

Table des matières

Remerciements	3
Liste des abréviations	9
Avant-propos	13
Chapitre 1 : Le cancer et la nanomédecine	17
I. Le cancer.....	19
1) Généralités	19
2) Les traitements actuels du cancer et leurs effets secondaires	19
a) La chirurgie	19
b) La radiothérapie	20
c) La chimiothérapie.....	20
II. La nanomédecine	22
1) Définition.....	22
2) Paramètres physiologiques à prendre en compte dans la conception des nano-vecteurs ..	23
a) Le système réticuloendothélial	23
b) Le système rénal.....	23
c) La barrière hémato-encéphalique	23
3) Ciblage passif des tissus tumoraux.....	24
4) Ciblage actif pour le traitement du cancer.....	24
5) Les nano-vecteurs actuellement développés.....	26
a) Les nanoparticules de polymères.....	26
b) Les liposomes	28
c) Les dendrimères	30
d) Les micelles de polymères.....	32
e) Les micelles à cœur lipidique	34
6) Nano-vecteurs activables par un stimulus ^{46, 47}	34
a) Les stimuli internes.....	35
b) Les stimuli externes	36
III. Conclusion et objectifs de la thèse.....	38
Chapitre 2 : Ciblage passif des tumeurs avec les micelles polydiacétyléniques.....	39
I. Les micelles polydiacétyléniques	41
1) Micelles PDA-NTA.....	41

2) Micelles PDA-PEG	43
3) Biodistribution des micelles	43
II. Préparation de micelles PDA-PEG ₂₀₀₀ covallement liées à un principe actif.....	45
1) Pourquoi lier de façon covalente un médicament à un nano-vecteur ?.....	45
2) Stratégies envisagées pour lier un médicament de façon covalente aux micelles PDA-PEG ₂₀₀₀	46
a) Conception et synthèse d'un amphiphile DA-alcène-PEG ₂₀₀₀	46
b) 1 ^{ère} stratégie de fonctionnalisation : click avec une tétrazine.....	49
c) 2 ^{ème} stratégie : fonctionnalisation par réaction thiol-ène	51
III. Une alternative aux PEG : les micelles zwitterioniques	54
1) Les micelles zwitterioniques.....	54
2) Préparation de micelles zwitterioniques comme plateforme de ciblage passif	55
a) Les sulfobétaïnes	55
b) Ciblage passif de tissus tumoraux avec des micelles zwitterioniques	55
c) Micelles zwitterioniques portant un alcyne	59
IV. Conclusion	62
Chapitre 3 : Micelles activables par un stimulus	65
I. Préparation de micelles photoactivables.....	67
1) La lumière comme stimulus	67
2) Travaux antérieurs de l'équipe : préparation de micelles présentant une cytotoxicité déclenchée par la lumière UV	70
a) Synthèse des amphiphiles	70
b) Dégradation photochimique des micelles.....	71
c) Internalisation cellulaire et cytotoxicité	73
3) Adaptation de nos micelles aux besoins <i>in vivo</i>	74
a) Les nanoparticules à conversion ascendante.....	74
b) Micelles photosensibles chargées avec des UCNP	76
II. Préparation de micelles sensibles au pH.....	83
1) Bibliographie.....	83
2) Synthèse de l'amphiphile sensible en milieu acide.....	85
a) Synthèse de la partie hydrophile.....	85
b) Synthèse de la partie lipophile	86
III. Conclusion	90
Chapitre 4 : Ciblage actif des cellules cancéreuses avec les micelles PDA-PEG₂₀₀₀	93
I. Fonctionnalisation des micelles avec la biotine	95

1) Bibliographie.....	95
2) Préparation des micelles PDA-PEG ₂₀₀₀ fonctionnalisées avec de la biotine	96
a) Stratégie de fonctionnalisation avant assemblage et polymérisation des micelles	97
b) Stratégie de fonctionnalisation après assemblage et polymérisation des micelles.....	99
3) Internalisation cellulaire des micelles PDA-PEG ₂₀₀₀ -biotine	100
4) Effet thérapeutique	102
II. Fonctionnalisation des micelles avec un aptamère	106
1) Bibliographie.....	106
2) Fonctionnalisation des micelles PDA-PEG ₂₀₀₀ avec l'aptamère ACE4G	107
3) Internalisation cellulaire des micelles PDA-PEG ₂₀₀₀ -aptamère.....	109
III. Conclusion	109
Chapitre 5 : Les micelles comme outils de diagnostic par IRM	111
I. Micelles chargées avec du gadolinium pour l'IRM du proton.....	113
1) Bibliographie.....	113
2) Préparation des micelles gadolinium	114
a) Préparation de l'amphiphile DA-DOTA.....	114
b) Première approche : chélation du Gd après assemblage et polymérisation des micelles	115
c) Deuxième approche : assemblage des micelles à partir d'un amphiphile DA-DOTA-Gd	116
3) Étude des propriétés IRM des micelles chargées avec du Gd	117
II. Micelles fluorées pour l'IRM du fluor.....	120
1) L'IRM du fluor	120
2) Préparation des micelles et encapsulation du Perfecta	122
3) Expériences en IRM- ¹⁹ F	124
III. Conclusion	125
Conclusion générale	127
Partie expérimentale	131
Chapitre 2 : Ciblage passif des tumeurs avec les micelles polydiacéténiques	133
I. Synthèse	134
II. Assemblage et fonctionnalisation des micelles.....	159
Chapitre 3 : Micelles activables par un stimulus	161
I. Synthèse	161
II. Assemblage des micelles et protocoles d'irradiation.....	181
Chapitre 4 : Ciblage actif des cellules cancéreuses avec les micelles PDA-PEG ₂₀₀₀	182

I.	Synthèse	182
II.	Préparation des micelles	191
III.	Tests biologiques	193
	Chapitre 5 : Les micelles comme outils de diagnostic par IRM	196
I.	Synthèse	196
II.	Préparation des micelles	202
	Bibliographie.....	205

Liste des abréviations

ACN	Acétonitrile
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
Boc	tert-Butoxycarbonyle
CMC	Concentration Micellaire Critique
CPP	Paramètre d'empilement critique (Critical Packing Parameter)
DA	Diacétylène
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCC	Dicyclohéxylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DIAD	Diisopropyl azodicarboxylate
DLS	Dynamic Light Scattering
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMEP	Demethylepipodophyllotoxine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOTA	acide 1,4,7,10-tétraazacyclododecane-1,4,7,10-tétraacétique
DOX	Doxorubicine
EDC	(3-Diméthylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
EPR	Enhanced Permeability and Retention
FDA	Food and Drug Administration
HOBt	Hydroxybenzotriazole
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LCMS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
LCST	Lower Critical Solution Temperature
MET	Microscopie Électronique en Transmission
MsCl	Chlorure de mésyle
MTT	methyl-thiazolylidiphenyl-tetrazolium-bromide
NB	Nitrobenzyle
NIR	Proche infrarouge (Near InfraRed)
NTA	Nitrilo-triacétate
OTf	Triflate
PA	Principe Actif
PACA	poly(alkyl ccyanoacrylate)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Polydiacétylène
PEG	Polyéthylèneglycol
PEO	Poly(oxyde d'éthylène)
PFOB	Bromure de perfluoroctyle
PFPE	Perfluoropolyéther
PLA	Acide polylactique
PMA	Polyméthacrylate
PMAA	Poly(acide méthacrylique)
RES	Système réticulo-endothélial
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment
t.a.	température ambiante
TBTA	Tris[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine

TCBC 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride

TEA Triéthylamine

TFA acide trifluoroacétique

THF Tétrahydrofurane

TsCl Chlorure de Tosyle

UCNP *Upconversion nanoparticle* – Nanoparticules à conversion ascendante

UV Ultraviolet

Avant-propos

Au cours de cette thèse nous nous sommes intéressés au développement d'outils nanométriques pour le diagnostic et la thérapie. Des micelles polymérisées ont été préparées et leurs propriétés évaluées *in vivo*. Différentes générations de micelles ont été conçues permettant le ciblage passif et actif de tumeurs cancéreuses, la libération contrôlée de médicaments sous l'influence d'un stimulus et le diagnostic par imagerie par résonnance magnétique du proton et du fluor. Cette étude nous a permis de mettre en évidence la versatilité des micelles polymérisées et leur potentiel en nanomédecine.

Chapitre 1 : Le cancer et la nanomédecine

I. Le cancer

1) Généralités

À l'échelle mondiale, le cancer représente la deuxième cause de mortalité, après les maladies cardiovasculaires. Il est la première cause de mortalité chez l'homme et la deuxième chez la femme. En 2012, 14,1 millions de cas ont été recensés dans le monde, et on estime que ce chiffre atteindra 24 millions en 2035. Les cancers les plus fréquents sont les cancers du poumon, du sein, du colon et de la prostate.^{1,2} Le cancer résulte d'une multiplication incontrôlée de cellules non-fonctionnelles dans un organe ou une partie du corps. Les cellules cancéreuses sont issues de cellules « normales » dont l'ADN a subi une ou plusieurs mutations. Il en résulte un phénotype cellulaire qui stimule la prolifération des cellules et inhibe les signaux limitant leur croissance.³ Les cellules cancéreuses ne sont pas sujettes à l'apoptose et peuvent conduire à des métastases une fois qu'elles ont migré dans le corps par voie sanguine et/ou lymphatique.

Dans les années 1970, deux familles importantes de gènes ont été découvertes : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Les oncogènes, issus de mutations de gènes normaux appelés proto-oncogènes, sont responsables de la division incontrôlée de cellules. Les gènes suppresseurs de tumeurs sont, quant à eux, des gènes normaux qui contrôlent la division cellulaire, la réparation de l'ADN et envoient des signaux de mort cellulaire. Dans le cas du cancer, les gènes suppresseurs de tumeurs sont inhibés et les oncogènes sont activés, ce qui entraîne une prolifération cellulaire incontrôlée.⁴

Il existe quatre grandes catégories de cancers :⁵

- Les cancers solides : les tumeurs solides se développent dans tout type de tissus, 90 % des cancers humains sont des cancers solides.
- Les cancers liquides (ou sanguins).
- Les cancers métastatiques.
- Les cancers secondaires (effet secondaire d'un traitement anti-cancéreux antérieur).

2) Les traitements actuels du cancer et leurs effets secondaires

Selon l'état d'avancement du cancer, le type de cancer et du fait de sa variabilité d'un patient à un autre, il existe plusieurs types de traitements :

a) La chirurgie

La chirurgie peut être utilisée comme moyen de prévention, de diagnostic et de traitement du cancer. Dans le cas de la chirurgie préventive, il s'agit de retirer un tissu susceptible de devenir cancéreux et ce, même en absence de tout signe avant-coureur au moment de l'intervention. Elle est réalisée pour les personnes présentant des facteurs de risques élevés. La chirurgie est pratiquée par exemple pour les femmes qui ont des antécédents familiaux de cancer du sein et qui ont hérité d'une modification génétique au niveau d'un gène suppresseur de tumeurs (au niveau de BRCA1 ou BRCA2 par exemple). Chez ces patientes, on peut préconiser une ablation préventive du sein. Lorsqu'elle est utilisée comme outil de diagnostic, la chirurgie permet la réalisation de biopsies et l'analyse des cellules afin de

déterminer leur nature cancéreuse ou non et, le cas échéant, le type de cancer dont il s'agit. La chirurgie peut aussi permettre d'évaluer le stade d'avancement d'un cancer. Dans ce cas ce sont les nodules lymphatiques ainsi que les organes à proximité de la tumeur qui sont examinés, ce qui permet d'orienter une décision dans le traitement à appliquer. Lorsqu'un cancer solide n'a pas métastasé, il peut être classiquement éradiqué par la chirurgie, en association parfois avec d'autres traitements comme la chimiothérapie ou la radiothérapie. Lorsque le cancer ne peut être retiré totalement, d'autres traitements sont utilisés en complément de la chirurgie.

La chirurgie n'est efficace que lorsque le cancer est présent dans une seule partie du corps. S'il est métastasé, il faut alors envisager des traitements à plus large spectre.

b) La radiothérapie

La radiothérapie consiste à irradier les cellules cancéreuses à l'aide de rayons ionisants. Elle est utilisée pour traiter environ 50 % des patients atteints de cancer.⁶ Il s'agit d'un traitement localisé, avec peu d'effets secondaires sur les cellules saines. Il existe deux types de radiothérapie : la radiothérapie externe et la curiethérapie. Dans le cas de la radiothérapie externe, les rayons sont émis en faisceau par une source située à proximité du patient et traversent la peau pour atteindre la tumeur. Dans le cas de la curiethérapie, la source radioactive est implantée dans le corps du patient.

Même si la radiothérapie traite des parties ciblées du corps, des effets délétères peuvent se manifester conduisant au développement d'un cancer secondaire (bien que le risque soit faible) à cause de l'altération des tissus sains.

c) La chimiothérapie

La chimiothérapie (utilisation de médicaments « chimiques » pour soigner le cancer) permet de cibler des cellules cancéreuses quelle que soit leur localisation dans le corps. Elle peut être utilisée pour soigner le cancer, le contrôler, ou en tant que soin palliatif pour soulager la douleur et améliorer la qualité de vie du patient. Le choix du médicament et de la dose à utiliser dépendent du type de cancer, de son état d'avancement, de l'âge et de la santé globale du patient ainsi que de ses antécédents cancéreux. Les anticancéreux sont classés en cinq grands groupes selon leur mode d'action, leur structure chimique et leurs interactions avec les autres médicaments (Tableau 1).^{1,7} On distingue ainsi les agents alkylants, les antimétabolites, les antibiotiques anti-tumoraux, les inhibiteurs de topoisomérase et les inhibiteurs mitotiques.

Étant donné que ces traitements manquent encore de spécificité et que, par conséquent, ils touchent aussi les cellules saines, ils engendrent souvent des effets secondaires lourds qui peuvent persister des années, voire de façon permanente. Les effets secondaires les plus courants sont la fatigue, la perte de cheveux, l'anémie, les nausées et les vomissements pour n'en citer que quelques-uns. Certains traitements peuvent en outre induire un nouveau cancer qui peut apparaître plusieurs années après la fin de la cure.

Tableau 1 : Classification des anticancéreux avec leur mode d'action, quelques exemples, leur utilisation et leurs effets secondaires connus

Groupe	Mode d'action	Exemples de médicaments	Cancers traités	Effets secondaires possibles
Agents alkylants	Endommagent l'ADN de la cellule, l'empêchant ainsi de se reproduire	Chlorambucil Cisplatine Oxalaplatine	Poumon, sein, leucémie, lymphome	Peuvent causer une leucémie (risque dose dépendant, et plus élevé 5 à 10 ans après le traitement)
Antimétabolites	Interfèrent avec la croissance de l'ADN et de l'ARN en substituant des groupements Interviennent lors de la copie des chromosomes	5-fluorouracile Gemcitabine Hydroxyurée	Leucémie, sein, ovaires, intestin	
Antibiotiques anti-tumoraux :	Modifient l'ADN des cellules cancéreuses pour les empêcher de se multiplier		Divers types de cancers	
Les anthracyclines	Interfèrent avec des enzymes impliquées dans la copie de l'ADN lors du cycle cellulaire	Doxorubicine		Endommagent le cœur de manière permanente
Non-anthracyclines		Bleomycine Mitomycine		
Inhibiteurs de topoisomérase	Interfèrent avec des topoisomérases qui aident à séparer les brins d'ADN pour en permettre la copie		Leucémie, ovaires, poumon, gastrointestinal	
Inhibiteurs de topoisomérase I		Topotécan		
Inhibiteurs de topoisomérase II		Etoposide		Risque de développer un deuxième cancer (leucémie myéloïde aigüe) 2 à 3 ans après le traitement
Inhibiteurs mitotiques	Ils interagissent avec le fuseau mitotique et empêchent les cellules de se diviser		Sein, poumon, myélomes, leucémie	Dommages nerveux
Taxoïdes	inhibent la dépolymérisation de la tubuline	Docetaxel Paclitaxel		
Alcaloïdes de Vinca	inhibent la polymérisation de la tubuline	Vinblastine		

L'hydrophobicité des composés anticancéreux est une caractéristique nécessaire car elle permet aux molécules de franchir les membranes cellulaires. Cependant, la faible solubilité dans l'eau des principes actifs (PA) peut entraîner leur agrégation après injection intraveineuse, ce qui peut causer des embolies ou encore des concentrations en PA trop élevées au niveau du site d'agrégation et donc causer des effets toxiques localisés.⁸ Les traitements actuels présentent de nombreux effets

secondaires qui peuvent être réduits si l'on parvient à les rendre plus spécifiques des cellules cibles et à diminuer les doses nécessaires pour qu'ils soient efficaces. Ce sont les objectifs de la nanomédecine.

II. La nanomédecine

1) Définition

La nanomédecine se définit comme l'application des nanotechnologies à la santé et à la médecine. Elle repose sur l'utilisation de matériaux « vecteurs » de taille nanométrique pour faciliter le diagnostic de maladies, leur traitement et leur suivi. Les premiers résultats découlant du développement de la nanomédecine sont apparus dans les années 1960 à l'ETH de Zurich et c'est en 2000 que le terme est apparu dans les publications. À ce jour, il existe plusieurs définitions de la nanomédecine. L'une d'entre elles, donnée par l'US National Nanotech Initiative est l'application de matériaux de taille nanométrique en médecine tirant avantage des propriétés uniques des nanomatériaux. En 2013, plus de 100 nanomédicaments sont sur le marché et 147 sont en phase d'essais cliniques.⁹⁻¹²

La nanomédecine a été développée afin d'améliorer les caractéristiques physico-chimiques des principes actifs « classiques » qui présentent un certain nombre de limitations. Ces derniers sont en effet souvent hydrophobes et ne sont pas stables dans les conditions physiologiques. Il est donc nécessaire d'en administrer une dose importante pour obtenir un effet thérapeutique. Les nano-vecteurs permettent d'augmenter la solubilité des médicaments hydrophobes en milieu physiologique, améliorant ainsi leur profil pharmacocinétique et leur biodistribution. Les propriétés de ciblage tissulaire et cellulaire que présentent les nano-vecteurs permettent d'augmenter l'efficacité thérapeutique des médicaments embarqués et réduisent leur toxicité vis-à-vis des tissus sains. Pour être efficaces, les nano-vecteurs doivent présenter une toxicité réduite et être stables en milieu physiologique. Ils doivent également être capables d'échapper aux phagocytes mononucléaires, et aux macrophages dans les tissus et les organes, afin d'augmenter le temps de circulation sanguine de l'agent thérapeutique transporté et son efficacité. La surface des nano-vecteurs doit être adaptée chimiquement, de sorte à ce qu'elle soit biocompatible et inerte d'un point de vue biologique.¹³ Leur surface peut être également aménagée pour conjuguer des ligands permettant de cibler des cellules spécifiques.

Un nano-vecteur doit donc répondre à certaines caractéristiques :³

- Il doit être biocompatible et/ou biodégradable, il ne doit pas induire d'effets secondaires liés à son administration
- Il doit présenter des propriétés de furtivité afin d'échapper au système immunitaire et ainsi éviter sa capture par des cellules du système réticulo-endothélial (macrophages)
- Il doit faciliter le transport de la molécule thérapeutique jusqu'à sa cible et la protéger dans les conditions physiologiques
- Il doit libérer la molécule au niveau de sa cible de manière efficace

Différents types de nano-vecteurs sont actuellement développés pour améliorer le traitement de différentes pathologies, dont le cancer. Un nano-vecteur doit être conçu en prenant en compte les compartiments et barrières physiologiques qu'il aura à franchir.

2) Paramètres physiologiques à prendre en compte dans la conception des nano-vecteurs

a) Le système réticuloendothélial

Le système réticulo-endothélial correspond à un ensemble de cellules disséminées dans l'organisme, plus particulièrement au niveau du foie, de la rate et la moelle osseuse. Ce système possède diverses fonctions dont la fabrication des éléments du sang et la destruction des corps considérés comme étrangers que peuvent représenter les nano-vecteurs. Lorsqu'ils entrent dans l'organisme, les nano-vecteurs peuvent être pris en charge par des phagocytes et être éliminés. Cette prise en charge peut activer la sécrétion de cytokines causant une inflammation locale et une détérioration du tissu. Afin d'éviter la prise en charge non spécifique des nanoparticules par des tissus sains, leur chimie de surface peut être modifiée pour empêcher l'adsorption de certaines protéines. La fonctionnalisation avec des ligands zwitterioniques ou la PEGylation peuvent empêcher l'adsorption non spécifique de certaines protéines ainsi que l'opsonisation. Ce processus correspond à la fixation de protéines du plasma (appelées opsonines) à la surface des vecteurs, favorisant ainsi leur prise en charge par les macrophages et par conséquent leur phagocytose. La présence de PEG à la surface des nanoparticules augmente leur temps de circulation dans le sang.^{14, 15} La forme, la taille, la charge de surface, l'hydrophobicité ainsi que la chimie de surface jouent aussi un rôle dans la reconnaissance au niveau du système immunitaire.

b) Le système rénal

Le procédé d'ultrafiltration rénale peut réguler la pharmacocinétique des nanoparticules. La taille, la forme et la charge des nanoparticules sont des paramètres importants dans la voie d'élimination rénale. Les nanoparticules sphériques, lorsqu'elles ont un diamètre inférieur à 6 nm, sont éliminées par cette voie. En revanche, les particules de diamètre supérieur à 8 nm passent avec difficulté la barrière de filtration glomérulaire.¹⁵

c) La barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) bloque près de 98 % des molécules. Le franchissement de cette barrière est l'un des plus grands défis à relever pour parvenir à transporter des principes actifs au niveau du système nerveux central. Des études ont montré que des nanoparticules peuvent passer la BHE par l'intermédiaire de récepteurs exprimés au niveau de cellules endothéliales, entraînant une endocytose et le transport vers le système nerveux central. Pour ce faire, les nanoparticules doivent être fonctionnalisées avec des ligands de ciblage, ou des surfactants (comme le polysorbate 80 ou le poloxamère 188) qui permettent l'adsorption spécifique de certaines protéines (apo-lipoprotéines E ou A-I) qui sont capables d'interagir avec les récepteurs spécifiques exprimés au niveau de la BHE. La taille des nanoparticules a également de l'importance avec un diamètre idéalement compris entre 20 et 70 nm. La charge joue aussi un rôle car les particules neutres ou chargées négativement en surface n'altèrent pas la BHE alors que celles chargées positivement sont neurotoxiques du fait de la perméabilité augmentée.¹⁵

En dehors de ces considérations physiologiques, dans le cadre du traitement de tumeurs solides, les nano-vecteurs doivent parvenir à atteindre les cellules cancéreuses de manière spécifique. Pour cela,

il existe deux types de ciblage : un ciblage dit « passif » qui permet l'accumulation au niveau des tissus tumoraux et un ciblage dit « actif » qui permet d'atteindre spécifiquement certaines populations de cellules cancéreuses.

3) Ciblage passif des tissus tumoraux

Dans le cas des cancers solides, les tumeurs présentent une néo-vascularisation qui s'est développée en parallèle de la prolifération des cellules pour compenser les besoins croissants en nutriments et en oxygène. La croissance de ces vaisseaux sanguins en milieu inflammatoire entraîne l'apparition de défauts de jonction au niveau des cellules endothéliales, entraînant la formation de pores, ce qui accroît la perméabilité vasculaire. Les cellules tumorales compressent également les canaux lymphatiques, réduisant le drainage lymphatique. Ces deux phénomènes permettent l'accumulation de composés au niveau des tissus tumoraux ainsi que leur rétention, il s'agit de l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) (Figure 1).¹⁶ Cet effet découvert en 1986 par Maeda et ses collaborateurs¹⁷ peut être exploité pour le ciblage passif des tissus tumoraux.

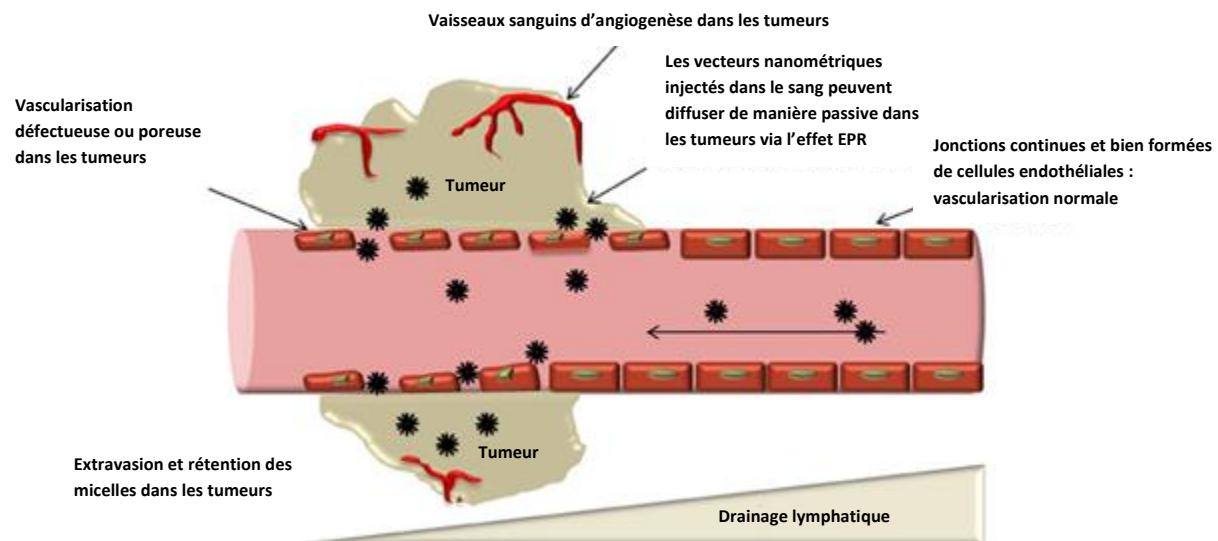


Figure 1 : Principe de l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention Effect) ¹⁶

Cet effet est exprimé dans de nombreuses tumeurs solides ainsi que certains nodules tumoraux métastatiques. Des composés de haut poids moléculaire comme les polymères ou des nanoparticules dont le diamètre est compris entre 10 et 500 nm peuvent, par ce biais, s'accumuler dans les tissus tumoraux.^{3, 18}

Cependant, cet effet ne permet que l'accumulation au niveau des tissus, il s'agit d'un ciblage passif. À ce stade, les vecteurs nanométriques ne sont pas préférentiellement internalisés dans les cellules cancéreuses. Pour cibler de manière spécifique les cellules cancéreuses il faut recourir à un ciblage dit actif.

4) Ciblage actif pour le traitement du cancer

Après s'être accumulés au niveau des tissus tumoraux grâce au ciblage passif, les vecteurs doivent être internalisés de manière spécifique dans les cellules cancéreuses. Afin de conférer ces propriétés aux vecteurs, ils peuvent être fonctionnalisés avec des ligands capables d'interagir avec les récepteurs

surexprimés à la surface des cellules cancéreuses. L'interaction entre ligand et récepteur permet une internalisation sélective par endocytose. Il s'agit ici d'un ciblage actif. Parmi les ligands de ciblage fréquemment utilisés, on trouve par exemple le folate et la transferrine.¹⁹ Pour le traitement du cancer, deux types de cellules peuvent être ciblées : les cellules cancéreuses et l'endothélium tumoral (Figure 2). Le ciblage des cellules cancéreuses vise à améliorer l'accumulation des nanoparticules dans ces dernières tandis que le ciblage de l'endothélium tumoral a pour but de priver les cellules cancéreuses d'oxygène et de nutriments.²⁰

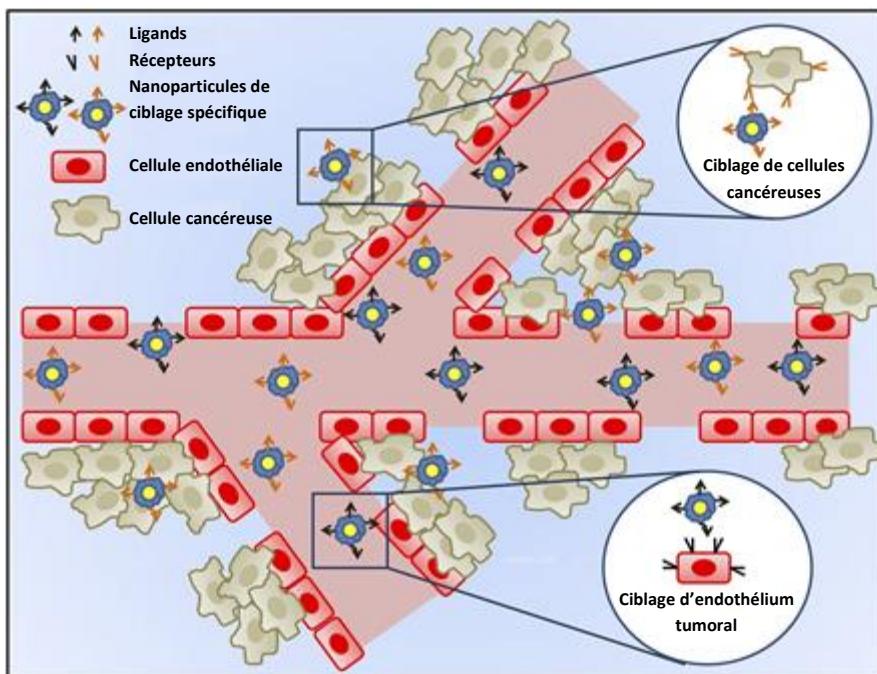


Figure 2 : Principe du ciblage actif²⁰

Le ciblage des cellules cancéreuses entraîne un effet direct par la libération des principes actifs dans la cellule. De nombreux récepteurs sont étudiés pour ce type de ciblage :

- Le récepteur à la transferrine : ce récepteur est 100 fois plus exprimé à la surface des cellules cancéreuses qu'à la surface des cellules normales.²⁰ Il a été montré que des formulations liposomales de doxorubicine, fonctionnalisées avec de la transferrine, s'accumulaient plus dans les cellules du cancer du poumon SBC-3-ADM, en 90 minutes d'incubation, que la doxorubicine libre et que la formulation liposomale sans transferrine.²¹
- Le récepteur au folate : il s'agit d'un marqueur de tumeurs qui se lie fortement avec son ligand, l'acide folique. Ce récepteur est surexprimé à la surface de certaines populations de cellules cancéreuses. Il a été montré que des liposomes fonctionnalisés avec du folate s'internalisent 31 fois mieux dans les cellules cancéreuses KB que les liposomes non fonctionnalisés.²²
- Les glycoprotéines exprimées à la surface des cellules : les cellules cancéreuses sur-expriment des glycoprotéines comme l'acide hyaluronique à leur surface. Ces glycoprotéines contiennent le plus souvent des sucres différents de ceux présents au niveau des cellules saines. Ainsi, les nano-vecteurs peuvent être fonctionnalisés avec des lectines pour cibler les sucres exprimés au niveau des cellules cancéreuses. Par ailleurs, certaines lectines sont elles-mêmes surexprimées à la surface de cellules cancéreuses (galectin-1 et galectin-2 à la surface de

cellules cancéreuses du colon). Ici ce sont des sucres qui seront utilisés pour cibler ces cellules.²³

- Le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) : il fait partie des récepteurs de type tyrosine kinase. Lorsqu'il est activé, il stimule des processus de croissance des tumeurs. Ce récepteur est surexprimé dans de nombreux types de cancer, notamment le cancer du sein, dans 15 à 20 % des cas.²⁴

D'autres récepteurs peuvent être ciblés lorsqu'il s'agit d'amener le vecteur au contact de l'endothélium tumoral. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est un récepteur endothérial surexprimé au niveau des tissus tumoraux. Des dérivés linéaires et cycliques du tripeptide Arg-Gly-Asp (RGD) ont été étudiés pour lier ce récepteur et cibler l'endothélium tumoral. Ainsi, la fonctionnalisation de liposomes PEGylés avec du RGD permet de lier cinq fois plus efficacement les cellules endothéliales de la veine ombilicale par rapport aux liposomes non fonctionnalisés.²⁵

5) Les nano-vecteurs actuellement développés

Plusieurs familles de vecteurs sont actuellement en cours de développement. Nous présentons ici quelques exemples de transporteurs nanométriques (les nanoparticules de polymères, les liposomes, les dendrimères et les micelles de polymères) qui peuvent bénéficier du ciblage passif et/ou actif. Il existe d'autres systèmes utilisés en nanomédecine pour véhiculer les principes actifs vers les cellules cibles comme les nanotubes de carbone ou les nanoparticules inorganiques mais ils ne seront cependant pas détaillés ici.

a) Les nanoparticules de polymères

Les nanoparticules de polymères ont des tailles comprises entre 10 et 1000 nm.³ Il existe plusieurs types de nanoparticules comme les nanocapsules, les particules de lipides, les nano-émulsions, ou encore les nano-bulles. Si les premières nanoparticules biodégradables ont été préparées à partir de polymères naturels, des polymères synthétiques comme le poly(alkyl cyanoacrylate) ou le poly(orthoester) ont par la suite été utilisés (Figure 3). Les nanoparticules de polymères présentent une grande flexibilité dans leur composition chimique, leur taille, leur capacité à se dégrader dans les milieux biologiques, leur forme et leur surface. Le cœur des nanoparticules est constitué de polymères hydrophobes biodégradables tels que des polyesters, des poly(alkyl cyanoacrylates), des poly-anhydrides ou encore des polymères naturels comme le chitosane.^{3,26}

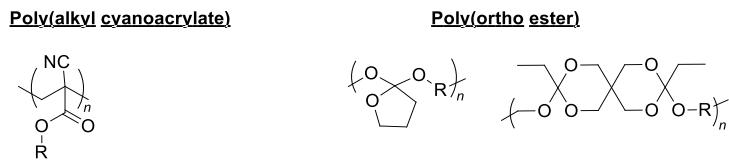


Figure 3 : Structures de poly(alkyl cyanoacrylate) et poly(ortho ester)

Les nanoparticules de polymères peuvent être classées en trois générations (Figure 4) :³

- Les nanoparticules dites de première génération :

Ces particules sont constituées de polymères hydrophobes biodégradables. Elles sont rapidement éliminées par le système réticuloendothélial et, par conséquent, s'accumulent majoritairement dans le foie. Ces nanoparticules sont donc adaptées au traitement de cancers qui ont métastasé au niveau de cet organe. Des nanoparticules de type poly(alkyl cyanoacrylate) chargées avec de la doxorubicine ont ainsi été utilisées pour le traitement des cancers du foie. Il a été montré que les polymères s'accumulaient préférentiellement dans les cellules de Kupffer et que la libération de doxorubicine au niveau des cellules cancéreuses était proportionnelle à la dégradation des nanoparticules. Cette prise en charge de la doxorubicine par le polymère permet de réduire sa toxicité cardiaque.

- Les nanoparticules de deuxième génération :

Ces nanoparticules sont recouvertes en surface d'un polymère hydrophile qui leur confère des propriétés de furtivité. Le poly(éthylène glycol) est le polymère le plus couramment utilisé, il permet de minimiser les interactions entre les nanoparticules et les protéines du plasma, ce qui a pour effet d'augmenter le temps de circulation sanguine des vecteurs. Les nanoparticules hydrophobes peuvent être recouvertes d'une couche hydrophile par adsorption d'amphiphiles PEGylés (comme le Pluronic par exemple) à leur surface. La préparation de nanoparticules présentant un polymère hydrophile en surface peut aussi être réalisée par nanoprecipitation ou par des méthodes d'évaporation de solvant à partir de blocs de copolymères amphiphiles (constitués de PEG par exemple et de polymères biodégradables hydrophobes). Ces nanoparticules, peuvent s'accumuler au niveau des tumeurs grâce à l'effet EPR car leur temps de circulation est augmenté.

- Les nanoparticules de troisième génération :

Ces nanoparticules disposent, en plus de la couche de protection de polymère hydrophile, d'un agent de ciblage. Les agents pouvant être utilisés sont, entre autres, des anticorps monoclonaux, des hormones, l'acide folique ou la transferrine.

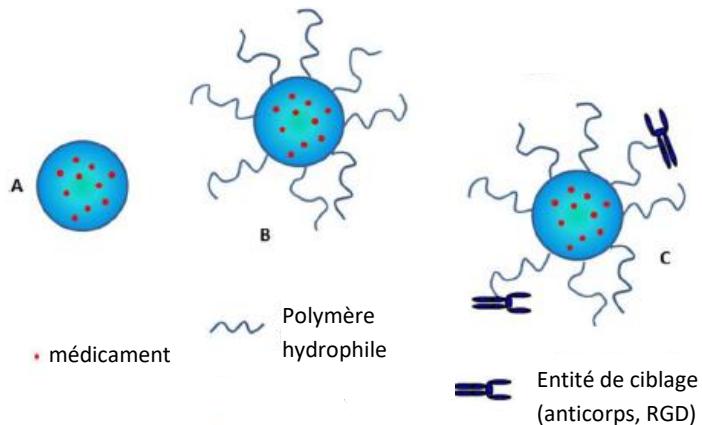


Figure 4 : Différentes générations de nanoparticules de polymères : A) première génération, B) deuxième génération, C) troisième génération ³

Bien que le procédé de synthèse des nanoparticules dépende de la structure considérée, différentes méthodes de préparation communes aux trois générations de nanoparticules sont possibles : ^{3,27}

- La méthode d'évaporation de solvant : le polymère, ainsi que la molécule active à encapsuler, sont solubilisés dans un solvant organique immiscible avec l'eau. La solution est émulsifiée par ultrasons dans l'eau puis le solvant est évaporé sous pression réduite.
- La méthode de salage : elle consiste en la solubilisation du polymère dans un solvant miscible à l'eau. De l'eau est ensuite rajoutée ainsi que des sels qui induisent la précipitation du polymère.
- La nanoprecipitation : le polymère est solubilisé dans un solvant organique miscible à l'eau et est additionné à une solution aqueuse qui conduit à une précipitation du polymère.

Il existe d'autres méthodes de préparation des nanoparticules comme la dialyse ou encore l'utilisation de fluides supercritiques.

b) Les liposomes

Les liposomes sont constitués d'une ou plusieurs bicouches lipidiques, formant un compartiment lipophile, un cœur polaire et une périphérie polaire en contact avec le milieu environnant (Figure 5). Ils sont constitués généralement de phospholipides. Les liposomes peuvent ainsi être chargés avec des principes actifs soit hydrophiles (au niveau du cœur polaire), soit lipophiles (au niveau de la bicouche lipidique).²⁶

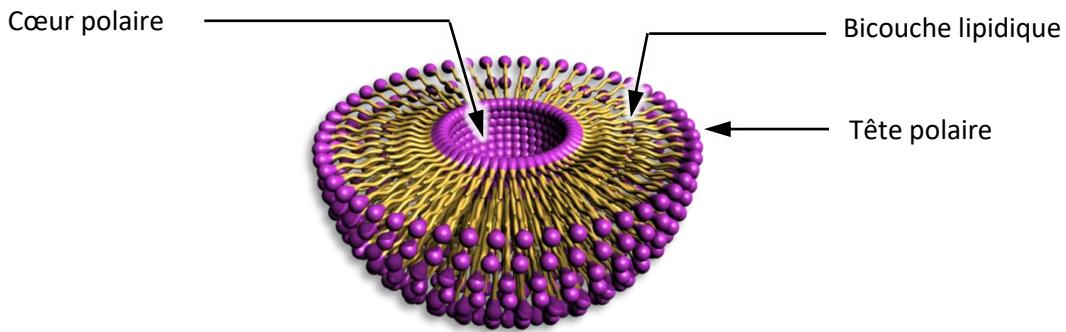


Figure 5 : Représentation d'un liposome

C'est Bangham qui, en 1965, a assemblé les premiers liposomes. Les phospholipides qui les constituent sont des amphiphiles qui possèdent une tête hydrophile et une queue hydrophobe. En milieu aqueux, ces derniers s'assemblent sous la forme de liposomes, il s'agit de l'organisation la plus stable minimisant les interactions entre les parties hydrophobes dans l'eau. Les liposomes sont classés en quatre catégories selon leur taille et leur nombre de bicouches, résultant de différents modes de préparation.^{27, 28}

Les catégories sont les suivantes :

- Les liposomes multi-lamellaires (MLV), leur taille est comprise entre 500 et 5000 nm.
- Les liposomes uni-lamellaires de petite taille (SUV), leur taille est d'environ 100 nm.
- Les liposomes uni-lamellaires de grande taille (LUV), leur taille est comprise entre 200 et 800 nm.
- Les liposomes géants (GUV), leur taille est supérieure à 1000 nm.

Les liposomes multi-lamellaires sont obtenus par évaporation du solvant organique contenant les phospholipides et la remise en suspension du résidu obtenu en solvant aqueux. Pour former les liposomes, il faut que la température soit supérieure à la température de transition de phase. En milieu aqueux, les phospholipides forment des bicouches. Les bicouches lipidiques sont concentriques et séparées par des couches d'eau. Les liposomes qui en résultent sont de taille variable.

Les liposomes uni-lamellaires de petite taille sont obtenus après un traitement aux ultrasons d'une suspension de liposomes multi-lamellaires à une température supérieure à la température de transition de phase.

Pour former les liposomes uni-lamellaires de grande taille, des cycles de congélation et décongélation d'une solution de liposomes multi-lamellaires sont réalisés, fragilisant la membrane de ces derniers et permettant la formation de structures uni-lamellaires.

Les liposomes géants sont obtenus par électro-formation. Un courant alternatif est appliqué dans une solution aqueuse à une fine couche de lipides présente sur des électrodes adjacentes.²⁹

Les liposomes peuvent vectoriser des molécules actives, par l'effet EPR et/ou par ciblage actif, vers les cellules cancéreuses. Le chargement en PA des liposomes peut se faire selon deux approches :³⁰

- De manière passive : le PA et les lipides sont co-dispersés dans une solution aqueuse, l'encapsulation se produit au cours de l'étape de formation des liposomes.
- De manière active : le PA est encapsulé après la formation des liposomes.

Les formulations liposomales de médicaments ont déjà montré leur efficacité. Le premier nanomédicament à avoir été approuvé par la FDA en 1995 est le Doxil®.³¹ Il s'agit d'une formulation de doxorubicine encapsulée dans un liposome PEGylé. Le PEG-DSPE (poly (éthylèneglycol) distearoylphosphatidylethanolamine) est le phospholipide utilisé, la partie PEG est utilisée comme stabilisateur stérique (Figure 6). La formulation du Doxil® est constituée de phosphatidylcholine de soja hydrogénée, de cholestérol et de PEG-DSPE dans un ratio molaire 55:40:5. Cette formulation est utilisée pour le traitement du sarcome de Kaposi.³²

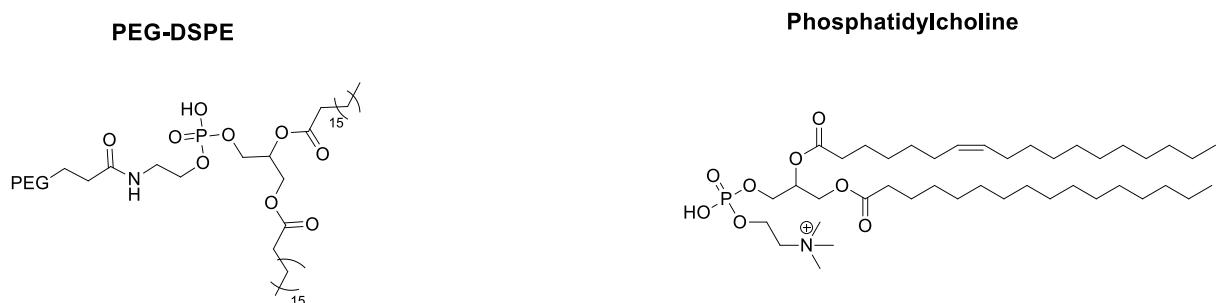


Figure 6 : PEG-DSPE et Phosphatidylcholine

c) Les dendrimères

Le mot dendrimère vient des termes grecs « dendron » qui veut dire arbre ou branche et « meros » qui signifie partie.³³ Les dendrimères sont des architectures macromoléculaires composées d'unités organiques hyperbranchées. Leur diamètre est inférieur à 20 nm. La chimie des branches des dendrimères peut être modulée pour les rendre furtifs ou les fonctionnaliser avec des ligands de ciblage.²⁶ Le dendrimère est constitué d'un cœur autour duquel sont branchés les dendrons. La structure d'un dendrimère est divisée en trois régions : le cœur, l'intérieur et la périphérie qui est fonctionnalisable. La génération du dendrimère correspond au nombre de points de branchement entre le cœur et la périphérie (Figure 7).²⁷

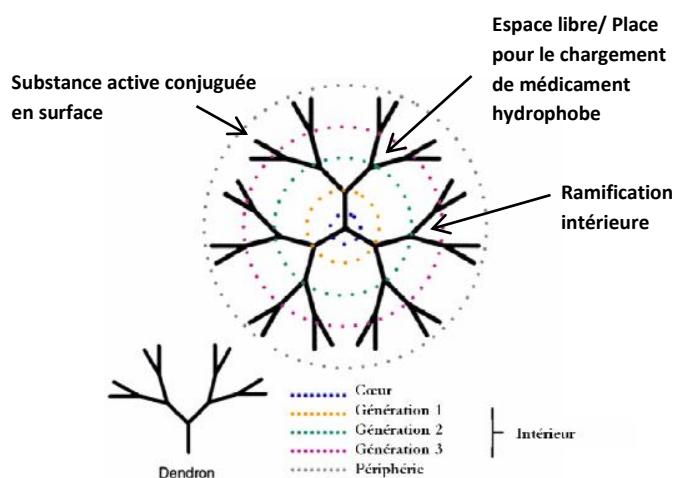


Figure 7 : Structure d'un dendrimère^{27, 34}

Il existe deux voies de synthèse des dendrimères.

- La synthèse divergente (Figure 8) :

Cette méthode a été développée par Tomalia³⁵ et Newkome³⁶ au début des années 1980. Elle consiste en une succession de réactions de couplage et d'activation à partir d'un noyau. Chaque série de couplage et d'activation permet l'ajout d'une génération à la structure du dendrimère. Lors de l'étape de couplage, le noyau qui est un monomère comporte plusieurs branches qui réagissent avec des groupements réactifs complémentaires non protégés situés sur d'autres monomères. Les groupes protégés peuvent ensuite être activés pour pouvoir réagir avec de nouveaux monomères et ainsi incrémenter le dendrimère d'une génération, il s'agit de l'étape d'activation. La croissance des dendrimères est ainsi contrôlée par la présence des groupements réactifs protégés, ce qui permet l'obtention de dendrimères de génération bien définie. Cette synthèse divergente permet la production à grande échelle des dendrimères. Cependant, la fonctionnalisation des branches peut être incomplète et des réactions secondaires peuvent se produire de génération en génération.²⁶

- La synthèse convergente (Figure 8) :

Cette approche a été développée par Fréchet.³⁷ Elle consiste à synthétiser le dendrimère depuis la périphérie vers le cœur. Des groupements terminaux sont placés sur les branches d'un monomère. Les fragments dendritiques sont synthétisés à partir de la périphérie puis une fois la taille souhaitée obtenue, les dendrons sont couplés au cœur du dendrimère. Cette approche permet un meilleur contrôle de la structure du dendrimère car elle réduit le nombre de réactions de couplage nécessaires. Les groupements fonctionnels peuvent aussi être placés de manière contrôlée sur la structure. Cependant il est difficile de travailler sur grande échelle avec cette méthode, elle permet préférentiellement la synthèse de dendrimères de petite taille.²⁶

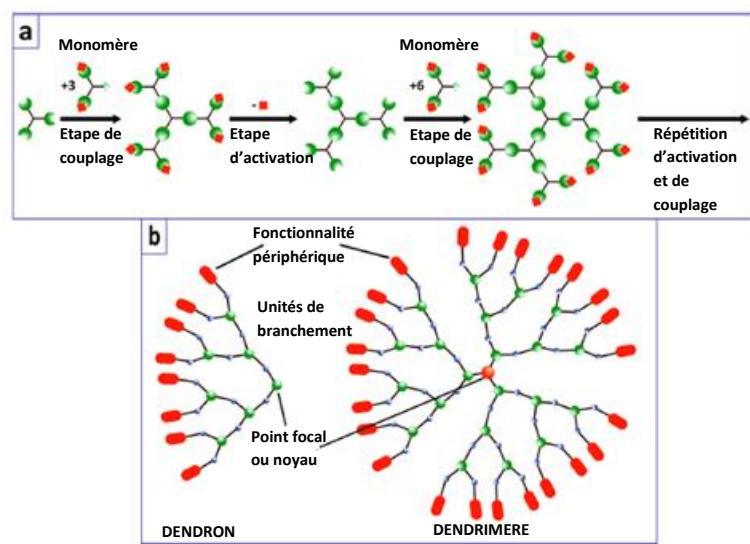


Figure 8 : Représentation schématique d'une synthèse divergente (a) et d'une synthèse convergente (b) de dendrimères.²⁶

Alors que la fonctionnalisation des dendrimères par des fonctions hydrophobes permet de les rendre solubles dans des solvants organiques,²⁷ la fonctionnalisation avec des PEG ou des sucres permet de les rendre hydrosolubles. Du fait de la variété des polymères pouvant être utilisés pour former les

dendrimères, ces derniers peuvent encapsuler différents types d'agents anticancéreux. Les dendrimères présentent la particularité de pouvoir transporter des principes actifs hydrophobes. Les molécules actives peuvent être encapsulées au niveau des branches ou liées de façon covalente à la périphérie des dendrimères (Figure 7). L'un des polymères fréquemment utilisé pour la synthèse des dendrimères est le poly (amidoamine) (PAMAM). Il s'agit d'un polymère hydrophile qui, sous forme de dendrimère, peut être utilisé pour transporter des PA hydrophobes.³⁴

Les principes actifs peuvent être encapsulés dans les dendrimères par interactions hydrophobes, liaisons hydrogènes ou interactions ioniques. En fonction de la génération des dendrimères, le taux de chargement en principe actif varie. Une étude réalisée par Ooya³⁸ a montré que des dendrimères de polyglycérol augmentent la solubilité du paclitaxel d'un facteur 270 lorsqu'ils sont de génération 3, d'un facteur 370 en génération 4 et 434 en génération 5.^{27, 39} La perméabilité du dendrimère change en fonction de la génération considérée. Le nombre de branches au niveau du cœur du dendrimère joue aussi un rôle sur la solubilisation des principes actifs hydrophobes car la cavité interne du dendrimère est modifiée. Plus il y a de branches, plus le dendrimère a un pouvoir de solubilisation élevé.²⁷

Les dendrimères présentent comme avantage d'être solubles dans l'eau, biocompatibles, polyvalents et d'avoir un poids moléculaire défini contrairement aux polymères classiques. Ces avantages ont conduit à une utilisation de plus en plus importante des dendrimères pour des applications biologiques.⁴⁰

d) Les micelles de polymères

Les micelles de polymères sont constituées d'un polymère constitué de deux régions présentant différentes affinités pour l'eau. Les blocs de copolymères amphiphiles d'architecture A-B ou A-B-A s'assemblent spontanément dans un milieu aqueux en micelles dont la taille varie de 5 à 100 nm.^{41, 42} En solution aqueuse, les parties hydrophobes s'agrègent pour former le cœur de la micelle tandis que les parties hydrophiles s'organisent autour pour protéger le cœur de l'eau environnante (Figure 9). Contrairement aux liposomes, le cœur des micelles est donc hydrophobe, ce qui leur permet de transporter des principes actifs de nature lipophile. Les micelles de polymères présentent l'avantage d'avoir une taille modulable ainsi qu'une forme et une surface modifiables. Elles sont aussi plus petites que les liposomes, ce qui leur permet de bénéficier au mieux de l'effet EPR car les pores engendrés par cet effet ont une taille comprise entre 400 et 600 nm, plus le vecteur est petit, plus son extravasation dans le microenvironnement tumoral et la pénétration dans les tissus sont efficaces.⁴³ Les micelles de polymères sont formées de copolymères à blocs qui possèdent des unités monomères hydrophiles et des unités monomères hydrophobes. La longueur du bloc hydrophile doit être plus grande que celle du bloc hydrophobe. Cependant, si la partie hydrophile est trop longue, les amphiphiles ne s'assemblent pas en micelles et si la partie hydrophobe est très longue, les copolymères forment des tubes.⁸

Il existe un équilibre entre les micelles formées et les unimères libres. Par rapport aux micelles formées à partir de surfactants monomériques, la concentration micellaire critique (CMC) des polymères (Figure 9), qui est la concentration à partir de laquelle les amphiphiles s'organisent en micelles, est plus faible, ce qui confère de la stabilité à la micelle. De plus, la stabilité des micelles de polymères

peut être accentuée en réticulant leur cœur.⁴¹ Pour que les micelles se forment, la température doit également être supérieure à la température micellaire critique.

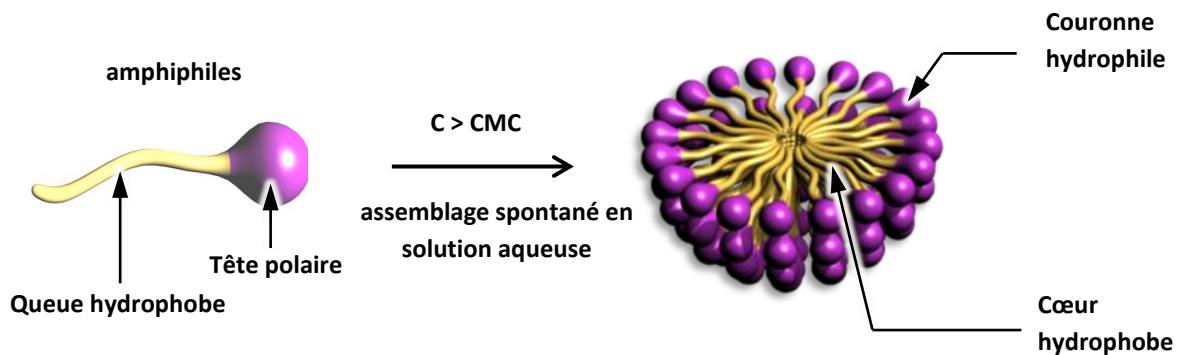


Figure 9 : assemblage spontané des micelles en solution aqueuse

Les micelles classiquement utilisées pour des applications biomédicales ont une taille comprise entre 10 et 80 nm, leur CMC est de l'ordre du millimolaire, voire du micromolaire pour certains copolymères, et leur taux de chargement varie entre 5 et 25 % en masse.⁸

Les amphiphiles de micelles de polymères sont souvent constitués de PEG pour former une couronne hydrophile. Le PEG est peu毒ique et sert de protection stérique vis-à-vis des protéines plasmatiques. Certains polymères hydrophiles sont parfois utilisés à la place du PEG comme le poly (*N*-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP) et l'alcool polyvinyle (Tableau 2). En ce qui concerne les monomères utilisés pour la partie hydrophobe, les plus courants sont l'oxyde de propylène, l'acide lactique et la caprolactone (Tableau 3).⁸

Tableau 2 : polymères hydrophiles utilisés pour la synthèse de copolymères amphiphiles

Bloc hydrophile	Structure chimique
PEG	$\text{H}(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{H})_n$
PVP	
Alcool polyvinyle	

Tableau 3 : polymères hydrophobes utilisés pour la synthèse de copolymères amphiphiles

Bloc hydrophobe	Structure chimique
Poly(oxyde de propylène)	
Acide polylactique (PLA)	
Polycaprolactone	

Les substances hydrophobes peuvent être chargées dans le cœur des micelles par des interactions physiques, ce qui permet une amélioration de la solubilité de certains anti-cancéreux.⁴¹ Une simulation mathématique montre que lors de l'encapsulation d'un principe actif hydrophobe, le procédé débute par le déplacement des molécules d'eau se trouvant dans le cœur des micelles suivi par l'accumulation du principe actif qui entraîne un déplacement des blocs hydrophobes se trouvant dans cette zone.⁴⁴ La taille des micelles peut donc augmenter du fait de l'expansion de son cœur. La taille des blocs hydrophobes et hydrophiles joue un rôle dans l'efficacité de chargement des micelles. Ainsi, plus le bloc hydrophobe est grand, plus le cœur de la micelle est gros et donc plus la quantité de PA chargé est importante. À l'opposé, plus la partie hydrophile est grande, plus la CMC diminue et plus la quantité de PA encapsulé est réduite. Il faut donc trouver un équilibre, car une chaîne hydrophile de PEG longue permet, par exemple, l'augmentation du temps de circulation et la furtivité vis-à-vis du système réticuloendothélial. L'efficacité de chargement d'un PA dépend de son hydrophobicité. Pour procéder à l'encapsulation, le protocole couramment utilisé est celui au cours duquel des solutions de PA et de polymères dans un solvant organique sont mélangées, les solvants organiques sont évaporés, un film est obtenu. Ce dernier est ensuite repris dans une solution aqueuse, les micelles se forment après agitation et le PA est encapsulé, l'excédent est éliminé par filtration.⁸

Le Genexol-PM est une formulation micellaire approuvée par la FDA pour le traitement des cancers du sein, du poumon et des ovaires.⁴⁵ Ce sont des micelles de copolymères diblocs constitués de PEG-poly (D,L-acide lactique) chargées avec du paclitaxel. Les essais de phase I montrent que le paclitaxel formulé sous forme de Genexol-PM est toléré à une plus forte dose (390 mg/m^2) que lorsqu'il est formulé en Taxol ($135\text{-}200 \text{ mg/m}^2$).⁴¹

e) Les micelles à cœur lipidique

D'autres types de micelles, ont un cœur hydrophobe constitué de phospholipides. Ces derniers peuvent apporter un gain de stabilité grâce à la présence des deux chaînes d'acides gras qui augmentent les interactions hydrophobes au cœur de la micelle. Les phospholipides sont conjugués à des polymères hydrophiles pour pouvoir former des micelles. Les amphiphiles utilisés sont par exemple des conjugués PEG-diacyllipides ou PEG-phosphatidyl ethanolamine (PEG-PE) (Figure 10). Ces conjugués de lipides et de polymères s'assemblent spontanément sous la forme de micelles en solution aqueuse. Les conjugués PEG-PE forment des micelles de taille comprise entre 7 et 35 nm et ont une CMC de l'ordre de $1 \mu\text{g/mL}$.⁸

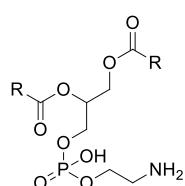


Figure 10 : Structure générale d'une phosphatidyl ethanolamine

6) Nano-vecteurs activables par un stimulus^{46, 47}

Grâce aux ciblages passif et actif, les nano-vecteurs peuvent véhiculer de manière plus efficace les principes actifs au niveau des tissus et cellules malades. Cependant, afin d'améliorer encore l'efficacité thérapeutique, ces objets peuvent être construits de sorte à ce qu'ils répondent à certains stimuli,

permettant ainsi une libération contrôlée du médicament au niveau de la cible. Cette approche est d'autant plus intéressante que le stimulus est propre à la maladie. L'idée de créer des nano-vecteurs répondant à des stimuli date des années 1970 avec l'utilisation de liposomes thermosensibles.⁴⁸ Il existe deux catégories de stimuli : les stimuli internes et externes.

a) Les stimuli internes

Dans le cas du cancer, certaines propriétés sont propres aux tissus et cellules malades. Il est donc possible d'utiliser ces stimuli biologiques pour procéder à une libération ciblée et contrôlée du principe actif par les nano-vecteurs. Le pH, la température et le microenvironnement redox ont des valeurs différentes au niveau des tissus tumoraux par rapport aux tissus sains.

Dans les tumeurs solides, le **pH** extracellulaire est plus acide (environ 6,5) que le pH du sang (7,4 à 37 °C). De plus, le pH au niveau des endosomes et des lysosomes à l'intérieur des cellules est plus bas que celui du cytosol. Il est donc possible, en choisissant une structure appropriée de nano-vecteur, d'exploiter ces variations de pH afin de libérer le principe actif au niveau de sites intracellulaires et extracellulaires spécifiques. Cette valeur plus faible de pH au niveau de la masse tumorale est liée au processus de formation de la tumeur. En effet, comme les tumeurs prolifèrent rapidement, la vascularisation au niveau de ces dernières est souvent insuffisante pour apporter assez de nutriments et d'oxygène pour l'ensemble des cellules tumorales. Cela entraîne une différence dans l'environnement métabolique entre les tumeurs et les tissus normaux. En effet, le manque d'oxygène (hypoxie) induit la production d'acide lactique et, par ailleurs, l'hydrolyse de l'ATP dans un environnement faible en énergie donne naissance à un microenvironnement acide.⁴⁶ Différents nano-vecteurs présentant des liens sensibles aux conditions de pH ont ainsi été préparés. Parmi les liens utilisés on trouve des groupes *cis*-aconityl, des hydrazones, des oximes, des acétals ou encore des éthers silylés (Figure 11).⁴⁷

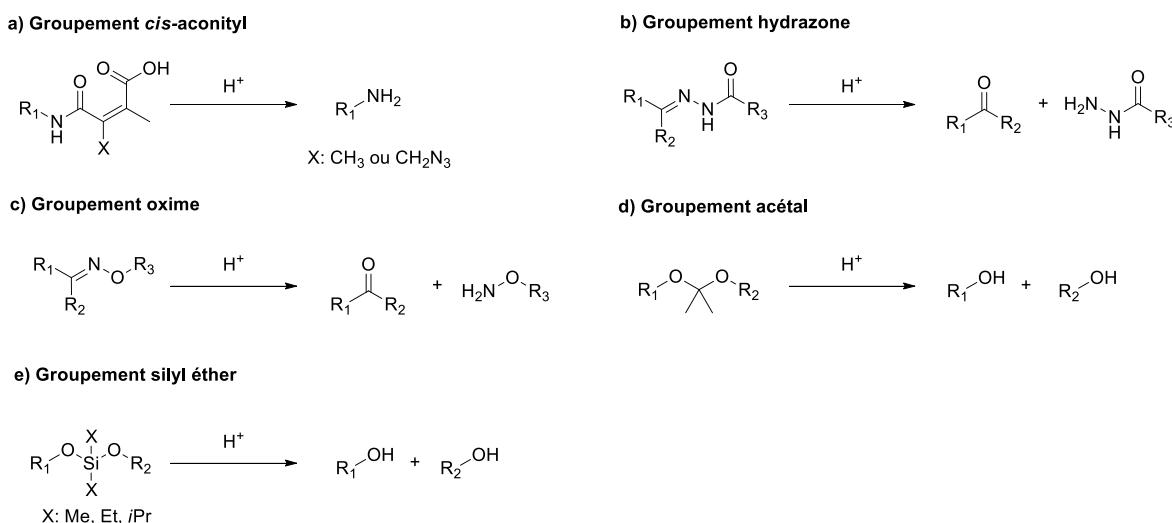


Figure 11 : Structure de quelques liens sensibles aux conditions acides⁴⁷

Fréchet a développé des micelles sensibles au pH qui peuvent libérer une molécule active encapsulée à pH 5. Le copolymère amphiphile possède un bloc hydrophobe labile (lien acétal) qui va, en conditions acides, s'hydrolyser et entraîner la rupture de la micelle pour libérer la substance encapsulée.⁴⁹

Les **propriétés redox** des cellules tumorales sont également différentes de celles des cellules saines. C'est le taux de glutathion présent à l'intérieur des cellules cancéreuses, 100 à 1000 fois plus élevé que dans le milieu extracellulaire, qui est responsable de ce phénomène. Cette concentration induit une différence de potentiel entre le milieu intracellulaire (qui a des propriétés réductrices) et le milieu extracellulaire (qui a des propriétés oxydantes). Des nano-vecteurs possédant des liens disulfures réductibles peuvent ainsi être utilisés pour libérer une molécule active à l'intérieur de la cellule. L'équipe de Cheng a ainsi préparé des micelles contenant des polymères conjugués à la camptothécine par un lien disulfure. Le polymère contenant la camptothécine est nanoprecipité avec du mPEG-*b*-Tyr-OCA et le cœur hydrophobe est réticulé avec un linker bis-azido par chimie click. Après clivage réducteur du linker et du lien camptothécine, les micelles sont déstabilisées et la camptothécine est libérée (Figure 12).⁵⁰

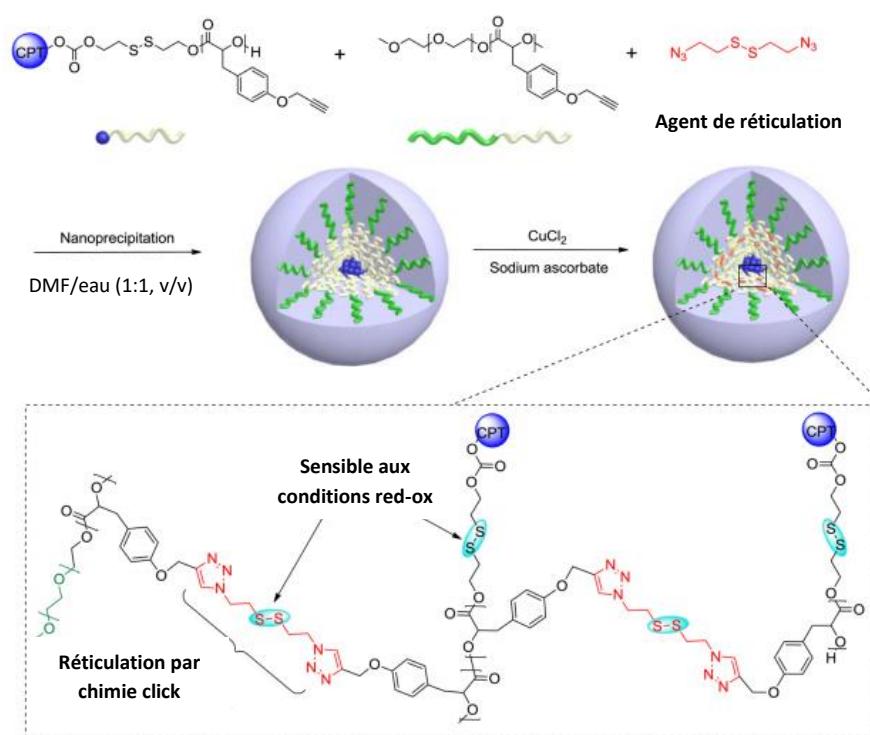


Figure 12 : Préparation de micelles réticulées sensibles aux conditions redox⁵⁰

b) Les stimuli externes

L'utilisation de stimuli externes est une autre stratégie pour perturber physiquement les nano-vecteurs. L'emploi de champs magnétiques, d'ultrasons ou de la lumière sont différents types de stimuli envisageables.⁵¹

L'utilisation d'un champ magnétique permanent peut permettre de guider les nano-vecteurs magnétiques vers un tissu malade. Pour diriger le vecteur, un champ magnétique externe est appliqué à la cible biologique (par exemple une tumeur) lors de l'administration d'une nanoparticule magnétique. Cela permet d'augmenter l'accumulation locale au niveau des tumeurs. Pour cette application, ce sont des nanoparticules possédant un cœur de magnétite (Fe_3O_4) ou de maghémite (Fe_2O_3) qui sont utilisées. L'application d'un champ magnétique permanent peut aussi entraîner la libération de principes actifs. Lorsque ces nanoparticules sont soumises à un champ alternatif, il se

produit un échauffement des particules qui se comportent alors comme des transducteurs. Ce type d'approche a été mis à profit pour le développement de thérapies par hyperthermie. L'utilisation du champ magnétique est cependant limitée aux nodules tumoraux accessibles.⁵¹ Les cellules tumorales semblent être plus sensibles au dommage causé par la chaleur que les cellules saines. La plupart des études cliniques sur l'hyperthermie utilisent des liposomes ou des nanoparticules contenant des oxydes de fer super-paramagnétiques. Les liposomes et les nanoparticules permettent de véhiculer les particules d'oxyde de fer au niveau des tissus souhaités. Lorsqu'un champ magnétique alternatif est appliqué *in vivo* (100–120 kHz) des températures locales comprises entre 40 et 45 °C sont atteintes. La chaleur peut également aider à accumuler plus de nanoparticules au niveau de la tumeur.⁵² Cela est possible en ajustant la transition LCST (Lower Critical Solution Temperature) des polymères utilisés pour assembler les vecteurs nanométriques. En effet, des polymères ayant une LCST légèrement supérieure à la température physiologique deviennent insolubles quand la température augmente. C'est ce phénomène qui leur permet de s'accumuler au niveau des tumeurs traitées par hyperthermie. Cela est possible pour une LCST de 40 °C par exemple. Les nano-vecteurs peuvent donc s'accumuler préférentiellement au niveau des tumeurs grâce au stimulus créant de la chaleur.⁵²

Les ultrasons sont efficaces pour réaliser un contrôle spatio-temporel de la libération des PA au niveau du site d'action souhaité. Il s'agit d'une technique non-invasive, et en ajustant la fréquence, il est facile d'ajuster la pénétration dans les tissus. Les ultrasons peuvent entraîner la libération de PA par des effets thermiques ou mécaniques causés par un phénomène de cavitation. Il a été montré que les forces physiques associées à la cavitation déstabilisent le nano-vecteur et entraînent la libération du PA. Cette cavitation permet en outre l'augmentation de la perméabilité au niveau des tissus tumoraux. Le seuil de cavitation est atteint avec des basses fréquences d'ultrasons (kHz).

