Nanoparticules polymères dans les sciences de la vie

Compte rendu de l'atelier de prospective EPF-GFP-UPMC. Paris, 24-25 mai 2004

Un atelier européen de prospective sur le sujet « Polymer nanoparticles in life science » s'est tenu, sous l'égide de l'European Polymer Federation (EPF), du Groupe Français des Polymères (GFP) et de l'Université Pierre et Marie Curie (UPMC), à Paris Jussieu les 24 et 25 mai 2004.

Maud Save (Laboratoire de chimie de polymère, UPMC), Christian Pichot (unité mixte CNRS-bioMérieux, Lyon) et Denis Labarre (Centre d'Études Pharmaceutiques, Université Paris-Sud) avaient pris en charge l'organisation de cette manifestation à laquelle ont participé une centaine d'inscrits, dont 15 % d'étrangers et 20 % d'industriels.

Les huit conférences plénières invitées (voir *encadré*) avaient l'ambition de présenter les diverses variétés de nanoparticules à base de polymères, leurs techniques de préparation et les grands domaines d'applications actuels ou émergents, tout cela en essayant de faire ressortir les difficultés et les verrous technologiques qui limitent ou ralentissent aujourd'hui les développements.

Des séances de communications par affiches (25 posters) avaient par ailleurs pour objectifs de présenter des résultats de recherche récents émanant de diverses équipes participant à cet atelier et de montrer la vitalité des recherches en cours sur ces sujets.

Nous soulignerons tout l'intérêt du « format » de ces ateliers européens qui aménagent de longues périodes de discussion et d'échange entre l'auditoire et les conférenciers après chaque intervention ; cela a fortement contribué à l'enrichissement du débat. Par ailleurs, la gratuité totale des inscriptions, rendue possible par l'aide financière du GFP et de sociétés industrielles intéressées par les thèmes de ces journées [1] a permis à de nombreux jeunes chercheurs de participer et de faire connaître leurs travaux.

A l'issue de cet atelier européen, une demi-journée de réflexion avait été organisée à l'initiative du GFP pour examiner la situation de la communauté française travaillant dans le domaine et envisager d'éventuelles actions pour faciliter le développement de sa compétence et l'orientation de ses programmes. Une vingtaine de personnes ont contribué à cette réflexion à laquelle participait aussi Valérie Cabuil, au nom du Département des Sciences chimiques du CNRS.

Les nanoparticules polymères Quels matériaux ? Pour quelles applications ?

Dans les sciences de la vie, on peut distinguer trois grands domaines où les nanoparticules à base de polymères sont impliquées assez directement :
- le diagnostic *in vitro* et l'analyse biologique,
- l'imagerie médicale (diagnostic *in vivo*),
- et les formulations pharmaceutiques.

La conférence de **B. Mandrand** a bien fait ressortir l'intérêt des nanoparticules polymères qui sont aujourd'hui largement utilisées comme supports et comme marqueurs pour détecter ou amplifier des réactions entre antigènes et anticorps (réactifs immunologiques) ou entre des brins d'ADN complémentaires (sondes ADN) [2]. Il existe aujourd'hui dans le commerce une très large gamme de nanoparticules dont la taille et les propriétés de surface (hydrophilie, groupements fonctionnels, coloration) sont extrêmement variées et peuvent a priori satisfaire les biologistes pour y fixer par adsorption ou covalence des biomolécules d'intérêt. Une grande quantité de protocoles sont décrits dans la littérature pour réaliser de telles fixations. Les latex magnétiques dont les particules composites ont un comportement superparamagnétique ont apporté de nouvelles solutions pour la fabrication et la réalisation des tests et facilité grandement leur automatisation (*figure 1*).

Ce même conférencier a beaucoup insisté sur les développements récents en biologie moléculaire en soulignant le grand intérêt des particules magnétiques fonctionnalisées, thermosensibles ou pH-sensibles, pour l'extraction sélective et la concentration de molécules (protéines, ADN), de cellules et de virus, ainsi que pour la réalisation de microsystèmes de type « lab-on chips » (puces ADN).

