


Transporteurs notables

Des particules synthétiques réduisent la toxicité et amplifient l'action de médicaments contre le cancer

PUBLIÉ EN FÉVRIER 2013

Représentation artistique d'un réseau d'artères



Quand le médecin Raul Maranhão a présenté dans des revues scientifiques nationales et internationales une stratégie de traitement contre le cancer basée sur des particules compactes de cholestérol artificiel, il n'aurait jamais imaginé, il y a vingt et un ans, qu'il pourrait vivre autant de surprises, de déceptions, de renversements et de changements de cap pour mener à bien son projet. Pas à pas, il a réalisé des expériences sur des modèles animaux et ensuite sur des groupes limités de personnes souffrant de cancer pour arriver à la conclusion que les nanoémulsions lipidiques appelées LDE pourraient agir comme une plateforme pharmaceutique capable de transporter des médicaments vers des cibles prédéfinies et de réduire la toxicité, un problème sérieux et habituel chez les antitumoraux car les effets secondaires sont souvent si intenses qu'ils conduisent à en limiter l'usage, à réduire le dosage et à provoquer l'arrêt du traitement. «Nous avons apprivoisé certains agents chimiothérapeutiques», déclare sereinement Raul Maranhão, en début d'année, dans sa salle située au deuxième sous-sol de l'Institut du Cœur (InCor) de l'Université de São Paulo (USP).

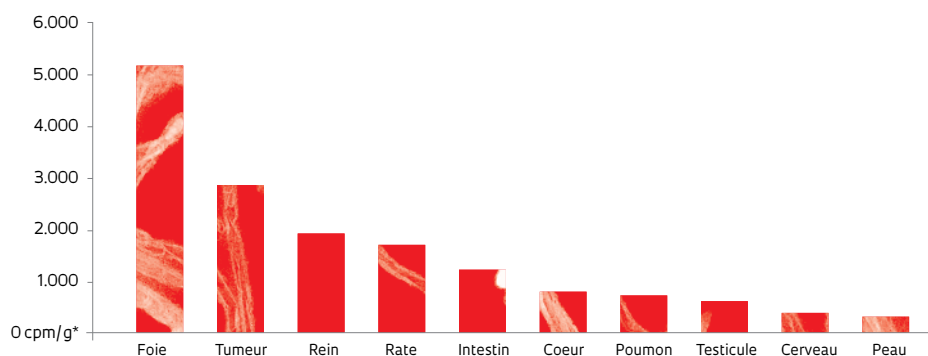
Il affiche ensuite sur l'écran de l'ordinateur un tableau qui résume les effets secondaires chez les 46 personnes traitées avec de la carmustine (un

antitumoral d'une toxicité élevée) combinée avec des sphères de cholestérol artificiel. Avec ce traitement, les effets les plus habituels comme la nausée, les vomissements, l'alopécie (perte de cheveux), l'anémie, la perte intense de cellules de défense et des modifications hépatiques ou rénales, évalués à des degrés 1, 2 et 3, ont été minimes même avec un dosage de 350 milligrammes qui est quatre fois plus élevé que le dosage normalement adopté. «Les résultats sont sans aucun doute probants et ne présentent pas de perte de l'action pharmacologique» commente-t-il.

Il n'est pas simple de faire en sorte que ces stratégies fonctionnent. Il y a une bataille mondiale visant à réduire la toxicité des médicaments, ce qui pourrait signifier une augmentation des options thérapeutiques pour les médecins et moins de troubles pour les personnes en traitement. Des équipes de l'Université Publique de Campinas (Unicamp) et de l'Institut Butantan étudient également d'autres types de particules qui se sont montrées efficaces pour améliorer l'action de médicaments ou de vaccins. Dans chaque cas, les nouvelles combinaisons devront passer par tous les tests de sécurité et de toxicité sur des modèles animaux et ensuite sur des êtres humains (si elles ont des performances satisfaisantes dans toutes les expériences), avant d'être utilisées à grande échelle.

