

Université de Limoges

École Doctorale Gay Lussac - Sciences pour l'Environnement (ED 523)

Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN)

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Discipline / Spécialité : [Chimie / Substances Naturelles]

Présentée et soutenue par

Gautier Mark Arthur NDONG NTOUTOUME

Le 14 décembre 2015

***Elaboration des nanocristaux de cellulose fonctionnalisés
pour la vectorisation d'agents anticancéreux et pour la
transfection de gènes***

Thèse dirigée par le Professeur Vincent SOL et le Docteur Robert GRANET

JURY :

Rapporteurs :

M. Sylvain ACHELLE, *Maitre de conférences – HDR*, Université de Rennes

M. Gilles LEMERCIER, *Professeur*, Université de Reims

Examineurs :

M. Jean Michel PETIT, *Professeur*, Université de Limoges

M. Vincent SOL, *Professeur*, Université de Limoges

Invités :

M. Robert GRANET, *Ingénieur de Recherche – HDR*, Université de Limoges

Dédicace

À mon père et ma mère

À mes défunts grands-parents

À tous mes grands, petits frères et sœurs

À ma grand-mère, à tous mes oncles et tantes

À mes deux petites chéries Marshall et Kénaelle

Rien n'est jamais perdu tant qu'il reste quelque chose à trouver

Pierre Dac

Remerciements

Toute belle histoire a une fin, mais dans la vie, chaque fin, annonce un nouveau départ et donc de nouvelles ambitions. C'est ainsi que je crois résumer cette aventure scientifique, professionnelle et humaine durant ces années passées au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de l'Université de Limoges (LCSN).

Je tiens tout d'abord à remercier le directeur du LCSN, Monsieur le Professeur Vincent SOL pour m'avoir offert l'opportunité de développer un projet aussi pertinent. Après m'avoir fait partager votre riche connaissance de la chimie des macrocycles tétrapyrroliques lors de mon stage de master recherche, vous êtes devenus aussitôt mon directeur de thèse. Durant ces trois années, vous avez toujours su m'accorder de votre temps précieux quand j'en avais besoin. Je vous en suis reconnaissant. Votre rigueur scientifique et surtout l'attachement que vous portiez au bon déroulement de ces travaux ont été des atouts clés pour le succès des résultats obtenus. Je vous suis également reconnaissant pour la confiance que vous m'avez accordée en me permettant de présenter mes travaux dans plusieurs congrès. J'espère juste avoir été à la hauteur de vos espérances et avoir bien représenté le laboratoire. Le chantier est énorme et je veux tout simplement vous assurer de mon profond respect, mon admiration et surtout vous dire un grand merci pour tout Vincent.

La vie ressemble à un immense terrain accidenté, parsemé d'embuches, de virages et même de détours, une sorte de labyrinthe bourré de pièges dans lequel la ligne droite n'existe quasiment pas. Mais, il suffit d'être accompagné par un « guide éclairé » et tout semble devenir clair voire même facile. Ceci pour vous exprimer ma profonde gratitude au Docteur Robert GRANET. Il n'est pas de mots pour vous remercier de m'avoir guidé durant ces années de travail, de réflexion, de doute et de remise en question. Vos qualités d'écoute, d'échange et de respect ainsi que votre dévouement sont autant de valeurs humaines qui m'ont largement aidé dans l'aboutissement de ce travail. Vos fructueux conseils ainsi que l'enthousiasme que vous m'avez prodigué au quotidien m'ont soutenu à chaque instant. Merci pour avoir quotidiennement encadré mon travail et pour m'avoir fait profiter de votre savoir-faire scientifique et de votre intarissable culture générale durant les pauses café.

Je vous remercie tous les deux pour votre réflexion sur l'orientation des travaux réalisés et aussi pour les discussions professionnelles et amicales. Une collaboration fructueuse initiée avec l'UGMA et le Professeur Jean Michel PETIT est là aussi un exemple concret de la pluridisciplinarité du projet.

Je remercie vivement l'ensemble des membres du jury : Monsieur le Professeur Gilles LEMERCIER et monsieur le Docteur Sylvain ACHELLE pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Veuillez trouver ici les marques de ma profonde reconnaissance.

Mes sincères remerciements au Professeur Jean Michel PETIT pour l'honneur qu'il m'a fait d'examiner ce travail et évidemment pour le projet « nanocristaux de cellulose – siRNA » sans que je n'oublie sa grande contribution lors de la journée GEIST de septembre dernier.

Je remercie également mon pays le Gabon et son "Agence National des Bourses du Gabon, ANBG" pour le financement de mes études universitaires et y compris ces trois années de thèse.

Mes remerciements au Professeur Michel Guilloton pour son esprit critique et pour tout le temps consacré à la correction de mes résumés de communication et surtout de mes articles.

Je tiens à remercier tous les biologistes impliqués dans le projet. Je pense tout d'abord à l'équipe de pharma : à Chloë FIDANZI, au Docteur David LEGER et au Professeur Bertrand LIAGRE pour la cytotoxicité directe avec les nanoparticules à base de curcumine. Du côté de l'UGMA, je pense au Docteur Vincent GRASSOT avec ses cellules C2C12. Vincent, je retiens de toi une personne sérieuse professionnellement et amicalement. Je n'oublie pas la fameuse « électrophorèse sur gel d'agarose » et les explications que tu n'as cessé de me donner. Je pense aussi à notre communication en "binôme" lors de la journée GEIST, je garde un très bon souvenir.

À notre exilé de la pharmacie et tout récemment de Reims, Monsieur le Docteur Jean Pierre MBAKIDI. Je te remercie pour le travail effectué sur l'évaluation photocytotoxique des différentes plateformes thérapeutiques synthétisées. Les résultats obtenus te doivent aussi une part de reconnaissance. Je te remercie pour tes conseils, tes encouragements, pour nos interminables conversations et aussi pour ton côté relationnel qui m'a d'ailleurs permis de rencontrer une personne sympathique au nom de Romain Grondin, à qui je fais un clin d'œil au passage. À vous deux, je voudrais simplement vous dire « qu'ici c'est Paris et c'est magique ».

Un grand merci à tous les stagiaires que j'ai pu encadrer durant ces trois années. Un clin d'œil spécial à Roger pour le volume de travail effectué. J'ai bien apprécié ton sérieux sur la paillasse.

Je remercie le Docteur Yves Champavier pour avoir effectué les analyses RMN et le Docteur Nicolas VILLANDIER pour les analyses en spectrométrie de masse de mes composés. J'adresse également mes remerciements aux membres du laboratoire SPCTS de Limoges pour leur aide dans la caractérisation des surfaces celluloses. Les Docteurs Anne AIMABLE et Hervé Goure pour la formation sur le zetasizer (Malvern Instruments) ainsi que Pierre Carles pour la microscopie électronique à transmission.

J'adresse mes remerciements à tous les membres permanents du laboratoire pour leur amabilité et leur gentillesse. En espérant n'oublier personne, les Professeurs Rachida ZERROUKI et Vincent CHALEIX pour leurs conseils, leur bonne humeur, et pour leurs encouragements. Le Professeur Vincent GLOAGUEN, les Docteurs Céline FAUGERON et Catherine RIOU pour leur bonne humeur et pour leurs conseils. Au Docteur Stéphanie LHEZ pour son écoute et ses conseils durant les séances de préparations de cours et de TP. Chères Christelle (Cricri) et Gaëlle, je vous remercie pour votre sympathie et pour les quelques échanges que nous avons eu par ci et là. Un petit coucou au passage à Evelyne et Frédérique. Merci à Michèle pour sa disponibilité en tant que "préparatrice de commande", à Dorothée pour son aide en TP. Je remercie également notre chère secrétaire Sylvie pour le côté administratif et surtout pour l'avoir fait venir au labo un samedi pour une histoire de billet de train. L'aventure n'aurait pas été la même sans vous tous.

J'ajoute à ces remerciements l'ensemble des thésards notamment Amandine B, Olivier R, Nicolas G, Florent, Patrice, Amauri, Tom, Zineb, Guillaume, Josiane, Lama, Saada, Aurélie et Gabin. Je ne peux oublier les anciens thésards comme Ahmad pour les discussions scientifiques et pour son amitié, Manu pour son humilité, sa bonne humeur et pour les fameux TRG, Amandine Dieu, Anaïs et Romain Villegier pour leur sympathie.

Mes remerciements vont également à l'endroit des Docteurs Julien Vergnaud, Cédric Astier et Nicolas Drogat pour l'aide que vous m'avez apporté. Tiens Cédric, j'ai au moins retenu « qu'un bon coq n'est jamais gras ».

Salim, Mohammed, Idelette, Valentin Teyssier, Benjamin Riou et Aurélien Glomot veuillez croire à mes sincères remerciements pour votre amitié. Vous figurez aussi dans ma liste des plus belles rencontres à Limoges. Les échanges footballistiques avec les garçons ont été tout aussi intéressants que l'offre de Valentin et son FC Sapin de Libreville. Salim, tu pourras dire à Momo « Visca Barça...! »

Je garde bien entendu les meilleurs pour la fin et je veux donc commencer par remercier les futurs Docteurs Jean Kerim Nzambe et Qiu Shihong avec qui j'ai effectué mes deux années de Masters entre Limoges et Poitiers et ces trois années de thèse. Je vous remercie du fond du cœur pour m'avoir offert votre amitié et c'est bien entendu réciproque. Tous ces moments inoubliables que l'on a pu passer ensemble, autour de bonnes bouteilles, de séances de football du dimanche et surtout des différents échanges professionnels, scientifiques ainsi que les différentes organisations festives de l'association SAMBA'A LIMOUSIN auxquels nous avons participé. Tous ces instants resteront pour moi des souvenirs formidables et je veux simplement vous dire de rester comme vous êtes. Je vous souhaite tout le meilleur et vous donne tout mon soutien pour finir la thèse en beauté.

En parlant de SAMBA'A Limousin, je remercie les membres qui se sont toujours investis pour le bien-être de tous et pour celui de l'association. En qualité d'ancien président, je remercie les membres qui m'ont accompagné durant mon mandat. Un grand merci aux gabonais de Limoges et de Poitiers pour leur amitié. Un clin d'œil à Lethyamba, Moctar, Roddy Ondo, Diophante, Anive Minko, Dany Obiang, Tanguy Ossima, Emmanuel Ebe, Daryl ITU, Yves Régis, Carole, Ludmilla, Nadège, Gaele, Aurore, Aude, Grace, Coralie, Judith, Phalonne, Rita, Christopher, Gallier, Hamish, Cédric, Hardy, Roy, Maryse Moutsinga et son Pato.

Je remercie infiniment celles et ceux qui de loin ou de près m'ont apporté un soutien constant pour venir à bout de ce travail. J'associe aussi dans cette catégorie tous mes amis de Cocobeach, de Libreville, du Lycée d'Etat de l'Estuaire devenu LPIG, de l'USTM, du Gabon, de la France et du monde entier. Votre soutien moral m'a beaucoup aidé.

Enfin, ma famille "mon sang". Le lieu de tout départ et où je puise toute mon énergie positive. Un nid où j'ai acquis les valeurs humaines et morales, et où je me suis forgé une identité. Je ne peux me passer de cet abri où je me suis toujours senti en sécurité et le plus aimé.

Ndoutoume Ndong Athanas et Obone Nguema Hélène, mes parents, mes anges gardiens et en même temps mes amis les plus fidèles. Ces deux êtres exceptionnels sans qui je ne serais très certainement pas là aujourd'hui. C'est donc pour dire que je vous dois la vie. Et c'est "fou" de voir comme vous avez toujours cru en moi même pendant que je traversais de grands moments de doute. Je vous dédie tout simplement ce travail et je vous remercie de l'encouragement inébranlable que vous m'avez toujours apporté. Loin d'oublier tout l'argent que vous aviez investi pour assurer ma scolarité. C'est grâce à vous que j'ai pu arriver jusque-là, je vous en serai éternellement reconnaissant. Papa et maman, je vous aime.

J'associe mes profonds remerciements à tous les membres de ma famille pour m'avoir soutenu et pour avoir cru en moi. J'ai le plaisir de citer particulièrement ma grand-mère Asselantame Jeanne Rose, mes tontons et tantines, mes cousins et cousines sans oublier mes petits frères et sœurs Marouchka Cécile, Providence, Zophia, Jérôme Abo, Romy TOME, Joseph Nkoghe et Joseph Obiang qui représentent ma principale source de motivation. C'est aussi grâce à vous que je tiens toujours debout. Je ne peux pas manquer l'occasion de citer dans mes remerciements les noms de certains membres de ma famille comme Henri Nzoghe, Paulin Obiang, Véronique Zang, Rachel Oyane, Hélène Marie Nzougha, Léon Ndzime, Séraphin Nguema, Christian Nguema, Liziane Minkoué, André Ondo, Saïd Obame, Crépin Ebe Mba, Thomas Edou, Prosper Bondime, Alphonsine Abang, Childric Biyoghe, Annie Femba, Alban Ondh, Léon Mebiame, Angèle Ebong, Yannick Bitome, Nguema Mba, Etienne Eyene, Frédérique Obame, Hervé Obiang, Yvon Bekale, Cédric Edou, Agathe Andeme, Christian Minko, Pamela Obone, Aminata Eleng, les Angoue Martine et Bettyna, les Mintoghe Dominique et Erika, Raymond Ovone, Jm Evoung, Dowe Bondime et Jean Baptiste Minko pour avoir cru en moi, pour leurs encouragements et surtout pour l'amour qu'ils me portent dans leur cœur. Je vous remercie infiniment.

À mes défunts grands-parents (Nguema Etome Séraphin, Angoue Gabriel et Ebong Nze Angèle), je vous dédie vivement ce travail. J'aurai bien voulu que vous puissiez vivre cet événement. Mon amour pour vous est éternel.

Parfois la famille, c'est pas les liens du sang, c'est ceux qui sont là quand tu as besoin de quelqu'un (Julius Lester). Pour dire à Idriss Ella, Rudy Noah Ndong, Max Aymard Mayombo, Vianney Bekale, Aldrick Befole, Sylvain Eyene, Cédric Edzang, Perez Assoumou, Jean Derrick Edou, Armel Ongbwa, Davy Nguema, Judicaël Obame, Pacôme Achimi, Hutch Nzenguélé, Kerim Nzambe, Anive Minko et à Albert Novy Messi que vous êtes nés certes, d'une mère différente de la mienne mais je vous considère comme mes frères. Je vous remercie pour vos encouragements et surtout pour la confiance que vous ne cessez de m'accorder.

Pour finir, je voudrais inclure deux personnes chères à mon cœur : Marshall mon rayon de soleil et Kenaelle mon petit cœur. Merci à vous deux d'être arrivées dans ma vie. Kenaelle, merci de m'avoir soutenu durant ces derniers mois. Je vous aime et je vous dédie aussi ce travail.

Table des matières

Introduction	1
Chapitre I. Le cancer	4
I.1. Généralités.....	4
I.2. La cellule cancéreuse	5
I.2.1. Comment l'ADN peut-il être endommagé ?.....	5
I.3. Le métabolisme de la cellule cancéreuse	6
I.3.1. Angiogénèse	7
I.3.1.1 Les facteurs angiogéniques	8
I.3.1.2 Les intégrines.....	9
I.4. Apoptose.....	10
I.4.1. La voie extrinsèque des récepteurs de mort.....	11
I.4.2. La voie mitochondriale intrinsèque	11
I.5. Traitements	11
I.5.1. Les traitements conventionnels.....	12
I.5.1.1 La chirurgie	12
I.5.1.2 La radiothérapie.....	12
I.5.1.3 Les chimiothérapies.....	12
I.5.2. Autres thérapies	12
I.5.2.1 Photothérapie dynamique ou PDT.....	12
I.5.2.2 Historique de la PDT	12
I.5.2.3 Principe	13
I.5.2.4 Mécanisme et processus photochimiques	14
Chapitre II. Vectorisation et les nanoparticules.....	17
II.1. Introduction.....	17
II.2. Paramètres pharmacocinétiques des nanoparticules	18
II.2.1. Administration	18
II.2.2. Distribution	18
II.2.3. Elimination	19
II.3. Importance des caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules sur leur devenir en milieu biologique	20
II.3.1. Influence de la composition et des caractéristiques de surface	20
II.3.1.1 Potentiel Zêta	21
II.3.2. Influence de la taille	22
II.3.2.1 Mouvement Brownien.....	22
II.3.2.2 Distribution en taille et taille moyenne	23

II.4. Nanoparticules au service de la médecine	23
II.4.1. Introduction	23
II.4.2. Quelques nanoparticules utilisées en nanomédecine	24
II.4.2.1 Les liposomes	25
II.4.2.2 Les micelles	26
II.4.2.3 Les dendrimères.....	27
II.4.2.4 Les puits quantiques ou « quantum dots ».....	27
II.4.2.5 Les nanotubes de carbones.....	28
II.4.2.6 Les nanoparticules d'or	28
II.4.3. Les nanoparticules ferromagnétiques	30
Chapitre III. Les nanocristaux de cellulose et les agents d'encapsulation et de ciblage	31
III.1. La cellulose	31
III.1.1. Introduction.....	31
III.1.2. Les nanocristaux de cellulose.....	32
III.2. Les cyclodextrines (CDs)	36
III.2.1. Structure	36
III.2.2. Propriétés de complexation	37
III.2.2.1 Caractérisations physico-chimiques.....	38
III.2.3. Propriétés biologiques	38
III.3. La polyéthylèneimine	38
III.4. Dérivés du triphénylphosphonium comme marqueur mitochondrial	39
Chapitre IV. Les principes actifs.....	41
IV.1. Les curcuminoïdes	41
IV.1.1. Introduction.....	41
IV.1.2. Origine et biosynthèse de la curcumine	42
IV.1.2.1 Extraction de la curcumine	43
IV.1.3. Propriétés physico-chimiques de la curcumine	43
IV.1.3.1 Solubilité et stabilité de la curcumine	44
IV.1.3.2 RMN et UV-Visible de la curcumine	46
IV.1.4. Biodisponibilité de la curcumine	46
IV.1.4.1 Métabolisme de la curcumine	47
IV.1.4.2 Propriétés biologiques de la curcumine	48
IV.1.4.2.1. Propriétés anti inflammatoires	49
IV.1.4.2.2. Propriétés anti-oxydantes	49

IV.1.4.2.3. Propriétés anticancéreuses	50
IV.1.5. Molécules cibles de la curcumine.....	51
IV.2. La piperlongumine.....	53
IV.2.1. Introduction	53
IV.2.2. Synthèse et caractéristiques physico-chimiques	54
IV.2.3. Propriétés biologiques de la piperlongumine.....	54
IV.3. La protoporphyrine IX.....	56
IV.4. Les ARN interférences : les siRNA	57
IV.4.1. Introduction.....	57
IV.4.2. Définition et rôle des siRNA dans les mécanismes d'interférence d'ARN.....	57
IV.4.3. Mécanisme d'interférence par les siRNA.....	58
IV.5. But du travail.....	62
Chapitre I. Nanocristaux de cellulose à base de cyclodextrine.....	68
I.1. Stratégie de synthèse	68
I.2. Synthèse des nanocristaux de cellulose 1.....	68
I.2.1. Caractérisations.....	69
I.2.1.1 Infra rouge (IR).....	69
I.2.1.2 Potentiel zêta	70
I.2.1.3 Microscopie électronique à transmission.....	70
I.2.1.4 Diffusion de la lumière ou DLS (Dynamic light Scattering).....	71
I.2.1.5 Diffraction des rayons X (DRX).....	71
I.3. Synthèse de la β -cyclodextrine cationique 3	72
I.3.1. Caractérisations	73
I.3.1.1 Infra-rouge.....	73
I.3.1.2 RMN ^1H	74
I.3.1.3 Analyse élémentaire	75
I.4. Synthèse des composés cyclodextrine/nanocristaux de cellulose (3).....	75
Chapitre II. Synthèse - Extraction et fonctionnalisation des principes actifs.....	77
II.1. Extraction des curcumines I, II et III	77
II.1.1. Caractérisations	77
II.1.1.1 UV-visible.....	77
II.1.1.2 Spectrométrie de masse (SM)	78
II.1.1.3 RMN ^1H	78
II.2. Protoporphyrine IX et dérivés.....	79
II.2.1. Métallation de la protoporphyrine IX	81

II.2.2. Synthèse de la protoporphyrine IX bis (hydroxyl éthyl ester)	82
II.2.3. Synthèse de la protoporphyrine IX mono (8)- et di- adamantane (9)	84
II.2.4. Métallation des dérivés de PpIX 9 et 10	87
II.2.4.1 Spectroscopie de masse	88
II.2.4.2 Spectroscopie UV-Visible	88
II.3. Synthèses de dérivés de phosphonium.	89
II.3.1. Synthèse du bromure de 3-hydroxy propyl triphénylphosphonium (11).....	90
II.3.1.1 RMN ¹ H.	90
II.3.1.2 RMN ¹³ C.	91
II.3.1.3 Infra-rouge.	91
II.3.1.4 UV-Visible.	92
II.3.2. Synthèse du bromure d'adamantane carboxylate de 3-propyl triphénylphosphonium.....	92
II.3.3. Synthèse du bromure de 5-carboxy pentyl triphénylphosphonium (13).	94
Chapitre III. Encapsulation des principes actifs	96
III.1. Inclusion de la curcumine I	96
III.1.1. Relargage de la curcumine I.....	98
III.2. Inclusion de la piperlongumine et des composés 9Zn et 10Zn.....	99
III.3. Inclusion du bromure d'adamantane carboxylate de 3-propyl triphénylphosphonium.	100
III.4. Conclusion	101
Chapitre IV. Nanocristaux de cellulose à base de polyéthylèneimine : transfection.....	102
IV.1. Stratégie de synthèse	102
IV.2. Synthèse des nanocristaux de cellulose oxydés CNCox (19).....	103
IV.2.1. Caractérisations.	104
IV.2.1.1 Infra rouge.....	104
IV.2.1.2 DLS et potentiel zêta.	106
IV.3. Synthèse de nanocristaux de cellulose polyaminés (20).....	106
IV.3.1. Caractérisations.	107
IV.3.1.1 DLS et potentiel zêta.	107
IV.4. Synthèse de nanocristaux de cellulose siRNA (21)	107
IV.4.1. Saturation des nanoparticules cationiques (20) en siRNA.	108
IV.5. Synthèse de la fluorescéine polyaminée (22).....	109
IV.6. Synthèse des nanocristaux de cellulose-FITC (23).....	110
IV.7. Conclusion.....	111
Chapitre V. Evaluation biologique.	112
V.1. Etude cytotoxique des composés 3, 14, 15, 16 et 17.....	112
V.1.1. Cytotoxicité directe.	112

V.1.1.1 Effet de la curcumine I et de son complexe de formation (complexe 14).....	112
V.1.1.2 Etude de l'internalisation cellulaire par microscopie confocale.	115
V.1.1.3 Effet de la piperlongumine et de son complexe de formation (complexe 15).	116
V.1.2. Cytotoxicité par la méthode PDT ou photocytotoxicité.....	117
V.2. Etude cytotoxique et transfection des siRNA.	119
V.2.1. Stabilité et test de la protection des siRNA par les nanocristaux.	120
V.2.2. Relargage des siRNA complexés en fonction du pH	121
V.2.3. Internalisation des nanocristaux dans cellules par endocytose	121
V.2.4. Viabilité cellulaire et induction de l'apoptose par les siRNA killer	122
V.3. Conclusion.....	123
Conclusion et perspectives.....	126
V.4. Réactifs et solvants	130
V.5. Chromatographie	131
V.5.1. Chromatographie sur couche mince : CCM	131
V.5.2. Chromatographie sur colonne.....	131
V.5.3. Chromatographie sur plaques préparatives	131
V.6. Analyses	131
V.6.1. UV-Visible	131
V.6.2. Infrarouge (IR).....	131
V.6.3. Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	131
V.6.4. Spectrométrie de masse (Maldi).....	132
V.6.5. Microscopie électronique à transmission (MET).....	132
V.6.6. Microscopie confocale	132
V.6.7. Diffraction des rayons X.....	132
V.6.8. Analyse élémentaire	132
V.6.9. DLS – Potentiel zêta.....	132
V.7. Synthèses	134
V.7.1. Synthèses des nanocristaux de cellulose (1).	134
V.7.2. Synthèse de la β -cyclodextrine cationique (2).	135
V.7.3. Synthèse des composés Cyclodextrine/Nanocristaux de cellulose (3).	136
V.7.4. Extraction des curcumines (4, 5 et 6).....	137
V.7.5. Synthèse de la protoporphyrine de zinc (ZnPpIX).....	138
V.7.6. Synthèse de la protoporphyrine IX bis (hydroxy éthyl ester) (8).	139
V.7.7. Synthèse de la protoporphyrine IX adamantane carboxy hydroxy éthyl ester (9).....	140
V.7.8. Synthèse de protoporphyrine IX bis (adamantane carboxy éthyl ester) (10).....	141
V.7.9. Synthèse de zinc protoporphyrinato IX adamantane carboxy hydroxy éthyl ester (9Zn).....	142
V.7.10. Synthèse de zinc protoporphyrinato IX bis (adamantane carboxy éthyl ester) (10Zn).	143
V.7.11. Synthèse du bromure de 3 – hydroxy propyl triphénylphosphonium (11).....	144

V.7.12. Synthèse du bromure d'adamantane carboxylate de 3 – propyl (triphényl phosphonium) (12).	145
V.7.13. Synthèse du bromure de 5 – carboxy pentyl triphényl phosphonium (13).	146
V.7.14. Encapsulation de la curcumine.....	147
V.7.14.1 Relargage de la curcumine	148
V.7.15. Encapsulation de la piperlongumine (15).....	149
V.7.16. Encapsulation de 9Zn (16)	150
V.7.17. Encapsulation de 10Zn (17)	151
V.7.18. Encapsulation de 12 (18)	152
V.7.19. Synthèse des nanocristaux de cellulose oxydée (19).....	153
V.7.20. Synthèse des nanocristaux de cellulose polyaminée (20).	154
V.7.21. Synthèse des nanocristaux de cellulose siRNA (21).....	155
V.7.22. Synthèse de la fluoescéine polyaminée (22).....	156
V.7.23. Synthèse des nanocristaux de cellulose fluoescéine (23).....	157
V.8. Culture cellulaire des PC-3, DU-145 et HT-29	160
V.8.1. Principe	160
V.8.2. Méthodologie.....	160
V.8.2.1 Cytotoxicité directe	160
V.8.2.2 Cytotoxicité par la méthode PDT ou Phototoxicité	160
V.8.3. Test MTT	161
V.8.4. Etude de l'internalisation cellulaire de la curcumine par microscopie confocale.....	161
V.8.4.1 Méthodologie.....	161
V.9. Culture cellulaire des C2C12.....	162
V.9.1. Apoptose – expression des gènes (caspases 8 et 9).....	162
V.9.2. Etude de l'internalisation des lignées C2C12 des nanocristaux par microscopie épi-fluorescence	162
V.9.3. Evaluation de la protection de siRNA par le composé 20 (PEI–CNCox).....	163
Annexes	171

Table des illustrations

Figure 1: Les trois cancers les plus meurtriers chez l'homme (à gauche) et chez la femme (à droite) ²	4
Figure 2 : Evolution (en %) de l'incidence et de la mortalité liée au cancer (taux standardisé monde estimé) en France métropolitaine de 1980 à 2012 selon le sexe.	5
Figure 3 : Représentation schématique du métabolisme du glucose dans les cellules cancéreuses.	7
Figure 4: Processus de formation de la néovascularisation (http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/dossiers/d/medecine-cancer-mecanismes-biologiques-1453/page/13/).	8
Figure 5 : Voies d'induction de l'apoptose.	10
Figure 6 : Structure chimique de l'hématoporphyrine (Hp) et de l'éosine.	13
Figure 7 : Représentation schématique du principe de la photothérapie dynamique.	13
Figure 8 : Diagramme de Perrin Jablonski.	14
Figure 9 : Schéma représentatif de la charge de surface (potentiel zêta) d'une nanoparticule.	21
Figure 10 : Gamme des tailles des principales structures chimiques et biologiques.	24
Figure 11 : Quelques nanoparticules développées par les nanotechnologies.	24
Figure 12: Structure de l'acide ursolique.	25
Figure 13 : a) Schéma de micelle en solution aqueuse et structure chimique de b) Déqualinium et c) camptothécine.	26
Figure 14: Structure chimique du polyamidoamine et du poly-propylène imine.	27
Figure 15: Représentation schématique de résonance plasmonique de surface des nanoparticules.	29
Figure 16 : Structure chimique de la cellulose.	31
Figure 17 : a) Schématisation de la composition des fibres de cellulose et b) représentation des zones amorphes de la cellulose.	32
Figure 18 : 1) Mécanisme de l'hydrolyse acide de la cellulose et 2) Mécanisme d'estérification de cellulose par hydrolyse à l'acide sulfurique.	33
Figure 19 : Le nombre de publications allant de 2000 – 2013 sur les matériaux à base de cellulose dans les applications telles que : ingénierie tissulaire, implants, délivrance de médicaments, antibactérien/antimicrobien, cardio-vasculaire, cicatrisation.	35
Figure 20 : Structure chimique et la forme en cône tronquée de la β -cyclodextrines.	36
Figure 21 : Structure chimique d'une PEI linéaire et d'une PEI branchée.	39
Figure 22 : Structure de la doxorubicine vectorisée par la TPP.	40
Figure 23 : Ciblage mitochondrial par la TPP.	40

Figure 24 : a) Plante, b) rhizome et c) poudre séchée de <i>Curcuma longa</i>	41
Figure 25 : Structures chimiques des curcumines I, II et III.	41
Figure 26 : Biosynthèse de la curcumine (Roughley et Whiting, 1973).	42
Figure 27 : Equilibre céto-énolique de la curcumine.	43
Figure 28 : Produits de dégradation de la curcumine en milieu tampon phosphate (0,1 M, 37°C, pH7,2) « Wang et al, 1997 ».	44
Figure 29 : Produits de la photo-dégradation de la curcumine (Sundaryono et al, 2003).	45
Figure 30 : Mécanisme de formation des produits de photo-dégradation de la curcumine (Tonnesen et Greenhill).	45
Figure 31 : Biodisponibilité de la curcumine chez l'homme avec ou sans pipérine (Ikiki et Dutta, 2014).	46
Figure 32 : Voie métabolique et métabolites possibles de la curcumine (Ikiki et Dutta, 2014).	47
Figure 33 : Pathologies pouvant être traitées par la curcumine (Naksuriya et coll., 2014).	48
Figure 34 : Cibles moléculaires de la curcumine (Prasade et coll., 2014).	51
Figure 35 : Structure chimique de la piperlongumine.	54
Figure 36 : Pourcentage de viabilité cellulaire en fonction de la concentration en piperlongumine.	55
Figure 37 : Mode d'action de la piperlongumine (Parkinson et Hergenrother).	55
Figure 38 : Rôle des analogues de piperlongumine et même de la piperlongumine.	56
Figure 39 : Schéma simplifié du mécanisme d'interférence des siRNA.	58
Figure 40 : Schéma général de la stratégie de synthèse 1.	68
Figure 41 : Synthèse des nanocristaux de cellulose 1.	68
Figure 42 : Spectre IR des nanocristaux de cellulose 1.	69
Figure 43: Photographies des nanocristaux de cellulose (1) obtenues par MET (la barre d'échelle représente à gauche 500 nm et à droite 100 nm).	70
Figure 44 : Diagramme de DRX des nanocristaux de cellulose1.	71
Figure 45 : Synthèse de la β -cyclodextrine cationique 2.	73
Figure 46 : Spectres IR des cyclodextrines cationiques (2) et natives.	73
Figure 47 : Spectre RMN ^1H des cyclodextrine native et cationique 2 dans le D_2O	74
Figure 48 : Synthèse du composé CD/CNCx (3).	75
Figure 49 : Schéma de l'extraction des curcumines I, II et III.	77
Figure 50 : Spectre UV-Visible des curcumines I, II et III dans le CHCl_3	78

Figure 51 : Spectre RMN ¹ H des curcumines I, II et III dans le CDCl ₃	79
Figure 52 : Schéma retro-synthétique des modifications effectuées sur la PPIX.....	80
Figure 53 : Synthèse de la protoporphyrine de zinc.	81
Figure 54 : Spectres UV-Visible de PPIX et ZnPPIX dans le DMSO.	81
Figure 55 : Synthèse du composé 7	82
Figure 56 : Synthèse du composé 8	82
Figure 57 : Spectre RMN ¹ H du composé 8 dans le CDCl ₃	83
Figure 58 : Numérotation adoptée pour la description des spectres RMN des dérivés protoporphyriniques.	84
Figure 59 : Synthèse des composés 9 et 10	85
Figure 60: Mécanisme d'estérification catalysée par la DMAP.....	85
Figure 61 : Synthèse des composés 9Zn et 10Zn	87
Figure 62 : Spectre UV-Visible des composés 9 , 10 , 9Zn et 10Zn dans le CHCl ₃	87
Figure 63 : Synthèse du composé 11	90
Figure 64 : Spectre RMN ¹ H du composé 11 dans CDCl ₃	90
Figure 65 : Spectre RMN ¹³ C du composé 11 dans le CDCl ₃	91
Figure 66 : Spectres IR de TPP et du composé 11	92
Figure 67 : Synthèse du composé 12	93
Figure 68: Spectre UV-Visible des composés 11 et 12 dans le CHCl ₃	93
Figure 69 : Synthèse du composé 13	94
Figure 70 : Schéma général de la synthèse de principe actif lié au composé 3 ou CD/CNCx.....	96
Figure 71 : Synthèse du complexe 14	96
Figure 72 : Spectre UV-Visible du complexe 14 dans l'eau.....	97
Figure 73 : a) Distribution en taille par DLS du complexe 14 et b) potentiel zêta du complexe 14	98
Figure 74 : Pourcentage de curcumine relarguée en fonction du temps.	99
Figure 75 : Structure des complexes 15 , 16 et 17	99
Figure 76 : Synthèse du complexe 18	100
Figure 77 : Schéma général de la stratégie de synthèse 2	102
Figure 78 : Mécanisme réactionnel de l'oxydation périodique des α-diols.	103

Figure 79 : Photo-décomposition du periodate.....	104
Figure 80 : Synthèse des nanocristaux de cellulose oxydés 19 par NaIO ₄	104
Figure 81 : Spectre IR des CNCx 1 (en noir) et des CNCox 19 (en rouge).	105
Figure 82 : Formes hydratées des UAGs oxydées.	105
Figure 83 : Structures possibles d'hémiacétal.	106
Figure 84 : Synthèse des nanocristaux cationiques 20 « ou PEI-CNCox ».	106
Figure 85 : Mécanisme réactionnel de la réaction d'amination réductrice.	107
Figure 86 : Synthèse des complexes siRNA-PEI-CNCox (21).	107
Figure 87 : Spectres UV de siRNA de référence (en rose) et des siRNA contenus dans le surnageant.	108
Figure 88 : Synthèse du composé 22	109
Figure 89 : Spectre UV-Visible du composé 22 dans le CHCl ₃	110
Figure 90 : Synthèse des nanoparticules fluorescentes 23	110
Figure 91 : Représentation du composés 3 , complexe 14 et de la structure de la curcumine I.....	112
Figure 92 : Etude des effets dose dépendants et antiprolifératifs de la curcumine et des complexes 3 et le complexe 14 sur la viabilité des cellules PC3, DU145 et HT29 à 24h et 48h.	114
Figure 93 : Images de microscopie confocale des cellules PC-3, DU 145 et HT-29 avant traitement (contrôle) et après 4h de traitement avec la curcumine et le complexe 14	115
Figure 94: Structure chimique de la piperlongumine et le complexe 15	116
Figure 95 : Etude des effets dose dépendants et antiprolifératif de la piperlongumine et des composés 3 et le complexe 15 sur la viabilité des cellules PC3, DU145 et HT29 à 24h et 48h.....	117
Figure 96 : Structure chimique des composés 9Zn , 10Zn , ZnPpIX et les complexes 16 et 17	118
Figure 97 : Effet dose dépendant et antiprolifératif des composés 9Zn , 10Zn et les complexes 16 et 17 à l'obscurité à 48h.....	118
Figure 98 : Effet dose dépendant et antiprolifératif des composés 9Zn , 10Zn , les complexes 16 et 17 éclairés par une lumière blanche avec une fluence de 75 J/cm ²	119
Figure 99 : Structure des composés 21 et 23	120
Figure 100: Electrophorèse des siRNA nus (a) et des siRNA complexés aux CNCx (b) sur gel d'agarose après interaction avec le bromure d'éthidium.	120
Figure 101 : Pénétration cellulaire des nanocristaux de cellulose dans les cellules C2C12.	122
Figure 102 : Mort cellulaire au cours de la cinétique de traitement par rapport aux cellules non traitées. ...	122

