

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur  
et de la Recherche Scientifique

محمد الصديق بن يحيى  
كلية علوم الطبيعة والحياة  
المكتبة  
رقم الجرد : 1807

Université de Jijel  
Faculté des Sciences Exactes et  
Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie  
Moléculaire et Cellulaire



جامعة جيجل  
كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة والحياة  
قسم البيولوجيا الجزيئية  
والخلوية

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme des  
Etudes Supérieures en Biologie

Option : Biochimie

Thème



Les liposomes : systèmes de ciblage et de  
vectorisation

Membres de jury :

Examineur : M<sup>cmc</sup> BENSEGHIER Salima

Encadreur : D<sup>f</sup> ALYANE Mohammed



Réalisé par :

BOULAHIA Nabila

AHMIA Nadira

KAMAH Leila

Promotion : 2011/2012



# Remerciement

*Nous tenons à  
Remercier en premier lieu  
Le dieu « ALLAH »*

*Nous encadrer :*

*D : ALYANE Mohammed*

*Pour tous ses efforts conseils*

*Nous remercions Madame BENSEGHIER Salima  
enseignante à l'université de Jijel pour avoir  
accepté d'être examinateur de notre travail*

*Nous exprimons notre profonde remerciement à*

*Nos parents*

*De plus nous remercions nos familles et toute personne  
Ayant aidé de près ou de loin à la réalisation de ce*

*Travail*

*A tous un grand et chaleureux*

*Merci*

# Sommaire

# Sommaire

---

<b>Sommaire</b> .....	i
<b>Liste des figures</b> .....	iv
<b>Introduction générale</b> .....	1

## **Chapitre 1 : VECTORISATION & VECTEURS**

1. Introduction.....	3
2. Définition et principe général de la vectorisation.....	4
3. Objectifs de la vectorisation .....	4
4. Principaux vecteur .....	4
4.1. Propriétés d'un vecteur idéal .....	5
4.2. Les classes des vecteurs.....	6
4.2.1. Les vecteurs macromoléculaires.....	6
4.2.2 Les vecteurs corpusculaires .....	6
4.2.2.1. Vecteurs de 1ère génération (vecteurs hépato- spléniques).....	7
4.2.2.2. Vecteurs de 2ème génération.....	8
4.2.2.3. Vecteurs de 3ème génération (vecteurs ciblant) .....	10
5. Devenir in vivo des vecteurs après leur administration.....	10
6. Quelques exemples des potentialités thérapeutiques des vecteurs .....	11
7. Les interactions entre les nanomédicaments et les cellules .....	12

## **CHAPITRE 2 : LES LIPOSOMES**

1. Introduction.....	14
2. Définition .....	15
3. Principaux vecteurs liposomales.....	15
3.1. Les Liposomes de 1 <sup>ère</sup> génération .....	15
3.2. Les liposomes de 2ème génération ou liposomes furtifs .....	16
3.3. Les Liposomes de troisième génération .....	18
4. Classification des liposomes.....	19

## Sommaire

---

4.1. Les vésicules multilamellaires (multilamellar vesicles : MLV) .....	19
4.2. Les petites vésicules unilamellaires (Small unilamellar vesicles : SUV) .....	19
4.3. Les grandes vésicules unilamellaires (large unilamellar vesicles : LUV).....	19
4.4. Les géants vésicules unilamellaires (large unilamellar vesicles : GUV) .....	19
5. Les méthodes de préparation des liposomes.....	20
5.1. Méthodes par réhydratation de film lipidique. ....	20
5.2. Méthodes fondées sur la dispersion d'une solution organique de phospholipides .....	21
5.2.1. Injection d'une solution organique de phospholipides .....	21
5.2.2. Evaporation en phase inverse .....	21
5.3. Méthodes par élimination de détergents au sein de micelles mixtes .....	22
5.4. Méthodes de réduction de taille des vésicules .....	22
5.4.1. Utilisation des ultrasons.....	22
5.4.2. Extrusion sur des membranes de polycarbonate.....	22
5.4.3 Microfluidisation .....	22
6. Caractérisation des liposomes.....	23
6.1. La mesure de la distribution la taille des liposomes .....	23
6.2. La mesure de potentiel zêta .....	23
7. Méthodes d'encapsulation des principes actifs au sein des liposomes.....	24
7.1. Encapsulation passive.....	24
7.1.1. Dispersion de liposomes déshydratés .....	24
7.1.2. Dispersion de liposomes congelés .....	24
7.2. Encapsulation dite active par création de gradient de concentration.....	24
9. Limite d'utilisation des liposomes.....	25
10. Comportement des liposomes en milieu biologique.....	27
10.1. Devenir dans le sang .....	27
10.2. Clairance plasmatique des liposomes .....	27

## Sommaire

---

11. Applications des liposomes .....	28
11.1. Applications thérapeutiques.....	28
11.2. Applications cosmétologiques .....	29
11.3. Applications biochimiques et biophysiques .....	29

### **Chapitre 3 : LIPIDES & LIPOSOMES**

1. Introduction.....	30
2. Les lipides liposomales.....	30
2.1. Les Phospholipides .....	30
2.2. Cholestérol.....	31
2.3. Les sphingolipides .....	32
2.4. Les lipides cationiques.....	32
3. Les différents modèles de membranes artificielles.....	33
3.1. Auto-assemblage des lipides.....	34
<b>Conclusion .....</b>	<b>36</b>
<b>Les références bibliographiques.....</b>	<b>37</b>

# *Liste des figures*

<b>Figure 1.</b> Représentation schématique d'une microsphère et d'une microcapsule.....	8
<b>Figure 2.</b> Nanoparticule multifonctionnelle. Une telle nanoparticule a la capacité de transporter un ou plusieurs principes actifs .....	9
<b>Figure 3.</b> Représentation schématiques de vecteur de 2 <sup>ième</sup> génération : Les Liposomes (A) sont des vésicules formées d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides. Les nanosphères (B) sont des particules formées d'une matrice de polymères et les nanocapsules (C) sont constituées d'un cœur aqueux ou huileux entouré d'une fine membrane polymère. ....	9
<b>Figure 4.</b> Représentation schématique de l'adressage moléculaire à l'aide d'un ligand de reconnaissance (vecteurs de troisième génération) .....	10
<b>Figure 5.</b> Schéma d'assemblage d'un liposome .....	15
<b>Figure 6.</b> Représentation schématique des quatre types de vecteurs liposomaux. Liposomes conventionnels (1ère génération) ; liposomes pégylés ou stealth (2 <sup>ème</sup> génération). Immunoliposomes (3 <sup>ème</sup> génération) avec un système de ciblage.....	16
<b>Figure 7.</b> Représentation schématique d'un liposome furtif.....	17
<b>Figure 8.</b> Représentation schématique du concept de répulsion stérique qui évite l'opsonisation et la reconnaissance par les macrophages (vecteurs de 2ème génération).....	18
<b>Figure 9.</b> Représentation graphique en 3 dimensions de la structure d'un globule fluorescent et fonctionnalisé par un ligand biologique .....	18
<b>Figure 10.</b> Classification des liposomes selon leur nombre de bicouches et leur taille .....	19
<b>Figure 11.</b> Préparation des liposomes par la méthode d'hydratation du film lipidique.....	20
<b>Figure 12.</b> Méthodes de préparation des liposomes .....	23
<b>Figure 13.</b> Mécanisme de l'encapsulation active de la doxorubicine.....	25
<b>Figure 14.</b> Structure de phospholipides .....	30
<b>Figure 15.</b> Structure de la molécule de cholestérol .....	31
<b>Figure 16.</b> Structure de sphingolipides. Le squelette sphingosine est représenté en noir ....	32

**Figure 17.** Structure chimique des principaux lipides cationique. .... 33

**Figure 18.** Les différents modèles membranaires : a) micelles et micelles inverses, b) bicouche, c) liposome, d) phase lamellaire, e) phase hexagonale inverse (micelles cylindriques inverses), f) phase éponge, g) phase cubique inverse bicontinue..... 34

# Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des vecteurs de médicament .....7

Tableau 2 : Différents arrangements des phospholipides en solution aqueuse .....35

# Introduction générale

Aucun médicament ne peut exercer d'activité thérapeutique si la molécule active qu'il renferme n'est pas capable de franchir les barrières biologiques qui séparent le site d'administration du site d'action. D'un point de vue thérapeutique, toutes les recherches concernant les phénomènes de reconnaissance moléculaire, d'adressage ou de réactivité sur une cible n'ont de sens que si l'on s'assure que les conditions d'administration et de transport (diffusion au travers des membranes) permettent d'acheminer le principe actif sous sa forme intacte vers la cible biologique. Dans ce contexte, de nombreux principes actifs (PA) présentent des caractéristiques physico-chimiques peu favorables au passage des barrières biologiques. Beaucoup de PA se caractérisent par une distribution peu sélective, l'activité thérapeutique s'en retrouve alors limitée et des tissus non-impliqués peuvent être touchés par des effets toxiques non-désirés. En outre, les formes galéniques classiques entraînent une distribution de la molécule dans le sang et l'organisme en fonction des propriétés physico-chimiques du PA et ne permettent pas un contrôle des taux plasmatiques. En effet, un PA injecté dans la circulation sanguine subit aussitôt une élimination par excrétion rénale ou biliaire et/ou par métabolisme avec une vitesse variable.

La vectorisation, opération visant à moduler ou à maîtriser la distribution d'une substance en l'associant à un système approprié appelé vecteur, est par conséquent devenue un aspect essentiel dans le domaine thérapeutique. La pharmacie galénique moderne développe des systèmes d'administration ou vecteurs susceptibles de promouvoir le passage transmembranaire et/ou intracellulaire vers la cible souhaitée tout en protégeant le PA de la dégradation par les enzymes. De nombreux systèmes de délivrance de molécules actives, possédant des propriétés spécifiques avantageuses pour des applications dans le domaine de la vectorisation, ont été élaborés depuis une vingtaine d'années. Cependant, de nombreux problèmes limitent l'application de ces vecteurs, l'inconvénient majeur étant généralement la complexité des systèmes, nécessitant d'être systématiquement adaptés en fonction du principe actif à vectorisé et de la cible à atteindre. Ces systèmes sont donc difficiles à mettre en œuvre industriellement.

Pendant ce travail, nous nous sommes intéressés aux vecteurs colloïdaux types liposomes. Ces derniers sont des vésicules sphériques dont la taille peut varier de quelques dizaines à quelques milliers de nanomètres. Ils sont composés d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques permettant de séparer un milieu intravésiculaire d'un milieu extérieur; c'est en 1965, que les premiers liposomes fabriqués volontairement l'ont été par Bangham.

A travers une recherche bibliographique, nous allons essayer de tirer l'attention sur la notion et l'intérêt de la vectorisation comme moyen pour d'une part, diminuer la toxicité des médicaments et d'autre part, augmenter leur efficacité à travers un meilleur ciblage.

# Chapitre 1

## 1. Introduction

Aucun médicament ne peut exercer une activité thérapeutique, si la molécule biologiquement active qu'il renferme n'est pas capable de franchir les barrières biologiques qui séparent le site d'administration du site d'action. Les barrières à traverser sont des systèmes très complexes faisant intervenir plusieurs éléments (épithélium, endothélium, membrane cellulaire) et plusieurs composantes (barrières mécaniques ou physico-chimiques et barrières enzymatiques). Certaines molécules sont inefficaces car elles ne diffusent pas spontanément à l'intérieur de la cellule alors que leur cible thérapeutique est à localisation intracellulaire.

Ainsi, la vectorisation des médicaments est aujourd'hui un axe important de recherche dans le domaine pharmaceutique. Il s'agit donc de transporter des molécules biologiquement actives jusqu'à leur cible biologique (Goutayer, 2008).

Au début du 20<sup>ème</sup> siècle, Paul Ehrlich, le lauréat du prix Nobel de médecine de 1908, a introduit le concept de « *magic bullet* » pour désigner un médicament qui pourrait spécifiquement différencier les pathogènes des cellules saines. Ce médicament traiterait ainsi spécifiquement les pathologies sans affecter l'homéostasie de l'organisme (Strebhardt et al., 2008). Bien que cette idée soit née à partir d'observations sur la coloration des bactéries en microbiologie, la quête du médicament parfaitement sélectif est devenue le *leitmotiv* de nombreux chercheurs dans le domaine de la vectorisation pharmaceutique.

La vectorisation, ou délivrance spécifique de principes actifs vers un organe, un tissu ou une cellule malade grâce à des transporteurs, est un des défis majeurs de la recherche thérapeutique. En effet, de nombreux principes actifs présentent des caractéristiques physicochimiques peu favorables au passage des barrières biologiques, qui séparent le site d'administration du site d'action. Certains médicaments se heurtent aussi à des barrières enzymatiques entraînant leur dégradation et métabolisation rapide. La distribution de ces molécules actives vers les zones cibles malades peut donc être déficiente. De plus, une accumulation de thérapeutiques dans les tissus sains peut entraîner une toxicité rédhibitoire, entraînant l'abandon du traitement malgré son efficacité (Elodie, 2007).



## 2. Définition et principe général de la vectorisation

La vectorisation est une opération visant à moduler ou à maîtriser la distribution d'une substance en l'associant à un système approprié appelé vecteur.

Le principe de la vectorisation consiste à rendre la distribution tissulaire et/ou cellulaire ou ses interactions avec des cellules cibles aussi indépendante que possible des propriétés physico-chimiques de la substance elle-même et à la soumettre à celle d'un vecteur approprié, choisi en fonction de l'objectif envisagé (**Puisieux et Roblot-Treupel, 1989**).

## 3. Objectifs de la vectorisation

- ✓ Modifier l'environnement immédiat des principes actifs pour changer leur comportement dans l'organisme et optimiser leur activité pharmacologique (**Bertrand, 2011**).
- ✓ Permettre la distribution de molécules actives uniquement au site d'action sans affecter les tissus sains comme les spécialités Ambisome® ou Daunoxone®, utilisées dans le traitement des tumeurs cancéreuses (**Gaffet, 2008**).
- ✓ Cibler le site thérapeutique du principe actif : Un autre objectif de la vectorisation consiste à utiliser les vecteurs pour délivrer la drogue à un endroit spécifique du corps. Le type de cellules à cibler dépend de la pathologie à traiter et du type de médicament à transporter. Étant donné la quantité de travaux qui ont été faits dans le domaine de la vectorisation des anticancéreux au cours des dernières années, les concepts suivants s'appliquent donc principalement au ciblage des cellules cancéreuses. Cependant, certains peuvent être adaptés à d'autres cibles thérapeutiques (**Wu et Nantz, 2002 ; Gao et Chen, 2008 ; Chan et al., 2010**).
- ✓ Faciliter le franchissement de certaines barrières physiologiques comme la barrière hémato-encéphalique, et de certains types de cellules (**Gaffet, 2008**).
- ✓ Administrer des médicaments par d'autres voies que la voie traditionnelle, par exemple l'administration de l'insuline par voie orale au lieu de la voie sous cutanée (**Gaffet, 2008**).
- ✓ Améliorer la cinétique des principes actifs dans l'organisme pour qu'ils ne soient pas trop vite éliminés (**Gaffet, 2008**). Dans certains cas, l'effet thérapeutique d'un médicament peut être amélioré en prolongeant son temps de circulation dans le sang et en permettant des administrations plus espacées (*ex.* pour certains peptides ayant une demi-vie très courte) (**Harris et al., 2003**). Dans d'autres cas, il peut s'agir de limiter la

distribution passive du composé vers un tissu sain pour éviter des effets secondaires ou une toxicité.

