



**HAL**  
open science

# Stratégies d'adressage des nanoparticules à base de dextrane dirigées contre les récepteurs au VEGF

Abed Brighet

► **To cite this version:**

Abed Brighet. Stratégies d'adressage des nanoparticules à base de dextrane dirigées contre les récepteurs au VEGF. Sciences pharmaceutiques. 2010. hal-01739051

**HAL Id: hal-01739051**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01739051v1>**

Submitted on 20 Mar 2018

**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.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1**

**2010**

---

**FACULTE DE PHARMACIE**

**T H E S E**

Présentée et soutenue publiquement

Le 11 Juin 2010

pour obtenir

**le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

par **Abed BRIGHET**  
né le 19 Aout 1983 à Thionville (57)

**STRATEGIES D'ADRESSAGE DES NANOPARTICULES A BASE  
DE DEXTRANE DIRIGÉES CONTRE LES RECEPTEURS AU  
VEGF**

**Membres du Jury**

Président : M. Jean Louis MERLIN, Professeur, UHP-Nancy 1

Juges : Emmanuelle MARIE, Chargée de recherche CNRS, Nancy  
Muriel BARBERI-HEYOB, Chargée de recherche CAV, Nancy  
Béatrice Faivre, Maître de Conférences, UHP-Nancy 1

**UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2009-2010**

**DOYEN**

Francine PAULUS

**Vice-Doyen**

Francine KEDZIEREWICZ

**Président du Conseil de la Pédagogie**

Bertrand RIHN

**Commission de la Recherche**

Christophe GANTZER

**Mobilité ERASMUS et Communication**

Francine KEDZIEREWICZ

**Hygiène Sécurité**

Laurent DIEZ

<b>Responsable de la filière Officine :</b>	Francine PAULUS
<b>Responsables de la filière Industrie :</b>	Isabelle LARTAUD, Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
<b>Responsable du Collège d'Enseignement : Pharmaceutique Hospitalier</b>	Jean-Michel SIMON

**DOYEN HONORAIRE**

Chantal FINANCE  
Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON  
Marie-Madeleine GALTEAU  
Gérard SIEST  
Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Roger BONALY  
Thérèse GIRARD  
Maurice HOFFMANN  
Michel JACQUE  
Lucien LALLOZ  
Pierre LECTARD  
Vincent LOPPINET  
Marcel MIRJOLET  
François MORTIER  
Maurice PIERFITTE  
Janine SCHWARTZBROD  
Louis SCHWARTZBROD

**MAITRES DE CONFERENCES  
HONORAIRES**

Monique ALBERT  
Gérald CATAU  
Jocelyne COLLOMB  
Bernard DANGIEN  
Marie-Claude FUZELLIER  
Françoise HINZELIN  
Marie-Andrée IMBS  
Marie-Hélène LIVERTOUX  
Jean-Louis MONAL  
Dominique NOTTER  
Marie-France POCHON  
Anne ROVEL  
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

**ASSISTANT HONORAIRE**

Marie-Catherine BERTHE  
Annie PAVIS

## ENSEIGNANTS

### PROFESSEURS

Gilles AULAGNER .....	Pharmacie clinique
Alain BAGREL.....	Biochimie
Jean-Claude BLOCK .....	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON .....	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE.....	Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL .....	Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Christophe GANTZER .....	Microbiologie environnementale
Max HENRY .....	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU.....	Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE.....	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD .....	Pharmacologie cardiovasculaire
Dominique LAURAIN-MATTAR.....	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER .....	Biochimie
Pierre LEROY .....	Chimie physique générale
Philippe MAINCENT .....	Pharmacie galénique
Alain MARSURA .....	Chimie thérapeutique
Patrick MENU .....	Physiologie
Jean-Louis MERLIN .....	Biologie cellulaire oncologique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS .....	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN .....	Biochimie, Biologie moléculaire
Jean-Michel SIMON .....	Economie de la santé, législation pharmaceutique

### MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS .....	Parasitologie
Mariette BEAUD .....	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT .....	Communication et santé
Isabelle BERTRAND.....	Microbiologie environnementale
Michel BOISBRUN .....	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX .....	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER.....	Chimie Physique
Cédric BOURA .....	Physiologie
Jean-Claude CHEVIN .....	Chimie générale et minérale
Igor CLAROT .....	Chimie analytique
Joël COULON.....	Biochimie
Sébastien DADE .....	Bio-informatique
Dominique DECOLIN .....	Chimie analytique
Béatrice DEMORE .....	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU .....	Biophysique, audioprothèse, acoustique
Florence DUMARCAY .....	Chimie thérapeutique
François DUPUIS .....	Pharmacologie
Raphaël DUVAL .....	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE .....	Hématologie - Génie Biologique
Adel FAIZ .....	Biophysique-acoustique
Luc FERRARI .....	Toxicologie
Stéphane GIBAUD .....	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT .....	Chimie organique
Frédéric JORAND .....	Santé et environnement

**FACULTE DE PHARMACIE****PRESENTATION**

Olivier JOUBERT .....	Toxicologie, sécurité sanitaire
Francine KEDZIEREWICZ .....	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT .....	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI.....	Hématologie biologique
Christophe MERLIN .....	Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU .....	Pharmacognosie
Maxime MOURER .....	Pharmacochimie supramoléculaire
Francine PAULUS .....	Informatique
Christine PERDICAKIS .....	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO .....	Pharmacologie
Virginie PICHON .....	Biophysique
Anne SAPIN .....	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER .....	Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY .....	Santé publique
Gabriel TROCKLE .....	Pharmacologie
Marie-Noëlle VAULTIER.....	Biodiversité végétale et fongique
Mohamed ZAIYOU .....	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI .....	Pharmacie galénique

**PROFESSEUR ASSOCIE**

Anne MAHEUT-BOSSER .....

Sémiologie
------------

**PROFESSEUR AGREGE**

Christophe COCHAUD .....

Anglais
---------

**Bibliothèque Universitaire Santé - Lionnois  
(Pharmacie - Odontologie)**

Anne-Pascale PARRET .....

Directeur
-----------

## SERMENT DES APOTHICAIRES



**Je** jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

**D'** honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

**D'** exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**De** ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

**Que** les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

**Que** je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

# REMERCIEMENTS

*Je tiens d'abord à témoigner ma reconnaissance à mon Directeur de Thèse, Monsieur Jean Louis MERLIN, Professeur de Biologie cellulaire oncologique, pour l'aide compétente qu'il m'a apportée, pour sa patience et son encouragement à finir ce travail. J'ai particulièrement apprécié son écoute attentive et ses conseils avisés.*

*Je remercie également Madame Emmanuelle MARIE, chargée de recherche CNRS au LCPM, de m'avoir fait confiance et accueilli dans son laboratoire, et également de m'avoir encadré et d'avoir rendu mon travail de fin d'études à l'ENSIC si passionnant.*

*Je remercie vivement Monsieur le Docteur Régis VANDERESSE, chargé de recherche CNRS au LCPM, pour les explications pertinentes concernant la synthèse des peptides.*

*J'adresse aussi mes remerciements à Madame le Docteur Muriel BARBERI-HEYOB et Madame Béatrice FAIVRE, de m'avoir fait l'honneur d'être les membres de ce jury.*

*Je tiens à remercier sincèrement l'ensemble du corps enseignant de la faculté de pharmacie ainsi de l'ENSIC, pour la qualité de la formation que j'ai reçue dans ces deux établissements.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à mes confrères Arnaud, Pierre, Yacine et Yassine que j'ai côtoyés durant mon aventure à l'ENSIC.*

*A mes parents,*

*Pour m'avoir permis d'être ce que je suis et m'avoir donné la liberté nécessaire à mon épanouissement. Que cette thèse témoigne de mon respect et de mon amour.*

*A mes frères et sœurs,*

*Pour être toujours présents à mes côtés.*

*A mes amis,*

*Pour leur présence à mes côtés quand cela est nécessaire.*

*Sans oublier les personnes qui de loin ou de près ont participé au bon déroulement de ce travail.*

# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS .....	1
SOMMAIRE.....	11
LISTE DES FIGURES .....	15
LISTE DES TABLEAUX .....	17
LISTE DES ABREVIATIONS .....	18
INTRODUCTION GENERALE .....	21
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	24
CHAPITRE I :.....	25
LES FACTEURS DE CROISSANCE ENDOTHELIAL VASCULAIRE (VEGF) ET LEURS RECEPTEURS : NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES ANTICANCEREUSES .....	25
I) LE PROCESSUS DE LA NEOVASCULARISATION DANS LE DEVELOPPEMENT TUMORAL... 26	26
1. PROCESSUS DE CANCERISATION.....	26
2. LES VAISSEAUX SANGUINS.....	29
2.1) GENERALITES .....	29
2.2) HISTOLOGIE.....	30
3. LES DIFFERENTS PROCESSUS DE FORMATION DES NEOVAISSEAUX.....	31
3.1) LA VASCULOGENESE .....	31
3.2) L'ANGIOGENESE.....	32
4. L'ANGIOGENESE TUMORALE.....	32
4.1) PROCESSUS DE L'ANGIOGENESE TUMORALE.....	33
4.1.1) <i>La phase avasculaire</i> .....	33
4.1.2) <i>La phase angiogénique</i> .....	33
5. INDUCTEURS ET INHIBITEURS NATURELS DE L'ANGIOGENESE.....	38
5.1) FACTEURS PRO-ANGIOGENIQUES .....	38
5.2) FACTEURS ANTI-ANGIOGENIQUES.....	40
II) LE FACTEUR DE CROISSANCE ENDOTHELIAL VASCULAIRE (VEGF).....	42
1. LE VEGF (OU VEGF-A) .....	42
1.1) ROLE .....	42
1.2) REGULATION DE L'EXPRESSION DU VEGF .....	43
1.2.1) <i>Régulation par l'hypoxie</i> .....	43
1.2.2) <i>Régulation par des facteurs de croissance, cytokines et hormones</i> .....	45
1.3) STRUCTURE ET ISOFORMES DU VEGF .....	45
2. LES AUTRES MEMBRES DE LA FAMILLE DU VEGF .....	46
2.1) LE FACTEUR DE CROISSANCE PLACENTAIRE (PLGF).....	47
2.2) LE VEGF-B .....	47
2.3) LE VEGF-C ET LE VEGF-D.....	47
2.4) LE VEGF-E.....	47
2.5) LE VEGF-F.....	48

<b>III) LES RECEPTEURS AU VEGF.....</b>	<b>48</b>
<b>1. LES RECEPTEURS A ACTIVITE TYROSINE KINASE.....</b>	<b>48</b>
1.1) CARACTERISTIQUES COMMUNES DES RECEPTEURS A ACTIVITE TYROSINE KINASE .....	48
1.2) LE RECEPTEUR AU VEGF DE TYPE 1.....	49
1.3) LE RECEPTEUR AU VEGF DE TYPE 2.....	49
1.4) LE RECEPTEUR AU VEGF DE TYPE 3.....	50
<b>2. LES NEUROPILINES.....</b>	<b>51</b>
2.1) STRUCTURE DES NEUROPILINES.....	51
2.2) LIGANDS DES NEUROPILINES .....	51
2.3) EXPRESSION DES NEUROPILINES .....	51
2.4) EFFETS MEDIÉS PAR LES NEUROPILINES.....	52
2.4.1) <i>Développement embryonnaire</i> .....	52
2.4.2) <i>L'angiogenèse tumorale et le processus métastatique</i> .....	52
<b>VI) THERAPIE ANTI-ANGIOGENIQUE ET THERAPIE ANTI-NEOVASCULAIRE .....</b>	<b>55</b>
<b>1. THERAPIE ANTI-ANGIOGENIQUE .....</b>	<b>55</b>
1.1) LES AVANTAGES DE LA THERAPIE ANTI-ANGIOGENIQUE .....	55
1.2) DIFFERENTES STRATEGIES DE LA THERAPIE ANTI-ANGIOGENIQUE.....	56
<b>2. THERAPIE ANTI-NEOVASCULAIRE.....</b>	<b>60</b>
2.1) LE CIBLAGE VASCULAIRE .....	60
2.2) LA THERAPIE METRONOMIQUE .....	63
2.3) LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE .....	64
2.3.1) <i>Principe</i> .....	64
2.3.2) <i>Application</i> .....	65
2.3.3) <i>Conception de nouveaux PS ciblant les cellules endothéliales</i> .....	66
<b>CHAPITRE II : .....</b>	<b>72</b>
<b>LA VECTORISATION PAR LES NANOPARTICULES : UN NOUVEAU MOYEN DE THERAPIE CIBLEE ANTI-VASCULAIRE .....</b>	<b>72</b>
<b>I) LA VECTORISATION DE MEDICAMENT .....</b>	<b>73</b>
<b>1. DEFINITION DE LA VECTORISATION.....</b>	<b>73</b>
<b>2. GENERATION DE VECTEURS DE MEDICAMENTS .....</b>	<b>73</b>
2.1) VECTEUR DE PREMIERE GENERATION : LES VECTEURS HEPATO-SPLENIQUE .....	73
2.1.1) <i>Les liposomes</i> .....	74
2.1.2) <i>Les nanosphères</i> .....	74
2.1.3) <i>Les nanocapsules</i> .....	75
2.2) VECTEURS DE 2EME GENERATION : LES VECTEURS « FURTIFS » .....	75
2.3) VECTEURS DE 3EME GENERATION : LES VECTEURS A RECONNAISSANCE MOLECULAIRE.....	76
<b>3) EXEMPLES DE VECTEURS UTILISES EN CLINIQUE .....</b>	<b>77</b>
<b>4. AVANTAGES DE LA VECTORISATION DE MEDICAMENTS.....</b>	<b>78</b>
<b>5. ELEMENTS CONSTITUTIFS DES VECTEURS (POLYMERES).....</b>	<b>79</b>
5.1) LES CARACTERISTIQUES REQUISES D'ELEMENTS CONSTITUTIFS DES VECTEURS .....	79
5.2) CLASSIFICATION DES POLYMERES .....	79
5.2.1) <i>D'origine naturelle</i> .....	80
5.2.2) <i>Polymères synthétiques</i> .....	80
<b>II) METHODES DE PREPARATION DE NANOPARTICULES.....</b>	<b>80</b>

<b>1. PREPARATION DE NANOPARTICULES PAR POLYMERISATION DE MONOMERES .....</b>	<b>81</b>
<b>2. PREPARATION DE NANOPARTICULES A PARTIR DE POLYMERES PREFORMES .....</b>	<b>82</b>
2.1) EMULSION/EVAPORATION DE SOLVANT.....	82
2.2) FLUIDE SUPERCRITIQUE.....	84
2.3) SALTING OUT.....	84
2.4) NANOPRECIPITATION.....	86
<b>III) PROCEDES D'HYDROPHILISATION DE SURFACE .....</b>	<b>87</b>
<b>1. FIXATION CHIMIQUE DU POLYMERE HYDROPHILE .....</b>	<b>88</b>
<b>2. ADSORPTION PHYSIQUE DE POLYMERES AMPHIPHILES .....</b>	<b>89</b>
<b>IV) DEXTRANE .....</b>	<b>91</b>
<b>1. SYNTHESE DU DEXTRANE .....</b>	<b>91</b>
<b>2. METABOLISME .....</b>	<b>92</b>
<b>3. CARACTERISTIQUE PHYSICO-CHIMIQUE.....</b>	<b>92</b>
3.1) STRUCTURE CHIMIQUE .....	92
3.2) SPECTRE RMN .....	93
3.3) AUTRES PROPRIETES DES DERIVES DU DEXTRANE .....	94
<b>4. APPLICATION.....</b>	<b>95</b>
<b>5. MODIFICATION CHIMIQUE DU DEXTRANE.....</b>	<b>95</b>
<b>V) CONCLUSION .....</b>	<b>96</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>98</b>
<b>ADRESSAGE DE NANOPARTICULES PAR UN HEPTAPEPTIDE « ATWLPPR » LIGAND DE NRP-1 : STRATEGIE ANTI-VASCULAIRE.....</b>	<b>99</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>100</b>
<b>I) MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>101</b>
<b>1. SYNTHESE DU PEPTIDE « ATWLPPR ».....</b>	<b>101</b>
1.1) PRINCIPE DE LA SYNTHESE PEPTIDIQUE .....	101
1.2) SYNTHESE DU PEPTIDE « ATWLPPR » SUR PHASE SOLIDE .....	102
1.3) PURIFICATION .....	105
1.4) ANALYSES .....	105
1.4.1) Analyse par Chromatographie Liquide (HPLC).....	105
1.4.2) Analyse par spectrométrie de masse .....	106
1.4.3) Analyse par résonance Magnétique Nucléaire .....	106
<b>2. MODIFICATION DU DEXTRANE .....</b>	<b>107</b>
2.1) PRINCIPE .....	107
2.2) PROTOCOLES .....	108
2.2.1) Protocole 1.....	108
2.2.2) Protocole 2.....	109
2.3) ANALYSE.....	110
2.4) TAUX DE SUBSTITUTION .....	110
<b>3. SYNTHESE DE NANOPARTICULES.....</b>	<b>111</b>
3.1) PROTOCOLE DE FABRICATION DES NANOPARTICULES.....	111
3.2) INFLUENCE DU TYPE DE POLYMERE ET DE LA CONCENTRATION EN DEXTRANE MODIFIE.....	113

3.3) INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN PLA DANS LA PHASE ORGANIQUE .....	114
<b>II) RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>115</b>
<b>1. SYNTHÈSE, PURIFICATIONS ET IDENTIFICATION CHIMIQUE DU PEPTIDE « ATWLPPR »</b> .....	<b>115</b>
<b>2. MODIFICATION CHIMIQUE DU DEXTRANE.....</b>	<b>116</b>
2.1) IDENTIFICATION PAR RMN <sup>1</sup> H.....	116
2.2) CALCUL DU TAUX DE SUBSTITUTION .....	118
<b>3. SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES.....</b>	<b>121</b>
3.1) INFLUENCE DU TYPE DE POLYMER ET DU TYPE ET DE LA CONCENTRATION EN DEXTRANE MODIFIÉ.....	121
3.1.1) <i>Etude de l'influence du type de polymère et de la concentration en dextrane modifié</i> .....	122
3.1.2) <i>Etude de l'influence du type de dextrane modifié avec une concentration fixée à 2,5 g/L</i> .....	125
3.2) INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN PLA DANS LA PHASE ORGANIQUE .....	126
3.3) CONCLUSION .....	128
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>130</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>132</b>

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. LES 6 CONCEPTS DE HANAHAN ET WEINBERG <sup>(2)</sup> .....	28
FIGURE 2. LES VOIES DE SIGNALISATION CELLULAIRE <sup>(2)</sup> .....	28
FIGURE 3. ULTRASTRUCTURE D'UN CAPILLAIRE ARTERIO-VEINEUX <sup>(5)</sup> .....	31
FIGURE 4 . STRUCTURE DES INTEGRINES.....	35
FIGURE 5. PROCESSUS DE L'ANGIOGENESE (ADAPTE D'APRES <sup>(17)</sup> ).....	36
FIGURE 6. RESEAU VASCULAIRE A L'ETAT NORMAL ET A L'ETAT TUMORAL <sup>(18)</sup> .....	37
FIGURE 7. LE SWITCH ANGIOGENIQUE.....	41
FIGURE 8. HYPOXIE ET L'ANGIOGENESE. ....	43
FIGURE 9. REGULATION DE L'EXPRESSION DU VEGF PAR HYPOXIE.....	44
FIGURE 10. REPRESENTATION EN HELICE A ET FEUILLET B DU VEGF MONOMERE (A) ET DIMERE (B) ..	46
FIGURE 11. LE VEGF ET SES RECEPTEURS <sup>(106)</sup> .....	54
FIGURE 12. LA VOIE VEGF. ....	58
FIGURE 13. COMPARAISON DU PROTOCOLE DE CHIMIOTHERAPIE TRADITIONNEL AVEC LE PROTOCOLE METRONOMIQUE, EN COMBINAISON OU NON AVEC D'AUTRES MOLECULES <sup>(151)</sup> .....	64
FIGURE 14. LIAISON DU PS (TPC) ET DU PS CONJUGUEE (TPC-AHX-ATWLPPR) AU CO-RECEPTEUR NRP-1 <sup>(159)</sup> .....	67
FIGURE 15. COUPE TRANSVERSALE D'UNE TUMEUR CEREBRALE PORTEE PAR UNE SOURIS <i>NUDE</i> <sup>(161)</sup> ..	68
FIGURE 16. SUIVI DE FLUX SANGUIN MICROVASCULAIRE PENDANT PDT. (A) AVEC UN PS CONJUGUE, (B) AVEC UN PS LIBRE <sup>(159)</sup> .....	69
FIGURE 17. STRUCTURE CHIMIQUE DU PEPTIDE ATWLPPR ET DU PSEUDOPEPTIDE AΨ[CH <sub>2</sub> NH]TWLPPR <sup>(164)</sup> .....	70
FIGURE 18. GENERATION DE VECTEURS DE MEDICAMENTS.....	77
FIGURE 19. PREPARATION DES NANOPARTICULES SELON LA METHODE D'EMULSION / EVAPORATION DE SOLVANT. ....	83
FIGURE 20. PREPARATION DES NANOPARTICULES SELON LA METHODE DE SALTING OUT.....	85
FIGURE 21. PREPARATION DES NANOPARTICULES SELON LA METHODE DE NANOPRECIPITATION.....	87
FIGURE 22. CONFORMATIONS DU POLYMERE AMPHIPHILE EN FONCTION DU MODE D'ADSORPTION. ..	88
FIGURE 23. STRUCTURE CHIMIQUE DU DEXTRANE.....	93
FIGURE 24. SPECTRE RMN <sup>1</sup> H DU DEXTRANE T 40 DANS LE DMSO. ....	93
FIGURE 25. LE SYNTHETISEUR INTAVIS AG, BIOANALYTICAL INSTRUMENT. ....	103
FIGURE 26. SCHEMA DES ETAPES DE LA SYNTHESE PEPTIDIQUE EN PHASE SOLIDE <sup>(212)</sup> .....	104
FIGURE 27. HPLC SERVANT A ANALYSER ATWLPPR. ....	106
FIGURE 28. SCHEMA DE SYNTHESE .....	107
FIGURE 29. LYOPHILISATEUR LABACONCO. ....	108
FIGURE 30. TITRATEUR METROHM 716 DMS-TITRINO. ....	111

FIGURE 31. SCHEMA DE PREPARATION DES NANOPARTICULES SUIVANT LE PROTOCOLE PAR EMULSION DIRECTE. ....	112
FIGURE 32. SCHEMA DE SYNTHESE (DEXC <sub>6</sub> ET DEXC <sub>10</sub> ). ....	113
FIGURE 33. PROFILS CHROMATOGRAPHIQUES DE ATWLPPR AVEC DETECTION PAR ABSORBANCE A 214 NM ENSUITE A 280 NM. ....	115
FIGURE 34. SPECTRES RMN <sup>1</sup> H DES PRODUITS OBTENUS SELON LE PROTOCOLE 1-A ET 1-B DANS LE DMSO. ....	117
FIGURE 35. SPECTRES RMN <sup>1</sup> H DU DEXTRANE MODIFIE OBTENU SELON LE PROTOCOLE 1-C DANS LE DMSO. ....	118
FIGURE 36. COURBES DE TITRAGE ACIDO-BASIQUE DES PRODUITS OBTENUS AVEC LE PROTOCOLE 1. ....	120

## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTS VAISSEAUX SANGUINS CHEZ L'HOMME. ....	29
TABLEAU 2. LES PRINCIPAUX FACTEURS PRO-ANGIOGENIQUES ( <sup>(20)</sup> <sup>(21)</sup> <sup>(9)</sup> ). ....	39
TABLEAU 3. LES PRINCIPAUX FACTEURS ANTI-ANGIOGENIQUES <sup>(9)</sup> . ....	41
TABLEAU 4. PRINCIPAUX ACTEURS REGULANT L'EXPRESSION DU VEGF. ....	45
TABLEAU 5. AFFINITE DES MEMBRES DE LA FAMILLE DU VEGF POUR LES RECEPTEURS DE CETTE FAMILLE <sup>(106)</sup> . ....	54
TABLEAU 6. INHIBITEURS ANGIOGENIQUES ET LEURS CIBLES (ADAPTE D'APRES <sup>(121)</sup> <sup>(122)</sup> ). ....	59
TABLEAU 7. PRINCIPAUX PEPTIDES CIBLANT LES RECEPTEURS AU VEGF <sup>(146)</sup> . ....	62
TABLEAU 8. PRINCIPAUX PHOTOSENSIBILISATEURS AYANT UNE AMM <sup>(156)</sup> . ....	66
TABLEAU 9. RECAPITULATIF DES DEUX PROTOCOLES UTILISES POUR MODIFIER LE DEXTRANE. ....	110
TABLEAU 10. INFLUENCE DE LA QUANTITE D'EPOXYDE SUR LE TAUX DE SUBSTITUTION DU DEXTRANE. ....	114
TABLEAU 11. DEPLACEMENTS CHIMIQUES DES PROTONS DE ATWLPPR DANS LE DMSO DEUTERE (PPM). ....	116
TABLEAU 12. RECAPITULATIF DES RESULTATS OBTENUS AVEC LE PROTOCOLE 1. ....	121
TABLEAU 13. DIAMETRE MOYEN DE NANOPARTICULES OBTENUES SELON LE PROTOCOLE PAR EMULSION DIRECTE EN FONCTION DU TYPE DE POLYMERE ET DE LA CONCENTRATION EN DEXTRANE MODIFIE. ....	122
TABLEAU 14. PLAN FACTORIEL AVEC LES DEUX FACTEURS ETUDIES (CONCENTRATION EN DEXC6 ET TYPE DU POLYMERE). ....	123
TABLEAU 15. ANALYSE DE LA VARIANCE DU PLAN FACTORIEL A DEUX FACTEURS (CONCENTRATION EN DEXC6 ET TYPE DU POLYMERE). ....	125
TABLEAU 16. PLAN FACTORIEL AVEC LES DEUX FACTEURS ETUDIES (TYPE DE DEX ET LA NATURE DU POLYMERE). ....	125
TABLEAU 17. ANALYSE DE LA VARIANCE DU PLAN FACTORIEL A DEUX FACTEURS (TYPE DE DEX ET LA NATURE DU POLYMERE). ....	126
TABLEAU 18. DIAMETRE MOYEN DE NANOPARTICULES OBTENUES SELON LE PROTOCOLE PAR EMULSION DIRECTE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PLA. ....	127
TABLEAU 19. PLAN FACTORIEL AVEC LES DEUX FACTEURS ETUDIES (CONCENTRATION EN DEXC10 ET LA CONCENTRATION EN PLA). ....	127
TABLEAU 20. ANALYSE DE LA VARIANCE DU PLAN FACTORIEL A DEUX FACTEURS (CONCENTRATION EN DEXC10 ET CONCENTRATION EN PLA). ....	128

## LISTE DES ABREVIATIONS

A: alanine (Ala)  
Akt/PKB: protéine kinase  
ARNm: acide ribonucléique messenger  
Boc : tertio-butyloxycarbonyle  
C: cystéine (cys)  
CML: cellule musculaire lisse  
D: acide aspartique (asp)  
DCC: dicyclohexylcarbodiimide  
DIEA: diisopropyl-éthyl-amine  
DMAP: 4-diméthylaminopyridine  
DMF: diméthylformamide  
DMLA: dégénérescence maculaire liée à l'âge  
DMSO: diméthylsulfoxyde  
E: acide glutamique (glu)  
EGF : epidermal growth factor  
eNOS : nitric oxide synthase  
FGFa et b : fibroblast growth factors acide et basique (Facteurs de croissance fibroblastiques)  
FGFR : récepteur au FGF  
Fmoc: N-(9-fluorényl-méthoxycarbonyle)  
FSC: fluide supercritique  
G: glycine (gly)  
G-CSF: granulocyte colony-stimulating factor  
GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor  
H: histidine (his)  
HGF/SF: hepatocyte growth factor/ scatter factor  
HIF-1: hypoxia inducible factor-1  
HOBt: hydroxybenzotriazole  
HUVEC: human umbilical vein endothelial cell  
I: isoleucine (ile)  
ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1  
IGF-1: insulin-like growth factor-1  
IL: interleukine  
IP3: inositol(1,4,5)-triphosphate  
K: lysine (lys)  
 $K_d$  : constante de dissociation  
KDR: kinase insert domain-containing receptor  
L : leucine (Leu)  
LCPM : laboratoire de chimie physique macromoléculaire

M: méthionine (met)  
MALDI-TOF: matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight  
MEC: matrice extracellulaire  
MMP-2 et MMP-9: métalloprotéases  
MO: moelle osseuse  
N: asparagine (asn)  
NO: oxyde nitrique  
NRP-1 et 2: neuropiline-1 et-2  
P: proline (Pro)  
PACA: poly alkyl cyanoacrylate  
PAI : plasminogen activator inhibitor  
PD-ECGF/TP: platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase  
PDGF: platelet derived growth factor  
PDT: thérapie photodynamique  
PGA: poly (acide glycolique)  
PIP3: phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate  
PLA: acide polylactide  
PCL: poly (DL-lactide-co-caprolactone)  
PLGA: poly(lactic-co-glycolic acid)  
PIGF: placental growth factor  
PMMA: poly (méthyl méthacrylate)  
PS : photosensibilisateur  
Q: glutamine (gln)  
R: arginine (Arg)  
RBC: red blood cells  
RMN : résonance magnétique nucléaire  
S: sérine (ser)  
SEMA: sémaphorine  
SPM: système des phagocytes mononucléés  
T: thréonine (Thr)  
TBTU: trifluoroborate de 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium  
TFA: acide trifluoroacétique  
TGF  $\alpha$  et  $\beta$ : transforming growth factor  $\alpha$  et  $\beta$   
TIMP: tissue inhibitor of métalloprotéinases  
TK: tyrosine kinase  
tPA: activateur tissulaire du plasminogène  
uPA: activateur du plasminogène de type urokinase  
V: valine (val)  
VCAM-1: vascular cell adhesion molecule  
VEGF: vascular endothelial growth factor  
VEGFR-1, 2 et 3: récepteurs au VEGF de type 1, 2 et 3  
VPF: vascular permeability factor  
W: tryptophane (Trp)  
Y: tyrosine (tyr)

$\alpha_v\beta_3, \alpha_5\beta_1$ : intégrines

# INTRODUCTION GENERALE

La croissance des tumeurs nécessite l'approvisionnement en nutriment et en oxygène et également l'élimination des métabolites toxiques qu'elles produisent. Au-delà d'une certaine taille des tumeurs, le phénomène de diffusion de l'oxygène devient insuffisant. Pour assurer leur survie, les tumeurs vont développer leurs propres réseaux vasculaires. En effet, l'hypoxie intratumorale induite par la forte prolifération des cellules cancéreuses semble être le principal initiateur de l'angiogénèse. Elle peut induire la sur-expression de gènes angiogéniques, et par voie de conséquence la sécrétion de facteur de croissance. Le VEGF est le chef de file de ces facteurs. Le nouveau réseau vasculaire est formé après une cascade de signaux intracellulaires suite à la liaison du VEGF à ses récepteurs bordant les cellules endothéliales.

La connaissance du processus de l'angiogénèse offre une voie thérapeutique anticancéreuse innovante. En effet, cette nouvelle piste consiste à inhiber le processus d'angiogénèse (thérapie anti-angiogénique) ou à détruire les vaisseaux nouvellement formés (thérapie anti-néovasculaire), afin d'asphyxier la tumeur et de la faire régresser.

Les principes actifs à l'occurrence les anticancéreux administrés par voie intraveineuse sont véhiculés par la circulation sanguine et se répartissent dans tout l'organisme. Leurs interactions avec certains tissus ou cellules dépendent de leurs caractéristiques physicochimiques (hydrophobie, masse molaire, etc.) ainsi que de leur aptitude à franchir les barrières biologiques. Leur devenir dans l'organisme vivant est fonction du métabolisme. En effet, certaines substances actives sont facilement éliminées par l'organisme, par des mécanismes chimiques ou enzymatiques. Seule une petite fraction atteindra la cellule ou le tissu ciblé. Or, pour que l'action thérapeutique soit préservée, une administration répétée s'impose et ceci au dépend du confort du patient. Le recours à ce type d'administration est généralement entaché par les effets secondaires.

Afin d'augmenter la biodisponibilité et de réduire les effets secondaires de certains principes actifs toxiques, une nouvelle stratégie thérapeutique a été développée, il s'agit des vecteurs. Ces systèmes particuliers peuvent assurer la vectorisation des principes actifs et offrent la possibilité de les acheminer de manière spécifique vers leurs sites actifs. Cette spécificité est rendue possible grâce à des ligands (peptide, anticorps, etc.). De plus, la dégradation *in vivo* des nanoparticules, permet d'assurer une libération contrôlée ou prolongée

des principes actifs. Le type de libération dépend des caractéristiques physicochimiques des éléments constitutifs de ces systèmes particuliers.

Paul Ehrlich qui est considéré comme le père de la chimiothérapie, rêvait d'une « Magic bullet » capable d'acheminer le principe actif de manière spécifique vers son site actif. Il a fallu attendre les années 70 pour que le concept de la vectorisation soit réellement mis en application avec les liposomes. Depuis plusieurs travaux ont été réalisés dans ce domaine et avaient pour conséquence d'élargir le champ de vecteurs à d'autres systèmes.

Ces nanoparticules destinées à une administration intraveineuse, doivent respecter quelques critères. Effectivement, ces systèmes doivent présenter un diamètre relativement faible pour éviter le problème d'embolie, et la surface externe ne doit pas être hydrophobe. En effet, le caractère hydrophobe favorise la capture des nanoparticules par le système des phagocytes mononucléés, ce qui a pour conséquence une limitation de la biodisponibilité. C'est pourquoi durant ces dernières années, de nombreuses études se sont focalisées sur l'hydrophilisation de la surface des nanoparticules. Les polysaccharides sont beaucoup utilisés dans ce domaine car ils ont l'avantage d'être hydrophile et biocompatible.

Le laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire a développé depuis une quinzaine d'années la synthèse de dérivés amphiphiles du dextrane. Ces composés sont obtenus par greffage de motifs hydrophobes sur la chaîne polysaccharidique. Les différents modes opératoires mis au point permettent de contrôler parfaitement la nature (linéaire, aromatique) et le nombre de greffons introduits.

Ce travail de thèse s'inscrit dans cette stratégie, et a pour but l'exploitation des possibilités d'adressage offertes par le concept de nanoparticules recouvertes de dextrane pour des applications anticancéreuses. En effet, le but est de développer des nanoparticules, capables d'acheminer le principe actif vers son site actif de manière spécifique dans le traitement des cancers, par la stratégie anti-vasculaire. Plusieurs travaux ont identifié des molécules capables de se fixer sur les récepteurs aux facteurs de croissance endothéliale vasculaire (VEGF). Nous avons choisi comme molécule ciblante le peptide « ATWLPPR », avant d'étudier les modalités du greffage de ce dernier sur le dextrane.

Ce rapport comprend dans une première partie, une synthèse bibliographique comportant deux chapitres. Le premier est consacré au processus de néovascularisation dans le développement tumoral ainsi qu'une étude sur les facteurs de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) et leurs récepteurs. Dans le deuxième chapitre, nous nous attacherons à

définir le concept de vectorisation, et à présenter les différentes générations de vecteurs ainsi que les avantages de ce concept avant d'aborder une étude détaillée sur le dextrane.

Dans la seconde partie, nous exposerons les matériels et méthodes ainsi que les résultats expérimentaux concernant les manipulations effectuées dans le cadre de mon stage de fin d'études au sein du laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire à l'ENSIC.

Une conclusion générale dégagera les principaux résultats issus de ce travail et les perspectives à court et moyen terme.

## **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

**CHAPITRE I :**

**LES FACTEURS DE CROISSANCE ENDOTHELIAL VASCULAIRE (VEGF)**

**ET LEURS RECEPTEURS : NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES**

**ANTICANCEREUSES**

## I) LE PROCESSUS DE LA NEOVASCULARISATION DANS LE DEVELOPPEMENT TUMORAL

### 1. PROCESSUS DE CANCERISATION

Le cancer est une pathologie caractérisée par la présence d'une ou de plusieurs tumeurs malignes, formées à partir d'une transformation d'une cellule initialement normale par mutations et/ou instabilité génétique (anomalies cytogénétiques). La cellule tumorale perd le contrôle du cycle cellulaire, et acquiert une insensibilité à l'apoptose, ainsi que des anomalies de la réparation de l'ADN. Les cancers sont alors classés selon le type de la cellule dans laquelle s'est produite la première transformation, cette première cellule maligne s'étant ensuite divisée, formant la tumeur primaire constituée de cellules clonales. Certaines tumeurs primaires peuvent progresser vers un envahissement plus global de l'organisme par échappement de cellules tumorales issues de cette tumeur primaire : on parle alors de métastase.

Le processus de la carcinogenèse peut être détaillé en trois étapes :

Stade d'initiation et de promotion du cancer <sup>(1)</sup> : résulte de l'exposition à des carcinogènes, d'origine chimique, physique ou virale, conduisant à l'activation de certains oncogènes et/ou l'inactivation de certains gènes suppresseurs de tumeurs. Ceci provoque l'accumulation des mutations génétiques.

Stade de progression : En parallèle à ces changements génétiques, les cellules cancéreuses induisent des changements profonds dans le tissu voisin normal. Ce tissu ainsi altéré, qu'on appelle également le stroma tumoral, offre un environnement favorable qui permet la croissance de la tumeur, l'invasion locale et la progression métastatique, qui est à l'origine de la majorité des décès par cancer.

Stade de formation de nouveaux vaisseaux sanguins : ceci a lieu dans le stroma tumoral. En effet, cette étape est très importante dans ce processus de cancérisation, car elle facilite non seulement la progression tumorale, en facilitant l'approvisionnement de la tumeur en oxygène et nutriments, mais également la dissémination des métastases.

Les mécanismes de cancérisation sont liés à des anomalies de la communication inter et intracellulaire. La prolifération et la survie sont orchestrées par des cascades de signaux intracellulaires contrôlés et organisés en réseaux complexes dans des conditions physiologiques, et déréglés dans le cancer.

Les résultats des études mécanistiques menées sur ces processus, démontrent l'hétérogénéité des acteurs moléculaires et des voies de transduction impliqués, en fonction du type de cancer ou de son stade de développement. Néanmoins, l'étiologie de l'établissement d'un phénotype cellulaire tumoral repose sur l'échappement aux multiples mécanismes de contrôle et d'inhibition de l'organisme. Hanahan et Weinberg <sup>(2)</sup> ont défini six altérations essentielles de la physiologie cellulaire, qui collectivement, dictent la croissance maligne.