Table des tableaux

Tableau 1 : Distribution en taille des nanocristaux de cellulose obtenus par hydrolyse acide, en fonction de la source cellulosique utilisée.....	33
Tableau 2 : Principales caractéristiques des cyclodextrines naturelles.	36
Tableau 3 : Quelques études cliniques publiées sur la curcumine	52
Tableau 4 : Quelques exemples des plantes du genre « Piper » contenant la piperlongumine, leur nom vernaculaire et leurs applications thérapeutiques traditionnelles.	53
Tableau 5 : Quelques exemples de matériaux utilisés pour vectoriser les siRNA.....	59
Tableau 6 : Résultats des analyses en UV-Visible et en spectrométrie de masse (MSMS) des curcumines. ...	78
Tableau 7 : RMN ¹ H des composés 8 , 9 et 10 dans le CDCl ₃	86
Tableau 8 : Les masses théoriques et trouvées par spectrométrie de masse par MALDI-Tof.	88
Tableau 9 : Valeurs de coefficients d'extinction molaire des composés (8 , 9 , 10 , ZnPpIX , 9Zn et 10Zn).....	88
Tableau 10 : RMN ¹ H des composés 9Zn et 10Zn dans le CDCl ₃	89
Tableau 11 : RMN ¹ H des composés 11 , 12 et 13 dans le CDCl ₃ (a) et le DMSO-d ₆ (b).	95
Tableau 12 : Taux et pourcentage de fixation de la curcumine sur le composé 3 « CD/CNCx ».	97
Tableau 13: Pourcentage de relargage de la curcumine contenue dans le composé 14 en fonction du temps.	98
Tableau 14 : Pourcentage de fixation en principe actif sur le composé 3 « CD/CNCx » et potentiel zêta.	100
Tableau 15 : Valeurs d'[IC ₅₀] obtenues après 24 et 48h de traitement.....	114
Tableau 16 : Valeurs d'[IC ₅₀] obtenus après 24 et 48h de traitement.	117

Liste des abréviations

ϵ : Coefficient d'absorption molaire

λ : Longueur d'onde

ν : Nombre d'onde

$\Delta\psi_m$: Potentiel transmembranaire mitochondriale

AIF : Apoptosis inducing factor

5-ALA : Acide 5-aminolévulinique

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ATP : Adénosine-5'-triphosphate

AuNPs : Nanoparticules d'or

β -CD : β -Cyclodextrine

CCM : Chromatographie sur couche mince

CIS : Conversion inter-système

CNCx ou CNCox : Nanocristaux de cellulose ou nanocristaux de cellulose oxydés

Coll. ou al : Collaborateur

COX : Cyclooxygenase

DED : Death effector domain

DISC : Death-inducing signalling complex

DLS : Dynamic Light Scattering (Diffusion de la lumière)

DMF : Diméthylformamide

DMAP : 4-diméthylaminopyridine

DMLA : Dégénérescence maculaire liée à l'âge

DMSO : Diméthyle sulfoxyde

D.O : Degré d'oxydation

DRX : Diffraction des rayons X

DS : Degré de substitution

EPR: Enhanced permeation and retention

éq ou équiv: Équivalent

FDA: Food and Drugs Administration

FITC : Fluorescéine isothiocyanate

FITR : Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier)

GTAC : Glycidyltrimethylammonium chloride

GSH : Glutathion

GSSG : Glutathion oxydé

GSTP1 : Glutathion s-transférase pi 1

H ou h : Heure

Hp : Hématoporphyrine

IC₅₀ : Concentration nécessaire pour diminuer de 50 % la viabilité cellulaire

INCa : Institut National du Cancer

InVS : Institut national de veille sanitaire

IR : Infrarouge

IRM : Imagerie par résonance magnétique nucléaire

J : Constante de couplage

J-C : Jésus Christ

JNK1 : Protein c-Jun N-terminal Kinases

K_a : Constante d'association

K_B : Constante de Boltzmann

LCSN : Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles

LDH : Lactate déshydrogénase

LUV : Large Unilamellar Vesicles, LUV

m/z : rapport masse sur charge

MALDI : Désorption-ionisation laser assisté par matrice

m-THPC : Tétra-(méta-hydroxylphényl) chlorure

MMPs : Métalloprotéinases matricielle

MEC : Matrice extracellulaire

MET : Microscopie électronique à transmission

MLV : Multi-lamellar Vesicles

mn : Minute

MPS : Système phagocytaire mononucléé

MTT : Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium

MWNT : Multiple-walled nanotube

NADPH : Nicotinamide adénine di nucléotide phosphate

nm : Nanomètre

NPs : Nanoparticules

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

O-THPP : Tétra-(ortho-hydroxylphényl) porphyrine

PACT : Photochimiothérapie antibactérienne

PBS : Phosphate buffer saline

PDT : Photothérapie dynamique

PEG : Polyéthylène glycol

PEI : Polyéthylèneimine

PL : Piperlongumine ou pipartine

PpIX ou ZnPpIX : Protoporphyrine IX ou protoporphyrine IX de zinc

ppm : Partie par million

PS : Photosensibilisateur

PTT : Thermothérapie

QD : Quantum dots

r : Rayon hydrodynamique des particules

R_f : Rapport frontal

RES : Système réticuloendothélial

RGD : Peptide arginine-glycine-acide aspartique

RMN : Résonance magnétique nucléaire

ROS : Reactive oxygen species (espèces réactives de l'oxygène)

siRNA : Small Interfering RNA

SPM : Système de phagocytoses mononuclées

SPIO : Particules super paramagnétiques d'oxyde de fer

SUV : Small Uni-lamellar Vesicles

SWNT : Single-walled nanotube

s : Singulet

d : Doublet

dél. : Doublet élargie

dd : Double doublet

q : Quadruplet

m : Multiplet

SM : Spectrométrie de masse

T₁ : Temps de relaxation longitudinal

T₂ : Temps de relaxation transversal

TA : Température ambiante

TMS : Tétraméthylsilane

TNFR : Récepteurs au tumor necrosis factor

TPP : Triphénylphosphine

TRAIL : TNF-related apoptosis inducing ligand

UAG : Unité anhydroglucose

UGMA : Unité de Génétique Moléculaire Animale

UV : Ultra-violet

USPIO : Ultra petite particule super paramagnétique d'oxyde de fer

VEGF : Facteur de croissance endothéliale vasculaire

VEGFR : Vascular endothelial growth facteur receptor (récepteur au facteur de croissance vasculaire endothelial)

uma : Unité de masse atomique

Introduction

Introduction

Le cancer est une pathologie dégénérative conduisant à une hyper-prolifération cellulaire anarchique et incontrôlée. Il s'agit d'une maladie complexe, multifactorielle et dont la mortalité (8,2 millions de décès par an) qui lui est associée la classe parmi les causes principales de décès au monde selon l'OMS. La lutte contre cette maladie constitue depuis plusieurs années un enjeu majeur de santé publique. Les progrès de la recherche thérapeutique incluant les techniques de chirurgie, de radiothérapie ou encore de chimiothérapie ont fait leurs preuves dans la prise en charge du traitement et ont même permis de guérir près de 50% des cas. La prise en charge des malades et la détection précoce ont aussi très fortement évolué. Malgré cela, certains cancers restent incurables. De plus, les différentes thérapies actuelles présentent des limites car les molécules utilisées sont hydrophobes, peu sélectives des zones tumorales et sont souvent toxiques pour les cellules saines. À ces limites s'ajoute un verrou supplémentaire, le développement des mécanismes de résistance des cellules cancéreuses vis-à-vis desdites molécules. La nécessité de mettre en œuvre des stratégies nouvelles pour améliorer l'efficacité et l'innocuité des traitements s'avère donc capitale. Aujourd'hui, une meilleure compréhension des caractéristiques moléculaires et des voies de signalisation sous-jacentes au cancer permet de cibler au mieux les tumeurs. De nombreuses études conceptuelles focalisent leur attention sur le métabolisme particulier de la cellule cancéreuse : celui-ci se caractérise par une glycolyse aérobie produisant de l'acide lactique à partir du pyruvate grâce au lactate déshydrogénase (LDH). Ce mécanisme induit aussi, dans des conditions hypoxiques (fréquentes dans les tumeurs), la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) susceptibles d'engendrer l'apoptose. Mais ce système de défense efficace mis en place par les cellules tumorales contre les ROS abaisse ce taux d'espèces oxydantes dans la mitochondrie. Dans ce cadre, nous nous proposons d'associer à ce processus des molécules capables de détruire les composés impliqués dans les mécanismes de lutte contre les ROS libres dans la mitochondrie. La curcumine (extraite de *curcuma longa*) et la piperlongumine (extraite de *piper longum* ou poivre long) sont des molécules modèles sélectionnées dans le cadre de ce projet de thèse. Ces deux molécules de structures chimiques voisines sont largement décrites dans la littérature pour leurs intéressantes propriétés anti-tumorales. De plus, elles ont un avantage d'être naturelles, faciles d'obtention, peu onéreuses et faiblement toxiques pour les cellules saines. Elles inhibent, entre autre, la glutathion s-transférase, et la thiorédoxine réductase qui sont connues pour diminuer la concentration en ROS dans les cellules cancéreuses. Dans le cadre de l'activité de recherche du LCSN sur les photosensibilisateurs, un intérêt tout particulier s'est porté sur la protoporphyrine IX. En effet, cette molécule qu'on retrouve sous forme ferrocyclée dans le sang est un composé photoactivable qui sera utilisé en photothérapie dynamique (PDT) pour optimiser le traitement.

La PDT est une technique non conventionnelle résultant de l'action combinée entre une molécule photosensibilisante et la lumière pour produire après irradiation lumineuse des espèces oxygénées dont l'une est appelée oxygène singulet est particulièrement active. Ces entités toxiques vont engendrer la mort de la cellule. Cependant, les différentes molécules sélectionnées peu stables en milieu plasmatique, ne sont pas hydrosolubles et nécessitent d'être véhiculées vers les zones tumorales. Dans ce contexte, nous nous sommes tout particulièrement intéressés au phénomène d'angiogénèse, un processus conduisant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguin à partir d'un réseau capillaire préexistant. Cette néovascularisation laisse apparaître des fenêtres de quelques centaines de nanomètres à travers lesquelles des particules de taille nanométrique peuvent passer. La nanotechnologie est une alternative prometteuse qui va exploiter cette perméabilité pour davantage concentrer les drogues dans la tumeur. En plus du développement et la conception de technologies innovantes pour la détection de biomarqueurs cancéreux, la nanotechnologie développe également des stratégies de vectorisation pour la délivrance des « médicaments intelligents » dans les tissus malades. Récemment, il a été montré que les sucres, les cyclodextrines, les polyamines et les peptides sont de bons candidats pour la vectorisation des principes actifs hydrophobes vers les tumeurs. Les travaux récemment réalisés au sein de notre laboratoire ont permis de mettre en évidence, l'intérêt d'utiliser des nanoparticules d'oxyde de fer ou des nanocristaux de cellulose (CNCx) pour la vectorisation de photosensibilisateurs vers les régions tumorales par effet EPR (Enhanced Permeation and Retention). Le présent travail s'inscrit dans cette démarche thérapeutique toutefois en apportant une nette amélioration de la stratégie. Au cours de ce travail, nous avons développé la synthèse et la fonctionnalisation du nanovecteur : nanocristaux de cellulose. Cette plateforme est tout d'abord utilisée afin de vectoriser les principes actifs tels que la curcumine, la piperlongumine et les dérivés de PpIX en utilisant la β -cyclodextrine, un oligosaccharide de sept unités glycopyranose qui a été préalablement fonctionnalisé par un ammonium quaternaire. L'autre approche consiste, dans un cadre de transfection de gène, à fixer de petits ARN de transfert (siRNA) sur les nanocristaux de cellulose oxydés, par l'intermédiaire d'un polymère d'amine, la polyéthylèneimine. Les nanobiomatériaux obtenus ont été réalisés de manière à cibler les régions tumorales et à éviter toute immunogénicité.

Tous les nanovecteurs ont été caractérisés grâce à l'étude de leur taille (DLS, Microscopie électronique à transmission), de leur charge (potentiel zêta) et des fonctions organiques présentes en surface (FITR). Afin de valider ce nouveau concept, l'évaluation biologique *in vitro* de ces plateformes a été réalisée sur des lignées cancéreuses de la prostate, du colon et sur une lignée du myoblaste murin de souris (C2C12). Enfin, le nanovecteur a également été utilisé pour la première fois afin de montrer son potentiel à transférer des gènes, des siRNA à l'intérieur des cellules cancéreuses en utilisant la polyéthylèneimine.

Partie 1.

Cancer – Vectorisation – Nanoparticules – Ciblage tumoral : état de la question

Chapitre I. Le cancer

I.1. Généralités

Le cancer existe fort probablement depuis l'origine de l'humanité. Les premières descriptions connues de cette maladie ont été faites par Hippocrate (460–377 av. J-C) depuis l'Antiquité¹. En comparant les cancers à un crabe, ce médecin grec leur a donné pour la première fois les termes grecs « carcinos » et « carcinoma » par analogie à l'aspect des tumeurs dont les prolongements rappellent l'animal. Celsus (28 av. J-C. –50 ap. J-C.)¹, médecin romain, introduit le mot grec "carcinus" tel quel, dans le langage latin pour désigner plutôt des ulcères d'allure maligne avec pénétration profonde tandis que le terme "carcinoma" s'appliquait plutôt pour des lésions pré-malignes et malignes plus superficielles. Bien que de plus en plus curable, le nombre de nouveaux cas de cancer en France ne cesse d'augmenter. En 2012, on estime environ à 355.000 le nombre de nouveaux cas soit 200.000 cas pour les hommes et 155.000 cas pour les femmes. Cette augmentation est liée non seulement à la croissance démographique mais également au vieillissement de la population. Il convient tout de même de rappeler que le cancer du poumon est la première cause de décès par cancer chez l'homme devant le cancer colorectal et le cancer de la prostate. Chez la femme, le cancer du sein se situe au premier rang devant le cancer du poumon et le cancer colorectal² (Figure 1).

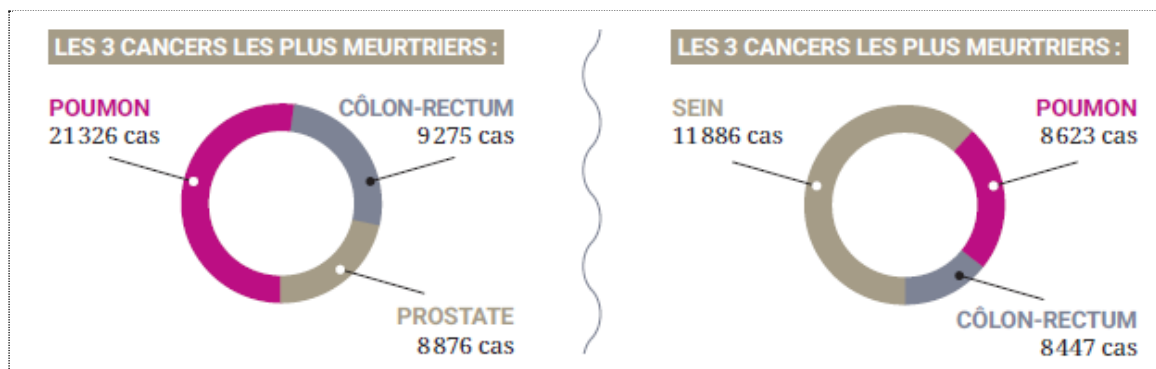


Figure 1: Les trois cancers les plus meurtriers chez l'homme (à gauche) et chez la femme (à droite)².

Malgré les progrès incessants faits tant en matière de traitement que de détection et de prévention, cette maladie véhicule encore beaucoup de peur et reste crainte par la majorité des malades. Bien que la mortalité qui lui est associée tende à se stabiliser ou à diminuer légèrement au cours des années (Figure 2), il convient de noter qu'en 2012, le cancer est à l'origine de 148.000 décès (85.000 chez l'homme et 72.700 chez la femme) en France.

¹ M. J. Imbault-Huart, Ed. *Histoire du Cancer*, 1985, 74-77.

² Source : OMS, profils des pays pour le cancer, 2014.

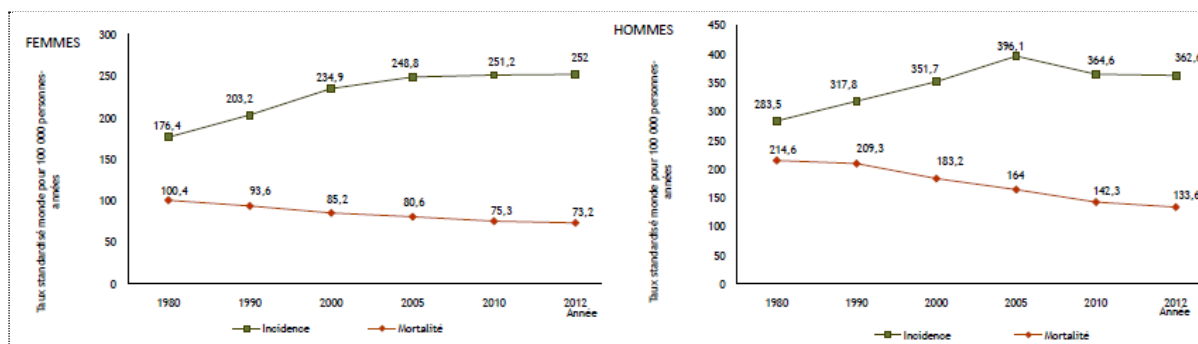


Figure 2 : Evolution (en %) de l'incidence et de la mortalité liée au cancer (taux standardisé monde estimé) en France métropolitaine de 1980 à 2012 selon le sexe³.

De nos jours, le cancer est un terme générique attribué à un grand nombre de maladies ayant une étiopathogénie et des manifestations très variées pouvant impliquer des soins et des traitements différents. Une caractéristique principale définissant cette pathologie (cancer) est l'apparition rapide de cellules anormales et dont la croissance est anarchique et incontrôlée.

I.2. La cellule cancéreuse

Une tumeur cancéreuse se caractérise par une hyper-prolifération cellulaire incontrôlée au sein d'un tissu ou d'un organe. Par opposition à la cellule saine, la cellule cancéreuse présente une membrane cytoplasmique hypertrophiée et un noyau plus volumineux. En fait, ce sont les gènes antiprolifératifs et réparateurs d'ADN (ou oncogènes) qui sont endommagés entraînant ainsi l'affaiblissement peu à peu du système de protection d'ADN. L'altération de l'ADN conduit à une cellule dérégulée ayant acquis les propriétés de se multiplier indéfiniment et de manière incontrôlée. L'accumulation au sein d'un tissu de l'organisme d'environ 100.000 cellules cancéreuses dérivant du clone (cellule initiatrice) conduit à la formation d'un cancer (ou tumeur maligne). Ce processus peut être court mais il est habituellement long : c'est-à-dire 10 à 30 ans peuvent séparer la naissance d'une cellule anormale et l'apparition d'une tumeur d'environ 1 à 2 cm³ de volume. Le cancer est susceptible, par des mécanismes biochimiques, de se répandre à travers tout le corps par métastase.

I.2.1. Comment l'ADN peut-il être endommagé ?

Les cellules vivantes sont constamment exposées à des stress générateurs d'importantes mutations sur leur ADN des cellules. Ces lésions sont dues d'une part à l'exposition à différentes substances (ou agents). Il peut s'agir de substances chimiques telles que celles présentes dans la fumée du tabac, les pesticides, etc. de rayonnements ionisants (radioactivité) ou de rayonnements solaires (UV), de virus (*papillomavirus*) ou de bactéries (*Helicobacter pylori*) etc. D'autre part, cette problématique peut-être héréditaire c'est-à-dire que des personnes naissent

³ Source: Blinder-Foucard F, 2013. Traitement: INCa 2012.

avec une prédisposition génétique les sensibilisant à cette maladie. Ces personnes ont un risque plus important que la population générale de développer un cancer dans le même environnement.

La compréhension des phases métaboliques indispensables à la croissance tumorale s'avère importante pour appréhender au mieux le phénomène de cancérogénèse. Il s'agira dans ce paragraphe d'insister sur certains points clés qui serviront de leviers pour améliorer ou imaginer des traitements anti-tumoraux. Pour survivre, la tumeur cancéreuse induit le développement de nouveaux vaisseaux sanguins : c'est le phénomène d'angiogénèse.

1.3. Le métabolisme de la cellule cancéreuse

Le métabolisme de la cellule cancéreuse est différent de celui de la cellule normale, il a été découvert en 1927 par Otto Warburg⁴, qui l'avait défini comme une fermentation. De nos jours, il est plutôt décrit sous l'appellation de glycolyse aérobie. Cette découverte qui lui a valu le prix Nobel en 1930 a peu à peu été oubliée au profit de mécanismes intéressants la multiplication infinie des cellules cancéreuses, aux traitements concernant la coupure de l'ADN et les processus bloquant la division cellulaire. Ce n'est que dans les toutes dernières années que l'on s'est intéressé à ce phénomène en essayant de le comprendre et d'en tirer des possibilités de thérapies. On peut penser que ce métabolisme est une adaptation des cellules aux conditions d'hypoxie qui règne lors de l'apparition des premières cellules cancéreuses mais il se maintient même lorsque la néovascularisation apporte suffisamment de l'oxygène. L'initiation et la progression de la tumeur implique la sélection des cellules les plus résistantes et les plus agressives et donc une production rapide d'ATP même au dépend du rendement de production supérieur qui serait obtenu par la voie classique d'oxydation phosphorylante^{5,6}.

La glycolyse aérobie produit de grandes quantités d'acide lactique qui sont rejetées dans l'environnement cellulaire et qui contribuent à la progression de la tumeur. En effet, l'acide lactique détruit les cellules saines environnantes et inhibe les cellules immunitaires⁷.

Les transporteurs de glucose sont fortement actifs notamment par le facteur HIF-1 et le processus est mis à profit pour la visualisation des tumeurs par tomographie en injectant du deoxy-fluoro-glucose radioactif. Le glucose est dans la plupart des cancers métabolisé dans la voie alternative, la voie des pentoses : PPP (pentose phosphate pathway). Cette voie sert à alimenter la synthèse des ADN et ARN à partir du ribulose 5 – phosphate. De plus, elle génère du NADPH qui

⁴ O. Warburg, F. Wind, E. Negeleni, *J. Gen. Physiol.*, 1927, **8**, 519-530.

⁵ D. Hanahan and R. A. Weinberg, *cell.*, 2000, **100**, 57-70.

⁶ M.G. Van Der Heiden, L. C. Cantley, C. B. Thompson, *Science*, 2009, 324, 1029-1033.

⁷ A. Calcinotto, P. Filipazzi, M. Grioni, M. Iero, A. De Milito, A. Ricupito, A. Cova, R. Canese, E. Jachetti, M. Rossetti, V. Huber, G. Parmiani, L. Generoso, M. Santinami, M. Borghi, S. Fais, M. Bellone and L. Rivoltini, *Cancer Res.*, 2012, **72**, 2746-2756.

sert à combattre l'excès de ROS produit par la voie de la mitochondrie modifiée. Le glucose restant est métabolisé de façon classique jusqu'au pyruvate (Figure 3). À ce stade, il est en grande majorité métabolisé en lactate selon la glycolyse aérobie. Le lactate est exporté hors de la cellule sous forme d'acide lactique. La conséquence est une acidification du milieu extérieur nocive pour les cellules saines. En outre, l'acide lactique exerce une activité immunosuppressive en désactivant les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T⁸.

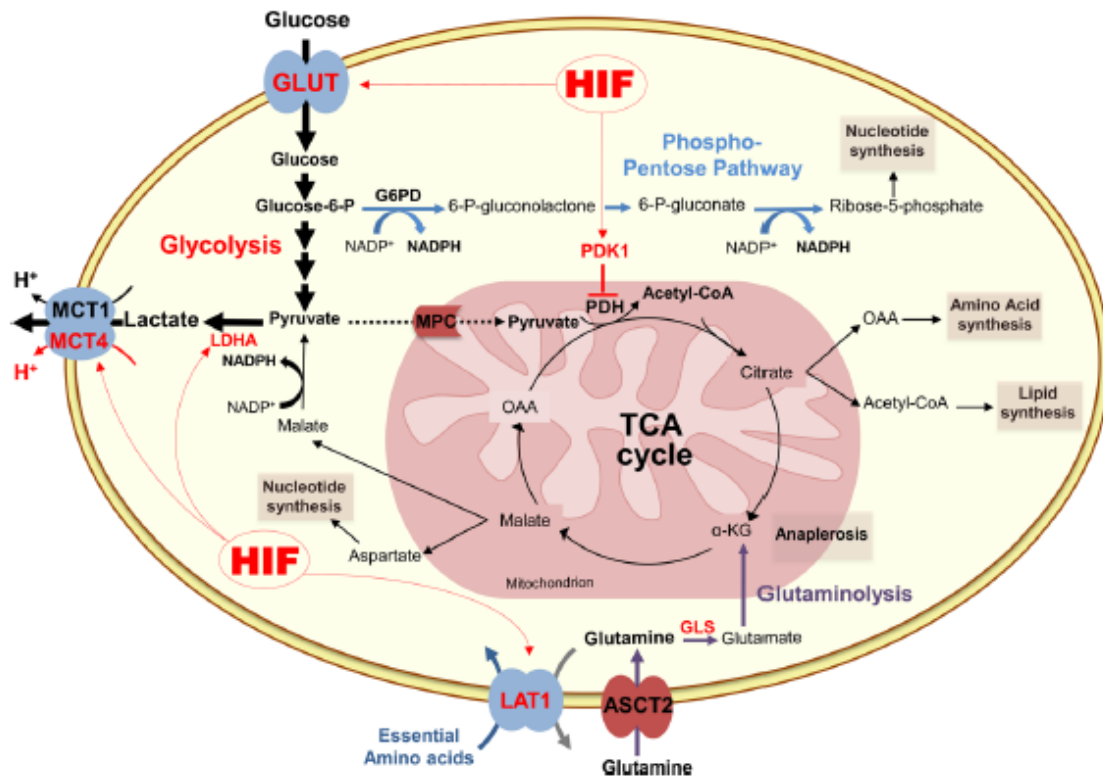


Figure 3 : Représentation schématique du métabolisme du glucose dans les cellules cancéreuses.

I.3.1. Angiogénèse

L'angiogénèse est un phénomène biologique permettant aux cellules cancéreuses de générer de nouveaux vaisseaux à partir des vaisseaux préexistants⁹ (Figure 4). Ce processus s'active au cours des phénomènes physiologiques comme la cicatrisation, le développement embryonnaire ou le cycle menstruel. La progression d'une tumeur dormante vers un cancer invasif conduit généralement la tumeur dans un état hypoxique au-delà d'un mm³. Pour échapper à l'hypoxie, la tumeur va relarguer les facteurs de croissance angiogéniques (VEGF) et induire ainsi le développement d'un nouveau réseau vasculaire pour assurer les apports en substances nutritives et en oxygène nécessaires à sa croissance et pourra donc se répandre à travers tout le corps par métastase¹⁰.

⁸ I. Marchiq and J. Pouysségur, *J. Mol. Med.*, 2015, 1-17.

⁹ D. Hanahan and J. Folkman, *Cell.*, 1996, 86, 353-364.

¹⁰ P. Carmeliet and R. K. Jain, *Nature*, 2000, 407, 249-257.

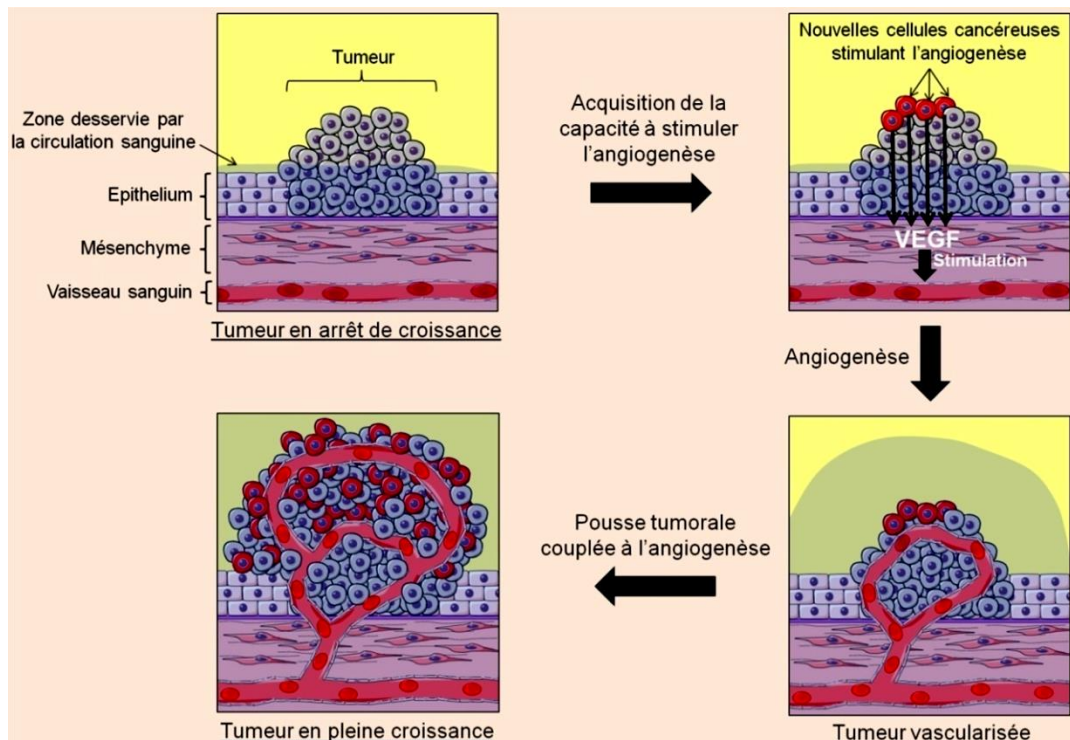


Figure 4: Processus de formation de la néovascularisation (<http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/dossiers/d/medecine-cancer-mecanismes-biologiques-1453/page/13/>).

L'angiogénèse est par ailleurs régulée par un équilibre complexe entre divers facteurs naturels pro et anti-angiogéniques¹¹. Ces facteurs activateurs ou inhibiteurs se trouvent aussi bien dans les tissus malades que dans les tissus normaux, c'est-à-dire, où il n'existe pas d'angiogénèse. Le déséquilibre de ces facteurs ou « switch angiogénique »¹² est susceptible d'engendrer une série d'évènements comme : la sécrétion de facteurs pro angiogéniques ; l'activation, la prolifération et la migration des cellules endothéliales ; la sécrétion d'enzymes protéolytiques suivie par la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire (MEC).

1.3.1.1 Les facteurs angiogéniques

La famille du facteur de croissance vasculaire endothélial « *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF » apparaît comme étant le régulateur clé de l'angiogénèse, de la perméabilité vasculaire et surtout de la croissance tumorale par métastase¹³. Ce facteur au pro-domaine N-terminal (NH₂) existe sous cinq isoformes humains responsables de l'augmentation de la perméabilité vasculaire et de la prolifération des cellules endothéliales. La surexpression de ces protéines régulatrices est associée à la présence de tumeurs, son inhibition induit une réduction de la croissance tumorale, ce qui en fait une cible thérapeutique et diagnostique intéressante. Les VEGFs présentent deux types de récepteurs à tyrosine kinase (VEGFR1/flt-1 et VEGFR2/flk-1) qui

¹¹ G. Liang, C. Butterfield, J. Liang, A. Birsner, J. Folkman and Y. Shing, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011, **409**, 562-566.

¹² L. Viger, F. Denis, M. Rosalie and C. Letellier, *J. Theor. Biol.*, 2014, **360**, 21-33.

¹³ S. Ławicki, G. E. Będkowska, E. Gacuta-Szumarska and M. Szmitkowski, *J. Ovarian Res.*, 2013, **6**, 45.

sont capables d'autophosphorylation ou de stimuler les voies de transmission du signal intra ou extracellulaire.

Outre ces facteurs, les molécules d'adhérence comme les cadhérines, les sélectines, la superfamille d'immunoglobulines, les intégrines etc. sont fortement impliquées dans le développement embryonnaire, la maintenance de l'architecture tissulaire, la motilité et l'adhésion cellulaire. Ces molécules sont des médiateurs des interactions cellule-cellule et cellule-matrice. Dans ce groupe, les intégrines, de structure complexe, sont souvent surexprimées lors des processus d'angiogénèse et jouent un rôle primordial.

1.3.1.2 Les intégrines

À la fois molécules d'adhésion et de signalisation, les intégrines constituent un groupe de récepteurs transmembranaires, capables de se lier aux protéines de la matrice extracellulaire. De structure hétérodimérique, elles se composent d'une chaîne polypeptidique de 18 sous-unités α (ITGA) et d'une autre de 8 sous-unités β (ITGB). Il en résulte donc une diversité de 24 formes d'intégrines¹⁴ issues de la combinaison de ces sous-unités, capables d'assurer un transfert bidirectionnel d'informations entre la cellule et son environnement conjonctif. Ce transfert d'informations se fait avec le recrutement de tyrosine kinases cytoplasmiques à travers le couplage avec des petites protéines G. Il se propage non seulement de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule comme toute voie de signalisation mais également de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur pour moduler d'une part l'attachement des cellules à la matrice extracellulaire et d'autre part, l'activité des métalloprotéinases matricielles. À ce titre, les intégrines peuvent intervenir directement dans : les phénomènes d'adhésion cellulaire, les processus de dissémination et d'invasion tumorale¹⁵. Cependant, certaines intégrines sont surexprimées dans certains cancers et moins dans d'autres et chacune d'entre elles est capable de reconnaître des ligands bien définis au niveau des protéines matricielles (collagènes, laminines, fibronectine, métalloprotéinases, angiostatine, etc.). De nombreuses études ont montré par exemple que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ se liait bien avec le motif Arg-Gly-Asp (RGD)¹⁵ et faisant d'elle une cible potentielle pour la thérapie anticancéreuse. De même, l'activation de la voie de survie des intégrines protégera les cellules en migration de l'apoptose.

¹⁴ D. V. Iwamoto and D. A. Calderwood, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 2015, **36**, 41-47.

¹⁵ F. Bianchini, P. Fabbri, G. Menchi, S. Raspanti, A. Bottoncetti, A. Passeri, E. Andreucci, A. Guarna, L. Calorini, A. Pupi and A. Trabocchi, *Bioorg. Med. Chem.*, 2015, **23**, 1112-1122.

I.4. Apoptose

Observée pour la première fois en 1885 par Flemming, l'apoptose ou mort cellulaire programmée n'a été clairement définie qu'en 1972 par John Kerr¹⁶ pour désigner une forme de mort cellulaire totalement différente de la nécrose, tant d'un point de vue morphologique que biochimique. En effet, la nécrose obéit à des facteurs létaux externes susceptibles d'enclencher une série de réactions inflammatoires au niveau des tissus environnants conduisant à la mort de la cellule par éclatement. Tandis que des lésions irréparables de l'ADN, l'activation d'un oncogène ou encore l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeurs déclenchent l'apoptose. L'apoptose est donc un processus physiologique provenant des rares cellules génétiquement anormales ayant échappé au suicide. Ce phénomène naturel permet de réguler l'homéostasie tissulaire et tout dysfonctionnement de ce processus programmé peut s'avérer délétère pour l'organisme conduisant ainsi au développement de diverses pathologies telles que : les désordres cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives ou les cancers. L'activation de l'apoptose se fait par les voies caspases-dépendante identifiées par : la voie extrinsèque des récepteurs à domaines de mort et la voie intrinsèque mitochondriale (Figure 5).