- ✓ Permettre l'éviction d'excipients entraînant des effets secondaires graves et obligeant l'administration d'un traitement préventif afin de les atténuer, comme le Crémophor, excipient utilisé pour solubiliser des principes actifs difficilement solubles et en améliorer l'absorption (**Gaffet, 2008**).
- ✓ La protection éventuelle du principe actif contre son inactivation prématurée (**Lucie, 2009**). Certains principes actifs particulièrement fragiles doivent être protégés afin de pouvoir exercer leur effet thérapeutique *in vivo*. C'est le cas pour certaines molécules de faible poids moléculaire rapidement métabolisées dans l'organisme (*ex.*, la 1- $\beta$ -Darabinofuranosyluracil (cytarabine) qui est désactivée par la cytidine désaminase) (**Hamada et Kawaguchi, 2002**) ou pour les acides nucléiques dégradés par les nucléases endogènes (**Whitehead et Langer, 2009**). Le vecteur consiste donc à masquer le principe actif pour empêcher sa reconnaissance par les enzymes responsables de son métabolisme.
- ✓ Augmentation de la pénétration cellulaire ou intracellulaire du principe actif inaccessible par simple diffusion (**Socha, 2008**).
- ✓ Augmenter la solubilité du principe actif : Dans leur forme la plus simple, les principes de formulation peuvent être appliqués pour augmenter la solubilité aqueuse d'un principe actif. En effet, il n'est pas rare que le développement de principes actifs prometteurs soit freiné par des problèmes de solubilité dans les milieux biologiques (**Rabinow, 2004**). Afin de limiter les quantités de solvant organiques apolaires utilisées dans les préparations pharmaceutiques, il peut être avantageux de solubiliser le principe actif dans la phase hydrophobe d'un système colloïdal pour permettre son administration.

## 4. Principaux vecteurs

### 4.1. Propriétés d'un vecteur idéal

Afin d'accomplir sa tâche, un vecteur doit répondre à un certain cahier des charges :

- **Biocompatible**  $\Rightarrow$  Il ne doit présenter aucune toxicité envers l'organisme.
- **Furtif** « stealth »  $\Rightarrow$  Il doit présenter une faible immunogénicité, c'est-à-dire avoir un temps de circulation dans le sang le plus long possible sans être reconnu par le système

immunitaire tel que le système réticulo-endothélial, il ne doit pas non plus être éliminé par les reins ou le foie avant d'avoir atteint sa cible.

- **Spécifique**  $\Rightarrow$  de l'organe ou du tissu visé.
- **Biodégradable ou de taille inférieure au filtre rénal**  $\Rightarrow$  Il ne doit pas s'accumuler dans l'organisme.
- **Taux de libération maximal.**

Pour cela, les chercheurs s'appliquent à mettre au point des systèmes particuliers, submicroniques tels que des **vecteurs viraux**, et des vecteurs **synthétiques** ou non viraux (des **liposomes**, des **vecteurs peptidiques**, des **nanoparticules inorganiques** ou bien des **polymères**). Seule une classe des vecteurs synthétiques, à savoir les corpusculaires, sera exposée (Deshayes, 2009).

## 4.2. Les classes de vecteurs

Les vecteurs peuvent être divisés en deux classes: les espèces macromoléculaires solubles et les entités corpusculaires non solubles (Laurence, 1999).

### 4.2.1. Les vecteurs macromoléculaires

L'association covalente d'un principe actif à une macromolécule définit un vecteur macromoléculaire. La macromolécule peut être soit d'origine naturelle comme le dextran ou l'albumine sérique, soit d'origine synthétique, comme le polyéthylène glycol (Laurence, 1999).

### 4.2.2. Les vecteurs corpusculaires

Les vecteurs corpusculaires sont des réservoirs de principe actif qui permettent de l'isoler ou de le protéger de l'environnement biologique (Laurence, 1999). Les vecteurs actuellement proposés peuvent être divisés en trois groupes, vecteurs de 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération (tableau 1).

Tableau 1 : Classification des vecteurs de médicament (Benoit et al., 1986) .

Génération	1 <sup>ère</sup>	2 <sup>ème</sup>	3 <sup>ème</sup>	
Cible	Organes	Tissus	Cellules	
Diamètre	>1µm	<1µm	<1µm	
Vecteurs	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Microsphères</li> <li>* Microcapsules</li> <li>* Microagrégats</li> </ul>	Passifs <ul style="list-style-type: none"> <li>* Liposomes</li> <li>* Nanosphères</li> <li>* Nanocapsules</li> </ul>	Actifs <ul style="list-style-type: none"> <li>* Liposomes</li> <li>* Nanosphères</li> <li>* Nanocapsules magnétiques ou thermostables</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Anticorps monoclonaux</li> <li>* Support moléculaire</li> <li>* Support particulaire</li> <li>* Glycoprotéines</li> </ul>
Mécanisme	Embolisation	Capture par le système des phagocytes mononuclées	Reconnaissance spécifique	

#### 4.2.2.1. Vecteurs de 1<sup>ère</sup> génération (vecteurs hépato- spléniques)

Ce sont des systèmes conçus pour libérer un principe actif au sein de la cible visée. Il est nécessaire, dans ce cas, de faire appel à un mode d'administration particulier : ils sont injectés en amont du tissu visé, principalement grâce à l'utilisation de cathéters. La molécule active est alors libérée de manière progressive et peut diffuser dans la cible généralement tumorale : cette technique s'appelle l'embolisation. A ce groupe appartiennent les *microsphères* (vecteurs matriciels) et les *microcapsules* (vecteurs vésiculaires) (figure 1) (Puisieux et Roblot-Treupel, 1989).

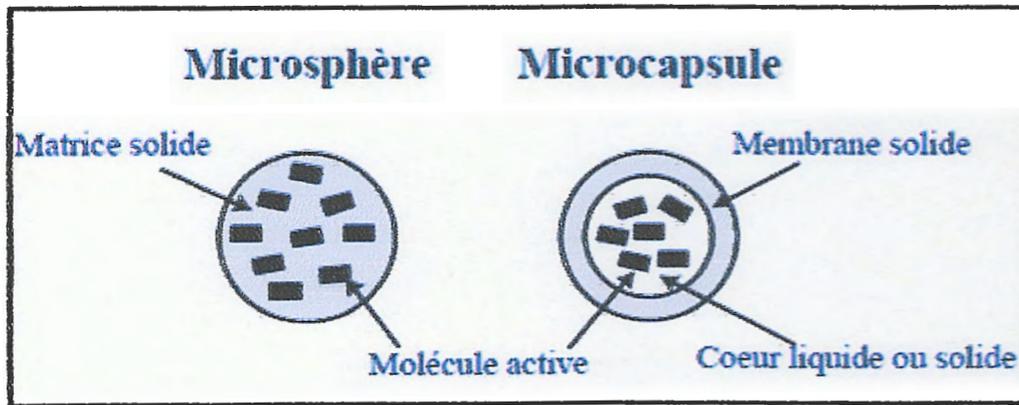


Figure 1: Représentation schématique d'une microsphère et d'une microcapsule (Guery, 2006)

#### 4.2.2.2. Vecteurs de 2<sup>ème</sup> génération

Les vecteurs de 2<sup>ème</sup> génération (figure 2 et 3) sont capables, sans mode d'administration particulier, de véhiculer un principe actif jusqu'à la cible visée. A ce groupe appartiennent les *liposomes*, les *nanocapsules* et les *nanosphères* qui sont des vecteurs passifs, c'est à dire que la distribution est en fonction des propriétés physico-chimiques de surface du vecteur. Appartiennent à ce groupe également certains vecteurs dits actifs tel que les liposomes thermo ou pH-sensibles (Puisieux et Roblot-Treupel, 1989).

- ❖ **Les liposomes** : sont des systèmes vésiculaires, biocompatibles et biodégradables composés d'un (liposome unilamellaire) ou de plusieurs bicouches (liposomes multilamellaires) de phospholipides organisés en phase lamellaire et délimitant un ou plusieurs compartiments aqueux (figure 3). Des principes actifs hydrophiles peuvent être encapsulés dans la phase aqueuse tandis que les molécules lipophiles se localisent dans la (les) bicouche(s) (Couvreur, 2004).
- ❖ **Les nanosphères** : sont des structures matricielles de forme sphérique constituées d'un réseau polymère (figure 3). Le principe actif est soit dispersé dans le réseau polymère durant la formation des nanosphères, soit adsorbé à la surface de ces particules après préparation par l'intermédiaire de liaisons de type hydrophobes, électrostatiques ou covalentes (Benoit et al., 1986).

- ❖ **Les nanocapsules** : sont des structures réservoirs et sphérique (figure 3). Elles sont constituées d'un cœur généralement huileux entouré par une mince paroi de polymère dont l'épaisseur n'excède pas quelques nanomètres. Le principe actif est généralement dissous dans le cœur huileux, mais, peut aussi être adsorbé à la surface des nanocapsules (Couvreur et al., 1977).

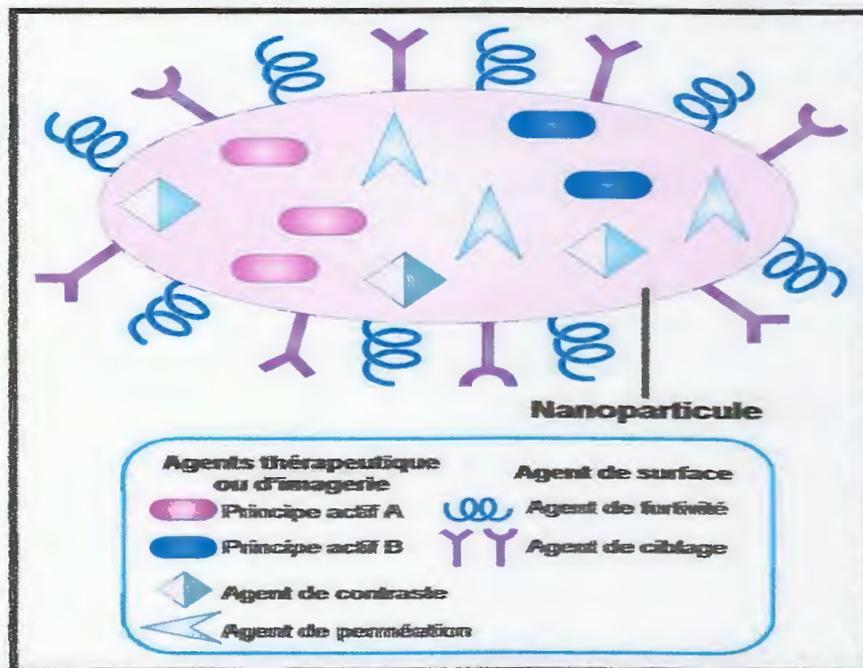


Figure 2 : Nanoparticule multifonctionnelle. Une telle nanoparticule a la capacité de transporter un ou plusieurs principes actifs (Ferrari, 2005).

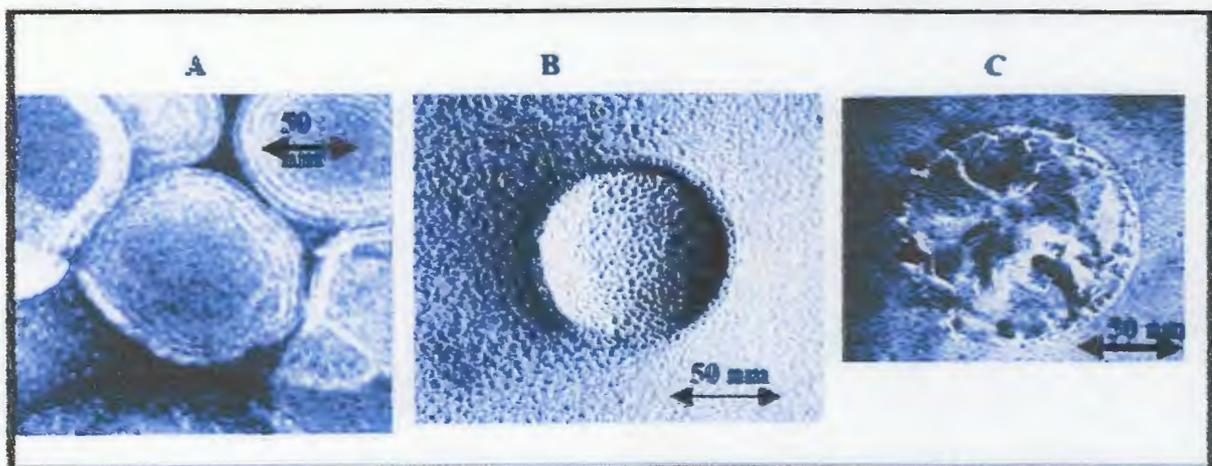


Figure 3 : Représentation schématique des vecteurs de 2<sup>ème</sup> génération : Les Liposomes (A) sont des vésicules formées d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides. Les nanosphères (B) sont des particules formées d'une matrice de polymères et les nanocapsules (C) sont constituées d'un cœur aqueux ou huileux entouré d'une fine membrane polymère (Couvreur, 2004).

### 4.2.2.3. Vecteurs de 3<sup>ème</sup> génération (vecteurs ciblant)

Afin de favoriser l'accumulation des vecteurs de 2<sup>ème</sup> génération dans un tissu donné, il est indispensable de fonctionnaliser leur surface avec des ligands biologiques qui seront reconnues par les cellules composants des tissus d'intérêt (figure 4). Les ligands peuvent être des anticorps, des peptides, des saccharides, des oligonucléotides ou d'autre molécule comme le folate (Goutayer, 2008).