L'imagerie médicale par résonance magnétique (IMR) permet de visualiser un organe ou un tissu à partir de

Les conférences plénières

- *Biomolecules - polymer particles interactions: scientific aspects*
  S. Slomkowski (University of Lodz. Pologne)
- *Polymeric nanoparticles for medical diagnostics*
  B. Mandrand (bioMérieux, Lyon)
- *Iron oxide containing nanoparticles for imaging through intraveneous delivery: characteristics, distribution and applications*
  B. Bonnemain (Guerbet, France)
- *The design of polymeric nanoparticles for pharmaceutic applications*
  C. Vauthier (Faculté de pharmacie, Université Paris-Sud)
- *Nanoparticulate systems for vaccine delivery*
  M.-J. Alonzo (Université Saint Jacques de Compostelle, Espagne)
- *Nanoparticles for controlled delivery of therapeutics across biological barriers*
  C. Lehr (University of Sarrebruck, Allemagne)
- *Phosphorous dendrimers in life sciences*
  J.-P. Majoral (Laboratoire de chimie de coordination, CNRS, Toulouse)
- *Controlled degradation of polymeric nanoparticles*
  J. Coudane (CRBM, Faculté de pharmacie, Montpellier)

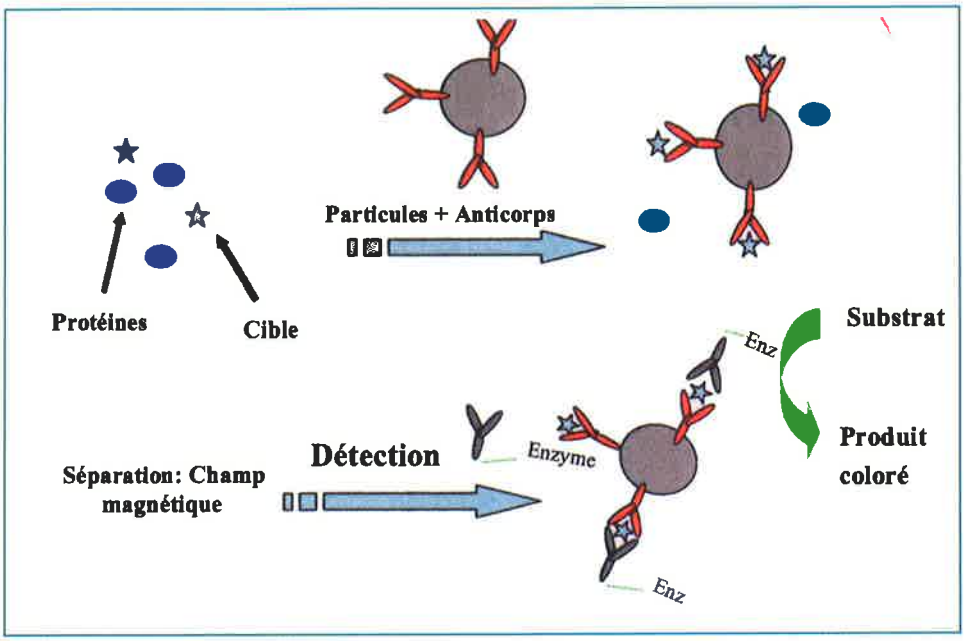

Figure 1 - Application des particules magnétiques dans les immunoessais.

la densité de protons. Le signal est nettement amélioré par l'utilisation d'agents de contraste paramagnétiques, comme les complexes de gadolinium, qui interviennent sur les relaxations de spin longitudinale et transversale. Comme **B. Bonnemain** l'a parfaitement illustré dans sa présentation, des progrès très sensibles ont été enregistrés ou sont attendus des nouvelles générations d'agents de contraste que sont les nanoparticules superparamagnétiques constituées de grains d'oxydes de fer de 4 à 6 nm inclus dans une matrice polymère de polysaccharides (dextranes). Il existe aujourd'hui deux classes de tels produits : les SPIO (« small superparamagnetic iron oxide ») dont le diamètre des particules composites est de l'ordre de 150 nm et les USPIO (« ultra small... ») avec un diamètre inférieur à 50 nm. En jouant sur la taille des particules et sur la composition du polymère de surface (revêtements de poly(oxyde d'éthylène) (PEO) ou de carboxydextrane), on peut agir sur le temps de séjour plasmatique de ces agents de contraste et surtout sur leur biodistribution. Le transport par les macrophages permet en particulier de traverser certaines barrières comme la barrière hémato-méningée et de visualiser les zones où ils s'accumulent. Des clichés de visualisation du tractus intestinal, de nodules lymphatiques et de lésions au foie et au cerveau ont ainsi été présentés par le conférencier.