Des systèmes sensibles à la lumière ont également été étudiés ces dernières années car ils sont non-invasifs et permettent de contrôler dans le temps et l'espace la libération des PA. Ces systèmes sont conçus pour se dégrader à la lumière (UV, visible ou proche infra-rouge) afin de libérer la molécule encapsulée. Ils peuvent aussi être utilisés pour produire de la chaleur par conversion de l'énergie lumineuse. C'est par exemple le cas des nano-bâtonnets d'or qui peuvent par irradiation dans le proche infrarouge générer une forte augmentation de température locale. Celle-ci a été mise à profit pour la déshybrideation de brins d'ADN à la surface des nanoparticules et la libération de la doxorubicine qui était associée à l'ADN (Figure 13).^{51, 53}

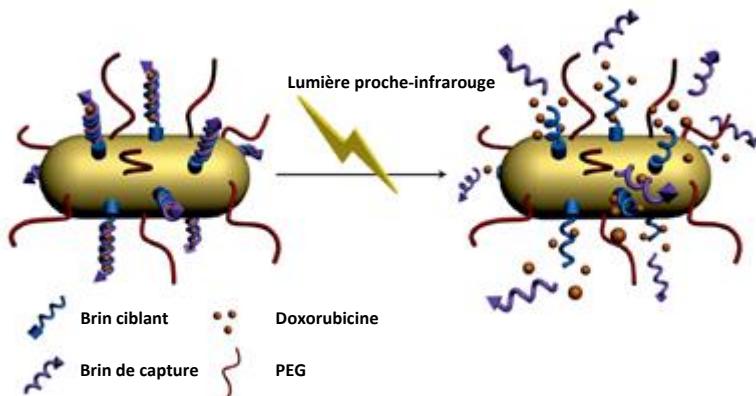


Figure 13 : Libération de doxorubicine par la déshybrideation de l'ADN conjugué à la surface de nanotubes d'or induite par le proche-infrarouge⁵³

III. Conclusion et objectifs de la thèse

Les principes actifs utilisés pour le traitement du cancer sont à l'origine de nombreux effets secondaires. La nanomédecine cherche à améliorer les propriétés pharmacocinétiques des médicaments et à être plus spécifique pour réduire ces effets secondaires. En travaillant sur la chimie de surface des nano-vecteurs pour les rendre plus circulants et en ajustant leur taille, l'accumulation de manière passive par effet EPR au niveau des tissus tumoraux est rendue possible. Cet effet permet de concentrer une plus forte dose de principe actif au niveau des tissus malades tout en diminuant la dose reçue au niveau des tissus sains. De plus, en fonctionnalisant les nano-vecteurs par des ligands de surface adaptés, il est possible de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses qui présentent des récepteurs de surfaces particuliers. Ce ciblage permet une meilleure internalisation du principe actif, la dose injectée peut alors être réduite. Différents objets sont développés et étudiés dans ce cadre : les nanoparticules de polymères, les liposomes, les dendrimères ainsi que les micelles de polymères ont déjà fait leurs preuves d'un point de vue clinique.

L'objectif de cette thèse est de développer des formulations micellaires, reposant sur les travaux antérieurs de l'équipe, pour cibler de manière passive les tissus tumoraux. Des micelles stimuli-sensibles seront également étudiées afin de permettre une libération contrôlée dans le temps et l'espace de la substance active en profitant soit d'un stimulus externe soit d'un stimulus interne propre aux tissus tumoraux. Ces objets peuvent être utilisés comme outils théranostiques, permettant simultanément le diagnostic et la thérapie. Enfin des micelles combinant les techniques de ciblage passif et actif seront également préparées.

Chapitre 2 : Ciblage passif des tumeurs avec les micelles polydiacétyléniques

I. Les micelles polydiacétyléniques

Les principes actifs médicamenteux couramment utilisés pour le traitement du cancer sont en général peu solubles en milieu aqueux et présentent une biodistribution difficile à contrôler. Un des défis de la nanomédecine consiste à développer des formulations nanométriques qui permettent de transporter ces molécules à activité thérapeutique à travers les différentes barrières biologiques pour atteindre sélectivement leur cible. Cependant, le développement de nano-vecteurs biocompatibles, qui ont un taux de chargement élevé, un temps de circulation long, une biodistribution et une pharmacocinétique favorables est un défi qui reste à relever. Parmi les différents nano-vecteurs, les micelles présentent un certain nombre d'avantages tels qu'un assemblage aisément réalisable et une forte capacité de chargement. De plus, du fait de leur taille réduite, les micelles peuvent bénéficier d'une diffusion en profondeur dans les tissus cibles. Cependant, les micelles conventionnelles sont assez peu stables (car dynamiques par nature) et ont une concentration micellaire critique (CMC) relativement élevée, ce qui conduit, en conditions diluées comme dans le sang, à une déstabilisation de l'édifice supramoléculaire. Afin de contourner ces limitations, des micelles de polymères ont été développées. Ces micelles ont une CMC plus faible mais leur diamètre est relativement important (généralement compris entre 5 et 100 nm).^{27, 41} Dans notre équipe, nous avons fait le choix de développer des micelles compactes constituées d'amphiphiles qui incorporent une fonction diacétylénique qui peut être polymérisée après la formation des micelles. Cette polymérisation a pour effet de renforcer la stabilité des micelles et de les rendre moins sensibles à la dilution.⁵⁴ Dans des travaux antérieurs, plusieurs dérivés de ces micelles ont été élaborés au laboratoire. Ils sont présentés ci-après.

1) Micelles PDA-NTA

Les micelles de première génération, dites PDA-NTA, ont été développées au laboratoire en 2007. Elles sont constituées d'unités amphiphiles **DA-NTA** qui incorporent un groupement diacétylénique (DA) et une tête polaire nitrilo-triacétatique (NTA) (Figure 14). La partie lipophile comporte 25 atomes de carbone et deux fonctions acétyléniques contigües en position 10 et 12. À l'issue de l'assemblage des micelles en solution aqueuse, les entités diacétyléniques sont polymérisées par irradiation sous lumière UV à 254 nm. Ce processus de polymérisation s'opère selon un mécanisme topochimique d'addition conjuguée 1,4 (Schéma 1).^{14, 54} Cette étape permet de stabiliser la structure des micelles PDA-NTA polymérisées en les rendant plus stables même lorsqu'elles sont diluées à une concentration inférieure à la CMC. Alors que la CMC des micelles non polymérisées est de 15 mg L⁻¹, elle est inférieure à 1 mg L⁻¹ après polymérisation.⁵⁵

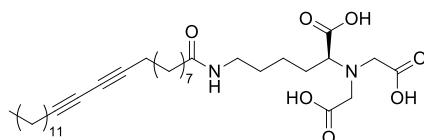


Figure 14 : amphiphile **DA-NTA**

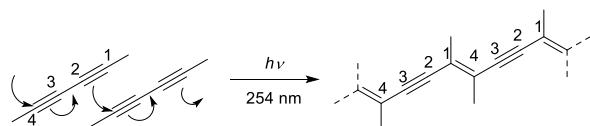


Schéma 1 : Mécanisme de photopolymérisation du motif diacétylène

Selon le pH du milieu dans lequel les amphiphiles baignent, leur comportement supramoléculaire est variable. Dans des conditions de pH neutres, les amphiphiles s'assemblent en bicouches formant des structures en forme de ruban. Après irradiation lumineuse à 254 nm, la solution de ruban devient bleue. Cette couleur est due à la nature hyper-conjuguée du système polymérisé. Lorsque cette solution est chauffée à 70 °C, la couleur évolue progressivement vers le violet puis le rouge, indiquant la formation de spirales. Il s'agit d'un procédé réversible, mais lorsque l'échantillon est chauffé à de plus fortes températures, des nanotubes organiques se forment de façon irréversible (Figure 15). Par contre, lorsque le pH de la solution d'amphiphiles est basique (> 10), ces derniers s'assemblent sous forme de micelles d'environ 6–7 nm de diamètre. Au cours de la polymérisation, la solution colloïdale devient jaune. Cette coloration est propre à l'augmentation de la conjugaison du polymère (qui reste cependant bien loin de l'hyper-conjugaison des bicouches).^{54, 56}

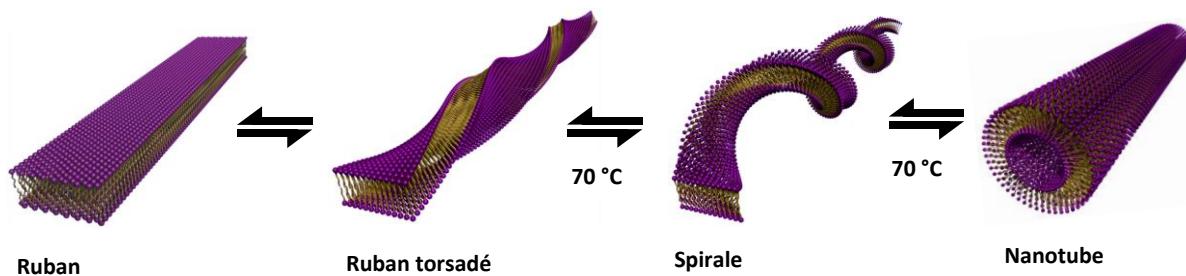


Figure 15 : Représentation schématique des assemblages supramoléculaires obtenus lors de l'irradiation sous UV du DA-NTA en conditions neutres

Cette différence de comportement en fonction du pH est due à l'état de protonation de la tête polaire NTA. Ce dernier fait varier le paramètre d'empilement critique (*critical packing parameter*, CPP) qui est inversement proportionnel à la surface de la tête polaire. Les micelles se forment pour un CPP inférieur à 0.33, ce qui est le cas lorsque l'amine tertiaire du NTA et les trois acides sont déprotonés (Figure 16).

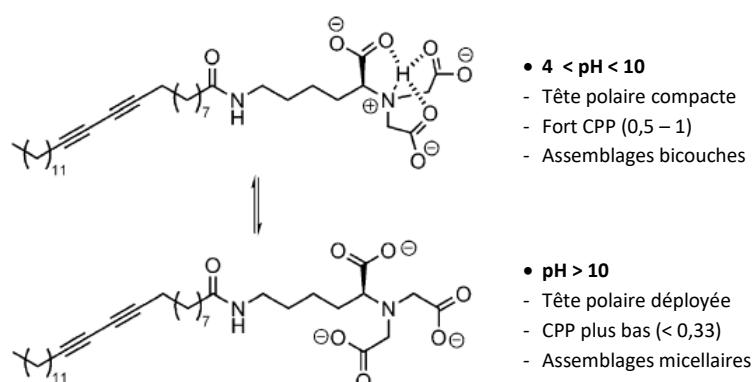


Figure 16 : CPP en fonction de l'état de protonation de la tête NTA⁵⁴

2) Micelles PDA-PEG

Afin de pouvoir transporter les molécules thérapeutiques à travers les différentes barrières biologiques, il a été montré que l'habillage des nano-vecteurs avec des polymères hydrophiles comme le PEG limitait leur prise en charge par le système réticulo-endothélial (RES) et améliorait le temps de résidence des micelles dans le sang. En effet, la présence de PEG confère aux nano-vecteurs une protection stérique qui limite l'opsonisation qui correspond à la fixation de marqueurs protéiques (opsonines) à la surface des vecteurs. Ce marquage conduit classiquement à l'identification des vecteurs comme corps étrangers et à leur phagocytose par des monocytes circulants.⁵⁷ Par ailleurs, le poids moléculaire du PEG utilisé est important pour la biocompatibilité et le comportement furtif de la micelle.⁵⁸ Il est donc nécessaire d'ajuster la taille du polyéther en fonction des propriétés souhaitées. Notre équipe a synthétisé des amphiphiles polymérisables qui présentent une chaîne lipophile diacétylénique constante et une partie hydrophile PEG de taille variable. Le comportement *in vivo* de ces micelles a été étudié et comparé avec celui des micelles PDA-NTA.¹⁴ Deux tailles de PEG ont été incorporées aux micelles, un PEG₃₅₀ et un PEG₂₀₀₀. Ces micelles se forment spontanément en solution aqueuse, quel que soit le pH (contrairement aux micelles PDA-NTA dont la formation dépend de la valeur du pH). Le volume de la tête polaire est ici contrôlé par la seule taille du PEG et non par son état de protonation.

Afin de pouvoir envisager une fonctionnalisation ultérieure des micelles, les amphiphiles PEG simples ont été mélangés à des amphiphiles terminés par un groupement carboxylate (Figure 17). Les micelles ont été assemblées dans un ratio de 1:1 de chacun des amphiphiles et polymérisées sous UV. Le diamètre des micelles PEGylées est de 8 nm pour la micelle PEG₃₅₀ et de 13 nm pour la micelle PEG₂₀₀₀.⁵⁴

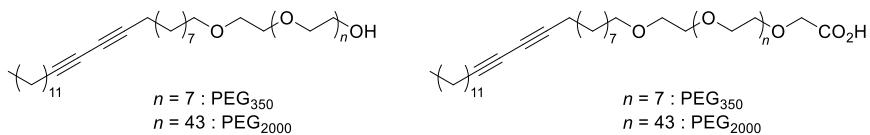


Figure 17 : Structure chimique des amphiphiles PEGylés

3) Biodistribution des micelles

La biodistribution des micelles PDA-NTA, PDA-PEG₃₅₀ et PDA-PEG₂₀₀₀ a été étudiée après avoir fonctionnalisé leur surface avec une sonde fluorescente FluoroProbes 730 (FP730). La fonctionnalisation a été réalisée par un couplage peptidique entre l'amine primaire du fluorophore et les acides carboxyliques présents à la surface des micelles. La présence de cette sonde à la surface des micelles permet de suivre leur biodistribution *in vivo*. Les micelles ont été injectées dans la veine caudale de souris xénogreffées avec la lignée cancéreuse MDA-MB-231 (cancer du sein). La biodistribution des micelles a été étudiée par imagerie planaire proche infrarouge (NIR). L'observation de la face ventrale montre que les micelles s'accumulent principalement dans le foie et les intestins quelques heures après l'injection. Aucune fluorescence n'a été observée dans la rate, la vessie ou les reins, suggérant la mise en place d'une voie d'excration hépatobiliaire. 24 h après l'injection des micelles, une accumulation forte au niveau de la tumeur est observée. En effet, un contraste marqué de fluorescence est détecté entre la tumeur et les tissus sains. Cette observation indique que les micelles se sont sélectivement accumulées dans la tumeur par effet EPR. La micelle PDA-PEG₂₀₀₀ est deux fois plus accumulée dans la tumeur que les autres systèmes micellaires (Figure 18). La

pharmacocinétique et la stabilité des micelles *in vivo* ont également été étudiées. Des échantillons de sang ont été collectés au cours du temps et la fluorescence du plasma mesurée à 732 nm. Les paramètres pharmacocinétiques ont été calculés avec un modèle à deux compartiments. Pour les trois types de micelles, le $T_{1/2\beta}$ (demi-vie dans le sang associée à la deuxième phase) est proche (entre 400 et 500 min) alors que le $T_{1/2\alpha}$ (demi-vie dans le sang associée à la 1^{ère} phase) varie de 11.7 à 42 min. Les micelles PEG₂₀₀₀ ont la meilleure pharmacocinétique (Tableau 4). Une électrophorèse sur gel d'agarose non dénaturant a permis de montrer que les micelles étaient stables dans le sang. En effet, les objets obtenus par prélèvement sanguin ont le même profil de migration que des échantillons non injectés.¹⁴ Ces observations mettent en évidence la supériorité des micelles PDA-PEG₂₀₀₀ comme candidats vecteurs. C'est la raison pour laquelle nous avons retenu ce système micellaire pour le transport de principes actifs et comme outil d'imagerie *in vivo*.

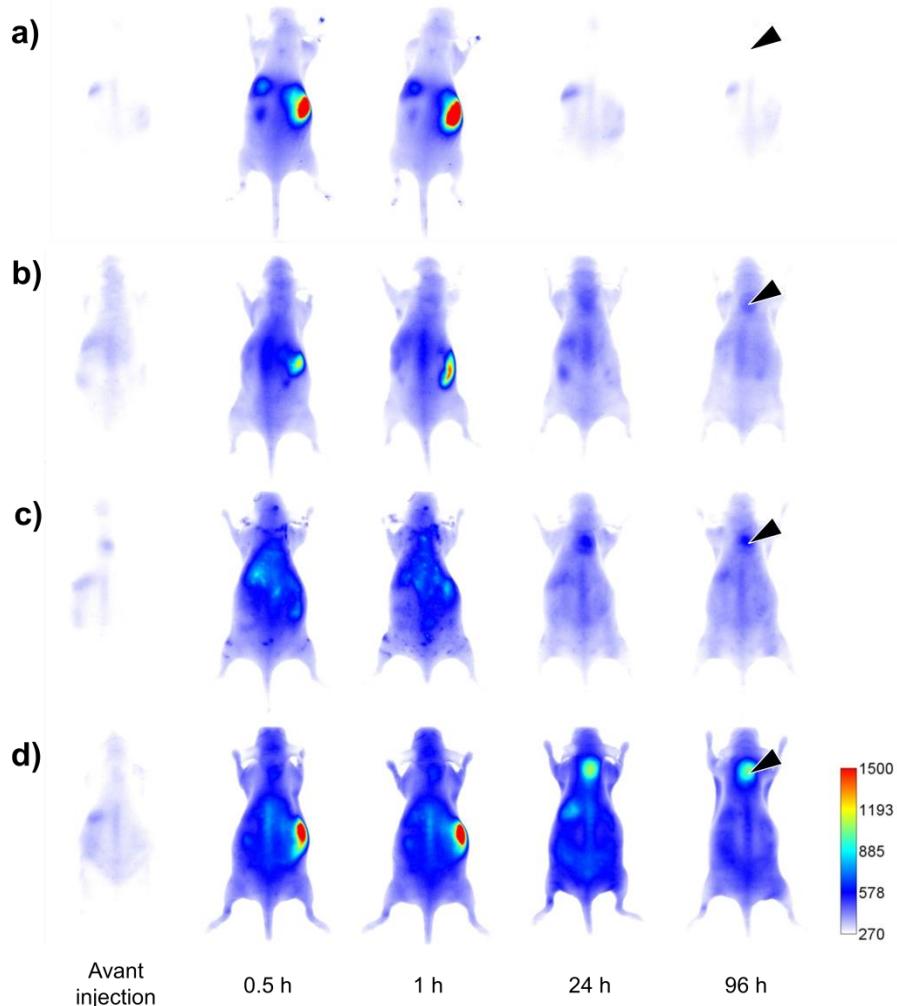


Figure 18 : Biodistribution par imagerie planaire NIR après injection intraveineuse dans des souris portant des xénogreffes MDA-MB-231 : a) FP730 seul, b) micelles PDA-NTA-FP730, c) micelles PDA-PEG₃₅₀-FP730, d) micelles PDA-PEG₂₀₀₀-FP730¹⁴

Tableau 4 : Paramètres pharmacocinétiques des différentes micelles¹⁴

Micelles	$T_{1/2\alpha}$ (min)	$T_{1/2\beta}$ (min)
PDA-NTA	12 ± 5.8	457 ± 35
PDA-PEG ₃₅₀	22 ± 1.5	433 ± 40
PDA-PEG ₂₀₀₀	42 ± 0.5	525 ± 72

II. Préparation de micelles PDA-PEG₂₀₀₀ covalemment liées à un principe actif

1) Pourquoi lier de façon covalente un médicament à un nano-vecteur ?

Lorsqu'une formulation nanométrique est injectée *in vivo*, il y a potentiellement un risque de libération non-contrôlée de la cargaison médicamenteuse si le principe actif est associé au vecteur de manière non covalente. Ce phénomène est essentiellement dépendant de la nature chimique de la molécule transportée. Cette libération peut entraîner un relargage massif du médicament, c'est ce que l'on appelle le « burst release ».⁵⁹ Pour pallier ce relargage incontrôlé, une liaison covalente entre le médicament et le nano-vecteur peut être envisagée. Cette stratégie permet de renforcer l'association entre la nanoparticule et le principe actif et d'augmenter son temps de circulation sanguine, favorisant ainsi l'accumulation dans les tumeurs par effet EPR tout en diminuant les effets secondaires.

Dans la littérature, de nombreuses études ont été réalisées sur la doxorubicine. Ce médicament est couramment utilisé dans le traitement de cancers, mais n'étant pas spécifique des cellules cancéreuses, il provoque de nombreux effets secondaires, essentiellement cardiaques. La dose qui peut être utilisée est donc limitée. Le Doxil®, une formulation liposomale de la doxorubicine, a été utilisé pour améliorer l'effet thérapeutique du médicament et diminuer ses effets secondaires.

Des pro-drogues sont aussi utilisées pour améliorer l'effet thérapeutique des principes actifs. Haisma *et al.* ont étudié une pro-drogue de la doxorubicine : la doxorubicine-glucuronide (DOX-GA3) (Figure 19), qui est activée *in vivo* par la β -glucuronidase, une enzyme présente dans l'espace extracellulaire des tumeurs nécrotiques. Sous forme de pro-drogue, la dose tolérée de doxorubicine est 60 fois supérieure à celle de la doxorubicine libre lorsqu'elle est administrée à des souris portant une tumeur OVCAR-3. La toxicité systémique est réduite et une plus grande concentration de doxorubicine est accumulée dans les tissus tumoraux. Cependant, l'un des inconvénients de cette prodrogue glucuronide est son hydrophilie qui conduit à une élimination rapide par les reins. L'utilisation de doses « massives » est donc nécessaire pour observer un effet thérapeutique. Afin de contourner ce problème, un dérivé ester méthylique lipophile de DOX-GA3 a été préparé (Figure 19) : DOX-mGA3, qui est hydrolysé en DOX-GA3 par les estérases présentes dans le sang. Du fait de la libération lente dans le sang de DOX-GA3 après l'administration de DOX-mGA3, les propriétés pharmacocinétiques sont améliorées.⁶⁰⁻⁶³ Cependant, elle présente une mauvaise solubilité aqueuse, ce qui diminue l'intérêt thérapeutique. Talelli *et al.* ont résolu ce problème en liant de façon covalente une pro-drogue de la doxorubicine (DOX-propGA3) à un copolymère à bloc amphiphile par une réaction de click entre l'alcyne présent sur la pro-drogue et l'azoture du copolymère (Schéma 2). Ce copolymère à bloc s'assemble sous forme de micelles liées de manière covalente à la doxorubicine. L'équipe a ainsi montré que la doxorubicine incorporée dans ces micelles de polymère est aussi efficace *in vitro* que la

doxorubicine avec des cellules UM-SCC-14C. Ce résultat laisse espérer un meilleur comportement *in vivo* que la pro-drogue DOX-mGA3.⁶⁴

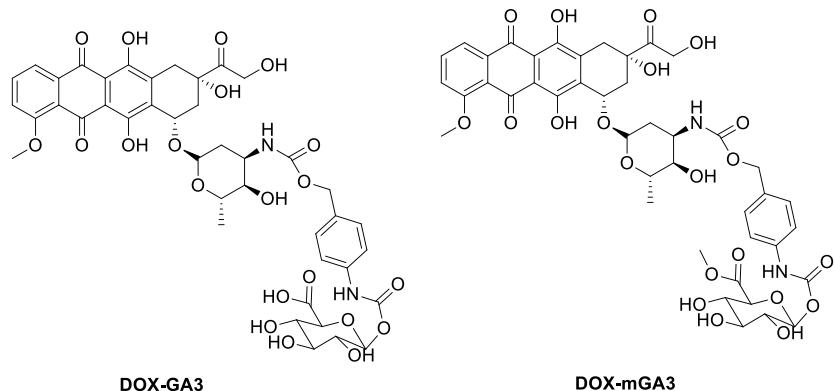


Figure 19 : Structures chimiques de DOX-GA3 et DOX-mGA3

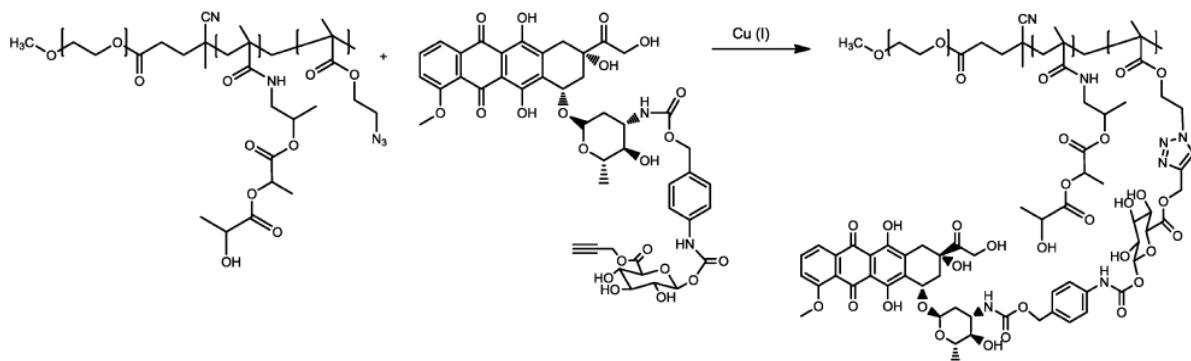


Schéma 2 : Click entre le copolymère bloc mPEG₅₀₀₀-b-p(HPMAMac₂-r-AzEMA) et DOX-propGA3⁶⁴

Lier un médicament de manière covalente à son transporteur présente donc un certain nombre d'avantages. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi d'assembler une micelle polydiacéténique pouvant servir de vecteur de médicaments par une prise en charge covalente de ces derniers.

2) Stratégies envisagées pour lier un médicament de façon covalente aux micelles PDA-PEG₂₀₀₀

Pour permettre la liaison covalente d'un principe actif sur les micelles PDA-PEG₂₀₀₀, un amphiphile a été conçu présentant un point d'accroche alcène. Le groupement alcène permet en effet d'envisager une fonctionnalisation de type click tétrazine-alcène ou thiol-ène. L'alcène sera positionné à la jonction entre la partie hydrophile et la partie lipophile de l'amphiphile de manière à protéger la molécule transportée par la couche périphérique de PEG.

a) Conception et synthèse d'un amphiphile DA-alcène-PEG₂₀₀₀

Un alcène peut être fonctionnalisé de diverses façons. Des réactions entre des tétrazines et des alcènes contrains ont été décrites par Fox et ses collègues et s'avèrent être rapides.⁶⁵ Il s'agit d'une réaction

de type Diels-Alder à demande inverse d'électrons. La réaction entre le *trans*-cyclooctène et la dipyridyltétrazine se fait dans l'eau avec une constante $k = 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Schéma 3).⁶⁶

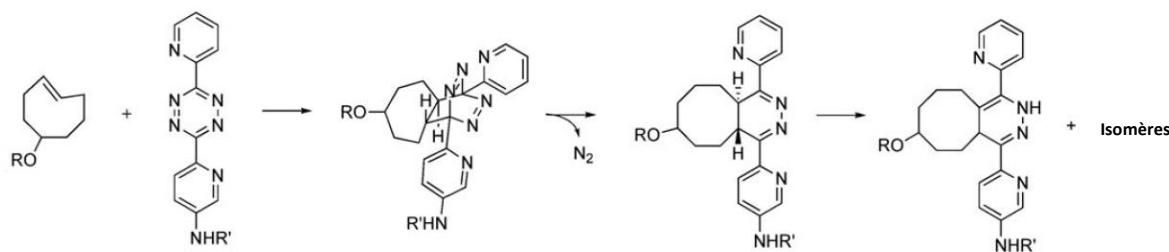


Schéma 3 : Réaction entre le *trans*-cyclooctène et la dipyridyltétrazine⁶⁶

L'utilisation d'oléfines contraintes dans notre cas n'est pas adaptée car ces oléfines sont sensibles aux rayonnements UV et risquent de se dégrader à l'étape de polymérisation de la micelle. Toutefois, Lee *et al.* ont pu montrer que des oléfines non contraintes pouvaient également réagir avec des tétrazines avec des vitesses de réaction plus lentes (k compris entre $1,2 \cdot 10^{-3}$ et $81 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, dans un tampon PBS).⁶⁷ C'est la raison pour laquelle, nous avons envisagé de fonctionnaliser les micelles avec un alcène linéaire qui devrait être moins sensible au rayonnement UV. Cet alcène sera fonctionnalisé par chimie « click » avec une tétrazine liée au principe actif médicamenteux ou par réaction avec un thiol.⁶⁸ Ces deux réactions peuvent en effet être classées dans la famille des réactions « click » (dont le concept a été introduit en 2001 par Sharpless) car elles sont bio-orthogonales, ne forment pas de sous-produits et conduisent à des systèmes moléculaires liés dans des conditions réactionnelles douces.⁶⁹

Nous avons choisi de modifier les micelles « classiques » PDA-PEG₂₀₀₀ pour permettre leur fonctionnalisation de manière covalente avec un principe actif. Cette approche nécessite de synthétiser une unité amphiphile qui comporte un point d'accroche, sous la forme d'une fonction alcène, situé entre la partie lipophile diacétylénique et la partie hydrophile PEG (Figure 20).

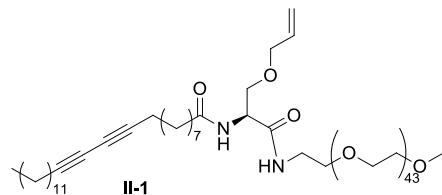


Figure 20 : Structure de l'amphiphile DA-PEG₂₀₀₀ incorporant une fonction alcène

La partie centrale de l'amphiphile (composé II-3) a tout d'abord été préparée à partir de la Boc-sérine dont la fonction hydroxyle est engagée dans une substitution nucléophile en milieu basique (NaH) avec le bromure d'allyle. Le produit d'alkylation II-2 est obtenu avec un rendement faible car il se forme également un produit de di-alkylation (de l'acide carboxylique) en quantité non négligeable. Le groupement Boc est ensuite déprotégé avec du TFA, pour conduire à l'amine libre II-3 (Schéma 4).

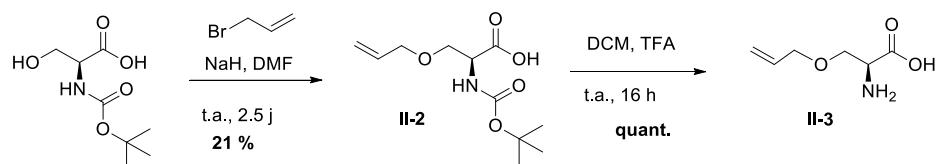


Schéma 4 : Synthèse de l’O-allyl L-sérine, partie centrale de l’amphiphile

Le fragment PEGylé **II-6** est quant à lui obtenu en trois étapes à partir du PEG₂₀₀₀-OMe commercial. Une première étape de tosylation permet d’activer la fonction alcool en groupement partant (**II-4**). Le tosylate est ensuite déplacé par substitution nucléophile avec de l’azoture de sodium pour conduire à l’azido **II-5**. Enfin, le groupement azoture est réduit en amine primaire par hydrogénéation catalytique sur Pd/C (Schéma 5). Le fragment PEGylé est isolé après filtration sur célite et lavage basique avec un rendement de 78 % pour la dernière étape. Le rendement global est de 65 %.

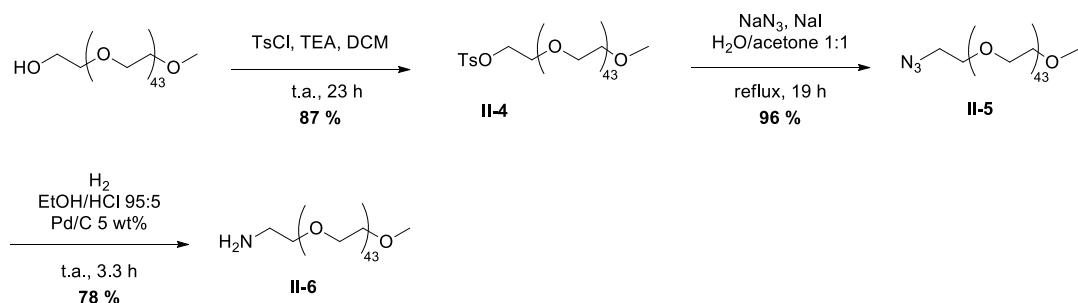


Schéma 5 : Synthèse du fragment PEG-amine **II-6**

Avec la partie centrale et la partie PEGylée en mains, l’amphiphile **II-1** est finalement assemblé à partir de l’acide 10,12-pentacosadiynoïque préalablement activé sous la forme d’ester de succinimide **II-7**. Ce dernier est engagé dans une réaction d’amidation avec le dérivé de sérine **II-3** préparé ci-dessus. Cette réaction conduit au produit intermédiaire **II-8** avec 97 % de rendement. Cet intermédiaire est mis à réagir avec le PEG-amine **II-6** *via* une activation *in situ* par EDC/HOBt. Cette deuxième réaction d’activation conduit à l’amphiphile souhaité **II-1** avec un rendement de 32 % (Schéma 6). L’encombrement stérique lié au PEG pourrait expliquer le faible rendement obtenu sur cette dernière étape.

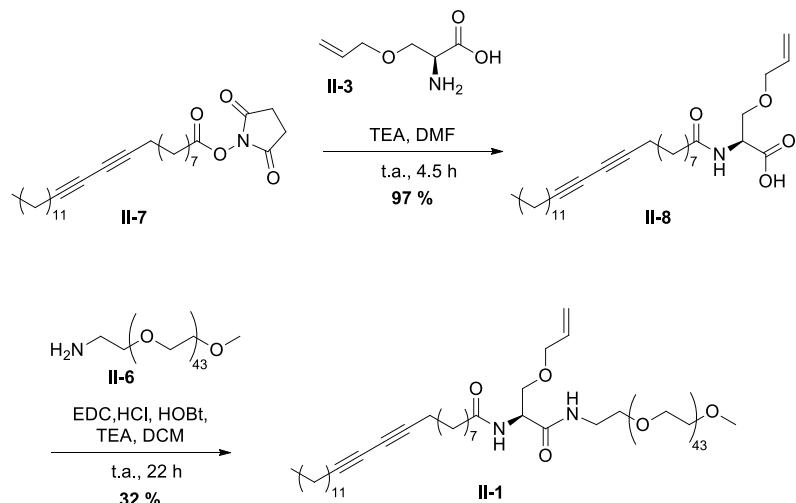


Schéma 6 : Synthèse de l'amphiphile DA-alcène-PEG₂₀₀₀ (II-1)

Les micelles ont ensuite été assemblées à partir de cet amphiphile II-1 dans de l'eau déminéralisée. Une solution à 10 mg/mL d'amphiphile dans de l'eau est traitée au bras à ultrasons pendant 10 minutes. Les micelles sont ensuite polymérisées pendant 6 h sous UV à 254 nm. Alors qu'avant polymérisation les micelles ont un diamètre de 12,5 nm, celles-ci deviennent plus compactes après polymérisation et leur diamètre est de 10 nm. Une analyse par RMN du proton de la micelle polymérisée dans le chloroforme deutéré montre que l'alcène libre n'est pas affecté par la polymérisation et peut donc servir de point d'accroche pour une fonctionnalisation ultérieure avec une molécule active.

b) 1^{ère} stratégie de fonctionnalisation : click avec une tétrazine

Même si la réaction entre les tétrazines et les alcènes non contraints est plus lente qu'avec les alcènes tendus, nous avons tenté de fonctionnaliser nos micelles PDA-alcène-PEG₂₀₀₀ avec une tétrazine qui serait liée à un principe actif.

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier que la réaction entre l'alcène porté par les micelles et une tétrazine modèle était opérante (Schéma 7). Nous avons donc préparé la tétrazine modèle II-9 (Schéma 8) dont le groupement amine est engagé dans un lien amide avec l'acide phénylacétique. Par la suite, cette amine pourra être fonctionnalisée par exemple avec un principe actif si la réaction click avec le composé modèle fonctionne.

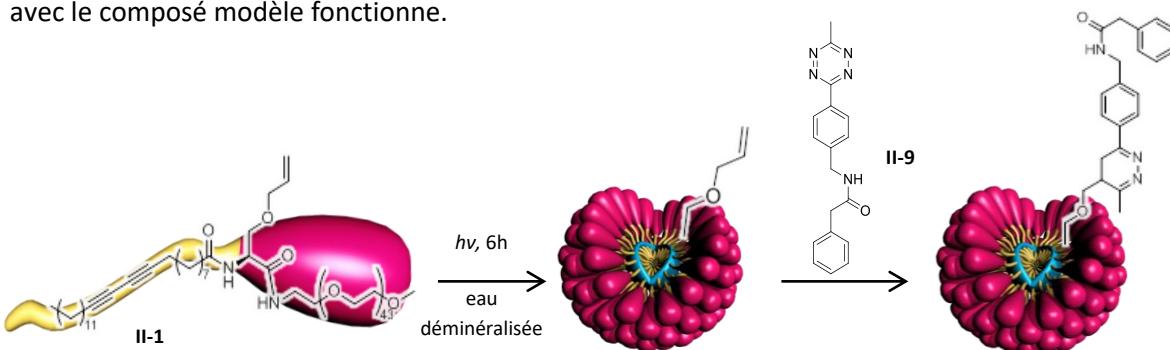


Schéma 7 : Stratégie de fonctionnalisation des micelles PDA-alcène-PEG₂₀₀₀ avec une tétrazine

La préparation de la tétrazine **II-9** se fait en quatre étapes en utilisant les protocoles mis au point par Evans et ses collaborateurs (Schéma 8).⁷⁰ Dans un premier temps, la fonction amine primaire du 4-(aminométhyl)benzonitrile-HCl est protégée sous la forme d'un carbamate de *tert*-butyle (**II-10**). La fonction tétrazine est ensuite introduite à partir du groupement nitrile en faisant réagir ce dernier avec de l'hydrazine en présence de nickel et d'acétonitrile. Il s'agit d'une méthode de formation de tétrazines en un seul pot qui a été développée par Devaraj et ses collaborateurs en utilisant une catalyse par un acide de Lewis.⁷¹ Cette réaction est une version améliorée de la synthèse de Pinner des *s*-tétrazines (1,2,4,5-tétrazines).⁷² Le nickel joue ici le rôle d'acide de Lewis qui facilite la condensation de l'hydrazine avec les deux nitriles nécessaires à la formation de la tétrazine (Figure 21).

Une fois la tétrazine **II-11** formée, la fonction amine est ensuite libérée par déprotection du Boc dans de l'acide trifluoroacétique (Schéma 8a) et le composé **II-12** est obtenu sous la forme d'un sel de TFA (le rendement de cette étape est quantitatif). La tétrazine modèle **II-9** est finalement produite par une réaction d'amidation entre l'amine **II-12** et l'ester activé **II-13** (Schéma 8b).

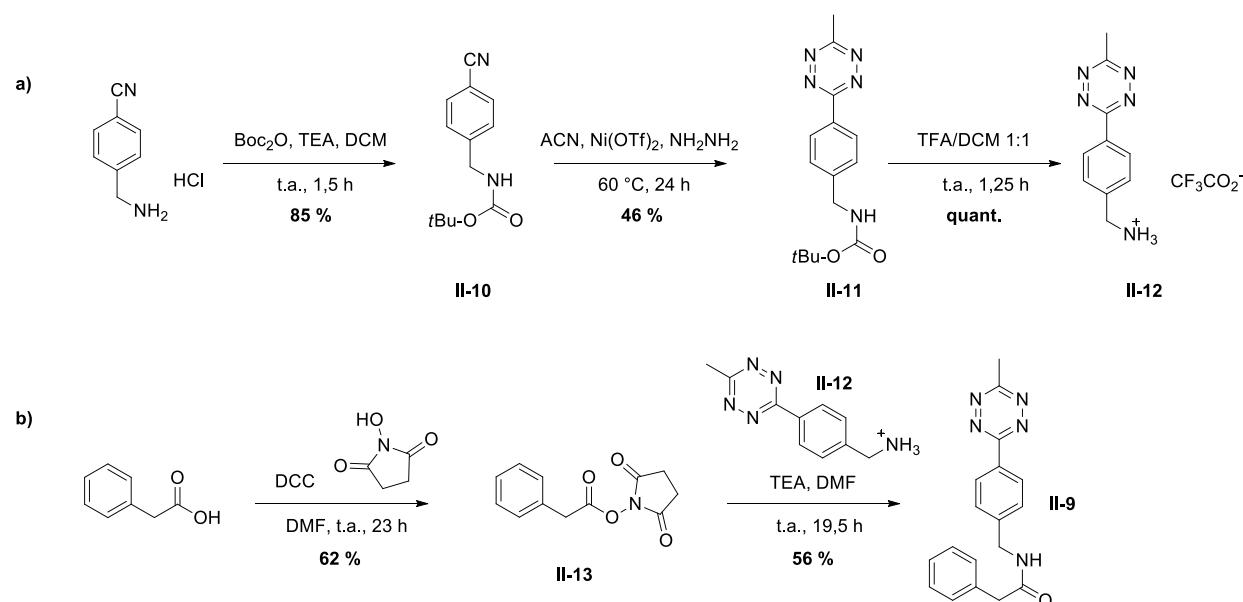


Schéma 8 : Préparation de la tétrazine modèle **II-9**

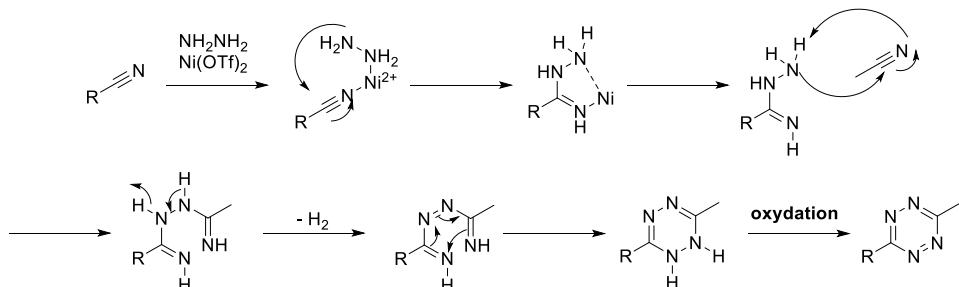


Figure 21 : Mécanisme supposé de la formation des *s*-tétrazines en présence d'un acide de Lewis

La réactivité de cette tétrazine vis-à-vis de la micelle PDA-alcène-PEG₂₀₀₀ a ensuite été testée dans différentes conditions.

Étant donné que la tétrazine modèle n'est pas soluble dans l'eau, un premier essai de réaction sur la micelle polymérisée a été réalisé dans un mélange eau/THF à température ambiante. L'avancement de la réaction peut être suivi par spectroscopie d'absorption UV en contrôlant la diminution du pic d'absorbance à 542 nm qui correspond à la disparition du noyau tétrazine. Cependant, le milieu réactionnel n'est pas homogène et après une nuit d'agitation, aucune réaction n'est observée. Le milieu réactionnel a été ultrasoniqué au bras à ultrasons, mais sans résultat probant sur l'activation de la réaction. En effet, la RMN du proton du mélange réactionnel montre que la fonction allyle est restée intacte ce qui nous indique que nous ne sommes pas parvenus à fonctionnaliser la micelle dans ces conditions.

Un deuxième essai de cycloaddition entre l'amphiphile **II-1** et la tétrazine-modèle a alors été réalisé en solvant organique pur (dichlorométhane). Cependant, ici également nous n'observons pas de réaction, même après trois jours de chauffage à 40 °C (Schéma 9a). Nous avons alors cherché à activer thermiquement le processus en travaillant dans le dioxane à 110 °C pendant 4 heures (Schéma 9b). Malheureusement, nous observons ici, une dégradation de la tétrazine.

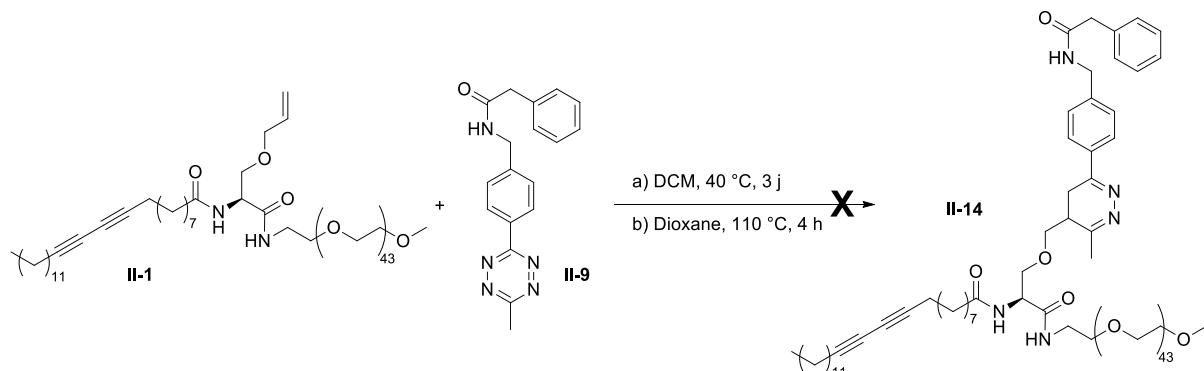


Schéma 9 : Conditions de réaction entre la tétrazine modèle et l'amphiphile DA-alcène-PEG₂₀₀₀

Nous ne sommes pas parvenus à trouver des conditions optimales pour fonctionnaliser la micelle ou l'amphiphile par réaction click avec la tétrazine modèle. Afin d'améliorer la réactivité, nous aurions pu envisager de préparer des tétrazines appauvries en électrons étant donné qu'il s'agit d'une réaction de type Diels–Alder à demande inverse d'électrons. Toutefois, nous n'avons pas continué à travailler sur cette voie de fonctionnalisation et avons opté pour une autre stratégie.

c) 2^{ème} stratégie : fonctionnalisation par réaction thiol-ène

L'autre stratégie de fonctionnalisation des micelles que nous avons envisagée repose sur une réaction de type thiol-ène. Cette réaction s'opère entre un thiol lié à un principe actif et un alcène porté par la micelle. Une première réaction a été réalisée avec un thiol modèle dans des conditions mises au point par Povie *et al.*⁷³ qui ne nécessitent pas d'activation photochimique ou thermique. Les amphiphiles polymérisés ont ainsi été mis en solution dans du dichlorométhane en présence de catéchol, de triéthylborane et d'ester méthylique dérivé de l'acide 3-mercaptopropionique (Schéma 11).

En présence de traces d'oxygène, le triéthylborane joue le rôle d'initiateur de radicaux éthyles qui vont réagir avec le thiol pour générer le radical soufré correspondant. Ce dernier va s'additionner sur l'oléfine pour conduire au conjugué thiol-ène attendu. Le catéchol intervient quant à lui dans la

réparation des processus parasites d'interruption de chaîne rencontrés sur les dérivés *O*-allyl (Schéma 10).

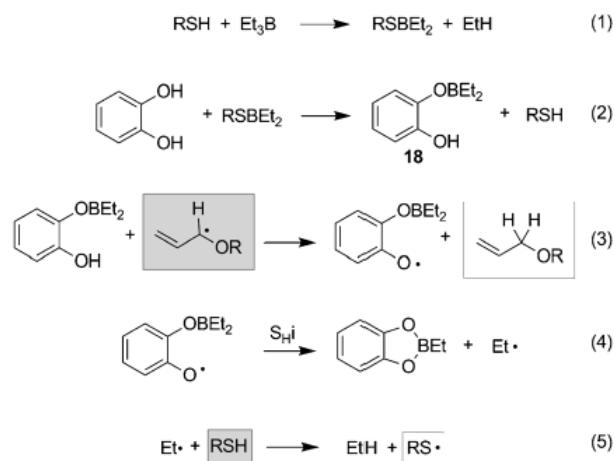


Schéma 10 : Mécanisme de réparation de l'interruption de chaîne par le catéchol et le triéthylborane⁷³

Après 18 h de réaction, la RMN du proton montre la disparition du signal de l'alcène libre, ce qui laisse penser que la fonctionnalisation a effectivement eu lieu.

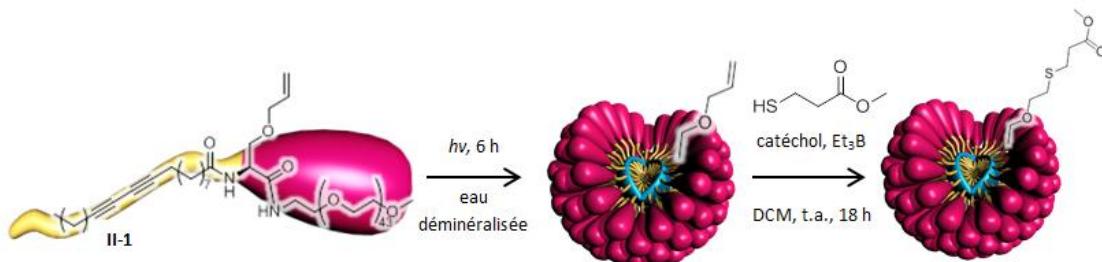


Schéma 11 : Fonctionnalisation de la micelle PDA-alcène-PEG2000-OMe par thiol-ène

La réaction test semblant être opérante, nous avons préparé un dérivé du chlorambucil portant un groupement thiol (Figure 22). Le chlorambucil est un agent alkylant, de la famille des moutardes à l'azote, utilisé dans le traitement de la leucémie lymphoïde chronique et des cancers avancés des ovaires et du sein.⁷⁴ Une fois lié à la micelle par réaction thiol-ène, le chlorambucil pourra être libéré *in vivo* par hydrolyse de l'ester.

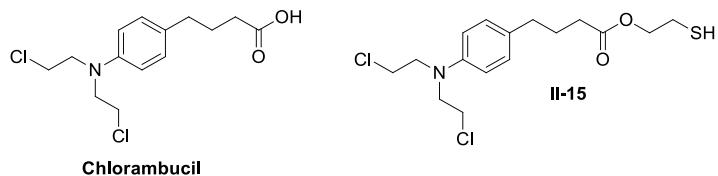


Figure 22 : Structures du chlorambucil et du dérivé thiol du chlorambucil

Le composé **II-15** est obtenu en deux étapes à partir du chlorambucil. La première étape consiste à estérifier l'acide carboxylique du chlorambucil avec le mercapto-alcool **II-16**. Ce dernier est obtenu par substitution nucléophile du 2-bromoéthanol par le thioacétate de potassium (Schéma 12). La fonction thiol du dérivé de chlorambucil **II-15** est démasquée par le traitement de l'acétate **II-17** avec du thiométhoxyde de sodium (Schéma 12).

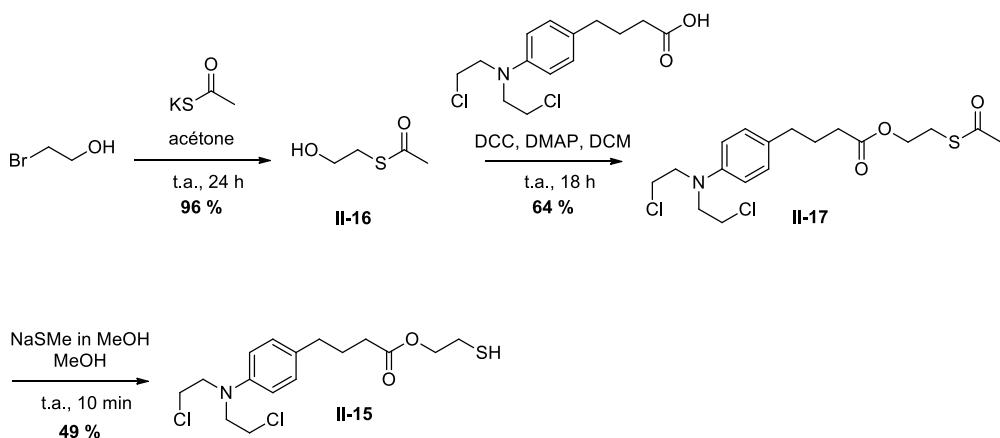


Schéma 12 : Préparation du dérivé thiol du chlorambucil

La micelle PDA-alcène-PEG₂₀₀₀ est ensuite engagée dans les mêmes conditions que la réaction test, c'est-à-dire en présence de catéchol, de triéthylborane et de **II-15** dans du dichlorométhane à température ambiante pendant une nuit. Cependant, dans ces conditions, la tentative de fonctionnalisation n'a pas abouti, la RMN du proton montrant un alcène intact après une nuit d'agitation.

La réaction a alors été mise en œuvre sur l'amphiphile **II-1** non assemblé en micelles afin de mettre en évidence si le manque de réactivité était imputable à l'assemblage supramoléculaire (Schéma 13). Malheureusement, ici également la réaction ne conduit pas à la formation de l'adduit chlorambucil-amphiphile. Après 20 h de réaction, nous observons seulement la dégradation du dérivé chlorambucil-thiol. La non-réactivité du système s'explique sans doute par le fait que le dérivé thiol du chlorambucil se dégrade plus rapidement qu'il n'a le temps de réagir avec l'alcène.

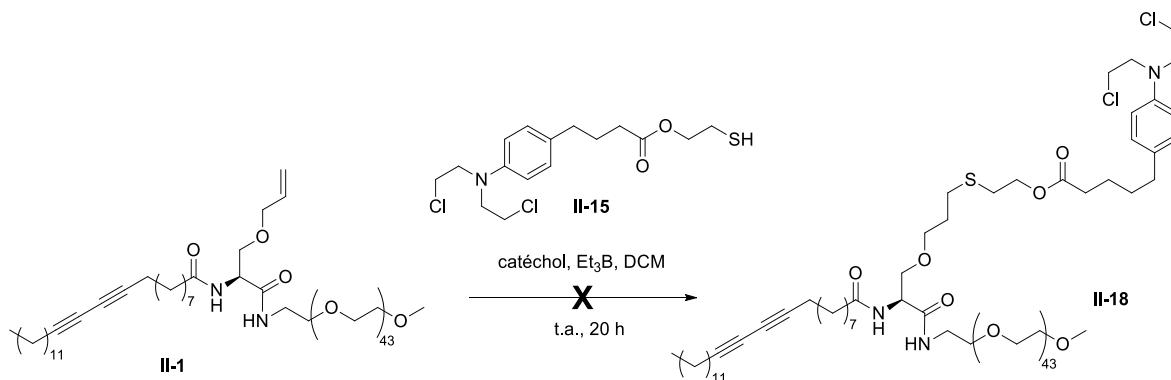


Schéma 13 : Essai de fonctionnalisation de l'amphiphile avec le dérivé thiol du chlorambucil

Les conditions que nous avons testées pour la réaction thiol-ène entre un principe actif et la micelle n'ont pas permis la fonctionnalisation du vecteur nanométrique. D'autres conditions réactionnelles impliquant des initiateurs de radicaux classiques auraient pu être mises en œuvre mais n'ont cependant pas été testées.

Nous avons jusque-là développé des micelles PEGylées pour cibler passivement les tumeurs car le PEG est connu pour conférer des propriétés de furtivité aux nano-vecteurs. Toutefois, il existe des alternatives au PEG décrites dans la littérature qui améliorent également les propriétés pharmacocinétiques des vecteurs. Nous nous sommes donc intéressés au développement de micelles poly-diacétyléniques zwitterioniques pour le ciblage des cellules cancéreuses.

III. Une alternative aux PEG : les micelles zwitterioniques

1) Les micelles zwitterioniques

Le PEG est le polymère hydrosoluble le plus fréquemment utilisé pour rendre les nano-vecteurs biocompatibles et furtifs *in vivo*. Toutefois, il a été montré que les dérivés de PEG pouvaient s'oxyder en présence d'ions métalliques (métaux de transition) et d'oxygène présents dans les milieux biologiques. Une réponse immunitaire vis-à-vis du PEG peut également apparaître, entraînant une sensibilisation à moyen terme.

Il apparaît donc intéressant de pouvoir développer des substituts de PEG pour l'habillage biocompatibilisant des nano-vecteurs. Nous avons retenu les motifs zwitterioniques pour la préparation de nano-vecteurs micellaires furtifs. Des zwitterions bio-inspirés comme les phosphorylcholines, les carboxybétaïnes, et les sulfobétaïnes ont déjà été mis à profit dans des formulations nanométriques. Les zwitterions permettent en effet de préparer des nano-vecteurs biocompatibles dont l'interaction avec les protéines plasmatiques et les cellules est minimisée. C'est, entre autres, la capacité d'hydratation de la couche superficielle qui joue un rôle clef dans la répulsion des protéines plasmatiques. Les zwitterions s'hydratent mieux que le PEG par solvatation ionique forte (sept à huit molécules d'eau peuvent se lier à une sulfobétaïne vs. une molécule d'eau/unité d'éthylène glycol).¹³

Pour nous affranchir du PEG, nous avons donc développé des micelles zwitterioniques, « simples » mais polymérisées, capables d'atteindre les tumeurs par effet EPR. Nous avons également développé

des micelles zwitterioniques pouvant servir de plateforme au greffage covalent d'un principe actif. Nous avons opté pour l'utilisation d'un motif de surface de type sulfobétaïne qui a déjà été utilisé par Luo *et al.* pour la préparation de vecteurs zwitterioniques chargés en doxorubicine.⁷⁵

2) Préparation de micelles zwitterioniques comme plateforme de ciblage passif

a) Les sulfobétaïnes

Les amphiphiles de type sulfobétaïnes sont généralement moins solubles dans l'eau que ceux dérivés de bétaïnes car leur tête polaire est moins hydrophile. Ces entités zwitterioniques ont le plus souvent un point (ou température) de Krafft qui correspond à la température au-dessus de laquelle les surfactants peuvent s'assembler en micelles. En dessous de cette température, les micelles ne peuvent pas se former. Lorsque la distance entre les deux centres chargés augmente, le caractère hydrophile augmente et le point de Krafft est abaissé. Cette distance n'est pas nécessairement proportionnelle au nombre d'atomes de carbone car la chaîne liant les deux centres est flexible et peut adopter plusieurs conformations. Le caractère hydrophile dépend également de l'anion présent. L'anion CO_3^- a un caractère hydrophile plus important que l'anion SO_3^- . Pour abaisser le point de Krafft, des sels inorganiques peuvent être ajoutés. Par exemple, les amidosulfobétaïnes avec une chaîne hydrophobe comprise entre 18 et 28 atomes de carbone sont insolubles dans l'eau pure, même à 100 °C. Cependant, l'ajout de NaCl permet la solubilisation de ces zwitterions par abaissement du point de Krafft. C'est la formation d'un sel interne entre la charge positive et la charge négative de la sulfobétaïne qui est à l'origine de la faible solubilité en absence de NaCl. Dans ce cas, peu d'ions libres peuvent entourer la tête polaire pour apporter l'hydratation ionique nécessaire à la solvatation. L'utilisation de NaCl permet de réduire cette interaction électrostatique, diminuant ainsi l'attraction entre les deux charges. Les ions libres dans le groupe de tête peuvent donc s'hydrater, la solubilité est ainsi augmentée et le point de Krafft diminue (Figure 23). Plus la chaîne hydrophobe est grande, plus le point de Krafft augmente.⁷⁶⁻⁷⁸

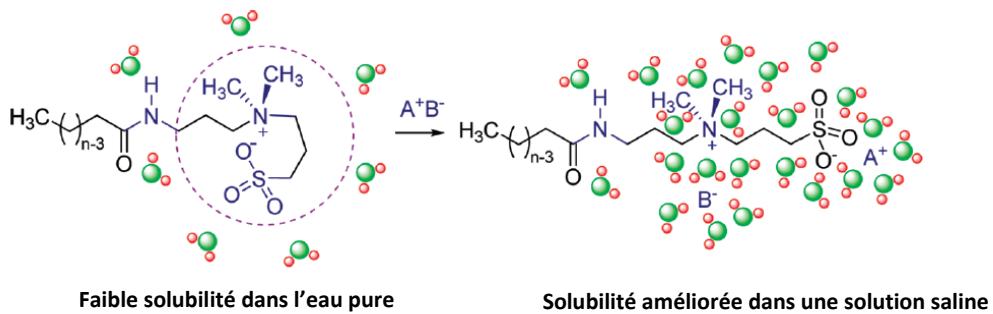


Figure 23 : Représentation schématique de l'abaissement de la température de Krafft par ajout de sels⁷⁷

Nous avons envisagé la préparation de micelles constituées d'amphiphiles avec une chaîne grasse possédant la fonction diacétylénique polymérisable, et une partie hydrophile sous la forme d'une tête polaire sulfobétaïne. Cette chimie de surface sera évaluée pour sa capacité à « biocompatibiliser » les micelles qui seront étudiées *in vivo*.

b) Ciblage passif de tissus tumoraux avec des micelles zwitterioniques

Des micelles constituées d'amphiphiles **DA-zwitt** (Figure 24) qui sont stabilisées par polymérisation ont été préparées et leur biodistribution ainsi que leurs propriétés de ciblage des tumeurs ont été étudiées.⁷⁹

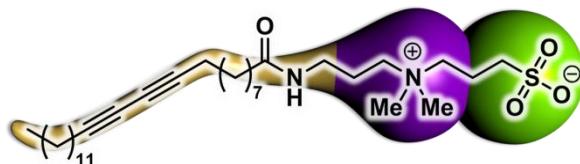


Figure 24 : Structure de l'amphiphile DA-zwitt

Trois étapes de synthèse sont nécessaires pour obtenir l'amphiphile **DA-zwitt** à partir de l'acide 10,12-pentacosadiynoïque. La première étape est l'activation de l'acide sous forme d'ester de succinimide. Cet ester est ensuite mis à réagir avec la *N,N*-diméthylaminopropylamine conduisant à l'amine **II-19**. Enfin, l'alkylation avec la 1,3-propanesultone permet de former l'amphiphile souhaité (Schéma 14).

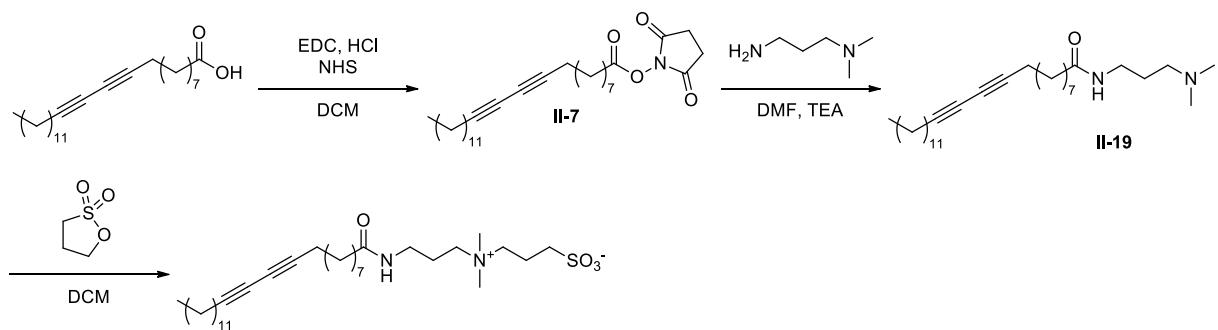


Schéma 14 : Synthèse de l'amphiphile DA-zwitt⁷⁹

Du fait de sa faible solubilité dans l'eau déminéralisée (due à la présence de sels internes entre les deux charges de la tête polaire)⁸⁰ cet amphiphile a été assemblé en micelles dans de l'eau contenant 9 mg/mL de NaCl. La CMC des micelles non polymérisées a été mesurée par la méthode de fluorescence du pyrène et est de 25 mg L⁻¹. Les micelles ont ensuite été polymérisées sous UV à 254 nm pendant 6 heures pour former des micelles stabilisées (PDA-zwitt, Figure 25) avec un diamètre hydrodynamique de 9 nm tel que mesuré par DLS.

