

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté de pharmacie
Université de Montréal
Grade octroyé le:

5-02-2009

Évaluation de la toxicité de nanoémulsions de tributyrine et de docétaxel

par

Marie-Ève Perron

Sciences pharmaceutiques

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître en sciences (M.Sc.)

Sciences pharmaceutiques

Option technologie pharmaceutique

Novembre 2008

© Marie-Ève Perron, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Évaluation de la toxicité de nanoémulsions de tributyrine et de docétaxel

présenté par :

Marie-Ève Perron

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Sylvie Marleau, président-rapporteur

Dr. Jean-Christophe Leroux, directeur de recherche

Dr. Michael Harvey, membre du jury

Résumé

La chimiothérapie fait actuellement face à de nombreux obstacles dont l'utilisation de nouvelles molécules cytotoxiques peu hydrosolubles. Le docétaxel (DTX) fait partie de ces molécules. Il est présentement disponible sur le marché, solubilisé dans du polysorbate 80, sous le nom de Taxotere[®] (TXT). Toutefois, les effets secondaires dus au manque de spécificité de la formulation limitent la dose de DTX tolérée. Dans ce travail, des nanoémulsions de DTX et de tributyrine (TB) ont été préparées dans le but de reformuler le DTX et de cibler les tumeurs. La TB est utilisée pour sa capacité à solubiliser le DTX ainsi que pour ses propriétés anti-tumorales intrinsèques. En effet, la TB est un analogue de l'acide butyrique, un inhibiteur des histones désacétylases. Dans le cadre de ce projet, l'interaction entre la TB et le DTX a été étudiée sur plusieurs souches de cellules cancéreuses. Ensuite, la toxicité de nanoémulsions combinant ces deux molécules a été testée *in vitro* et *in vivo*. La TB seule ou combinée au DTX, formulée sous forme de nanoémulsion ou non, n'a démontré qu'une faible activité cytotoxique. Aucune synergie n'a été observée entre le DTX et la TB. De plus, des expériences de détection d'apoptose sur des cellules HL-60 et PC-3 n'ont pas permis de conclure à l'induction de l'apoptose par la TB. Finalement, la forte toxicité observée sur les souris ayant reçu les nanoémulsions par voie intraveineuse semble indiquer que la TB ne constitue pas un excipient de choix pour la formulation de DTX.

Mots-clés : docétaxel, tributyrine, chimiothérapie, nanoémulsions, vecteurs de médicaments

Abstract

The use of chemotherapy as an efficient cancer treatment is hindered by many obstacles. A major issue is the poor solubility of many anticancer drugs, like docetaxel (DTX). DTX is presently solubilized in polysorbate 80 and available on the market under the name of Taxotere[®] (TXT). However, side-effects due to the non specificity of the formulation limit the tolerated DTX dose. Consequently, in this work, nanoemulsions of DTX and tributyrin (TB) were prepared in order to reformulate DTX in a way that would allow the targeting of the tumors. TB was chosen for its capacity to solubilize DTX and for its intrinsic anticancer properties. TB is indeed an analogue of butyric acid, which is an inhibitor of histone deacetylases. In this project, the interaction between TB and DTX has been investigated on several cancer cell lines. The toxicity of nanoemulsions combining the drugs was studied *in vitro* and *in vivo*. Under our experimental conditions, TB showed a poor cytotoxic activity, whether administered alone, with DTX, within nanoemulsions or in aqueous form. No synergistic interaction between the two agents was discovered. Moreover, the apoptosis detection tests conducted on HL-60 and PC-3 cells showed no induction of apoptosis by TB. Finally, the toxicity of the nanoemulsion combining DTX and TB observed in mice currently indicates that TB may not be an appropriate excipient for intravenous administration of DTX.

Keywords: docetaxel, tributyrin, chemotherapy, nanoemulsions, drug carriers

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xi
CHAPITRE 1 : CHIMIOTHÉRAPIE.....	1
1.1. Le cancer.....	2
1.2. Les différentes classes d'agents anticancéreux.....	3
1.3. La chimiorésistance.....	6
Références.....	9
CHAPITRE 2 : LES TAXANES ET LES INHIBITEURS DES HISTONES DÉSACÉTYLASES.....	10
2.1. Les taxanes.....	11
2.2. Les inhibiteurs des histones désacétylases (IHDAC).....	16
Références.....	23
CHAPITRE 3 : LA VECTORISATION.....	27
3.1. La vectorisation.....	28
3.2. Le ciblage passif : l'effet EPR (« <i>enhanced permeability and retention</i> »)	29
3.3. Les caractéristiques des vecteurs aux temps de circulation prolongés...30	
3.4. Le ciblage actif.....	31
3.5. Les différents types de nanovecteurs.....	36
Références.....	47
CHAPITRE 4 : PRÉSENTATION DE L'ARTICLE.....	52
Abstract.....	53
Introduction.....	54
1. Materials and Methods.....	56
2. Results.....	62
3. Discussion.....	72
References.....	76
CHAPITRE 5 : DISCUSSION.....	80
Références.....	89
CHAPITRE 6 : CONCLUSION.....	91

Liste des tableaux

Tableau 3-1: Exemples de ligands utilisés dans la vectorisation de médicaments anticancéreux.....	32
Table 4-1: Composition and size of NEs used in the cell assays.....	56
Table 4-2: Composition and size of formulations injected in the <i>in vivo</i> toxicity study	56
Table 4-3: IC ₅₀ values of DTX (nM) administered alone or combined with TB. Mean (± SD) of 3 independent experiments.	64
Tableau 5-1: Toxicité des nanoémulsions administrées <i>in vivo</i>	87

Liste des figures

Figure 2.1: Structure chimique du paclitaxel	12
Figure 2.2: Structure chimique du DTX	12
Figure 2.3: Schéma de l'action de la tributyrine et du docétaxel sur la protéine du rétinoblastome (pRb). Lorsque non phosphorylée, la pRb peut recruter HDAC1, lier E2F et inhiber le passage de la cellule de la phase G1 à la phase S1. En phosphorylant pRb, les CDKs empêchent celle-ci de bloquer le cycle cellulaire. Le DTX et la TB induisent l'expression de protéines inhibitrices des CDKs, ce qui favorise la forme non phosphorylée de la pRb et provoque donc l'arrêt de la cellule dans la phase G1.....	14
Figure 2.4: Schéma de l'action de la P-gp, qui expulse hors de la cellule les molécules de principe actif (PA) par un mécanisme dépendant de l'ATP.....	15
Figure 2.5: Structure chimique de l'acide butyrique (A) et de la tributyrine (B).....	17
Figure 2.6: Schéma d'un nucléosome. Un nucléosome est constitué de deux superhélices d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones, elles-mêmes arrangées en un tétramère H3-H4 et deux dimères H2A-H2B. H1 est une autre histone qui s'associe à l'ADN sans contact direct avec l'octamère d'histones.	19
Figure 2.7: Schéma représentant le rôle des HATs et des HDACs dans l'acétylation, qui a elle un impact sur la forme, favorable à la transcription ou non, de la chromatine.	20
Figure 3.1: Schéma de l'effet EPR. Grâce à leurs fenestrations, les capillaires tumoraux permettent la diffusion de plus grosses particules que les capillaires normaux. Les particules qui traversent la barrière endothéliale sont alors retenues dans le tissu tumoral dû à un drainage lymphatique déficient.	30

Figure 3.2: Schéma de l'internalisation d'un vecteur. Un vecteur (ici un liposome) peut être internalisé par macropinocytose (1) ou par interaction électrostatique (2). L'internalisation par endocytose (3) est favorisée par la présence de ligands reconnus par des récepteurs membranaires. Le principe actif peut soit diffuser de l'endosome (4), soit en sortir seul (5) ou lié au vecteur (6) par des pores créés par des peptides liés au vecteur ou suite à une endosomolyse. Si le vecteur entier se retrouve dans le cytoplasme, un ligand reconnu par une cible subcellulaire (ici un récepteur de la membrane nucléaire) peut permettre de diriger plus précisément le vecteur (7). Finalement, celui-ci peut également entrer dans le cytoplasme au niveau du compartiment lysosomal (8).34

Figure 3.3: Schéma d'un liposome. Le principe actif (PA) peut être incorporé dans le cœur du liposome ou dans sa membrane, selon s'il est hydrophile ou hydrophobe.38

Figure 3.4: Schéma d'une micelle polymère en milieu aqueux. Le principe actif (PA) peut être incorporé dans le cœur ou la couronne de la micelle selon sa nature hydrophobe ou hydrophile, respectivement.40

Figure 4.1: Cell viability of HL-60 cells (the most TB-responsive cell line) as a function of DTX concentration. Cells were exposed to DTX and TB (0.01, 0.1, and 0.3 mM) or to DTX alone. A typical cell toxicity profile is represented here.....65

Figure 4.2: HL-60 cell viability as a function of DTX concentration and incubation sequence. Cells were exposed 48 h to DTX followed by 24 h to TB (0.2 mM) or culture medium; or exposed 24 h to TB (0.2 mM) or culture medium, followed by 48 h to DTX. The resulting DTX IC₅₀ values were 0.25 ± 0.04, 0.38 ± 0.10, 2.5 ± 0.5 and 3.3 ± 0.7 nM, respectively. Mean ± SD (n=3).66

Figure 4.3: HL-60 cell viability as a function of NE-control or NE/TB concentration expressed as Solutol HS15 concentration. The maximum TB concentration in the culture medium was 0.35 mM. Cells were incubated with the emulsions for 72 h. Mean ± SD (n=3).67

Figure 4.4: Apoptosis assays on HL-60 (A) and PC-3 (B) cells. Percentage of non-fluorescent cells (normal) or in early apoptosis stage (EA) after 48 or 72 h of exposition to culture medium (control), TB-free emulsion (NE-control), 0.6 mM unformulated TB (TB) or 0.6 mM TB incorporated into the emulsion (NE/TB). In the NE-control and NE/TB (see Table 4-1 for composition) the emulsion concentration was 0.58 mM (0.56 mg/mL) expressed as Solutol HS15 concentration. *p < 0.05 vs. control. Mean \pm SD (n=4).69

Figure 4.5: Body weight variations of mice that received the indicated formulations on days 0, 3 and 6. Formulation characteristics are given in Table 4-2. Toxicity threshold was defined as a weight loss > 15%. Mean \pm SD (n=10).71

Figure 5.1: Viabilité cellulaire des cellules HL-60 en fonction de la concentration en DTX. Les cellules étaient exposées à du DTX plus de la TB (0,01 ; 0,1 et 0,3 mM) ou à du DTX seul.....82

Figure 5.2 : Exemple de la distribution de taille d'une NE/TB. Les trois courbes superposées représentent trois mesures de la même nanoémulsion. Diamètre moyen : 111 nm. Indice de polydispersité moyen : 0,108.....84

Liste des abréviations

ann.V	annexin V-FITC
apo	apolipoprotéine
CDK	kinase cycline-dépendante
CMC	concentration micellaire critique
DTX	docétaxel
E/H	eau dans l'huile
E/H/E	eau dans l'huile dans l'eau
EPR	« <i>enhanced permeability and retention</i> »
FDA	« <i>US Food and Drug Administration</i> »
HAT	histone acétyltransférase
HCPT	hydroxycamptothécine
HDAC	histone désacétylase
H/E	huile dans l'eau
IHDAC	inhibiteur d'histone désacétylase
i.p.	intrapéritonéal
i.v.	intraveineux ou intraveineuse
LDL	lipoprotéine de faible densité
MDR	« <i>multidrug resistance</i> »
MPS	système des phagocytes mononucléés
PEG	poly(éthylène glycol)
pRb	protéine du rétinoblastome
P-gp	glycoprotéine P
PLA	poly(acide lactique)
POMP	méthotrexate, vincristine, 6-mercaptopurine, prednisone
TB	tributyryne
TXT	Taxotere [®]

Remerciements

Je voudrais tout d'abord vous remercier, Jean-Christophe, pour votre direction efficace. Un énorme merci à toi, François, pour ton amitié et ton travail méticuleux ; les deux me furent précieux. Nicolas, mon ami, merci d'avoir égayé et ensoleillé mes journées au laboratoire. Anda, since I'm not sure if it's english week or not: merci et thank you. Tantôt amie, chimiste et professeure d'anglais, tu as contribué à ce que je persévère dans les moments difficiles et je t'en suis grandement reconnaissante. Finalement, une pensée spéciale pour toi, Julie, pour l'ultime élan que ton amour a donné à la rédaction de ce mémoire.

CHAPITRE 1 : CHIMIOTHÉRAPIE

1.1. Le cancer

Le cancer est la deuxième cause de mortalité dans les pays industrialisés [1]. C'est une maladie difficile à combattre, car elle est provoquée par une prolifération de cellules dérégées qui possèdent presque toutes les caractéristiques des cellules normales. La recherche sur le traitement du cancer a connu des débuts modestes, mais est aujourd'hui devenue une immense industrie dû à l'importance de la maladie. Les traitements de chimiothérapie (la chimiothérapie consiste par définition en l'administration d'agents chimiques, mais notons que tout au long de ce mémoire, le terme chimiothérapie fera référence à la chimiothérapie du cancer spécifiquement) ont très tôt dévoilé leur faiblesse; le manque de spécificité. En effet, pour l'instant, les modes d'action des traitements conventionnels rendent ces derniers actifs sur les cellules en division, qu'elles soient cancéreuses ou non. Ceci est à l'origine des effets secondaires les plus communs causés par la chimiothérapie, comme l'alopécie et les nausées. En effet, ils sont dus à l'atteinte des épithéliums, des tissus très sensibles aux traitements de chimiothérapie étant donné leur haut taux de renouvellement. Cette stratégie si imparfaite qui consiste à viser les cellules en division s'explique par l'absence de différences marquantes identifiées entre les cellules cancéreuses et les cellules saines. En effet, les cellules néoplasiques sont des cellules normales qui, suite à un dérèglement, cessent d'exercer leur rôle et prolifèrent de façon rapide et incontrôlée. Normalement, de telles cellules sont reconnues par le système immunitaire et éliminées ou elles enclenchent en elles-mêmes le processus d'apoptose, c'est-à-dire la mort cellulaire programmée des cellules dégénérantes. Il arrive toutefois que des cellules présentent globalement les mêmes molécules de surface que les cellules normales malgré leur fonctionnement altéré et que les voies métaboliques menant à l'apoptose soient bloquées. Elles se soustraient donc à

l'action du système immunitaire et se multiplient. Pour cibler ces cellules, les différences d'expression de certaines protéines, généralement dues à leur fort taux de division, sont utilisées. Ceci ne permet toutefois pas d'épargner complètement les tissus sains. De nombreux efforts de recherche visent actuellement à identifier des caractéristiques propres à ces tissus cancéreux afin de développer des moyens de ciblage plus sélectifs.

La recherche se concentre aussi sur l'identification des mécanismes moléculaires impliqués dans l'apparition et la progression des tumeurs. Ces connaissances semblent primordiales dans la mise au point de traitements véritablement spécifiques et permettent de développer de nouveaux agents comme le mésylate d'imatinib (Glivec®), par exemple. Ce médicament est un inhibiteur synthétique des tyrosine kinases qui s'est montré efficace pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique et des tumeurs stromales gastro-intestinales [2, 3]. Il se lie à des tyrosine kinases spécifiques dont l'activité est dérégulée dans certains types de cancers. En inhibant l'action de ces tyrosine kinases, le Glivec® bloque des cascades de signalisation intracellulaire, ce qui mène au rétablissement de l'apoptose ainsi qu'au blocage de la prolifération et de la différenciation cellulaire [4]. Ce traitement novateur contraste avec la chimiothérapie classique dont les principaux agents seront décrits dans les prochains paragraphes.

1.2. Les différentes classes d'agents anticancéreux

Bien que le principe sous-jacent à la chimiothérapie pour le traitement du cancer soit le même pour la plupart des molécules utilisées en clinique, soit l'atteinte des cellules en division, les différentes classes d'agents anticancéreux possèdent des

modèles d'actions variables. Un résumé des mécanismes d'action des principales classes est présenté ici, selon leur ordre d'apparition dans l'histoire de l'oncologie.

Les premières molécules utilisées furent les agents alkylants et les analogues de l'acide folique, dans les années 1940 [5]. Les agents alkylants (cyclophosphamide, chlorambucil, lomustine) provoquent des coupures sur l'ADN simple brin et créent des liens entre les brins d'ADN en substituant un atome d'hydrogène de la molécule d'ADN (habituellement d'une guanine) par un groupe alkyle [6]. Les analogues de l'acide folique, comme l'aminoptérine et le méthotrexate, font partie des antimétabolites. Ces derniers, qui comprennent également des analogues des purines et des pyrimidines, interfèrent avec la synthèse des acides nucléiques soit en se substituant aux métabolites normaux, soit en bloquant l'activité des enzymes les utilisant [6]. La cytosine arabinoside, qui inhibe de façon compétitive l'ADN polymérase, est un exemple classique de cette classe d'agent [6]. Plus tard, dans les années 50, des vinca-alcaloïdes telles que la vincristine et la vinblastine, découverts lors de recherches sur le diabète, furent utilisés dans le traitement du cancer [5]. Ces molécules agissent en se liant aux microtubules, inhibant ainsi leur polymérisation et donc la division cellulaire.

Déjà, à cette époque, la chimiothérapie naissante faisait face au problème de la chimiorésistance, dont il sera question plus loin dans ce chapitre. Dans le milieu des années 1960, dans une tentative pour contrer le problème, le milieu médical utilisa avec un certain succès une combinaison de quatre agents, le régime « POMP » (méthotrexate, vincristine, 6-mercaptopurine et prednisone), pour induire une longue rémission chez les enfants souffrant de leucémie aiguë lymphoblastique [5]. Au même moment, une première taxane, soit le paclitaxel, fut découverte. Celle-ci, tout

comme le docétaxel (DTX) qui est également une taxane, inhibe la dépolymérisation des microtubules. Le mécanisme d'action du DTX, l'un des deux agents utilisés dans notre projet de recherche, sera présenté plus en détail au chapitre 2. Les camptothécines, dont l'irinotécane et le topotécane sont issus, furent également découverts vers la même période. Ces derniers sont des alcaloïdes dérivés de l'arbre chinois *camptotheca accuminata* qui inhibent la topo-isomérase I, une enzyme qui déroule l'ADN [5]. Vint également la découverte des antibiotiques antitumoraux tels la doxorubicine, la mitoxantrone et les épipodophyllotoxines (dont l'étoposide). Ces agents inhibent l'action de la topo-isomérase II, une enzyme cruciale pour la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN [5].

Divers autres agents sont également utilisés en clinique, parmi lesquels des métaux lourds (cisplatine, carboplatine) qui se lient à l'ADN et causent des liaisons inter et intra-brins ainsi que les corticostéroïdes, inclus dans plusieurs protocoles de chimiothérapie [6]. Ces derniers agissent sur des récepteurs nucléaires spécifiques pour briser l'ADN de certaines cellules cancéreuses [7].

Les inhibiteurs des histones désacétylases (IHDACs), dont l'acide butyrique et la tributyrine (TB), constituent une autre classe d'anticancéreux actuellement en développement. Les histones désacétylases (HDACs) agissent sur les histones, des protéines qui condensent l'ADN et qui sont sujettes à l'acétylation, à la méthylation et à la phosphorylation, trois phénomènes qui jouent un rôle important dans la régulation de l'expression génique [8]. Ces changements, indépendants de la séquence d'ADN, sont dits épigénétiques et sont transmissibles aux cellules filles [8]. Le dérèglement de ces transformations a été associé au développement de cancers, et

ainsi, la régulation de ces modifications épigénétiques est devenue une stratégie étudiée en oncologie [9, 10]. Tout comme ceux du DTX, les mécanismes d'action des IHDACs seront détaillés dans le prochain chapitre.

Une dernière catégorie de traitement est apparue dans les années 1990 : les thérapeutiques ciblées. Contrairement à la chimiothérapie classique qui inhibe la prolifération cellulaire ou tue les cellules, les thérapeutiques ciblées visent des molécules cellulaires impliquées dans l'oncogénèse. Elles ciblent, par exemple, des protéines à l'origine du cancer plutôt que des protéines qui en résultent. Le mésylate d'imatinib (Glivec[®]), mentionné plus tôt, et le trastuzumab (Herceptin[®]), qui lui cible le récepteur HER2, en sont des exemples. La vectorisation, qui n'est pas une catégorie de traitement mais plutôt une stratégie de ciblage utilisant des agents de chimiothérapie classique ou de thérapeutiques ciblées, est un autre concept important dans le traitement du cancer et il sera le sujet du troisième chapitre.

Avant de passer aux mécanismes d'action du DTX et de la TB, la dernière section de ce chapitre abordera le concept de la chimiorésistance, un obstacle majeur au succès des traitements anticancéreux en général, y compris celui utilisant le DTX.

1.3. La chimiorésistance

Dès le début de la chimiothérapie, le phénomène de la chimiorésistance, c'est-à-dire la résistance intrinsèque ou acquise d'une tumeur au traitement, est apparu. La chimiorésistance peut impliquer plusieurs facteurs comme l'inactivation du médicament, l'inactivation des mécanismes d'apoptose, l'augmentation de l'expression des pompes à efflux qui rejettent le médicament, l'augmentation de la

capacité cellulaire à réparer l'ADN et les mutations des cibles moléculaires du médicament [11]. Les mutations, fréquentes au sein des tumeurs, conduisent à l'apparition de sous-populations de cellules ayant des caractéristiques biologiques différentes qui peuvent leur conférer la capacité de résister à un traitement [12]. Ainsi, alors qu'un traitement diminue initialement la taille d'une tumeur, la présence d'une seule sous-population de cellules résistantes (résistance intrinsèque) suffit, au fil du temps, à former une tumeur complètement insensible à l'agent administré. L'utilisation d'une combinaison de médicaments anticancéreux est ainsi avantageuse puisqu'il est moins probable qu'une cellule résiste simultanément à plusieurs agents. Les cocktails de médicaments peuvent aussi être utiles pour contrer la chimiorésistance acquise. Cette dernière est due à la grande capacité d'adaptation des cellules. En effet, les cellules possèdent des cascades de signalisation parallèles, de sorte que le blocage d'une voie est compensé par l'utilisation d'une autre, que la cellule favorisera, en augmentant l'expression des protéines nécessaires, par exemple. Ainsi, un traitement ne ciblant qu'une seule molécule cellulaire risque d'être inefficace parce que, bien que parvenant à atteindre sa cible, il ne parviendra pas à bloquer les voies de contournement de la cellule [12]. Par conséquent, une tumeur décelée à un stade de développement précoce (qui aura connu moins de mutations) et qui sera traitée à l'aide de plusieurs agents aux mécanismes d'action différents aura plus de chance d'être éradiquée qu'une tumeur diagnostiquée tardivement et combattue à l'aide d'un seul médicament.