- Autosuffisance en facteurs de croissance,
- Insensibilité aux signaux antiprolifératifs,
- Potentiel illimité de réplication,
- Acquisition d'une résistance à l'apoptose,
- Stimulation de l'angiogenèse,
- Pouvoir d'invasion et de dissémination (métastases).



Figure 1. Les 6 concepts de Hanahan et Weinberg <sup>(2)</sup>.

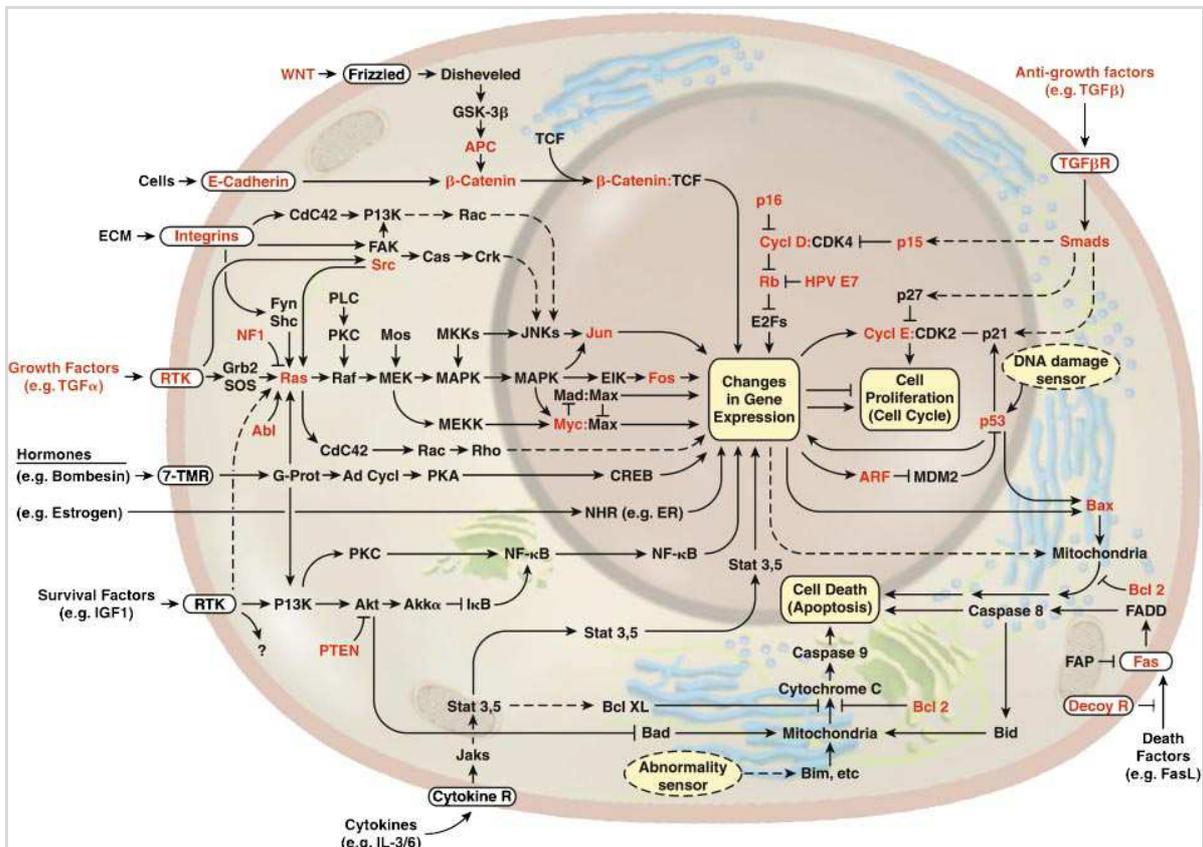


Figure 2. Les voies de signalisation cellulaire <sup>(2)</sup>.

## 2. LES VAISSEAUX SANGUINS

### 2.1) Généralités

Les vaisseaux sanguins permettent de transporter les différents éléments du sang à travers l'organisme. Le système vasculaire est divisé en deux : d'une part les artères qui acheminent le sang depuis le cœur vers les organes, et d'autre part les veines qui assurent la circulation du sang dans le sens contraire. Des liens existent entre ces deux réseaux assurés par les capillaires. Les systèmes artériels et veineux sont composés de différents types de vaisseaux selon leur taille et leurs fonctions.

	Diamètre du lumen	Epaisseur de la paroi	Cellules musculaires lisses	Composition de la matrice extracellulaire	
				Elastine	Collagène
<b>Artères</b>	4 mm	1 mm	+++	++	I, III
<b>Artérioles</b>	30 µm	6 µm	+	+/-	I, III
<b>Capillaires</b>	8 µm	1 µm	0	0	IV, V
<b>Veinules</b>	20 µm	1 µm	0	+/-	
<b>Veines</b>	5 mm	0,5 mm	+	+/-	

Tableau 1. Caractéristiques des différents vaisseaux sanguins chez l'homme.

Comme décrit précédemment, le sang joue un rôle crucial dans le processus de cancérisation, et particulièrement dans le transport d'oxygène et de nutriments aux tissus et l'élimination de leurs déchets.

Si on s'intéresse à la composition de ce liquide, on peut différencier : une phase liquide, le plasma et des éléments figurés qui sont détaillés dans le paragraphe suivant.

- Les érythrocytes (ou hématies ou globules rouges) (99% des éléments figurés), qui assurent le transport de l'oxygène.
- Les leucocytes (ou globules blancs), impliqués dans les réactions immunitaires. Au sein de ces éléments on peut différencier plusieurs types cellulaires, *ex.* granulocytes ou polynucléaires (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), lymphocytes (B et T) et monocytes.
- Les thrombocytes (ou plaquettes sanguines), impliqués dans le processus de coagulation.

## 2.2) Histologie

La paroi interne de tous les vaisseaux sanguins est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (*intima* des vaisseaux), en contact direct avec le sang <sup>(3)(4)</sup>. Ces cellules reposent sur une membrane basale, type de matrice extracellulaire (MEC) d'une épaisseur de 50 à 800 nm, qui les sépare du tissu conjonctif sous-jacent. La membrane basale est formée de l'union de deux feuillets : une lame basale (mince feuillet de glycoprotéines sécrétées par les cellules endothéliales) et une lame réticulaire (feuillet de matériel extracellulaire sécrété par les cellules du tissu conjonctif). La lame basale est elle-même composée d'une couche dense ou *lamina densa* (constituée de collagène IV pour les capillaires), entre deux couches claires (*lamina lucida*) contenant de la laminine. La lame réticulaire, quant à elle, est notamment constituée de fibronectine.

Contrairement aux capillaires, des cellules musculaires lisses (CML) entrent dans la composition des artères, artérioles, veines et veinules. Ces cellules ont un rôle dans la régulation du flux et de la perméabilité vasculaires. Les péricytes qui dans certains capillaires, entourent les cellules endothéliales en étant logés dans un dédoublement de la membrane basale, ont des caractéristiques qui les rapprochent des CML. Il s'agit de cellules mésenchymateuses-*like*, indifférenciées, servant de support aux vaisseaux.

La formation de nouveaux vaisseaux par angiogenèse implique principalement les capillaires, très fins vaisseaux d'environ 5 à 8 µm de diamètre, constitués uniquement d'une

couche de cellules endothéliales avec une lame basale et quelques fibres de collagène, mais ne possédant pas de CML (Figure 3).

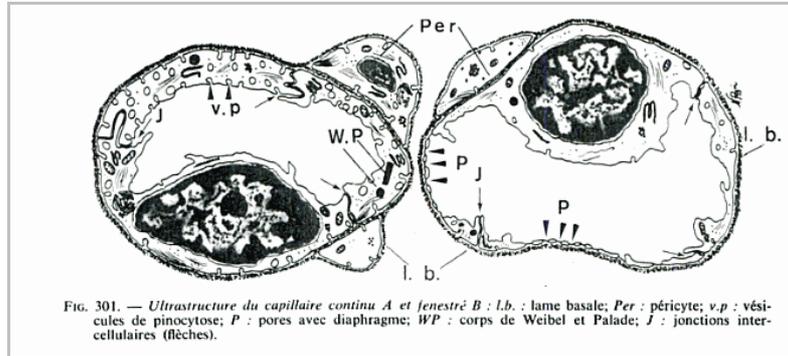


Figure 3. Ultrastructure d'un capillaire artériovoineux : lame basale; Per : péricyte; v.p : vésicule de pinocytose; P : pores avec diaphragme; W.P : corps de Weibel et Palade; j : jonction intercellulaires (flèche) <sup>(5)</sup>.

### 3. LES DIFFERENTS PROCESSUS DE FORMATION DES NEOVAISSEAUX

Sur le plan physiologique on peut différencier deux processus de formation des néovaisseaux : la vasculogénèse et l'angiogénèse.

#### 3.1) La vasculogénèse

Ce phénomène contribue à la formation des réseaux vasculaires propres à chaque organe, ainsi qu'à la mise en place de l'appareil cardio-vasculaire, au cours du développement embryonnaire.

Il s'agit de vaisseaux constitués essentiellement de cellules endothéliales, formés après des étapes de différenciation cellulaire à partir de précurseurs mésenchymateux. Les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques sont issues d'un précurseur commun, l'hémangioblaste. En effet, après agglutination de ce dernier, les cellules en périphérie donnent angioblastes, qui eux donnent les cellules endothéliales, tandis que les cellules

localisées à l'intérieur donnent les cellules hématopoïétiques qui vont donner par différenciation cellulaire, les cellules sanguines (rouges, globules blancs et plaquettes).

### 3.2) L'angiogenèse

Contrairement à la vasculogénèse, l'angiogenèse contribue à la formation de nouveaux capillaires à partir d'un réseau vasculaire préexistant, et intervient également au cours du développement embryonnaire. L'angiogenèse intervient dans la régénération de l'utérus, la formation du corps jaune et du placenta, les processus de cicatrisation, la reperméabilisation des thromboses ou encore l'adaptation musculaire à l'exercice physique et l'ossification endochondrale <sup>(6)</sup>.

Ce phénomène est parfaitement régulé par l'organisme dans des conditions physiologiques <sup>(7)</sup>, par des mécanismes de contrôle de l'angiogenèse. Lorsque ces mécanismes sont défaillants, l'angiogenèse peut être impliquée dans le développement de divers types de pathologie : maladie inflammatoire (les rétinopathies diabétiques, dégénérescence maculaire liée à l'âge), le sarcome de Kaposi, la maladie d'Alzheimer et les cancers.

L'angiogenèse joue un rôle important dans la néovascularisation tumorale. Par contre, il existe d'autres phénomènes, tels que vasculogenic mimicry (différenciation des cellules tumorales en cellules endothéliales), ou encore la cooption vasculaire (utilisation des vaisseaux existants par la tumeur).

## 4. L'ANGIOGENESE TUMORALE

L'angiogenèse peut se faire par bourgeonnement (*sprouting*) ou par intussusception (élargissement et séparation de vaisseaux déjà formés) <sup>(8)</sup>. Nous détaillons ici l'angiogenèse par bourgeonnement, qui est la plus largement décrite.

A l'échelle tissulaire, les étapes morphologiques du processus angiogénique sont identiques, quel que soit le stimulus physiologique ou pathologique initial <sup>(9)</sup>, seuls les mécanismes cellulaires et moléculaires peuvent être légèrement différents.

Il s'agit d'un processus complexe faisant intervenir deux types tissulaires, la tumeur et le réseau vasculaire, qui interagissent pour former des néovaisseaux. Les cellules endothéliales capillaires <sup>(9)</sup> sont les principaux acteurs de ce mécanisme, mais les autres composants des vaisseaux tels que les péricytes ou la MEC interviennent également <sup>(10)</sup>.

## 4.1) Processus de l'angiogenèse tumorale

On peut simplifier ce processus en deux phases.

### 4.1.1) La phase avasculaire

Cette phase a eu lieu au début de la prolifération (taille de la tumeur inférieure à 1-2 mm<sup>3</sup>). Cette phase est indépendante de l'angiogenèse. En effet, l'apport de l'oxygène et des nutriments aux cellules tumorales est assuré par diffusion simple <sup>(11)</sup>.

### 4.1.2) La phase angiogénique

Sous l'effet de l'accumulation d'altérations génétiques, la prolifération des cellules tumorales devient plus active. La croissance tumorale ralentit, du fait d'un équilibre entre prolifération et mortalité cellulaires. Lorsque la tumeur grossit au-delà des limites de diffusion simple de l'oxygène, un état hypoxique intratumoral est généré. Dans les tissus, on estime que la limite de diffusion de l'oxygène correspond à une distance de 100-150 µm entre le capillaire et les cellules, ce qui correspond à environ 3-5 couches de cellules autour d'un vaisseau. Les carcinomes *in situ* peuvent rester à l'état dormant pendant plusieurs années, mais ils peuvent également acquérir un phénotype angiogénique. Ce *switch* angiogénique résulte de la rupture de l'équilibre préexistant entre facteurs anti- et pro-angiogéniques. Les facteurs pro-angiogéniques sont en excès par rapport aux agents anti-angiogéniques, ce qui va déclencher l'angiogenèse tumorale <sup>(12)</sup>, qui peut se décomposer en plusieurs étapes.

#### ➤ Etape 1 : Initiation de l'angiogenèse

Le facteur déclenchant de ce processus est l'hypoxie intratumorale résultant de la forte prolifération. Son action intervient au niveau des gènes angiogéniques. En effet, ceci se

traduit par la sur-expression de ces gènes après l'activation du facteur de transcription HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor-1*). Ce dernier va induire l'expression du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), par les cellules tumorales ou stromales <sup>(13)(14)</sup>. En parallèle, se produit une activation des cellules endothéliales par induction de l'expression de récepteurs aux facteurs de croissance pro-angiogéniques.

### ➤ **Étape 2 : Dégradation de la membrane basale**

Sous l'action de l'urokinase et l'activateur tissulaire du plasminogène, ce dernier est transformé en plasmine, qui à son tour active les enzymes suivants : métalloprotéinases (MMP-2 et MMP-9), endopeptidases zinc-dépendantes sécrétées par les cellules tumorales, stromales et endothéliales. Ces enzymes sont responsables de la dégradation des différents composés de la MEC (laminine, fibrine, fibronectine, élastine, collagène) et de la membrane basale. Les péricytes se détachent et les jonctions entre cellules endothéliales sont altérées. Cette action sur le MEC a comme conséquence une migration des cellules endothéliales et la libération du facteur de croissance fibroblastique basique (FGFb ou FGF-2), et certaines isoformes du VEGF.

### ➤ **Étape 3 : Migration des cellules endothéliales**

La migration des cellules endothéliales en direction de la tumeur se fait par chimiotactisme. Les principaux facteurs de croissance intervenant au cours de cette étape sont le FGFb et le VEGF <sup>(3)</sup>. L'activation de ces cellules intervient suite à la liaison du VEGF à ses récepteurs exprimés au niveau de ces cellules <sup>(15)</sup>.

Les cellules migrantes prennent en charge leur migration et également leur intégration sur le nouveau site tumoral. En effet, ces cellules forment une matrice provisoire, qui a comme rôle le guidage de la migration. Cette matrice est composée de fibronectine et ténascine. Enfin, les cellules endothéliales vont exprimer de nouveaux récepteurs pour interagir avec les protéines du site accueillant. Parmi ces récepteurs, on peut citer ICAM-1, VCAM-1, les sélectines E et P ou encore les intégrines (e.g.  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ) <sup>(9)</sup>.

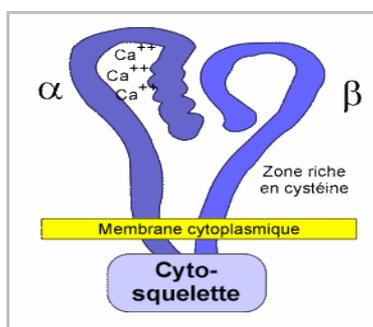


Figure 4 . Structure des intégrines.

Les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  interagissent avec de nombreuses protéines de la matrice extra-cellulaire, comme la fibronectine, la thrombospondine, la vitronectine, le facteur Von Willebrand ou encore l'ostéopontine. La fixation se fait par un motif RGD (séquence arginine-glycine-aspartyl). Cependant, les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  interagissent également avec la protéine MMP-2 qui intervient dans la dégradation de la matrice extracellulaire durant l'angiogenèse.

➤ **Etape 4 : Prolifération des cellules endothéliales**

Sous l'influence du VEGF et du FGFb, les cellules endothéliales vont alors proliférer pour fournir le nombre de cellules nécessaire à la formation de nouveaux vaisseaux.

➤ **Etape 5 : Remodelage vasculaire**

Les cellules endothéliales proliférantes se réorganisent en structures tubulaires, formant de nouveaux vaisseaux immatures mais fonctionnels. Afin de stabiliser les néovaisseaux, les cellules endothéliales vont induire la mise en place de la paroi vasculaire, caractérisée par la déposition d'une lame basale riche en laminine et en collagène IV et par l'accolement de péricytes. Ce dernier est issu de la différenciation locale de cellules mésenchymateuses non spécialisées.

L'angiogenèse va soutenir la croissance de la tumeur en apportant l'oxygène et les nutriments nécessaires à son expansion, en produisant des facteurs qui stimulent la croissance des cellules cancéreuses et en fournissant aux cellules tumorales leur principale voie pour coloniser d'autres organes <sup>(16)</sup>.

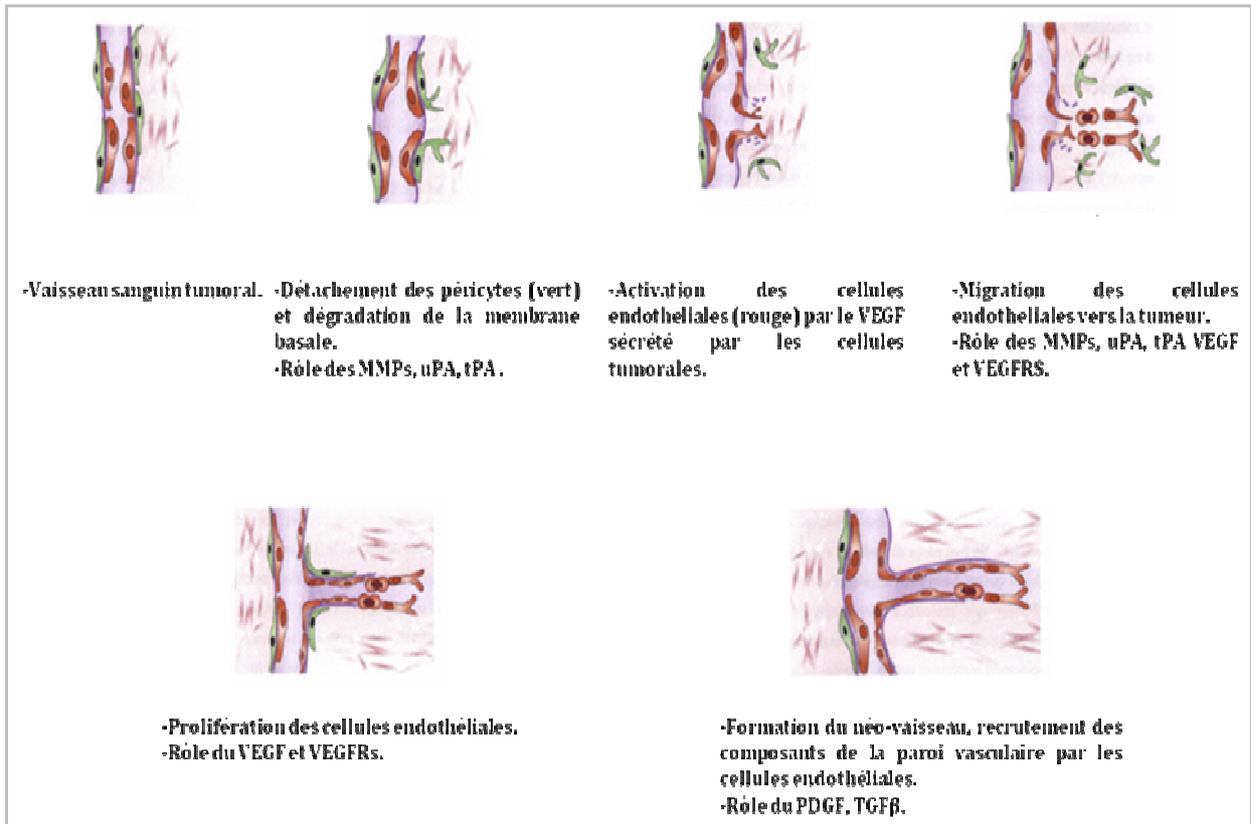


Figure 5. Processus de l'angiogenèse (adapté d'après <sup>(17)</sup>).

Les réseaux vasculaires associés aux tumeurs sont différents des réseaux capillaires normaux :

- Architecture :**
- architecture anarchique et leurs arborisations sont irrégulières.
  - Les réseaux vasculaires fragilisés formés de vaisseaux de diamètre irrégulier (compression de la paroi vasculaire par les cellules tumorales en prolifération)
- Histologie:**
- les parois sont bordées de cellules endothéliales parfois fenêtrées.
  - Les péricytes ne forment pas un manchon complet autour des cellules endothéliales (fragilité des vaisseaux tumoraux).
  - la membrane basale souvent incomplète ou dissociée, conduisant à une perméabilité vasculaire importante et par voie de conséquence, une forte pression interstitielle.
- Hémodynamique :**
- le flux est discontinu, il peut s'arrêter, voire s'inverser.
  - Les réseaux capillaires associés aux tumeurs sont constamment dépourvus de sphincters précapillaires <sup>(9)</sup>.

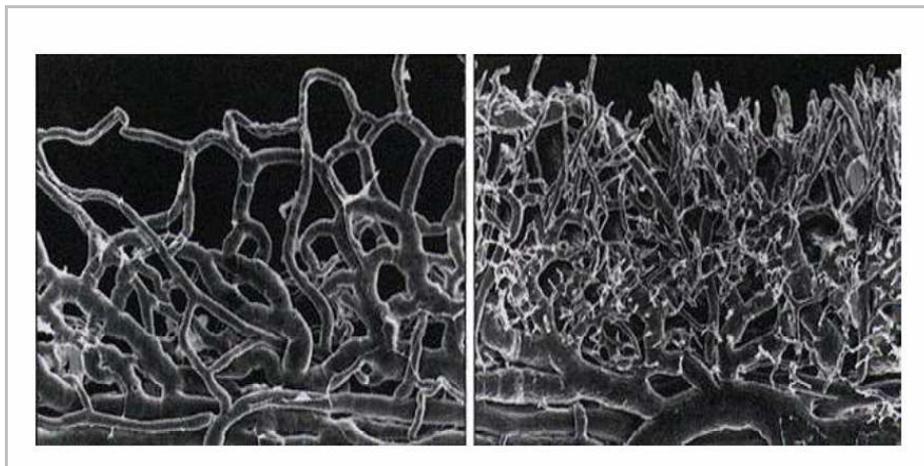


Figure 6. Réseau vasculaire à l'état normal (*vasa vasorum* de sinus carotidien de rat, *gauche*) et à l'état tumoral (xénogreffe de tumeur humaine chez la souris *nude*, *droite*), par microscopie électronique à balayage <sup>(18)</sup>.

## **5. INDUCTEURS ET INHIBITEURS NATURELS DE L'ANGIOGENESE**

Contrairement aux cellules proliférantes, les cellules endothéliales sont quiescentes avec un taux de renouvellement très faible malgré la présence de facteurs pro-angiogéniques. Cependant, on peut conclure que l'état physiologique est maintenu grâce à un équilibre entre facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques. En effet, tout déséquilibre peut conduire à un état pathologique et si la balance penche vers les facteurs pro-angiogéniques, le processus angiogénique peut être initié.

### **5.1) Facteurs pro-angiogéniques**

Ce sont essentiellement des facteurs de croissance, qui jouent un rôle capital dans la migration et la prolifération des cellules endothéliales. Ces facteurs de croissance ont des origines multiples. En effet, ils peuvent être sécrétés par les cellules tumorales ou par des cellules du stroma, comme les macrophages recrutés sur le site tumoral ou les fibroblastes <sup>(19)</sup>. La MEC est également un réservoir considérable de facteurs régulateurs de l'angiogénèse. Les principaux facteurs pro-angiogéniques impliqués dans la prolifération des cellules endothéliales sont Le VEGF et le FGFb. Contrairement au FGFb, qui est un facteur de croissance pleïotropique impliqué dans un grand nombre d'effets biologiques, le VEGF est relativement spécifique aux cellules endothéliales.

**CHAPITRE I : LES FACTEURS DE CROISSANCE ENDOTHELIAL VASCULAIRE (VEGF) ET LEURS REPECTEURS :**  
NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES ANTICANCEREUSES

	<b>Induction de la prolifération des cellules endothéliales</b>	<b>Induction de la migration des cellules endothéliales</b>	<b>Induction de la différentiation des cellules endothéliales</b>
<b>Facteurs de croissance</b>			
VEGF	+	+	+
PlGF	±	+	?
FGFa (FGF-1), FGFb (FGF-2)	+	+	+
PDGF	+	+	+
HGF/SF	+	+	+
TGFα	+	+	+
TGFβ	-	0	+
EGF	+	+	+
IGF-1	+	+	+
<b>Médiateurs de l'inflammation</b>			
TNFα	-	0	+
Interleukine -8	+	+	?
Interleukine -3	+	+	+
Prostaglandines E1, E2	0	0	+
<b>Enzymes</b>			
PD-ECGF/TP	0	+	?
Cyclooxygénase-2	0	+	+
Angiogénine	0	+	+
<b>Facteurs hématopoïétiques</b>			
Erythropoïétine	+	?	+
G-CSF	+	+	?
GM-CSF	+	+	?
<b>Molécules d'adhésion</b>			
VCAM-1	0	+	?
Sélectine-E	0	+	+
<b>Autre</b>			
Angiopoïétine-1	0	+	+
Angiopoïétine-2	L'angiopoïétine 2 est un puissant facteur pro-angiogénique, agissant en coordination avec le VEGF.		

Tableau 2. Les principaux facteurs pro-angiogéniques ( <sup>(20)</sup> <sup>(21)</sup> <sup>(9)</sup> ).

Un nouvel inducteur physiologique de l'angiogenèse a été découvert récemment, AcSDKP. IL s'agit d'un térapeptide qui est présent en concentrations nanomolaires dans la circulation, stimule la formation des capillaires sanguins in vitro et augmente la densité

vasculaire in vivo <sup>(22)</sup>. Suite a cette découverte, plusieurs études ont été lancées dont les principaux axes sont :

- L'intérêt thérapeutique de ce peptide dans le contrôle de la vascularisation normale et pathologique.
- Le rôle dans l'angiogenèse oncologique.

Concernant le premier axe, Les résultats montrent que AcSDKP à un rôle actif dans la réparation des lésions cutanées, et qui ouvre la porte à une éventuelle utilisation comme agent cicatrisant et comme adjuvant en chirurgie reconstructrice et esthétique <sup>(23)</sup>. Une autre étude a permis de mettre l'accent sur le rôle de ce tétrapeptide dans la restauration de la vascularisation déficiente chez une souris après une ischémie des membres inférieurs <sup>(24)</sup>. Dans le deuxième axe, une forte surexpression de AcSDKP a été mise en évidence dans de nombreuses pathologies cancéreuses étudiées (leucémie et diverses tumeurs solides humaines) <sup>(25)(26)</sup>. Cependant, le rôle exact de cet heptapeptide dans le processus de l'angiogenèse tumorale et dans la physiopathologie du cancer reste à déterminer.

## 5.2) Facteurs anti-angiogéniques

Pour la plupart, ce sont des fragments issus de la protéolyse de grosses protéines, comme l'angiostatine (fragment du plasminogène) <sup>(27)</sup> ou l'endostatine (issue du collagène XVIII) <sup>(28)</sup>. Ils agissent sur les cellules endothéliales en inhibant leur migration, leur prolifération et/ou leur capacité à former des capillaires fonctionnels.

**CHAPITRE I : LES FACTEURS DE CROISSANCE ENDOTHELIAL VASCULAIRE (VEGF) ET LEURS RECEPTEURS :**  
**NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES ANTICANCEREUSES**

Inhibiteur	Mécanisme d'action
<b>Fragments protéiques</b>	
Angiostatine (fragment du plasminogène)	↓ prolifération, ↑ apoptose des cellules endothéliales (CE)
Endostatine (fragment du collagène XVIII)	↓ prolifération CE, ↑ apoptose CE
Fragment de l'anti-thrombine III	↓ prolifération CE, ↑ apoptose CE
Prolactine 16 kDa	↓ prolifération CE, ↓ angiogenèse induite par FGFb
<b>Médiateurs solubles</b>	
Thrombospondine-1	↓ prolifération CE, ↑ apoptose CE
Troponine-1	↓ prolifération CE
Interféron $\alpha$	↓ prolifération CE, ↑ apoptose CE, ↓ angiogenèse induite par FGFb
Interféron $\gamma$	↓ prolifération CE
Facteur plaquettaire-4 (PF-4)	↓ prolifération CE, ↓ angiogenèse induite par FGFb et l'interleukine-8
Interleukine -12	↑ Interféron- $\gamma$
Interleukine -4	↓ migration CE
Inhibiteur du VEGF (VEGI)	↓ prolifération CE
TIMP	↓ activité MMP
PAI	↓ activité uPA
Acide rétinoïque	↓ migration CE

Tableau 3. Les principaux facteurs anti-angiogéniques <sup>(9)</sup>.

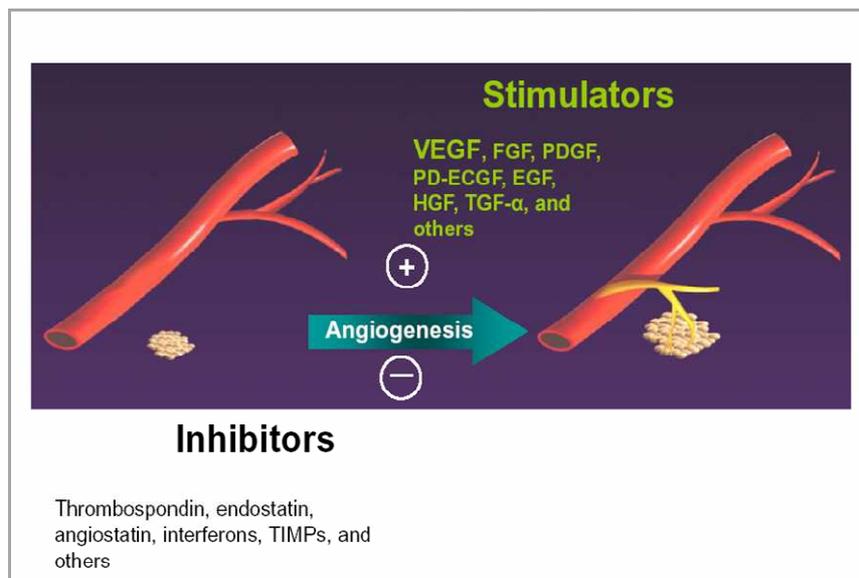


Figure 7. Le switch angiogénique.

## II) LE FACTEUR DE CROISSANCE ENDOTHELIAL VASCULAIRE (VEGF)

### 1. LE VEGF (OU VEGF-A)

Senger et al <sup>(29)</sup> sont les premiers à travailler sur ces facteurs, en démontrant la possibilité d'induction de la perméabilisation vasculaire par une molécule « tumor vascular permeability factor ». En 1989, des travaux réalisés par Ferrara et Henzel <sup>(30)</sup> ont conduit à isoler un mitogène spécifique des cellules endothéliales nommé «Vascular Endothelial Growth Factor». Durant la même année, d'autres travaux ont pu démontré qu'il s'agissait de la même molécule <sup>(31) (32)</sup>.

#### 1.1) Rôle

Le VEGF intervient dans le développement embryonnaire. En effet, des études ont été réalisées dans ce domaine. Elles ont permis de constater une létalité embryonnaire chez la souris suite à une inactivation d'un des allèles du VEGF <sup>(33) (34)</sup>. D'autres travaux ont montré dans le cas d'une sur-expression de ce facteur dans des souris transgéniques des anomalies sévères du développement cardiaque <sup>(35)</sup>.

Le facteur de croissance endothéliale compte également un rôle chez l'adulte. Le VEGF joue un rôle crucial dans plusieurs processus, on peut citer par exemple la formation du corps jaune <sup>(36)</sup>, la croissance des vaisseaux de l'endomètre dans l'utérus ou également dans l'ossification endochondrale <sup>(37)</sup>. Le VEGF a également un rôle dans le processus de la néo-angiogenèse. En effet, il joue un rôle important dans la néovascularisation, cette action est démontrée par des études de modèles tumoraux utilisant des anticorps anti VEGF <sup>(38)</sup>. L'expression du VEGF par les cellules tumorales est un indicateur du pouvoir métastasant (corrélation avec la densité vasculaire de la tumeur). Cette expression est souvent associée à un mauvais pronostic dans de nombreux types de tumeurs solides et hématologiques <sup>(39)</sup>.

## 1.2) Régulation de l'expression du VEGF

Le VEGF est synthétisé physiologiquement par les cellules endothéliales, les macrophages, les lymphocytes T, les CML, les ostéoblastes et divers autres types cellulaires mais également par les cellules tumorales <sup>(40) (41) (31) (42) (29)</sup>.

Plusieurs facteurs régulent la synthèse du VEGF, le plus important est la régulation par l'hypoxie due à la prolifération de la tumeur <sup>(43)</sup>.

### 1.2.1) Régulation par l'hypoxie

Le mécanisme de la surexpression des VEGF se fait soit par une activité transcriptionnelle importante, soit par une stabilisation de l'ARNm (demi de vie passe de 30-45 min en état normal à 6-8 heures dans des états hypoxiques <sup>(44)</sup>).

Le premier mécanisme est semblable à celui de la régulation de l'érythropoïétine par la pression partielle en oxygène <sup>(43)</sup>. En effet, Ces mécanismes mettent en jeu le facteur de transcription HIF-1. Il s'agit d'un hétérodimère composé de deux sous-unités : la sous-unité HIF-1 $\alpha$  et la sous-unité HIF-1 $\beta$ .

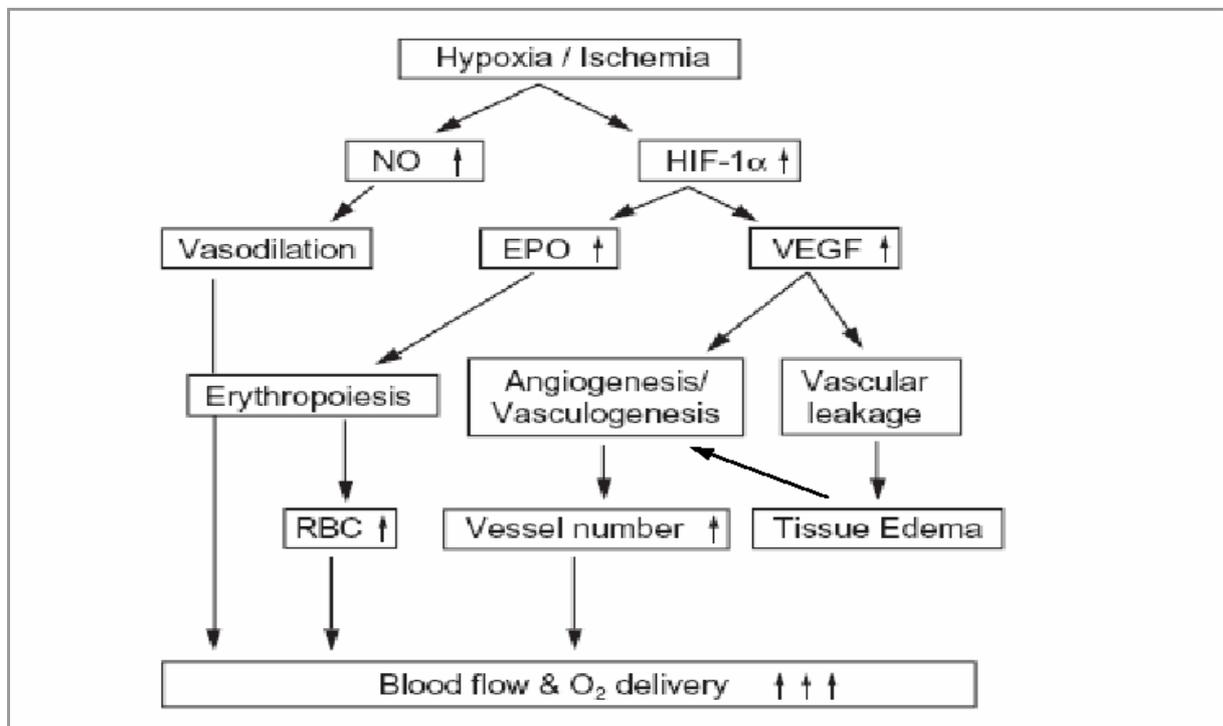


Figure 8. Hypoxie et l'angiogenèse.

Une étude a permis de démontrer le rôle crucial de médiateur dans la réponse à l'hypoxie que peut jouer cet hétérodimère <sup>(45)</sup>. La sous-unité HIF-1 $\beta$  est présente dans le noyau de façon constitutive, tandis que la sous unité HIF-1 $\alpha$  est présente à des taux très faibles dans des conditions normales (rapidement dégradée dans le cytoplasme par le protéasome, demi-vie < 5 minutes).

L'élément qui donne le signal de dégradation de la sous unité HIF-1 $\alpha$  est la fixation de la protéine (Von Hippel-Lindau) sur cette sous unité après avoir été hydroxylés <sup>(46)</sup>. Cette protéine appartient à un complexe enzymatique qui possède une activité E3-ubiquitine ligase. Dans des conditions d'hypoxie intratumorale, l'hydroxylation de HIF-1 $\alpha$  est limitée, ce qui diminue la fixation de pVHL sur celle-ci, et donc une dégradation par le protéasome moindre. HIF-1 $\alpha$  migre vers le noyau où elle forme avec l'autre sous unité le dimère HIF-1 $\alpha$ / HIF-1 $\beta$ . Le facteur de transcription HIF-1 ainsi formé va se fixer sur des séquences *enhancer* du gène codant pour le VEGF et en permettre la transcription.