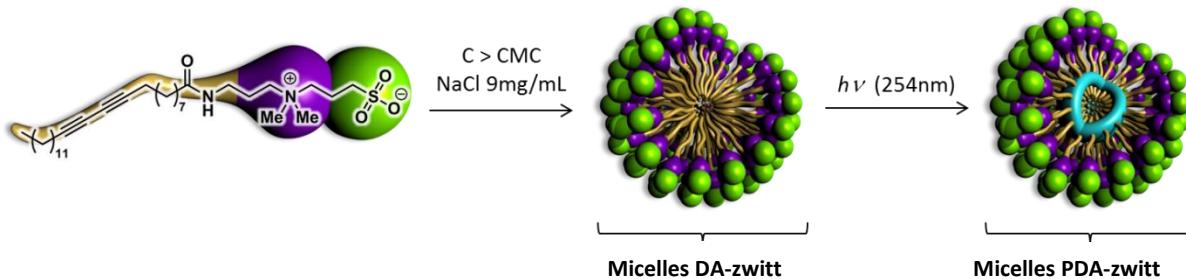


Figure 25 : Préparation des micelles PDA-zwitt

Les micelles ont tout d'abord été chargées à 1 % en masse avec un fluorophore correspondant à une carbocyanine lipophile, le DiR, dont le maximum d'excitation est à 750 nm et le maximum d'émission à 779 nm. Les micelles rendues fluorescentes ont ensuite été injectées par voie intraveineuse à des

souris « nude » et leur pharmacocinétique a été étudiée par imagerie de fluorescence proche infrarouge. Des échantillons de sang ont été collectés à intervalles réguliers et la fluorescence résiduelle du plasma a été mesurée. Cette fluorescence correspond à la fraction de micelles toujours circulantes à un instant T. Comme pour les micelles étudiées précédemment par notre équipe (PDA-NTA et PDA-PEG), la concentration des micelles au cours du temps évolue selon deux phases et les paramètres pharmacocinétiques ont été calculés à partir d'un modèle à deux compartiments. Les micelles PDA-zwitt ont ainsi un $T_{1/2\alpha}$ de 21 ± 1.2 min et un $T_{1/2\beta}$ de 1013 ± 360 min. En comparant ces valeurs à celles obtenues pour les micelles PDA-PEG₃₅₀, qui ont un diamètre hydrodynamique comparable, on constate une persistance plus longue des micelles PDA-zwitt dans la circulation sanguine de la souris ($T_{1/2\alpha}$ est du même ordre de grandeur mais $T_{1/2\beta}$ est deux fois plus élevé).

Afin d'étudier la biodistribution des micelles PDA-zwitt et de confirmer leur capacité à cibler de façon passive des tissus tumoraux par effet EPR, les micelles chargées avec du DiR ont été injectées dans la veine caudale de souris « nude » portant des xénogreffes de tumeurs sous-cutanées de la lignée cancéreuse humaine MDA-MB-231 (cancer du sein). Les expériences *in vivo* ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Dr. Frédéric Ducongé du « Molecular Imaging Research Center » - MIRCen (CEA/Fontenay-aux-Roses). La biodistribution a été évaluée en utilisant l'imagerie planaire proche infra-rouge. L'intensité du signal de fluorescence augmente rapidement dans l'ensemble du corps de la souris, laissant penser à une diffusion des micelles dans l'ensemble des tissus. Cette fluorescence diminue cependant au cours du temps ce qui suggère la mise en place d'une voie d'excrétion lente des micelles. L'imagerie de fluorescence de la face ventrale et latérale montre une accumulation forte des micelles au niveau du foie et de la rate 1 h après injection. Aucune fluorescence n'est observée dans la vessie et les reins, ce qui suggère une voie d'élimination hépatobiliare comme pour les autres types de micelles polydiacétyléniques étudiées antérieurement au laboratoire. Les images de fluorescence de la face dorsale (Figure 26) montrent une accumulation préférentielle des micelles au niveau de la tumeur 24 h après injection, un contraste important est observable entre la tumeur et les tissus sains. La fluorescence moyenne au niveau de la tumeur est plus importante que celle mesurée dans une zone de référence au niveau d'un muscle de la jambe (Figure 27). Des mesures de fluorescence *ex vivo* sur organes isolés ont montré que les micelles s'accumulaient majoritairement i) dans le foie, ii) la rate et iii) la tumeur. Ces résultats confirment donc l'accumulation passive des micelles PDA-zwitt par effet EPR dans le tissu tumoral.

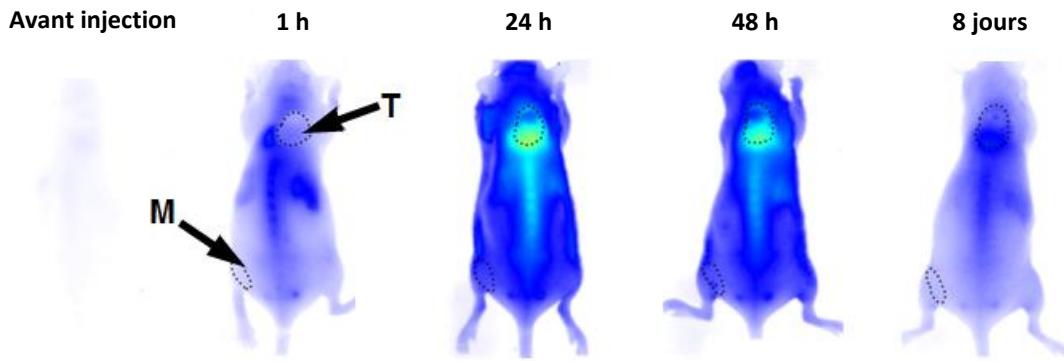


Figure 26 : Vue dorsale de l'imagerie planaire proche infra-rouge des micelles PDA-zwitt après injection intraveineuse à des souris portant des xénogreffes MDA-MB-231 (T : tumeur, M : muscle)⁷⁹

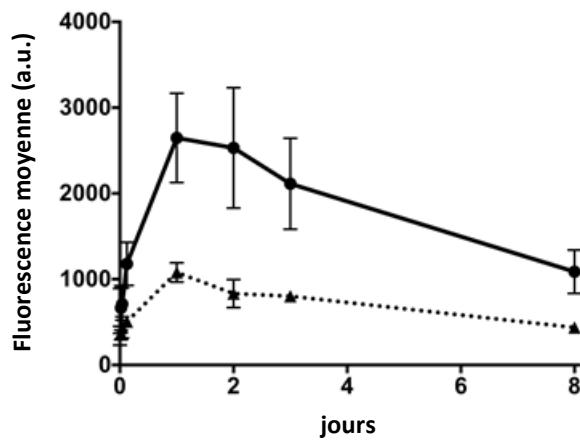


Figure 27 : Évolution de la fluorescence au cours du temps au niveau de la tumeur et du muscle⁷⁹

Afin de mesurer plus précisément l'accumulation des micelles au niveau de la zone tumorale, des analyses de fluorescence par tomographie optique diffuse (« free-space fluorescence diffuse optical tomography » - fDOT) tridimensionnelles ont été réalisées 24 h après injection. Ces analyses montrent une distribution non-homogène des micelles au sein de la tumeur, ces dernières s'accumulent préférentiellement sous la tumeur, qui est la zone la plus vascularisée du fait de l'angiogenèse. Des analyses histologiques ont ensuite été réalisées *ex vivo* (Figure 28). 24 h après injection des micelles, les souris sont sacrifiées et les tumeurs collectées. Les tissus ont été marqués avec du DAPI (pour visualiser le noyau des cellules) avant d'être observés par microscopie en épi-fluorescence (canal bleu). Dans le modèle de xénogreffé utilisé, les cellules cancéreuses utilisées avaient été au préalable modifiées pour pouvoir exprimer la Green Fluorescent Protein (eGFP : enhanced-GFP). Ce marquage permet de visualiser facilement ces cellules (canal vert). Les micelles chargées avec le DiR sont quant à elles visibles sur le canal rouge. Selon les coupes histologiques de la tumeur, les micelles sont présentes au niveau du tissu tumoral (Figure 28, A). La superposition des images de fluorescence des micelles, du noyau des cellules et des cellules cancéreuses montre que les micelles sont à la périphérie de la tumeur et entourent les cellules cancéreuses (Figure 28, D). Une image reconstituée de l'ensemble de la tumeur (Figure 28, E) montre que les cellules cancéreuses ainsi que les micelles sont localisées à la périphérie du tissu tumoral, il n'y a pas de diffusion profonde au niveau de la tumeur.

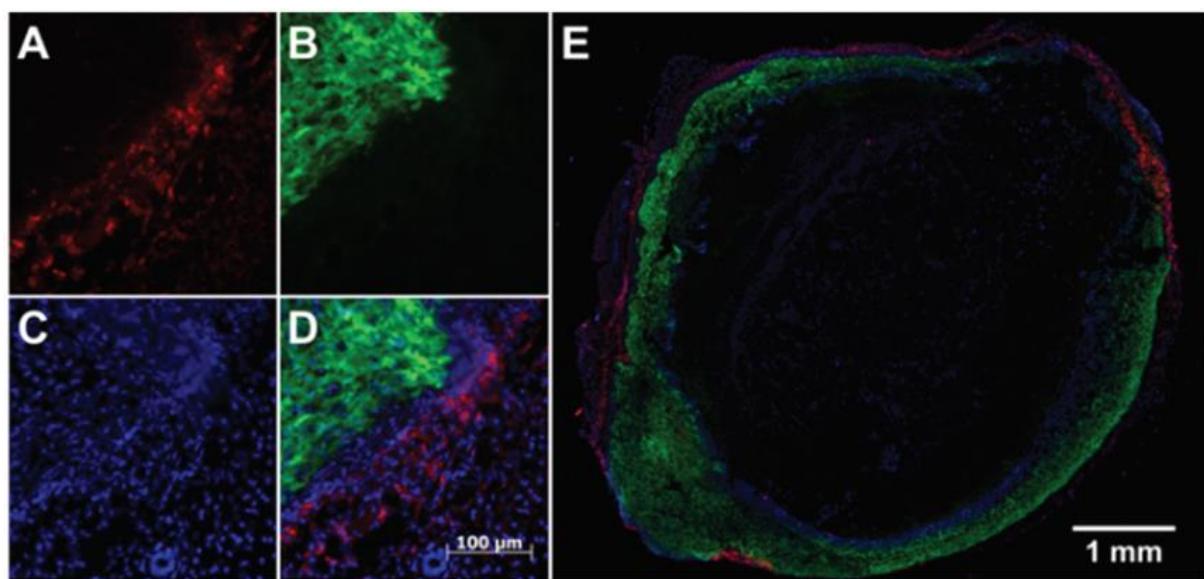


Figure 28 : Images de microscopie en fluorescence de tranches de tissus tumoraux de MDA-MB-231 GFP 24 h après injection des micelles PDA-zwitt. A) canal rouge : DiR (micelles), B) canal vert : GFP (cellules cancéreuses), C) canal bleu : DAPI (noyau des cellules), D) images de fluorescence superposées de A à C, E) reconstitution de l'ensemble de la tumeur à partir des images de fluorescence superposées⁷⁹

L'accumulation passive au niveau des tissus tumoraux des micelles PDA-zwitt a été confirmée par imagerie de fluorescence et les analyses montrent une accumulation de ces dernières à la périphérie de la tumeur. Les micelles ne pénètrent cependant pas en profondeur dans les tissus tumoraux. Ce phénomène peut s'expliquer par la pression interstitielle des fluides élevée au niveau des tumeurs. Cette pression interne induit une circulation des fluides partant de la zone de pression élevée (le cœur de la tumeur) vers la périphérie de la tumeur, empêchant ainsi la pénétration de certaines formulations thérapeutiques.⁸¹

Nous avons mis en évidence que ces micelles arrivaient à la périphérie des tumeurs. Elles pourraient donc trouver leur utilité comme outils pour la chirurgie assistée par imagerie en délimitant le volume des zones à opérer ou comme vecteurs de médicaments, amenant ces derniers à la périphérie des tumeurs et donc au contact des cellules cibles.

Nous avons par conséquent souhaité comme pour les micelles PDA-PEG₂₀₀₀ développer des micelles PDA-zwitt qui possèdent un point d'ancrage pour associer un principe actif afin de pouvoir le vectoriser vers la tumeur sans qu'il y ait de relargage incontrôlé. La chimie « click » mise en œuvre précédemment (thiol-ène et tétrazine-alcène) n'ayant pas donné de résultats très probants, nous nous sommes orientés vers la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen. Nous avons donc choisi de développer des micelles zwitterioniques dotées d'un bras alcyne pouvant être fonctionnalisé ultérieurement par réaction de chimie click avec un azoture lié à un principe actif.

c) Micelles zwitterioniques portant un alcyne

Afin de préparer des micelles PDA-zwitterioniques pouvant se lier de manière covalente à un principe actif portant une fonction azoture, nous avons conçu un amphiphile avec une tête polaire zwitterionique de type sulfobétaïne portant un bras alcyne. Dans un premier temps, nous nous

sommes attelés à préparer l'amidosulfobétaïne **II-20** (Figure 29) qui possède un bras alcyne porté par l'ammonium.

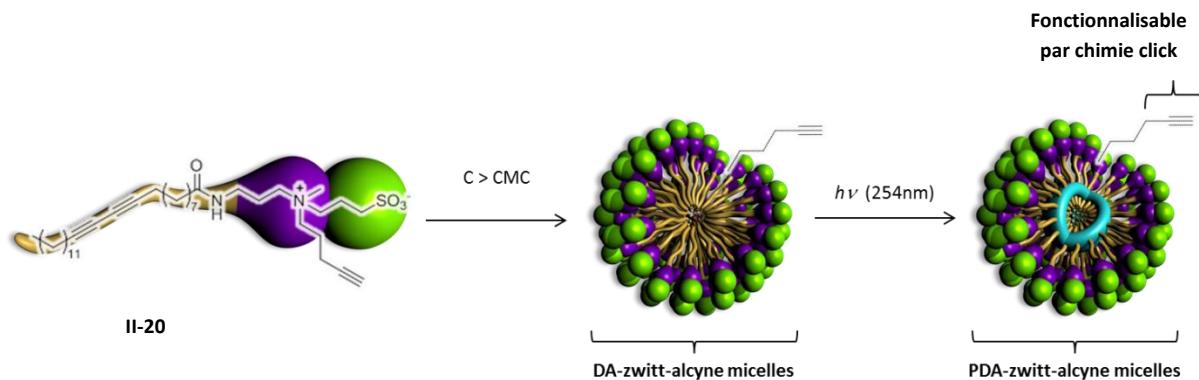


Figure 29 : Structure de l'amidosulfobétaïne **II-20** et stratégie de fonctionnalisation ultérieure

Cet amphiphile est obtenu en trois étapes de synthèse à partir de l'acide 10,12-pentacosadiynoïque activé sous forme d'ester de succinimide **II-7**. La première étape est le couplage de la 3-(methylamino) propylamine sur **II-7** pour former l'amide **II-21** avec un rendement de 83 %. L'amine secondaire **II-21** est ensuite alkylée en présence de carbonate de potassium et du 4-pentyn-1-yl methanesulfonate **II-22**, préparé à partir du chlorure de méthanesulfonyle et de 4-pentyl-1-ol. La tête zwitterionique est finalement obtenue par alkylation de l'amine tertiaire **II-23** avec la 1,3-propanesultone dans le dichlorométhane pour conduire à **II-20** (Schéma 15).

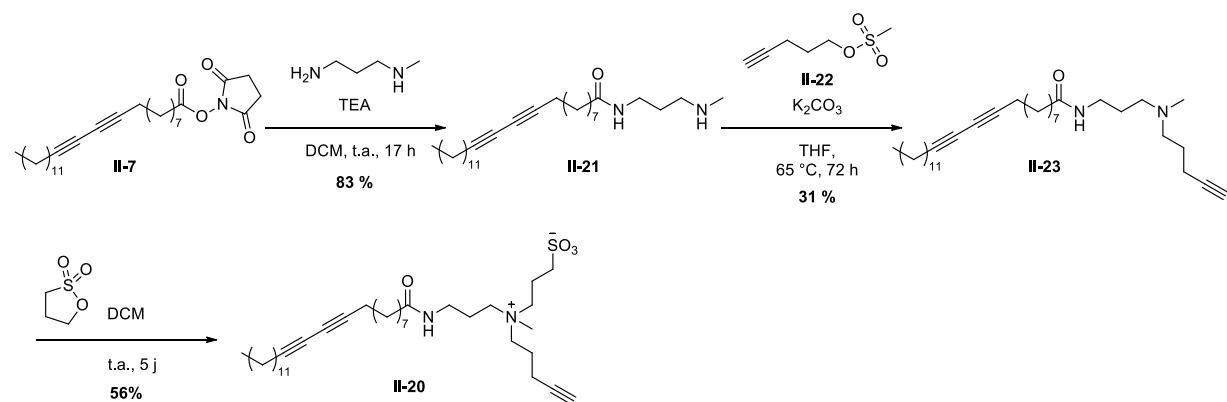


Schéma 15 : Synthèse de l'amphiphile **II-20**

Une fois l'amphiphile à disposition, nous avons essayé de l'assembler en micelles. À 5 mg/mL dans l'eau, cet amphiphile ne se solubilise pas totalement. Le chauffage de la solution n'apporte pas d'amélioration. Le mélange est traité pendant 30 minutes au bras à ultrasons mais l'amphiphile n'est pas totalement solubilisé, quelques filaments sont encore présents. Un trouble fort apparaît après 6 heures d'irradiation UV (la solution avait été filtrée au préalable pour éliminer la fraction d'amphiphile non solubilisée) et la formation de filaments en suspension est observée. La solution est filtrée sur filtre Nylon 0.2 μm et la DLS du filtrat montre des micelles de diamètres polydispersés avec un large pic centré sur 17 nm en volume. Les micelles ne semblent pas être très stables avec l'apparition rapide de filaments.

Nous avons alors essayé de préparer des micelles plus diluées à 0,25 mg/mL d'amphiphile dans l'eau. La suspension est mise au bras à ultrasons pendant 30 minutes mais demeure trouble. Ce résultat suggère la formation d'agrégats au détriment des micelles. Comme évoqué précédemment, la présence de NaCl a généralement un effet bénéfique pour la solubilisation de micelles zwitterioniques en aidant à leur hydratation. Nous avons donc essayé de former des micelles sous ultrasons à 5 mg/mL dans une solution aqueuse à 9 mg/mL de NaCl. Cependant, nous obtenons ici un gel. Ce dernier est néanmoins placé sous une lampe UV puis filtré. Une analyse par DLS de la fraction « soluble » montre des nanoparticules de 100 nm de diamètre (distribution large). Cette taille est très supérieure à la taille des micelles attendues. Malgré nos efforts, nous ne sommes jamais parvenus à solubiliser correctement ces amphiphiles pour former les micelles de taille comprise entre 10 et 20 nm.

La distance entre les centres chargés ayant une influence sur le point de Krafft, nous avons voulu ajouter une unité carbone afin d'essayer d'améliorer la solubilité des amphiphiles. En effet, le point de Krafft peut être abaissé en augmentant cette distance.⁷⁶ Le dérivé **II-24**, avec 4 atomes de carbone (au lieu de 3) entre les centres chargés, a ainsi été préparé en remplaçant à la dernière étape de synthèse la 1,3-propanesultone par la 1,4-butanesultone (Schéma 16).

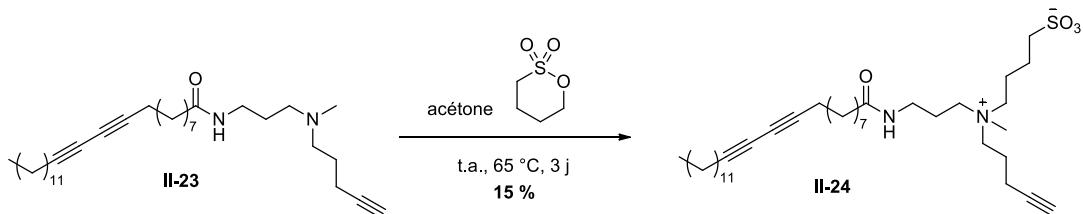


Schéma 16 : Dérivé de **II-20** avec 4 carbones entre les centres chargés

Dans l'eau déminéralisée contenant 9 mg/mL de NaCl l'amphiphile **II-24** (10 mg/mL) ne se solubilise pas et ce même après chauffage à 60 °C et après passage au bras à ultrasons. Nous obtenons systématiquement un échantillon laiteux en mélange avec un résidu solide. Nous ne parvenons pas, ici non plus, à assembler les micelles à partir de ces unités amphiphiles.

L'ajout d'un carbone entre les deux centres chargés n'ayant pas aidé à la formation des micelles, nous nous sommes alors demandé si la présence d'un amide dans la structure de l'amphiphile pouvait gêner la formation des micelles. En effet, l'amide peut être à l'origine de liaisons hydrogènes qui peuvent pré-organiser le système et donc rendre difficile la mise en solution et l'assemblage des micelles. Un dérivé sans liaison amide, **II-25**, a été synthétisé (Schéma 17). Il est obtenu en cinq étapes à partir de l'acide 10,12-pentacosadiynoïque. La première étape consiste à réduire l'acide carboxylique en alcool avec le tétrahydruroaluminate de lithium dans l'éther éthylique avec un rendement de 83 %. Cette étape est suivie par une réaction d'Appel avec la triphénylphosphine et le tétrabromométhane pour obtenir le dérivé bromé **II-27**. L'éthylamine réagit sur ce dérivé pour former l'amine secondaire **II-28** qui est ensuite alkylée avec le 4-pentyn-1-yl methanesulfonate en présence de carbonate de potassium. Cette étape permet d'introduire la chaîne latérale pour une fonctionnalisation ultérieure. Enfin, la dernière étape avec la 1,3-propanesultone permet de former le composé zwitterionique souhaité **II-25** (Schéma 17).

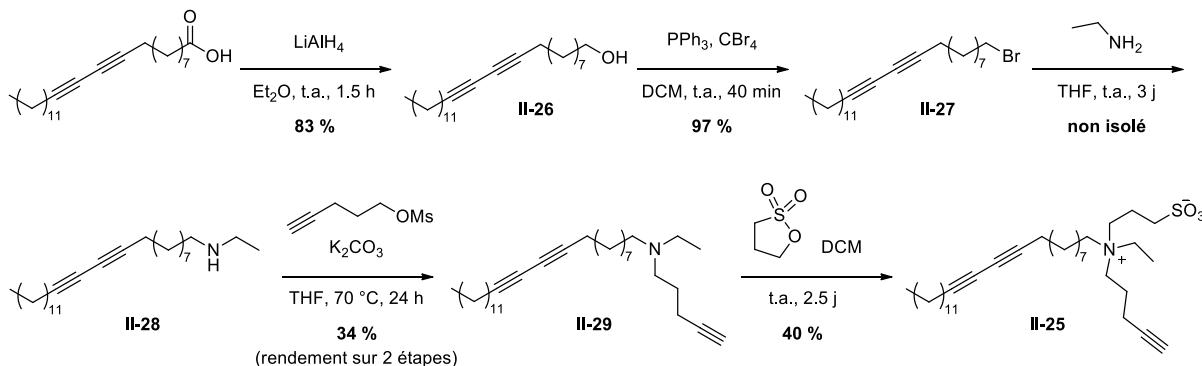


Schéma 17 : Synthèse du zwitterion II-25

5 mg d'amphiphile sont solubilisés dans 0,5 mL de solution de NaCl à 9 mg/mL et mis au bras à ultrasons pendant 30 minutes. La DLS est mesurée avant polymérisation et montre des micelles de tailles polydisperses, deux familles de population sont présentes (une de taille centrée autour de 9 nm et une de taille centrée autour de 21 nm). Lors de la polymérisation des micelles, un précipité se forme. L'absence de l'amide semble aider à solubiliser l'amphiphile avant l'étape de polymérisation sous UV, cependant lors de la polymérisation des agrégats se forment.

Après avoir synthétisé ces amphiphiles nous avons voulu les assembler sous forme de micelles. En solution aqueuse pure, ces amphiphiles se solubilisent très difficilement et ne sont pas stables. Compte tenu de la littérature, nous avons essayé de former des micelles dans une solution de NaCl, cependant nous ne sommes pas parvenus à obtenir des micelles stables (solutions laiteuses). L'interaction attractive entre les micelles sulfobétaïnes peut être à l'origine de la formation d'agrégats de grande taille (100-200 nm) ou d'une précipitation indésirable.⁸²

Plusieurs hypothèses pourraient être évoquées pour expliquer la « non-formation » de micelles stables et monodisperses à partir des amphiphiles zwitterioniques portant un bras pentyne. Ce résultat est surprenant dans la mesure où des micelles zwitterioniques stables et de morphologie définie avaient pu être préparées à partir du dérivé méthylique correspondant. Une des hypothèses concerne la nature chimique de la chaîne latérale qui est ici une chaîne à cinq atomes de carbone. Ce bras porté par l'ammonium confère peut-être un caractère plus « hydrophobe » à la tête polaire ce qui la rend moins apte à solubiliser l'amphiphile. La présence du bras alcyne peut également être à l'origine d'une contrainte stérique plus importante au niveau de la tête polaire entraînant une modification du Critical Packing Parameter (CPP) et un changement du volume de cette tête. Ce changement implique une structuration de l'amphiphile autre que sous la forme de micelles. Une dernière hypothèse enfin concerne les interactions ioniques intermoléculaires entre motifs sulfobétaïnes qui pourraient conduire à une agrégation des amphiphiles au cours de la polymérisation. Même si l'absence de lien amide semble aider à la solubilisation des amphiphiles et à la formation des micelles, celles-ci ne sont pas monodisperses et après polymérisation elles précipitent. Nous ne sommes malheureusement pas parvenus à préparer des micelles PDA-zwitterioniques portant un bras alcyne en vue d'une fonctionnalisation ultérieure.

IV. Conclusion

Les micelles PDA-PEG₂₀₀₀ présentent une meilleure pharmacocinétique et accumulation au niveau des tumeurs que les micelles PDA-NTA et les micelles PDA-PEG₃₅₀. Ces micelles s'accumulent grâce à l'effet EPR au niveau des tumeurs. Une alternative au PEG a été envisagée sous la forme de micelles zwitterioniques. Nous avons montré que les micelles PDA-zwitt s'accumulent de manière passive au niveau de la périphérie des tissus tumoraux, elles peuvent ainsi être utilisées comme vecteurs de médicaments ou comme outil d'aide à la chirurgie.

Différentes tentatives de greffage de manière covalente d'un principe actif au niveau des micelles PDA-PEG₂₀₀₀ par l'intégration d'une fonction alcène terminale ont été abordées mais n'ont pas abouti, que ce soit par la réaction de click entre une tétrazine et l'alcène ou par la réaction thiol-ène. Par ailleurs, nous ne sommes pas parvenus à préparer des micelles zwitterioniques stables que l'on pourrait fonctionnaliser par chimie click entre un alcyne et un azoture.

Cibler de manière passive les tissus tumoraux est nécessaire pour parvenir à vectoriser un principe actif au niveau des tumeurs. Une libération contrôlée de ce principe actif, en réponse à des stimuli propres aux tissus et cellules malades, au niveau des cellules cancéreuses le rendrait encore plus efficace. C'est pourquoi nous avons choisi de travailler sur le développement de micelles sensibles sous certaines conditions, permettant ainsi une libération contrôlée des principes actifs.

Chapitre 3 : Micelles activables par un stimulus

Nous avons vu dans le premier chapitre que deux types de stimuli pouvaient être utilisés pour activer les vecteurs nanométriques : les stimuli internes et les stimuli externes. L'utilisation d'un stimulus pour contrôler la libération d'un principe actif au niveau des cellules cibles permet d'en améliorer l'efficacité thérapeutique et de réduire ses effets secondaires. Nous avons envisagé de développer deux types de micelles qui répondent à des stimuli différents. Les premières ont été conçues pour être activées sous l'influence d'un stimulus externe, la lumière, et les secondes sous un stimulus interne, le pH.

I. Préparation de micelles photoactivables

1) La lumière comme stimulus

La lumière utilisée comme stimulus externe présente pour avantage de pouvoir être localisée dans le temps et l'espace mais également activée depuis l'extérieur du système. Les procédés photochimiques sont amorcés par la lumière mais s'arrêtent en absence de source lumineuse, ce qui permet un meilleur contrôle des réactions. Ce mode d'activation est dit « propre » puisqu'il ne nécessite pas de co-activateur.⁸³⁻⁸⁵

Nous avons envisagé l'utilisation de la lumière pour contrôler la libération d'un principe actif chargé au cœur des micelles. Notre approche va consister à intégrer des groupements photolabiles dans la structure des amphiphiles constitutifs des micelles. Parmi les groupements photolabiles étudiés, les dérivés d'*o*-nitrobenzyle (*o*-NB) sont fréquemment utilisés comme groupements protecteurs en synthèse organique ou comme liens photolabiles pour les hydrogels, les copolymères bloc et les bioconjugués. Sous irradiation UV, les dérivés alcooliques d'*o*-NB se clivent par réarrangement en *o*-nitrosobenzaldéhyde en libérant un fragment acide carboxylique et un aldéhyde (Schéma 18).⁸⁶

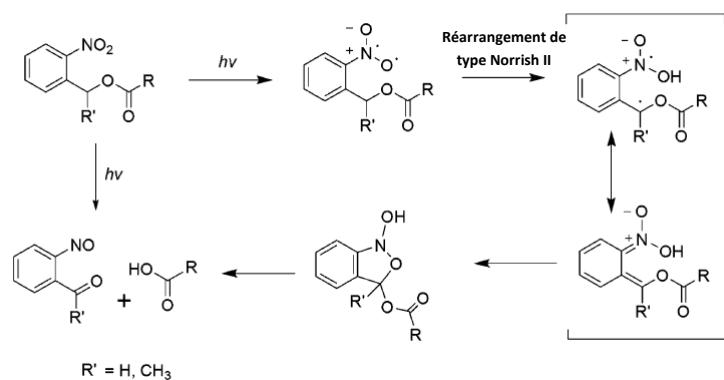
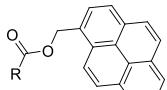
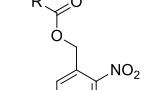
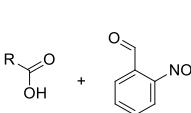
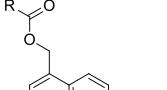
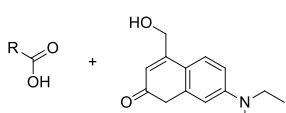
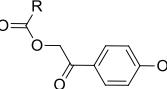
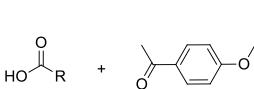


Schéma 18 : Mécanisme de réarrangement photochimique de dérivés d'*o*-nitrobenzyl en *o*-nitrosobenzaldéhyde et en acide carboxylique⁸⁶

Le clivage des dérivés d'*o*-NB se fait en quelques minutes ou quelques heures (selon l'intensité de la lampe utilisée) lorsqu'ils sont irradiés entre 300 et 365 nm.⁸⁶ Il existe d'autres motifs photolabiles qui sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Caractéristiques de certains groupements photolabiles utilisés pour la préparation de copolymères à blocs photosensibles⁸³

Groupement photosensible	Produits de clavage	Position dans le copolymère à blocs
 Ester de pyrenylméthyle	$\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$ + 	Chaîne latérale ⁸⁷
 Ester d' <i>o</i> -nitrobenzyle	$\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$ + 	Chaîne latérale ⁸⁸ Chaîne principale ⁸⁹ Jonction de blocs ⁹⁰
 Ester de coumarinyle	$\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$ + 	Chaîne latérale ⁹¹
 Ester de <i>p</i> -méthoxy-phénacyle	$\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-\text{R}$ + 	Chaîne latérale ⁹²

Des micelles de polymères possédant des groupements photolabiles ont déjà été développées dans la littérature. Selon l'effet recherché, le choix du groupement photosensible et sa localisation au niveau des micelles de polymères sont différents (Tableau 5). Les groupements photosensibles peuvent être localisés au cœur de la micelle, au niveau de la couronne ou encore à l'interface entre le cœur et la couronne.⁸³ La principale utilisation de ces micelles de polymères photosensibles est la libération contrôlée de principes actifs encapsulés (Figure 30).

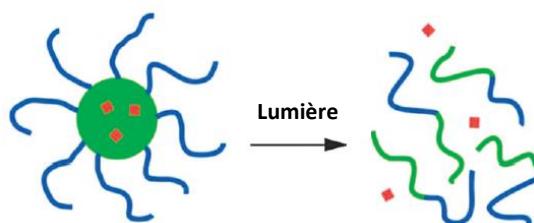


Figure 30 : Libération déclenchée par la lumière d'une molécule encapsulée dans le cœur de micelles de polymères photosensibles⁸⁸

La lumière peut ainsi être utilisée pour déclencher la dissociation irréversible des micelles. Zhao et son équipe⁸⁸ sont les premiers à avoir décrit la préparation de micelles de polymères sensibles à la lumière en utilisant des groupements photolabiles de type ester d'*o*-nitrobenzyle,⁸⁸ ester de pyrenylméthyle,⁸⁷ et ester de (diméthylamino)coumarine.⁹¹ Ces groupements ont été introduits au niveau de la chaîne polyméthacrylate (PMA) formant ainsi un bloc hydrophobe, la partie hydrophile de

l'amphiphile étant le PEG. Ces copolymères à blocs s'assemblent en solution aqueuse sous la forme de micelles avec une couronne hydrophile PEG et un cœur hydrophobe PMA. Ce cœur incorpore les groupements photolabiles qui, sous irradiation lumineuse, peuvent s'activer et libérer les acides carboxyliques formant un bloc poly(acide méthacrylique) (PMAA) issu de la chaîne PMA. Le copolymère à blocs produit PEG-*b*-PMAA est ainsi complètement hydrophile, ce qui entraîne la déstabilisation des micelles et la libération d'une molécule encapsulée (Figure 31).⁸³

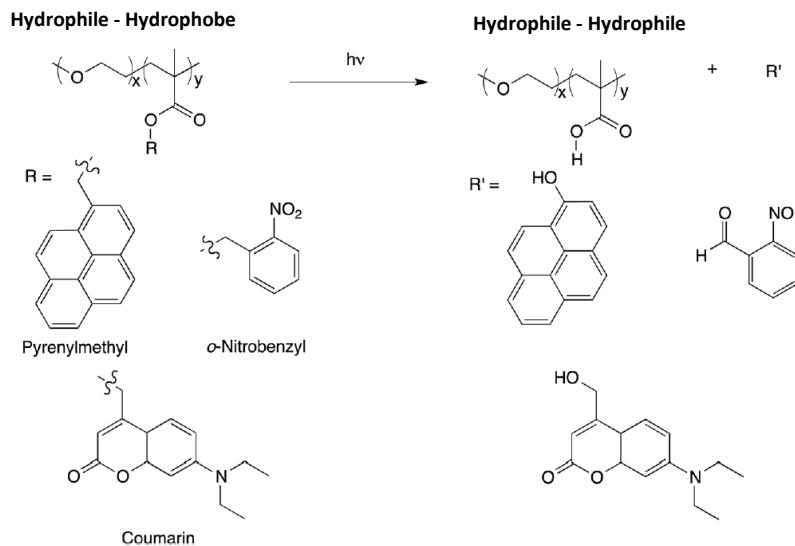


Figure 31 : Les différents types d'esters photolabiles utilisés pour la préparation de micelles de polymères photosensibles⁸³

L'avantage du groupement *o*-nitrobenzyle est qu'il peut se cliver selon un mécanisme de réarrangement intra-moléculaire de type Norrish II. Ce réarrangement correspond formellement à l'élimination du proton adjacent à l'ester et qui est capté par le groupement nitro (Schéma 18), sans la participation de molécules de solvant, contrairement au clivage des groupements esters de pyrényleméthyle.

Même si l'utilisation d'un rayonnement UV permet d'activer efficacement ces groupements photosensibles, les UV ne sont que très peu pénétrants dans les tissus biologiques à cause de leur forte diffusion et de leur absorption par l'eau et les substances biologiques présentes dans l'organisme.⁹³ De plus, les UV sont généralement altérants pour les tissus et les cellules.⁹⁴ Afin de contourner ces limitations, il pourrait être envisagé d'utiliser la lumière proche infrarouge pour activer les groupements photosensibles. Ces longueurs d'onde sont en effet moins énergétiques (donc moins altérantes) et peuvent pénétrer en profondeur dans les tissus qui sont « transparents » à $\lambda > 650 \text{ nm}$.^{93, 95} Cependant, les groupements *o*-nitrobenzyle ne sont sensibles qu'à des longueurs d'ondes comprises entre 300 et 365 nm. Pour permettre leur utilisation *in vivo*, nous nous sommes attelés à trouver un moyen de les irradier dans le proche infrarouge tout en conservant la même réactivité. Une des approches consiste à utiliser des nanoparticules à conversion ascendante (*upconversion nanoparticles*, UCNP) qui peuvent générer des photons dans l'UV lorsqu'elles sont éclairées dans le proche infrarouge. Une irradiation à deux photons dans l'infrarouge peut aussi être envisagée, cependant elle nécessite l'utilisation de lasers à forte puissance pour que l'absorption simultanée de deux photons puisse se faire. Les réactions sont généralement lentes car les chromophores ont une faible fenêtre d'absorption à deux photons.^{85, 96, 97}

2) Travaux antérieurs de l'équipe : préparation de micelles présentant une cytotoxicité déclenchée par la lumière UV

a) Synthèse des amphiphiles

Lors du clivage photo-déclenché du groupement *o*-nitrobenzyle, le sous-produit libéré est un nitroso-benzaldéhyde. Les composés de ce type sont cytotoxiques^{84, 98} car ils forment des adduits covalents avec de nombreuses protéines possédant des cystéines dans leur structure. Cette interaction inhibe l'activité enzymatique ou cellulaire des protéines liées.⁹⁹

Dans des travaux antérieurs de notre équipe, nous avons développé des amphiphiles comportant une chaîne stéaryl hydrophobe liée à un PEG₂₀₀₀ par un motif *o*-NB (Figure 32). Ces amphiphiles ont été assemblés en micelles et utilisés comme pro-drogues photo-sensibles pour inhiber la division cellulaire.¹⁰⁰ Les micelles ainsi constituées ont été incubées avec une lignée cellulaire cancéreuse avant d'être irradiées pour en déclencher la cytotoxicité.

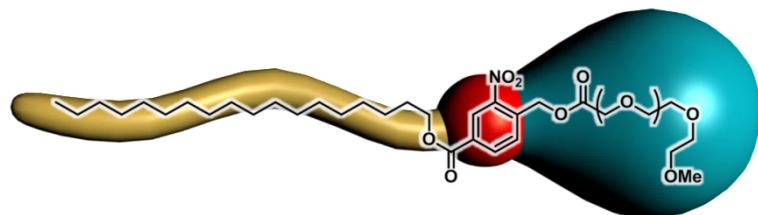
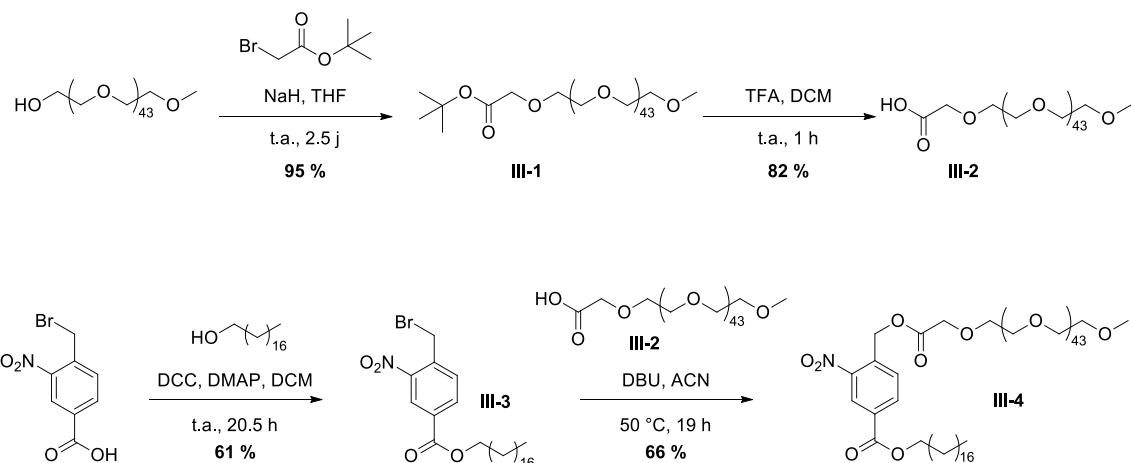


Figure 32 : Structure chimique de l'amphiphile C₁₈-NB-PEG

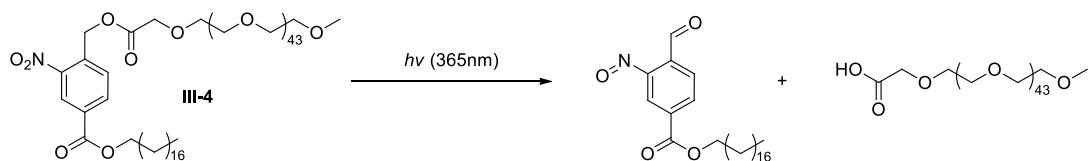
L'amphiphile **III-4** est obtenu en deux étapes à partir de l'acide 3-nitro-4-(bromométhyl)benzoïque. La première étape est une réaction d'estérisation entre l'acide benzoïque et l'alcool stéarylène en présence de DCC et de DMAP dans le dichlorométhane qui conduit à l'ester **III-3** avec 61 % de rendement. Le dérivé acide du PEG₂₀₀₀ **III-2** qui a été préparé à partir du PEG₂₀₀₀ en deux étapes (introduction de l'ester *tert*-butylique de l'acide bromoacétique et déprotection) est alkylé avec **III-3** en présence de DBU dans l'acétonitrile à 50 °C formant ainsi le diester amphiphile **III-4** correspondant au composé d'intérêt avec 66 % de rendement (Schéma 19).


 Schéma 19 : Synthèse de l'amphiphile C₁₈-NB-PEG

En solution aqueuse, cet amphiphile s'assemble sous forme de micelles. La CMC a été mesurée en utilisant la technique d'encapsulation du pyrène, elle est de 85 mg/L.¹⁰⁰ Les mesures par diffusion dynamique de la lumière montrent que les micelles ont un diamètre d'environ 12 nm.¹⁰⁰

b) Dégradation photochimique des micelles

Lorsque ces micelles sont irradiées à 365 nm (100 W, 120 min), une fragmentation de l'amphiphile s'opère et conduit à un dérivé du nitrosobenzaldéhyde et à un acide carboxylique PEGylé (Schéma 20).


 Schéma 20 : Produits obtenus après irradiation des micelles C₁₈-NB-PEG

La fragmentation induite par la lumière de l'amphiphile III-4 implique un réarrangement des électrons π aromatiques et la cinétique peut être suivie par spectroscopie d'absorption. Avant irradiation, le spectre d'absorption des micelles présente un pic à 224 nm et un épaulement à 265 nm qui correspondent à la transition électronique du NB. Les expériences d'irradiation ont été réalisées à 365 nm sur une solution de micelles à 0.15 mg/mL.¹⁰⁰ Le spectre d'absorption est mesuré entre 200 et 500 nm après 0, 5, 15, 30, 60 et 120 min d'irradiation. Au cours de l'irradiation des micelles, l'intensité du pic à 224 nm diminue tandis qu'une bande d'absorption à 325 nm apparaît (Figure 33). Ce pic à 325 nm suggère la formation d'un système aromatique plus délocalisé qui correspond au nitrosobenzaldéhyde et atteint son maximum après 2 h d'irradiation.

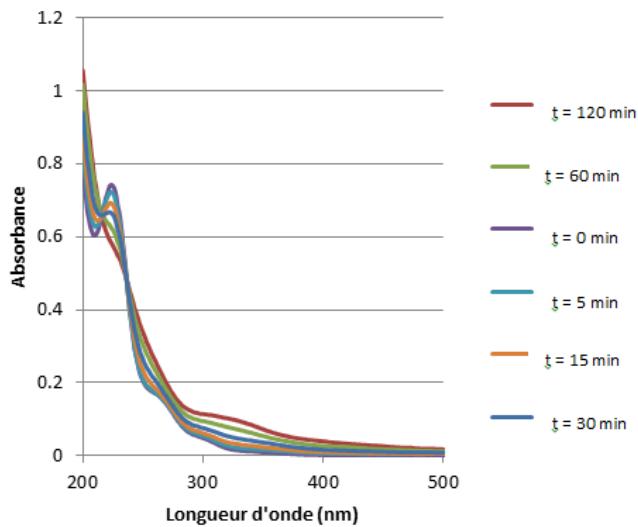


Figure 33 : Profil d'absorption des micelles photolabiles irradiées à 365 nm à 0, 5, 15, 60 et 120 min d'irradiation

La dégradation des micelles sous l'irradiation UV a également été mise en évidence en incorporant du Rouge du Nil au cœur des micelles et en réalisant des mesures de spectroscopie de fluorescence.¹⁰⁰ Une solution d'amphiphiles à 150 mg L⁻¹ et 10⁻⁶ M de Rouge du Nil a été préparée. Après encapsulation, la solution est filtrée sur membrane à 0.22 µm et les micelles sont irradiées à 365 nm. La variation de fluorescence du Rouge du Nil est mesurée par spectroscopie de fluorescence à différents temps (Figure 34). Avant irradiation, le Rouge du Nil présente une forte bande d'émission à 633 nm (ex. à 550 nm) étant donné que ce fluorophore est très soluble dans les environnements hydrophobes (le cœur des micelles ici). Cependant, il répond moins bien quand il est libéré en solution aqueuse et son émission se décale vers les longueurs d'ondes plus grandes. Ce sont ces propriétés qui ont été utilisées pour démontrer qualitativement la destruction des micelles après irradiation à 365 nm. Ainsi, l'intensité du pic d'émission de fluorescence du Rouge du Nil diminue fortement après 30 min d'irradiation et ce processus continue jusqu'à 120 min avec un décalage bathochrome de 6 nm de l'émission. Ce résultat suggère donc la dégradation des micelles avec la libération concomitante du Rouge du Nil dans l'eau.

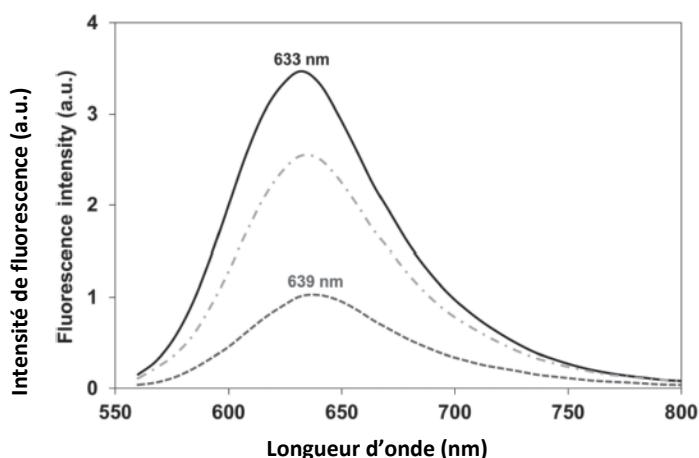


Figure 34 : Profil de fluorescence (excitation à 550 nm) du Rouge du Nil encapsulé dans les micelles C₁₈-NB-PEG, avant irradiation (trait plein), après 30 min (trait discontinu gris clair), et 120 min (trait discontinu noir) d'irradiation à 365 nm¹⁰⁰

Nous avons pu montrer que la présence du groupement *o*-nitrobenzyle permettait la dégradation par irradiation de micelles constituées des amphiphiles C₁₈-NB-PEG₂₀₀₀. Nous pouvons donc envisager d'utiliser ces micelles comme pro-drogues nanométriques activables pour la libération contrôlée d'un agent cytotoxique (dérivé nitrosobenzaldéhyde). Nous avons réalisé dans un premier temps des études *in vitro* afin de vérifier si les micelles s'internalisent dans les cellules et si elles avaient la capacité d'induire une cytotoxicité après irradiation à 365 nm.

c) Internalisation cellulaire et cytotoxicité

L'internalisation cellulaire des micelles C₁₈-NB-PEG a été étudiée. Les micelles ont été chargées à hauteur de 5 % en masse avec du DiO, une carbocyanine lipophile fluorescente qui présente un maximum d'excitation de 484 nm et un maximum d'émission à 501 nm. Les micelles chargées en DiO ont été ensuite incubées avec des cellules cancéreuses de la lignée MDA-MB-231. Après 12 h d'incubation, la microscopie de fluorescence montre la présence de vésicules intracellulaires réparties uniformément dans la cellule (canal vert). Cette expérience nous a permis de montrer que les micelles étaient internalisées de façon efficace dans les cellules, reste à savoir si elles peuvent devenir cytotoxiques sous l'influence d'un stimulus lumineux (Figure 35).

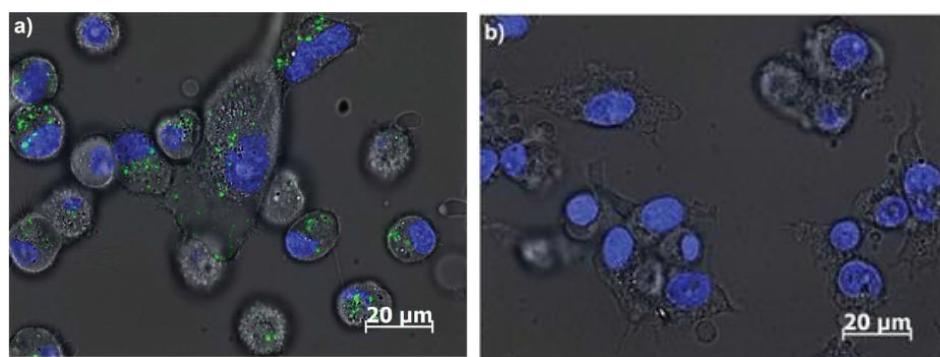


Figure 35 : Microscopie de fluorescence à champ large de cellules MDA-MB-231 incubées pendant 12 h en présence de micelles chargées avec du DiO (a) ou en absence de micelles (b). Canal bleu (colorant de Hoechst - noyau) et canal vert (DiO - micelles) ¹⁰⁰

L'effet cytotoxique des micelles lorsqu'elles sont irradiées à 365 nm a été étudié par le test colorimétrique MTT (methyl-thiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide). Trois expériences ont été conduites en parallèle : i) les micelles C₁₈-NB-PEG ont été incubées avec les cellules sans être irradiées, ii) les micelles ont été irradiées pendant 1 h avant incubation avec les cellules et enfin iii) des micelles ont été incubées dans un premier temps avec les cellules puis irradiées à 365 nm pendant 1 h. Dans chaque cas, les cellules ont été incubées pendant 12 h avec des concentrations de micelles variant de 0.2 à 40 μM. Ces tests ont pu montrer que les micelles non irradiées n'étaient pas toxiques jusqu'à une dose d'environ 10 μM. En ce qui concerne les micelles qui ont été irradiées avant d'être incubées avec les cellules, une cytotoxicité est observée à des concentrations supérieures à 6 μM, les micelles ont dans ce cas une IC₅₀ de 38 μM. Enfin, les micelles, irradiées après avoir été incubées avec les cellules, présentent une cytotoxicité forte avec une valeur d'IC₅₀ de 1.7 μM (Figure 36).¹⁰⁰

L'absence de toxicité cellulaire lorsque les micelles n'ont pas été irradiées comparée à la cytotoxicité observée des micelles lorsqu'elles sont irradiées met en évidence que la mort cellulaire est provoquée par les produits de photo dégradation des micelles. Lorsque les micelles sont irradiées avant d'être incubées avec les cellules, le dérivé nitrosobenzaldéhyde est généré à l'extérieur des cellules et est

moins altérant. Par contre, lorsque les micelles sont irradiées après incubation avec les cellules, la photo dégradation se produit au cœur des cellules, libérant ainsi l'entité nitrosobenzaldéhyde au contact de la machinerie cellulaire et avec une cytotoxicité plus importante.

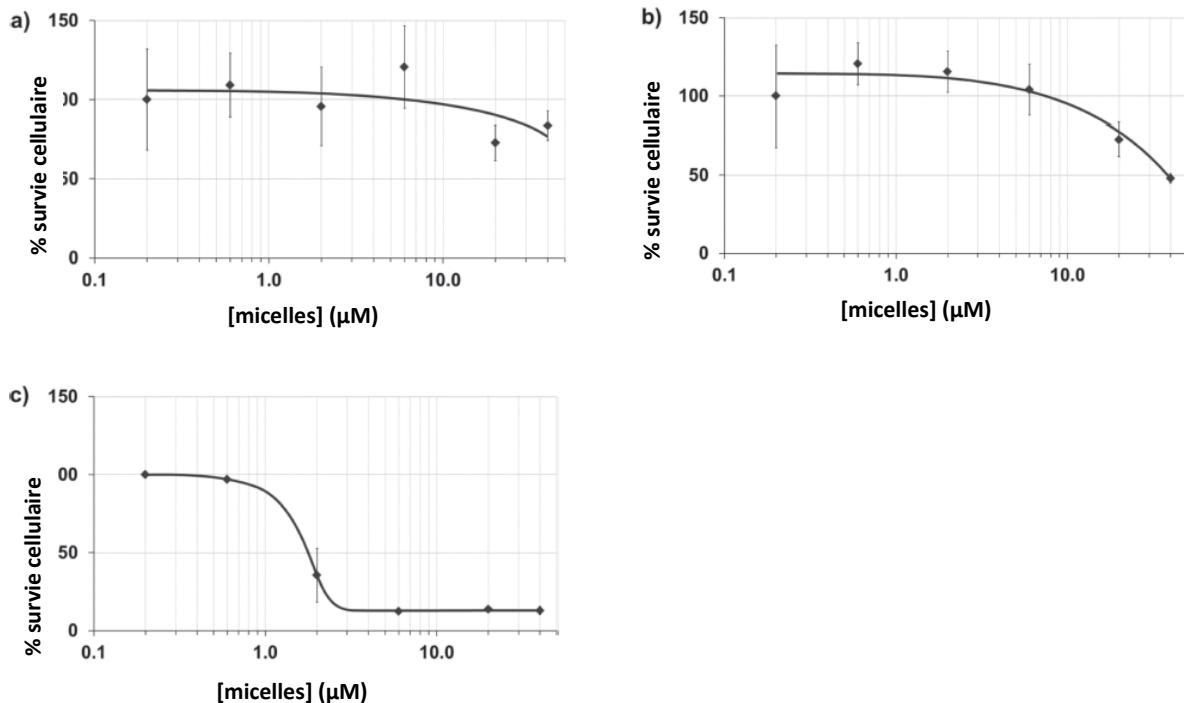


Figure 36 : Résultats des tests MTT pour les micelles incubées avec les cellules MDA-MB-231 a) sans irradiation, b) après irradiation, c) avant irradiation¹⁰⁰

Ces micelles peuvent ainsi être utilisées pour inhiber de manière contrôlée la prolifération des cellules cancéreuses. Cependant, l'utilisation de l'UV pour des applications *in vivo* n'est pas adaptée. C'est pourquoi nous avons souhaité combiner les micelles photoclavables à des particules à conversion ascendante afin de pouvoir nous affranchir d'une excitation dans l'UV et travailler avec des longueurs d'ondes dans le domaine du proche infrarouge. Nous avons également envisagé l'approche à deux photons pour déclencher la fragmentation/cytotoxicité du composé *o*-nitrobenzyle.

3) Adaptation de nos micelles aux besoins *in vivo*

a) Les nanoparticules à conversion ascendante

Les réactions de clavage photochimique des photochromes sont classiquement sensibles à la lumière UV qui est de grande énergie,⁸⁴ mais pas aux rayonnements proches infrarouge qui sont moins énergétiques. Les nanoparticules à conversion ascendante (UCNP) dopées avec des lanthanides peuvent représenter une alternative à l'utilisation du rayonnement UV. En effet, la conversion ascendante de photons correspond à un processus optique non linéaire au cours duquel des photons (au moins deux) du proche infrarouge peuvent être absorbés et réémis à des longueurs d'ondes plus courtes sous forme d'un seul photon de plus forte énergie.¹⁰¹ Les nanoparticules à conversion ascendante ont la propriété d'émettre de la lumière de forte énergie dans le visible ou l'UV lorsqu'elles sont excitées dans le proche infrarouge.¹⁰² Ces nanoparticules ont été décrites dans la littérature pour la première fois en 2000.¹⁰³ En 2009, un premier exemple de l'utilisation d'UCNP pour activer une

réaction photochimique est décrit.¹⁰⁴ Contrairement à l'excitation par absorption à deux photons, l'excitation des UCNP par la lumière proche infrarouge ne nécessite pas une source laser très puissante et se fait par absorption séquentielle et multiple avec de vrais niveaux d'énergie.⁹⁶ Les deux UCNP les plus efficaces sont les systèmes NaYF_4 : Yb/Tm (matrice nanocristalline de β -phase NaYF_4 dopée avec Yb^{3+} et Tm^{3+}) et NaYF_4 : Yb/Er . Les UCNP comportant du Tm^{3+} émettent dans le bleu et l'UV sous excitation à 980 nm alors que celles contenant Er^{3+} émettent dans la lumière verte et rouge (excitation à 980 nm). Le mécanisme de conversion ascendante des UCNP Tm^{3+} et Er^{3+} sensibilisées avec Yb^{3+} est présenté dans la Figure 37. Les activateurs de la conversion ascendante de la photoluminescence sont Er^{3+} et Tm^{3+} , Yb^{3+} étant le sensibilisateur.⁹⁷

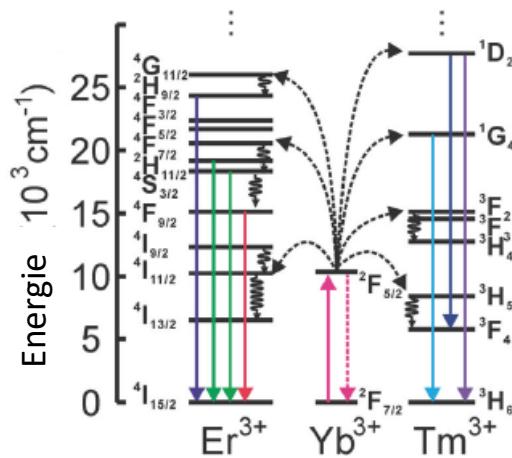
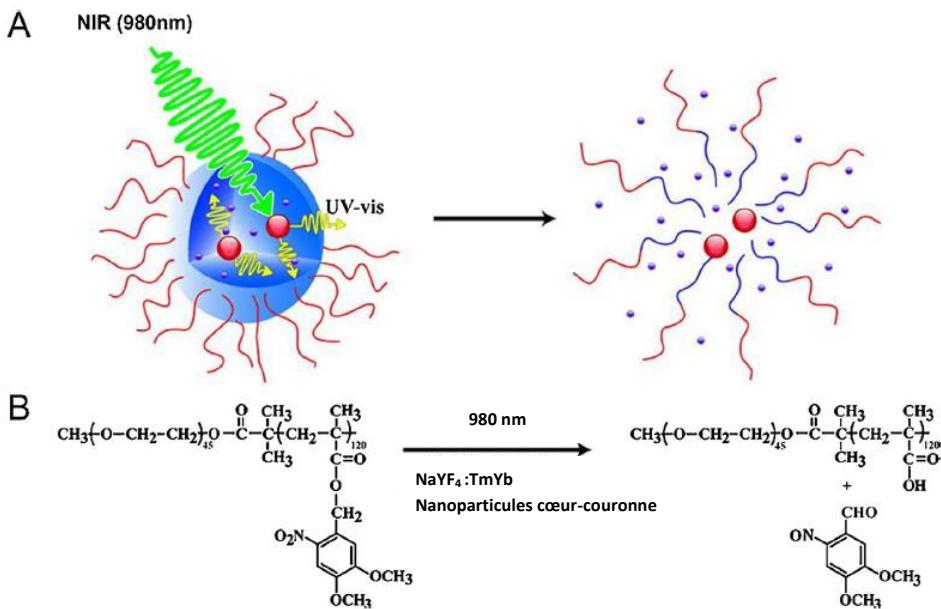


Figure 37: Diagramme des niveaux d'énergie de la conversion ascendante de photon dans les UCNP Er^{3+} et Tm^{3+} sensibilisées avec Yb^{3+} .⁹⁷

Des vecteurs nanométriques photolabiles sous UV et incorporant des UCNP ont déjà été décrits dans la littérature. Ainsi, des micelles de copolymères à bloc (PEO-*b*-PNBMA) incorporant un groupement *o*-NB ont été utilisées pour encapsuler des UCNP (NaYF_4 : Yb/Tm). Après irradiation à 980 nm, les UCNP émettent des photons dans l'UV, ce qui conduit au clivage des groupements *o*-NB et à la dissociation des micelles car le bloc polyméthacrylate devient hydrophile ce qui perturbe l'assemblage micellaire étant donné que l'équilibre hydrophile-hydrophobe nécessaire à la formation des micelles est rompu (Figure 38).⁹⁶



84, 96

Les UCNP semblent donc être prometteuses pour pouvoir utiliser des groupements sensibles à la lumière UV tout en irradiant dans le proche infrarouge. Nous avons donc choisi de développer des micelles chargées avec des UCNP afin de pouvoir utiliser notre système de vectorisation micellaire *in vivo*.

b) Micelles photosensibles chargées avec des UCNP

Afin de pouvoir travailler dans le domaine du proche infrarouge nous avons envisagé d'encapsuler dans les micelles photosensibles des nanoparticules à conversion ascendante NaGdF₄: 18% Yb/0.5% Tm, qui ont été préparées par l'équipe du Dr. Wei Zheng du Fujian Institute of Research on the Structure of Matter, à Fuzhou (Chine). Ces nanoparticules ont un diamètre de 16 nm et sont ligandées par de l'acide oléique qui permet leur mise en suspension dans le cyclohexane (Figure 39). Après irradiation à 980 nm, les UCNP émettent des photons à différentes longueurs d'onde dans l'UV (notamment à 365 nm) ce qui pourrait permettre de cliver le motif *o*-NB présent dans les micelles et induire un effet cytotoxique par la génération de l'entité nitrosobenzaldéhyde (Figure 40). Le spectre d'émission des UCNP a été mesuré dans l'équipe du Dr. Thierry Gacoin, au laboratoire de Physique de la Matière Condensée de l'École Polytechnique à Palaiseau. Nous avons enregistré le spectre d'émission des nanoparticules après excitation à 980 nm en irradiant avec un laser à 6 W/cm². Les pics majoritaires d'émission sont à 475 et 450 nm mais nous observons également un pic d'émission minoritaire à 365 nm (Figure 41).

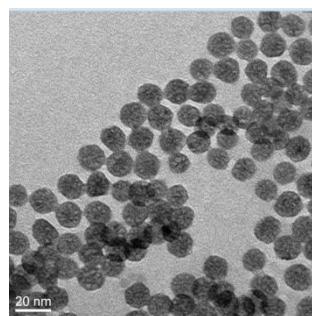


Figure 39 : Image MET des UCNP NaGdF₄ : 18% Yb/0.5% Tm

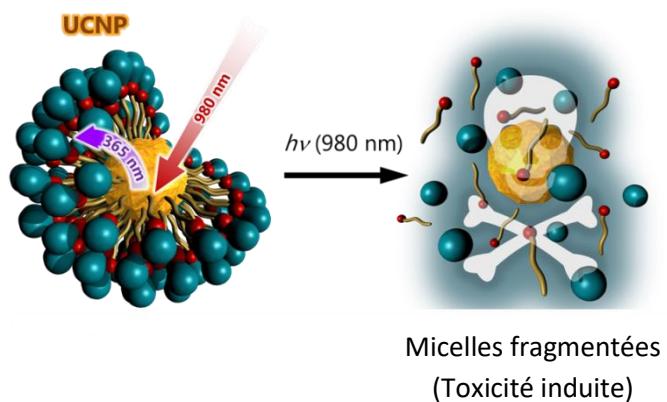


Figure 40 : Principe de fonctionnement des micelles photoclavables chargées avec des UCNP

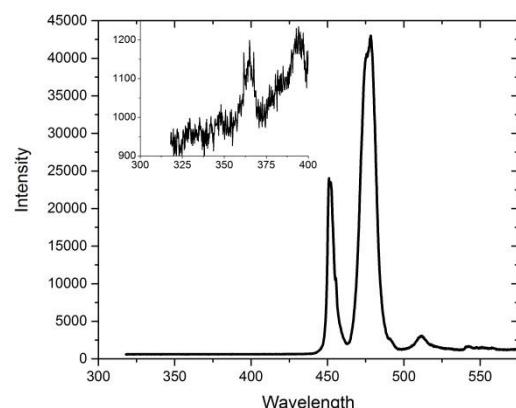


Figure 41 : Spectre d'émission des UCNP après excitation à 980 nm (densité de puissance du laser : 6 W/cm²)

Dans un premier temps nous avons tenté d'encapsuler les UCNP dans les micelles photoclavables C₁₈-NB-PEG qui ont été décrites précédemment. Pour ce faire nous ajoutons une solution d'UCNP dans le cyclohexane à une solution aqueuse de micelles qui est ensuite traitée au bras à ultrasons jusqu'à évaporation du cyclohexane. Cependant, au cours des essais d'encapsulation dans l'eau, nous observons un dépôt correspondant aux nanoparticules non suspendues au fond du pilulier. Ce résultat laisse penser que les UCNP ligandées par de l'acide oléique ne s'encapsulent pas ou très peu dans les

micelles C₁₈-NB-PEG. Une analyse MET réalisée après filtration de la solution de micelles sur filtre Nylon 0.2 µm (Figure 42) montre que des UCNP semblent s'être encapsulées dans les micelles. Afin de quantifier la quantité d'UCNP encapsulée, le contenu en Gd (métal présent dans les UCNP) de la suspension colloïdale a été dosé par ICP-MS. Deux encapsulations successives ont été réalisées afin de vérifier si l'efficacité d'encapsulation pouvait être améliorée (Tableau 6). Nous constatons que deux encapsulations successives permettent d'augmenter la charge encapsulée (1,5 fois plus d'UCNP encapsulées lors de la deuxième encapsulation). Cependant, la quantité d'UCNP encapsulée est très faible. Ce résultat pourrait être mis sur le compte d'un encombrement stérique de la chaîne PEG qui empêche une encapsulation efficace des nanoparticules.