Il est estimé que la chimiorésistance est responsable de 90% des échecs du traitement des cancers métastatiques [13]. Un cancer est dit métastatique lorsque les cellules composant la tumeur initiale se disséminent dans le reste et du corps et

forment d'autres tumeurs, dites métastases. Une des stratégies prometteuses à l'heure actuelle est la combinaison d'agents de classes différentes. C'est dans cette optique que l'association du docétaxel et de la tributyrine a été envisagée. Les mécanismes d'action de ces agents ainsi que la chimiorésistance provoquée par le traitement au DTX seront vus dans le prochain chapitre.

Références

1. Novotny L. and Szekeres T., *Cancer therapy: new targets for chemotherapy*. Hematology, 2003. **8**(3): p. 129-37.
2. De Mestier P. and Des Guetz G., *Treatment of gastrointestinal stromal tumors with imatinib mesylate: a major breakthrough in the understanding of tumor-specific molecular characteristics*. World Journal of Surgery, 2005. **29**(3): p. 357-61; discussion 362.
3. Moen M. D., McKeage K., Plosker G. L., and Siddiqui M. A., *Imatinib: a review of its use in chronic myeloid leukaemia*. Drugs, 2007. **67**(2): p. 299-320.
4. Steeghs N., Nortier J. W., and Gelderblom H., *Small molecule tyrosine kinase inhibitors in the treatment of solid tumors: an update of recent developments*. Annals of Surgical Oncology, 2007. **14**(2): p. 942-53.
5. Chabner B. A. and Roberts T. G., JR., *Timeline: Chemotherapy and the war on cancer*. Nature Reviews. Cancer, 2005. **5**(1): p. 65-72.
6. McKnight J. A., *Principles of chemotherapy*. Clinical Techniques in Small Animal Practice, 2003. **18**(2): p. 67-72.
7. Kristeleit R., Stimson L., Workman P., and Aherne W., *Histone modification enzymes: novel targets for cancer drugs*. Expert Opinion on Emerging Drugs, 2004. **9**(1): p. 135-54.
8. Bar-Sela G., Jacobs K. M., and Gius D., *Histone deacetylase inhibitor and demethylating agent chromatin compaction and the radiation response by cancer cells*. Cancer Journal, 2007. **13**(1): p. 65-9.
9. Yoo C. B. and Jones P. A., *Epigenetic therapy of cancer: past, present and future*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(1): p. 37-50.
10. Wilson T. R., Longley D. B., and Johnston P. G., *Chemoresistance in solid tumours*. Annals of Oncology, 2006. **17 Suppl 10**: p. x315-24.
11. Chen E. X. and Siu L. L., *Development of molecular targeted anticancer agents: successes, failures and future directions*. Current Pharmaceutical Design, 2005. **11**(2): p. 265-72.
12. Longley D. B. and Johnston P. G., *Molecular mechanisms of drug resistance*. Journal of Pathology, 2005. **205**(2): p. 275-92.

CHAPITRE 2 : LES TAXANES ET LES INHIBITEURS DES HISTONES DÉSACÉTYLASES

2.1. Les taxanes

2.1.1. Caractéristiques des taxanes

Le paclitaxel (Figure 2.1), obtenu de la racine de l'arbre *Taxus brevifolia*, est la première taxane à avoir été découverte. Elle fut approuvée par la « *US Food and Drug Administration* » (FDA) en 1992 sous une formulation commerciale appelée Taxol[®]. Le paclitaxel se présente sous la forme d'une poudre soluble dans l'éthanol, dans le méthanol, dans l'acétone et dans l'acétate d'éthyle, mais très peu soluble dans l'eau (0,3 µg/mL) [1]. Les excipients utilisés dans le Taxol[®] sont le surfactant Cremophor EL, l'acide citrique et l'éthanol.

Le DTX (Figure 2.2) est quant à lui la deuxième molécule de la classe des taxanes à avoir été découverte, en 1986. Elle est obtenue à partir des aiguilles de l'arbre *Taxus baccata* [2]. Le DTX est approuvé par la FDA pour le traitement des cancers du poumon non à petites cellules, du sein, de la prostate, de l'ovaire et de l'estomac [3]. Le DTX est légèrement plus soluble que le paclitaxel en solution aqueuse (5-6 µg/mL) [1]. Les surfactants contenus dans le Taxotere[®] (TXT), la formulation commerciale du DTX, sont le polysorbate 80 et l'éthanol.

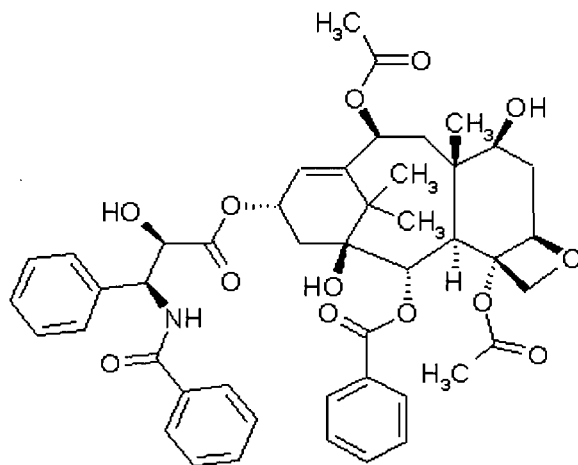


Figure 2.1: Structure chimique du paclitaxel

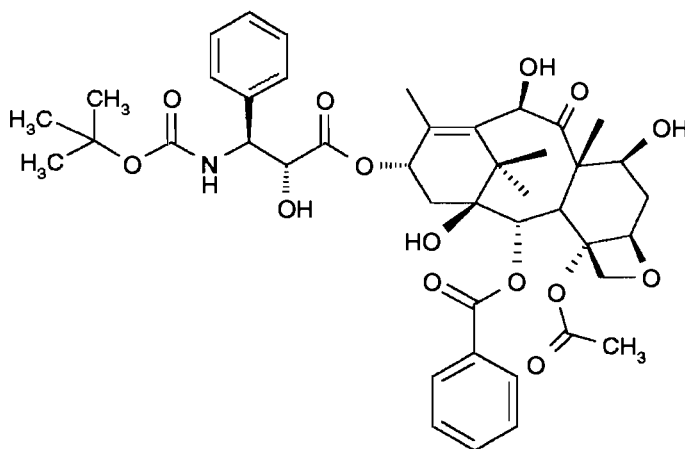


Figure 2.2: Structure chimique du DTX

2.1.2. Mode d'action du docétaxel

Le DTX agit à peu de choses près comme le paclitaxel. Il se lie préférentiellement et de façon réversible à la sous-unité *B* de la tubuline dans les microtubules [2]. Cette liaison brise l'équilibre dynamique entre la polymérisation et la dépolymérisation des microtubules. L'assemblage de ces derniers est favorisé par le DTX et la stabilisation du réseau microtubulaire qui en résulte provoque un arrêt

du cycle cellulaire, puisque la dépolymérisation est nécessaire à la mitose. En plus de leur rôle lors du processus mitotique, les microtubules participent à la motilité cellulaire et au transport des organelles. Par conséquent, l'action du DTX altère le fonctionnement général de la cellule et, ultimement, provoque la mort cellulaire [2, 4].

En plus de son action sur les microtubules, le DTX a démontré une capacité à inhiber l'angiogénèse et à promouvoir l'apoptose [4]. Cependant, l'effet anti-angiogénique de la taxane semble contrecarré par des facteurs de croissance comme le facteur de croissance vasculaire endothélial et doit donc être associé à des inhibiteurs de ces facteurs afin d'exercer son effet [5]. L'induction de l'apoptose par le DTX a quant à elle fait l'objet de plusieurs travaux. L'apoptose, également appelée le suicide cellulaire, est un processus essentiel qui conduit la cellule à s'autodétruire lorsque son fonctionnement est altéré. Cependant, ce processus fait fréquemment défaut dans de multiples types de cancer. La réactivation des voies apoptotiques peut permettre de cibler les cellules néoplasiques tout en épargnant les cellules saines au sein desquelles est maintenu un bon équilibre entre les différentes molécules régissant l'apoptose. Le DTX provoquerait l'apoptose par l'induction de la p53, une protéine suppressive de tumeur, et d'une protéine inhibitrice des kinases cycline-dépendantes (CDKs), la p21/waf1, bien qu'il ne soit pas clair si cette dernière est induite indirectement par l'augmentation de l'expression de la p53 [6] (Figure 2.3). L'augmentation de l'expression de la protéine p27 provoquée par le DTX a également été révélée comme étant impliquée dans l'apoptose [7]. Il faut cependant noter que la capacité du DTX à induire l'apoptose et les mécanismes impliqués dans cet événement varient selon les lignées cellulaires testées [7, 8].

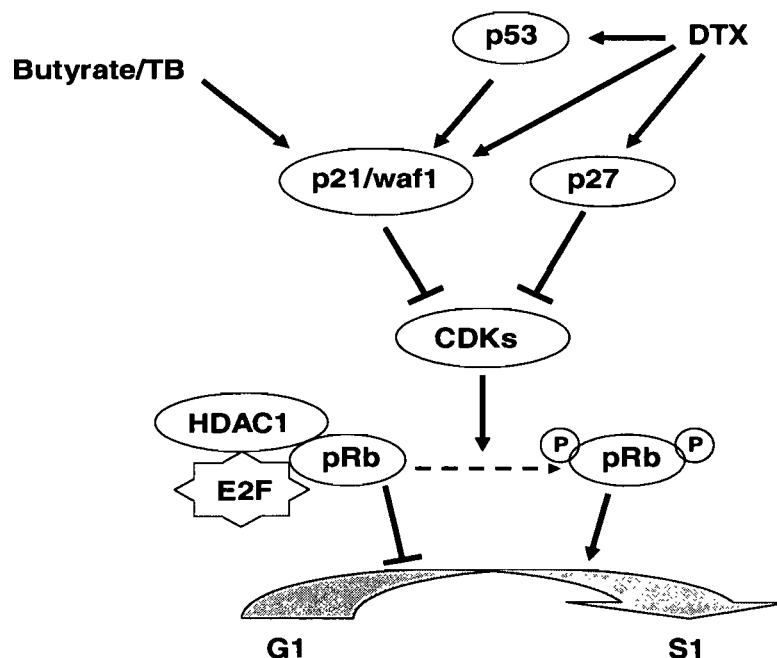


Figure 2.3: Schéma de l'action de la tributyrine et du docétaxel sur la protéine du rétinoblastome (pRb). Lorsque non phosphorylée, la pRb peut recruter HDAC1, lier E2F et inhiber le passage de la cellule de la phase G1 à la phase S1. En phosphorylant pRb, les CDKs empêchent celle-ci de bloquer le cycle cellulaire. Le DTX et la TB induisent l'expression de protéines inhibitrices des CDKs, ce qui favorise la forme non phosphorylée de la pRb et provoque donc l'arrêt de la cellule dans la phase G1.

2.1.3. Les effets indésirables du DTX : le développement de la résistance pléiotropique

Tel que mentionné plus tôt, l'efficacité du DTX est limitée par ses effets toxiques sur les tissus sains. Ses principaux effets secondaires sont la toxicité hématologique et la neuropathie [9, 10]. Le TXT cause également des réactions d'hypersensibilité qui ont été attribuées au polysorbate 80, le surfactant non ionique avec lequel est solubilisé le DTX [10]. Un autre problème rencontré avec le DTX est

le développement, par les cellules exposées, de la résistance pléiotropique (« *multidrug resistance* » (MDR)) [11]. Ce phénomène est associé à des protéines transmembranaires transporteuses de médicament et principalement à la glycoprotéine P (P-gp) qui agit comme une pompe et expulse les médicaments hors de la cellule [12]. La P-gp fonctionne par un mécanisme dépendant de l'ATP et peut donc agir contre un gradient de concentration pour diminuer la concentration cellulaire d'un médicament à des niveaux sous-thérapeutiques [11, 12] (Figure 2.4).

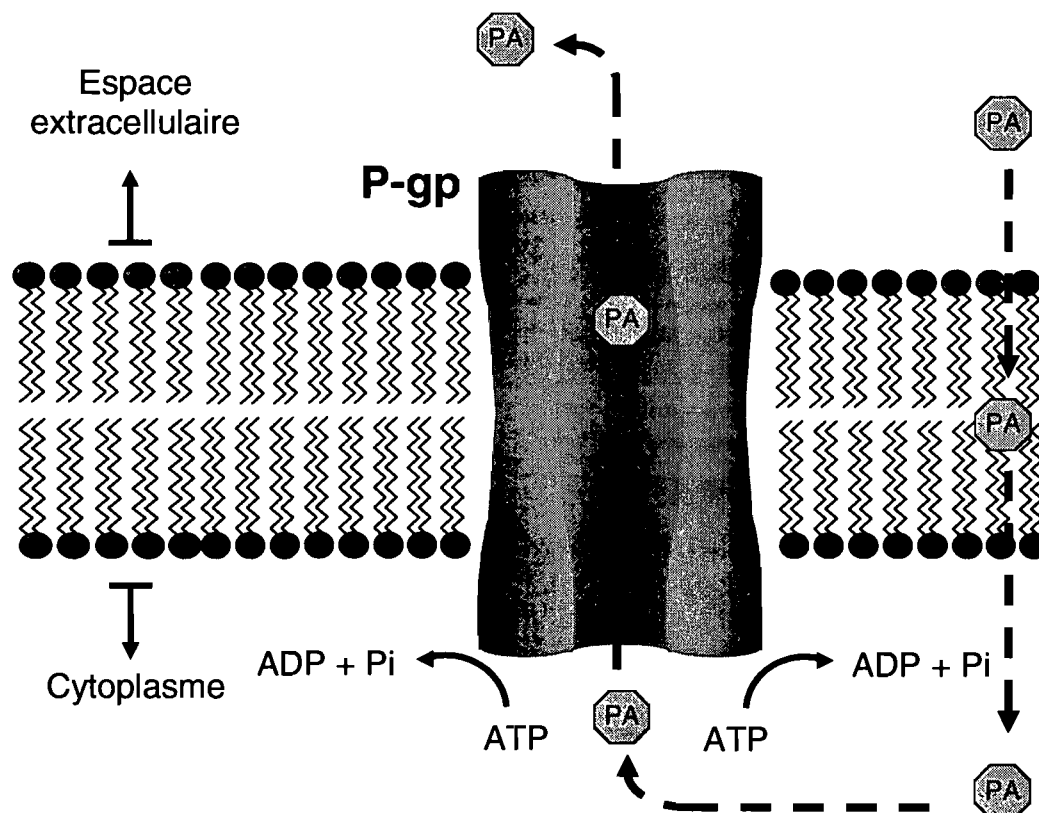


Figure 2.4: Schéma de l'action de la P-gp, qui expulse hors de la cellule les molécules de principe actif (PA) par un mécanisme dépendant de l'ATP.

Afin d'éviter l'augmentation de l'expression de la P-gp et l'apparition de la MDR, plusieurs stratégies sont étudiées. Une d'entre elles consiste à administrer le principe actif avec des inhibiteurs de la P-gp. Cette approche est prometteuse même si la plupart des agents inhibiteurs de la P-gp testés présentent des inconvénients

comme une forte toxicité ou des interactions pharmacocinétiques indésirables [13]. Le Solutol[®] HS15 (PEG 660 12-hydroxystearate) est un exemple d'inhibiteur de la P-gp qui s'est révélé capable de renverser la MDR installée dans certaines lignées cellulaires [14]. Il présente un profil de toxicité acceptable et se retrouve déjà dans des formulations commerciales injectables [15]. Sa capacité à inhiber la P-gp a été invoquée pour expliquer l'efficacité accrue du paclitaxel administré au moyen de nanoparticules lipidiques solides [16]. Cette caractéristique en fait un composant intéressant en formulation pharmaceutique et c'est pourquoi il a été choisi dans la composition des nanoémulsions de DTX qui sont décrites dans ce travail de maîtrise.

2.2. Les inhibiteurs des histones désacétylases (IHDAC)

2.2.1. La tributyrine

L'excipient majeur des nanoémulsions faisant l'objet de ce mémoire est la TB. Cette dernière est un triglycéride contenant trois butyrates estérifiés au glycérol (Figure 2.5). Elle peut être hydrolysée par des estérases plasmatiques ou par des estérases ou lipases cellulaires pour générer de l'acide butyrique, un IHDAC (3 moles d'acide butyrique libérés par mole de TB) [17]. L'acide butyrique est un acide gras à courte chaîne présent dans les fruits, les légumes et le gras du lait [18] et il est également produit chez l'humain par la flore intestinale lors de la fermentation anaérobie des fibres [19]. Il a été suggéré que la corrélation entre une diète pauvre en fibres et le développement du cancer colorectal pouvait être liée à l'effet protecteur des acides gras à courte chaîne (acétate, propionate et butyrate) produits lors de la fermentation des fibres [20]. L'effet bénéfique est attribué plus particulièrement au butyrate, ce qui expliquerait la plus grande diminution du risque

de cancer colorectal observé avec une diète riche en fibres de blé entier, celles dont la fermentation produit le plus haut taux de butyrate [20]. Les acides gras à courtes chaînes, bien qu'ayant démontré des résultats prometteurs, entre autres pour le traitement de la leucémie, sont peu spécifiques et ont une faible biodisponibilité orale [21]. Le problème majeur de l'acide butyrique (et de son sel sodique, le butyrate de sodium), est sa courte demi-vie qui empêche l'obtention de concentrations plasmatiques assez élevées pour avoir un effet thérapeutique, même avec une administration sous forme de perfusion intraveineuse continue [22]. D'autres sels d'acide butyrique (l'arginine butyrate, l'isobutyramide et le phénylbutyrate de sodium) ont été administrés par la voie intrapéritonéale (i.p.) chez des lapins et des souris, avec des demi-vies plasmatiques toujours inférieures à 5 min [23]. Cet inconvénient a amené des chercheurs à travailler avec des analogues ou des prodrogues de l'acide butyrique ayant de plus longues demi-vies plasmatiques, comme la TB. En effet, celle-ci se compare avantageusement à l'acide butyrique en termes de stabilité sanguine et de propriétés pharmacocinétiques [21, 24] tout en présentant une plus forte cytotoxicité que l'acide butyrique [25].

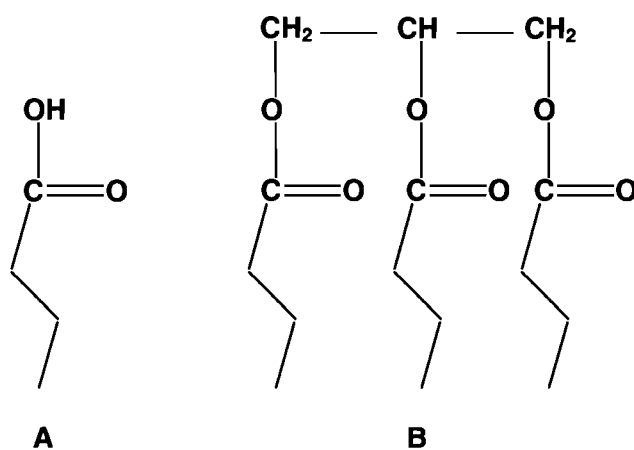


Figure 2.5: Structure chimique de l'acide butyrique (A) et de la tributyrine (B)

2.2.2. *Les effets antitumoraux de la tributyrine*

In vitro, il a été mis en évidence que la TB pouvait entraîner la différenciation de plusieurs types de cellules cancéreuses comme des cellules sanguines, épithéliales et prostatiques [26-28]. De plus, des effets pro-apoptotiques de la TB ont fréquemment été rapportés [18, 26, 29-31]. En outre, des études effectuées sur des souris auxquelles on avait inoculé des cellules cancéreuses de mélanome ont montré qu'une dose i.p. de 5 mg/kg/jour de TB pendant trois jours consécutifs induisait une diminution significative du nombre de nouveaux vaisseaux formés [32]. Bien que de multiples expériences aient démontré ses propriétés anti-tumorales, les mécanismes exacts par lesquels la TB ainsi que les autres types d'IHDACs exercent leur action sont peu connus. Par exemple, la corrélation entre l'inhibition de la croissance et l'hyperacétylation des histones causées par le butyrate n'est pas toujours vérifiée et la différenciation cellulaire ne semble pas nécessairement passer par une hyperacétylation des histones [23]. Avant d'exposer l'état actuel des connaissances sur les mécanismes d'action de la TB, il est nécessaire de présenter un aperçu de certains processus de régulation de l'expression génique.

2.2.3. *Les modifications épigénétiques de la structure de l'ADN*

La chromatine est arrangée en unités structurales nommées nucléosomes. Ces derniers consistent en deux superhélices d'ADN de 146 paires de bases, enroulées autour d'un octamère d'histones (Figure 2.6). Pour que les molécules régulatrices de l'expression génique dans le noyau cellulaire puissent interagir avec l'ADN, la chromatine doit se trouver dans sa forme ouverte (euchromatine), et cet état dépend en partie des modifications sur les histones. Ces dernières contiennent deux

domaines, le domaine carboxy-terminal qui maintient la cohésion du nucléosome, et le domaine amino-terminal qui est flexible et riche en lysines. Ce dernier est chargé positivement, ce qui permet les interactions avec les autres nucléosomes, ainsi que les interactions électrostatiques avec l'ADN. Ce sont ces domaines amino-terminaux, particulièrement ceux des H3 et H4, qui sont les sites de l'acétylation, de la méthylation et de la phosphorylation [33]. Ces modifications épigénétiques altèrent les interactions des histones avec d'autres protéines, déterminant ainsi la structure de la chromatine et modifiant par conséquent l'expression génique [33].

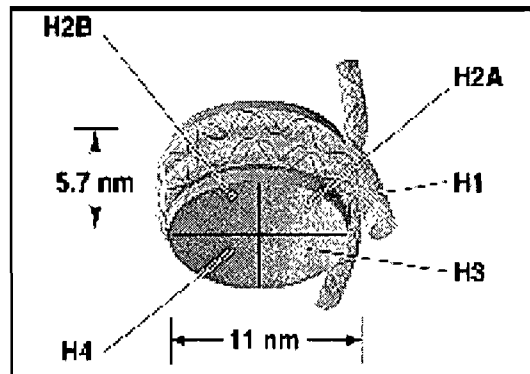


Figure 2.6 : Schéma d'un nucléosome. Un nucléosome est constitué de deux super-hélices d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones, elles mêmes arrangées en un tétramère H3-H4 et deux dimères H2A-H2B. H1 est une autre histone qui s'associe à l'ADN sans contact direct avec l'octamère d'histones.

