

## RESUME

Le cancer est l'une des maladies les plus mortelles au monde; elle est la première cause de décès dans les pays développés. En 2012, il y a eu 14,1 millions de nouveaux cas de cancer, dont 1,1 million de cancer de la prostate.

Une cinquantaine de chimiothérapies sont disponibles et d'autres sont encore en cours de développement. Cependant, les traitements actuellement utilisés présentent des inconvénients comme de lourds effets secondaires, la distinction entre les différents grades tumoraux, les rechutes, la résistance aux traitements ou encore les phénomènes métastatiques ; ces problèmes ne peuvent être ignorés et représentent un challenge pour les nouvelles thérapies anti-cancéreuses.

Ces dernières années, une attention particulière a été portée aux nanotechnologies de par leur capacité d'interaction avec l'organisme à l'échelle moléculaire. De nouvelles thérapies anti-cancéreuses utilisant des nanotechnologies sont en cours d'étude et/ou de développement pour leur conférer une meilleure spécificité et un ciblage du principe actif vers la zone lésée afin d'obtenir un meilleur index thérapeutique.

Ce travail est une étude pluridisciplinaire. Ainsi, chimie, biologie et pharmacotechnie sont alliées pour concevoir, synthétiser, caractériser et évaluer des nanoparticules métalliques et polymériques afin d'améliorer l'administration des chimiothérapies aux tissus néoplasiques.

Cette thèse est consacrée au développement et à l'évaluation de nanoparticules pour le traitement du cancer. Bien que les nanotransporteurs décrits aient des applications potentielles dans de nombreux types de tumeurs, cette étude est dédiée au traitement du cancer de la prostate mais aussi à l'encapsulation de deux principes actifs, le docétaxel et la mitoxantrone, qui sont des chimiothérapies de première ligne dans le traitement du cancer de la prostate métastatique.

Le docétaxel est un médicament bien connu. Comme le paclitaxel, il s'agit d'un taxoïde d'origine naturelle ; toutefois, le docétaxel est synthétisé à partir d'un précurseur extrait de l'If (*Taxus Baccata*). Il s'agit d'un agent anti-mitotique qui rompt les microtubules rendant la réplication des cellules défailante et induisant la mort cellulaire. Bien que son efficacité ait été prouvée, les effets secondaires associés à la thérapie peuvent être importants. Neutropénie, œdèmes et neuropathie sont des exemples de sérieuses réactions indésirables rencontrées lors de l'administration de docétaxel.

La mitoxantrone est une anthracycline synthétique comme la doxorubicine ou encore l'aclarubicine. Elle a été synthétisée pour la première fois en 1979 et hormis son activité anti-tumorale, elle possède aussi une activité antibiotique, antivirale et immunomodulatrice et est employée dans le traitement de la sclérose en plaques. En comparaison avec le docétaxel, la mitoxantrone agit comme un inhibiteur de la synthèse d'ADN qui interfère avec la progression du cycle cellulaire.

Des effets secondaires ont été signalés chez des patients traités par la mitoxantrone dus à son accumulation dans la thyroïde, le foie et le cœur. La cardiotoxicité associée à l'administration de ce médicament semble être irréversible et dose-dépendante conduisant à une prédisposition et à des défaillances cardiaques. D'autres effets secondaires incluent la stomatite, l'alopecie et la myelosuppression.

L'utilisation de nanoparticules métalliques ou de nanoparticules polymériques biocompatibles et biodégradables (PNPs) pour l'encapsulation de ces molécules est une approche thérapeutique permettant d'éviter les effets secondaires de la chimiothérapie.

Le but de ce travail est de développer un système de délivrance de principes actifs multifonctionnel basé sur des nanoparticules d'or pour le docétaxel et des nanoparticules polymériques de type copolymère à bloc polyéthylène glycol-polyester pour le docétaxel et la mitoxantrone.

Le premier chapitre est une revue de la littérature et qui a été publié dans les *Annales Pharmaceutiques Françaises*. La revue couvre les différentes stratégies de la nanomédecine pour le traitement du cancer de la prostate. Les bases de la délivrance de médicament et de leur ciblage mais aussi les études qui ont été effectuées dans ce domaine sont explorées dans cette publication.

Des cas historiques de cancer de la prostate dans l'antiquité sont présentés, ainsi que les premiers rapports modernes. De plus, les trois principales plateformes de délivrance de médicaments à base de nanoparticules sont décrites; à savoir: les liposomes, les nanoparticules polymères et de nanoparticules métalliques. D'importants travaux publiés, y compris les thérapies dans des essais cliniques en cours sont discutés.