Selon une estimation de l'Organisation Mondiale de la Santé rapportée par **M.-J. Alonso**, sur les 1,2 milliards d'injections réalisées chaque année dans le monde à des fins vaccinales, 30 % seraient effectuées en ne respectant pas les conditions de sécurité nécessaires, ce qui entraîne de gros risques pour les populations concernées : hépatites B et C, sida... Le développement de formulations administrables sans seringue constitue donc un objectif prioritaire. Des résultats très encourageants ont été présentés avec des formulations de vaccins « transmucosaux », administrables par voie orale ou nasale, dans lesquels le principe actif (protéine ou fragment d'ADN) est encapsulé dans des nanoparticules biodégradables submicroniques à base de copolymères à blocs polylactides-poly(oxyde d'éthylène) (PLA-PEO) ou de chitosane. Cette association permet un bien meilleur franchissement des barrières mucosales et déclenche une réponse immunitaire beaucoup plus forte, sans doute en raison d'une présentation plus pertinente de l'antigène.

L'utilisation de nanoparticules biodégradables apparaît aujourd'hui comme une stratégie bien adaptée à la vectorisation des nouveaux principes actifs de la pharmacie. On trouve parmi ceux-ci une forte proportion de molécules de grande taille (peptides, protéines, ADN) qui ne traversent pas naturellement les barrières membranaires (exposé de **C. Lehr**) et qui doivent être protégées et véhiculées jusqu'à leur cible. De plus, il est souhaitable de vectoriser certains principes actifs « difficiles » pour limiter les effets secondaires (anticancéreux par exemple). **C. Vauthier** a présenté un nombre impressionnant de techniques qui permettent, à partir de polymères synthétiques et naturels, de préparer des (nano)particules ou des (nano)capsules de tailles et de morphologies diverses, en particulier à partir de poly(alkylcyanoacrylates) biodégradables (*figure 2*).

Où en est le développement des nanoparticules ? Quelques défis majeurs

Les nanoparticules polymères sont effectivement utilisées aujourd'hui dans le diagnostic et l'imagerie, et il semble bien que des possibilités de développement existent encore dans ces domaines et en particulier dans les technologies associées à la biologie moléculaire.

Un frein au développement est peut-être constitué par la très grande diversité des supports disponibles et des méthodes de couplage décrites dans la littérature. Cette situation est parfois déconcertante pour un nouveau venu dans le domaine ; en fait elle traduit bien un manque de connaissance profonde des interactions en situation réelle des biomolécules avec ces supports. Comme l'a souligné **S. Slomkowski** dans son exposé d'introduction, il y a encore beaucoup de progrès à espérer pour prévoir le comportement spécifique des biomolécules fixées sur ces supports de fort rayon de courbure et les effets compétitifs entre des partenaires multiples. Les nouvelles méthodes de caractérisation par des techniques de fluorescence, de chromatographie sous champ (FFF) et surtout de microscopie (confocale ou en champ proche), devraient constituer des outils de choix pour une meilleure compréhension des phénomènes.

Beaucoup de ces espoirs de développement reposent sur les nanoparticules à comportement superparamagnétique qui posent cependant encore quelques problèmes :

- La présence de traces de fer en surface des particules ou dans le sérum inhibe certaines enzymes, en particulier celles qui interviennent dans les réactions d'amplification par PCR.
- La densité des oxydes est limitative au niveau des compromis réalisés entre la stabilité colloïdale et la vitesse de sédimentation sous champ des nanoparticules.
- Les oxydes de fer sont fortement colorés et peuvent interférer avec d'autres pigments intéressants pour le marquage des particules (colorants, agents fluorescents...).