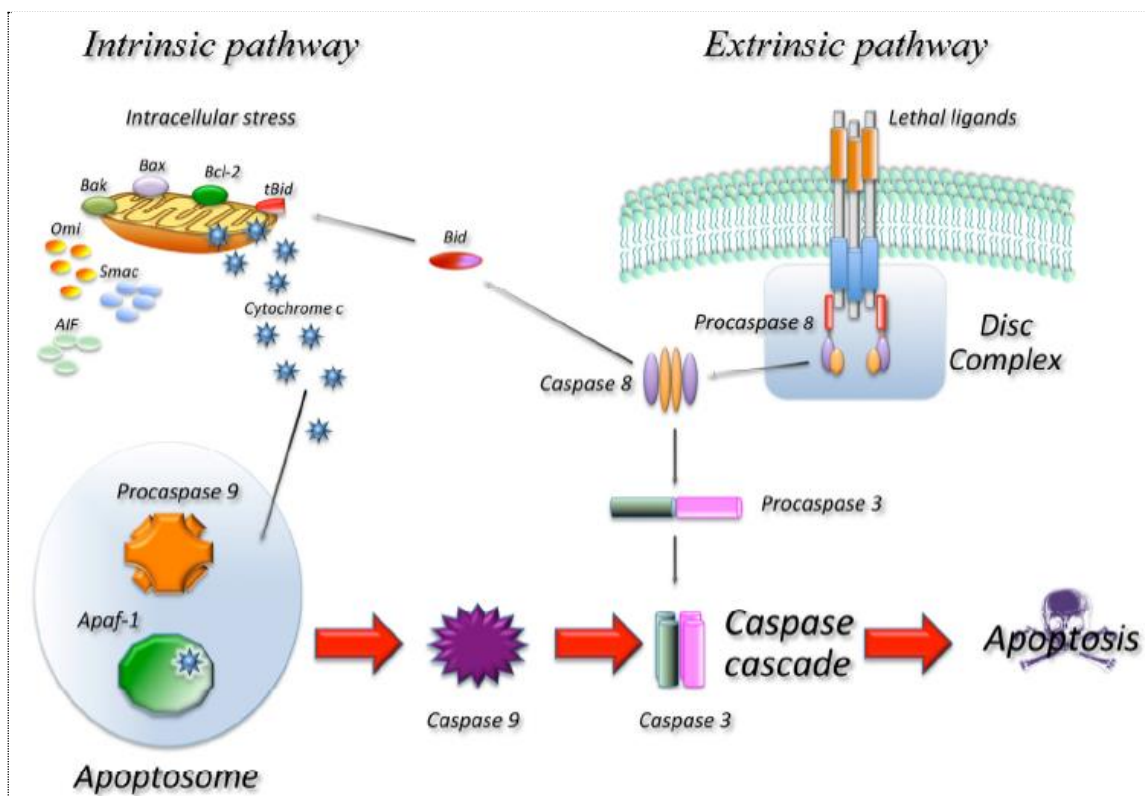


Figure 5 : Voies d'induction de l'apoptose¹⁷.

¹⁶ J. F. Kerr, A. H. Wyllie and A. R. Currie, *Br. J. Cancer*, 1972, **26**, 239.

¹⁷ B. Favaloro, N. Allocati, V. Graziano, C. Di Ilio and V. De Laurenzi, *Aging*, 2012, **4**, 330.

I.4.1. La voie extrinsèque des récepteurs de mort

La voie extrinsèque de l'apoptose est déclenchée par un signal extérieur à la cellule. Son activation se fait en réponse à la fixation de ligands spécifiques de type cytokines sur des récepteurs ou surface membranaire appelés récepteurs de mort. Cette superfamille des récepteurs au tumor necrosis factor (TNFR) incluent par exemple : Fas et TRAIL (récepteurs TNF-related apoptosis inducing ligand). L'activation par exemple de Fas par son ligand (Fas-L) entraîne la formation d'un complexe dénommé DISC (death-inducing signalling complex) qui va interagir avec la procaspase 8 par son domaine de mort (Death effector domain, DED). La caspase 8 activée va activer la procaspase 3 et la voie subséquente des caspases dites effectrices (caspases 3, 6 et 7).

I.4.2. La voie mitochondriale intrinsèque

Par opposition à la voie extrinsèque, la voie intrinsèque de l'apoptose, est généralement induite par des signaux internes à la cellule. Ces signaux internes proviennent généralement d'un excès de radicaux libres ou espèces oxygénées radicalaires (ROS) capables d'activer le complexe Bid-Bax. Le complexe Bid-Bax va s'insérer dans la mitochondrie et perméabiliser la membrane grâce à l'activation de p53. Cette perméabilisation de la membrane conduit à la chute du potentiel transmembranaire mitochondriale ($\Delta\psi_m$) et au relargage vers le cytosol de plusieurs protéines pro-apoptotiques comme le cytochrome C, Smac etc. Une fois dans le cytosol, le cytochrome C va se fixer à la protéine Apaf1 (apoptotic protease activating factor 1) qui s'oligomériser pour former un complexe, apoptosome. Ce complexe va recruter la procaspase 9 pour l'activer. Ensuite la caspase 9 active va activer à son tour les caspases effectrices, en l'occurrence la caspase 3. Le facteur AIF (apoptosis inducing factor) qui est endonucléase également libéré de la mitochondrie et induira une condensation de la chromatine.

De manière non exhaustive, nous venons de présenter quelques éléments intervenant dans l'angiogenèse tumorale, qui sont autant de cibles potentielles pour les différents modes de thérapie antitumorale connus jusqu'à ce jour.

I.5. Traitements

Les équipes médicales disposent actuellement de plusieurs types de traitements pour lutter contre le cancer, les plus utilisés étant la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie.

I.5.1. Les traitements conventionnels

I.5.1.1 La chirurgie

Les actes de chirurgie ont pour objectif l'ablation de la tumeur et de ses extensions ainsi que celle des ganglions affectés. Elles comprennent également, par sécurité, l'ablation d'une partie de tissu sain les entourant. La chirurgie est utilisée dans environ 80 % des cas dans un but diagnostic, curatif, palliatif ou de réparation.

I.5.1.2 La radiothérapie

La radiothérapie utilise des radiations de haute énergie, afin de détruire les cellules cancéreuses. Les radiations utilisées sont des rayons X, des rayons gamma ou des particules ionisées (protons). Elles sont souvent produites grâce à des accélérateurs de particules ou des sources radioactives. Les radiations endommagent les composants de l'ADN des cellules cancéreuses, ce qui a pour effet de conduire les cellules à l'apoptose.

I.5.1.3 Les chimiothérapies

Les traitements anticancéreux les plus fréquemment utilisés aujourd'hui sont des chimiothérapies. Elles agissent en freinant ou en éliminant les cellules en division rapide au moyen de molécules toxiques. Mais les cellules saines environnantes subissent aussi des dommages, à l'origine des effets secondaires. Un des objectifs des chercheurs est d'obtenir des molécules moins agressives pour les cellules saines de l'organisme, ou d'adapter les modes d'administration des produits afin qu'ils soient mieux tolérés par l'organisme (privilégier la voie orale par rapport à la voie sanguine pour préserver les vaisseaux par exemple).

I.5.2. Autres thérapies

Pour améliorer l'efficacité du traitement, les thérapies traditionnelles sont de plus en plus souvent associées à de nouvelles thérapies prescrites en fonction des caractéristiques moléculaires de la tumeur : thérapies ciblées, immunothérapie, hormonothérapie, photothérapie dynamique (PDT), thermothérapie (PTT) etc. Nous n'évoquerons que les seuls aspects de la PDT.

I.5.2.1 Photothérapie dynamique ou PDT

I.5.2.2 Historique de la PDT

Les médecins allemands Tappeiner et Jesionek ont introduit en 1903 le concept de photothérapie dynamique (PDT) en traitant un patient atteint d'un cancer de la peau par l'action

combinée de l'éosine (Figure 6) et de la lumière solaire¹⁸. Dix ans plus tard, Meyer-Betz démontre de manière courageuse et spectaculaire l'action photosensibilisatrice de l'hématoporphyrine (Hp) (Figure 6) : après l'injection de 200 mg de ce composé, il constate sur lui-même que les effets toxiques ne se développent qu'après exposition à la lumière solaire. En 1948, Figge et Weishaupt proposent d'exploiter la phototoxicité de l'hématoporphyrine pour traiter les tumeurs cancéreuses épithéliales¹⁹. Cependant, le manque de sélectivité du photosensibilisateur pour les tissus cancéreux inflige de graves lésions aux tissus sains environnants²⁰. En 1978, Weishaupt montre que la photocytotoxicité de ce nouvel agent est due à la production d'oxygène singulet (espèce très réactive vis-à-vis des cellules cancéreuses) après absorption de l'énergie lumineuse²¹.

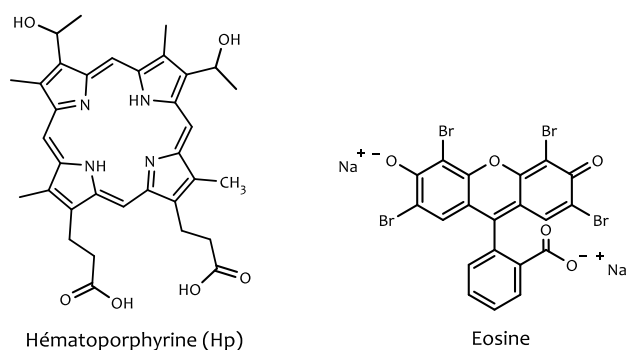


Figure 6 : Structure chimique de l'hématoporphyrine (Hp) et de l'éosine.

1.5.2.3 Principe

La photothérapie dynamique est une technique de traitement des cancers basée sur l'utilisation d'un agent photosensible rendu cytotoxique par activation lumineuse. Le principe de cette méthode de traitement antitumoral est représenté sur la Figure 7.

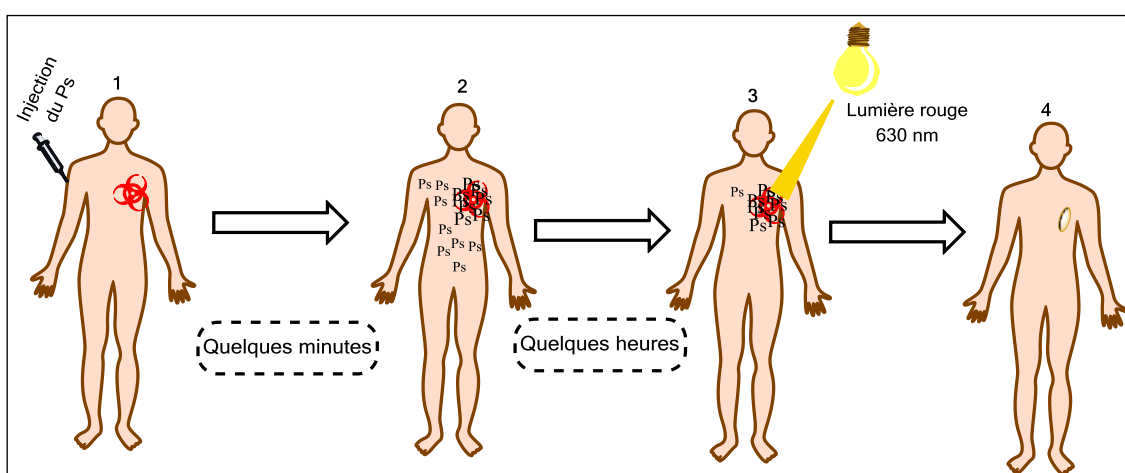


Figure 7 : Représentation schématique du principe de la photothérapie dynamique.

¹⁸A. Jesionek, H. von Tappeiner, *Muench. Med. Wochschr.*, 1903, **41**, 2042-2051.

¹⁹F. Meyer-Betz, *Dtsch. Arch. Klin. Med.*, 1913, **112**, 476-503.

²⁰F. H. J. Figge, G. S. Weiland, L. O. J. Manganiello, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1948, **68**, 640-641.

²¹R. L. Lipson, E. J. Baldes, *Arch. Dermatol.*, 1960, **82**, 508-516.

La première étape d'une séance de PDT consiste à introduire généralement par voie intraveineuse, l'agent photosensibilisateur (1). Un délai de quelques heures est requis pour que l'agent intègre les cellules cancéreuses (2). Les zones tumorales sont alors éclairées avec une lumière rouge (3) afin de favoriser au maximum la pénétration de la lumière dans les tissus pour détruire les cellules malignes siégeant dans leurs couches profondes (4).

1.5.2.4 Mécanisme et processus photochimiques

L'absorption du photon par le photosensibilisateur le conduit dans un état excité. Le retour à l'état fondamental se fait par conversion interne de l'énergie photonique en chaleur ou bien par l'émission de photon de fluorescence. Mais dans la majorité des cas, l'agent photosensibilisateur, du fait de sa stabilité, réalise une conversion inter-système par inversion de spin électronique qui conduit à la formation d'un photosensibilisateur à l'état triplet. Celle-ci peut se désactiver selon deux mécanismes :

- ✓ Le mécanisme de type I impliquant un transfert d'électron du photosensibilisateur vers les substrats biologiques
- ✓ Le mécanisme de type II impliquant quant à lui un transfert de l'énergie vers l'oxygène moléculaire, qui passe de son état fondamental (état triplet : $^3\text{O}_2$) à l'état excité (état singulet $^1\text{O}_2$) (Figure 8) :

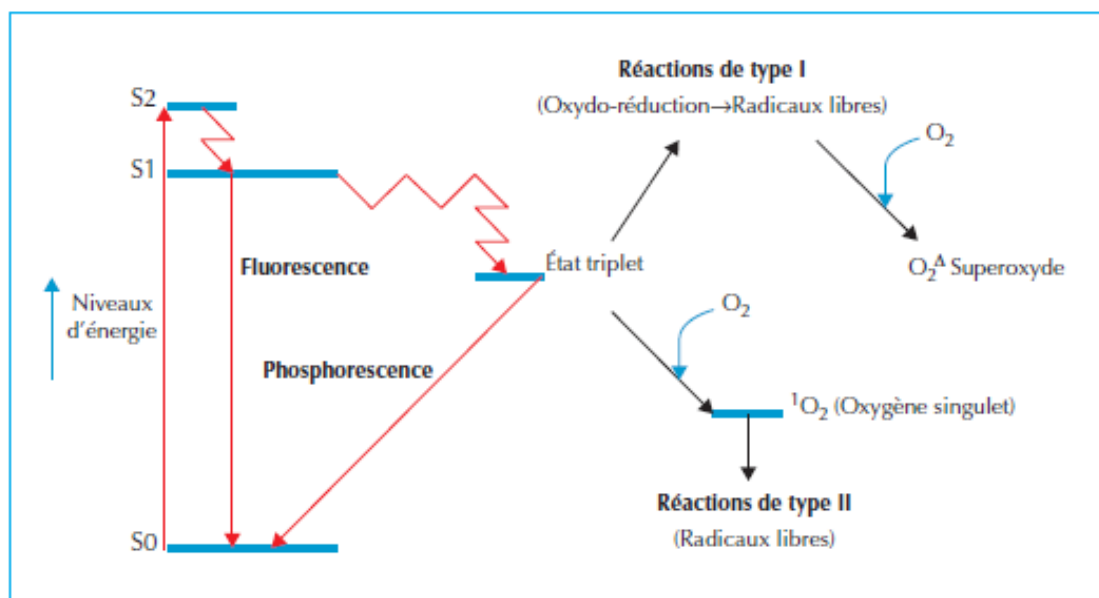
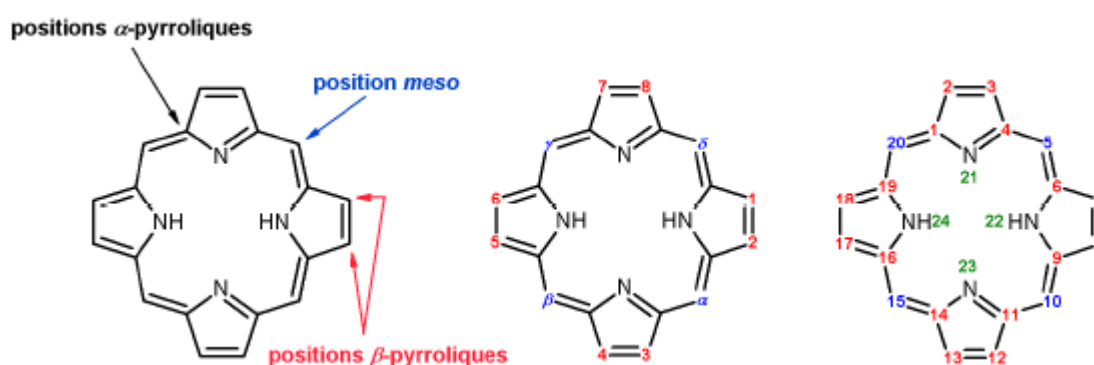


Figure 8 : Diagramme de Perrin Jablonski.

L'efficacité de la PDT est principalement attribuée par la formation d'oxygène singulet. La cytotoxicité de l'oxygène singulet est due à son extrême électrophilie : il s'additionne sur les liaisons π de toutes les biomolécules environnantes. Cette extrême réactivité explique la très courte durée de vie de l'oxygène singulet (de l'ordre de la microseconde) et de son court rayon

d'action qui se limite à son site de formation²². La mort cellulaire survient à la suite de lésions nucléaires (ADN et protéines) ou de lésions membranaires infligées à certains organites cytosoliques (mitochondries et lysosomes).

Bien que l'effet photodynamique ait été observé pour de très nombreuses molécules aux profils variés, l'histoire de la PDT reste étroitement liée aux porphyrines et plus généralement aux macrocycles tétrapyrroliques. Il s'agit de molécules présentant quatre groupements pyrrole reliés par leurs positions α via un pont méthine. Les atomes d'azote pyrroliques sont orientés vers l'intérieur du cycle.



Les positions pyrroliques libres sont appelées positions β -pyrroliques et les atomes reliant les pyrroles sont appelés méso. Les molécules utilisées en PDT des cancers sont essentiellement des photosensibilisateurs tétrapyrroliques. Initialement, l'arsenal thérapeutique s'est constitué autour des porphyrines. Ainsi, les photosensibilisateurs de première génération regroupent l'hématoporphyrine (Hp) qui s'obtient à partir du sang soumis à des conditions acides et ses dérivés. Ces premiers agents sont incontestablement phototoxiques, cependant, il s'agit de mélanges complexes mal définis, ce qui pose certains problèmes :

- la préparation d'un échantillon n'est pas reproductible et il est donc difficile d'obtenir les mêmes propriétés photodynamiques d'un lot médicamenteux à l'autre.
- Leur durée de vie dans l'organisme est importante (de 3 à 5 semaines) entraînant une photosensibilisation du patient qui doit être maintenu en chambre noire pendant encore quatre à huit semaines après l'acte thérapeutique²³.
- Leur faible sélectivité pour les cellules malignes nécessite une application lumineuse extrêmement précise, faute de quoi, les tissus sains avoisinants sont sérieusement endommagés.
- Leur indication reste limitée aux traitements de tumeurs épithéliales superficielles (dans les cancers des bronches et de l'œsophage) car les photons les plus efficaces pour exciter ces sensibilisateurs à 420 nm sont peu pénétrants.

²²K. R. Weishaupt, C. J. Gomer, T. J. Dougherty, *Cancer Rech.*, 1976, **36**, 2326-2329.

²³J. Moan, *Photochem. Photobiol.*, 1990, **6**, 343-347.

L'introduction des photosensibilisateurs de seconde génération marque d'importantes avancées thérapeutiques, mais ces agents manquent encore de sélectivité : ils ne seront pas parfaitement efficaces et bien tolérés que s'ils possèdent la capacité de se concentrer spécifiquement sur les sites tumoraux.

Une troisième génération de photosensibilisateurs est actuellement en cours de développement. Ce sont les chlorines ou les porphyrines substituées par des motifs de vectorisation et d'adressage (stéroïdes, sucres, amines, acides aminés ou peptides), qui dérivent de ligands naturels spécifiquement reconnus par les cellules cancéreuses.

La mise au point des traitements plus ciblés et moins pourvoyeurs d'effets secondaires du cancer constitue une voie de recherche porteuse d'espoir pour les patients. Les traitements ciblés agissent en bloquant les mécanismes du développement tumoral, en induisant la mort des cellules cancéreuses, en empêchant leur multiplication ou en inhibant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins autour de la zone tumorale pour limiter l'apport en nutriments ralentissant ainsi la croissance de la tumeur. Ces traitements novateurs ont pour but de concentrer préférentiellement les substances actives hydrophobes dans la tumeur via un mécanisme de transport spécifique, appelé vectorisation. Ce concept extrêmement séduisant consiste à concentrer sélectivement les principes actifs jusqu'à leur site thérapeutique.

Chapitre II. Vectorisation et les nanoparticules

II.1. Introduction

La vectorisation est un ensemble d'approches permettant de transporter une molécule biologiquement active (entité chimique, peptide, protéine, acide nucléique, etc.) en quantité suffisante de son lieu d'administration jusqu'à sa cible thérapeutique. En effet, le cheminement de la biomolécule est généralement parsemé d'embûches, susceptibles d'engendrer soit sa dégradation ; soit une diminution de l'efficacité de la dose administrée, ou sa distribution vers des organes autres que sa cible. La conception d'un vecteur doit donc répondre à un grand nombre de défis à la fois théoriques et pratiques. Tout d'abord, le vecteur doit être biocompatible, c'est-à-dire toléré par l'organisme. Il doit transporter la molécule d'intérêt en quantité biologiquement efficace et avoir une forte affinité pour les tissus ciblés. Il doit franchir les barrières biologiques (membranes cellulaire, pH, enzymes, macrophages etc.) en protégeant le principe actif jusqu'à son site d'action. Le vecteur se doit aussi d'être non toxique ou immunogène. Depuis l'énoncé de la théorie du « *Magic Bullet* »²⁴ par l'immunologue allemand Paul Ehrlich (Prix Nobel 1908), la vectorisation se présente comme l'une des avancées scientifiques majeure et prometteuse dans le domaine des nanotechnologies appliquées à la médecine. En effet, de nombreux vecteurs ont été élaborés, on cite à titre d'exemples, les vecteurs viraux appliqués en thérapie génique. On note également un certain nombre de formulations pour la thérapie anticancéreuse, approuvées par la Food and Drugs Administration (FDA) comme médicaments pour les traitements cliniques :

- ✓ Doxil®, une formulation nanoparticulaire de liposome encapsulant la doxorubicine pour le traitement du sarcome de Kaposi, puis des cancers du sein et de l'ovaire²⁵.
- ✓ Abraxane®, une formulation nanoparticulaire d'albumine couplée au paclitaxel, pour le cancer du sein métastatique^{26,27}.

Cependant, la biodistribution de ces nano-objets dans l'organisme est influencée par leur mode d'administration mais aussi par les propriétés intrinsèques du vecteur (taille, hydrophilie, charge de surface, composition etc.).

²⁴ F. Winau, O. Westphal and R. Winau, *Microbes Infect.*, 2004, **6**, 786-789.

²⁵ T. Safra, F. Muggia, S. Jeffers, D. D. Tsao-Wei, S. Groshen, O. Lyass, R. Henderson, G. Berry and A. Gabizon, *Ann. Oncol.*, 2000, **11**, 1029-1033.

²⁶ H. Shigematsu, T. Kadoya, N. Masumoto, T. Sasada, A. Emi, M. Ohara, K. Kajitani and M. Okada, *Clin. Breast Cancer*, 2015, **15**, 110-116.

²⁷ G. Dranitsaris, J. King, S. Kaura, B. Yu and A. Zhang, *Clin. Outcomes Res.*, 2015, 249.

II.2. Paramètres pharmacocinétiques des nanoparticules

La pharmacocinétique a pour but d'étudier le destin *in vivo* des médicaments dans l'organisme de l'administration jusqu'à son site d'action.

II.2.1. Administration

Avant d'étudier le comportement d'un vecteur, il convient de déterminer la voie d'administration qu'il empruntera. Le système sanguin irriguant l'ensemble des organes et tissus de l'organisme semble être une voie privilégiée pour atteindre l'ensemble des tissus et cellules ciblées. Le vecteur peut être injecté directement au niveau de la zone malade mais c'est principalement au moyen de la circulation sanguine que le principe actif est transporté dans l'organisme pour atteindre sa cible. Il existe deux principales voies pour l'administration médicamenteuse : les voies facilitant l'accès à la circulation sanguine (voies intraveineuse, intradermique, sous cutanée, intramusculaire, intra-artérielle...) et les voies impliquant une muqueuse (voies orale, nasale, pulmonaire, oculaire et vaginale). De ces deux, l'administration intraveineuse semble être la plus adaptée car elle permet de s'affranchir des problèmes d'absorption/résorption liés aux autres voies d'administration et permet également de maîtriser la quantité administrée. Il convient de mentionner que l'absorption consiste en la prise du médicament alors que la résorption est le processus par lequel le médicament passe dans la circulation générale.

II.2.2. Distribution

La circulation sanguine et les vaisseaux lymphatiques constituent un réseau de transport pour les corps étrangers (nutriments, virus, nanoparticules, vecteurs, principes actifs etc.). En effet, la distribution des vecteurs dans l'organisme après leur injection intraveineuse sera fonction d'une part de l'irrigation des tissus et d'autre part des défenses dont dispose le corps humain contre les corps étrangers. Ainsi, les organes ayant un flux sanguin élevé (cerveau, foie, cœur, intestins, poumons, rate, reins, etc.) seront exposés à de fortes concentrations en nanoparticules²⁸. Ensuite, l'accumulation sélective de vecteurs médicamenteux est également accrue au niveau des zones tumorales grâce à la perméabilité membrane et via l'effet EPR^{29,30}. La distribution des nanoparticules est aussi influencée par ses paramètres propres (leur taille ou leur fonctionnalisation de surface). Ainsi, les nanoparticules de petite taille, comprise entre 1 et 20 nm, présentent un temps de circulation plus long dans le sang et une extravasation lente vers les

²⁸ S. M. Moghimi, A. C. Hunter and J. C. Murray, *FASEB J.*, 2005, **19**, 311-330.

²⁹ X.-Q. Zhang, X. Xu, N. Bertrand, E. Pridgen, A. Swami and O. C. Farokhzad, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2012, **64**, 1363-1384.

³⁰ S. K. Hobbs, W. L. Monsky, F. Yuan, W. G. Roberts, L. Griffith, V. P. Torchilin and R. K. Jain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998, **95**, 4607-4612.

espaces interstitiels³¹ altérant probablement le volume de distribution des particules lors d'une administration intraveineuse. Les injections locales nécessitent, quant à elles, des nanoparticules de taille légèrement supérieure, de l'ordre de 30 à 100 nm³². Cette taille est suffisante pour éviter la fuite dans les capillaires, mais suffisamment petite pour empêcher l'élimination par le système réticulo-endothélial. Enfin, la modification de la surface des nanoparticules permet de contrôler leur distribution et de limiter leur élimination. Par exemple, l'ajout de PEG (molécules hydrophiles) à la surface des nanoparticules augmente leur temps de circulation dans le sang^{33,34}.

II.2.3. Elimination

Les mécanismes de défenses immunitaires se composent d'une immunité dite naturelle et d'une autre adaptative permettant d'éliminer les corps étrangers de l'organisme. En effet, les nanoparticules (NPs) ont pour mission principale d'augmenter la durée de vie de la drogue transportée dans le compartiment sanguin. Malheureusement, ces nanostructures souvent considérés comme des éléments du « non-soi » voient leur séjour finir au niveau des organes de séquestrations (reins, foie, rate etc.) via le système réticuloendothélial (RES). Ce système phagocytaire mononucléé (MPS) participe à une réponse immunitaire non spécifique, par reconnaissance des éléments étrangers à l'organisme. Au cours de la première étape appelée opsonisation, les nano-objets vont être recouverts *via* des interactions non spécifiques par des opsonines. Ce marquage permettra aux cellules de Kupffer (présentes au niveau de la rate ou la moelle osseuse) d'identifier au mieux les nanoparticules pour la phagocytose. L'opsonisation est donc un processus permettant de concentrer les NPs dans le foie, la rate et les ganglions lymphatiques, en vue de leur élimination ultérieure. Sauf que cette accumulation peut entraîner des effets secondaires au niveau de ces tissus. Et dans le cas d'agent de contraste, ces accumulations peuvent masquer la zone d'intérêt, et donc perturber ou fausser la détection. N'existant pas de règle générale permettant de leurrer l'opsonisation, des stratégies permettant d'augmenter la durée de vie des nanoparticules dans la circulation sanguine sont de plus en plus développées. Ces techniques se basent d'une part sur la taille des nano-objets, et d'autre part sur la modification chimique de leur surface : on parle ainsi de furtivité.

³¹ P. M. Winter, S. D. Caruthers, A. Kassner, T. D. Harris, L. K. Chinen, J. S. Allen, E. K. Lacy, H. Zhang, J. D. Robertson, S. A. Wickline and G. M. Lanza, *Cancer Res.*, 2003, **63**, 5838–5843.

³² S. M. Moghimi, A. C. Hunter, J. C. Murray, *Pharmacol Rev.*, 2001, **53**, 283-318.

³³ Sadzuka, S. Hirotsu and S. Hirota, *Cancer Lett.*, 1998, **127**, 99–106.

³⁴ V. P. Torchilin, V. S. Trubetskoy, K. R. Whiteman, P. Caliceti, P. Ferruti and F. M. Veronese, *J. Pharm. Sci.*, 1995, **84**, 1049–1053.

II.3. Importance des caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules sur leur devenir en milieu biologique

Comme nous venons de le voir, la clairance et l'opsonisation sont fortement liées aux différentes caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules, telle leur taille, leur géométrie, leur charge et les groupements présents à leur surface.

II.3.1. Influence de la composition et des caractéristiques de surface

Une des méthodes les plus couramment utilisées afin de ralentir l'opsonisation est l'enrobage par adsorption ou greffage de groupements capables de bloquer les interactions électrostatiques ou hydrophobes aidant les opsonines à se lier à la surface du vecteur. Ces groupements à base de polymère hydrophiles (poly-oxy-éthylène, polyéthylène-glycol, dextran, chitosan, héparines etc.)³⁵ sont biocompatibles, biodégradables et permettent d'augmenter la durée de vie plasmatique des drogues transportées. Ainsi, fonctionnaliser par exemple les NPs par le PEG permet en plus des propriétés précitées, d'améliorer non seulement l'accumulation passive de l'agent d'intérêt dans les tumeurs par effet EPR mais surtout de relever l'index thérapeutique de cette dernière³⁶. L'usage de polysaccharide tel que le dextran a été largement décrit dans la littérature, en l'occurrence pour ses propriétés de couche protectrice et stabilisante des nanoparticules d'oxydes de fer³⁷. Le chitosan quant à lui, peut interagir avec les acides nucléiques (oligonucléotides, ADN, etc.) en améliorant ainsi la capacité de charge des nanoparticules en acides nucléiques, leur stabilité dans les fluides biologiques et leurs propriétés de transfection. Par ailleurs, la masse moléculaire, la nature (ramifiée ou linéaire) ainsi que la densité de greffage de ces différents polymères influencent le devenir des nanoparticules dans les milieux biologiques³⁸. Ainsi, l'adsorption des opsonines à la surface des nanoparticules diminue lorsque le poids moléculaire du polymère de recouvrement augmente. Alors que les NPs greffées de polymères à chaînes ramifiées sont moins opsonisées que celles greffées avec des polymères à chaînes linéaires. Pavey *et coll.*³⁹, suggère qu'il serait plus adapté de mélanger des PEG à chaînes courtes et à chaînes longues, ces dernières étant plus flexibles, alors que les chaînes courtes permettent un recouvrement optimal de la nanoparticule. La furtivité peut donc être accrue suivant la densité et la conformation de la chaîne. De sorte qu'une faible densité surfacique entraîne un plus grand degré de liberté des chaînes polymériques. Alors que pour des densités trop faibles, des trous apparaîtront dans la barrière de protection et réduiront la furtivité de la

³⁵ C. Lemarchand, R. Gref and P. Couvreur, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2004, **58**, 327-341.

³⁶ G. Barratt, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.*, 2003, **60**, 21-37.

³⁷ J.-P. Mbakidi, V. Sol, R. Granet, G. Begaud, C. LeMorvan, T. Sothea Ouk, P. Krausz, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2011, **8**, 208.

³⁸ A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier and J.-P. Benoit, *Biomaterials*, 2006, **27**, 4356-4373.

³⁹ K. D. Pavey and C. J. Olliff, *Biomaterials*, 1999, **20**, 885-890.

particule. Donc, plus la densité est élevée, plus les chaînes tendront à s'organiser sous forme de peigne. Cette configuration permet de recouvrir la particule en totalité mais suppose une diminution de la mobilité des chaînes et par là même de leur propriété d'isolant stérique. Ce qui a pour conséquence, une circulation plasmatique prolongée^{40,41}.

II.3.1.1 Potentiel Zêta

Le potentiel zêta caractérise la charge de surface des colloïdes en solution. Il ne correspond cependant pas à la charge réelle de la surface du colloïde, mais à celle qu'il acquiert en solution. La solvataion d'une particule chargée entraîne la formation d'une double couche ionique. La couche la plus proche de la particule est composée d'ions de charge opposée à celle de la surface de la particule. Ces ions sont solidement liés à la particule, c'est pourquoi cette couche dite de Stern est aussi nommée couche liée. La couche de Stern attire à son tour des ions de charge opposée (donc de même charge que la particule). Cette seconde couche appelée couche diffuse ou couche de Gouy contient également des ions de charge identique à celle des ions de la couche liée mais en concentration volumique moindre (Figure 9).

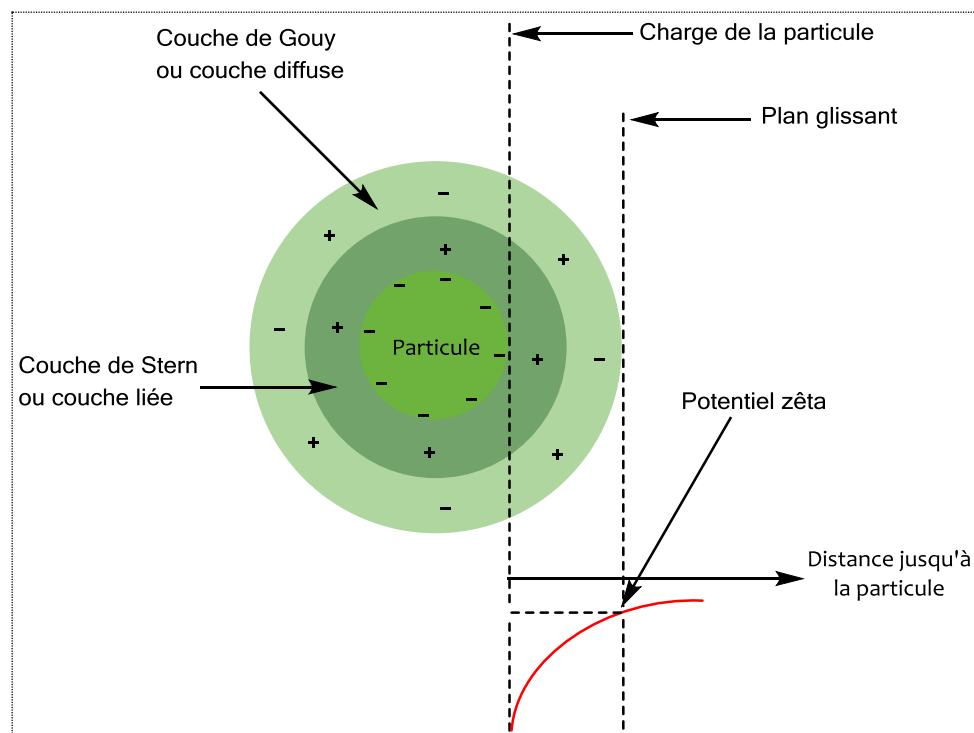


Figure 9 : Schéma représentatif de la charge de surface (potentiel zêta) d'une nanoparticule.

Lorsque la particule est mise en mouvement, que ce soit par mouvement brownien ou induit (par un champ électrique par exemple), il se forme un plan de glissement (ou plan glissant) au niveau de la double couche de solvatation : la couche de Stern et une partie de la couche de Gouy restent

⁴⁰ M. T. Peracchia, C. Vauthier, C. Passirani, P. Couvreur and D. Labarre, *Life Sci.*, 1997, **61**, 749-761.

⁴¹ D. E. Owens III and N. A. Peppas, *Int. J. Pharm.*, 2006, **307**, 93-102.

liées à la particule et vont la suivre dans son mouvement, alors que le reste de la couche diffuse reste immobile ou bouge avec du retard par rapport à la particule. C'est au niveau de ce plan de glissement que les particules interagissent entre elles et c'est donc à ce niveau que le potentiel zêta est mesuré. Le potentiel zêta est souvent mesuré pour prédire la stabilité des particules en suspension. L'intensité de la force de répulsion électrostatique est en effet liée au potentiel zêta : plus les particules ont un potentiel zêta élevé (en valeur absolue), plus elles vont se repousser et moins elles vont avoir tendance à s'agréger.

II.3.2. Influence de la taille

En se basant sur les paramètres physiologiques tels que la filtration hépatique, l'élimination rénale, l'extravasation et la diffusion dans les tissus, il semble évident, qu'avec les caractéristiques de surface, la taille des nanoparticules est un facteur clé pour leur biodistribution. Une étude *in vitro* de la biodistribution sur une émulsion de nanoparticules a montré une faible adsorption des protéines de Kupffer pour les nanoparticules de taille inférieure à 100 nm, une adsorption moyenne pour les nanoparticules de 100 à 200 nm et une adsorption forte si leur taille dépasse 200 nm⁴². L'effet de la taille des particules sur l'adsorption des protéines a ensuite été confirmé par un test de capture par des macrophages et l'étude de la cinétique de la clairance sanguine. Il en ressort que la clairance sanguine est deux fois plus lente pour les particules de grande taille. Une autre étude portant sur les nanoparticules d'or a également montré que les petites particules chargées positivement sont à la fois moins captées par le foie et éliminées plus rapidement par voie rénale que les plus grosses ou celles qui sont chargées négativement ou neutres⁴³. La taille de la nanoparticule est un facteur clé pour la biodistribution des principes actifs naturels dans l'organisme.