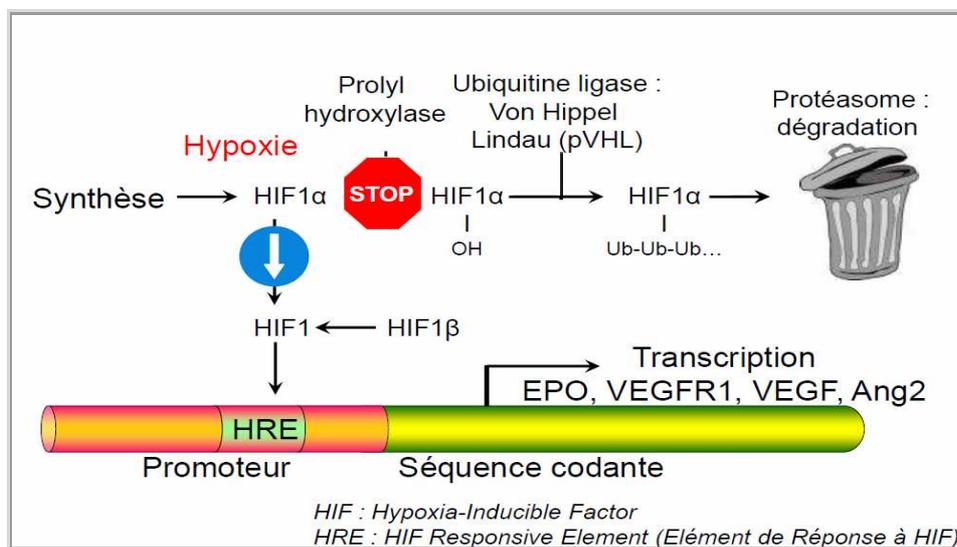


Figure 9. Régulation de l'expression du VEGF par hypoxie.

La stabilisation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  peut également être induite en conditions normoxiques. Le mécanisme mis en jeu fait intervenir la voie PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)/Akt et le gène suppresseur de tumeur PTEN (Phosphatase and TENsin homologdeleted on chromosome TEN) <sup>(46)</sup>.

## 1.2.2) Régulation par des facteurs de croissance, cytokines et hormones

Les principaux acteurs sont détaillés dans le tableau suivant :

<b>Facteurs de croissance</b> <sup>(47) (48) (49)</sup>
• l'EGF ( <i>epidermal growth factor</i> ),
• TGF $\alpha$
• TGF $\beta$
• IGF-1
• FGFb
• PDGF
<b>Cytokines inflammatoires</b>
• IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6
<b>Hormones</b> <sup>(50) (51) (52) (53) (54) (55)</sup>
• thyroïdostimuline
• corticotropine
• gonadotropines,
• œstrogènes
• progestérone

Tableau 4. Principaux acteurs régulant l'expression du VEGF.

## 1.3) Structure et isoformes du VEGF

Le VEGF appartient à la super-famille de gènes du PDGF. Leur structure est schématisée dans la figure suivante <sup>(56)</sup>.

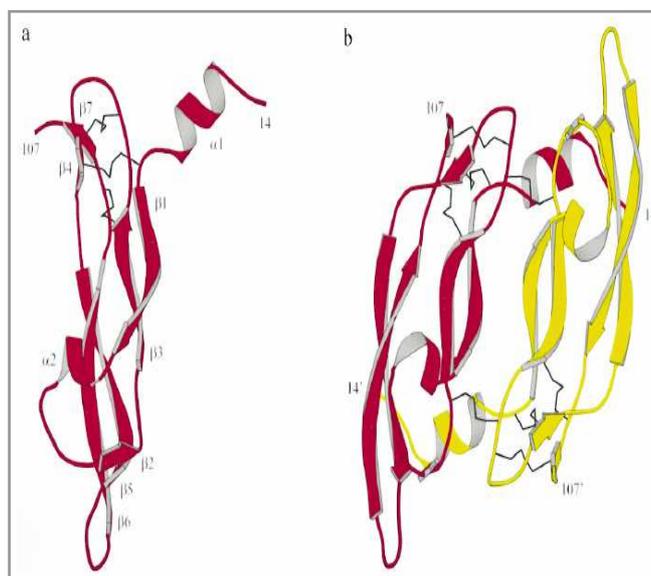


Figure 10. Représentation en hélice  $\alpha$  et feuillet  $\beta$  du VEGF monomère (a) et dimère (b). Les ponts disulfures sont représentés par des traits noirs <sup>(56)</sup>.

Le gène du VEGF humain est localisé sur le chromosome 6 (6p21.3)<sup>(57)</sup> et organisé en huit exons, séparés par sept introns. L'épissage alternatif de son ARNm aboutit à la formation de plusieurs isoformes. Les plus communes étant constituées de 121, 145, 165, 189 et 206 acides aminés, nommées respectivement VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> et VEGF<sub>206</sub>. Le VEGF<sub>165</sub> en est la forme la plus abondante <sup>(58)</sup>. Le VEGF<sub>165</sub> est sécrété comme une glycoprotéine homodimérique d'environ 45 kDa, possédant un caractère basique et une affinité modérée pour l'héparine (présente au niveau de la MEC sous forme de protéoglycane héparane-sulfate), notamment du fait de la présence de 15 acides aminés basiques contenus dans les 44 acides aminés de l'exon 7<sup>(32)(31)</sup>.

## 2. LES AUTRES MEMBRES DE LA FAMILLE DU VEGF

A ce jour, six autres protéines de la famille du VEGF ont été identifiées dans différentes espèces.

## 2.1) Le facteur de croissance placentaire (PlGF)

- Découvert en 1991<sup>(59)</sup>.
- **Structure** : homodimère de 46-50 kDa, 50% d'homologie avec le VEGF<sub>165</sub><sup>(59)</sup>.
- **Localisation** : cœur, poumons, glande thyroïde, muscle squelettique, cellules endothéliales, MO et kératinocytes<sup>(60) (61)</sup>.
- **Affinité** : VEGFR-1, peut rentrer en compétition avec le VEGF<sub>165</sub><sup>(62) (63)</sup>.
- **Isoformes** : PlGF-1 (PlGF<sub>131</sub>), PlGF-2 (PlGF<sub>152</sub>), PlGF-3 (PlGF<sub>203</sub>) et PlGF-4 (PlGF<sub>224</sub>)<sup>(64)(65)</sup>.

## 2.2) Le VEGF-B

- Cloné et caractérisé en 1996 chez la souris<sup>(66)</sup>.
- **Localisation** : cœur, muscle squelettique et pancréas.
- **Structure** : homodimère de 21 et 32 kDa (2 isoformes de 167 et 186 acides aminés)<sup>(67)</sup>.
- **Affinité** : les 2 isoformes peuvent se lier au VEGFR-1<sup>(67)</sup>.

## 2.3) Le VEGF-C et le VEGF-D

- Le VEGF-C cloné à partir de cellules de cancers humains de la prostate<sup>(68)</sup>.
- **Structure** : le VEGF-C partage 30% d'homologie avec le VEGF<sub>165</sub> et 60% avec le VEGF-D<sup>(69)</sup>.
- **Affinité** : le VEGF-C joue un rôle dans l'angiogenèse traduit par VEGFR-2. Le VEGF-C et le VEGF-D peuvent se lier au VEGFR-3 pour assurer un rôle important dans la lymphangiogenèse.

## 2.4) Le VEGF-E

- Identifié en 1994 dans le génome d'un virus parapox.
- **Affinité** : il s'agit d'un groupe de protéines qui se lient au VEGFR-2<sup>(70)</sup>. Certaines d'entre elles se lient également à la NRP-1<sup>(71)</sup>.

## 2.5) Le VEGF-F

- Isolé à partir du venin de serpents.
- **Affinité** : il s'agit d'un groupe de protéines qui se lient avec des affinités différentes au VEGFR-2 <sup>(72)</sup> <sup>(73)</sup> <sup>(74)</sup>.

## III) LES RECEPTEURS AU VEGF

Il existe plusieurs récepteurs de la famille du VEGF. Néanmoins, on peut les diviser en deux classes, les récepteurs au VEGF à activité tyrosine kinase (TK) et les neuropilines (NRPs).

### 1. LES RECEPTEURS A ACTIVITE TYROSINE KINASE

Il existe trois récepteurs de la famille du VEGF à activité TK, appartenant à la super-famille du récepteur au PDGF : VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase-1, Flt-1) <sup>(75)</sup>, VEGFR-2 (fetal liver kinase-1, Flk-1 pour sa version murine ou kinase insert domain-containing receptor, KDR, pour son homologue humain) <sup>(76)(77)</sup>, et VEGFR-3 (fms-like tyrosine kinase-4, Flt-4) <sup>(68)</sup>. Chez l'adulte, le VEGFR-1 et le VEGFR-2 sont exprimés essentiellement au niveau des cellules endothéliales vasculaires, tandis que le VEGFR-3 est localisé principalement au niveau de l'endothélium lymphatique.

#### 1.1) Caractéristiques communes des récepteurs à activité tyrosine kinase

Les récepteurs à activité TK présentent trois domaines distincts, une partie extracellulaire, responsable de la reconnaissance et de la fixation du ligand, une partie intracytoplasmique, siège de l'activité TK, ces deux parties étant reliées entre elles par une région transmembranaire qui permet au récepteur d'être fixé à la membrane cellulaire.

Une fois le ligand fixé sur la région extracellulaire des deux récepteurs monomères, plusieurs évènements s'enchainent. On peut décrire ces processus comme suivant :

- Après dimérisation du récepteur, les résidus tyrosine des deux récepteurs sont phosphorylés par la protéine kinase de l'autre monomère au niveau intracytoplasmique. Ceci induit une cascade de transduction du signal.
- Les récepteurs phosphorylés sont internalisés par la cellule par endocytose, et la protéine kinase est dégradée par les lysosomes.

## 1.2) Le récepteur au VEGF de type 1

Le VEGFR-1 (180 kDa) est un récepteur de haute affinité pour le VEGF-A, VEGF-B, PlGF et TfsvVEGF (*cf. tableau 5*). Son gène est situé sur le chromosome 13 chez l'homme. Il est exprimé par les cellules endothéliales vasculaires, mais aussi par des cellules non endothéliales, comme les macrophages et les monocytes <sup>(78)</sup> et les cellules souches hématopoïétiques <sup>(79)</sup>. Le VEGF-B et le PlGF se fixent essentiellement au niveau de son deuxième domaine Ig <sup>(80)</sup>.

Le VEGFR-1 est impliqué dans plusieurs processus. On peut citer :

- La capture du VEGF en excès afin de limiter la signalisation via le VEGFR-2.
- La migration des cellules endothéliales. Les anticorps anti-VEGFR-1 bloquent la migration, mais non la prolifération.
- Le VEGFR-1 est aussi impliqué dans la migration des monocytes et macrophages <sup>(81)</sup>, et le recrutement des cellules souches hématopoïétiques <sup>(79)</sup>.

## 1.3) Le récepteur au VEGF de type 2

Le VEGFR-2 (200-230 kDa) est un récepteur de haute affinité pour le VEGF-A, le VEGF-E et le VEGF-F, ainsi que pour les formes clivées de VEGF-C et VEGF-D (*cf. tableau 5*). Son gène est situé sur le chromosome 4 chez l'homme, et 5 chez la souris. Il est exprimé par les cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques, ainsi que d'autres types

cellulaires, tels que les mégacaryocytes, les cellules souches hématopoïétiques<sup>(82)</sup>, et les CML<sup>(83)</sup>.

Les signaux intracellulaires résultant de la fixation du VEGF sur le domaine extracellulaire de VEGFR-2 sont divers.

- **Prolifération cellulaire** : ceci est produit par l'activation des ERKs (extracellular-signal-regulated proteins kinases).
- **Survie cellulaire** : les cellules endothéliales vasculaires des vaisseaux immatures requièrent des signaux de survie, en l'absence desquels une apoptose est induite<sup>(84)(85)</sup>. Cette voie fait intervenir en partie l'activation par PI3K de la protéine anti-apoptotique Akt/PKB (protéine kinase B), mais le mécanisme d'activation de PI3K reste inconnu
- **Induction de la perméabilité vasculaire**<sup>(86)(29)</sup> : Akt induit l'activation par phosphorylation de eNOS (endothelial nitric oxide synthase). Par ailleurs, IP<sub>3</sub> se lie à un récepteur spécifique présent sur le réticulum endoplasmique, ce qui induit la libération du calcium Ca<sup>2+</sup>. Cette libération va stimuler la production de NO, inducteur de la perméabilité vasculaire. L'augmentation de la perméabilité vasculaire à un rôle dans la croissance endothéliale vasculaire. En effet, ceci permet l'extravasation de protéines plasmatique, comme la fibrine constituant un gel, qui forme un substrat pour cette croissance<sup>(87)</sup>.
- **Migration cellulaire** : La production de NO jouerait également un rôle dans la migration cellulaire.

#### 1.4) Le récepteur au VEGF de type 3

Le VEGFR-3 (195 kDa) est un récepteur de haute affinité pour le VEGF-C et le VEGF-D. Il est le principal récepteur impliqué dans la lymphangiogenèse. Son gène est situé sur le chromosome 5 chez l'homme. Contrairement au VEGFR-1 et au VEGFR-2, le VEGFR-3 est clivé par protéolyse au niveau du cinquième domaine Ig et les fragments générés restent assemblés par un pont disulfure.

## 2. LES NEUROPILINES

Les neuropilines (NRP-1 et NRP-2) sont des glycoprotéines transmembranaires qui jouent un rôle clef dans le développement des systèmes neuronaux et vasculaires. Les neuropilines (NRPs) sont des récepteurs de la famille des sémaphorines de classe 3, facteurs de la guidance axonal et des récepteurs de la famille du VEGF, facteurs de l'angiogénèse.

### 2.1) Structure des neuropilines

Contrairement aux trois types de récepteurs décrits précédemment, les NRPs sont des récepteurs de 120 à 130 kDa n'ayant pas l'activité TK<sup>(88)</sup>. Les neuropilines sont composées de 5 domaines : une portion extracellulaire de 860 acides aminés composée de 3 domaines (a1a2, b1b2 et c), un domaine transmembranaire de 23 acides aminés, et un court domaine cytoplasmique d'environ 40 acides aminés. Le domaine cytoplasmique est court et ne contient pas de motif kinase (*cf. figure 11*).

### 2.2) Ligands des neuropilines

Les NRPs jouent le rôle de récepteurs ou de co-récepteurs pour deux classes de ligands : les SEMA3 et certains sous-types de la famille du VEGF. Les ligands de la NRP-1 sont le VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF-2, HGF, SEMA3A, SEMA3B et SEMA3C. Les ligands de la NRP-2 sont le VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF-C, VEGF-D, HGF, SEMA3B, SEMA3C et SEMA3F.

Les SEMAs et le VEGF<sub>165</sub> se lient au niveau des domaines extracellulaires A et B. Concernant le VEGF<sub>165</sub>, le domaine B des NRPs est nécessaire et suffisant pour sa liaison. Néanmoins, pour NRP-1, la présence du domaine A augmente considérablement cette liaison.

### 2.3) Expression des neuropilines

Les neuropilines sont présentes à la fois sur des cellules saines et sur les cellules tumorales. En effet, NRPs ont été détectées dans les ostéoblastes, les cellules neuroendocrines

du tractus gastro-intestinal, les cellules dendritiques, les lymphocytes T, les fibroblastes, les adipocytes de la moelle osseuse et les cellules épithéliales glomérulaires.

Les NRPs sont également présentes dans les vaisseaux matures et en développement, à la fois sur les CML et sur les cellules endothéliales, mais également au niveau de l'endothélium vasculaire des tumeurs<sup>(89)(90)</sup>. L'expression de la NRP-2 au niveau endothélial semble être restreinte aux veines et aux vaisseaux lymphatiques. La NRP-1 et la NRP-2 sont aussi exprimées au niveau de plusieurs types de cellules tumorales. Par exemple, dans les cancers du poumon non à petites cellules, l'expression de la NRP-1 et de la NRP-2 est supérieure à celle trouvée dans les tissus non néoplasiques<sup>(91)</sup>.

## **2.4) Effets médiés par les neuropilines**

Les neuropilines interviennent dans des phénomènes physiologiques ainsi dans des processus pathologiques.

### **2.4.1) Développement embryonnaire**

Le rôle des neuropilines dans le développement embryonnaire se manifeste au niveau du développement des systèmes cardio-vasculaire et nerveux. En effet, une absence d'expression de ces récepteurs, conduit à la mort de l'embryon, tandis qu'une surexpression serait responsable de phénomène d'hémorragie, causée par la présence d'un excès de capillaires.

### **2.4.2) L'angiogenèse tumorale et le processus métastatique**

NRP-1 est impliquée dans la croissance et l'apparition de métastases dans le cancer du colon<sup>(92)</sup> et dans l'angiogenèse et la croissance tumorale dans le cancer de la prostate<sup>(93)</sup>. Dans des tumeurs humaines, l'expression de la NRP-1 est corrélée à la croissance tumorale et au pouvoir invasif du cancer de la prostate<sup>(94)</sup>, colorectal<sup>(95)</sup>, du poumon<sup>(96)</sup>, du sein<sup>(90)</sup> et des astrocytomes. Dans le cancer de la vessie, l'expression de la NRP-2 est corrélée à l'avancement du cancer<sup>(97)</sup>. A l'opposé, dans certaines études, la corrélation semble inversée. Ainsi, dans des cellules de cancer du pancréas, la sur-expression de la NRP-1 conduit à une diminution de la croissance tumorale. Ces résultats parfois antagonistes, soulignent la complexité du système des NRPs. Des travaux ont été réalisés sur certains

modèles animaux et ont démontré que l'expression de la NRP-1 au niveau des cellules cancéreuses favorisait l'angiogenèse tumorale <sup>(93)</sup> <sup>(92)</sup>. D'autres ont montré que l'utilisation d'un anticorps anti-NRP-1 supprime les effets mitogéniques induits par le VEGF<sub>165</sub> sur des cellules endothéliales bovines de la rétine <sup>(98)</sup>, ce qui montre que la liaison du VEGF sur NRP-1 stimulerait la migration et l'adhésion des cellules endothéliales.

Les NRPs interagissent généralement avec un autre récepteur pour la transmission de signaux intracellulaires, ceci du à leur court domaine intracellulaire ne possédant pas d'activité tyrosine kinase. En effet, on peut décrire des complexes avec des co-récepteurs, notamment avec les plexines au niveau des neurones même en l'absence du ligand <sup>(99)</sup>, un complexe ternaire a été décrit dans la littérature, celui entre la NRP, la plexine et la SEMA3 <sup>(100)</sup>. Même chose pour les signaux médiés par le VEGF<sub>165</sub> *via* la NRP-1 se feraient par la formation de complexes avec le VEGFR-2 au niveau des cellules endothéliales <sup>(101)</sup> <sup>(88)</sup>. La présence de la NRP-1 augmente la liaison du VEGF<sub>165</sub> à VEGFR-2 <sup>(102)</sup>, et potentialise les effets mitogéniques et chimiotactiques médiés par le VEGFR-2 <sup>(103)</sup> <sup>(104)</sup> <sup>(88)</sup>.

Cependant, plusieurs études laissent penser que la signalisation médiée par le VEGF *via* les NRPs peut se faire en l'absence de VEGFR-1 ou de VEGFR-2 <sup>(88)</sup>. Ainsi, le VEGF<sub>165</sub> inhibe l'apoptose dans la lignée de cancer du sein humain, qui exprime NRP-1 mais pas VEGFR-2. Le VEGF<sub>121</sub>, qui ne reconnaît pas la NRP-1, n'induit pas ce type d'effet, ce qui suggère que le VEGF<sub>165</sub> apporte un signal de survie traduit par la NRP-1 <sup>(105)</sup>.

Ci-dessous un tableau qui résume l'affinité des membres de la famille du VEGF pour les récepteurs VEGFR, ainsi que les valeurs des constantes de dissociation  $K_d$  en mol/L.

**CHAPITRE I : LES FACTEURS DE CROISSANCE ENDOTHELIAL VASCULAIRE (VEGF) ET LEURS RECEPTEURS :**  
**NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES ANTICANCEREUSES**

	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	NRP-1	NRP-2
VEGF-A <sub>165</sub>	1,0.10 <sup>-11</sup>	0,7-7,7.10 <sup>-10</sup>		1,8.10 <sup>-10</sup>	1,3.10 <sup>-10</sup>
VEGF-A <sub>121</sub>				-	-
VEGF-A <sub>145</sub>				-	7,0.10 <sup>-10</sup>
VEGF-A <sub>189</sub>				+	+
VEGF-A <sub>206</sub>				+	+
PlGF-1	1,9.10 <sup>-10</sup>			-	-
PlGF-2	2,5.10 <sup>-10</sup>			+	+
VEGF-B <sub>167</sub>	10 <sup>-11</sup> -10 <sup>-10</sup>			+	N.D.
VEGF-B <sub>186</sub>				+	
VEGF-C (précurseur)		~10 <sup>-8</sup>	~10 <sup>-9</sup>		-
VEGF-C (clivé)		4,1.10 <sup>-10</sup>	1,4.10 <sup>-10</sup>		+
VEGF-D (précurseur)		1,6.10 <sup>-5</sup>	8,2.10 <sup>-7</sup>		-
VEGF-D (clivé)		5,6.10 <sup>-8</sup>	2,0.10 <sup>-8</sup>		+
VEGF-E		3,3.10 <sup>-10</sup>		A divers degrés pour VEGF-E <sub>NZ-2</sub> , VEGF-E <sub>NZ-10</sub> , VEGF-E <sub>D1701</sub>	N.D.

Tableau 5. Affinité des membres de la famille du VEGF pour les récepteurs de cette famille<sup>(106)</sup> (case grise et - = absence de reconnaissance du récepteur, ND = non déterminé).

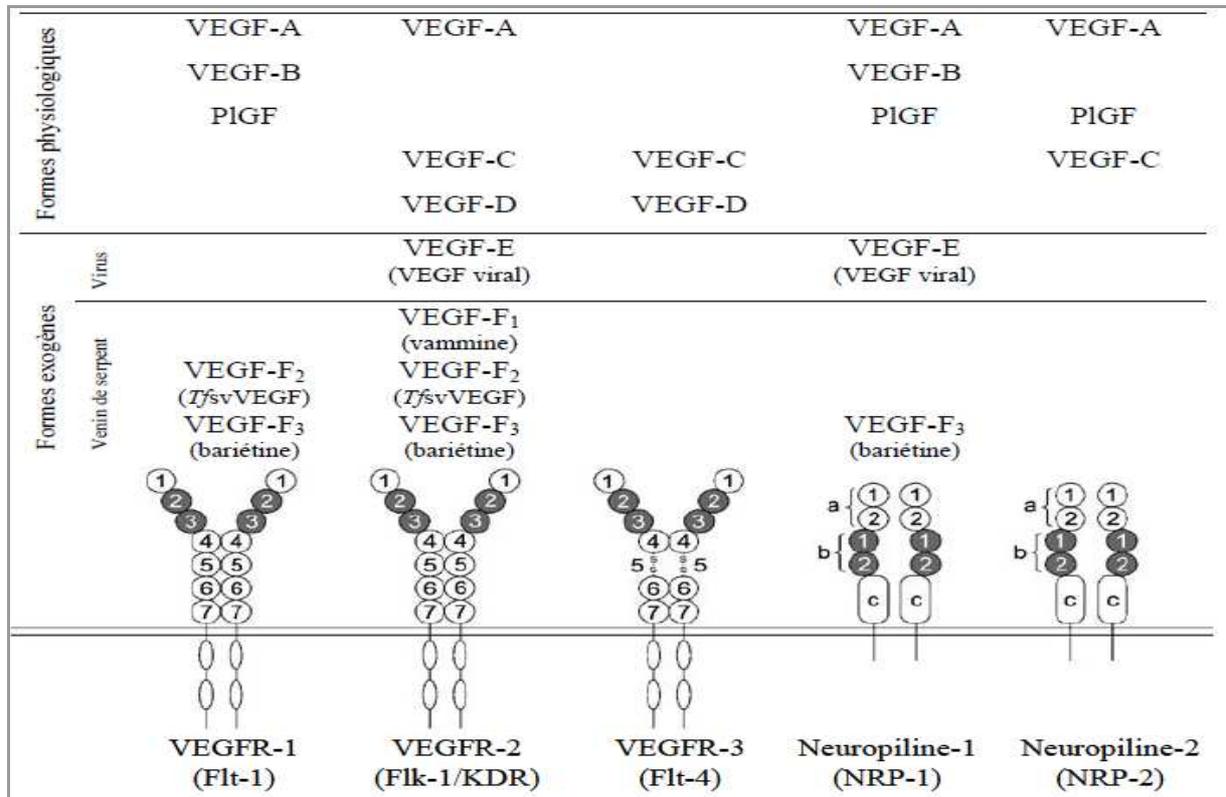


Figure 11. Le VEGF et ses récepteurs<sup>(106)</sup>.

## **VI) THERAPIE ANTI-ANGIOGENIQUE ET THERAPIE ANTI-NEOVASCULAIRE**

L'angiogenèse associée à la croissance tumorale s'impose comme un facteur pronostique d'importance dans nombre de tumeurs malignes, et représente, de plus, une prometteuse nouvelle cible thérapeutique. Elle fait actuellement l'objet d'une intense recherche. Il existe à ce jour deux stratégies thérapeutiques différentes, mais ayant le même but, asphyxier la tumeur. L'une vise à inhiber la formation de nouveaux vaisseaux : thérapie anti-angiogénique. Tandis que l'autre, plus récente, consiste à développer des thérapies qui vont spécifiquement détruire la vascularisation nouvellement formée des tumeurs : thérapie anti-néovasculaire.

### **1. THERAPIE ANTI-ANGIOGENIQUE**

Cette démarche vise à inhiber la formation de nouveaux vaisseaux. Elle a été suggérée pour la première fois par un chirurgien du Children's Hospital de Boston, dans les années 70<sup>(107)</sup>. Il a observé que toute tumeur de taille supérieure à 1-2 mm<sup>3</sup> développait son propre réseau vasculaire. Cependant, ce n'est qu'à partir des années 90 que les résultats expérimentaux ont prouvé cette hypothèse.

#### **1.1) Les avantages de la thérapie anti-angiogénique**

La thérapie anti-angiogénique offre plusieurs avantages par rapport à la stratégie thérapeutique classique visant surtout les cellules tumorales. La cible de cette démarche qui est la cellule endothéliale est facile à atteindre, contrairement aux thérapies anticancéreuses traditionnelles, où le tissu tumoral est difficile d'accès.

Ci-dessous certains avantages les plus importants de cette thérapie :

- *L'inhibition de la formation d'un petit nombre de vaisseaux tumoraux* pourrait affecter la croissance de nombreuses cellules tumorales.
- *limitation des effets secondaires*. En effet, cette démarche vise seulement les cellules endothéliales associées aux tumeurs, contrairement à l'action de l'arsenal thérapeutique anticancéreux classique
- *La stabilité génétique des cellules endothéliales*, ne permet pas à ces dernières d'acquiescer une résistance envers ce type de thérapie <sup>(108)</sup>, contrairement à l'instabilité génétique des cellules tumorales, qui conduit souvent à l'échappement thérapeutique.

## 1.2) Différentes stratégies de la thérapie anti-angiogénique

L'angiogenèse résulte d'un déséquilibre de la balance entre facteurs anti-angiogéniques et facteurs pro-angiogéniques, en faveur de ces derniers. Le rétablissement de cette balance peut donc se faire, soit en augmentant la quantité de facteurs anti-angiogéniques, soit en diminuant la quantité ou en inhibant les effets de facteurs pro-angiogéniques, et ce, en agissant sur une ou plusieurs étapes de l'angiogenèse.

- **Inhibition de la dégradation de la MEC** : il est possible d'interférer avec le processus angiogénique en inhibant la dégradation de la MEC, et par voie de conséquence, bloquer les étapes d'invasion et de migration des cellules endothéliales. Cette stratégie consiste à inhiber les MMPs avec de petits inhibiteurs synthétiques (MMPIs). Les premiers essais cliniques avec le batimastat (BB-94) ont été stoppés aux dépens d'une faible biodisponibilité<sup>(109)</sup>. Néanmoins, l'exploration de cette stratégie n'a pas été freinée et d'autres molécules ont vu le jour, le marimastat (BB-2516, British Biotech), actuellement en essais de phase III dans le cancer du sein et le mélanome<sup>(110)</sup>, le prinomastat (AG3340)<sup>(111)</sup>, le neovastat, le metastat et le tanomastat<sup>(112)</sup>.
- **Diminuer l'expression de VEGF et/ou de ces récepteurs** : cette stratégie vise à inhiber la première étape du processus de l'angiogenèse, qui est la sécrétion des facteurs de croissance, tel que VEGF, et aussi l'expression de leurs récepteurs. La cible de cette stratégie est EGFR, puisque l'EGF facilite la sécrétion de VEGF par les cellules

stromales. Des oligonucléotides antisens neutralisant l'ARNm du VEGF ont été développés afin de diminuer l'expression du VEGF et montrent un potentiel anti-angiogénique<sup>(113)</sup>. Notamment, un antisens neutralisant l'angiopoïétine-1 a été testé *in vitro* et a montré une diminution marquée de la croissance tumorale<sup>(114)</sup>.

- **Inhiber la migration des cellules endothéliales :** ceci s'effectue en inhibant l'adhésion des cellules endothéliales aux composants de la MEC. La cible de cette stratégie est l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , elle se lie spécifiquement à la séquence H-Arg-Gly-Asp-OH (RGD) de la vitronectine. Ainsi des peptides antagonistes des intégrines  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_v\beta_5$  contenant le motif RGD comme le cyclopeptide cilengitide (EMD 121974)<sup>(115)</sup> et des anticorps anti- $\alpha_v\beta_3$  tels que le LM609<sup>(116)</sup> sont capables d'inhiber la prolifération des cellules endothéliales activées mais aussi d'induire leur apoptose. MEDI-522/Abegrin® (anciennement Vitaxin®, MedImmune) est une version humanisée de cet anticorps anti intégrine- $\alpha_v\beta_3$ . Cette molécule est en phase II d'essais cliniques.
- **Empêcher la liaison du VEGF avec son (ses) récepteur(s) :** cette stratégie vise soit à capturer les facteurs de croissance circulants, soit à bloquer ses récepteurs. Le bevacizumab (Avastin®) est le premier agent anti-angiogénique approuvé par la FDA en 2004, puis par EMEA<sup>(117)</sup>. Il s'agit d'un anticorps anti-VEGF à 93 % humain et 7 % murin. Il reconnaît toutes les isoformes du VEGF avec un  $k_d = 8 \times 10^{-10}$  M et une demi-vie de 17-21 jours. Il inhibe la liaison du VEGF à ses récepteurs, Flt-1 (VEGFR-1) et KDR (VEGFR-2), situés à la surface des cellules endothéliales. L'indication première de l'Avastin® est le traitement de première ligne du cancer métastatique du colon ou du rectum en association avec une chimiothérapie comprenant du 5-FU. Il induit une diminution de la perfusion tumorale, de la densité des microvaisseaux, de la pression interstitielle. L'IMC-1C11 est un autres anticorps monoclonal à l'étude. Il s'agit d'un anticorps chimérique de type IgG1 dirigé contre le VEGFR-2. Une étude de phase I chez 14 patients atteints d'un cancer colorectal métastatique a permis une stabilisation prolongée malgré la présence d'anticorps anti-chimériques chez sept patients<sup>(118)</sup>. Une autre stratégie consiste à utiliser des récepteurs solubles, qui ont comme action la capture du VEGF circulant. Le VEGF Trap (AVE0005, Sanofi-aventis) est une protéine de fusion contenant des portions du domaine extracellulaire de VEGFR1 et 2 liée à la région Fc (C-terminale) d'un anticorps humain. Il se lie à VEGF l'empêchant de

stimuler VEGFR, Son affinité pour le VEGF est 100 fois supérieure à celle obtenue avec des anticorps monoclonaux. Des études de phase III sont en cours en association avec des agents cytotoxiques, en particulier le docetaxel, et intègrent de l'imagerie fonctionnelle (DCE-MRI). D'autres molécules agissent en aval de la transduction du stimulus angiogénique. Il s'agit de petits inhibiteurs synthétiques de l'activité TK de récepteurs, notamment au VEGF. On peut citer le semaxanib (SU5416) qui est un dérivé de l'indoline-2-one. Cet agent antiangiogénique a comme action l'inhibition de façon sélective l'autophosphorylation du récepteur VEGFR-2. Chez l'animal, il présente une activité antitumorale, et est capable d'induire l'apoptose des cellules endothéliales<sup>(119)</sup>. Cette molécule ne verra pas le jour suite à de nombreux incidents (embolies pulmonaires et infarctus du myocarde notamment) survenus lors d'essais cliniques. Le sunitinib (SU11248, Sutent®) approuvé en 2007 par la FDA est indiqué dans le traitement des cancers du rein avancés et/ou métastatiques (MRCC)<sup>(120)</sup>. Il inhibe le VEGFR-2 et le PDGFR. Une autre molécule a vu également le jour, il s'agit de sorafenib (Nexavar®). Elle a été approuvée en première foie en 2005 par la FDA pour le traitement du carcinome rénal, en suite en 2006 par l'EMEA, pour traitement du carcinome rénal avancé après échec d'un traitement préalable à base de TNF $\alpha$  ou d'IL-2, ou chez des patients pour lesquels ces traitements sont considérés comme inadaptés.

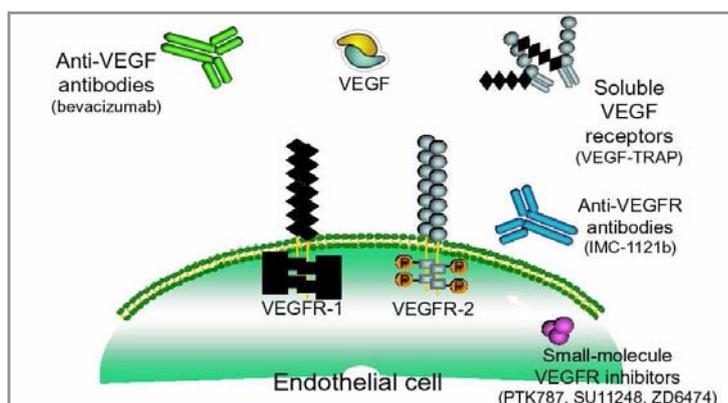


Figure 12. La voie VEGF.

Les principales molécules anti-angiogéniques en cours d'études ou sur le marché sont résumées dans le tableau suivant.

**CHAPITRE I : LES FACTEURS DE CROISSANCE ENDOTHELIAL VASCULAIRE (VEGF) ET LEURS RECEPTEURS :**  
**NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES ANTICANCEREUSES**

<b>Molécules inhibitrices</b>	<b>Cibles</b>	<b>Essais cliniques</b>
<b>Inhibiteurs des métalloprotéases</b>		
Batimastat (BB-94)	De nombreuses MMPs	Stoppés
Marimastat (BB-2516)	MMP-1, -2, -3, -7, -9	Phase III
Prinomastat (AG3340)	MMP-2, -9	Phase III
Neovastat (AE-941)	MMP-2, -9, -12, VEGF	Phase III
Rebimastat (BMS-275291)	MMP-1, -2, -8, -9, -13, -14	Phase III
Metastat (COL-3)	MMP-2, -9	Phase I
Tanomastat (Bay 12-9566)	MMP-2, -9	Phase III
<b>Inhibiteurs de l'adhésion cellulaire</b>		
MEDI-522 (Abegrin®)	Intégrines $\alpha v \beta 3$	Phase II
Cilengitide (EMD 121974)	Intégrines $\alpha v \beta 3$ et $\alpha v \beta 5$	Phase II
<b>Inhibition des cellules endothéliales activées</b>		
ABT-510	Cellules endothéliales CD36	Phase II
TNP-470	Inhibition de la prolifération cellulaire	Phase I
Combretastatine A-4 (CA4P)	Induction de l'apoptose des CE	Phase II
Thalidomide	TNF- $\alpha$	AMM
Anginex	Inhibition de la migration et de la prolifération cellulaire	Précliniques
<b>Anticorps monoclonaux</b>		
Bevacizumab (Avastin®)	VEGF-A	AMM
IMC-1C11	VEGFR-2	Phase I
2C3	VEGF-A	Précliniques
<b>Inhibiteurs des RTKs</b>		
Vatalanib PTK-787	VEGFR-1, -2	Phase III
ZD6474 ( Zactima® )	VEGFR-1, -2, -3, EGFR	AMM en 2009 (cancer du poumon)
Semaxanib (SU5416)	VEGFR-2	Stoppés
SU6668	VEGFR-2, FGFR-1, PDGFR	Phase II
Sunitinib (SU11248, Sutent®)	VEGFR-1, VEGFR-2, PDGFR	AMM
Sorafenib (Nexavar®)	VEGFR-1, -2, PDGFR	AMM en 2005 (cancer du rein métastatique)
AMG 706	VEGFR-1, -2, -3	Phase II
Cediranib (AZD 2171, Recentin®)	VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3	Echec dans un essai clinique de phase II/III pour le traitement du cancer colorectal métastatique en 2010. Phase III (traitement du glioblastome récurrent)
BIBF1120	VEGFR-2, PDGFR, FGFR et c-Kit	Phase III (cancer bronchique non à petites cellules)
Telatinib	VEGFR-2, VEGFR-3 et c-Kit	Phase II/III (cancer gastrique)
CP-547,632	VEGFR-2 et FGFR	Phase II
Axitinib	VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR et c-Kit	Phase II/III
<b>Autres</b>		
CBO-P11	VEGFR-1, -2 et FGFR-1	Précliniques
RPI 4610 (Angiozyme®)	VEGFR-1	Phase II
VEGF-Trap (AVE0005)	VEGF-A, PlGF	Phase III
VGA1155	VEGFR-2	Précliniques

Tableau 6. Inhibiteurs angiogéniques et leurs cibles (adapté d'après <sup>(121)(122)</sup>).

La vision simpliste du rôle de l'angiogenèse dans le développement tumoral bute sur certaines observations cliniques<sup>(123)</sup>. En effet, ceux-ci résultent en fait de problèmes méthodologiques liés à la conception d'essais cliniques adaptés aux molécules anti-angiogéniques<sup>(124)</sup>. Pour conclure, la monothérapie anti-VEGF (anticorps monoclonaux) n'a montré aucune efficacité en clinique, contrairement aux modèles animaux précliniques. L'administration d'inhibiteurs de kinases actifs vis à vis des récepteurs au VEGF ne montrent aucun bénéfice en association avec la chimiothérapie contrairement à l'association avec les anticorps anti-VEGF.

Concernant la survenue d'effets secondaires avec des molécules anti-angiogéniques, le risque n'est pas nul<sup>(125)(126)</sup>, car le degré d'angiogenèse (évalué par mesure de la densité capillaire) dans certaines conditions physiologiques est supérieur à celui trouvé dans certaines tumeurs humaines<sup>(127)(128)</sup>. Ces molécules peuvent perturber le rôle de l'angiogenèse chez l'adulte dans des phénomènes de cicatrisation tissulaire et d'adaptation des tissus à une hypoxie ou une inflammation locale.