Il y aurait très certainement un gros intérêt pour une nouvelle génération de matériaux superparamagnétiques qui présenteraient d'autres caractéristiques que les grains de magnétites utilisés actuellement.

Il est important de remarquer qu'en dehors du diagnostic et de l'imagerie, les autres applications mentionnées (vaccins et « drug delivery ») ne sont aujourd'hui que potentielles ! Bien que de nombreux essais cliniques aient été lancés, aucune formulation à base de nanoparticules n'a été commercialisée à ce jour. Il est pourtant clair que ce sont ces applications qui représentent les enjeux les plus importants pour le futur.

Les freins actuels semblent bien identifiés :
- réticence des sociétés pharmaceutiques à engager des essais cliniques longs et très coûteux avec de nouveaux additifs de formulation ;
- manque de connaissance sur les mécanismes de passage des barrières et d'outils de prédiction fiables.

Au niveau des polymères, les mieux placés paraissent aujourd'hui, naturellement, ceux sur lesquels on dispose de plus de données, en particulier au niveau de leur biodégradabilité et de leur toxicité : les poly(alkylcyanoacrylates) (PACA) et les copolymères à base de polylactides (PLA).

Comme l'a montré **C. Vauthier**, les PACA se dégradent selon un mécanisme de bioérosion de surface induite par l'hydrolyse enzymatique des liaisons ester entre les groupements alkyles latéraux et la chaîne hydrocarbonée principale. Si la masse molaire a été convenablement choisie, l'acide polycyanoacrylique résultant est éliminé par voie rénale. La réaction de dégradation pouvant donner lieu à libération de formaldéhyde toxique est très lente et négligeable par rapport à la précédente, à la température corporelle. On dispose de résultats de nombreux essais cliniques qui confirment la non-toxicité de ces polymères.

La dégradation des copolymères de PLA dépend entre autres paramètres de la taille des objets qui en sont constitués. Elle est assez bien connue quand il s'agit de fils de suture, de films ou dans le cas d'objets de plus grandes dimensions (plaques), mais **J. Coudane** a montré que les nanoparticules ont un comportement bien particulier qui fait intervenir des mécanismes différents et que le contrôle de leur dégradation reste encore une affaire délicate, surtout lorsqu'il s'agit de copolymères à blocs. Les différentes techniques proposées pour prévoir les passages des membranes (membranes artificielles à base de cultures de cellules) apparaissent très lourdes et ne donnent pas de résultats suffisamment reproductibles. Elles sont encore loin de remplacer les essais sur animal, bien que ceux-ci soient loin d'être prédictifs pour ce qui concerne l'Homme. Le cas du passage de la membrane nucléaire (en thérapie génique) a été souvent évoqué comme un exemple révélateur.

Quelles solutions alternatives aux nanoparticules polymères ?

Il faut être conscient que les nanoparticules ne sont pas forcément la solution la mieux adaptée pour les diverses applications citées ci-dessus. Les nanoparticules d'or métallique sont de plus en plus considérées pour les applications diagnostiques, en raison des nouvelles perspectives qu'elles apportent en matière de détection (coloration, résonance du plasmon, conductivité électrique). Des particules de silice, éventuellement magnétiques, peuvent constituer une autre classe de nanoparticules d'intérêt non seulement pour le diagnostic, mais bien que réputées non biodégradables, pour la vectorisation de principes actifs. Les performances en thérapie génique de vecteurs non viraux constitués par des nanoparticules cationiques de silice, présentées par **C. Lehr**, sont assez étonnantes.