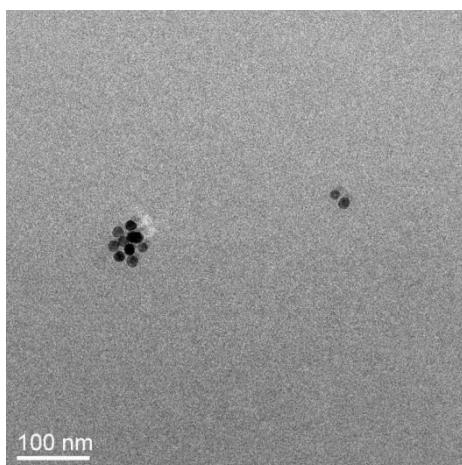


Figure 42 : Image MET des UCNP chargées dans les micelles photoclavables de base (C₁₈-NB-PEG)

Tableau 6 : Résultats du dosage du Gd après encapsulation dans les micelles

Micelles	Gd (en ppb)
Micelles C ₁₈ -NB-PEG 1 ^{ère} encapsulation	1 689
Micelles C ₁₈ -NB-PEG 2 ^{ème} encapsulation	2 552

Nous avons donc conçu un nouvel amphiphile (photoclavable) qui incorpore une autre tête polaire. Par homologie avec les travaux antérieurs de l'équipe, nous avons choisi une tête nitrilo-triacététique (NTA) car ces motifs, lorsqu'ils sont incorporés à des micelles, permettent généralement de très bien disperser en solution aqueuse des nanoparticules et des composés moléculaires.^{14, 54} Nous avons donc synthétisé un nouvel amphiphile photoclavable III-5 avec une tête polaire NTA (Figure 43).

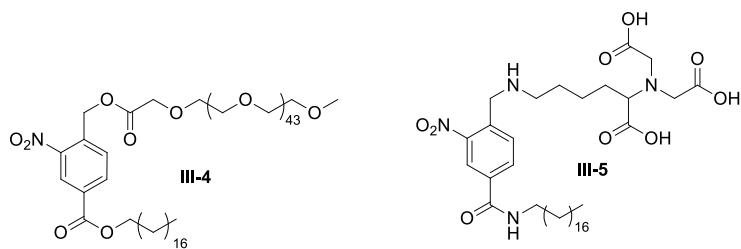


Figure 43 : Structure des amphiphiles C₁₈-NB-PEG et C₁₈-NB-NTA

La tête polaire NTA protégée par des groupements *tert*-butyles III-8 a été obtenue en trois étapes. La première étape est une réaction de *trans*-estérification entre l'acétate de *tert*-butyle et le groupement

acide de la *N*-benzyloxycarbonyl-L-lysine en présence d'acide perchlorique. Après deux jours de réaction à température ambiante, l'ester *tert*-butylique **III-6** est obtenu avec 53 % de rendement. L'amine primaire de **III-6** est ensuite di-alkylée avec du bromoacetate de *tert*-butyle dans l'acétonitrile à reflux. Enfin, le groupement carboxybenzyle est déprotégé par hydrogénéation en présence d'une quantité sous-stœchiométrique de palladium pour donner **III-8** dans lequel l'amine est libre (Schéma 21).

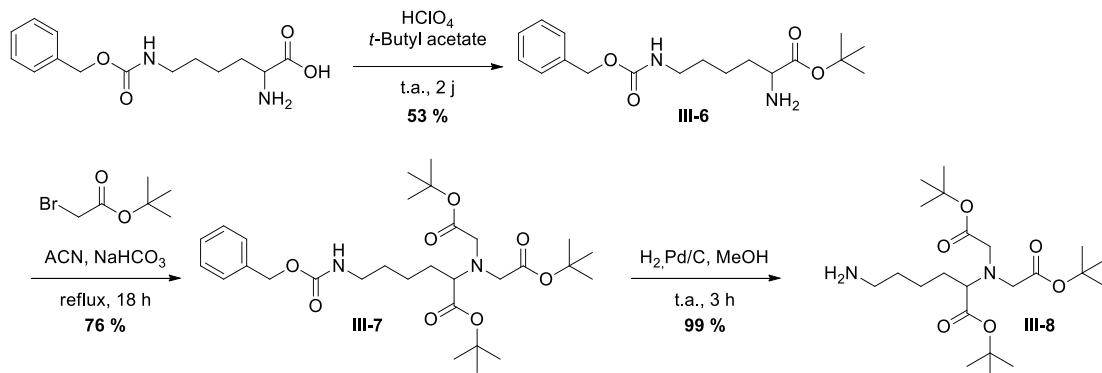


Schéma 21 : Synthèse de la tête polaire protégée **III-8**

La partie « basse » **III-9** de l'amphiphile C₁₈-NB-NTA a été préparée par amidation de l'acide 3-nitro-4-(bromométhyl)benzoïque par l'octadécylamine en présence de DCC et de DMAP (Schéma 22). Cette étape fonctionne avec un rendement de 37 % et permet d'introduire la partie lipophile de l'amphiphile C₁₈-NB-NTA. Il est à noter que l'on observe au cours du processus, une réaction secondaire d'addition de l'amine sur le site électrophile bromé.

Le couplage de la tête NTA protégée **III-8** (préparée précédemment) avec la partie « basse » **III-9** est ensuite réalisé. Cette réaction s'opère à température ambiante en présence de triéthylamine. Une dernière étape de déprotection des trois acides carboxyliques de la tête NTA par du TFA nous permet enfin d'obtenir l'amphiphile photoclivable **III-11** (Schéma 22).

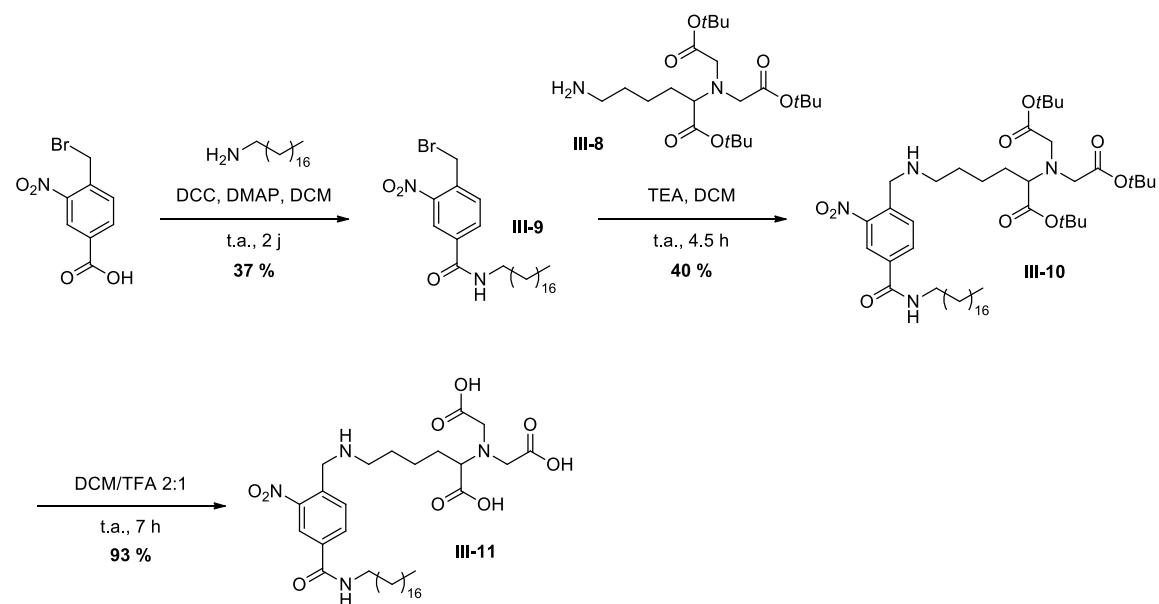


Schéma 22 : Synthèse de l'amphiphile C₁₈-NB-NTA

Les micelles ont ensuite été assemblées dans de l'eau basique (pH 12) afin de déprotoner intégralement la tête polaire (qui devient alors moins « compacte ») pour conférer à l'amphiphile un paramètre d'empilement critique inférieur à 0.33. À une concentration dans l'eau de 10 mg/mL les micelles C₁₈-NB-NTA ont un diamètre d'environ 9 nm, tel que mesuré par DLS. Nous avons ensuite vérifié que ces dernières se dégradent bien par irradiation à 365 nm. Les micelles ont été diluées à 0.075 mg/mL et ont été irradiées pendant 2 h à 365 nm. Le spectre d'absorption a été mesuré à 0, 5, 15, 30, 60 et 120 min. Un pic d'absorption apparaît à 325 nm au cours de l'irradiation (Figure 44a), il correspond à la formation du nitrosobenzaldéhyde. Le rapport des absorbances A_(325 nm)/A_(224 nm) au cours du temps (Figure 44b) confirme l'apparition d'un nouveau pic à 325 nm et montre que la cinétique de dégradation atteint un palier au bout de 100 min d'irradiation.

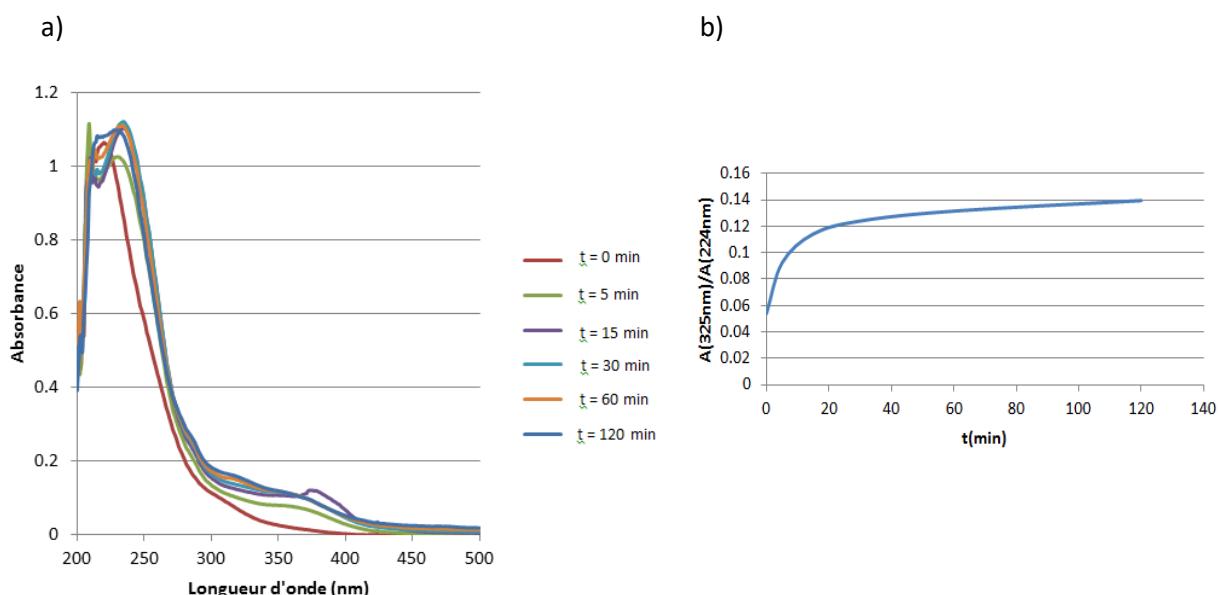


Figure 44 : a) Profil d'absorption des micelles modifiées irradiées à 365 nm à 0, 5, 15, 30, 60 et 120 min d'irradiation, b) Rapport des absorbances A_(325 nm)/A_(224 nm) en fonction du temps d'irradiation à 365 nm

L'encapsulation des nanoparticules à conversion ascendante est réalisée en ajoutant des UCNP suspendues dans le cyclohexane à une solution aqueuse de micelles C₁₈-NB-NTA. Le mélange est soniqué au bras à ultrasons pendant 10 minutes. Cette opération est répétée trois fois. Après sonication, des dépôts d'UCNPs sont toujours visibles dans les piluliers. La solution est filtrée sur filtre Nylon 0.2 µm et le contenu en Gd de la suspension colloïdale a ensuite été dosé par ICP-MS afin de pouvoir évaluer l'efficacité de l'encapsulation dans les micelles.

Deux encapsulations successives ont été réalisées comme pour les micelles C₁₈-NB-PEG afin de forcer la prise en charge des UCNP par les micelles. Le Tableau 7 montre les résultats obtenus. Les encapsulations successives, comme pour les micelles C₁₈-NB-PEG, permettent de charger plus d'UCNP qu'une encapsulation simple (1,8 fois plus). De plus, les micelles C₁₈-NB-NTA encapsulent environ 200 fois plus d'UCNP que les micelles C₁₈-NB-PEG.

Tableau 7 : Résultats du dosage du Gd après encapsulation dans les micelles C₁₈-NB-NTA

Micelles	Gd (en ppb)
Micelles C ₁₈ -NB-NTA 1 ^{ère} encapsulation	302 787
Micelles C ₁₈ -NB-NTA 2 ^{ème} encapsulation	559 724

L'image MET de la solution de micelles ayant encapsulé des UCNP confirme l'encapsulation des particules dans les micelles C₁₈-NB-NTA (Figure 45).

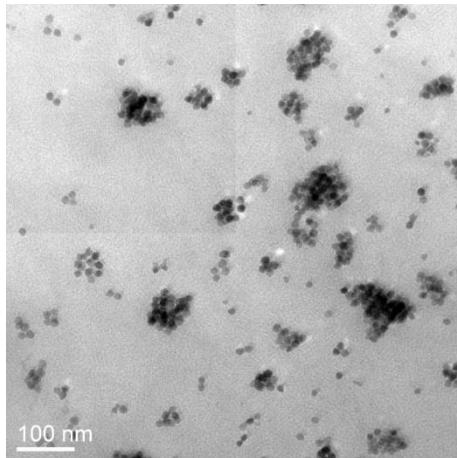


Figure 45 : Image MET des UCNP chargées dans les micelles photocliviales modifiées (C₁₈-NB-NTA)

Après avoir vérifié que les micelles constituées de l'amphiphile C₁₈-NB-NTA encapsulent les UCNP de manière plus efficace que les micelles C₁₈-NB-PEG, nous avons souhaité vérifier que la conversion ascendante des nanoparticules permettait la dégradation des micelles suite à une irradiation dans le proche infrarouge à 980 nm. Dans un premier temps nous nous sommes assuré que le système de micelles C₁₈-NB-NTA chargées avec des UCNP se dégradait toujours à la suite d'une irradiation à 365 nm. Lors de l'irradiation à 365 nm nous observons bien l'apparition d'une nouvelle bande à 325 nm, confirmant la dégradation de l'amphiphile, et la cinétique d'irradiation atteint un plateau au bout de 2 heures. Ayant confirmé que l'amphiphile se dégrade après irradiation à 365 nm en présence des UCNP, nous avons réalisé l'expérience en irradiant à 980 nm.

La solution de micelles constituées de l'amphiphile C₁₈-NB-NTA à 10 mg/mL et chargées avec les UCNP ont été irradiées avec un laser à 980 nm (puissance de 1,2 W pour un faisceau de diamètre 5 mm, densité de puissance de 6 W/cm²). Des mesures du spectre d'absorption ont été réalisées à 0, 5, 15, 30, 60 et 120 min d'irradiation. Cependant, quel que soit le temps d'irradiation, nous n'observons pas de dégradation photo-induite des micelles. En effet, lorsque le rapport des absorbances A_(325 nm)/A_(224 nm) est tracé, nous n'observons aucune variation de ce rapport (Figure 46). Même après 15 h d'irradiation à 980 nm, la courbe d'absorbance se superpose avec celle obtenue avant irradiation montrant que les micelles demeurent intactes.

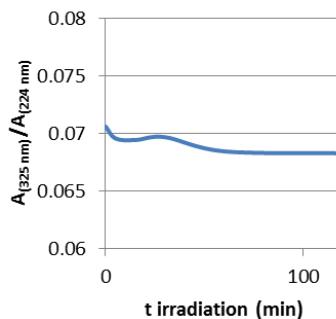


Figure 46 : Rapport des absorbances $A_{(325 \text{ nm})}/A_{(224 \text{ nm})}$ au cours du temps lors de l'irradiation des micelles $C_{18}\text{-NB-NTA}$ chargées avec des UCNP à 980 nm

Ce résultat paraît surprenant dans la mesure où nous avions observé dans la série d'expériences préliminaires une émission des UCNP à 365 nm lorsqu'elles étaient irradiées à 980 nm. Cependant, nous avions également observé que l'intensité de ce pic d'émission était relativement faible. De plus, le laser utilisé ici est de faible puissance (1,2 W). Il est donc probable que le nombre de photons réémis à 365 nm ne soit pas suffisant pour ammorcer la coupure photoinduite des micelles. N'ayant pas trouvé de banc laser de plus forte puissance, nous nous sommes résignés et avons orienté notre approche vers une activation à deux photons des micelles.

c) Irradiation à deux photons des micelles $C_{18}\text{-NB-PEG}$

L'absorption simultanée de deux photons a été étudiée théoriquement en 1930 par Göppert-Mayer et a été démontrée expérimentalement en 1961.¹⁰⁵ Ce phénomène d'absorption à deux photons ne s'observe qu'avec des lasers pulsés de forte intensité, générant instantanément une densité importante de photons. Ce phénomène permet l'accès à un état excité suite à l'absorption simultanée, par une molécule dans un état donné, de deux photons dont la somme des énergies correspond à la différence d'énergie entre l'état initial et l'état excité de la molécule.¹⁰⁵ Ce processus peut donc être utilisé pour la dégradation de molécules sensibles à l'UV en irradiant à deux photons dans le visible ou le proche infrarouge.

Nous avons souhaité vérifier si les micelles photolivables $C_{18}\text{-NB-PEG}$ pouvaient se dégrader selon un mécanisme à deux photons. Une solution de micelles à 6 mg/mL dans de l'eau déminéralisée a été chargée à 2.8 μM en rouge du Nil et irradiée à 740 nm. Les expériences d'irradiation à deux photons ont été réalisées par les Dr. Frédéric Bolze et Alexandre Specht de l'Université de Strasbourg. La solution de micelles a été irradiée pendant 1 h avec un laser de puissance 400 mW (laser titane saphir) émettant un rayonnement monochromatique à 740 nm. La libération du Rouge du Nil du cœur de la micelle a été suivie au cours du temps en mesurant la baisse d'intensité de fluorescence et le décalage bathochrome de l'émission du fluorophore. Les valeurs obtenues ont été comparées à une valeur de référence correspondant à 100 % de colorant libéré en ajoutant du DMSO à la solution micellaire à la fin de l'expérience. Nous observons après 1 h d'irradiation 90 % de photolyse des micelles. Toutefois, le laser utilisé étant de forte puissance, un effet thermique n'est pas à exclure. En effet, le composé amphiphile est construit de part et d'autre du motif *o*-nitrobenzyle par des liens esters qui pourraient, par échauffement localisé, être hydrolysés. Afin de pouvoir discriminer entre un effet photochimique et un effet thermique, des expériences complémentaires doivent être réalisées en analysant par exemple les produits de dégradation. Si des acides carboxyliques PEGylés ou à chaîne grasse sont

identifiés par spectrométrie de masse, cela voudra dire qu'un effet thermique est responsable de l'hydrolyse et donc de la dissociation des micelles. Nous pouvons également envisager la synthèse d'un analogue non-photoactivable du composé C₁₈-NB-PEG en remplaçant le motif *o*-nitrobenzyle central par un groupement benzyle « neutre ». Si ce composé, une fois assemblé en micelles et chargé en Rouge du Nil, se dégrade également à 740 nm, cela voudra dire qu'il y a un effet thermique prédominant. Les expériences de contrôle sont en cours, en collaboration avec l'équipe Strasbourgeoise.

Nous avons donc développé dans cette partie des micelles qui sont capables de se dégrader sous l'influence d'un stimulus lumineux à 365 nm et de libérer un composé cytotoxique. La transposition des micelles à une utilisation *in vivo* implique de pouvoir irradier les échantillons dans le proche infrarouge. Cependant, nous avons été confrontés à des limitations d'ordre technique avec un laser de trop faible puissance qui n'a pas été en mesure d'activer la dégradation des micelles. La validation du système UCNP-micelles sous irradiation NIR demande donc encore quelques ajustements que nous n'avons malheureusement pas pu mettre en œuvre. Toutefois, le mode d'activation à deux photons semble être prometteur au vu des premiers résultats obtenus.

En parallèle du développement de micelles répondant à un stimulus externe, nous avons également travaillé sur des micelles capables de répondre à un stimulus interne qui serait propre aux cellules cancéreuses. Nous avons ainsi envisagé de construire des micelles sensibles au pH.

II. Préparation de micelles sensibles au pH

1) Bibliographie

Nous avons vu dans le premier chapitre que le pH extracellulaire dans les tumeurs solides était plus acide (environ 6,5–7,2) que le pH sanguin (7,4 à 37 °C). Par ailleurs, le pH au niveau des endosomes est compris entre 5,5–6,0 et celui des lysosomes est de 4,5–5,0.^{106, 107} Cette différence de pH entre les tumeurs et le milieu physiologique peut être mise à profit pour déclencher la libération contrôlée d'un principe actif encapsulé dans un nano-vecteur. Ce phénomène a déjà été exploité dans la littérature pour construire des nano-vecteurs sensibles au pH. Ces vecteurs sont stables dans la circulation sanguine mais se dégradent lorsqu'ils sont internalisés dans les cellules cancéreuses.¹⁰⁷ Les nano-vecteurs s'accumulent passivement au niveau des tumeurs grâce à l'effet EPR et l'internalisation cellulaire se fait classiquement par endocytose. Les nano-vecteurs passent alors d'endosomes précoces à des endosomes tardifs puis à des lysosomes dont le pH est acide. Au niveau des lysosomes, la plupart des médicaments sont hydrolysés.¹⁰⁸

Nous avons souhaité exploiter cette propriété liée au pH pour développer des vecteurs nanométriques qui soient capables non seulement de transporter des principes actifs médicamenteux et de les libérer au contact de la cible, mais également capables de servir d'outils d'imagerie activables par le pH. L'idée étant d'incorporer dans la structure du nano-vecteur une sonde pro-fluorescente dont l'émission sera modulée par la coupure sélective d'une liaison chimique en milieu acide.

Les amphiphiles mis en œuvre au laboratoire sont classiquement constitués d'une chaîne polaire PEGylée et d'une chaîne lipophile. Les deux unités seront reliées ici par un motif *cis*-aconityle qui est sensible au pH et qui pourra libérer en milieu acide un naphtalimide fluorescent (Figure 47).

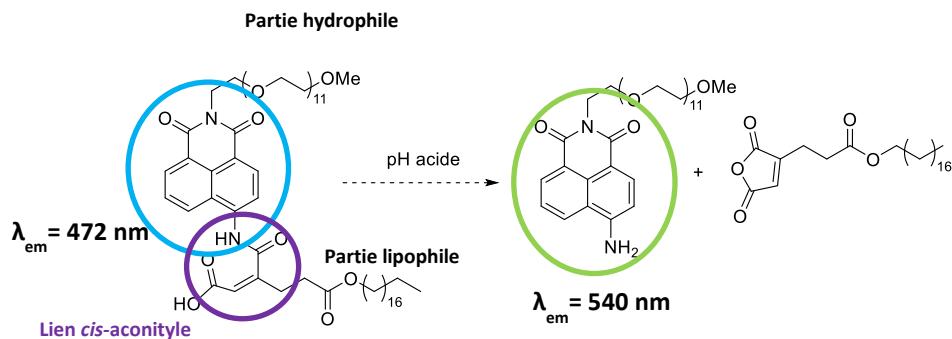


Figure 47 : Structure chimique de l'amphiphile sensible au pH et sa dégradation en milieu acide (référence des longueurs d'ondes : Lee et al¹⁰⁹)

Le lien sensible au pH choisi est le lien *cis*-aconityle. Ce lien a déjà été employé par Sun et ses collègues pour créer des systèmes de copolymères à blocs sensibles au pH pour libérer des principes actifs.¹¹⁰ Leur copolymère a été préparé en reliant les fragments PEG et PDLLA (poly(D,L-lactide) par un lien *cis*-aconityle qui se réarrange en milieu acide. L'amphiphile PEG-PDLLA a été assemblé sous la forme de nanoparticules qui s'accumulent préférentiellement au niveau des tumeurs. Le léger caractère acide de la matrice tumorale (pH = 6,5–7,0) déclenche l'hydrolyse de l'amide, libérant ainsi le fragment PEG de la nanoparticule. Cette libération a pour effet d'augmenter le potentiel zeta de la nanoparticule ce qui facilite son internalisation cellulaire (Figure 48).¹¹⁰

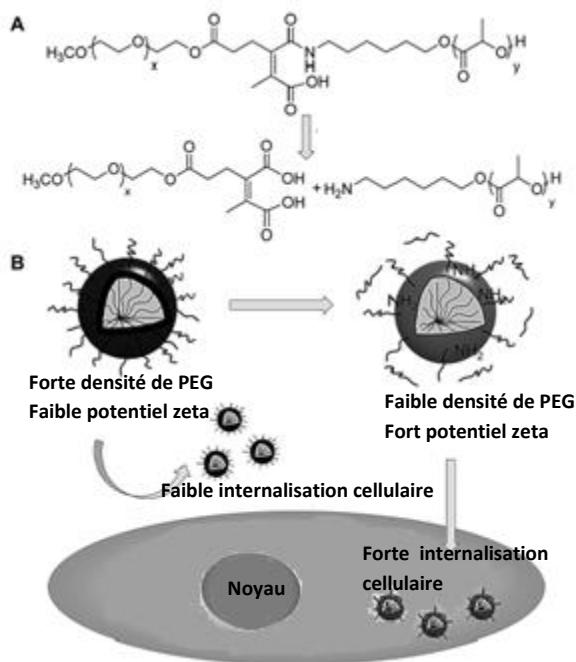


Figure 48 : A) Structure de l'amphiphile et son clivage en milieu acide, B) Illustration de l'augmentation de l'internalisation cellulaire après dégradation¹¹⁰

Nous avons choisi de transposer cette approche et d'utiliser le lien *cis*-aconityle en association avec une sonde fluorescente, le 4-amino-1,8-naphthalimide. Cette sonde lorsqu'elle est libre présente de bonnes propriétés spectroscopiques avec une longueur d'onde d'émission à 540 nm (exc. 428 nm) pour des motifs similaires décrits dans la littérature (Figure 47).¹⁰⁹ Par contre lorsque le groupement 4-amino est engagé dans un lien amide, l'émission de fluorescence est décalée avec une longueur d'onde d'émission à 472 nm (valeurs issues de motifs similaires décrits dans la littérature).¹⁰⁹ Sous

l'influence d'un stimulus acide, le lien amide reliant le *cis*-aconityle et le 4-amino-1,8-naphtalimide devrait se couper pour libérer la sonde pro-fluorescente. Ce type d'approche permettra de visualiser sélectivement l'internalisation et le clivage du vecteur nanométrique dans les cellules cibles par révélation de la fluorescence à 540 nm.

Le mécanisme possible de la dégradation du lien *cis*-aconityle est décrit en Figure 49.

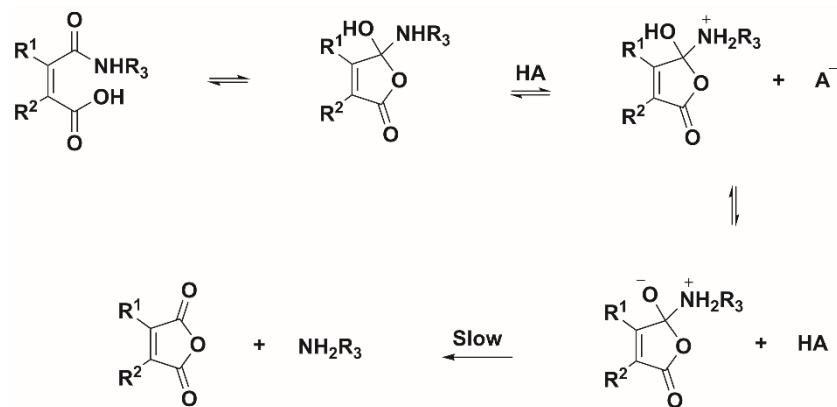


Figure 49 : Mécanisme de dégradation possible des dérivés amides d'acide maléique¹¹¹

2) Synthèse de l'amphiphile sensible en milieu acide

Nous avons choisi de préparer un amphiphile incorporant une unité PEG₅₅₀ car la synthèse est plus facile de mise en œuvre que celle d'amphiphiles incorporant un PEG de plus haut poids moléculaire. De plus nous ne souhaitons dans un premier temps que réaliser des expériences *in vitro*, nous n'avons donc pas besoin des propriétés de circulation prolongée dans le sang obtenues classiquement avec les PEG₂₀₀₀. La synthèse de l'amphiphile peut être divisée en deux volets qui correspondent aux deux fragments clés : la partie hydrophile qui incorpore la sonde fluorescente et la partie hydrophobe qui incorpore le lien sensible au pH.

a) Synthèse de la partie hydrophile

La partie hydrophile de l'amphiphile est constituée d'un naphtalimide portant une chaîne PEG₅₅₀. Elle est obtenue en deux étapes à partir de l'anhydride 4-nitro-1,8-naphtalique (Schéma 23).

Le PEG₅₅₀-NH₂ conférant l'hydrophilie à l'amphiphile a été préparé en trois étapes à partir du PEG₅₅₀ commercial. Une première étape de tosylation a permis d'introduire un groupement partant qui est déplacé par l'azoture de sodium. L'azoture est ensuite réduit en amine par hydrogénéation catalytique en présence de palladium sur charbon. Le rendement sur ces trois étapes est de 66 %.

Avec le PEG₅₅₀-NH₂ en mains, nous avons formé l'imide **III-15** en faisant réagir l'anhydride 4-nitro-1,8-naphtalique avec le PEG₅₅₀-amine dans l'éthanol à reflux. Le groupement nitro est ensuite réduit en amine en présence de palladium sur charbon sous atmosphère d'hydrogène. Le rendement sur ces deux étapes est de 70 %.

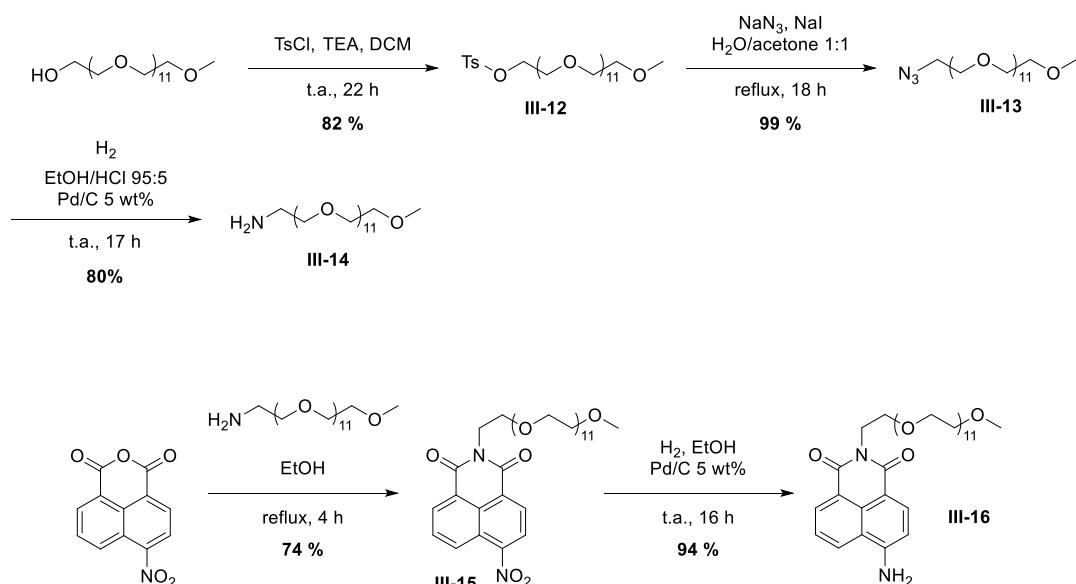


Schéma 23 : Synthèse de la partie hydrophile de l'amphiphile et du naphtalimide

b) Synthèse de la partie lipophile

Ayant synthétisé la partie hydrophile, nous nous sommes ensuite consacrés à la préparation de la partie lipophile **III-17** comportant un anhydride maléique qui sera utilisé pour le greffage au naphtalimide. Le couplage de ces deux parties devrait conduire au composé amphiphile espéré **III-18** (Figure 50).

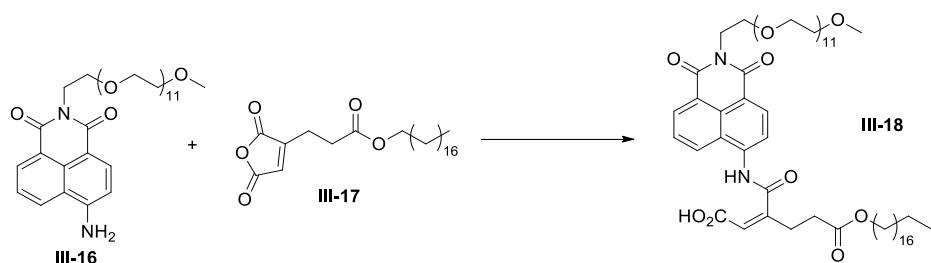


Figure 50 : Structure de l'amphiphile cible III-18

Pour préparer **III-17**, nous avons tout d'abord synthétisé un anhydride maléique (**III-20**) possédant un acide carboxylique terminal qui permettra une fonctionnalisation ultérieure avec une chaîne grasse lipophile. Pour obtenir cet anhydride, nous avons réalisé une réaction de Horner-Wadsworth-Emmons entre le diméthyl-2-oxoglutarate et le triéthyl-2-phosphonoacétate selon une procédure décrite par Kang.¹¹¹ Le triester est ensuite hydrolysé à chaud dans une solution hydro-alcoolique de potasse pour conduire à l'anhydride maléique souhaité (Schéma 24). Cet anhydride est obtenu sous la forme d'un mélange avec l'anhydride hydrolysé (forme ouverte) dans un ratio de 1:3.

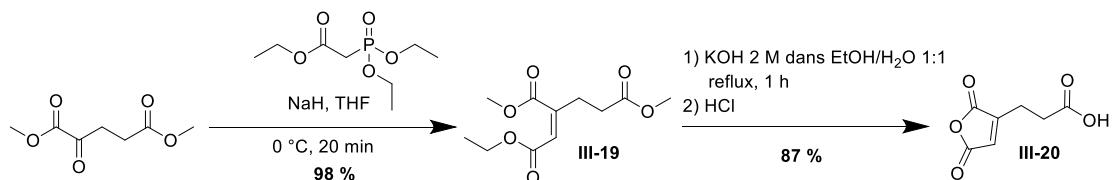


Schéma 24 : Synthèse de l'anhydride III-20

Plusieurs conditions de réaction ont été testées afin de tenter de former l'ester III-17. Cependant aucune n'a donné de résultat satisfaisant (Tableau 8). Des conditions d'estérification entre l'alcool stéarylque et l'acide ont été essayées : l'activation sous forme de chlorure d'acide ou avec les agents de couplage EDC et DCC n'ont pas fonctionné. Les conditions de Mitsunobu n'ont pas non plus permis de conduire au produit attendu, tout comme les conditions d'estérification de Yamaguchi. Nous avons alors voulu alkyler l'acide avec le 1-bromo-octadecane (obtenu en réalisant une réaction d'Appel sur l'octadecanol), mais cette méthode n'a pas permis d'accéder au composé souhaité.

Tableau 8 : Conditions réactionnelles testées



Partenaire de réaction	Conditions	Résultats
a) 	1) Chlorure d'oxalyle, DMF, DCM, 15 min à 0°C puis 2,5 h à t.a. 2) III-21, DCM, pyridine, 2 h, t.a. Ref ¹¹⁰	Pas de produit formé. Dégradation des produits de départ
	EDC, HCl, THF, reflux, 2,5 h	Alcool de départ intact
	DCC, DMAP, DCM, t.a., 1 h	Alcool de départ intact
	PPh ₃ , DIAD, DCM, t.a., 12 h	Détection de la masse de l'anhydride ouvert en masse introduite, cependant très faible quantité
	TEA, TCBC, DMAP, toluène, t.a., 2 h	Dégradation des produits de départ
b) 	DBU, DCM, 50 °C, 18 h	Très peu de conversion, masse de l'anhydride ouvert détectée, pas isolable
	K ₂ CO ₃ , DMF, t.a., 12 h	Produit de départ récupéré

Une nouvelle stratégie a alors été envisagée en modifiant légèrement la structure de la partie lipophile. Nous avons ainsi souhaité synthétiser le composé III-23 (Figure 51) sur lequel la chaîne grasse est déjà accolée à l'anhydride. Cette molécule diffère de l'anhydride précédent par l'absence de lien ester sur la chaîne grasse.

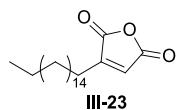


Figure 51 : Structure de l'anhydride III-23

La synthèse de cet anhydride débute avec la préparation de l'intermédiaire imide III-25 (Schéma 25). La première étape consiste à préparer un ester de Barton en activant l'acide stéarique sous la forme d'un chlorure d'acide et en couplant ce dernier avec le *N*-oxyde de 2-mercaptopypyridine. Le rendement de cette étape est quantitatif. Une décarboxylation de Barton en une étape est ensuite réalisée en présence de *N*-phénylmaléimide sous irradiation lumineuse avec une lampe à mercure pour conduire à III-25, selon un protocole décrit par Mangin (Schéma 25).¹¹² Sous l'effet de la lumière, un réarrangement radicalaire se produit conduisant à la décarboxylation de l'ester de Barton et à la libération du radical alkyle et du radical de la 2-mercaptopypyridine (Schéma 26). Ces radicaux sont ensuite piégés par l'alcène du *N*-phénylmaléimide et le composé III-25 est obtenu avec 70 % de rendement.

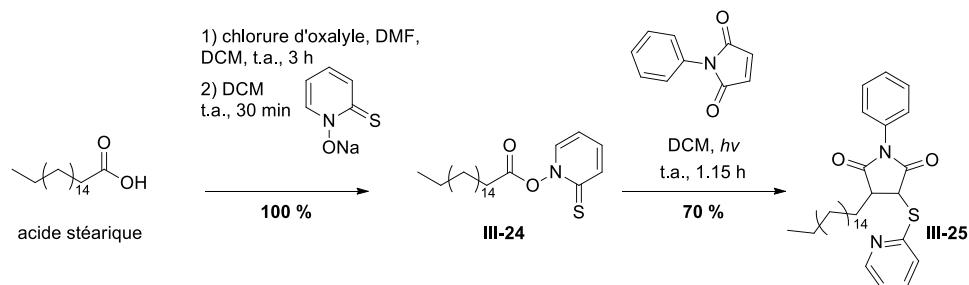


Schéma 25 : Préparation de l'imide III-25

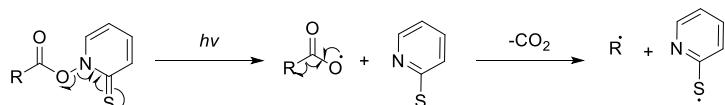


Schéma 26 : Décarboxylation de l'ester de Barton sous activation photochimique

Cet intermédiaire doit ensuite être traité en milieu alcalin pour induire une élimination de la thio-pypyridine et une hydrolyse du maléimide pour accéder à l'anhydride souhaité. L'imide III-25 a ainsi été traité dans un premier temps par LiOH puis chauffé à reflux dans de l'anhydride acétique. Cependant nous n'avons récupéré que du produit de départ et du produit d'élimination simple mais pas de composé qui corresponde à l'anhydride cible III-27 (Schéma 27).

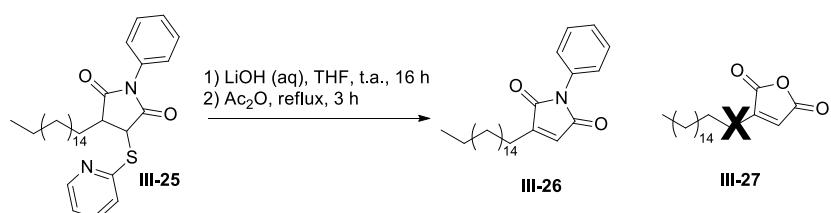


Schéma 27 : Conditions réactionnelles pour la préparation de l'anhydride III-27

Des conditions d'hydrolyse un peu plus fortes ont alors été utilisées sur **III-25** pour essayer d'obtenir l'anhydride. Le milieu réactionnel a été chauffé à reflux dans un mélange THF/MeOH en présence d'une solution aqueuse à 30 % massique de KOH puis chauffé à 80 °C dans un mélange AcOH/Ac₂O 1:1. Dans ces conditions réactionnelles nous observons la formation de l'anhydride souhaité mais en très faible proportion. De plus, ce composé n'a pas pu être isolé. Nous observons également la formation de l'amide **III-28** qui est un intermédiaire de la transformation de **III-25** en **III-29** (Schéma 28).

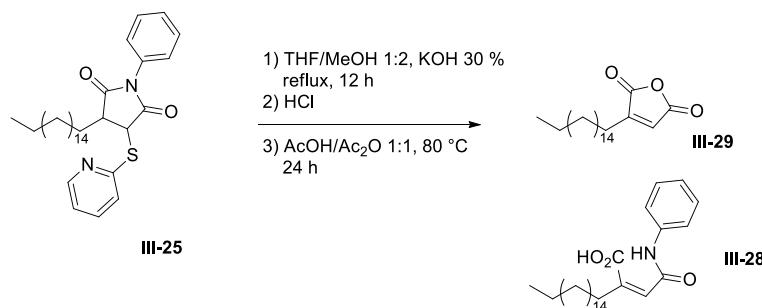


Schéma 28 : Conditions de réaction pour préparer l'anhydride **III-29**

Nous n'avons pas réussi à préparer l'anhydride lipophile nécessaire pour la construction de l'amphiphile sensible au pH. Cependant, certaines étapes peuvent être optimisées pour préparer ce composé et les conditions d'hydrolyse en présence de THF/MeOH et de KOH 30 % semblent jusqu'à présent être les plus prometteuses bien que l'anhydride ne se forme qu'en faible quantité.

Étant donné que nous rencontrons des difficultés à synthétiser l'anhydride à partir du maléimide **III-25** mais que nous obtenons l'amide intermédiaire **III-28** avec le lien *cis*-aconityl désiré (Schéma 28), nous pourrions envisager de transposer la réaction de décarboxylation de Barton sur un dérivé de maléimide directement accolé au fragment naphtalimide PEGylé **III-16** (Schéma 29). Cette approche, si elle fonctionne, offre l'avantage de pouvoir introduire la chaîne grasse et le motif acido-sensible de façon simultanée sur le composé amphiphile. Nous avons donc appliqué la réaction de décarboxylation de Barton à la partie hydrophile naphtalimide dont l'amine est fonctionnalisée sous la forme d'un maléimide **III-30**. Ce composé est ensuite traité par irradiation avec une lampe à mercure pendant 1 h et en présence de l'ester de Barton. Cependant, seuls 0,5 équivalents de **III-30** semblent avoir réagi. Selon la spectrométrie de masse le produit s'est formé, il n'a toutefois pas pu être isolé (Schéma 29).

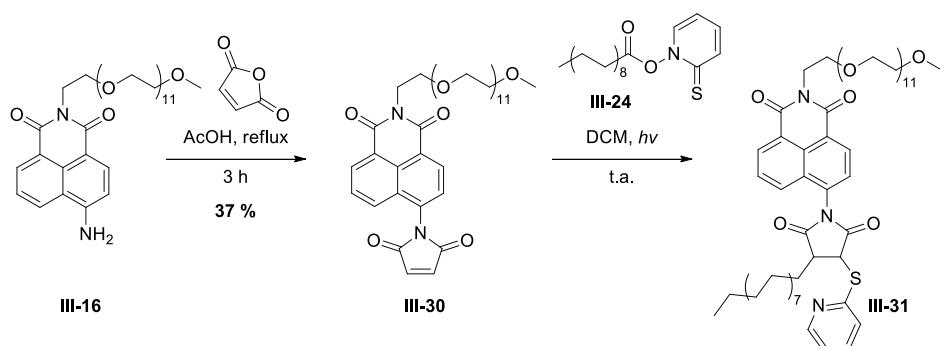


Schéma 29 : Réaction de décarboxylation de Barton sur le maléimide formé à partir de la partie hydrophile

L'amide **III-28** présente une structure similaire à l'amphiphile ciblé (Figure 52). Nous avons donc étudié la possibilité de former l'anhydride en milieu acide. Toutefois, nous ne sommes pas parvenus à former l'anhydride bien que **III-28** ait été chauffé à 80 °C dans un mélange AcOH/Ac₂O pendant 24 h ou encore chauffé à reflux dans une solution aqueuse de HCl 2 M. Seul l'amide **III-28** a été récupéré. Étant donné la similitude de la structure de l'amide **III-28** avec l'amphiphile ciblé (Figure 52) et les difficultés rencontrées pour obtenir la coupure de la liaison amide en conditions acides et ce, même après l'avoir porté à reflux dans HCl 2 M, nous sommes amenés à penser que l'amphiphile que nous ciblons pourrait ne pas être sensible au pH acide. Dans la littérature, le réarrangement des liaisons *cis*-aconityles ont majoritairement été décrits avec des amines aliphatiques.¹¹⁰ Or dans notre cas l'amine engagée est aromatique et peut ne pas être assez basique pour l'étape de protonation nécessaire à la fragmentation du lien chimique en milieu acide. Nous avons donc mis le projet en suspens.

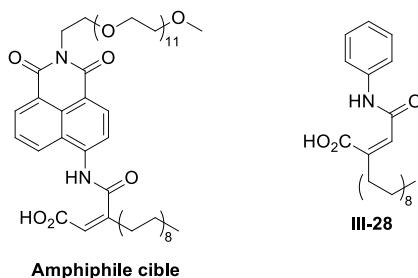


Figure 52 : Structures de l'amphiphile ciblé et l'amide **III-28**

III. Conclusion

En ce qui concerne le projet de micelles photoactivables, nous avons préparé des micelles capables d'encapsuler efficacement des nanoparticules à conversion ascendante composées de NaGdF₄: 18% Yb/0.5% Tm. Les différents essais de photoactivation dans le proche infrarouge (980 nm) ne nous ont pas permis d'induire la fragmentation souhaitée de la micelle par émission de photons à 365 nm. Ce résultat décevant a été mis sur le compte de la faible intensité du laser utilisé qui ne permet pas la production d'un flux continu de photons UV. Ce flux est en effet nécessaire pour activer le processus photoinduit. Par ailleurs, les premiers essais d'absorption à 2 photons semblent être prometteurs puisque nous observons la dégradation de la micelle sous rayonnement lumineux à 740 nm. Les conditions réactionnelles doivent toutefois encore être optimisées et des expériences de contrôle doivent être réalisées afin de s'assurer que l'effet observé n'est pas attribuable à une simple activation thermique.

Pour ce qui est des micelles sensibles au pH acide, la synthèse proposée n'a pas pu aboutir puisque nous avons été confrontés à de nombreux écueils dans la préparation de notre composé amphiphile. Nous avons néanmoins pu obtenir un composé modèle (**III-28**) qui est un mime du composé acido-sensible cible dans la mesure où il incorpore une amine aromatique (aniline) liée à un lien *cis*-aconityle. Ce composé a été utilisé pour étudier la faisabilité d'une coupure induite en milieu acide. Malheureusement, quelles que soient les conditions acides utilisées, nous n'observons pas de fragmentation du lien *cis*-aconityle. Ce résultat a été attribué à la basicité moindre des dérivés d'anilines qui empêche leur protonation et la coupure qui en découle.

Ces nano-vecteurs sont conçus pour s'accumuler au niveau des tumeurs par un ciblage « passif ». Afin d'améliorer le ciblage des cellules cancéreuses et l'internalisation cellulaire des nano-vecteurs et donc des principes actifs véhiculés par ces derniers, il faut procéder à un ciblage « actif » en fonctionnant la surface des nano-vecteurs avec des ligands de ciblage. Cet aspect est développé dans le chapitre suivant.

Chapitre 4 : Ciblage actif des cellules cancéreuses avec les micelles PDA-PEG₂₀₀₀

Nous avons montré dans les chapitres précédents que les micelles PDA-PEG₂₀₀₀ présentaient les meilleures propriétés pharmacocinétiques pour des études *in vivo* réalisées antérieurement par notre équipe. Ces micelles s'accumulent de manière passive au niveau des tissus tumoraux. Afin d'améliorer leurs propriétés de ciblage, nous avons envisagé de les fonctionnaliser avec des ligands qui peuvent interagir avec des récepteurs spécifiques surexprimés à la surface des cellules cancéreuses et ainsi améliorer leur internalisation. Nous avons choisi de fonctionnaliser les micelles avec deux familles de ligands différents : la biotine et un aptamère pour étudier le ciblage actif que pourrait conférer ces molécules.

I. Fonctionnalisation des micelles avec la biotine

1) Bibliographie

La biotine est un promoteur de croissance cellulaire qui est importé massivement par les cellules car, outre son rôle dans la synthèse *de novo* de lipides, la biotine intervient également dans l'activation de la synthèse des protéines nécessaires à la croissance et à la viabilité cellulaire. Les récepteurs à la biotine sont de ce fait souvent surexprimés à la surface des cellules cancéreuses qui ont une demande accrue en biotine du fait de leur croissance rapide.¹¹³ La présence des récepteurs assure une internalisation continue qui est nécessaire au développement des cellules.¹¹⁴ Des études récentes ont ainsi montré que les récepteurs à la biotine sont surexprimés (dans une proportion comparable et même supérieure à celle des récepteurs au folate) au niveau de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses.^{114, 115}

Parmi les équipes qui ont déjà travaillé sur l'utilisation de la biotine comme ligand destiné au ciblage des cellules cancéreuses, l'équipe de Patrick Couvreur a développé des nanoparticules biodégradables de poly(alkyl cyanoacrylate) PACA fonctionnalisées en surface.¹¹⁶ La fonctionnalisation des nanoparticules a été réalisée par une réaction de chimie click catalysée au cuivre entre une biotine possédant un bras alcyne et une chaîne PEG portant un azoture. Les polymères amphiphiles sont ensuite assemblés en solution aqueuse sous forme de nanoparticules (Figure 53). Ces dernières ont été préparées avec 10 % de biotine à leur surface et chargées avec de la rhodamine B qui est un fluorophore qui a été utilisé pour suivre l'internalisation cellulaire des nanoparticules. L'étude a montré que les nanoparticules fonctionnalisées avec de la biotine s'internalisent mieux dans les cellules MCF-7 (qui surexpriment les récepteurs à la biotine) que les nanoparticules nues. L'absence d'internalisation des nanoparticules après incubation à 4 °C avec les cellules suggère un mécanisme actif de type endocytose. Les auteurs ont réalisé une expérience contrôle en incubant les cellules avec les particules fonctionnalisées en présence d'une solution à 2 mM de biotine libre, destinée à saturer les récepteurs. Ils ont alors observé une diminution du taux d'internalisation des particules, démontrant ainsi que le processus était effectivement médié par les récepteurs à la biotine (Figure 54).¹¹⁶

Afin d'améliorer les propriétés des micelles PDA-PEG₂₀₀₀ déjà développées au laboratoire, nous avons fonctionnalisé leur surface avec de la biotine et étudié leur capacité à cibler activement une population cellulaire exprimant le récepteur à la biotine.

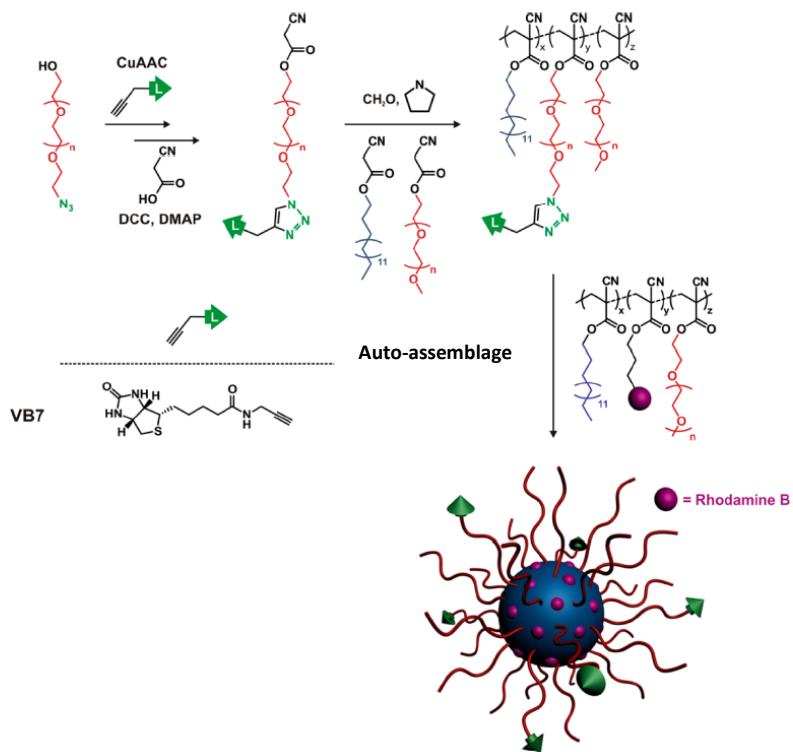


Figure 53 : Préparation de nanoparticules fluorescentes de poly(alkyl cyanoacrylate) PEGylées fonctionnalisées avec de la biotine (VB7)¹¹⁶

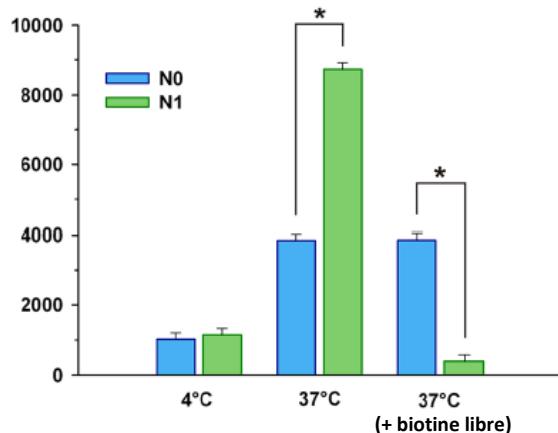


Figure 54 : Fluorescence de la rhodamine B dans les cellules après incubation pendant 5 h de 100 µg/mL de nanoparticules N0 (non fonctionnalisées avec de la biotine) et N1 (fonctionnalisées avec de la biotine) avec des cellules MCF-7 à 4 et 37 °C en présence et en absence de biotine libre¹¹⁶

2) Préparation des micelles PDA-PEG₂₀₀₀ fonctionnalisées avec de la biotine

Deux stratégies ont été envisagées pour fonctionnaliser les micelles avec de la biotine : i) une fonctionnalisation de l'amphiphile avant assemblage en micelles suivi d'une polymérisation et ii) une polymérisation des micelles suivie d'une fonctionnalisation post-assemblage. L'option de

fonctionnaliser les amphiphiles avec la biotine, de les assembler ensuite sous la forme de micelles et de les polymériser permet un meilleur contrôle du taux de fonctionnalisation en biotine. La polymérisation et fonctionnalisation post-assemblage nécessite quant à elle de pouvoir doser la biotine à la surface des micelles pour connaître le taux de recouvrement.

a) Stratégie de fonctionnalisation avant assemblage et polymérisation des micelles

Nous avons synthétisé l'amphiphile DA-PEG₂₀₀₀-biotine **IV-5** (Figure 55) afin d'incorporer le ligand dans la structure de l'amphiphile avant assemblage en micelles. Grâce à cette approche nous pouvons envisager d'avoir un contrôle fin de la stœchiométrie en biotine à la surface de nos micelles en mélangeant par exemple l'amphiphile biotine avec un amphiphile simple DA-PEG₂₀₀₀-OMe (sans biotine) dans différentes proportions. Selon le ratio initial en amphiphile biotine, nous aurons des micelles plus ou moins recouvertes de ligands.

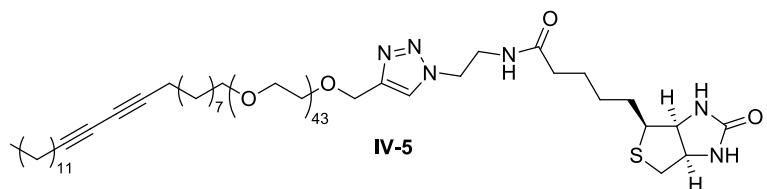


Figure 55 : Structure de l'amphiphile DA-PEG₂₀₀₀-biotine

L'amphiphile DA-PEG₂₀₀₀-biotine **IV-5** est obtenu grâce à une réaction clé de cycloaddition catalysée au cuivre entre une biotine portant un bras azoture et le DA-PEG₂₀₀₀-alcyne. Nous nous sommes attelés à la préparation des deux partenaires de la réaction de click. La biotine-azoture est préparée à partir de la biotine commerciale qui est activée sous forme d'ester de succinimide **IV-1**. Une réaction d'amidation avec la 2-azidoéthanamine **IV-2** (préparée à partir de la 2-bromoéthanamine) est ensuite réalisée et conduit à l'azoture **IV-3** avec un rendement de 45 % sur les deux étapes (Schéma 30).

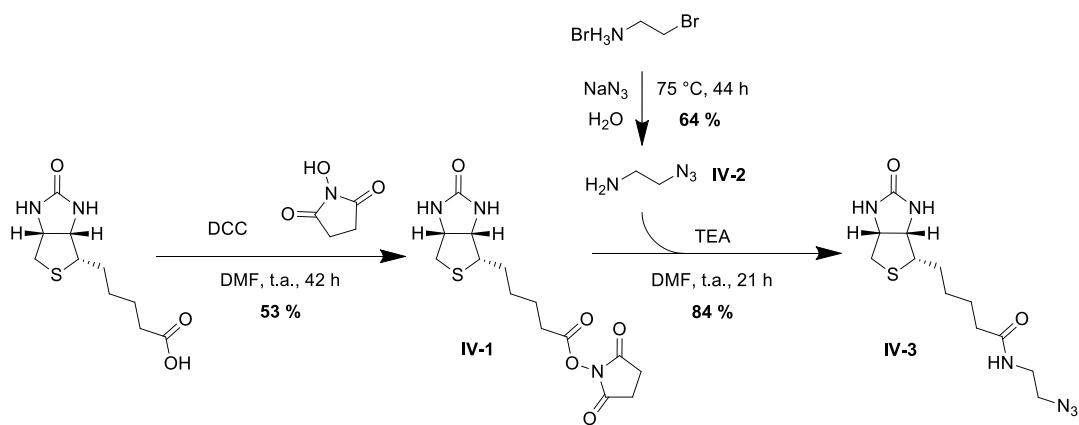


Schéma 30 : Préparation de la biotine-azoture

Ayant le partenaire azoture en mains, il nous faut préparer l'amphiphile PEGylé avec une terminaison alcyne avant de pouvoir procéder à la réaction de couplage. Pour ce faire nous avons utilisé un amphiphile PEGylé présentant une fonction hydroxyle fonctionnalisable. Nous avons donc utilisé l'amphiphile DA-PEG₂₀₀₀-OH qui était disponible au laboratoire. L'amphiphile DA-PEG₂₀₀₀-OH est alkylé

avec du bromure de propargyle dans le THF à température ambiante en présence d'hydrure de sodium pour former l'amphiphile DA-PEG₂₀₀₀-alcyne. Ce dernier est ensuite engagé dans une réaction de chimie click catalysée au cuivre pour conduire à l'amphiphile DA-PEG₂₀₀₀-biotine (Schéma 31). Le **ligand 1** qui a été utilisé pour cette étape est un dérivé du TBTA qui est un ligand soluble dans l'eau. Ce ligand est un bon stabilisant du cuivre dans son état d'oxydation +1,¹¹⁷ il permet de rendre la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire plus efficace. La préparation du **ligand 1** a été décrite par Wang et ses collaborateurs.¹¹⁸ La triéthanolamine est utilisée comme base. La conversion de la réaction click est totale mais nous obtenons un rendement isolé qui est faible (25 %). Ce mauvais rendement a pour origine les difficultés rencontrées lors de la purification de l'amphiphile qui est extrêmement polaire.

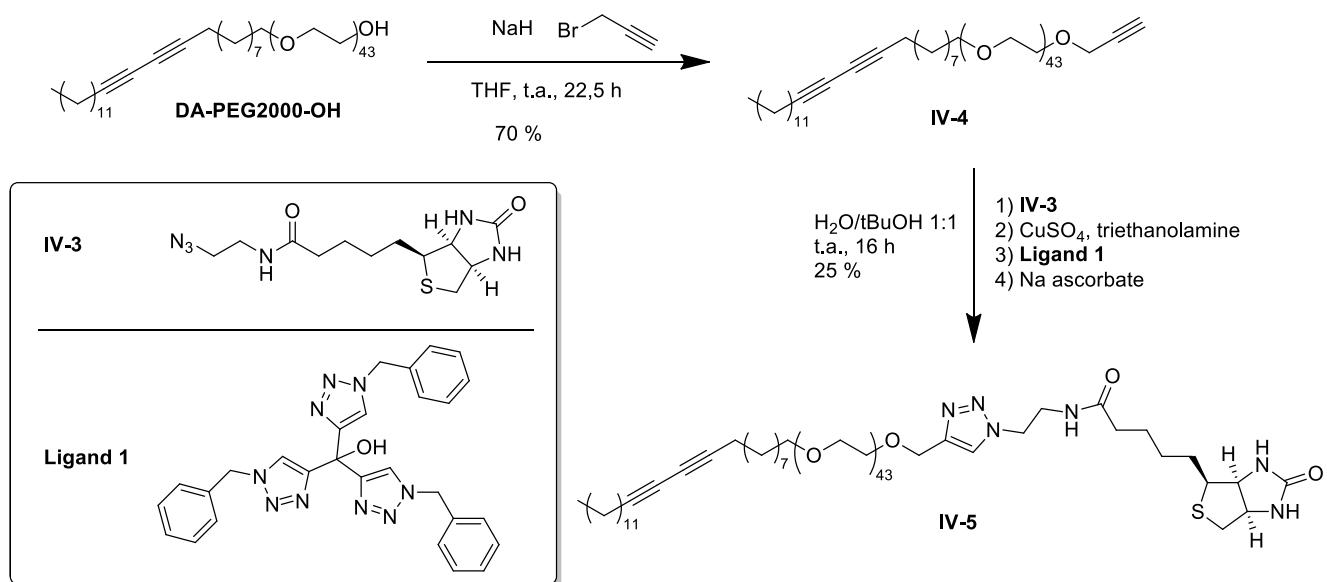


Schéma 31 : Préparation de l'amphiphile DA-PEG₂₀₀₀-biotine

L'amphiphile biotinylé **IV-5** a ensuite été assemblé en micelles qui présentent 100 % de biotine à leur surface. Pour ce faire, une solution de l'amphiphile DA-PEG₂₀₀₀-biotine à 10 mg/mL dans l'eau déminéralisée a été préparée et irradiée sous UV à 254 nm pendant 6 h. Nous avons vérifié par DLS que les micelles se formaient bien et nous avons observé une population dont le diamètre est centré sur 15 nm. Afin de nous assurer que la biotine est restée intègre au cours du processus de photopolymérisation, une RMN du proton de la micelle dans le DMSO-d₆ a été enregistrée après irradiation à 254 nm. Nous observons sur le spectre ¹H une modification des signaux des protons portés par la biotine. En effet, les signaux correspondants aux protons adjacents à l'atome de soufre disparaissent tout comme ceux des protons adjacents à l'urée. Ces observations nous laissent penser que la biotine ne supporte pas la photopolymérisation. Ce résultat est surprenant dans la mesure où avant de nous lancer dans cette stratégie, nous avions étudié la stabilité de la biotine sous irradiation à 254 nm. Cependant, comme la biotine n'est pas soluble dans l'eau nous avons dû étudier sa dégradation dans un solvant organique (DMSO). Nous avions ainsi réalisé une irradiation à 254 nm de la biotine dans le DMSO deutéré pendant 6 heures et n'avons pas observé d'altération.

Pour nous rapprocher au mieux des conditions de polymérisation des micelles (solution aqueuse) nous avons synthétisé un analogue PEGylé de la biotine, qui est hydrosoluble (Schéma 32). Le composé a été préparé selon la même voie de synthèse que l'amphiphile précédent en utilisant le di(éthylène glycol) éthyl éther à la place du DA-PEG₂₀₀₀. La biotine PEGylée a été mise en solution dans l'eau et irradiée sous UV à 254 nm. L'avancement de la réaction a été suivi par RMN et LCMS. Nous constatons ici également qu'après 6 h d'irradiation les signaux caractéristiques de la biotine disparaissent avec la formation de nouveaux produits qui ont été détectés en spectrométrie de masse (de masse molaire 454 g/mol, 442 et 386 g/mol) mais que nous ne sommes pas parvenus à identifier. Cette expérience contrôle nous indique que la biotine se dégrade effectivement dans l'eau sous irradiation UV à 254 nm.