2.2.4. L'acétylation des histones

Parmi ces modifications, c'est l'acétylation qui est la mieux comprise. L'acétylation est un processus réversible qui implique le transfert d'un groupe acétyl sur les lysines situées sur les queues des histones. Il en résulte une neutralisation de la charge positive. Cette neutralité diminue l'affinité de la queue de l'histone pour les nucléosomes voisins, pour d'autres protéines régulatrices et pour l'ADN, ce qui favorise une structure de la chromatine plus ouverte, facilitant ainsi l'expression

génique. L'équilibre entre l'état acétylé ou non est normalement maintenu par deux familles d'enzymes, les histones acétyltransférases (HATs) et les HDACs (Figure 2.7). Or, des dérèglements dans la balance entre l'activité des HATs et des HDACs ont été liés au cancer [34]. Trois grands types de dérèglements ont été identifiés. Le premier est une hyperacétylation désordonnée qui active des promoteurs normalement réprimés, ce qui entraîne l'expression inappropriée de protéines. Le second consiste, au contraire, en des niveaux d'acétylation diminués qui répriment l'expression de protéines nécessaires. Finalement, dans le troisième cas, le niveau d'acétylation total n'est pas modifié, mais la régulation du processus ne s'effectue pas correctement et l'acétylation ne se fait pas aux bons sites.

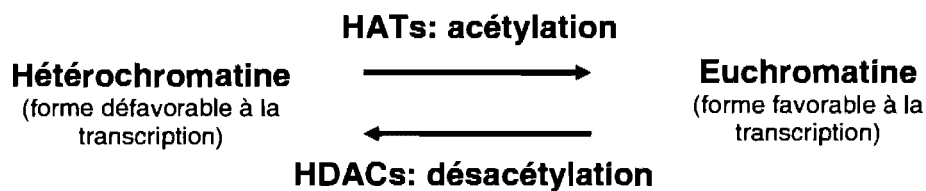


Figure 2.7 : Schéma représentant le rôle des HATs et des HDACs dans l'acétylation, qui a elle un impact sur la forme, favorable à la transcription ou non, de la chromatine.

2.2.5. Mode d'action de la tributyrine

La tributyrine n'agit pas seulement sur les HDACs, action dont il sera question plus loin, mais également, indirectement, sur la protéine du rétinoblastome (pRb). Un très grand nombre de tumeurs présentent des dérèglements de fonction du gène du rétinoblastome dont la protéine (pRb) est un point central de contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire [35]. En effet, lorsqu'elle est non phosphorylée, pRb se fixe sur le facteur de transcription E2F, empêchant ainsi ce dernier de se lier à l'ADN et d'induire la progression de la cellule de la phase G1 à la

phase S1 du cycle cellulaire (Figure 2.3). Lorsque pRb est phosphorylée (par des CDKs), elle ne peut plus lier E2F, et la cellule peut alors passer à la phase S1. La liaison de pRb avec E2F se fait avec le concours du recrutement d'HDAC1 et lorsque la pRb est mutée ou inactivée, elle perd la capacité de recruter HDAC1 [33, 36].

Dans les cellules saines, lorsque l'ADN cellulaire est endommagé, pRb n'est plus phosphorylée, ce qui bloque la progression dans le cycle cellulaire afin que la cellule répare les lésions ou s'engage vers l'apoptose [35]. Au cours de ce processus, qui est compromis dans les cellules cancéreuses, la protéine p53 intervient en activant l'expression de la p21/waf1 (alternativement appelée p21/waf1/cip1 et p21/cip1 dans la littérature), une protéine qui inhibe l'action des CDKs, qui ne peuvent ainsi phosphoryler pRb [35] (Figure 2.3). Le butyrate et la TB semblent exercer une action indépendante de leur effet sur les HDACs en activant l'expression de p21/waf1 [18], sans toutefois passer par l'habituel intermédiaire p53 [29, 37]. Ceci permet donc au butyrate d'agir aussi sur les cellules p53-négatives, caractéristique intéressante considérant le fait que les mutations dans le gène p53 font partis des événements génétiques les plus communs dans les cellules cancéreuses [38]. Une action du butyrate et de la TB à ce niveau est corroborée par les résultats obtenus sur des cellules possédant des mutations sur le gène p53, à savoir les cellules prostatiques cancéreuses PC-3 et TSU-PR1. En effet, une diminution de la proportion de cellules en phase S et une augmentation de la proportion de cellules en phase G ont été rapportées suite à leur exposition au butyrate de sodium ou à la TB [26]

L'action de la TB sur la p21 n'explique que l'effet antiprolifératif de la TB. Tel que mentionné plus tôt, celle-ci peut aussi provoquer la différenciation cellulaire, effet quant à lui associé à l'hyperacétylation des histones entraînée par l'inhibition des HDACs. À ce niveau, l'action de la TB et du butyrate est moins comprise. L'effet global de la TB qui peut provoquer des effets opposés (prolifération vs inhibition de croissance [21]) semble dépendant des protéines mutées et du type de dérèglement de l'acétylation des histones présent. Par exemple, il semble peu probable que la TB soit appropriée pour le traitement de tumeurs dont les cellules présentent un taux d'acétylation global plus élevé. Finalement, il est à noter que l'effet à long terme des HDACs est inconnu et que, tout comme les autres agents chimiothérapeutiques, les HDACs affectent également les cellules saines.

En parallèle de la recherche d'agents spécifiques aux cellules cancéreuses, les effets secondaires peuvent être limités par le développement de systèmes de libération ciblée de ces médicaments. L'objectif est d'obtenir une concentration en principe active supérieure au site d'action que dans le reste du corps afin de diminuer les effets secondaires et d'augmenter ainsi les doses administrables. Le prochain chapitre fera état de différentes stratégies de ciblage utilisant les nanotechnologies et présentera le système étudié au cours de ce projet de recherche ainsi que les objectifs spécifiques de ce dernier.

Références

1. Ali S. M., Hoemann M. Z., Aube J., Mitscher L. A., Georg G. I., McCall R., and Jayasinghe L. R., *Novel cytotoxic 3'-(tert-butyl) 3'-dephenyl analogs of paclitaxel and docetaxel*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1995. **38**(19): p. 3821-8.
2. Verweij J., Clavel M., and Chevalier B., *Paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere): not simply two of a kind*. *Annals of Oncology*, 1994. **5**(6): p. 495-505.
3. Hennenfent K. L. and Govindan R., *Novel formulations of taxanes: a review. Old wine in a new bottle?* *Ann. Oncol.*, 2006. **17**(5): p. 735-49.
4. Herbst R. S. and Khuri F. R., *Mode of action of docetaxel - a basis for combination with novel anticancer agents*. *Cancer Treat Rev*, 2003. **29**(5): p. 407-15.
5. Sweeney C. J., Miller K. D., Sissons S. E., Nozaki S., Heilman D. K., Shen J., and Sledge G. W., Jr., *The antiangiogenic property of docetaxel is synergistic with a recombinant humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor or 2-methoxyestradiol but antagonized by endothelial growth factors*. *Cancer Research*, 2001. **61**(8): p. 3369-72.
6. Wang L. G., Liu X. M., Kreis W., and Budman D. R., *The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review*. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology*, 1999. **44**(5): p. 355-61.
7. Brown I., Shalli K., McDonald S. L., Moir S. E., Hutcheon A. W., Heys S. D., and Schofield A. C., *Reduced expression of p27 is a novel mechanism of docetaxel resistance in breast cancer cells*. *Breast Cancer Research*, 2004. **6**(5): p. R601-7.
8. Schimming R., Mason K. A., Hunter N., Weil M., Kishi K., and Milas L., *Lack of correlation between mitotic arrest or apoptosis and antitumor effect of docetaxel*. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology*, 1999. **43**(2): p. 165-72.
9. Katsumata N., *Docetaxel: an alternative taxane in ovarian cancer*. *Br J Cancer*, 2003. **89 Suppl 3**: p. S9-S15.
10. ten Tije A. J., Verweij J., Loos W. J., and Sparreboom A., *Pharmacological effects of formulation vehicles : implications for cancer chemotherapy*. *Clin Pharmacokinet*, 2003. **42**(7): p. 665-85.
11. Geney R., Ungureanu M., Li D., and Ojima I., *Overcoming multidrug resistance in taxane chemotherapy*. *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine*, 2002. **40**(9): p. 918-25.

12. Ojima I., Geney R., Ungureanu I. M., and Li D., *Medicinal chemistry and chemical biology of new generation taxane antitumor agents*. IUBMB Life, 2002. **53**(4-5): p. 269-74.
13. Longley D. B. and Johnston P. G., *Molecular mechanisms of drug resistance*. Journal of Pathology, 2005. **205**(2): p. 275-92.
14. Coon J. S., Knudson W., Clodfelter K., Lu B., and Weinstein R. S., *Solutol HS 15, nontoxic polyoxyethylene esters of 12-hydroxystearic acid, reverses multidrug resistance*. Cancer Res, 1991. **51**(3): p. 897-902.
15. Strickley R. G., *Solubilizing excipients in oral and injectable formulations*. Pharm Res, 2004. **21**(2): p. 201-30.
16. Garcion E., Lamprecht A., Heurtault B., Paillard A., Aubert-Pouessel A., Denizot B., Menei P., and Benoit J. P., *A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats*. Molecular Cancer Therapeutics, 2006. **5**(7): p. 1710-22.
17. Edelman M. J., Bauer K., Khanwani S., Tait N., Trepel J., Karp J., Nemieboka N., Chung E. J., and Van Echo D., *Clinical and pharmacologic study of tributyrin: an oral butyrate prodrug*. Cancer Chemother Pharmacol, 2003. **51**(5): p. 439-44.
18. Heerdt B. G., Houston M. A., Anthony G. M., and Augenlicht L. H., *Initiation of growth arrest and apoptosis of MCF-7 mammary carcinoma cells by tributyrin, a triglyceride analogue of the short-chain fatty acid butyrate, is associated with mitochondrial activity*. Cancer Res, 1999. **59**(7): p. 1584-91.
19. Cummings J. H., *Short chain fatty acids in the human colon*. Gut, 1981. **22**(9): p. 763-79.
20. Sowa Y. and Sakai T., *Butyrate as a model for "gene-regulating chemoprevention and chemotherapy"*. Biofactors, 2000. **12**(1-4): p. 283-7.
21. Yoo C. B. and Jones P. A., *Epigenetic therapy of cancer: past, present and future*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(1): p. 37-50.
22. Miller A. A., Kurschel E., Osieka R., and Schmidt C. G., *Clinical pharmacology of sodium butyrate in patients with acute leukemia*. European Journal of Cancer & Clinical Oncology, 1987. **23**(9): p. 1283-7.
23. Santini V., Gozzini A., Scappini B., Grossi A., and Rossi Ferrini P., *Searching for the magic bullet against cancer: the butyrate saga*. Leukemia & Lymphoma, 2001. **42**(3): p. 275-89.

24. Planchon P., Pouillart P., Ronco G., Villa P., and Pieri F., *Differential elimination of synthetic butyric triglycerides in vivo: a pharmacokinetic study*. J Pharm Sci, 1993. **82**(10): p. 1046-8.
25. Clarke K. O., Feinman R., and Harrison L. E., *Tributyryn, an oral butyrate analogue, induces apoptosis through the activation of caspase-3*. Cancer Lett, 2001. **171**(1): p. 57-65.
26. Maier S., Reich E., Martin R., Bachem M., Altug V., Hautmann R. E., and Gschwend J. E., *Tributyryn induces differentiation, growth arrest and apoptosis in androgen-sensitive and androgen-resistant human prostate cancer cell lines*. Int J Cancer, 2000. **88**(2): p. 245-51.
27. Schroder C., Eckert K., and Maurer H. R., *Tributyryn induces growth inhibitory and differentiating effects on HT-29 colon cancer cells in vitro*. Int J Oncol, 1998. **13**(6): p. 1335-40.
28. Chen Z. X. and Breitman T. R., *Tributyryn: a prodrug of butyric acid for potential clinical application in differentiation therapy*. Cancer Research, 1994. **54**(13): p. 3494-9.
29. Kuefer R., Hofer M. D., Altug V., Zorn C., Genze F., Kunzi-Rapp K., Hautmann R. E., and Gschwend J. E., *Sodium butyrate and tributyrin induce in vivo growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer*. Br J Cancer, 2004. **90**(2): p. 535-41.
30. Schroder C. P. and Maurer H. R., *Tributyryn-induced differentiation promotes apoptosis of LS 174T colon cancer cells in vitro*. Int J Oncol, 2002. **20**(1): p. 195-200.
31. Watkins S. M., Carter L. C., Mak J., Tsau J., Yamamoto S., and German J. B., *Butyric acid and tributyrin induce apoptosis in human hepatic tumour cells*. J Dairy Res, 1999. **66**(4): p. 559-67.
32. Giermasz A., Nowis D., Jalili A., Basak G., Marczak M., Makowski M., Czajka A., Mlynarczuk I., Hoser G., Stokosa T., Lewandowski S., and Jakobisiak M., *Antitumor activity of tributyrin in murine melanoma model*. Cancer Lett, 2001. **164**(2): p. 143-8.
33. Kristeleit R., Stimson L., Workman P., and Aherne W., *Histone modification enzymes: novel targets for cancer drugs*. Expert Opinion on Emerging Drugs, 2004. **9**(1): p. 135-54.
34. Bar-Sela G., Jacobs K. M., and Gius D., *Histone deacetylase inhibitor and demethylating agent chromatin compaction and the radiation response by cancer cells*. Cancer Journal, 2007. **13**(1): p. 65-9.
35. Weinberg R. A., *The retinoblastoma protein and cell cycle control*. Cell, 1995. **81**(3): p. 323-30.

36. Giacinti C. and Giordano A., *RB and cell cycle progression*. *Oncogene*, 2006. **25**(38): p. 5220-7.
37. Nakano K., Mizuno T., Sowa Y., Orita T., Yoshino T., Okuyama Y., Fujita T., Ohtani-Fujita N., Matsukawa Y., Tokino T., Yamagishi H., Oka T., Nomura H., and Sakai T., *Butyrate activates the WAF1/Cip1 gene promoter through Sp1 sites in a p53-negative human colon cancer cell line*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(35): p. 22199-206.
38. Vogelstein B., *Cancer. A deadly inheritance.[comment]*. *Nature*, 1990. **348**(6303): p. 681-2.

CHAPITRE 3 : LA VECTORISATION

3.1. La vectorisation

La vectorisation consiste à associer un principe actif à un vecteur, de sorte que la distribution du médicament ne dépende plus de ses propriétés physicochimiques, mais de celles du vecteur que l'on peut modifier selon la pathologie traitée. Il est alors possible d'effectuer une libération ciblée du médicament, c'est-à-dire de libérer le principe actif aux sites voulus et de diminuer son action sur les tissus sains. Les stratégies de ciblage considérées sont multiples et variées, de type passif ou actif, et interviennent à différents niveaux d'organisation biologique (organique, cellulaire, moléculaire).

Les vecteurs de médicaments, littéralement des « transporteurs » de principes actifs, ont été développés afin de remplir de multiples fonctions. Tout d'abord, les vecteurs peuvent avoir comme objectif de solubiliser un médicament. En effet, les nouvelles molécules issues de la recherche sur le cancer sont fréquemment peu hydrosolubles, une caractéristique qui pose un défi majeur à leur administration par la voie intraveineuse (i.v.) [1]. Les vecteurs peuvent aussi protéger le principe actif de la dégradation par le milieu environnant, augmenter son temps de circulation systémique, moduler sa distribution dans l'organisme, faciliter sa diffusion à travers les membranes ou lui permettre d'atteindre une cible intracellulaire (cytoplasme, noyau, etc.). Pour ce faire, les vecteurs peuvent, par exemple, être munis d'un ligand de ciblage ou dotés de propriétés permettant la libération de l'agent transporté en réponse à un stimulus externe (pH, température, etc.) [2, 3]. Les diverses stratégies de ciblage ainsi que la différence entre leur caractère passif ou actif seront vus dans les prochains paragraphes.

3.2. Le ciblage passif : l'effet EPR (« *enhanced permeability and retention* »)

Le ciblage passif utilise des vecteurs capables de s'accumuler dans les tissus ciblés, sans qu'il y ait d'interaction spécifique de type ligand-récepteur. Dans le cas de l'administration systémique d'agents anticancéreux, le ciblage passif est directement lié à l'effet dit EPR « *enhanced permeability and retention* » qui est causé par deux caractéristiques que l'on retrouve généralement dans les tumeurs solides. La première particularité est une perméabilité accrue des capillaires tumoraux due à des fenestrations de l'endothélium de taille supérieure à celles présentes dans le réseau capillaire irrigant les tissus sains (Figure 3.1). De ce fait, des vecteurs dont le diamètre est inférieur à 300 nm peuvent s'échapper de la circulation sanguine au niveau d'une tumeur à travers ces fenestrations et s'accumuler préférentiellement dans le tissu tumoral après plusieurs passages [4]. De tels vecteurs se retrouveront aussi en forte proportion dans quelques organes du corps possédant des capillaires plus perméables comme le foie, la rate et la moelle osseuse. [5]. La deuxième particularité qui permet l'effet EPR est la diminution du drainage lymphatique au sein des tumeurs. Ainsi, les particules qui traversent l'endothélium sont davantage « retenues » dans le liquide interstitiel tumoral. Afin de permettre une accumulation notable du vecteur dans la tumeur, il est primordial que ce dernier circule de manière prolongée dans le compartiment sanguin (> 6 h). La prochaine section présentera justement les caractéristiques qu'un vecteur doit posséder afin de présenter un temps de circulation prolongé.

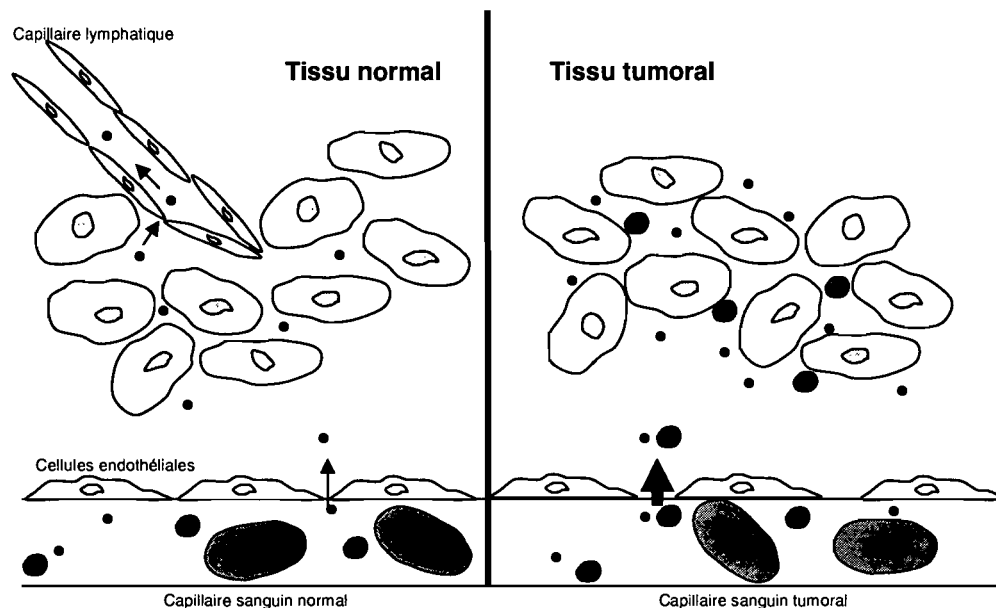


Figure 3.1: Schéma de l'effet EPR. Grâce à leurs fenestrations, les capillaires tumoraux permettent la diffusion de plus grosses particules que les capillaires normaux. Les particules qui traversent la barrière endothéliale sont alors retenues dans le tissu tumoral dû à un drainage lymphatique déficient.

3.3. Les caractéristiques des vecteurs aux temps de circulation prolongés

Comme on vient de l'expliquer, afin de profiter de l'effet EPR, il est primordial d'augmenter le temps de circulation des vecteurs. Pour cela, ceux-ci doivent être furtifs, c'est-à-dire qu'ils doivent offrir une certaine résistance à la dégradation et à l'opsonisation (adsorption de protéines plasmatique provoquant sa reconnaissance par le système des phagocytes mononucléés (MPS)) [6]. Une solution communément utilisée à cette fin est l'incorporation de poly(éthylène glycol) (PEG) linéaire de poids moléculaire variant entre 2000 et 5000 à la surface des particules [7]. On peut ajouter du PEG aux vecteurs de diverses façons, par exemple en couplant du PEG aux phospholipides de liposomes [2] ou en incubant des nanoémulsions avec une solution de PEG hydrophobisé [8]. Le PEG est un polymère faiblement immunogène et sa présence à la surface du vecteur permet de créer autour

de ce dernier une barrière stérique qui lui confère un caractère furtif. Il évite ainsi la reconnaissance par les cellules du MPS qui phagocytent les corps étrangers directement ou suite à leur opsonisation [7, 9]. Ceci empêche ou retarde la clairance des vecteurs qui s'effectue principalement par le foie, la rate et la moelle osseuse [9]. La charge des vecteurs influence également leur devenir; une charge neutre étant préférable pour éviter l'interaction avec d'autres éléments circulants et pour échapper à l'opsonisation [10]. En bref, la taille, la charge et l'antigénicité due à la nature même du vecteur sont à considérer afin d'obtenir un système pouvant circuler suffisamment longtemps pour s'accumuler préférentiellement dans les tissus tumoraux.

3.4. Le ciblage actif

Le ciblage actif consiste à associer au vecteur un ligand capable de se lier spécifiquement à un récepteur visé. Toutefois, afin de maximiser les probabilités d'établissement d'une liaison, les caractéristiques requises dans le cas du ciblage passif sont aussi à respecter avec le ciblage actif. Plusieurs ligands utilisés pour le ciblage actif sont listés dans le Tableau 3-1 avec des exemples de formulations. Il est intéressant de noter que l'anticorps monoclonal contre le récepteur HER2 n'est pas utilisé que comme ligand, mais constitue également un médicament en soi, approuvé par la FDA. Ce dernier est le trastuzumab (Herceptin[®]), un médicament qui fait partie des thérapies ciblées et qui est administré par perfusion pour traiter le cancer du sein [11].