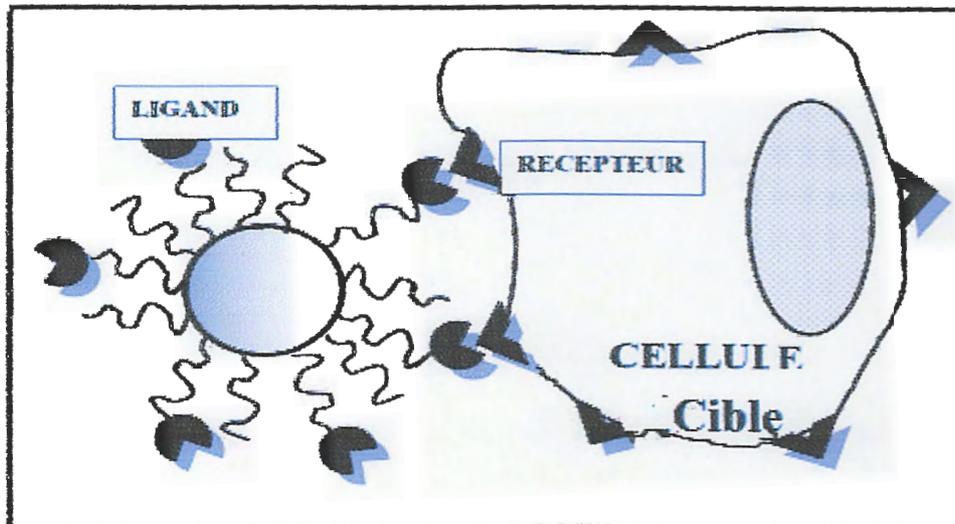


Figure 4 : Représentation schématique de l'adressage moléculaire à l'aide d'un ligand de reconnaissance (vecteurs de troisième génération) (Couvreur, 2004).

## 5. Devenir in vivo des vecteurs après leur administration

Le devenir in vivo des vecteurs colloïdaux et des principes actifs encapsulés dépend de très nombreux paramètres, pouvant être divisés en deux groupes principaux :

- d'une part, les facteurs associés aux caractères physico-chimiques et structuraux du vecteur : composition, structure, taille, charge électrique superficielle, etc.
- d'autre part, les facteurs liés aux caractéristiques du milieu auquel sont confrontés les vecteurs et leur contenu actif : fluides biologiques, barrières membranaires, etc.

Le devenir in vivo des vecteurs colloïdaux après administration intraveineuse a été très étudié. Tous les travaux démontrent que ceux-ci sont rapidement captés par les cellules du système phagocytaire mononucléée, notamment par les macrophages du foie (cellules du Kupffer) et de la rate, et dans une moindre mesure par les cellules mononucléées de la moelle osseuse, les cellules dendritiques cutanées, les macrophages alvéolaires, péritonéaux et lymphatiques.

Les travaux montrent également que les vecteurs colloïdaux sont capables de franchir la paroi des vaisseaux, sauf lorsque ceux-ci sont pourvus d'un endothélium discontinu ou sinusoïdal, c'est à dire présentant de petites brèches capables de laisser passer les liposomes les plus petits (Dousset et Douste-Blazy, 1985 ; Couvreur, 1993).

L'accès des colloïdes aux différents tissus de l'organisme, après administration intraveineuse semble ainsi limité. Par exemple, le rein et le cœur sont des organes à endothélium continu ; les vecteurs comme les liposomes permettront alors de détourner les principes actifs de ces organes et éviteront l'apparition de toxicité (Dousset et Douste-Blazy, 1985 ; Couvreur, 1993).

Les vecteurs colloïdaux subissent dès leur injection dans la circulation des modifications profondes dues à diverses interactions avec les protéines plasmatiques. L'adsorption de surface des protéines, dénommée « opsonisation », est un phénomène très précoce, et qui est important dans la reconnaissance et la capture des vecteurs par les cellules du système phagocytaire mononucléé. Toute réduction de leur interaction avec les protéines plasmatiques devrait donc ralentir l'élimination des vecteurs. Pour éviter le foie et cibler d'autres organes (tumeurs solides), il est primordial d'éviter l'opsonisation, conduisant au concept de vecteurs «furtifs» (Scherpfof et al., 1997).

Les stratégies les plus efficaces pour élaborer de tels vecteurs furtifs consistent à modifier l'état de surface des colloïdes de façon à rendre l'interaction opsonine/vecteur impossible. On peut citer :

- ✓ La réduction de la taille des vecteurs, (50 nm) qui conduit à un très fort rayon de courbure en surface des particules.
- ✓ Le greffage ou l'adsorption de chaînes de polymères hydrophiles qui confèrent au vecteur une surface mouvante et fortement hydratée) (Lasic, 1992; Coukell et Spencer, 1997 ; Gabizon et Martin ,1997).

## 6. Quelques exemples des potentialités thérapeutiques des vecteurs

Les potentialités thérapeutiques des vecteurs comme les liposomes conventionnels administrés par voie intraveineuse, sont directement liées à leur devenir in vivo. Les vecteurs de 1<sup>ère</sup> génération subissent une capture préférentielle et relativement rapide par les macrophages des

systèmes de phagocytes mononucléés (SPM), le foie et la rate, après leur administration intraveineuse, diminuant leur disponibilité pour les cibles thérapeutiques (Plats et al., 2005).

Les liposomes peuvent par conséquent être utilisés pour concentrer les principes actifs dans les macrophages ou dans les tissus irrigués par des vaisseaux à endothélium discontinu (tissu hépatique en particulier), mais aussi pour détourner les principes actifs de certains sites non accessibles (reins, cœur) (Plats et al., 2005).

On peut citer à titre d'illustration, les travaux d'Alving et al (1978) qui ont démontré l'intérêt d'une vectorisation des dérivés antimonisés dans le traitement de leishmaniose. Les liposomes se concentrent dans le foie où sont localisés les parasites et permettent de diviser ainsi par 700 la dose nécessaire.

Concernant la deuxième potentialité, on peut citer les études réalisées par Weitkamp et al (1998) qui décrivent l'encapsulation d'amphotéricine B au sein de liposomes (AMBISOME). Ainsi, il est possible de réduire considérablement la toxicité rénale de l'antifongique. Ambisome, liposome particulièrement stable, reste intact dans la circulation à fortes concentrations pendant des périodes de temps prolongées. Il interagit directement avec les champignons en exerçant un effet fongicide renforcé. Les liposomes adhèrent à la paroi cellulaire du champignon, site de l'interaction locale avec "Ambisome". Cette interaction rompt le liposome et l'amphotéricine B ainsi libérée endommage la membrane cellulaire du champignon, entraînant sa mort (Plats et al., 2005).

Quant aux vecteurs furtifs, la prolongation de leur temps de circulation dans le sang leur permet d'atteindre des organes périphériques dont les capillaires sont perméables, comme les tumeurs solides par exemple (Plats et al., 2005).

## 8. Les interactions entre les nanomédicaments et les cellules

Ces interactions sont importantes à connaître car, beaucoup de cibles biologiques étant intracellulaires, les voies de pénétration dans la cellule ainsi que le trafic intracellulaire vont influencer l'effet thérapeutique. Dès 1977, il a été montré que l'utilisation de nanocapsules permettait de libérer au niveau intracellulaire des molécules qui ne diffusent pas spontanément dans la cellule.

Depuis, de nombreuses études ont montré que la voie d'entrée dépendait de la nature de la cellule ainsi que des caractéristiques physico-chimiques des nanovecteurs, tandis que les cellules endothéliales et épithéliales semblent favoriser la pénétration intracellulaire des nanovecteurs par la voie de l'endocytose *via* les clathrines, les macrophages utilisent plutôt la

voie de la phagocytose. Bien qu'il n'y ait pas de consensus clair concernant l'influence de la taille des nanoparticules sur leur capture intracellulaire, il semble que les plus petites particules sont internalisées en plus grand nombre par les cellules, bien que, dans certains cas, la quantité totale de nanomatériau internalisé puisse être plus importante avec des nanoparticules de taille moyenne (environ une centaine de nanomètres). Les nano-objets chargés positivement présentent un taux d'endocytose généralement plus important que les particules de même taille mais chargées négativement, en raison de l'effet d'attraction (particules positives) ou de répulsion (particules négatives) avec la membrane cellulaire chargée négativement.

D'autre part, certains nanovecteurs chargés positivement sont capables d'échapper à la voie déprédatives des lysosomes grâce à un effet d'« éponges à protons » : ionisés au pH acide des endosomes, ces matériaux cationiques perméabilisent la membrane endosomale et favorisent ainsi l'échappement avant la fusion avec les lysosomes primaires originaires de l'appareil de Golgi.

Enfin, lorsque les nanovecteurs sont recouverts de ligands (acide folique, peptides, anticorps) spécifiquement orientés vers des récepteurs exprimés à la surface de la membrane cellulaire, ils sont internalisés suivant la voie de capture utilisée par ce récepteur (Couvreur, 2010).

# Chapitre 2



## 1. Introduction

Le principal type de formulation lipidique de principes actifs (PA) déjà commercialisés et valorisés sous forme liposomale relève des procédés de vectorisation. Les liposomes ont été découverts dans les années 1960 par un scientifique anglais, **Alex Bangham**. Les premières recherches sur l'encapsulation de PA, quant à elles, datent de plus de **20 ans**, illustrant les difficultés scientifiques et techniques à surmonter avant qu'un concept thérapeutique puisse devenir une réalité clinique.

Les liposomes constituent le principal système à libération contrôlée pour l'encapsulation de principe actif. En effet, plusieurs investigateurs ont démontré l'efficacité *in vivo* de principe actif encapsulé à l'intérieur des liposomes (**Guery, 2006**).

Qu'entend-on par libération contrôlée ; selon Robinson, ce concept regroupe tout système exerçant un contrôle soit spatial, soit temporel ou bien les deux à la fois sur la libération d'un médicament (**Li et al., 1987**). Un tel système comporte plusieurs avantages comparativement au médicament classique parmi lesquels on note:

- 1) le maintien prolongé de la concentration thérapeutique du médicament.
- 2) une diminution des effets secondaires indésirables par ciblage du médicament à un type cellulaire.
- 3) une diminution de la dose requise pour l'action thérapeutique.
- 4) un meilleur respect par les patients de la posologie.
- 5) un outil approprié pour l'administration de biopharmaceutiques ayant une courte demi-vie *in vivo* (protéines et peptides) (**Langer, 1998**).

De manière générale, ces systèmes de libération contrôlée ont une vitesse de libération d'ordres zéro, donc indépendants de la concentration du médicament. Des systèmes de libération contrôlée intelligents qui réagissent en fonction des conditions du milieu sont encore au stade de développement et seront bientôt disponibles sur le marché.

## 2. Définition

Les liposomes font partie des systèmes supramoléculaires organisés de molécules tensioactives (Plats et al., 2005). Ce sont des microvésicules constituées d'une ou plusieurs bicouches concentriques (figure 5) de nature phospholipidique et de cholestérol entourant un ou plusieurs espaces internes aqueux. Les principes actifs hydrophiles sont encapsulés dans les cavités aqueuses, les molécules lipophiles dans les bicouches (Torchilin, 2006 ; Santra et Mukherjee, 2009).

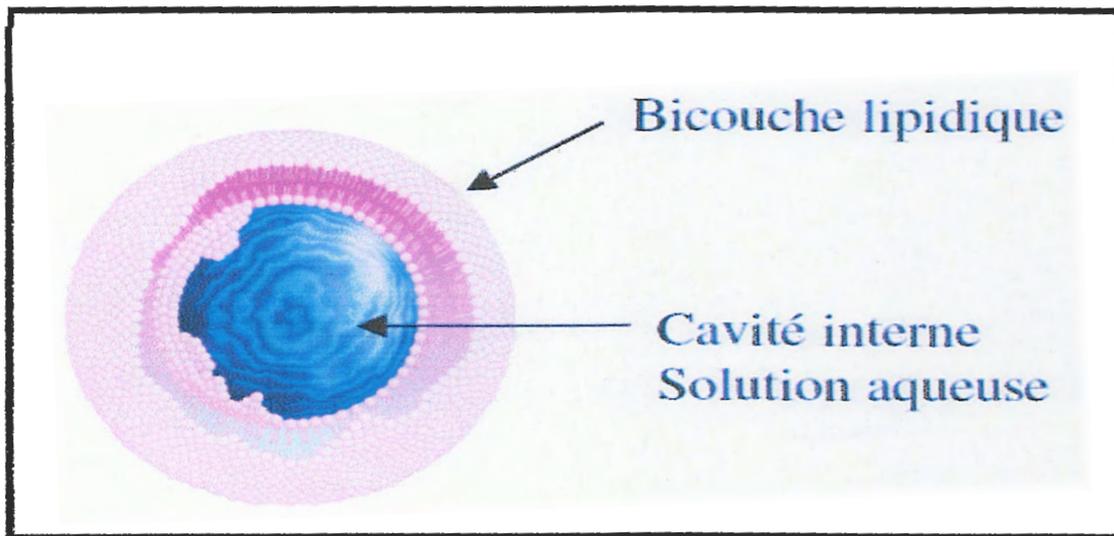


Figure 5 : Schéma d'assemblage d'un liposome (Klein, 2009).

## 3. Principaux vecteurs liposomaux

Les vecteurs liposomaux, forme pharmaceutique particulière orientant un principe actif à un niveau donné dans l'organisme, se déclinent en génération en fonction de l'évolution des progrès.

### 3.1. Liposomes de 1<sup>ère</sup> génération

Les liposomes de première génération peuvent être définis comme des liposomes composés seulement de phospholipides (neutres et/ou négativement chargés) et/ou de cholestérol. Il s'agit d'une structure vésiculaire constituée d'une ou plusieurs bicouche lipidique et renfermant un compartiment aqueux (figure 6).

L'inconvénient majeur de ces vecteurs de première génération provient de leur courte durée de vie dans la circulation sanguine. Ceci est dû à leur accumulation principalement hépatique et splénique secondaire au phénomène d'opsonisation. Les liposomes de première

génération ont été utilisés pour le traitement des affections hépatique et splénique; le Myocet est une forme liposomale (1<sup>ère</sup> génération) de doxorubicine (Storm et Crommelin, 1998 ; Santra et Mukherjee, 2009).