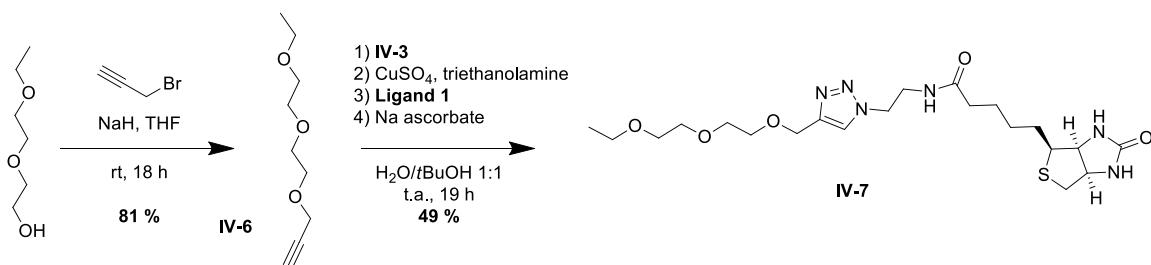


Schéma 32 : Préparation du composé modèle

La stratégie de fonctionnalisation des amphiphiles avec de la biotine avant l'assemblage des micelles n'est pas optimale car la biotine se détériore au cours de l'étape de polymérisation. Il nous a donc fallu nous tourner vers l'option 2 qui consiste à fonctionnaliser les micelles après leur assemblage et leur polymérisation.

b) Stratégie de fonctionnalisation après assemblage et polymérisation des micelles

Nous avons souhaité préparer des lots de micelles fonctionnalisées par différents taux de biotine en surface. Nous avons ainsi assemblé des micelles mixtes en associant des amphiphiles DA-PEG₂₀₀₀-OMe simples et DA-PEG₂₀₀₀-alcyne fonctionnels dans les proportions molaires correspondant aux taux de biotine souhaités, à savoir 0, 10, 25 et 50 %. Ces micelles ont ensuite été stabilisées par polymérisation en les irradiant sous UV à 254 nm pendant 6 h (Schéma 33). Nous avons vérifié par RMN du proton que la fonction alcyne libre restait intacte (et donc ultérieurement disponible) lors de la polymérisation (doublet en α de l'alcyne à 4.22 ppm dans le DMF-d₇).

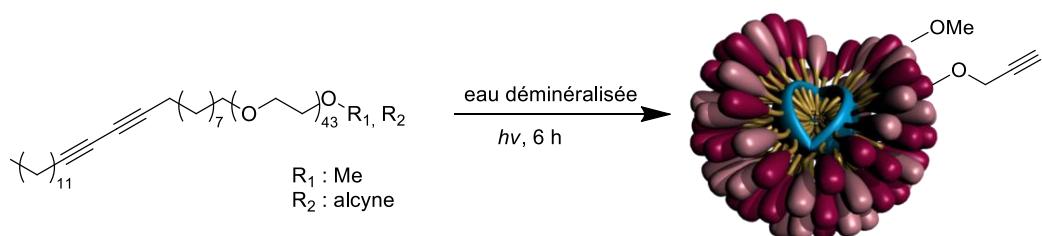


Schéma 33 : Préparation des micelles PDA-PEG₂₀₀₀-OMe/alcyne

Les fonctions alcynes libres à la surface des micelles sont ensuite fonctionnalisées par chimie click catalysée au cuivre (0.1 équiv.) en présence d'un léger excès (1.3 équiv.) de biotine-azoture (par rapport aux fonctions alcynes) (Schéma 34). Le ligand (BimC4A)₃ a été utilisé ici pour stabiliser le cuivre

dans son état d'oxydation +1. À la fin de la réaction, le milieu réactionnel est traité avec une solution d'EDTA afin d'éliminer au maximum le catalyseur métallique, puis filtré sur une colonne d'exclusion stérique afin d'éliminer les réactifs en excès. Il est à noter que les sels de cuivre résiduels peuvent poser des problèmes de toxicité lors des tests *in vitro*. Nous avons ainsi vérifié par ICP-MS que nous parvenions à réduire significativement la quantité de cuivre par le traitement à l'EDTA à l'issue de la réaction. Nous avons mis en évidence par RMN du proton de la micelle fonctionnalisée, la présence des signaux caractéristiques de la biotine (protiens de l'urée et adjacents à l'urée) et du proton porté par le triazole. Le taux de fonctionnalisation des micelles est ensuite validé par la même technique RMN en observant, pour chacun des lots traités, la disparition totale des protons en α de l'alcyne. Si l'on considère qu'une micelle PEGylée est classiquement constituée d'environ 100 unités amphiphiles, tel que mesuré précédemment au laboratoire sur des systèmes apparentés par des techniques de diffusion statique de la lumière, nous avons préparé 4 lots de micelles contenant respectivement 0, 10, 25 et 50 unités biotine à leur surface.

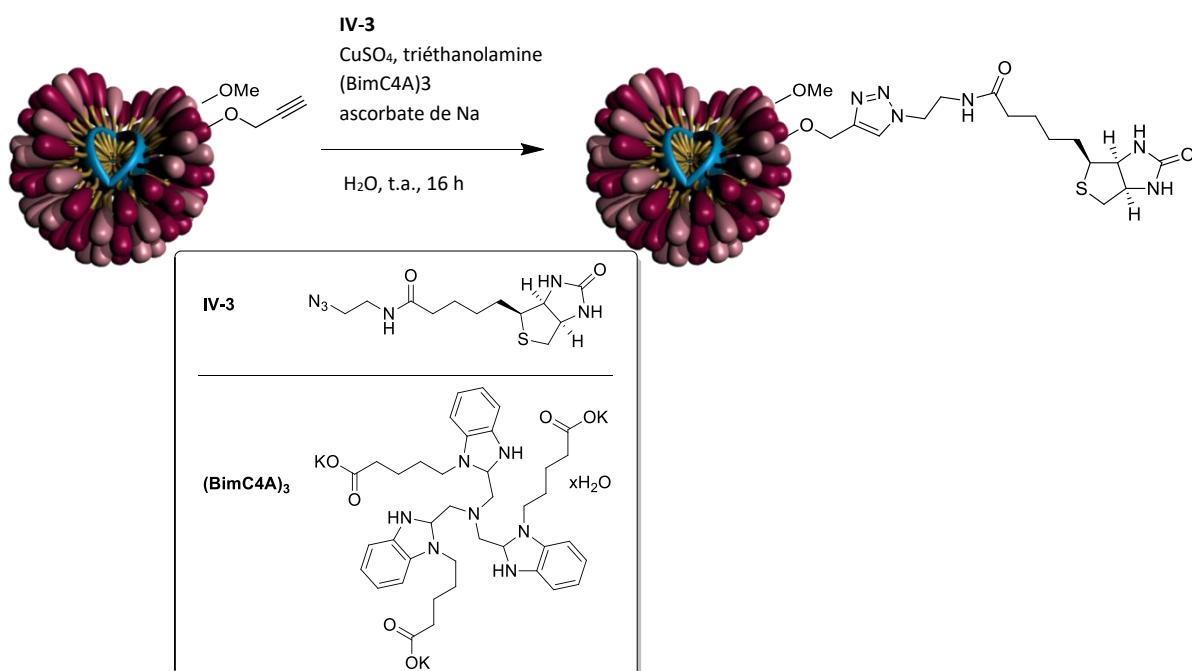


Schéma 34 : Fonctionnalisation des alcynes à la surface des micelles avec de la biotine

De cette manière, nous avons pu préparer des micelles PDA-PEG₂₀₀₀-OMe/biotine avec des taux de greffage en ligand de 0, 10, 25 et 50 %. Ces micelles ont un diamètre d'environ 7 nm selon la DLS. Nous constatons que les micelles obtenues après fonctionnalisation avec de la biotine sont plus compactes qu'avant leur fonctionnalisation. Cette observation pourrait avoir pour origine l'hydrophobicité intrinsèque de la biotine qui provoque un repliement partiel de la tête polaire vers le cœur de la micelle.

3) Internalisation cellulaire des micelles PDA-PEG₂₀₀₀-biotine

L'étude *in vitro* de l'internalisation des micelles fonctionnalisées avec de la biotine a été faite sur une lignée de cellules cancéreuses MCF-7 qui surexprime le récepteur à la biotine. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Dr. Frédéric Ducongé (CEA/MIRCen). Afin d'étudier leur

internalisation cellulaire par cytométrie de flux, les micelles ont été chargées avec du DiO à 1 % en masse. La présence du fluorophore au cœur des micelles permettra de suivre leur devenir en interaction avec les cellules. Dans une première expérience, l'internalisation des micelles en fonction du temps et du taux de recouvrement en biotine a été évaluée (Figure 56). Les micelles qui ont un taux de biotine de 25 % en surface sont celles qui semblent s'internaliser le mieux dans les cellules, suivies de celles portant 10 % de biotine en surface. Les micelles présentant 50 % de biotine en surface ont un comportement comparable à celui des micelles nues (sans biotine) sans accélération de l'internalisation. Il semble donc y avoir un taux de biotine optimal pour favoriser l'internalisation des micelles. Ce taux optimal semble être voisin de 25 %, dans notre cas.

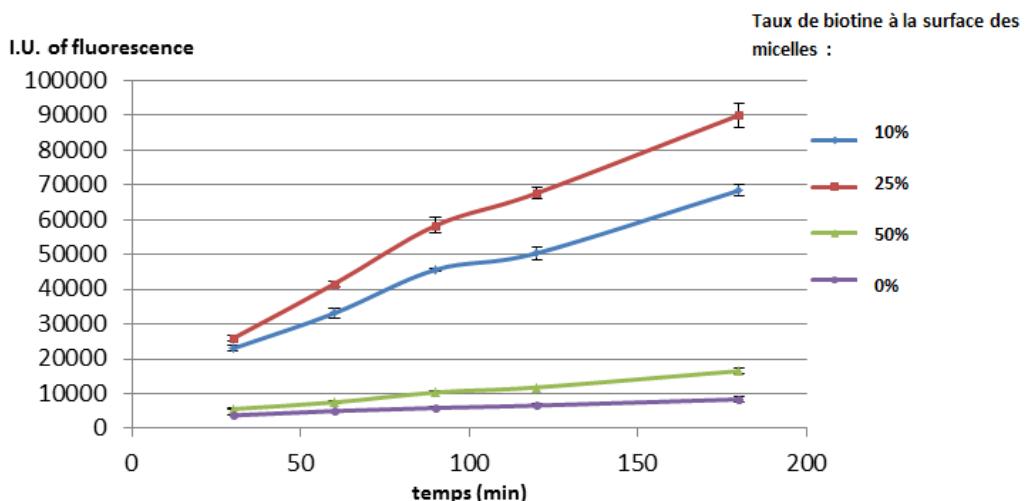


Figure 56 : Internalisation des micelles fonctionnalisées avec de la biotine, chargées avec du DiO, en fonction du temps d'incubation avec des cellules MCF-7

Afin de vérifier que l'internalisation des micelles fonctionnalisées avec de la biotine passe effectivement par l'intermédiaire des récepteurs à la biotine, une expérience de saturation des récepteurs a été réalisée. Les micelles sont ainsi co-incubées avec de la biotine libre à 2 mM (Figure 57) (dans un mélange DMSO/PBS). L'excès de biotine libre dans le milieu devrait venir saturer les récepteurs correspondants et inhiber le transport des micelles si celui-ci s'effectue par le biais de ces récepteurs. Les résultats obtenus au cours de cette expérience montrent que, quel que soit le taux de recouvrement en biotine de nos micelles, il y a un ralentissement de la cinétique d'internalisation. Nous observons en effet environ deux fois moins de micelles biotinylées internalisées en présence de la biotine libre dans le milieu. Par contre, l'influence de la biotine sur l'internalisation des micelles nues (0 %) semble être négligeable. Dans cette série d'expériences nous observons également une « supériorité » de la micelle à 25 % en biotine qui est mieux internalisée que ses congénères à 10 et 50 %. La présence de biotine libre dans le milieu sature donc effectivement les récepteurs et diminue leur disponibilité vis-à-vis des ligands à la surface des micelles. L'internalisation se fait donc bien par les récepteurs à la biotine.

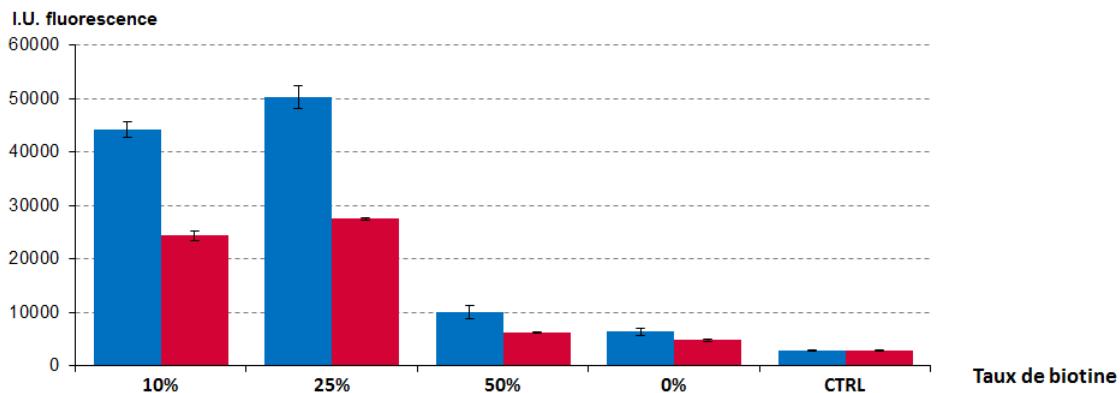


Figure 57 : Internalisation des micelles dans les cellules MCF-7 après 90 minutes d'incubation avec biotine libre (en rouge) et sans biotine libre (en bleu)

Contrairement à ce à quoi on pourrait s'attendre, ce n'est pas en mettant plus de ligand en surface des micelles que l'on améliore forcément leur taux d'internalisation et une charge optimale en biotine semble exister (25 %). Cette observation avait déjà été faite dans la littérature pour des micelles de polymère (PLA-*b*-PEG) fonctionnalisées avec de la biotine ou de l'acide folique. Les auteurs ont observé qu'il y avait un taux optimal de ligands compris entre 10 et 20 mol %.¹¹⁹ Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées pour tenter de rationaliser ce taux optimal en ligands : i) au-delà d'un certain pourcentage surfacique de ligands, il se crée des interactions moléculaires entre les biotines qui empêchent leur reconnaissance par les récepteurs cellulaires, ii) une autre explication pourrait être que la présence de trop de biotine à la surface des micelles induise une interaction multiple d'une micelle unique avec plusieurs récepteurs de la même cellule. Cette interaction multiple réduit le nombre de micelles liées et leur internalisation.¹¹⁹

Nous avons pu montrer que la fonctionnalisation des micelles PDA-PEG₂₀₀₀ avec de la biotine permettait d'améliorer leur internalisation cellulaire. Nous avons également pu voir qu'il fallait travailler avec un taux de fonctionnalisation « optimal » de 25 %. La micelle fonctionnelle étant internalisée préférentiellement, nous avons cherché à la valoriser pour délivrer une cargaison médicamenteuse et induire un effet thérapeutique sélectif.

4) Effet thérapeutique

Le paclitaxel est l'un des anticancéreux le plus utilisé car son activité anti-cancéreuse est importante (IC₅₀ comprise entre 2.5 et 7.5 nM).¹²⁰ Il agit comme poison du fuseau mitotique en inhibant la dépolymérisation des microtubules, bloquant ainsi le mécanisme de la mitose. Nous avons donc essayé de l'encapsuler dans nos micelles biotinylées mais n'avons réussi qu'à encapsuler au mieux 1 % en masse de PTX. De plus, nous observons au cours de cette étape la formation d'agrégats de 100 nm de diamètre. Nous avons donc essayé d'encapsuler dans nos micelles d'autres molécules actives. Pour que ces dernières s'encapsulent de manière significative, il faut prendre en considération leur coefficient de partage octanol/eau (log(P)) qui doit être élevé. Nous avons donc réalisé la synthèse de dérivés de médicaments anticancéreux connus, l'épipodophyllotoxine et le chlorambucil, pour les rendre plus lipophiles et ainsi permettre leur encapsulation dans les micelles.

Le composé 4'-DMEP est un inhibiteur de topoisomérase II,¹²¹ il a une IC₅₀ de 0.31 µM sur la lignée cellulaire HL60. Il s'agit d'un intermédiaire clé dans la préparation de podophyllotoxines.¹²² Nous avons donc préparé un dérivé à chaîne grasse **IV-8** de l'épipodophyllotoxine 4'-DMEP pour pouvoir l'encapsuler dans les micelles. Ce dérivé est obtenu à partir de la 4'-DMEP grâce à une réaction de Mitsunobu avec l'alcool stéarylque en présence de triphénylphosphine et de DIAD (Schéma 35).

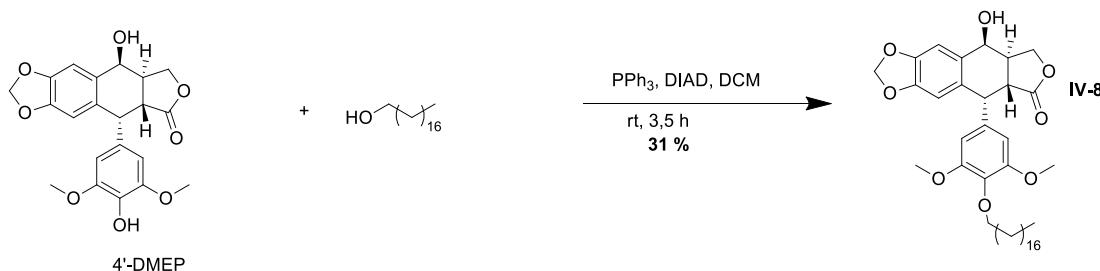


Schéma 35 : Préparation du dérivé à chaîne grasse de l'épipodophyllotoxine

Le deuxième principe actif lipophile dont nous avons réalisé la synthèse est le chlorambucil. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, le chlorambucil est un agent alkylant, de la famille des moutardes à l'azote, utilisé dans le traitement de la leucémie lymphoïde chronique et des cancers avancés des ovaires et du sein.⁷⁴ Le dérivé à chaîne grasse du chlorambucil est obtenu par estérification du chlorambucil avec l'alcool stéarylque en présence de DCC et de DMAP (Schéma 36).

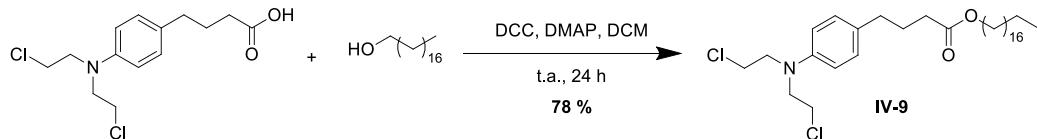


Schéma 36 : Préparation du dérivé à chaîne grasse du chlorambucil

Avant d'encapsuler ces composés dans nos micelles biotinylées, nous avons évalué leur cytotoxicité par un test MTT sur les cellules MCF-7. Il s'agit d'un test colorimétrique permettant de quantifier les cellules vivantes après qu'elles ont été incubées avec des composés dont on souhaite mesurer l'activité cytotoxique par exemple. Ce test utilise le sel MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) soluble dans l'eau qui est réduit par les cellules vivantes en formazan, qui est insoluble dans l'eau. La quantité de précipité formée est donc proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. Une lecture de l'absorbance à 560 nm dans le DMSO permet de déterminer la quantité de cellules vivantes. Après une nuit d'incubation des composés avec les cellules, le test colorimétrique est réalisé.

Nous avons dans un premier temps testé les composés 4'-DMEP et chlorambucil non modifiés afin de vérifier que le test MTT était valide et que l'on observe bien de la cytotoxicité sur la lignée MCF-7. Les résultats du test montrent que le 4'-DMEP et le chlorambucil sont effectivement cytotoxiques avec une IC₅₀ mesurée de 20 µM et 80 µM, respectivement. Par contre, les analogues lipophiles perdent presque entièrement leur potentiel cytotoxique puisque le dérivé du 4'-DMEP n'impacte aucunement la croissance cellulaire, même aux concentrations les plus élevées étudiées (60 µM). Il en est de même

pour le dérivé de chorambucil qui perd totalement sa toxicité lorsqu'il est modifié par une chaîne grasse.

Les dérivés gras de chlorambucil et de 4'-DMEP n'étant pas actifs sur la lignée cellulaire MCF-7, nous avons cherché une molécule active qui serait intrinsèquement lipophile. Nous avons ainsi identifié le tamoxifène qui est un principe actif dont le log(P) = 7. Ce composé possède une activité cytotoxique sur la lignée cellulaire MCF-7 avec une IC₅₀ de 24.8 µM.¹²³

Nous avons ainsi encapsulé le tamoxifène dans des micelles fonctionnalisées avec 25 % de biotine en surface et dans les micelles sans biotine en surface. L'encapsulation a été réalisée en solubilisant le tamoxifène dans du chloroforme, et en ajoutant un volume défini à la solution de micelles. Le mélange est ensuite passé au bras à ultrasons trois fois 10 minutes et filtré sur filtre 0.22 µm. Le tamoxifène encapsulé est dosé par LCMS après dissociation de la micelle en phase organique et la taille des micelles est mesurée par DLS. Un taux de chargement de 5 % massique en principe actif a pu être obtenu et les micelles ont un diamètre de 13 nm.

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés dans le laboratoire du Dr. Guillaume Pinna (CEA/SBIGEM). Les cellules MCF-7 ont été incubées pendant 72 h avec soit i) du tamoxifène libre, ii) des micelles vides (biotinylées ou non), iii) des micelles chargées en tamoxifène (biotinylées ou non). Le nombre de cellules vivantes a été évalué à l'aide d'un marqueur fluorescent des noyaux : le colorant de Hoechst. Les résultats pour la survie cellulaire sont représentés en Figure 58.

Selon ce test MTT, le tamoxifène présente une IC₅₀ de 13 µM et son activité est conservée dans les micelles PDA-PEG₂₀₀₀-OMe. L'activité cytotoxique du tamoxifène chargé à 5 % en masse dans les micelles est la même qu'il y ait ou non de la biotine en surface des vecteurs. Nous n'observons donc pas de gain apporté par la présence de la biotine. Les concentrations en micelles auxquelles nous devons travailler ici sont comprises entre 0.007 et 0.74 mg/mL. Ce sont des concentrations relativement élevées qui conduisent à une cytotoxicité propre à la micelle. Nous observons cependant que les micelles biotinylées sont moins toxiques que les micelles non biotinylées, ce qui est surprenant. Si l'on parvenait à encapsuler une molécule plus active que le tamoxifène au cœur des micelles nous n'observerions pas ce phénomène de toxicité parasite lié aux micelles car nous travaillerions à des concentrations micellaires plus faibles.

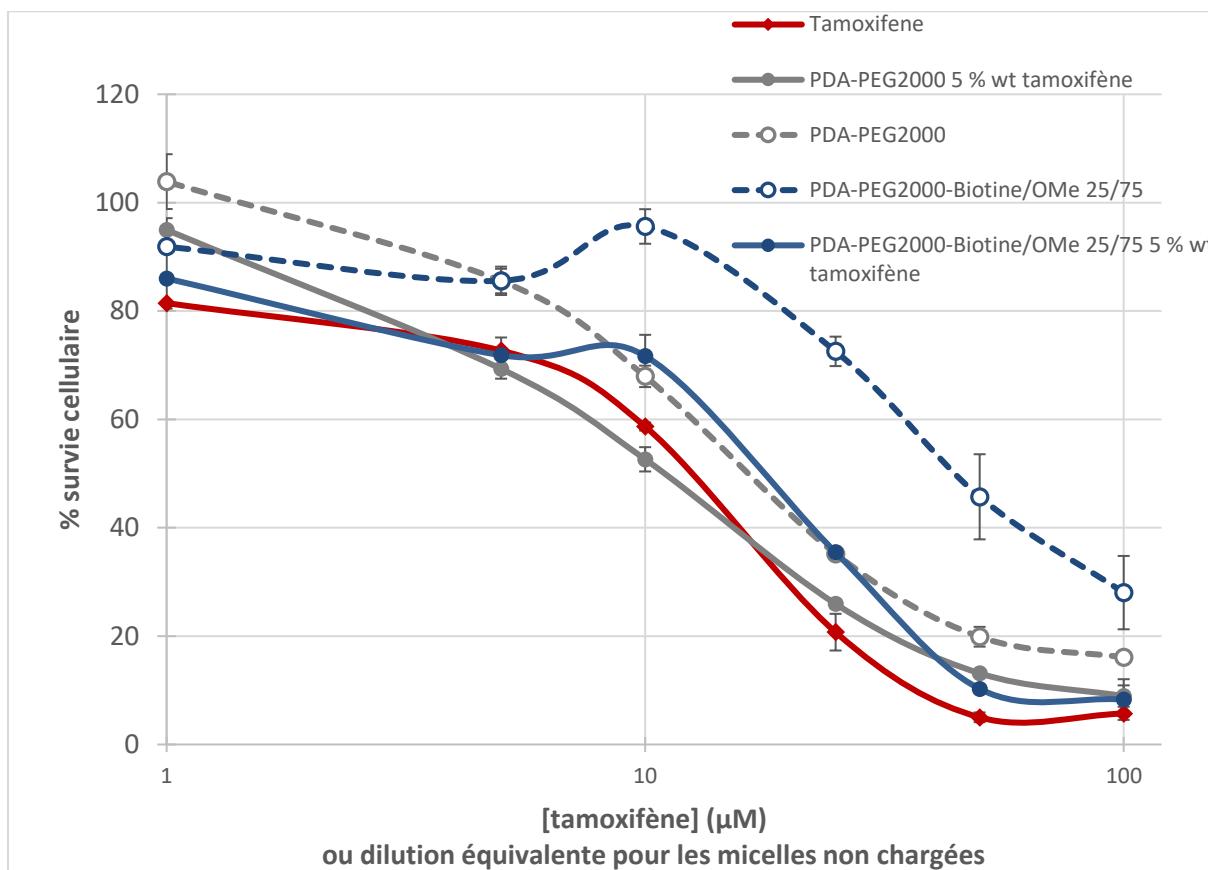


Figure 58 : Survie cellulaire des cellules MCF-7 après 72 h d'incubation avec du tamoxifène, des micelles PDA-PEG₂₀₀₀ chargées avec 5 % en masse de tamoxifène, des micelles PDA-PEG₂₀₀₀ vides, des micelles PDA-PEG₂₀₀₀-Biotine/OMe 25/75, des micelles PDA-PEG₂₀₀₀-Biotine/OMe 25/75 chargées avec 5 % en masse de tamoxifène

Nous ne sommes pas parvenus à encapsuler un anticancéreux puissant tel que le paclitaxel dans nos micelles. L'encapsulation du tamoxifène, qui est moins actif, ne permet pas de tirer bénéfice de la présence de biotine à la surface des micelles pour l'internalisation préférentielle dans les cellules étant donné qu'une forte concentration de micelles est nécessaire pour arriver à une concentration de tamoxifène active. Une cytotoxicité des micelles est alors observée. Nous ne pouvons donc pas évaluer l'amélioration de l'effet thérapeutique des micelles en présence de biotine à leur surface. Toutefois, nous avons pu montrer que la présence de biotine en surface des micelles favorisait leur accumulation dans les cellules cancéreuses. Ces micelles peuvent donc être utilisées comme outil de diagnostic spécifique des cellules cancéreuses lorsqu'on y incorpore un élément rapporteur.

Outre la biotine, nous avons également étudié une autre famille de composés pour le ciblage actif et avons évalué les propriétés de ciblage conférées par un aptamère.

II. Fonctionnalisation des micelles avec un aptamère

1) Bibliographie

Un aptamère est un oligonucléotide monocaténaire qui est capable de se lier à une cible moléculaire telle qu'une protéine.¹²⁴ Les aptamères sont composés d'une courte séquence d'ARN ou d'un simple brin d'ADN et peuvent, lorsqu'ils sont dans leur conformation tridimensionnelle unique, se lier à leur cible avec une grande spécificité et une grande affinité.¹²⁵ Les aptamères ont été découverts en 1990 par Tuerk et Gold¹²⁶ et Ellington et Szostak¹²⁷. Ils sont identifiés et sélectionnés par SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment). Lors d'un SELEX, une librairie aléatoire d'oligonucléotides est synthétisée et leur affinité sur une cible est étudiée. Le but est de sélectionner les oligonucléotides se liant avec la plus haute affinité sur une cible. Des techniques de séparation, comme la chromatographie d'affinité en gel natif, permettent d'isoler les oligonucléotides d'intérêt qui sont ensuite amplifiés par PCR. Ces oligonucléotides correspondent aux aptamères.^{126, 128}

Ces composés sont considérés comme des anticorps chimiques, ils présentent des fonctions similaires aux anticorps.¹²⁵ Des aptamères ont déjà été greffés à la surface de nanovecteurs afin de conférer à ces derniers des propriétés de ciblage actif. Ainsi, Xing et ses collègues ont préparé des liposomes fonctionnalisés avec l'aptamère AS1411 dans le but de traiter spécifiquement le cancer du sein avec de la doxorubicine. Les études *in vitro* ont montré de bonnes propriétés de ciblage et un fort taux d'internalisation. De plus, des études réalisées sur des souris portant des xénogreffes de cancer du sein ont montré que les liposomes fonctionnalisés avec l'aptamère pénétraient mieux dans les tissus tumoraux.¹²⁹ L'équipe d'Elias Fattal a également fonctionnalisé des liposomes avec des aptamères interagissant avec les récepteurs CD44.¹³⁰ Ces récepteurs sont surexprimés dans de nombreuses tumeurs et font partie des marqueurs de la surface des cellules souches cancéreuses. Les auteurs ont montré que les liposomes fonctionnalisés avec l'aptamère se liaient spécifiquement aux cellules cancéreuses qui surexpriment les récepteurs CD44 (Figure 59).

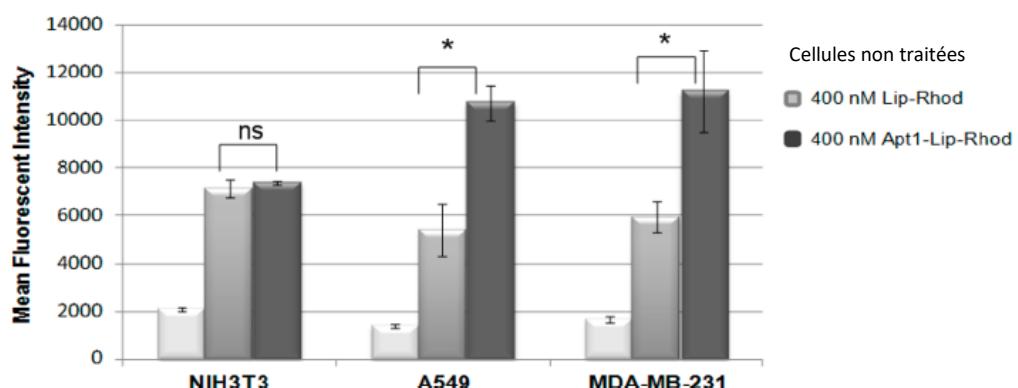


Figure 59 : Internalisation cellulaire de liposomes avec et sans aptamère dans les cellules NIH3T3 qui ne sur-expriment pas le récepteur CD44 et les cellules A549 et MDA-MB-231 qui surexpriment le récepteur CD44¹³⁰

Nous avons souhaité fonctionnaliser nos micelles avec l'aptamère ACE4G qui cible l'Annexine A2 qui est surexprimée à la surface de certaines lignées de cellules cancéreuses, comme la lignée MCF-7. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr. Frédéric Ducongé (CEA/MIRCen).

2) Fonctionnalisation des micelles PDA-PEG₂₀₀₀ avec l'aptamère ACE4G

La fonctionnalisation de nos micelles PDA-PEG₂₀₀₀ avec l'aptamère ACE4G a été réalisée en deux étapes. Le précurseur de cet aptamère a été synthétisé sous forme d'ADN par Eurogentec puis amplifié par PCR afin d'ajouter une séquence permettant une hybridation ultérieure à un oligonucléotide (spacer G). Une transcription *in vitro* a ensuite été réalisée permettant l'obtention de l'aptamère proprement dit sous la forme d'un ARN modifié qui a été purifié par PAGE.

Tout d'abord les micelles sont fonctionnalisées avec un oligonucléotide, le spacer G qui possède 31 bases et qui est terminé par un groupement azido. C'est sur cet oligonucléotide que l'aptamère ACE4G sera ensuite hybridé (Schéma 37). Cette hybridation est rendue possible car l'aptamère a été élongé par PCR avec une séquence complémentaire de celle du spacer G (qui sera porté par la micelle). Les micelles sont fonctionnalisées avec le spacer G selon la même stratégie que celle employée pour leur fonctionnalisation avec la biotine. Une réaction de chimie click catalysée au cuivre entre l'oligonucléotide présentant une fonction azoture et les micelles polymérisées présentant des fonctions alcynes libres en surface est réalisée. Les micelles obtenues ont un diamètre d'environ 12 nm. L'hybridation de la micelle-spacer G avec l'aptamère a été ensuite réalisée par nos collaborateurs biologistes dans une solution tampon Tris-EDTA à 60 °C.

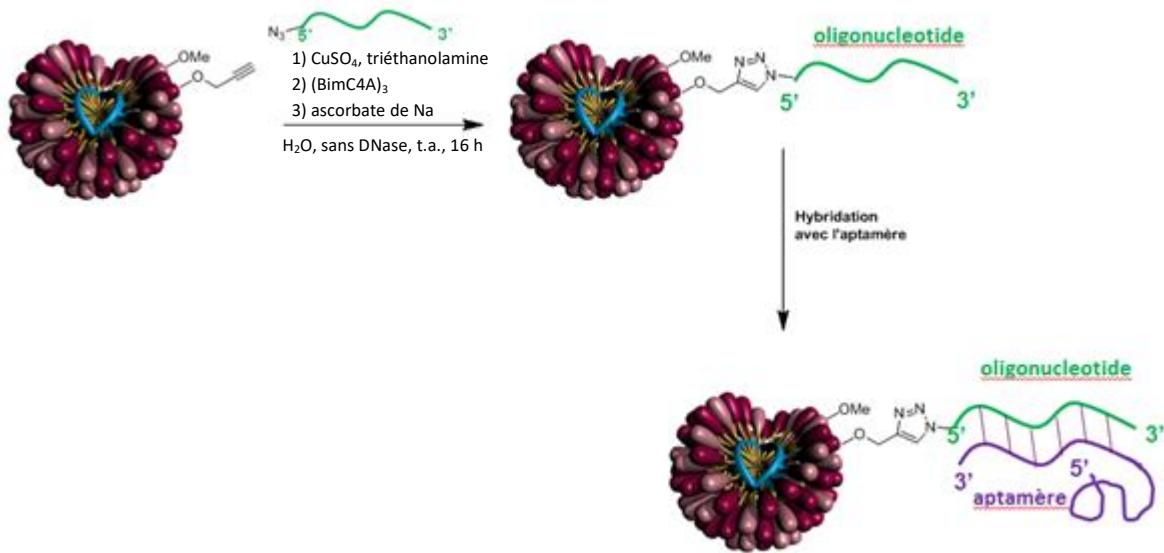


Schéma 37 : Préparation des micelles fonctionnalisées avec l'aptamère ACE4G

Afin de mettre en évidence la fonctionnalisation effective des micelles avec l'oligonucléotide et son hybridation avec l'aptamère, les micelles ont été déposées sur un gel d'agarose et une migration électrophorétique a été réalisée (Figure 60). Le gel d'électrophorèse à 2 % d'agarose avec du gelRed 1 X, est placé dans un champ électrique de 100 V pendant environ 30 min. Le gelRed est un colorant d'acides nucléiques qui permet de révéler sous UV les composés présents sur le gel d'électrophorèse. La première colonne du gel correspond aux marqueurs de taille moléculaire (de 50 pdb à 300 pdb). La 2^{ème} colonne aux micelles contrôle PDA-PEG₂₀₀₀-alcyne/PDA-PEG₂₀₀₀-OMe 50:50. On observe ici une

légère migration de ces dernières vers la cathode bien qu'elles ne soient normalement pas chargées. La 3^{ème} colonne correspond au spacer G seul et la 4^{ème} colonne correspond à l'aptamère ACE4G. Nous observons pour les deux oligonucléotides (spacer G et aptamère) une migration vers l'anode car leur charge globale est négative. Le spacer G qui a un poids moléculaire plus faible que l'aptamère migre plus loin dans le gel d'agarose.

Les micelles qui ont été fonctionnalisées avec l'oligonucléotide présentent, après migration sur gel d'électrophorèse (5^{ème} colonne), une bande correspondant au spacer G non lié et une nouvelle bande qui correspond aux micelles fonctionnalisées avec l'oligonucléotide, elles migrent également vers l'anode. De même après hybridation avec l'aptamère (6^{ème} colonne), une bande correspondant à l'aptamère non lié, ainsi qu'une bande de plus haut poids moléculaire correspondant aux micelles hybridées avec l'aptamère apparaissent. Cette bande nous indique que l'hybridation de l'aptamère avec les micelles fonctionnalisées fonctionne. Cependant, nous ne connaissons pas le taux de fonctionnalisation initial de la micelle, car la réaction de chimie click entre l'oligonucléotide et la micelle n'est pas totale. Nous sommes ainsi parvenus à fonctionnaliser les micelles avec l'aptamère ACE4G. Nous avons ensuite étudié leur internalisation cellulaire afin de voir si ce ligand apportait des propriétés de ciblage.

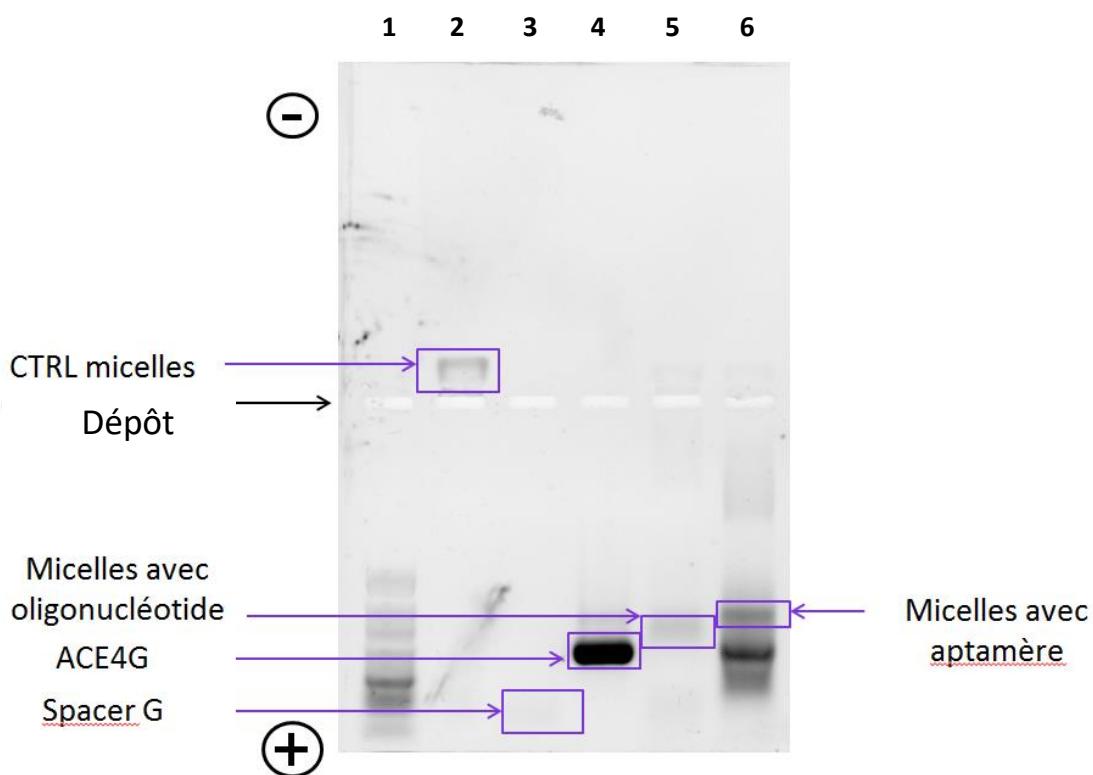


Figure 60 : Résultats de fonctionnalisation des micelles avec l'oligonucléotide Spacer G et d'hybridation avec l'aptamère ACE4G

3) Internalisation cellulaire des micelles PDA-PEG₂₀₀₀-aptamère

Afin d'étudier l'internalisation des micelles fonctionnalisées avec l'aptamère ACE4G dans les cellules MCF-7, les micelles ont été chargées avec du DiO (fluorophore hydrophobe) à 1 % en masse avant l'étape d'hybridation. Les cellules MCF-7 sont incubées pendant 30 minutes avec différents lots de micelles. Le suivi de l'internalisation des micelles fluorescentes a été réalisé par cytométrie en flux qui nous indique que les micelles fonctionnalisées avec l'aptamère ACE4G s'internalisent deux fois mieux que celles sans aptamère ou celles fonctionnalisées avec un aptamère contrôle. Cet aptamère contrôle est un aptamère « neutre » qui ne reconnaît pas l'annexine-A2. La présence de l'aptamère ciblant ACE4G apporte donc bien un effet de reconnaissance aux micelles (Figure 61).

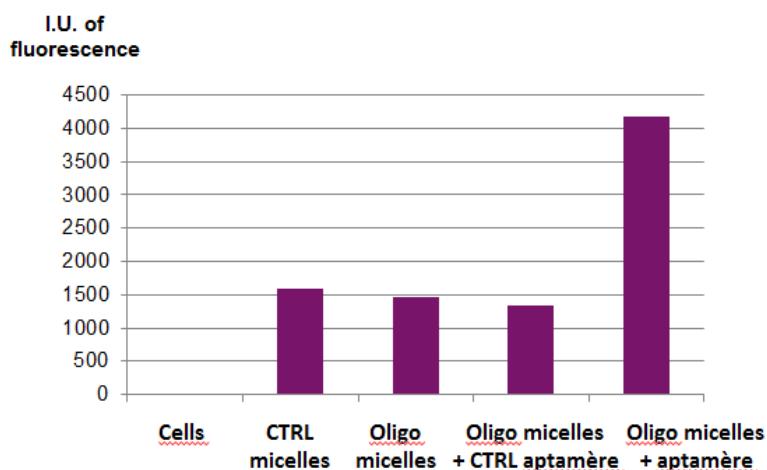


Figure 61 : Internalisation cellulaire des micelles avec ou sans aptamère sur la lignée MCF-7. Différentes micelles ont été incubées avec les cellules : des micelles PDA-PEG₂₀₀₀-OMe/alcyne 50:50 non fonctionnalisées (CTRL micelles), des micelles fonctionnalisées avec l'oligonucléotide (Oligo micelles), des micelles fonctionnalisées avec l'oligonucléotide hybridées avec un aptamère ne ciblant pas l'annexine A2 (Oligo micelles + CTRL Aptamère) et enfin, des micelles fonctionnalisées avec l'aptamère ACE4G (Oligo micelles + aptamère).

III. Conclusion

Nous sommes parvenus à préparer des lots de micelles fonctionnalisées à 0, 10, 25 et 50 % de biotine en surface. Les études d'internalisation cellulaire sur la lignée cellulaire MCF-7 ont montré que la présence de biotine favorisait l'internalisation cellulaire des micelles. Toutefois, un taux de fonctionnalisation optimal de 25 % a été observé. En effet, un excès de fonctionnalisation en biotine fait perdre l'effet recherché. Nous avons également montré que l'internalisation cellulaire était liée aux récepteurs à la biotine. Nous ne sommes pas parvenus à évaluer le bénéfice thérapeutique que pourraient conférer ces micelles étant donné que nous ne sommes pas parvenus à les charger avec un cytotoxique puissant. Nous avons également préparé des micelles fonctionnalisées avec l'aptamère ACE4G qui reconnaît l'annexine A2. Les études *in vitro* ont également montré que la présence du ligand apportait un bénéfice dans l'internalisation cellulaire des micelles.

Nous pouvons donc envisager d'utiliser ce type de micelles pour vectoriser des principes actifs de manière plus spécifique vers les cellules cancéreuses et ainsi en réduire les effets secondaires. Des

outils de diagnostic peuvent aussi être développés sur la base de ces mêmes plateformes en les associant à des fluorophores ou des agents de contraste utiles en imagerie.

Chapitre 5 : Les micelles comme outils de diagnostic par IRM

Nous avons vu dans les chapitres précédents que les micelles pouvaient cibler les tissus tumoraux par l'intermédiaire de l'effet EPR et interagir sélectivement avec des cellules cancéreuses lorsqu'elles sont fonctionnalisées avec un ligand de surface. Outre leur rôle thérapeutique et en fonction de la cargaison transportée, les micelles peuvent également servir d'outils d'imagerie. En effet, le réservoir central et la périphérie des micelles peuvent être aménagés de telle sorte qu'ils puissent transporter sélectivement vers une cible des agents de contraste utiles pour le diagnostic. Nous avons ainsi envisagé de développer des micelles pour l'imagerie biomédicale par résonance magnétique (IRM). Deux types d'approches ont été explorés, l'IRM du proton et l'IRM du fluor.

I. Micelles chargées avec du gadolinium pour l'IRM du proton

1) Bibliographie

L'imagerie par résonance magnétique est un des outils de diagnostic efficace qui compte parmi les plus utilisés pour l'imagerie biomédicale.^{131, 132} Il s'agit d'un mode d'exploration non invasif qui est utilisé pour imager les structures anatomiques du corps et s'avère être très utile pour la détection et la caractérisation de tissus mous pathologiques tels que les tumeurs cancéreuses solides. Cet outil d'imagerie ne fait pas intervenir de rayonnements ionisants et fournit une image en 3D avec une haute résolution spatiale et un fort contraste.¹³³ L'IRM « conventionnelle » repose sur l'observation de la résonance magnétique nucléaire des protons de l'eau qui constitue environ 70 % d'un organisme. L'intensité du signal observé va dépendre non seulement de la concentration en eau mais aussi du temps de relaxation des spins nucléaires des protons de l'eau. Il est ainsi possible d'obtenir une image de la répartition en eau dans le corps du patient.

Afin d'améliorer la sensibilité et la qualité de l'image, des agents de contraste peuvent être utilisés dans le but d'augmenter l'intensité des signaux des tissus malades par rapport aux tissus sains.¹³⁴ Le contraste en IRM dépendant des différences dans les temps de relaxation et de la densité des protons de l'eau, il peut être exalté par la présence d'agents de contraste¹³¹ qui modifient la vitesse de relaxation longitudinale ($1/T_1$) et la vitesse de relaxation transversale ($1/T_2$) des protons de l'eau présente dans l'environnement de l'agent de contraste. Cet effet permet l'augmentation du contraste des tissus d'intérêt.¹³³ Les agents de contraste sont classés comme étant des agents de type T_1 ou T_2 selon leurs mécanismes de relaxation et leurs propriétés magnétiques. Les plus utilisés sont des complexes de l'ion gadolinium (Gd^{3+}) avec des ligands polyaminocarboxylates.¹³⁵ Le paramagnétisme du Gd entraîne l'augmentation de la vitesse de relaxation R_1 ($1/T_1$) des protons de l'eau.^{132, 133, 136} Les agents de contraste au Gd génèrent un contraste positif en augmentant l'intensité du signal. Par contre, lorsque ($1/T_2$) augmente, l'intensité du signal diminue et on parle de contraste négatif tel qu'observé avec les particules d'oxyde de fer qui sont des agents de contraste de type T_2 .^{133, 137}

La relaxivité d'un agent de contraste est un critère essentiel pour l'IRM, plus sa valeur est élevée, meilleur est l'agent de contraste. La relaxivité correspond à la capacité de l'agent de contraste à modifier le taux de relaxation des protons de l'eau environnante. Elle s'exprime en $mM^{-1}s^{-1}$ et varie selon que l'agent de contraste est lié à une structure moléculaire/macromolécule ou non. Elle dépend aussi du champ magnétique. Cependant, les ions Gd qui sont de bons agents de contraste avec une relaxivité élevée, ne peuvent être administrés tels quels car ils sont toxiques. Ils interfèrent en effet avec les canaux calciques et les sites de liaison des protéines. La dose létale des ions Gd^{3+} est de 0,2 mmol/kg.¹³⁸

Cette toxicité associée au métal peut être atténuée par complexation de l'ion avec des ligands. Cependant, même si la complexation est robuste, une libération *in vivo* des ions Gd³⁺ par des processus de transmétallation ne peut être exclue. La fibrose systémique néphrogène est l'un des effets secondaires causés par les agents de contraste au gadolinium. Il apparaît donc important de développer de nouveaux agents de contraste au Gd, en les rendant plus stables et en facilitant leur élimination rapide après l'examen.¹³³

Nous avons choisi d'adapter la structure des micelles polymérisées que nous développons au laboratoire pour y incorporer des ions Gd et faire de l'imagerie par résonnance magnétique en ayant à l'esprit plusieurs prérequis : i) les micelles doivent permettre d'amener localement une forte concentration en gadolinium (→ meilleur signal), ii) elles doivent complexer fortement le métal afin d'éviter son relargage intempestif (→ toxicité amoindrie), iii) l'association du métal à une macromolécule (micelles) devrait ralentir le mouvement de rotation des complexes (→ augmentation de la relaxivité).^{133, 139}

2) Préparation des micelles gadolinium

Il existe aujourd'hui un grand nombre d'agents de contraste commerciaux qui sont préparés à base de gadolinium ligandé. Ces derniers sont utilisés en routine pour réaliser des diagnostics chez l'homme. Parmi les différentes formulations disponibles, le Dotarem®, développé par les laboratoires Guerbet, est un produit qui associe l'acide 1,4,7,10-tétraazacyclododecane-1,4,7,10-tétraacétique (également connu sous l'abréviation DOTA) et des sels de gadolinium. Ce complexe étant particulièrement stable *in vivo* ($\log(K) = 25,3$)¹³⁸ nous avons envisagé de l'associer à nos micelles. Dans un premier temps, nous avons préparé un amphiphile simple DA-DOTA qui incorpore une chaîne grasse polymérisable et une tête polaire complexante. Le but ici étant de vérifier que nous parvenons bien à assembler des systèmes micellaires polymérisés chargés avec du gadolinium dont le signal IRM pourra être détecté *in vivo*. Une fois cette validation faite, nous pourrons nous atteler à l'assemblage d'autres micelles plus biocompatibles avec notamment des propriétés de furtivité *in vivo* en y incorporant des unités PEG par exemple.

a) Préparation de l'amphiphile DA-DOTA

La synthèse de l'amphiphile DA-DOTA est réalisée en trois étapes à partir de l'ester de succinimide dérivé de l'acide 10,12-pentacosadiynoïque. La première étape est la réaction d'amidation de l'éthylène diamine avec l'ester activé dans le DCM qui conduit à l'amine primaire **V-1**. La diamine est utilisée ici en excès (10 équivalents) afin d'éviter sa double substitution. **V-1** est ensuite engagé dans une deuxième réaction d'amidation avec le DOTA protégé sous la forme de tri-*tert*-butyle ester en présence d'EDC/HOBt et de TEA. Le diamide **V-2** est obtenu avec un rendement de 61 %. Enfin, les groupements carboxyliques sont déprotégés en présence de TFA dans le DCM pour conduire à l'amphiphile **V-3** (Schéma 38) avec un rendement quantitatif sur cette dernière étape.

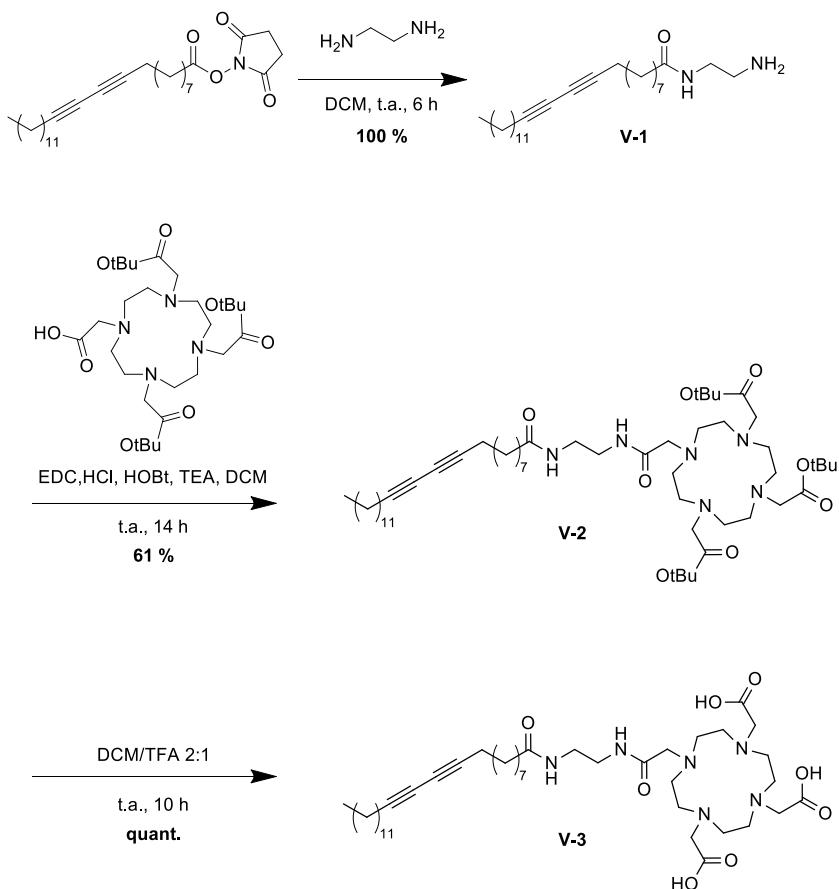


Schéma 38 : Préparation de l'amphiphile DA-DOTA

L'amphiphile ayant été synthétisé, il nous reste à complexer le gadolinium avec la tête DOTA. Pour ce faire, nous avons envisagé deux approches : i) La première est d'assembler les amphiphiles sous la forme de micelles, de les stabiliser par polymérisation puis de charger le DOTA avec du Gd ; ii) la deuxième stratégie va consister à chélater le gadolinium à l'unité amphiphile, la purifier et l'assembler sous la forme de micelles. Cette dernière approche présente l'avantage de pouvoir construire des micelles dont nous pourrons contrôler finement le chargement en Gd en faisant varier de manière contrôlée, au sein d'une même micelle, la proportion d'amphiphiles dont les têtes sont fonctionnalisées et complexées au métal.

b) Première approche : chélation du Gd après assemblage et polymérisation des micelles

Dans le cadre de la première stratégie nous avons assemblé l'amphiphile **V-3** sous forme d'une solution de micelles à 10 mg/mL dans de l'eau déminéralisée. La solution est soniquée au bras à ultrasons pendant 10 min avant d'être irradiée à 254 nm pendant 6 h pour conduire aux micelles polymérisées (Schéma 39). Avant polymérisation les micelles ont un diamètre centré autour de 7,5 nm en volume, après polymérisation elles ont un diamètre autour de 7 nm tel que mesuré par diffusion dynamique de la lumière. Les têtes DOTA de ces micelles polymérisées sont ensuite chargées avec du gadolinium en les incubant avec une solution de GdCl_3 ($6\text{H}_2\text{O}$). Il est important, au cours de cette étape, de contrôler de manière continue le pH et de l'ajuster à une valeur de 5,5 par ajout de KOH 0,1 M. En effet, une chute importante de la valeur du pH pourrait entraîner la protonation de la tête DOTA, ce qui aurait pour conséquence d'inhiber la complexation. Le sel de gadolinium est ajouté par fractions

qui correspondent à 0,2 équivalents de $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ par rapport à la quantité d'amphiphiles dans les micelles. Après chaque ajout, le milieu réactionnel est agité pendant 1 h à 60 °C, puis nous vérifions si du Gd libre est présent ou non par l'utilisation d'un indicateur coloré, l'Arsenazo III. Le test colorimétrique avec l'Arsenazo III a été réalisé selon des protocoles décrits dans la littérature : à 20 μL d'une solution à $6 \cdot 10^{-4}$ M d'Arsenazo III dans du tampon acétate sont ajoutés 5 μL du milieu pour lequel nous souhaitons savoir si du Gd libre est présent. La couleur de la solution d'Arsenazo III vire du violet au vert en présence Gd libre.^{140, 141}

Les ajouts successifs de 0,2 équivalents de gadolinium sont arrêtés lorsque nous détectons la présence de Gd libre par le dosage à l'Arsenazo III. L'excès de Gd est ensuite éliminé par ajout d'une résine complexante (Chelex-100) à la solution de micelles. On laisse agir la résine pendant 2 h à température ambiante avant de la filtrer sur une membrane Nylon 0,2 μm . La solution de micelles M1 contient donc des assemblages supra-moléculaires dont les têtes polaires sont complexées à du Gd. Le contenu en métal (Gd) a pu être mesuré par ICP-MS après avoir digéré pendant une nuit, une aliquote de la solution micellaire dans HNO_3 . La valeur mesurée en gadolinium est de 3,5 mM. Cette mesure nous indique que toutes les têtes DOTA ne sont pas complexées et que nous avons environ 10 têtes sur 25 qui sont associées au métal. Ce non recouvrement total de la micelle par le gadolinium pourrait avoir pour origine l'encombrement stérique de la micelle qui empêche l'accessibilité du métal à la tête complexante. Le diamètre des micelles chargées en gadolinium est de 11 nm.

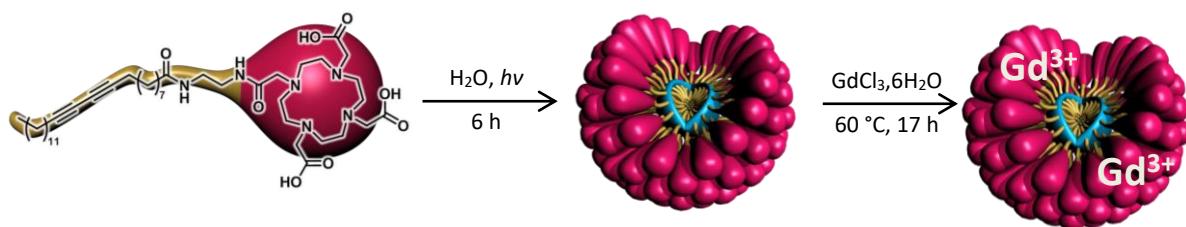


Schéma 39 : Préparation des micelles PDA-DOTA chargées en Gd^{3+} selon la 1^{ère} stratégie (micelles M1)

c) Deuxième approche : assemblage des micelles à partir d'un amphiphile DA-DOTA-Gd

Nous avons également préparé des micelles fonctionnalisées avec du Gd selon la deuxième stratégie qui consiste à charger le métal sur l'unité amphiphile avant l'assemblage en micelles. L'amphiphile **V-3** a été complexé avec du Gd en solution aqueuse dont le pH est ajusté à 5,5. Le mélange est chauffé à 60 °C pendant 17 h en présence de 0,5 équivalents de $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Schéma 40). La solution aqueuse est ensuite lyophilisée et l'amphiphile complexé au gadolinium (**V-4**) est purifié par LC-MS préparative. Les micelles sont ensuite assemblées (10 mg/mL en amphiphile-Gd) et polymérisées par irradiation à 254 nm pendant 6 h. Nous nous sommes assurés que cette étape de photopolymérisation n'induisait pas de décomplexation du métal. Un dosage de la solution micellaire polymérisée à l'Arsenazo III indique qu'il n'y a pas de Gd libre.

Nous avons ainsi obtenu une solution de micelles M2 contenant 7,9 mM de Gd (mesuré par ICP-MS) dont le diamètre est centré sur 7 nm en volume selon la DLS. Nous constatons que les micelles obtenues sont un peu plus compactes que celles obtenues par la première approche.

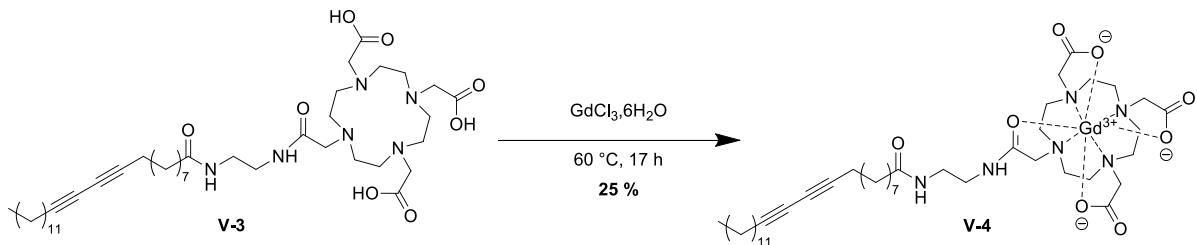


Schéma 40 : Préparation de l'amphiphile DA-DOTA-Gd

La stratégie qui consiste à former les micelles après avoir préalablement chargé les amphiphiles avec du gadolinium permet d'avoir des micelles avec une concentration plus importante en contrastophore que la stratégie de chélation après assemblage des micelles. C'est cette méthode qui sera retenue pour la préparation des lots ultérieurs. Nous avons tout de même étudié les propriétés en IRM des micelles issues des deux différentes approches.

3) Étude des propriétés IRM des micelles chargées avec du Gd

La relaxivité des différents échantillons a été mesurée par le Dr. Andreas Volk de l'institut Curie à Orsay en utilisant un instrument opérant avec un champ magnétique de 9,4 Tesla (Tableau 9). La mesure de la relaxivité r_1 repose sur la relation de base :

$$R_1([C]) = R_{10} + r_1[C] \quad (\text{E1})$$

Avec R_1 la vitesse de relaxation longitudinale de l'eau ($R_1 = 1/T_1$) ; T_1 le temps de relaxation longitudinale ; C la concentration d'agent de contraste ; et R_{10} la vitesse de relaxation longitudinale des protons de l'eau en absence d'agent de contraste.

La mesure de la relaxivité se fait en deux étapes. La première consiste à mesurer les temps de relaxation T_1 de plusieurs échantillons de concentrations C différentes. Pour ce faire, une technique de RMN dite « inversion récupération » est utilisée. Pour chaque concentration le signal RMN (S) est enregistré en fonction d'une série de délais (délais d'inversion T_I), permettant d'obtenir T_1 selon la relation :

$$S(TI) = S_0(1-2A\exp(-TI/T_1)) \quad (E2)$$

S_0 : signal RMN à l'état d'équilibre, A : facteur de correction

Concrètement, cela se fait en mesurant le signal RMN de tubes dans lesquels sont placés des solutions à différentes concentrations en agent de contraste. Dans notre cas, nous utilisons un assemblage de 7 tubes de RMN de 5 mm de diamètre pour effectuer la mesure de T_1 à 6 concentrations différentes de micelles M1 (contenant de 0,11 à 3,5 mM de Gd) ainsi que pour l'eau (tube central) (Figure 62). Le signal RMN est mesuré pour chaque tube en fonction du délai d'inversion et la courbe $S(T_1)$ est tracée pour chaque concentration, permettant de déterminer le T_1 de chaque concentration (Figure 63).



Figure 62 : Assemblage de tubes RMN pour la mesure de T_1 pour 6 concentrations différentes et l'eau

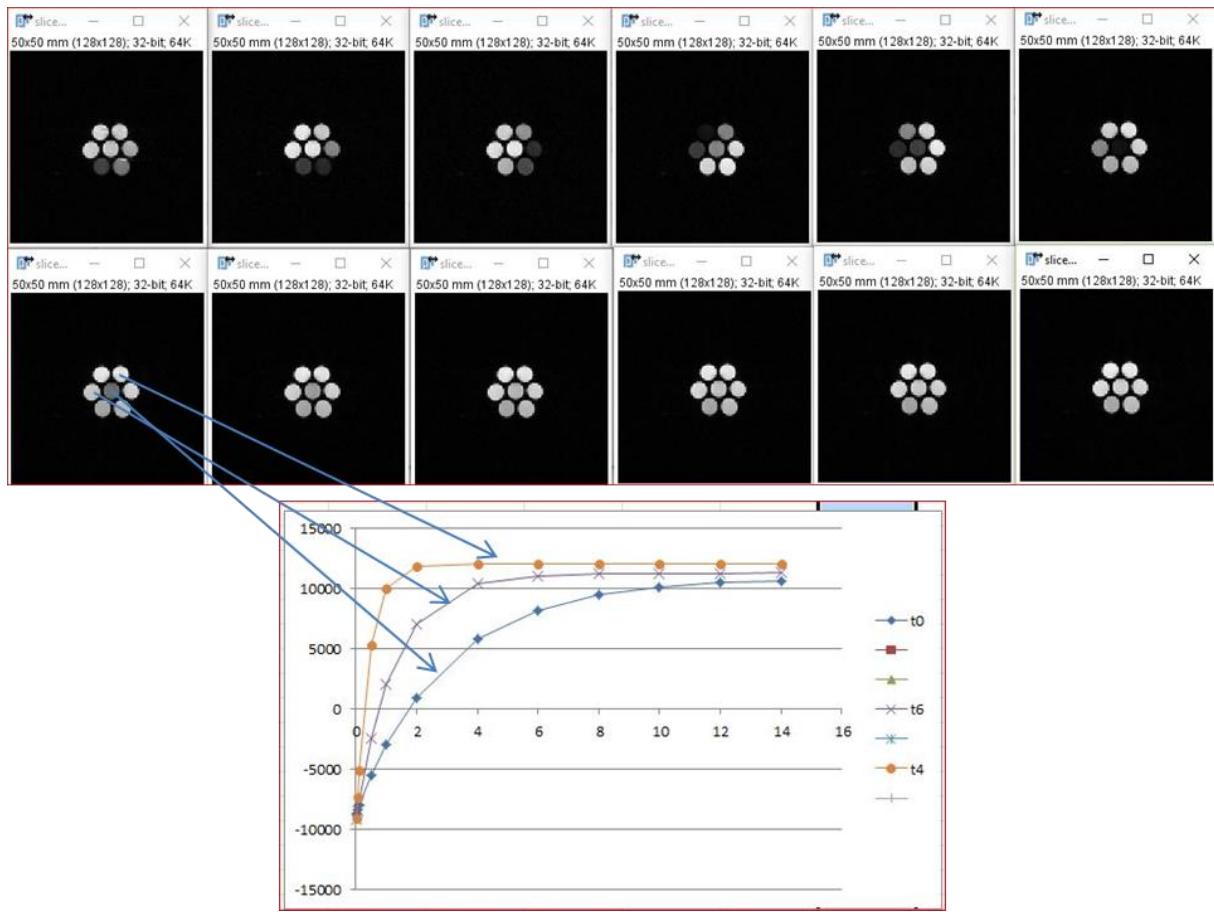


Figure 63 : Images IRM permettant la mesure du signal IRM en fonction de T_1 des différents échantillons (12 T_1 ont été utilisés ici) et les courbes $S(T_1)$ qui en résultent

Une fois que T_1 est déterminé pour chacune des concentrations, la droite R_1 en fonction de C est tracée, et permet de déterminer la valeur de r_1 . Nous avons obtenu des relaxivités de 4,9 et 5,2 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour les micelles M1 et M2 respectivement (Tableau 9). Ces valeurs sont à comparer à celle du complexe Gd-DOTA (3 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) qui est classiquement utilisé comme outil d'imagerie *in vivo*. Les micelles-Gd M2 ont une relaxivité 1,7 fois supérieure à celle du DOTA-Gd. Cette supériorité des micelles par rapport au complexe Gd-DOTA est attribuée à l'abaissement des vitesses de rotation du métal complexé dans la formulation micellaire. En effet, contrairement aux petits chélates (ex. Gd-DOTA) qui ont une rotation libre en solution, le mouvement rotationnel des complexes de Gd macromoléculaires (ex. Gd-

micelle) est abaissé ce qui impacte directement la relaxivité observée. Ces résultats sont particulièrement encourageants étant donné que plus la relaxivité est importante, meilleur est le contraste en IRM.