## **2. THERAPIE ANTI-NEOVASCULAIRE**

Cette démarche consiste à développer des molécules qui vont spécifiquement détruire la vascularisation nouvellement formée des tumeurs et non pas à inhiber la formation de nouveaux vaisseaux. On distingue trois grandes stratégies : le ciblage vasculaire, la thérapie métronomique et la thérapie photodynamique.

### **2.1) Le ciblage vasculaire**

Le concept de ciblage de la vascularisation tumorale est lié à l'anti-angiogenèse, mais l'approche est différente, puisque l'objectif est de détruire une vascularisation déjà en place. Il repose sur la constatation que la vascularisation tumorale diffère structurellement et au niveau moléculaire de la vascularisation normale. En effet, les cellules endothéliales associées aux tumeurs sont caractérisées par les marqueurs qu'elles peuvent exprimer contrairement aux cellules endothéliales quiescentes. Ces marqueurs sont les antigènes, les

récepteurs aux facteurs de croissance parmi lesquels : les intégrines  $\alpha_v\beta_3$ , les récepteurs Tie, les récepteurs des éphrines et ceux du VEGF<sup>(129)</sup>.

L'objectif est d'amener un effecteur ou un agent cytotoxique spécifiquement au niveau de la vascularisation des tumeurs solides pour empêcher l'irrigation de la tumeur. Les travaux menés au cours de mon projet de fin d'études à l'ENSIC, consistaient à explorer la voie de ciblage des VEGFR. En effet, la destruction des néovaisseaux peut se faire en utilisant des systèmes particuliers qui comportent à la fois, des molécules capables de reconnaître spécifiquement les VEGFRs, et une ou des substances actives possédant un potentiel cytotoxique.

Les molécules servant à cibler les VEGFR peuvent être de différentes natures. Il est possible d'utiliser le VEGF lui-même, des anticorps<sup>(130)</sup> ou des peptides<sup>(131)(132)</sup>. Les peptides représentent des molécules intéressantes pour des stratégies de ciblage notamment par rapport à l'utilisation d'anticorps. En effet, le risque immunogène est plus faible. De plus, l'attractivité des peptides repose sur leur petite taille qui facilite la diffusion dans les tissus, et également sur leur facilité de synthèse<sup>(133)</sup>. Néanmoins, on peut prévoir un manque de stabilité des peptides *in vitro* et *in vivo* qui pourrait compromettre la stratégie de ciblage. Pour permettre d'améliorer leur temps de circulation et leur affinité par une stratégie de multivalence, les peptides sont greffés sur des polymères comme le PEG (Poly-éthylène-glycol). Ainsi, les peptides peuvent être présentés à la surface de tout type de vecteur (*cf. Chapitre II, paragraphe 2*), ce qui peut par contre les rendre immunogènes. Dans le tableau 7 figure quelques exemples de peptide ciblant les récepteurs au VEGF décrits dans la littérature.

Peptide	Cibles	Identification	Agoniste/ Antagoniste
ATWLPPR	<b>NRP-1, NRP-2</b>	Phage display	<b>Antagoniste</b> <sup>(134)</sup>
TKPPR	<b>NRP-1</b>	Dérivé de tuftsine (TKPR)	<b>Antagoniste</b> <sup>(135)</sup>
SCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPR R (EG3287)	<b>NRP-1</b>	VEGF (exons 7-8)	<b>Antagoniste</b> <sup>(136)</sup>
CSCCKNTDSRCKARQLELNERTCRC- amide	<b>NRP-1</b>	VEGF (exon 7)	<b>Antagoniste</b> <sup>(137)</sup>
NGYEIEWYSWVTHGMY (SP5.2)	<b>Flt-1</b>	Phage display	<b>Antagoniste</b> <sup>(138)</sup>
GNQWFI	<b>Flt-1</b>	Screening de peptides	<b>Antagoniste</b> <sup>(139)</sup>
Ac-KLTWQELYQLKYKGI-amide (QK)	<b>KDR, Flt-1</b>	Conception rationnelle à partir du VEGF (exon 3)	<b>Agoniste</b> <sup>(131)</sup>
SYGRKKRRQRRRAPQ	<b>KDR, Flt-1</b>	HIV TAT 46–60	<b>Agoniste</b> <sup>(140)</sup>
HTMYHHYQHHL (K237)	<b>KDR</b>	Phage display	<b>Antagoniste</b> <sup>(141)</sup>
WHSDMEWWYLLG (F56)	<b>Flt-1</b>	Phage display	<b>Antagoniste</b> <sup>(142)</sup>
QKRKRKKSRYKS	<b>KDR, NRP-1</b>	VEGF (exon 6)	<b>Antagoniste</b> <sup>(143)</sup>
cycle(fPQIMRIKPHQGQHIGE) (Cyclo-VEGI)	<b>KDR, Flt-1</b>	Conception rationnelle à partir du VEGF (exon 4)	<b>Antagoniste</b> <sup>(144)</sup>
CPQPRPLC	<b>Flt-1, NRP-1</b>	Homologies avec le VEGF- B <sub>167</sub> et le VEGF- B <sub>186</sub>	(145)

Tableau 7. Principaux peptides ciblant les récepteurs au VEGF<sup>(146)</sup>.

En lisant ce tableau, nous pouvons poser quelques questions. En effet, la première concerne la méthode d'identification de ces peptides. Ces peptides ont été identifiés par des stratégies rationnelles, à partir de la séquence du VEGF, d'autres par des stratégies de *screening*, de type *phage display*, et les peptides concernés peuvent alors ne présenter aucune homologie apparente de séquence en acides aminés avec le VEGF. La deuxième question qui peut être posée est celle sur le choix du ciblage des NRP-1. En effet, si le ciblage du VEGFR-2, principal récepteur du VEGF en termes de transduction du signal, semble un choix logique, il peut s'avérer également intéressant de cibler les co-récepteurs du VEGF, comme la NRP-1 qui sont également internalisés<sup>(147)</sup>, comme les VEGFR-2. Des cellules endothéliales en culture comportent environ 3 000 molécules de VEGFR-1 et 40 000 molécules de VEGFR-2

<sup>(129)</sup>. Par contre, certaines lignées de cancer du sein (MDA-MB-231) ou de la prostate (PC3) expriment de l'ordre de 1 200 000 copies de NRP-1 <sup>(148)</sup> .

Le peptide ATWLPPR fait l'objet de quelques travaux de recherche notamment dans le domaine de la thérapie photodynamique. Les résultats de recherches concernant le ciblage du co-récepteur NRP-1 par un PS couplé à ce peptide sont évoqués dans le *paragraphe 2.3.2.*

## **2.2) La thérapie métronomique**

Un protocole de chimiothérapie est classiquement élaboré selon le principe de la recherche de la dose maximale tolérée (DMT). Cette démarche a été poussée aux extrêmes limites avec les intensifications de dose. Ceci cause des dommages non seulement aux cellules en forte prolifération, *i.e.* cellules cancéreuses, mais également à certaines cellules normales, comme les cellules hématopoïétiques. Afin de permettre aux cellules normales de reprojiférer, il est alors nécessaire de laisser un temps suffisant entre deux traitements. Ceci induit également une reprojifération des cellules tumorales et par voie de conséquence, une reformation des néovaisseaux tumoraux. Même si ce type de protocole conduit souvent à de bonnes réponses (diminution du volume tumoral) à court terme, il est accompagné de sérieux effets secondaires, et d'une reprise de la croissance tumorale. Par ailleurs, des phénomènes de résistance aux agents anticancéreux peuvent survenir <sup>(149)</sup>.

Le concept métronomique, qui se distingue des autres schémas de type "dose-dense", a nécessité un changement de paradigme. En effet, la cible n'est plus directement la cellule tumorale, mais la cellule endothéliale activée en forte prolifération. Les molécules de chimiothérapie sont administrées à doses réduites, répétées à la façon d'un métronome<sup>(150)</sup>.

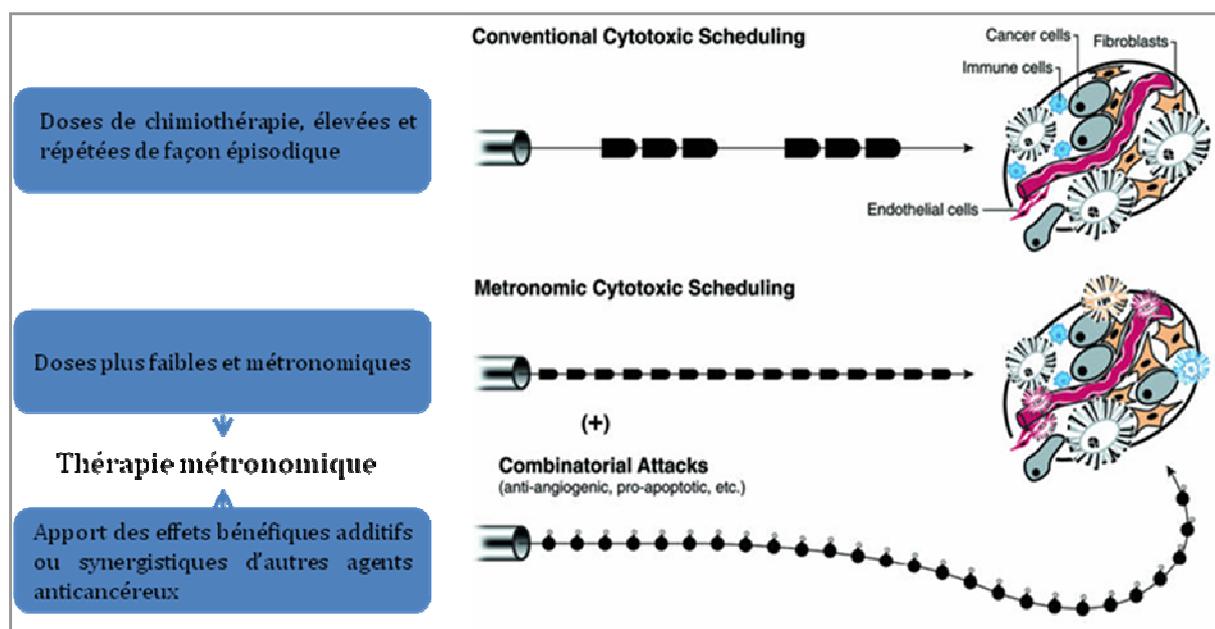


Figure 13. Comparaison du protocole de chimiothérapie traditionnel avec le protocole métronomique, en combinaison ou non avec d'autres molécules <sup>(151)</sup>.

La chimiothérapie métronomique permet d'éviter l'apparition de résistance à l'agent anticancéreux et diminue sa toxicité habituellement associée (alopécie, toxicité médullaire, vomissements et autres toxicités organiques), elle représente ainsi une alternative intéressante à la chimiothérapie traditionnelle en pédiatrie. Dans la littérature, il ya plusieurs protocoles évaluant cette thérapie dans les tumeurs pédiatriques. Parmi les molécules concernées par ce type d'administration, on peut citer tamoxifène, célécoxib et cyclophosphamide. Les données précliniques suggèrent que la thérapie métronomique serait plus efficace en combinaison avec un agent anti-angiogénique <sup>(152)(153)</sup>.

## 2.3) La thérapie photodynamique

### 2.3.1) Principe

Le principe de la thérapie photodynamique (PDT) repose sur la réaction photochimique résultant de l'activation d'un photosensibilisateur (PS). En effet, ce dernier sous l'action de la lumière à une longueur d'onde spécifique et en présence d'oxygène, induit

la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène qui vont détruire les cellules <sup>(154)</sup>. La PDT se distingue de la photochimiothérapie (Psoralen-UVA (PUVA)-thérapie du psoriasis) qui n'implique pas l'oxygène et de la photothérapie où la lumière agit seule (traitement de l'ictère néonatal).

L'activité d'un PS se caractérise par son rendement quantique en état triplet à la longueur d'onde d'excitation considérée. La longueur d'onde de la lumière d'excitation est choisie en fonction de la fenêtre optique des tissus ( $600 \text{ nm} < \lambda < 800 \text{ nm}$ ) et le spectre d'absorption du PS. Les sources de lumière sont des lasers, des diodes laser ou des lampes filtrées. La lumière est amenée par une fibre optique dans le cas des lasers et est distribuée par un diffuseur qui permet une illumination homogène du site à traiter. L'intensité de la lumière s'exprime en  $\text{W.cm}^{-2}$ , la dose de lumière ou fluence s'exprime quant à elle en  $\text{J.cm}^{-2}$ .

### 2.3.2) Application

La thérapie photodynamique est utilisée dans le cas des tumeurs accessibles directement (tumeurs cutanées) ou par voie endoscopique (vessie, œsophage), du fait de l'utilisation d'une lumière peu pénétrante dans les tissus. Il est également possible d'utiliser la PDT dans le traitement des tumeurs solides (prostate, foie) en insérant les fibres optiques directement dans la tumeur<sup>(155)</sup>. La PDT est actuellement utilisée en traitement curatif des cancers superficiels à des stades précoces ou en traitement palliatif (après échec de la radiothérapie et de la chirurgie).

Les principaux photosensibilisateurs ayant une AMM sont résumés dans le tableau suivant.

DCI	Nom commercial	$\lambda_{max}$	Dose de PS (mg/Kg)	Intervalle Drogue-lumière (h)	Fluence (J/cm <sup>2</sup> ), Irradiance (J/cm <sup>2</sup> )	Indications
Porfimer sodium	<b>Photofrin®</b> , Axcan Pharma	630 nm	2	48-72	100-200, 100	Rechutes des cancers bronchiques non à petites cellules et de l'œsophage (AMM en France en 1996)
Acide 5-aminolévulinique/ALA  Photocure, ester de ALA et précurseur de la Protoporphyrine IX (PpIX)	<b>Levulan®</b> DUSA Pharmaceuticals  <b>Metvix®</b>	635 nm (PpIX)	20%, topique	3-6	100, 100-150	<b>Levulan®</b> : kératoses actiniques (approuvé par la FDA an 2000) ; <b>Metvix®</b> : kératoses actiniques et carcinome basocellulaire (AMM européenne en 2000)
Témoporfine	<b>Foscan®</b> Biolitec	652 nm	0,1-0,15	96	10-20, 100	Cancers de la tête et du cou (AMM en Europe, Norvège et Islande : 2001)
Verteporfin (BPD-MA)	<b>Visudyne®</b> Novartis	690 nm	0,2-0,6	0,1-0,25	50-100, 600	DMLA dans sa forme Exsudative, présentant une néovascularisation choroïdienne (NVC) rétrofovéolaire à prédominance visible (AMM en 2002)

Tableau 8. Principaux photosensibilisateurs ayant une AMM <sup>(156)</sup>.

### 2.3.3) Conception de nouveaux PS ciblant les cellules endothéliales

L'effet anti-vasculaire est un des effets recherchés par la thérapie photodynamique. La potentialisation de cet effet passe par l'utilisation de nouvelles générations de PSs. En effet, la 3<sup>ème</sup> génération est constituée de PSs modifiés en additionnant de groupements chimiques (anticorps, ligands, sucres, protéines), de manière à conférer à ces PSs une sélectivité pour les cellules endothéliales des néovaisseaux tumoraux, et donc aboutir à une destruction de ceux-ci lors de l'irradiation lumineuse. Ce concept permet d'améliorer la sélectivité contrairement aux PSs de 1<sup>ère</sup> <sup>(157)</sup> et 2<sup>ème</sup> génération.

Plusieurs travaux ont été réalisés sur les PSs de troisième génération. En effet, des études comparatives en termes d'affinité cellulaire et de sélectivité tumorale ont été effectuées

entre un PS libre (tétraphénylchlorine, TPC) et un PS conjugué (couplage de TPC à un heptapeptide (ATWLPPR) via un bras espaceur (acide amino hexanoïque, Ahx). Il a été démontré dans un premier temps que la TPC ne présentait aucune affinité vis-à-vis de NRP-1, contrairement à TPC-Ahx-ATWLPPR sur les HUVEC exprimant NRP-1<sup>(158)</sup>. Ce résultat a été également confirmé sur une autre lignée sur-exprimant NRP-1 (MDA-MB-231)<sup>(159)</sup>. Sur cette dernière lignée l'implication de NRP-1 dans l'incorporation cellulaire de ce PS conjugué a été quantifiée. En effet, ces récepteurs permettent une amélioration de l'incorporation d'un facteur de 10.

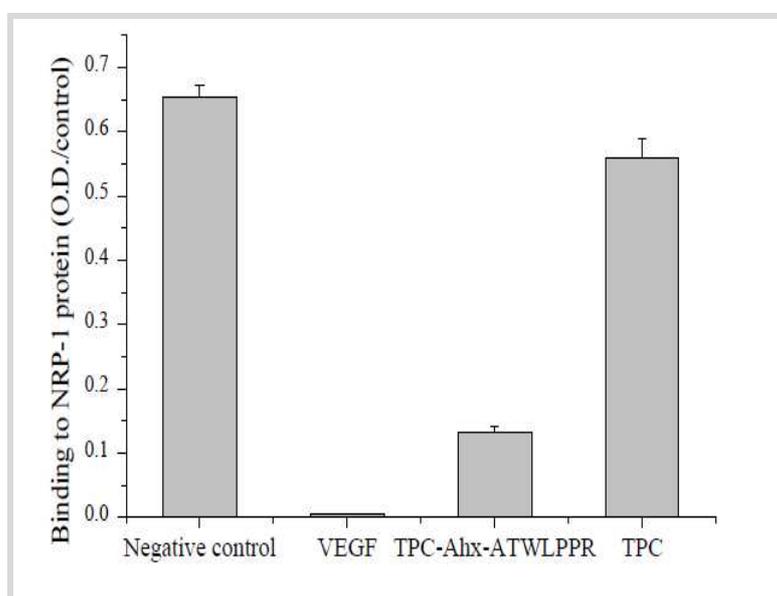


Figure 14. Liaison du PS (TPC) et du PS conjuguée (TPC-Ahx-ATWLPPR) au co-récepteur NRP-1<sup>(159)</sup>.

Par contre, sur cette lignée mais partiellement réprimée en termes d'expression de NRP-1 par une technique d'ARN interférence, l'incorporation est diminuée de 50%<sup>(140)</sup>.

Une étude intéressante concerne cette fois-ci la stabilité *in vitro* et *in vivo* du PS conjugué (TPC-Ahx-ATWLPPR)<sup>(160)</sup>. Si la portion peptidique du PS conjugué est stable dans du plasma *in vitro*, elle est progressivement dégradée *in vivo*, chez la souris, au niveau de la liaison peptidique située entre les résidus alanine et thréonine. Cette dégradation a principalement lieu dans le foie, où le PS conjugué s'accumule à des taux élevés. TPC-Ahx-A

a été identifié en étant le principal produit de dégradation formé, par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Néanmoins, le PS conjugué est stable dans le milieu de culture des cellules endothéliales, mais dégradé après incorporation intracellulaire, par des peptidases lysosomales.

Des travaux concernant la pharmacocinétique et la distribution ont également été faits sur ce PS conjugué <sup>(161)</sup>. L'élimination de la TPC-Ahx-ATWLPPR s'est révélée rapide à partir du compartiment sanguin que le Foscan®. Le conjugué est présent à des taux élevés dans la tumeur et faible dans la peau. L'accumulation du conjugué est importante dans les organes du système réticuloendothélial où le processus de dégradation de la partie peptidique est majoritaire. TPC-Ahx-A a été observé dès 2 h dans le plasma. Ce produit de dégradation a perdu toute sélectivité et est moins rapidement éliminé, notamment dans la peau.

La figure ci-dessous montre par fluorescence la localisation du PS conjugué au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins.

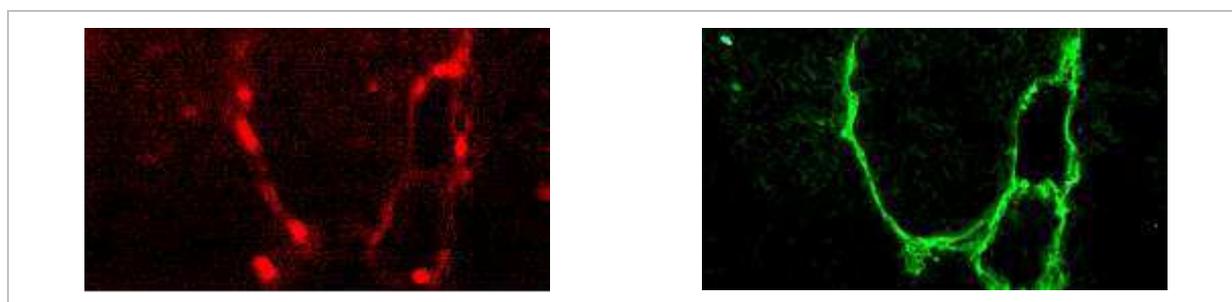


Figure 15. Coupe transversale d'une tumeur cérébrale portée par une souris *nude*. En rouge : PS conjugué, en vert : vaisseaux sanguins de la tumeur <sup>(161)</sup>.

L'action anti-vasculaire de TPC-Ahx-ATWLPPR a été validée sur un modèle de gliome malin humain xénotransplanté en ectopique chez la souris *nude*. Les conditions de traitement ont été optimisées par une méthodologie de plan d'expérience <sup>(162)</sup>. Le délai entre l'administration du photosensibilisateur et l'irradiation est fixé pour atteindre une concentration intravasculaire tumorale maximale et une moindre dégradation de l'entité peptidique du conjugué. Durant la PDT, l'effet anti-vasculaire se caractérise par une diminution du flux sanguin tumoral (d'environ 50%). L'efficacité de la photodynamique avec

la TPC-Ahx-ATWLPPR a permis d'aboutir à un retard de croissance statistiquement significatif<sup>(159)</sup>.

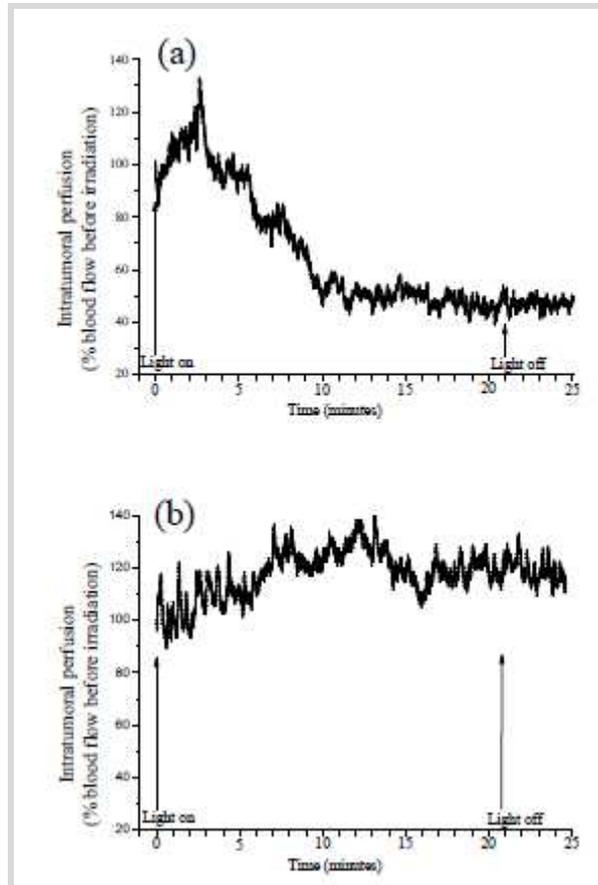


Figure 16. Suivi de flux sanguin microvasculaire pendant PDT. (a) avec un PS conjugué, (b) avec un PS libre<sup>(159)</sup>.

D'autres peptides ont été synthétisés pour stabiliser la liaison entre alanine et thréonine. Les modifications entre les résidus Ala et Thr du peptide ATWLPPR ne sont pas préjudiciables à l'affinité vis-à-vis des NRPs. De plus, le PS conjugué au peptide possédant une liaison peptidique réduite entre ces deux peptide ( $A_{\psi} [CH_2NH] TWLPPR$ ) est stable 4 h après injection. Ce résultat extrêmement prometteur indique qu'en utilisant la TPC-Ahx- $A_{\psi} [CH_2NH]TWLPPR$  nous ne devrions pas avoir d'incorporation non spécifique due à la dégradation de la partie peptidique<sup>(163)</sup>.

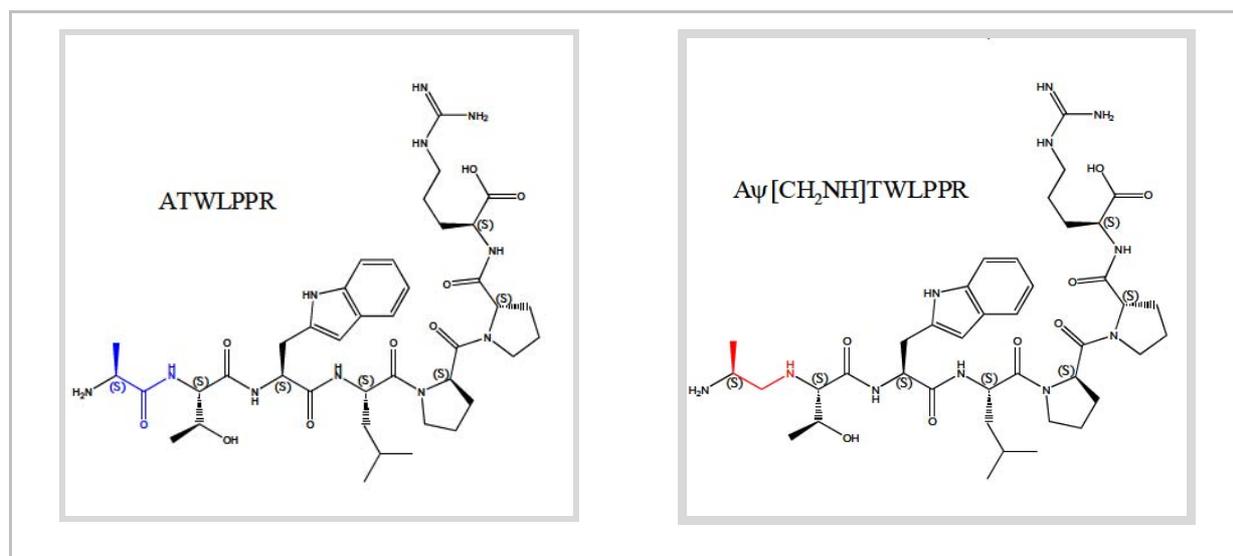


Figure 17. Structure chimique du peptide ATWLPPR et du pseudopeptide A $\Psi$ [CH<sub>2</sub>NH]TWLPPR <sup>(164)</sup>.

Les nanoparticules de troisième génération représentent une alternative intéressante pour améliorer cette stratégie de ciblage de neuropiline-1. En effet, ces vecteurs pourront être fonctionnalisés par des pseudopeptides et par voie de conséquence, réduire les phénomènes non spécifiques résultant de la diminution d'affinité des peptides pour NRP-1 suite au couplage avec le cytotoxique. Ils permettent également d'améliorer la dispersion et la sélectivité de ces molécules photoactives ou d'autres cytotoxiques en évitant une grande capture par le système SPM (réduire l'hydrophobicité de la surface). Ils représentent un excellent moyen pour le traitement des tumeurs cérébrales guidé par imagerie (élément constituant le cœur se comporte comme un agent de contraste). L'élargissement du ciblage de la photodynamique en utilisant des vecteurs comme les nanoparticules font actuellement l'objet de plusieurs travaux. Les différents vecteurs de médicament y compris les nanoparticules sont détaillés dans le chapitre suivant.



**CHAPITRE II :**

**LA VECTORISATION PAR LES NANOPARTICULES : UN NOUVEAU  
MOYEN DE THERAPIE CIBLEE ANTI-VASCULAIRE**

## I) LA VECTORISATION DE MEDICAMENT

### 1. DEFINITION DE LA VECTORISATION

Le concept de vectorisation des médicaments consiste à véhiculer une substance chimique biologiquement active du site d'administration vers le site actif. Cet adressage peut se faire de manière spécifique ou non, au moyen d'un vecteur hydrophile ou hydrophobe n'exerçant aucune action thérapeutique. Le vecteur permet au principe actif de franchir les barrières biologiques. Ces barrières sont des systèmes très complexes faisant intervenir plusieurs éléments (épithélium, endothélium, membrane cellulaire) et plusieurs composantes (barrières mécaniques ou physico-chimiques et barrières enzymatiques). Ce sont les propriétés du vecteur et non celles du principe actif qui détermineront le sort du système *in vivo*.

Les enjeux de la pharmacie galénique moderne sont donc la mise au point de systèmes d'administration permettant d'assurer un ciblage de la substance active et un traitement moins agressif, une meilleure biodisponibilité, une mise à disposition progressive, et dans certains cas, d'améliorer le passage de différentes barrières naturelles dans l'organisme tout en protégeant le principe actif, notamment face aux nombreuses enzymes de dégradations.

### 2. GENERATION DE VECTEURS DE MEDICAMENTS

Il existe plusieurs classifications des vecteurs. Il y a vingt ans, une étude a permis de les classer en trois générations selon leur taille et l'application recherchée<sup>(165)</sup>. Actuellement, les vecteurs sont toujours classés en trois générations, mais en fonction de leur biodisponibilité *in vivo*<sup>(166)</sup>.

#### 2.1) Vecteur de première génération : les vecteurs hépato-splénique

Les vecteurs de la première génération sont des systèmes colloïdaux développés spécialement en vue de leur utilisation thérapeutique. Ces systèmes sont classés selon la

nature des éléments qui les constituent et leur structure. On distingue ainsi les liposomes, les nanosphères, et les nanocapsules.

### 2.1.1) Les liposomes

Ils sont apparus il y a quarante ans et ont été les premiers à être utilisés comme vecteur de médicaments. Ce sont de petites vésicules sphériques, dont la paroi est composée par une ou plusieurs bicouches phospholipidiques qui entourent une cavité centrale de nature hydrophile. Le diamètre de ces structures est compris entre 20 nm à 1  $\mu\text{m}$ .

Les liposomes sont destinés à transporter des principes actifs de nature hydrophile sous forme dissoute dans la phase aqueuse centrale, ou de nature hydrophobe par insertion dans la bicouche. Les matières premières qui constituent ces structures sont des composés naturels qui rendent les liposomes biocompatibles.

Les liposomes représentent d'intéressants vecteurs de PSs en PDT du fait de leur nature amphiphile et de leur compatibilité avec les systèmes biologiques. L'encapsulation des PSs dans des vésicules liposomales permet d'augmenter leur perméabilité et leur rétention. Le Foslip® est une forme liposomale (DPPC) de la *m*-THPC facilitant son administration par voie intra-veineuse. Une étude récente a montré une différence de temps de vie de fluorescence entre le Foscan® et le Foslip® (6,6 *versus* 8,4 ns) traduisant une différence de localisation cellulaire <sup>(167)</sup>. De nombreux autres systèmes liposomaux ont été étudiés en PDT. En règle générale, ils permettent d'améliorer l'incorporation cellulaire et de diminuer les phénomènes d'agrégation <sup>(168)(169)</sup>.

Les liposomes présentent quelques inconvénients. En effet, ces espèces sont instables chimiquement (oxydation et hydrolyse des phospholipides) et physiquement (agrégation, fusion et perte du contenu).

### 2.1.2) Les nanosphères

Les premières nanosphères ont été obtenues en 1976 <sup>(170)</sup>. Elles étaient composées de polyacrylamide réticulé, un polymère non biodégradable. Par la suite d'autres travaux ont

permis de développer des systèmes biodégradables à base de PACA<sup>(171)</sup>. Les nanosphères sont des structures matricielles, de forme sphérique.

Le principe actif est soit incorporé à l'intérieur du réseau polymère durant la formation des nanosphères, soit adsorbé à leur surface par l'intermédiaire de liaison de type hydrophobe, électrostatique ou covalente. Il est libéré par simple diffusion ou à la suite de la (bio) dégradation du polymère dans l'organisme.

### **2.1.3) Les nanocapsules**

Les nanocapsules sont des structures réservoirs sphériques. Elles sont constituées d'un cœur généralement huileux entouré par une mince paroi de polymère dont l'épaisseur n'excède pas quelques nanomètres. Comme dans le cas précédent, le principe actif est généralement dissous dans le cœur huileux, ou adsorbé à la surface des nanocapsules.

Après administration intraveineuse, les opsonines, des protéines cationiques plasmatiques, s'adsorbent rapidement à la surface des vecteurs particuliers qui présentent généralement en surface une hydrophobie et une charge de surface négative. Cette opsonisation favorise leur capture par les organes du SPM comme le foie, la rate, le rein et MO. Ces systèmes sont réservés pour le traitement de certaines infections sur SPM.

## **2.2) Vecteurs de 2ème génération : les vecteurs « furtifs »**

L'adsorption des protéines plasmatique sur les vecteurs est un phénomène complexe gouvernée par plusieurs facteurs. L'hydrophobie et la charge des particules sont les principaux paramètres. En effet, de nombreuses études ont conclu, que plus la surface de ces vecteurs est hydrophobe, plus la quantité des protéines adsorbées est grande<sup>(172)(173)</sup>. Les charges peuvent être attractives ou répulsives. Si la densité des charges est supérieure à une certaine limite, elles permettent d'accélérer l'adsorption par interaction électrostatique.

Pour avoir une bonne répartition du principe actif dans l'organisme, et non une accumulation dans la sphère hépatique, une modification de surface de ces vecteurs s'impose. Cette étape est importante et consiste en une hydrophilisation de la surface de nanoparticules, par un polymère amphiphile. Ceci se fait le plus souvent par adsorption physique (interactions hydrophobes, liaison hydrogène ou interaction ionique). La fixation chimique de polymères hydrophiles consiste en un greffage de chaînes hydrophiles par liaisons covalentes à la surface des particules. Ce mode de fonctionnalisation est plus stable. L'hydrophilisation des surfaces sera détaillée dans *le paragraphe III*.

De manière générale, l'hydrophilisation par des polymères non ioniques et flexibles permet d'obtenir une couche hydrophile à la surface des particules. Cette modification de surface confère aux vecteurs le caractère furtif. En effet, ces vecteurs deviennent difficilement repérables par les macrophages.

### **2.3) Vecteurs de 3<sup>ème</sup> génération : les vecteurs à reconnaissance moléculaire**

Les vecteurs de 2<sup>ème</sup> génération permettent de contrôler la libération du principe actif, de diminuer le nombre de prise en prolongeant la durée de vie du médicament. Par contre, ces vecteurs ne permettent pas d'avoir un ciblage, ce qui est indispensable dans le cas d'utilisation des substances relativement toxiques tels que les agents de chimiothérapie.

Les vecteurs de 3<sup>ème</sup> génération ont été développés dans l'optique de mettre au point de nanoparticules capables de véhiculer le principe actif jusqu'au site d'action désiré. Ce concept permet de mettre en place un traitement ciblé avec les notions combinées de furtivité et de ciblage. Ces vecteurs se divisent en deux types : vecteurs de ciblage tissulaire ou cellulaire. A la différence des vecteurs de 2<sup>ème</sup> génération, ces vecteurs possèdent une structure supramoléculaire : des ligands (anticorps, peptides, sucres, acide folique) <sup>(166)</sup> sont fixés à la surface des vecteurs « furtifs ». Ces ligands sont capables de reconnaître de manière sélective des marqueurs spécifiques (antigènes ou récepteur) qui sont sur-exprimés à la surface de cellules cibles (cellules cancéreuses, cellules infectées, etc.).

Ce type de ciblage constitue la nouvelle génération de médicament, ou on différencie deux phases : étape de reconnaissance de la cible et étape de l'action thérapeutique propre à la molécule véhiculée par ce vecteur.

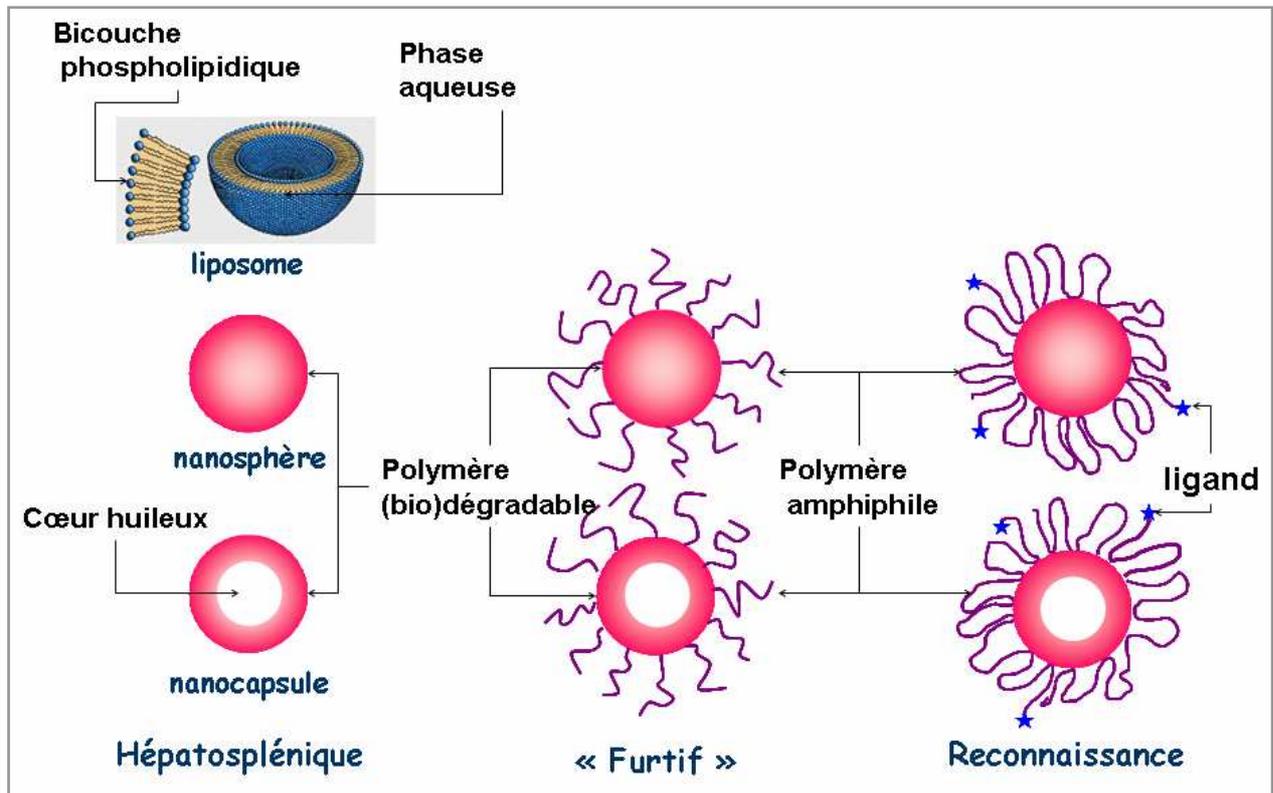


Figure 18. Génération de vecteurs de médicaments.