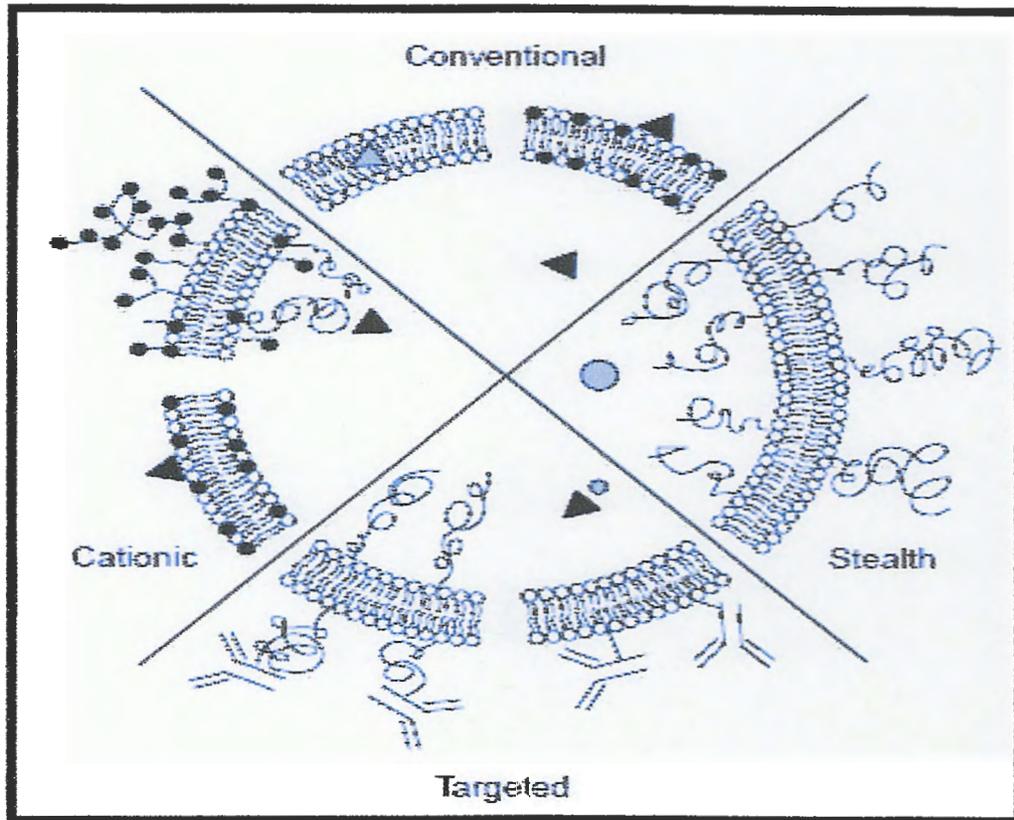


Figure 6 : Représentation schématique des quatre types de vecteurs liposomaux. Liposomes conventionnels (1<sup>ère</sup> génération) ; liposomes pégylés ou stealth (2<sup>ème</sup> génération). Immunoliposomes (3<sup>ème</sup> génération) avec un système de ciblage (Storm et Crommelin, 1998).

### 3.2. Les liposomes de 2<sup>ème</sup> génération ou liposomes furtifs

Il s'agit de liposomes de 1<sup>ère</sup> génération recouverts de longs polymères hydrophiles et flexibles comme les polyéthylènes glycols (PEG), les polysaccharides, les poloxamères et les polyxamines (figure 7 et 8) qui confèrent aux liposomes un caractère furtif, en empêchant les protéines plasmatiques de s'adsorber à leur surface en les repoussant comme une goutte d'eau sur une feuille de lotus. Ces liposomes se caractérisent de ce fait par un temps de demi-vie plasmatique prolongé et une capture hépatique réduite. L'absence de reconnaissance par les macrophages du foie, de la rate et de la moelle est d'autant plus prononcée que les liposomes sont de faible taille ; de plus le temps de résidence dans le sang dépend de la longueur des chaînes PEG (Gaffet, 2008).

Les vecteurs pégylés (PEG) sont appelés vecteur furtif (stealth vecteurs) (Gaffet, 2008) ou liposomes stériquement stables « Sterically stabilized liposomes » en référence à leur longue demi-vie; ils sont capables de s'accumuler dans les tissus tumoraux à travers leur vascularisation lacunaire grâce à un phénomène de rétention propre aux tumeurs nommé effet EPR (Enhanced Permeability and Retention effet) (Maeda et al., 2001).

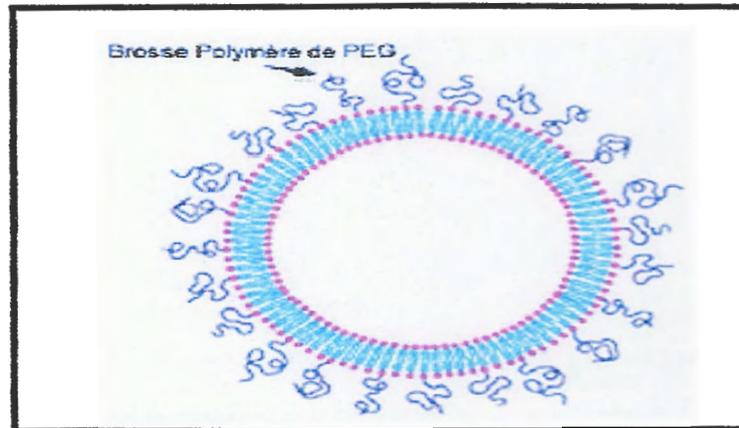


Figure 7: Représentation schématique d'un liposome furtif (Leblond, 2005).

La stabilisation stérique provient de la présence à la surface des liposomes de groupements PEG hautement hydratés, qui créent une barrière stérique empêchant les interactions hydrophobes et électrostatiques entre les liposomes et les composantes moléculaires et cellulaires dans les liquides biologiques (figure 8) (Storm et Crommelin, 1998 ; Santra et Mukherjee, 2009; Chuto et al., 2010).

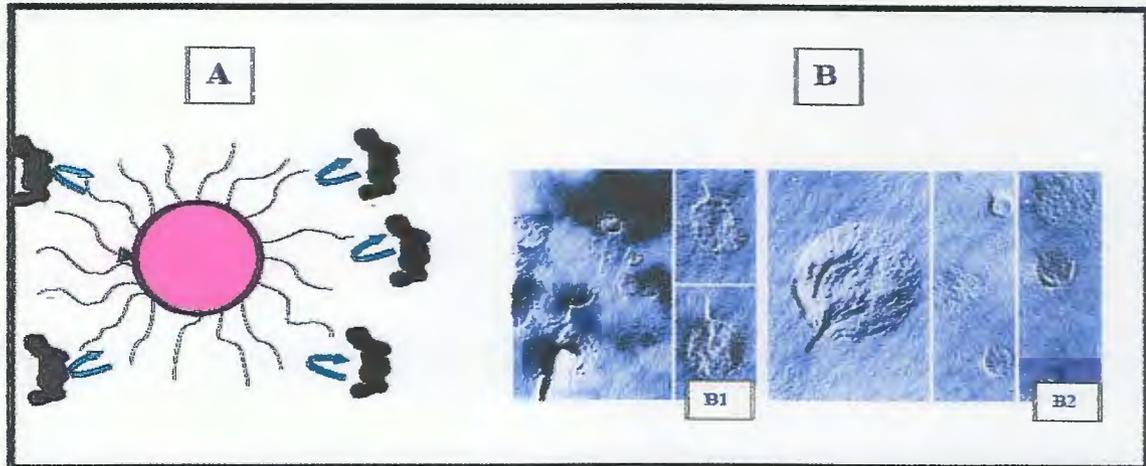


Figure 8 : Représentation schématique du concept de répulsion stérique qui évite l'opsonisation et la reconnaissance par les macrophages (vecteurs de 2ème génération) (A) ; lorsque les nanoparticules ne sont pas décorées de PEG, on peut observer en microscopie électronique qu'elles sont recouvertes par les protéines du sérum (B1, la surface des particules est granuleuse) ; au contraire, lorsqu'elles sont recouvertes de PEG elles exercent un effet de répulsion vis-à-vis des protéines plasmatiques (B2, la surface des particules est lisse). Ces particules sont capables de diffuser sélectivement à travers l'endothélium vasculaire tumoral (C) (Couvreur, 2004).

### 3.3. Liposomes de troisième génération

Afin de favoriser l'accumulation des liposomes dans un tissu donné, il est indispensable de fonctionnaliser leur surface avec des ligands biologiques qui seront reconnus par les cellules composant le tissu d'intérêt (figure 9). Les ligands peuvent être des anticorps, des peptides, des saccharides, des oligonucléotides ou d'autres molécules comme le folate. Ainsi, ils correspondent à des vecteurs de deuxième génération (présence d'une barrière stérique) auxquels ont été fixé un élément de reconnaissance particulier pour la cible visée par un bras espaceur (Torchilin, 2006).



Figure 9 : Représentation graphique en 3 dimensions de la structure d'un globule fluorescent et fonctionnalisé par un ligand biologique (Liposomes de troisième génération) (Ferrari, 2003)

#### 4. Classification des liposomes

La classification des liposomes est basée sur le nombre de leurs compartiments, leur taille et leur mode d'obtention. En se fondant sur ces critères, trois types de liposomes ou de vésicules ont été distingués (figure 10) :

##### 4.1. Les vésicules multilamellaires (*multilamellar vesicles MLV*)

Il s'agit de liposomes présentant plusieurs compartiments aqueux concentriques et dont le diamètre varie de 0.1µm à 2µm. La structure observée ressemble à une coupe transversale d'un oignon étant donné qu'ils sont constitués de plusieurs couches membranaires superposées concentriques (Dousset et Douste-Blazy, 1985 ; Plats et al., 2005).

##### 4.2. Les petites vésicules unilamellaires (*Small unilamellar vesicles SUV*)

Comportent une seule paroi et une seule cavité aqueuse. Leur diamètre est de l'ordre de 15nm-25nm. Ce sont les plus petites structures vésiculaires qui peuvent être obtenues (Dousset et Douste-Blazy, 1985 ; Plats et al., 2005).

##### 4.3. Les grandes vésicules unilamellaires (*large unilamellar vesicles LUV*)

Ce sont des vésicules de dimension similaires à celles des MLV mais entourées d'une seule bicouche lipidique à 1 µm (Dousset et Douste-Blazy, 1985 ; Plats et al., 2005).

##### 4.4. Les géantes vésicules unilamellaires (*large unilamellar vesicles GUV*)

Appartiennent à la grande famille des liposomes. Ce sont des objets tridimensionnels en forme de petits sacs fermés, et d'une taille de plusieurs microns de diamètre elle est comprise entre 5 et 100 microns de diamètre (Korting et Schäfer-Korting, 2010).

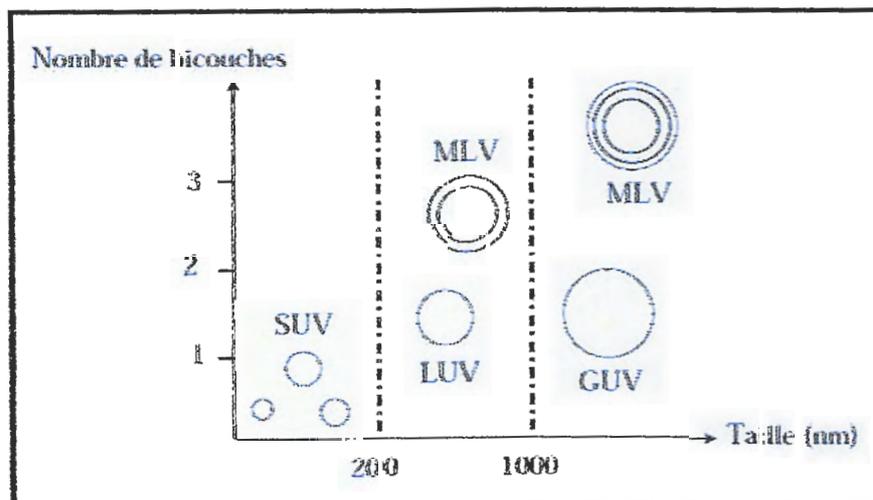


Figure 10 : Classification des liposomes selon leur nombre de bicouches et leur taille (Lorin et al., 2004).

## 5. Les méthodes de préparation des liposomes

Les différentes méthodes de préparation (figure 11 et figure 12) résident surtout dans les méthodes employées pour disperser les lipides séchés. La dispersion peut en effet être provoquée par l'hydratation du film phospholipidique, par utilisation d'ultrasons, par microfluidisation, par extrusion, par évaporation en phase inverse, par infusion d'éther, par injection d'une solution éthanolique, par réhydratation, par congélation/décongélation, par élimination de détergent ainsi que par électroformation.

### 5.1. Méthode par réhydratation de film lipidique (méthode de Bengham 1965)

Cette technique initiée dès les années 60 consiste à évaporer une solution organique (généralement du chloroforme) de phospholipides jusqu'à la formation d'un film phospholipidique sur les parois du récipient avant de le réhydrater à une température supérieure à la température de transition de phase gel-cristal liquide ( $T_c$ ) des phospholipides utilisés dans la préparation. Au cours de la préparation, le film phospholipidique, au contact de la solution aqueuse, gonfle, puis se décolle des parois du ballon pour former spontanément des vésicules de type MLV. Le diamètre des vésicules obtenues par cette méthode est très élevé, de l'ordre de quelques micromètres et la distribution de la taille est très hétérogène. Les techniques d'homogénéisation telles que les ultrasons, l'extrusion ou la microfluidisation (permettent de réduire la taille et l'hétérogénéité des vésicules. Enfin, le faible volume aqueux encapsulé peut être augmenté par addition de 10 à 20 mol% de lipides chargés. Les taux d'encapsulation peu élevés (2 à 15%) peuvent être majorés par une augmentation de la durée d'hydratation qui par contre entraîne une augmentation du diamètre des vésicules (figure 11) (Benoit et al., 2007).

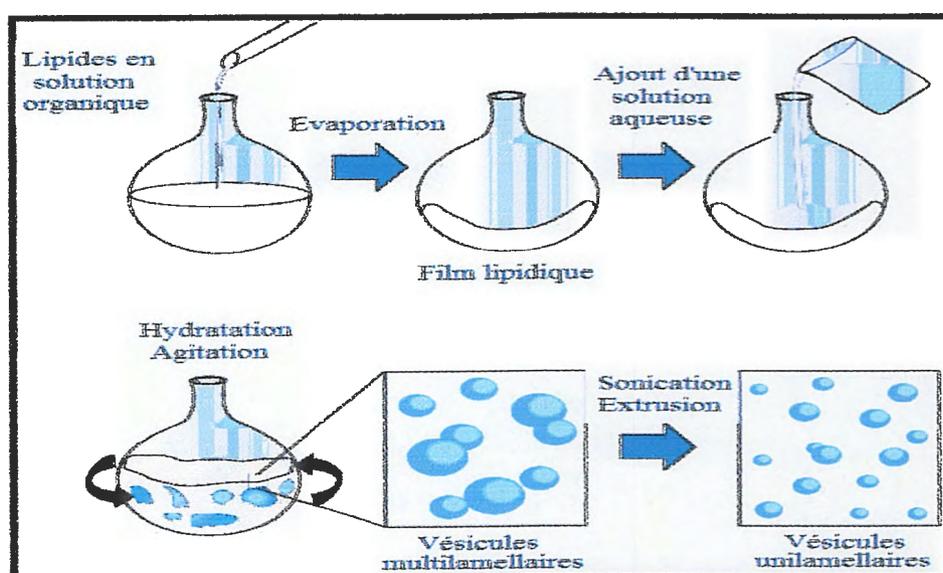


Figure 11 : Préparation des liposomes par la méthode d'hydratation du film lipidique (Lasic, 1997).