Après avoir illustré par quelques exemples l'influence des paramètres physicochimiques des nanoparticules sur leur biodistribution, il convient de noter que la taille de celles-ci est déterminée par la diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering, DLS).

II.3.2.1 Mouvement Brownien

Le phénomène d'autodiffusion appelé aussi le mouvement brownien a été observé pour la première fois par Robert Brown, au XVIIIème siècle. Ce botaniste écossais constate en observant au microscope le pollen d'une fleur, appelée *Clarkia pulchella*, la présence de petites particules bougeant de façon chaotique. Ce phénomène a été par la suite étudié par d'éminents physiciens. En 1877, Delsaux suggère que le mouvement brownien résulte de l'ensemble des

⁴² C. Fang, B. Shi, Y.-Y. Pei, M.-H. Hong, J. Wu and H.-Z. Chen, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2006, **27**, 27-36.

⁴³ L. Balogh, S. S. Nigavekar, B. M. Nair, W. Lesniak, C. Zhang, L. Y. Sung, M. S. T. Kariapper, A. El-Jawahri, M. Llanes, B. Bolton, F. Mamou, W. Tan, A. Hutson, L. Minc and M. K. Khan, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, 2007, **3**, 281-296.

chocs exercés par les molécules d'eau sur les particules. Albert Einstein en 1905 et indépendamment, Marian Smoluchowski en 1906, proposent une théorie complète et unifiée du mouvement brownien. Le mouvement brownien est dû aux innombrables collisions entre les particules et les molécules du fluide environnant.

II.3.2.2 Distribution en taille et taille moyenne

La diffusion quasi-élastique de la lumière ou DLS, également nommée spectroscopie par corrélation de photons permet d'accéder à la taille et à la distribution en taille de particules en suspension dans un liquide. Lors de la mise en œuvre de cette technique, une solution colloïdale est éclairée par un faisceau lumineux monochromatique. Une partie de la lumière diffusée par les particules est alors détectée par un photomultiplicateur.

Le mouvement brownien des particules modifie constamment les distances entre les particules diffusantes dans le temps. Le déplacement des particules engendre alors des fluctuations au niveau des interactions constructives et destructives de la lumière diffusée. Le traitement de ces fluctuations par un corrélateur numérique permet d'obtenir une fonction d'autocorrélation du signal qui représente la probabilité pour une particule de se trouver à un instant $t+dt$ au même point de l'espace qu'à l'instant t . Plus une particule est petite, plus cette probabilité est faible. Inversement, la probabilité augmente avec la taille des particules. Le traitement mathématique de la fonction d'autocorrélation permet donc d'obtenir la distribution en taille des particules. L'utilisation de l'équation de Stokes-Einstein permettra ainsi de définir le rayon hydrodynamique des particules (r).

$$D = \frac{R \cdot T}{N_A} \times \frac{1}{6\pi\eta r}$$

Avec D : coefficient de diffusion, η : Viscosité du fluide, r : rayon de la particule sphérique, N_A : nombre d'Avogadro et R : constante des gaz parfait.

II.4. Nanoparticules au service de la médecine

II.4.1. Introduction

L'usage des nanotechnologies pour la conception et le développement des nanoparticules connaît ces dernières décennies, une émergence spectaculaire dans de nombreux domaines comme la chimie^{44,45}, la physique^{46,47}, le magnétisme^{48,49}, la biologie⁵⁰ etc. En effet, une

⁴⁴ C. Mauriello-Jimenez, J. Croissant, M. Maynadier, X. Cattoën, M. W. C. Man, J. Vergnaud, V. Chaleix, V. Sol, M. Garcia, M. Gary-Bobo, L. Raehm and J.-O. Durand, *J. Mater. Chem. B.*, 2015, **3**, 3681–3684.

⁴⁵ Y. Chen, Y. Zhang, C. Xu and X. Cao, *Carbohydr. Polym.*, 2015, **130**, 149-154.

⁴⁶ K. Li, T. Peng, Z. Ying, S. Song and J. Zhang, *Appl. Catal. B Environ.*, 2016, **180**, 130-138.

⁴⁷ L. Chen, W. Cao, N. Grishkewich, R. M. Berry and K. C. Tam, *J. Colloid Interface Sci.*, 2015, **450**, 101-108.

nanoparticule est un assemblage d'atomes dont la taille est comprise entre 1 et 100 nm sur au moins une de ses dimensions. En taille, les nanoparticules sont du même ordre de grandeur que les anticorps, les récepteurs membranaires ou les protéines (Figure 10).

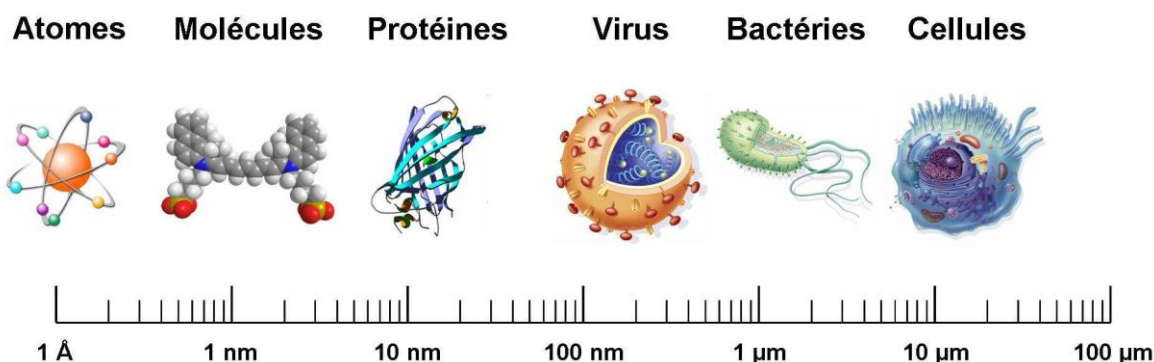


Figure 10 : Gamme des tailles des principales structures chimiques et biologiques.

Par définition, un objet est dit nanoparticulaire lorsque ses propriétés physico-chimiques produisent des réponses différentes par rapport à de plus grands objets de composition similaire⁵¹. Parmi les nombreuses nanoparticules développées pour la délivrance de médicaments, il y a celles qui sont de nature organique et d'autres sont inorganiques (Figure 11).

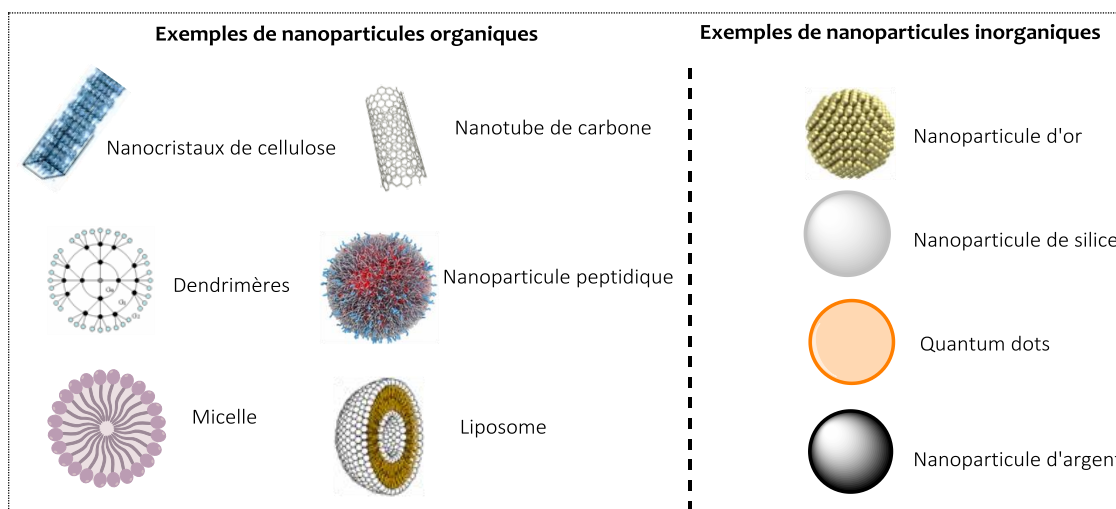


Figure 11 : Quelques nanoparticules développées par les nanotechnologies.

II.4.2. Quelques nanoparticules utilisées en nanomédecine

Comme présenté aux paragraphes précédents, la définition des nanoparticules est uniquement basée sur la taille de ces objets : au moins une des dimensions de l'objet doit être inférieure à 100 nm. Cette définition n'est donc pas limitative vis-à-vis de la composition de ces particules. Ainsi, depuis l'avènement des nanotechnologies, un nombre varié de nanoparticules a

⁴⁸ H. R. Rajabi, H. Arjmand, S. J. Hoseini and H. Nasrabadi, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2015, **394**, 7-13.

⁴⁹ L. Yu, G. Hao, J. Gu, S. Zhou, N. Zhang and W. Jiang, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2015, **394**, 14-21.

⁵⁰ S. Jain, D. G. Hirst and J. M. O'Sullivan, *Br. J. Radiol.*, 2012, **85**, 101-113.

⁵¹ D. B. Warheit, C. M. Sayes, K. L. Reed, K. A. Swain, *Pharmacol. Ther.*, 2008, **120**, 35-42.

été développé : celui-ci va des liposomes aux nanoparticules métalliques et en passant par des systèmes polymériques. Seules les nanoparticules les plus prometteuses pour les applications de « drug delivery » seront détaillées.

II.4.2.1 Les liposomes

Les liposomes ont été découverts pour la première fois en 1965 par Bangham^{52,53}. Ces objets sont des vésicules artificielles formées par une ou plusieurs bicouches de phospholipides encapsulant entre elles des réservoirs aqueux⁵⁴. Les liposomes sont des systèmes sphériques à la base de l'industrie de la « Drug Delivery » et les récents travaux de Zhao et collaborateurs mettent en évidence l'intérêt de les utiliser pour la vectorisation de l'acide ursolique⁵⁵ (Figure 12).

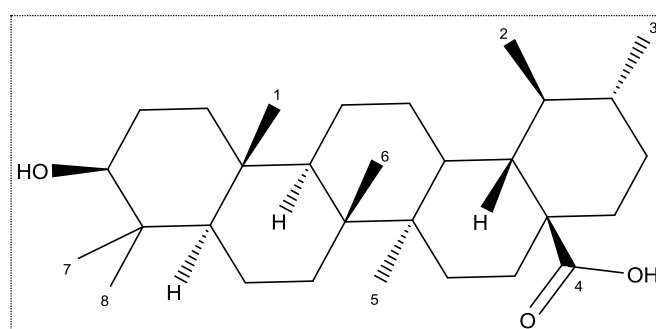


Figure 12: Structure de l'acide ursolique.

Ces entités dont le diamètre moyen varie de 30 nm à quelques dizaines de microns sont généralement obtenues à partir de film de lipides amphiphiles, le plus souvent des phospholipides^{56,57} mais il est aussi possible de les développer à partir de polymères synthétiques. En effet, l'utilisation de phospholipides naturels (biodégradables, non toxiques et non immunogènes) permet de créer avec un faible coût de production des systèmes qui miment les membranes cellulaires^{58,59}. En fonction de leur taille et du nombre de couches phospholipidiques formées, on distingue : des liposomes multi lamellaires (*Multi-lamellar Vesicles, MLV*) relativement stables, polydisperses et possédant deux ou plusieurs bicouches lipidiques ; des oligoliposomes à une seule bicouche (*Large Unilamellar Vesicles, LUV*) de taille élevée très hétérogène et enfin, des liposomes uni lamellaires (*Small Uni-lamellar Vesicles, SUV*) de taille plus faible. Les liposomes sont facilement fonctionnalisables par des ligands et/ou des polymères capables d'améliorer leur

⁵² A. D. Bangham, *Chem. Phys. Lipids*, 1993, **64**, 275-285.

⁵³ A. D. Bangham, M. M. Standish and J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.*, 1965, **13**, 238-252.

⁵⁴ P. Menon, T. Yin Yin and M. Misran, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.*, 2015, **481**, 345-350

⁵⁵ T. Zhao, Y. Liu, Z. Gao, D. Gao, N. Li, Y. Bian, K. Dai and Z. Liu, *Mater. Sci. Eng. C*, 2015, **53**, 196-203.

⁵⁶ M. P. N. Gaeti, P. L. Benfca, L. P. Mendes, M. S. Vieira, J. L. V. Anjos, A. Alonso, K. R. Rezende, M. C. Valadares and E. M. Lima, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2015, **15**, 838-847.

⁵⁷ F. Olson, C. A. Hunt, F. C. Szoka, W. J. Vail and D. Papahadjopoulos, *BBA - Biomembr.*, 1979, **557**, 9-23.

⁵⁸ S. Madrigal-Carballo, S. Lim, G. Rodriguez, A. O. Vila, C. G. Krueger, S. Gunasekaran and J. D. Reed, *J. Funct. Foods*, 2010, **2**, 99-106.

⁵⁹ R. Gharib, H. Greige-Gerges, S. Fourmentin, C. Charcosset and L. Auezova, *Carbohydr. Polym.*, 2015, **129**, 175-186.

biocompatibilité, leur durée de vie sanguine et leur utilisation pour la « drug delivery »⁶⁰. Cependant, la production de ces colloïdes est délicate, leur stabilité est modérée, leur capacité d'encapsulation (notamment pour les molécules lipophiles piégées dans la couche de phospholipides) et la libération des principes actifs hydrophiles dans le sang peut s'avérer précoce⁶¹.

II.4.2.2 Les micelles

Une micelle est un agrégat sphéroïdal de molécules amphiphiles. Ce sont des nanoparticules habituellement obtenues sous la forme de cœur-coquille (ou core-shell, en anglais) en milieu aqueux. Leur formation n'est possible qu'au-dessus d'une certaine concentration dite « micellaire critique », correspondant à la concentration en tensioactifs en dessous de laquelle il n'y a pas d'auto-assemblage des tensioactifs sous forme de micelles. En solution aqueuse, la partie hydrophile des molécules amphiphiles est dirigée vers l'eau et la partie hydrophobe vers l'intérieur formant le cœur de la particule (Figure 13a). Les propriétés physico-chimiques de ces systèmes nanométriques (10 – 30 nm) en font des nanoparticules intéressantes pour des applications *in vivo*. Facilement fonctionnalisables, les micelles ont l'avantage, selon leur affinité, d'incorporer, de protéger et de véhiculer aussi bien les molécules hydrophobes « camptothécine (Figure 13b), déqualinium⁶² (Figure 13c) etc. » que les gènes et protéines « les VEGFs et les siRNA ».

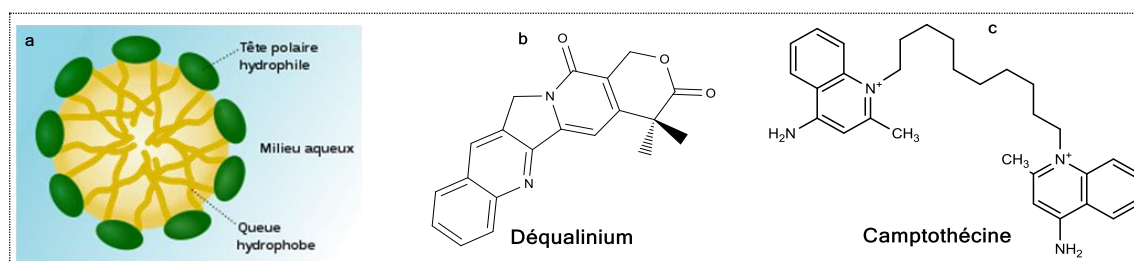


Figure 13 : a) Schéma de micelle en solution aqueuse et structure chimique de b) Déqualinium et c) camptothécine.

De plus, l'organisation stérique particulière de la couronne des micelles les protège de l'opsonisation augmentant ainsi leur temps de demi-vie dans le sang⁶³ et bien évidemment leur libération contrôlée dans les zones tumorales par l'effet EPR. Malgré cela, ces systèmes sont souvent limités par leur stabilité et leur faible capacité d'encapsulation⁶⁴.

⁶⁰ V. P. Torchilin, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2005, **4**, 145-160.

⁶¹ H. Pinto-Alphandary, A. Andreumont and P. Couvreur, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2000, **13**, 155–168.

⁶² C. Lizano, V. Weissig, V. P. Torchilin, P. Sancho, A. I. Garcia-Pérez and M. Pinilla, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2003, **56**, 153-157.

⁶³ K. Kataoka, T. Matsumoto, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, S. Fukushima, K. Okamoto, and G. S. Kwon, *J. Control Release*, 2000, **64**, 143-153.

⁶⁴ S. Kim, J. H. Kim, O. Jeon, I. C. Kwon, K. Park, K, *J. Pharm. Biopharm.*, 2009, **71**, 420-430.

II.4.2.3 Les dendrimères

Depuis leur première synthèse en 1978 par F. Vögtle et coll.⁶⁵, les dendrimères constituent une classe de nanoparticules dont l'architecture tridimensionnelle est constituée d'unités de branchement émanant radialement à partir d'un noyau central polyfonctionnel. Synthétisés de manière contrôlée, ils peuvent être modulés selon la taille, la forme ou la polarité en fonction du monomère utilisé⁶⁶. Ces structures hyperbranchées ont la capacité de solubiliser dans l'eau les composés hydrophobes. Ils trouvent leurs applications potentielles dans un certain nombre de domaines de la nanomédecine et peuvent être utilisés en tant que catalyseurs, pour l'élaboration des nanomatériaux⁶⁷. La plupart des dendrimères sont constitués de fragments organiques, et ont en particulier un atome d'azote à chaque point de ramification, comme dans le cas de la très populaire poly-(amidoamine) « PAMAM ». D'autres études ont conduit à l'élaboration de dendrimères du type : les poly-(propylène imine) « PPI »⁶⁸ et les polyether-copolyester « PEPE »⁶⁹ (Figure 14).

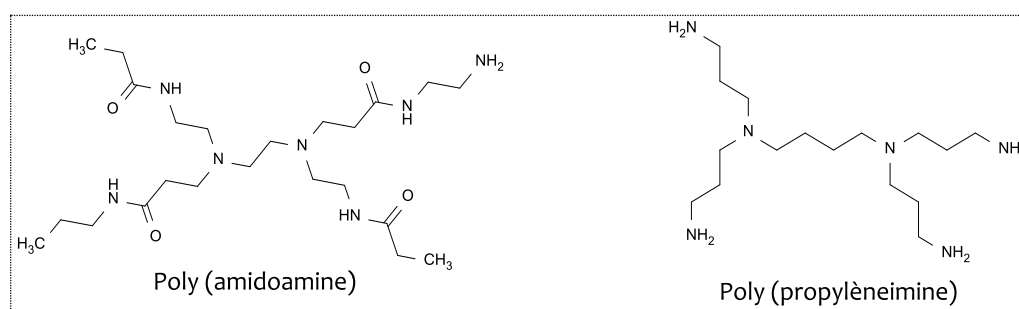


Figure 14: Structure chimique du polyamidoamine et du poly-propylèneimine.

II.4.2.4 Les puits quantiques ou « quantum dots »

Communément appelés « quantum dots [QD] »⁷⁰, les puits quantiques sont des nanocristaux inorganiques constitués de quelques centaines à quelques milliers d'atomes métalliques. De taille variant entre 1 et 10 nm, ces nanoparticules se composent d'un cœur cristallin semi-conducteur et se caractérisent par une émission de fluorescence suite à une excitation lumineuse. L'intensité de cette émission est étroitement liée à leur taille, leur forme et à leur composition. Ainsi, des QDs de 2 nm en de diamètre émettent dans le vert et ceux d'environ 7 nm présentent une émission de fluorescence dans le rouge. Les puits quantiques sont formés le

⁶⁵ H.-B. Meikelburger, F. Vögtle and K. Rissanen, *Chem. Ber.*, 1993, **126**, 1161-1169.

⁶⁶ W. Yang, Y. Cheng, T. Xu, X. Wang and L. Wen, *Eur. J. Med. Chem.*, 2009, **44**, 862-868.

⁶⁷ A.-M. Caminade, R. Laurent, C.-O. Turrin, C. Rebout, B. Delavaux-Nicot, A. Ouali, M. Zablocka and J.-P. Majoral, *Comptes Rendus Chim.*, 2010, **13**, 1006-1027.

⁶⁸ A. A. A. Baleb, N. M. Jahed, O. A. Arotiba, S. N. Mailu, N. R. Hendricks, P. G. Baker and E. I. Iwuoha, *J. Electroanal. Chem.*, 2011, **652**, 18-25.

⁶⁹ W. Wijagkanalan, S. Kawakami and M. Hashida, *Pharm. Res.*, 2010, **28**, 1500-1519.

⁷⁰ A. Smith, H. Duan, A. Mohs and S. Nie, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, **60**, 1226-1240.

plus souvent par les couples d'éléments suivants : cadmium/sélénium [Cd/Se]⁷¹, cadmium/tellure [Cd/Te]⁷², ou indium/arsenic [In/As]⁷³ etc. Ils ont l'avantage d'être utilisés sur un large spectre d'émission : celui-ci s'étend du proche infrarouge (1400 nm) aux longueurs d'onde du visible (jusqu'à 400 nm). Grâce à leurs propriétés optoélectroniques et physicochimiques, leur utilisation en tant que nano-véhicule pour la délivrance médicamenteuse a abouti à de nombreuses études liants l'imagerie et le diagnostic à la thérapeutique⁷⁴. Les quantum dots ont l'avantage (par rapport aux fluorophores traditionnels) d'être photostables et de présenter une forte brillance (meilleur rapport signal/bruit)⁷⁵. Cependant, la toxicité liée à leur composition limite leur utilisation.

II.4.2.5 Les nanotubes de carbones

Découverts depuis le début du siècle dernier, ce n'est qu'en 1991 que les nanotubes de carbone ont été décrits au niveau moléculaire par le japonais Sumio Iijima⁷⁶. Ces structures allongées et aux enroulements cylindriques sont éventuellement fermées à leurs extrémités par des pentagones de carbone caractéristiques des fullerènes. On distingue en effet, deux types de nanotubes de carbone : les mono feuillets « *single-walled nanotube* [SWNT] »⁷⁷ dont le diamètre varie de 0,2 à 2,4 nm et les multi feuillets « *multiple-walled nanotube* [MWNT] » présentant un espace inter-feuillet de 0,3 nm et un diamètre compris entre 2,5 à 100 nm⁷⁸. L'usage en nanomédecine de ces nano-objets nécessite une modification chimique de leur surface pour pallier au problème de solubilité dans l'eau. L'intérêt de ces nanostructures est croissant aussi bien en science des matériaux qu'en nanomédecine. Leurs excellentes propriétés mécaniques, électroniques, physiques et chimiques, leur offrent des possibilités immenses dans le traitement des cancers par hyperthermie⁷⁹. Les nanotubes peuvent ainsi être utilisés comme sonde pour l'imagerie médicale⁸⁰.

II.4.2.6 Les nanoparticules d'or

Depuis de nombreux millénaires, l'or est ce métal noble qui a toujours fasciné l'humanité. Réduit à l'état de particules de taille nanométrique (1 à 150 nm), il présente d'excellentes

⁷¹ H. Liu, W. Tang, C. Li, P. Lv, Z. Wang, Y. Liu, C. Zhang, Y. Bao, H. Chen, X. Meng, Y. Song, X. Xia, F. Pan, D. Cui and Y. Shi, *Nanoscale Res. Lett.*, 2015, **10**, 265.

⁷² D. Pei, Y. Li, Q. Huang, Q. Ren, F. Li and T. Shi, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2015, **127**, 130-136.

⁷³ V. D. Dasika, E. M. Krivoy, H. P. Nair, S. J. Maddox, K. W. Park, D. Jung, M. L. Lee, E. T. Yu and S. R. Bank, *Appl. Phys. Lett.*, 2014, **105**, 253104.

⁷⁴ Y. Wang, R. Hu, G. Lin and K.-T. Yong, in *Nanoelectronics Conference (INEC), 2013 IEEE 5th International*, 2013, 476-479.

⁷⁵ M. Stanisavljevic, S. Krizkova, M. Vaculovicova, R. Kizek and V. Adam, *Biosens. Bioelectron.*, 2015, **74**, 562-574.

⁷⁶ M. Monthieux and V. L. Kuznetsov, *Carbon*, 2006, **44**, 1621-1623.

⁷⁷ A. Kasperski, A. Weibel, L. Datas, E. De Grave, A. Peigney and C. Laurent, *J. Phys. Chem. C*, 2015, **119**, 1524-1535.

⁷⁸ F. G. Liu, L. Z. Zhao, N. An, D. S. Tong, W. H. Yu and C. H. Zhou, *J. Porous Mater.*, 2015, **22**, 927-937.

⁷⁹ R. Singh and S. V. Torti, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2013, **65**, 2045-2060.

⁸⁰ G. P. Kotchey, Y. Zhao, V. E. Kagan and A. Star, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2013, **65**, 1921-1932.

propriétés optoélectroniques, physicochimiques et une reconnaissance moléculaire permettant de détruire les cellules cancéreuses par photothermie. Cette technique de traitement a pour but de faire osciller les électrons produits par les nanoparticules d'or (AuNPs) suite à l'application d'un champ électromagnétique de longueur d'onde beaucoup plus grande que leur taille. Ainsi, tous les électrons libres de la bande de conduction de la nanoparticule subissent le même champ et oscillent collectivement et en phase. Et si la fréquence de l'onde incidente correspond à la fréquence propre de ces oscillations, il se produit un phénomène de résonance, appelé « résonance plasmonique de surface [SPR]» (Figure 15).

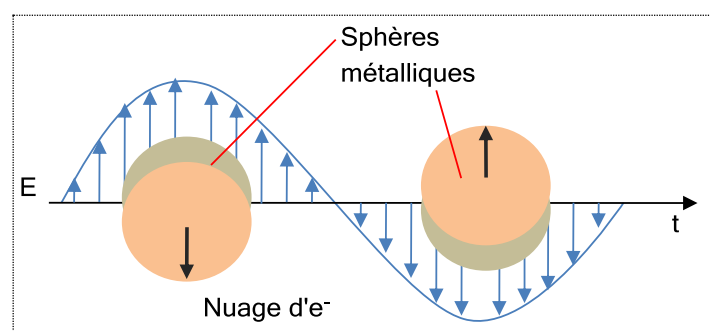


Figure 15: Représentation schématique de résonance plasmonique de surface des nanoparticules.

La résonance plasmonique de surface a lieu dans le domaine du visible. Elle dépend de la taille et la forme des AuNPs, des propriétés diélectriques du substrat (ou du milieu environnant) et des interactions inter-particules. Il est possible de jouer sur ces différents paramètres pour faire varier la couleur des nanoparticules d'or dans tout le domaine du visible, voire de déplacer la fréquence de résonance de plasmon dans le proche infrarouge.

L'usage des AuNPs en tant qu'agents de vectorisation, de ciblage ou de contraste suscite un intérêt de plus en plus grandissant dans divers domaines en raison de leur biocompatibilité et de leur maniabilité en termes de manipulation chimique. En effet, les AuNPs sont très souvent obtenues par réduction des sels d'or en présence d'agents réducteurs (CTAB, NaBH₄, Citrate etc.)⁸¹. Pour améliorer leur dispersion, les nanoparticules peuvent facilement être fonctionnalisées par l'intermédiaire des fonctions organiques (les thiols, les amines ou les acides carboxyliques etc.) qui présentent une très bonne affinité pour les atomes d'or⁸². Par ailleurs, des molécules comme la curcumine⁸³, l'amoxicilline⁸⁴ ou encore la phtalocyanine⁸⁵ peuvent-être greffées sur les AuNPs.

⁸¹M. S. Strozyk, M. Chanana, I. Pastoriza-Santos, J. Pérez-Juste, L. M. Liz-Marzán, *Adv. Funct. Mater.*, 2012, **22**, 1436-1444.

⁸²F. Dong, W. Guo, S.-K. Park, C.-S. Ha, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 1108-1110.

⁸³R. K. Gangwar, V. A. Dhumale, D. Kumari, U. T. Nakate, S. W. Gosavi, R. B. Sharma, S. N. Kale and S. Datar, *Mater. Sci. Eng. C*, 2012, **32**, 2659-2663.

⁸⁴M. Demurtas and C. C. Perry, *Gold Bull.*, 2013, **47**, 103-107.

⁸⁵P. Ghosh, G. Han, M. De, C. K. Kim and V. M. Rotello, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, **60**, 1307-1315.

II.4.3. Les nanoparticules ferromagnétiques

Composées de cristaux magnétite (Fe_3O_4) ou maghémite (Fe_2O_3), les nanoparticules ferromagnétiques sont des nanostructures inorganiques couramment rencontrées en médecine. Ces oxydes de fer nanoparticulaires sont classés en deux grandes familles : les SPIONs (superparamagnetic iron oxide nanoparticles) et les USPIONs (ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles). Synthétisées généralement par co-précipitation à partir des sels de fer (chlorure, nitrate, sulfate etc.), ces nanoparticules magnétiques peuvent échapper à l'opsonisation grâce à l'enrobage de leur surface par des molécules de type : dextran⁸⁶, chitosan⁸⁷, polyéthylèneimine ou PEG⁸⁸. Les propriétés thermiques de ces nano-objets leur permettent de générer localement de la chaleur par hystérésis suite à l'application d'un champ magnétique oscillant à haute fréquence. Ainsi lorsqu'elles sont à l'intérieur des cellules cancéreuses, elles induisent leur mort. Par ailleurs, ces matériaux magnétiques sont d'excellents agents de contraste en IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) et ouvrent de perspectives intéressantes en biologie clinique.

⁸⁶ J. P. Mbakidi, N. Drogat, R. Granet, T.-S. Ouk, M.-H. Ratinaud, E. Rivière, M. Verdier and V. Sol, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, **23**, 2486–2490.

⁸⁷ A. Zhu, L. Yuan, W. Jin, S. Dai, Q. Wang, Z. Xue and A. Qin, *Acta Biomater.*, 2009, **5**, 1489-1498.

⁸⁸ M. M. Lin, Y. J. Kang, Y. Sohn and D. K. Kim, *J. Nanoparticle Res.*, 2015, **17**, 1-18.

Chapitre III. Les nanocristaux de cellulose et les agents d'encapsulation et de ciblage

III.1. La cellulose

III.1.1. Introduction

La cellulose est le biopolymère naturel le plus répandu sur terre. Sa production annuelle est estimée à environ 7,5 milliards de tonnes. Constitué d'unités glucopyranose reliées entre elles par des liaisons β (1,4), ce polysaccharide linéaire est un homopolymère dont le motif de répétition est le dimère cellobiose (Figure 16). La cellulose constitue la structure principale dans une large variété d'espèces incluant, les végétaux (bois, coton, paille de blé, etc.), les algues (valonia) et les animaux marins.

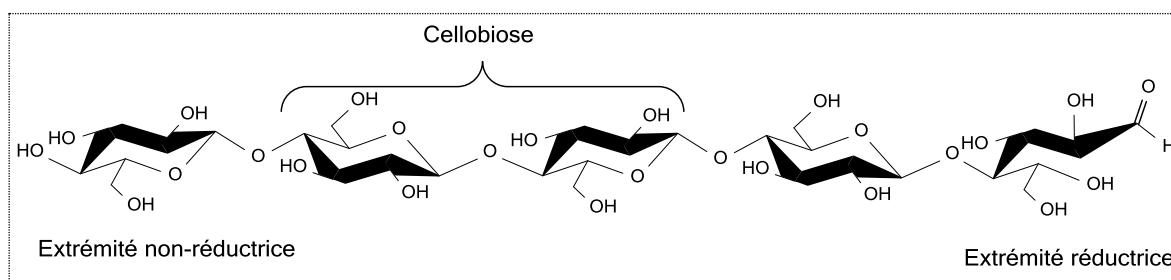


Figure 16 : Structure chimique de la cellulose.

La macromolécule se caractérise entre autre par son degré de polymérisation (DP) élevé qui varie selon l'espèce végétale. À titre d'exemple, la teneur en cellulose (pourcentage de matière sèche) du coton varie de 92 à 99% alors que celle contenue dans le lin et le maïs varie respectivement de 70 à 75% et de 17 à 20%.

En bout de chaîne se trouvent deux extrémités chimiquement différentes. L'une appelée extrémité réductrice du polymère correspond à l'unité glucose dont l'hydroxyle anomérique est libre. Il existe donc une forme hémiacétal en équilibre avec la forme aldéhyde réductrice minoritaire. L'extrémité non réductrice correspond quant à elle à une unité glucose dont l'hydroxyle anomérique est engagé dans une liaison glucosidique β -1,4. La cellulose est un polymère dont les fonctions hydroxylées sont en position équatoriale par rapport au plan du cycle de la molécule de glucose. Les molécules sont stabilisées entre elles par l'intermédiaire de ponts hydrogènes ce qui donne à l'ensemble un fort pouvoir cohésif. Les molécules de cellulose vont s'agencer en protofibrille qui donnera des microfibrilles et formeront enfin des fibres de cellulose (Figure 17a).

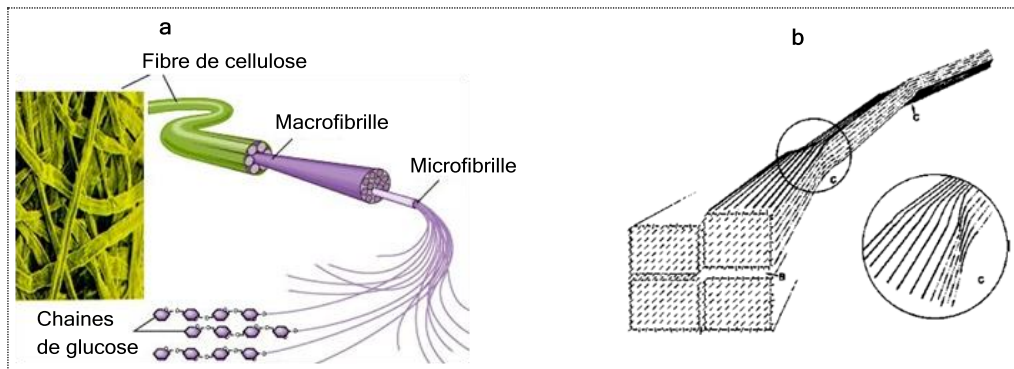


Figure 17 : a) Schématisation de la composition des fibres de cellulose et b) représentation des zones amorphes de la cellulose.

Les conditions de biosynthèse sont à l'origine de l'agencement des fibres et diffèrent selon la source polymérique. Elles conduisent généralement à une cellulose de structure fibrillaire composée de zones cristallines ordonnées et de zones amorphes totalement désordonnées. Ces régions amorphes, les plus accessibles sont les plus exposées aux attaques chimiques (voir Figure 17b). Après que Rånby ait découvert pour la première fois dans les années 1950 qu'il était possible d'obtenir une suspension colloïdale de cellulose par dégradation des fibres catalysée par l'acide sulfurique, les analyses telles que la microscopie électronique à transmissions (MET), la diffraction de rayons X (DRX), la diffraction de neutrons et aujourd'hui la DLS ont permis de révéler que la dégradation des fibres conduisait à des structures nanométriques en forme de bâtonnets d'où leur dénomination : nanocristaux de cellulose. La conséquence directe de l'hydrolyse est la diminution du DP.