### 3) EXEMPLES DE VECTEURS UTILISES EN CLINIQUE

De nombreux vecteurs sont actuellement en cours d'études précliniques et cliniques. Ce sont principalement des liposomes incorporant des molécules hydrophiles, ou des nanoparticules solides à base de lipides, de protéines ou de polymères biodégradables encapsulant des molécules lipophiles. Parmi les molécules sur le marché, on peut citer DaunoXome® (NeXstar Pharmaceuticals, Inc.). Il s'agit de liposomes encapsulant de la daunorubicine, cette forme a été approuvée en 1997. L'antifongique, Amphotéricine B, est également commercialisé sous forme liposomale depuis 1999 sous le nom AmBisome®

(Gilead Sciences / Fujisawa Healthcare). Le principe actif fait partie intégrante de la bicouche lipidique. Myocet® (Europe) et Doxil®(USA) sont des formes liposomales de la doxorubicine. Cette dernière est également disponible sous forme liposomale comportant des agents de furtivité (Caelix®, Johnson & Johnson Alza). En 2005, le laboratoire Baxter Healthcare a mis sur le marché l'Abraxane®, une particule à base d'albumine renfermant la paclitaxel pour le traitement du cancer du sein.

On trouve également sur le marché des nanoparticules inorganiques à vocation diagnostique. En effet, d'Endorem® (Laboratoire Guerbet), est constitué de particules d'oxydes de fer de 5 à 6 nm de diamètre enrobées par une couche de dextrane (augmentant la furtivité) pour aboutir à des particules d'environ 100 nm de diamètre. Cet agent de contraste est utilisé pour visualiser les lésions du foie dans le cas des tumeurs et métastases hépatiques.

#### 4. AVANTAGES DE LA VECTORISATION DE MÉDICAMENTS

La vectorisation de médicaments présente plusieurs avantages, certains ont été décrits précédemment. Les principaux bénéfices de ce concept sont énumérés ci-dessous :

- **Protection du principe actif.** La substance active se trouve à l'abri de l'inactivation chimique, biochimique, enzymatique ou immunologique que la substance active nue est susceptible de subir.
- **Amélioration de la pharmacocinétique.** Le concept de vectorisation permet une libération contrôlée de la substance active, et donc de garder sa concentration dans la zone d'efficacité thérapeutique, entre  $C_{\min}$  et  $C_{\max}$ . La vitesse de libération de la substance active est fonction de la dégradation du vecteur, donc dépend de la sensibilité des composants structuraux du vecteur vis-à-vis des enzymes, pH et température.
- **Réduction des effets secondaires non désirés.** Les nanoparticules peuvent transporter directement les médicaments vers leur cible, évitant des phénomènes de métabolisme, d'élimination ou de toxicité.

Dans le traitement des cancers, l'efficacité thérapeutique est proportionnelle à la quantité injectée, or les traitements sont composés de substances toxiques. L'utilisation des nanoparticules permet de réduire les effets toxiques, tout en assurant une quantité suffisante de ces substances dans le site actif.

- **Ciblage thérapeutique.** La vectorisation peut garantir une libération sélective et spécifique, par l'intermédiaire des ligands (à la surface des vecteurs) susceptibles d'interagir avec des cellules cibles.

Grâce à cette possibilité de ciblage, le champ d'utilisation des nanoparticules dans le domaine biomédical est très vaste. Citons la délivrance de médicaments (traitement ciblé), le transfert de gènes, l'imagerie, la destruction de tumeur (chimique ou hyperthermique).

## 5. ELEMENTS CONSTITUTIFS DES VECTEURS (POLYMERES)

### 5.1) Les caractéristiques requises d'éléments constitutifs des vecteurs

- **Biocompatibilité :** les polymères qui rentrent dans la composition des vecteurs, doivent être biocompatibles, non cancérogènes, non immunogènes, non toxiques ainsi que leurs produits de dégradation.
- **Masse Molaire :** les polymères doivent présenter une masse molaire ne dépassant pas 60-70 kDa, pour qu'ils puissent passer le filtre glomérulaire, ceci pour les polymères à métabolisme rénal.
- **Elimination par les voies naturelles.**

### 5.2) Classification des polymères

On peut classer ces polymères selon différents critères. La classification la plus judicieuse est de les différencier selon leur origine, ensuite selon la structure chimique.

### 5.2.1) D'origine naturelle

Les polymères naturels sont de deux types, les protéines (albumine, gélatine)<sup>(174)</sup>, et les polysaccharides (dextrane, alginate, chitosane, cellulose)<sup>(175)(176)</sup>. Les polysaccharides sont les plus utilisés, car en général, ils répondent aux critères cités dans le paragraphe précédent. En effet, les polysaccharides sont biocompatibles, biodégradables, leurs produits de dégradation sont facilement éliminés par les voies naturelles. Ils sont également hydrophiles, c'est pourquoi ils sont généralement utilisés pour constituer la couche hydrophile des vecteurs furtifs. Parmi les polysaccharides utilisés pour la vectorisation de médicaments, le dextrane est de loin le plus employé. Une présentation plus détaillée de ce polymère est décrite dans *le paragraphe IV*.

### 5.2.2) Polymères synthétiques

Dans la vectorisation de médicaments, les polymères synthétiques peuvent être utilisés, à condition qu'ils répondent aux critères cités dans *le paragraphe 4.1*. Parmi ces polymères, on peut citer les polyesters aliphatiques (PGA, PLA), les dérivés de type méthacrylate (PMMA), le polyalkylcyanoacrylate (PACA) et le polyoxy d'éthylène. Ces polymères présentent certains avantages par rapport aux polymères naturels. En effet, par le biais de la chimie des polymères, les propriétés mécaniques, viscoélastiques ou tensioactives peuvent être relativement contrôlées.

## II) METHODES DE PREPARATION DE NANOPARTICULES

Les méthodes de préparation de nanoparticules sont diverses. On peut différencier ces techniques en deux classes. En effet, dans le premier groupe, les nanoparticules sont formées par polymérisation de monomères en émulsion. L'incorporation de(s) principe(s) actif(s) peut se faire pendant ou après la préparation de la dispersion de polymères. Tandis que dans l'autre groupe, les nanoparticules sont préparées à partir de polymères préformés. Ces polymères peuvent avoir des propriétés physicochimiques variées. En effet, ils peuvent

être hydrosolubles ou hydrophobes. Ils peuvent avoir également des origines différentes : synthétiques, semi-synthétiques, ou d'origine naturelle.

Le choix de la méthode de préparation des particules et du polymère les constituant dépend des propriétés physicochimiques du principe actif, de caractéristiques désirées pour la libération du médicament, du but de la thérapie, et de la voie d'administration. La méthode choisie doit permettre une bonne encapsulation avec un excellent rendement et doit être potentiellement applicable d'un point de vue industriel.

## **1. PREPARATION DE NANOPARTICULES PAR POLYMERISATION DE MONOMERES**

Cette technique a été utilisée pour la première fois dans les années 20 afin de produire du polyisoprène. Durant la deuxième guerre mondiale, cette technique a été utilisée et développée dans le milieu industriel pour synthétiser le caoutchouc et le plastique.

Le recours à cette méthode permet de limiter l'utilisation des solvants organiques toxiques qui sont utilisés pendant la production du polymère par voie radicalaire.

Le principe de cette méthode consiste à disperser le(s) monomère(s) dans un milieu aqueux. Des gouttelettes sont ensuite formées à l'aide d'une contrainte représentée par un fort cisaillement. Ces gouttelettes sont stabilisées par l'utilisation de tensioactifs. L'amorceur utilisé est souvent hydrophile.

Cette technique a été utilisée dans plusieurs travaux pour la fabrication de nanoparticules. On peut citer deux études, la première réalisée par Birrenbach et Speiser en 1976<sup>(170)</sup>, pour préparer des nanoparticules de polyacrylamide réticulé à partir de l'acrylamide et de N, N-méthylène bis acrylamide. Kreuter et Speiser ont fabriqué des particules de PMMA en se basant sur le protocole développé par Birrenbach et Speiser. Ce procédé permet de réaliser la polymérisation du monomère et la formation des nanoparticules en une seule étape. L'emploi des nanoparticules citées précédemment est limité pour des applications en tant que vecteur, car les polymères employés ne sont pas biodégradables. Par conséquent, ils vont s'accumuler dans l'organisme. Pour pallier à ce problème, des nanoparticules bioéliminables à base de PACA ont été développées par le Professeur P. Couvreur<sup>(171)</sup>.

## 2. PREPARATION DE NANOPARTICULES A PARTIR DE POLYMERES

### PREFORMES

La technique de préparation de nanoparticules à partir de polymères préformés comporte certains avantages par rapport à la méthode utilisant la polymérisation de monomères. En effet, le procédé ne nécessite pas une étape d'élimination des monomères résiduels et des réactifs (amorceur, catalyseur, etc.). Les polymères préformés possèdent des propriétés physicochimiques bien définies. De plus il ne peut y avoir de réaction avec le principe actif pendant la préparation des nanoparticules. Les principales méthodes utilisant les polymères préformés sont détaillées dans les paragraphes suivants.

#### 2.1) Emulsion/évaporation de solvant

Cette technique a été utilisée pour la première fois en 1981 <sup>(177)</sup> pour la préparation des nanoparticules de PLA par la technique d'émulsion/évaporation de solvant. Cette technique consiste à préparer une émulsion (simple ou double) puis à éliminer le solvant organique par évaporation. Lors de cette élimination, le polymère précipite, ce qui conduit à la formation de sphères.

Dans un premier temps, une phase organique est préparée par ajout du polymère choisi pour constituer les nanoparticules dans le solvant organique non miscible à l'eau (dichlorométhane, chloroforme ou acétate d'éthyle). Ce mélange ensuite émulsifié dans une phase aqueuse. Un tensioactif est utilisé pour stabiliser l'émulsion H/E. (cholate de sodium, poly(alcool vinylique) (PVA)) <sup>(178)(179)</sup>. L'évaporation de solvant organique se fait par élévation de température, sous pression réduite ou simplement par agitation à température ambiante.

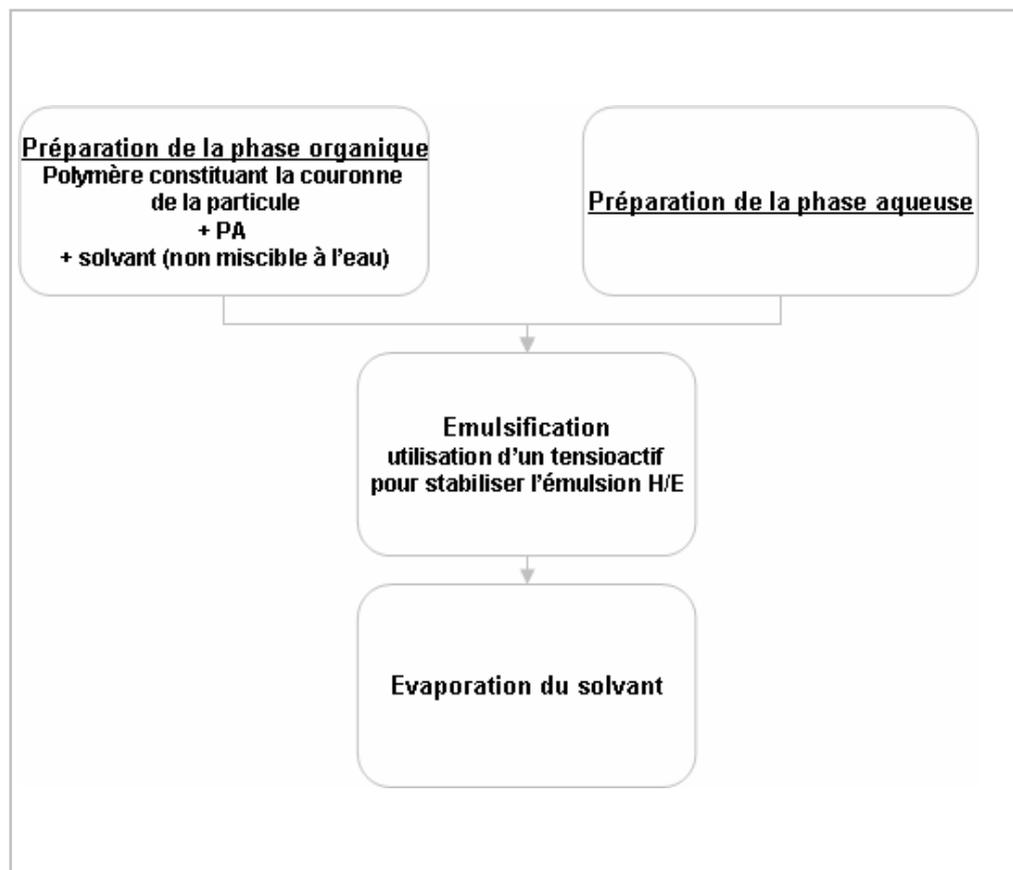


Figure 19. Préparation des nanoparticules selon la méthode d'Emulsion / Evaporation de solvant.

Selon la nature du principe actif une émulsion simple ou double est nécessaire pour l'encapsulation de la substance active. En effet, dans le cas d'un principe actif hydrophobe, l'encapsulation se fait par simple ajout du composé dans la solution de polymère. Après évaporation du solvant organique, le médicament encapsulé se trouve au sein de la matrice polymère <sup>(180)</sup>. Tandis que pour un principe actif hydrophile, une première émulsion est formée en dispersant la substance active dans la phase organique contenant le polymère. Cette émulsion est elle-même dispersée dans une phase aqueuse externe pour constituer une émulsion double H/E/H <sup>(179)</sup>. Les nanoparticules contenant le principe actif hydrosoluble sont formées après évaporation du solvant organique.

Le bon fonctionnement de ce processus nécessite non seulement l'utilisation des tensioactifs pour faciliter la formation et améliorer la stabilité des émulsions <sup>(180)</sup>, mais

également d'apport d'énergies pour former une émulsion homogène. Afin d'éliminer le solvant résiduel, une étape de purification des nanoparticules formées est nécessaire.

## 2.2) Fluide supercritique

Cette technique a été développée pour remédier aux problèmes posés par la technique l'émulsion/évaporation de solvant sur le plan industriel. Cette technique, dite Rapid Expansion of Supercritical Solvent (RESS) consiste à dissoudre le polymère et le principe actif à encapsuler dans un fluide supercritique (FSC). Ensuite, une réduction rapide de pression due à l'expansion du FSC dans l'air provoque la saturation et la précipitation du soluté, ce qui permet d'obtenir des nanoparticules. Les produits finaux ont une bonne pureté <sup>(181)</sup>. Le FSC utilisé est souvent le CO<sub>2</sub>, puisqu'il est non toxique, non inflammable, relativement inerte et recyclable <sup>(182)</sup>. Cette technique est limitée par la faible solubilité des polymères et des principes actifs dans le FSC, et la taille de particules obtenues par cette méthode est souvent supérieure à 1µm <sup>(183)</sup>. De plus, elle nécessite une très haute pression, généralement supérieure à 200 bar <sup>(182)</sup>.

Pour améliorer la solubilité du polymère dans FSC, on a parfois recours à l'utilisation de solvant organique (acétone, éthanol) <sup>(184)</sup>. On peut alors normalement travailler à une pression inférieure à 100 bar lorsque la température est légèrement supérieure à la température critique du CO<sub>2</sub>(304,1 K) <sup>(182)</sup>.

le RESS a été amélioré en mettant en place une solution contenant un tensioactif après l'expansion rapide du FSC (Rapid Expansion of a supercritical solution into a liquid SOLVent (RESOLV) <sup>(185)</sup>.

## 2.3) Salting out

La technique de salting out consiste à préparer une solution aqueuse saturée en sel et contenant un stabilisant (par exemple : le PVA), à laquelle est ajoutée sous agitation une phase organique miscible à l'eau (acétone) contenant le polymère. Cette technique permet l'encapsulation de principes actifs hydrophobes, solubles dans des solvants polaires <sup>(186)</sup>.

Les deux phases sont immiscibles due à la saturation en sel de la phase aqueuse. Par voie de conséquence, une émulsion de type Huile/ Eau est formée. La précipitation du polymère est assurée par la diffusion de l'acétone dans la phase aqueuse, ce transfert est assuré par l'ajout d'eau dans le milieu. Cette précipitation conduit à la formation des particules.

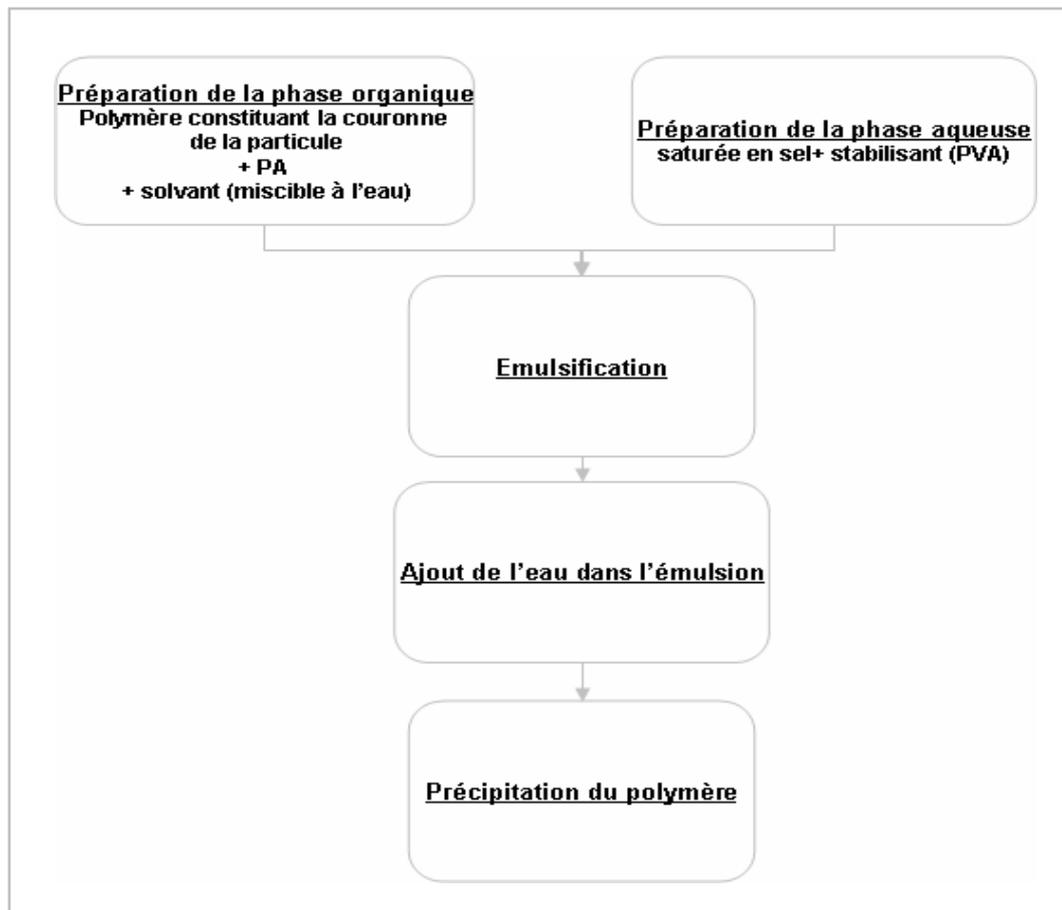


Figure 20. Préparation des nanoparticules selon la méthode de Salting Out.

Le procédé de salting out peut subir des modifications. En effet, le solvant organique utilisé peut être partiellement miscible dans l'eau. Le polymère est dissout dans le solvant initialement saturé en eau pour assurer l'équilibre thermodynamique des deux phases. Ensuite, il est émulsifié dans une phase contenant un tensioactif. Afin de déplacer l'équilibre thermodynamique et provoquer la diffusion du solvant dans la phase aqueuse et également la précipitation du polymère, de l'eau est ajoutée au milieu.

## 2.4) Nanoprécipitation

Le procédé de nanoprécipitation permet l'encapsulation d'une grande quantité de principe actif avec un excellent rendement. Cette technique ne nécessite pas d'opération supplémentaire telle que l'évaporation ou l'extraction pour provoquer la précipitation du polymère. Néanmoins, ce procédé est réservé exclusivement à l'encapsulation de principes actifs hydrophobes solubles dans un solvant polaire mais insolubles dans l'eau. Ex : l'isradipine (agent contre l'hypertension) <sup>(187)</sup>.

La première utilisation de nanoprécipitation pour la fabrication de nanoparticules remonte en 1986. En effet, cette technique a été décrite par Fessi et al. <sup>(188)</sup> Celui-ci requiert l'utilisation d'une phase organique polaire contenant le polymère et le principe actif organosoluble. Cette phase organique doit être un solvant miscible à l'eau tel que l'acétone <sup>(187)</sup>. Cette solution de polymère est émulsifiée dans une phase aqueuse (le tensioactif est facultatif) pour former des gouttelettes. La diffusion spontanée du solvant dans la phase aqueuse entraîne une précipitation du polymère, et la formation des nanoparticules solides.

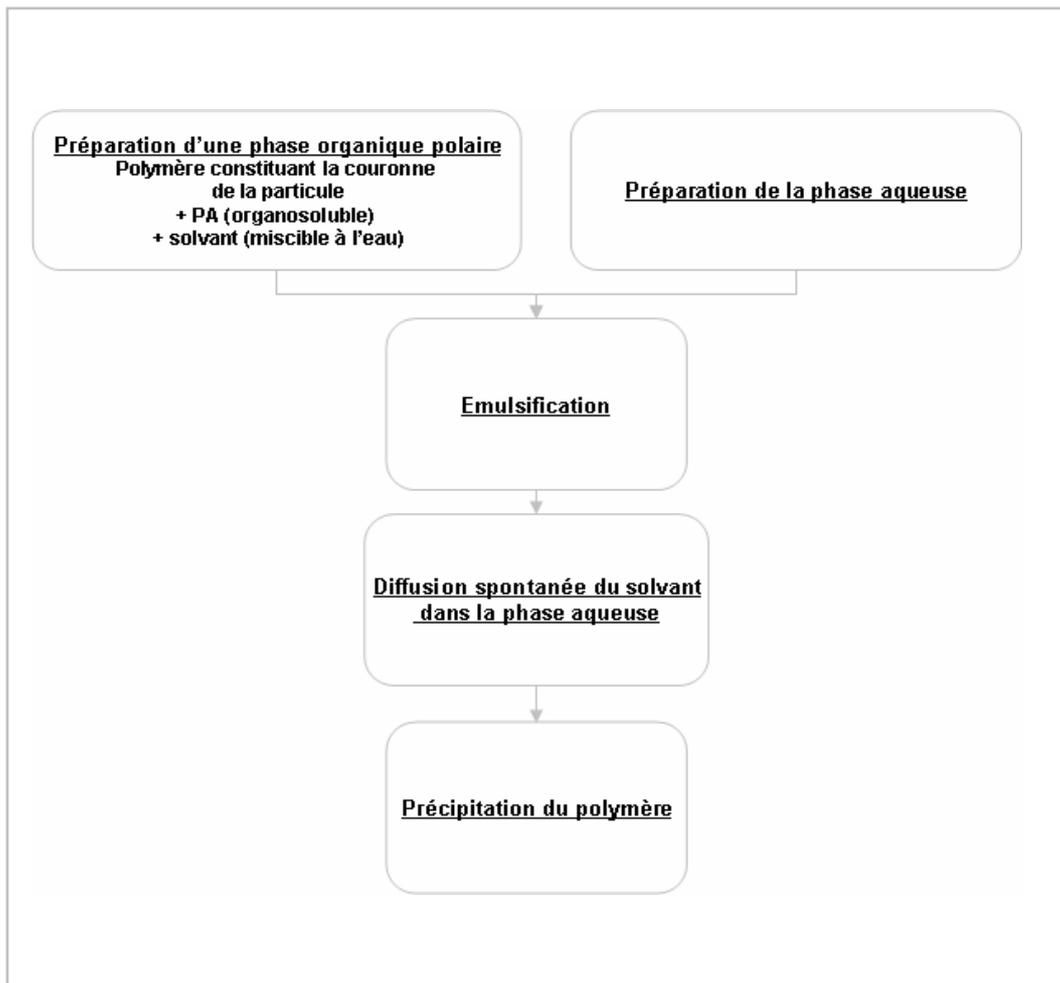


Figure 21. Préparation des nanoparticules selon la méthode de Nanoprécipitation.

### III) PROCÉDES D'HYDROPHILISATION DE SURFACE

Comme décrit précédemment, les protéines s'adsorbent plus au moins facile sur la plupart des surfaces solides hydrophobes. En effet, la modification de la surface hydrophobe des particules par adsorption de polymères amphiphiles est une étape primordiale. Ces procédés permettent de diminuer l'accumulation des vecteurs dans la sphère hépatique et par voie de conséquence, prolonger leur temps de circulation. Les polymères amphiphiles peuvent adopter des conformations très différentes à la surface des particules (*cf. figure 22*), ceci dépend du mode d'adsorption. L'adsorption du polymère à la surface peut s'effectuer par un seul site ans le cas d'un polymère uniquement substitué en extrémité de chaîne par un

segment interagissant avec la particule, l'adsorption est de type « end-on ». Le polymère adopte alors une conformation en brosse. Tandis que, si le polymère est porteur de plusieurs motifs réactifs le long de la chaîne macromoléculaire, l'adsorption du polymère, de type « side on », s'effectue par de nombreux sites de fixation. La conformation du polymère est alors en boucle- trains et queues à la surface.

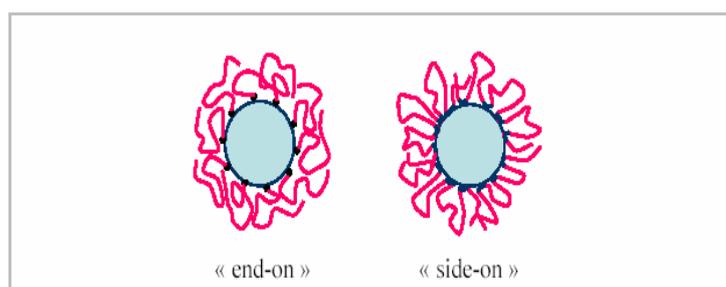


Figure 22. Conformations du polymère amphiphile en fonction du mode d'adsorption.

Les procédés d'hydrophilisation de surface les plus utilisés peuvent se diviser en deux classes. La première classe repose sur le greffage chimique de polymères hydrophiles à la surface des particules. Par contre, la deuxième classe est basée sur l'adsorption physique de polymères amphiphiles lors de la préparation des nanoparticules.

## 1. FIXATION CHIMIQUE DU POLYMERE HYDROPHILE

L'hydrophilisation de surfaces par fixation chimique a pour principe de former des liaisons covalentes entre les chaînes hydrophiles et la surface à modifier. Cette technique permet d'avoir une bonne stabilité de la couche hydrophile. Ce procédé d'hydrophilisation nécessite la fonctionnalisation des chaînes hydrophiles et la surface hydrophobe dans le cas de couplage d'un polymère hydrophile préformé.

La nanoprécipitation <sup>(189)</sup> et l'émulsion/évaporation de solvant <sup>(190)</sup> permettent également l'hydrophilisation de la surface par fixation chimique. En effet, ceci passe par l'utilisation de copolymères amphiphiles organosolubles préformés. Au cours du procédé d'élaboration des particules, les segments hydrophobes des copolymères sont dissous dans la phase organique alors que les segments hydrophiles s'exposent à la phase aqueuse. Après

l'élimination du solvant organique, les particules possèdent un cœur riche en chaîne hydrophobe et une couronne constituée de chaînes hydrophiles.

Cette technique a pour avantage de bien contrôler la structure particulaire car leur composition peut être bien définie <sup>(191)</sup>. Des exemples de cette méthode ont été décrits en particulier avec des copolymères dibloc tels que le poly(méthoxy poly(oxyde d'éthylène) cyanoacrylate-co-hexadécyl cyanoacrylate) <sup>(190)(192)</sup> et le poly(lactide)-b-poly(oxyde d'éthylène) organosoluble <sup>(193)</sup> ou avec un tribloc comme le POE-PPO-POE <sup>(194)</sup>.

## 2. ADSORPTION PHYSIQUE DE POLYMERES AMPHIPHILES

Ce procédé consiste à adsorber physiquement des polymères à l'interface solide-liquide. Il présente une grande facilité de mise en œuvre. Il s'agit simplement de mettre en contact des nanoparticules préformées à surface hydrophobe et/ou chargée. Cette technique d'adsorption ne nécessite pas de segments réactifs à la surface de nanoparticules. En effet, l'adsorption est régie soit par des interactions électrostatiques soit par des interactions hydrophobes. Dans le premier cas, des particules chargées, des poly électrolytes tels que le chitosane <sup>(195)</sup> et l'acide hyaluronique <sup>(196)</sup> s'adsorbent sur la surface de charge opposée par interaction électrostatique. Tandis que dans le deuxième cas, la surface des particules hydrophobes et neutres est souvent modifiée par des dérivés amphiphiles de polysaccharides <sup>(197)(198)</sup>. Ces dérivés possèdent des propriétés tensioactives, ils sont capables de s'adsorber sur une surface hydrophobe pour y former une couche hydrophile. Néanmoins, la stabilité de la couche adsorbée n'est pas garantie, elle peut être déplacée par les protéines plasmatiques.

Le procédé d'hydrophilisation de surface par adsorption physique peut se réaliser au cours de l'élaboration des particules. Avant la polymérisation du monomère, le polymère amphiphile s'adsorbe à la surface des gouttes de monomère (interface liquide/liquide), après la réaction, le polymère amphiphile s'adsorbe à la surface des particules solides <sup>(199)</sup>.

Le phénomène d'adsorption est maintenant bien connu grâce à de nombreux travaux sur ce sujet. Le paramètre le plus important à suivre est la tension interfaciale qui décrit la forme d'une interface. La théorie de Gibbs permet de dégager une relation entre la tension de surface, le taux d'adsorption et la concentration en tension actif.

$$\Gamma_{\max} = - \frac{1}{2.303RT} \frac{d\gamma}{d \log C}$$

$\Gamma_{\max}$  est le taux de recouvrement maximal des chaines latérales (mol de groupements hydrophobes/m<sup>2</sup>) et  $C$  la concentration en tensioactif en volume (mol/m<sup>3</sup>). L'isotherme de Gibbs est obtenue en traçant la tension de surface en fonction de la concentration en tension actif ( $\gamma = f(C)$ ).

Cette théorie est basée sur un équilibre entre adsorption et désorption des tensioactifs à la surface. Néanmoins, dans notre cas, la désorption des polymères est limitée à cause des contraintes entropiques liées à la chaîne. Le processus d'adsorption s'accompagne d'une diminution de la tension interfaciale.

Si on s'intéresse à la cinétique d'adsorption des polymères, on peut diviser ce phénomène en plusieurs étapes. En effet, on peut citer l'étape de diffusion de polymères vers l'interphase (interface des deux phases non miscible), ensuite l'étalement des molécules, puis adsorption et enfin réarrangement de la molécule adsorbée entre la surface et l'interface.

Plusieurs travaux ont été réalisés sur ce sujet pour modéliser ce phénomène. Ward et Tordai <sup>(200)</sup> ont proposé un modèle en choisissant la phase de diffusion comme étape limitante. En appliquant la loi de Fick qui régit les phénomènes de diffusion on arrive à l'équation suivante :

$$\Gamma = 2\sqrt{\frac{D}{\pi}} \left( C_0 \sqrt{t} - \int_0^{\sqrt{t}} \phi(z) d[\sqrt{t-z}] \right)$$

$\Gamma$  est la concentration à la surface (mol/m<sup>2</sup>),  $C_0$  la concentration en tensioactif dans la phase continue (mol/m<sup>3</sup>),  $D$  le coefficient de diffusion des molécules amphiphiles (m<sup>2</sup>/s) et  $\phi(z)$  une fonction décrivant la variation de concentration à l'interface. Cette fonction n'est généralement pas connue ce qui rend cette équation difficilement applicable.

D'autres hypothèses ont été fixées pour aboutir à des modèles simplistes. En effet, en faisant l'approximation que l'adsorption peut se décrire par une isotherme de Langmuir <sup>(201)</sup>, on arrive à l'équation suivante:

$$\gamma(t) = \gamma_e + \frac{\Gamma^2 RT}{C_0} \sqrt{\frac{1}{\pi D t}}$$

$\gamma_e$  la tension de surface de la solution quand l'équilibre est atteint sur des particules. Cette équation est applicable à des temps plus longs.

## IV) DEXTRANE

La présence d'une couche polymère hydrophile à la surface va permettre aux particules de prolonger leur temps de circulation dans le sang. Ceci est le résultat d'un effet de répulsion stérique vis-à-vis de certaines protéines plasmatiques. Cette couche hydrophile est dans la plupart des cas à base de polysaccharides. Le LCPM s'est positionné sur ce sujet en synthétisant différents dérivés de dextrane capables de s'adsorber à la surface des particules.

Le dextrane est utilisé dans différentes applications, essentiellement dans la formulation de différentes formes pharmaceutiques comme excipient, mais également comme support de chromatographie et récemment comme agent texturant. Son application dans le domaine médical a connu un essor considérable.

### 1. SYNTHÈSE DU DEXTRANE

La synthèse en masse du dextrane est assurée par la bactérie *Leuconostoc mesenteroides*. En effet, cette dernière possède l'enzyme dextrane-saccharase DSR-S qui catalyse la synthèse du dextrane, à partir du saccharose et d'oligosides. Le dextrane produit par *L. mesenteroides* NRRL B-512F contient des liaisons  $\alpha$ -1,6 et celui produit par *L. mesenteroides* NRRL B-1299, des liaisons  $\alpha$ -1,6 et  $\alpha$ -1,2.

Le dextrane obtenu possède une forte masse molaire, avec une distribution de masses molaires larges<sup>(202)(203)</sup>. Il ne peut donc être directement utilisé dans des applications médicales. En effet, le dextrane de très faibles masses molaires va avoir une durée de vie *in*

*in vivo* très courte, car il est rapidement éliminé, tandis que les fractions de très grandes masses molaires peuvent contribuer à la formation de cailloux dans le sang <sup>(202)</sup>. C'est pourquoi, le dextrane doit subir une hydrolyse partielle <sup>(204)</sup>, le plus souvent réalisée par de l'acide chlorhydrique, afin d'obtenir des polymères plus courts. Une étape de séparation par fractionnement en utilisant un mélange eau/éthanol <sup>(203)</sup> est ensuite nécessaire. Dans le commerce, on peut trouver différents types de dextrane selon la masse molaire, on peut ainsi citer le dextrane T40 (Mw = 40000 g/mol) et T10 (Mw = 10000 g/mol).

## 2. METABOLISME

L'organisme de l'être humain comporte la dextranase ( $\alpha$ -1 glucosidase), enzyme responsable de la dégradation du dextrane. Cette enzyme est présente dans la rate, le rein et le foie particulièrement dans les phagocytes mononucléés. Le polysaccharide est totalement dégradé par cette enzyme pour donner du glucose, qui sera à son tour également dégradé en éléments simple (CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O). Le dextrane est donc biodégradable et ses produits de dégradation ne sont pas toxiques ni immunogènes, ce qui permet son utilisation pour des applications médicales.

## 3. CARACTERISTIQUE PHYSICO-CHIMIQUE

### 3.1) Structure chimique

Le dextrane est un polysaccharide constitué par un enchainement  $\alpha$ -1,6 d'unité glucopyranose avec des chaînes latérales en  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3 ou  $\alpha$ -1,4. Ce polymère est hydrophile, grâce à la présence d'un grand nombre de groupement hydroxyle, ce qui permet au dextrane d'avoir la faculté d'interagir avec de nombreuses substances, notamment les principes actifs. Il n'est soluble que dans l'eau et dans quelques solvants polaires (diméthylsulfoxyde, l'éthylène glycol ou le glycérol). Des études de viscosité ont permis de conclure que ce polymère se comporte comme une pelote flexible et ne présente pas d'association intramoléculaire. Par ailleurs, le dextrane ne présente aucune interaction avec

les milieux biologiques, il est donc tout à fait inerte et peut par conséquent être utilisé dans des applications biomédicales.

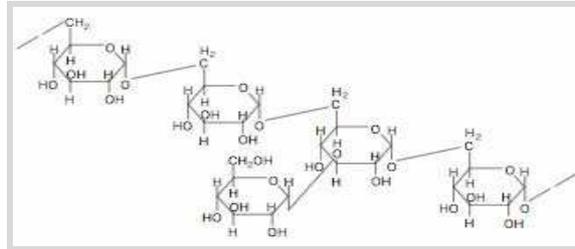


Figure 23. Structure chimique du dextrane.

### 3.2) Spectre RMN

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  présente différents signaux, correspondant aux différents protons positionnés sur les motifs glucose constituant le dextrane. Le proton anomérique est visible aux alentours de 4,7 ppm, les six protons non échangeables apparaissent sous forme d'un large massif [3,2-3,8]ppm <sup>(205)</sup>, alors que les fonctions hydroxyle correspondent aux pics à 4,5, 4,8 et 4,9 ppm.

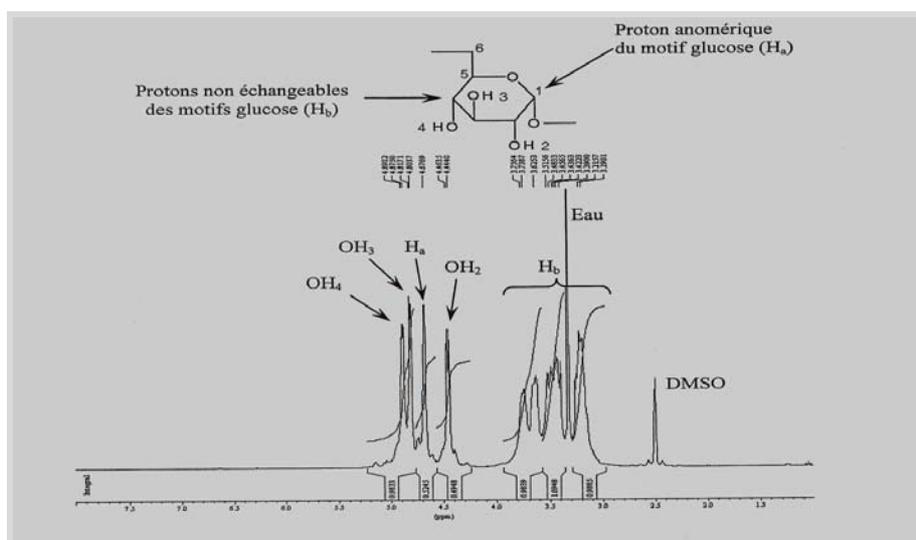


Figure 24. Spectre RMN  $^1\text{H}$  du dextrane T 40 dans le DMSO.