## 5.2. Méthodes fondées sur la dispersion d'une solution organique de phospholipides

### 5.2.1. Injection d'une solution organique de phospholipides

Cette technique consiste à former spontanément des liposomes unilamellaires de petite taille SUV<sub>S</sub> à la suite d'une injection d'une solution organique de lipides dans une solution aqueuse et de l'élimination du solvant organique par évaporation sous pression réduite, par dialyse ou par filtration tangentielle. Les faibles diamètres et polydispersités des liposomes sont obtenus à des vitesses d'injection et des vitesses d'agitation rapides ainsi qu'à des concentrations en phospholipides réduites. Cette méthode facilement transposable à l'échelle industrielle a une utilisation limitée par la solubilité des phospholipides dans les solvants organiques tels que. L'éthanol, l'éther éthylique, le mélange éther éthylique/méthanol ou le diméthylsulfoxyde (Benoit et al., 2007).

### 5.2.2. Evaporation en phase inverse

Afin d'améliorer le rendement d'encapsulation des liposomes, une méthode de préparation, dite d'évaporation en phase inverse (REV) a été mise au point afin de permettre de préparer des liposomes LUV constitués d'une grande cavité aqueuse. Dans ce procédé, les phospholipides sont dissous dans un solvant organique tel que l'éther éthylique. La phase aqueuse est ensuite ajoutée à un excès de phase organique émulsionnée aux ultrasons (H/L), avec des lipides se plaçant à l'interface. L'élimination du solvant par évaporation sous pression réduite conduit au rapprochement des micelles inverses puis à la formation d'un gel.

Au cours de cette étape, les micelles inverses, formées de monocouches de phospholipides entourant des compartiments aqueux, s'agrègent pour former un réseau compact gélifié. Au cours de l'étape suivante, la pression est réduite davantage afin de favoriser l'évaporation totale de l'éther. Ceci entraîne la rupture de la phase gel et le rapprochement des monocouches pour former des liposomes. Les vésicules ainsi obtenues sont unilamellaires avec un diamètre moyen de 0,5 µm et une encapsulation maximale de la phase aqueuse (65%) en présence d'une solution de faible force ionique (0,01M Na Cl). La filtration des liposomes sur des membranes de polycarbonate de diamètre de pores décroissants jusqu'à 0,1 µm permet d'obtenir des liposomes homogènes d'un diamètre moyen de 150 nm mais en diminuant le taux d'encapsulation de 48 à 12%. Un excès de lipides augmente le volume d'encapsulation et le taux d'encapsulation de ces liposomes (Benoit et al., 2007).

### 5.3. Méthodes par élimination de détergents au sein de micelles mixtes

Dans cette méthode, les phospholipides sont d'abord dispersés, en milieu aqueux, à l'aide d'un détergent. Il se forme alors des micelles mixtes. Ensuite, le détergent est éliminé par dialyse, filtration sur gel ou par adsorption par des polymères. Au fur et à mesure de cette élimination, les micelles s'enrichissent en phospholipides et finalement, deviennent coalescentes pour former les vésicules unilamellaires de type SUV ou LUV (Benoit et al., 2007).

### 5.4. Méthodes de réduction de taille des vésicules

#### 5.4.1. Utilisation des ultrasons

Afin de réduire le diamètre des liposomes MLV, obtenus par hydratation d'un film phospholipidique, la suspension liposomale peut être soumise à l'action des ultrasons dans un bain ou plus efficacement à l'aide d'une sonde pour former des SUV de 20 à 50 nm. Cette taille très réduite de vésicules limite fortement les volumes encapsulés et les taux d'encapsulation (< 1%). Il est possible en fin de préparation d'éliminer tous les liposomes MLV qui contaminent la suspension en les centrifugeant à grande vitesse (Benoit et al., 2007).

#### 5.4.2. Extrusion sur des membranes de polycarbonate

Ce procédé consiste à calibrer la taille des liposomes MLV ou des LUV en les faisant passer à travers des membranes, dont le diamètre des pores est bien défini. Quand les liposomes sont filtrés sous faible pression d'azote sur des cellules de filtration munies de plusieurs membranes en polycarbonate de diamètres de pores décroissants (1 - 0,8 - 0,6 - 0,4 - 0,2  $\mu\text{m}$ ), les diamètres descendent jusqu'à 200-300 nm. Avec des pressions d'azote atteignant 800 psi les réductions de taille vont jusqu'à 60-100 nm après 5 à 10 passages sur des membranes de 0,1  $\mu\text{m}$ . Le volume aqueux encapsulé est assez faible, entre 1 et 3  $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$  de lipides et les taux d'encapsulation varient entre 5 à 30% (Benoit et al., 2007).

#### 5.4.3. Microfluidisation

Cette technique permet d'homogénéiser les suspensions de liposomes MLV. La suspension de vésicules passe par l'intermédiaire d'une pompe, sous de fortes pressions (10000 psi), à travers un filtre, comportant des pores de 5  $\mu\text{m}$  de diamètre, pour se retrouver ensuite dans une chambre d'interaction. A ce niveau, les fluides sont séparés en deux canaux qui se rejoignent au bout de la chambre à des vitesses très importantes (>500 m/s). Des collisions de vésicules se produisent et s'accompagnent d'un transfert d'énergie élevé. Le choc des particules entre elles provoque la rupture des grandes vésicules qui se reforment pour donner de petites vésicules de taille homogène. Ainsi, au bout de deux passages de liposomes MLV, le diamètre diminue jusqu'à 0,1-0,2  $\mu\text{m}$ . Après 10 passages, les liposomes obtenus sont des SUV avec un diamètre inférieur à 0,1  $\mu\text{m}$  (Benoit et al., 2007).

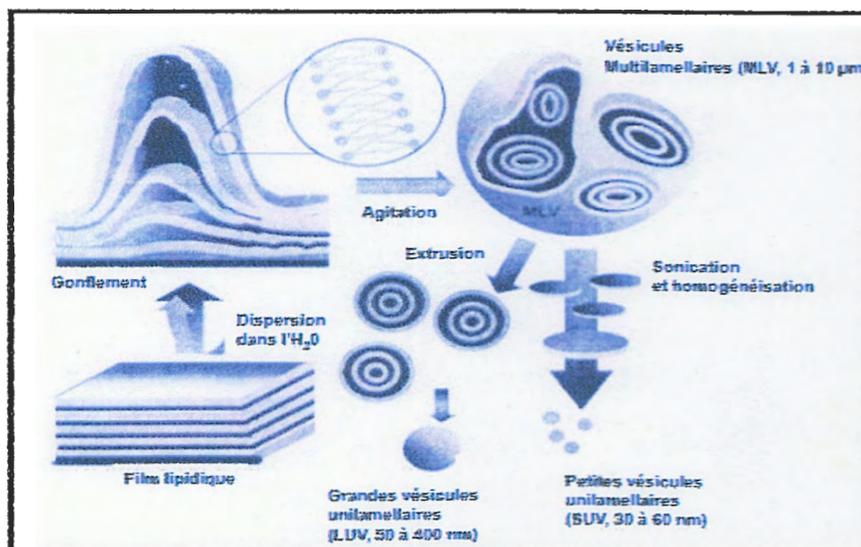


Figure 12 : méthodes de préparation des liposomes (Lasic, 1997).

## 6. Caractérisation des liposomes

### 6.1. Mesure de la distribution de la taille des liposomes

La distribution de taille des liposomes est déterminée par diffraction laser. Cet instrument se base sur la mesure de l'angle de diffraction et de l'intensité du rayon lumineux pour calculer la taille des particules. Un rayon laser passe au travers de la cellule qui contient la suspension de liposomes. Le rayon est en partie diffracté et absorbé par les particules dispersées. Les petites particules diffractent le rayon sous un grand angle mais avec une faible intensité et inversement pour les grosses particules. Cette méthode de détermination est valable pour des distributions de taille allant jusqu'à 1 µm (Edwards et Baeumner, 2005 ; Thompson et Singh, 2006).

### 6.2. La mesure de potentiel zêta

Le potentiel zêta est souvent mesuré pour prédire la stabilité des liposomes en suspension. L'intensité de la force de répulsion électrostatique est en effet liée au potentiel zêta : plus les particules ont un potentiel zêta élevé (en valeur absolue), plus elles vont se repousser et moins elles vont avoir tendance à s'agréger. La mesure du potentiel zêta des particules colloïdales est basée sur la mesure de leur mobilité électrophorétique (Marc, 2005). Le potentiel zêta des liposomes est mesuré par spectroscopie de corrélation de photons avec le même appareil (Socha, 2007). Les mesures sont réalisées à température ambiante (Goutayer, 2008).

## 7. Méthodes d'encapsulation des principes actifs au sein des liposomes

Une étape importante lors de la formation des liposomes est l'encapsulation des principes actifs. Deux grandes méthodes sont utilisées :

- ✓ *Piégeage passif.*
- ✓ *Concentration par transport actif des substances dans les vésicules (Gradient de pH).*

### 7.1. Encapsulation passive

#### 7.1.1. Dispersion de liposomes déshydratés

Cette méthode consiste à disperser dans une solution aqueuse de produit à encapsuler, une suspension de liposomes SUV préformés préalablement lyophilisée. Après reconstitution par une solution aqueuse de faible volume, on obtient des liposomes dont le diamètre moyen est inférieur à 1  $\mu\text{m}$  et qui autorisent des pourcentages d'encapsulation élevés, de l'ordre de 40%.

Contrairement aux lipides séchés par évaporation de solvant, les SUV lyophilisés conservent leur structure membranaire. Au moment de l'hydratation du lyophilisat, les membranes des SUV fusionnent pour former des vésicules multilamellaires avec un volume d'encapsulation important. Une modification de cette méthode consiste à sécher les lipides sur des particules de chlorure de sodium ou de sorbitol. On obtient ainsi une poudre déshydratée connue sous le nom de "proliposome". Après hydratation, le film phospholipidique formé sur les particules gonfle pendant que le support pulvérulent se dissout rapidement. Il se forme par cette technique des liposomes MLV (Benoit et al., 2007).

#### 7.1.2. Dispersion de liposomes congelés

Dans ce procédé de préparation, les liposomes SUV et le soluté à encapsuler sont congelés dans de l'azote liquide puis ensuite ramenés à température ambiante. A ce stade, une sonication permet de réduire la perméabilité des vésicules en accélérant la disparition des défauts des membranes qui surviennent lors de la congélation. Il est ainsi possible d'obtenir par cette technique des vésicules qui possèdent un volume d'encapsulation de l'ordre de 10  $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$  de lipides avec des taux d'encapsulation de 30%. Les liposomes formés sont des LUV et résultent de la fusion des liposomes SUV de départ. Cette technique n'est réalisable qu'en présence d'une charge au sein des lipidiques des vésicules et sans cryoprotecteurs comme le saccharose, ou sans cations divalents ou encore de solutions à force ionique élevée. Les LUV obtenus sont extradables pour former des vésicules entre 50 et 150 nm (Benoit et al., 2007).

### 7.2. Encapsulation dite active par création de gradient de concentration

L'encapsulation dite active consiste à introduire les substances à encapsuler dans des liposomes préformés. La principale technique développée au niveau industriel consiste à créer une différence de pH de part et d'autre de la membrane des liposomes.

Cette méthode repose sur le fait que les acides et bases faibles ne traversent les membranes phospholipidiques qu'à l'état non ionisé. Ainsi, une base comme la doxorubicine, traverse la membrane d'un liposome sous la forme Dox-NH<sub>2</sub> (figure 13).

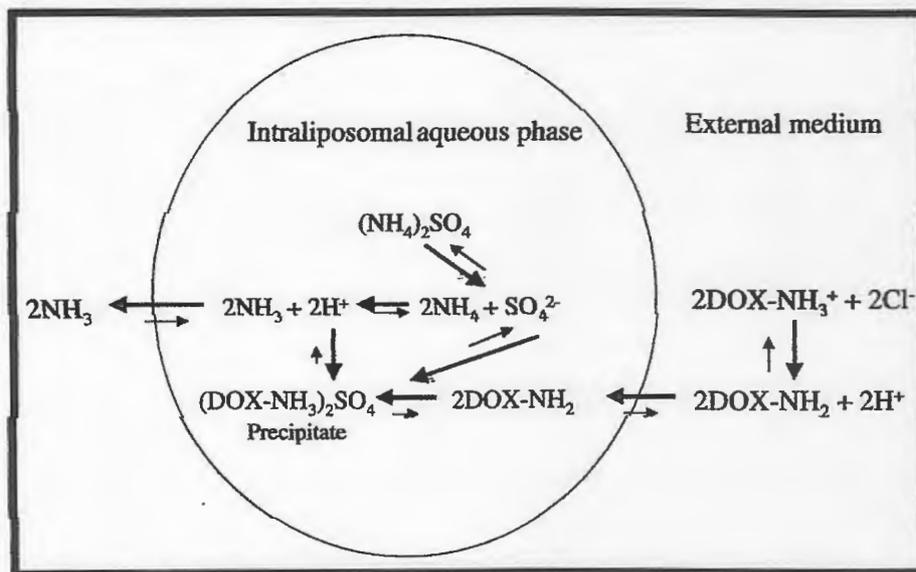


Figure 13 : mécanisme de l'encapsulation active de la doxorubicine (Barenholtz, 2001).

Si les liposomes ont été préparés à pH acide, et que la suspension a été neutralisée après préparation, il existera un gradient de pH intérieur/extérieur en raison de la faible perméabilité des phospholipides aux ions.

En raison de la protonation des molécules de doxorubicine à l'intérieur des vésicules ( $\text{Dox-NH}_3^+$ ) la diffusion de l'anthracycline se poursuivra jusqu'à l'équilibre des concentrations en forme non-ionisée de part et d'autre de la membrane, c'est à dire jusqu'à épuisement du milieu extraliposomal (Tardy et Boman, 1996).

Dans cette méthode, seule la forme non ionisée traverse la membrane liposomale. Dès son entrée dans la cavité acide du liposome, la doxorubicine est protonée, ce qui permet de déplacer l'équilibre en faveur de l'encapsulation quasi totale du principe-actif. Des taux d'encapsulation de plus de 90% avec des fuites très limitées sont ainsi obtenus.

### 8. Limite d'utilisation des liposomes

Les liposomes restent des systèmes instables, physiquement et chimiquement. Aujourd'hui, par exemple, aucune application pharmaceutique des liposomes par voie orale n'est possible en raison de la dégradation rapide des membranes lipidiques par la bile.