En effet, les médicaments approuvés à base de particules pour la libération contrôlée des anti-hormones sont répertoriés. Il est important de noter que, bien qu'il n'existe pas encore de formulations à base de nanoparticules approuvés pour l'administration de médicaments dans le traitement du cancer de la prostate, l'utilisation de microparticules ou implants de polymère joue un rôle important car ils sont souvent utilisés comme la première option pour la castration hormonale.

Cependant, une analyse critique de l'impact des nanomatériaux sur la santé publique et l'environnement et a été faite pour mettre en évidence la nécessité d'un contrôle précis de l'utilisation des nanomatériaux. Ces risques ne sont pas encore bien établis et doivent être considérés.

L'article mentionné peut être trouvé via le lien ci-dessous:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003450914000534>.

Suivent deux chapitres qui décrivent le travail expérimental qui a été effectué.

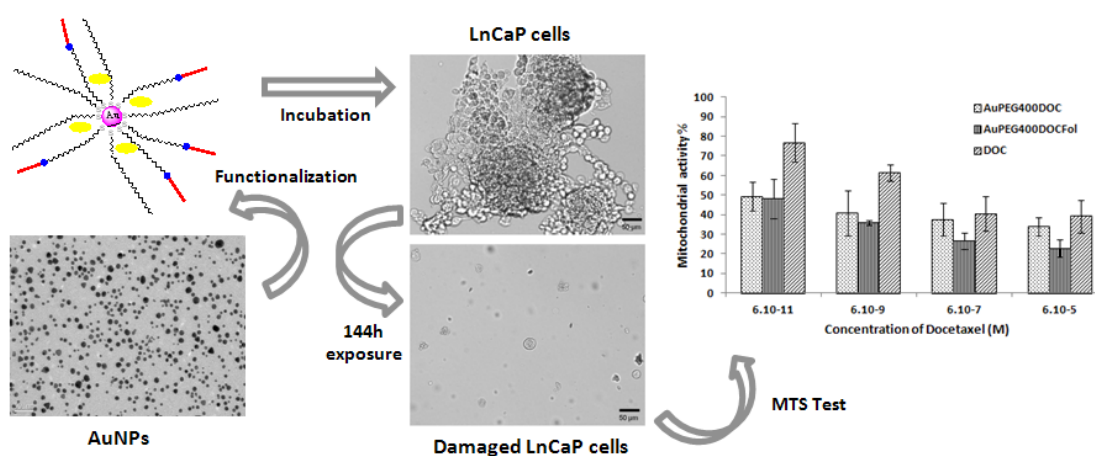
Le second chapitre, une publication dans *International Journal of Pharmaceutics*, intitulé "Synthesis and *in vitro* studies of gold nanoparticles loaded with docetaxel"

publié en mai 2013, concerne la synthèse de nanoparticules d'or (AuNPs) avec et sans acide folique utilisant deux longueurs de PEG, le PEG 550 et le PEG 2000 fabriqués par nos partenaires de l'université de Bordeaux I, suivi de leur caractérisation, leur chargement en docétaxel et l'évaluation de leur effet antinéoplasique sur des cellules de cancer de la prostate effectués dans notre équipe. Le cœur des nanoparticules mesure de 7 à 10 nm avec une polydispersité étroite.

L'étude complète des interactions possibles entre les nanoparticules exprimant de l'acide folique à leur surface et des Folate Binding Proteins (FBP) sont présentées en annexe comme elles ne sont pas présentées dans l'article. Le Docétaxel a ensuite été chargé dans des nanoparticules d'or par adsorption non covalente et les systèmes finaux ont été utilisés directement afin d'évaluer leur cytotoxicité sur des cellules de cancer de la prostate humaines, les LnCaP.

Les AuNPs non chargées n'ont pas montrées de toxicités aux concentrations utilisées dans cette étude. Lorsque le docétaxel est adsorbé sur les AuNPs, il se produit un effet cytotoxique prolongé *in vitro*. Ces petites particules pourraient être utiles pour concentrer la substance active dans les tumeurs grâce à l'effet EPR et le cœur de ces nanoparticules d'or pourrait être utilisé pour de l'imagerie des tumeurs ou encore de la cytolysse thermique de cellules cancéreuses.

Le résumé graphique de l'article mentionné est représenté dans la figure ci-dessous.