PRINCIPALES CIBLES

Concentration de particules de cholestérol (LDE) avec taxol, marquées avec des éléments radioactifs, dans des tissus ou des organes de souris



*cpm/g: radioactivité des particules par gramme de tissu

RCE LABORATOIRE DES LIPIDES / INCOR-USP

Raul Maranhão a dû surmonter de nombreuses difficultés scientifiques, techniques et bureaucratiques avant de voir les sphères contenant le médicament se concentrer sur les tumeurs (voir graphique ci-dessus) et aller de l'avant. Les LDE sont riches en cholestérol, ont une structure identique à la lipoprotéine de basse densité (LDL) et un diamètre de 20 à 60 nanomètres (1 nanomètre équivaut à 1 milliardième de millimètre), et sont captées par les cellules par des récepteurs de LDL, abondants dans les cellules tumorales. «Nous dupons les cellules tumorales en leur offrant une matière première dont elles ont besoin pour se multiplier avec un médicament qui va les détruire», déclare-t-il.

Deux autres antitumoraux, paclitaxel (taxol) et étoposide, ont été plus difficile à apprivoiser. En compagnie d'Hélio Stefani, collègue de la Faculté de Sciences Pharmaceutiques de l'USP, Raul Maranhão les a trempés dans un acide gras, un type de graisse pour augmenter leur adhésion aux sphères de LDE. «Dans des tests sur des souris et sur des personnes atteintes de cancer, la toxicité a diminué drastiquement», affirme-t-il. Cela ne fonctionne pas toujours. La toxicité du méthotrexate n'a pas chuté. «Je ne saurais pas dire pourquoi, mais il faudrait peut-être réduire le dosage, car la combinaison avec les LDE permet aux cellules tumorales de capter davantage le médicament».

DES TESTS DANS DES HÔPITAUX

Une forte production scientifique et les résultats initiaux des tests cliniques (réalisés depuis 1990 sur environ 200 personnes) ont servi d'argument pour deux études cliniques plus amples en cours dans des hôpitaux publics de São Paulo. Dans l'un des hôpitaux, 23 personnes souffrant de cancer de la prostate, du sein, de l'ovaire et du poumon, dont certains déjà avec une métastase osseuse, ont reçu du taxol et la LDE à l'Institut du Cancer Arnaldo Vieira de Carvalho, après avoir suivi

d'autres traitements. Le niveau d'antigène prostatique spécifique (PSA) est passé de 100 à 10 nanogrammes par décilitre de sang, indiquant une régression du cancer de la prostate après sept mois de traitement sur deux individus, selon Silvia Graziani, médecin du service d'oncologie clinique de l'institut. «Pour les cancers de l'ovaire et du sein nous avons constaté une stabilisation de la maladie et une amélioration significative du cadre clinique, compte-tenu de l'absence d'effets secondaires communs à la chimiothérapie», dit-elle. «Nous avons vu beaucoup de patients déjeuner pendant qu'ils faisaient leur chimiothérapie», relate Raul Maranhão. Les médications administrées pour éviter les vomissements, un effet habituel du traitement, avaient été écartées.

«Les LDE ont une affinité élevée avec les tissus enflammés ou avec des zones d'intense division cellulaire», déclare Raul Maranhão. Cette caractéristique a conduit à d'autres possibilités d'utilisation, comme le traitement de l'athérosclérose, une maladie inflammatoire chronique caractérisée par l'accumulation de plaques de graisse dans les veines et les artères. Dans l'une des expériences, des artères de lapin avec des plaques de cholestérol ont, comme les tumeurs, captées trois fois plus de LDE que les autres tissus ou organes. «Les LDE avec paclitaxel ont nettoyé les artères des lapins», dit-il, montrant une succession de photos et de graphiques. Les informations qu'il a réunies ont servi d'argument pour tester la sécurité de l'usage d'une combinaison de taxol avec la LDE sur un groupe de 10 personnes en traitement et sélectionnées à l'Institut Dante Pazzanese de Cardiologie, à São Paulo. Les résultats, décrits dans un article en phase finale d'élaboration, indiquent que cette stratégie peut réduire l'inflammation qui accompagne la formation de plaques de graisse dans les artères coronaires chez les personnes ayant déjà eu un infarctus. «Nous avons pratiquement

éliminé la toxicité», déclare-t-il. Les évidences impressionnent également car elles ouvrent des possibilités pour l'utilisation d'un antitumoral, le taxol, pour traiter les maladies cardiaques.