III.1.2. Les nanocristaux de cellulose

Les nanocristaux de cellulose sont donc un assemblage de chaînes polymériques de glucose. La production de ces nanoparticules biosourcées est conditionnée par la nature de l'acide, la température et le temps, et surtout par la source cellulosique. Ainsi, l'obtention dans les solvants de nanoparticules stables se fait généralement avec l'usage de l'acide sulfurique car il permet de générer des groupements sulfates chargés négativement qui induisent des répulsions électrostatiques permettant de maintenir les nano-objets en suspension. Le schéma de formation de ces colloïdes est donné ci-dessous (Figure 18) :

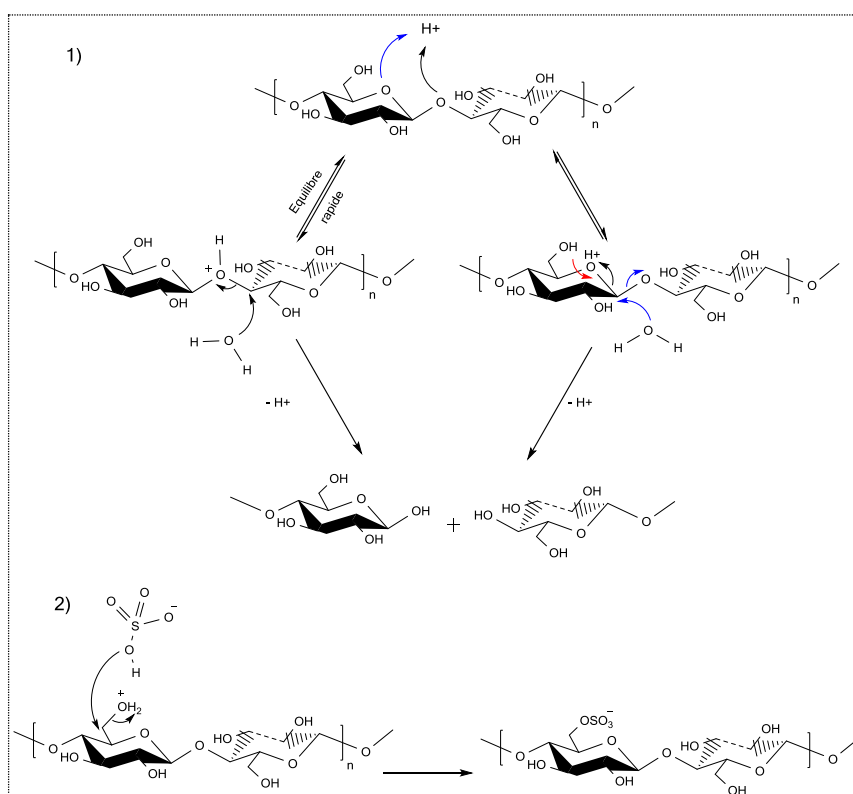


Figure 18 : 1) Mécanisme de l'hydrolyse acide de la cellulose et 2) Mécanisme d'estérification de cellulose par hydrolyse à l'acide sulfurique.

La plupart du temps la concentration massique en acide sulfurique est fixée à 64% alors que les températures peuvent varier de 20 à 70 °C et que les temps de réactions oscillent entre 30 mn et 12 heures. Tous ces paramètres, associés à la nature de la source de cellulose nous permettent d'établir une liste morphologique non exhaustive des nanocristaux (Tableau 1).

Tableau 1 : Distribution en taille des nanocristaux de cellulose obtenus par hydrolyse acide, en fonction de la source cellulosique utilisée.

Source	L (nm)	l (nm)	Techniques	Références
Bactérie	100 – 1000	10 – 15	MET	89
	100 - 1000	5 – 10 x 30 –50	MET	90,91
Coton	100 – 150	5 - 10	MET	92
	70 - 170	~ 7	MET	93
	200 – 300	8	MET	94
	255	15	DDL	95

⁸⁹ J. Araki, S. Kuga, *Langmuir*, 2001, **17**, 4493.

⁹⁰ M. Grunnert, W. T. Winter, *J. Polym. Environ.* 2002, **10**, 27.

⁹¹ M. Roman, W. T. Winter, *Biomacromolecules* 2004, **5**, 1671.

⁹² J. Araki, M. Wada, S. Kuga, S. *Langmuir*, 2001, **17**, 21.

⁹³ X. M. Dong, T. Kimura, J-F. Revol, D. G. Gray, *Langmuir*, 1996, **12**, 2076.

⁹⁴ L. Heux, G. Chauve, C. Bonini, *Langmuir*, 2000, **16**, 8210.

⁹⁵ M. M. de Souza Lima, J. T. Wong, M. Paillet, R. Borsali, R. Pecora, *Langmuir*, 2003, **19**, 24.

	150 – 210	5 – 11	AFM	96
Linter de coton	100 – 200	10 – 20	MEB	97
	25 - 320	6 – 70	MET	98
	300 – 500	15 – 30	AFM	99
MCC	250 – 270	23	MET	100
	~ 500	10	AFM	101
Ramie	150 – 250	6 – 8	MET	102
	50 – 150	5 – 10	MET	103
Sisal	100 – 500	3 – 5	MET	104
	150 – 280	3,5 – 6,5	MET	105
Tunicien		8,8 x 18,2	SANS	106
	500 – 1000	10	MET	107
	1000 - 3000	15 – 30	MET	108
Valonia	>1000	10 - 20	MET	109
Bois tendre	100 – 200	3 – 4	MET	110 - 111
	100 – 150	4 – 5	SANS	112
Bois dur	140 - 150	4 – 5	SANS	

En raison de leurs propriétés physicochimiques remarquables de la cellulose (biodégradable, durabilité, cristallinité etc.), la recherche actuelle focalise une attention particulière sur ces objets et le nombre de publications de 2000 à 2013 pour les matériaux à base de cellulose dans le domaine biomédical, en particulier dans le domaine de la « drug delivery » témoigne de cet attrait (Figure 19).

⁹⁶A. F. Miller, A. M. Donald, *Biomacromolecules*, 2003, **4**, 510.

⁹⁷M. Roohani, Y. Habibi, N. M. Belgacem, G. Ebrahim, A. N. Karimi, A. Dufresne, *Eur. Polym. J.*, 2008, **44**, 2489.

⁹⁸Q. Li, J. Zhou, L. J. Zhang, *Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* 2009, **47**, 1069.

⁹⁹S. Elazzouzi-Hafraoui, Y. Nishiyama, J.-L. Putaux, L. Heux, F. Dubreuil, C. Rochas, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 57.

¹⁰⁰J. R. Capadona, K. Shanmuganathan, S. Trittschuh, S. Seidel, S. J. Rowan, C. Weder, *Biomacromolecules*, 2009, **10**, 712.

¹⁰¹L. Pranger, R. Tannenbaum, *Macromolecules*, 2008, **41**, 8682.

¹⁰²Y. Habibi, A. L. Goffin, N. Schiltz, E. Duquesne, P. Dubois, A. Dufresne, *J. Mater. Chem.*, 2008, **18**, 5002.

¹⁰³A. Junior de Menezes, G. Siqueira, A. A. S. Curvelo, Dufresne, A. *Polymer*, 2009, **50**, 4552.

¹⁰⁴N. L. Garcia de Rodriguez, W. Thielemans, A. Dufresne, *Cellulose*, 2006, **13**, 261.

¹⁰⁵G. Siqueira, J. Bras, A. Dufresne, *Biomacromolecules*, 2009, **10**, 425.

¹⁰⁶P. Terech, L. Chazeau, J. Y. Cavaille, *Macromolecules*, 1999, **32**, 1872.

¹⁰⁷M. N. Angles, A. Dufresne, *Macromolecules*, 2000, **33**, 8344.

¹⁰⁸F. Kimura, T. Kimura, M. Tamura, A. Hirai, M. Ikuno, F. Horii, *Langmuir*, 2005, **21**, 2034.

¹⁰⁹J. F. Revol, *Carbohydr. Polym.*, 1982, **2**, 123.

¹¹⁰J. Araki, M. Wada, S. Kuga, T. Okano, *J. Wood Sci.*, 1999, **45**, 258.

¹¹¹J. Araki, M. Wada, S. Kuga, T. Okano, *Colloids Surf.A*, 1998, **142**, 75.

¹¹²S. Beck-Candanedo, M. Roman, D. G. Gray, *Biomacromolecules*, 2005, **6**, 1048.

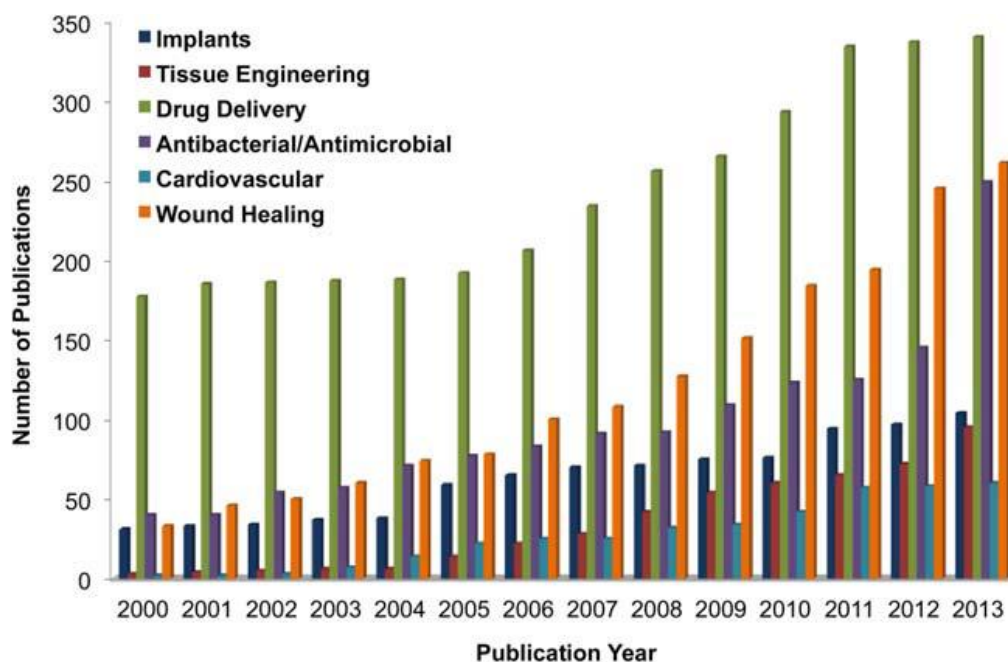


Figure 19 : Le nombre de publications allant de 2000 – 2013 sur les matériaux à base de cellulose dans les applications telles que : ingénierie tissulaire, implants, délivrance de médicaments, antibactérien/antimicrobien, cardio-vasculaire, cicatrisation.

Des évaluations *in vitro* de la toxicité de ces nanoparticules sur plusieurs lignées cellulaires ont prouvé que les CNCx n'étaient pas toxiques pour des concentrations comprises entre 0,02 et 100 µg/mL¹¹³. De plus, ces nanocristaux de cellulose ont l'avantage d'être hydrophiles, stables et il est possible de fonctionnaliser à leur surface des molécules antibactériennes, anti-inflammatoires, anticancéreuses voire même de fixer des ADN, des ARN, des molécules fluorescentes, des agents de couplages, des agents d'internalisations, etc. De ce fait, les CNCx peuvent donc être utilisées en biologie comme véhicule pour le transport d'agents d'intérêt et peuvent donc aussi servir pour l'imagerie médicale.

Pour fixer une molécule active sur les nanocristaux de cellulose en milieu aqueux, deux types de stratégies semblent être adaptées : la première peut utiliser la fonctionnalisation de la drogue elle-même par des agents organiques hydrophiles capables de la rendre hydrosoluble. Dans ce contexte, on fait généralement appel à l'usage des molécules comme les polyéthylèneimines, les spermines, les spermidines, les ammoniums etc. pour les rendre hydrosolubles.

¹¹³ M. M. Pereira, N. R. B. Raposo, R. Brayner, E. M. Teixeira, V. Oliveira, C. C. R. Quintão, L. S. A. Camargo, L. H. C. Mattoso and H. M. Brandão, *Nanotechnology*, 2013, **24**, 075103.

III.2. Les cyclodextrines (CDs)

III.2.1. Structure

Les cyclodextrines sont des oligomères cycliques issues de la dégradation enzymatique de l'amidon par une enzyme produite par *Bacillus macerans*, la GTase « Cyclodextrin Glucosyl Transferase »¹¹⁴. Découvertes pour la première fois par Villiers en 1891 puis caractérisées par Sharding douze ans plus tard, les cyclodextrines sont des oligosaccharides naturels constituées de 6 (α), 7 (β) et 8 (γ) unités D-glucopyranose liées entre elles par une liaison α (1 \rightarrow 4)¹¹⁵. Quelques caractéristiques principales de ces structures sont représentées dans le (Tableau 2).

Tableau 2 : Principales caractéristiques des cyclodextrines naturelles.

CD	Nombre d'unités glucidiques	Masse molaire (g/mol)	Solubilité dans l'eau (g/L)	Diamètre interne (Å)	Formule brute
α	6	972	145	4,5	C ₃₆ H ₆₀ O ₃₀
β	7	1135	18,5	7,0	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅
γ	8	1297	232	8,5	C ₄₈ H ₈₀ O ₄₀

La structure en trois dimensions des cyclodextrines apparaît sous la forme d'un cône tronqué creux (Figure 20), à l'extérieur duquel se trouvent les groupements hydroxyles primaires portés par les carbones en C6 du cycle glucidique et les hydroxyles secondaires portés par les carbones C2 et C3 qui sont plutôt figés et engagés dans les liaisons osidiques. La libre rotation des OH primaires diminue le diamètre de la cavité extérieure et confère aux CDs un caractère hydrophile. Alors que les hydrogènes portés par les carbones C3 et C5 sont orientés vers l'intérieur de la grande cavité des CDs et confèrent à cette dernière un caractère apolaire¹¹⁶.

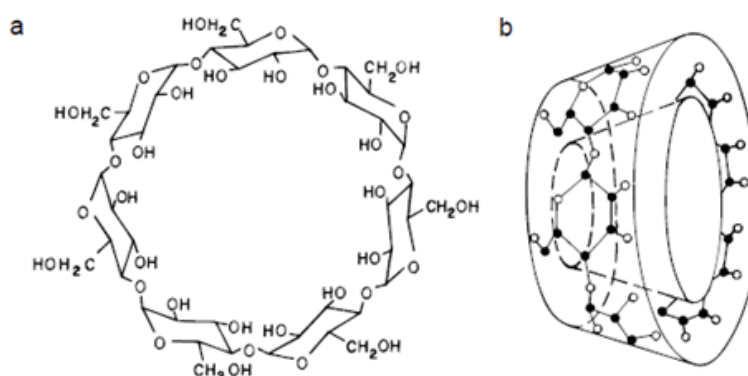


Figure 20 : Structure chimique et la forme en cône tronquée de la β -cyclodextrines.

¹¹⁴ S. Rawat and S. K. Jain, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2004, **57**, 263-267.

¹¹⁵ J. Szejtli, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 1743-1753.

¹¹⁶ I. M. Mavridis and K. Yannakopoulou, *Int. J. Pharm.*, 2015, **492**, 275-290.

Dans l'eau, les cyclodextrines seront donc capables d'inclure dans leur cavité hydrophobe une pléthore de molécules¹¹⁷ : porphyrines¹¹⁸, paclitaxel¹¹⁹, etc.

De nombreuses réactions chimiques (substitution nucléophile, amination réductrice, oxydation, etc.)¹²⁰ sont possibles avec les cyclodextrines. Celles-ci permettent généralement de fixer les polymères, les bras espaceurs, les agents de ciblage et couplage, les ammoniums quaternaires, etc. Les ammoniums quaternaires vont par exemple rendre la β -cyclodextrine davantage hydrosoluble (18,5 g/L).

III.2.2. Propriétés de complexation

Aussi appelées « molécules hôtes », les cyclodextrines présentent une cavité interne relativement apolaire favorisant la formation de complexes de type hôte-invité (host-guest, en anglais) entre la CD et la molécule lipophile « dite invitée ». En milieu aqueux, la complexation est un équilibre réversible et déplacé en faveur de la formation du complexe. En effet, ces interactions de nature hydrophobes ou de type Van Der Waals¹²¹ conduisent généralement à la formation de complexes hôte/invité ayant une stœchiométrie (1/1 ; 1/2 ; ou 2/1)¹²² qui dépend de la taille de la molécule invitée:



Les constantes d'association ou de complexation (K_a) liées à ces équations s'expriment en M^{-1} et peuvent être décrites par les relations :

$$K_{a1} = \frac{[\text{MI} \cdot \text{CD}]}{[\text{CD}][\text{MI}]}$$

$$K_{a2} = \frac{[\text{MI} \cdot \text{CD}_2]}{[\text{CD}][\text{MI} \cdot \text{CD}]}$$

Le logarithme décimal de la constante d'association du complexe (β -CD/benzylpiperidine) vaut par exemple $3,30 \pm 0,05$ dans l'eau et à 298 K¹²³.

¹¹⁷ T. Loftsson and M. E. Brewster, *J. Pharm. Sci.*, 1996, **85**, 1017-1025.

¹¹⁸ J. Mosinger, L. Slavětínská, K. Lang, P. Coufal and P. Kubát, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 3797-3804.

¹¹⁹ A. Zarrabi and M. Vossoughi, *J. Mol. Liq.*, 2015, **208**, 145-150.

¹²⁰ H. JIANG, Z. YANG, X. ZHOU, Y. FANG and H. JI, *Chin. J. Chem. Eng.*, 2012, **20**, 784-792.

¹²¹ K. Srinivasan, K. Kayalvizhi, K. Sivakumar and T. Stalin, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2011, **79**, 169-178.

¹²² P.-C. Chiang, Y. Shi and Y. Cui, *Pharmaceutics*, 2014, **6**, 467-480.

¹²³ M. V. Rekharsky, R. N. Goldberg, F. P. Schwarz, Y. B. Tewari, P. D. Ross, Y. Yamashoji, Y. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 8830-8840.

III.2.2.1 Caractérisations physico-chimiques

Les cyclodextrines et les complexes d'inclusion qu'elles forment avec les biomolécules peuvent être caractérisés par de nombreuses méthodes d'analyses spectrométriques (FITR, DRX, UV-Visible, ATG, SEM, DSC, Spectroscopie Raman, RMN, etc.)^{124,125}.

III.2.3. Propriétés biologiques

La solubilisation dans l'eau, le transport et le relargage contrôlé de principes actifs de polarité « moyenne ou faible » constituent un verrou permanent en médecine. La recherche actuelle porte un regain d'attention sur l'utilisation des cyclodextrines pour vaincre ce problème. En effet, ces structures en forme de « cage » présentent une faible immunogénicité et leur nature non toxique fait d'eux d'excellents candidats pour la drug delivery. De plus, ces cages ont l'avantage d'être relativement solubles et capables de protéger les principes hydrophobes des agressions chimiques et biologiques grâce à leur cavité apolaire. Ainsi, les cyclodextrines sont utilisées dans diverses applications¹²⁶ : la thérapie anticancéreuse et antibactérienne¹²⁷, les nanoparticules¹²⁸, cosmétiques¹²⁹, l'agroalimentaire¹³⁰, la transfection de gène¹³¹ etc.' Dans les domaines pharmaceutiques, les CDs sont utilisées comme excipients¹³² de médicaments lipophiles.

III.3. La polyéthylèneimine

Généralement utilisée pour la transfection d'acides nucléiques, la polyéthylèneimine est un polymère d'amine linéaire ou branché présentant un chaînon sur trois qui est un atome d'azote (Figure 21). En effet, cet homopolymère est très souvent qualifié « d'éponge à protons »¹³³ en raison de la protonation de 20 à 45% de ses groupements amines lors des processus d'acidification du système lysosomal/endosomal (pH7 à pH5). Elle acquiert de ce fait un pouvoir endosomolytique qui lui permet de libérer les polyplexes dans le cytoplasme sans que l'ADN ne soit dégradé par les enzymes lysosomales. Ainsi, la PEI se présente comme un excellent vecteur non viral pour le transfert de molécules en thérapie génique *in vitro* et *in vivo*.

¹²⁴ P. Mura, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2015, **113**, 226-238.

¹²⁵ D. Bonenfant, P. Niquette, M. Mimeault, A. Furtos-Matei and R. Hausler, *Water Res.*, 2009, **43**, 3575-3581.

¹²⁶ L. Szente and J. Szejtli, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1999, **36**, 17-28.

¹²⁷ A. Celebioglu, O. C. O. Umu, T. Tekinay and T. Uyar, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2014, **116**, 612-619.

¹²⁸ J.R. Lakkakula, R.W. Maçedo Krause, *Nanomedicine*, 2014, **9**, 877-894.

¹²⁹ T. Kongprathet and S. Wanichwecharungruang, *Carbohydr. Polym.*, 2015, **119**, 110-117.

¹³⁰ A. Stepniak, S. Belica-Pacha, S. Rozalska, J. Dlugonski, P. Urbaniak and B. Palecz, *J. Mol. Liq.*, 2015, **211**, 288-293.

¹³¹ L. Gallego-Yerga, L. Blanco-Fernández, K. Urbiola, T. Carmona, G. Marcelo, J. M. Benito, F. Mendicuti, C. Tros de Ilarduya, C. Ortiz Mellet and J. M. García Fernández, *Chem. – Eur. J.*, 2015, **21**, 12093-12104.

¹³² T. Loftsson, M.E. Brewster, *J. Pharm. Sci.*, 2012, **101**, 3019-3032.

¹³³ I. Kurtulus, G. Yilmaz, M. Ucuncu, M. Emrullahoglu, C. R. Becer and V. Bulmus, *Polym. Chem.*, 2014, **5**, 1593-1604.

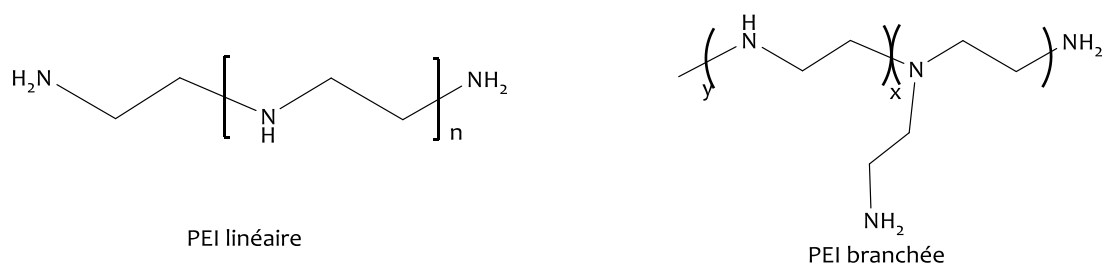


Figure 21 : Structure chimique d'une PEI linéaire et d'une PEI branchée.

L'efficacité de transfection est liée à la charge globale du complexe « PEI/molécule d'intérêt ». Plus cette charge est suffisamment positive, plus l'internalisation de la membrane cellulaire (chargée négativement) est meilleure. La charge globale du complexe dépend aussi du poids moléculaire de la PEI qui varie de 0,6 à 25 kDa¹³⁴.

Cependant, une forte charge positive du complexe « PEI/molécule d'intérêt » est susceptible d'engendrer une toxicité *in vivo*. Cette toxicité résulte des interactions entre le complexe et les globules rouges chargés négativement et engendre ainsi une thrombose, ou une mort rapide de l'animal¹³⁵. De ce fait, différentes approches ont été envisagées pour modifier les polymères de polyéthylèneimine afin d'atténuer leur toxicité. Ces modifications comprennent la conjugaison de la polyéthylèneimine avec différentes molécules possédant des fonctions chimiquement réactives incluant, les polysaccharides (chitosan¹³⁶, pullulane¹³⁷, l'acide hyaluronique¹³⁸, etc.), l'acide cholique¹³⁹, acide stéarique¹⁴⁰, ainsi que des poly (éthylène glycol)^{141,142}.

III.4. Dérivés du triphénylphosphonium comme marqueur mitochondrial

La mitochondrie est une cible de choix pour le traitement anticancéreux car c'est dans cet organe que se passent les mécanismes de production d'énergie nécessaire à la vie de la cellule mais aussi les mécanismes d'apoptose nécessaires au maintien de l'homéostasie du corps. Dans la littérature, les dérivés de la triphénylphosphine (TPP), sont décrits comme des molécules

¹³⁴ G. P. Tang, H. Y. Guo, F. Alexis, X. Wang, S. Zeng, T. M. Lim, J. Ding, Y. Y. Yang and S. Wang, *J. Gene Med.*, 2006, **8**, 736-744.

¹³⁵ C. Li, D. Zhong, Y. Zhang, W. Tuo, N. Li, Q. Wang, Z. Liu and W. Xue, *J. Mater. Chem. B*, 2013, **1**, 1885-1893.

¹³⁶ J. Yue, J. Wu, D. Liu, X. Zhao and W. W. Lu, *Nanoscale Res. Lett.*, 2015, **10**, 203.

¹³⁷ X.-C. Yang, Y.-L. Niu, N.-N. Zhao, C. Mao and F.-J. Xu, *Biomaterials*, 2014, **35**, 3873-3884.

¹³⁸ J. Li, Y. He, W. Sun, Y. Luo, H. Cai, Y. Pan, M. Shen, J. Xia and X. Shi, *Biomaterials*, 2014, **35**, 3666-3677.

¹³⁹ M. W. Amjad, M. C. I. M. Amin, H. Katas and A. M. Butt, *Nanoscale Res. Lett.*, 2012, **7**, 687.

¹⁴⁰ Q. Jin, Z. Wang, F. Yan, Z. Deng, F. Ni, J. Wu, R. Shandas, X. Liu and H. Zheng, *PLoS ONE*, 2013, **8**, e76544.

¹⁴¹ L. Zhou, Z. Chen, F. Wang, X. Yang and B. Zhang, *Acta Biomater.*, 2013, **9**, 6019-6031.

¹⁴² Y.-Y. Liu, X.-Y. Yang, Z. Li, Z.-L. Liu, D. Cheng, Y. Wang, X.-J. Wen, J.-Y. Hu, J. Liu, L.-M. Wang and H.-J. Wang, *CNS Neurosci. Ther.*, 2014, **20**, 76-85.

capables de cibler spécifiquement la mitochondrie¹⁴³. Ainsi, les travaux de Lavasanifa *et coll.*¹⁴⁴, ont consisté à fixer ce cation (TPP) sur un anticancéreux, la doxorubicine et ont montré une vectorisation importante de la molécule dans la mitochondrie (Figure 22).

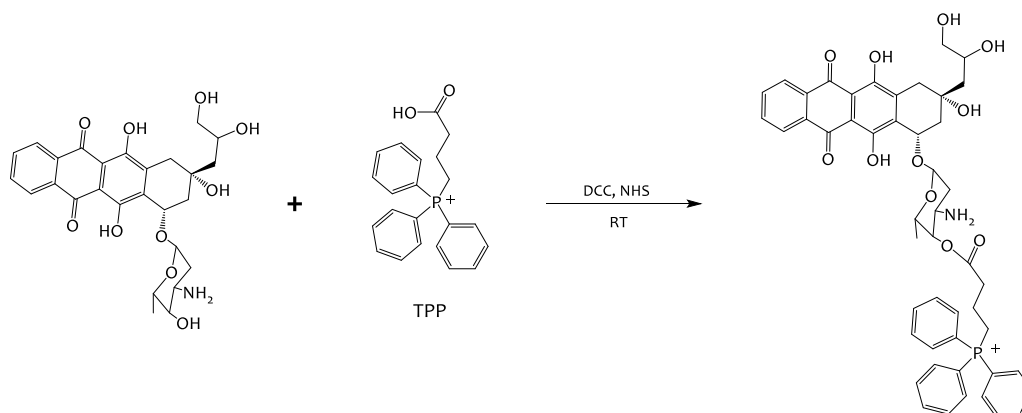


Figure 22 : Structure de la doxorubicine vectorisée par la TPP.

Kim *et coll.*¹⁴⁵, ont effectué une expérience similaire en fixant la TPP sur une nanoparticule d'oxyde de fer, le complexe est véhiculé facilement dans la cellule tumorale par l'effet EPR. La TPP permet l'internalisation dans les mitochondries, puis l'illumination au laser des nanoparticules de fer détruit toutes les cellules tumorales par hyperthermie (Figure 23).

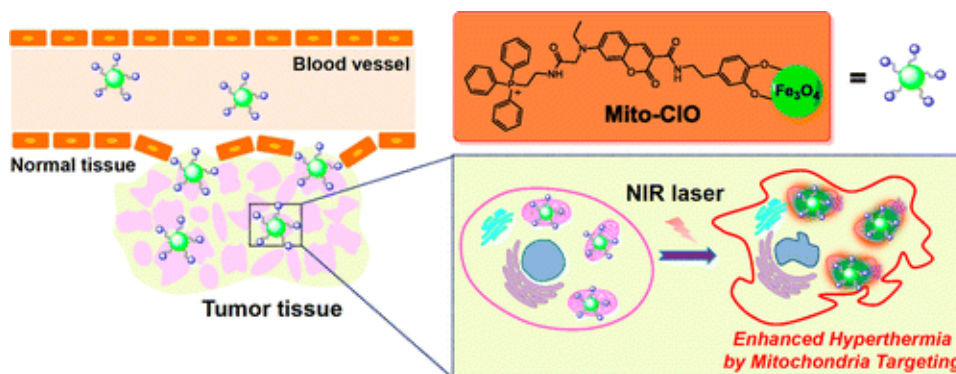


Figure 23 : Ciblage mitochondrial par la TPP.

¹⁴³R. K. Pethak, S. Marrache, D. A. Harn, S. Dhar, *ACS Chemical biology*, 2004, 9, 1178.

¹⁴⁴A. Lavasanifa, M. Han, M. R. Vakili, H. S. Abyaneh, O. Molavi, R. Lai, *Molecular Pharmaceutics*, 2014, 11, 2640

¹⁴⁵J. S. Kim, C. Kang, H. J. Jung, K. M. Byun, J. H. KIM, J. H. Han, H. S. Kweon, J. M. Choi, J. H. Lee, J. Han, H. Jung, *JACS*, 2015, 137, 3017-3023.

Chapitre IV. Les principes actifs

IV.1. Les curcuminoïdes

IV.1.1. Introduction

Les curcumines sont des composés d'origine végétale, extraites à partir du rhizome de la plante *Curcuma longa*. Cette plante à rhizomes allongés appartient à la famille des zingibéracées et est cultivée majoritairement en Asie du sud-est et en Inde pour ses vertus médicinales. Les rhizomes séchés et broyés constituent un ingrédient essentiel pour la préparation de la moutarde et du curry en raison de la couleur jaunâtre¹⁴⁶ (Figure 24).

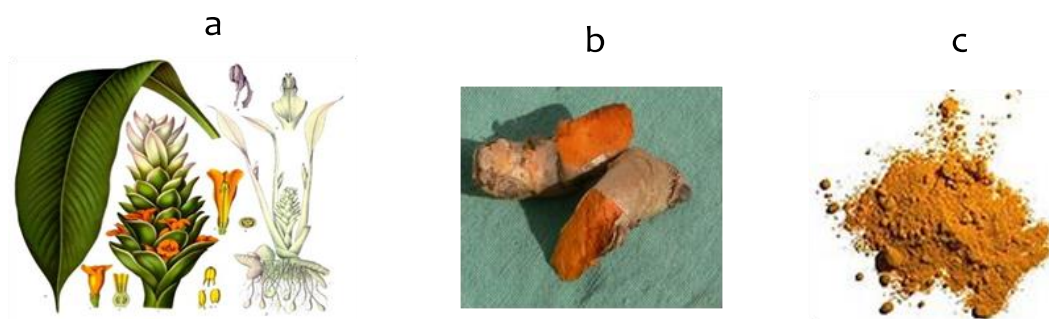


Figure 24 : a) Plante, b) rhizome et c) poudre séchée de *Curcuma longa*.

La curcumine (curcumine I, constituant majoritaire), la monodéméthoxycurcumine (curcumine II) et bisdéméthoxycurcumine (curcumine III) sont les différents curcuminoïdes (Figure 25) pouvant être extraites des rhizomes de *Curcuma longa*.

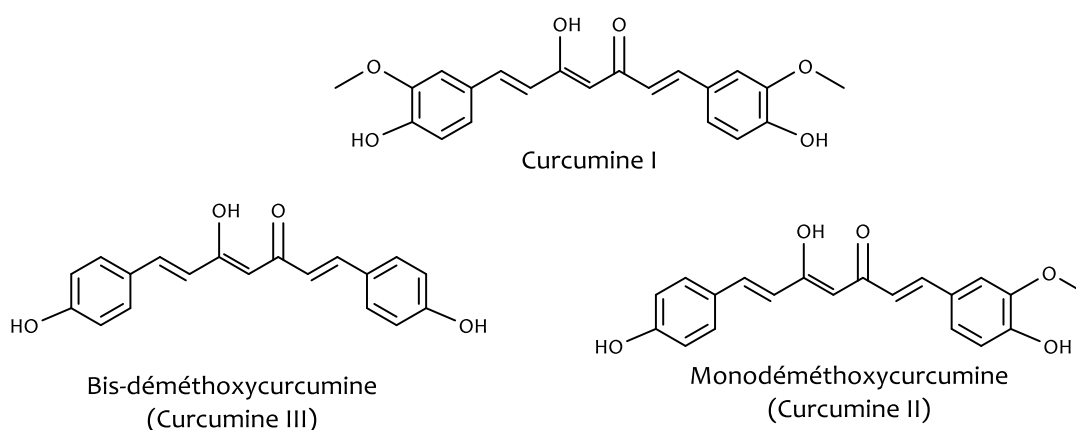


Figure 25 : Structures chimiques des curcumines I, II et III.

¹⁴⁶C. H. Park, E. R. Hahm, S. Park, H.-K. Kim and C. H. Yang, *FEBS Lett.*, 2005, **579**, 2965-2971.

Les curcumines peuvent également être isolées à partir d'autres espèces du genre *Curcuma* : *C. phaeocaulis* (3%), *C. aromatica*, *C. mangga*, *C. zedoaria* (0,1%) et *C. xanthorrhiza* (1-2%). La teneur de ces composés varie de 3 à 8% selon l'espèce¹⁴⁷.

Souvent utilisé comme complément alimentaire dans l'industrie agroalimentaire, le curcuma joue également le rôle de matière colorante dans l'industrie cosmétique et du textile. En médecine traditionnelle ayurvédique et chinoise, la curcumine servait à traiter les problèmes respiratoires, les troubles hépatiques, l'acné, les douleurs abdominales, l'anorexie, la dermatite et le psoriasis¹⁴⁸. Le regard porté sur ces composés, notamment sur la curcumine nécessite que l'on s'intéresse en particulier à sa biogénèse et à ses propriétés physico-chimiques et biologiques.

IV.1.2. Origine et biosynthèse de la curcumine

Isolée pour la première fois en 1815 par Vogel et Pelletier, la curcumine n'a été obtenue sous forme de cristaux qu'en 1870 par Daube et coll. puis par Ivanow-Gajewsky en 1872. Sa structure a été décrite comme étant un diferuloylmethane naturel ou (E, E)-1,7-bis (4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-1,6-heptadiène-3,5-dione en 1910 par Milobedzka (Prasade et al., 2014)¹⁴⁹.

La biosynthèse de la curcumine demeure un sujet à discussion. Toutefois, Roughley et Whiting¹⁵⁰ ont proposé en 1973, une voie plausible pour la formation du squelette de ce diferuloylmethane: celle-ci correspond à la condensation de deux unités phénylpropéniques et d'un carbone central fourni par une molécule d'acide malonique sous forme de thioester du coenzyme A (Figure 26).

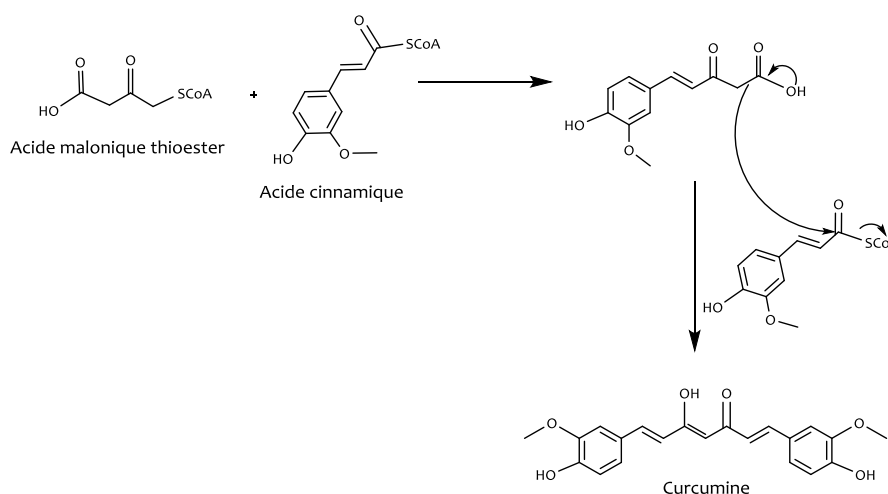


Figure 26 : Biosynthèse de la curcumine (Roughley et Whiting, 1973).

¹⁴⁷ B. B. Aggarwal, C. Sundaram, N. Malani, H. Ichikawa, *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007, **595**, 1-75.

¹⁴⁸ S. C. Gupta, G. Kismali and B. B. Aggarwal, *BioFactors*, 2013, **39**, 2-13.

¹⁴⁹ S. Prasad, S. C. Gupta, A. K. Tyagi and B. B. Aggarwal, *Biotechnol. Adv.*, 2014, **32**, 1053-1064.

¹⁵⁰ P. J. Roughley and D. A. Whiting, *J. Chem. Soc. [Perkin 1]*, 1973, 2379-2388.

Lampe et coll., ont réalisé la première synthèse de la curcumine en 1913 et Srinivasan est le premier à séparer les curcuminoïdes par des méthodes chromatographiques.