L'article mentionné peut être trouvé sur internet à l'adresse suivante :

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517313004341>

De nombreuses recherches sont consacrées au ciblage du docétaxel. Ce taxane est l'un des rares médicaments qui soit efficace chez les patients atteints de cancer de la prostate hormono-résistant. Des combinaisons impliquant le docétaxel ont montré dans les études de phase II une baisse significative des niveaux de l'antigène prostatique spécifique (PSA) par rapport au traitement traditionnel avec le docétaxel. Cependant, la toxicité reste une préoccupation et il existe un besoin de développer des formulations qui peuvent cibler ce principe actif plus spécifiquement vers les cellules cancéreuses.

De nouvelles formes innovantes capables de cibler spécifiquement la tumeur sont nécessaires pour le développement d'un système approprié conférant toutes les caractéristiques exigées par un bon médicament anti-cancer. L'efficacité du

docétaxel couplé aux nanotechnologies pourrait être une stratégie importante pour améliorer les traitements du cancer de la prostate.

#### Prostate Specific Antigen membrane et acide folique

La découverte du PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen) est l'une des découvertes les plus importantes dans l'étude du cancer de la prostate. Le PSMA a une affinité pour l'acide folique et il a été trouvé que sa surexpression donne aux cellules du cancer de la prostate davantage de croissance *in vitro* dans un milieu physiologiquement riche en folate.

Le PSMA peut non seulement être utilisé comme un outil de diagnostic et un moyen de suivre l'efficacité du traitement, mais il fournit également une bonne cible pour les thérapies. En effet, l'efficacité des médicaments peut être largement améliorée par un ciblage spécifique des récepteurs de folate. L'acide folique a été utilisé en tant que ligand pour le ciblage des protéines, sur des liposomes et d'autres molécules. Quand les molécules d'acide folique sont liées de manière covalente aux macromolécules, le conjugué est internalisé par endocytose après liaison au PSMA.

#### Poly (éthylène glycol) (PEG)

La capacité des systèmes de délivrance de médicaments colloïdaux dont les surfaces ont été modifiés par le poly (éthylène glycol) (PEG) à s'accumuler dans les tumeurs solides a été amplement démontrée. Le PEG réduit l'opsonisation de la surface des particules avec les protéines du sang et retarde leur capture par les cellules phagocytaires. Les systèmes de délivrance de médicaments peuvent alors rester dans la circulation et atteindre la tumeur par le «enhanced permeation and retention» effet (EPR), lorsque l'endothélium capillaire tumoral est fenestré et le drainage lymphatique est altéré. La fixation de chaînes de PEG à la surface des nanoparticules à base de polyesters biodégradables a permis à des principes actifs anticancéreux, notamment le docétaxel, d'être délivré à des tumeurs solides.

## Les nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or (AuNPs) sont connues depuis longtemps comme des ensembles d'atomes d'or, d'un diamètre de l'ordre de 1 à 100 nm. Elles ont été utilisées avec des résultats prometteurs en tant que véhicules d'administration de médicaments. Plus récemment, les AuNPs sphériques ont été utilisées pour la thérapie photothermique du cancer par irradiation de la bande de plasmon qui correspond à leur absorption par résonance autour de 530 nm. Un des intérêts majeurs dans l'utilisation AuNPs est leur facile bioconjugaison et biomodification.

En particulier, la forte affinité entre la surface des AuNPs et les ligands de thiolate permettent la conjugaison de surface avec des peptides, des protéines et de l'ADN par la fonction thiol disponible naturellement ou un thiol synthétiquement incorporé comme dans l'ADN simple brin. Par exemple, l'acide folique a été greffé pour le ciblage sélectif des cellules cancéreuses.

Le PEG thiolé rend furtives les AuNPs et les masque du système immunitaire, ce qui permet des temps de circulation sanguin plus longs. Les AuNPs peuvent être greffées avec de multiples fonctionnalités, permettant la fabrication d'un système d'administration de médicaments puissant.

Les objectifs de cette partie de l'étude étaient de formuler des nanoparticules d'or portant le docétaxel et le PEG avec et sans acide folique, de les caractériser et d'évaluer leur activité anticancéreuse *in vitro*.

Le deuxième chapitre présente la première partie du travail expérimental. Un document intitulé "Synthèse et études *in vitro* des nanoparticules d'or chargées de docétaxel " Publication mai 2013 dans *International Journal of Pharmaceutics* décrit et discute de la partie de l'étude consacrée aux nanoparticules d'or en tant que vecteur potentiel de docétaxel pour une application dans le cancer de la prostate.