Ces dégradations de la membrane mais aussi les pertes de principe actif au cours de la fabrication mènent à des taux d'encapsulation relativement faibles de ces systèmes (inférieurs à

50%). La séparation, en fin de processus de fabrication, des molécules de principe actif libres de celles encapsulées entraînent des coûts importants qui limitent l'exploitation des liposomes à l'échelle industrielle. Développer des matériaux performants passe par l'utilisation de lipides de grande pureté, ce qui n'est pas non plus sans conséquence sur le prix du matériau (Guery, 2006).

Les liposomes exercent un effet sur le comportement et le devenir du PA qu'ils véhiculent par (Plats et al., 2005):

- Une modification de ses caractéristiques physicochimiques en solubilisant notamment les PA hydrophobes, rendant envisageable leur administration dans le meilleur des cas ou, au moins, améliorant leur « administrabilité ».
- Une protection des PA des transformations chimiques et de la dégradation enzymatique.
- Une libération retardée.
- Un ciblage possible des cellules du SPM.
- Une augmentation des concentrations sur les sites infectieux, voire au niveau intracellulaire.
- Une diminution du volume de distribution.
- Une clairance plasmatique différée (liée à la taille du liposome).
- Une diminution potentielle de certaines toxicités, particulièrement intéressant pour les PA faible index thérapeutique. Mais il y a aussi des limites : avant même l'arrivée au site d'action, fuite possible du PA dans la circulation suite la déstabilisation de la paroi par les lipoprotéines par exemple, et plus particulièrement par les HDL.
- Séquestration des microvésicules dans le foie, la rate, le système reticulo- endothélial, même lorsque ceux-ci ne constituent pas le site cible.
- Possibilité d'activation du système du complément, augmentant la clairance du liposome et induisant des effets indésirables cardiovasculaires et hématologiques par libération des fractions C3a et C5a du complément.

## 10. Comportement des liposomes en milieu biologique

La pharmacocinétique des liposomes dépend de la dose administrée, de leur composition, de leur taille, donc du nombre de bicouches, de l'état physique de leur paroi, en particulier de sa fluidité et de la présence d'agent stabilisant, de la répartition granulométrique des liposomes et de leur charge de surface (Plats et al., 2005).

### 10.1. Devenir dans le sang

Les liposomes vont être injectés directement dans le sang afin de s'affranchir de leur passage à travers certaines barrières biologiques (intestin, peau, ...).

Dans le sang, des protéines se fixent à la surface des liposomes et modifient leurs caractéristiques physicochimiques, entraînant un changement au niveau de leur stabilité et leur clairance. Il s'agit des *opsonines* dont la fibronectine, la fraction C3 du complément, les IgG...etc.

L'adsorption des opsonines à leur surface provoque une déstabilisation des liposomes, qui se traduit par une augmentation de leur perméabilité. On assiste donc à un ciblage des PA vers les sites accessibles aux vecteurs, les macrophages des systèmes de phagocytes mononucléés (SPM), et un détournement des PA des sites non accessibles : cœur, reins... Dans le sang, les liposomes interagissent également avec des lipoprotéines telles que les HDL, agents déstabilisants majeurs (Plats et al., 2005).

### 10.2. Clairance plasmatique des liposomes

La capture peut se faire au niveau des cellules accessibles qui possèdent des récepteurs pour une ou plusieurs des protéines adsorbées à la surface des liposomes. Physiologiquement, ils ne sont pas capturés par les cellules endothéliales car elles n'ont pas de récepteurs de surface capables de reconnaître les opsonines. Si des anticorps monoclonaux sont présents et dirigés contre des protéines membranaires de cellules endothéliales, la capture serait possible.

En revanche, les opsonines sont reconnues par les récepteurs des macrophages du SPM, entraînant une concentration des liposomes dans les organes ou tissus particulièrement riches en macrophages : foie, rate, poumons, moelle osseuse. Capturés par endocytose, les liposomes libèrent leur contenu dans les endolysosomes de ces cellules après action des phospholipases lysosomiales.

La disparition des liposomes de la circulation sanguine repose par conséquent sur une capture cellulaire active, mais pas seulement. En effet, il existe aussi une distribution granulométrique, processus passif dépendant de la nature et de l'état des capillaires. Ceci met en évidence l'importance de la taille des liposomes et de leur répartition granulométrique dans leur clairance. Les liposomes sont incapables d'accéder aux organes dont l'irrigation est assurée par des vaisseaux endothélium continu ou même fenestré, sauf s'il s'agit de tissus inflammatoires et tumoraux. Dans ces conditions en effet, il y a perte locale de l'intégrité vasculaire qui présente une plus grande perméabilité, tout au moins aux petits liposomes par un phénomène d'extravasation. Il peut aussi y avoir une activation cellulaire locale du système phagocytaire. Une sortie de la circulation sanguine est possible chaque fois que la discontinuité des capillaires forme des pores de diamètre supérieur celui des liposomes (Plats et al., 2005).

## 11. Applications des liposomes

### 11.1. Applications thérapeutiques

Les premiers transporteurs pharmacologiques nano-particulaires ont été commercialisés dans la dernière décennie du XX<sup>ème</sup> siècle. L'injection à l'homme de liposomes de quelques dizaines de nanomètres de diamètre encapsulant des molécules anticancéreuses est approuvée depuis plus de 10 ans pour le traitement de certains cancers du sein ou de l'ovaire. Ainsi en 1997, le DaunoXome® (NeXstar Pharmaceuticals, Inc.) est arrivé dans l'arsenal de chimiothérapie. Il s'agit de liposomes encapsulant de la daunorubicine. Cette formulation a été suivie en 1999 par l'AmBisome® (Gilead Sciences / Fujisawa Healthcare) qui est également basée sur des liposomes dont la bicouche lipidique comporte des molécules d'Amphotéricine B, un antibiotique antifongique. La doxorubicine, une molécule anticancéreuse, est également commercialisée sous forme liposomale sous les noms de Myocet® (Elan Europe) et Doxil®(USA) / Caelix®(Europe) (Johnson & Johnson Alza). Dans ce dernier cas, la formulation du liposome comporte des agents de furtivité afin d'améliorer sa biodistribution ; de telles particules sont appelées liposomes furtifs (Plats et al., 2005).

### 11.2. Applications cosmétologiques

De nombreuses substances utilisées en cosmétologie (antioxydants, collagène, etc.) sont en général appliquées localement sous forme d'émulsion huileuse ou de solution alcoolique. L'huile et l'alcool peuvent endommager la peau en cas d'application prolongée. L'encapsulation dans des liposomes permet de contourner ce problème ; diffusion passive et continue du produit au travers des bicouches des liposomes, ceux-ci peuvent fusionner avec les cellules de la peau et libérer le principe actif dans la cellule et augmenter son efficacité (Klein, 2009).

### 11.3. Applications biochimiques et biophysiques

Les liposomes sont largement utilisés pour l'étude des propriétés membranaires. En effet, ils constituent un modèle membranaire qui tente de reproduire la structure et les propriétés des membranes biologiques. L'avantage de leur utilisation réside dans la possibilité de moduler les conditions expérimentales pour mettre en évidence l'influence de certains facteurs sur les propriétés membranaires. L'effet de paramètres tels que la composition lipidique, la température, la force ionique, l'asymétrie lipidique et le pH du milieu peuvent être étudiés. Un large éventail de techniques a été développé. La plupart s'appliquent à l'étude de membranes biologiques. Elles donnent accès à des informations diverses, telles que la perméabilité, la fluidité ou encore l'organisation des vésicules. Il importe cependant de rester vigilant avant d'extrapoler aux membranes biologiques les résultats obtenus avec des liposomes. Ces derniers ne miment pas parfaitement la complexité des structures membranaires. Ils ne reproduisent que pauvrement l'implication des facteurs extramembranaires dans la régulation de leurs fonctions. La matrice lipidique des liposomes peut assez bien correspondre à celle des membranes biologiques. Par contre, il est difficile de prendre en considération des éléments comme la variabilité des chaînes d'acides gras ou la présence de certains lipides et glycolipides dans les membranes biologiques. De plus, les membranes biologiques sont entourées par des milieux complexes et différents de part et d'autre, alors que les liposomes sont généralement dans un tampon de pH et de contenu ionique déterminés mais homogènes. Toutefois, les liposomes constituent de bons modèles pour étudier ce qui se déroule au niveau membranaire lors de différents processus (Lorin et al., 2004).

# Chapitre 3

## 1. Introduction

Les lipides appartiennent à une famille particulière de molécules amphiphiles qui possèdent une tête polaire, donc hydrophile, chargée ou non, et au moins une chaîne aliphatique, hydrophobe (Shechter, 1993). Lorsqu'ils sont mis en solution aqueuse, ces composés amphiphiles, vont dans un premier temps se positionner aux interfaces, comme à l'interface eau-air : la partie hydrophile du composé amphiphile est solubilisée dans l'eau tandis que la partie hydrophobe est exposée à l'air. Lorsque la concentration en molécules amphiphiles est augmentée jusqu'à saturation de l'interface eau-air par une monocouche adsorbée, des molécules individuelles restent en solution. Cependant, si ces molécules restaient solubilisées de façon individuelle, cette situation serait très coûteuse en énergie libre car les parties hydrophobes de la molécule seraient alors exposées à l'eau. Afin de minimiser l'énergie libre du système, un auto-assemblage des molécules individuelles a lieu. Cet auto-assemblage peut être à l'origine de nombreuses phases de morphologie différentes (Israelachvili, 1992; Lipowsky et Sackmann, 1995).

## 2. Les lipides liposomales

La membrane des liposomes est généralement composée d'un mélange de substances lipidiques : les phospholipides, les sphingolipides, le cholestérol et lipides cationiques (Benoit et al., 2007).

### 2.1. Phospholipides

Les phospholipides (PL) sont parmi les plus polaires des lipides. Ils sont constitués par une molécule d'un polyalcool, en général le glycérol ( $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$ ) estérifié, d'une part par des acides gras (que hydrophobe), et d'autre part par l'acide phosphorique (tête hydrophile) (Sarr, 2010).

La plupart des phospholipides naturels sont constitués de deux chaînes d'acides gras estérifiant les fonctions alcool du glycérol en positions 1 et 2. Les groupes polaires fixés sur le phosphate estérifient la position 3 du glycérol (figure 14) (Marc, 2005).

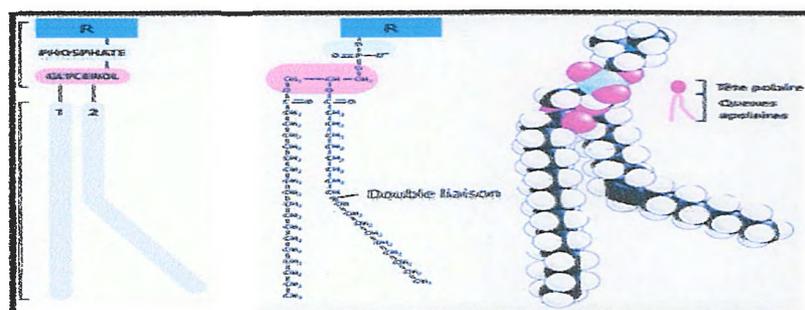


Figure 14 : La structure de phospholipides (Lorin, 2004).

Les phospholipides sont la composante principale des liposomes. La forme de ces molécules peut varier selon la structure de la tête polaire (type de substituant sur le groupement phosphate) et de la partie hydrophobe (nature des chaînes d'acides gras). Alors que les molécules cylindriques forment des bicouches propices à la formation des liposomes (New, 1990).

## 2.2. Cholestérol

Le cholestérol est une molécule possédant un caractère hydrophobe très marqué, ce qui lui permet de s'insérer au sein d'une membrane lipidique. Elle est composée de quatre cycles rigides coplanaires et d'une chaîne ramifiée à 8 atomes de carbone (figure 15).

Le groupement hydroxyle placé en position 3 du premier cycle, représente la seule partie polaire du cholestérol. Ce dernier s'insère dans la membrane dans une direction perpendiculaire au plan moyen de la bicouche lipidique avec le groupe hydroxyle placé au niveau de la partie polaire des phospholipides tandis que ses cycles sont "solubilisés" par les chaînes grasses des phospholipides.

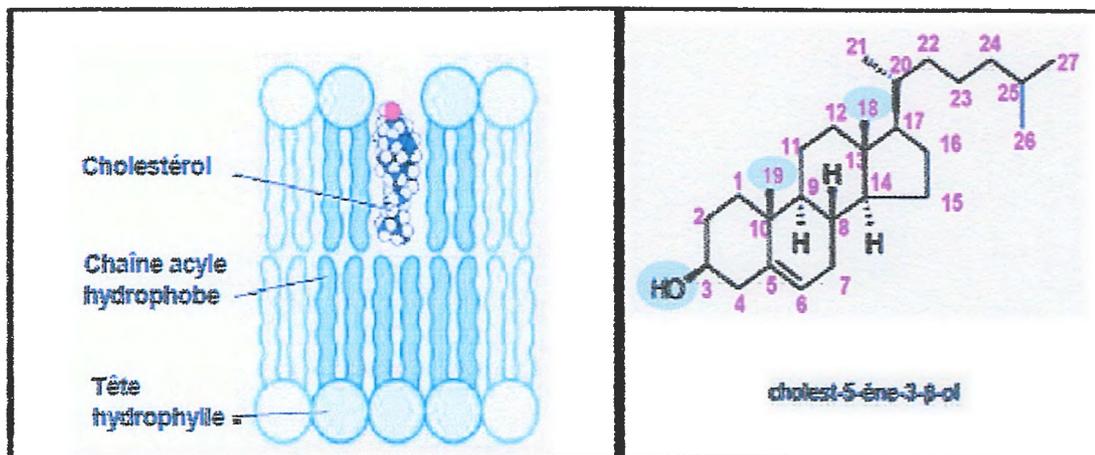


Figure 15 : Structure de la molécule de cholestérol (Oswald et Pieranski, 2000).

La longueur du cholestérol, d'environ 17.5 Å, est plus courte que la longueur de chaîne des phospholipides qui est proche de 25 Å. La présence de cholestérol au sein de la membrane lipidique tend à la rigidifier. Cette rigidification provient du fait que le cholestérol engendre un effet de condensation forte dans la membrane lipidique, faisant ainsi diminuer l'aire occupée par les molécules de lipides (Shechter, 1993).

### 2.3. Les sphingolipides

Les sphingolipides sont des lipides polaires complexes structurellement très diversifiés et impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques. D'origines animale ou végétale (Sullard et al., 2000). Ils sont des molécules ubiquitaires présentes chez les eucaryotes et certaines bactéries. La structure de base est un amino-alcool à longue chaîne, la sphingosine. Leur nom est dû à la présence de cette dernière ; sur la fonction amine est greffé un acide gras à longue chaîne et la fonction alcool secondaire porte le groupement polaire (Figure 16) (Leterrier et Gary-Bobo, 1989). En fonction de la nature de leur tête polaire, le groupe des SPL se divise en deux sous-groupes : les glycosphingolipides et les sphingophospholipides (Liu et al., 1999).