Tableau 9 : Mesures des relaxivités

Échantillon	Relaxivité ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Micelles M1	4,9
Micelles M2	5,2
Gd-DOTA	3

Nous avons donc réussi à préparer un système vecteur qui semble prometteur pour pouvoir être détecté par imagerie IRM *in vivo*. Nous pourrions donc envisager d'utiliser nos micelles (sous réserve qu'elles soient circulantes) pour la visualisation et le diagnostic de tumeurs cancéreuses.

Un calcul rapide montre que la proportion de micelles accumulées au niveau des tumeurs solides pourra probablement être détectée par la technique d'IRM. En effet, lorsque 1 mg de micelles est injecté par voie intraveineuse à des souris xénogreffées, environ 5 % de la dose (soit 0,05 mg) se retrouvent classiquement accumulés dans la tumeur par effet EPR. Ces 0,05 mg correspondent à environ $4 \cdot 10^{-8}$ moles de Gd (solution de départ à 10 mg/mL en micelles et $[\text{Gd}] = 7.9 \text{ mM}$). Si l'on considère un volume moyen de tumeur de 200 μL , nous aurons dans ce volume une concentration en Gd-micellaire de 0,2 mM. La technique IRM utilisée permet la détection *in vivo* de 10 μM de Gd. Nous sommes donc confiants quant au potentiel en imagerie IRM de nos micelles. Cependant, les expériences d'imagerie *in vivo* n'ont pas pu être réalisées pour le moment car il est nécessaire de définir au préalable un protocole précis d'expérience animale et d'obtenir les autorisations administratives légales. Cette procédure est en cours.

La formulation micellaire que nous avons préparée présente les avantages déjà mentionnés plus tôt, à savoir une capacité à amener localement une forte concentration de Gd (ce sera vérifié par les tests *in vivo*) et une augmentation de la relaxivité par l'abaissement de la vitesse de rotation du système.

En fonction des résultats obtenus *in vivo*, nous pourrons ajuster les propriétés de nos micelles, notamment de furtivité, en préparant des micelles mixtes qui incorporeront un mélange d'amphiphiles DOTA-Gd (pour le signal d'imagerie) et d'amphiphiles PEGylés (pour la furtivité).

En parallèle de cette approche pour l'IRM du proton, nous avons également travaillé au développement de micelles pour l'IRM du fluor.

II. Micelles fluorées pour l'IRM du fluor

1) L'IRM du fluor

Contrairement à l'utilisation d'agents de contraste pour l'IRM du proton, où la détection est dite indirecte car le signal observé correspond à la modification de la relaxation de l'eau environnante du contrastophore, lorsqu'on fait de l'IRM du fluor c'est le signal de l'halogène lui-même qui est mesuré. Il s'agit d'une détection directe.

L'IRM du ^{19}F présente certains avantages en comparaison avec l'IRM du ^1H . Cet atome présente des propriétés RMN favorables, faisant de lui un noyau prometteur pour l'imagerie. En effet, le noyau ^{19}F a une abondance naturelle de 100 %, sa sensibilité RMN est presque équivalente (83 %) à celle du ^1H , son rapport gyromagnétique γ est de 40,08 MHz/T (alors que celui du ^1H est de 42,58 MHz/T) et il possède un spin de $\frac{1}{2}$.^{142, 143} Par ailleurs, le corps humain présente très peu de fluor endogène qui est essentiellement localisé au niveau des os et des dents. Ce fluor endogène est de plus difficile à visualiser *in vivo* car immobilisé dans une phase solide entraînant un temps de relaxation T_2 court et un signal non détectable en IRM.¹⁴³ L'utilisation d'une sonde fluorée est donc intéressante puisque si un signal est observé *in vivo*, il ne peut avoir pour origine que le fluor incorporé dans la sonde d'imagerie.¹⁴⁴

De nombreux agents de contraste fluorés ont déjà été développés pour l'IRM, il s'agit principalement de perfluorocarbones ou de perfluoropolyéthers administrés sous la forme de nanoémulsions dont la taille est comprise entre 100 et 200 nm.¹⁴⁵ De par la force de la liaison C-F, l'électronégativité importante et la faible polarisabilité du fluor, les perfluorocarbones présentent une stabilité importante. Ces composés ne sont pas métabolisés et nécessitent l'utilisation de surfactants pour les solubiliser dans l'eau.^{142, 143} Les agents de contraste principalement utilisés en études précliniques et cliniques sont des émulsions contenant du perfluoro[15]-5éther-couronne¹⁴⁶, un mélange de polymères linéaires de perfluoropolyéthers¹⁴⁷ (commercialisé sous le nom de CellSense)¹⁴⁵, ou encore du bromure de perfluorooctyle¹⁴⁸ (PFOB, Figure 64) qui est le premier perfluorocarbone linéaire à avoir été utilisé pour l'IRM *in vivo* du système réticuloendothélial.¹⁴⁹ Chen et son équipe ont par exemple préparé des nanoparticules de PFOB et les ont utilisées pour marquer des cellules souches. Ces cellules marquées ont été injectées dans le muscle squelettique de souris avant d'être observées par IRM du fluor à 11,7 T (Figure 65).¹⁵⁰

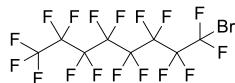


Figure 64 : Structure chimique du PFOB

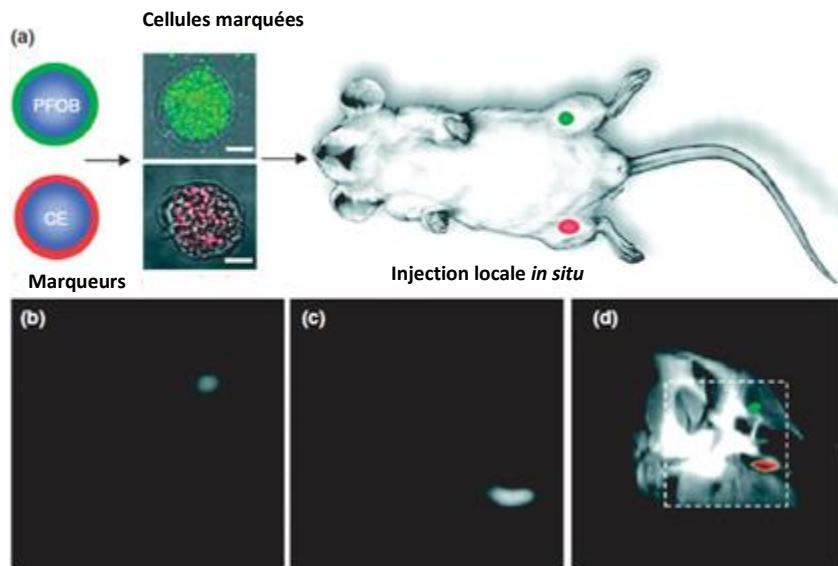


Figure 65 : a) Injection locale des cellules marquées avec des nanoparticules de PFOB (vert) ou de PFPE (rouge) dans le muscle squelettique de la cuisse d'une souris avant analyse IRM, b) détection à 11,7 T des cellules PFOB, c) détection à 11,7 T des cellules PFPE, d) combinaison de l'IRM du fluor et du proton (fluor en couleur et proton en nuances de gris) montrant la présence de PFOB dans la jambe gauche et de PFPE dans la jambe droite¹⁵⁰

L'utilisation de sondes fluorées est donc avantageuse pour améliorer le contraste en IRM et une sonde idéale doit présenter les caractéristiques suivantes : i) elle doit posséder un grand nombre d'atomes de fluor (→ exaltation du signal), ii) être synthétisée et formulée facilement, iii) être stable, iv) ne pas être toxique, et v) avoir un spectre RMN simple.¹⁴³ Nous avons ainsi choisi de développer un système micellaire fluoré qui aurait des caractéristiques favorables pour l'IRM.

Les « meilleures » micelles jusqu'à présent développées au laboratoire sont constituées d'une couche périphérique à base d'éthers de polyéthylène glycol. Cette couche protège les micelles de l'opsonisation, permet de les rendre furtives et de prolonger leur temps de circulation sanguine. Nous avons ainsi choisi d'adapter la structure de nos micelles afin de pouvoir y incorporer du fluor 19 et faire de l'imagerie par résonnance magnétique. Ces micelles seront assemblées à partir d'unités amphiphiles constituées d'une partie hydrophobe à base de chaînes perfluorées et d'une partie hydrophile à base de PEG. La cohésion des objets micellaires sera assurée ici, non pas par une polymérisation, mais par des interactions hydrophobes simples classiquement rencontrées avec les chaînes perfluorées. Ces interactions n'étant pas de nature lipophile, les amphiphiles endogènes de l'organisme tels que les phospholipides ne peuvent pas interagir avec la structure micellaire et la déstabiliser. Le cœur de la micelle pourra en outre servir de réservoir pour la prise en charge de molécules à activité thérapeutique et qui seraient elles-mêmes fluorées.

La conception de ces micelles fluorées doit prendre en compte un pré-requis qui est leur capacité à amener localement une forte concentration en fluor afin d'exalter le signal IRM. Toutefois, les chaînes perfluorées linéaires constitutives du cœur de la micelle présentent des atomes de fluor qui sont non équivalents et qui résonnent à des fréquences différentes. Cette disparité dans les fréquences peut entraîner non seulement l'apparition d'artéfacts de déplacements chimiques mais également des couplages F-F pouvant causer une atténuation du signal. C'est la raison pour laquelle nous avons envisagé d'encapsuler dans les micelles fluorées un agent de contraste capable de résonner à une fréquence unique. Nous avons ainsi sélectionné le Perfecta (Figure 66). Ce composé est un éther

ramifié qui comporte 36 atomes de fluor qui sont tous magnétiquement équivalents et qui conduisent donc à un signal unique en RMN du fluor. Ce composé a récemment été utilisé dans la littérature par Tirotta et ses collègues qui ont préparé une émulsion de lécithine/huile de carthame contenant du Perfecta.¹⁴⁵ L'émulsion a été utilisée pour marquer des cellules dendritiques (par incubation) qui ont par la suite été injectées dans le muscle d'une souris (utilisé comme un fantôme) et visualisées par IRM du fluor après 10 min d'acquisition. Cette sonde semble donc être un bon candidat agent de contraste pour l'IRM du fluor 19.

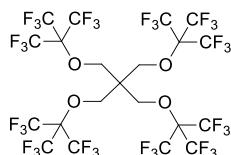


Figure 66 : Structure chimique de la sonde superfluorée Perfecta

Nous avons ainsi choisi d'assembler des micelles fluorées dans lesquelles nous allons encapsuler du Perfecta pour avoir accès à des formulations nanométriques biocompatibles pour l'imagerie *in vivo*.

2) Préparation des micelles et encapsulation du Perfecta

Les micelles que nous avons choisi d'assembler sont constituées d'unités amphiphiles comportant une chaîne perfluorée hydrophobe et un éther de polyéthylène glycol hydrophile. Les deux parties sont reliées par un simple lien éther (Figure 67).

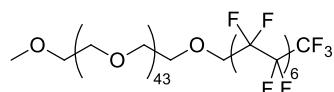


Figure 67 : Structure chimique de l'amphiphile C₁₄-perfluoré-PEG₂₀₀₀

Cet amphiphile était déjà disponible au laboratoire, il avait été synthétisé en deux étapes (Schéma 41) par le Dr. Agathe Bélimé, une ancienne post-doctorante de notre équipe. La première étape consiste à mésyler l'alcool terminal du PEG₂₀₀₀-OMe en présence de chlorure de mésyle et de triéthylamine dans le DCM. Une substitution nucléophile du mésylate est ensuite réalisée par le ¹H,¹H-perfluoro-1-tétradecanol en présence d'hydrure de sodium à 70 °C. Le rendement de cette dernière étape est de 50 %.

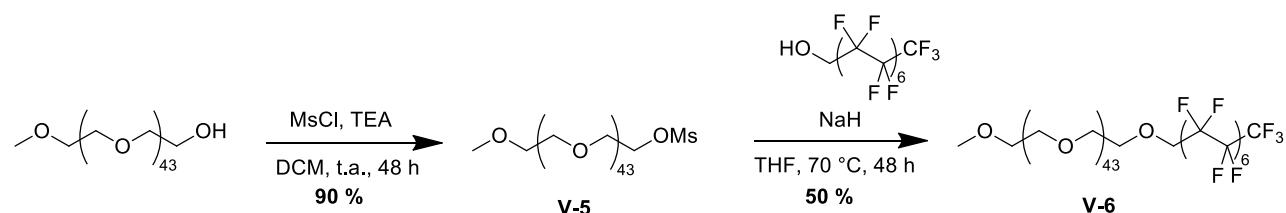


Schéma 41 : Synthèse de l'amphiphile C₁₄-perfluoré-PEG₂₀₀₀

L'amphiphile est ensuite assemblé sous la forme de micelles en préparant une solution aqueuse à 10 mg/mL d'amphiphile et en la traitant au bras à ultrasons pendant 10 minutes. Les micelles obtenues ont un diamètre centré autour de 14,7 nm en volume. La RMN du fluor dans le D₂O de la solution micellaire montre deux populations principales de signaux à -83.1 et -123.0 ppm intégrant respectivement pour 3 et 24 atomes de fluor. La concentration micellaire critique a été mesurée par la méthode de tension de surface, elle est de 58 mg/L (Figure 68). Cette faible valeur mesurée pour la CMC nous conforte dans l'idée de pouvoir utiliser nos assemblages *in vivo* dans la mesure où la cohésion de la micelle sera encore assurée dans des conditions de forte dilution (dans la circulation sanguine par ex.).

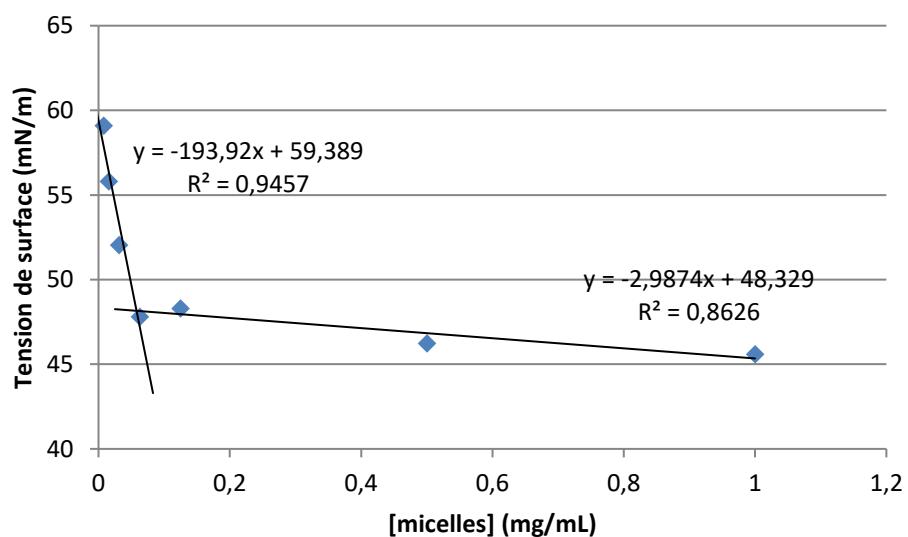


Figure 68 : Détermination de la CMC des micelles fluorées par la mesure de tension de surface

Les micelles ainsi assemblées ont été utilisées pour encapsuler du Perfecta qui a été préparé selon le protocole de la littérature en condensant le pentaérythritol avec le perfluoro-*tert*-butanol dans les conditions de Mitsunobu.¹⁴⁵ 10 mg de Perfecta en poudre sont ainsi ajoutés à 1 mL d'une solution d'amphiphile à 10 mg/mL. La suspension est traitée au bras à ultrasons pendant 10 minutes avant d'être filtrée sur une membrane 0,2 µm.

La micelle chargée a ensuite été caractérisée par RMN du fluor. Le spectre RMN a été réalisé dans l'eau deutérée et montre trois signaux caractéristiques à -72.3, -83.2 et -123.1 ppm (Figure 69). Alors que les signaux à -83.2 et -123.1 ppm sont associés à la micelle, le signal unique et intense à -72.3 ppm correspond au Perfecta. L'intégration des signaux nous indique que le Perfecta a été encapsulé dans un rapport de 1:1 massique avec la micelle, c'est-à-dire qu'un gramme de micelles peut prendre en charge un gramme de Perfecta.

Des mesures de diffusion de la lumière montrent que les micelles chargées ont un diamètre de 21,5 nm. On observe donc un léger gonflement des micelles suite à l'encapsulation du Perfecta. Ce résultat n'est pas surprenant en tant que tel puisque nous avons mis en évidence que le chargement de la micelle était conséquent. Le Perfecta occupant un volume propre au cœur de la micelle il provoque donc cet effet de dilatation.

Les micelles-Perfecta ont été étudiées par rapport à leurs propriétés de résonnance magnétique. Cette évaluation a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr. Sébastien Mériaux du

laboratoire Neurospin (CEA/Saclay). Les tests préliminaires d'IRM du ^{19}F serviront à jauger du potentiel de cette nouvelle formulation.

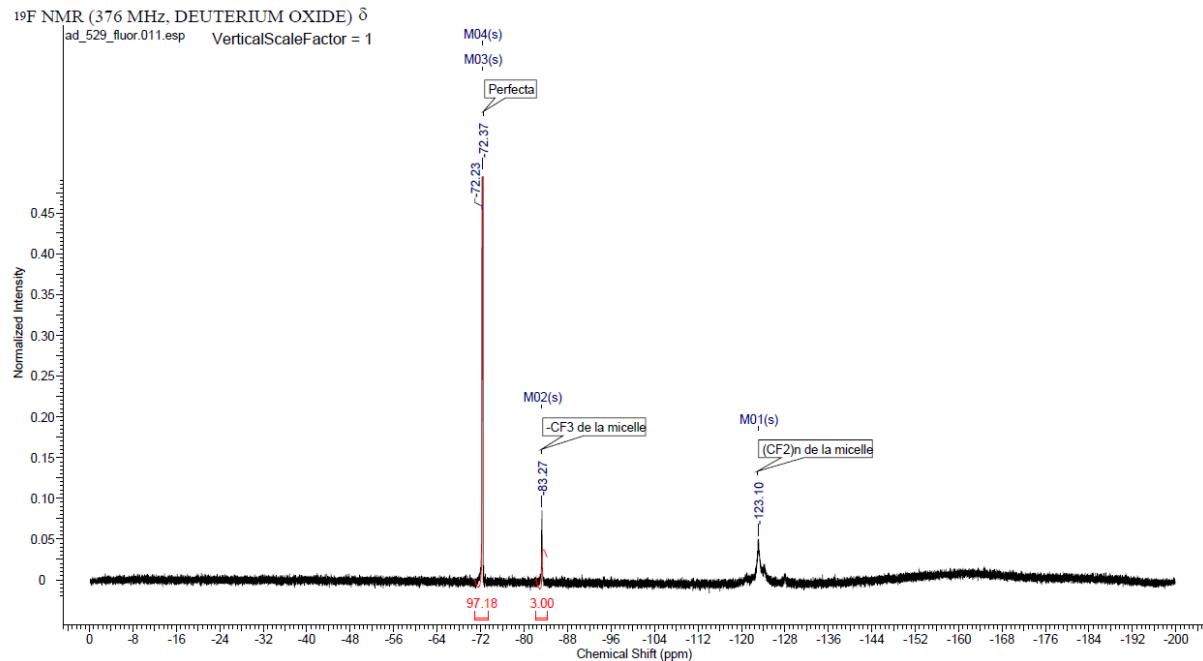


Figure 69 : Spectres ^{19}F -RMN des micelles fluorées chargées avec du Perfecta

3) Expériences en IRM- ^{19}F

Les imageries par résonnance magnétique du fluor ont été réalisées à Neurospin sur différents échantillons : i) du Perfecta encapsulé dans les micelles, ii) des micelles vides dans l'eau, iii) du Perfecta dans le chloroforme + quelques gouttes d'hexafluoroisopropanol pour la solubilisation, et iv) de l'hexafluoroisopropanol dans du chloroforme. Les expériences ont été réalisées sur un imageur avec une antenne ^{19}F et opérant à 7 Tesla.

Les différentes solutions de composés fluorés ont été préparées avec des concentrations connues, et afin d'avoir un élément de comparaison, nous avons calculé pour chacun des lots les concentrations en élément fluor. Une première série d'expériences montre que l'hexafluoroisopropanol et le Perfecta peuvent être très facilement détectés par la technique d'imagerie. Ce résultat met en évidence la capacité de l'imageur et de la séquence développée par les RMNistes à détecter le fluor à des concentrations relativement fortes ($[^{19}\text{F}] > 5 \text{ M}$). Lorsque la micelle est imagée seule, nous ne détectons pas de signal. Ici la concentration en fluor est de 0,1 M avec plusieurs résonnances possibles (donc moins de signal à une fréquence donnée) pour les différents atomes de fluor répartis dans la chaîne fluoro-carbonée. Enfin, lorsque les micelles-Perfecta ont été imágées, nous avons eu l'agréable surprise de pouvoir visualiser le Perfecta encapsulé au cœur des micelles. En effet, même si l'intensité du signal est encore modeste, nous observons après 40 s d'acquisition (Figure 70) une image distincte, la concentration en fluor étant 5 fois supérieure à celle des micelles vides.

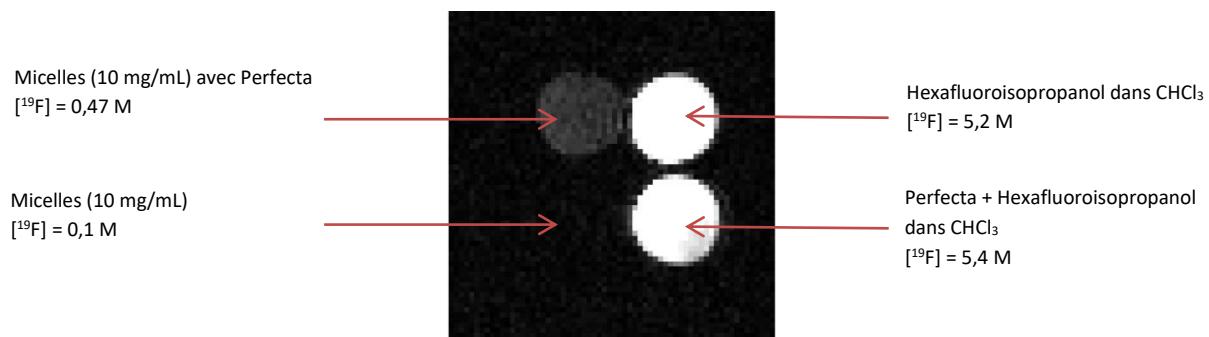


Figure 70 : Séquence IRM à 7 T acquise avec une antenne surfacique ^{19}F (Tx/Rx) avec 2 averages en séquence RARE des échantillons de micelles chargées avec du Perfecta ou non dans l'eau, du Perfecta avec l'hexafluoroisopropanol dans le chloroforme et de l'hexafluoroisopropanol dans le chloroforme

Le temps de relaxation T_2 de la micelle-Perfecta a également été mesuré en utilisant une séquence MSME et 24 TE (temps d'échos) et $TR = 5000$ ms. T_2 s'obtient d'après la courbe du signal de résonance magnétique en fonction du temps d'échos (Figure 71). Nous obtenons une valeur de T_2 de 184 ms pour les micelles chargées avec du Perfecta. Cette valeur est comparable avec celle obtenue dans la littérature pour la nanoémulsion de Perfecta (74,4 mM en Perfecta) qui est de 182 ms.¹⁴⁵

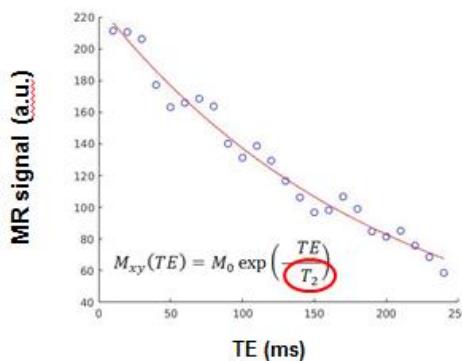


Figure 71 : Détermination de T_2

Les micelles chargées avec du Perfecta répondent aux critères énoncés précédemment puisqu'elles possèdent un grand nombre d'atomes de fluor magnétiquement équivalents, permettant un signal unique et distinct. La valeur de T_2 mesuré est proche de celle mesurée pour une nanoémulsion du Perfecta décrite dans la littérature, ce qui nous conforte sur le potentiel IRM de notre système micellaire. Les micelles chargées avec l'agent de contraste vont maintenant être étudiées *in vivo* afin de confirmer leur potentiel en tant qu'outil nanométrique pour l'imagerie biomédicale.

III. Conclusion

Nous avons préparé deux types de contrastophores micellaires pour l'imagerie par résonance magnétique. Des micelles polymérisées contenant du gadolinium ont été assemblées et évalués en imagerie du proton. Les résultats obtenus montrent que la formulation micellaire offre un gain notable en ce qui concerne la concentration locale en élément rapporteur (Gd) et l'exaltation de la relaxivité des protons de l'eau environnante par empêchement de la libre rotation du complexe DOTA-Gd. Nous observons en effet une relaxivité améliorée d'un facteur 1,7 par rapport à celle du DOTA-Gd. Des études *in vivo* doivent encore être réalisées afin de valider le potentiel des micelles en imagerie biomédicale.

D'autre part, des micelles fluorées ont été préparées pour l'imagerie du fluor non radioactif. Ces micelles ont été chargées avec un élément rapporteur (le Perfecta) qui présente la particularité de ne porter que des atomes de fluor qui résonnent tous à une seule et même fréquence. Cette spécificité autorise la détection d'un signal unique et intense qui a pu être visualisé sur un imageur à 7 T. Nous envisageons également ici d'exploiter ces micelles pour de l'imagerie IRM *in vivo*. Ces études sont en cours.

Conclusion générale

Nous avons au cours de cette thèse développé des formulations micellaires capables de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses dans le but de concevoir des outils pour la thérapie et le diagnostic.

Dans une première partie, nous avons montré que des micelles constituées d'une chimie de surface zwitterionique présentaient une biocompatibilité et une furtivité *in vivo* comparable aux micelles PEGylées classiquement utilisées jusqu'à présent. Ces formulations nanométriques incorporent une chimie de surface globalement neutre qui les rend compactes, furtives et leur confère une biocompatibilité accrue *in vivo*. Une biodistribution des micelles chargées avec un fluorophore émettant dans le proche infra-rouge a été réalisée chez le petit animal. Les résultats obtenus montrent que ces micelles s'accumulent de façon passive au niveau de la périphérie des tumeurs. Cette accumulation sélective permet de délimiter visuellement le volume de la masse tumorale et pourrait trouver son utilité dans la chirurgie assistée par imagerie de fluorescence en sécurisant l'exérèse tout en préservant les structures tissulaires saines.

Dans une deuxième partie, nous avons conçu des systèmes micellaires « intelligents » capables de libérer une cargaison médicamenteuse sous l'influence d'un stimulus. Nous avons ainsi préparé des micelles photosensibles qui, par activation UV, libèrent une entité cytotoxique. Nous avons essayé de transposer ce système pour pouvoir l'utiliser *in vivo* en y associant des nanoparticules à conversion ascendante (UCNP) qui sont excitables dans le proche infra-rouge. Des expériences préliminaires d'irradiation des UCNP encapsulées montrent que nous sommes limités par la puissance du laser utilisé. Une alternative pour dissocier la micelle serait de réaliser une excitation à deux photons. Les études sont en cours. Nous avons d'autre part également souhaité développer des micelles qui soient capables de se dissocier aux pH acides classiquement rencontrés dans les tissus tumoraux. Nous ne sommes toutefois pas parvenus à finaliser notre synthèse d'amphiphile acido-sensible.

Dans une troisième partie, nous avons préparé des systèmes micellaires fonctionnalisés avec de la biotine ou de l'aptamère ACE4G. Ces micelles ont été conçues de telle sorte à pouvoir cibler de manière active les cellules cancéreuses. Nous avons montré que l'internalisation cellulaire des micelles fonctionnalisées avec ces ligands était meilleure qu'en l'absence de ligands sur une lignée cancéreuse MCF-7. Nous avons également mis en évidence que l'internalisation des micelles était médiée par l'interaction entre le ligand et son récepteur. Il existe un taux de fonctionnalisation optimal qui est de 25 % (pour la biotine) puisque c'est ce recouvrement de surface qui nous donne les meilleurs résultats en termes de cinétique d'internalisation.

Dans le dernier chapitre, nous avons étudié des systèmes micellaires pour l'imagerie par résonance magnétique du proton et du fluor. Deux types d'agents de contraste ont été développés dont des micelles incorporant du gadolinium pour l'IRM du proton. Le métal a été associé aux micelles par l'intermédiaire d'une tête polaire DOTA. Des résultats préliminaires montrent que la formulation micellaire-Gd contient une concentration importante en gadolinium ce qui est favorable au contraste en imagerie. La relaxivité induite par la micelle-Gd est également 1,7 fois supérieure à celle du DOTA-Gd. Un deuxième type de micelle a été développé pour l'IRM du fluor. La formulation est constituée de micelles PEGylées perfluorées qui ont été chargées avec un élément rapporteur moléculaire (le Perfecta) qui présente 36 atomes de fluor magnétiquement équivalents. Les premiers résultats obtenus sur un imageur à 7 Teslas nous indiquent que le Perfecta peut être détecté dans la micelle à des concentrations telles que des expériences *in vivo* ont été programmées.

Partie expérimentale

Les réactifs chimiques ont été achetés et utilisés sans purification supplémentaire. Le dichlorométhane a été distillé sur CaH_2 avant utilisation et le THF a été distillé en présence de sodium et de benzophénone avant utilisation.

Les chromatographies sur colonne ont été réalisées sur gel de silice (230-240 mesh, Merck). Les chromatographies sur couche mince ont été faites sur des plaques de type Silice Merck 60 F₂₅₄ sur support de verre. Elles ont été révélées sous UV et/ou après immersion dans une solution éthanolique à 5 % d'acide phosphomolybdique ou une solution aqueuse de permanganate de potassium.

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance 400 dont les fréquences de résonance du proton, du carbone et du fluor sont 400.13 MHz, 100.62 MHz et 376.50 MHz, respectivement. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm. Les RMN du proton sont référencées de cette manière : déplacement chimique (δ ppm), multiplicité (s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, quin = quintuplet, m = multiplet, br.s. = signal large), constante de couplage (Hz) et intégration.

Les spectres de masse ont été enregistrés avec un spectromètre Waters Micromass ZQ 2000 ESI.

Les spectres infra-rouges ont été mesurés sur un appareil Perkin-Elmer 2000 FT-IR. Les longueurs d'ondes sont reportées en cm^{-1} à leur intensité maximale.

Les spectres UV ont été enregistrés sur un spectromètre Varian Carry 50 Scan.

Les mesures DLS ont été réalisées avec un Zetasizer Nano Serie de la société Malvern.

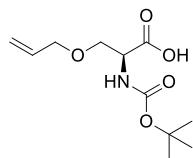
Les réactions photochimiques ont été réalisées avec une lampe UV Heraus à basse pression de mercure (254 nm), une lampe UV Heraus à moyenne pression de mercure couvrant une large gamme de longueur d'onde munie d'un tube à immersion en quartz et d'un tube de réfrigération en quartz ou une lampe Fisher Bioblock Scientific monochromatique (365 nm).

Les expériences d'irradiation à 980 nm ont été réalisées avec un laser titane saphir (Ti:Saph) de Spectra-physics modèle Tsunami en régime picoseconde avec une densité de puissance de 6 W/cm².

La préparation des micelles par sonication est réalisée à l'aide d'une sonde à ultrasons Branson Sonifier 450 (60 W, 20 kHz).

I. Synthèse

(S)-3-(allyloxy)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoic acid (II-2)



À une suspension de NaH à 95 % (136 mg, 5.37 mmol, 2.2 équiv.) dans le DMF (2.5 mL) est ajoutée au goutte à goutte une solution de Boc-serine (500 mg, 2.44 mmol, 1 équiv.) dans le DMF (5 mL) à 0 °C. Après 20 min, du bromure d'allyle (250 µL, 2.93 mmol, 1.2 équiv.) est ajouté et le refroidissement est retiré pour laisser le mélange revenir à t.a. Le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote pendant 66 h. Le DMF est évaporé. Le résidu est repris dans de l'eau et extrait avec Et₂O trois fois. La phase aqueuse est acidifiée à pH = 1 avec du HCl 1 M à 0 °C et est extraite avec EtOAc (× 3). Les phases organiques sont rassemblées, lavées à la saumure, séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées à sec. Une huile jaune (123 mg, 0.51 mmol) est obtenue.

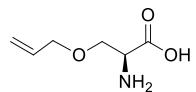
Rendement : 21 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 5.73–5.96 (m, 1H), 5.41 (d, J = 7.14 Hz, 1H), 5.14–5.33 (m, 2H), 4.44 (br. s., 1H), 4.02 (d, J = 5.67 Hz, 2H), 3.90 (m, J = 6.40 Hz, 1H), 3.67 (dd, J = 3.84, 9.51 Hz, 1H), 1.32–1.59 (m, 9H) en adéquation avec le produit attendu.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 155.8, 133.8, 117.8, 80.3, 72.4, 69.5, 53.7, 28.3

Masse (MeOH) : ESI(+), m/z = 246.1 [M+H]⁺, ESI(-), m/z = 244.2 [M-H]⁻

(S)-3-(allyloxy)-2-aminopropanoic acid (II-3)



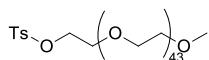
Le produit **II-2** (116 mg, 0.47 mmol) est solubilisé dans du DCM (5 mL) puis du TFA (1 mL) est ajouté. Le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote pendant 16 h puis évaporé à sec. Le résidu est repris dans de l'acétone et évaporé trois fois. Le produit est obtenu sous forme d'huile (192 mg, 0.47 mmol).

Rendement : > 99 %

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 5.77–5.98 (m, 1H), 5.16–5.37 (m, 2H), 4.24 (dd, *J* = 3.29, 4.76 Hz, 1H), 4.01–4.11 (m, 2H), 3.98 (dd, *J* = 4.76, 11.16 Hz, 1H), 3.86 (dd, *J* = 3.29, 11.16 Hz, 1H) en accord avec le produit attendu.

Masse (MeOH) : ESI(+), *m/z* = 146.0 [M+H]⁺, ESI(-), *m/z* = 144.0 [M-H]⁻

Poly(ethylene glycol)methyl ether tosylate (masse moyenne 2000 g/mol) (II-4)



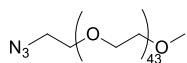
Du PEG₂₀₀₀ monomethylether (1 g, 0.5 mmol, 1 équiv.) et du chlorure de tosyle (476 mg, 2.5 mmol, 5 équiv.) sont solubilisés dans du DCM (14 mL). De la TEA (340 µL, 2.5 mmol, 5 équiv.) est ajoutée (pH > 10). Le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote pendant 23 h. Le milieu réactionnel est ensuite lavé trois fois avec HCl 1 M et une fois avec de la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée à sec. Le résidu brut obtenu (1.236 g) est solubilisé dans un minimum de DCM et est précipité dans l'éther trois fois. Le produit est obtenu sous forme de solide blanc (941 mg, 0.44 mmol).

Rendement : 87 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.72–7.84 (m, J = 8.42 Hz, 2H), 7.28–7.39 (m, J = 8.23 Hz, 2H), 4.07–4.21 (m, 2H), 3.50–3.86 (m, 174H), 3.38 (s, 3H), 2.44 (s, 3H) en accord avec le produit attendu.

Masse (MeOH) : ESI(+), m/z = 2146 [M+Na]⁺

Poly(ethylene glycol) methyl ether azide (masse moyenne 2000 g/mol) (II-5)



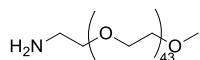
À une solution de **II-4** (1.037 g, 0.49 mmol, 1 équiv.) dans un mélange eau/acétone (1:1, v/v, 10 mL) sont ajoutés, par portions, de l'azoture de sodium (159 mg, 2.45 mmol, 5 équiv.) et de l'iodure de sodium (7 mg, 0.049 mmol, 0.1 équiv.). Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 19 h. L'acétone est évaporée. La phase aqueuse restante est extraite au DCM trois fois. Les phases organiques sont rassemblées, lavées à la saumure, séchées sur MgSO_4 , filtrées et évaporées à sec. Le produit est obtenu sous forme de solide blanc (934 mg, 0.47 mmol).

Rendement : 96 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 3.43–3.83 (m, 174H), 3.34–3.42 (m, 5H)

Masse (MeOH) : ESI(+), m/z = 2017 [M+Na]⁺

Poly(ethylene glycol) methyl ether amine (masse moyenne 2000 g/mol) (II-6)



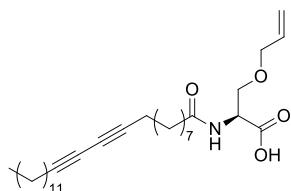
À une solution de **II-5** (888 mg, 0.45 mmol, 1 équiv.) dans un mélange EtOH/HCl (95:5, v/v, 10 mL) est ajouté du Pd/C 5 wt% (96 mg, 0.045 mmol, 0.1 équiv.). Le mélange est mis sous azote puis agité à t.a. sous 1 atm de H₂ pendant 3.33 h. Le milieu réactionnel est filtré sur célite et concentré sous vide. Un solide blanc (1.312 g) est obtenu et solubilisé dans du DCM et une solution aqueuse de NaHCO₃ saturée. La phase aqueuse est extraite trois fois au DCM. Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec de la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée à sec. Le produit est obtenu sous forme de solide blanc (688 mg, 0.35 mmol).

Rendement : 78 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.47–3.89 (m, 174H), 3.37 (s, 3H), 3.02–3.12 (m, 2H) en accord avec le produit attendu.

Masse (MeOH) : ESI(+), m/z = 1969 [M+H]⁺, m/z = 1991 [M+Na]⁺

DA-*O*-allyl-L-serine (II-8)



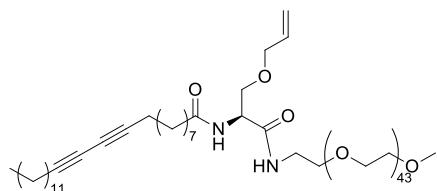
Du 1-(10,12-Pentacosadiynoyloxy)-2,5-pyrrolidinedione (222 mg, 0.47 mmol, 1 équiv.) est solubilisé dans du DMF (2 mL). **II-3** (192 mg, 0.47 mmol, 1 équiv.) est solubilisé dans du DMF (3 mL), de la TEA (600 μ L, 6.4 mmol, 14 équiv.) est ajoutée, la solution devient rose trouble, de l'eau (1 mL) est ajoutée, la solution devient limpide (pH 10). Le tout est ajouté à la solution précédente dans le DMF. De l'eau (400 μ L) est ajoutée, le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote (pH 12) pendant 4.5 h. Le milieu réactionnel est concentré et le résidu est lavé avec une solution aqueuse de HCl 2 M. La phase aqueuse est extraite trois fois avec du DCM. Les phases organiques sont rassemblées, lavées à la saumure, filtrées et évaporées à sec. Le produit est obtenu sous forme de solide blanc (229 mg, 0.46 mmol).

Rendement : 97 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 6.32 (d, J = 7.14 Hz, 1H), 5.76–5.94 (m, 1H), 5.16–5.32 (m, 2H), 4.66–4.78 (m, 1H), 4.03 (d, J = 5.67 Hz, 2H), 3.94 (dd, J = 3.75, 9.79 Hz, 1H), 3.68 (dd, J = 4.12, 9.61 Hz, 1H), 2.18–2.30 (m, 6H), 1.57–1.70 (m, 2H), 1.45–1.56 (m, 4H), 1.16–1.45 (m, 26H), 0.88 (t, J = 6.77 Hz, 3H) en accord avec le produit attendu.

Massé (MeOH) : ESI(+), m/z = 502.6 [M+H] $^+$, m/z = 524.6 [M+Na] $^+$, ESI(-), m/z = 500.6 [M-H] $^-$

Amphiphile DA-alcène-PEG₂₀₀₀ (II-1)



Le produit **II-8** (50 mg, 0.1 mmol, 1 équiv.), l'EDC,HCl (21 mg, 0.11 mmol, 1.1 équiv.) et le HOEt (20 mg, 0.15 mmol, 1.5 équiv.) sont mélangés dans du DCM (1.5 mL). Le produit **II-6** (210 mg, 0.11 mmol, 1.1 équiv.) dans du DCM (1.5 mL) est ajouté sous azote. Le pH est de 4, de la TEA (40 μ L, 0.3 mmol, 3 équiv.) est ajoutée (pH 12). Le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote pendant 22 h. Le milieu réactionnel est évaporé à sec. Le brut est solubilisé dans du DCM, lavé avec une solution aqueuse de NaHCO₃, la phase aqueuse est extraite trois fois au DCM. Les phases organiques sont lavées avec NH₄Cl saturé puis de la saumure, séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées à sec. 231 mg sont obtenus. Le résidu brut est solubilisé dans du DCM et est purifié sur colonne de silice (DCM/MeOH 95:5 → 90:10). Le produit pur est obtenu (79 mg, 0.09 mmol).

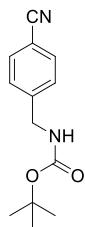
Rendement : 92 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 6.86 (br. s., 1H), 6.43 (d, J = 6.22 Hz, 1H), 5.77–5.94 (m, 1H), 5.15–5.28 (m, 2H), 4.46–4.57 (m, 1H), 4.02 (t, J = 5.31 Hz, 2H), 3.77–3.88 (m, 2H), 3.51–3.75 (m, 183H), 3.43–3.50 (m, 4H), 3.35–3.41 (m, 3H), 2.14–2.31 (m, 6H), 1.61 (d, J = 7.32 Hz, 2H), 1.43–1.58 (m, 4H), 1.36 (br. s., 4H), 1.17–1.32 (m, 22H), 0.87 (t, J = 6.77 Hz, 3H) en accord avec le produit attendu.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 173.1, 170.0, 134.0, 71.9, 70.6, 70.5, 70.3, 69.4, 39.4, 36.5, 29.6, 29.5, 29.3, 29.2, 29.2, 29.1, 28.8, 28.3, 25.5, 22.7, 19.2, 14.1 certains signaux sont absents.

Mass (MeOH) : ESI(+) $m/z = 1227$ $[M+2H]^{2+}$, $m/z = 2475$ $[M+Na]^+$

tert-butyl 4-cyanobenzylcarbamate (II-10)⁷⁰



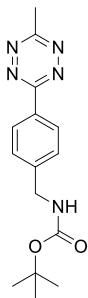
Du 4-(aminomethyl)benzonitrile-HCl (500 mg, 3 mmol, 1 équiv.) est dissous dans du toluène et évaporé (2 × 2 mL). Du Boc₂O (720 mg, 3.3 mmol, 1.1 équiv.) est ajouté. Du DCM (0.5 mL) et de la TEA (1.1 mL, 8.2 mmol, 2.7 équiv.) sont ajoutés. Un dégagement gazeux est observé lorsque le milieu réactionnel est mis au bain à ultrasons. Du DCM (0.5 mL) est ajouté pour solubiliser un peu plus les réactifs. Le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote pendant 1.5 h. Le milieu réactionnel est évaporé à sec. Un solide blanc est obtenu. Le solide est dissous dans du DCM et est lavé à l'eau deux fois. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le produit est obtenu sous forme de solide blanc (617 mg, 2.61 mmol).

Rendement : 85 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.46 (s, 9 H) 4.37 (d, *J* = 5.85 Hz, 2 H) 4.95 (br. s., 1 H) 7.32–7.45 (m, 2H) 7.53–7.69 (m, 2 H) en accord avec le produit attendu.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 184.0, 179.3, 165.0, 155.9, 150.3, 146.7, 144.6, 132.4, 127.8, 127.2, 118.8, 111.1, 80.1, 44.2, 28.3, 27.4 en adéquation avec la littérature⁷⁰, les C quaternaires ne ressortent pas très bien.

Masse (MeOH) : ESI(+), *m/z* = 233.0 [M+H]⁺

tert-butyl 4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzylcarbamate (II-11)⁷⁰

Le produit **II-10** (232 mg, 1 mmol, 1 équiv.) et $\text{Ni}(\text{OTf})_2$ (178 mg, 0.5 mmol, 0.5 équiv.) sont introduits dans un tube micro-ondes et mis sous azote. De l'acétonitrile (525 μL , 10 mmol, 10 équiv.) est ajouté ainsi que de l'hydrazine monohydrate (2.4 mL, 50 mmol, 50 équiv.). Le tube est scellé et chauffé à 60 °C sous azote pendant 24 h. Le milieu réactionnel est dilué avec de l'acétate d'éthyle. NaNO_2 (1.4 g, 20 mmol, 20 équiv.) dans de l'eau (5 mL) est ajouté au milieu réactionnel. Une solution aqueuse de HCl 1 M est ajoutée au goutte à goutte à la solution précédente jusqu'à ce que le pH atteigne 3. Une fois que le dégagement gazeux est achevé, la solution est extraite avec EtOAc trois fois. Les phases organiques sont rassemblées, lavées à l'eau deux fois puis une fois avec une solution saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée à sec. Le résidu brut obtenu (301 mg) est solubilisé dans du DCM et est purifié sur silice (100 % DCM -> DCM/Et₂O 97:3). Le produit est obtenu sous forme de solide rose (137 mg, 0.46 mmol).

Rendement : 46 %

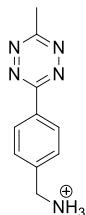
¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 8.48–8.61 (d, J = 8.23 Hz, 2H), 7.43–7.56 (d, J = 8.23 Hz, 2H), 4.97 (br. s., 1H), 4.44 (d, J = 6.04 Hz, 2H), 3.09 (s, 3H), 1.35–1.54 (s, 9H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 167.2, 163.9, 155.9, 143.9, 130.7, 128.1, 128.0, 79.8, 77.3, 77.2, 76.7, 44.3, 28.4, 21.1

Masse (MeOH) : ESI(+), m/z = 302.0 [M+H]⁺, m/z = 246.0 [M-*t*Bu+H]⁺

En accord avec la littérature.⁷⁰

(4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)phenyl)methanaminium (II-12)



Le produit **II-11** (121 mg, 0.4 mmol) est solubilisé dans du DCM (5.5 mL) puis du TFA (5.5 mL) est ajouté. La réaction est agitée pendant 1.25 h sous azote à t.a. Le milieu réactionnel est évaporé à sec, mis sous la rampe à vide. Le résidu est solubilisé dans du DCM et évaporé deux fois. Un solide rose (123 mg, 0.4 mmol) est obtenu (sels de TFA).

Rendement : > 99 %

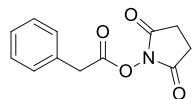
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 8.46–8.59 (d, *J*= 8.42 Hz, 2H), 8.35 (br. s., 2H), 7.69–7.77 (m, *J*= 8.60 Hz, 2H), 4.19 (br. s., 2H), 3.01 (s, 3H)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 167.3, 163.0, 138.4, 132.0, 129.8, 127.7, 42.0, 40.1, 39.9, 39.7, 39.3, 39.1, 38.9, 30.7 en accord avec la littérature.

Masse (MeOH) : ESI(+), *m/z* = 202.0 [M+H]⁺

En accord avec la littérature.⁷⁰

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-2-phenylacetate (II-13)



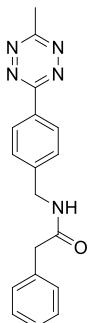
Le NHS (212 mg, 1.84 mmol, 1 équiv.) est dissous dans du DMF (12 mL). La solution est refroidie à 0 °C et du DCC (413 mg, 2 mmol, 1.1 équiv.) et de l'acide phenylacétique (250 mg, 1.84 mmol, 1 équiv.) sont ajoutés. Le mlieu réactionnel est agité à 0 °C pendant 2 h, sous azote, puis à t.a. pendant 19 h. Le précipité qui s'est formé est filtré sur coton et lavé au DMF. Le filtrat est lavé avec une solution saturée de NaHCO₃ aqueuse, de l'eau est ajoutée pour solubiliser le précipité qui s'est formé, et le tout est extrait avec EtOAc trois fois. Les phases organiques sont combinées, lavées à l'eau, séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées à sec. Le brut est solubilisé dans un mélange de DCM et de MeOH et est pré-absorbé sur silice puis purifié sur colonne avec une élution 100 % DCM. Le produit pur (268 mg, 1.14 mmol) est obtenu.

Rendement : 62 %

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 7.23–7.43 (m, 5H), 4.11 (s, 2H), 2.81 (s, 4H)

Masse (MeOH) : ESI(+), m/z = 233.9 [M+H]⁺

***N*-(4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-2-phenylacetamide (II-9)**



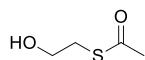
Le produit **II-12** (40 mg, 0.19 mmol, 1 équiv.) et **II-13** (86 mg, 0.37 mmol, 1.9 équiv.) sont solubilisés dans du DMF (3.8 mL). De la TEA (260 µL, 1.9 mmol, 10 équiv.) est ajoutée. Le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote pendant 19 h. Le milieu réactionnel est évaporé à sec. Le brut est solubilisé dans du DCM et est purifié par colonne de silice. Le gel de silice est préparé avec cyclohexane/EtOAc 8:2 puis l'élution est faite avec cyclohexane/EtOAc 5:5. Un solide rose (34 mg, 0.11 mmol) est obtenu.

Rendement : 56 %

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 8.70 (t, *J* = 6.04 Hz, 1H), 8.36–8.43 (d, *J* = 8.23 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 8.42 Hz, 2H), 7.18–7.35 (m, 5H), 4.40 (d, *J* = 6.22 Hz, 2H), 3.52 (s, 2H), 2.99 (s, 3H) en accord avec le produit attendu.

Masse (MeOH) : ESI(+), *m/z* = 320.1 [M+H]⁺, ESI(-), *m/z* = 318.4 [M-H]⁻

S-(2-hydroxyethyl) ethanethioate (II-16)



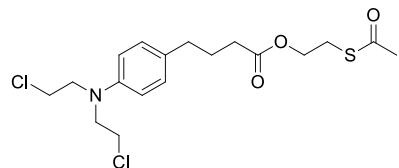
Du thioacetate de potassium (2.26 g, 0.020 mol, 1.2 équiv.) est dissous dans de l'acétone (48 mL) (tout n'est pas solubilisé). Du 2-bromoéthanol (1.2 mL, 0.017 mol, 1 équiv.) est ajouté lentement. Le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote. Un léger dégagement de chaleur est observé au cours de la réaction. Le milieu réactionnel devient orange. Après 24 h de réaction, le milieu réactionnel est filtré sur fritté. L'acétone est évaporée. Le résidu est dissous dans du DCM et est lavé à l'eau et à la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée à sec. Un liquide orange (1.959 g, 0.019 mol) est obtenu.

Rendement : 96 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 3.76 (q, $J = 5.92$ Hz, 2H), 3.08 (t, $J = 6.04$ Hz, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.03 (t, $J = 5.95$ Hz, 1H) en accord avec le produit attendu.

Masse (MeOH) : ESI(+), $m/z = 121.0$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-(acetylthio)ethyl 4-(4-(bis(2-chloroethyl)amino)phenyl)butanoate (II-17)



Du DCC, (163 mg, 0.79 mmol, 1.1 équiv.) est ajoutée à une solution de **II-16** (84 mg, 0.70 mmol, 1 équiv.), de chlorambucil (212 mg, 0.70 mmol, 1 équiv.) et de DMAP (8 mg, 0.066 mmol, 0.1 équiv.) dans du DCM (4 mL) à 0 °C. La réaction est agitée à 0 °C pendant 30 min puis à t.a. sous azote pendant 18 h. Le milieu réactionnel est filtré sur fritté de porosité 4 pour éliminer la dicyclohexylurée formée. Le filtrat est lavé avec une solution aqueuse de HCl 0.5 M deux fois, puis à l'eau, puis deux fois avec une solution de NaHCO₃ saturée. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée à sec. Le mélange brut obtenu (huile + solide, 297 mg) est solubilisé dans du DCM et est purifié sur colonne de silice (DCM 100 %). Une huile incolore (183 mg, 0.51 mmol) est obtenue.

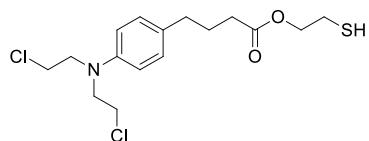
Rendement : 64 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.01 - 7.11 (m, *J* = 8.42 Hz, 2H), 6.57–6.67 (m, *J* = 8.60 Hz, 2H), 4.17 (t, *J* = 6.50 Hz, 2H), 3.66–3.75 (m, 4H), 3.57–3.66 (m, 4H), 3.13 (t, *J* = 6.50 Hz, 2H), 2.56 (t, *J* = 7.59 Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 2.32 (t, *J* = 7.50 Hz, 2H), 1.90 (t, *J* = 7.59 Hz, 2H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 194.9, 173.2, 144.2, 130.6, 129.7, 112.2, 62.6, 53.6, 40.4, 33.9, 33.4, 30.5, 27.9, 26.6

Masse (MeOH) : ESI(+), *m/z* = 406.2 [M+H]⁺

2-mercaptopethyl 4-(4-(bis(2-chloroethyl)amino)phenyl)butanoate (II-15)



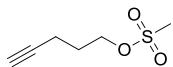
À une solution de **II-17** (122 mg, 0.30 mmol, 1 équiv.) dans du MeOH (3 mL) est ajouté NaSM_e 1 M dans le MeOH (300 µL, 0.30 mmol, 1 équiv.). La réaction est agitée à t.a. sous azote pendant 10 min (le produit s'hydrolyse rapidement et la réaction ne peut pas être amenée jusqu'à conversion totale du produit de départ). Le milieu réactionnel est versé dans une solution aqueuse de HCl à 0.1 M (20 mL). La phase aqueuse est extraite au DCM. Les phases organiques sont lavées à la saumure, séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées à sec. Le résidu brut obtenu (huile, 112 mg) est solubilisé dans du DCM et est purifié sur colonne de silice (DCM 100 %). Le produit est obtenu sous forme d'huile (22 mg, 0.15 mmol). Le produit de départ non déprotégé a pu être aussi récupéré par colonne. Le rendement est calculé à partir de la quantité de produit de départ qui a été consommée.

Rendement : 49 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.05–7.15 (d, *J* = 8.42 Hz, 2H), 6.57–6.71 (d, *J* = 8.78 Hz, 2H), 4.21 (t, *J* = 6.59 Hz, 2H), 3.69–3.79 (m, 4H), 3.60–3.67 (m, 4H), 2.76 (td, *J* = 6.66, 8.46 Hz, 2H), 2.59 (t, *J* = 7.50 Hz, 2H), 2.37 (t, *J* = 7.50 Hz, 2H), 1.94 (q, *J* = 7.41 Hz, 2H)

Masse (MeOH) : ESI(+), *m/z* = 364.2 [M+H]⁺

pent-4-yn-1-yl methanesulfonate (II-22)

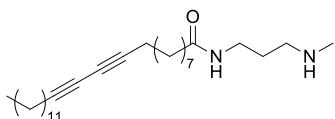


Du MsCl (620 μ L, 8.07 mmol, 1.5 équiv.) est ajouté à une solution de 4-pentyl-1-ol (500 μ L, 5.38 mmol, 1 équiv.) et de TEA (1.45 mL, 10.8 mmol, 2 équiv.) dans du DCM (30 mL) à 0 °C. Le milieu réactionnel est ensuite agité pendant 2.5 h à t.a. sous azote. Le milieu réactionnel est lavé deux fois à l'eau et une fois avec de la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée sous vide. Un liquide orange (898 mg, 5.38 mmol) est obtenu.

Rendement : 100 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 4.35 (t, J = 6.13 Hz, 2H), 3.02 (s, 3H), 2.36 (dt, J = 2.65, 6.82 Hz, 2H), 2.01 (t, J = 2.65 Hz, 1H), 1.95 (quin, J = 6.50 Hz, 2H) en accord avec le produit attendu.

N-(3-(methylamino)propyl)pentacosa-10,12-diynamide (II-21)



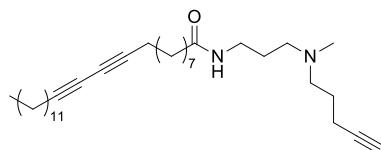
Du 1-(10,12-Pentacosadiynoyloxy)-2,5-pyrrolidinedione (1.191 g, 2.53 mmol, 1 équiv.) est dissous dans du DCM (13 mL). De la 3-(Methylamino)propylamine (2.6 mL, 25.3 mmol, 10 équiv.) et de la TEA (3.4 mL, 25.3 mmol, 10 équiv.) sont ajoutés et le milieu est agité à t.a. sous azote, à l'abri de la lumière pendant 17 h. Le milieu réactionnel est lavé à l'eau et extrait avec du DCM. La phase organique est lavée avec de la saumure. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 , filtrées et évaporées à sec. Une poudre blanche (929 mg, 2.1 mmol) est obtenue. Le produit est utilisé tel quel pour la suite et considéré comme pur.

Rendement : 83 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 sur alumine basique) δ (ppm) 6.73 (br. s., 1H), 3.32–3.40 (m, 2H), 3.28 (br. s, 1H), 2.72–2.79 (m, 2H), 2.50 (s, 3H), 2.23 (t, $J = 7.04$ Hz, 5H), 2.11–2.20 (m, 2H), 1.79 (quin, $J = 6.31$ Hz, 2H), 1.56–1.67 (m, 3H), 1.45–1.55 (m, 5H), 1.21–1.42 (m, 32H), 0.84–0.90 (m, 3H) quelques signaux supplémentaires par rapport au produit attendu, le produit est tout de même considéré comme pur et engagé tel quel dans l'étape suivante.

Masse (MeOH) : ESI(+), $m/z = 445$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

N-(3-(methyl(pent-4-yn-1-yl)amino)propyl)pentacosa-10,12-diynamide (II-23)



II-21 (900 mg, 2 mmol, 1 équiv.), **II-22** (486 mg, 3 mmol, 1.5 équiv.) et du carbonate de potassium (415 mg, 3 mmol, 1.5 équiv.) sont dissous dans du THF (26 mL). Le milieu réactionnel est agité à 60 °C sous azote pendant 67 h. Le milieu réactionnel est lavé à l'eau, extrait au DCM. La phase organique est lavée avec de la saumure, séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée à sec. Le résidu brut obtenu (1.2 g) est dissous dans du DCM et purifié par colonne de silice. Le gel de silice est préparé dans DCM/MeOH 99:1 et 0.5 % en volume de NH_4OH . Le dépôt est réalisé, l'élution est faite avec DCM/MeOH 98:2 et 0.5% en volume de NH_4OH . L'élution est faite progressivement jusqu'à DCM/MeOH 95:5 une fois que les premières impuretés sont sorties. Un solide (318 mg, 0.62 mmol) est obtenu.

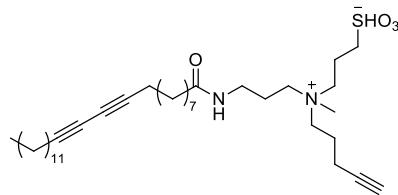
Rendement : 31 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 6.88 (br. s., 1H), 3.30–3.37 (m, 2H), 2.47–2.56 (m, 4H), 2.19–2.29 (m, 9H), 2.10–2.17 (m, 2H), 1.97 (t, $J = 2.65$ Hz, 1H), 1.66–1.78 (m, 4H), 1.56–1.65 (m, 2H), 1.45–1.55 (m, 4H), 1.17–1.41 (m, 26H), 0.84–0.90 (m, 3H). En accord avec le produit attendu.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 172.91, 83.81, 77.55, 77.41, 68.66, 65.23, 65.17, 56.99, 56.59, 41.78, 16.22–39.36, 14.09

Masse : ESI(+), $m/z = 511$ [$\text{M}+\text{H}]^+$, ESI(-), $m/z = 509$ [$\text{M}-\text{H}]^-$

3-(methyl(pent-4-yn-1-yl)(3-(pentacosa-10,12-diynamido)propyl)ammonio)propane-1-sulfonate (II-20)



II-23 (273 mg, 0.53 mmol, 1 équiv.) est dissous dans du DCM (5 mL) sous azote. De la 1,3 propanesultone (194 mg, 1.59 mmol, 3 équiv.) dans du DCM (5.6 mL) est additionnée lentement à la solution précédente. Le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote à l'abri de la lumière (pH 8) pendant 22.5 h. De la 1,3 propanesultone (194 mg, 1.59 mmol, 3 équiv.) est ajoutée et le milieu réactionnel est agité à t.a. pendant 18 h. De la 1,3 propanesultone (155 mg, 1.27 mmol, 2.4 équiv.) est ajouté au milieu réactionnel et le tout est agité à t.a. pendant 24 h. Le milieu réactionnel est concentré et séché sous vide. La RMN du proton montre qu'il ne reste plus de produit de départ (pas de pic à 6.88 ppm). Le résidu est solubilisé dans du DCM et précipité dans l'éther, deux fois. Le produit (186 mg, 0.3 mmol) est récupéré.

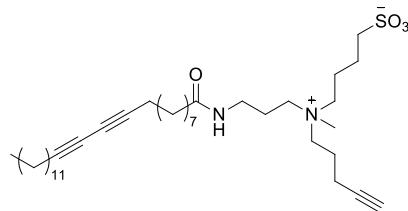
Rendement : 56 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ(ppm) 7.67 (t, *J* = 5.85 Hz, 1H), 3.68–3.83 (m, 2H), 3.42–3.53 (m, 2H), 3.29–3.42 (m, 4H), 3.10 (s, 3H), 2.88–2.96 (m, 2H), 2.33–2.41 (m, 2H), 2.17–2.30 (m, 8H), 2.13 (t, *J* = 2.56 Hz, 1H), 2.03–2.09 (m, 2H), 1.93–2.03 (m, *J* = 8.40 Hz, 2H), 1.18–1.65 (m, 34H), 0.83–0.92 (t, 3H) en accord avec le produit attendu.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 174.7, 81.3, 79.3, 77.7, 77.4, 71.5, 66.0, 65.4, 65.4, 60.8, 48.8, 47.5, 41.6, 41.1, 37.0, 36.4, 35.9, 33.9, 33.0, 32.1, 29.8, 29.6, 29.5, 29.5, 29.2, 29.2, 29.0, 28.5, 25.9, 22.8, 22.6, 19.4, 19.0, 15.7, 15.4, 14.3

Mass : ESI(+), $m/z = 633.5$ [M+H]⁺

4-(methyl(pent-4-yn-1-yl)(3-(pentacosa-10,12-diynamido)propyl)ammonio)butane-1-sulfonate (II-24)



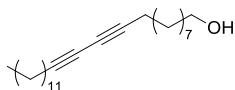
II-23 (100 mg, 0.2 mmol, 1 équiv.) est dissous dans de l'acétone (0.2 mL) sous azote. De la 1,4 butanesultone (100 μ L, 1 mmol, 5 équiv.) dans de l'acétone (0.2 mL) est ajoutée à la solution précédente. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux (65 °C) sous azote pendant 72 h. Le milieu réactionnel est évaporé à sec, le résidu est dissous dans du DCM et précipité deux fois dans l'éther. Le solide est récupéré et est trituré dans l'éther. Du produit sous forme de solide (18.8 mg, 0.03 mmol) est obtenu.

Rendement : 15 %

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d₆) : δ (ppm) 7.88 (m, 1H), 3.46 (br. s., 12H), 3.35 (t, J = 6.50 Hz, 1H), 3.14–3.28 (m, 4H), 3.04–3.14 (m, 2H), 2.95 (s, 3H), 2.66 (td, J = 1.83, 3.66 Hz, 1H), 2.30–2.38 (m, 2H), 2.20–2.30 (m, 4H), 2.05 (t, J = 7.50 Hz, 2H), 1.82 (d, J = 7.87 Hz, 2H), 1.75 (br. s., 3H), 1.51–1.65 (m, 3H), 1.37–1.51 (m, 5H), 1.15–1.35 (m, 18H), 0.80–0.89 (m, 3H)

Masse (MeOH) : ESI(+), m/z = 647 [M+H]⁺, m/z = 669 [M+Na]⁺

pentacosa-10,12-diyn-1-ol (II-26)



De l'acide pentacosa-10,12-diynoïque (1 g, 2.67 mmol, 1 équiv.) est solubilisé dans de l'éther anhydre (50 mL). La solution est refroidie à 0 °C dans un bain de glace puis LiAlH₄ (304 mg, 8.01 mmol, 3 équiv.) est ajouté par portion sous azote. Le milieu réactionnel devient violet, il est agité à t.a. sous azote pendant 1.5 h. Au-dessus d'un bain de glace, une solution de NaOH à 15 % massique dans l'eau (300 µL) puis de l'eau (900 µL) sont ajoutés. Le précipité rose est filtré sur céléite. Le filtrat est lavé deux fois avec HCl 1 M aqueux, la phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée à sec. Un solide blanc (802 mg, 2.22 mmol) est obtenu.