### 3.3) Autres propriétés des dérivés du dextrane

Une caractérisation plus approfondie pourrait être effectuée afin de déterminer des propriétés physico-chimiques importantes, il n'en a pas été question dans le cadre de mon travail. Toutefois on peut citer les propriétés suivantes présentes dans la littérature <sup>(206)</sup>.

- Détermination des masses molaires moyennes : ceci peut se faire par chromatographie d'exclusion stérique qui est fondée sur la rétention sélective des macromolécules en solution en fonction de leur taille. Cette technique permet de vérifier la pureté des polymères et de mettre en évidence les changements de volume hydrodynamique des macromolécules après modification chimique.
- Etude viscosimétrique : les études viscosimétriques des polymères en régime dilué permettent de déterminer les caractéristiques géométriques des pelotes macromoléculaires correspondantes, essentiellement par l'intermédiaire de la valeur de la viscosité intrinsèque, noté  $[\eta]$ , qui reflète le volume hydrodynamique de cette pelote dans un solvant donné et à une température donnée (conditions spécifiques). l'accroissement de la viscosité due à une augmentation de la concentration en polymère ( $\eta - \eta_0$ ) et les mesures des temps d'écoulement de ces solutions dans un tube capillaire ( $t - t_0$ ), permettent de déterminer  $\eta$ , qui est définie comme la limite de la viscosité réduite ( $\eta_{sp}/C$ ) quand la limite du polymère tend vers zéro :

$\eta_{sp}/C = (\eta - \eta_0) / \eta_0 C \approx (t - t_0) / t_0 C$ . Le terme  $C$  représente la concentration en polymère dans la solution.

- Mesure des tensions de surface : les polymères de dextrane modifié se comportent en solution comme des surfactants, il est donc important de mesurer cette propriété. Pour cela, il existe plusieurs techniques, La plus simple et la plus couramment utilisée est la méthode de la plaque de Wilhelmy. Il apparaît qu'indépendamment de la nature du groupement greffé, la tension superficielle d'une solution aqueuse de dextrane natif est toujours supérieure à celle du dextrane modifié. De plus, cet abaissement de la tension superficielle des solutions de dextrane modifié est d'autant plus important que le taux de substitution est élevé et que le greffon est hydrophobe.

## 4. APPLICATION

Les exemples d'utilisation du dextrane sont nombreux. Le polysaccharide de masse moléculaire comprise entre 2000 et 150 000 g/mol sont couramment utilisés dans le domaine thérapeutique. Toutefois, pour être utilisable dans de telles applications, le dextrane doit être préalablement fonctionnalisé via ses groupes hydroxyles. Le dextrane peut être couplé à un principe actif via ses fonctions hydroxyles. Ce couplage permet de renforcer l'action de la substance active en la protégeant contre les dégradations et également en prolongeant le temps de circulation. Plusieurs agents thérapeutiques ont été couplés au dextrane, on peut citer les antibiotiques et l'insuline <sup>(207)</sup>.

Ce polymère peut également être utilisé pour la préparation d'hydrogels en vue de l'encapsulation et la libération contrôlée de peptides ou protéines. Ces hydrogels sont obtenus par polymérisation radicalaire de méthacrylate de dextrane. Ces structures peuvent également être utilisées dans le domaine de la chromatographie. En effet, le Sephadex est un gel d'exclusion à base de dextrane plus ou moins réticulé <sup>(204)</sup>.

Le dextrane est un bon candidat pour toute opération visant à modifier les surfaces solides (oxyde de fer, silice et PLA). Les matériaux obtenus peuvent avoir des applications diverses, telle que agent de contraste pour les tests de diagnostic.

## 5. MODIFICATION CHIMIQUE DU DEXTRANE

Pour certaines applications et notamment en biomédical, l'utilisation du dextrane nécessite des étapes de modification chimique préliminaires, afin d'obtenir un polymère amphiphile. Au LCPM ces étapes consistent à fixer des groupements hydrophobes ou des groupements fonctionnels.

Plusieurs recherches ont été réalisées dans ce domaine en vue d'obtenir des polymères amphiphiles. Les premières sont celles de Landoll en 1980. Concernant la modification chimique réalisée sur le dextrane, on trouve plusieurs procédés dans la littérature. J'ai sélectionné deux parmi ces techniques. La première consistait à modifier le dextrane par estérification des groupements hydroxyles avec de l'anhydride butyrique, en utilisant comme catalyseur une amine tertiaire <sup>(208)</sup>. Tandis que dans la deuxième étude, une

autre voie de synthèse a été développée, celle qui a permis de synthétiser du dextrane linéaire, sélectivement méthylé sur la position C-3. Ceci se fait par polymérisation (par ouverture de cycle du monomère 1,6-anhydro-2,4-di-O-méthyl-glucopyranose) suivi d'une débenzylation<sup>(209)</sup>.

L'hydrophilisation de nanoparticules qui font l'objet de mes travaux sera réalisée par adsorption de dextrane modifié. La modification du dextrane avait pour but de faciliter le couplage de ce dernier avec un heptapeptide (ATWLPPR). Cette modification est détaillée dans la partie expérimentale *paragraphe I.2*.

## V) CONCLUSION

Les nanoparticules représentent un réel espoir pour la conception de molécules innovantes dans le domaine thérapeutique. Ainsi depuis quelques années, un grand nombre de nanoparticules ont été développées et étudiées. Cependant, bien qu'elles aient souvent des propriétés intéressantes, bien peu d'entre elles sont parvenues à une utilisation clinique. Le fil directeur des travaux de recherches actuellement est la production, la stabilité, la biodistribution, et l'efficacité des nanoparticules. En effet, la réunion de ces éléments est indispensable pour une éventuelle utilisation clinique de ces vecteurs.

Dans cette partie, nous avons introduit le concept de la vectorisation de médicament, énuméré les différentes générations de vecteurs et les principales méthodes de préparation. Les vecteurs de troisième génération nous intéressent tout particulièrement, ils offrent la possibilité de concevoir des thérapies efficaces grâce aux notions de furtivité et de sélectivité. Ces vecteurs permettent ainsi de mieux explorer la stratégie anti-vasculaire.



## **PARTIE EXPERIMENTALE**

**ADRESSAGE DE NANOPARTICULES PAR UN HEPTAPEPTIDE  
« ATWLPPR » LIGAND DE NRP-1 : STRATEGIE ANTI-VASCULAIRE**

## INTRODUCTION

Le concept de nanoparticules offre la possibilité d'acheminer un ou plusieurs principes actifs de manière spécifique en ciblant les sites actifs. Cette stratégie d'adressage utilise des vecteurs capables de reconnaître sélectivement l'endroit où s'effectue l'activité thérapeutique des substances actives associées. Ceci permet d'améliorer la biodisponibilité des principes actifs, et également de réduire leurs effets secondaires particulièrement dans le traitement des cancers, où l'arsenal thérapeutique traditionnel est difficilement supporté par les patients. Plusieurs travaux ont montré l'efficacité des peptides et notamment l'heptapeptide ATWLPPR dans la reconnaissance des co-récepteurs du VEGF<sup>(134)</sup>. Ces co-récepteurs sont impliqués dans le processus de vascularisation des tumeurs.

Dans cette partie, nous avons étudié le ciblage vasculaire comme stratégie anticancéreuse. Pour cela, nous avons choisi le peptide « ATWLPPR » comme molécule ciblante. Nous détaillerons les étapes qui ont conduit à la synthèse et à la purification de ce peptide, avant d'examiner les possibilités de greffer cette molécule sur le dextrane modifié chimiquement. Le dextrane modifié est l'élément qui recouvre ces nanoparticules afin de les rendre hydrophiles. Pour limiter l'encombrement stérique résultant du couplage du peptide sur le dextrane, qui pourrait affecter l'affinité du peptide pour les VEGFRs, un bras espaceur, anhydride succinique a été utilisé pour coupler les deux molécules. Enfin, nous avons étudié l'influence de quelques paramètres sur la taille des nanoparticules, notamment le type de polymères et la concentration en dextrane modifié. En effet, trois polymères ont été testés (le poly (DL-lactide-co-caprolactone), le poly (DL-lactide-coglycolide) et l'acide polylactique (PLA)) avec deux types de dextrane modifié (DexC6 et DexC10) selon le procédé par émulsion directe.

## I) MATERIELS ET METHODES

### 1. SYNTHÈSE DU PEPTIDE « ATWLPPR »

#### 1.1) Principe de la synthèse peptidique

La synthèse peptidique peut se faire soit en phase liquide soit en phase solide. Bruce Merrifield a révolutionné le domaine en 1963 avec sa technique de synthèse sur phase solide (SPPS) <sup>(210)</sup>, pour laquelle il reçoit le prix Nobel en 1984. Même si la synthèse en solution ne demande pas une étape supplémentaire de clivage du peptide de la résine et permet d'obtenir un bon rendement, nous avons, quant à nous, retenu une synthèse sur phase solide. Cette technique est facilement automatisable, qui simplifie les étapes de purification intermédiaires (simples lavages) et finales et qui permet une réaction complète grâce à un excès de réactifs.

Ce type de méthode requiert l'utilisation d'une résine insoluble, sur laquelle sont greffés successivement les différents acides aminés qui composent le peptide à synthétiser. Contrairement à la synthèse protéique par les ribosomes, la synthèse en phase solide se fait du C- vers le N-terminal. La résine (qui gonfle dans des solvants de type dichlorométhane) est placée dans un réacteur, dans lequel on fait passer successivement un solvant contenant chacun des acides aminés et des catalyseurs de couplage en excès. La résine sur laquelle est greffé le peptide en croissance est maintenue dans le réacteur, tandis qu'à la fin de chaque étape, des lavages permettent d'éliminer les réactifs n'ayant pas réagi. Le temps de synthèse en est considérablement réduit (d'autant plus que le système peut être automatisé), et cela permet de simplifier les étapes de purification ultérieures.

Le principe de cette méthode est le suivant :

- La fonction -NH<sub>2</sub>, à engager dans la prochaine liaison peptidique, est protégée par des groupements protecteurs, qui s'éliminent facilement lors des étapes de couplage. Il existe plusieurs stratégies de protection, on peut citer la méthode Merrifield qui utilise le groupement Boc (*tertio*-butyloxycarbonyle), labile en milieu acide (*e.g.* acide trifluoroacétique, TFA). Le clivage final du peptide de la résine requiert l'utilisation d'acides forts (*e.g.* HF), dont l'utilisation est délicate. Nous avons opté pour la stratégie de type Fmoc (N-(9-fluorényl-méthoxycarbonyl)), labile dans des conditions basiques douces (*e.g.* 20% pipéridine dans de la diméthylformamide, DMF). La déprotection des chaînes latérales des acides aminés (protégées par des groupes de type *tertiobutyl*) et le clivage du peptide de la résine sont effectués en présence de TFA, et de pièges à espèces réactives (phénol, thiols, silanes, eau) qui capturent les carbocations et radicaux formés et les empêchent de se fixer sur les sites sensibles du peptide.
- La fonction -COOH de l'acide aminé à introduire dans le peptide est activée ce qui permet des rendements de couplage supérieurs à 99%. L'activation classique d'un acide aminé consiste à remplacer le H du COOH par un groupement bon partant. Les solutions courantes sont l'utilisation d'esters activés ou d'anhydrides symétriques. La réaction doit être rapide et totale. Nous avons retenu une stratégie utilisant les esters activés d'hydroxybenzotriazole (HOBT) formés *in situ*, en utilisant le réactif de Knorr (trifluoroborate de 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium, TBTU). La présence de HOBT semble diminuer les réactions secondaires de racémisation. Une amine tertiaire (*e.g.* diisopropyl-éthyl-amine, DIEA) est utilisée pour capturer le contre-anion PF<sub>6</sub><sup>-</sup>.

## 1.2) Synthèse du peptide « ATWLPPR » sur phase solide

La synthèse du peptide « ATWLPPR » a été effectuée par un synthétiseur intavis AG. La synthèse se fait dans le sens R → A en utilisant la résine « Fmoc-Arg(Pmc)-Wang résine ». Cette stratégie permet de laisser libre l'arginine présente en position C-terminale, cruciale pour l'affinité du peptide. En effet, le remplacement de l'arginine par une alanine supprimerait totalement l'activité du peptide<sup>(211)</sup>.



Figure 25. Le synthétiseur intavis AG, Bioanalytical instrument.

La résine « Fmoc-Arg(Pmc)-Wang résine » est placée dans le réacteur, ensuite gonflée par addition de DMF. Le groupe Fmoc protecteur de la fonction -NH<sub>2</sub> en position N-terminale de l'arginine est enlevé, par traitement de la résine avec de la pipéridine (20% dans de la DMF). Les acides aminés sont alors successivement greffés, en ajoutant du Fmoc-aminoacide (3 éq.), TBTU (3 éq.), HOBt (3 éq.) et DIEA (9 éq.) dans de la DMF.

Le synthétiseur réalise à chaque fois des doubles couplages (temps de chaque couplage : 20 min) pour améliorer le rendement. Des lavages sont alors effectués pour éliminer les réactifs en excès, le groupement Fmoc de l'acide aminé nouvellement greffé est enlevé avec 20% de pipéridine. L'appareil répète ces séquences pour greffer successivement tous les acides aminés. Les groupements latéraux du tryptophane et de la thréonine sont protégés par des groupements Boc et *tertio*-butyl respectivement.

Les étapes de synthèse sont schématisées dans la figure suivante :

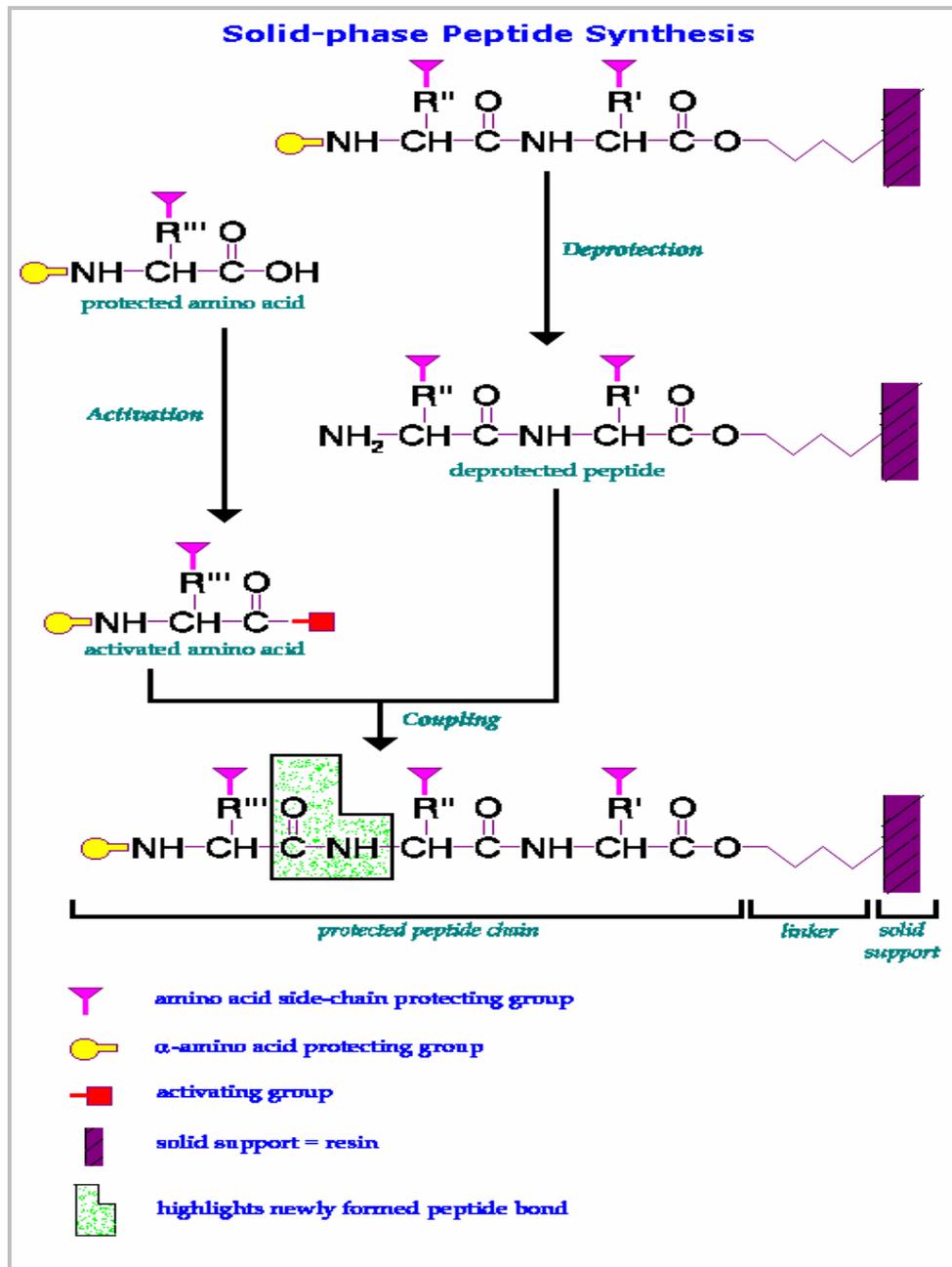


Figure 26. Schéma des étapes de la synthèse peptidique en phase solide <sup>(212)</sup>.

### 1.3) Purification

Une fois la synthèse finie, la résine est ensuite séchée sous vide dans un dessiccateur pendant au moins 3 heures. Le clivage de la molécule « ATWLPPR » de son support est effectué avec un mélange acide acétique/éthanol/dichlorométhane (2/2/6) sous agitation à température ambiante pendant 2 heures. « ATWLPPR » est récupéré et transvasé dans un ballon. Les solvants et notamment le dichlorométhane sont éliminés en utilisant un rotavapor. Le peptide est à nouveau séché sous vide dans un dessiccateur, puis lyophilisé.

### 1.4) Analyses

Le produit obtenu suite à cette synthèse, contient notre molécule « ATWLPPR » mais aussi des peptides de délétion ou des peptides ayant subi des modifications sur les chaînes latérales. L'identification de la ou des molécules obtenues se fait par chromatographie liquide à haute performance à phase inverse, spectrométrie de masse et par RMN.

#### 1.4.1) Analyse par Chromatographie Liquide (HPLC)

L'analyse du peptide « ATWLPPR » est réalisée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse, avec une colonne semi-préparative RP-C18 (VARIAN Pursuit 150×21,2mm).

L'analyse du peptide est effectuée en utilisant un gradient d'eau-TFA 0,1% (v/v) (A) et d'acétonitrile (B) (10 à 100% de B en 30 min), avec un débit de 4 mL/min et une détection par absorbance à 280 nm. Cette HPLC est menée d'un détecteur UV-visible. Les composés sont ensuite lyophilisés et conservés à -20°C.



Figure 27. HPLC servant à analyser ATWLPPR.

#### 1.4.2) Analyse par spectrométrie de masse

La vérification de la structure de l'ATWLPPR a été faite par spectrométrie de masse. Le principe de cette méthode est basé sur la technique de MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*). En effet, elle permet une ionisation douce des composés étudiés, qui sont désorbés par laser depuis une matrice déposée sur une surface métallique. Les molécules sont ionisées puis analysées en fonction de leur rapport masse/charge par un spectromètre à temps de vol (TOF), en utilisant la propriété de déviation d'une particule chargée dans un champ électrique.

#### 1.4.3) Analyse par résonance Magnétique Nucléaire

La RMN a également été utilisée pour vérifier la structure de l'ATWLPPR. En effet, un spectre RMN  $^1\text{H}$  à 200 Hz a été effectué, d'un échantillon en solution dans du DMSO deutéré, avec une concentration d'environ 10 mM.

## 2. MODIFICATION DU DEXTRANE

### 2.1) Principe

La modification chimique du dextrane T40 (Pharmacia Biotech, masse molaire moyenne  $M_w = 40\ 000$  g/mol) est réalisée par réaction d'un anhydride (anhydride succinique) sur la fonction OH en position 2 des motifs de glucose donnant lieu à une liaison ester. Cette modification permet de transformer les fonctions OH en COOH plus réactives sur une fonction  $NH_2$  et par voie de conséquence, faciliter le couplage du peptide « ATWLLPR ». En l'absence d'études sur cette modification, nous avons suivi plusieurs protocoles. Le but de ces travaux est d'établir un protocole permettant une modification du dextrane, en donnant le produit recherché, et avec un taux de substitution proche de celui fixé préalablement.

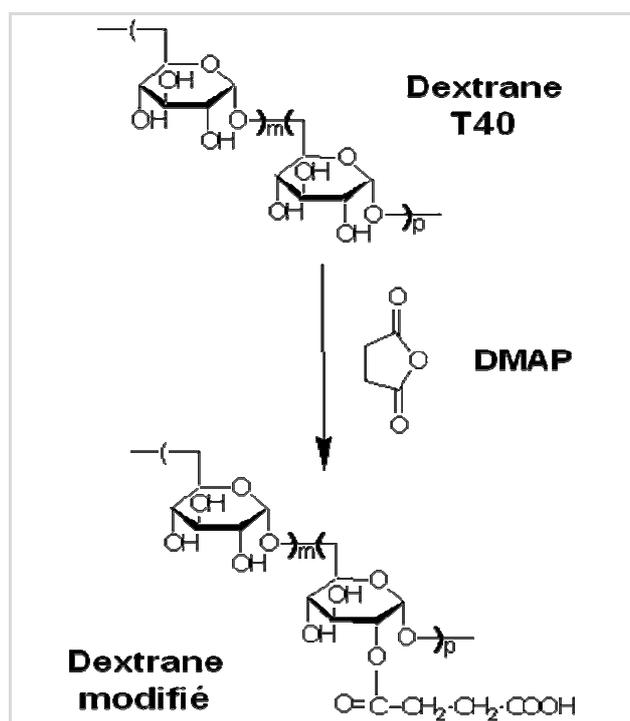


Figure 28. Schéma de synthèse

## 2.2) Protocoles

Les différents protocoles de modification du dextrane qui ont été suivis sont décrits ci-dessous.

### 2.2.1) Protocole 1

Nous avons opté dans un premier temps pour une réaction à température ambiante. La réaction se fait en présence d'un catalyseur d'acylation, la DMAP. En effet, le dextrane est dissous dans le DMSO avant d'ajouter le catalyseur et l'anhydride succinique. Ce protocole est testé avec différents taux de substitution visé.

Protocole 1 –A : nous avons testé ce protocole la première fois avec un taux de substitution de 30%. En effet, le dextrane (1g) est dissous dans 50 ml de DMSO pendant 1h sous agitation. 0,67g (soit 5,5 mmol) de DMAP sont alors ajoutés, ainsi que 0,55g (soit 5,5 mmol) d'anhydride succinique. Le mélange est maintenu à température ambiante pendant 2 jours. La solution est ensuite dialysée (membrane Spectra/Por MWCO:6000-8000), d'abord avec un mélange eau-éthanol (50-50) pendant 4 jours, avec un renouvellement de ce mélange une fois toutes les heures durant le premier jour, ensuite avec de l'eau pure. Le contenu de la membrane qui devrait être dépourvu de DMSO et DMAP est lyophilisé.



Figure 29. Lyophilisateur LABACONCO.

Protocole 1-B : Nous avons lancé une batterie de synthèses visant des taux de substitution suivants : 15, 60 et 90%. En effet, des quantités en anhydride succinique ont été recalculées pour chaque cas, elles sont égales respectivement à 0,275, 1,1 et 1,65g. Par contre, la quantité du catalyseur reste inchangée et égale à 0.67 g.

Protocole 1 –C : taux de substitution de 20%

Suite aux résultats obtenus avec les deux premiers cas, nous avons décidé de lancer une autre synthèse en visant un taux de substitution de 20 %. Contrairement au 1-B, la quantité en catalyseur a été ajustée. En effet, 0,45g de DMAP et 0,37g d'anhydride succinique ont été utilisées pour cette synthèse.

### 2.2.2) Protocole 2

La modification du dextrane a été également testée en apportant des calories. En effet, les mêmes étapes que précédemment ont été conduites à 50°C. Le but est d'accélérer la cinétique de la réaction selon le principe d'Arrhenius. En effet, la vitesse de réaction peut s'écrire de la manière suivante :

$$r = kC_1^{n_1} C_2^{n_2}$$

$$k = A \exp\left(-\frac{Ea}{RT}\right)$$

$r$  : vitesse de réaction ( $\text{mol.l}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ).

$k$  : constante de vitesse ( $(\text{mol}^{-1}.\text{l})^{n-1}.\text{s}^{-1}$ ).

$C_1, C_2$  : concentration en réactifs (dextrane et anhydride succinique).

$n_1, n_2$  : ordres partiels par rapport aux réactifs (dextrane et anhydride succinique).

$A$  : facteur préexponentiel.

$Ea$  : énergie d'activation.

$R$  : constante des gaz parfait et  $T$  : température.

On constate que la vitesse de réaction est proportionnelle à la constante de vitesse, qui elle-même fonction de température. La durée de réaction a été réduite à 2 heures.

<i>Protocole</i>	<i>Dextrane (g)</i>	<i>DMSO (ml)</i>	<i>DMAP (g)</i>	<i>Anhydride succinique (g)</i>	<i>Degré de substitution visé %</i>	<i>Température °C</i>	<i>Temps de réaction</i>		
1-A	1	50	0,67	0,55	30	ambiante	2jours		
1-B				0,275	15				
				1,1	60				
				1,65	90				
1-C			0,45	0,37	20			50	2h
2			0,67	0,55	30				
				0,275	15				
				1,1	60				
	1,65	90							

Tableau 9. Récapitulatif des deux protocoles utilisés pour modifier le dextrane.

### 2.3) Analyse

L'analyse des produits obtenus selon les différents protocoles décrits ci-dessus se fait par RMN du proton à 200 Hz. Les échantillons à analyser sont mis en solution dans du DMSO deutéré, avec une concentration d'environ 20 g/L.

### 2.4) Taux de substitution

Le taux de substitution réel du dextrane est calculé par un titrage acido-basique. En effet, chaque motif glucose sur lequel est greffé l'anhydride succinique, portera une fonction acide. La méthode de titrage, nous permet de calculer le nombre de moles de glucose greffé, et donc on pourra déduire le taux de substitution. Le titrage est assuré par un appareil, Titrateur Metrohm 716 DMS-Titrino. Le système est un potentiomètre équipé de burettes d'ajouts automatiques de la base (NaOH). Le logiciel Titration Network (TiNet 2.4) est associé au système, il gère les programmes de calibration et les titrations. Il permet également de tracer les courbes de titrage ainsi que le calcul des points d'équivalences.



Figure 30. Titrateur Metrohm 716 DMS-Titrino.

### 3. SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES

Il existe différentes méthodes de préparation de nanoparticules destinées à vectoriser un médicament. Le choix de la technique à utiliser dépend des propriétés physico-chimiques du principe actif à adresser. Dans le cadre de mon travail, l'incorporation d'un principe actif n'a pas été effectuée. De ce fait, nous avons procédé à la fabrication de nanoparticules à partir de plusieurs polymères, en vue de déterminer le meilleur polymère à utiliser pour la suite. Le dextrane modifié utilisé dans cette partie est différent de celui du paragraphe précédent.

#### 3.1) Protocole de fabrication des nanoparticules

Le protocole de préparation des nanoparticules est schématisé sur la figure 31. Les conditions opératoires utilisées (temps et puissance de l'agitation et de la sonication) ont été optimisées lors de travaux précédents effectués au laboratoire (LCPM), elles n'ont de ce fait pas été modifiées.

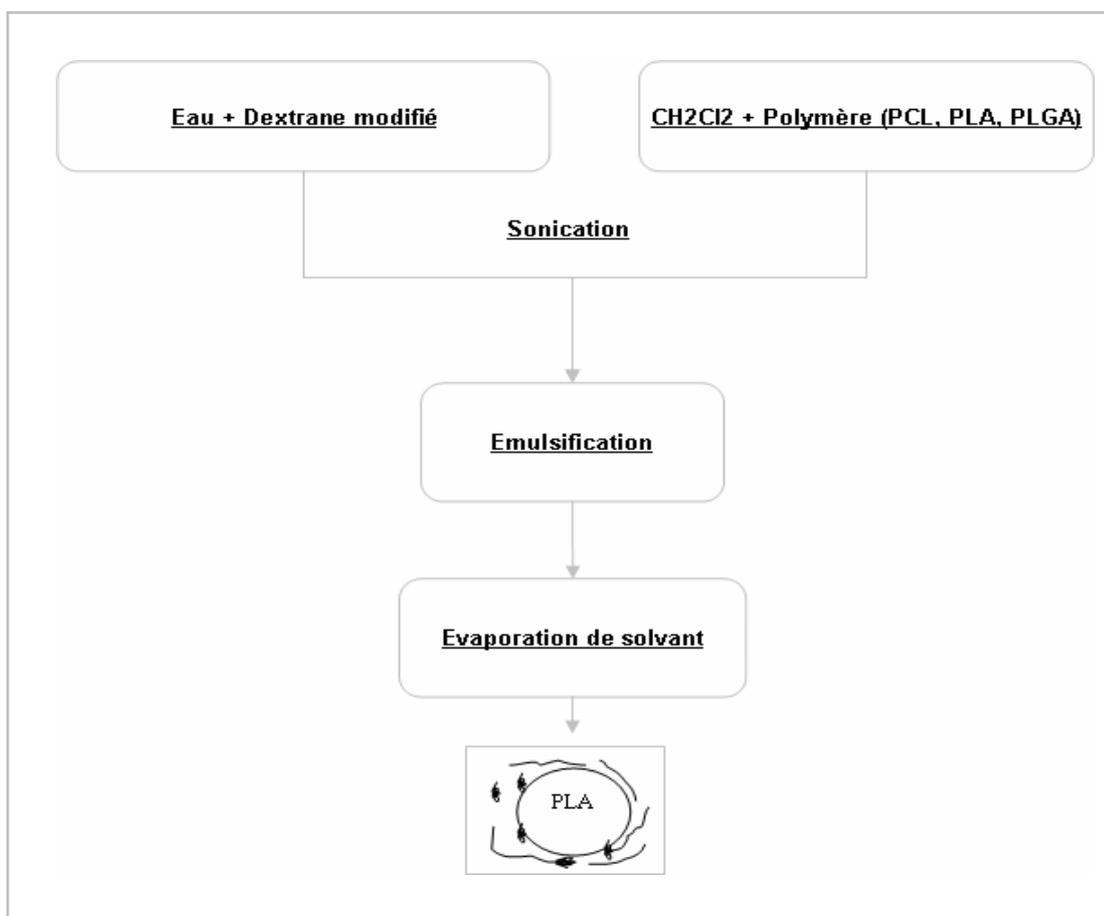


Figure 31. Schéma de préparation des nanoparticules suivant le protocole par émulsion directe.

10 ml de solution de dérivés de dextrane sont préparés à une concentration donnée. Dans 1 ml de dichlorométhane, 25 mg de polymère (élément constituant le cœur des particules) sont dissous. Une émulsion huile/eau est préparée par utilisation du vortex pendant 30s suivie par une sonication d'une puissance de 10 W en mode pulsé (50 % de cycle actif, pulse de 1 s) pendant 1 min. Le solvant organique est ensuite évaporé sous agitation à 37°C et sous pression atmosphérique pendant 1h30.

### 3.2) Influence du type de polymère et de la concentration en dextrane modifié

Cette étude a pour but de déterminer l'influence du type de polymère constituant le cœur de la particule (à une concentration de 25g/l) et de la concentration en dextrane modifié sur la taille des nanoparticules. Pour cela, trois polymères différents ont été utilisés avec deux types de dextrane modifié (DexC6 et DexC10) selon le procédé par émulsion directe. Les polymères utilisés sont le poly (DL-lactide-co-caprolactone) noté PCL, le poly (DL-lactide-coglycolide) noté PLGA et l'acide polylactique noté PLA. Par ailleurs, les dérivés de dextrane DexC6 et DexC10 ont été utilisés aux concentrations de 1 g/l, 2,5 g/l et 5 g/l. Les mesures effectuées ont été faites sur le MASTERSIZER 2000 (un équipement *MALVERN INSTRUMENTS*).

Les dérivés de dextrane DexC6 et DexC10 sont préparés par fixation de groupements hydrophobes sur les fonctions hydroxyles du polysaccharide grâce à une liaison éther. Cette réaction se fait en une seule étape, par réaction en milieu basique, du dextrane sur des dérivés 1,2- époxy porteur du motif hydrophobe. Il est ainsi possible d'obtenir du dextrane aliphatique à partir du 1,2- époxyoctane pour avoir du dextrane substitué, noté DexC6, et 1,2 époxydodécane pour obtenir du dextrane substitué, noté DexC10. Le taux de substitution du dextrane conditionne sa solubilité et au-delà d'un certain taux on constate l'apparition d'espèces insolubles.

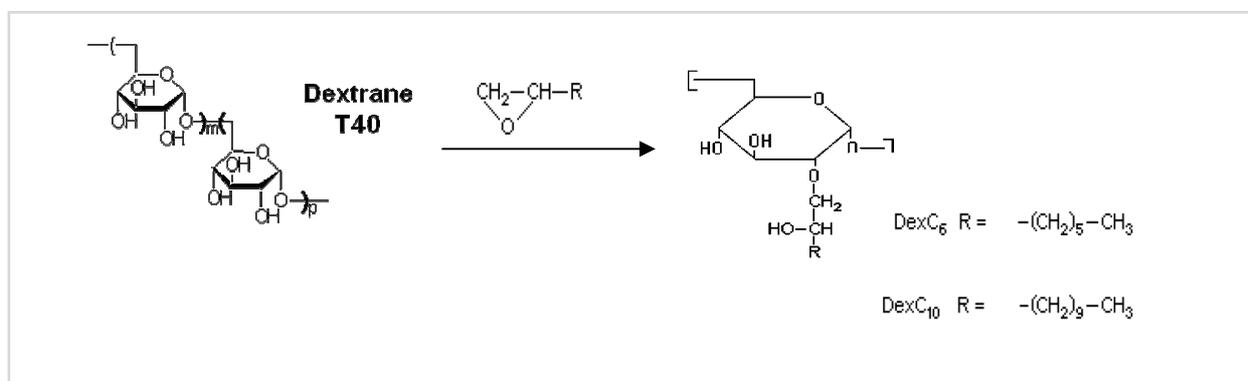


Figure 32. Schéma de synthèse (DexC<sub>6</sub> et DexC<sub>10</sub>).

<i>Polymère</i>	<i>Taux d'époxyde initial (<math>\mu\text{l/g}</math> de dextrane)</i>	<i>% d'époxyde initial (mol/mol glucose)</i>	<i>% de chaines greffées (mol/mol glucose)</i>
DexC6	282	30	3
	470	50	8
	651	69	10
	960	100	15
DexC10	134	10	3
	1076	80	7

Tableau 10. Influence de la quantité d'époxyde sur le taux de substitution du dextrane.

Pour cette étude, nous avons utilisé ces deux types de dextrane modifié avec un taux de substitution de 19% pour le DexC6 et de 5,2 % pour le DexC10.

### **3.3) Influence de la concentration en PLA dans la phase organique**

Afin de déterminer l'influence sur la taille des nanoparticules de la concentration en PLA, qui jusqu'à présent était de 25 g/l dans le dichlorométhane, des nanoparticules ont été fabriquées selon le protocole de l'émulsion directe mais avec une concentration en PLA 4 fois moins importante, soit 6,25 g/l. Ces nanoparticules ont été fabriquées avec différentes concentrations en DexC6 et DexC10.

## II) RESULTATS ET DISCUSSION

### 1. SYNTHÈSE, PURIFICATIONS ET IDENTIFICATION CHIMIQUE DU PEPTIDE « ATWLPPR »

Le profil du chromatographe obtenu après passage de l'échantillon sur la HPLC nous montre la présence de trois produits, avec des temps de rétention de 20, 23 et 31 min. ces fractions correspondant soit à des peptides de délétion, soit à un enchainement d'acide aminé ayant subi des modifications sur les chaînes latérales. La chromatographie préparative nous a permis de séparer ces trois fractions. Pour savoir si une de ces trois segments correspond au peptide désiré, nous avons analysé ces trois produits par spectrométrie de masse et par RMN.

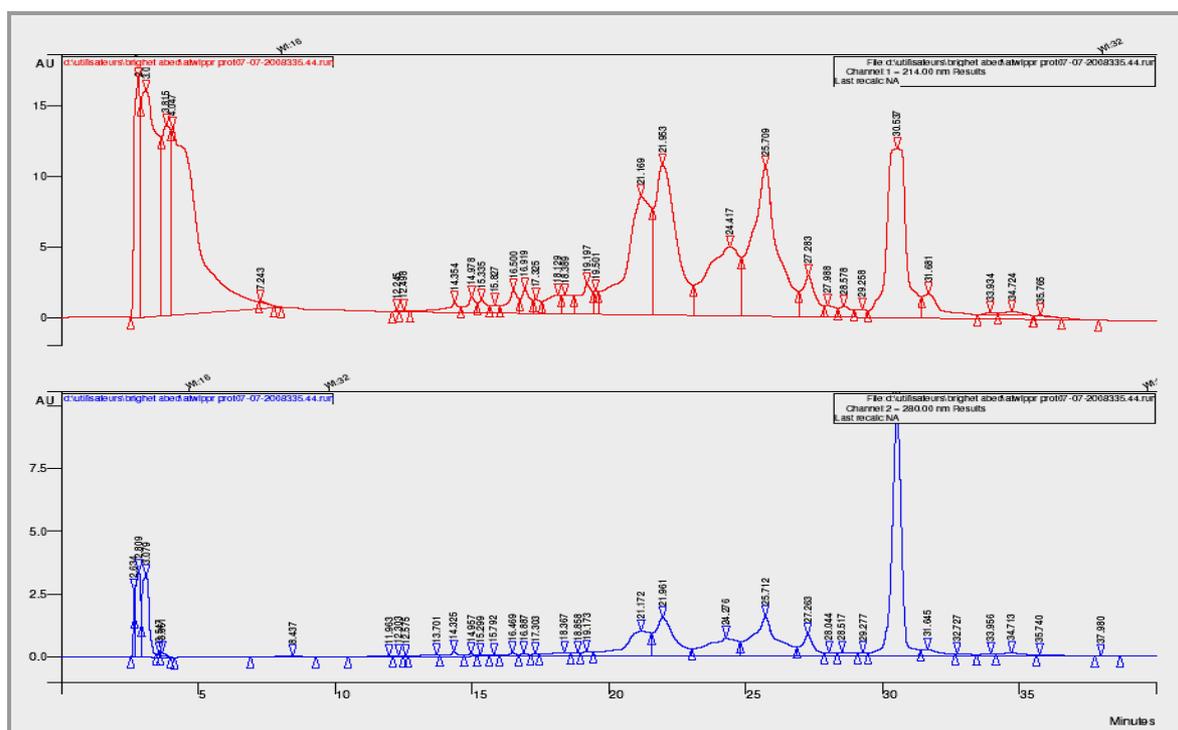


Figure 33. Profils chromatographiques de ATWLPPR avec détection par absorbance à 214 nm ensuite à 280 nm.