Tableau 3-1: Exemples de ligands utilisés dans la vectorisation de médicaments anticancéreux

Type de vecteur	Ligand	Cible étudiée	Référence
Micelles	Acide folique	Cellules cancéreuses du sein ayant développée une résistance pléiotropique	[12]
	Peptide TAT du HIV	Cellules cancéreuses du sein	[13]
	Séquence peptidique Arg-Gly-Asp	Cellules endothéliales des vaisseaux sanguins tumoraux	[14]
Liposomes	Transferrine	Cellules cancéreuses de l'estomac	[15]
	Peptide intestinal vasoactif (VIP)	Cellules cancéreuses du sein	[16]
	Fragment d'anticorps contre le récepteur de la transferrine	Cellules cancéreuses du pancréas	[17]
Macromolécules solubles	Galactosamine, lactose et galactose multivalent	Cellules cancéreuses du colon	[18]
Émulsions	Anticorps contre le récepteur HER2	Cellules cancéreuses de la prostate	[19]

L'interaction entre le ligand ajouté au vecteur et son récepteur membranaire favorise généralement l'internalisation par endocytose. Sans ligand, l'internalisation peut se faire par interaction électrostatique avec la membrane ou par macropinocytose (Figure 3.2). Dans un cas comme dans l'autre, l'invagination de la membrane formera un endosome (pH ~6) qui s'acidifiera pour former un lysosome (pH ~5). Plusieurs cas de figures sont alors possibles quant au devenir du vecteur. À l'intérieur de l'endosome, le principe actif peut se dissocier du vecteur et diffuser à travers la membrane endosomale. Alternativement, il est possible d'utiliser des peptides capables de créer des pores dans la membrane ou des polymères endosomolytiques [20]. En cas de rupture, la dissociation du médicament et du vecteur peut survenir avant ou après l'endosomolyse. Dans le dernier cas, le vecteur peut posséder un élément de ciblage qui le dirigera vers sa cible intracellulaire. Par exemple, la présence de signaux de localisation nucléaire (NLS) sur une molécule en permet le transport actif vers le noyau [21].

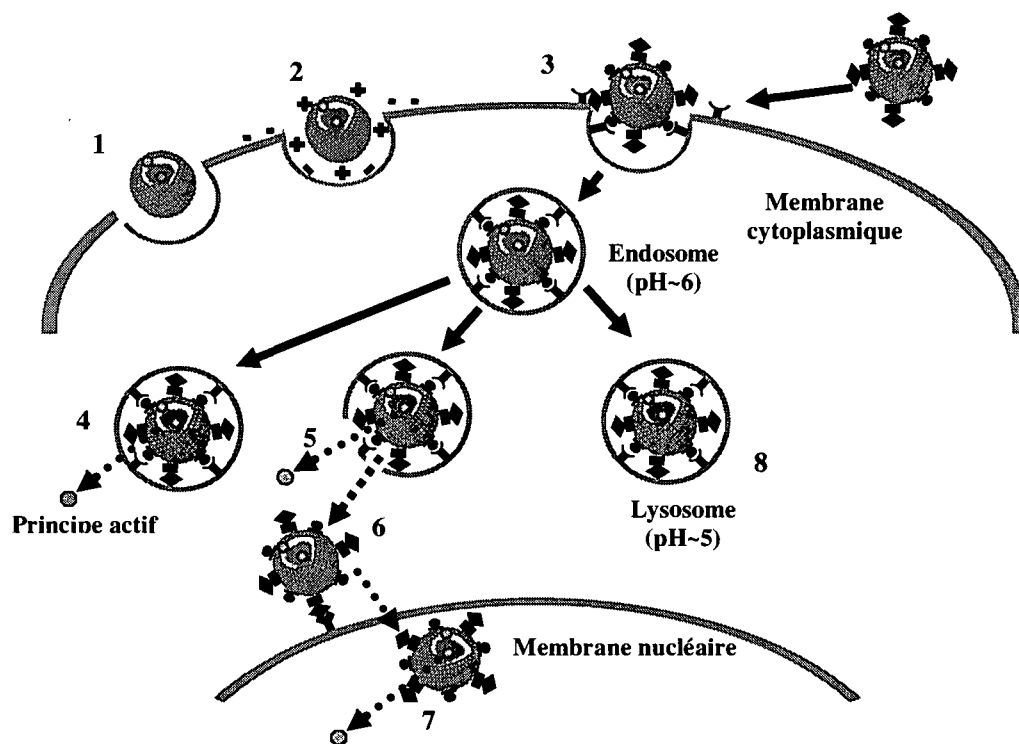


Figure 3.2 : Schéma de l'internalisation d'un vecteur. Un vecteur (ici un liposome) peut être internalisé par macropinocytose (1) ou par interaction électrostatique (2). L'internalisation par endocytose (3) est favorisée par la présence de ligands reconnus par des récepteurs membranaires. Le principe actif peut soit diffuser de l'endosome (4), soit en sortir seul (5) ou lié au vecteur (6) par des pores créés par des peptides liés au vecteur ou suite à une endosomolyse. Si le vecteur entier se retrouve dans le cytoplasme, un ligand reconnu par une cible subcellulaire (ici un récepteur de la membrane nucléaire) peut permettre de diriger plus précisément le vecteur (7). Finalement, celui-ci peut également entrer dans le cytoplasme au niveau du compartiment lysosomal (8).

Les stratégies envisagées afin de mettre au point un vecteur efficace sont multiples. Tel que mentionné précédemment, il est possible de rendre un vecteur sensible à un stimulus, que ce dernier soit endogène (*e.g.* variation de pH dans les compartiments endosomaux ou dans le liquide interstitiel tumoral) ou exogène (*e.g.* application de chaleur, de lumière ou d'ultrasons), afin de provoquer l'activation ou la libération du principe actif. Par exemple, le dioleoyl phosphatidyléthanolamine, en combinaison avec des amphiphiles acides, est utilisé dans la fabrication de liposomes sensibles au pH afin de favoriser la libération de médicaments dans le compartiment

endosomal ou lysosomal, où le pH est plus acide [3, 22]. Une autre approche consiste à rendre un vecteur sensible à un changement de température, par exemple au moyen de copolymères de *N*-isopropylacrylamide [3]. En solution aqueuse, ces polymères subissent un changement de conformation lors d'une augmentation de la température qui peut être exploitée pour déstabiliser des micelles [23] ou des liposomes [24].

Le choix de la stratégie adoptée est dicté par les obstacles rencontrés pour l'administration du principe actif, obstacles eux-mêmes spécifiques au type de cancer à combattre et aux caractéristiques du médicament. En effet, pour l'instant, les vecteurs développés sont loin de l'idéal du vecteur polyvalent qui permettrait d'administrer une panoplie de molécules différentes. Ceci est encore plus vrai dans le cas de la vectorisation la plus minimaliste, qui ne consiste qu'à associer le ligand directement au principe actif. Malgré tout, les vecteurs doivent être simples à préparer, faciles à modifier, biocompatibles et stables *in vivo*. Dans la recherche sur les traitements oncologiques, les vecteurs les plus étudiés sont les macromolécules solubles, les liposomes, les micelles polymères, les nanoparticules et les nanoémulsions. Les prochains paragraphes feront un survol de ces vecteurs en terminant avec les nanoémulsions, le système développé dans notre projet de recherche.

3.5. Les différents types de nanovecteurs

3.5.1. *Les macromolécules solubles*

Les macromolécules solubles sont constituées de principes actifs hydrophiles ou hydrophobes liés de façon covalente ou électrostatique à une structure polymère linéaire ou branchée [20, 25]. Le vecteur résultant, dont la taille varie généralement entre 2 et 100 nm, possède une masse molaire élevée comparativement au principe actif seul. Ceci permet de modifier la biodistribution de ce dernier, de diminuer la clairance rénale et de profiter de l'effet EPR dans le cas des tumeurs solides, ainsi que de limiter le problème de résistance pléiotropique qui peut survenir lorsque le principe actif pénètre la cellule par diffusion [21]. Toutefois, les macromolécules solubles présentent de faibles taux de chargement en principe actif par rapport aux autres types de nanovecteurs.

Afin d'effectuer un ciblage actif, un ou plusieurs ligands peuvent être attachés aux polymères, que ce soit pour favoriser l'internalisation de la macromolécule par les cellules ciblées ou pour rejoindre le site d'action intracellulaire du principe actif. La liaison utilisée afin de coupler le principe actif et les ligands aux polymères peut être adaptée suivant la cible finale visée et les molécules à lier. Parmi les liens connus, citons le peptide Cys-Phe-Leu-Gly et les liens liens hydrazone et cis-aconityl. Le premier est spécifiquement dégradé par la cathepsine-B, une enzyme que l'on retrouve en forte concentration dans les lysosomes, mais qui est absente du sang, alors que les deux autres sont hydrolysés à pH acide [20].

Le SMANCS (« *poly(styrene-comaleic acide anhydride)-neocarzinostatin* »), approuvé au Japon dès 1994 pour le traitement du cancer du foie, est un exemple de macromolécule soluble [25]. Un autre exemple est l'OpaxioTM, un médicament composé de paclitaxel conjugué à du poly(acide glutamique), précédemment connu sous les noms de paclitaxel poliglumex, CT-2103 et XyotaxTM. L'OpaxioTM a donné des résultats encourageants dans les études précliniques [25] et des études de phase II et III sont présentement en cours.

3.5.2. Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules lipidiques possédant une ou plusieurs membranes bilamellaires et constituées de lipides naturels ou synthétiques. Ils sont principalement adaptés à l'encapsulation de molécules hydrophiles ou amphiphiles pouvant être piégés dans le cœur aqueux. (Figure 3.3). Bien qu'il soit possible de solubiliser un principe actif hydrophobe dans la membrane lipidique, les taux d'encapsulation généralement atteints demeurent faibles [4]. A forte concentration, l'incorporation d'un médicament hydrophobe dans la bicouche peut déstabiliser cette dernière. Les liposomes sont déjà largement utilisés en clinique pour traiter diverses affections comme la méningite néoplasique (DepoCyt[®]) [26], les infections fongiques (Ambisome[®]) [10], la rétinopathie (Visudyne[®]) [27] et le cancer (Doxil[®] et Myocet[®]). Le Doxil[®] et le Myocet[®] sont des formulations liposomales à base de doxorubicine. Le Doxil[®] est approuvé pour le traitement des sarcomes de Kaposi et pour le cancer de l'ovaire réfractaire aux traitements primaires, alors que le Myocet[®] est utilisé dans le traitement du cancer métastatique du sein. Des liposomes avec différentes compositions lipidiques contenant du DTX ont été testés par Immordino et *al.* Bien que certains de ces liposomes présentaient des profils pharmacocinétiques

plus intéressants que le TXT, la faible quantité de médicament incorporé était incompatible avec le développement clinique de ces formulations [28].

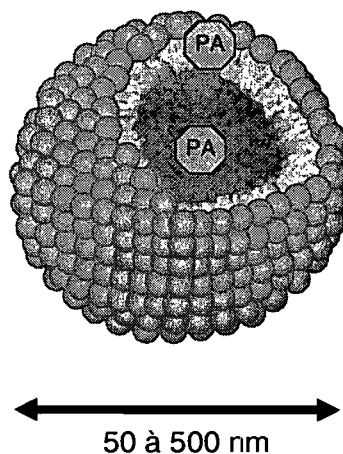


Figure 3.3 : Schéma d'un liposome. Le principe actif (PA) peut être incorporé dans le cœur du liposome ou dans sa membrane, selon s'il est hydrophile ou hydrophobe.

Source : Nicolas Bertrand (figure modifiée)

3.5.3. Les micelles polymères

Les micelles polymères sont des colloïdes obtenus par auto-assemblage de copolymères amphiphiles ou de polymères de charges opposées lorsque mis en solution à une concentration supérieure à la concentration micellaire critique (CMC). Elles peuvent être aussi fabriquées par liaison d'un polymère chargé avec un métal tel que le platine [29]. En milieu aqueux, la micelle possède un cœur hydrophobe que délimite une couronne hydrophile (Figure 3.4). L'agent véhiculé se situe en général dans le cœur de la micelle. Bien que les micelles présentent de nombreux avantages pour la vectorisation d'agents anticancéreux, incluant leur capacité de solubiliser de fortes proportions de principes actifs hydrophobes [1], aucune formulation n'a encore été commercialisée.

Un des principaux inconvénients à l'utilisation clinique des micelles est la dissociation *in vivo* des micelles lorsque diluées en deçà de leur CMC et la fuite rapide du médicament dans le volume sanguin [30]. Une étude récente a démontré que des composantes plasmatiques peuvent déstabiliser des micelles polymères même lorsque la concentration du polymère excède la CMC [31]. En fait, cette étude a été réalisée avec la formulation micellaire Genexol[®], la formulation micellaire de taxane la plus avancée. Ces micelles ont un diamètre entre 20 et 50 nm et sont constituées de PEG-*block*-poly(acide lactique) (PLA) [32]. Les chaînes de PEG forment la couronne des micelles alors que celles de PLA en forment le cœur et permettent de solubiliser le paclitaxel. À ce jour, ce système a été testé en combinaison avec de la cisplatine en phase clinique II et a permis l'administration d'une plus grande dose de paclitaxel que le Taxol[®] sans augmenter significativement la toxicité [33]. D'autres études avec le Genexol[®] en combinaison avec d'autres agents, avec différents régimes d'administration et contre d'autres types de cancer sont prévues. Le DTX a quant à lui été solubilisé dans des micelles de poly(oxide d'éthylène)-*block*-poly(oxyde de butylène/styrène) [34] ainsi que dans des micelles de poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-acrylamide)-*b*-PLA [23]. Cependant, le comportement *in vivo* de ces micelles n'a pas été caractérisé.

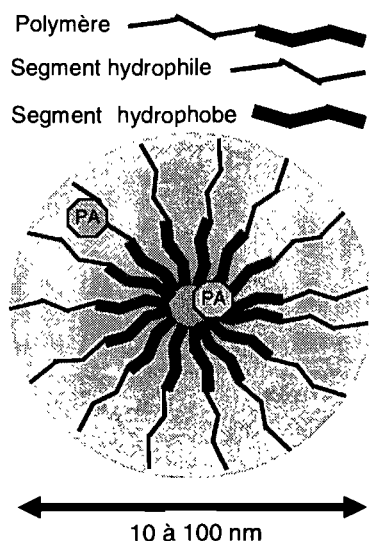


Figure 3.4: Schéma d'une micelle polymère en milieu aqueux. Le principe actif (PA) peut être incorporé dans le cœur ou la couronne de la micelle selon sa nature hydrophobe ou hydrophile, respectivement.

3.5.4. *Les nanoparticules polymères, les nanoparticules lipidiques solides et les nanocristaux*

3.5.4.1. Nanoparticules polymères

Les nanoparticules polymères, dont le diamètre varie entre 50 et 500 nm, constituent un autre système destiné à véhiculer des molécules hydrophobes. Ces nanoparticules sont formées d'une matrice polymère dans laquelle est dispersé le principe actif. La libération de ce dernier dépend de sa vitesse de diffusion à travers la matrice et/ou de la vitesse de dégradation de celle-ci [35]. Le choix des polymères entrant dans la composition des nanoparticules est limité, car ceux-ci, ainsi que leurs produits de dégradation, doivent être non toxiques. Les nanoparticules polymères présentent une stabilité physique généralement supérieure à celle des liposomes et des micelles polymères. Elles ont par contre souvent le désavantage d'être préparées à l'aide de solvants organiques, ce qui impose un contrôle rigoureux de la présence de solvants résiduels.

Des nanoparticules contenant du DTX ont récemment été décrites [36]. Ces nanoparticules sont composées de PLA ou de « *poly(lactide-co-glycolide)* », des polymères biodégradables fréquemment utilisés pour la composition de nanoparticules [35]. Les auteurs ont effectué la caractérisation physico-chimique de ces nanoparticules ainsi que des expériences de libération *in vitro* afin de déterminer l'influence de la composition des nanoparticules sur la diffusion du DTX. Une expérience réalisée avec un modèle de membrane a démontré qu'entre 33% et 50% du DTX est libéré de nanoparticules de PLA après 48 h [36]. Finalement, les résultats montrent que le DTX diffuse peu de ces vecteurs et que son profil de libération dépend plutôt de la vitesse de dégradation des polymères, elle-même dépendante du poids moléculaire de ceux-ci [36].

3.5.4.2. Nanoparticules lipidiques solides

Il est également possible de préparer des nanoparticules solides à base de lipides. Cette forme de vecteurs, dont le diamètre varie aussi entre 50 et 500 nm, est préparée par le refroidissement d'une émulsion de lipides fondus [37]. Serpe et al (2004) ont préparé de telles nanoparticules destinées à délivrer de l'acide butyrique en dispersant une émulsion chaude de butyrate de cholestéryl, un ester de cholestérol et d'acide butyrique, dans de l'eau froide (1 :10). L'émulsion est composée de 12% de butyrate de cholestéryl, de 15% d'Epikuron 200 (contenant 95% de phosphatidylcholine de soja), de 3% de taurocholate de sodium, de 11% de butanol et de 59% d'eau chaude [38]. Cette formulation a été comparée au butyrate de sodium *in vitro* pour sa capacité à inhiber la croissance cellulaire et à induire l'apoptose. Les résultats varient selon la lignée cellulaire testée, mais à concentration égale, les nanoparticules sont en général plus cytotoxiques, alimentant l'intérêt d'utiliser des

prodrogues d'acide butyrique afin d'obtenir des concentrations élevées de cette dernière [38].

3.5.4.3. Les nanocristaux

Les nanocristaux de médicaments, dont le diamètre varie entre 200 et 500 nm, sont des particules cristallines de principes actifs stabilisées par un polymère ou un surfactant [37]. Les médicaments sont réduits sous forme de nanocristaux par homogénéisation à haute pression ou à l'aide de moulins colloïdaux. Les produits Rapamune[®] (sirolimus) et Emend[®] (aprepitant) sont fabriqués à l'aide de cette méthode et sont respectivement utilisés comme immunosuppresseur et comme anti-nauséeux [37]. La technologie d'homogénéisation à haute pression a aussi été utilisée avec le paclitaxel dans une solution d'albumine afin de produire Abraxane[®]. Cette formulation, composée uniquement de paclitaxel et d'albumine, est moins toxique que le Taxol[®], ce qui permet d'en administrer de plus fortes doses [39].

3.5.5. Les nanoémulsions

Finalement, les émulsions consistent en des mélanges de deux phases immiscibles (eau et huile) dans lesquelles la phase interne est dispersée sous forme de gouttelettes dans l'autre phase, appelée phase externe. Les émulsions sont en général de type eau dans l'huile (E/H) ou huile dans l'eau (H/E) bien qu'il y ait des variations plus complexes comme dans le cas des émulsions dites multiples (E/H/E) [40]. Une émulsion étant un système thermodynamiquement instable, elle subira inévitablement une séparation de phase par coalescence et/ou par mûrissement d'Oswald. Le mûrissement d'Oswald consiste en la dissolution de gouttelettes dans

la phase externe avec diffusion de la phase interne qu'elles contenaient vers les gouttelettes non dissoutes, processus qui entraîne avec le temps une séparation de phase. Les émulsions polydisperses sont plus sujettes que les émulsions monodisperses à ce phénomène puisque les petites gouttelettes sont plus solubles que les grandes dans la phase externe [41]. L'ajout d'un ou plusieurs émulsifiants, possédant ou non une charge électrostatique, permet de stabiliser l'émulsion en réduisant la tension interfaciale et en procurant une force de répulsion électrostatique ou stérique entre les globules [9]. Une trop grande concentration de surfactant peut toutefois entraîner le mûrissement d'Oswald. Néanmoins, il est possible de produire des émulsions dont la stabilité est satisfaisante, comme en témoignent les émulsions mises sur le marché dont il sera fait mention plus loin.

Tout comme les autres types de vecteurs, les nanoémulsions, des émulsions dont la taille des gouttelettes est inférieure à 1 μm , sont sujettes à la capture par le MPS. De plus, elles sont susceptibles d'être métabolisées par des lipases suite à l'adsorption d'apolipoprotéines (apos) à leur surface [9]. D'un autre côté, les nanoémulsions, en acquérant des apos B ou apos E ou en se liant à des lipoprotéines de faible densité (LDL), peuvent être internalisées préférentiellement par des cellules tumorales surexprimant des récepteurs LDL [42, 43]. Il est possible d'influencer le devenir des nanoémulsions *in vivo*, dépendamment de ce que l'on vise, par le choix des huiles et des surfactants utilisés [44, 45]. Le processus de préparation des émulsions permet également un contrôle sur la taille des gouttelettes qui a elle-même un impact majeur sur le comportement des émulsions suite à leur injection par la voie i.v. [5]. Tel que mentionné plus tôt, il est également possible de PÉGyler, c'est-à-dire d'entourer de PEG, des nanoémulsions afin de rendre ces dernières furtives. De plus,

le PEG crée une répulsion stérique entre les gouttelettes, ce qui augmente la stabilité de l'émulsion [5]. Les nanoémulsions ont l'avantage d'être faciles à produire sur une grande échelle [40], d'être biocompatibles et de pouvoir solubiliser de grandes quantités de principe actif lipophile, un avantage non négligeable étant donné le défi de solubilisation que pose beaucoup de molécules anticancéreuses [1].

Des émulsions H/E contenant des huiles végétales émulsifiées et destinées à une administration parentérale ont fait leur entrée dans le domaine médical il y a déjà plus de 40 ans. Des formulations telles l'Intralipid[®], l'Intrafat[®] et le Lipofundin[®] sont utilisées en nutrition parentérale comme source de lipides [46]. Diprivan[®] est une émulsion injectable utilisée quant à elle pour l'administration d'un anesthésiant, le propofol [47]. Bien qu'il y ait des émulsions utilisées comme vecteurs de médicaments anticancéreux en développement, aucune formulation n'a encore atteint le stade de la commercialisation. Le Tocosol[®], une nanoémulsion de paclitaxel ayant démontré une activité anti-tumorale supérieure à celle du Taxol[®] en phase II [48], a finalement été abandonnée suite à une étude de phase III. Comparativement au Taxol[®], la formulation commerciale du paclitaxel, le Tocosol[®] présentait un taux de réponse inférieur et des effets secondaires plus importants (neutropénie et neutropénie fébrile).