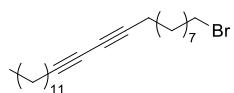
Rendement : 83 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0.84–0.91 (m, 3 H), 1.19–1.42 (m, 28 H), 1.44–1.60 (m, 6H), 2.24 (t, J = 6.95 Hz, 4 H), 3.64 (t, J = 6.59 Hz, 2H). En adéquation avec le produit attendu et la littérature.¹⁴

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 77.6, 77.5, 65.2, 63.1, 32.8, 31.9, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.1, 29.0, 28.8, 28.8, 28.3, 28.3, 25.7, 22.7, 19.2, 14.1

Massé : ESI(+), m/z = 361.3 [M+H]⁺, ESI(+), m/z = 383.3 [M+Na]⁺

1-bromopentacosa-10,12-diyné (II-27)



Le produit **II-26** (500 mg, 1.39 mmol, 1 équiv.) et de la triphénylphosphine (546 mg, 2.08 mmol, 1.5 équiv.) sont solubilisés dans du DCM (3 mL) sous azote. Du tetrabromométhane (690 mg, 2.08 mmol, 1.5 équiv.) est ajouté par petites portions. Le milieu réactionnel est agité pendant 40 min à t.a. Après ajout d'eau froide (2 mL), la phase organique est séparée (le lavage à l'eau permet d'éliminer les sels PPh_3Br^+ et CBr_3^-), séchée sur MgSO_4 et purifiée sur un plug de silice (pour éliminer PPh_3O formée) élué avec DCM 100 %. Le produit (567 mg, 1.37 mmol) est obtenu sous forme d'un liquide jaune.

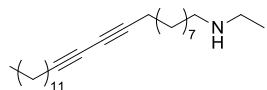
Rendement : 97 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 0.88 (t, J = 7.40 Hz, 3 H), 1.19–1.45 (m, 28 H), 1.45–1.55 (m, 4 H), 1.85 (quin, J = 8.40 Hz, 2 H), 2.24 (t, J = 6.68 Hz, 4 H), 3.40 (t, J = 6.86 Hz, 2 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 77.5, 77.3, 65.3, 65.2, 33.9, 32.8, 31.9, 29.6, 29.6, 29.5, 29.3, 29.2, 29.1, 28.9, 28.8, 28.7, 28.6, 28.3, 28.2, 28.1, 22.7, 19.1, 14.1

Masse (MeOH, DCM) : ESI(+), m/z = 423 [M+H] $^+$, m/z = 425 [M+H+2] $^+$

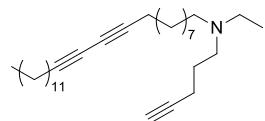
***N*-ethylpentacosa-10,12-diyn-1-amine (II-28)**



Le produit **II-27** (150 mg, 0.36 mmol, 1 équiv.) est introduit dans un ballon de 50 mL sous azote, de l'éthylamine à 2 M dans le THF (9 mL, 18 mmol, 50 équiv.) est ajoutée à -78 °C. Le mélange est agité à -78 °C pendant 10 min puis il est agité à t.a. sous azote pendant 21 h. Le milieu réactionnel est concentré, le résidu est solubilisé dans Et₂O et une solution de 5 % en masse de NaOH aqueux est ajoutée. La phase organique est lavée avec cette solution puis la phase aqueuse est extraite avec Et₂O. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. La RMN du proton montre qu'il reste du produit de départ (50% de conversion). De l'éthylamine à 2 M dans le THF (9 mL, 18 mmol, 50 équiv.) est ajoutée à t.a. sous azote. Le mélange est agité à t.a. sous azote pendant 48 h. Le milieu réactionnel est évaporé à sec. Le résidu est solubilisé dans Et₂O et une solution de 5 % en masse de NaOH aqueux. La phase organique est lavée avec cette solution, la phase aqueuse est extraite avec Et₂O. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. Selon la RMN du proton dans le chloroforme deutéré sur alumine basique, la conversion est de 90 %, le produit est formé, il y a des impuretés et il reste du produit de départ. Le produit est utilisé tel quel pour la suite. 155 mg d'un produit huileux orange sont obtenus.

Masse : ESI(+), M+H, *m/z* = 388,5

***N*-ethyl-*N*-(pent-4-yn-1-yl)pentacosa-10,12-diyn-1-amine (II-29)**



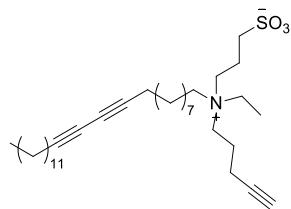
Le produit **II-28** (140 mg, 0.32 mmol, 1 équiv.), **II-22** (91 mg, 0.56 mmol, 1.8 équiv.) et du carbonate de potassium (78 mg, 0.48 mmol, 1.5 équiv.) sont dissous dans du THF (1.6 mL). Le milieu réactionnel est agité à 70 °C sous azote pendant 24 h. Le milieu réactionnel est lavé à l'eau et extrait au DCM. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. Le résidu brut (190 mg) est solubilisé dans DCM+NH₄OH 0.5 % et purifié sur colonne de silice (DCM 100 % -> DCM/MeOH 97:3). Un liquide foncé (50 mg, 0.11 mmol) est obtenu.

Rendement : 34 % (sur deux étapes)

¹H-RMN (400MHz, CDCl₃ sur alumine basique) δ (ppm) 2.45–2.56 (m, 4H), 2.39 (br. s., 2H), 2.18–2.27 (m, 6H), 1.94 (t, J = 2.65 Hz, 1H), 1.19–1.72 (m, 36H), 1.01 (t, J = 7.14 Hz, 3H), 0.83–0.92 (m, 3H). Correspond au produit souhaité.

Masse (MeOH) : ESI(+), m/z = 454 [M+H]⁺

3-(ethyl(pent-4-yn-1-yl)(pentacosa-10,12-diyn-1-yl)ammonio)propane-1-sulfonate (II-25)



II-29 (42 mg, 0.09 mmol, 1 équiv.) est dissous dans du DCM (0,9 mL) sous azote. De la 1,3 propanesultone (43 mg, 0.35 mmol, 3.9 équiv.) dans du DCM (0.9 mL) est ajoutée goutte à goutte à la solution précédente. Le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote pendant 48 h. Il reste du produit de départ. De la 1,3-ropanesultone (43 mg, 0.35 mmol, 3.9 équiv.) dans du DCM (0.9 mL) est ajoutée goutte à goutte à la solution précédente. Le milieu réactionnel est agité à t.a sous azote pendant 6 h. Aucune amélioration n'est observée. Le milieu réactionnel est évaporé à sec. Le résidu brut est dissous dans du DCM et purifié sur colonne de silice (DCM 100 % + 0.5 % NH₄OH -> DCM/MeOH 9:1). Le produit est obtenu sous forme d'un solide huileux (21 mg, 0.036 mmol).

Rendement : 40 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ sur alumine basique) δ (ppm) 3.71–3.80 (m, 2H), 3.31–3.43 (m, 4H), 3.11–3.20 (m, 2H), 2.95 (t, J = 6.13 Hz, 2H), 2.37–2.45 (m, 2H), 2.21–2.28 (m, 4H), 2.12–2.21 (m, 2H), 2.07 (t, J = 2.56 Hz, 1H), 1.89–2.05 (m, 2H), 1.17–1.76 (m, 37H), 0.81–0.92 (m, 3H) en accord avec le produit attendu.

Masse (MeOH) : ESI(+), m/z = 576 [M+H]⁺, m/z = 1152 [2M+H]⁺

II. Assemblage et fonctionnalisation des micelles

Protocole général d'assemblage des micelles et de leur polymérisation :

Une solution à 10 mg/mL d'amphiphiles est mise au bras à ultrasons pendant 10 min. La solution est ensuite transférée dans un cristallisoir et mise sous UV à 254 nm (à une distance de 10 cm de la lampe environ) pendant 6 h. La solution est alors filtrée sur filtre Nylon 0.2 µm et la taille des micelles est analysée en DLS.

Micelles PDA-alcène-PEG₂₀₀₀ :

Elles sont préparées selon le protocole précédent. La taille des micelles est mesurée avant et après polymérisation par DLS. Les micelles ont un diamètre centré sur 12.5 nm en volume avant polymérisation (Figure 72) et 10 nm après polymérisation (Figure 73).

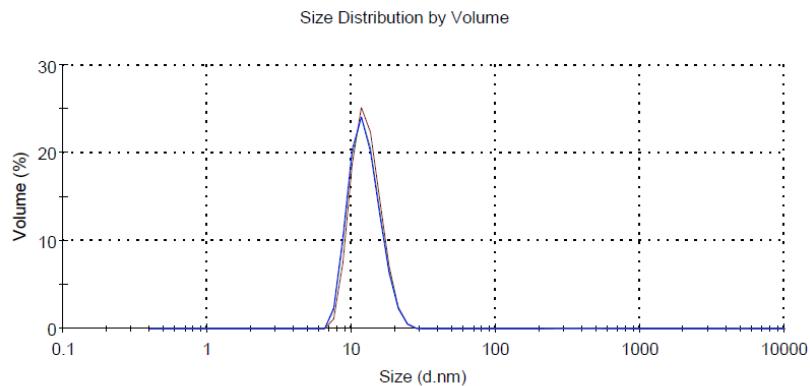


Figure 72 : Mesure de la taille des micelles DA-alcène-PEG₂₀₀₀ par DLS

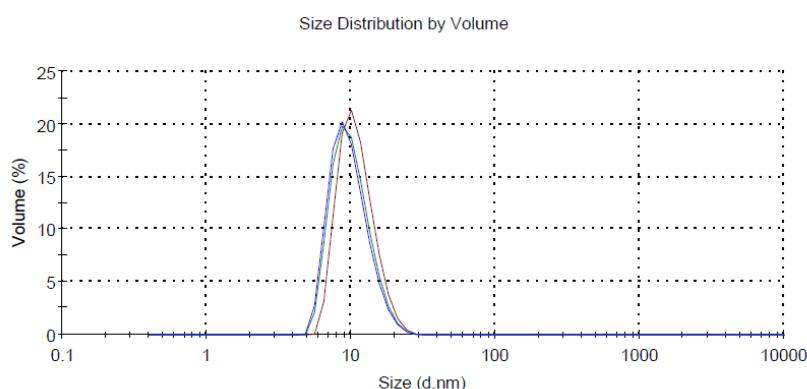
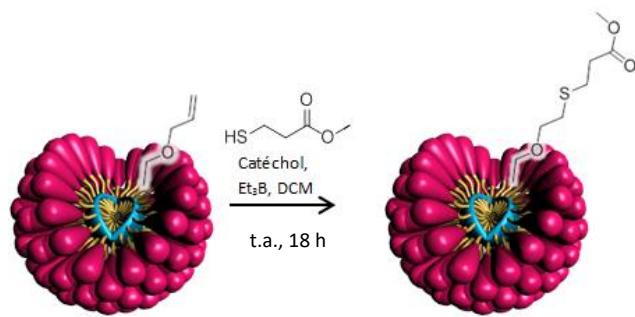


Figure 73 : Mesure de la taille des micelles PDA-alcène-PEG₂₀₀₀ par DLS

Fonctionnalisation des micelles PDA-alcène-PEG₂₀₀₀ avec l'ester méthylique de l'acide 3-mercaptopropionique



Solution d'ester méthylique de l'acide 3-mercaptopropionique : 50 µL de 3-Mercaptopropionic Acid Methyl Ester sont dilués dans 1.450mL de DCM.

Solution de catéchol : 9.7 mg de catéchol sont solubilisés dans 1 mL de DCM.

Du **PDA-alcène-PEG₂₀₀₀** (5 mg, 0.002mmol, 1 équiv.) lyophilisé est solubilisé dans du DCM (0.5 mL). De la solution de catéchol (50 µL, 0.0048 mmol, 2.4 équiv.) et de la solution de thiol (11 µL, 0.003 mmol, 1.5 équiv.) préparées sont ajoutés. Du triéthylborane (10 µL, 0.0048 mmol, 2.4 équiv.) est ajouté. Un peu d'air est laissé entrer dans le ballon puis le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote pendant 18 h. Le solvant est évaporé. Le résidu est repris dans 1 mL d'eau déminéralisée. La solution est mise au bras à ultrasons pendant 10 min puis filtrée sur filtre Nylon 0.2µm. La solution est purifiée par dialyse contre de l'eau (cut-off de la membrane de dialyse : 10 kDa) pendant deux jours. Après lyophilisation, une RMN du proton est réalisée et montre la disparition des protons de l'alcène libre.

DLS : en volume diamètre centré sur 13.5nm, épaulement vers les plus grandes tailles (Figure 74).

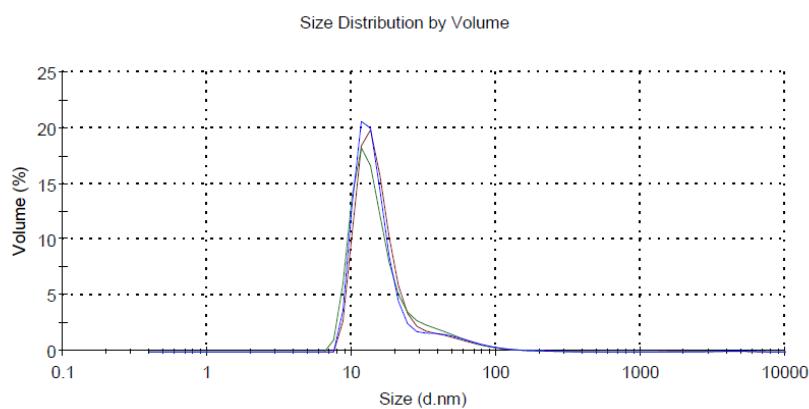
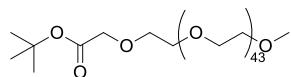


Figure 74 : Mesure DLS de la taille des micelles PDA-alcène-PEG₂₀₀₀ fonctionnalisées avec l'ester méthylique de l'acide 3-mercaptopropionique

Chapitre 3 : Micelles activables par un stimulus

I. Synthèse

Poly(ethylene glycol) methyl ether *tert*-butyl ester (masse moyenne 2000 g/mol) (III-1)



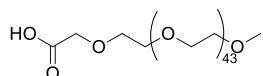
Du PEG₂₀₀₀ monomethylether (500 mg, 0.25 mmol, 1 équiv.) est solubilisé dans du THF (7 mL). Du NaH 60 % dans l'huile (50 mg, 1.25 mmol, 5 équiv.) est ajouté. Le milieu réactionnel est mis au bain à ultrasons jusqu'à obtenion d'un trouble blanc homogène. Le milieu réactionnel est agité à t.a. pendant 35 min. Du *t*Bu-bromoacetate (180 µL, 1.25 mmol, 5 équiv.) est ensuite ajouté. Le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote pendant 60 h. Le milieu réactionnel est neutralisé avec une solution de HCl aq à 2 M au-dessus d'un bain de glace. Le milieu réactionnel est extrait trois fois au DCM, les phases organiques sont séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées à sec. Le résidu est dissous dans du DCM et précipité dans l'éther deux fois. Le produit est obtenu sous forme de solide blanc (493 mg, 0.24 mmol).

Rendement : 95 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.02 (s, 2H), 3.60–3.86 (m, 176H), 3.38 (s, 3H), 1.47 (s, 9H)

Masse (MeOH) : ESI(+), m/z = 2107 [M+Na]⁺, m/z = 2124 [M+K]⁺

Poly(ethylene glycol) methyl ether carboxylic acid (masse moyenne 2000 g/mol) (III-2)



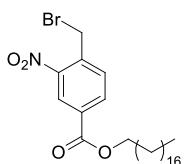
III-1 (493 mg, 0.24 mmol) est dissous dans du DCM (20 mL) et du TFA (10 mL) est ajouté. Le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote pendant 1 h puis il est évaporé à sec. Le résidu est dissous dans de l'acétone et évaporé à sec. Le résidu brut est dissous dans du DCM et précipité dans l'éther trois fois. Un solide blanc (401 mg, 0.20 mmol) est obtenu.

Rendement : 82 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.15 (s, 2H), 3.42–3.84 (m, 176H), 3.37 (s, 3H)

Mass (MeOH) : ESI(+), m/z = 2050 [M+Na]⁺

octadecyl 4-(bromomethyl)-3-nitrobenzoate (III-3)



À une solution d'acide 3-nitro-4-(bromomethyl)benzoïque (200 mg, 0.77 mmol, 1 équiv.), d'alcool stéarylïque (208 mg, 0.77 mmol, 1 équiv.) et de DMAP (9.4 mg, 0.077 mmol, 0.1 équiv.) dans du DCM (3 mL) est ajouté du DCC (159 mg, 0.77 mmol, 1 équiv.) dans du DCM (1 mL) sous azote à 0 °C. Le milieu réactionnel est agité à 0 °C pendant 1 h puis à t.a. sous azote pendant 20 h. La dicyclohexylurée formée est filtrée sur coton, le filtrat est évaporé à sec. Le résidu brut est solubilisé dans du DCM et pré-absorbé sur silice pour être purifié sur colonne de silice (hexane 100 % -> hexane/EtOAc 9:1). Le produit isolé (240 mg, 0.47 mmol) est obtenu.

Rendement : 61 %

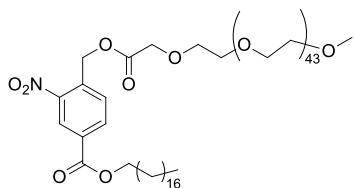
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.65 (d, *J* = 1.83 Hz, 1H), 8.25 (dd, *J* = 1.65, 8.05 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.05 Hz, 1H), 4.85 (s, 2H), 4.36 (t, *J* = 6.68 Hz, 2H), 1.73–1.83 (m, 2H), 1.28–1.49 (m, 8H), 1.25 (s, 24H), 0.84–0.91 (m, 4H), en accord avec le produit attendu.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 164.0, 148.0, 136.9, 134.1, 132.8, 132.1, 126.5, 66.2, 31.9, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 28.6, 27.9, 25.9, 22.7, 14.1

Massé (MeOH) : ESI(+), m/z = 534 $[M+Na]^+$, m/z = 536 $[M+Na+2]^+$, ESI(-), m/z = 510 $[M-H]^-$, m/z = 512 $[M-H+2]^-$ en accord avec le produit attendu.

IR : 1717.76 cm^{-1} (carbonyle de l'ester), 1533.82 cm^{-1} , 1334.52 cm^{-1} (nitro aromatique), 1293.22 cm^{-1} , 1262.60 cm^{-1} (C-O ester)

Amphiphile photosensible C₁₈-NB-PEG (III-4)



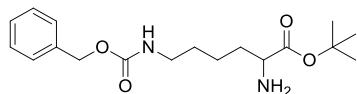
Les produits **III-2** (264 mg, 0.13 mmol, 1 équiv.) et **III-3** (83 mg, 0.16 mmol, 1.2 équiv.) sont mis en solution dans de l'ACN (4 mL). Du DBU (20 μ L, 0.13 mmol, 1 équiv.) dans de l'ACN (1 mL) est ajouté au goutte à goutte à la solution précédente. La solution passe de blanche à rose-orange. Le milieu réactionnel est chauffé à 50 °C sous azote pendant 19 h. Le milieu réactionnel est évaporé à sec. Le résidu brut est dissous dans du DCM et lavé à l'eau. La phase aqueuse est extraite deux fois avec du DCM. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées à sec. Le solide est dissous dans du DCM et lavé avec une solution saturée de K₂CO₃, la solution devient orange. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée à sec. Le solide obtenu (268 mg) est dissous dans du DCM et est précipité dans l'éther trois fois. Un solide blanc (210 mg, 0.09 mmol) est obtenu.

Rendement : 66 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.73 (d, J = 1.83 Hz, 1H), 8.29 (dd, J = 1.74, 8.14 Hz, 1H), 7.70 (d, J = 8.05 Hz, 1H), 5.64 (s, 2H), 4.37 (t, J = 6.77 Hz, 2H), 4.29 (s, 2H), 3.52–3.84 (m, 176H), 3.38 (s, 3H), 1.72–1.84 (m, 2H), 1.15–1.50 (m, 30H), 0.78–0.92 (m, 3H) en accord avec le produit attendu.

Masse (MeOH) : ESI(+), m/z = 1260.3 [M+K+Na]²⁺

tert-butyl 2-amino-6-(((benzyloxy)carbonyl)amino)hexanoate (III-6)



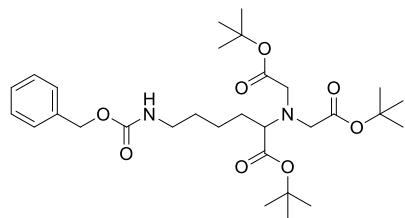
À une suspension (laiteuse) de *N*-benzyloxycarbonyl-L-Lysine (1 g, 3.6 mmol, 1 équiv.) dans du *tert*-butyl acetate (12 mL) est ajouté HClO_4 (460 μL , 5.6 mmol, 1.6 équiv.) (la solution devient incolore et limpide, réaction exothermique). Le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote pendant 22 h. Le milieu réactionnel est extrait avec de l'eau et une solution aqueuse de HCl 0.5 N. Les phases aqueuses sont rassemblées et le pH est ajusté à 9 avec une solution de K_2CO_3 à 10 % dans l'eau. La phase aqueuse résultante est extraite au DCM trois fois. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 , filtrées et évaporées à sec. Une huile incolore (646 mg, 1.9 mmol) est obtenue.

Rendement : 53 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.28–7.40 (m, 5H), 5.01–5.20 (m, 2H), 4.75–4.89 (m, 1H), 3.29 (t, J = 6.04 Hz, 1H), 3.20 (q, J = 6.59 Hz, 2H), 1.35–1.76 (m, 15H) en accord avec le produit attendu.

Masse (MeOH) : ESI(+), m/z = 337.2 [M+H]⁺

di-*tert*-butyl-2,2'-(6-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-1-(*tert*-butoxy)-1-oxohexan-2-yl)azanediyil diacetate (III-7)



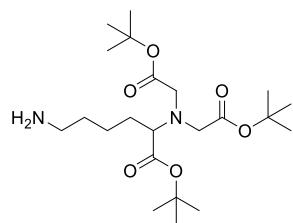
III-6 (626 mg, 1.9 mmol, 1 équiv.) est dissous dans de l'acétonitrile (13 mL) (suspension laiteuse). NaHCO₃ (353 mg, 4.2 mmol, 2.2 équiv.) et du *tert*-butyl-bromoacetate (840 µL, 5.7 mmol, 3 équiv.) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité à reflux sous azote pendant 18 h. Le milieu réactionnel est concentré sous vide. Le résidu est repris dans l'eau et extrait avec EtOAc deux fois. La phase organique est lavée avec une solution de saumure deux fois, séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée évaporée à sec. Le résidu brut est solubilisé dans du DCM et est purifié sur colonne de silice (hexane/EtOAc 8:2). Une huile (819 mg, 1.44 mmol) est obtenue.

Rendement : 76 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.28–7.42 (m, 5H), 5.08 (s, 2H), 3.35–3.54 (m, 4H), 3.29 (t, *J* = 7.50 Hz, 1H), 3.10–3.24 (m, 2H), 1.38–1.68 (m, 33H) en accord avec le produit attendu.

Masse (MeOH) : ESI(+), *m/z* = 565.5, [M+H]⁺

di-*tert*-butyl 2,2'-(6-amino-1-(*tert*-butoxy)-1-oxohexan-2-yl)azanediyldiacetate (III-8)



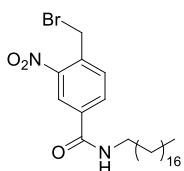
Du Pd/C 5 wt% (151 mg, 0.071 mmol, 0.05 équiv.) est ajouté à une solution de **III-7** (800 mg, 1.42 mmol, 1 équiv.) dans du MeOH (16 mL). Le milieu réactionnel est agité à t.a. sous 1 atm de H₂ pendant 3 h. Le milieu réactionnel est filtré sur célite, le filtrat est évaporé à sec sous vide. Une huile incolore (616 mg, 0.071 mmol) est obtenue.

Rendement : > 99 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.38–3.55 (m, 4H), 3.30 (t, J = 7.50 Hz, 1H), 2.67 (t, J = 6.77 Hz, 2H), 1.22–1.73 (m, 33H) en accord avec le produit attendu.

Masse (MeOH) : ESI(+) , m/z = 375.4 [M-Boc+H]⁺, ESI(-) , m/z = 373.2 [M-Boc-H]⁻

4-(bromomethyl)-3-nitro-N-octadecylbenzamide (III-9)

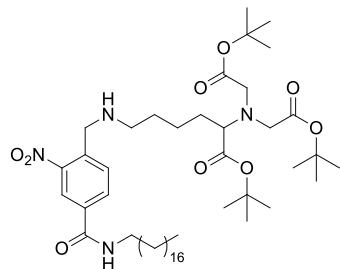


À une solution d'acide 3-nitro-4-(bromométhyl)benzoïque (600 mg, 2.32 mmol, 1 équiv.), et de DMAP (30 mg, 0.12 mmol, 0.05 équiv.) dans du DCM (4 mL) sont ajoutés du DCC (476 mg, 2.30 mmol, 1 équiv.) dans du DCM (4 mL) sous azote à 0 °C. De l'octadecylamine (626 mg, 2.32 mmol, 1 équiv.) dans du DCM (11 mL) est ensuite ajoutée. Le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote pendant 48 h. Le précipité est filtré sur fritté de porosité 4, le filtrat est évaporé à sec. Le résidu brut est solubilisé dans du DCM et est pré-absorbé sur silice pour être purifié sur colonne (hexane/EtOAc 95:5 -> hexane/EtOAc 7:3). Un solide blanc (433 mg, 0.86 mmol) est obtenu.

Rendement : 37 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.30–8.47 (m, 1H), 7.94–8.11 (m, 1H), 7.67 (d, J = 8.05 Hz, 1H), 6.15 (br. s., 1H), 4.85 (s, 2H), 3.37–3.54 (m, 2H), 1.25–1.72 (s, 32H), 0.88 (t, J = 6.68 Hz, 3H) en accord avec le produit attendu.

C₁₈-NB-NTA-Boc (III-10)



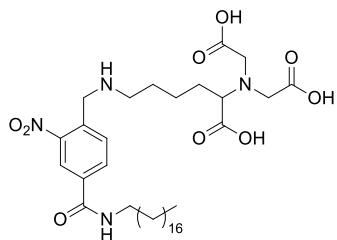
Le produit **III-9** (430 mg, 0.84 mmol, 1 équiv.) est solubilisé dans du DCM (33 mL). Le produit **III-8** (344 mg, 0.80 mmol, 1 équiv.) dans du DCM (2.430 mL) est ajouté au goutte à goutte. De la TEA (110 μ L, 0.84 mmol, 1 équiv.) est ajoutée, le pH est de 10, le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote pendant 4.5 h. Le milieu réactionnel est évaporé à sec. Le brut est solubilisé dans du DCM et est purifié sur colonne (élution DCM 100% -> DCM/MeOH 96:4). Une mousse jaune (276 mg, 0.34 mmol) est obtenue.

Rendement : 40 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.31 (d, J = 1.83 Hz, 1H), 8.00 (dd, J = 1.83, 8.05 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 8.05 Hz, 1H), 6.25 (s, 1H), 4.09 (s, 2H), 3.39–3.54 (m, 6H), 3.30 (t, J = 7.41 Hz, 1H), 2.61 (t, J = 6.50 Hz, 2H), 1.20–1.69 (m, 65H), 0.82–0.91 (m, 3H) en accord avec le produit attendu.

Mass (MeOH) : ESI(+), m/z = 861 [M+H]⁺, m/z = 883 [M+Na]⁺, ESI(-), m/z = 859 [M-H]⁻, m/z = 895 [M+Cl]⁻

Amphiphile C₁₈-NB-NTA (III-11)



Le produit **III-10** (265 mg, 0.31 mmol) est solubilisé dans du DCM (11 mL) puis du TFA (5.5 mL) est ajouté. Le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote pendant 6.75 h. Le milieu réactionnel est évaporé à sec et le résidu est repris dans de l'acétone et évaporé trois fois. Le résidu brut (440 mg) est repris dans de l'eau (pH = 1). Le mélange est centrifugé, le lavage à l'eau est répété deux fois, le solide est récupéré. Un solide blanc (199 mg, 0.29 mmol) est obtenu.

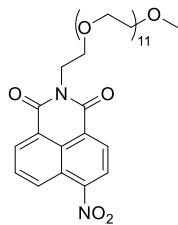
Rendement : 93 %

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 8.86 (t, *J* = 5.49 Hz, 1H), 8.60 (d, *J* = 1.46 Hz, 1H), 8.26 (d, *J* = 7.50 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 7.32 Hz, 1H), 4.45 (br. s., 2H), 3.19–3.47 (m, 7H), 2.97 (br. s., 2H), 1.23–1.63 (m, 38H), 0.76–0.93 (m, 3H) en accord avec le produit attendu.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 174.4, 174.2, 163.4, 148.2, 136.3, 133.1, 132.4, 123.8, 65.0, 54.9, 47.5, 47.4, 40.1, 31.3, 29.3, 29.1, 28.9, 28.8, 28.7, 26.5, 25.4, 22.8, 22.1, 14.0

Masse (MeOH) : ESI(+), *m/z* = 693 [M+H]⁺, ESI(-), *m/z* = 691 [M-H]⁻

PEG₅₅₀-nitro-naphthalimide (III-15)



III-14 (241 mg, 0.43 mmol, 1 équiv.) et de l'anhydride 4-nitro-1,8-naphthalique (104 mg, 0.43 mmol, 1 équiv.) sont solubilisés dans de l'EtOH (5 mL). Le milieu réactionnel est chauffé à reflux sous azote pendant 3.75 h. Le milieu réactionnel est évaporé à sec. Le brut est solubilisé dans un mélange DCM/MeOH 9:1 et purifié sur colonne de silice (DCM/MeOH 9:1). Une huile (250 mg, 0.32 mmol) est obtenue.

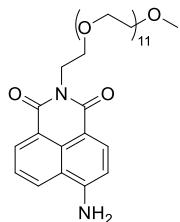
Rendement : 74 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.84 (d, *J* = 8.60 Hz, 1H), 8.73 (d, *J* = 7.32 Hz, 1H), 8.69 (d, *J* = 8.05 Hz, 1H), 8.41 (d, *J* = 7.87 Hz, 1H), 7.99 (t, *J* = 7.96 Hz, 1H), 4.44 (t, *J* = 5.95 Hz, 2H), 3.83 (t, *J* = 5.85 Hz, 2H), 3.49–3.73 (m, 40H), 3.37 (s, 3H) en accord avec le produit attendu.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 163.3, 132.5, 129.9, 129.9, 129.3, 129.1, 123.9, 123.7, 122.9, 71.9, 70.5, 70.5, 70.1, 67.7, 59.0, 53.4, 39.5

Masse (MeOH) : ESI(+), *m/z* = 807.9 [M+Na]⁺

PEG₅₅₀-amino-naphtalimide (III-16)



À une solution de **III-15** (213 mg, 0.27 mmol, 1 équiv.) dans l'EtOH (2 mL) est ajouté du Pd/C 5 wt %. (57 mg, 0.027 mmol, 0.1 équiv.). Le mélange est mis sous azote, puis le milieu réactionnel est agité à t.a. sous 1 atm de H₂ pendant 16.5 h. Le milieu réactionnel est filtré sur célite. Le filtrat est évaporé à sec. Une huile (191 mg, 0.25 mmol) est obtenue.

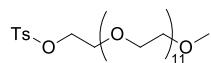
Rendement : 94 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.52 (d, *J* = 7.14 Hz, 1H), 8.31 (d, *J* = 8.23 Hz, 1H), 8.15 (br. s., 1H), 7.57 (t, *J* = 7.78 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 8.42 Hz, 1H), 5.33–5.56 (m, 2H), 4.41 (t, *J* = 5.95 Hz, 2H), 3.83 (t, *J* = 5.85 Hz, 2H), 3.47–3.74 (m, 44H), 3.44 (d, *J* = 3.66 Hz, 2H), 3.36 (s, 3H) en accord avec le produit attendu.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 164.7, 164.0, 133.9, 131.4, 124.6, 119.9, 109.2, 71.9, 70.6, 70.5, 70.4, 70.3, 70.3, 68.2, 59.0, 38.9 il manque des signaux aromatiques.

Masse (MeOH) : ESI(+), *m/z* = 777.8 [M+Na]⁺, *m/z* = 400.5 [M+2Na]²⁺, ESI(-), *m/z* = 753.8 [M-H]⁻

Poly(ethylene glycol) methyl ether tosylate (Masse moyenne 550 g/mol) (III-12)



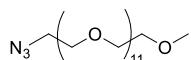
Du PEG₅₅₀ monomethylether (1 mL, 1.9 mmol, 1 équiv.) et du chlorure de tosyle (1.8 g, 9.7 mmol, 5.1 équiv.) sont solubilisés dans du DCM (20 mL). De la TEA (1.3 mL, 9.7 mmol, 5.1 équiv.) est ajoutée. Le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote pendant 21.5 h. Le milieu réactionnel est lavé trois fois avec une solution aqueuse de HCl 1 M et une fois avec de la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée à sec. Le résidu brut obtenu (2.5 g) est solubilisé dans du DCM et est purifié sur colonne de silice (DCM/MeOH 9:1). Une huile marron (1,12 g, 1.6 mmol) est obtenue.

Rendement : 82 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.73–7.83 (d, J = 8.42 Hz, 2H), 7.29–7.39 (d, J = 8.60 Hz, 2H), 4.15 (t, J = 5.31 Hz, 2H), 3.46–3.74 (m, 46H), 3.37 (s, 3H), 2.44 (s, 3H)

Masse (MeOH) : ESI(+), m/z = 737.8 [M+Na]⁺

Poly(ethylene glycol) methyl ether azide (Masse moyenne 550 g/mol) (III-13)



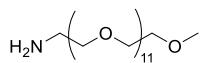
À une solution de **III-12** (1.07 g, 1.5 mmol, 1 équiv.) dans un mélange eau/acétone (1:1, v/v, 30 mL) sont ajoutés par portions de l'azoture de sodium (488 mg, 7.5 mmol, 5 équiv.) et de l'iodure de sodium (22 mg, 0.15 mmol, 0.1 équiv.). Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 18 h. L'acétone est évaporée. La phase aqueuse restante est extraite au DCM trois fois. Les phases organiques sont rassemblées, lavées à la saumure, séchées sur MgSO_4 , filtrées et évaporées à sec. Un liquide brun-orange (887 mg, 1.5 mmol) est obtenu.

Rendement : > 99 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 3.57–3.78 (m, 4H), 3.51–3.56 (m, 2H), 3.34–3.43 (m, 5H) en accord avec le produit attendu.

Masse (MeOH) : ESI(+), m/z 608.7 [M+Na]⁺

Poly(ethylene glycol) methyl ether amine (Masse moyenne 550 g/mol) (III-14)



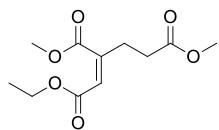
À une solution de **III-13** (863 mg, 1.47 mmol, 1 équiv.) dans un mélange EtOH/HCl (95:5, v/v, 30 mL) est ajouté du Pd/C 5 wt% (319 mg, 0.15 mmol, 0.1 équiv.). Le mélange est d'abord mis sous atmosphère d'azote puis agité à t.a. sous 1 atm de H₂ pendant 17 h. Le milieu réactionnel est filtré sur célite et concentré sous vide. Le résidu est repris dans du DCM et est lavé avec une solution aqueuse de K₂CO₃ (10 %). La phase aqueuse est extraite avec du DCM trois fois, les phases organiques sont séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées à sec. Une huile incolore (659 mg, 1.2 mmol) est obtenue.

Rendement : 80 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.60–3.68 (m, 40H), 3.53–3.56 (m, 6 H), 3.37 (s, 3H), 2.89 (t, *J* = 5.21 Hz, 2H), 2.08 (br. s., 2H) en accord avec le produit attendu.

Mass (MeOH) : ESI(+), $m/z = 560.6$ [M+H]⁺

(Z)-1-ethyl-2,4-dimethylbut-1-ene-1,2,4-tricarboxylate (III-19)



À une solution de triethyl phosphonoacetate (1.345 mL, 6.8 mmol, 1.2 équiv.) dans du THF anhydre (28 mL) est ajouté du NaH 95 % (217 mg, 8.6 mmol, 1.5 équiv.) à 0 °C sous azote, par portions. Une fois le dégagement de dihydrogène terminé, du dimethyl-2-oxoglutarate (830 µL, 5.7 mmol, 1 équiv.) est ajouté, entraînant la formation d'un précipité qui se dissout au cours de la réaction. Le milieu réactionnel est agité sous azote à 0 °C pendant 20 min. Une solution saturée de NH₄Cl est ajoutée au goutte à goutte au milieu réactionnel (7 mL). Le THF est évaporé et le résidu aqueux est extrait avec de l'EtOAc trois fois. Les phases organiques sont rassemblées, lavées à l'eau puis à la saumure, séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées à sec. Le résidu brut huileux (1.757 g) est dissous dans un mélange hexane/EtOAc 8:2 et est purifié sur colonne de silice (hexane/EtOAc 8:2). Une huile incolore (1.367 g, 6.7 mmol) est obtenue.

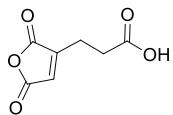
Rendement : 98 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 5.88 (t, J = 1.46 Hz, 1H), 4.17 (q, J = 7.14 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 2.64–2.71 (m, 2H), 2.50–2.57 (m, 2H), 1.27 (t, J = 7.14 Hz, 3H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 168.6, 164.7, 147.2, 121.3, 115.0, 60.9, 52.4, 51.9, 31.5, 29.2, 14.1

Masse (MeOH) : ESI(+), m/z = 245.1 [M+H]⁺, ESI(-), m/z = 243.1 [M-H]⁻

3-(2,5-dioxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)propanoic acid (III-20)



Le produit **III-19** (1.319 g, 5.4 mmol) est dissous dans une solution de KOH 1.6 M dans EtOH/H₂O 1:1 (17 mL), le milieu réactionnel devient jaune. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 1 h. L'éthanol est évaporé, la solution est acidifiée à pH 2 avec HCl 37 % puis extraite avec EtOAc deux fois. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée à sec. Un solide blanc (798 mg, 4.7 mmol) est obtenu.

Rendement : 87 %

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm) 5.95 (t, J = 1.28 Hz, 1H), 2.54– 2.72 (m, 4H)

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ (ppm) 176.6, 173.1, 168.6, 149.9, 120.2, 31.43, 28.77

Masse (H₂O) : ESI(+), m/z = 171.1 [M+H]⁺, anhydride ouvert : ESI(+), m/z = 189.1 [M+H]⁺, ESI(-), m/z = 187.1 [M-H]⁻

1-bromooctadecane (III-22)



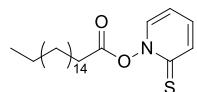
De l'alcool stéaryl (200 mg, 0.74 mmol, 1 équiv.) et de la triphénylphosphine (291 mg, 1.11 mmol, 1.5 équiv.) sont solubilisés dans du DCM anhydre (4 mL) sous azote. Du tétrabromométhane (368 mg, 1.11 mmol, 1.5 équiv.) est ajouté par petites portions. Le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote (il devient jaune puis se décolore au cours de la réaction) pendant 25 min. De l'eau (2 mL) est ajoutée. La phase organique est séparée, séchée sur MgSO_4 , puis purifiée sur plug de silice. Un solide (199 mg, 0.60 mmol) est obtenu.

Rendement : 81 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 3.41 (t, J = 6.86 Hz, 2H), 1.85 (m, 2H), 1.36–1.47 (m, 2H), 1.18–1.36 (m, 28H), 0.82–0.92 (t, J = 6.95 Hz, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 34.1, 32.8, 29.7, 29.5, 28.8, 28.2, 22.7, 14.1

2-thioxopyridin-1(2H)-yl stearate (III-24)



À une solution d'acide stéarique (569 mg, 2 mmol, 1 équiv.) dans du DCM anhydre (10 mL) sont ajoutés du chlorure d'oxalyle (341 µL, 4 mmol, 2 équiv.) et 1 goutte de DMF, un dégagement gazeux est observé. Le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote pendant 3 h. Le milieu réactionnel est évaporé à sec et le résidu est solubilisé dans du DCM anhydre (10 mL). Du N-oxyde de 2-mercaptopypyridine sous forme de sel de sodium (313 mg, 2.1 mmol, 1 équiv.) est ajouté. Le milieu réactionnel devient jaune vif, il est agité à t.a. sous azote à l'abri de la lumière pendant 30 min. Le milieu réactionnel est filtré rapidement sur coton. Le filtrat est évaporé. Un solide jaune (819 mg, 2 mmol) est obtenu.

Rendement : 100 %

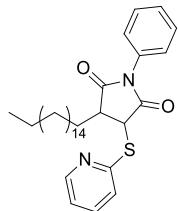
Chlorure d'acide :

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.84–2.91 (m, 2H), 1.66–1.75 (m, 2H), 1.17–1.40 (m, 28H), 0.82–0.92 (m, 3H)

Ester de Barton III-24 :

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.64–7.76 (m, 1H), 7.55 (td, J = 0.75, 7.09 Hz, 1H), 7.05–7.24 (m, 1H), 6.55–6.70 (m, 1H), 2.71 (t, J = 7.50 Hz, 2H), 1.81 (quin, J = 7.50 Hz, 2H), 1.18–1.34 (m, 28H), 0.87 (t, J = 6.68 Hz, 3H) en accord avec le produit attendu.

3-heptadecyl-1-phenyl-4-(pyridin-2-ylthio)pyrrolidine-2,5-dione (III-25)



Le produit **III-24** (360 mg, 0.92 mmol, 1 équiv.), et du N-phénylmaléinimide (797 mg, 4.6 mmol, 5 équiv.) sont solubilisés dans du DCM (6 mL) et irradiés avec une lampe de tungstène à 100 W pendant 1 h. Le milieu réactionnel est évaporé à sec. Le résidu brut obtenu (1.1 g) est solubilisé dans du DCM, pré-absorbé sur silice et purifié sur colonne (cyclohexane 100 % -> cyclohexane/EtOAc 7:3). Un solide blanc (337 mg, 0.64 mmol) est obtenu.

Rendement : 70 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 8.29 (d, *J* = 4.94 Hz, 1H), 7.45 - 7.58 (m, 3H), 7.33 - 7.43 (m, 3H), 7.22 (d, *J* = 8.05 Hz, 1H), 7.02 (dd, *J* = 5.49, 6.95 Hz, 1H), 3.90 (d, *J* = 5.67 Hz, 1H), 3.23 (td, *J* = 5.21, 8.78 Hz, 1H), 1.99–2.17 (m, 1H), 1.73–1.91 (m, 1H), 1.48–1.65 (m, 2H), 1.15–1.37 (m, 28H), 0.79–0.94 (m, 3H) en accord avec le produit attendu et la littérature.¹¹²

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 177.3, 174.4, 156.0, 149.0, 136.6, 132.5, 129.1, 128.4, 126.4, 126.3, 122.1, 120.2, 47.1, 46.9, 31.9, 30.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 26.5, 22.7, 14.1 en accord avec la littérature.

Masse (DCM/MeOH) : ESI(+), *m/z* = 523.5 [M+H]⁺, *m/z* = 545 [M+Na]⁺, *m/z* = 1067 [2M+Na]⁺, ESI(-), *m/z* = 521 [M-H]⁻

II. Assemblage des micelles et protocoles d'irradiation

Assemblage des micelles photosensibles

Amphiphiles C₁₈-NB-PEG₂₀₀₀ : Une solution à 10 mg/mL d'amphiphiles dans l'eau est préparée par agitation au vortex puis elle est filtrée sur filtre Nylon 0.2 µm. Les micelles obtenues ont un diamètre centré autour de 13 nm en volume d'après les mesures DLS.

Amphiphiles C₁₈-NB-NTA : Une solution à 10 mg/mL en amphiphiles est préparée en solubilisant l'amphiphile dans une solution aqueuse de NaOH à pH 12, elle est mise au bras à ultrasons 10 min puis filtrée sur membrane Nylon 0.2 µm. Les micelles ont un diamètre centré autour de 9 nm en volume.

Encapsulation des UCNP

À une solution de 10 mg/mL de micelles photosensibles est ajoutée une solution d'UCNP dans le cyclohexane. La solution est soniquée au bras à ultrasons pendant 10 min. L'opération est reproduite une deuxième fois (deux encapsulations successives). La solution est ensuite filtrée sur membrane Nylon 0.2 µm. Le Gd des UCNP est dosé par ICP-MS. Les micelles chargées avec des UCNP ont un diamètre centré autour de 95 nm.

Protocoles d'irradiation des micelles photosensibles

Une solution de micelles est irradiée à 365 nm dans une cuve de quartz à une distance de 10 cm de la lampe. Pour l'irradiation à 980 nm la solution est irradiée dans une cuve de quartz avec un laser de densité de puissance 6 W/cm².

Encapsulation rouge du Nil dans les micelles C₁₈-NB-PEG₂₀₀₀

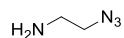
L'amphiphile C₁₈-NB-PEG₂₀₀₀ (12 mg) est solubilisé dans de l'eau déminéralisée (2 mL). La solution est filtrée sur membrane Nylon 0.2 µm. Les micelles ont un diamètre centré autour de 11.3 nm en volume.

Une solution de rouge du Nil à 0.1 mg/mL dans l'EtOH (10 µL) est ajoutée à une solution de micelles (1 mL) et mis au bras à ultrasons trois fois 10 min. La solution est filtrée sur filtre Nylon 0.2 µm. [Rouge du Nil] = 2.8 µM (dosage par mesure de l'absorbance à 553 nm dans EtOH, un échantillon de la solution de micelles (20 µL) est dilué avec de l'EtOH (180 µL)). Micelles de diamètre centré autour de 16.6 nm en volume.

Chapitre 4 : Ciblage actif des cellules cancéreuses avec les micelles PDA-PEG₂₀₀₀

I. Synthèse

2-azidoethanamine (IV-2)

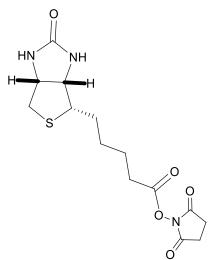


Du 2-bromoethylamine hydrobromide (1 g, 4.9 mmol, 1 équiv.) et de l'azoture de sodium (952 mg, 14.6 mmol, 3 équiv.) sont dissous dans de l'eau (4 mL). Le milieu réactionnel est chauffé à 75 °C pendant 44 h. Le milieu réactionnel est refroidit à t.a. KOH (1.6 g) et Et₂O (4 mL) sont ajoutés. La solution est extraite trois fois avec Et₂O. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée, et concentrée. Un liquide incolore (358 mg, 3.14 mmol) est obtenu.

Rendement : 64 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.37 (t, *J* = 5.58 Hz, 2H), 2.89 (t, *J* = 5.67 Hz, 2H), 1.44 (s, 2H) en accord avec le produit attendu et la littérature.¹⁵¹

Biotine-NHS (IV-1)

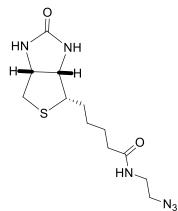


De la (D)-Biotine (200 mg, 0.819 mmol, 1 équiv.) et du *N*-hydroxysuccinimide (94 mg, 0.819 mmol, 1 équiv.) sont dissous dans du DMF anhydre (6 mL) (solubilisation après chauffage). Du DCC (220 mg, 1.06 mmol, 1.3 équiv.) est additionné et la solution est agitée à température ambiante pendant 42 h. La dicyclohexylurée est filtrée, le filtrat est concentré et le résidu est précipité dans Et₂O. Le précipité blanc est lavé à l'isopropanol deux fois. Après recristallisation dans l'isopropanol, une poudre blanche (147.8 mg, 0.43 mmol) est obtenue.

Rendement : 53 %

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 6.42 (s, 1H), 6.36 (s, 1H), 4.25 - 4.33 (m, 1H), 4.15 (m, *J* = 4.39 Hz, 1H), 3.10 (m, 1H), 2.76–2.87 (m, 5H), 2.67 (t, *J* = 7.41 Hz, 2H), 2.55 (m, 1H), 1.57–1.70 (m, 3H), 1.34–1.55 (m, 3H) en accord avec le produit attendu.

Biotine-N₃ (IV-3)



Les produits **IV-1** (37 mg, 0.108 mmol, 1 équiv.) et **IV-2** (93 mg, 0.216 mmol, 2 équiv.) sont dissous dans du DMF (2 mL) puis de la TEA (160 µL, 1.2 mmol, 11.1 équiv.) est additionnée. La solution est agitée sous N₂ à t.a. pendant 21 h. Le milieu réactionnel est concentré sous vide et le résidu est purifié sur colonne de silice (EtOAc/MeOH 5:1). Une poudre blanche (28.2 mg, 0.091 mmol) est obtenue.

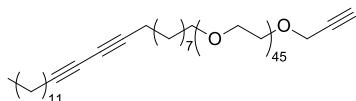
Rendement : 84 %

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 8.04 (t, J = 5.49 Hz, 1H), 6.43 (s, 1H), 6.36 (s, 1H), 4.30 (m, 1H), 4.10–4.15 (m, 1H), 3.22 (m, 2H), 3.06–3.12 (m, 1H), 2.82 (dd, J = 5.12, 12.44 Hz, 1H), 2.53–2.57 (m, 1H), 2.07 (t, J = 7.41 Hz, 2H), 1.20–1.66 (m, 6H) un signal pour 2 protons se trouve sous le pic de l'eau, en accord avec le produit attendu.

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 172.38, 162.67, 61.01, 59.17, 55.39, 49.98, 38.14, 35.12, 28.19, 28.03, 25.14. En adéquation avec la littérature¹⁵¹, le signal à 39.9 ppm manque, il est sans doute sous le pic du solvant.

Masse (EtOH) : ESI(+), m/z = 313.3 [M+H]⁺, ESI(-), m/z = 311.2 [M-H]⁻

DA-PEG₂₀₀₀-alcyne (IV-4)



Du **DA-PEG₂₀₀₀-OH** (300 mg, 0.128 mmol, 1 équiv.) est dissous dans du THF anhydre (5 mL), sous azote. Du NaH à 60 % dans l'huile (15 mg, 0.384 mmol, 3 équiv.) est introduit lentement. Le mélange est agité pendant 30 min à t.a. sous azote, la solution est orange. Du bromure de propargyle (100 µL, 0.898 mmol, 7 équiv.) est ajouté, lentement, et le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote (la solution est devenue brune) pendant 22 h. De l'eau est ajoutée au milieu réactionnel, le THF est évaporé et le milieu réactionnel est extrait quatre fois au DCM. Les phases organiques sont séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées à sec. Le solide est dissous dans du DCM, précipité dans Et₂O froid puis trituré dans l'éther. Un solide (214 mg, 0.09 mmol) est obtenu.

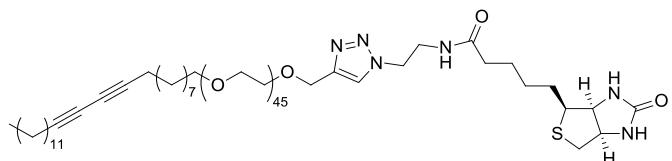
Rendement : 70 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.18–4.22 (d, J = 2.56 Hz, 2H), 3.42–3.81 (m, 180H), 3.41–3.49 (m, 2H), 2.42–2.45 (t, J = 2.38 Hz, 1H), 2.24 (t, J = 6.95 Hz, 4H), 1.45–1.61 (m, 6), 1.22–1.36 (m, 28H), 0.88 (t, J = 6.59 Hz, 3H) en accord avec le produit attendu.

¹H-NMR (400 MHz, DMF-d₇) : le CH₂ en alpha de l'alcyne vrai sort sous forme d'un doublet à 4.23 ppm

Masse : ESI(+), m/z = 2403 [M+Na]⁺, m/z = 2419 [M+K]⁺, m/z = 1191 [M+2H]²⁺, m/z = 1213 [M+2Na]²⁺, m/z = 1221 [M+K+Na]²⁺

Amphiphile DA-PEG₂₀₀₀-Biotine (IV-5)



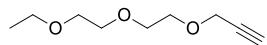
Les produits **IV-4** (50 mg, 0.021 mmol, 1 équiv.), **IV-3** (7.9 mg, 0.025 mmol, 1.2 équiv.), le **ligand 1** (1 mg, $2.1 \cdot 10^{-3}$ mmol, 0.1 équiv.) et de l'ascorbat de sodium (4.2 mg, 0.021 mmol, 1 équiv.) sont introduits dans un ballon poire de 5 mL. De l'eau dégazée (65 μ L) et du *t*BuOH dégazé (275 μ L) sont ajoutés, le tout est solubilisé au bras à ultrasons. Une solution de triéthanolamine dans de l'eau dégazée (50 mg/mL, 60 μ L, 0.021 mmol, 1 équiv.) est ajoutée puis une solution de sulfate de cuivre pentahydraté dans de l'eau dégazée (5 mg/mL, 100 μ L, $2.1 \cdot 10^{-3}$ mmol, 0.1 équiv.) est ajoutée. La réaction est agitée à t.a. sous azote pendant 16 h. Le milieu réactionnel est lavé avec une solution aqueuse saturée de NH₄Cl, extrait au DCM, puis la phase organique est lavée à l'eau et à la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée à sec. Le résidu brut est solubilisé dans du DCM et purifié par colonne en phase normale au combiflash (colonne de 4 g, 100 % DCM à DCM/MeOH 9:1, fractions de 4 mL). Un solide (14 mg, 0.005 mmol) est obtenu.

Rendement : 25 %

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 8.04 (s, 1H), 7.96 (t, *J* = 5.67 Hz, 1H), 6.41 (s, 1H), 6.36 (s, 1H), 4.51 (s, 2H), 4.39 (t, *J* = 6.22 Hz, 2H), 4.27–4.34 (m, 1H), 4.11 (m, 1H), 3.41–3.72 (m, 182H), 3.08 (m, 1H), 2.82 (dd, *J* = 5.12, *J* = 12.26 Hz, 1H), 2.57–2.63 (m, 1H), 2.27 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H), 2.02 (t, *J* = 7.50 Hz, 2H), 1.13–1.51 (m, 40H), 0.80–0.88 (m, 3H), il manque le signal du CH₂ en alpha de l'amide, il est peut-être sous le signal de l'eau.

Masse (MeOH) : ESI(+), *m/z* = 1347 [M+2H]²⁺, ESI(+), *m/z* = 1391 [M+2Na]²⁺, ESI(+), *m/z* = 906 [M+Na+2H]³⁺

3-(2-(2-ethoxyethoxy)ethoxy)prop-1-yne (IV-6)

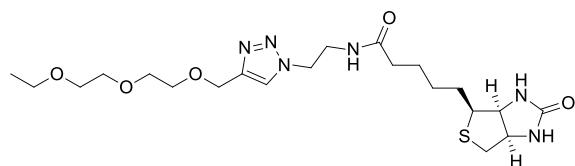


À une solution de NaH 60 % dans l'huile (320 mg, 8 mmol, 2 équiv.) dans du THF (11 mL) refroidie dans un bain de glace est ajoutée une solution de di(ethylene glycol) ethyl ether (0.540 mL, 4 mmol, 1 équiv.) dans le THF (8 mL). Le milieu réactionnel est agité pendant 15 min et du bromure de propargyle (80 % dans le toluène, 0.5 mL, 4.4 mmol, 1.1 équiv.) est ajouté au-dessus du bain de glace. Le milieu réactionnel est ensuite agité à t.a. sous azote pendant 18 h. Le milieu réactionnel est neutralisé avec de l'eau au-dessus d'un bain de glace. Le THF est évaporé, le résidu est extrait au DCM, lavé à l'eau et à la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée. Le résidu liquide brut obtenu (795 mg) est solubilisé dans un mélange DCM/EtOAc/MeOH et est pré-absorbé sur silice et purifié sur colonne de silice (hexane 100 % -> hexane/EtOAc 50:50). Un liquide jaune (556 mg, 3.2 mmol) est obtenu.

Rendement : 81 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 4.16 - 4.22 (m, 2H), 3.62 - 3.74 (m, 6H), 3.56 - 3.62 (m, 2H), 3.52 (q, J = 7.30 Hz, 2H), 2.38 - 2.44 (m, 1H), 1.20 (t, J = 6.77 Hz, 3H) en adéquation avec le produit souhaité.

***N*-(2-((2-(2-ethoxyethoxy)ethoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl)-5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamide (IV-7)**



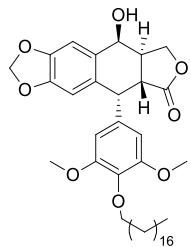
Les produits **IV-6** (14 mg, 0.04 mmol, 1 équiv.), **IV-3** (15 mg, 0.048 mmol, 1.2 équiv.), le **ligand 1** (2 mg, 4 10^{-3} mmol, 0.1 équiv.) et de l'ascorbate de sodium (8 mg, 0.04 mmol, 1 équiv.) sont introduits dans un ballon de 5 mL. De l'eau dégazée (180 μ L) et du *t*BuOH dégazé (500 μ L) sont ajoutés, le tout est solubilisé au bain à ultrasons. Une solution de triéthanolamine dans de l'eau dégazée (50 mg/mL, 120 μ L, 0.04 mmol, 1 équiv.) est ajoutée puis une solution de sulfate de cuivre pentahydraté dans de l'eau dégazée (5 mg/mL, 200 μ L, 4 10^{-3} mmol, 0.1 équiv.) est ajoutée. Le milieu réactionnel devient jaune. La réaction est agitée à t.a. sous N_2 pendant 19 h. Le milieu réactionnel est évaporé à sec. Le résidu brut est solubilisé dans du DCM et du MeOH et est pré-absorbé sur silice et purifié par colonne (DCM 100 % -> DCM/MeOH 9:1). Un solide blanc (11.3 mg, 0.02 mmol) est obtenu.

Rendement : 49 %

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 8.04 (s, 1H), 7.92–8.01 (m, 1H), 6.42 (s, 1H), 6.36 (s, 1H), 4.52 (s, 2H), 4.40 (t, J = 6.22 Hz, 2H), 4.27–4.34 (m, 1H), 4.13 (m, 1H), 3.36–3.60 (m, 12H), 3.09 (m, 1H), 2.82 (dd, J = 5.03, 12.35 Hz, 1H), 2.59 (m, 1H), 2.03 (t, J = 7.32 Hz, 2H), 1.19–1.51 (m, 6H), 1.09 (t, J = 7.04 Hz, 3H) en adéquation avec le produit attendu.

Masse (MeOH) : ESI(+), m/z = 485.3 [M+H]⁺, ESI(-), m/z = 483.5 [M-H]⁻

Épipodophyllotoxine à chaîne grasse (IV-8)



Sous azote, de la triphénylphosphine (393 mg, 1.5 mmol, 1.2 équiv.), du 1-octadecanol (405 mg, 1.5 mmol, 1.2 équiv.) et du DIAD (295 μ L, 1.5 mmol, 1.2 équiv.) sont ajoutés à une suspension de 4'-DMEP (500 mg, 1.25 mmol, 1 équiv.) dans du DCM anhydre (5 mL). Le milieu réactionnel est agité à t.a sous azote pendant 3.5 h. HCl 0.1 M (3 mL) est ajouté au milieu réactionnel qui est extrait avec Et₂O trois fois. Les phases organiques sont rassemblées et lavées à la saumure, séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées à sec. Le résidu brut est solubilisé dans un mélange Et₂O/cyclohexane 1:1 et purifié sur colonne de silice (Et₂O/cyclohexane 1:1 -> Et₂O/cyclohexane 7:3). Un solide (255 mg, 0.39 mmol) est obtenu.

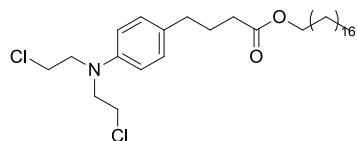
Rendement : 31 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 6.87 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 6.27 (s, 2H), 6.00 (d, *J* = 1.28 Hz, 1H), 5.97 (d, *J* = 1.28 Hz, 1H), 4.87 (t, *J* = 3.75 Hz, 1H), 4.61 (d, *J* = 5.12 Hz, 1H), 4.34–4.40 (m, 2H), 3.90 (t, *J* = 6.95 Hz, 2H), 3.72 (s, 6H), 3.27 (dd, *J* = 5.12, 14.09 Hz, 1H), 2.78–2.90 (m, 1H), 1.66–1.77 (m, 3H), 1.36–1.46 (m, 3H), 1.16–1.35 (m, 29H), 0.83–0.91 (m, 3H) en adéquation avec le produit attendu.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 175.0, 152.8, 148.5, 147.5, 136.8, 134.7, 132.1, 110.6, 108.9, 108.5, 101.6, 73.5, 67.6, 66.8, 56.4, 43.9, 40.5, 38.2, 31.9, 30.1, 29.7, 29.7, 29.5, 29.4, 25.8, 22.7, 14.1

Masse (MeOH) : ESI(+), *m/z* = 675.8 [M+Na]⁺, ESI(-), *m/z* = 651.7 [M-H]⁻

Dérivé à chaîne grasse du chlorambucil (IV-9)



Du DCC (151 mg, 0.73 mmol, 1.1 équiv.) est ajoutée à une solution d'alcool stéarylique (178 mg, 0.66 mmol, 1.1 équiv.), de chlorambucil (200 mg, 0.66 mmol, 1 équiv.) et de DMAP (8 mg, 0.066 mmol, 0.1 équiv.) dans du DCM (4 mL) à 0 °C. La réaction est agitée à 0 °C pendant 30 min puis à t.a. sous azote pendant 24 h. Le milieu réactionnel est filtré sur fritté de porosité 4 pour éliminer la dicyclohexyl urée formée. Le filtrat est lavé avec HCl 0.5 M deux fois puis à l'eau puis avec NaHCO₃ puis à la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée à sec. Le résidu brut est solubilisé dans du DCM et est purifié sur colonne de silice (DCM 100 %). Un solide blanc (285 mg, 0.57 mmol) est obtenu.

Rendement : 78 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 6.98–7.15 (m, 2H), 6.53–6.70 (m, 2H), 4.05 (t, J = 6.77 Hz, 2H), 3.66–3.73 (m, 4H), 3.58–3.66 (m, 4H), 2.51–2.59 (m, 2H), 2.31 (t, J = 7.50 Hz, 2H), 1.85–1.95 (m, 2H), 1.57–1.66 (m, 2H), 1.18–1.39 (m, 30H), 0.84–0.91 (m, 3H) en accord avec le produit attendu.

Masse (DCM/MeOH) : ESI(+), m/z = 556.7 [M+H]⁺, m/z = 578.7 [M+Na]⁺

II. Préparation des micelles

Procédure de formation des micelles PDA-PEG₂₀₀₀-alcyne/OMe (10:90 ; 25:75 ; 50:50 ; 0:100)

Un mélange d'amphiphiles **IV-4** et DA-PEG₂₀₀₀-OMe dans les proportions molaires souhaitées est mis en solution dans de l'eau déminéralisée de sorte à avoir une concentration totale en amphiphiles de 10 mg/mL. La solution est soniquée pendant 30 minutes au bras à ultrasons puis irradiées sous UV à 254 nm pendant 6 h. Le volume de la solution est ajusté au volume initial puis elle est filtrée sur membrane Nylon 0.2 µm. Les tailles des micelles sont mesurées par DLS. Elles ont chacune un diamètre centré sur 9.5 nm en volume.

Procédure de fonctionnalisation des micelles avec de la biotine

1.3 équivalents de **IV-3**, 0.2 équivalents de ligand (BimC4A)3 et 3 équivalents de Na-ascorbat sont introduits dans un ballon de 5 mL. 1.5 mL (1 équivalent d'alcyne) de micelles (à 10 mg/L) sont ajoutés, la solution est soniquée pour solubiliser la biotine-N₃, la solution est dégazée. 1 équivalent de triéthanolamine sont ajoutés à partir d'une solution de triéthanolamine dans de l'eau dégazée (5 mg/mL). 0.1 équivalents de CuSO₄, 5 H₂O prélevés à partir d'une solution de CuSO₄, 5 H₂O dans de l'eau dégazée (1 mg/mL) sont ajoutés à la solution. Le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote pendant 16 h. 10 équiv. d'HEDTA sous forme d'une solution aqueuse à 0.05 M sont ajoutés et le milieu réactionnel est agité à t.a. pendant 24 h. Le milieu réactionnel est ensuite purifié sur colonne d'exclusion stérique de type NAP-25 de GE-Healthcare. La concentration en micelles est recalculée à partir du facteur de dilution issu de cette purification. Nous vérifions par LCMS l'absence de biotine libre et nous vérifions par RMN du proton dans le DMF-d₇ que tous les alcynes ont été fonctionnalisés avec de la biotine. La taille des micelles est mesurée par DLS (Tableau 10).