Des nanotubes de carbone ont activé des cellules de défense et ont amplifié les réponses contre les antigènes

DE NOUVEAUX VACCINS EN VUE

Les particules qui transportent le médicament peuvent faire davantage que ce que l'on attend d'elles et modifier d'autres caractéristiques qui contrarient l'utilisation de médicaments. À l'Unicamp, l'équipe du chimiste Oswaldo Alves a apparemment réussi à surmonter une limitation de la camptotécine, antitumoral difficile à administrer pour être insoluble, conformément aux tests réalisés sur des cellules tumorales à l'Université Fédérale de São Paulo (Unifesp).

«Nous avons créé une suspension avec des nanoparticules de silice et la camptotécine est entrée dans les cellules comme si elle était soluble», observe Amauri Jardim de Paula, chercheur du groupe d'Oswaldo Alves. «Nous pouvons aujourd'hui synthétiser des nanostructures en conservant un contrôle élevé des propriétés chimiques et physiques de la surface et de l'intérieur, de manière à ce que la surface réussisse à attirer et l'intérieur à repousser les molécules d'eau».

Dans l'article de couverture du Journal of the Brazilian Chemical Society d'octobre 2012, Oswaldo Alves a montré un aspect important démontrant la fiabilité de l'utilisation des nanoparticules mésoporeuses de silice. En effet, ces nanostructures ne détruisent pas les hématies du sang dans des conditions réelles, immergées dans du plasma, indépendamment de la charge électrique de la surface des particules; des études antérieures faites dans une solution de cellules avaient suggéré qu'elles pourraient les détruire.

Un type de silice poreuse nanostructurée appelée SBA-15 s'est révélée efficace pour transporter des vaccins par voie orale, selon les résultats des études menées depuis 2002 en collaboration avec

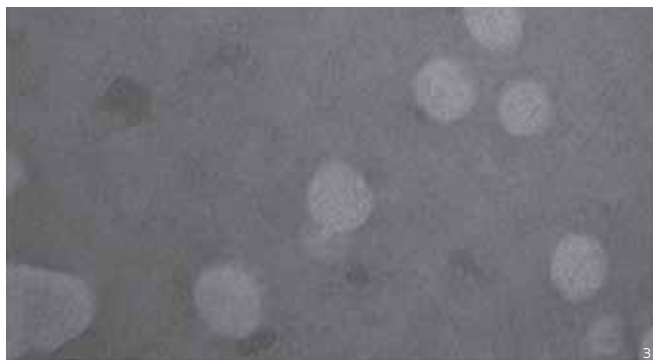
l'Institut Butantan, l'Université de São Paulo et le Laboratoire Cristália. Des tests avec le vaccin contre l'hépatite B réalisés sur des souris ont montré que des antigènes viraux transportés par les sphères de silice parviennent à traverser l'environnement extrêmement

acide de l'estomac, auquel la plupart des protéines ne résistent pas, et à être absorbé dans l'intestin.

«Nous en sommes maintenant à une phase de planification pour réaliser des tests sur des volontaires», dit Oswaldo Sant'Anna, chercheur à l'Institut Butantan et enthousiasmé par l'idée de développer davantage la vaccination par voie orale, limitée à Sabin, contre la poliomyélite. Il estime que si les tests avancent et que les résultats sont positifs, les particules de silice pourraient transporter plus d'un vaccin à la fois et de manière moins invasive que les techniques actuelles d'application (injections) Elles permettraient également une économie considérable en dispensant l'usage d'aiguilles et de seringues, augmenteraient le nombre de personnes vaccinées, et d'administrer des doses plus faibles que les doses actuelles.

Diego Stéfani Teodoro Martinez, de l'équipe d'Oswaldo Alves, a préparé des nanotubes de carbone de 10 à 40 nanomètres de diamètre et de 10 micromètres de longueur trempés dans des antigènes. Cette combinaison a amplifié la réponse de l'organisme comparée à celle induite seulement par des antigènes, dans des tests préliminaires menés sur des souris à l'Institut Butantan, en partenariat avec Oswaldo Sant'Anna. «Les nanotubes ont apparemment un effet immunostimulant», déclare Diego Stéfani Teodoro Martinez «car ils ont possiblement activé les macrophages, un type de cellule de défense, et la libération de cytokines» qui sont les molécules de communication du système immunologique.