La synthèse des nanoparticules a été réalisée par nos partenaires à l'Université Bordeaux 1. La caractérisation ultérieure, l'encapsulation et des tests *in vitro* contre des cellules de cancer de la prostate ont été ma contribution personnelle. Des

données supplémentaires sont jointes au présent chapitre présentant les résultats des mesures de résonance de plasmons de surface qui n'ont pas été présentées dans la publication.

Le troisième chapitre décrit la synthèse, la caractérisation et les tests *in vitro* de nanoparticules polymériques biodégradables et biocompatibles pégylées comme système d'administration de deux substances actives anti-cancéreuses : la mitoxantrone et le docétaxel étudié précédemment. Ce chapitre est divisé en deux parties.

La première partie concerne une étude réalisée avec un copolymère commercial, le poly(lactide-co-glycolide)-polyéthylène glycol. Ce copolymère a été formulé en nanoparticules par la méthode de nanoprécipitation à différents ratios de phases organique et aqueuse et de concentration en polymère. Les produits finaux ont été caractérisés par diffusion quasi-élastique de la lumière (DLS) et microscopie électronique à transmission (TEM) et ont montré des nanoparticules sphériques de polydispersité étroite de diamètre allant de 71 nm à 128 nm.

Une fois la méthodologie définie, une série de copolymères diblocs pégylés a été synthétisée. La polycaprolactone, le polylactide et le poly(lactide-co-glycolide) ont été synthétisés par polymérisation par ouverture de cycle à partir du polyéthylène glycol monométhyléther (2000 et 5000 g/mol), jouant le rôle d'amorceur en présence d'étain comme catalyseur. Les copolymères ont été caractérisés par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN  $^1\text{H}$ ) et par chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Les polymères obtenus présentent des masses molaires de 19 000 à 34 000 g/mol et un indice de polydispersité (Pdi) variant de 1,8 à 2,6. Ensuite, la méthode de nanoprécipitation a été appliquée à ces copolymères et ont permis d'obtenir des nanoparticules monodisperse de taille variant de 50 à 80 nm.

La deuxième partie est présentée sous forme d'un manuscrit soumis à Special Journal Issue on *Advances in Nanoscience and Nanotechnology*. Cette publication



concerne l'utilisation du polylactide-co-polyéthylène glycol (PLA-PEG 2000) synthétisé précédemment et son chargement par deux anticancéreux : le docétaxel et la mitoxantrone. Pour la première fois dans la littérature, deux agents anticancéreux ont été encapsulés pour une application concomitante. Les nanoparticules ont été préparées par la méthode de nanoprécipitation ; des nanoparticules monodisperses d'un diamètre d'environ 70 nm ont été obtenues, elles présentent un taux d'encapsulation de 58% en docétaxel et de 6% en mitoxantrone. L'efficacité anti-tumorale de ces nanoparticules sur des lignées de cancer de la prostate PC3 et LnCaP a été évaluée *in vitro* par MTS. L'efficacité de chaque type de nanoparticule a été évaluée séparément mais aussi sous forme de mélange de ces deux types de nanovecteurs à différents ratios afin d'observer des phénomènes de synergie, d'additivité ou encore d'antagonisme. La capture des nanoparticules contenant de la mitoxantrone par les cellules vivantes a été étudiée qualitativement et confirmée par cytométrie en flux.

L'étude de la viabilité cellulaire *in vitro* a montré une efficacité de toutes les combinaisons des nanoparticules chargées avec au moins une réduction de 50% de l'activité cellulaire dans les premières 48h. En outre, un effet synergique a été observé avec deux combinaisons de MITNPs et DOCNPs conduisant à moins de 10% d'activité cellulaire sur la lignée PC3 après 96 h de traitement. Ces résultats indiquent que les nanoparticules de PLA-PEG 2000 développées dans ce travail peuvent être potentiellement utilisées pour améliorer la solubilité du docétaxel et augmenter la concentration intracellulaire en mitoxantrone et par conséquent avoir des applications cliniques potentielles.

A la fin du manuscrit, une discussion générale résume les résultats expérimentaux, les regroupant avec d'autres travaux décrits dans la littérature et soulignant ainsi leurs potentielles applications en thérapie anti-cancéreuse.

Les perspectives indiquent que d'autres études doivent être faites sur les deux systèmes. En ce qui concerne les nanoparticules d'or, la détermination de l'efficacité d'encapsulation doit être déterminée avec plus de précision et le mode de stockage doit être optimisé. Les nanoparticules polymériques doivent être étudiées plus en

détails dans les tests *in vitro* afin de déterminer si l'induction de l'apoptose est associée à la captation de ces particules. Les profils de libération et la pharmacocinétique de deux plateformes d'administration de médicaments doivent être mesurés.