IV.1.2.1 Extraction de la curcumine

Les curcuminoïdes sont classiquement extraits à partir de la poudre de curcuma par des solvants organiques polaires tels que les alcools, l'acétone, l'acétate d'éthyle, etc. De tous ces solvants, seule l'acétone conduit à un rendement d'extraction maximal (22,8%)¹⁵¹. Les spécifications du JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) listent l'acétone, le méthanol, l'éthanol et l'isopropanol comme solvants utilisables.

IV.1.3. Propriétés physico-chimiques de la curcumine

Les extraits de poudre de racines de curcuma séché contiennent les huiles volatiles et non volatiles, des protéines, des acides gras, des minéraux, les hydrates de carbones, les moisissures et les curcuminoïdes. La curcumine commerciale contient approximativement 77% de curcumine, 17% de monodéméthoxycurcumine et environ 6% de bisdéméthoxycurcumine¹⁵². La curcumine est un polyphénol de formule brute (C₂₁H₂₀O₆), de poids moléculaire égal à 368,37 et son point de fusion est d'environ 183°C (Goel et al, 2008)¹⁵³. La curcumine est connue pour présenter une tautomérisation céto-énoles (Figure 27) ayant une forme céto prédominante dans des solutions acides et neutres et une forme énolique stable en milieu alcalin. Son pKa est de 8,54.

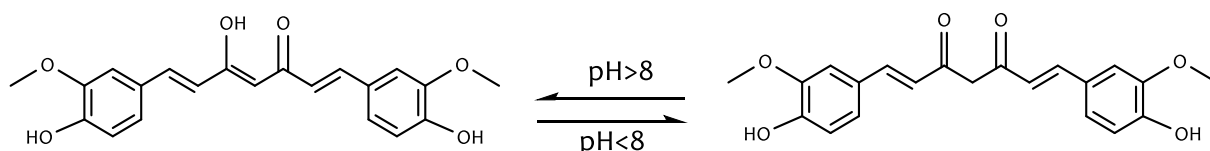


Figure 27 : Equilibre céto-énoles de la curcumine.

En conditions physiologiques, cette propriété de la curcumine est d'une importance cruciale dans la détermination de la sélectivité de sa liaison aux protéines car elle peut être responsable de l'inhibition de l'agrégation de la protéine β -amyloïde dans les modèles de la maladie d'Alzheimer¹⁵⁴.

¹⁵¹S. K. Bajpai, N. Chand, S. Ahuja and M. K. Roy, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2015, **75**, 239-247.

¹⁵²P. Anand, A. B. Kunnumakkara, R. A. Newman, B. B. Aggarwal, *Mol. Pharm.*, 2007, **4**, 807-818.

¹⁵³A. Goel, A. B. Kunnumakkara and B. B. Aggarwal, *Biochem. Pharmacol.*, 2008, **75**, 787-809.

¹⁵⁴S. Elavarasan, D. Bhakiaraj, B. Chellakili, T. Elavarasan and M. Gopalakrishnan, *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2012, **97**, 717-721.

IV.1.3.1 Solubilité et stabilité de la curcumine

Si la curcumine est soluble dans les solvants organiques (alcools, solvants chlorés, acétone, diméthylsulfoxyde ou acide acétique glacial, etc.), elle reste néanmoins quasiment insoluble dans l'eau (0,6 µg/mL). À pH neutre ou acide, la curcumine a une couleur jaune-orangé et se comporte comme un donneur de proton alors qu'à pH basique, elle est de couleur rouge et joue plutôt le rôle de donneur d'électron, lui conférant ses propriétés anti-oxydantes.

Par ailleurs, dans des systèmes de tampon phosphate (pH 7,2), plus de 90% de curcumine se dégrade dans les 30 minutes en : féruloilméthane, acide férulique et en vanilline (Figure 28) (Wang et al, 1997)¹⁵⁵.

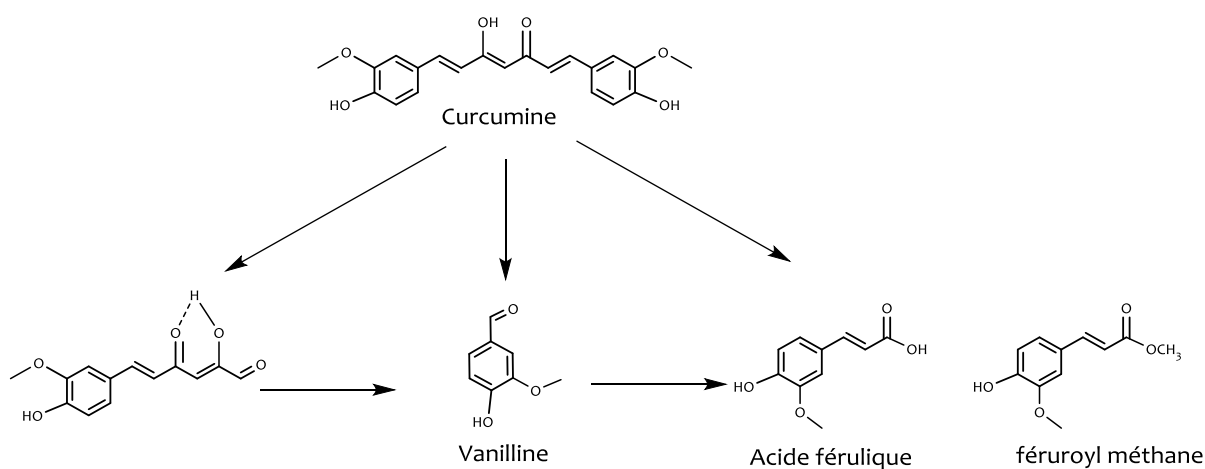


Figure 28 : Produits de dégradation de la curcumine en milieu tampon phosphate (0,1 M, 37°C, pH7,2) « Wang et al, 1997 ».

L'excitation lumineuse est un paramètre qui affecte grandement la stabilité de la curcumine (Sundaryono et al, 2003)¹⁵⁶. En effet, un certain nombre de photo-adduits ont été identifiés suite à une exposition de la curcumine à la lumière. Le mécanisme de formation de ces adduits reste toujours sujet à discussion en raison des propriétés réductrices et pièges de radicaux de la curcumine (Figure 29).

¹⁵⁵Y.-J. Wang, M.-H. Pan, A.-L. Cheng, L.-I. Lin, Y.-S. Ho, C.-Y. Hsieh, J.-K. Lin, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1997, **15**, 1867-1876.

¹⁵⁶A. Sundaryono, A. Nourmamode, C. Gardrat, S. Grelier, G. Bravic, D. Chasseau and A. Castellan, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2003, **2**, 914-920.

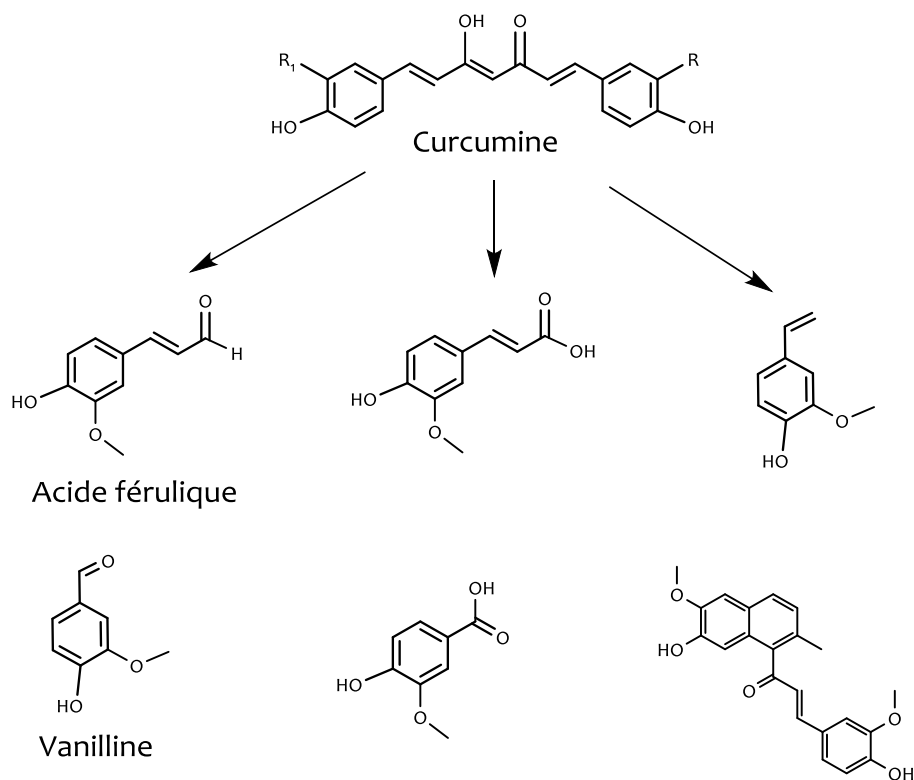


Figure 29 : Produits de la photo-dégradation de la curcumine (Sundaryono *et al*, 2003).

Les auteurs estiment que les mécanismes de formation de produits de photo-dégradation impliquent des réactions radicalaires entre la curcumine et des radicaux oxygénés (Figure 30). De plus, ces voies de photo-dégradation n'impliquent pas des groupes phénoliques car des réactions redox similaires avaient déjà été trouvées avec curcuminoïdes non-phénoliques « Tonnesen et Greenhill »¹⁵⁷.

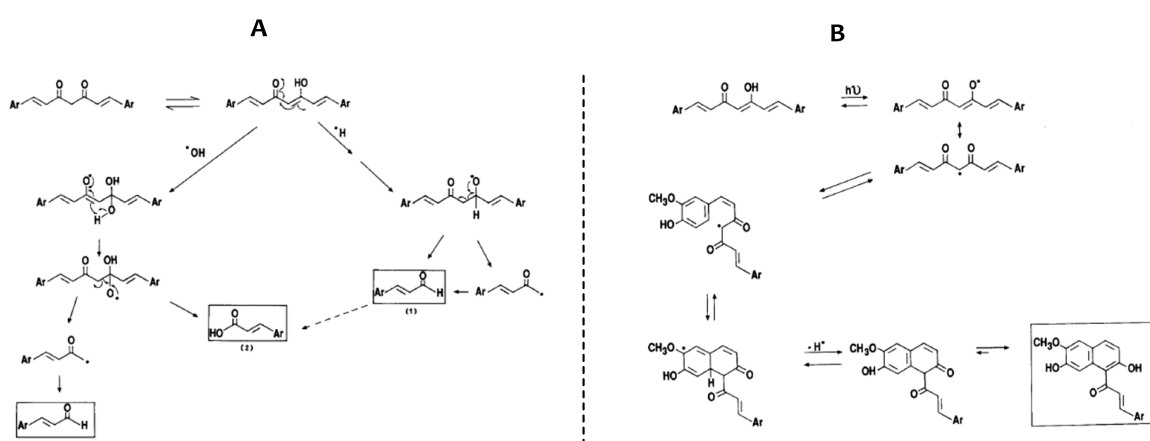


Figure 30 : Mécanisme de formation des produits de photo-dégradation de la curcumine (Tonnesen et Greenhill).

¹⁵⁷H. H. Tonnesen, J. V. Greenhill, *Int. J. Pharm.*, 1992, **87**, 79-87.

IV.1.3.2 RMN et UV-Visible de la curcumine

L'analyse par RMN de la curcumine peut se faire dans les solvants comme le DMSO mais aussi dans les solvants deutérés comme : CD_3OD , CD_3COOD , et $CDCl_3$. Quelque soit le solvant utilisé, les spectres de la curcumine et même de la déméthoxycurcumine indiquent la présence d'une conversion céto-énolique rapide. Des études ont montré que les curcuminoïdes présentent dans une solution d'alcool éthylique une absorption maximale entre 320 et 500 nm. La curcumine absorbe fortement à 430 nm dans le méthanol et entre 415 et 425 nm dans l'acétone (Goel et al, 2008).

Après avoir présenté la structure et les caractéristiques physico-chimiques de la curcumine, nous allons nous intéresser à son métabolisme physiologique ainsi qu'à sa biodisponibilité dans le milieu sanguin. Enfin, nous illustrerons brièvement ses propriétés biologiques à savoir : son mécanisme d'action, les cibles moléculaires et les différentes pathologies pouvant être traitées.

IV.1.4. Biodisponibilité de la curcumine

Des études pharmacocinétiques de la curcumine ont révélé une mauvaise absorption et un métabolisme rapide qui limite fortement sa biodisponibilité, conduisant ainsi à des taux sériques très faibles (Ikiki et Dutta, 2014)¹⁵⁸. Cette faible biodisponibilité peut néanmoins être améliorée grâce à l'action de la pipérine (Figure 31), un alcaloïde naturel du poivre qui inhibe les processus de métabolisation (glucuronidation) et d'élimination cellulaire (P-glycoprotéine ou PgP)¹⁵⁹.

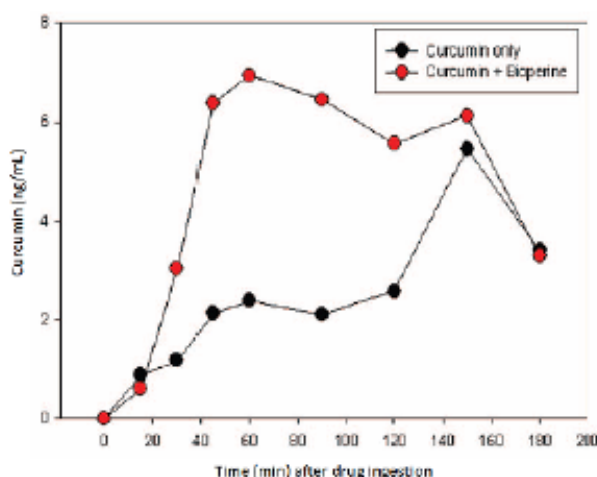


Figure 31 : Biodisponibilité de la curcumine chez l'homme avec ou sans pipérine (Ikiki et Dutta, 2014).

¹⁵⁸E. Ikiki, J. Bioequivalence Bioavailab., 2014, 06.

¹⁵⁹G. Shoba, D. Joy, T. Joseph, M. Majeed, R. Rajendran and P. Srinivas, *Planta Med.*, 1998, 64, 353-356.

IV.1.4.1 Métabolisme de la curcumine

Une fois absorbée, la curcumine est susceptible de subir plusieurs transformations conduisant soit à sa sulfatation ou soit à sa glucuronoconjugaison au niveau de certains sites. Elle peut également subir une réduction grâce à l'action de l'alcool déshydrogénase, suivie d'une conjugaison conduisant aux divers métabolites comme la dihydrocurcumine, la tétrahydrocurcumine, l'hexahydrocurcumine, l'hexahydrocurcuminol, l'acide férulique, l'acide dihydroférulique, glucurono-curcumine, et la sulfo-curcumine (Figure 32).

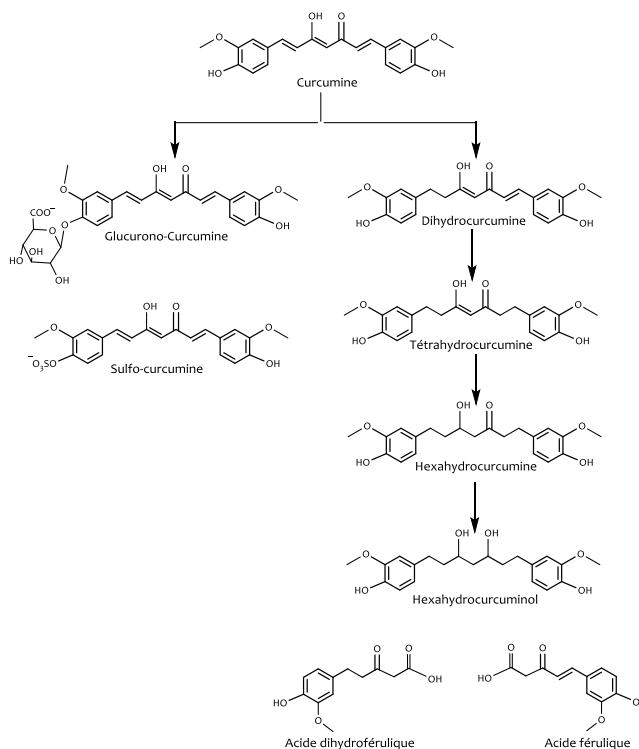


Figure 32 : Voie métabolique et métabolites possibles de la curcumine (Ikiki et Dutta, 2014).

Des études ont montré que la dihydrocurcumine et la tétrahydrocurcumine sont les premiers produits de la biotransformation de la curcumine même si elles sont généralement par la suite converties en conjugués monoglucuronide. De plus, la dihydrocurcumine est l'un des métabolites majoritaire de la curcumine. Et elle s'avère être plus stable que la curcumine en milieu physiologique¹⁶⁰. Par ailleurs, Muruganet et coll.¹⁶¹ ont rapporté que la tétrahydrocurcumine avait une activité antidiabétique et antioxydante meilleure que la curcumine sur 2 types de rats diabétiques alors que les travaux de Sandur et coll.¹⁶² ont montré une activité anti-inflammatoire et antiproliférative des tétrahydrocurcumines inférieure comparée à celle de la curcumine. Ireson

¹⁶⁰M.-H. Pan, T.-M. Huang and J.-K. Lin, *Drug Metab. Dispos.*, 1999, **27**, 486-494.

¹⁶¹P. Murugan and L. Pari, *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, 2006, **17**, 231-244.

¹⁶²S. K. Sandur, M. K. Pandey, B. Sung, K. S. Ahn, A. Murakami, G. Sethi, P. Limtrakul, V. Badmaev and B. B. Aggarwal, *Carcinogenesis*, 2007, **28**, 1765-1773.

et coll.¹⁶³ ont démontré dans une étude que la glucurono-curcumine et la tétrahydrocurcumine présentaient des effets antiprolifératifs moindres que la curcumine. Une étude vient également de montrer que les mono- ou di- glucurono-curcumine ne pouvaient présenter un niveau d'activité biologique (par exemple, anti-inflammatoire ou une activité antiproliférative) supérieure à celui de la curcumine¹⁶⁴.

IV.1.4.2 Propriétés biologiques de la curcumine

La curcumine présente un large spectre d'activités biologiques et pharmacologiques incluant, les activités anti-oxydantes¹⁶⁵, anti-inflammatoires¹⁶⁶, antibactériennes¹⁶⁷, anti Alzheimer¹⁶⁸, anticancéreuses¹⁶⁹ et bien d'autres sans effets secondaires¹⁷⁰. Elle est également utilisée pour le traitement de diverses pathologies. Une liste plus exhaustive est représentée sur la Figure 33.

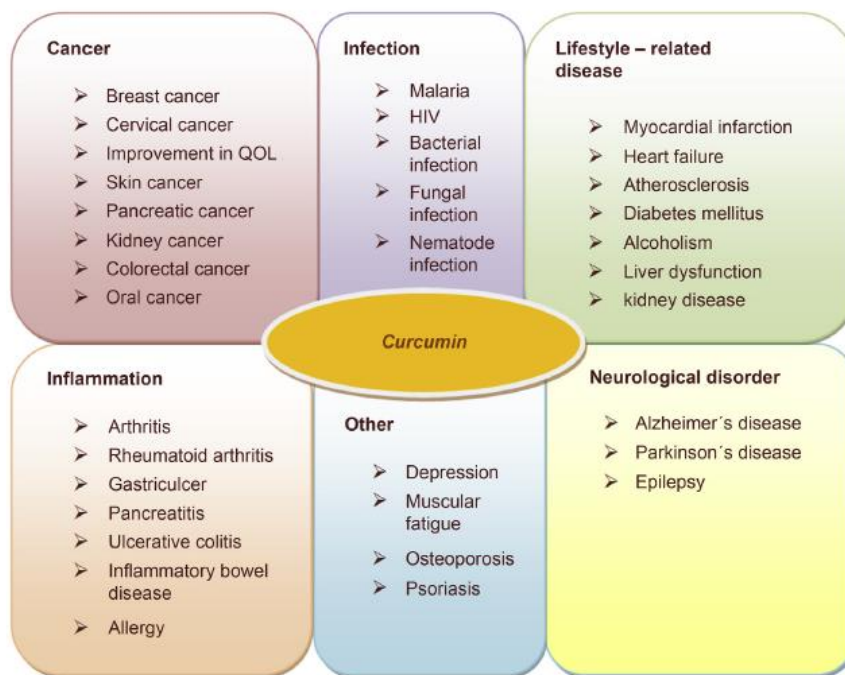


Figure 33 : Pathologies pouvant être traitées par la curcumine (Naksuriya et coll., 2014).

¹⁶³C. Ireson, S. Orr, D. J. L. Jones, R. Verschoyle, C.-K. Lim, J.-L. Luo, L. Howells, S. Plummer, R. Jukes, M. Williams, W. P. Steward and A. Gescher, *Cancer Res.*, 2001, **61**, 1058-1064.

¹⁶⁴ A. Pal, B. Sung, B. A. Bhanu Prasad, P. T. Schuber Jr., S. Prasad, B. B. Aggarwal and W. G. Bornmann, *Bioorg. Med. Chem.*, 2014, **22**, 435-439.

¹⁶⁵ Q. Li, J. Chen, S. Luo, J. Xu, K. Huang, T. Liu, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **93**, 461-469.

¹⁶⁶ X. Shi, Z. Zheng, J. Li, Z. Xiao, W. Qi, A. Zhang, Q. Wu, Y. Fang, *Neurosci. Lett.*, 2015, **594**, 105-110.

¹⁶⁷ E. El Khoury, M. Abiad, Z. G. Kassaify, D. Patra, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 2015, **127**, 274-280.

¹⁶⁸ K. K. Cheng, C. F. Yeung, S. W. Ho, S. F. Chow, A. H. L. Chow, L. Baum, *Am. Ass. Pharm. Sci.*, 2012, **15**, 324-356.

¹⁶⁹ Y. Li, T. Zhang, *Cancer Letters*, 2014, **346**, 197-205.

¹⁷⁰ A. O. Boztas, O. Karakuzu, G. Galante, Z. Ugur, F. Kocabas, C. Z. Altuntas, A. Ozgur Yazaydin, *Mol. Pharm.*, 2013, **10**, 2676-2683.

Dans ce manuscrit, nous illustrerons les propriétés biologiques à travers quelques exemples décrits dans la littérature. Mais, seules les propriétés anticancéreuses sont celles qui vont nous intéresser dans ce projet de thèse.

IV.1.4.2.1. Propriétés anti inflammatoires

Pour évaluer les propriétés anti inflammatoires des curcumines, Ramsewak *et coll.*¹⁷¹ ont réalisé des essais biologiques *in vitro* sur les enzymes pro inflammatoires : les cyclooxygénases I et II (COX I et COX II). Dans ce cadre, l'activité de la cyclooxygénase I (COX I) a été mesurée en utilisant une préparation d'enzyme de vésicules séminales de bélier et celle de la cyclo-oxygénase II (COX II) a été mesurée grâce à la préparation enzymatique à partir d'un lysat de cellules d'insecte dilué dans le tampon Tris. Ces expériences ont été réalisées en présence de l'acide arachidonique comme substrat des enzymes. Les résultats obtenus au cours de ces travaux montrent une inhibition de 32 ; 38,5 et 39,2% pour la COX I et une inhibition de 89,7 ; 82,5 et 58,9% pour la COX II respectivement par les curcumines I, II, III à la concentration de 125 µg/mL. Ces résultats obtenus avec les curcumines ont montré une meilleure activité anti inflammatoire contre la COX II comparée à l'aspirine, l'ibuprofène et le naproxène commercial. Les mêmes travaux ont permis de mettre en évidence l'intérêt d'utiliser les curcumines comme d'intéressants agents anti oxydants.

IV.1.4.2.2. Propriétés anti-oxydantes

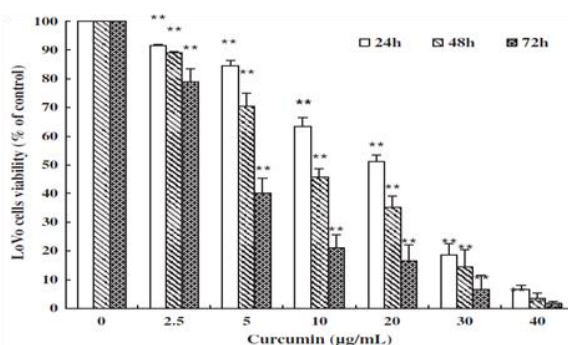
Les mêmes travaux de (Ramsewak *et coll.*) évoqués précédemment utilisent un modèle de liposome catalysé par un ion fer pour évaluer l'activité des curcumines quant à l'inhibition de la peroxydation lipidique de leur part. La spectroscopie de fluorescence a permis de mesurer l'intensité de fluorescence au cours de la peroxydation. Les résultats obtenus montrent que les curcumines I, II et III à la concentration de 100 µg/mL inhibent respectivement de 58 ; 40 et 22% la peroxydation des liposomes alors que la vitamine E présente une inhibition de la peroxydation de 7% dans les mêmes conditions.

Outre les propriétés citées précédemment, de nombreuses études s'intéressent aux diverses autres propriétés biologiques de la curcumine. Près de mille articles mettent en évidence l'intérêt d'utiliser la curcumine comme agent anti cancéreux.

¹⁷¹R. S. Ramsewak, D. L. Dewitt, M.G. Nair, *Phytomed*, 2000, 7, 303-308.

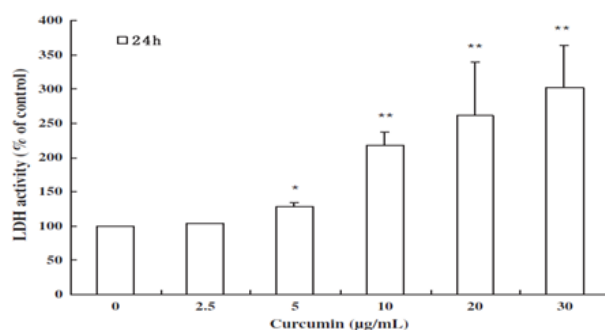
IV.1.4.2.3. Propriétés anticancéreuses

Nous illustrerons ce paragraphe par un exemple concret de la cytotoxicité de ce polyphénol. Pour cela, nous nous sommes basés sur les travaux de Li-da Guo et coll.¹⁷² qui ont permis de valoriser les potentiels effets anti carcinogéniques et chimio préventive de la curcumine sur une lignée de cellules cancéreuses. Dans l'objectif d'évaluer les effets et d'élucider les mécanismes d'induction de l'apoptose chez les cellules de LoVo (une lignée cellulaire du cancer colorectal), les auteurs ont effectué des essais biologiques de viabilité cellulaire par MTT à 24, 48 et 72h sur ces cellules comme nous le montre le graphe ci-dessous :



Les résultats obtenus montrent que la mort cellulaire est dose et temps dépendante. À 72h, ils ont obtenu une inhibition très significative des cellules LoVo traitées en présence de curcumine (IC₅₀ = 5 µg/mL). De par ces résultats, il est certain que la curcumine est active contre les cellules de LoVo et donc d'intéressantes propriétés anti prolifératives contre les cancers du colon.

Parallèlement au test MTT, ils ont réalisé une étude du relargage de la lactate-déshydrogénase (LDH). Dans ce cadre, les cellules de LoVo ont été traitées avec des concentrations en curcumine allant de 0 à 30 µg/mL. Après 24h d'incubation suivie du traitement du milieu de culture, le pourcentage de relargage de LDH issues de cellules est quantifié par UV (graphe ci-dessous) :



Le graphe montre que le relargage de la LDH est dose dépendante et il est une preuve significative de la souffrance des cellules dans les conditions de l'expérience et donc de la mort cellulaire programmée (apoptose).

¹⁷²Li-da. Guo, Xue-jie. Chen, Yu-hong. Hu, Zhi-jun. Yu, Duo. Wang, Jing-ze. Liu, *Phytotherapy research*, 2013, **27**, 422-430.

Dans ces mêmes travaux, les auteurs ont montré que la curcumine induisait l'arrêt du cycle cellulaire de LoVo à la phase S et qu'elle était capable de diminuer le potentiel de la membrane mitochondriale avec l'activation des caspases 3 et 9.

IV.1.5. Molécules cibles de la curcumine

La curcumine est une molécule naturelle largement étudiée pour ces fonctions biologiques et surtout pour sa faible cytotoxicité. Elle est connue pour moduler plusieurs cibles moléculaires efficacement. De nombreux travaux ont suggéré que la curcumine peut moduler les molécules impliquées dans presque tous les stades de développement de la maladie par la régulation des facteurs de transcription (tel que le facteur NF- κ B), les facteurs de croissance, récepteurs, les cytokines, les kinases, des enzymes, la survie des cellules métastatiques, et des molécules pro-apoptotiques (Figure 34).

La curcumine agit également en augmentant le taux de ROS dans la mitochondrie¹⁷³ notamment l'anion superoxyde. Ce qui compte tenu du taux déjà élevé de ROS dans la cellule cancéreuse va conduire à l'apoptose. Ce mécanisme implique sans doute l'inhibition de la thioredoxine réductase.



Figure 34 : Cibles moléculaires de la curcumine (Prasade et coll., 2014).

Les intéressantes propriétés biologiques de la curcumine sont limitées tout d'abord par sa faible solubilité dans l'eau en raison de son caractère hydrophobe ensuite, par sa faible biodisponibilité résultant de la clairance rapide de la circulation sanguine. Pour contourner ces problèmes, la curcumine est parfois greffée sur des sucres, des peptides (RGD), des systèmes nanoparticulaires

¹⁷³J. L. Watson, R. Hill, P. B. Yaffe, A. Greenshields, M. Walsh^a, P. W. Lee, C. A. Giacomantonio, D. W. Hoskin, *Cancer Lett*, 2010, **297**, 1-8.

(nanogels, liposomes, nanoparticules ferromagnétiques, d'or, etc.) pour une meilleure vectorisation. Des systèmes d'encapsulation pour une parfaite solubilisation et protection sont largement étudiés. Dans ce contexte, les cyclodextrines occupent une place de choix. Ces oligosaccharides forment des complexes stables avec la curcumine en conditions physiologiques. Le Tableau 3 ci-dessous présente quelques exemples de formulations à base de curcumine en études et/ou en cours d'études cliniques.

Tableau 3 : Quelques études cliniques publiées sur la curcumine

Etat du patient	À haut risque ou lésion pré-maligne	Cancer du sein métastatique avancé	Cancer pancréatique avancé	Cancer pancréatique et cancer des voies biliaires avancé
Phase	I	I	I & II	I
Dose de curcumine	500, 1000, 2000, 4000, 8000, 12000 mg/jr pendant 3 mois	450, 900, 1800, 3600 mg/jr pendant 3	8000 mg/jr en association avec une chimiothérapie à de gemcitabine	Theracurcumin® (formulation de nanoparticule) + 100, 200, 400 mg/jr en association avec une chimiothérapie à de gemcitabine
Observation	Aucune toxicité jusqu'à 8000 mg / jour	<ul style="list-style-type: none"> ▫ Aucun effet toxique observé ▫ Taux de PG2 significativement faible à dose élevée 	<ul style="list-style-type: none"> ▫ Niveau de dose bien toléré ▫ Etat stable de 5 patients ▫ Aucun patient n'a manifesté de réponse partielle ou complète. 	Aucun effet indésirable observé
Références	174	175	176	177

¹⁷⁴A.-L. Chen, C.-H. Hsu, J.-K. Lin, M.-M. Hsu, Y.-F. Ho, T.-S. She, J.-Y. Ko, J.-T. Lin, B.-R. Lin, M.-S. Wu, H.-S. Yu, S.-H. Jee, G.-S. Chen, T.-M. Chen, C.-A. Chen, M.-K. Lai, Y.-S. Pu, M.-H. Pan, Y.-J. Wang, C.-C. Tsai and C.-Y. Hsieh, *Anticancer Res.*, 2001, **21**, 2895-2900.

¹⁷⁵ R. A. Sharma, S. A. Euden, S. L. Platton, D. N. Cooke, A. Shafayat, H. R. Hewitt, T. H. Marczylo, B. Morgan, D. Hemingway, S. M. Plummer, M. Pirmohamed, A. J. Gescher and W. P. Steward, *Clin. Cancer Res.*, 2004, **10**, 6847-6854.

¹⁷⁶ M. Kanai, K. Yoshimura, M. Asada, A. Imaizumi, C. Suzuki, S. Matsumoto, T. Nishimura, Y. Mori, T. Masui, Y. Kawaguchi, K. Yanagihara, S. Yazumi, T. Chiba, S. Guha, B. B. Aggarwal, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2011, **68**, 157-164.

IV.2. La piperlongumine

IV.2.1. Introduction

La piperlongumine est une petite molécule naturelle extraite à partir du poivre long (*Piper longum*). La piperlongumine porte aussi le nom de « piplartine » et peut être extraite d'autres plantes médicinales du genre « piper ». De plus, les usages thérapeutiques traditionnels et le nom vernaculaire de ce dernier varient selon la zone géographique Tableau 4.

Tableau 4 : Quelques exemples des plantes du genre « Piper » contenant la piperlongumine, leur nom vernaculaire et leurs applications thérapeutiques traditionnelles.

Espèce	Nom vernaculaire	Usage traditionnel et références bibliographiques
<i>Piper longum</i> L.	Long pepper ou poivre long	En médecine ayurvédique indienne cette plante est utilisée pour traiter les tumeurs, bronchite, asthme, toux, infections des voies respiratoires, le choléra, le paludisme, l'hépatite virale, la gonorrhée, la constipation, la diarrhée, les maux d'estomac, la paralysie de la langue, les maladies de la rate, et comme contraceptif ^{178,179}
<i>Piper tuberculatum</i> J.	Pimenta-d'arda	Au Nord-est du Brésil, <i>P. tuberculatum</i> est utilisé comme sédatif et antidote au venin du serpent ¹⁸⁰ . Cette plante est utilisée en médecine traditionnelle péruvienne comme un anti-inflammatoire et désinfectant des plaies chez les humains et les animaux domestiques ¹⁸¹
<i>Piper arborescens</i>	Boyo-boyo	En Malaisie, <i>Piper arborescens</i> est utilisé pour le traitement de rhumatisme
<i>Piper sylvaticum</i>	Rari	En Amazonie, les feuilles de <i>Piper sylvaticum</i> sont utilisées comme légume ¹⁸² . Les racines sont utilisées comme un antidote au venin de serpent ¹⁸³
<i>Piper puberulum</i>	Hairy pepper	En médecine traditionnelle chinoise, <i>P. puberulum</i> est utilisé pour traiter les douleurs, la hernie, les douleurs menstruelles, et la douleur de l'estomac et de l'abdomen

Globalement, *Piper longum* est largement utilisé en médecine populaire comme additif alimentaire. Outre la piperlongumine, différents autres constituants comme la pipérine, ou la pipéridine peuvent être extraits à partir des fruits et des racines de cette plante¹⁸⁴.

¹⁷⁷ M. Kanai, Y. Otsuka, K. Otsuka, M. Sato, T. Nishimura, Y. Mori, M. Kawaguchi, E. Hatano, Y. Kodama, S. Matsumoto, Y. Murakami, A. Imaizumi, T. Chiba, J. Nishihira and H. Shibata, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2013, **71**, 1521-1530.

¹⁷⁸ S. Kumar, J. Kamboj, Suman and S. Sharma, *JAMS J. Acupunct. Meridian Stud.*, 2011, **4**, 134-140.

¹⁷⁹ M. R. Chaudhury, R. Chandrasekaran and S. Mishra, *J. Ethnopharmacol.*, 2001, **74**, 189-193.

¹⁸⁰ F. CíceroBezerra Felipe, J. Trajano Sousa Filho, L. E. de Oliveira Souza, J. Alexandre Silveira, D. Esdras de Andrade Uchoa, E. Rocha Silveira, O. DeusdêniaLoiola Pessoa and G. S. de Barros Viana, *Phytomedicine*, 2007, **14**, 605-612.

¹⁸¹ Z. G. F. Palacios, G. E. Delgado, M. C. Moreno, M. J. Kato and C. Rojas, *Rev. Peru. Biol.*, 2009, **16**, 209-214.

¹⁸² R. C. Srivastava, *Indian J. Tradit. Knowl.*, 2009, **8**, 146-153.

¹⁸³ V. S. Parmar, S. C. Jain, K. S. Bisht, R. Jain, P. Taneja, A. Jha, O. D. Tyagi, A. K. Prasad, J. Wengel, C. E. Olsen and P. M. Boll, *Phytochemistry*, 1997, **46**, 597-673.

IV.2.2. Synthèse et caractéristiques physico-chimiques

Découvert dans les années 1961 par les chimistes indiens Atal et Banga¹⁸⁵, la piperlongumine est un alcaloïde d'amide dont la structure exacte n'a été correctement définie qu'en 1967 par Joshi, Kamat et Saksena¹⁸⁶ (Figure 35).