Véhicules spéciaux: nanotubes de carbone purifiés (en rouge) et nanoémulsion lipidique seule (à gauche), avec méthotrexate (à droite)





D'autres combinaisons de transporteurs et de médicaments peuvent également produire des résultats impressionnants. Des groupes de l'Unicamp, de l'USP et de l'Unesp coordonnés par Wagner Fávaro et Nelson Duran, les deux de l'Unicamp, ont réussi à réduire d'environ 10 fois la dose du médicament immunomodulateur P-Mapa, sans qu'il perde son efficacité contre le cancer de la vessie, en utilisant un polymère commercial appelé Poloxamer ou Pluronic, dans des tests préliminaires réalisés sur des modèles animaux.

«Le Pluronic a du faciliter l'entrée du P-Mapa dans la couche de cellules qui revêt l'intérieur de la vessie urinaire», commente Wagner Fávaro. «C'est un excellent résultat». Si cet effet est confirmé par les études en cours il permettra une économie notable du médicament et améliorera son action, outre le fait de réduire le risque éventuels des effets toxiques car le P-Mapa et les sphères de LDE n'ont apparemment pas provoqué de réactions hostiles et n'ont pas indiqué de risques pour la santé, selon les derniers tests.

Dans les études menées à l'Unicamp et à l'Université de l'État du Colorado, aux États-Unis, avec un financement du réseau de recherche Farmabrilis, de la FAPESP, du Conseil National de Développement Scientifique et Technologique (CNPq), des Instituts Nationaux de santé (NIH) étasuniens et de l'Unesp de Botucatu, le P-Mapa a été capable d'enrayer la progression du cancer de la vessie et de réduire la croissance de colonies de bactéries à l'origine de la tuberculose en modèle animal. Dans des études sur des souris porteuses du cancer de la

vessie, le P-Mapa a montré une efficacité supérieure à celle du vaccin BCG, le meilleur traitement disponible pour cette maladie, comme cela est décrit dans un article publié en juin 2012 dans la revue *Infectious Agents and Cancer*.

Avant d'arriver à ces résultats qui semblent maintenant simples, il a fallu prendre des décisions difficiles. En 2006, Oswaldo Alves s'est trouvé face à un dilemme qui était de savoir s'il devait acheter ou synthétiser les nanotubes de carbone. Il les a achetés mais s'est aperçu qu'il ne s'agissait pas d'une substance pure comme elle aurait dû l'être. Il a donc commencé à se méfier des résultats (positifs ou négatifs) des expériences, sans savoir s'ils étaient dus soit à l'action des nanotubes soit aux impuretés.

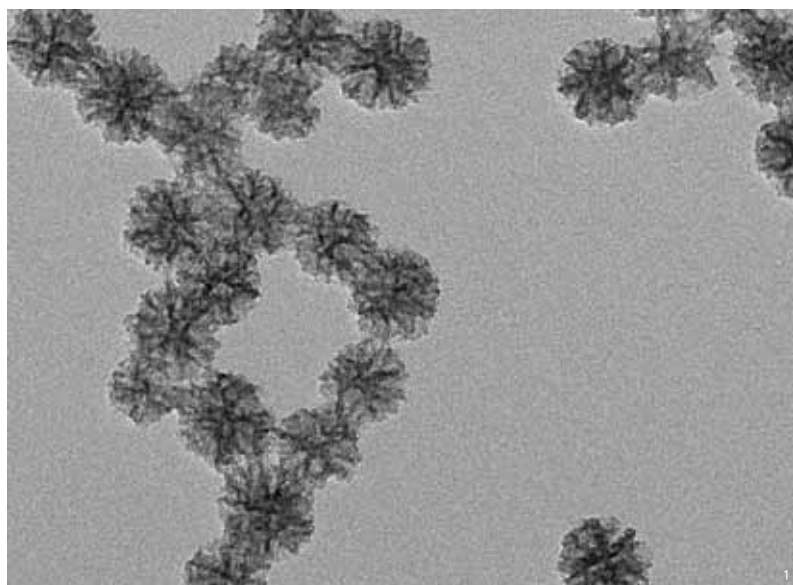
«Pratiquement personne ne questionne l'origine et la pureté des échantillons des nanostructures utilisées dans les expériences», déclare Alves