3.5.5.1. Les nanoémulsions de DTX et de TB et les objectifs du projet

Au cours de ce travail de maîtrise, nous avons mis au point des nanoémulsions de DTX dont une partie de la phase huileuse est constituée de TB. Cette dernière, dont l'hydrolyse de chaque mole libère 3 moles d'acide butyrique, présente une demi-vie supérieure à l'acide butyrique. Outre ses propriétés

anticancéreuses, la TB est un excellent solvant pour le DTX, permettant d'en dissoudre jusqu'à 108 mg/mL [49]. La plupart des travaux *in vivo* publiés sur la TB traitent de son administration par la voie orale [50-52]. Il existe un nombre limité d'études rapportant la fabrication de nanoémulsions de TB dans l'optique d'une administration i.v. Des nanoémulsions contenant de la TB (5, 10 et 15%) comme source d'acide butyrique ont toutefois déjà été préparées et administrées par perfusion i.v. chez des rats [43]. Un résultat intéressant de cette étude est l'élimination plus rapide de la TB chez des rats dont l'expression des récepteurs LDL a été augmentée par un prétraitement au 17- α -éthynylestradiol. Les mêmes auteurs avaient conclu que leur émulsion pouvait être internalisée *via* ces récepteurs après avoir acquis des apos à leur surface [42]. Néanmoins, au meilleur de nos connaissances, des nanoémulsions de TB n'ont jamais été utilisées pour une administration i.v. de DTX. L'action anticancéreuse de la TB ainsi que sa grande capacité à solubiliser le DTX nous a laissé entrevoir l'intérêt de développer des nanoémulsions stables combinant les deux agents. L'interaction entre ces deux substances devait ensuite être étudiée. La découverte d'un effet synergique était souhaitable et espéré suite à la démonstration d'un effet synergique entre le DTX et l'isobutyramide, une molécule analogue à la TB [53]. Le but ultime était donc de développer des nanoémulsions dont le ciblage tumoral permettrait l'atteinte d'une concentration cytotoxique de TB au sein des tumeurs et l'administration d'une plus grande dose de DTX sans augmenter les effets secondaires.

Le prochain chapitre présente les résultats obtenus lors de ce travail de maîtrise sous forme d'article scientifique. Les objectifs de ce travail étaient les suivants :

- 1) Sélectionner une lignée cellulaire sensible au DTX et à la TB.
 - a. Mesurer la cytotoxicité de la TB, du DTX et de la combinaison du DTX et de la TB.
 - b. Déterminer le type d'interaction entre le DTX et la TB.
 - c. Étudier l'impact de la séquence d'exposition sur l'interaction entre le DTX et la TB.

- 2) Préparer des nanoémulsions de DTX, de TB et des deux agents.
 - a. Mesurer la cytotoxicité de ces émulsions sur la lignée précédemment choisie.

- 3) Mesurer le taux d'apoptose provoqué par la TB.
 - a. Comparer les taux d'apoptose induits par la TB et une nanoémulsion de TB.
 - b. Comparer les taux d'apoptose induits sur deux lignées cellulaires, l'une sensible et l'autre insensible à la TB.

- 4) Évaluer la toxicité des nanoémulsions combinant le DTX et la TB *in vivo*.

Références

1. Torchilin V. P., *Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging*. AAPS Journal, 2007. **9**(2): p. E128-47.
2. Couvreur P. and Vauthier C., *Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease*. Pharmaceutical Research, 2006. **23**(7): p. 1417-50.
3. Torchilin V. P., *Multifunctional nanocarriers*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2006. **58**(14): p. 1532-55.
4. Hoarau D., Delmas P., David S., Roux E., and Leroux J. C., *Novel long-circulating lipid nanocapsules*. Pharm Res, 2004. **21**(10): p. 1783-9.
5. Moghimi S. M., Hunter A. C., and Murray J. C., *Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(2): p. 283-318.
6. Greish K., Fang J., Inutsuka T., Nagamitsu A., and Maeda H., *Macromolecular therapeutics: advantages and prospects with special emphasis on solid tumour targeting*. Clinical Pharmacokinetics, 2003. **42**(13): p. 1089-105.
7. Harris J. M., Martin N. E., and Modi M., *Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics*. Clinical Pharmacokinetics, 2001. **40**(7): p. 539-51.
8. Rossi J., Giasson S., Khalid MN., Delmas P., Allen C., and Leroux JC., *Long-circulating poly(ethylene glycol)-coated emulsions to target solid tumors*. Eur J Pharm Biopharm, 2007. **67**(2): p. 329-338.
9. Tamilvanan S., *Oil-in-water lipid emulsions: implications for parenteral and ocular delivering systems*. Progress in Lipid Research, 2004. **43**(6): p. 489-533.
10. Jensen G. M. and Bunch T. H., *Conventional liposome performance and evaluation: lessons from the development of Vescan*. Journal of Liposome Research, 2007. **17**(3-4): p. 121-37.
11. Widakowich C., de Azambuja E., Gil T., Cardoso F., Dinh P., Awada A., and Piccart-Gebhart M., *Molecular targeted therapies in breast cancer: where are we now?* International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007. **39**(7-8): p. 1375-87.
12. Wang Y., Yu L., Han L., Sha X., and Fang X., *Difunctional Pluronic copolymer micelles for paclitaxel delivery: synergistic effect of folate-mediated targeting and Pluronic-mediated overcoming multidrug resistance in tumor cell lines*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. **337**(1-2): p. 63-73.

13. Sethuraman V. A. and Bae Y. H., *TAT peptide-based micelle system for potential active targeting of anti-cancer agents to acidic solid tumors*. Journal of Controlled Release, 2007. **118**(2): p. 216-24.
14. Hu Z., Luo F., Pan Y., Hou C., Ren L., Chen J., Wang J., and Zhang Y., *Arg-Gly-Asp (RGD) peptide conjugated poly(lactic acid)-poly(ethylene oxide) micelle for targeted drug delivery*. Journal of Biomedical Materials Research. Part A, 2008. **85**(3): p. 797-807.
15. Iinuma H., Maruyama K., Okinaga K., Sasaki K., Sekine T., Ishida O., Ogiwara N., Johkura K., and Yonemura Y., *Intracellular targeting therapy of cisplatin-encapsulated transferrin-polyethylene glycol liposome on peritoneal dissemination of gastric cancer*. International Journal of Cancer, 2002. **99**(1): p. 130-7.
16. Dagar S., Krishnadas A., Rubinstein I., Blend M. J., and Onyüksel H., *VIP grafted sterically stabilized liposomes for targeted imaging of breast cancer: in vivo studies*. Journal of Controlled Release, 2003. **91**(1-2): p. 123-33.
17. Pirollo K. F., Zon G., Rait A., Zhou Q., Yu W., Hogrefe R., and Chang E. H., *Tumor-targeting nanoimmunoliposome complex for short interfering RNA delivery*. Human Gene Therapy, 2006. **17**(1): p. 117-24.
18. David A., Kopeckova P., Minko T., Rubinstein A., and Kopecek J., *Design of a multivalent galactoside ligand for selective targeting of HPMA copolymer-doxorubicin conjugates to human colon cancer cells*. European Journal of Cancer, 2004. **40**(1): p. 148-57.
19. Goldstein D., Gofrit O., Nyska A., and Benita S., *Anti-HER2 cationic immunoemulsion as a potential targeted drug delivery system for the treatment of prostate cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(1): p. 269-75.
20. Christie R. J. and Grainger D. W., *Design strategies to improve soluble macromolecular delivery constructs*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2003. **55**(3): p. 421-37.
21. Nori A. and Kopecek J., *Intracellular targeting of polymer-bound drugs for cancer chemotherapy*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2005. **57**(4): p. 609-36.
22. Roux E., Francis M., Winnik F. M., and Leroux J. C., *Polymer based pH-sensitive carriers as a means to improve the cytoplasmic delivery of drugs*. International Journal of Pharmaceutics, 2002. **242**(1-2): p. 25-36.
23. Yang M., Ding Y., Zhang L., Qian X., Jiang X., and Liu B., *Novel thermosensitive polymeric micelles for docetaxel delivery*. Journal of Biomedical Materials Research. Part A, 2007. **81**(4): p. 847-57.

24. Han H. D., Shin B. C., and Choi H. S., *Doxorubicin-encapsulated thermosensitive liposomes modified with poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide): drug release behavior and stability in the presence of serum*. European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics, 2006. **62**(1): p. 110-6.
25. Duncan R., *Polymer conjugates as anticancer nanomedicines*. Nature Reviews. Cancer, 2006. **6**(9): p. 688-701.
26. Cole B. F., Glantz M. J., Jaeckle K. A., Chamberlain M. C., and Mackowiak J. I., *Quality-of-life-adjusted survival comparison of sustained-release cytosine arabinoside versus intrathecal methotrexate for treatment of solid tumor neoplastic meningitis*. Cancer, 2003. **97**(12): p. 3053-60.
27. Keam S. J., Scott L. J., and Curran M. P., *Verteporfin : a review of its use in the management of subfoveal choroidal neovascularisation*. Drugs, 2003. **63**(22): p. 2521-54.
28. Immordino M. L., Brusa P., Arpicco S., Stella B., Dosio F., and Cattel L., *Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing docetaxel*. Journal of Controlled Release, 2003. **91**(3): p. 417-29.
29. Nishiyama N., Kato Y., Sugiyama Y., and Kataoka K., *Cisplatin-loaded polymer-metal complex micelle with time-modulated decaying property as a novel drug delivery system*. Pharmaceutical Research, 2001. **18**(7): p. 1035-41.
30. Gaucher G., Dufresne M. H., Sant V. P., Kang N., Maysinger D., and Leroux J. C., *Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery*. J Controlled Release, 2005. **109**(1-3): p. 169-88.
31. Chen H., Kim S., Li L., Wang S., Park K., and Cheng J. X., *Release of hydrophobic molecules from polymer micelles into cell membranes revealed by Forster resonance energy transfer imaging*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(18): p. 6596-601.
32. Kim T. Y., Kim D. W., Chung J. Y., Shin S. G., Kim S. C., Heo D. S., Kim N. K., and Bang Y. J., *Phase I and pharmacokinetic study of Genexol-PM, a cremophor-free, polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies*. Clinical Cancer Research, 2004. **10**(11): p. 3708-16.
33. Kim D. W., Kim S. Y., Kim H. K., Kim S. W., Shin S. W., Kim J. S., Park K., Lee M. Y., and Heo D. S., *Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a novel Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, with cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer*. Annals of Oncology, 2007. **18**(12): p. 2009-14.

34. Elsabahy M., Perron M. E., Bertrand N., Yu G. E., and Leroux J. C., *Solubilization of docetaxel in poly(ethylene oxide)-block-poly(butylene/styrene oxide) micelles*. *Biomacromolecules*, 2007. **8**(7): p. 2250-7.
35. Soppimath K. S., Aminabhavi T. M., Kulkarni A. R., and Rudzinski W. E., *Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices*. *Journal of Controlled Release*, 2001. **70**(1-2): p. 1-20.
36. Musumeci T., Ventura C. A., Giannone I., Ruozi B., Montenegro L., Pignatello R., and Puglisi G., *PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel*. *Int J Pharm*, 2006. **325**(1-2): p. 172-9.
37. Muller R. H. and Keck C. M., *Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs--a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles*. *Journal of Biotechnology*, 2004. **113**(1-3): p. 151-70.
38. Serpe L., Laurora S., Pizzimenti S., Ugazio E., Ponti R., Canaparo R., Briatore F., Barrera G., Gasco M. R., Bernengo M. G., Eandi M., and Zara G. P., *Cholesteryl butyrate solid lipid nanoparticles as a butyric acid pro-drug: effects on cell proliferation, cell-cycle distribution and c-myc expression in human leukemic cells*. *Anti-Cancer Drugs*, 2004. **15**(5): p. 525-36.
39. Hennenfent K. L. and Govindan R., *Novel formulations of taxanes: a review. Old wine in a new bottle?* *Ann. Oncol.*, 2006. **17**(5): p. 735-49.
40. Sarker D. K., *Engineering of nanoemulsions for drug delivery*. *Current Drug Delivery*, 2005. **2**(4): p. 297-310.
41. Rossi J. and Leroux J. C., *Principles in the development of intravenous lipid emulsions*, in *Role of lipid excipients in modifying oral and parenteral drug delivery : basic principles and biological examples* K.M. Wasan, Editor. 2007, John Wiley & Sons, Inc. : Hoboken.
42. Su J. and Ho P. C., *Preparation of tributyrin emulsion and characterization of the binding of the emulsion particles to low-density lipoprotein in vitro*. *J Pharm Sci*, 2004. **93**(7): p. 1755-65.
43. Su J., He L., Zhang N., and Ho P. C., *Evaluation of tributyrin lipid emulsion with affinity to low-density lipoprotein: pharmacokinetics in adult male Wistar rats and cellular activity on Caco-2 and HepG2 cell lines*. *J Pharmacol Exp Ther* 2006. **316**(1): p. 62-70.
44. Redgrave T. G., Rakic V., Mortimer B. C., and Mamo J. C., *Effects of sphingomyelin and phosphatidylcholine acyl chains on the clearance of triacylglycerol-rich lipoproteins from plasma. Studies with lipid emulsions in rats*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992. **1126**(1): p. 65-72.

45. Hultin M., Mullertz A., Zundel M. A., Olivecrona G., Hansen T. T., Deckelbaum R. J., Carpentier Y. A., and Olivecrona T., *Metabolism of emulsions containing medium- and long-chain triglycerides or interesterified triglycerides*. Journal of Lipid Research, 1994. **35**(10): p. 1850-60.
46. Rensen P. C., de Vruhe R. L., Kuiper J., Bijsterbosch M. K., Biessen E. A., and van Berkel T. J., *Recombinant lipoproteins: lipoprotein-like lipid particles for drug targeting*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **47**(2-3): p. 251-76.
47. Sun N. C., Wong A. Y., and Irwin M. G., *A comparison of pain on intravenous injection between two preparations of propofol*. Anesthesia & Analgesia, 2005. **101**(3): p. 675-8.
48. Constantinides P. P., Chaubal M. V., and Shorr R., *Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008. **60**(6): p. 757-67.
49. Huynh L., Grant J., Leroux J. C., Delmas P., and Allen C., *Predicting the solubility of the anti-cancer agent docetaxel in small molecule excipients using computational methods*. Pharmaceutical Research, 2008. **25**(1): p. 147-57.
50. Edelman M. J., Bauer K., Khanwani S., Tait N., Trepel J., Karp J., Nemieboka N., Chung E. J., and Van Echo D., *Clinical and pharmacologic study of tributyrin: an oral butyrate prodrug*. Cancer Chemother Pharmacol, 2003. **51**(5): p. 439-44.
51. Egorin M. J., Yuan Z. M., Sentz D. L., Plaisance K., and Eiseman J. L., *Plasma pharmacokinetics of butyrate after intravenous administration of sodium butyrate or oral administration of tributyrin or sodium butyrate to mice and rats*. Cancer Chemother Pharmacol, 1999. **43**(6): p. 445-53.
52. Conley B. A., Egorin M. J., Tait N., Rosen D. M., Sausville E. A., Dover G., Fram R. J., and Van Echo D. A., *Phase I study of the orally administered butyrate prodrug, tributyrin, in patients with solid tumors*. Clin. Cancer Res., 1998. **4**(3): p. 629-34.
53. Miyake H., Hara S., Arakawa S., Kamidono S., and Hara I., *Overexpression of Bcl-2 regulates sodium butyrate- and/or docetaxel-induced apoptosis in human bladder cancer cells both in vitro and in vivo*. Int J Cancer, 2001. **93**(1): p. 26-32.

CHAPITRE 4 : PRÉSENTATION DE L'ARTICLE

An investigation on the use of tributyrin nanoemulsions for docetaxel delivery

Marie-Ève Perron, François Plourde, Simon Guérard, Loan Huynh, Christine Allen
and
Jean-Christophe Leroux

Abstract

Tributylin, an oil with anticancer properties, is a good solubilizer for docetaxel, an agent used in the treatment of several cancers. In this manuscript, the interaction between tributyrin and docetaxel was investigated *in vitro* in search of a potential synergistic effect. Then, nanosized emulsions (ca. 100 nm) combining both tributyrin and docetaxel were developed and tested for their cell growth inhibition properties and their systemic toxicity in healthy mice. Tributyrin alone or in combination with docetaxel, and formulated or not in a nanoemulsion, was found to exhibit a modest *in vitro* antimitotic activity. No synergy could be detected under the conditions tested. Furthermore, no induction of apoptosis was revealed by flow cytometry experiments when treating HL-60 and PC-3 cells with tributyrin. When injected intravenously to mice as a nanoemulsion, the docetaxel/tributyrin combination displayed extreme toxicity. Therefore, the current data preclude its combination with docetaxel in nanoemulsions for intravenous administration.

Key words: docetaxel – tributyrin – butyrate – nanoemulsions – chemotherapy - apoptosis.

Introduction

Docetaxel (DTX) is an anticancer drug whose primary effect is to promote microtubulin assembly and prevent depolymerisation of the microtubules [1]. It is approved by the US Food and Drug Administration for the treatment of breast, ovarian, prostate and non-small-cell lung cancer [2]. DTX is a highly hydrophobic molecule that is solubilized in polysorbate 80 (Taxotere[®]) (TXT) for intravenous (i.v.) injection. Side-effects of the treatment include haematological toxicity and neuropathy due to DTX [3, 4], and hypersensitivity reactions attributed to polysorbate 80 [3]. In order to increase the drug's therapeutic index, efforts are being made to develop polysorbate 80-free formulations and improve the delivery of DTX to tumor sites. To achieve this objective, DTX has been incorporated into several types of nanosized drug carriers such as liposomes [5], micelles [6] and nanoemulsions (NEs) [7], which can passively accumulate into malignant tissues through the enhanced permeability and retention (EPR) effect [8, 9]. Besides targeting, another strategy to increase the efficiency of chemotherapy is to combine compounds with additive or synergistic curative activity while avoiding additive side-effects. Therefore, an ideal delivery system for DTX would be one devoid of polysorbate 80, capable of targeting the drug to tumoral tissues, and exerting an additive or synergistic cytotoxic effect.

Tributylin (TB) is a triglyceride containing three butyrate moieties esterified to glycerol. It can be hydrolysed by plasma esterases or cellular lipases or esterases into butyric acid, a histone deacetylase (HDAC) inhibitor. Inhibiting HDACs is of interest in cancer therapy since these enzymes are responsible for a loss in lysine acetylation, which is a phenomenon that has been identified as the first step in the gene silencing that occurs in cancerous cells [10]. Short-chain fatty acids such as

butyric acid are HDAC inhibitors that have shown promising results for the treatment of leukemia [10]. However, their lack of specificity as well as their low oral bioavailability [10] led researchers to investigate prodrugs of butyric acid such as TB. The latter possesses multiple advantages over butyrate including higher blood stability, greater potency and more favourable pharmacokinetic properties [10-12]. It was shown that TB causes apoptosis [13], induces cell differentiation [14] and has anti-angiogenic effects [15]. Despite the encouraging results obtained, the mechanism by which TB exerts its action is not clearly defined. The interaction between TB and DTX is unknown, but interestingly, another butyrate analogue, namely isobutyramide, was shown to display a synergistic interaction with DTX, both *in vitro* and *in vivo* [16].

Aside from its antitumoral activity, TB is an excellent solubilizer for taxanes [17]. It can dissolve up to 108 mg/mL of DTX at room temperature [18]. Therefore, given its interesting physicochemical and pharmacological characteristics, we hypothesized that TB, formulated as a NE, could prove to be an efficient excipient for the parenteral delivery of DTX. In the past, most of the *in vivo* investigations performed with TB have involved the oral route of administration [19-21]. However, TB emulsions have recently been prepared [22] and perfused intravenously to rats as a source of butyric acid [23]. So far, no NE combining TB and DTX for i.v. injection has been reported. Accordingly, the objectives of this manuscript were twofold. Firstly, the potential additive or synergistic effects of the TB/DTX combination were investigated in several tumoral cell lines. Secondly, NEs containing both components were developed, and assessed for their *in vitro* cytotoxic activity and tolerability after i.v. injection into healthy mice.

1. Materials and Methods

1.1 Preparation of NEs

The typical compositions of the four different NEs used in the *in vitro* experiments are given in Table 4-1. Specific compositions of the NEs used in the *in vivo* experiments are shown in Table 4-2.

Table 4-1: Composition and size of NEs used in the cell assays

Formulation	DTX (mg)	TB (mg)	Labrafac CC (mg)	Solutol HS15 (mg)	NaCl 0.9% (w/v) (mL)	Diameter (nm) [PI]
NE-control	0	0	495	306	14.2	129 [0.16]
NE/TB	0	99	396	306	14.2	113 [0.16]
NE/DTX	5	0	495	306	14.2	124 [0.13]
NE/TB/DTX	5	99	396	306	14.2	112 [0.16]

PI = polydispersity index

Table 4-2: Composition and size of formulations injected in the *in vivo* toxicity study

Formulation	1	2	3	4
DTX (mg)	62	61	61	61
TB (mg)	-	2454	2454	245
Labrafac CC (mg)	6145	3682	3682	5891
Solutol HS15 (mg)	3793	3803	3803	3803
NaCl 0.9% (w/v) (mL)	10	10	10	10
Diameter (nm)	98	96	96	104
Polydispersity index	0.08	0.14	0.14	0.12
TB injected (mg/kg)	0	800	200	80
DTX injected (mg/kg)	20	20	5	20
Number of mice injected	10	4	10	10
Number of toxic deaths	0	4	3	0

Labrafac[®] CC (caprylic/capric triglycerides) (Gattefossé S.A., Saint-Priest, France), DTX (Shanghai Fudan Taxusal New Technology Co., Shanghai, China) and TB (purity ~99%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were mixed at 70°C/630 rpm for 30 min. Solutol[®] HS15 (PEG 660 12-hydroxystearate) (BASF, Ludwigshafen, Germany), was added and the solutions were mixed at 40°C/840 rpm for 15 min. A solution of 0.9% (w/v) NaCl (Braun Medical Inc., Irvine, CA) was then added to the oil phase and mixed for 10 min under the same conditions. The NEs were finally homogenized at 10,000 psi for 105 s using an EmulsiFlex[®]-C3 homogenizer (Avestin Inc., Ottawa, ON, Canada) and passed through 0.45- μ m sterile nylon filters prior to their use. The mean hydrodynamic diameter and size distribution were determined at 25°C by dynamic light scattering with a Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK). Measurements were performed in triplicate after dilution of the emulsions in water, before and after filtration. To determine the drug loss upon filtration (~13%), a NE/TB/DTX emulsion (Table 4-1) was prepared and radiolabelled with trace amounts of DTX (60 mCi/mmol, American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, MO).