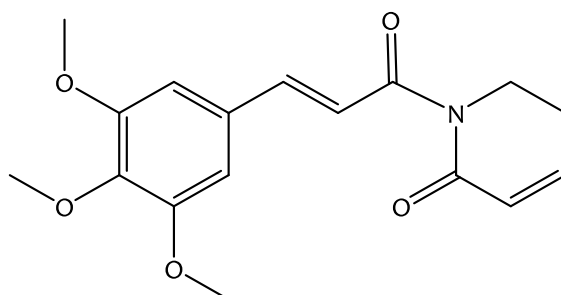


Figure 35 : Structure chimique de la piperlongumine.

Bien que son nom commercial soit la piperlongumine, son nom systématique est le 5,6-dihydro-1-[(2E)-1-oxo-3-(3, 4, 5-trimethoxyphenyl)-2-propenyl]-2(1H)-pyridinone. Comme tout principe actif naturel hydrophobe, la piperlongumine est insoluble dans l'eau et soluble dans les solvants organiques du genre : solvants chlorés, acétone, éthanol, méthanol, éther, DMSO ou DMF. La première synthèse de cet alcaloïde d'amide a été réalisée en 1984 par Boll et coll.¹⁸⁷

IV.2.3. Propriétés biologiques de la piperlongumine

La piperlongumine est un alcaloïde ayant une variété d'activités pharmacologiques^{188,189} incluant les propriétés anticancéreuses (Bezerra et coll., 2013)¹⁹⁰. En effet, les travaux de Raj et coll.¹⁹¹ ont montré que la piperlongumine (PL) présentait un effet antitumoral significatif vis-à-vis de modèles de souris xénogreffées et *in vitro* vis-à-vis d'une variété d'autres lignées cellulaires cancéreuses. Ils montrent de plus que la piperlongumine est peu toxique vis-à-vis des cellules saines (Figure 36).

¹⁸⁴Y.-C. Yang, S.-G. Lee, H.-K. Lee, M.-K. Kim, S.-H. Lee and H.-S. Lee, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 3765-3767.

¹⁸⁵C. K. Atal and S. S. Banga, *Curr. Sci.*, 1963, **32**, 354-355.

¹⁸⁶B. S. Joshi, Y. N. Kamat and A. K. Saksena, *Tetrahedron Lett.*, 1968, **9**, 2395-2400.

¹⁸⁷P. M. Boll, J. Hansen, O. Simonsen and N. Thorup, *Tetrahedron*, 1984, **40**, 171-175.

¹⁸⁸D. J. Son, S. Y. Kim, S. S. Han, C. W. Kim, S. Kumar, B. S. Park, S. E. Lee, Y. P. Yun, H. Jo and Y. H. Park, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012, **427**, 349-354.

¹⁸⁹M. Iwashita, N. Oka, S. Ohkubo, M. Saito and N. Nakahata, *Eur. J. Pharmacol.*, 2007, **570**, 38-42.

¹⁹⁰D. P. Bezerra, C. Pessoa, M. O. de Moraes, N. Saker-Neto, E. R. Silveira and L. V. Costa-Lotufo, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2013, **48**, 453-463.

¹⁹¹L. Raj, T. Ide, A. U. Gurkar, M. Foley, M. Schenone, X. Li, N. J. Tolliday, T. R. Golub, S. A. Carr, A. F. Shamji, A. M. Stern, A. Mandinova, S. L. Schreiber and S. W. Lee, *Nature*, 2011, **475**, 231-234.

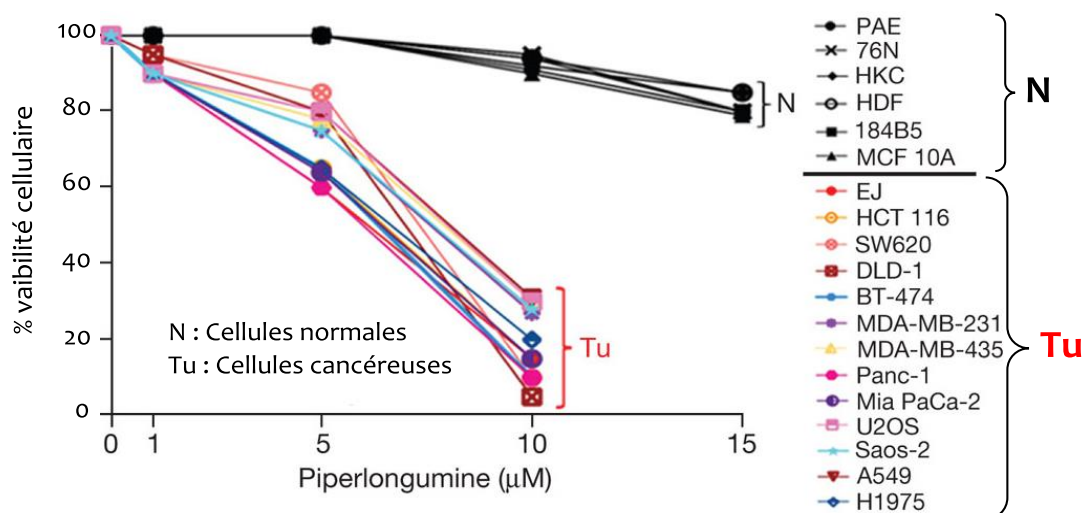


Figure 36 : Pourcentage de viabilité cellulaire en fonction de la concentration en piperlongumine.

Dans la même perspective, les auteurs ont montré que la piperlongumine peut interagir directement avec le glutathion s-transférase pi 1 (GSTP1) ou avec son recombinant purifié et inhibé son activité, ce qui conduit à une diminution des niveaux de glutathion (GSH) réduit et à une augmentation des niveaux de glutathion oxydé (GSSG) dans les cellules cancéreuses. De plus, ils ont montré que l'activation de p53 (un facteur pro-apoptotique) par la piperlongumine entraînait sa surexpression. Ainsi, ces résultats les conduisirent à la conclusion suivante : la piperlongumine induit préférentiellement la mort cellulaire par apoptose suite à une augmentation du taux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans des lignées cellulaires de cancer. Les résultats de cette étude ont conduit Parkinson et Hergenrother¹⁹² a proposé un mécanisme d'action de la piperlongumine (Figure 37):

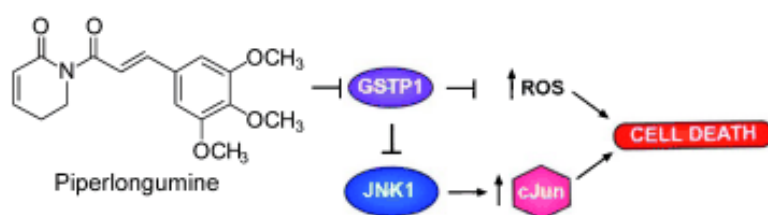


Figure 37 : Mode d'action de la piperlongumine (Parkinson et Hergenrother).

Pour Parkinson et Hergenrother, l'inhibition par la piperlongumine de la glutathion s-transférase pi 1 ou GSTP1 (une protéine connue pour réduire le stress oxydatif dans les cellules) conduit à une augmentation des niveaux de ROS et systématiquement à la mort cellulaire. Par ailleurs, la GSTP1 a une autre fonction : l'inactivation d'une protéine pro-apoptotique, la JNK1 (proteins c-Jun N-terminal Kinases). Donc, l'inhibition de son interaction conduit à l'activation de c-Jun (facteur de

¹⁹²E. I. Parkinson and P. J. Hergenrother, *ChemMedChem*, 2011, **6**, 1957-1959.

transcription de la protéine activatrice) de sorte que le gène transcrit est immédiatement impliqué dans la mort de la cellule.

Les excellentes propriétés biologiques de la piperlongumine ont conduit une autre équipe de recherche au développement d'analogues de la piperlongumine afin d'améliorer davantage son index thérapeutique. Dans ce cadre, Adams et coll.¹⁹³ ont synthétisé plusieurs analogues et ont procédé à leur évaluation biologique sur certaines lignées cellulaires. Ce qui leur a permis de proposer un rôle biologique aux doubles liaisons C2=C3 et C7=C8 présentes dans la structure chimique d'analogues de la piperlongumine (Figure 38).

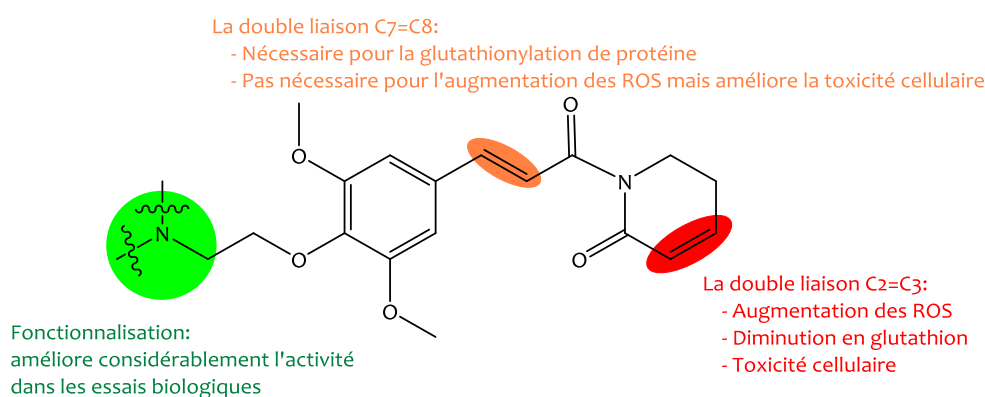


Figure 38 : Rôle des analogues de piperlongumine et même de la piperlongumine.

IV.3. La protoporphyrine IX

Etant donné le métabolisme très perturbé des cellules cancéreuses comme nous l'avons décrit précédemment, il existe une concentration importante d'espèces réactives oxydantes très réactives (H_2O_2 , $\cdot OH^-$, etc.). Cette concentration en ROS est nécessaire à la survie de la cellule cancéreuse car elle favorise les mutations de l'ADN. Cependant, une augmentation même faible de cette concentration peut être fatale à la survie de la cellule cancéreuse. La régulation de cette concentration en ROS est assurée par deux systèmes distincts, la plus importante est basée sur la synthèse du glutathion assurée par la glutathion réductase, elle-même dépendante de la thiorédoxine réductase. Cette dernière enzyme peut constituer une cible importante dans la lutte anticancéreuse car elle va déboucher sur une augmentation considérable des ROS qui sera fatales à la cellule cancéreuse.

Une autre voie de lutte contre les oxydants est constituée par l'hème oxydase (HO-1) qui par sa production de bilirubine à partir de la protoporphyrine (PpIX) va contribuer à la destruction

¹⁹³D. J. Adams, M. Dai, G. Pellegrino, B. K. Wagner, A. M. Stern, A. F. Shamji and S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2012, **109**, 15115-15120.

des ROS. Maeda *et coll.*¹⁹⁴ ont montré que la protoporphyrine IX métallée au zinc (ZnPpIX) était un inhibiteur de cette enzyme dans des essais *in vitro* et *in vivo*^{195,196}. Plus récemment¹⁹⁷, il a été montré que la ZnPpIX est capable d'inhiber totalement et rapidement l'expression de la protéine β -caténine qui est un acteur important dans la voie de signalisation Wnt/ β -caténine. Les auteurs ont mis à jour le mécanisme de la dégradation de la β -caténine par l'intermédiaire de la dégradation du lysosome par la ZnPpIX.

Pour pouvoir véhiculer la molécule de ZnPpIX par l'intermédiaire du système nanocristaux de cellulose/ β -cyclodextrine cationique, nous avons été amené à fixer une molécule d'adamantane sur la ZnPpIX. En effet, l'adamantane présente une grande affinité pour la cavité de la β cyclodextrine de par ses dimensions et l'hydrophobicité qu'elle présente.

IV.4. Les ARN interférences : les siRNA

IV.4.1. Introduction

L'interférence ARN (ARNi) représente l'expression post-transcriptionnelle des gènes¹⁹⁸ ou plus précisément un mécanisme de régulation du taux d'ARN messenger (ARNm) traduit. La première description de ce phénomène a été faite en 1990 par Napoli, Lemieux et Jorgensen¹⁹⁹. Avec l'idée de renforcer la coloration de pétunias, les auteurs introduisirent un transgène de la pigmentation dans le génome de la plante et obtinrent contre toute attente une extinction de 45% de la coloration. Ce phénomène de « co-suppression » peut aussi être appelé « *Post Transcriptional Gene Silencing* ou *silencing* » et a également été observé chez *C. elegans* comme étant une activité post-transcriptionnelle²⁰⁰. Deux classes des petites molécules d'ARN ont été trouvées comme étant des régulateurs d'une séquence spécifique post-transcriptionnelle : les siRNA et les microRNA (miRNA). Nous ne nous intéresserons qu'à celle de siRNA dans ce paragraphe.

IV.4.2. Définition et rôle des siRNA dans les mécanismes d'interférence d'ARN

Les small interfering ARN ou siRNA constituent une classe de petites molécules d'une vingtaine de nucléotides capables d'induire la dégradation séquence-spécifique d'un ou plusieurs

¹⁹⁴ A. K. Iyer, K. Greish, J. Fang, R. Murakami and H. Maeda, *Biomaterials*, 2007, **28**, 1871–1881.

¹⁹⁵ J. Fang, K. Greish, H. Qin, L. Liao, H. Nakamura, M. Takeya and H. Maeda, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2012, **81**, 540–547.

¹⁹⁶ H. Nakamura, J. Fang, B. Gahininath, K. Tsukigawa and H. Maeda, *J. Control Release*, 2011, **155**, 367–375.

¹⁹⁷ S. Wang, J. E. Avery, B. N. Hannafon, S. E. Lind and W.-Q. Ding, *Biochem. Pharmacol.*, 2013, **85**, 1611–1618.

¹⁹⁸ A. Z. Fire, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, **46**, 6966–6984.

¹⁹⁹ C. Napoli, C. Lemieux and R. Jorgensen, *Plant Cell*, 1990, **2**, 279–289.

²⁰⁰ A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello, *Nature*, 1998, **391**, 806–811.

ARN messager (ARNm) dans le cytoplasme²⁰¹. Cette nouvelle génération de biologie peut être utilisée pour le « silencing » dans le traitement de diverses pathologies incluant les cancers²⁰².

IV.4.3. Mécanisme d'interférence par les siRNA

L'interférence ARN est un terme qui fait référence à un silencing génique post transcriptionnel. Il a pour fonction principale de protéger la cellule de l'introduction des éléments transposables et des virus. Ainsi, dans la cellule, les siRNA vont former avec plusieurs autres protéines un complexe dénommé RISC « RNAi Induced Silencing Complex ». Ce complexe siRNA/RISC se chargera ensuite de scanner les différents ARNm présents dans le cytoplasme de sorte que : en cas de non homologie entre le siRNA et l'ARNm scanné, celui-ci est normalement traduit en protéine. Alors que si le siRNA est parfaitement homologue avec une région de l'ARNm, celui-ci est clivé par le complexe RISC. L'ARNm clivé est ainsi rapidement dégradé et la protéine correspondante ne peut plus être synthétisée (Figure 39).

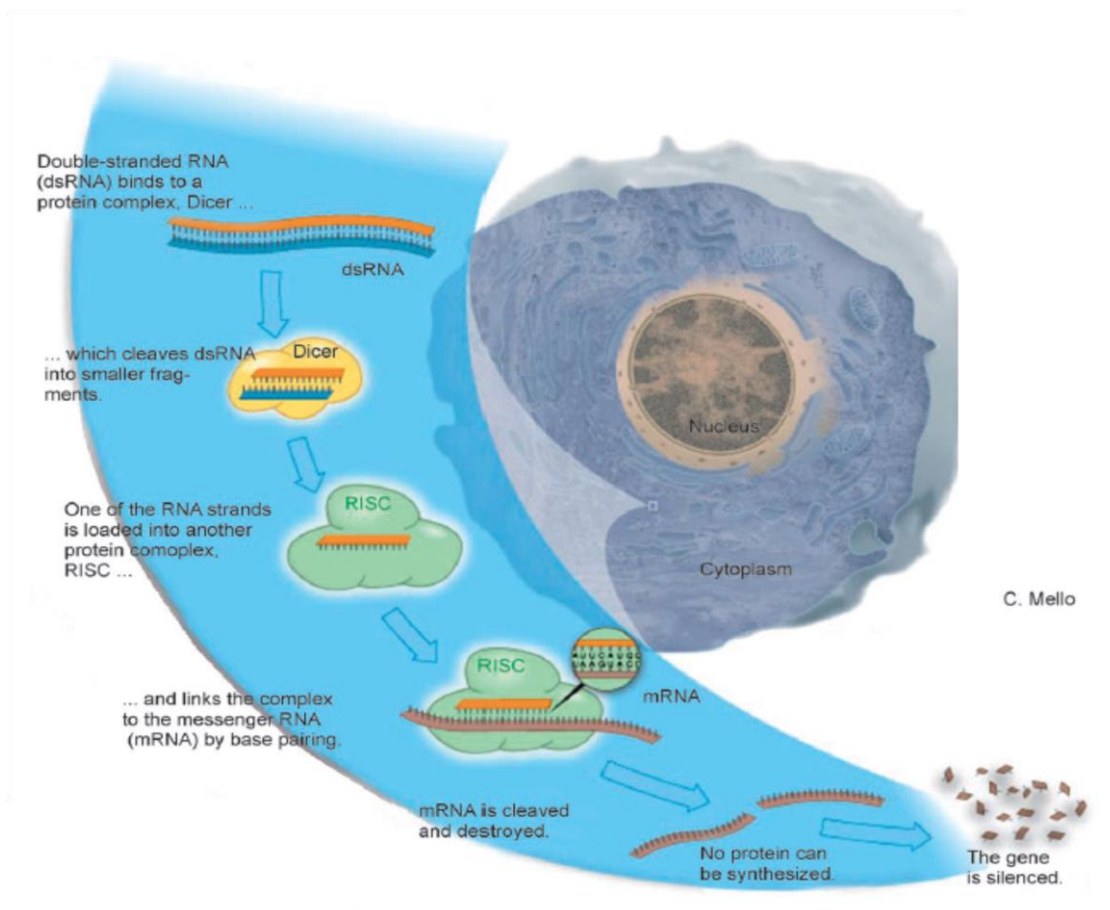


Figure 39 : Schéma simplifié du mécanisme d'interférence des siRNA²⁰³.

²⁰¹ R. C. C. Ryther, A. S. Flynt, B. D. Harris, J. A. Phillips and J. G. Patton, *Endocrinology*, 2004, **145**, 2988-2996.

²⁰² J. C. Burnett and J. J. Rossi, *Chem. Biol.*, 2012, **19**, 60-71.

²⁰³ A. Z. Fire, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, **46**, 6966-6984.

Le complexe siRNA/RISC présente un avantage, celui de ne pas être détruit par le clivage. Il peut donc à nouveau scanner des ARNm et recommencer une coupure.

L'administration systématique des siRNA est limitée par de nombreux obstacles : une rapide dégradation par le système enzymatique (RNase), une élimination par filtration rénale car leur taille est inférieure à 6 nm²⁰⁴. Pour résoudre ces problématiques, un certain nombre de matériaux incluant les polyéthylèneimines²⁰⁵, les cyclodextrines²⁰⁶, les dendrimères²⁰⁷, ainsi que les formulations nanoparticulaires^{208,209} a été développé pour la vectorisation des siRNA. Quelques exemples sont présentés sur le Tableau 5.

Tableau 5 : Quelques exemples de matériaux utilisés pour vectoriser les siRNA.

Matériaux	Modèle cellulaire	Cible	Référence
Liposome	Cellules épithéliales	Angiogénèse récepteur VEGFR-2	210
Nanostructure dendritique	Cellule neuronale	Récepteurs cannabinoïdes	211
Nanostructure à base de PEI	Cellules ostéosarcome humain (U2OS)	Luciférase	212

²⁰⁴ D. M. Dykxhoorn, *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2009, **19**, 475-491.

²⁰⁵ Y. K. Buchman, E. Lellouche, S. Zigdon, M. Bechor, S. Michaeli, J.-P. Lellouche, *Bioconjug. Chem.*, 2013, **24**, 2076-2087.

²⁰⁶ B. M. D. C. Godinho, J. R. Ogier, R. Darcy, C. M. O'Driscoll and J. F. Cryan, *Mol. Pharm.*, 2013, **10**, 640-649.

²⁰⁷ J. Liu, C. Gu, E. B. Cabigas, K. D. Pendergrass, M. E. Brown, Y. Luo and M. E. Davis, *Biomaterials*, 2013, **34**, 3729-3736.

²⁰⁸ H. J. Kim, H. Takemoto, Y. Yi, M. Zheng, Y. Maeda, H. Chaya, K. Hayashi, P. Mi, F. Pittella, R. J. Christie, K. Toh, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata and K. Kataoka, *ACS Nano*, 2014, **8**, 8979-8991.

²⁰⁹ J. Han, J. Cai, W. Borjihan, T. Ganbold, T. M. Rana and H. Baigude, *Carbohydr. Polym.*, 2015, **117**, 324-330.

²¹⁰ A. Yousefi, M. Bourajaj, N. Babae, P. I. van Noort, R. Q. J. Schaapveld, J. R. van Beijnum, A. W. Griffioen, G. Storm, R. M. Schiffelers and E. Mastrobattista, *Int. J. Pharm.*, 2014, **472**, 175-184.

²¹¹ K. Brunner, J. Harder, T. Halbach, J. Willibald, F. Spada, F. Gnerlich, K. Sparrer, A. Beil, L. Möckl, C. Bräuchle, K.-K. Conzelmann, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, **54**, 1946-1949.

²¹² L. L. Israel, E. Lellouche, S. Ostrovsky, V. Yarmiayev, M. Bechor, S. Michaeli and J.-P. (Moshe) Lellouche, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015, **7**, 15240-15255.

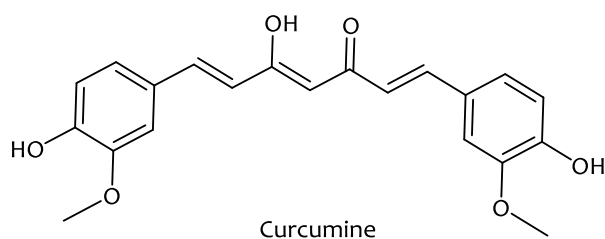
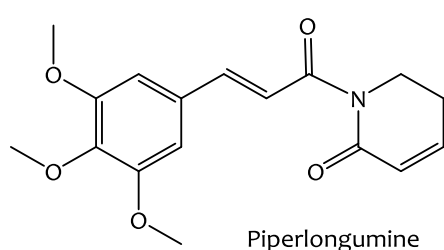
Partie 2.

Synthèses – Caractérisations & Résultats – Discussions

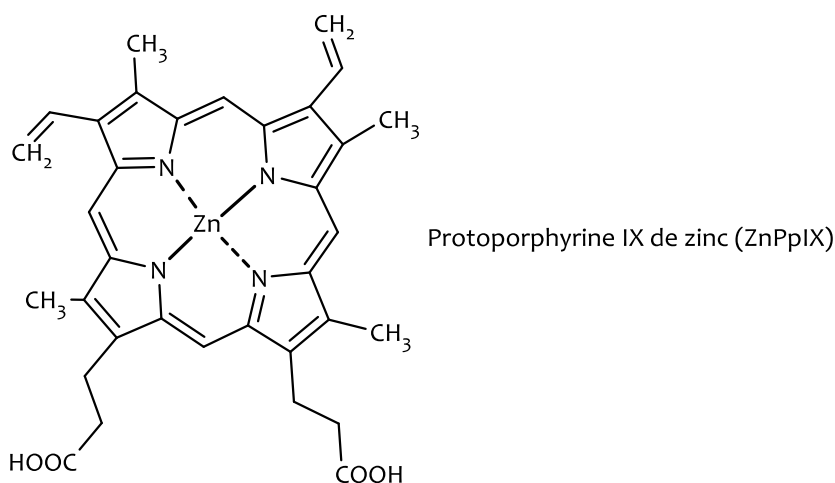
IV.5. But du travail

Dans la poursuite des travaux déjà réalisés au sein du LCSN concernant l'élaboration de plateformes à base de nanoparticules pour la vectorisation et le ciblage d'agents anticancéreux, nous nous sommes proposés de développer deux nanobiomatériaux hydrosolubles capables d'encapsuler et transporter des principes actifs hydrophobes pour les véhiculer vers les cellules cancéreuses via l'effet EPR.

La curcumine et la piperlongumine sont des molécules naturelles peu toxiques et ont été choisies pour leur action sur le système de régulation des espèces oxydantes (ROS) dans la mitochondrie (thioredoxine réductase en particulier).

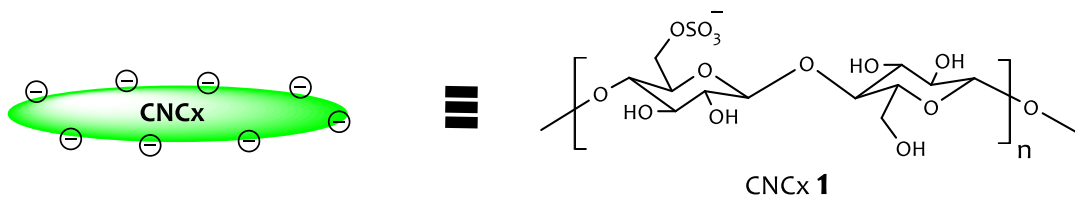


La protoporphyrine IX de zinc quant à elle est connue pour avoir une action sur un autre système de régulation des ROS qui est l'hème oxydase I. Elle possède également des propriétés photosensibles pour ainsi être employée en photothérapie dynamique anticancéreuse.

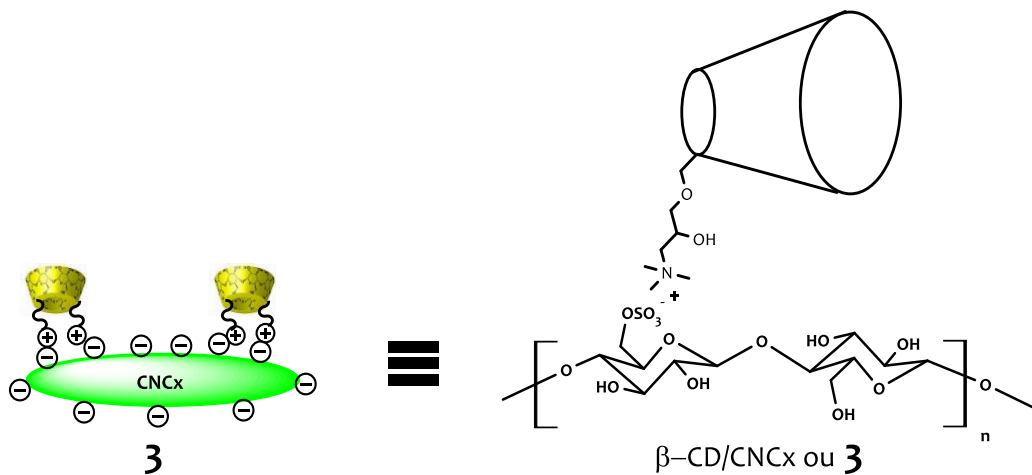


En ce qui concerne la nature des plateformes médicamenteuses, les nanocristaux de cellulose se sont révélés un matériel de choix. En effet, ils ont des dimensions qui leur permettent de pouvoir prétendre à un ciblage passif des tumeurs par effet EPR. Leur forme de bâtonnets leur permet de pénétrer facilement dans la tumeur. Des travaux récents ont montré une non-toxicité de ces nanomatériaux par les cellules. De plus, en raison de leur origine polysaccharidique, ils possèdent une surface polyhydroxylée leur conférant un caractère de furtivité vis-à-vis des macrophages, une fonctionnalisation chimique accessible et enfin la présence de charge négative

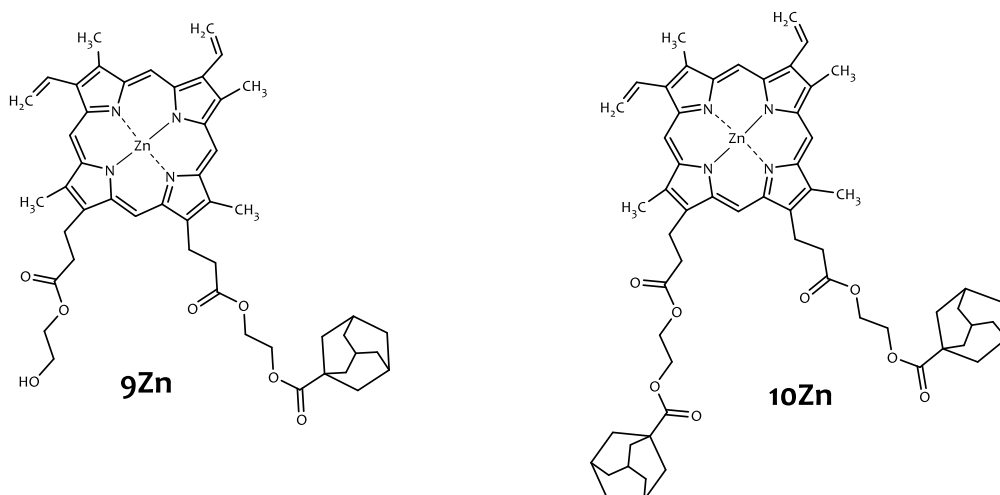
obtenue de leur élaboration à partir du polymère natif. Pour toutes ces raisons, nous avons envisagé deux approches de fixations des produits naturels à la surface des nanocristaux.



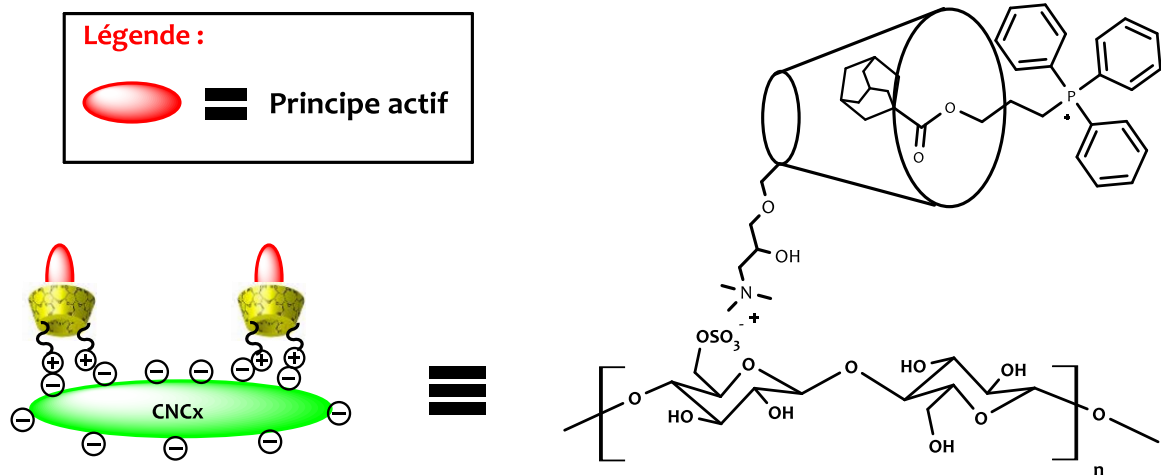
La première consiste à utiliser la technique " layer by layer " afin d'élaborer l'édifice nanoparticulaire. La β -cyclodextrine connue pour ses propriétés d'encapsulation des substances hydrophobes est rendue cationique puis fixée à travers des liaisons électrostatiques sur les nanocristaux. Les agents anticancéreux (curcumine, piperlongumine et ZnPpIX) sont ensuite incorporés sur l'assemblage " nanocristaux/ β -cyclodextrine « β -CD/CNCx ou composé **3** »".



Cependant, les protoporphyrines IX de zinc ne sont pas connues pour s'incorporer au sein des cyclodextrines, elles devront être préalablement dérivatisées par des molécules d'adamantane qui possèdent une très forte affinité pour les cyclodextrines.

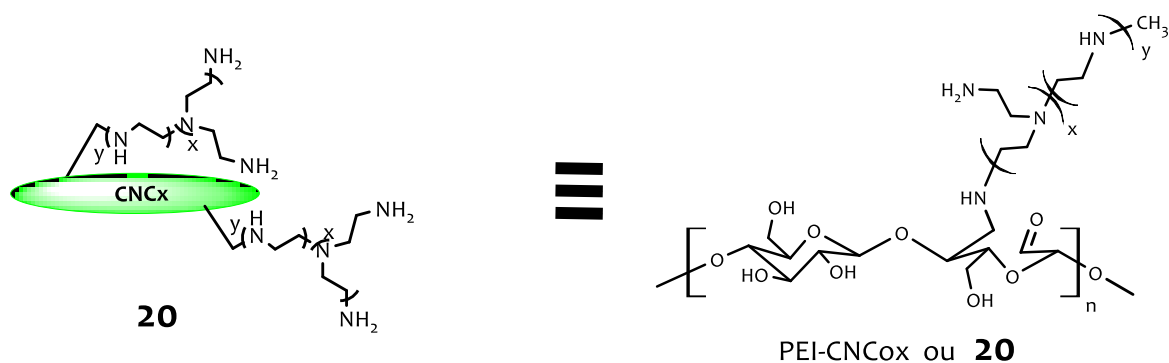


Enfin, nous avons élaboré une stratégie de ciblage de la mitochondrie en synthétisant une molécule à base de triphénylphosphonium connue pour sa grande facilité à traverser la membrane mitochondriale. Cette molécule a été fixée sur l'adamantane et incorporée dans la cyclodextrine.

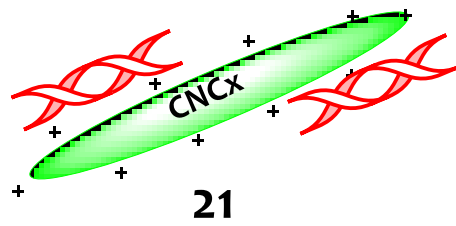


L'ensemble " β -CD/CNCx-triphénylphosphonium" constitue une plateforme capable de transporter des molécules actives vers les tumeurs puis vers les cellules et finalement atteindre la mitochondrie.

Grâce à une collaboration avec l'Unité de Génétique Moléculaire Animale (UGMA) et, en se basant sur le concept de la thérapie génique, une seconde approche a été développée. Celle-ci consiste à fixer des siRNA (small interfering RNA) sur les nanocristaux afin de les transporter vers les membranes des cellules puis vers leur cible dans le cytoplasme. Pour cela, les nanocristaux de cellulose ont tout d'abord été rendus cationiques par la fixation de polyéthylèneimine (PEI) sur ceux-ci. La fixation de la PEI se fait de manière covalente par une réaction d'amination réductrice entre les fonctions amine primaire de la PEI et les fonctions aldéhydes des nanocristaux obtenues par l'oxydation au periodate de sodium.



La fixation des siRNA s'effectue ensuite par liaison électrostatique entre les nanocristaux chargés positivement et les siRNA chargés négativement.



Légende :



Pour évaluer la cytotoxicité des principes actifs seuls ou liés aux nanocristaux, des essais biologiques *in vitro* sont réalisés sur des lignées cellulaires cancéreuses de la prostate, du colon et sur une lignée murine du myoblaste de souris.

Résultats & discussions

Chapitre I. Nanocristaux de cellulose à base de cyclodextrine

I.1. Stratégie de synthèse

La synthèse de la plateforme 1 portant le principe actif est faite en quatre étapes (voir Figure 40).

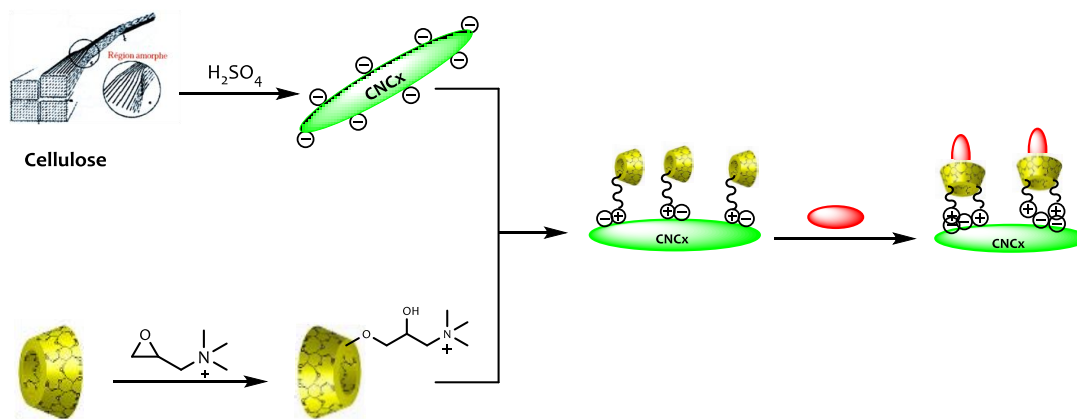


Figure 40 : Schéma général de la stratégie de synthèse 1.