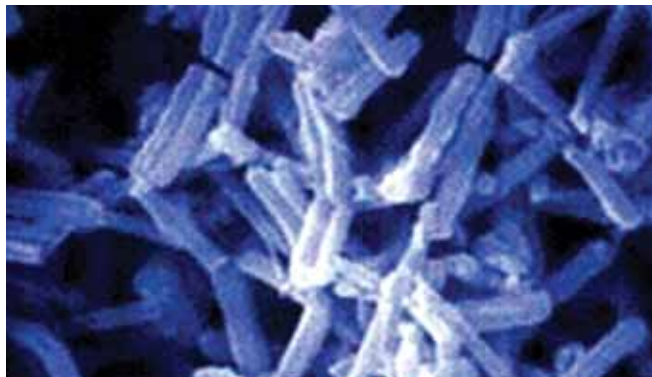
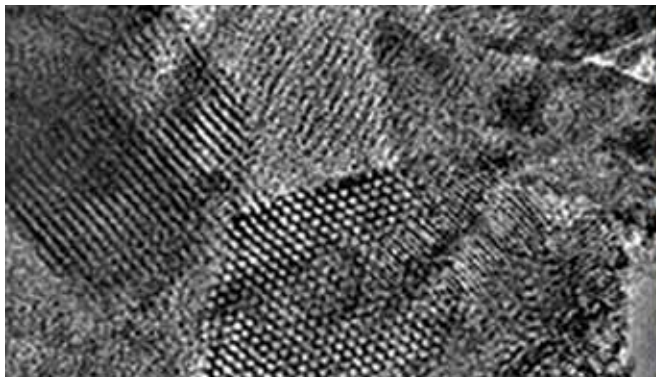
«La pureté a été un point négligé» dit-il. Dans la précipitation pour publier des résultats, pratiquement personne ne questionne l'origine des échantillons de nanostructures utilisés dans les expériences, on suppose simplement qu'ils sont purs». Oswaldo Alves et son groupe ont développé leurs propres techniques de purification et aujourd'hui retirent 98 % des résidus métalliques et carbonés des nanomatériaux importés. La substance obtenue après pu-

rification dans le laboratoire de Chimie de l'État Solide de l'Unicamp est différente de l'originale au point d'avoir gagné les noms de LQES-1 et LQES-2. L'autre enjeu permanent, selon lui, est «d'identifier d'autres chimistes, physiciens, biologistes et médecins désirant travailler sur les nanostructures et croyant qu'il est possible de faire une science brésilienne de qualité».

«Seuls nous ne pouvons pas avancer», répète Raul Maranhão, qui a dû affronter plusieurs dilemmes. L'un d'eux était de savoir où il devait publier ses résultats. S'il les diffusait trop en choisissant les revues les plus lues, il pourrait être dépassé par d'autres groupes qui pourraient avancer plus vite. Ne pas publier était impensable car ce sont les articles scientifiques qui apportent de la crédibilité et de la visibilité à tout chercheur. La solution trouvée a été de publier ses résultats dans des revues médicales d'impact moyen, «sans faire trop de bruit».

Quand il a commencé, il n'y avait pas de législation en matière de brevet pour les nouveaux produits pharmaceutiques, ni de concept de nanotechnologie médicale, ni d'entreprises nationales





Deux types de nanoparticules mésoporeuses de silice: celle de l'Unicamp, avec des pores qui repoussent l'eau et une surface qui l'attire (page ci-contre); et celle de l'Institut Butantan-USP, avec des pores hexagonaux (ci-dessus, à gauche) et en forme de tubes cylindriques (à droite)

intéressées par le développement de médicaments dans le pays. Il a contacté quelques entreprises étrangères avec l'espoir de trouver des partenaires qui pourraient l'aider dans la production et le développement des nanoparticules, mais les fusions et les acquisitions d'entreprises ont interrompu les négociations. Il s'est donc rendu compte qu'il devrait produire lui-même et a installé un laboratoire de production à côté de sa salle à l'InCor en payant une fortune pour acheter des agents chimiothérapeutiques importés jusqu'à ce que les indiens et les chinois commencent à les vendre à des prix bien plus avantageux. «C'est comme un jeu d'échec, la stratégie précède souvent la science», dit-il.