1.2 Stability of NEs

The physical stability of the nanoemulsion was assessed by size measurements performed as described in the previous paragraph, after storage of the emulsions in the dark, at 4°C. The nanoemulsions were observed under an Axiovert S100 microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) to detect docetaxel crystallisation. After storage in the dark, at room temperature, chemical stability of DTX in the emulsion was monitored by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis (Agilent Technologies series 1200 Liquid Chromatograph; Mississauga, On,

Canada) with an XTerra C₁₈ reverse-phase column (particle size: 5 µm) of dimensions 4.6 x 250 mm (Waters Inc., Milford, MA). DTX and its 7-epimer were extracted from the emulsion using a mixture of acetonitrile and hexane (1:1, v/v). The concentrations of DTX and 7-epimer were detected at a wavelength of 227 nm. The retention times were approximately 7.5 min and 11.5 min for DTX and the 7-epimer, respectively, at a flow rate of 1.0 mL/min. The proportion of epimer was calculated as follows:

$$\% \text{ Epimer} = \frac{\text{peak area of epimer}}{\text{peak area of epimer} + \text{peak area of DTX}} * 100 \quad \text{Eq.1}$$

1.3 Cell culture

All cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Culture media, sodium-pyruvate, penicillin G / streptomycin (pen-strep) (100 U/mL) and trypsin EDTA 0.25% were purchased from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Logan, UT) was heat-inactivated (56 °C, 30 min) prior to its addition to the culture medium. B16F10 and A-549 cells were maintained in DMEM high-glucose medium containing 10% (v/v) FBS and 1% (v/v) pen-strep. OVCAR-3 cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 20% FBS, 1% pen-strep, 10 mM HEPES (Sigma-Aldrich) and 1 mM sodium pyruvate. HL-60 cells were maintained in RPMI 1640 with 20% FBS and 1% pen-strep. MCF-7 and PC-3 were cultured in RPMI 1640 containing 10% FBS and 1% pen-strep. Adherent cells were detached with trypsin EDTA 0.25% and re-seeded when 70-90% confluence was reached. HL-60 suspensions were routinely diluted with fresh medium to maintain cell density between 1x10⁵ and 1x10⁶ cells/mL.

1.4 Cytotoxicity assays

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT), sodium dodecyl sulphate (SDS), NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ and polysorbate 80 were obtained from Sigma-Aldrich. Unformulated DTX and TB solutions were prepared by dissolving the compounds in ethanol, followed by dilution with culture medium. The maximum ethanol concentration to which cells were exposed (< 0.1% v/v) had no effect on cell viability. The TXT formulation consisted of polysorbate 80/ethanol/DTX (72.8:24.3:2.9 wt%). Filtered NEs (Table 4-1) and TXT were diluted with cell culture medium prior to use. Adherent cells were seeded in 96-well plates at a density of 1×10^3 (B16F10 cells) or 5×10^3 cells/well. The medium (100 μ L) was replaced after 24 h, 20 μ L of the DTX/TB solutions were added, and the cells were incubated for a total of 72 h. In the case of non-adherent HL-60 cells, the latter were suspended at a density of 1×10^4 cells/well 3 h before drug addition. For assays where DTX and TB were added sequentially, cells were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) (NaCl 75 mM, Na₂HPO₄ 53 mM, NaH₂PO₄ 13 mM; pH 7.4) and fed with fresh medium before the addition of the second agent. At the end of the incubation period, cells were rinsed with PBS, fed with 100 μ L of fresh medium and allowed to grow for 24 h. They were then exposed to 10 μ L/well of a filtered (0.22 μ m) MTT solution (5 mg/mL in PBS). After a 3.5-h incubation time, 100 μ L of SDS solution (10% in HCl 0.01 N) were added to each well to dissolve the blue formazan product generated by living cells. Absorbance was read at 570 nm using a Tecan Safire plate reader (Durham, NC). All MTT assays were performed in triplicate, using at least three wells per condition. Sigmoidal curves were built using Origin 5.0 software (Microcal Software Inc., Northampton, MA) and IC₅₀ was defined as the concentration resulting in 50% cell viability. Differences between IC₅₀ values of

different drug combinations were analyzed for statistical significance by the Kruskal–Wallis test followed by Nemenyi’s post hoc test for multiple comparisons. The combination effects of DTX and TB were analyzed by calculation of the combination indices (CI) using the equation for mutually nonexclusive drugs (Equation 2):

$$CI = (D)_1/(D_x)_1 + (D)_2/(D_x)_2 + (D)_1(D)_2/(D_x)_1(D_x)_2 \quad \text{Eq. 2}$$

where $(D)_1$ and $(D)_2$ are the concentration of TB and DTX for which a given percentage of viability was observed when they were used in combination, and $(D_x)_1$ and $(D_x)_2$ are the concentrations of TB and DTX for which the same effect was observed when they were tested separately. This equation was used since the effect exclusivity of the two compounds could not be ascertained due to the limited concentration range in which TB was effective, and also because the drugs are not known to have a similar mode of action. According to this equation, when $CI=1$, $CI<1$, or $CI >1$, the interaction is additive, synergistic or antagonistic, respectively [24].

1.5 Apoptosis assays

Apoptosis experiments were performed in quadruplicate following the protocol described in the annexin V-FITC (ann.V) apoptosis detection kit (Sigma Aldrich). PC-3 cells were seeded in 25-cm² culture flasks at a density of 5×10^4 cells/mL (9 mL). The medium was renewed 24 h later, followed by the addition of 1 mL of either culture medium, TB solution, NE-control or NE/TB (Table 4-1). HL-60 cells were suspended at a density of 1×10^5 cells/mL (18 mL) 3 h before the addition of 2 mL of the same formulations. Cells were exposed for 48 or 72 h. At

the end of the treatment, PC-3 floating cells were collected. Adherent cells were detached with trypsin EDTA 0.25% and added to the floating cells. In the case of HL-60 cells, 10 mL of the suspension were collected. Both cell lines were rinsed with PBS and re-suspended in the binding buffer supplied in the kit at a concentration of 1×10^6 cells/mL. Then, 10 μ L of propidium iodide and 5 μ L of annexin V were added to 500 μ L of this cell solution. After exactly 10 min of incubation in the dark, fluorescence intensities were recorded for 10,000 cells with a FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) at a laser excitation wavelength of 488 nm. Results were treated with the BD CellQuest™ Pro software and analyzed for statistical significance by a one-way analysis of variance followed by a Dunnett's test for paired comparisons.

1.6 *In vivo* toxicity study

Female Balb/C mice weighing 17-18 g were purchased from Charles River (St. Constant, QC, Canada). Animal care and studies were approved by the Animal Welfare and Ethics Committee of the Université de Montréal in accordance with the Declaration of Helsinki. Mice were separated in five different groups and received one i.v. injection (150 μ L injected over ~ 90 s) of the NEs formulations (Table 4-2) or TXT (Aventis Pharma Ltd., Dagenham, UK) on day 0. Prior to injection, the NEs and TXT were diluted in NaCl 0.9% (w/v) to adjust the DTX dose. NEs formulations 1 and 4 and TXT were injected again on days 3 and 6. Weight variations were calculated relative to the body weight of the animals before the first injection and recorded over a period of three weeks.

2. Results

2.1 Preparation of NEs

Monodisperse oil-in-water emulsions with a mean diameter of ~100 nm were successfully prepared by high-pressure homogenization using Solutol HS15 as the single emulsifier. Solutol HS15 is considered a safe surfactant and is found in several commercialized parenteral products such as propanidid [25]. DTX was dissolved in the oil phase at 70°C since it can withstand relatively high temperatures in aprotic solvents. However, the oil phase was then mixed at 40°C with Solutol HS15 and the water phase to avoid the potential degradation of DTX (data not shown). It was not possible to produce NEs containing only TB as the oil phase. It had to be diluted with medium chain triglycerides such as Labrafac CC. Up to 12.3% (w/w) TB (40% w/w of the oil phase) could be incorporated without destabilizing the oil droplets. The proportion of DTX in the oil phase was always kept below solubility of DTX in Labrafac CC at room temperature (36.8 mg/mL) in order to avoid the precipitation of the drug upon dilution of TB (DTX solubility: 108 mg/mL) [18] with Labrafac CC. Previous studies have demonstrated that the major degradant of DTX is the 7-epimer that results from structural rearrangement of the hydroxide functional group at the C-7 position [26, 27]. In the present investigation, following storage for up to one week, at room temperature, negligible amounts of 7-epimer (1.0% and 1.6%) were detected in formulation 1 containing no TB and formulations 2 and 3 containing 12.3% TB (Table 4-2). In terms of physical stability, it was verified that the emulsions prepared were stable during the timeframe of the investigations. This implied no change in mean diameter and no drug crystallization for at least 2 weeks (the emulsions used in the cell assay (20% TB w/w in the oil phase) were stable for more than 8 weeks). No

changes in size distribution were observed before and after filtration. The issue of long term stability was not addressed in this work.

2.2 Cytotoxicity assays

The antimitotic activity of TB was assessed in several tumoral cell lines. To avoid the formation of oil deposits at the bottom of the wells, the maximum TB concentration tested did not exceed 0.6 mM. Of all exposed cell lines, HL-60 was the most sensitive to TB ($IC_{50} = 0.15 \pm 0.07$ mM), followed by MCF-7 ($IC_{50} = 0.49 \pm 0.04$ mM). All other cell lines (OVCAR-3, A549, PC-3 and B16F10) were resistant to the oil, with IC_{50} values above 0.6 mM. The cytotoxic activity of DTX was then measured alone or in combination with increasing concentrations of TB (0.01-0.3 mM) in the same cell lines (Table 4-3). Assuming that TB would be retained in the NE after injection, it was estimated that such TB concentrations could be reached in the malignant tissues based on a previous *in vivo* study showing that up to 0.55 mg of NE could deposit per gram of tumor (0.6 mM lipids) after i.v. injection [28]. DTX was cytotoxic at the nM level, with IC_{50} values ranging from 0.8 to 2 nM. The addition of increasing concentrations of TB had a modest impact on the DTX activity as shown in Table 4-3 and in Figure 4.1.

Table 4-3: IC₅₀ values of DTX (nM) administered alone or combined with TB. Mean (± SD) of 3 independent experiments.

	HL-60	OVCAR-3	A-549	PC-3	MCF-7	B16F10
DTX	0.83 (0.55)	0.67 (0.12)	0.77 (0.40)	2.02 (0.80)	1.95 (0.58)	1.80 (1.07)
DTX + 0.01 mM TB	0.73 (0.45)	0.83 (0.18)	0.83 (0.23)	2.36 (0.93)	2.19 (1.02)	2.57 (1.43)
0.1 mM TB	n.a.	0.49 (0.20)	0.80 (0.26)	1.28 (0.79)	1.41 (0.78)	1.92 (1.08)
0.3 mM TB	n.a.	0.50 (0.18)	0.60 (0.17)	1.03 (0.80)	0.59 (0.40)*	1.39 (1.06)

n.a.: not available. Less than 50% cell viability was observed with the lowest, non-toxic concentration of DTX; IC₅₀ could not be calculated. * $p < 0.05$ vs. DTX.

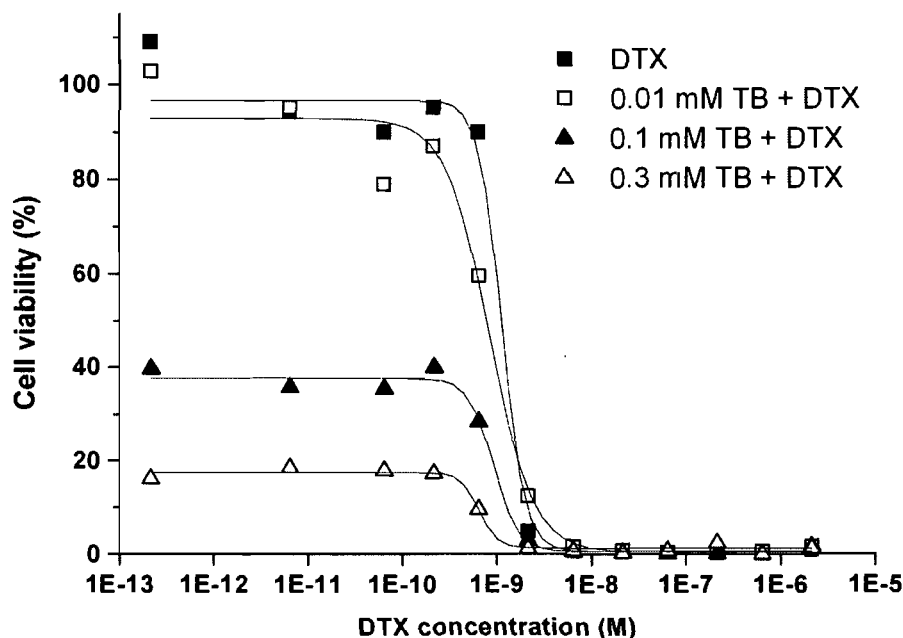


Figure 4.1: Cell viability of HL-60 cells (the most TB-responsive cell line) as a function of DTX concentration. Cells were exposed to DTX and TB (0.01, 0.1, and 0.3 mM) or to DTX alone. A typical cell toxicity profile is represented here.

Whenever possible, CIs were calculated using cell viability values ranging from 25 to 85% for the two TB-sensitive cell lines, *i.e.* HL-60 and MCF-7. The mean combined CIs were 1.41 ± 0.40 and 0.92 ± 0.23 , respectively, suggesting that the TB/DTX combination was slightly antagonistic or additive.

To verify whether the TB/DTX combination effect could be modified by changing the sequence of administration, both compounds were incubated sequentially with the HL-60 cells. Cells were first exposed to different concentrations of DTX for 48 h and then to 0.2 mM TB or culture medium for 24 h or to the inverted sequence (Figure 4.2).

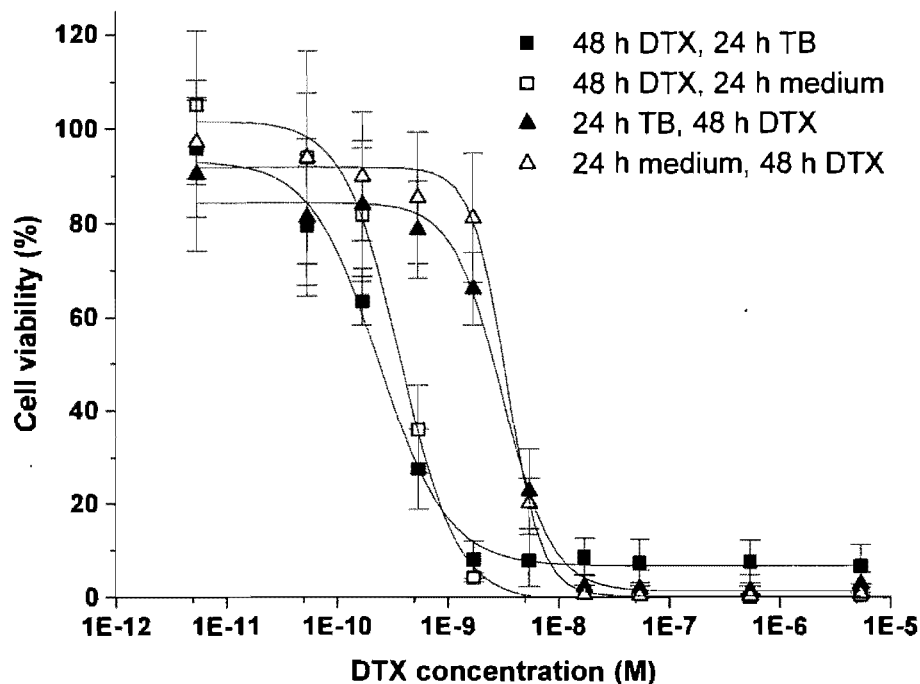


Figure 4.2: HL-60 cell viability as a function of DTX concentration and incubation sequence. Cells were exposed 48 h to DTX followed by 24 h to TB (0.2 mM) or culture medium; or exposed 24 h to TB (0.2 mM) or culture medium, followed by 48 h to DTX. The resulting DTX IC_{50} values were 0.25 ± 0.04 , 0.38 ± 0.10 , 2.5 ± 0.5 and 3.3 ± 0.7 nM, respectively. Mean \pm SD (n=3).

A concentration of 0.2 mM was selected for TB because it caused little toxicity when used alone (~85% cell viability), and thus was deemed appropriate to detect a potential synergistic effect. Toxicity was about 10-fold greater when DTX was administered first (DTX IC_{50} = 0.25 nM for DTX-TB sequence vs. 2.5 nM for TB-DTX sequence). However, as observed for the combination treatment, the contribution of TB was modest, irrespective of the administration sequence (slight decrease in DTX IC_{50} value with administration of TB compared to culture medium).

The NEs cytotoxicity towards HL-60 cells was then assessed in the presence and absence of incorporated TB and DTX. The cell viability profiles of NE-control

and NE/TB (see Table 4-1 for composition) are shown in Figure 4.3 and expressed as a function of Solutol HS15 concentration.

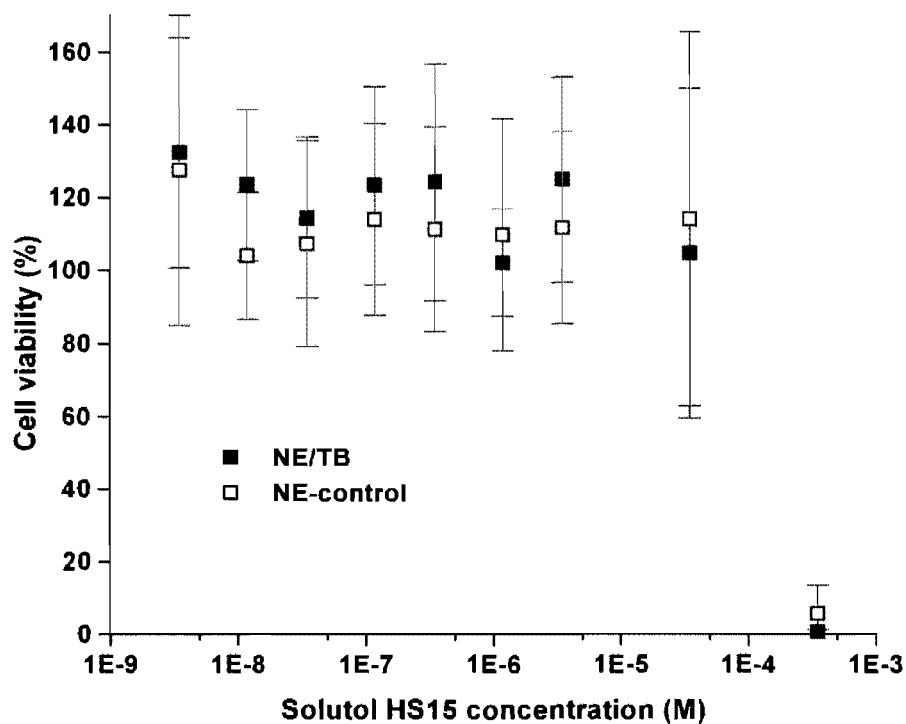


Figure 4.3: HL-60 cell viability as a function of NE-control or NE/TB concentration expressed as Solutol HS15 concentration. The maximum TB concentration in the culture medium was 0.35 mM. Cells were incubated with the emulsions for 72 h. Mean \pm SD (n=3).

Both emulsions did not exhibit significant toxicity up to 0.035 mM of Solutol HS15 (0.034 mg/mL) or \sim 0.35 mM (0.06 mg/mL) total lipids. Above this concentration, NE-control and NE/TB drastically decreased cell viability to a similar extent. The presence of TB (20% w/w) in the oil phase did not significantly modify the toxicity pattern of the emulsion. The DTX IC_{50} values of the NE/DTX and NE/TB/DTX formulations (Table 4-1) were 1.3 ± 0.6 nM and 1.2 ± 0.6 nM,

respectively. These values were not statistically different from the DTX IC₅₀ value of the control TXT formulation (1.8 ± 0.2 nM).

2.3 Apoptosis assays

To gain more insight into the mechanisms by which TB and NE/TB led to cell death, annexin V apoptosis detection tests were performed on HL-60 (TB-sensitive) and PC-3 (TB-insensitive) cells (Figure 4.4). These assays rely on the interaction of annexin V with phosphatidylserine which is translocated to the external leaflet of the cytoplasmic membrane during the early apoptosis stage. To allow comparisons between the two cell lines, a concentration of TB for which an antiproliferative effect was observed on both cell lines was tested (0.6 mM).