Mais c'est certainement les polymères dendritiques qui constituent l'alternative aux nanoparticules « conventionnelles ». Ces objets, souvent biodégradables en produits non toxiques et dont la taille peut être ajustée en fonction du nombre de générations entre 2 et 20 nm, ont en effet des caractéristiques extrêmement attractives en termes de morphologie, de souplesse et de fonctionnalité de surface. **J.-P. Majoral** a illustré toute la richesse de leur chimie et de leur physico-chimie au travers des dendrimères phosphorés que développe son laboratoire (*figure 3*). Des applications existent déjà en imagerie médicale avec des produits commerciaux à base de gadolinium. Mais la recherche est très active pour développer ces produits en thérapie génique (associations de gènes à des dendrimères cationiques), et des résultats très prometteurs ont été enregistrés pour l'inactivation du prion. Enfin, en Australie, suite à des

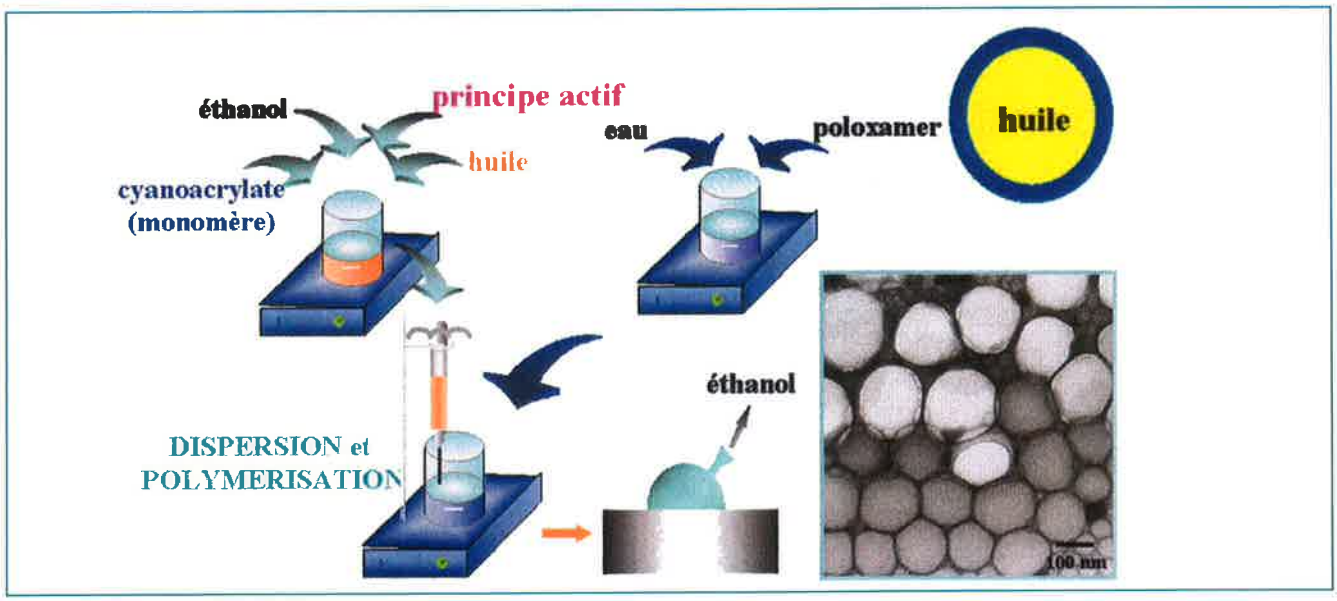

Figure 2.

résultats très prometteurs chez l'animal, la société Starpharma a démarré des essais cliniques sur l'Homme avec des gels (Vivagel®) contenant des dendrimères pour la protection contre le virus HIV.

C'est peut-être en termes de complémentarité qu'il conviendrait de s'intéresser à ces produits. Peu de choses, semble-t-il, ont été publiées sur leur association avec des nanoparticules ; n'est-ce pas pourtant là une stratégie à considérer ?

Il convient de mentionner que l'apport des tensioactifs macromoléculaires a été peu évoqué dans cet atelier. Ces molécules, et plus particulièrement les copolymères amphiphiles à blocs, sont pourtant de plus en plus considérées avec intérêt pour modifier les surfaces des nanoparticules, mais aussi pour élaborer des édifices micellaires dont la structure et les dimensions (quelques dizaines de nanomètres seulement) en font des candidats sérieux pour le passage membranaire et pour augmenter leur durée de circulation dans la circulation sanguine (nanoparticules « furtives »).