La spectrométrie de masse a permis d'identifier le peptide désiré « ATWLPPR » et qui correspond à la fraction 2. Une analyse par RMN  $^1\text{H}$  de cette fraction a permis de confirmer ce résultat.

	NH	$\alpha$ -H	$\beta$ -H	$\gamma$ -H	$\delta$ -H	autres
<b>Ala</b>		3,95	1,05 ;1,03			
<b>Thr</b>	8,36	3,95	4,33	1,04		5H=6,95 ; 2H,6H=6,97 ; 7H=7,30 4H=7,53 ; 1H=10,79
<b>Trp</b>	7,88	4,56	3,10 ;3,01			
<b>Leu</b>	8.11	4.53	1,27 ;1,24	1,58	0,86	
<b>Pro</b>		4.53	2.10 ;1.90	1,80	3,49	
<b>Pro</b>		4.33	2,00 ;1,80	1,90	3,56	
<b>Arg</b>	8.00	4.13	1,82	1,52	3,10	$\epsilon$ -NH=7,52

Tableau 11. Déplacements chimiques des protons d'ATWLPPR dans le DMSO deutéré (ppm).

Nous venons de démontrer la faisabilité de synthétiser et de purifier le peptide servant comme molécule pour cibler les co-récepteurs du VEGF. L'obtention d'un mélange contenant plusieurs produits, est due à l'appareil (Intavis AG). En effet, lors de la synthèse nous avons constaté des problèmes d'étanchéité qui ont certainement eu un impact sur la qualité finale du mélange obtenu. Les peptides est un meilleur choix pour une utilisation comme molécules ciblantes. En effet, la synthèse au niveau industriel à grand échelle ne devrait poser aucun problème, en plus, la production peut être totalement automatisée.

## 2. MODIFICATION CHIMIQUE DU DEXTRANE

### 2.1) Identification par RMN $^1\text{H}$

Le protocole 2 ne nous a pas permis d'obtenir les produits recherchés, et ceci malgré un catalyseur thermique. En effet les spectres RMN du proton obtenu à 200 Hz pour les quatre produits synthétisés en suivant ce protocole, ne correspondaient pas à des spectres de dextrane. Au contraire, les spectres RMN  $^1\text{H}$  des produits obtenus selon le protocole 1 montraient des similitudes avec le spectre du dextrane pur (*cf. partie bibliographique*,

paragraphe IV.3.2). Par contre, nous avons constaté la présence d'impuretés. Ces impuretés ont été identifiées comme étant de la DMAP n'ayant pas été éliminée par la dialyse (identification des protons de la double liaison sur les spectres RMN  $^1\text{H}$  (6,5-8ppm)). Il a été estimé judicieux de refaire les étapes de dialyse, mais cette fois-ci avec de l'eau acide (pH=3), qui permet d'ioniser la DMAP, et donc facilite l'élimination de celle-ci. Les spectres RMN  $^1\text{H}$  des produits synthétisés selon le protocole 1-A et 1-B, après avoir éliminé totalement la DMAP, sont présentés dans la figure 34.

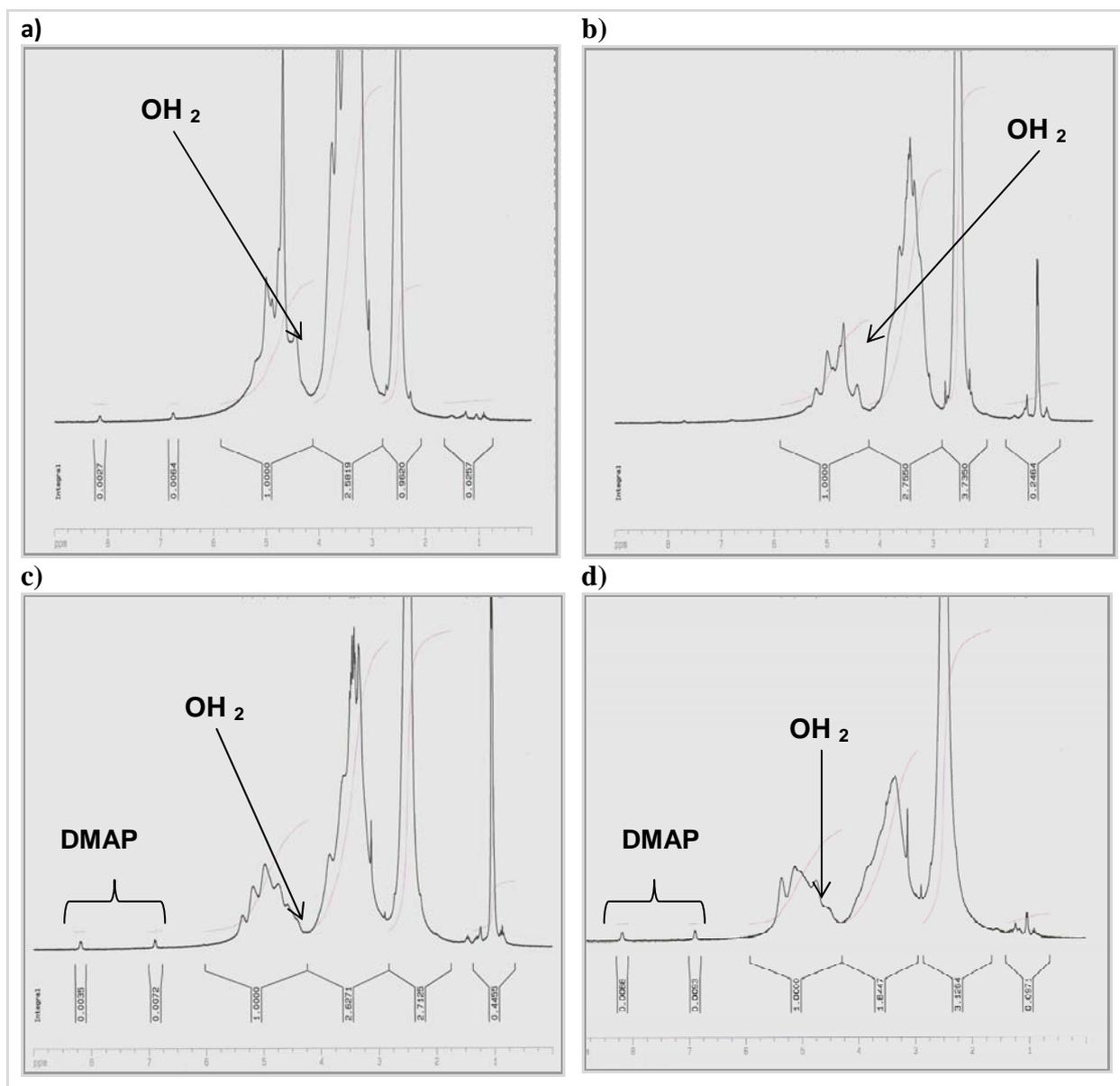


Figure 34. Spectres RMN  $^1\text{H}$  des produits obtenus selon le protocole 1-A et 1-B dans le DMSO. a) avec taux de substitution visé de 30%; b) 15% ; c) 60% et d) 90%.

Le protocole 1-C semble le plus adapté des trois. En effet, le spectre RMN  $^1\text{H}$  est beaucoup plus parlant. On identifie facilement les protons correspondant aux fonctions hydroxyle du dextrane. On remarque également que le pic correspondant au OH en position 2 est moins intense. Ceci montre qu'une partie des fonctions hydroxyle à cette position a réagi, conséquence du greffage de l'anhydride succinique sur le dextrane. Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du produit obtenu est présenté ci-dessous.

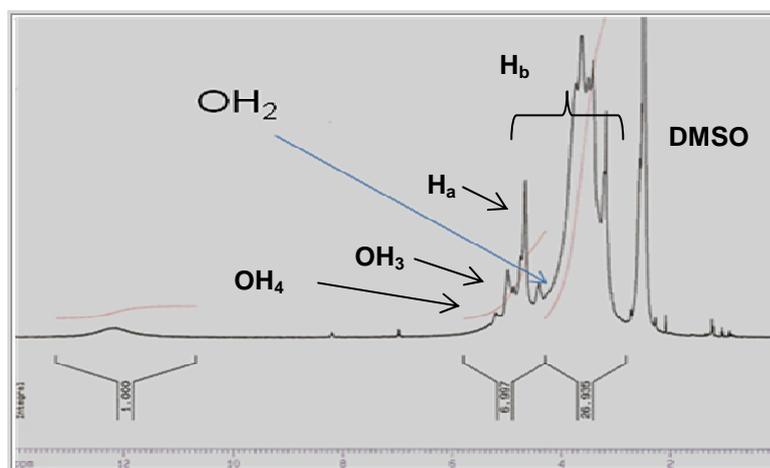


Figure 35. Spectres RMN  $^1\text{H}$  du dextrane modifié obtenu selon le protocole 1-C dans le DMSO.

## 2.2) Calcul du taux de substitution

Le dextrane ayant été modifié portera des fonctions acides. Le calcul du taux de substitution est rendu possible en réalisant un titrage acido-basique. D'après le point d'équivalence, on lit sur la courbe le volume de base ajouté correspondant à ce point, ce qui permet de calculer le nombre de moles de base. Ce nombre de moles correspond au nombre de moles de motif glucose greffé. Le taux de substitution est donné par l'équation suivante.

$$T = \left( \frac{A}{A + B} \right) \times 100$$

$$B = \frac{\left( m_0 - \left( A \times M_{r_{glcgreffé}} \right) \right)}{M_{r_{glc}}}$$

A : nombre de moles de glucose greffé

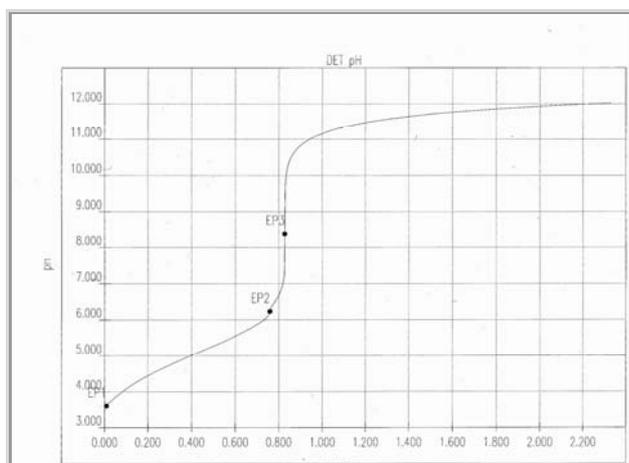
B : nombre de moles de glucose non greffé

$m_0$  : masse de l'échantillon en g

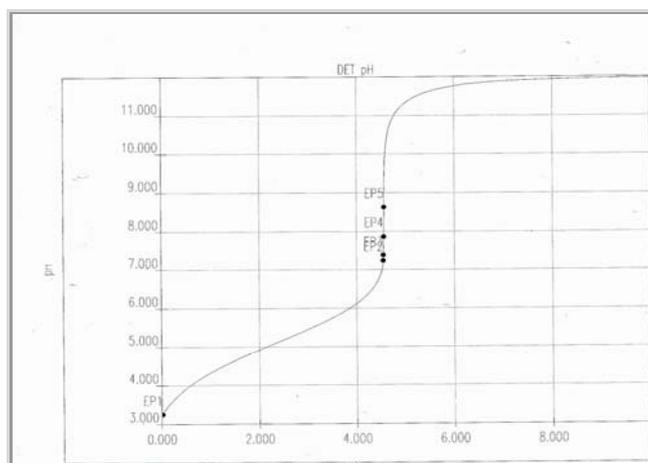
$M_{r_{glc greffé}}$  : masse molaire de glucose greffé  
(262 g/mol)

$M_{r_{glc}}$  : masse molaire de glucose (162 g/mol)

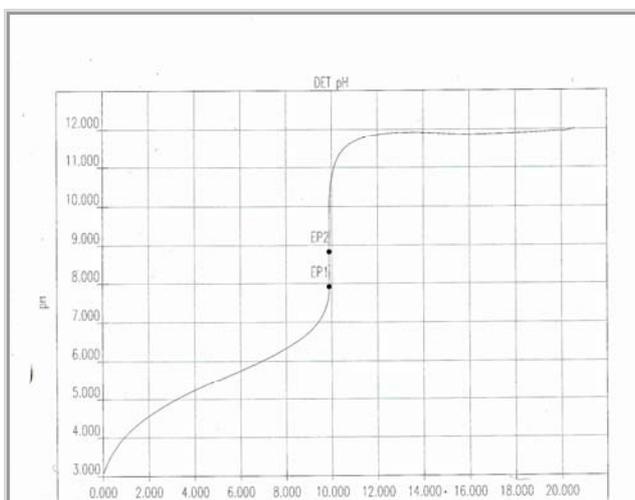
a) Protocole1-A, taux de substitution 30%



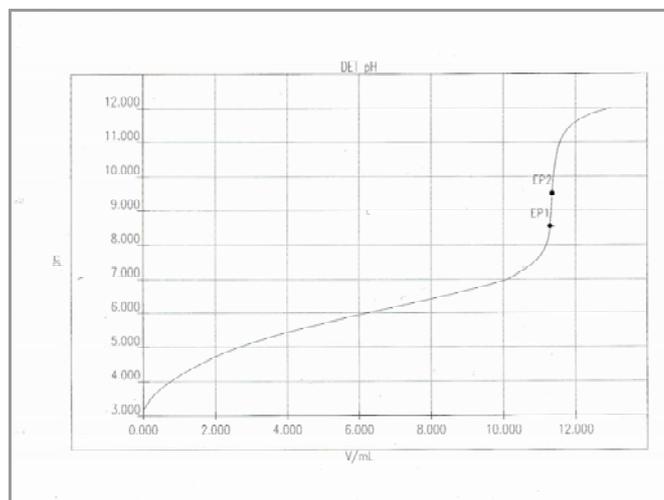
b) Protocole1-B, taux de substitution 15%



c) Protocole1-B, taux de substitution 60%



d) Protocole1-B, taux de substitution 90%



e) Protocole1-C, taux de substitution 20%

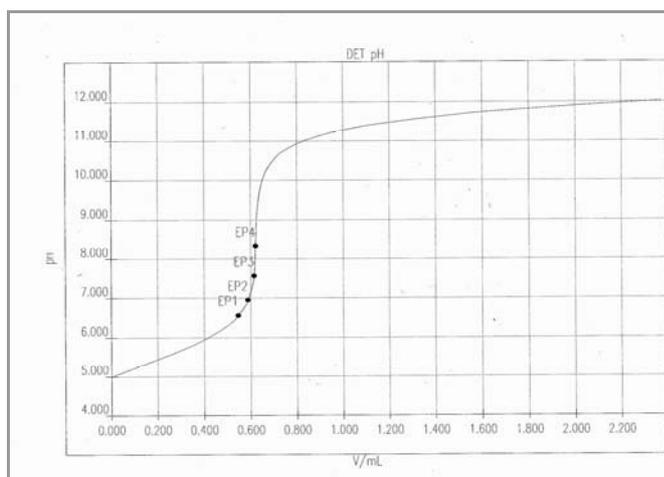


Figure 36. Courbes de titrage acido-basique des produits obtenus avec le protocole 1.

<i>Protocole</i>	<i>Quantité de l'anhydride succinique (g)</i>	<i>Taux de substitution visé (%)</i>	<i>Taux de substitution obtenu (%)</i>	<i>Ecart (%)</i>
<b>1-A</b>	0,55	30	48	60
<b>1-B</b>	0,275	15	33	120
	1,1	60	>100	-
	1,65	90	>100	-
<b>1-C</b>	0,37	20	31	55

Tableau 12. Récapitulatif des résultats obtenus avec le protocole 1.

On constate que les taux de substitutions pour les produits obtenus avec le protocole 1 (A et B), sont très supérieurs à ceux visés. Ceci peut être expliqué, par la présence d'anhydride succinique n'ayant pas été greffé, et qui reste mélangé au dextrane. Des étapes de dialyse supplémentaires à l'eau avec différents pH ont été effectuées sur ces produits, afin d'ioniser l'anhydride succinique non greffé, et donc favoriser son élimination. Malheureusement, ces taux de substitution restent aussi élevés.

Néanmoins, le produit obtenu selon le protocole 1-C présente un taux de substitution relativement proche de celui visé. Ce résultat est obtenu après avoir prolongé la durée de la deuxième étape de dialyse (eau pure).

### **3. SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES**

#### **3.1) Influence du type de polymère et du type et de la concentration en dextrane modifié**

Les résultats obtenus sont décrits dans le tableau 13.

<i>Polymère</i>	<i>Dextrane modifié</i>	<i>[dextrane] (g/l)</i>	<i>d<sub>moyen</sub> (nm)</i>	<i>d<sub>moyen</sub> par type de polymère</i>	<i>Ecart type <math>\sigma_{(N-1)}</math></i>	<i>Allure de la courbe de distribution</i>
<b>PCL</b>	DexC6	1	257	253	52	Trimodale
		2,5	218			Trimodale
		5	333			Bimodale
	DexC10	1	185			Trimodale
		2,5	237			Bimodale
		5	288			Bimodale
<b>PLGA</b>	DexC6	1	223	271	39	Trimodale
		2,5	238			Trimodale
		5	333			Trimodale
	DexC10	1	268			Unimodale
		2,5	288			Bimodale
		5	275			Bimodale
<b>PLA</b>	DexC6	1	125	116	6	Unimodale
		2,5	119			Unimodale
		5	112			Unimodale
	DexC10	1	120			Unimodale
		2,5	110			Unimodale
		5	110			Unimodale

Tableau 13. Diamètre moyen de nanoparticules obtenues selon le protocole par émulsion directe en fonction du type de polymère et de la concentration en dextrane modifié.

Afin de statuer sur l'influence du type de polymère et du type et de la concentration en dextrane modifié sur la taille des particules, des études statistiques par analyse de la variance ont été réalisées.

### 3.1.1) Etude de l'influence du type de polymère et de la concentration en dextrane modifié

Pour cette étude, seul le DexC6 a été pris en compte avec trois concentrations (1, 2,5 et 5 g/l) afin de simplifier la matrice.

			Facteur A (DexC6 (g/l))		
			i=1	i=2	i=3
			1	2,5	5
Facteur B (polymère)	j=1	PCL	257	218	333
	j=2	PLGA	223	238	333
	j=3	PLA	125	119	112

Tableau 14. Plan factoriel avec les deux facteurs étudiés (concentration en DexC6 et type du polymère).

La comparaison des estimations de la variance, donc des carrés moyens entre eux par le test de Fischer-Snedecor, permettra de vérifier l'influence éventuelle des facteurs contrôlés. On compare  $F$  calculé à la valeur tabulée  $F_{\alpha; \nu_A; \nu_{AB+R}}$  pour le facteur A,  $F_{\alpha; \nu_B; \nu_{AB+R}}$  pour B.  $\alpha$  est le niveau de signification et qui est fixé à 0.05. Si  $F$  est inférieure à la valeur tabulée pour le niveau de signification  $\alpha$ , le facteur étudié n'a pas d'influence. Le calcul des estimations de variance se fait en respectant la procédure détaillée ci-dessous.

La somme des carrés moyenne est égale à la somme des carrés divisée par le nombre de degrés de liberté correspondant.

$$SS_A = \frac{SS_A}{\nu_A}$$

$$SS_B = \frac{SS_B}{\nu_B}$$

$$SS_{AB} = \frac{SS_{AB}}{\nu_{AB}}$$

$\nu$  est le degré de liberté.

La somme des carrés pour les différents facteurs se calcule en utilisant les équations suivantes :

Pour l'effet sur A :

$$SS_A = m_B \sum_i a_i^2, \text{ avec } a_i = (\bar{x}_{i.} - \bar{x}_{..})^2$$

Pour l'effet sur B :

$$SS_B = m_A \sum_j b_j^2, \text{ avec } b_j = (\bar{x}_{.j} - \bar{x}_{..})^2$$

Pour l'interaction AB et l'erreur d'analyse (plan factoriel sans répétition, l'interaction AB et l'erreur sont confondues) :

$$SS_{AB+R} = \sum_i \sum_j (x_{ij} - \bar{x}_{i.} - \bar{x}_{.j} + \bar{x}_{..})^2$$

La moyenne de la population  $\bar{x}_{..}$  égale à :

$$\bar{x}_{..} = \frac{1}{m_A \times m_B} \sum_i \sum_j x_{ij}$$

La somme totale des carrés  $SS_T$  se calcule comme suivant :

$$SS_T = SS_A + SS_B + SS_{AB+R} = (m_A m_B - 1) \times s^2$$

$s$  : L'écart type de la population.

La comparaison des estimations de la variance par le test de Fischer-Snedecor est détaillée dans le suivant.

Source de variation	Somme des carrés	Degré de liberté(v)	carré moyen (ss)	F	F <sub>référence</sub>
<b>A : [DexC6]</b>	$SS_A = 8004$	$m_A - 1 = 2$	$SS_A / v_A = 4002$	$SS_A / SS_{AB} = 2,65$	$F_{0.05;v_A;v_{AB}} = 6,94$
<b>B : Polymère</b>	$SS_B = 44038$	$m_B - 1 = 2$	$SS_B / v_B = 22019$	$SS_B / SS_{AB} = 14,59$	$F_{0.05;v_B;v_{AB}} = 6,94$
<b>AB</b>	$SS_{AB} = 6038$	$(m_A - 1)(m_B - 1) = 4$	$SS_{AB} / v_{AB} = 1509$		
<b>Total</b>	58080	$m_A m_B - 1 = 8$			
<b>Conclusion</b>	<b>Concentration en DexC6 n'a pas d'influence</b>				
	<b>Type de polymère a de l'influence</b>				

Tableau 15. Analyse de la variance du plan factoriel à deux facteurs (concentration en DexC6 et type du polymère).

### 3.1.2) Etude de l'influence du type de dextrane modifié avec une concentration fixée à 2,5 g/L

		Facteur A (type de Dex)		
		i=1	i=2	
		DexC6	DexC10	
Facteur B (polymère)	j=1	PCL	218	237
	j=2	PLGA	238	288
	j=3	PLA	119	110

Tableau 16. Plan factoriel avec les deux facteurs étudiés (type de Dex et la nature du polymère).

La comparaison des estimations de la variance par le test de Fischer-Snedecor est détaillée dans le tableau suivant.

Source de variation	Somme des carrés	Degré de liberté(v)	carré moyen (ss)	F	F <sub>référence</sub>
<b>A</b>	600	$m_A - 1 = 1$	$SS_A / v_A = 600$	$SS_A / SS_{AB} = 1.38$	$F_{0.05; v_A; v_{AB}} = 18.5$
<b>B</b>	24054	$m_B - 1 = 2$	$SS_B / v_B = 12027$	$SS_B / SS_{AB} = 27.62$	$F_{0.05; v_B; v_{AB}} = 19$
<b>AB</b>	871	$(m_A - 1)(m_B - 1) = 2$	$SS_{AB} / v_{AB} = 436$		
<b>Total</b>	25525	$m_A m_B - 1 = 5$			
<b>Conclusion</b>	<b>Type de Dextrane modifié n'a pas d'influence</b>				
	<b>Nature du polymère a de l'influence</b>				

Tableau 17. Analyse de la variance du plan factoriel à deux facteurs (type de Dex et la nature du polymère).

Il n'apparaît pas de différence significative liée au type de dextrane modifié (DexC6 ou DexC10) ni à sa concentration. Par ailleurs, le type de polymère a de l'influence sur la taille des nanoparticules. Si on examine les résultats du tableau 13, le meilleur polymère est l'acide polylactique (PLA). Il permet d'obtenir une distribution unimodale de nanoparticules avec un faible diamètre (116 nm en moyenne).

### 3.2) Influence de la concentration en PLA dans la phase organique

Suite aux résultats du *paragraphe 3.1*, nous avons voulu connaître l'influence de la concentration en PLA dans la phase organique sur la taille des particules. Des nanoparticules ont été fabriquées avec une concentration en PLA de 6,25 g/L. Les résultats sont comparés avec ceux obtenus dans l'étude précédente. L'ensemble des résultats figure dans le tableau 18.

<i>Concentration en PLA (g/L)</i>	<i>Dextrane modifié</i>	<i>Concentration du dérivé dextrane (g/l)</i>	<i>Diamètre moyen (nm)</i>	<i>Allure de la courbe de distribution</i>
<b>6,25</b>	<b>DexC6</b>	1	680	Polymodale
		2,5	290	Trimodale
		5	148	Unimodale
	<b>DexC10</b>	1	270	Bimodale
		2,5	163	Unimodale
		5	155	Unimodale
<b>25</b>	<b>DexC6</b>	1	125	Unimodale
		2,5	119	Unimodale
		5	112	Unimodale
	<b>DexC10</b>	1	120	Unimodale
		2,5	110	Unimodale
		5	110	Unimodale

Tableau 18. Diamètre moyen de nanoparticules obtenues selon le protocole par émulsion directe en fonction de la concentration en PLA.

Le plan factoriel qui a été composé pour cette étude compare l'influence de deux facteurs, concentration en PLA et la concentration en DexC10. En effet, ce dernier donne des nanoparticules présentant une distribution homogène en termes de taille (distribution unimodale avec les deux concentrations en PLA).

		<b>Facteur A (DexC10 (g/l))</b>			
		<b>i=1</b>	<b>i=2</b>	<b>i=3</b>	
		<b>1</b>	<b>2,5</b>	<b>5</b>	
<b>Facteur B (Concentration en PLA)</b>	<b>j=1</b>	<b>6,25</b>	270	163	155
	<b>j=2</b>	<b>25</b>	120	110	110

Tableau 19. Plan factoriel avec les deux facteurs étudiés (concentration en DexC10 et la concentration en PLA).

La comparaison des estimations de la variance par le test de Fischer-Snedecor est détaillée dans le tableau suivant.

Source de variation	Somme des carrés	Degré de liberté(v)	carré moyen (ss)	F	F <sub>référence</sub>
<b>A : [DexC10]</b>	$SS_A = 4896$	$m_A - 1 = 2$	$SS_A / v_A = 2448$	$SS_A / SS_{AB} = 1.43$	$F_{0.05; v_A; v_{AB}} = 19.00$
<b>B : [PLA]</b>	$SS_B = 10251$	$m_B - 1 = 1$	$SS_B / v_B = 10251$	$SS_B / SS_{AB} = 6.00$	$F_{0.05; v_B; v_{AB}} = 18.50$
<b>AB</b>	$SS_{AB} = 3416$	$(m_A - 1)(m_B - 1) = 2$	$SS_{AB} / v_{AB} = 1708$		
<b>Total</b>	$SS_T = 10563$	$m_A m_B - 1 = 5$			
<b>Conclusion</b>	<b>Concentration en DexC10 n'a pas d'influence</b>				
	<b>Concentration en PLA n'a pas de l'influence</b>				

Tableau 20. Analyse de la variance du plan factoriel à deux facteurs (concentration en DexC10 et concentration en PLA).

Donc, le diamètre moyen des nanoparticules obtenues avec une concentration en PLA de 6.25 g/l dans la phase organique est sensiblement identique à celui des nanoparticules fabriquées avec 25 g/L. Cette dilution en PLA n'a donc pour effet que de diluer les nanoparticules dans la solution (diminution de leur nombre par unité de volume) sans modifier leur taille et donc la surface globale par unité de masse de PLA. Cette étude confirme également que la concentration en dextrane modifié n'a pas d'influence sur la taille des nanoparticules au moins pour ce procédé de fabrication.

### 3.3) Conclusion

Les travaux effectués permettent de conclure que sur les trois polymères étudiés, le poly (acide lactique) présente les résultats les plus satisfaisants, en permettant une meilleure stabilité des nanoparticules et une taille optimale (environ 116 nm de diamètre).

D'autre part, la concentration et la nature du dérivé de dextrane (DexC6 ou DexC10) n'a pas d'influence significative sur la taille des nanoparticules obtenues par émulsion directe. Néanmoins, en lisant les résultats du tableau 18, il apparaît qu'il existe pour une concentration donnée en PLA, une concentration limite en dérivé dextrane. En dessous de cette concentration les nanoparticules ne sont plus stables et présentent une hétérogénéité pour leur taille (2,5 g/l pour le DexC6 et 1 g/l pour le DexC10). Donc, il reste à prouver cette constatation, en vérifiant par exemple la reproductibilité de ces résultats.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail de projet de fin d'études s'inscrit dans le cadre de développement de nouveaux systèmes d'administration de médicaments, et plus particulièrement les nanoparticules. Nous avons exploré une des applications médicales offertes par ces systèmes : ciblage thérapeutique.

Nous avons vu dans la première partie de ce manuscrit les nouvelles stratégies anticancéreuses, et notamment la thérapie anti-vasculaire, visant les marqueurs moléculaires spécifiques des cellules endothéliales bordant les vaisseaux sanguins tumoraux, comme les co-récepteurs au VEGF. Pour cela, des peptides comme ATWLPPR pourront être associés à des cytotoxiques dans des systèmes particuliers.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié la possibilité de coupler un heptapeptide (ATWLPPR) spécifique de la NRP-1, co-récepteur du VEGF, au dextrane par un intermédiaire d'un bras espaceur (Anhydride succinique).

Nous avons démontré la faisabilité de coupler le bras espaceur (anhydride succinique) au dextrane. La méthode d'analyse par RMN a permis d'établir un protocole permettant d'obtenir le produit recherché tout en maîtrisant le taux de substitution. L'étude sur l'influence de la nature des polymères sur la taille des nanoparticules nous a conduit à conclure que le PLA présente des résultats satisfaisants avec une meilleure stabilité des nanoparticules et une taille optimale. Néanmoins, ces constatations sont faites avec des nanoparticules ne renfermant pas de principe actif, et doivent être confirmées après l'encapsulation de substance chimique. En effet, le comportement des particules peut être différent dans les deux cas. Par ailleurs, des améliorations peuvent être apportées à cette analyse statistique. Il serait intéressant de réaliser un plan d'expérience avec un nombre important de test pour chaque facteur étudié.

Le greffage du peptide « ATWLPPR » sur la couronne de dextrane modifié est la prochaine étape avant l'encapsulation d'un principe actif dans les nanoparticules pour effectuer les tests *in vitro et in vivo*. En effet, plusieurs études restent à réaliser, faute de temps. Le greffage du peptide sera réalisé en faisant réagir la fonction N-terminal de l'heptapeptide avec la fonction COOH libérée suite au couplage de l'anhydride succinique sur le dextrane. Afin de faciliter cette réaction, il est préférable d'activer la fonction COOH en remplaçant le H par un bon groupement partant.

Il serait nécessaire de réaliser une étude *in vitro*, avec ces nanoparticules comportant la molécule ciblante (peptide : ATWLPPR) et renfermant un cytotoxique, sur des cellules endothéliales, par exemple de type HUVEC exprimant NRP-1, ainsi qu'une étude comparative avec le même système, mais dépourvu de peptide.

Les peptides peuvent être dégradés *in vivo* par des peptidases, ce qui diminuerait fortement la sélectivité vis-à-vis des néovaisseaux. Pour cela, une étude de stabilité *in vitro et in vivo* devrait également être réalisée. L'affinité pour NRP-1 du peptide accroché à la nanoparticule est certainement différente de celle du peptide seul, et voir probablement faible suite au couplage. Cette affinité pourrait être améliorée, en étudiant différents taux de greffage et d'en tirer, celui qui maximise cette affinité.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1) PITOT, H.; DRAGAN, Y. «Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis», *Faseb Journal*, 1991, 2280-6.
- 2) HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. «The hallmarks of cancer», *CELL*, 2000, 100:57-70.
- 3) GRIFFIOEN, A.; MOLEMA, G. «Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation», *Pharmacological Reviews*, 2000, 52(2): 237-68.
- 4) SCHRAA, A.; EVERTS, M.; KOK, R. ET AL. «Development of vasculature targeting strategies for the treatment of cancer and chronic inflammatory diseases », *Biotechnology Annual Review*, 2002, 81:33-65.
- 5) COUJARD, R.; PIORIER, J.; RACADOT, J. «Precis d'histologie humaine», *Ed. Masson*, 1980, 2-225-62690-1:373-377.
- 6) BONNET, C.; WALSH, D. «Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation», *Rheumatology (Oxford)*, 2005, 44(1): 7-16.
- 7) RISAU, W. «Mechanisms of angiogenesis», *Nature*, 1997, 86(6626): 671-4.
- 8) DJONOV, V.; BAUM, O.; BURRI, P. ET AL. «Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis», *Cell Tissue Research*, 2003, 314(1): 107-17.
- 9) SCOAZEC, J. «Tumor angiogenesis », *Ann Pathol*, 2000, 20(1): 25-37.
- 10) AUERBACH, R.; LEWIS, R.; SHINNERS, B. ET AL. «Angiogenesis assays: a critical overview », *Clinical Chemistry*, 2003, 49(1): 32-40.
- 11) FOLKMAN, J. «What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? », *Journal of the National Cancer Institute*, 1990, 82(1): 4-6.
- 12) HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. «Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis», *Cell*, 1996, 86(3): 353-64.
- 13) KERBEL, R.; FOLKMAN, J. «Clinical translation of angiogenesis inhibitors », *Nature Reviews Cancer*, 2002, 2(10): 727-39.
- 14) PUGH, C.; RATCLIFFE, P. «Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system», *Nature Medicine*, 2003, 9(6): 677-84.
- 15) ABEDI, H.; ZACHARY, I. «Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells », *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(24): 15442-51.

- 16) FOLKMAN, J. «Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease », *Nature Medicine*, 1995, 1(1): 27-31.
- 17) BERGERS, G.; BENJAMIN, L.E. «Tumorigenesis and the angiogenic switch », *Nature Reviews Cancer*, 2003, 3(6):401-10.
- 18) MCDONALD, DM.; CHOYKE, PL. «Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic », *Nature Medicine*, 2003; 9(6): 713-25.
- 19) HLATKY, L.; TSIONOU, C.; HAHNFELDT, P. ET AL «Mammary fibroblasts may influence breast tumor angiogenesis via hypoxia-induced vascular endothelial growth factor up-regulation and protein », *Cancer Research*, 1994, 54(23):603-6.
- 20) FAYETTE, J.; SORIA, J.; ARMAND, J. ET AL «Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment», *European Journal of Cancer*, 2005, 41(8): 1109-16.
- 21) LIEKENS, S.; DE, C. E.; NEYTS, J.ET AL «Angiogenesis: regulators and clinical applications», *Biochemical Pharmacology*, 2001, 61(3): 253-70.
- 22) JIAN-MIAO, J.M.; LAWRENCE, F.; KOVACEVIC, M. ET AL. «The tetrapeptide AcSDKP, an inhibitor of primitive hematopoietic cell proliferation, induces angiogenesis in vitro and in vivo», *Blood*, 2003, 101(8):3014-3020.
- 23) FROMES, Y.; LIU, J.M., KOVACEVIC, M. ET AL. «The tetrapeptide acetyl-serine-aspartyl-lysine-proline improves skin flap survival and accelerates wound healing», *Wound Repair Regen*, 2006, 14(3): 306-12.
- 24) WAECKEL, L.; BIGNON, J.; LIU, J.M. ET AL. «Tetrapeptide AcSDKP Induces Postischemic Neovascularization Through Monocyte Chemoattractant Protein-1 Signaling», *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2006, 26:773-779.
- 25) LIU, J.M., BIGNON, J., ILIC, V. ET AL. «Evidence for an association of high levels of endogenous Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro, a potent mediator of angiogenesis, with acute myeloid leukemia development», *Leukemia and Lymphoma*, 2006, 47(9):1915-1920.
- 26) LIU, J.M., KUSINSKI, M., ILIC, V. ET AL. «Overexpression of the angiogenic tetrapeptide AcSDKP in human malignant tumors», *Anticancer Research*, 2008, 28:2813-2818.
- 27) O'REILLY, M.; HOLMGREN, L.; SHING, Y. ET AL. «Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth», *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1994, 59:471-82.
- 28) O'REILLY, M.; BOEHM, T.; SHING, Y. ET AL. «Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth», *Cell*, 1997, 88(2): 277-85.
- 29) SENGER, D.; GALLI, S.; DVORAK, A. ET AL. «Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid», *Science*, 1983, 219(4587): 983-5.
- 30) FERRARA, N.; HENZEL, W. «Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells», *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1989, 161(2): 851-8.

- 31) KECK, P.; HAUSER, S.; KRIVI, G. ET AL. «Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF», *Science*, 1989, 246(4935): 1309-12.
- 32) LEUNG, D.; CACHIANES, G.; KUANG, W. ET AL. «Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen», *Science*, 1989, 246(4935): 1306-9.
- 33) CARMELIET, P.; FERREIRA, V.; BREIER, G. ET AL. «Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele», *Nature*, 1996, 380(6573): 435-9.
- 34) FERRARA, N.; CARVER-MOORE, K.; CHEN, H. ET AL. «Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene», *Nature*, 1996, 380(6573): 439-42.
- 35) MIQUEROL, L.; LANGILLE, B.; NAGY, A. ET AL «Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression», *Development*, 2000, 127(18): 3941-6.
- 36) TAKAHASHI, H.; SHIBUYA, M. «The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions », *Clinical Science*, 2005, 109(3): 227-41.
- 37) GERBER, H.; VU, T.; RYAN, A. ET AL. «VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation», *Nature Medicine*, 1999, 5(6): 623-8.
- 38) KIM KJL, B.; WINER, J.; ARMANINI, M. ET AL. «Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo», *Nature*, 1993, 362:841-844.
- 39) DVORAK, H. «Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy», *Journal of Clinical Oncology*, 2002, 20(21): 4368-80.
- 40) BERSE, B.; BROWN, L.; VAN DE WATER, L. ET AL. «Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors», *Molecular Biology of the Cell*, 1992, 3(2): 211-20.
- 41) FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. «The biology of vascular endothelial growth factor», *Endocrine Reviews*, 1997, 18(1): 4-25.
- 42) MELTER, M.; REINDERS, M.; SHO, M. ET AL. «Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo», *Blood*, 2000, 96(12): 3801-8.
- 43) GOLDBERG, M.; SCHNEIDER, T. «Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin», *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(6): 4355-9.
- 44) SHWEIKI, D.; ITIN, A.; DOFFER, D. ET AL.«Vascular Endothelial Growth Factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis », *Nature*, 1992, 359:843-845.