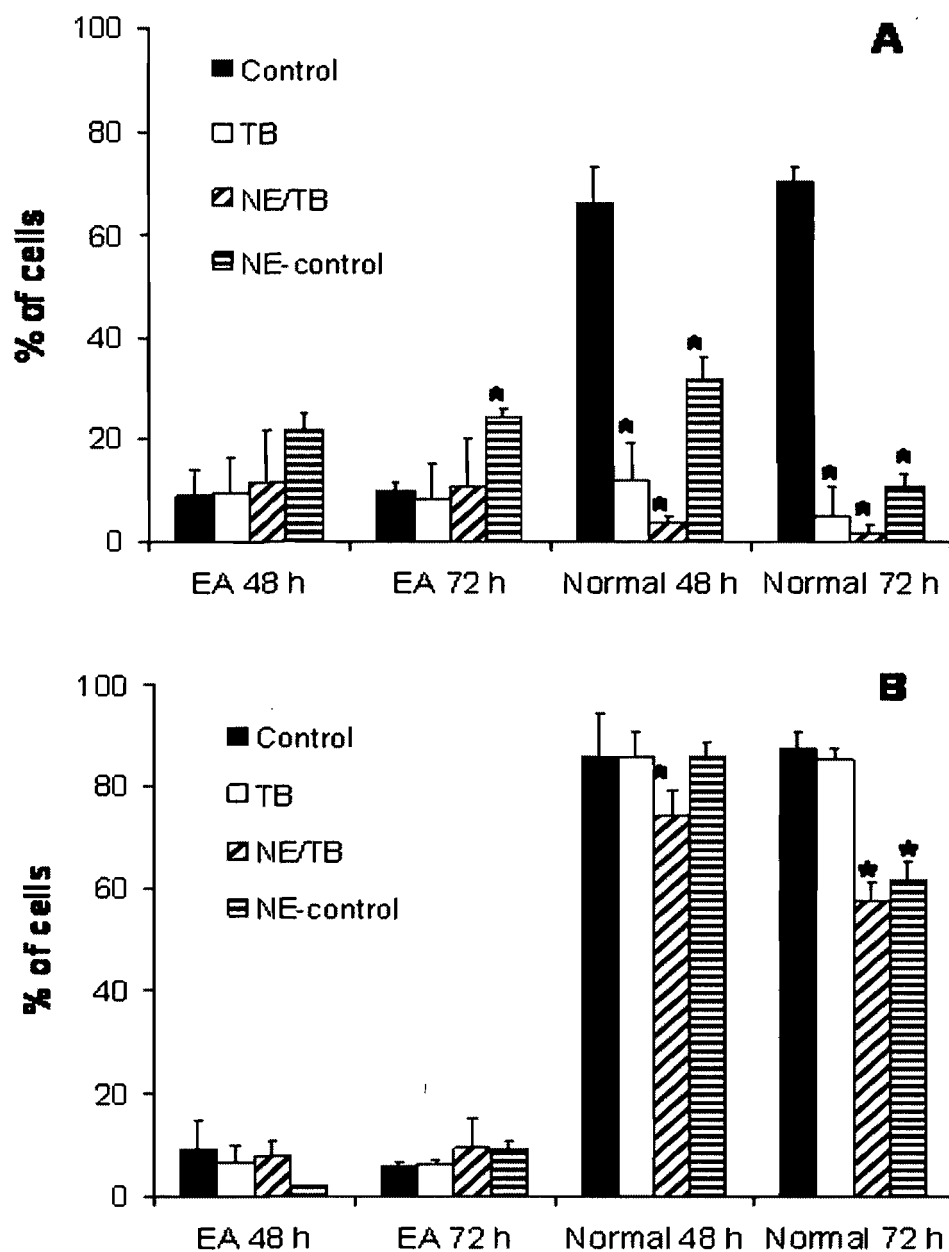


Figure 4.4: Apoptosis assays on HL-60 (A) and PC-3 (B) cells. Percentage of non-fluorescent cells (normal) or in early apoptosis stage (EA) after 48 or 72 h of exposition to culture medium (control), TB-free emulsion (NE-control), 0.6 mM unformulated TB (TB) or 0.6 mM TB incorporated into the emulsion (NE/TB). In the NE-control and NE/TB (see Table 4-1 for composition) the emulsion concentration was 0.58 mM (0.56 mg/mL) expressed as Solutol HS15 concentration. * $p < 0.05$ vs. control. Mean \pm SD (n=4).

In the case of HL-60 cells, exposure to TB, NE-control and NE/TB for 48 and 72 h resulted in a significant decrease in the proportion of cells in the normal stage. The most pronounced effect was observed with the NE/TB formulation. A slight apoptotic effect was seen only with NE-control, after 72 h (Figure 4.4A). For the PC-3 cell line (Figure 4.4B), which was found to be more resistant to TB, a significant decrease in the amount of cells in the normal stage was observed with NE/TB after 48 h and with both NE/TB and NE-control after 72 h. In both cell lines, TB, alone or formulated as a NE (NE/TB), was not found to induce a significant increase in the percentage of cells in the early stage of apoptosis under the conditions investigated.

2.4 *In vivo* toxicity study

In order to determine whether TB could be safely administered when co-formulated with DTX, NEs containing DTX and TB were prepared and injected into healthy mice at TB doses ranging from 80 to 800 mg/kg (formulations 2, 3 and 4, Table 4-2). Mice received 3 injections at days 0, 3 and 6. Formulations 2 and 3, both containing 40% (*w/w*) TB in the oil phase were associated with a high rate of toxic deaths (Table 4-2). The significant lethality associated with formulation 3 was particularly surprising considering the DTX dose injected was 4-times lower than that for formulation 1, a NE with DTX, but containing no TB (Table 4-2), which caused no mortality. Consequently, only mice which were given the formulation 1, formulation 4 (4% (*w/w*) TB in the oil phase) and control TXT were followed for weight loss (Figure 4.5).

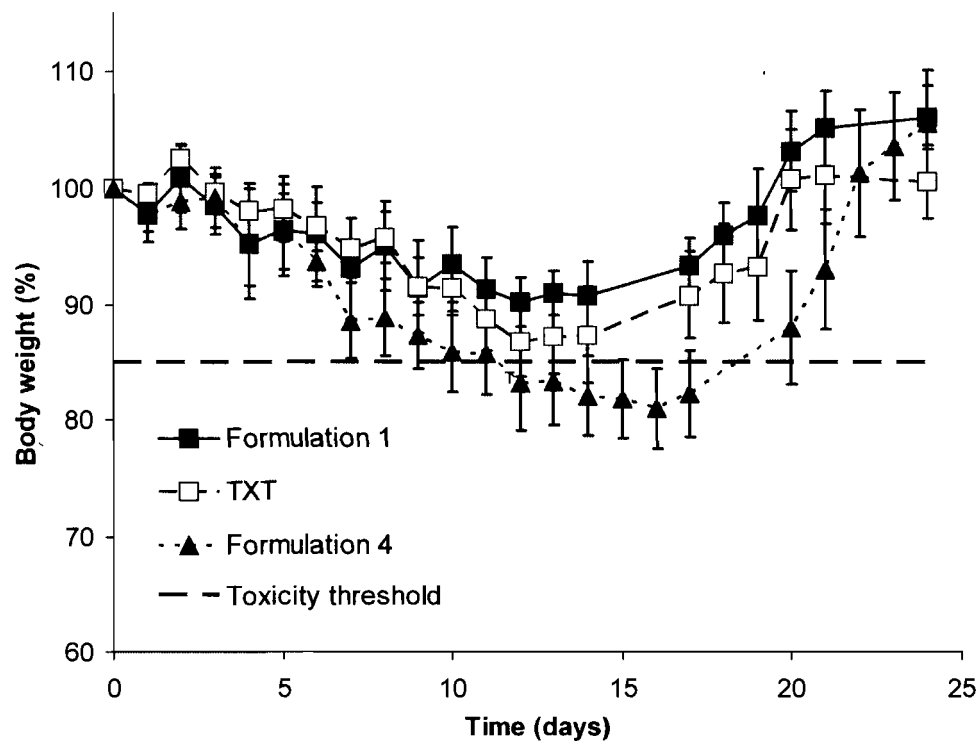


Figure 4.5: Body weight variations of mice that received the indicated formulations on days 0, 3 and 6. Formulation characteristics are given in Table 4-2. Toxicity threshold was defined as a weight loss >15%. Mean \pm SD (n=10).

Maximum weight loss was observed approximately 10 days after the last injection, with formulation 4 exhibiting the highest toxicity. Body weight of mice that received formulation 4 fell under 85% from days 12 to 18. Comparatively, mice that were given formulation 1 and TXT, while presenting similar weight variations, did not lose over 15 % of their body weight during the entire period of observation.

3. Discussion

TB has been reported to inhibit cell growth in several cell lines (HT-29, MCF-7, PC-3, TSU-PRI, LNCaP, SGC-7901) [13, 29-31]. Moreover, it was found that TB induced apoptosis in a time-dependent manner in HT-29 and SGC-7901 cells [31, 32]. It is thought that this triglyceride is cleaved into butyric acid (3 moles of butyric acid per mol of TB) which, *via* inhibition of the HDACs, reactivates expression of crucial genes for regulation of cell function such as differentiation, proliferation and apoptosis [10].

On the other hand, it has been demonstrated repeatedly that oil-based nanocarriers such as NEs [28] and lipid nanocapsules [33] can distribute passively to malignant tissues to an appreciable extent after i.v. administration owing to the EPR effect. Given that TB is a good solubilizer for taxanes and that it could be formulated as an emulsion, it appeared to be of potential value for the delivery of hydrophobic anticancer drugs. Therefore, we investigated the cytotoxic activity of unformulated-DTX and TB, and prepared NEs containing both compounds. In this work, 100-nm NEs containing high levels of TB (up to 40% (*w/w*) of the oil phase) and stabilized by Solutol HS15 were successfully prepared. Interestingly, Solutol HS15-containing lipid nanocapsules were also found to enhance the efficacy of paclitaxel [34], an improvement partially explained by Solutol HS15's capability to inhibit the efflux pump P-gp [35]. As previously reported, TB exhibited a modest antimitotic activity, *i.e.* in the lower mM range for the sensitive cells (HL-60 and MCF-7). In the HL-60 model, treatment with 0.6 mM TB (1.8 mM butyrate after hydrolysis) did not cause an increase in the number of cells in the early stage of apoptosis compared to the control. These results do not support the induction of apoptosis that was previously

observed in HL-60 cells after 24 h of incubation with 1 mM of sodium butyrate [36]. However, a drastic decrease in the number of cells in the normal stage was observed in the present study, suggesting that TB induced necrosis. These apparent discrepancies between the two studies could be explained by the differences in the source of butyrate (sodium butyrate vs. TB), in the incubation times (24 h vs. 48-72 h) and in the total amount of butyrate delivered. As for the PC-3 model, no increase in early apoptotic cells or decrease in the fraction of normal cells could be evidenced in the presence of TB. Similar results had been obtained after treatment of PC-3 cells with 1 mM TB [37].

The combination of TB and DTX resulted at best in an additive effect. No potentiation of the DTX activity could be detected in the two human cell lines (HL-60 and MCF-7) that were most responsive to TB. Moreover, the sequence of administration was also found to have no bearing on the combination effect of TB and DTX. When co-formulated in the emulsion, (Table 4-1), the NE/TB/DTX formulation was found to be equipotent to the NE/DTX and TXT formulations. Indeed, under the *in vitro* conditions tested, the amount of TB delivered to the HL-60 cells in the NE/TB/DTX system was limited because the other components of the emulsion strongly inhibited cell growth before cytotoxic levels of TB (~0.05 mM, corresponding to 0.05 mM of Solutol HS15 in NE/TB) could be reached (Figure 4.3). The toxic effect of NE-control and NE/TB seen at high concentrations might be related to the surface active properties of Solutol HS15 (maximum concentration of 0.034%). Previous experiments evaluating lactate dehydrogenase release and adenosine triphosphate content demonstrated that Solutol HS15 was not cytotoxic up to a concentration of 0.03% [38]. However, the incubation time used in these studies

was 3 times shorter than that employed in the current investigation. The apoptosis assays performed with PC-3 cells (TB-resistant) also revealed that, in the absence of DTX, NE-control and NE/TB produced a significant decrease in the number of cells in the normal stage after 72 h (Figure 4.4B). This effect was not accompanied by an increase of cells in the stage of early apoptosis, suggesting the induction of necrosis at high emulsion (surfactant) concentrations. Altogether, these findings suggest that NEs may not deliver enough TB to the cells to produce a therapeutic benefit. More importantly, the NEs containing both TB and DTX exhibited severe systemic toxicity after i.v. injection into healthy mice even at a TB dose that would be considered acceptable for a parenteral excipient (80 mg/kg). This is in contrast to the weight-loss profile for mice that received the NEs containing DTX but no TB (formulation 1, Table 4-2), which compared favourably to the TXT formulation group. The drastic systemic effect of TB when associated with DTX was unexpected since safe intraperitoneal (i.p.) and i.v. administration of TB in rodents at doses ranging from 263 to 2000 mg/kg have been previously reported [14, 23]. Apart from the possible systemic toxicity of the DTX/TB association, the administration mode (slow bolus vs. perfusion or i.p. injection) and the presence of Solutol HS15 in the NEs may have also potentiated the TB side effects *in vivo*.

In conclusion, given the modest activity of TB, the absence of a synergistic effect when combined with DTX and its intrinsic toxicity, this excipient should be considered with caution when used for the parenteral delivery of hydrophobic anticancer drugs. The current data preclude its combination with DTX in NEs for i.v. injection.

Acknowledgements

This work was financially supported by Bioxel Pharma Inc. (Quebec City, Qc, Canada), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Canada Research Chair program. Geneviève Gaucher and Mahmoud Elsabahy are also acknowledged for their assistance in the correction of this manuscript.

References

1. Herbst R. S. and Khuri F. R., *Mode of action of docetaxel - a basis for combination with novel anticancer agents*. Cancer Treat Rev, 2003. **29**(5): p. 407-15.
2. Hennenfent K. L. and Govindan R., *Novel formulations of taxanes: a review. Old wine in a new bottle?* Ann. Oncol., 2006. **17**(5): p. 735-49.
3. ten Tije A. J., Verweij J., Loos W. J., and Sparreboom A., *Pharmacological effects of formulation vehicles : implications for cancer chemotherapy*. Clin Pharmacokinet, 2003. **42**(7): p. 665-85.
4. Katsumata N., *Docetaxel: an alternative taxane in ovarian cancer*. Br J Cancer, 2003. **89 Suppl 3**: p. S9-S15.
5. Musumeci T., Ventura C. A., Giannone I., Ruozi B., Montenegro L., Pignatello R., and Puglisi G., *PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel*. Int J Pharm, 2006. **325**(1-2): p. 172-9.
6. Gaucher G., Dufresne M. H., Sant V. P., Kang N., Maysinger D., and Leroux J. C., *Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery*. J Controlled Release, 2005. **109**(1-3): p. 169-88.
7. Goldstein D., Gofrit O., Nyska A., and Benita S., *Anti-HER2 cationic immunoemulsion as a potential targeted drug delivery system for the treatment of prostate cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(1): p. 269-75.
8. Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., and Hori K., *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review*. J Controlled Release, 2000. **65**(1-2): p. 271-84.
9. Moghimi S. M., Hunter A. C., and Murray J. C., *Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(2): p. 283-318.
10. Yoo C. B. and Jones P. A., *Epigenetic therapy of cancer: past, present and future*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(1): p. 37-50.
11. Clarke K. O., Feinman R., and Harrison L. E., *Tributyryn, an oral butyrate analogue, induces apoptosis through the activation of caspase-3*. Cancer Lett, 2001. **171**(1): p. 57-65.
12. Planchon P., Pouillart P., Ronco G., Villa P., and Pieri F., *Differential elimination of synthetic butyric triglycerides in vivo: a pharmacokinetic study*. J Pharm Sci, 1993. **82**(10): p. 1046-8.

13. Maier S., Reich E., Martin R., Bachem M., Altug V., Hautmann R. E., and Gschwend J. E., *Tributylin induces differentiation, growth arrest and apoptosis in androgen-sensitive and androgen-resistant human prostate cancer cell lines*. Int J Cancer, 2000. **88**(2): p. 245-51.
14. Kuefer R., Hofer M. D., Altug V., Zorn C., Genze F., Kunzi-Rapp K., Hautmann R. E., and Gschwend J. E., *Sodium butyrate and tributyrin induce in vivo growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer*. Br J Cancer, 2004. **90**(2): p. 535-41.
15. Giermasz A., Nowis D., Jalili A., Basak G., Marczak M., Makowski M., Czajka A., Mlynarczuk I., Hoser G., Stokosa T., Lewandowski S., and Jakobisiak M., *Antitumor activity of tributyrin in murine melanoma model*. Cancer Lett, 2001. **164**(2): p. 143-8.
16. Miyake H., Hara S., Arakawa S., Kamidono S., and Hara I., *Overexpression of Bcl-2 regulates sodium butyrate- and/or docetaxel-induced apoptosis in human bladder cancer cells both in vitro and in vivo*. Int J Cancer, 2001. **93**(1): p. 26-32.
17. Kan P., Chen Z. B., Lee C. J., and Chu I. M., *Development of nonionic surfactant/phospholipid o/w emulsion as a paclitaxel delivery system*. J Controlled Release, 1999. **58**(3): p. 271-8.
18. Huynh L., Grant J., Leroux J.C., Delmas P., and Allen C., *Predicting the solubility of the anti-cancer agent docetaxel in small molecule excipients using computational methods*. Pharm Res, 2008. **25**(1): p. 147-157.
19. Edelman M. J., Bauer K., Khanwani S., Tait N., Trepel J., Karp J., Nemieboka N., Chung E. J., and Van Echo D., *Clinical and pharmacologic study of tributyrin: an oral butyrate prodrug*. Cancer Chemother Pharmacol, 2003. **51**(5): p. 439-44.
20. Egorin M. J., Yuan Z. M., Sentz D. L., Plaisance K., and Eiseman J. L., *Plasma pharmacokinetics of butyrate after intravenous administration of sodium butyrate or oral administration of tributyrin or sodium butyrate to mice and rats*. Cancer Chemother Pharmacol, 1999. **43**(6): p. 445-53.
21. Conley B. A., Egorin M. J., Tait N., Rosen D. M., Sausville E. A., Dover G., Fram R. J., and Van Echo D. A., *Phase I study of the orally administered butyrate prodrug, tributyrin, in patients with solid tumors*. Clin. Cancer Res., 1998. **4**(3): p. 629-34.
22. Su J. and Ho P. C., *Preparation of tributyrin emulsion and characterization of the binding of the emulsion particles to low-density lipoprotein in vitro*. J Pharm Sci, 2004. **93**(7): p. 1755-65.

23. Su J., He L., Zhang N., and Ho P. C., *Evaluation of tributyrin lipid emulsion with affinity to low-density lipoprotein: pharmacokinetics in adult male Wistar rats and cellular activity on Caco-2 and HepG2 cell lines.* J Pharmacol Exp Ther 2006. **316**(1): p. 62-70.
24. Chou T. C. and Talalay P., *Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors.* Adv Enzyme Regul, 1984. **22**: p. 27-55.
25. Strickley R. G., *Solubilizing excipients in oral and injectable formulations.* Pharm Res, 2004. **21**(2): p. 201-30.
26. Tian J. and Stella V.J., *Degradation of paclitaxel and related compounds in aqueous solutions I: Epimerization.* J Pharm Sci, 2007.
27. Vasu Dev R., Moses Babu J., Vyas K., Sai Ram P., Ramachandra P., Sekhar N. M., Mohan Reddy D. N., and Srinivasa Rao N., *Isolation and characterization of impurities in docetaxel.* J Pharm Biomed Anal, 2006. **40**(3): p. 614-22.
28. Rossi J., Giasson S., Khalid MN., Delmas P., Allen C., and Leroux JC., *Long-circulating poly(ethylene glycol)-coated emulsions to target solid tumors.* Eur J Pharm Biopharm, 2007. **67**(2): p. 329-338.
29. Schroder C., Eckert K., and Maurer H. R., *Tributyrin induces growth inhibitory and differentiating effects on HT-29 colon cancer cells in vitro.* Int J Oncol, 1998. **13**(6): p. 1335-40.
30. Heerdt B. G., Houston M. A., Anthony G. M., and Augenlicht L. H., *Initiation of growth arrest and apoptosis of MCF-7 mammary carcinoma cells by tributyrin, a triglyceride analogue of the short-chain fatty acid butyrate, is associated with mitochondrial activity.* Cancer Res, 1999. **59**(7): p. 1584-91.
31. Yan J. and Xu Y. H., *Tributyrin inhibits human gastric cancer SGC-7901 cell growth by inducing apoptosis and DNA synthesis arrest.* World J Gastroenterol., 2003. **9**(4): p. 660-4.
32. Schroder C. P. and Maurer H. R., *Tributyrin-induced differentiation promotes apoptosis of LS 174T colon cancer cells in vitro.* Int J Oncol, 2002. **20**(1): p. 195-200.
33. Khalid M. N., Simard P., Hoarau D., Dragomir A., and Leroux J. C., *Long circulating poly(ethylene glycol)-decorated lipid nanocapsules deliver docetaxel to solid tumors.* Pharm Res, 2006. **23**(4): p. 752-8.

34. Garcion E., Lamprecht A., Heurtault B., Paillard A., Aubert-Pouessel A., Denizot B., Menei P., and Benoit J. P., *A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2006. **5**(7): p. 1710-22.
35. Coon J. S., Knudson W., Clodfelter K., Lu B., and Weinstein R. S., *Solutol HS 15, nontoxic polyoxyethylene esters of 12-hydroxystearic acid, reverses multidrug resistance*. *Cancer Res*, 1991. **51**(3): p. 897-902.
36. Rahmani M., Reese E., Dai Y., Bauer C., Payne S. G., Dent P., Spiegel S., and Grant S., *Coadministration of histone deacetylase inhibitors and perifosine synergistically induces apoptosis in human leukemia cells through Akt and ERK1/2 inactivation and the generation of ceramide and reactive oxygen species*. *Cancer Res*, 2005. **65**(6): p. 2422-32.
37. Floryk D. and Huberman E., *Differentiation of androgen-independent prostate cancer PC-3 cells is associated with increased nuclear factor-kappaB activity*. *Cancer Res*, 2005. **65**(24): p. 11588-96.
38. Bravo Gonzalez R. C., Huwyler J., Boess F., Walter I., and Bittner B., *In vitro investigation on the impact of the surface-active excipients Cremophor EL, Tween 80 and Solutol HS 15 on the metabolism of midazolam*. *Biopharm Drug Dispos*, 2004. **25**(1): p. 37-49.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION

La TB est un triglycéride qui libère 3 molécules d'acide butyrique lors de son hydrolyse. L'acide butyrique, par des mécanismes encore mal cernés, inhibe les HDACs et réactive ainsi l'expression de gènes cruciaux pour la régulation d'importantes fonctions cellulaires comme la différenciation, la prolifération et l'apoptose [1]. De plus, l'acide butyrique a un effet antiprolifératif par son activation de la p21 qui inhibe les CDKs, ce qui maintient la pRb dans un état non phosphorylé qui bloque le cycle cellulaire de la cellule (Figure 2.3). Il a ainsi été démontré que la TB inhibait la croissance cellulaire de multiples lignées cellulaires (HT-29, MCF-7, PC-3, TSU-PRI, LNCaP, SGC-7901) [2-5]. De plus, la TB s'est révélée capable d'induire l'apoptose sur les cellules HT-29 et SGC-7901, et ce, d'une façon dépendante du temps d'incubation [5, 6].