LA PROCHAINE BATAILLE

Raul Maranhão a dû pénétrer dans des domaines qu'il ne connaissait pas et former des équipes, un autre risque, car le rythme de travail et la rigueur méthodologique des membres d'un groupe peuvent diverger. «Par chance je n'ai jamais eu de problèmes avec mes collaborateurs» garantit-il, «et je dois beaucoup à mes collègues médecins et professeurs comme Sílvia Graziani, Noedir Stolf, Vânia Hungria, Eloisa Bonfá, Roberto Hegg, Jesus Carvalho, Durvanei Maria et beaucoup d'autres qui ont collaboré à ce projet depuis de nombreuses années et qui font un travail de très haute qualité».

Il raconte qu'il a eu des problèmes avec des donneurs d'avis, nécessairement anonymes, pour ses demandes de financement, qui critiquaient son manque d'objectif bien défini car il explorait d'autres applications médicales des LDE, on lui demandait aussi de fournir des détails qu'il n'avait pas et qui ne le souciaient absolument pas. «Nous sommes nos propres bourreaux», a déclaré un autre professeur de l'USP, qui suit le travail de Raul depuis des années.

Pour ceux qui pensent qu'après avoir découvert une molécule apparemment fantastique les étapes suivantes de la recherche et du développement seront simples, Raul Maranhão prévient: «On ne doit jamais relâcher son attention. Si vous voulez vraiment assumer la chose, il faut vous préparer à parcourir un long chemin». Le sien n'est pas encore

terminé. La prochaine bataille en vue sera l'enregistrement des combinaisons entre les LDE et les médicaments auprès des organismes régulateurs du gouvernement.

«Grâce à l'argumentation scientifique et médicale que nous avons déjà et compte tenu de l'urgence pour de nouveaux médicaments contre le cancer, notre demande d'enregistrement aux États-Unis pourra facilement entrer dans un processus fast track». Fast track c'est le chemin rapide et simplifié adopté par le gouvernement fédéral étasunien pour approuver de nouveaux médicaments. Au Brésil, il n'y a pas de fast track le processus d'enregistrement exige de nombreux documents et prend de nombreuses années avant d'obtenir l'autorisation finale. Une entreprise brésilienne a déclaré avoir envoyé 70 kilos de documents à l'organisme responsable à Brasilia et avoir attendu sept ans avant d'obtenir l'enregistrement d'un médicament brésilien similaire au Viagra. ■ Carlos Fioravanti

Projets

1. Nanoparticules lipidiques: applications dans l'étude de la physiopathologie, dans le diagnostic et la thérapie des maladies dégénératives – n° 06/58917-3; **Modalité** Projet thématique; **Coordonnateurs** Raul Cavalcante Maranhão – USP; **Investissement** 1 406 940,52 reais (FAPESP);
2. Nouvelles stratégies thérapeutiques pour le cancer de la vessie urinaire non muscle invasif – n° 12/20706-2; **Modalité** Ligne Régulière d'Aide au Projet de Recherche; **Coordonnateurs** Wagner José Fávoro – Unicamp; **Investissement** 133 260,00 reais (FAPESP);
3. Production de nanostructures mésoporeuses à base de silice pour le transport d'agents antitumoraux hydrophobiques – n° 09/10056-8; **Modalité** Doctorat; **Coordonnateurs** Amauri Jardim de Paula – Unicamp; **Investissement** 110 201,13 reais (FAPESP)

Articles scientifiques

- FÁVARO, W.J. et al. Effects of P-Mapa immunomodulator on toll-like receptors and p53: potential therapeutic strategies for infectious diseases and cancer. **Infectious Agents and Cancer**. v. 7, n. 14.2012 (on line).
- KRETZER, I.F. et al. Drug-targeting in combined cancer chemotherapy: tumor growth inhibition in mice by association of paclitaxel and etoposide with a cholesterol-rich nanoemulsion. **Cellular Oncology**. v. 35, n. 6, p. 451-60. 2012.
- PAULA, A.J. et al. Suppression of the hemolytic effect of mesoporous silica nanoparticles after protein corona interaction: independence of the surface microchemical environment. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 23, n. 10, p. 1.807-14. 2012.