- 45) SHIMA, D.; DEUTSCH, U.; D'AMORE, P. ET AL. «Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability», *FEBS Lett*, 1995, 370(3): 203-8.
- 46) SEMENZA, G. «Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1», *Biochemical Pharmacology*, 2002, 64(5-6): 993-8.
- 47) BROGI, E.; WU, T.; NAMIKI, A. ET AL. «Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only», *Circulation*, 1994, 90(2): 649-52.
- 48) STAVRI, G.; ZACHARY, I.; BASKERVILLE, P. ET AL. «Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells Synergistic interaction with hypoxia», *Circulation*, 1995, 92(1): 11-4.
- 49) WARREN, R.; YUAN, H.; MATLI, M. ET AL. «Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma», *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(46): 29483-8.
- 50) CULLINAN-BOVE, K.; KOOS, R. «Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth», *Endocrinology*, 1993, 133(2): 829-37.
- 51) MUELLER, M.; VIGNE, J.; MINCHENKO, A. ET AL. «Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta», *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 2000, 97(20): 10972-7.
- 52) MUELLER, M.; VIGNE, J.; PRITTS, E. ET AL. «Progestins activate vascular endothelial growth factor gene transcription in endometrial adenocarcinoma cells», *Fertility and Sterility*, 2003, 79(2): 386-92.
- 53) SCHWARZENBACH, H.; CHAKRABARTI, G.; PAUST, H. ET AL. «Gonadotropin-mediated regulation of the murine VEGF expression in MA-10 Leydig cells», *Journal of Andrology*, 2004, 25(1): 128-39.
- 54) SHIFREN, J.; MESIANO, S.; TAYLOR, R. ET AL. «Corticotropin regulates vascular endothelial growth factor expression in human fetal adrenal cortical cells», *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1998, 83(4): 1342-7.
- 55) SOH, E.; SOBHI, S.; WONG, M. ET AL. «Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines», *Surgery*, 1996, 120(6): 944-7.
- 56) MULLER, Y.; CHRISTINGER, H.; KEYT, B. ET AL. «The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding», *Structure*, 1997, 5(10): 1325-38.
- 57) VINCENTI, V.; CASSANO, C.; ROCCHI, M. ET AL. «Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3», *Circulation*, 1996, 93(8): 1493-5.

- 58)** TISCHER, E.; MITCHEL, R.; HARTMAN, T. ET AL. «The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing», *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(18): 11947-54.
- 59)** MAGLIONE, D.; GUERRIERO, V.; VIGLIETTO, G. ET AL. «Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor», *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1991, 88(20): 9267-71.
- 60)** PERSICO, M.; VINCENTI, V.; DIPALMA, T. ET AL. «Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PIGF) », *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1999, 23731-40.
- 61)** TORRY, D.; MUKHERJEA, D.; ARROYO, J. ET AL.. «Expression and function of placenta growth factor: implications for abnormal placentation», *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 2003, 10(4): 178-88.
- 62)** PARK, J.; CHEN, H.; WINER, J. ET AL. «Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR», *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(41): 25646-54.
- 63)** SAWANO, A.; TAKAHASHI, T.; YAMAGUCHI, S. ET AL. «Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor», *Cell Growth Differ*, 1996, 7(2): 213-21.
- 64)** MAGLIONE, D.; GUERRIERO, V.; VIGLIETTO, G. ET AL. «Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PIGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14», *Oncogene*, 1993, 8(4): 925-31.
- 65)** YANG, W.; AHN, H.; HINRICHS, M. ET AL. «Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PIGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells», *Journal of Reproductive Immunology*, 2003, 60(1): 53-60.
- 66)** OLOFSSON, B.; PAJUSOLA, K.; KAIPAINEN, A. ET AL. «Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells», *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 1996, 93(6): 2576-81.
- 67)** OLOFSSON, B.; JELTSCH, M.; ERIKSSON, U. ET AL.. «Current biology of VEGF-B and VEGF-C», *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, 10(6): 528-35.
- 68)** JOUKOV, V.; PAJUSOLA, K.; KAIPAINEN, A. ET AL. «A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases», *EMBO Journal*, 1996, 15(7): 1751.
- 69)** LOHELA, M.; SAARISTO, A.; VEIKKOLA, T. ET AL. «Lymphangiogenic growth factors, receptors and therapies», *Thromb Haemost*, 2003, 90(2): 167-84.
- 70)** LYTTLE, D.; FRASER, K.; FLEMING, S. ET AL. «Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus», *Journal of Virology*, 1994, 68(1): 84-92.

- 71) TOKUNAGA, Y.; YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. ET AL. «Localization of heparin- and neuropilin-1-recognition sites of viral VEGFs», *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 348(3): 957-62.
- 72) JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I.; FARSKY, S.; OLIVEIRA, M. ET AL. «Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* pit viper. A new member of the VEGF family of proteins», *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(43): 39836-42.
- 73) KOMORI, Y.; NIKAI, T.; TANIGUCHI, K. ET AL. «Vascular endothelial growth factor VEGF-like heparin-binding protein from the venom of *Vipera aspis aspis* (Aspic viper) », *Biochemistry*, 1999, 38(36): 11796-803.
- 74) GASMI, A.; BOURCIER, C.; ALOUI, Z. ET AL. «Complete structure of an increasing capillary permeability protein (ICPP) purified from *Vipera lebetina* venom. ICPP is angiogenic via vascular endothelial growth factor receptor signalling», *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(33): 29992-8.
- 75) YAMANE, A.; SEETHARAM, L.; YAMAGUCHI, S. ET AL. «A new communication system between hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in liver through vascular endothelial growth factor and Flt tyrosine kinase receptor family (Flt-1 and KDR/Flk-1) », *Oncogene*, 1994, 9(9): 2683-90.
- 76) QUINN, T.; PETERS, K.; DE VRIES, C. ET AL. «Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium», *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 1993, 90(16): 7533-7.
- 77) TERMAN, B.; DOUGHER-VERMAZEN, M.; CARRION, M. ET AL. «Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor», *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1992, 187(3): 1579-86.
- 78) BARLEON, B.; SOZZANI, S.; ZHOU, D.; WEICH, H. ET AL. «Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1», *Blood*, 1996, 87(8): 3336-43.
- 79) HATTORI, K.; HEISSIG, B.; WU, Y. ET AL. «Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment», *Nature Medicine*, 2002, 8(8): 841-9.
- 80) CHRISTINGER, H.; FUH, G.; DE VOS, A. ET AL.. «The crystal structure of placental growth factor in complex with domain 2 of vascular endothelial growth factor receptor-1», *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(11): 10382-8.
- 81) SAWANO, A.; IWAI, S.; SAKURAI, Y. ET AL. «Flt-1 vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans», *Blood*, 2001, 97(3): 785-91.
- 82) KATOH, O.; TAUCHI, H.; KAWAISHI, K. ET AL. «Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation», *Cancer Research*, 1995, 55(23): 5687-92.

- 83)** GROSSKREUTZ, C.; ANAND-APTE, B.; DUPLAA, C. ET AL. «Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro», *Microvascular Research*, 1999, 58(2): 128-36.
- 84)** BENJAMIN, L.; GOLIJANIN, D.; ITIN, A. ET AL. «Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal », *Journal of Clinical Investigation*, 1999, 103(2): 159-65.
- 85)** GERBER, H.; DIXIT, V.; FERRARA, N. ET AL. «Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells», *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(21): 13313-6.
- 86)** CONNOLLY, D.; OLANDER, J.; HEUVELMAN, D. ET AL. «Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells», *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(33): 20017-24.
- 87)** PEPPER, MS.; FERRARA, N.; ORCI, L. ET AL. «Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro», *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1992, 189(2): 824-31.
- 88)** SOKER, S.; TAKASHIMA, S.; MIAO, H. ET AL. «Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor», *Cell*, 1998, 92(6): 735-45.
- 89)** BROHOLM, H.; LAURSEN, H. «Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor neuropilin-1's distribution in astrocytic tumors», *Apmis*, 2004, 112(4-5): 257-63.
- 90)** STEPHENSON, J.; BANERJEE, S.; SAXENA, N. ET AL. «Neuropilin-1 is differentially expressed in myoepithelial cells and vascular smooth muscle cells in preneoplastic and neoplastic human breast: a possible marker for the progression of breast cancer», *International Journal of Cancer*, 2002, 101(5): 409-14.
- 91)** KAWAKAMI, T.; TOKUNAGA, T.; HATANAKA, H. ET AL. « Neuropilin 1 and neuropilin 2 co-expression is significantly correlated with increased vascularity and poor prognosis in nonsmall cell lung carcinoma », *Cancer*, 2002, 95(10): 2196-201.
- 92)** PARIKH, A.; FAN, F.; LIU, W. ET AL. «Neuropilin-1 in human colon cancer: expression, regulation, and role in induction of angiogenesis», *American Journal of Pathology*, 2004, 164(6): 2139-51.
- 93)** MIAO, H.; LEE, P.; LIN, H. ET AL. «Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression», *FASEB Journal*, 2000, 14(15): 2532-9.
- 94)** LATIL, A.; BIECHE, I.; PESCHE, S. ET AL. «VEGF overexpression in clinically localized prostate tumors and neuropilin-1 overexpression in metastatic forms», *International Journal of Cancer*, 2000, 89(2): 167-71.
- 95)** HANSEL, D.; WILENTZ, R.; YEO, C. ET AL. «Expression of neuropilin-1 in high-grade dysplasia, invasive cancer, and metastases of the human gastrointestinal tract», *American Journal of Surgical Pathology*, 2004, 28(3): 347-56.

- 96)** LANTUEJOUL, S.; CONSTANTIN, B.; DRABKIN, H. ET AL. «Expression of VEGF, semaphorin SEMA3F, and their common receptors neuropilins NP1 and NP2 in preinvasive bronchial lesions, lung tumours, and cell lines», *American Journal of Pathology*, 2003, 200(3): 336-47.
- 97)** SANCHEZ-CARBAYO, M.; SOCCI, N.; LOZANO, J. ET AL. «Gene discovery in bladder cancer progression using cDNA microarrays », *American Journal of Pathology*, 2003, 163(2): 505-16.
- 98)** OH, H.; TAKAGI, H.; OTANI, A. ET AL. «Selective induction of neuropilin-1 by vascular endothelial growth factor (VEGF): a mechanism contributing to VEGF-induced angiogenesis», *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 2002, 99(1): 383-8.
- 99)** NEUFELD, G.; COHEN, T.; SHRAGA, N. ET AL. «The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis», *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2002, 12(1): 13-9.
- 100)** TAMAGNONE, L.; ARTIGIANI, S.; CHEN, H. ET AL. «Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates», *Cell*, 1999, 99(1): 71-80.
- 101)** GLUZMAN-POLTORAK, Z.; COHEN, T.; HERZOG, Y. ET AL.. «Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165 [corrected]», *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(24): 18040-5.
- 102)** SOKER, S.; MIAO, H.; NOMI, M. ET AL. «VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding», *Journal of Cellular Biochemistry*, 2002, 85(2): 357-68.
- 103)** BERNATCHEZ, P.; ROLLIN, S.; SOKER, S. ET AL. «Relative effects of VEGF-A and VEGF-C on endothelial cell proliferation, migration and PAF synthesis: Role of neuropilin-1», *Journal of Cellular Biochemistry*, 2002, 85(3): 629-39.
- 104)** ROLLIN, S.; LEMIEUX, C.; MALIBA, R. ET AL. «VEGF-mediated endothelial P-selectin translocation: role of VEGF receptors and endogenous PAF synthesis», *Blood*, 2004, 103(10): 3789-97.
- 105)** BACHELDER, R.; CRAGO, A.; CHUNG, J. ET AL. «Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells», *Cancer Research*, 2001, 61(15): 5736-40.
- 106)** YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. «Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. », *Molecular Diversity*, 2006, 10(4): 515-27.
- 107)** FOLKMAN, J. «Tumor angiogenesis: therapeutic implications», *The New England Journal of Medicine*, 1971.
- 108)** SCAPPATICCI, F. «The therapeutic potential of novel antiangiogenic therapies», *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2003, 12(6): 923-32.
- 109)** BOTOS, I.; SCAPOZZA, L.; ZHANG, D. ET AL. «Batimastat, a potent matrix metalloproteinase inhibitor, exhibits an unexpected mode of binding», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93:2749-2754.

- 110)** SPARANO, J.A.; BERNARDO, P.; STEPHENSON, P. ET AL. «Randomized phase III trial of marimastat versus placebo in patients with metastatic breast cancer who have responding or stable disease after first-line chemotherapy: eastern cooperative oncology group trial E2196», *Journal of Clinical Oncology*, 2004, 22:4683-4690.
- 111)** SHALINSKY, D.R.; BREKKE, J.; ZOU, H. ET AL. «Broad antitumor and antiangiogenic activities of AG3340, a potent and selective MMP inhibitor undergoing advanced oncology clinical trials», *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1999, 878:236-270.
- 112)** OVERALL, C.M.; KLEIFELD, O. «Towards third generation matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy». *British Journal of Cancer*, 2006, 94:941-946.
- 113)** HOTZ, H.G; HINES, O.J; MASOOD, R. «VEGF antisense therapy inhibits tumor growth and improves survival in experimental pancreatic cancer», *Surgery*, 2005, 137:192-199.
- 114)** 88) SHIM, W.S.N.; TEH, M.; MACK, P.O.P. «Inhibition of angiopoietin-1 expression in tumor cells by an antisense RNA approach inhibited xenograft tumor growth in immunodeficient mice», *International Journal of Cancer*, 2001, 94:6-15.
- 115)** ESKENS, F.A.L.M.; DUMEZ, H.; HOEKSTRA, R. ET AL. «Phase I and pharmacokinetic study of continuous twice weekly intravenous administration of Cilengitide (EMD 121974), a novel inhibitor of the integrins  $\alpha\beta3$  and  $\alpha\beta5$  in patients with advanced solid tumours», *European Journal of Cancer*, 2003, 39:917-926.
- 116)** 79) BROOKS, P.C.; STRÖMBLAD, S.; KLEMKE, R. ET AL. «Antiintegrin  $\alpha\beta3$  blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin», *Journal of Clinical Investigation*, 1995, 96:1815-1822.
- 117)** HURWITZ, H.; FEHRENBACHER, L.; NOVOTNY, W. ET AL. «Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer», *New England Journal of Medicine*, 2004, 350:2335-2342.
- 118)** POSEY, J.A.; NG, T.C.; YANG, B. ET AL. «A phase I study of anti-kinase insert domain-containing receptor antibody, IMC-1C11, in patients with liver metastases from colorectal carcinoma», *Clinical Cancer Research*, 2003, 9:1323-1332.
- 119)** SHAHEEN, R.M.; DAVIS, D.W.; LIU, W. ET AL. «Antiangiogenic therapy targeting the tyrosine kinase receptor for vascular endothelial growth factor receptor inhibits the growth of colon cancer liver metastasis and induces tumor and endothelial cell apoptosis», *Cancer Research*, 1999, 59: 5412-5416.
- 120)** GOODMAN, V.L.; ROCK, E.P.; DAGHER, R. ET AL. «Approval summary: Sunitinib for the treatment of imatinib refractory or intolerant gastrointestinal stromal tumors and advanced renal cell carcinoma», *Clinical Cancer Research*, 2007, 13:1367-1373.
- 121)** CLARKE, S.J.; SHARMA, R. «Angiogenesis inhibitors in cancer - mechanisms of action», *Experimental and clinical pharmacology*, 2006, 29:9-12.
- 122)** DHANABAL, M.; KARUMANCHI, S.A.; SUKHATME, V.P. ET AL. «Targeting tumor vascular endothelium: an emerging concept for cancer therapy», *Drug Development Research*, 2008, 69:340-351.

- 123)** KRUGER, E.; DURAY, P.; PRICE, D. ET AL. «Approaches to preclinical screening of antiangiogenic agents», *Seminars in Oncology*, 2001, 28(6): 570-6.
- 124)** DAVIS, D.; MCCONKEY, D.; ABBRUZZESE, J. ET AL. «Surrogate markers in antiangiogenesis clinical trials», *British Journal of Cancer*, 2003, 89(1): 8-14.
- 125)** KLAUBER, N.; ROHAN, R.; FLYNN, E. ET AL. «Critical components of the female reproductive pathway are suppressed by the angiogenesis inhibitor AGM-1470», *Nature Medicine*, 1997, 3(4): 443-6.
- 126)** SHIMIZU, K.; OKU, N. «Cancer anti-angiogenic therapy», *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(5): 599-605.
- 127)** MARAGOUKAKIS, M.; TSOPANOGLIOU, N.; ANDRIOPOULOU, P. «Mechanism of thrombin-induced angiogenesis», *Biochemical Society Transactions*, 2002, 30(2): 173-7.
- 128)** AUGUSTIN, H. «Antiangiogenic tumour therapy: will it work? », *Trends in Pharmacological Sciences*, 1998, 19(6): 216-22.
- 129)** MOLEMA, G.; MEIJER, D.; DE LEIJ, L. «Tumor vasculature targeted therapies: getting the players organized», *Biochemical Pharmacology*, 1998, 55(12): 1939-45.
- 130)** TRACHSEL, E.; NERI, D. «Antibodies for angiogenesis inhibition, vascular targeting and endothelial cell transcytosis», *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006, 58(5-6): 735-54.
- 131)** D'ANDREA, L.; DEL GATTO, A.; PEDONE, C. ET AL. «Peptide-based molecules in angiogenesis», *Chemical Biology & Drug Design*, 2006, 67(2): 115-26.
- 132)** ZACHARY, I. «VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology», *Biochemical Society Transactions*, 2003, 31(Pt 6): 1171-7.
- 133)** SCHNEIDER, R.; TIRAND, L.; FROCHOT, C. ET AL. «Recent improvements in the use of synthetic peptides for a selective photodynamic therapy», *Anticancer Agents Med Chem*, 2006, 6(5): 469-88.
- 134)** BINETRUY-TOURNAIRE, R.; DEMANGEL, C.; MALAVAUD, B. ET AL. «Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis», *EMBO Journal*, 2000, 19(7): 1525-33.
- 135)** VON WRONSKI, M.; RAJU, N.; PILLAI, R. ET AL. «Tuftsin binds neuropilin-1 through a sequence similar to that encoded by exon 8 of vascular endothelial growth factor», *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(9): 5702-10.
- 136)** JIA, H.; BAGHERZADEH, A.; HARTZOULAKIS, B. ET AL. «Characterization of a bicyclic peptide neuropilin-1 (NP-1) antagonist (EG3287) reveals importance of vascular endothelial growth factor exon 8 for NP-1 binding and role of NP-1 in KDR signaling», *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(19): 13493-502.
- 137)** SOKER, S.; GOLLAMUDI-PAYNE, S.; FIDDER, H. ET AL. «Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial cell proliferation by a peptide corresponding to the exon 7-encoded domain of VEGF165», *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(50): 31582-8.

- 138)** EL-MOUSAWI, M.; TCHISTIAKOVA, L.; YURCHENKO, L. ET AL. «A vascular endothelial growth factor high affinity receptor 1-specific peptide with antiangiogenic activity identified using a phage display peptide library», *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(47): 46681-91.
- 139)** BAE, D.; KIM, T.; LI, G.. ET AL. «Anti-flt1 peptide, a vascular endothelial growth factor receptor 1-specific hexapeptide, inhibits tumor growth and metastasis», *Clinical Cancer Research*, 2005, 11(7): 2651-61.
- 140)** ALBINI, A.; SOLDI, R.; GIUNCIUGLIO, D. ET AL. «The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells», *Nature Medicine*, 1996, 2(12): 1371-5.
- 141)** HETIAN, L.; PING, A.; SHUMEI, S. ET AL. «A novel peptide isolated from a phage display library inhibits tumor growth and metastasis by blocking the binding of vascular endothelial growth factor to its kinase domain receptor», *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(45): 43137-42.
- 142)** AN, P.; LEI, H.; ZHANG, J. ET AL. «Suppression of tumor growth and metastasis by a VEGFR-1 antagonizing peptide identified from a phage display library», *International Journal of Cancer*, 2004, 111(2): 165-73.
- 143)** JIA, H.; JEZEQUEL, S.; LOHR, M. ET AL. «Peptides encoded by exon 6 of VEGF inhibit endothelial cell biological responses and angiogenesis induced by VEGF», *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 283(1): 164-73.
- 144)** ZILBERBER, L.; SHINKARU, S.; LEQUI, O. ET AL. «Structure and inhibitory effects on angiogenesis and tumor development of a new vascular endothelial growth inhibitor», *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(37): 35564-73.
- 145)** GIORDANO, R.; CARDO-VILA, M.; LAHDENRANTA, J. ET AL. «Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands», *Nature Medicine*, 2001, 7(11): 1249-53.
- 146)** TIRAND, L. «Ciblage de la Neuropiline-1, corécepteur du VEGF, pour potentialiser l'effet anti-vasculaire de la thérapie photodynamique», *Thèse de doctorat, Bioingénierie Nancy 1*, 2007, p.43.
- 147)** NARAZAKI, M.; TOSATO, G. «Ligand-induced internalization selects use of common receptor neuropilin-1 by VEGF165 and semaphorin3A. », *Blood*, 2006, 107(10): 3892-901.
- 148)** KLAGSBRUN, M.; TAKASHIMA, S.; MAMLUK, R. «The role of neuropilin in vascular and tumor biology», *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2002, 515:33-48.
- 149)** GATELY, S.; KERBEL, R. «Antiangiogenic scheduling of lower dose cancer chemotherapy», *Cancer Journal*, 2001, 7(5): 427-36.
- 150)** BROWDER, T.; BUTTERFIELD, C.; KRALING, B. ET AL. «Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer», *Cancer Research*, 2000, 60(7): 1878-86.
- 151)** HANAHAN, D.; BERGERS, G.; BERGLAND, E. «Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice», *Journal of Clinical Investigation*, 2000, 105(8): 1045-7.

- 152)** MAN, S.; BOCCI, G.; FRANCA, G. ET AL. «Antitumor effects in mice of low-dose (metronomic) cyclophosphamide administered continuously through the drinking water», *Cancer Research*, 2002, 62(10): 2731-5.
- 153)** ORLANDO, L.; CARDILLO, A.; ROCCA, A. ET AL. «Prolonged clinical benefit with metronomic chemotherapy in patients with metastatic breast cancer», *Anticancer Drugs*, 2006, 17(8): 961-7.
- 154)** DOUGHERTY, T.J. «Photodynamic therapy», *Clinics in Chest Medicine*, 1985, 6:219.
- 155)** VOGL, T.J.; EICHLER, K.; MACK, M.G. ET AL. « Interstitial photodynamic laser therapy in interventional oncology», *European Radiology*, 2004, 14(6): 1063-73.
- 156)** TRIESSCHEIJN, M.; BAAS, P. ET AL. «Photodynamic therapy in oncology», *Oncologist*, 2006, 11(9): 1034-44.
- 157)** DOUGHERTY, T.J.; MANG, T.S. «Characterization of intra-tumoral porphyrin following injection of hematoporphyrin derivative or its purified component», *Photochemistry and Photobiology*, 1987, 46(1):67-70.
- 158)** TIRAND, L.; FROCHOT, C.; VANDERESSE, R. ET AL. «A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells», *Journal of Control Release*, 2006, 111(1-2): 153-64.
- 159)** THOMAS, N. ; BECHET, D.; BECUWE, P.; TIRAND, L. ET AL. «Peptide-conjugated chlorine-type photosensitizer binds neuropilin-1 in vitro and in vivo», *Photochemistry and Photobiology B*, 2009, 96(2):101-8.
- 160)** TIRAND, L.; THOMAS, N.; DODELLER, M. ET AL. «Metabolic profile of a peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1: an in vivo and in vitro study», *Drug Metabolism and Disposition*, 2007, 35(5):806-13.
- 161)** THOMAS, N.; TIRAND, L.; CHATELUT, E. ET AL. «Tissue distribution and pharmacokinetics of an ATWLPPR conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1 in glioma-bearing nude mice», *Photochemistry and Photobiology*, 2008, 7(4):433-41.
- 162)** TIRAND, L.; BASTOGNE, T.; BECHET, D. ET AL. «Response surface methodology: an extensive potential to optimize in vivo photodynamic therapy conditions», *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*, 2009, 75(1):244-52.
- 163)** THOMAS, N. «Thérapie photodynamique ciblant la vascularisation tumorale par l'adressage du co-récepteur neuropiline-1 : vers l'élaboration de peptides biologiquement plus stables», *Thèse de doctorat, UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I*, 2009.
- 164)** THOMAS, N.; PERNOT, M.; VANDERESSE, R. ET AL. « Photodynamic therapy targeting neuropilin-1: Interest of pseudopeptides with improved stability properties», *Biochemical Pharmacology*, 2010, 80(2):226-35.
- 165)** BENOIT, J.; COUVREUR, P.; DEVISSAGUET, J. ET AL. «Carrier or modulated distribution forms, new systems for drug administration», *Journal de pharmacie de Belgique*, 1986, 41(5):319-329.

- 166)** ANDRIEUX, K.; DESMAELE, D.; D'ANGELO, J. ET AL. «Nanotechnologies and new drugs», *Actualité Chimique*, 2003, 135-139.
- 167)** LASSALLE, H.P.; WAGNER, M.; BEZDETAYA, L. ET AL.. «Fluorescence imaging of Foscan and Foslip in the plasma membrane and in whole cells », *Photochemistry and Photobiology*, 2008, 92(1):47-53.
- 168)** KONAN, Y.N.; GURNY, R.; ALLEMANN, E. «State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy», *Photochemistry and Photobiology*, 2002, 66(2):89-106.
- 169)** DERYCKE, A.S.; DE WITTE, P.A. «Liposomes for photodynamic therapy», *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004, 56(1):17-30.
- 170)** BIRRENBACH, G.; SPEIDER, P. «Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology», *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1976, 65(12):1763-1766.
- 171)** COUVREUR, P.; ROLAND, M.; SPEISER, P. «Submicroscopic biodegradable particles containing a biologically-active substance», *BE*, 1979, 869107.
- 172)** BLUNK, T.; HOCHSTRASSER, D.; SANCHEZ, J. ET AL. «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(2):1382-1387.
- 173)** PRICE, M.; CORNELIUS, R.; BRASH, J. «Protein adsorption to polyethylene glycol modified liposomes from fibrinogen solution and from plasma», *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1512(2):191-205.
- 174)** WEBER, C.; COESTER, C.; KREUTER, J. ET AL. «Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles», *International Journal of Pharmaceutics*, 2000, 194:91-102.
- 175)** HOVGAARD, L.; BRONSDSED, H. «Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery», *Journal of Controlled Release*, 1995, 36(1-2):256-274.
- 176)** MITRA, S.; GAUR, U.; GHOSH, P. ET AL. «Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using Chitosan nanoparticles as carrier», *Journal of Controlled Release*, 2001, 74(1-3):317-323.
- 177)** GURNY,R.; PEPPAS, N.A. ;HARRINGTON, D.D. ET AL.. «Development of biodegradable and injectable atexes for controlled release of potent drugs», *Drug development and Industrial Pharmacy*, 1981, 7(1):1-25.
- 178)** BODMEIER, R.; MAINCENT, P. «Polymeric dispersions a drog carriers», *Pharmaceutical dosage forms*, 1998, 3:87-128.
- 179)** ZAMBAUX, M.; BONNEAUX, F.; GREF, R. ET AL. «Influence of experimental parameters on the characteristics of POLY (lactid acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method», *Journal of controlled release*, 1998, 50(1-3):31-40.
- 180)** DELLACHERIE, E.; RUXANDRA, G.; PATRICIA, Q. «Les nanosphères "furtive" comme nouvelles formes galéniques injectables: espoirs et réalités», *Medcin/Science*, 2001, 17:619-626.

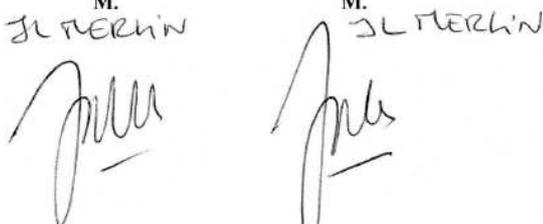
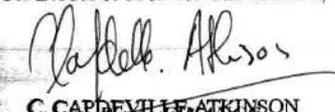
- 181)** TOM, J.; DEBENEDETTI, P. «Particle formation with supercritical fluids», *Journal of Aerosol Science*, 1991, 22(5):554-584.
- 182)** WANG, Y.; DAVE, R.; PFEFFER, R. «Polymer coating/encapsulation of nanoparticles using a supercritical anti-solvent process», *Journal of Supercritical Fluids*, 2004, 28(1):85-99.
- 183)** PERRUT, M.; JUNG, J.; LEBOEUF, F. «Enhancement of dissolution rate of poorly-soluble active ingredients by supercritical anti-solvent process», *Journal of Supercritical Fluids*, 2004, 28(1).
- 184)** FOSTER, N.; MAMMUCARI, R.; DEGHANI, F. ET AL. «Processing Pharmaceutical Compounds Using Dense gas Technology», *Industrial & Engineering Chemistry Society*, 2003, 42(25):6476-6493.
- 185)** PATHAK, P.; MEZIANI, M.; DESAI, T. ET AL. «Nanosizing Drug Particles in Supercritical Fluid Processing», *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(35):10842-10843.
- 186)** ALLEMANN, E.; GURNY, R.; DOELKER, E. «Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size», *International Journal of Pharmaceutics*, 1992, 87(1-3):247-253.
- 187)** LEROUÉIL LE VERGER, M.; FLUCKIGER, L. ET AL. «Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent», *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1998, 46(2):137-143.
- 188)** FESSI, H.; DEXVISSAGUET, J.; PUISIEUX, F. ET AL. «Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance, sous forme de nanoparticules», *FR8618446*, 1986.
- 189)** BRIGGER, I.; MORIZET, J.; AUBERT, G. ET AL. «POLY (ethylene glycol)-coated hexadecyl cyanoacrylate nanospheres display a combined effect for brain tumor targeting», *Journal of pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2002, 303(3):928-936.
- 190)** CALVO, P.; GOURITIN, B.; CHACUN, H. ET AL. «Long-circulating PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery», *Pharmaceutical Research*, 2001, 18(8):1157-1166.
- 191)** CHOIGNOT, D.; SIX, J.; LEONARD, M. ET AL. «Physicochemical evaluation of PLA nanoparticles stabilized by water-soluble MPEO-PLA block copolymers», *Journal of colloid and interface Science*, 2003, 268(2):441-447.
- 192)** PERACCHIA, M.; DESMAELE, D.; COUVREUR, P. ET AL. «Synthesis of a Novel POLY (MePEG cyanoacrylate-co-alkyl cyanoacrylate) Amphiphilic Copolymer for Nanoparticle Technology», *Macromolecules*, 1997, 30(4):846-851.
- 193)** LEMARCHAND, C.; GREF, R.; COUVREUR, P. ET AL. «Polysaccharide-decorated nanoparticles», *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58(2):327-341, 2004.
- 194)** STOLNIK, S.; ILLUM, L.; DAVIS, S. ET AL. «Long-circulating microparticulate drug carriers», *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1995, 16(2,3):195-214.

- 195)** CALVO, P.; REMUNAN LOPEZ, C.; VILA JATO, J. ET AL. «Development of positively charged colloidal drug carriers. Chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsion», *Colloid and Polymer Science*, 1997, 275(1):46-53.
- 196)** BARBAULT FOUCHER, S.; GREF, R.; RUSSO, P. ET AL. «Design of poly var epsilon caprolactone nanospheres coated with bioadhesive hyaluronic acid for ocular delivery», *Journal of Controlled Release*, 2002, 83(3):365-375.
- 197)** ROUZES, C.; GREF, R.; LEONARD, M. ET AL. «Surface modification of POLY (lactic acid) nanospheres using hydrophobically modified dextrans as stabilizers in o/w emulsion/evaporation technique», *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000, 50(4):557-565.
- 198)** ROUZES, C.; DURAND, A.; LEONARD, M. ET AL. «Surface activity and emulsion properties of hydrophobically modified dextrans», *Journal of Colloid and Interface Science*, 2002, 253(1):217-223.
- 199)** DURAND, A.; MARIE, E.; ROTUREU, E. ET AL. «Amphiphilic polysaccharides useful tools for the preparation of nanoparticles with controlled surface characteristics», *Langmuir*, 2004, 20(16):6956-6963.
- 200)** WARD, A.F.H.; TORDAI, L. «Time-dependance of boundary tensions of solutions I. The role of diffusion in time-effects», *Journal of Chemical Physics*, 1946, 453-461.
- 201)** HANSEN, F.K. «the theory of diffusion controlled adsorption kinetics with accompanying evaporation», *Journal of Chemical Physics*, 1960, 64:637-641.
- 202)** ALSOP, R.; VLACHOGIANNIS, G. «Determination of the molecular weight of clinical dextran by gel permeation chromatography on TSK PW type columns», *Journal of chromatography*, 1982, 246(2):227-240.
- 203)** BARKER, P.; BHAMBRA, K.; ASLOP, R. ET AL. «Fractionation of dextran using ethanol», *Chemical Engineering Research and Design*, 1987, 65(5):390-395.
- 204)** MONSAN, P.; BOZONNET, S.; ALBENNE, C. ET AL. «Homopolysaccharides from lactic acid bacteria», *International Dairy Journal*, 2001, 11(9):675-685.
- 205)** NOUVEL, C. «Synthèse contrôlée de copolymères dextrane-g-polyactide: de leur utilisation comme surfactifs biodégradables à la mise en oeuvre de système de vectorisation particulaire», *Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine*, 2002, p.226.
- 206)** ROUZES, C. «Nanosphères à cœur de POLY (acide lactique) et couronne de dextrane: élaboration, propriétés et applications biomédicales», *Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine*, 2001.
- 207)** BAUDYS, M.; LETOURNEUR, D.; LIU, F. ET AL. « Extending insulin action in vivo by conjugation to carboxymethyl dextran », *Bioconjugate Chemistry*, 1998, 9(2):176-183.
- 208)** SHANCHEZ-CHAVES, M.; ARRANZ, F. «Water-insoluble dextran polymers by grafting of hydrophobic groups. I. reaction with butyric anhydride and heterogeneous hydrolysis of the partially modified dextran», *Angewandte Makromolekulare Chemie*, 1983, 118:53-63.

- 209)** KOBAYASHI, K.; SUMITOMO, H. «Regioselectively modified stereoregular polysaccharides. 2. synthesis of 3-O-methyl-(1->6)-a-D-glucofuranan», *Macromolecules*, 1981, 14(2):250-253.
- 210)** MERRIFIELD, R. «Solid Phase Peptide Synthesis», *Journal of the American Chemical Society*, 1963, 85(14):2149-54.
- 211)** TOURNAIRE, R.; DEMANGEL, C.; DERBIN, C. ET AL. «Peptides blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis polynucleotides encoding said peptides and methods of use thereof», 2001.
- 212)** THOMAS, N. «Thérapie photodynamique ciblant la vascularisation tumorale par l'adressage du co-récepteur neuropiline-1 : vers l'élaboration de peptides biologiquement plus stables», *Thèse de doctorat, UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I*, 2009, p.144.

## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 11/06/2010

<p align="center"><b>DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</b></p> <p>présenté par <b>Abed BRIGHET</b></p> <p><u>Sujet</u> : Stratégies d'adressage de nanoparticules à base de dextrane dirigées contre les récepteurs au VEGF.</p> <p><u>Jury</u> : Président : Jean Louis MERLIN, Professeur, Nancy 1 Directeur : Jean Louis MERLIN</p> <p><u>Juges</u> : Emmanuelle MARIE : Chargée de recherche CNRS Muriel BARBERI-HEYOB : Chargée de recherche CAV Béatrice FAIVRE : Maitre de conférences, Nancy 1</p>	<p align="center">Vu, Nancy, le 7.5.10</p> <p align="center">Le Président du Jury      Le Directeur de Thèse</p> <p align="center">M. JL MERLIN      M. JL MERLIN</p> 
<p align="center">Vu et approuvé, Nancy, le 07 MAI 2010</p> <p align="center">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,</p>  <p align="center">Francine PAULUS</p> 	<p align="center">Vu, Nancy, le 17.05.2010</p> <p align="center">Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1, Pour le Président et par Délégation, La Vice-Présidente du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire,</p>  <p align="center">C. CAPDEVILLE-ATKINSON</p> <p align="center">N° d'enregistrement : 3294</p>

N° d'identification :

**TITRE**

**Stratégies d'adressage des nanoparticules à base de dextrane dirigées contre les récepteurs au VEGF.**

**Thèse soutenue le 11/06/2010**

**Par Abed BRIGHET**

**RESUME :**

La croissance d'une tumeur nécessite l'approvisionnement en nutriment et en oxygène et également l'élimination des métabolites toxiques qu'elle produit. Au-delà de quelques mm<sup>3</sup>, elle requiert la formation de son propre réseau vasculaire par angiogénèse. La connaissance de ce processus offre une voie thérapeutique innovante qui vise à détruire ces vaisseaux nourriciers afin d'asphyxier la tumeur, et par voie de conséquence, une régression tumorale. L'effet de cette stratégie anti-vasculaire est favorisé en ciblant les cellules endothéliales de cette néovascularisation tumorale. En effet, plusieurs molécules peuvent jouer le rôle de ligand, notamment un heptapeptide (ATWLPPR) spécifique au co-récepteur du VEGF, la neuropiline-1 (NRP-1) bordant les cellules ciblées.

Les nanoparticules de troisième génération représentent une alternative intéressante pour améliorer cette stratégie de ciblage de neuropiline-1. En effet, ce concept offre la possibilité d'acheminer un ou plusieurs principes actifs de manière spécifique en ciblant le site actif. Pour ce faire, ces vecteurs pourront être fonctionnalisés par des peptides. Ils permettent également d'améliorer la dispersion et la sélectivité des molécules cytotoxiques en évitant une grande capture par le système SPM.

La stratégie définie dans le cadre de mon stage de fin d'études à l'ENSIC, était de coupler cet heptapeptide au dextrane qui vient s'adsorber sur les nanoparticules, afin de réduire l'hydrophobicité de la surface et leur conférer un caractère furtif. Pour faciliter ce couplage, un bras espaceur a été choisi (anhydride succinique). Nous avons synthétisé et purifié ATWLPPR, ensuite un protocole permettant de coupler l'anhydride succinique au dextrane a été défini. L'étude sur l'influence de la nature des polymères sur la taille des nanoparticules a montré que le PLA présente des résultats satisfaisants avec une meilleure stabilité et une taille optimale des nanoparticules.

**MOTS CLES :** Adressage vasculaire, neuropiline-1, heptapeptide, nanoparticules, dextrane.

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
<b><u>Jean Louis MERLIN</u></b>		<b>Expérimentale</b> ■
		<b>Bibliographique</b> ■
		<b>Thème</b> <b>3</b>

**Thèmes**      1 – Sciences fondamentales      2 – Hygiène/Environnement  
                  3 – Médicament                      4 – Alimentation – Nutrition  
                  5 - Biologie                                6 – Pratique professionnelle