Tableau 10 : Diamètre des différents lots de micelles

Type de micelles	Diamètre (en volume) (nm)
PDA-PEG ₂₀₀₀ -biotine/OMe 10:90	6
PDA-PEG ₂₀₀₀ -biotine/OMe 25:75	6
PDA-PEG ₂₀₀₀ -biotine/OMe 50:50	7

Encapsulation du tamoxifène

À une solution de 5 mg/mL de micelles (100 % PDA-PEG₂₀₀₀-OMe ou PDA-PEG₂₀₀₀-Biotine/OMe 25:75) est ajouté 10 % en volume d'une solution de tamoxifène dans le chloroforme dont la quantité en tamoxifène correspond à 5 % en masse de la quantité de micelles. Le mélange est traité au bras à ultrasons trois fois 10 minutes, filtré sur membrane PVDF 0.22 µM. La quantité de tamoxifène encapsulé est dosée par LC-MS après avoir prélevé 10 µL de la solution de micelles et l'avoir diluée avec 90 µL de MeOH et est de 5 %. Les micelles obtenues ont un diamètre centré sur 13 nm selon la DLS.

Fonctionnalisation des micelles avec l'oligonucléotide Spacer G

Le même protocole que celui de la fonctionnalisation des micelles avec la biotine est suivi avec pour différence que seuls 0.2 équivalents d'oligonucléotide pour 1 équivalent d'alcyne sont introduits dans

un volume de 0.1 mL (micelles à 10 mg/mL). La réaction est faite dans de l'eau sans DNases tout comme la préparation des micelles. La purification est réalisée sur NAP-5. Nous avons vérifié que l'oligonucléotide a bien été greffé sur les micelles par électrophorèse par l'équipe du Dr. Frédéric Ducongé (électrophorèse sur gel d'agarose, 1 % agar). Le diamètre des micelles est centré sur 13 nm en volume d'après les mesures DLS.

Procédure d'encapsulation du DiO dans les micelles

À une solution de micelles est ajouté une solution de DiO dans l'EtOH à 5 mg/mL (le volume ajouté est calculé de sorte à ajouter 1 % de DiO en masse par rapport à la masse de micelles dans la solution). La solution est mise au bras à ultrasons trois fois 10 minutes puis filtrée sur filtre Nylon 0.2 µm. Les tailles des micelles sont mesurées par DLS et consignées dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Tailles des micelles (mesures DLS)

Type de micelles chargées à 1 % en masse avec du DiO	Diamètre (en volume) (nm)
PDA-PEG ₂₀₀₀ -OMe	12
PDA-PEG ₂₀₀₀ -biotine/OMe 50:50	12
PDA-PEG ₂₀₀₀ -biotine/OMe 25:75	11
PDA-PEG ₂₀₀₀ -biotine/OMe 10:90	9.5
PDA-PEG ₂₀₀₀ -oligonucléotide/alcyne/OMe	14

Hybridation de l'aptamère sur les micelles fonctionnalisées avec l'oligonucléotide

Ces expériences sont réalisées par l'équipe du Dr. Frédéric Ducongé. L'hybridation est réalisée dans une solution de Tris-EDTA 1× et MgCl₂ (respectivement, 1× et 6 mM final), le programme d'hybridation est : 60 °C pendant 10 min et puis -1 °C/sec jusqu'à 25 °C. Le succès de l'hybridation est vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose.

III. Tests biologiques

Culture cellulaire MCF-7

Les cellules MCF-7 sont cultivées dans du RPMI complété (RPMI + 10 % SVF + 1 % PS) dans des flasques adhérentes. Pour récupérer les cellules, le milieu est aspiré, la flasque est lavée avec du PBS, de la trypsine est ajoutée, la flasque est mise 5 min à l'incubateur. Du milieu de culture est utilisé pour transférer dans un tube Falcon. Centrifugation à 1250 tours/min pendant 7 min. Le surnageant est aspiré et le culot est repris dans du milieu de culture.

Test MTT sur la lignée de cellules MCF-7

Des plaques de 96 puits sont préparées avec 5000 cellules/puits contenues dans 50 μ L de milieu de culture et mises à incuber à 37 °C pendant 24 h. 50 μ L de composés dilués dans PBS + Ca + Mg sont ajoutés, et mis à incuber à 37 °C pendant une nuit. Le milieu est aspiré, 100 μ L de MTT à 0,5 mg/mL (dilution d'une solution à 5 mg/mL dans PBS+Ca+Mg dans le milieu de culture) sont ajouté et mis à incuber à 37 °C pendant 4 h. Le milieu est aspiré, 50 μ L de DMSO sont ajoutés et incubation pendant 10 min à 37 °C. Lecture de l'absorbance à 560 nm. Les solutions mères des composés à tester sont préparées dans le DMSO et sont diluées dans le PBS + Ca + Mg de manière à avoir 1 % en DMSO dans la solution finale.

Protocole internalisation cellulaire micelles : ces expériences sont réalisées par Nam NGUYEN QUANG (équipe du Dr. Frédéric Ducongé)

Micelles biotinylées :

Matériel :

- 6 plaques de 12 puits, culture cellulaire de MCF-7 pendant 3 jours, Vf = 500 μ L de RPMI complété SVFi 10 % et Antibiotiques 1 % ; les cellules étaient à 80 % de confluence
- 900 μ g de chaque micelles dans un Vf de 9 mL de DPBS Mg²⁺/Ca²⁺
- Trypsine-EDTA 1 ×

Protocole :

Le milieu des puits est aspiré. Lavage de 1mL avec du DPBS -/. 500 μ L de solution de micelles sont ajoutés dans chaque puits (100 μ g/mL). Chaque plaque correspond à un temps d'incubation (30, 60, 90, 120, 180, 240 min) à 37 °C. Le milieu d'incubation est ensuite aspiré. 2 lavages de 1 mL sont réalisés avec du DPBS -/. 100 μ L de trypsine sont ajoutés dans chaque puits. Incubation 3 min à 37 °C. 300 μ L de DPBS -/ complémenté avec du SVFi 10 % sont ajoutés pour inactiver la trypsine. Aspiration-refoulement pour décoller les cellules. Elles sont collectées dans des tubes eppendorfs, posés dans un bac à glace puis passées au cytomètre

Internalisation cellulaire après 90 min d'incubation et expérience de compétition avec de la biotine

Matériel :

- 3 plaques de 12 puits, culture cellulaire de MCF-7 pendant 3 jours, Vf = 500 μ L de RPMI complété SVFi 10 % et Antibiotiques 1 % ; les cellules étaient à 100 % de confluence

- solution DPBS Mg²⁺/Ca²⁺ et biotine 2 mM pH 7,36
- 150 µg de chaque micelles dans un Vf de 1,5 mL du DPBS Mg²⁺/Ca²⁺
- 150 µg de chaque micelles dans un Vf de 1,5 mL de solution de biotine à 2 mM

Protocole :

Pour la plaque « pré incubation avec de la biotine »

- le milieu des puits de la plaque "pré incubation" est aspiré. Lavage de 1 mL avec du DPBS -/-
- 500 µL de solution de biotine sont ajoutés à chaque puits de la plaque "préincubation"
- incubation de la biotine 1 h à 37 °C
- le milieu des puits est aspiré
- 500 µL de solution de micelles avec biotine sont ajoutés dans chaque puits (100 µg/mL)
- Incubation 90 min à 37 °C
- Le milieu d'incubation est ensuite aspiré. 2 lavages de 1 mL sont réalisés avec du DPBS -/-
- 100 µL de trypsine sont ajoutés dans chaque puits. Incubation 3 min à 37 °C
- 100 µL de DPBS -/- complémenté avec du SVFi 10 % sont ajoutés pour inactiver la trypsine
- aspiration-refoulement pour décoller les cellules. Elles sont collectées dans des tubes eppendorfs, posés dans un bac à glace.
- passage au cytomètre

Pour la plaque sans pré incubation

- le milieu des puits est aspiré. Lavage de 1 mL avec du DPBS -/-
- 500 µL de solution de micelles sans biotine est ajouté dans chaque puits (100 µg/mL)
- Incubation 90 min à 37 °C
- Le milieu d'incubation est ensuite aspiré. 2 lavages de 1 mL sont réalisés avec du DPBS -/-
- 100 µL de trypsine sont ajoutés dans chaque puits. Incubation 3 min à 37 °C
- 100 µL de DPBS -/- complémenté avec du SVFi 10 % sont ajoutés pour inactiver la trypsine
- aspiration-refoulement pour décoller les cellules. Elles sont collectées dans des tubes eppendorfs, posés dans un bac à glace.
- passage au cytomètre

Pour la plaque témoin

- le milieu des puits est aspiré. Lavage de 1 mL avec du DPBS -/-
- 3 puits incubés avec 500 µL de DPBS Mg²⁺/Ca²⁺ pendant 90 min
- 3 puits incubés avec 500µL de solution biotine 2 mM pendant 60 + 90 min
- Le milieu d'incubation est ensuite aspiré. 2 lavages de 1 mL sont réalisés avec du DPBS -/-
- 100 µL de trypsine sont ajoutés dans chaque puits. Incubation 3 min à 37 °C
- 100 µL de DPBS -/- complémenté avec du SVFi 10 % sont ajoutés pour inactiver la trypsine
- aspiration-refoulement pour décoller les cellules. Elles sont collectées dans des tubes eppendorfs, posés dans un bac à glace.
- passage au cytomètre
- Trypsine-EDTA 1 X

Micelles fonctionnalisées avec un aptamère :

Internalisation cellulaire après 30 min d'incubation des micelles fonctionnalisées avec l'aptamère ACE4G

Tableau 12 : Internalisation cellulaire des micelles fonctionnalisées avec l'aptamère ACE4G :

Échantillon	ACE4G	ACEAscrG	Micelles oligonucléotide	Micelles PDA-PEG ₂₀₀₀ -alcyne/OMe 50:50
[aptamère] _{voulue} ou [micelles] _{voulue} pour les contrôles	10 nM	10 nM	25 µg/mL	25 µg/mL
$V_{\text{micelles}} (\mu\text{L})$ [micelles oligonucléotide] = 1 mg/mL et [PDA-PEG ₂₀₀₀ -alcyne/OMe 50/50] = 5 mg/mL	/	/	12,5	2,5
$V_{\text{mélange aptamère-micelles}}$ [aptamère] _{totale} = 0,236 µM	21,2	21,2	/	/
$V_{\text{DPBS Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}}$ (µL)	373,8	373,8	382,5	392,5
V_{tRNA} (µL)	5	5	5	5
V_f (µL)	400	400	400	400

Cellules utilisées : MCF-7. Taille de la flask : 150 cm³

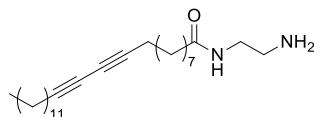
Enlever le surnageant de la flask. Laver avec 5 mL de DPBS--/-. Ajouter 1 mL de Versène. 5 min incubation à 37 °C puis aspiration refoulement pour détacher les cellules. transvaser dans Falcon 50 avec 5 mL de milieu complet (RPMI). Centrifugation swing out 1000 rpm (maximum 200-300 g) 5 min à 4 °C. Enlever le surnageant. Ajouter 500 µL de DPBS Mg²⁺/Ca²⁺. Prendre un échantillon de 50 µL de cellules, ajouter 50µL de DPBS et compter les cellules au FACS.

Ajouter les cellules dans les tubes de mixture préparés plus haut (Tableau 12). Incubation des cellules 30 min à 37 °C. Ajouter 5mL de DPBS Mg²⁺/Ca²⁺. Centrifugation swing out 1000 rpm (maximum 200-300 g) 5 min à 4 °C. Enlever le surnageant. Ajouter 5mL DPBS Mg²⁺/Ca²⁺. Centrifugation swing out 1000 rpm (maximum 200-300 g) 5 min à 4 °C. Compléter à 200µL avec du DPBS Mg²⁺/Ca²⁺. Aspirer/refouler. Analyse FACS (cytometre accuri C6). Garder les échantillons dans la glace pendant l'analyse.

Chapitre 5 : Les micelles comme outils de diagnostic par IRM

I. Synthèse

N-(2-aminoethyl)pentacosa-10,12-diynamide (V-1)



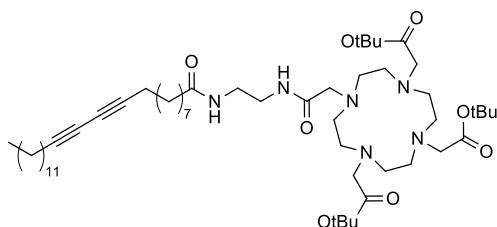
Du 1-(10,12-Pentacosadiynoyloxy)-2,5-pyrrolidinedione (500 mg, 1.06 mmol, 1 équiv.) est dissous dans du DCM anhydre (6 mL). De l'éthylènediamine (0,7 mL, 10.6 mmol, 10 équiv.) est ajoutée rapidement et le milieu réactionnel est agité à t.a. sous N₂, à l'abri de la lumière pendant 6 h. Le milieu réactionnel est lavé à l'eau et à la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée à sec. Un solide blanc (417 mg, 1.06 mmol) est obtenu.

Rendement : 100 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 5.90 (br. s., 1H), 3.30 (q, J = 5.73 Hz, 2H), 2.83 (t, J = 5.85 Hz, 2H), 2.24 (t, J = 6.95 Hz, 4H), 2.15–2.21 (m, 2H), 1.14–1.70 (m, 32H), 0.80–0.93 (m, 3H)

Masse (MeOH) : ESI(+), m/z = 417.6 [M+H]⁺

tri-tert-butyl 2,2',2''-(10-(2-oxo-2-((2-(pentacosa-10,12-diynamido)ethyl)amino)ethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate (V-2)



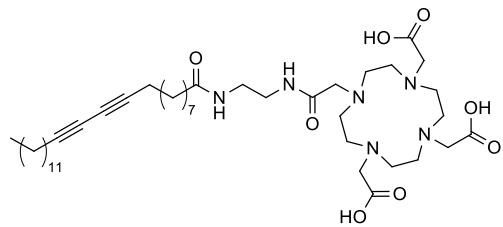
Du DOTA-tris-*t*Bu-ester (100 mg, 0.17 mmol, 1 équiv.), **V-1** (71 mg, 0.17 mmol, 1 équiv.), de l'EDC,HCl (3 mg, 0.19 mmol, 1.1 équiv.) et de l'HOBt (35 mg, 0.26 mmol, 1.5 équiv.) sont mis en solution dans du DCM (2 mL). De la TEA (23 µL, 0.17 mmol, 1 équiv.) est ajoutée. Le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote pendant 15 h. Le milieu réactionnel est évaporé à sec. Le résidu est repris dans du DCM, lavé à l'eau et à la saumure. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée à sec. Le résidu brut est solubilisé dans du DCM et purifié sur colonne de silice (DCM 100 % -> DCM/MeOH 9:1). Un solide blanc pâteux (100 mg, 0.10 mmol) est obtenu.

Rendement : 61 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 9.15 (br. s., 1H), 8.43 (br. s., 1H), 3.36–3.50 (br. s., 9H), 2.29–2.40 (m, 4H), 2.15–2.29 (m, 6H), 1.41–1.55 (m, 29H), 1.25–1.33 (s, 26H), 0.84–0.92 (m, 3H) tous les signaux ne sont pas visibles, présence de signaux larges à cause des amines

Masse (MeOH) : ESI(+), m/z = 994 [M+Na]⁺, ESI(-), m/z = 970 [M-H]⁻, ESI(-), m/z = 1005 [M+Cl]⁻

DA-DOTA (V-3)



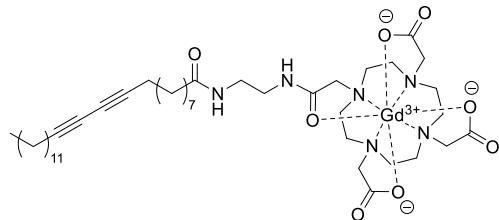
Le produit **V-2** (96 mg, 0.10 mmol) est solubilisé dans du DCM (4 mL) et du TFA (2 mL) est ajouté. Le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote pendant 10 h. Le milieu réactionnel est évaporé à sec, le résidu est repris dans de l'acétone, et évaporé. Cela est répété trois fois puis le résidu est repris dans le DCM et évaporé à sec. Une d'huile/cire (93 mg, 0.10 mmol) est obtenue. Le produit est obtenu sous forme de sels de TFA.

Rendement : quantitatif

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 8.61 (br. s., 1H), 7.90 (t, J = 5.21 Hz, 1H), 4.10 (br. s., 2H), 3.87 (br. s., 2H), 3.48–3.08 (br. s, 23H), 2.76 (d, J = 4.21 Hz, 2H), 2.27 (t, J = 6.86 Hz, 4H), 2.06 (t, J = 7.50 Hz, 2H), 1.37–1.56 (m, 6H), 1.21–1.37 (m, 28H), 0.77–0.90 (m, 3H) en adéquation avec le produit attendu

Masse (MeOH) : ESI(+), m/z = 804 [M+H]⁺, m/z = 825 [M+Na]⁺, ESI(-), m/z = 802 [M-H]⁻

DA-DOTA-Gd (V-4)

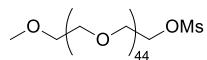


À **V-3** (0.21 mmol, 1 équiv.) dans de l'eau déminéralisée (2 mL) (le pH est ajusté à 5.5 avec des solutions aqueuses de KOH 0.1 M et HCl dilué) est ajouté du Gadolinium (III) chloride hydrate (35 mg, 0.10 mmol, 0.5 équiv.), le pH est ajusté à 5.5 avec KOH 0.1 M. Le milieu réactionnel est chauffé à 60 °C pendant 17 h. L'eau est évaporée. La moitié du résidu brut est purifiée par LCMS préparative sur une Colonne Waters XSelect Fluorophénol 150 × 19 mm en 5 microns (élution : H₂O/ACN 95:5 -> ACN 100 %). Un solide blanc (25 mg, 0.05 mmol) est obtenu.

Rendement : 25 %

Masse (eau) : ESI(+), m/z = 958.6 [M+H]⁺, ESI(-), m/z = 956.3 [M-H]⁻

Poly(ethylene glycol) methyl ether mesylate (masse moyenne 2000 g/mol) (V-5)

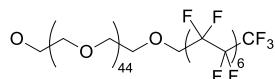


Du PEG₂₀₀₀ monomethylether (2 g, 1 mmol, 1 équiv.) est solubilisé dans du DCM anhydre (20 mL). De la TEA (0.670 mL, 5 mmol, 5 équiv.) est ajoutée et du chlorure de mésyle (600 mg, 5.3 mmol, 5.3 équiv.) de. Le milieu réactionnel est agité à t.a. sous azote pendant 48 h. Le milieu réactionnel est lavé avec une solution aqueuse de HCl 1 M trois fois puis avec de la saumure. La phase organique est évaporée à sec, reprise dans un minimum de DCM et de l'éther froid est ajouté. Le produit est récupéré par précipitation. Un solide (1.8 g, 0.9 mmol) est obtenu.

Rendement : 90 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.34–4.41 (m, 2H), 3.46–3.87 (m, 178H), 3.38 (s, 3H), 3.08 (s, 3H)

Amphiphile C₁₄-perfluoré-PEG₂₀₀₀ (V-6)



Du perfluoro-1-tetradecanol (1 g, 1.4 mmol, 4.2 équiv.) est séché sous rampe à vide et solubilisé dans du THF anhydre (5 mL). Du NaH 60 % dans l'huile (40 mg, 1.4 mmol, 4.2 équiv.) est lavé trois fois au pentane et séché. La solution de perfluoro-1-tetradecanol dans le THF est ajoutée, le milieu réactionnel est agité à 70 °C pendant 30 minutes. V-5 (700 mg, 0.33 mmol, 1 équiv.) dans du THF anhydre (5 mL) est ajouté et le milieu réactionnel est agité à 70 °C sous azote pendant 48 h.

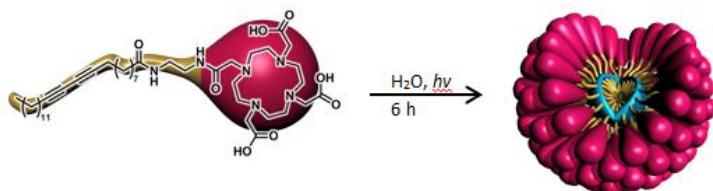
Le THF est évaporé, le résidu est repris dans du DCM, filtré sur cérite. Le filtrat est évaporé, puis le résidu est repris dans un minimum de DCM et est précipité dans de l'éther froid. De la poudre blanche (450 mg, 0.7 mmol) est récupérée.

Rendement : 50 %

¹⁹F-NMR (D₂O) δ (ppm) –83.13, –123.03

II. Préparation des micelles

Assemblage des micelles à partir de l'amphiphile DA-DOTA



30 mg de **V-3** sont solubilisés dans 3 mL d'eau déminéralisée. La solution est soniquée au bras à ultrasons pendant 10 min puis mise sous à UV 254nm pendant 6 h. La solution est ensuite filtrée sur filtre Nylon 0.2 µm. Le diamètre mesuré par DLS est centré sur 7 nm en volume.

Protocole de détermination de la présence de Gd non chélaté avec l'Arsenazo III

Prélever 5 µL du milieu à doser et y ajouter 20 µL d'une solution d'Arsenazo III à $6 \cdot 10^{-4}$ M dans du tampon acétate. Si la solution devient verte c'est qu'il y a du Gd libre.

Assemblage des micelles à partir de l'amphiphile DA-DOTA-Gd

10 mg de **V-4** sont solubilisés dans 1 mL d'eau déminéralisée. La solution est soniquée 10 min au bras à ultrasons puis irradiée sous UV à 254 nm pendant 6 h. Elle est ensuite filtrée sur filtre Nylon 0.2 µm. Un dosage avec l'indicateur coloré Arsenazo III montre qu'il n'y a pas de Gd libre. Le Gd est dosé par ICP-MS. 7.9 mM de Gd sont dans la solution. Le diamètre des micelles est de 7 nm en volume selon les mesures DLS.

Chélation du Gd sur les micelles PDA-DOTA

À 2 mL (0.025 mmol, 1 équiv.) de micelles PDA-DOTA à 10 mg/mL (le pH est ajusté à 5,5 avec des solutions aqueuses de KOH à 0.1 M et de HCl dilué) sont ajoutés 25 µL (0.005 mmol, 0,2 équiv.) d'une solution de Gadolinium (III) chloride hydrate (7 mg) dans de l'eau (100 µL), une vérification avec de l'Arsenazo III est réalisée à chaque ajout pour voir s'il y a du Gd non chélaté. Le milieu réactionnel est chauffé à 60 °C pendant 1 h jusqu'à disparition du Gd libre. 25 µL (0,005 mmol, 0,2 équiv.) de la solution de Gd sont ajoutés, le pH est ajusté à 5.5 avec KOH 0.1 M. Le milieu réactionnel est chauffé à 60 °C pendant 1 h. 25 µL (0.005 mmol, 0,2 équiv.) de la solution de Gd sont ajoutés, le pH est ajusté à 5.5 avec KOH 0.1 M. Le milieu réactionnel est chauffé à 60 °C pendant 12 h. Le milieu réactionnel est refroidi à t.a. Les 2.8 mL de milieu réactionnel sont ajoutés à 60 mg de Chelex-100. La solution est agitée à t.a. pendant 2 h. La solution est filtrée sur filtre Nylon 0.2 µm. Le dosage à l'Arsenazo III montre qu'il n'y a pas de Gd libre. La concentration en micelles finale est de 7 mg/mL, leur diamètre est centré sur 11 nm en volume et la concentration en Gd est de 3.5 mM. La concentration en Gd est mesurée par ICP-MS.

Dosage du Gd par ICP-MS

50 µL de la solution à doser sont ajoutés à 1 mL de HNO₃. Après une nuit, le volume est complété à 5 mL avec de l'eau et l'échantillon est dosé.

Assemblage des micelles fluorées et chargement avec du Perfecta

Une solution à 10 mg/mL d'amphiphiles fluorées est traitée au bras à ultrasons pendant 10 minutes puis filtrée sur filtre Nylon 0.2 µm. Elles ont un diamètre de 14.7 nm. À 1 mL de cette solution sont ajoutés 10 mg de Perfecta sous forme de solide, l'encapsulation est réalisée par traitement pendant 10 minutes au bras à ultrasons. La solution est filtrée sur filtre Nylon 0.2 µm. Les micelles obtenues ont une taille de 21.5 nm. Une RMN du fluor montre que tout le Perfecta a été encapsulé dans les micelles.

Détermination de la CMC des micelles fluorées par mesure de la tension de surface

La tension de surface de solutions de micelles fluorées à différentes concentrations est mesurée (Tableau 13). Les courbes de la tension de surface en fonction de la concentration en micelles sont tracées (Figure 72). La CMC correspond à l'intersection entre les deux droites. Elle est de 58 mg/L.

Tableau 13 : Tension de surface des différentes solutions de micelles fluorées

[micelles] (mg/mL)	tension de surface (mN/m)			Moyenne (mN/m)
1	45.5	45.6	45.7	45.6
0.5	46.2	46.2	46.3	46.2
0.125	48.2	48.3	48.4	48.3
0.063	47.7	47.9	47.8	47.8
0.0313	52.1	52	52	52.0
0.0156	55.9	55.7	55.8	55.8
0.0078	59.2	59.1	59	59.1

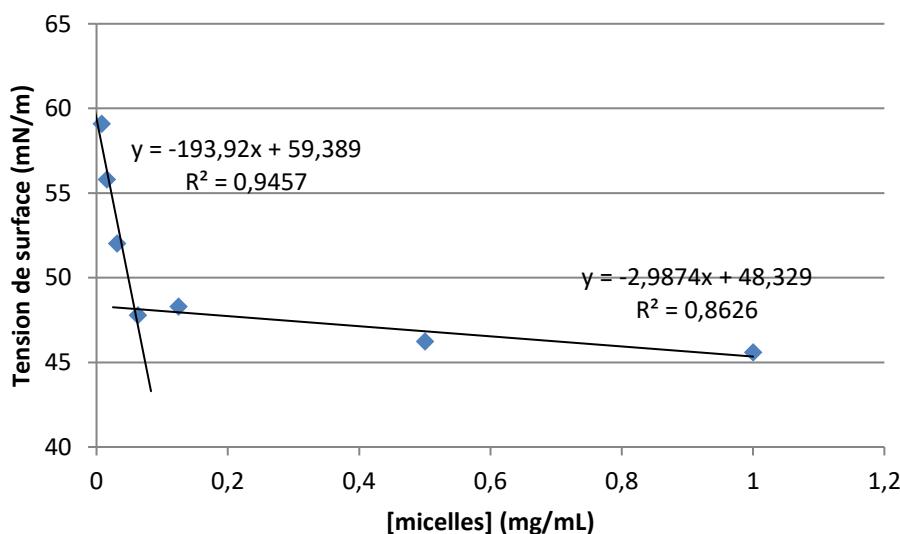


Figure 75 : Détermination de la CMC des micelles fluorées

Bibliographie

1. <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/worldwide-data>.
2. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
3. Ulbrich, K.; Hola, K.; Subr, V.; Bakandritsos, A.; Tucek, J.; Zboril, R., Targeted Drug Delivery with Polymers and Magnetic Nanoparticles: Covalent and Noncovalent Approaches, Release Control, and Clinical Studies. *Chemical Reviews* **2016**, *116* (9), 5338-5431.
4. Sudhakar, A., History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of cancer science & therapy* **2009**, *1* (2), 1-4.
5. Les types de cancer. <http://www.cancer.be/le-cancer/jeunes-et-cancer/les-cancers/les-types-de-cancers> (accessed 11/05/17).
6. Stapleton, S.; Jaffray, D.; Milosevic, M., Radiation effects on the tumor microenvironment: Implications for nanomedicine delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2017**, *109*, 119-130.
7. <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy/how-chemotherapy-drugs-work.html>.
8. Torchilin, V. P., Micellar nanocarriers: Pharmaceutical perspectives. *Pharmaceutical Research* **2007**, *24* (1), 1-16.
9. Min, Y. Z.; Caster, J. M.; Eblan, M. J.; Wang, A. Z., Clinical Translation of Nanomedicine. *Chemical Reviews* **2015**, *115* (19), 11147-11190.
10. Kunjachan, S.; Ehling, J.; Storm, G.; Kiessling, F.; Lammers, T., Noninvasive Imaging of Nanomedicines and Nanotheranostics: Principles, Progress, and Prospects. *Chemical Reviews* **2015**, *115* (19), 10907-10937.
11. Boisseau, P.; Loubaton, B., Nanomedicine, Nanotechnology in medicine. Académie des Sciences: Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, 2011.
12. Etheridge, M. L.; Campbell, S. A.; Erdman, A. G.; Haynes, C. L.; Wolf, S. M.; McCullough, J., The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **2013**, *9* (1), 1-14.
13. Jin, Q.; Chen, Y. J.; Wang, Y.; Ji, J., Zwitterionic drug nanocarriers: A biomimetic strategy for drug delivery. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2014**, *124*, 80-86.
14. Mackiewicz, N.; Gravel, E.; Garofalakis, A.; Ogier, J.; John, J.; Dupont, D. M.; Gombert, K.; Tavitian, B.; Doris, E.; Duconge, F., Tumor-Targeted Polydiacetylene Micelles for In Vivo Imaging and Drug Delivery. *Small* **2011**, *7* (19), 2786-2792.
15. von Roemeling, C.; Jian, W.; Chan, C. K.; Weissman, I. L.; Kim, B. Y. S., Breaking Down the Barriers to Precision Cancer Nanomedicine. *Trends in Biotechnology* **2017**, *35* (2), 159-171.
16. Jhaveri, A. M.; Torchilin, V. P., Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA. *Frontiers in Pharmacology* **2014**, *5*, 26.
17. Matsumura, Y.; Maeda, H., A NEW CONCEPT FOR MACROMOLECULAR THERAPEUTICS IN CANCER-CHEMOTHERAPY - MECHANISM OF TUMORITROPIC ACCUMULATION OF PROTEINS AND THE ANTITUMOR AGENT SMANCS. *Cancer Research* **1986**, *46* (12), 6387-6392.
18. Petros, R. A.; DeSimone, J. M., Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature Reviews Drug Discovery* **2010**, *9* (8), 615-627.
19. Lammers, T.; Kiessling, F.; Hennink, W. E.; Storm, G., Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *Journal of Controlled Release* **2012**, *161* (2), 175-187.
20. Yingchoncharoen, P.; Kalinowski, D. S.; Richardson, D. R., Lipid-Based Drug Delivery Systems in Cancer Therapy: What Is Available and What Is Yet to Come. *Pharmacological Reviews* **2016**, *68* (3), 701-787.
21. Kobayashi, T.; Ishida, T.; Okada, Y.; Ise, S.; Harashima, H.; Kiwada, H., Effect of transferrin receptor-targeted liposomal doxorubicin in P-glycoprotein-mediated drug resistant tumor cells. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *329* (1-2), 94-102.
22. Yang, G.; Yang, T.; Zhang, W. D.; Lu, M.; Ma, X.; Xiang, G. Y., In Vitro and in Vivo Antitumor Effects of Folate-Targeted Ursolic Acid Stealth Liposome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62* (10), 2207-2215.

23. Danhier, F.; Feron, O.; Preat, V., To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release* **2010**, *148* (2), 135-146.
24. Bossuyt, V.; Fadare, O.; Martel, M.; Ocal, I. T.; Burtness, B.; Moinfar, F.; Leibl, S.; Tavassoli, F. A., Remarkably high frequency of EGFR expression in breast carcinomas with squamous differentiation. *International Journal of Surgical Pathology* **2005**, *13* (4), 319-327.
25. Schiffelers, R. M.; Koning, G. A.; ten Hagen, T. L. M.; Fens, M.; Schraa, A. J.; Janssen, A.; Kok, R. J.; Molema, G.; Storm, G., Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin. *Journal of Controlled Release* **2003**, *91* (1-2), 115-122.
26. Chen, G. Y.; Roy, I.; Yang, C. H.; Prasad, P. N., Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy. *Chemical Reviews* **2016**, *116* (5), 2826-2885.
27. Ogier, J. Evaluation de Nanobagues comme Vecteurs de Délivrance de Médicaments. Thèse, Université Paris XI, 2008.
28. Lorin, A.; Flore, C.; Thomas, A.; Brasseur, R., Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* : 2004; Vol. 8, pp 163-176.
29. Discher, B. M.; Won, Y. Y.; Ege, D. S.; Lee, J. C. M.; Bates, F. S.; Discher, D. E.; Hammer, D. A., Polymersomes: Tough vesicles made from diblock copolymers. *Science* **1999**, *284* (5417), 1143-1146.
30. Cullis, P. R.; Mayer, L. D.; Bally, M. B.; Madden, T. D.; Hope, M. J., Generating and loading of liposomal systems for drug-delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1988**, *3*, 267-282.
31. Barenholz, Y., Doxil (R) - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release* **2012**, *160* (2), 117-134.
32. Abraham, S. A.; Waterhouse, D. N.; Mayer, L. D.; Cullis, P. R.; Madden, T. D.; Bally, M. B., The liposomal formulation of doxorubicin. In *Liposomes*, Pt E, Duzgunes, N., Ed. Elsevier Academic Press Inc: San Diego, 2005; Vol. 391, pp 71-97.
33. Roy, M.; Quéléver, G. Les dendrimères, des nano-molécules pour le transport de médicaments. <http://nanosciences.cinam.univ-mrs.fr/index.php?page=dendri>.
34. Raju, G. S. R.; Benton, L.; Pavitraa, E.; Yu, J. S., Multifunctional nanoparticles: recent progress in cancer therapeutics. *Chemical Communications* **2015**, *51* (68), 13248-13259.
35. Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P., A NEW CLASS OF POLYMERS - STARBURST-DENDRITIC MACROMOLECULES. *Polymer Journal* **1985**, *17* (1), 117-132.
36. Newkome, G. R.; Yao, Z. Q.; Baker, G. R.; Gupta, V. K., CASCADE MOLECULES - A NEW APPROACH TO MICELLES. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **1985**, *189* (APR-), 166-ORGN.
37. Hawker, C. J.; Frechet, J. M. J., PREPARATION OF POLYMERS WITH CONTROLLED MOLECULAR ARCHITECTURE - A NEW CONVERGENT APPROACH TO DENDRITIC MACROMOLECULES. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112* (21), 7638-7647.
38. Ooya, T.; Lee, J.; Park, K., Effects of ethylene glycol-based graft, star-shaped, and dendritic polymers on solubilization and controlled release of paclitaxel. *Journal of Controlled Release* **2003**, *93* (2), 121-127.
39. Gupta, U.; Agashe, H. B.; Asthana, A.; Jain, N. K., Dendrimers: Novel polymeric nanoarchitectures for solubility enhancement. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (3), 649-658.
40. Madaan, K.; Kumar, S.; Poonia, N.; Lather, V.; Pandita, D., Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues. *J Pharm Bioallied Sci* **2014**, *6* (3), 139-150.
41. van Elk, M.; Murphy, B. P.; Eufrasio-da-Silva, T.; O'Reilly, D. P.; Vermonden, T.; Hennink, W. E.; Duffy, G. P.; Ruiz-Hernandez, E., Nanomedicines for advanced cancer treatments: Transitioning towards responsive systems. *International Journal of Pharmaceutics* **2016**, *515* (1-2), 132-164.
42. Kakizawa, Y.; Kataoka, K., Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54* (2), 203-222.
43. Gu, F. X.; Karnik, R.; Wang, A. Z.; Alexis, F.; Levy-Nissenbaum, E.; Hong, S.; Langer, R. S.; Farokhzad, O. C., Targeted nanoparticles for cancer therapy. *Nano Today* **2007**, *2* (3), 14-21.

44. Xing, L.; Mattice, W. L., Large internal structures of micelles of triblock copolymers with small insoluble molecules in their cores. *Langmuir* **1998**, *14* (15), 4074-4080.
45. Genexol-PM. <https://www.samyangbiopharm.com/eng/ProductIntroduce/injection01> (accessed 31/05/17).
46. Ganta, S.; Devalapally, H.; Shahiwala, A.; Amiji, M., A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release* **2008**, *126* (3), 187-204.
47. Tong, R.; Tang, L.; Ma, L.; Tu, C. L.; Baumgartner, R.; Cheng, J. J., Smart chemistry in polymeric nanomedicine. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43* (20), 6982-7012.
48. Yatvin, M. B.; Weinstein, J. N.; Dennis, W. H.; Blumenthal, R., DESIGN OF LIPOSOMES FOR ENHANCED LOCAL RELEASE OF DRUGS BY HYPERTHERMIA. *Science* **1978**, *202* (4374), 1290-1293.
49. Gillies, E. R.; Frechet, J. M. J., pH-responsive copolymer assemblies for controlled release of doxorubicin. *Bioconjugate Chemistry* **2005**, *16* (2), 361-368.
50. Wang, H.; Tang, L.; Tu, C. L.; Song, Z. Y.; Yin, Q.; Yin, L. C.; Zhang, Z. H.; Cheng, J. J., Redox-Responsive, Core-Cross-Linked Micelles Capable of On-Demand, Concurrent Drug Release and Structure Disassembly. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (10), 3706-3712.
51. Mura, S.; Nicolas, J.; Couvreur, P., Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nature Materials* **2013**, *12* (11), 991-1003.
52. Meyer, D. E.; Shin, B. C.; Kong, G. A.; Dewhirst, M. W.; Chilkoti, A., Drug targeting using thermally responsive polymers and local hyperthermia. *Journal of Controlled Release* **2001**, *74* (1-3), 213-224.
53. Xiao, Z. Y.; Ji, C. W.; Shi, J. J.; Pridgen, E. M.; Frieder, J.; Wu, J.; Farokhzad, O. C., DNA Self-Assembly of Targeted Near-Infrared-Responsive Gold Nanoparticles for Cancer Thermo-Chemotherapy. *Angewandte Chemie-International Edition* **2012**, *51* (47), 11853-11857.
54. Gravel, E.; Ogier, J.; Arnauld, T.; Mackiewicz, N.; Duconge, F.; Doris, E., Drug Delivery and Imaging with Polydiacetylene Micelles. *Chemistry-a European Journal* **2012**, *18* (2), 400-408.
55. Perino, A.; Klymchenko, A.; Morere, A.; Contal, E.; Rameau, A.; Guenet, J. M.; Mely, Y.; Wagner, A., Structure and Behavior of Polydiacetylene-Based Micelles. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2011**, *212* (2), 111-117.
56. Ogier, J.; Arnauld, T.; Carrot, G.; Lhumeau, A.; Delbos, J. M.; Boursier, C.; Loreau, O.; Lefoulon, F.; Doris, E., Enhanced drug loading in polymerized micellar cargo. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, *8* (17), 3902-3907.
57. Torchilin, V. P., PEG-based micelles as carriers of contrast agents for different imaging modalities. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54* (2), 235-252.
58. Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U. S., Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angewandte Chemie-International Edition* **2010**, *49* (36), 6288-6308.
59. Louage, B.; Nuhn, L.; Risseeuw, M. D. P.; Vanparijs, N.; De Coen, R.; Karalic, I.; Van Calenbergh, S.; De Geest, B. G., Well-Defined Polymer-Paclitaxel Prodrugs by a Grafting-from-Drug Approach. *Angewandte Chemie-International Edition* **2016**, *55* (39), 11791-11796.
60. Houba, P. H. J.; Leenders, R. G. G.; Boven, E.; Scheeren, J. W.; Pinedo, H. M.; Haisma, H. J., Characterization of novel anthracycline prodrugs activated by human beta-glucuronidase for use in antibody-directed enzyme prodrug therapy. *Biochemical Pharmacology* **1996**, *52* (3), 455-463.
61. de Graaf, M.; Nevalainen, T. J.; Scheeren, H. W.; Pinedo, H. M.; Haisma, H. J.; Boven, E., A methylester of the glucuronide prodrug DOX-GA3 for improvement of tumor-selective chemotherapy. *Biochemical Pharmacology* **2004**, *68* (11), 2273-2281.
62. Houba, P. H. J.; Boven, E.; van der Meulen-Muileman, I. H.; Leenders, R. G. G.; Scheeren, J. W.; Pinedo, H. M.; Haisma, H. J., A novel doxorubicin-glucuronide prodrug DOX-GA3 for tumour-selective chemotherapy: distribution and efficacy in experimental human ovarian cancer. *British Journal of Cancer* **2001**, *84* (4), 550-557.
63. de Graaf, M.; Boven, E.; Scheeren, H. W.; Haisma, H. J.; Pinedo, H. M., Beta-glucuronidase-mediated drug release. *Current Pharmaceutical Design* **2002**, *8* (15), 1391-1403.

64. Talelli, M.; Morita, K.; Rijcken, C. J. F.; Aben, R. W. M.; Lammers, T.; Scheeren, H. W.; van Nostrum, C. F.; Storm, G.; Hennink, W. E., Synthesis and Characterization of Biodegradable and Thermosensitive Polymeric Micelles with Covalently Bound Doxorubicin-Glucuronide Prodrug via Click Chemistry. *Bioconjugate Chemistry* **2011**, 22 (12), 2519-2530.
65. Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M., Tetrazine ligation: Fast bioconjugation based on inverse-electron-demand Diels-Alder reactivity. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130 (41), 13518-+.
66. Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R., Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, 48 (38), 6974-6998.
67. Lee, Y. J.; Kurra, Y.; Yang, Y. Y.; Torres-Kolbus, J.; Deiters, A.; Liu, W. S. R., Genetically encoded unstrained olefins for live cell labeling with tetrazine dyes (vol 50, pg 13085, 2014). *Chemical Communications* **2014**, 50 (87), 13396-13396.
68. Xi, W. X.; Scott, T. F.; Kloxin, C. J.; Bowman, C. N., Click Chemistry in Materials Science. *Advanced Functional Materials* **2014**, 24 (18), 2572-2590.
69. Hoyle, C. E.; Bowman, C. N., Thiol-Ene Click Chemistry. *Angewandte Chemie-International Edition* **2010**, 49 (9), 1540-1573.
70. Evans, H. L.; Carroll, L.; Aboagye, E. O.; Spivey, A. C., Bioorthogonal chemistry for Ga-68 radiolabelling of DOTA-containing compounds. *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals* **2014**, 57 (4), 291-297.
71. Yang, J.; Karver, M. R.; Li, W. L.; Sahu, S.; Devaraj, N. K., Metal-Catalyzed One-Pot Synthesis of Tetrazines Directly from Aliphatic Nitriles and Hydrazine. *Angewandte Chemie-International Edition* **2012**, 51 (21), 5222-5225.
72. Zhou, Q. Synthesis of new tetrazines functionalized with photoactive and electroactive groups. 2013.
73. Povie, G.; Tran, A. T.; Bonnaffé, D.; Habegger, J.; Hu, Z. Y.; Le Narvor, C.; Renaud, P., Repairing the Thiol-Ene Coupling Reaction. *Angewandte Chemie-International Edition* **2014**, 53 (15), 3894-3898.
74. Beyer, U.; Roth, T.; Schumacher, P.; Maier, G.; Unold, A.; Frahm, A. W.; Fiebig, H. H.; Unger, C.; Kratz, F., Synthesis and in vitro efficacy of transferrin conjugates of the anticancer drug chlorambucil. *Journal of Medicinal Chemistry* **1998**, 41 (15), 2701-2708.
75. Cao, J.; Xie, X. X.; Lu, A. J.; He, B.; Chen, Y. W.; Gu, Z. W.; Luo, X. L., Cellular internalization of doxorubicin loaded star-shaped micelles with hydrophilic zwitterionic sulfobetaine segments. *Biomaterials* **2014**, 35 (15), 4517-4524.
76. Weers, J. G.; Rathman, J. F.; Axe, F. U.; Crichlow, C. A.; Foland, L. D.; Scheuing, D. R.; Wiersema, R. J.; Zielske, A. G., Effect of the intramolecular charge separation distance on the solution properties of betaines and sulfobetaines. *Langmuir* **1991**, 7 (5), 854-867.
77. Chu, Z. L.; Feng, Y. J., Empirical Correlations between Krafft Temperature and Tail Length for Amidosulfobetaine Surfactants in the Presence of Inorganic Salt. *Langmuir* **2012**, 28 (2), 1175-1181.
78. Chu, Z. L.; Feng, Y. J.; Su, X.; Han, Y. X., Wormlike Micelles and Solution Properties of a C22-Tailed Amidosulfobetaine Surfactant. *Langmuir* **2010**, 26 (11), 7783-7791.
79. Theodorou, I.; Anilkumar, P.; Lelandais, B.; Clarisse, D.; Doerflinger, A.; Gravel, E.; Duconge, F.; Doris, E., Stable and compact zwitterionic polydiacetylene micelles with tumor-targeting properties. *Chemical Communications* **2015**, 51 (80), 14937-14940.
80. Perttu, E. K.; Szoka, F. C., Zwitterionic sulfobetaine lipids that form vesicles with salt-dependent thermotropic properties. *Chemical Communications* **2011**, 47 (47), 12613-12615.
81. Holback, H.; Yeo, Y., Intratumoral Drug Delivery with Nanoparticulate Carriers. *Pharmaceutical Research* **2011**, 28 (8), 1819-1830.
82. Chevalier, Y.; Kamenka, N.; Chorro, M.; Zana, R., Aqueous solutions of Zwitterionic surfactants with varying carbon number of the intercharge group .3. Intermicellar interactions. *Langmuir* **1996**, 12 (13), 3225-3232.
83. Gohy, J. F.; Zhao, Y., Photo-responsive block copolymer micelles: design and behavior. *Chemical Society Reviews* **2013**, 42 (17), 7117-7129.

84. Cho, H. J.; Chung, M.; Shim, M. S., Engineered photo-responsive materials for near-infrared-triggered drug delivery. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **2015**, *31*, 15-25.
85. Aujard, I.; Benbrahim, C.; Gouget, M.; Ruel, O.; Baudin, J. B.; Neveu, P.; Jullien, L., o-Nitrobenzyl photolabile protecting groups with red-shifted absorption: Syntheses and uncaging cross-sections for one- and two-photon excitation. *Chemistry-a European Journal* **2006**, *12* (26), 6865-6879.
86. Zhao, H.; Sterner, E. S.; Coughlin, E. B.; Theato, P., o-Nitrobenzyl Alcohol Derivatives: Opportunities in Polymer and Materials Science. *Macromolecules* **2012**, *45* (4), 1723-1736.
87. Jiang, J. Q.; Tong, X.; Zhao, Y., A new design for light-breakable polymer micelles. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (23), 8290-8291.
88. Jiang, J. Q.; Tong, X.; Morris, D.; Zhao, Y., Toward photocontrolled release using light-dissociable block copolymer micelles. *Macromolecules* **2006**, *39* (13), 4633-4640.
89. Han, D. H.; Tong, X.; Zhao, Y., Fast Photodegradable Block Copolymer Micelles for Burst Release. *Macromolecules* **2011**, *44* (3), 437-439.
90. Cabane, E.; Malinova, V.; Meier, W., Synthesis of Photocleavable Amphiphilic Block Copolymers: Toward the Design of Photosensitive Nanocarriers. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2010**, *211* (17), 1847-1856.
91. Babin, J.; Pelletier, M.; Lepage, M.; Allard, J. F.; Morris, D.; Zhao, Y., A New Two-Photon-Sensitive Block Copolymer Nanocarrier. *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, *48* (18), 3329-3332.
92. Bertrand, O.; Gohy, J. F.; Fustin, C. A., Synthesis of diblock copolymers bearing p-methoxyphenacyl side groups. *Polymer Chemistry* **2011**, *2* (10), 2284-2292.
93. Weissleder, R., A clearer vision for in vivo imaging. *Nature Biotechnology* **2001**, *19* (4), 316-317.
94. Clydesdale, G. J.; Dandie, G. W.; Muller, H. K., Ultraviolet light induced injury: Immunological and inflammatory effects. *Immunology and Cell Biology* **2001**, *79* (6), 547-568.
95. Smith, A. M.; Mancini, M. C.; Nie, S. M., BIOIMAGING Second window for in vivo imaging. *Nature Nanotechnology* **2009**, *4* (11), 710-711.
96. Yan, B.; Boyer, J. C.; Branda, N. R.; Zhao, Y., Near-Infrared Light-Triggered Dissociation of Block Copolymer Micelles Using Upconverting Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (49), 19714-19717.
97. Wu, S.; Butt, H. J., Near-Infrared-Sensitive Materials Based on Upconverting Nanoparticles. *Advanced Materials* **2016**, *28* (6), 1208-1226.
98. Il'ichev, Y. V.; Schworer, M. A.; Wirz, J., Photochemical reaction mechanisms of 2-nitrobenzyl compounds: Methyl ethers and caged ATP. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (14), 4581-4595.
99. Liu, X. S.; Shi, Y.; Maag, D. X.; Palma, J. P.; Patterson, M. J.; Ellis, P. A.; Surber, B. W.; Ready, D. B.; Soni, N. B.; Ladror, U. S.; Xu, A. J.; Iyer, R.; Harlan, J. E.; Solomon, L. R.; Donawho, C. K.; Penning, T. D.; Johnson, E. F.; Shoemaker, A. R., Iniparib Nonselectively Modifies Cysteine-Containing Proteins in Tumor Cells and Is Not a Bona Fide PARP Inhibitor. *Clinical Cancer Research* **2012**, *18* (2), 510-523.
100. Anilkumar, P.; Gravel, E.; Theodorou, I.; Gombert, K.; Theze, B.; Duconge, F.; Doris, E., Nanometric Micelles with Photo-Triggered Cytotoxicity. *Advanced Functional Materials* **2014**, *24* (33), 5246-5252.
101. Tsang, M. K.; Bai, G. X.; Hao, J. H., Stimuli responsive upconversion luminescence nanomaterials and films for various applications. *Chemical Society Reviews* **2015**, *44* (6), 1585-1607.
102. Wang, C.; Cheng, L.; Liu, Z., Upconversion Nanoparticles for Photodynamic Therapy and Other Cancer Therapeutics. *Theranostics* **2013**, *3* (5), 317-330.
103. Capobianco, J. A.; Vetrone, F.; D'Alesio, T.; Tessari, G.; Speghini, A.; Bettinelli, M., Optical spectroscopy of nanocrystalline cubic Y₂O₃ : Er³⁺ obtained by combustion synthesis. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2000**, *2* (14), 3203-3207.
104. Carling, C. J.; Boyer, J. C.; Branda, N. R., Remote-Control Photoswitching Using NIR Light. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (31), 10838-+.

105. Pawlicki, M.; Collins, H. A.; Denning, R. G.; Anderson, H. L., Two-Photon Absorption and the Design of Two-Photon Dyes. *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, *48* (18), 3244-3266.
106. Fu, Q.; Xu, J.; Ladewig, K.; Henderson, T. M. A.; Qiao, G. G., Degradable cross-linked polymer vesicles for the efficient delivery of platinum drugs. *Polymer Chemistry* **2015**, *6* (1), 35-43.
107. Hu, J.; He, J. L.; Cao, D. L.; Zhang, M. Z.; Ni, P. H., Core cross-linked polyphosphoester micelles with folate-targeted and acid-cleavable features for pH-triggered drug delivery. *Polymer Chemistry* **2015**, *6* (17), 3205-3216.
108. Lee, M. H.; Sessler, J. L.; Kim, J. S., Disulfide-Based Multifunctional Conjugates for Targeted Theranostic Drug Delivery. *Accounts of Chemical Research* **2015**, *48* (11), 2935-2946.
109. Lee, M. H.; Han, J. H.; Kwon, P. S.; Bhuniya, S.; Kim, J. Y.; Sessler, J. L.; Kang, C.; Kim, J. S., Hepatocyte-Targeting Single Galactose-Appended Naphthalimide: A Tool for Intracellular Thiol Imaging in Vivo. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (2), 1316-1322.
110. Sun, C. Y.; Liu, Y.; Du, J. Z.; Cao, Z. T.; Xu, C. F.; Wang, J., Facile Generation of Tumor-pH-Labile Linkage-Bridged Block Copolymers for Chemotherapeutic Delivery. *Angewandte Chemie-International Edition* **2016**, *55* (3), 1010-1014.
111. Kang, S.; Kim, Y.; Song, Y.; Choi, J. U.; Park, E.; Choi, W.; Park, J.; Lee, Y., Comparison of pH-sensitive degradability of maleic acid amide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24* (10), 2364-2367.
112. Mangin, F.; Banaszak-Leonard, E.; Len, C., One-step Barton decarboxylation by micellar catalysis - application to the synthesis of maleimide derivatives. *Rsc Advances* **2015**, *5* (85), 69616-69620.
113. Zhong, Y.; Meng, F.; Deng, C.; Zhong, Z., Ligand-Directed Active Tumor-Targeting Polymeric Nanoparticles for Cancer Chemotherapy. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (6), 1955-1969.
114. Vineberg, J. G.; Zuniga, E. S.; Kamath, A.; Chen, Y. J.; Seitz, J. D.; Ojima, I., Design, Synthesis, and Biological Evaluations of Tumor-Targeting Dual-Warhead Conjugates for a Taxoid-Camptothecin Combination Chemotherapy. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57* (13), 5777-5791.
115. Russell-Jones, G.; McTavish, K.; McEwan, J.; Rice, J.; Nowotnik, D., Vitamin-mediated targeting as a potential mechanism to increase drug uptake by tumours. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2004**, *98* (10), 1625-1633.
116. Le Droumaguet, B.; Nicolas, J.; Brambilla, D.; Mura, S.; Maksimenko, A.; De Kimpe, L.; Salvati, E.; Zona, C.; Airoldi, C.; Canovi, M.; Gobbi, M.; Noiray, M.; La Ferla, B.; Nicotra, F.; Scheper, W.; Flores, O.; Masserini, M.; Andrieux, K.; Couvreur, P., Versatile and Efficient Targeting Using a Single Nanoparticulate Platform: Application to Cancer and Alzheimer's Disease. *Acs Nano* **2012**, *6* (7), 5866-5879.
117. del Amo, D. S.; Wang, W.; Jiang, H.; Besanceney, C.; Yan, A. C.; Levy, M.; Liu, Y.; Marlow, F. L.; Wu, P., Biocompatible Copper(I) Catalysts for in Vivo Imaging of Glycans. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (47), 16893-16899.
118. Wang, C. L.; Ciganda, R.; Salmon, L.; Gregurec, D.; Irigoyen, J.; Moya, S.; Ruiz, J.; Astruc, D., Highly Efficient Transition Metal Nanoparticle Catalysts in Aqueous Solutions. *Angewandte Chemie-International Edition* **2016**, *55* (9), 3091-3095.
119. Mackiewicz, N.; Nicolas, J.; Handke, N.; Noiray, M.; Mougin, J.; Daveu, C.; Lakkireddy, H. R.; Bazile, D.; Couvreur, P., Precise Engineering of Multifunctional PEGylated Polyester Nanoparticles for Cancer Cell Targeting and Imaging. *Chemistry of Materials* **2014**, *26* (5), 1834-1847.
120. Liebmann, J. E.; Cook, J. A.; Lipschultz, C.; Teague, D.; Fisher, J.; Mitchell, J. B., Cytotoxic Studies of Paclitaxel (Taxol) in Human Tumor-Cell Lines. *British Journal of Cancer* **1993**, *68* (6), 1104-1109.
121. Duca, M.; Arimondo, P. B.; Leonce, S.; Pierre, A.; Pfeiffer, B.; Monneret, C.; Dauzon, D., Novel carbamate derivatives of 4-ss-amino-4 '-O-demethyl-4-desoxypodophyllotoxin as inhibitors of topoisomerase II: synthesis and biological evaluation. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2005**, *3* (6), 1074-1080.

122. Tang, Y. J.; Zhao, W.; Li, H. M., Novel Tandem Biotransformation Process for the Biosynthesis of a Novel Compound, 4-(2,3,5,6-Tetramethylpyrazine-1)-4 '-Demethylepipodophyllotoxin. *Applied and Environmental Microbiology* **2011**, 77 (9), 3023-3034.
123. Abu, N.; Akhtar, M. N.; Ho, W. Y.; Yeap, S. K.; Alitheen, N. B., 3-Bromo-1-Hydroxy-9,10-Anthraquinone (BHAQ) Inhibits Growth and Migration of the Human Breast Cancer Cell Lines MCF-7 and MDA-MB231. *Molecules* **2013**, 18 (9), 10367-10377.
124. D. Keefe, A.; Pai, S.; Ellington, A., Aptamers as therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* **2010**, 9, 537-550.
125. Sun, H.; Zu, Y., Aptamers and Their Applications in Nanomedicine. *Small* **2015**, 11 (20), 2352-2364.
126. Tuerk, C.; Gold, L., Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment - RNA Ligands to Bacteriophage-T4 DNA-Polymerase. *Science* **1990**, 249 (4968), 505-510.
127. Ellington, A. D.; Szostak, J. W., In vitro Selection of RNA Molecules that Bind Specific Ligands. *Nature* **1990**, 346 (6287), 818-822.
128. Irvine, D.; Tuerk, C.; Gold, L., Selexion - Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment with Integrated Optimization by Nonlinear-Analysis. *Journal of Molecular Biology* **1991**, 222 (3), 739-761.
129. Xing, H.; Tang, L.; Yang, X. J.; Hwang, K.; Wang, W. D.; Yin, Q.; Wong, N. Y.; Dobrucki, L. W.; Yasui, N.; Katzenellenbogen, J. A.; Helferich, W. G.; Cheng, J. J.; Lu, Y., Selective delivery of an anticancer drug with aptamer-functionalized liposomes to breast cancer cells in vitro and in vivo. *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, 1 (39), 5288-5297.
130. Alshaer, W.; Hillaireau, H.; Vergnaud, J.; Ismail, S.; Fattal, E., Functionalizing Liposomes with anti-CD44 Aptamer for Selective Targeting of Cancer Cells. *Bioconjugate Chemistry* **2015**, 26 (7), 1307-1313.
131. Goswami, L. N.; Ma, L. X.; Kueffer, P. J.; Jalasatgi, S. S.; Hawthorne, M. F., Synthesis and Relaxivity Studies of a DOTA-Based Nanomolecular Chelator Assembly Supported by an Icosahedral Closo-B-12(2-)-Core for MRI: A Click Chemistry Approach. *Molecules* **2013**, 18 (8), 9034-9048.
132. Han, H. D.; Jung, S. H.; Seong, H.; Cho, S. H.; Shin, B. C., Dual Functional Gd(III)-DOTA Liposomes for Cancer Therapy and Diagnosis as a Theragnostic Carrier. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2013**, 34 (1), 154-158.
133. Zhou, Z. X.; Lu, Z. R., Gadolinium-based contrast agents for magnetic resonance cancer imaging. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2013**, 5 (1), 1-18.
134. Guo, C. H.; Hu, J. N.; Bains, A.; Pan, D. Y.; Luo, K.; Li, N.; Gu, Z. W., The potential of peptide dendron functionalized and gadolinium loaded mesoporous silica nanoparticles as magnetic resonance imaging contrast agents. *Journal of Materials Chemistry B* **2016**, 4 (13), 2322-2331.
135. Darras, V.; Nelea, M.; Winnik, F. M.; Buschmann, M. D., Chitosan modified with gadolinium diethylenetriaminepentaacetic acid for magnetic resonance imaging of DNA/chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* **2010**, 80 (4), 1137-1146.
136. Swanson, S. D.; Kukowska-Latallo, J. F.; Patri, A. K.; Chen, C. Y.; Ge, S.; Cao, Z. Y.; Kotlyar, A.; East, A. T.; Baker, J. R., Targeted gadolinium-loaded dendrimer nanoparticles for tumor-specific magnetic resonance contrast enhancement. *International Journal of Nanomedicine* **2008**, 3 (2), 201-210.
137. Nonat, A. Complexes de lanthanides(III) pour le développement de nouvelles sondes magnétiques et luminescentes. Thèse, université Joseph Fourier, Grenoble, 2007.
138. Ceulemans; Matthias; Nuyts, K.; De Borggraeve, W. M.; Parac-Vogt, T. N., Gadolinium(III)-DOTA Complex Functionalized with BODIPY as a Potential Bimodal Contrast Agent for MRI and Optical Imaging. *Inorganics*: 2015; Vol. 3, pp 516-533.
139. Tong, G. Q.; Fang, Z. N.; Huang, G.; Jing, Y. H.; Dai, S. L.; Jiang, Q.; Zhang, C.; Feng, S. T.; Li, Z. P., Gadolinium/DOTA functionalized poly(ethylene glycol)-block-poly(acrylamide-co-acrylonitrile)

- micelles with synergistically enhanced cellular uptake for cancer theranostics. *Rsc Advances* **2016**, *6* (56), 50534-50542.
140. Nagaraja, T. N.; Croxen, R. L.; Panda, S.; Knight, R. A.; Keenan, K. A.; Brown, S. L.; Fenstermacher, J. D.; Ewing, J. R., Application of arsenazo III in the preparation and characterization of an albumin-linked, gadolinium-based macromolecular magnetic resonance contrast agent. *Journal of Neuroscience Methods* **2006**, *157* (2), 238-245.
141. Abdelmoez, A. A.; Thurner, G. C.; Wallhofer, E. A.; Klammsteiner, N.; Kremser, C.; Talasz, H.; Mrakovcic, M.; Frohlich, E.; Jaschke, W.; Debbage, P., Albumin-based nanoparticles as magnetic resonance contrast agents: II. Physicochemical characterisation of purified and standardised nanoparticles. *Histochemistry and Cell Biology* **2010**, *134* (2), 171-196.
142. Ruiz-Cabello, J.; Barnett, B. P.; Bottomley, P. A.; Bulte, J. W. M., Fluorine (F-19) MRS and MRI in biomedicine. *Nmr in Biomedicine* **2011**, *24* (2), 114-129.
143. Tirotta, I.; Dichiarante, V.; Pigliacelli, C.; Cavallo, G.; Terraneo, G.; Bombelli, F. B.; Metrangolo, P.; Resnati, G., F-19 Magnetic Resonance Imaging (MRI): From Design of Materials to Clinical Applications. *Chemical Reviews* **2015**, *115* (2), 1106-1129.
144. Tsapis, N., Les agents fluorés pour la théagnostique : Vers une détection de plus en plus précoce des pathologies et un traitement localisé. *l'actualité chimique*: 2010; Vol. 347, pp 47-51.
145. Tirotta, I.; Mastropietro, A.; Cordigliero, C.; Gazzera, L.; Baggi, F.; Baselli, G.; Bruzzone, M. G.; Zucca, I.; Cavallo, G.; Terraneo, G.; Bombelli, F. B.; Metrangolo, P.; Resnati, G., A Superfluorinated Molecular Probe for Highly Sensitive in Vivo(19)F-MRI. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (24), 8524-8527.
146. Ahrens, E. T.; Flores, R.; Xu, H. Y.; Morel, P. A., In vivo imaging platform for tracking immunotherapeutic cells. *Nature Biotechnology* **2005**, *23* (8), 983-987.
147. Janjic, J. M.; Srinivas, M.; Kadavakkara, D. K. K.; Ahrens, E. T., Self-delivering nanoemulsions for dual fluorine-19 MRI and fluorescence detection. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (9), 2832-2841.
148. Lanza, G. M.; Yu, X.; Winter, P. M.; Abendschein, D. R.; Karukstis, K. K.; Scott, M. J.; Chinen, L. K.; Fuhrhop, R. W.; Scherrer, D. E.; Wickline, S. A., Targeted antiproliferative drug delivery to vascular smooth muscle cells with a magnetic resonance imaging nanoparticle contrast agent implications for rational therapy of restenosis. *Circulation* **2002**, *106* (22), 2842-2847.
149. Ratner, A. V.; Hurd, R.; Muller, H. H.; Bradleysimpson, B.; Pitts, W.; Shibata, D.; Sotak, C.; Young, S. W., F-19 Magnetic-Resonance Imaging of the Reticuloendothelial System. *Magnetic Resonance in Medicine* **1987**, *5* (6), 548-554.
150. Chen, J. J.; Lanza, G. M.; Wickline, S. A., Quantitative magnetic resonance fluorine imaging: today and tomorrow. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2010**, *2* (4), 431-440.
151. Wang, S.; Yin, J.; Chen, D.; Nie, F.; Song, X.; Fei, C.; Miao, H.; Jing, C.; Ma, W.; Wang, L.; Xie, S.; Li, C.; Zeng, R.; Pan, W.; Hao, X.; Li, L., Small-molecule modulation of Wnt signaling via modulating the Axin-LRP 5/6 interaction *Nature Chemical Biology* **2013**, *9*, 579-585.

Titre : Conception et synthèse de micelles pour le diagnostic et la thérapie de tumeurs

Mots clés : micelles, cancer, nanomédecine

Résumé : De nombreux traitements anti-cancéreux ont été découverts au cours des dernières années. Cependant, ces derniers sont souvent responsables d'effets secondaires du fait de leur manque de spécificité.

Le but de cette étude est de développer des formulations nanométriques de micelles pour améliorer le ciblage des cellules malades par ciblage passif et/ou actif. Les micelles peuvent être utilisées en tant que transporteurs de médicaments afin de les amener aux cellules cibles sans atteindre les organes sains.

Des micelles polymérisées ont été développées pour cibler de manière passive les tissus tumoraux.

Des micelles sensibles à certains stimuli comme la lumière ou le pH ont également été préparées pour assurer une libération contrôlée de principes actifs.

Afin de conférer aux micelles des propriétés de ciblage actif, elles ont été fonctionnalisées par des ligands de ciblage. Les ligands présents à la surface du transporteur permettent un ciblage actif des cellules qui sur-expriment certains récepteurs.

Enfin des micelles ont été développées pour pouvoir les utiliser comme agents de contraste en IRM.

Title : Design and synthesis of micelles for the diagnosis and therapy of tumors

Keywords : micelles, cancer, drug delivery, nanomedicine

Abstract : Many drugs directed against cancer have been discovered over the past few years. However, the latter often induce severe side effects due to their lack of specificity.

The aim of this study is to develop nanometric micellar formulations in order to improve the passive and/or active targeting of diseased cells. The micelles can be used as drug carriers to deliver drugs without affecting healthy organs.

Polymerized micelles have been developed in order to passively target tumor tissues.

Micelles sensitive to some stimuli such as light or pH have been prepared in order to ensure a controlled release of active compounds.

In order to achieve active targeting, micelles were functionnalized with targeting ligands. These ligands at the carrier's surface are responsible for active targeting of cells overexpressing some receptors.

Some micelles have also been developed in order to be used as contrast agents in MRI.