D'un autre côté, la TB étant à la fois un bon solvant pour le DTX et une huile antitumorale pouvant être émulsifiée, il apparaissait intéressant de préparer une nanoémulsion combinant le DTX et la TB. De plus, des vecteurs de médicament possédant des temps de circulation prolongés, tels que, par exemple, des nanoémulsions [7] et des nanoparticules lipidiques [8], peuvent s'accumuler de façon appréciable dans les tumeurs après administration i.v. grâce à l'effet EPR. Dans un premier temps, avant de préparer des nanoémulsions, nous avons évalué la cytotoxicité du DTX et de la TB sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (HL-60, MCF-7, OVCAR-3, PC-3, A-549, B16F10). Les HL-60 et les MCF-7 se sont avérées être les cellules les plus sensibles à la TB, alors qu'il y avait peu de différence de sensibilité au DTX entre les différentes lignées (Table 4-3). Des combinaisons de DTX avec trois concentrations différentes de TB n'ont pu permettre de détecter une synergie entre les deux agents. Afin d'en arriver à cette conclusion, l'équation des

indices de combinaison de Chou-Talalay a été utilisée [9] et les indices moyens obtenus (1.41 ± 0.40 pour les HL-60 et 0.92 ± 0.23 pour les MCF-7) montrent une interaction légèrement antagoniste ou additive entre la TB et le DTX (voir également les valeurs d'IC₅₀ similaires avec ou sans les trois différentes concentrations de TB, (Table 4-3). Ces derniers essais ont été réalisés en exposant les cellules aux deux agents simultanément pendant 72 h. La figure 4.1 est un exemple de profil de toxicité sur les cellules HL-60, les plus sensibles à la TB. La Figure 5.1 présente les résultats des triplicatas de la même expérience. Il est possible que l'absence de synergie soit due à un effet plus puissant du DTX à travers son action sur p21/waf1 et/ou sur p27.

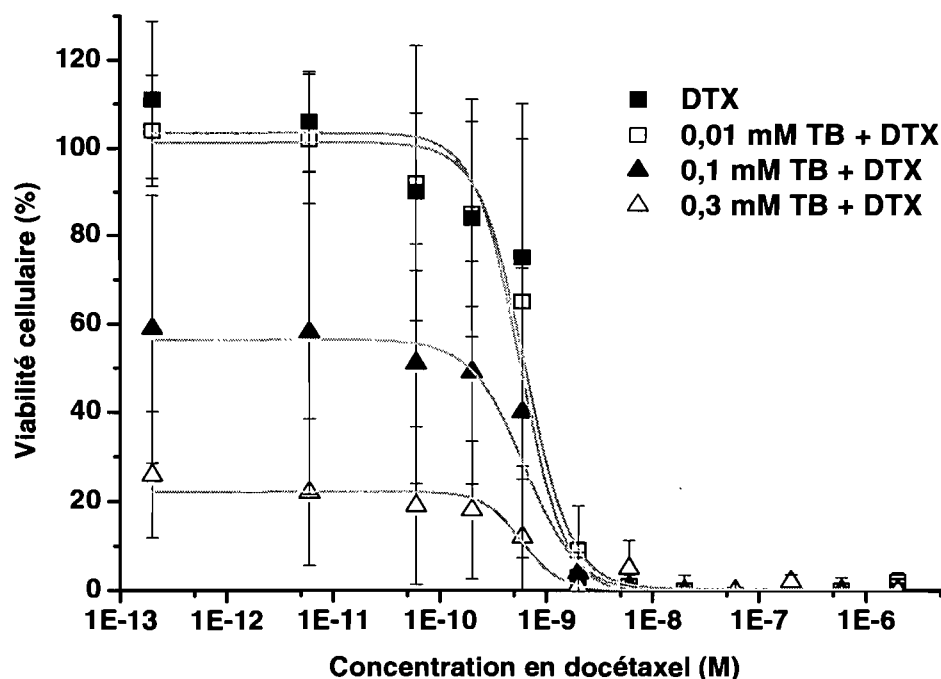


Figure 5.1: Viabilité cellulaire des cellules HL-60 en fonction de la concentration en DTX. Les cellules étaient exposées à du DTX plus de la TB (0,01 ; 0,1 et 0,3 mM) ou à du DTX seul.

Différentes séquences d'incubation des deux agents ont ensuite été testées puisque avec des IHDACs, des modifications survenant dans des séquences temporelles différentes ont des conséquences parfois variables sur l'expression

génique [10]. Ainsi, les cellules ont été exposées à la TB pendant 24 h et ensuite au DTX pendant 48 h, ou vice-versa, en utilisant du milieu de culture cellulaire plutôt que de la TB dans les séquences d'exposition contrôles (Figure 4.2). Toutefois, les séquences d'administration testées n'ont pas permis de mettre en évidence un avantage à une exposition séquentielle plutôt que simultanée des cellules à la TB et au DTX.

Malgré l'absence de synergie détectée, il nous apparaissait toujours intéressant de réaliser des nanoémulsions de TB et de DTX. En effet, il a été démontré précédemment que les nanoémulsions pouvaient augmenter la concentration cellulaire de certaines drogues et en modifier la distribution intracellulaire. Par exemple, une étude *in vitro* a montré une accumulation d'hydroxycamptothécine (HCPT) dans des cellules de 18 à 33 fois supérieure lorsqu'elle était administrée sous forme d'émulsion plutôt qu'administrée seule [11]. De plus, la proportion d'HCPT qui se trouvait dans le noyau par rapport au cytoplasme était supérieure dans le cas des cellules qui avaient reçu l'HCPT sous forme d'émulsion. Or, dans le cas où la cible du principe actif est intracellulaire, comme c'est le cas pour le DTX et la TB, une accumulation intracellulaire supérieure est souhaitable, puisqu'elle peut conduire à une efficacité accrue du traitement [12]. De plus, dans un système à deux agents, une modification de la distribution intracellulaire peut également modifier l'interaction entre les deux médicaments. Pour ces raisons, la combinaison des agents a également été testée sous forme de nanoémulsion.

Ainsi, au cours de ce travail de maîtrise, la TB et le DTX ont été testés sous forme de nanoémulsions, séparément et en combinaison, afin de comparer leurs cytotoxicités avec celles des agents non formulés et avec celle du TXT. Des nanoémulsions monodisperses d'environ 100 nm de diamètre (Figure 5.2) contenant une grande proportion de TB (jusqu'à 40 % *p/p* de la phase huileuse) et stabilisées à l'aide de Solutol HS15 ont été préparées et caractérisées.

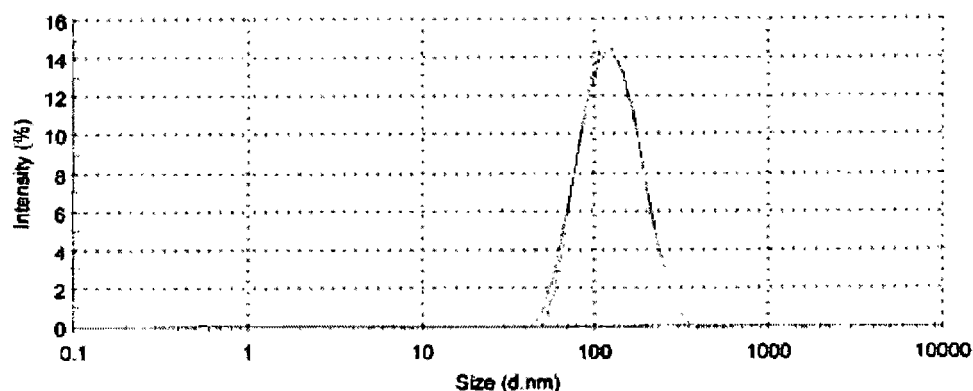


Figure 5.2 : Exemple de la distribution de taille d'une NE/TB (Table 4-1). Les trois courbes superposées représentent trois mesures de la même nanoémulsion. Diamètre moyen : 111 nm. Indice de polydispersité moyen : 0,108.

Lors d'études précédentes, le Solutol HS15 avait démontré sa capacité à inhiber la P-gp [13], une caractéristique intéressante étant donné le développement de la MDR observée dans les cancers traités avec le DTX [14]. Les nanoémulsions combinant la TB et le DTX (NE/TB/DTX) (Table 4-1) ont démontré une toxicité similaire aux nanoémulsions de DTX sans TB (NE/DTX) et au TXT. En fait, sous les conditions testées, la quantité de TB délivrée aux cellules HL-60 avec la formulation NE/TB/DTX était limitée puisque le DTX inhibait la croissance cellulaire avant qu'une concentration cytotoxique de TB (~0,05 mM, correspondant à 0,05 mM de Solutol HS15 dans NE/TB) ne soit atteinte. En réalité, même la toxicité de la nanoémulsion avec TB et sans DTX (NE/TB) ne semble pas due à l'action de la

TB. En effet, lorsque l'on compare la toxicité de cette dernière avec celle d'une nanoémulsion contrôle (NE-control) ne contenant ni DTX, ni TB, on observe des profils de toxicité semblables (Figure 4.3). La toxicité des nanoémulsions NE-control et NE/TB à une haute concentration en Solutol HS15, représentée sur la Figure 4.3, pourrait justement être due à l'action de ce surfactant dont la concentration maximale utilisée était de 0,034% (concentration associée à une concentration en TB non cytotoxique de 0,035 mM). Une étude menée par Bravo et *al.*, qui avait comme objectif d'évaluer l'impact de différents surfactants sur la clairance du midazolam, a évalué le potentiel qu'avait le Solutol HS15 de déstabiliser la membrane plasmique. Les tests de cytotoxicité conduits évaluant la libération de lactate déshydrogénase et d'adénosine triphosphate ont démontré que le Solutol HS15 était non cytotoxique jusqu'à une concentration de 0,03% [15]. Bien que cette concentration corresponde à la concentration maximale employée dans nos expériences, nos temps d'incubation 3 fois plus longs que ceux de l'étude de Bravo suggèrent que le Solutol HS15 pourrait être responsable de la toxicité intrinsèque des nanoémulsions. De plus, les tests d'apoptose réalisés sur les cellules PC-3 (résistantes à la TB) ont montré qu'en absence de DTX, les nanoémulsions NE-control et NE/TB induisaient une diminution significative du nombre de cellules en stade normal après 72 h (Figure 4.4B). Ce résultat ne s'accompagne pas d'une augmentation du nombre de cellules en stade précoce d'apoptose, suggérant l'induction de nécrose à de hautes concentrations de surfactant. Ainsi, la quantité de TB dans les nanoémulsions est insuffisante pour l'observation de son effet cytotoxique. En réalité, lors des tests MTT, l'augmentation de la concentration de nanoémulsions menait à l'atteinte de concentrations cytotoxiques de DTX pour les NE/DTX/TB ou de Solutol HS15 pour les NE/TB avant l'atteinte d'une concentration cytotoxique de TB.

Des tests d'apoptose détectant la présence d'annexin V sur la face externe de la membrane cytoplasmique ont été conduits avec des cellules sensibles à la TB (HL-60) et d'autres, insensibles (PC-3). L'objectif était de comparer l'induction de l'apoptose sur les deux lignées cellulaires afin de potentiellement lier celle-ci à la sensibilité à la TB. L'exposition des HL-60 à 0,6 mM de TB (soit environ ~ 1,8 mM d'acide butyrique supposant une hydrolyse complète de la TB) n'a pas causé d'augmentation du nombre de cellules dans le stade précoce d'apoptose. Cependant, une importante diminution du nombre de cellules se trouvant en stade normal a été observée, suggérant l'induction de la nécrose par la TB. Ces résultats ne concordent pas avec l'induction d'apoptose observée précédemment avec les cellules HL-60 après leur exposition à 1 mM de sodium butyrate pendant 24 h [16]. L'absence de concordance entre les deux études pourrait s'expliquer par la différence entre la source de butyrate (butyrate de sodium vs TB), entre les temps d'incubation (24 h vs. 48-72 h) et entre les concentrations de butyrate utilisées. Dans le cas des PC-3, aucune augmentation de la proportion des cellules en stade précoce d'apoptose ou de diminution de la proportion des cellules en stade normal n'a pu être détectée suite à leur exposition à la TB non formulée. Des résultats similaires ont été obtenus suite au traitement des PC-3 avec 1 mM de TB pendant 72 h [17].

Les expériences de cytotoxicité ont principalement été réalisées sur les cellules HL-60, les plus sensibles à la TB. Ces cellules ne forment pas de tumeurs solides, donc elles ne sont pas sensibles à l'accumulation passive de principe actif que les nanoémulsions permettent en principe d'obtenir. Toutefois, comme expliqué précédemment, les nanoémulsions peuvent être internalisées par des récepteurs LDL. Or, puisque les cellules leucémiques ont une activité liée aux récepteurs LDL

supérieure à celle des globules blancs sains [18], il nous apparaissait toujours intéressant d'investiguer la cytotoxicité de notre système sur ces cellules.

Les expériences *in vitro* n'ont pas démontré de grand potentiel pour le système développé au cours de cette maîtrise. De plus, ces résultats ont été accompagnés de résultats *in vivo* inattendus. En effet, comme on peut le voir dans le Tableau 5-1, l'injection de nanoémulsions administrant 800 mg/kg de TB et 20 mg/kg de DTX ont conduit à la mort rapide des souris. L'administration de 200 mg/kg de TB et d'une dose aussi petite que 5 mg/kg de DTX s'est révélée être plus toxique que l'administration de 80 mg/kg de TB et de 20 mg/kg de DTX. Les nanoémulsions contenant de la TB et du DTX ont apparu être fortement toxiques suite à leur injection i.v., et ce, même à une dose de TB considérée acceptable (80 mg/kg) (voir Figure 4.5 pour les variations de poids des souris). Ces résultats contrastent avec les profils de variation de poids observés chez les souris qui ont reçu le TXT et celles qui ont reçu les nanoémulsions avec DTX mais sans TB (formulation 1, Table 4-2).

Tableau 5-1: Toxicité des nanoémulsions administrées *in vivo*

Formulation	1	2	3	4
Dose de TB injectée (mg/kg)	0	800	200	80
Dose de DTX injectée (mg/kg)	20	20	5	20
Nombre de souris injectées	10	4	10	10
Nombre de décès	0	4	3	0

La mortalité observée suite à l'injection de la TB était surprenante puisque l'administration i.p. et i.v. de TB à des doses variant entre 263 et 2000 mg/kg avait été précédemment effectuée sur des rongeurs sans que de telles toxicités soient observées [19, 20]. Ces résultats pourraient s'expliquer par une augmentation de la toxicité systémique de la TB ou du DTX *in vivo* lorsque ces 2 composés sont combinés. On ne peut toutefois exclure la possibilité d'un impact du mode d'administration (bolus administré lentement *vs* perfusion ou injection i.p.) et de la présence du Solutol HS15 qui aurait pu potentialiser les effets secondaires de la TB. Ces données devront être confirmées par des études subséquentes au cours desquelles la vitesse d'injection devra être mieux contrôlée. De plus, l'impact de la présence de Solutol HS15 sur la toxicité systémique des émulsions en présence de TB et du mélange DTX/TB devrait être investiguée. A ce stade, les résultats obtenus indiquent que la combinaison TB/DTX devrait être utilisée avec la plus grande prudence en raison de son fort potentiel toxique.

Références

1. Yoo C. B. and Jones P. A., *Epigenetic therapy of cancer: past, present and future*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(1): p. 37-50.
2. Maier S., Reich E., Martin R., Bachem M., Altug V., Hautmann R. E., and Gschwend J. E., *Tributylin induces differentiation, growth arrest and apoptosis in androgen-sensitive and androgen-resistant human prostate cancer cell lines*. Int J Cancer, 2000. **88**(2): p. 245-51.
3. Schroder C., Eckert K., and Maurer H. R., *Tributylin induces growth inhibitory and differentiating effects on HT-29 colon cancer cells in vitro*. Int J Oncol, 1998. **13**(6): p. 1335-40.
4. Heerdt B. G., Houston M. A., Anthony G. M., and Augenlicht L. H., *Initiation of growth arrest and apoptosis of MCF-7 mammary carcinoma cells by tributyrin, a triglyceride analogue of the short-chain fatty acid butyrate, is associated with mitochondrial activity*. Cancer Res, 1999. **59**(7): p. 1584-91.
5. Yan J. and Xu Y. H., *Tributylin inhibits human gastric cancer SGC-7901 cell growth by inducing apoptosis and DNA synthesis arrest*. World J. Gastroenterol., 2003. **9**(4): p. 660-4.
6. Schroder C. P. and Maurer H. R., *Tributylin-induced differentiation promotes apoptosis of LS 174T colon cancer cells in vitro*. Int J Oncol, 2002. **20**(1): p. 195-200.
7. Rossi J., Giasson S., Khalid MN., Delmas P., Allen C., and Leroux JC., *Long-circulating poly(ethylene glycol)-coated emulsions to target solid tumors*. Eur J Pharm Biopharm, 2007. **67**(2): p. 329-338.
8. Khalid M. N., Simard P., Hoarau D., Dragomir A., and Leroux J. C., *Long circulating poly(ethylene glycol)-decorated lipid nanocapsules deliver docetaxel to solid tumors*. Pharm Res, 2006. **23**(4): p. 752-8.
9. Chou T. C. and Talalay P., *Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors*. Adv Enzyme Regul, 1984. **22**: p. 27-55.
10. Kristeleit R., Stimson L., Workman P., and Aherne W., *Histone modification enzymes: novel targets for cancer drugs*. Expert Opinion on Emerging Drugs, 2004. **9**(1): p. 135-54.
11. Zhao Y., Gao J., Sun X., Chen H., Wu L., and Liang W., *Enhanced nuclear delivery and cytotoxic activity of hydroxycamptothecin using o/w emulsions*. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, 2007. **10**(1): p. 61-70.

12. Xiong X. B., Huang Y., Lu W. L., Zhang H., Zhang X., and Zhang Q., *Enhanced intracellular uptake of sterically stabilized liposomal Doxorubicin in vitro resulting in improved antitumor activity in vivo*. *Pharmaceutical Research*, 2005. **22**(6): p. 933-9.
13. Coon J. S., Knudson W., Clodfelter K., Lu B., and Weinstein R. S., *Solutol HS 15, nontoxic polyoxyethylene esters of 12-hydroxystearic acid, reverses multidrug resistance*. *Cancer Res*, 1991. **51**(3): p. 897-902.
14. Geney R., Ungureanu M., Li D., and Ojima I., *Overcoming multidrug resistance in taxane chemotherapy*. *Clinical Chemistry & Laboratory Medicine*, 2002. **40**(9): p. 918-25.
15. Bravo Gonzalez R. C., Huwyler J., Boess F., Walter I., and Bittner B., *In vitro investigation on the impact of the surface-active excipients Cremophor EL, Tween 80 and Solutol HS 15 on the metabolism of midazolam*. *Biopharm Drug Dispos*, 2004. **25**(1): p. 37-49.
16. Rahmani M., Reese E., Dai Y., Bauer C., Payne S. G., Dent P., Spiegel S., and Grant S., *Coadministration of histone deacetylase inhibitors and perifosine synergistically induces apoptosis in human leukemia cells through Akt and ERK1/2 inactivation and the generation of ceramide and reactive oxygen species*. *Cancer Res*, 2005. **65**(6): p. 2422-32.
17. Floryk D. and Huberman E., *Differentiation of androgen-independent prostate cancer PC-3 cells is associated with increased nuclear factor-kappaB activity*. *Cancer Res*, 2005. **65**(24): p. 11588-96.
18. Ho Y. K., Smith R. G., Brown M. S., and Goldstein J. L., *Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells*. *Blood*, 1978. **52**(6): p. 1099-114.
19. Kuefer R., Hofer M. D., Altug V., Zorn C., Genze F., Kunzi-Rapp K., Hautmann R. E., and Gschwend J. E., *Sodium butyrate and tributyrin induce in vivo growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer*. *Br J Cancer*, 2004. **90**(2): p. 535-41.
20. Su J., He L., Zhang N., and Ho P. C., *Evaluation of tributyrin lipid emulsion with affinity to low-density lipoprotein: pharmacokinetics in adult male Wistar rats and cellular activity on Caco-2 and HepG2 cell lines*. *J Pharmacol Exp Ther* 2006. **316**(1): p. 62-70.

CHAPITRE 6 : CONCLUSION

Le cancer est une maladie en expansion dans les sociétés occidentales et bien que la recherche sur cette maladie soit prolifique, les solutions thérapeutiques proposées sont loin d'être complètement satisfaisantes. Ce projet visait à explorer la combinaison TB/DTX comme traitement anticancéreux, le DTX étant un agent puissant et la TB une huile anticancéreuse démontrant un bon pouvoir solubilisant pour ce médicament. *A priori*, l'inconvénient majeur de la TB est sa faible puissance. La combinaison avec le DTX ou son administration sous forme de nanoémulsions sous les conditions testées dans ce travail n'ont permis de pallier cet obstacle. En fait, *in vitro*, la combinaison DTX/TB ne présente pas d'avantage à l'utilisation du DTX seul. Les résultats *in vivo* ont quant à eux démontré qu'il était inapproprié d'utiliser la TB comme excipient du DTX pour une administration i.v. Il serait intéressant d'investiguer les causes de la mortalité observée chez les souris. Tout d'abord, l'étude *in vivo* pourrait être répétée en administrant les nanoémulsions par perfusion plutôt qu'en bolus. Il est probable que le mode d'administration soit la cause de la mortalité. Sinon, des nanoémulsions de TB et de DTX/TB comprenant un autre surfactif que le Solutol HS15 pourraient être ajoutées aux émulsions déjà testées. Ceci afin de déterminer l'impact du Solutol HS15 dans la toxicité observée. Afin de voir une possible corrélation entre la sensibilité des lignées cellulaires à la TB (sous forme de nanoémulsion ou non) et l'expression des récepteurs LDL, cette dernière pourrait être mesurée sur les cellules HL-60, PC-3 et MCF-7 (la deuxième lignée plus sensible à la TB).

En utilisant des lignées cancéreuses différentes en recherche, on constate à quel point les résultats varient avec les cellules, même sur des lignées cellulaires d'un même type de cancer. Cela démontre les différences interindividuelles chez les

patients cancéreux qui posent un obstacle au développement d'un traitement applicable à tous. Par exemple, un nanovecteur possédant un ligand de reconnaissance pour effectuer un ciblage actif sera plus ou moins efficace chez les patients selon le degré de surexpression du récepteur cible du ligand. Les immenses différences entre chaque patient semblent écarter l'idée d'un traitement miraculeux et unique. C'est pourquoi est apparu l'idée d'effectuer un traitement individualisé du cancer. Pour chaque patient, il s'agirait de prélever ses cellules cancéreuses et de détailler les protéines exprimées afin de déterminer le traitement à employer. Cette façon de faire a ses avantages qui sont cependant complètement surpassés par l'inconvénient du coût beaucoup trop élevé de ce procédé. À défaut de trouver la panacée du cancer, il faut donc continuer la recherche, fondamentale et appliquée, pour développer traitements et stratégies qui permettront de traiter, de plus en plus efficacement, de plus en plus de cancers différents.