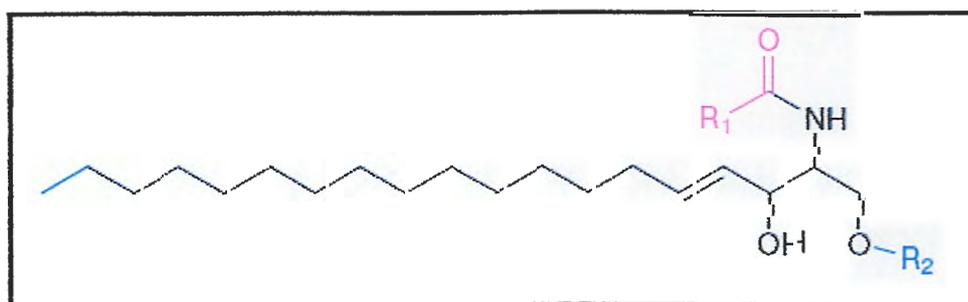
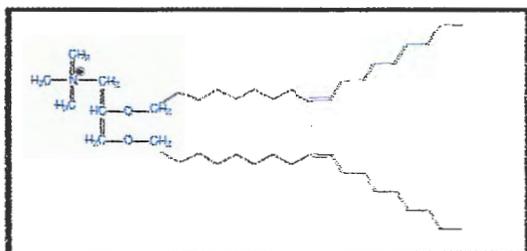


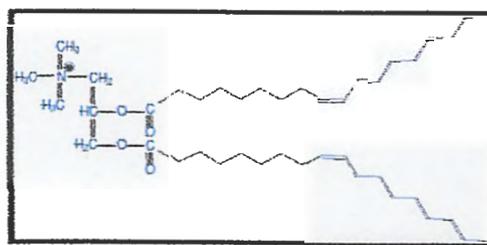
Figure 16 : Structure de sphingolipides. Le squelette sphingosine est représenté en noir. Ce lipide est constitué d'une chaîne à 18 atomes de carbones. Celle-ci porte deux groupements OH en position 1 et 3, un groupement NH<sub>2</sub> en position 2 et une insaturation en position 4. L'ancrage d'un acide gras, en rouge, via une liaison amide donne naissance à une céramide. Si une tête polaire (R<sub>2</sub> en bleu) se lie à la céramide par le groupement OH en position 1, on obtient un glycosphingolipide ou un sphingophospholipide (Liu et al., 1999).

### 2.4. Les lipides cationiques

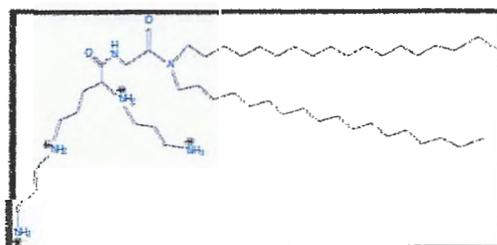
Les lipides cationiques sont de deux types. Ils peuvent être monovalents (une seule charge positive) ou multivalents (plusieurs charges positives) Le premier lipide cationique décrit est le bromure de 2,3-Dioleoylloxypropyl-1-triméthyl ammonium bromide (DOTMA) (Lipofectamine®). Dans le but d'obtenir une meilleure biodégradabilité et de réduire la toxicité du DOTMA, la liaison éther a été remplacée par une liaison ester pour obtenir le 1,2-Dioleoyl-3-triméthylammonium-propane (DOTAP). Plus récemment, des lipides cationiques sont complexés avec des RNA et testés sur des cellules mammaires. Il s'agit notamment d'analogues de structure 1,2-Dioleoyl-3 triméthylammonium-propane DOTAP, dioctadecylamido-glycylspermine (DOGS ou transfectam), N-méthyle-4-(dioleoyl) méthylpyridinium (SAINT-2), de lipides cationiques contenant du cholestérol, ou des lipopolyamines dont la tête cationique est généralement dérivée de la spermine (figure 17) (Felgner et al., 1987; Stamatatos et al., 1988).



DOTMA



DOTAP



DOGS

Figure 17 : Structure chimique des principaux lipides cationique (Behret *et al.*, 1987; Leventis *et al.*, 1990; Felgner *et al.*; 1997).

### 3. Les différents modèles de membranes artificielles

Les lipides amphiphiles peuvent, dans certaines conditions, s'organiser en structures sphériques, monocouche (les micelles), si leur molécule comprend une seule molécule d'acide gras. La morphologie des phases formées dépend de plusieurs paramètres dont la concentration, la température, mais aussi la forme géométrique des molécules. Ainsi, les glycérophospholipides comportent deux queues hydrophobes et forment des bicouches planes ou sphériques (Decher, 1991).

La (figure 18) montre les différents types d'organisation possible des molécules amphiphiles en solution qui ont toutes en commun la mise en contact des parties hydrophiles avec l'eau et le masquage des parties hydrophobes (Decher *et al.*, 1992).

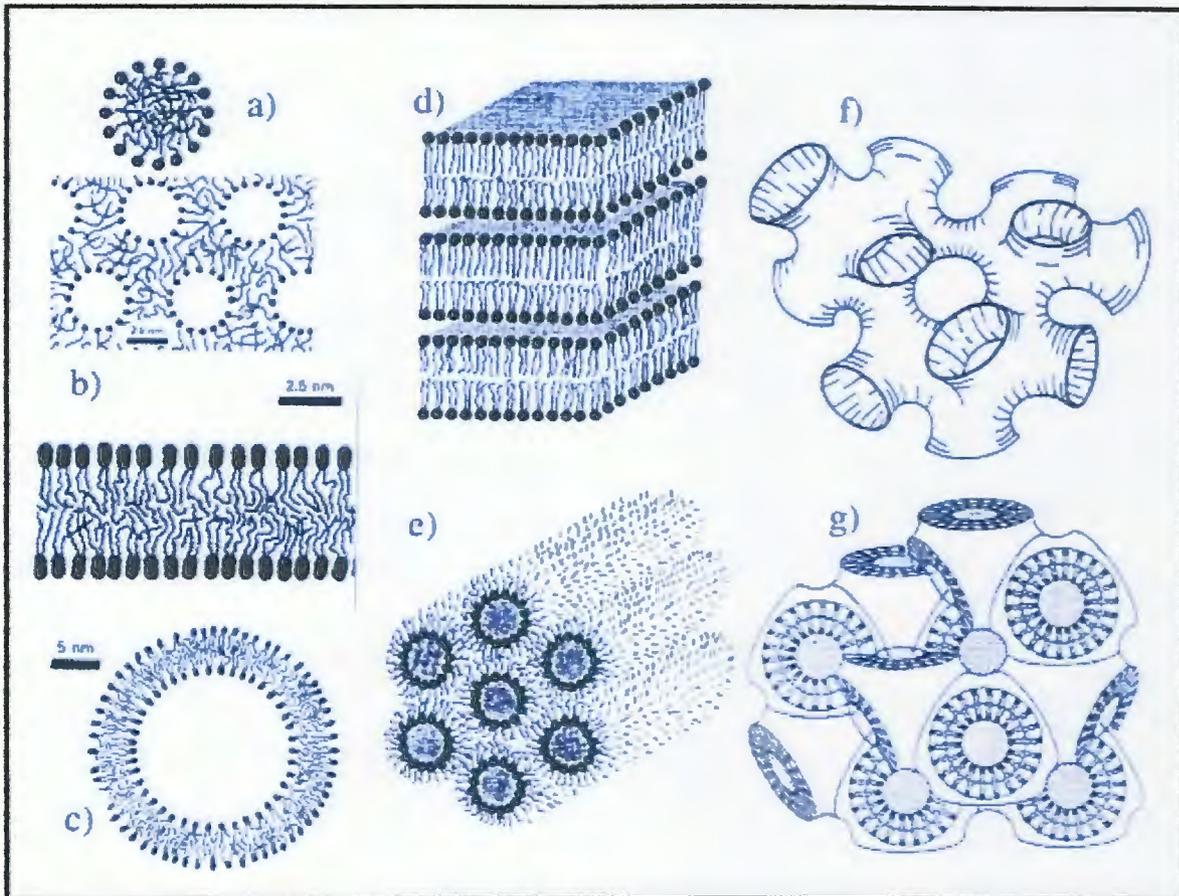


Figure 18: Les différents modèles de membranes artificielles: a) micelles et micelles inverses, b) bicouche, c) liposome, d) phase lamellaire, e) phase hexagonale inverse (micelles cylindriques inverses), f) phase éponge, g) phase cubique inverse bicontinue (Decher et al., 1992).

### 3.1. Auto-assemblage des lipides

En milieu aqueux, les lipides s'organisent pour former différentes. La morphologie des phases formées dépend non seulement de la concentration des molécules amphiphiles et de la température mais également de la forme géométrique des molécules considérées. En particulier, le rapport entre le volume de la partie hydrophobe et le produit de l'aire de la tête polaire par la longueur de la molécule détermine la topologie de l'édifice auto-assemblé. Ce rapport constitue le paramètre de forme  $p$  (Israelachvili, 1992). Ce paramètre dépend :

$$P = V / (a_0 \cdot l_c)$$

$V \Rightarrow$  est le volume de la chaîne hydrophobe.

$a_0 \Rightarrow$  la surface de la tête polaire.

$l_c \Rightarrow$  la longueur de la chaîne.

De ce paramètre  $P$  et donc de la géométrie de l'amphiphile, dépend un type d'auto-assemblage (Tableau 2) (Thauvin, 2009).

- ✓  $P < 1/3 \Rightarrow$  micelle sphérique.
- ✓  $1/3 < P < 1/2 \Rightarrow$  micelle cylindrique.
- ✓  $1/2 < P < 1 \Rightarrow$  bicouche sphérique (vésicules, liposome).
- ✓  $P = 1 \Rightarrow$  bicouches planes.
- ✓  $P > 1 \Rightarrow$  micelles inversées sphérique ou cylindrique.

Tableau 2 : Différents arrangements des phospholipides en solution aqueuse (Delattre et al., 1993).

$P = \frac{v}{a_0 l_c}$	Forme	Structure
$P < 1/3$		Micelles sphériques
		
$1/3 < P < 1/2$		Micelles cylindriques
		
$1/2 < P < 1$		Vésicules
		
$P \sim 1$		Bicouches planes
		
$P > 1$		Micelles inverse
		

# **Conclusion**

Les vecteurs corpusculaires représentent un réel espoir pour la médecine. Elles peuvent en effet favoriser la délivrance d'agents thérapeutiques au sein même de la zone à traiter en limitant leur capture par d'autres tissus. Cela permet ainsi de réduire les effets secondaires de ces traitements, et redonne de l'intérêt à des principes actifs qui avaient des propriétés physiques et une biodistribution insatisfaisantes.

Ainsi depuis quelques années, un grand nombre de vecteurs corpusculaires à vocation thérapeutique ont été développées et étudiées. Cependant, bien qu'ils aient souvent des propriétés intéressantes, bien peu d'entre eux sont parvenues à une utilisation clinique.

En effet, la production, la stabilité, la biodistribution, et l'efficacité restent des conditions critiques à réunir pour l'utilisation clinique de nouveaux vecteurs. La toxicité des vecteurs reste également un point crucial qu'il convient de connaître afin d'éviter que le remède soit pire que le mal.

Parmi les différents types de vecteurs corpusculaires, les liposomes ont été très utilisés à ce jour. Ces matériaux présentent une grande biocompatibilité et une importante versatilité qui leur permettent d'encapsuler de manière durable de nombreuses molécules ou particules aux fonctions différentes.

Cependant, malgré les grands progrès réalisés, la vectorisation a des limites étant donné que jusqu'à ce jour les formes galéniques classiques restent les plus utilisées et plus efficaces malgré leurs effets secondaires. En effet, lors de l'encapsulation, une fraction du médicament est effectivement encapsulée, mais une autre, parfois plus importante va s'adsorber en surface. En conséquence, lorsque l'on va administrer cet ensemble par voie intraveineuse, il y aura une libération immédiate et totalement incontrôlée du principe actif ; un autre inconvénient, probablement plus important, et qui limite d'autant plus les possibilités de ces technologies est de pouvoir estimer quel poids de médicament est-il possible d'introduire par rapport au poids du vecteur. Bien souvent, il s'avère que la valeur de 8% est très satisfaisant, alors qu'il est souvent difficile de dépasser les 1 ou 2%, cette limitation pose un problème important puisque alors soit la quantité de médicament injectée est insuffisante et donc l'efficacité est faible, soit il va être nécessaire d'administrer des grandes quantités de matériel vecteur ce qui provoquera l'apparition d'effets secondaires, en particulier liés à la toxicité par accumulation intracellulaire de matériel polymère.

Un gros travail reste donc à faire par les chimistes pour développer des nanotechnologies qui résoudront ces deux problèmes en particulier celui du taux de charge, afin de pouvoir améliorer l'index thérapeutique des médicaments et éventuellement de contourner des phénomènes de résistance.

**Références**

**Bibliographiques**

Alving CR, Steck EA, Chapman NL, Waits VB, Hendricks LD, Swartz GM, Hanson WL. *Therapy of leishmaniose, superior efficacies of liposomes-encapsulated drugs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* .1978 (75): P 2959-2963.

Andrieux K, Desmalte J, Angelo D and Couvreur P. *Nanotechnologies and new drugs. Actualité chimique* .2003: P 135.

Balazs DA, Godbey WT. *Liposomes for Use in Gene Delivery. Journal of Drug Delivery* .2011. doi:10.1155/2011/326497.

Barenholz Y. *Liposome application: problems and prospects. Current Opinion in Colloid & Interface Science* . 2001 (6): P 66 - 77.

Behr JP, Demeneix B, Loeffler JP and J. Perez-Mutul J. *Efficient gene transfer intomammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. Proc Natl Acad Sci USA* .1989: P 6.

Benoit JP, Couvreur P, Devissaguet JP, Fessi H, Puisieux, F, and Roblot L. Les formes vectorisées ou à distribution modulée, nouveaux systèmes d'administration des médicaments. *J. Pharm. Belgique*.1986 (5): P 319-329.

Benoit JP, Briançon S, Fattal E, Fessi H, Legrand P, Passirani C. Pharmacie galénique ; Formulation et technologie pharmaceutique : Sphéroïdes et formes vectorisées. 2007: P 219-250.

Bertrand N. Caractérisation de la pharmacocinétique de formulations sensibles au pH et de formulations destinées au traitement des intoxications médicamenteuses. Thèse de Doctorat, Université de Montréal .Canada .2011 : P 26.

