenteral administration. The aim of this work was to develop polymeric nanoparticles (NP) for targeting TAM. NP could modulate macrophage functions or use them as storage of anticancer drugs. After a formulation study, the 200 nm NP of poly(D, L) lactic acid were selected. These NP showed a good internalization by macrophages *in vitro* and specific targeting of TAM in human glioma tumor implanted in nude mice after intratumoral injection of NP. All-*trans* retinoic acid (RA, immuno-modulator) was first encapsulated with an encapsulation efficiency of 90%. RA-NP have a sustained release profile for 4 days and enhance stability of the RA. Changes in gene expression of RA-NP treated macrophages were observed *in vitro*. Secondly, active-metabolites of vitamin D₃ (25-OH-vitamin D₃ and 1,25-(OH)₂-vitamin D₃) were encapsulated for their anticancer properties. The aim was to target the tumor cells via TAM avoiding the hypercalcemia produced by high doses of vitamin D₃. *In vitro* evaluations on breast cancer cell line (MCF-7) highlighted NP advantages to extend and enhance the antiproliferative action of vitamin D₃ derivatives.

DISCIPLINE :

Ingénierie pour le vivant - Pharmacotechnie

MOTS-CLES

Nanoparticules polymères, Macrophages, Tumeur, Rétinoïdes, Vitamine D, Encapsulation, Ciblage

KEY-WORDS

Polymeric nanoparticles, Macrophages, Tumor, Retinoids, Vitamin D, Encapsulation, Targeting, Drug delivery

Laboratoire d'Automatique et de Génie de Procédés (LAGEP) - UMR CNRS 5007

Université Claude Bernard - Lyon1-Bât CPE- 308G, 43 bd. du 11 novembre 1918

69622 VILLEURBANNE CEDEX