Réflexion sur la situation en France : quelle suite donner à ces journées ?

La participation et les contributions d'équipes françaises à ces journées témoignent de l'existence d'une communauté active dans ce domaine, bien que quelque peu dispersée. Une autre constatation a également été faite : cette manifestation initiée par des polymeristes a surtout attiré des... polymeristes ! Toutefois, cette remarque doit être tempérée par le fait que plusieurs congrès intéressant le public potentiel se tenaient dans la même période.

Pour poursuivre et approfondir la réflexion sur les divers sujets abordés, il est nécessaire d'encourager une approche fortement pluridisciplinaire dans laquelle le biologiste doit avoir un rôle moteur, le chimiste apportant son inventivité en tenant bien compte de la richesse et des contraintes de la physico-chimie en milieu vivant. La présence de plus de biologistes et surtout de pharmaciens et de médecins semble indispensable pour bâtir avec eux des programmes de recherche pertinents, bien orientés sur leurs préoccupations.

Dans ce contexte, la discussion a conduit à proposer la constitution d'un « club Nanomatériaux et sciences du vivant » permettant à ses membres de se retrouver pour des journées d'échange centrées sur quelques thèmes porteurs d'enjeux, tout en intégrant mieux les biologistes, les pharmaciens et les médecins. De telles journées pourraient s'appuyer sur le réseau très pluridisciplinaire du GTRV (Groupe de travail et de recherche sur les vecteurs), initié en France il y a quelques années et qui fonctionne maintenant à une échelle internationale [3].

Ces échanges devraient logiquement déboucher sur la mise en place de structures de travail, de type GDR, que le CNRS serait prêt à soutenir, pour rassembler des compétences appartenant à des disciplines différentes (le GDR constitué il y a quelques années sur la vectorisation d'oligonucléotides paraît un bon modèle de fonctionnement).

Christine Vauthier (CNRS UMR 8612, Faculté de pharmacie Paris-Sud), Thierry Delair (unité mixte bioMérieux, Lyon) et Thierry Hamaide (LCPP-ESCPE Lyon) se sont proposés pour animer ce club et mettre sur pied les journées « thématiques ».

Christian Pichot (CNRS-bioMérieux),
Denis Labarre (Université Paris-Sud)
et Jean-Claude Daniel (GFP-V2P)

[1] Sociétés bioMérieux, Guerbet, Malvern, GFP section Ile-de-France, GFP national.
[2] Voir également Delair T., Elaissari A., Perrin A., Mandrand B., Les polymères de synthèse, supports du diagnostic médical, *L'Act. Chim.*, nov.-déc. **2003**, p. 79.
[3] http://www.gtrv.org/

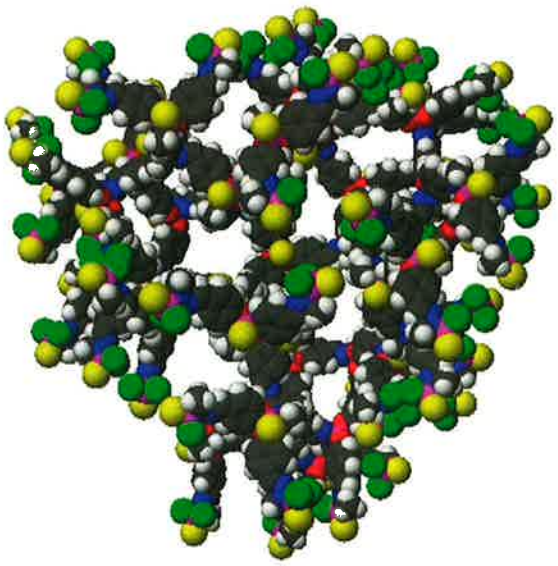

Figure 3 - Code de couleur utilisé pour les atomes : azote (bleu), carbone (noir), chlore (vert), hydrogène (blanc), oxygène (rouge), phosphore (violet), soufre (jaune).