Boussif O, Lezoualch F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995 (92): P 7297-7301.

Chan JM, Zhang L, Tong R, Ghosh D, Gao W, Liao G, Yuet KP, Gray D, Rhee J-W, Cheng J, Golomb G, Libby P, Langer R, Farokhzad OC. *"Spatiotemporal controlled delivery of nanoparticles to injured vasculature."* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010 (107): P 2213-2218.

Chuto G, Chaumet-Riffaud P. Les nanoparticules. *Médecine Nucléaire*, doi:10.1016/j.mednuc. 2010.

Coukell A J, Spencer CM. *Polyethylene glycol-liposomal doxorubicin: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of AIDS-related Kaposi's sarcoma. Drug*. 1997 (53): P 520-538.

Couvreur P, Tulkens P, Roland M, Touret A and Speiser P .*Nanocapsule : A new type of lysosomotropic carrier. FEBS Lettre* . 1977 (84) : P 323-326.

Couvreur P. Liposomes en clinique humaine. In : Delattre J, Couvreur P., Puisieux F., Philippot JR, Schuber F. *Les liposomes : aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*, Edition INSERM et TEC & DOC-LAVOISIER. Paris .1993: P 43-62.

Couvreur P. L'encapsulation des médicaments Texte de la 524<sup>e</sup> conférence de l'Université de tous les savoirs (UTLS) .2004 : P 2.

Decher G, Hong JD. *Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: I. Consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles.* *Makromol. Chem., Macromol. Symp.* .1991: P 46- 321.

Decher G, Hong JD, Schmitt J. *Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces.* *Thin Solid Films.* 1992: P 831-835.

Delattre J, Couvreur P, Puisieux F. Les liposomes : Aspects technologiques, biologiques et pharmacologique. Ed. Inserm : P 257.

Deshayes S. Synthèse de nanoparticules spécifiques pour le ciblage et l'imagerie de l'angiogenèse tumorale. Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux 1 .France. 2009 : P 33.

Dousset N, Douste-Blazy L. Méthodes de préparation des liposomes. In : Puisieux F., Delattre J. eds. Les liposomes (applications thérapeutiques), Edition TEC & DOC (Lavoisier), Paris .1985 : P 41- 72.

Edwards K, Baeumner A. *Analysis of liposomes.* *Talanta.* 2005 (68): P 1432–1441.

Elodie S. Conception de vésicules catanioniques dérivés de sucre mécanisme de délivrance de principes et étude de leurs actifs. Thèse de doctorat, Université Toulouse III .France. 2007: P 7.

Felgner PL, Gadek T R, Holm M , Roman R, Chan HW, Wenz M., Northrop JP, Ringold GM and Danielsen, M. *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNATransfection procedure.* *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 1987(21): P 7413-7.

Ferrari M. *Cancer nanotechnology: opportunities and challenges.* *Nat Rev Cancer* .2005 (3): P 161-171.

Gabison A, Martin F. *Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. Rationale for use in solid tumours.* *Drugs.*1997 (54):P 15-21.

Gaffet E. Directeur de recherche au CNRS, Nanomaterials Research Group/ UMR CNRS 5060: Nanomatériaux: différentes voies de synthèse, propriétés, applications et marchés. 2008 : P 25.

Gao X, Chen J. *"Quantum dots bearing lectin-functionalized nanoparticles as a platform for in vivo brain imaging."* *Bioconjugate Chem.* 2008 (19): P 2189-2195.

Goutayer M. Nano-émulsions pour la vectorisation d'agents thérapeutiques ou diagnostiques ; étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence in vivo. Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie. France.2008 : P 10-183.

Guery J. Emulsion double cristallisable: Stabilité, encapsulation et relargage.Thèse de Doctorat, Université de Paris VI .France. 2006: P 23-36.

- Hamada A, Kawaguchi T. "Clinical pharmacokinetics of cytarabine formulations." *Clin. Pharmacokinet.* 2002 (41): P 705-718.
- Harris M J and Chess RB. "Effect of Pegylation of Pharmaceuticals." *Nat. Rev. Drug Discovery* .2003 (2): 214-221.
- Hillaireau H, Couvreur P. *Cellular and Molecular Life Sciences*.2009 (66): P 2873-2896.
- Israelachvili JN. *Intermolecular and surface forces; 2<sup>nd</sup> edition; Academic Press, London* 1992.
- Klein J. Développement d'une nouvelle famille d'amphiphiles fluorés pour la délivrance d'agents thérapeutiques. Thèse de Doctorat, Université de Strasbourg .France. 2009: P 15-19.
- Korting HC, Schäfer-Korting M . *Carriers in the Topical Treatment of Skin Disease. In Drug Delivery, M. Schäfer-Korting, Editor, Springer Berlin Heidelberg.* 2010: P 435-468.
- Langer R. *Drug delivery and targeting. Nature.* 1998 (392): P 5-10.
- Lasic DD, Woodle MC. *sterically stabilised liposomes. Biochimica & Biophysica Acta* .1992 (1113): P 171-199.
- Lasic DD. *Applications of Liposomes. In: Lipowsky R and Sackmann editions, Handbook of Biological Physics, volume 1, Elsevier Science B.V.* 1995: P 491-519.
- Lasic DD. *Liposomes in Gene Delivery. CRC Press, Boca Raton.* 1997: P 295.
- Laurence F. Intérêt de nanosphères comme forme orale a libération modifiée pour améliorer la biodisponibilité et le profil pharmacodynamique de l'isradipine. Thèse de Doctorat, Université d'Henri Poincaré- Nancy I .France. 1999: P19- 20.
- Laverman P, Brouwers AH, Dams ET. *Preclinical and clinical evidence for disappearance of long-circulating characteristics of polyethylene glycol liposomes at low lipid dose. J Pharmacol Exp Ther.* 2000 (293): P 996.
- Leblond J : Conception, synthèse et évaluation de systèmes de vectorisation non cationiques de l'AND. Thèse de Doctorat, Université Paris VI .France. 2005 : P 36.
- Letierrier F, Gary-Bobo CL. *Biologie membranaire: Structure et dynamique des membranes biologique. Hermann, éditeurs des sciences et des arts. Paris* .1989: P 45.
- Leventis R , Silviu JR. *Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. Biochim Biophys Acta* .1990 (1023): P 124-32.
- Lewin M, Carlesso N, Tung CH, Tang XW, Cory D, Scadden DT, Weissleder R, *Nat. Biotechnol.* 2000 (18): P 410-414.

Li VHK, Lee VHL, Robinson JR. *Influence of drug properties and routes of drug administration on the design of sustained and controlled release systems. In Controlled Drug Delivery, Fundamentals and Applications. Eds. Marcel Dekker Inc, Second edition, Chapter 1.* New York. USA. 1987: P 3-94.

Lipowsky, R., Sackmann, E. *Structure and dynamics of membranes; Elsevier sciences .B.V.* 1995.

Liu G, Kleine L, Hébert R: *Advances in the signal transduction of ceramide and related sphingolipids. Crit Rev. Clin Lab Sci.*1999 (36): P 73.

Lorin A, Flore C, Thomas A, Brasseur R. Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnologie. Agron. Soc. Environ.* 2004 (3) : P 163–176.

Lucie J. *Etudes in vitro et in vivo de deux héparines de bas poids moléculaire microencapsulées de rapports ANTI-Xa/ANTI-IIa différents : la nadroparine et la tinzaparine.* Thèse de doctorat, Université de Henri Poincaré – Nancy I .France .2009 : P 77.

Maeda H, Sawaa T, Konnob T: *Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. J. Control. Release.* 2001(74): P 47-61.

Marc M. fonctionnalisation de films multicouches de polyélectrolytes avec des liposomes enfouis : création de réacteurs immobilisés. Thèse de Doctorat, Université Strasbourg I- Louis Pasteur .France. 2005 : P 67.

Murray RK, Granner DK. Membranes : structure et fonction. In: *Biochimie de Harper.* De Boeck Université. Bruxelles. 2008 : P 422-441.

New RR. *Chapter 1: Introduction. Liposomes: a practical approach.* R. R. New. Oxford, Oxford University Press. 1990: P 1-31.

Oswald P, Pieranski P. « Les cristaux liquide » Gordon and Breash Science Publishers .2000 (1): P 52-53.

Plats D, Baudrant M., Ratsimbazafy V. Liposomes et formes pégylées: revue des médicaments disponibles. *Actualités pharmaceutiques hospitalières.* 2005 (3): 46-60.

Puisieux F., Roblot-Treupel L. Vectorisation et vecteurs de médicaments. *S.T.P. Pharma* .1989 (52): P 107-113.

Rabinow BE. *Nanosuspensions in drug delivery. Nat Rev Drug Discov.* 2004 (9): P 785-96.

Santra K, Mukherjee B. *Liposomes and their application (an overview). International Journal of Pharmaceutical Science and Technology.* 2009 (2): P 1-13.

Sarr F.S. Modélisation du mécanisme de diffusion d'une série de station à travers la membrane cellulaire: Approche biochromatographie et thermodynamique. Thèse de Doctorat, Université de France comté. 2010: P 31.

Scherphof GL, Velinova M, Kamps J, Donga J, Want H, Kuipers F, Havekes I, Daemen T. *Modulation of pharmacokinetic behavior of liposomes. Advanced Drug delivery Reviews.* 1997 (24): P 179-191.

Shechter E. *Biochimie et Biophysique des membranes*; 2<sup>nd</sup> édition. Masson.1993 : P 20-21.

Simard P. *Systèmes vésiculaires colloïdaux pour la vectorisation de la 1-β-D-arabinofuranosylcytosine.* Thèse de Doctorat, Université de Montréal .Canada.2009 : P 40.

Socha M .*Développement de nanoparticules furtives.* Thèse de Doctorat, Université Nancy 1-Henri Poincaré .France.2007 : P 51.

Socha M. *Apport des nanotechnologies dans le domaine des peptides et des protéines application à l'absorption par voie orale et à la furtivité.* Thèse de Doctorat, Université Nancy 1- Henri Poincare .France.2008: P 1-234.

Stamatatos L, Leventis R, Zuckermann MJ and Silvius JR. *Interactions of cationic lipid vesicles with negatively charged phospholipid vesicles and biological membranes.* *Biochemistry.*1988 (11): P 25.

Storm G, Crommelin DJA. *Liposomes: quo vadis? Pharmaceutical Science & Technology Today .*1998 (1): P 19-31.

Strebhardt K, Ulrich A. *Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. Nat Rev Cancer.* 2008 (6): P 473-80.

Sullards M, Lynch AH, Merrill AH, Adams J. *Structure determination of soybean and wheat glucosylceramides by tandem mass spectroscopy. J Mass Spectrom.* 2000 (35): P 347-353.

Tardy P, Boman N. *Liposomal doxorubicin (review). Journal of drug targeting.* 1987 (3): P 129-140.

Thauvin C. *Conception et utilisation de constructions lipidiques polymérisées pour la solubilisation de molécule hydrophobe en milieux aqueux.* Thèse de Doctorat, Université Strasbourg .France. 2009: P 11.

Thompson AK, Singh H. *Preparation of Liposomes from Milk Fat Globule Membrane Phospholipids Using a Microfluidizer. J. Dairy Sci.* 2006 (89): P 410-419.

Torchilin VP. *Multifunctional nanocarriers. Advanced Drug Delivery Reviews.* 2006 (58): P 1532-1555.

Weitkamp JH, Poets CF, Sievers R. *Candida infection in very low birth weight infants: Out come and nephrotoxicity of treatment with liposomal amphotericin B (Ambisome).* *Infection* .1998 (1): P 11-15.

Whitehead KA, Langer RS. *"Knocking down barriers: advances in siRNA delivery."* *Nat. Rev. Drug Discovery.* 2009 (8): P 129-138.

Wu JMH, Nantz. *"Targeting hepatocytes for drug and gene delivery: Emerging novel approaches and applications."* *Front. Biosci.* 2002 (7): P 717-725.

## المخلص

إن مسار وتوزيع الأدوية في أشكالها التقليدية داخل العضوية يعتمد أساسا على خصائصها الفيزيائية والكيميائية مما ينجم عنه نقص في الفعالية و عدم وصولها بالتركيز الكافي إلى الخلايا الهدف و انتشارها في الأنسجة السليمة كما يلاحظ أيضا أن هناك طرح سريع لهذه الأدوية ،و من أجل تفادي و التقليل من هذه السلبيات لجأ الباحثون إلى ابتكار جسيمات خاصة بنقل وتوجيه هذه الأدوية ،بحيث انها تعتمد على الخصائص الفزيوكيميائية للناقل ،من بين هذه النواقل الأكثر استعمالا "الليبوزومات" او الجسيمات الشحمية و هي عبارة عن حويصلات ثنائية الطبقة الليبيدية ، و التي اثبتت الدراسات نجاعتها في التقليل من السمية و أكثر ضمانا لوصولها إلى مكانها المحدد.

الكلمات المفتاحية : الناقل، الخلايا الهدف ، النقل و التوجيه ، الليبوزومات

## Résumé

La biodistribution des médicaments dans leurs formes traditionnelles au sein de l'organisme dépend principalement de leurs propriétés physico-chimiques, ce qui entraîne une dilution du principe actif, un manque d'efficacité et l'absence de concentration suffisante au niveau des cellules cibles ainsi la répartition des médicaments dans les tissus sains. En outre, on note l'élimination rapide du principe actif. Pour pouvoir pallier et minimiser ces inconvénients, les chimistes ont développé des systèmes capables de transporter les PA vers leurs cibles toutes en évitant les tissus sains, ces systèmes sont appelés vecteurs, et dont des propriétés physico-chimiques dépendra la biodistribution du PA. Parmi ces vecteurs, les liposomes sont les plus utilisés; il s'agit de vésicules lipidiques, dont les études ont montré l'efficacité dans la réduction de la toxicité et le ciblage des tissus malades en se basant surtout sur les propriétés anatomiques des tissus considéré.

**Les mots clés : le vecteur, les cellules cibles, transporter et orienter, les liposomes.**

## Abstract

The biodistribution of drugs in their traditional forms within the body depends mainly on their physicochemical properties, resulting in a dilution of the drug, inefficiency and lack of sufficient concentration to target cells and the distribution of drugs in normal tissues. Furthermore, we note the rapid elimination of the active ingredient. To minimize these disadvantages, chemists have developed systems capable of transporting all PA to their targets by avoiding healthy tissue, such systems are called vectors. Among these vectors, liposomes are the most used; it comes to lipid vesicles, which studies have shown efficacy in reducing the toxicity and targeting of diseased tissues based mainly on the anatomical properties of the tissues considered.

**Key's words: vectors, target cells, transporting, liposomes.**