Elle consiste à fixer les principes actifs sur les nanocristaux de cellulose par l'intermédiaire de la cyclodextrine.

I.2. Synthèse des nanocristaux de cellulose 1

Nous avons utilisé la méthode de synthèse déjà utilisée au laboratoire²¹³ pour préparer les CNCx (Figure 41).

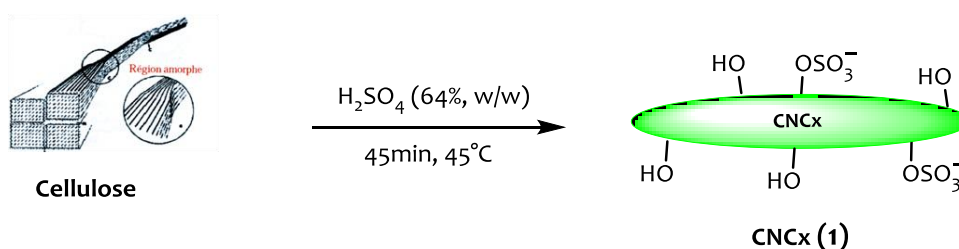


Figure 41 : Synthèse des nanocristaux de cellulose 1.

Les nanocristaux de cellulose (CNCx) sont obtenus par hydrolyse acide par l'acide sulfurique à 64% des zones amorphes du coton. Ils sont constitués de la partie cristalline des fibres cellulosiques. Ces nanoparticules sont recueillies sous la forme d'une suspension colloïdale stable dans l'eau avec un rendement massique de 60% après centrifugation et dialyse. En tenant compte du fait que

²¹³N. Drogat, R. Granet, C. Le Morvan, G Bégau-Grimaud, P. Krausz, V. Sol, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, **22**, 3648-3652.

la cristallinité de la source cellulosique utilisée est toujours inférieure ou égale à 73%, le rendement de la réaction obtenu est conforme à la littérature²¹⁴. La stabilité de la suspension résulte du mouvement brownien et est assurée par des répulsions électrostatiques entre groupements sulfate présents sur certaines unités anhydroglucose. Ces interactions répulsives empêchent les CNCx de s'agréger. Ces groupements sulfates sont obtenus lors de l'hydrolyse de la cellulose par réaction d'estérification entre les alcools primaires du polymère et l'acide sulfurique.

I.2.1. Caractérisations

Après purification, les nanocristaux ont été caractérisés par spectroscopie infrarouge (IR), par microscopie électronique à transmission (MET), DLS, potentiel zêta et par DRX.

I.2.1.1 Infra rouge (IR)

L'analyse du spectre IR (Figure 42) met en évidence les fonctions caractéristiques de la cellulose à 3340 cm^{-1} (νOH), 2896 cm^{-1} (νCH); 1282 cm^{-1} (δCH); 1201 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}\text{C-O}$: cycle pyranose); 1158 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}\text{C-O-C}$: pont) et à 1032 cm^{-1} ($\gamma\text{C-O}$: C-6).

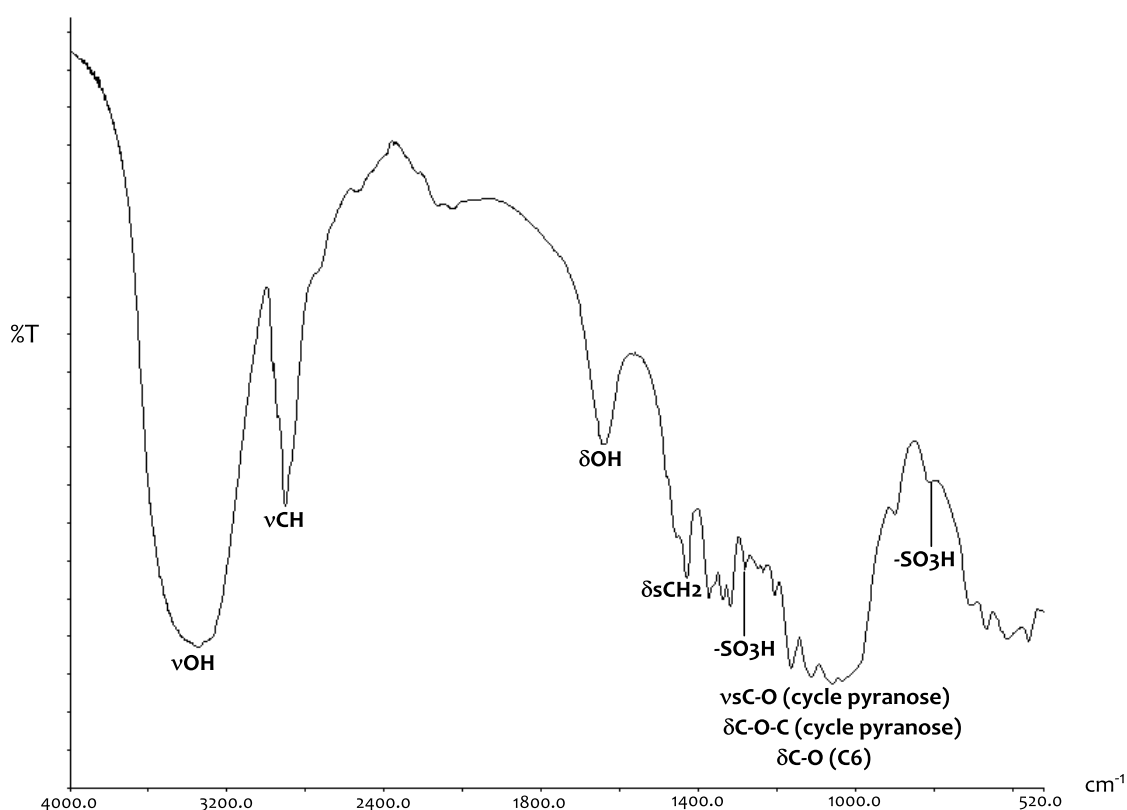


Figure 42 : Spectre IR des nanocristaux de cellulose 1.

²¹⁴ A. E. Zavadskij, Fibre Chemistry, 2004, 36, 425-430.

Ce spectre est semblable à celui de la cellulose microcristalline. Cependant, il apparaît deux nouveaux pics de faible intensité à 1280 et 825 cm^{-1} correspondant aux bandes d'élongation et de vibration des fonctions sulfates (SO_3H).

1.2.1.2 Potentiel zêta

Le potentiel zêta permet de déterminer la charge globale de surface d'une nanoparticule en suspension. Cet indicateur des interactions entre la particule et son milieu environnant permet de déduire la stabilité des colloïdes. La valeur moyenne du potentiel zêta des nanocristaux de cellulose est de l'ordre de -55 mV. Cette valeur négative caractérise la présence de charge sulfate en surface des nanocristaux résultant du traitement par l'acide sulfurique. Ce résultat vient conforter celui obtenu avec le spectre IR.

Pour déterminer la distribution en taille ainsi que la forme de ces nanostructures, une analyse par microscopie électronique à transmission et par diffusion dynamique de la lumière été réalisées.

1.2.1.3 Microscopie électronique à transmission

Les nanocristaux de cellulose sont constitués essentiellement d'atomes légers (carbone, hydrogène, oxygène). Ne pouvant pas directement être observés au microscope électronique à transmission car « translucide » aux électrons, des composés de forte masse atomique comme le tétr oxyde d'osmium ou l'acétate d'uranyle sont généralement utilisés pour améliorer le contraste de leur image. Ces derniers se fixent préférentiellement au bord des particules, ainsi l'échantillon apparaît blanc sur un fond sombre, on parle alors de coloration négative. Pour cette étude, nous avons eu recours à une solution d'acétate d'uranyle 2% (Figure 43).

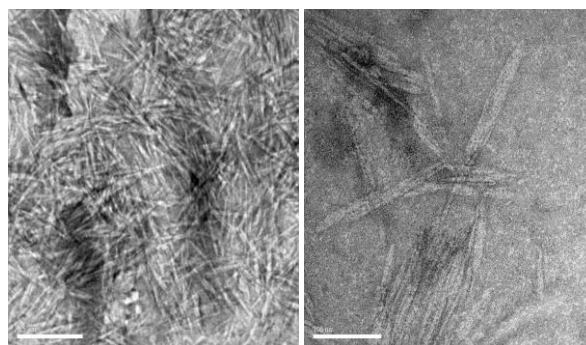


Figure 43: Photographies des nanocristaux de cellulose (1) obtenues par MET (la barre d'échelle représente à gauche 500 nm et à droite 100 nm).

Les photographies obtenues révèlent des CNCx en forme de bâtonnet ayant des longueurs comprises entre 100 et 150 nm et des largeurs compris entre 10 et 15 nm. Ces résultats sont

conformes à ceux décrits dans la littérature²¹⁵ et valident ainsi la méthode utilisée pour préparer les CNCx.

1.2.1.4 Diffusion de la lumière ou DLS (Dynamic light Scattering)

Le DLS est une technique d'analyse spectroscopique non destructive permettant de déterminer le rayon hydrodynamique ainsi que la distribution en taille de particules en suspension dans un solvant allant de 1 nm à plusieurs centaines de nanomètres de diamètre environ. L'indice de polydispersité (PDI) traduisant ainsi l'homogénéité ou l'hétérogénéité des nanoparticules est compris entre 0 et 1. Plus il tend vers zéro, plus l'échantillon sera homogène. Les mesures de DLS effectuées révèlent que la taille moyenne des CNCx est d'environ 141 nm. Le PDI (indice de polydispersité) est de 0,288, ce qui correspond à un échantillon relativement homogène. Ce résultat est similaire à celui obtenu avec le MET. Les nanocristaux de cellulose obtenus sont donc stables et de taille homogène de l'ordre de 150 nm.

1.2.1.5 Diffraction des rayons X (DRX)

La DRX est une technique d'analyse permettant de déterminer les propriétés cristallines d'une matière. Le spectre (Figure 44) ci-dessous nous a permis, grâce aux angles de diffractions 2θ obtenus, d'accéder à l'indice de cristallinité (Crl) ainsi qu'à l'épaisseur des cristallites.

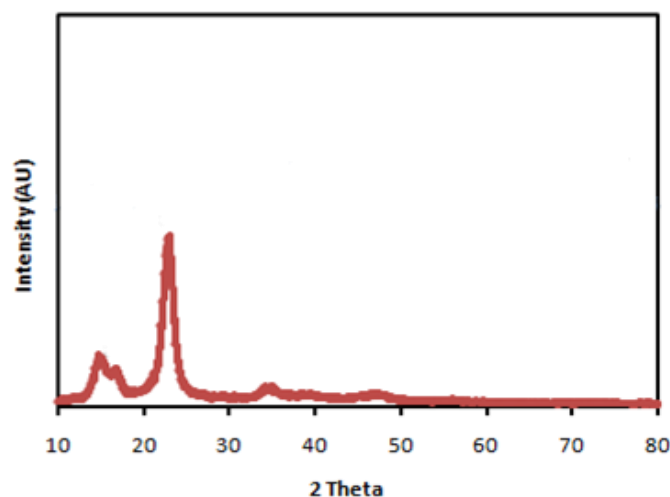


Figure 44 : Diagramme de DRX des nanocristaux de cellulose¹.

Cet indice de cristallinité est obtenu à partir de la relation empirique ci-dessous :

$$Crl = (I_{002} - I_{AM}) \cdot I_{002}.$$

²¹⁵Y. Habibi, I. Hoeger, S. Kelley, R. J. Orlando, *Langmuir*, 2010, **26**, 990-1001.

Où I_{002} et I_{AM} sont respectivement l'intensité maximale du pic de diffraction du plan (002) et l'intensité diffusée par la phase amorphe. Sur ce spectre, le pic du plan (002) est situé à un angle 2θ de $22,8^\circ$. Cependant, l'absence du pic I_{AM} à $18,0^\circ$, nous a permis de conclure d'un taux de cristallinité des CNCx de 100%. Ce qui signifie que les zones amorphes de la cellulose ont disparu et confirme la nature cristalline des nanocristaux obtenus.

Cette analyse nous a également permis d'évaluer l'épaisseur (L) des cristallites, à partir de la largeur (H) à mi-hauteur du pic (002) avec la formule de Scherrer ci-dessous :

$$L = 0,9\lambda/H\cos\theta$$

Où λ est la longueur d'onde du rayon diffractant (raie $K\alpha_1$) et θ l'angle de diffraction du pic (002). Les valeurs numériques de $\theta = 0,3979$ rad et $\lambda = 1,54060$ Å. Après calculs, la DRX indique une épaisseur des cristallites de l'ordre de 6 nm.

Les nanocristaux de cellulose présentent l'avantage d'être d'origine naturelle, faciles d'obtention et présentent une persistance dans l'organisme supérieure par rapport aux nanoparticules artificielles grâce aux fonctions hydroxyles de surface (on parle de caractère furtif)²¹⁶. Cela permettrait également d'augmenter la biocompatibilité, de diminuer les effets cytotoxiques, et conjointement d'accroître les temps de rétention dans la circulation sanguine, ce qui augmenterait les chances de cibler la tumeur. Comme cela a été évoqué précédemment, ils pourraient dans le cas du traitement des cancers servir de vecteur de molécules thérapeutiques comme les curcumines. Ces CNCx seront par la suite fonctionnalisés par les cyclodextrines préalablement cationisées.

1.3. Synthèse de la β -cyclodextrine cationique 3

La β -cyclodextrine (β -CD) est un oligosaccharide très utilisé en chimie en raison de son faible coût et qui permet d'encapsuler une large gamme de molécules hydrophobes. Cependant, la β -CD a une faible solubilité (18 g/L) dans l'eau par rapport aux α -cyclodextrines (172,5 g/L) et γ -CD (232 g/L). L'introduction des charges positives nous permettra d'augmenter le caractère hydrophile de la molécule puis de la fixer sur les nanocristaux de cellulose (chargé négativement) grâce à un couplage électrostatique. En utilisant la méthode décrite par C. D. Chisholm et coll.²¹⁷, nous avons fixé par un couplage covalent un ammonium quaternaire, le chlorure de 2,3-

²¹⁶ H.H. Weetall, *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, **212**, 1-7.

²¹⁷ C. D. Chisholm and T. J. Wenzel, *Tetrahedron Asymmetry*, 2011, **22**, 62-68.

époxypropyl trimethyl ammonium (ou glycidyltrimethylammonium chloride, GTAC) sur la β -CD afin d'introduire une charge positive (Figure 45).

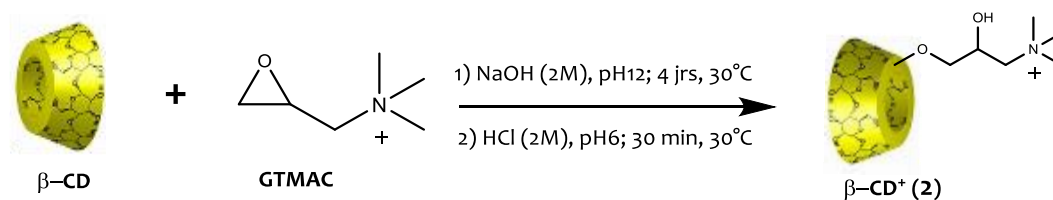


Figure 45 : Synthèse de la β -cyclodextrine cationique **2**.

La réaction a lieu en milieu basique afin de déprotonation les hydroxyles de la β -cyclodextrine. Ensuite, par une réaction de substitution nucléophile, les alcoolates résultant vont engendrer l'ouverture du cycle époxyde du GTAC et conduire ainsi à la formation d'une cyclodextrine chargée positivement après une purification par dialyse. Le produit cationique **2** est obtenu avec un rendement de 55% et a été caractérisé par spectroscopie infrarouge, par spectrométrie RMN ^1H et par analyse élémentaire.

I.3.1. Caractérisations

I.3.1.1 Infra-rouge

Les spectres IR représentés ci-dessous (Figure 46), nous ont tout d'abord permis de mettre en évidence les bandes caractéristiques de la cyclodextrine native à 3406 cm^{-1} correspondant aux vibrations de valence νOH et à 1634 cm^{-1} correspondant aux vibrations de déformation δOH .

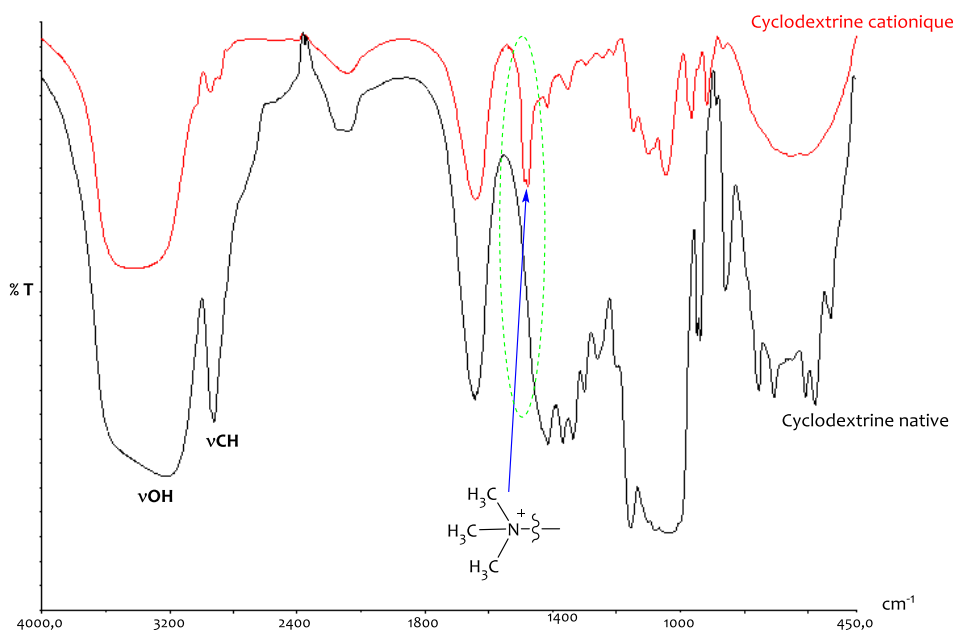


Figure 46 : Spectres IR des cyclodextrines cationiques (**2**) et natives.

L'apparition d'un nouveau pic à 1478 cm^{-1} est caractéristique des vibrations d'élongation des ammoniums quaternaires. Ce résultat confirme la présence des groupes $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$ sur la cyclodextrine et est conforme à la littérature²¹⁸.

1.3.1.2 RMN ^1H

Le spectre RMN du proton de la β -cyclodextrine cationique **2** a été réalisé dans le D_2O (Figure 47). Le spectre RMN ^1H de la β -cyclodextrines native a également été réalisé dans les mêmes conditions afin d'établir des comparaisons.

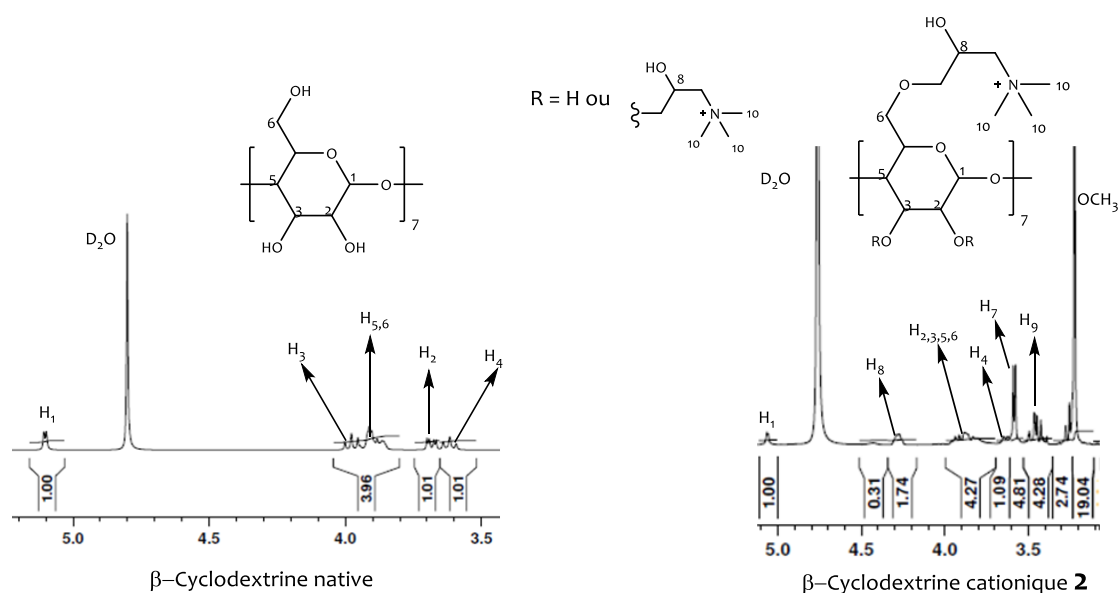


Figure 47 : Spectre RMN ^1H des cyclodextrine native et cationique **2** dans le D_2O .

Quel que soit le spectre considéré, il apparaît un pic très déblindé à 5,06 ppm sous forme de doublet (1H, d, $J = 4\text{Hz}$), caractéristique du proton anomérique (H_1). En comparaison avec la CD native, il apparaît trois nouveaux signaux sur le spectre du produit **2** :

- À 4,28 ppm : un pic qui intègre pour 1,7 protons sous forme de double doublet (dd, $J = 5,64$ et $5,96$ Hz) correspondant au proton H_8 .
- À 3,59 ppm : un pic intégrant pour quatre protons sous forme de doublet, correspondant au proton H_7 (4H, d, $J = 5,36$ Hz).
- À 3,45 ppm : un multiplet intégrant pour quatre protons et correspondant au proton H_9 (4H, m).

Les résultats obtenus par RMN ^1H confirment la structure du composé **2** obtenu et nous ont permis aussi de déterminer le degré de substitution (DS) par unité anhydroglucose en effectuant

²¹⁸Y. Qin, C. Zou, X. Yan, L. Zhou, P. Luo, *Chem. Eng. Res. Design*, 2015, **94**, 301-306.

le rapport de l'intégration du proton H₈ caractéristique du groupe ammonium sur le proton anomérique H₁. Après calcul, le spectre de RMN ¹H indique un DS de 1,7. Pour confirmer ce résultat, une analyse centésimale du composé **2** a été réalisée.

1.3.1.3 Analyse élémentaire

L'analyse a été réalisée suivant la méthode CHNS avec un standard de type BBOT par le Pr. Nicolas Joly et le Dr Vincent Lequart. L'analyse nous permet de déterminer la composition centésimale et ainsi le degré de substitution (DS) en ammonium quaternaire par unité anhydroglucose (UAG). Ce DS s'obtient par la relation suivante :

$$DS = \frac{162 \%N}{(14 - 151,5 \%N)}$$

Où %N représente le pourcentage massique en azote. Alors que 14, 162 et 151,5 correspondent respectivement aux masses molaires de l'azote, de l'unité anhydroglucose et du GTAC. Les pourcentages obtenus avec notre échantillon sont : N(5,5%), H(8%), C(46%) et O+Cl (40,5). Après calculs, l'analyse élémentaire indique un DS de 1,6.

Ce résultat nous permet d'avoir une bonne corrélation avec la valeur obtenue en RMN du proton (DS = 1,7). Ce type de cyclodextrines modifiées présente une meilleure efficacité d'encapsulation lorsque le DS des groupes ammonium par unité anhydroglucose est comprise entre 1,5 et 2. Au-delà de cette valeur, ces groupes ammonium auront plutôt un effet d'encombrement stérique empêchant les molécules invitées d'être incorporées dans la cavité hydrophobe de la cyclodextrine²¹³. La cyclodextrine cationique obtenue sera par la suite fixée sur les CNCx.

1.4. Synthèse des composés cyclodextrine/nanocristaux de cellulose (3)

Par un coulage ionique, nous avons fixé la cyclodextrine cationique **2** sur les nanocristaux de cellulose¹ (Figure 48).

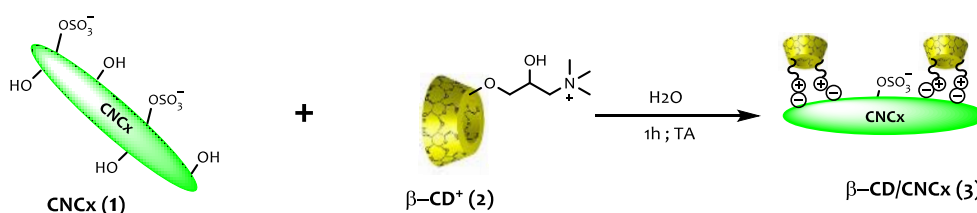


Figure 48 : Synthèse du composé CD/CNCx (3).

Le produit de réaction obtenu après purification par centrifugation (8000 rpm, 10 mn) a été caractérisé par son potentiel zêta ($\zeta = -41$ mV). Cette valeur augmente par rapport à celle des nanocristaux de cellulose de départ ($-55,5$ mV) et confirme la modification des CNCx (1).

Après avoir synthétisé la plateforme¹ qui servira à fixer les principes actifs sur les CNCx (1) par l'intermédiaire des CDs, nous avons procédé à l'encapsulation de ces derniers. Mais avant d'effectuer l'inclusion des molécules actives, nous avons réalisé en parallèle l'extraction des curcumines, la synthèse des dérivés de protoporphyrines IX et enfin la synthèse des cations triphénylphosphonium.

Chapitre II. Synthèse - Extraction et fonctionnalisation des principes actifs

II.1. Extraction des curcumines I, II et III

Le *Curcuma longa* est traditionnellement utilisé pour traiter les troubles du système digestif, soulager et réduire les ulcères de l'estomac. Les curcuminoïdes issues du rhizome de cette plante de l'Asie du Sud-est absorbent fortement en UV-Visible autour de 420 nm. La curcumine, constituant majoritaire présente de potentielles propriétés anticancéreuses car elle inhibe entre autre le facteur Nf-kB et la thioredoxine réductase connue pour réduire la concentration en espèces réactives de l'oxygène. Ceci fait d'elle une intéressante candidate pour notre projet.

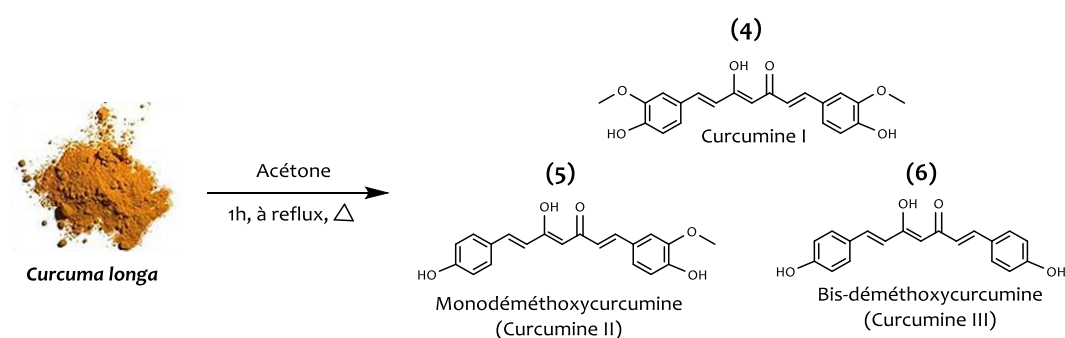


Figure 49 : Schéma de l'extraction des curcumines I, II et III.

La poudre commerciale de *Curcuma longa* est extraite trois fois par l'acétone à chaud. L'extrait brut obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice ce qui permet d'obtenir le mélange des trois curcumines purs (Figure 49). Ce mélange est ensuite séparé sur plaque préparative afin d'obtenir les trois composés dans les proportions suivantes : 200 mg (4 %), 70 mg (1,4 %) et 40 mg (0,8 %) respectivement pour les curcumines I, II et III. Les composés sont caractérisés, par RMN ^1H , par Infrarouge, par UV-visible et par spectrométrie de masse MSMS en mode négatif.

II.1.1. Caractérisations

II.1.1.1 UV-visible

Les curcumines absorbent fortement entre 400 à 450 nm. Dans notre cas, les curcumines I, II, III en solution dans le chloroforme présentent respectivement des absorptions intenses à 422, 419 et 414 nm (Figure 50).

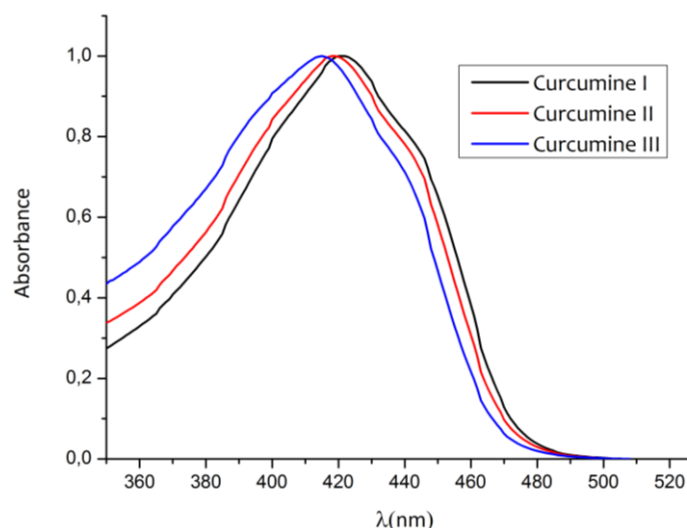


Figure 50 : Spectre UV-Visible des curcumines I, II et III dans le CHCl_3 .

Ces absorptions sont conformes à ce qui est décrit au paragraphe **IV.1.2.3**. À partir des spectres UV-Visible, nous avons pu déterminer le coefficient d'extinction molaire ϵ (exprimé en $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) de chaque curcumine (Tableau 6). Les variations de λ_{max} et ϵ sont dues à l'aptitude de la curcumine à former des liaisons hydrogène inter- ou intra-moléculaires, en fonction du solvant.

II.1.1.2 Spectrométrie de masse (SM)

La caractérisation MSMS en mode négatif nous a permis d'obtenir des ions moléculaires (m/z) de 367,2 ; 337,2 et 307,2 Da respectivement pour les curcumines I, II et III. Les résultats sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Résultats des analyses en UV-Visible et en spectrométrie de masse (MSMS) des curcumines.

Composés	UV-Visible		Spectrométrie de masse	
	λ (nm)	$\epsilon \times 10^{-4} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	Ion monoisotopique calculée ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$)	Trouvée (m/z)
Curcumine I	422	2,9	368,12	367,2
Curcumine II	419	1,7	338,11	337,2
Curcumine III	414	2,2	308,10	307,2

II.1.1.3 RMN ^1H

L'analyse RMN ^1H des trois curcumines a été réalisée dans le chloroforme deutéré et présente des signaux caractéristiques permettant de distinguer nettement les trois composés. Nous détaillerons plus particulièrement l'attribution des signaux de la curcumine I (Figure 51).

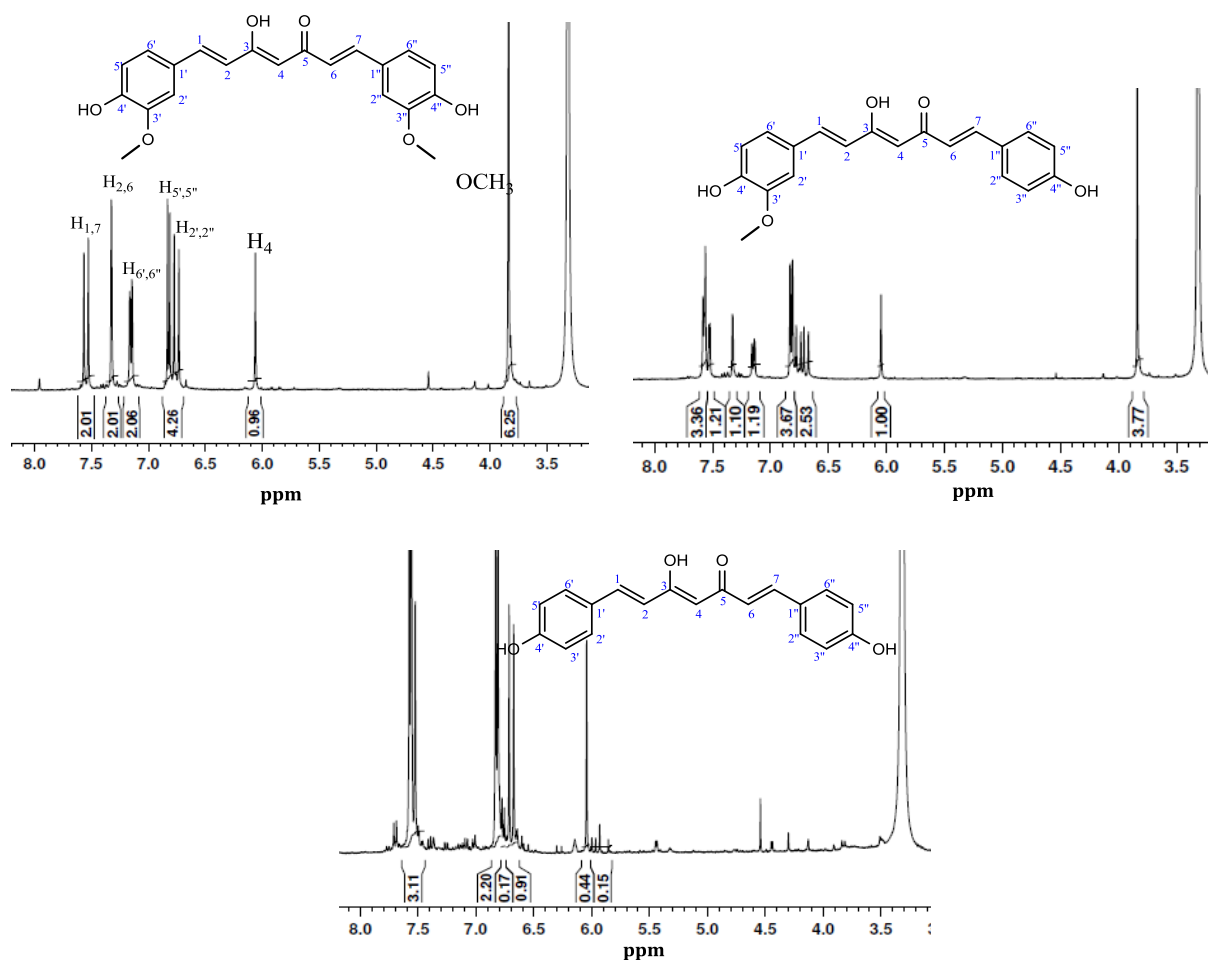


Figure 51 : Spectre RMN ^1H des curcumines I, II et III dans le CDCl_3 .

Les protons des groupes méthoxy présents sur les curcumines I–II résonnent autour 3 à 4 ppm sous forme de singulet. Ce singulet intègre pour six protons (correspondant à la présence des deux groupes méthoxy) dans le cas de la curcumine I. Alors que celui de la curcumine II intègre pour trois protons. On n’observe pas résonance de OCH_3 dans le cas de la curcumine III car il n’y a pas de groupe méthoxy sur la curcumine III. Nous observons l’apparition des pics autour de 6,50 – 7,30 ppm correspondant aux protons du cycle benzénique. Il apparaît également un singulet autour de 6,05 ppm, ce pic est caractéristique du proton H_4 de la chaîne carbonée et ce proton est très acide. Il est le siège de plusieurs réactions.

II.2. Protoporphyrine IX et dérivés

En tenant compte du savoir-faire du LCSN sur la synthèse et ou la modification chimique de photosensibilisateurs pour une application en photothérapie dynamique des cancers (PDT), nous avons choisi comme molécule de départ une porphyrine d’origine naturelle et facilement accessible, la protoporphyrine IX (PpIX). De plus, la chimie de ce photosensibilisateur a largement

été étudiée et sa capacité à avoir un rendement quantique en oxygène singlet, indispensable pour une application en photothérapie, est bien connue. Le macrocyclique protoporphyrinique a été tout d'abord modifié chimiquement avant de le fixer aux nanocristaux de cellulose. Nous avons ainsi développé trois photosensibilisateurs potentiels à partir de la PpIX :

- La PpIX métallée au zinc (ZnPpIX)
- La ZnPpIX estérifiée par un motif adamantane (**9Zn**)
- La ZnPpIX estérifiée par deux motifs d'adamantane (**10Zn**)

Nous avons choisi de fixer l'adamantane sur la PpIX au travers d'une liaison ester car l'adamantane a une très forte affinité pour la β -cyclodextrine et la liaison ester peut être facilement clivée en milieu acide ou en présence d'estérase, en milieu biologique.

La stratégie de fonctionnalisation du photosensibilisateur est représentée par le schéma retro-synthétique de la Figure 52.

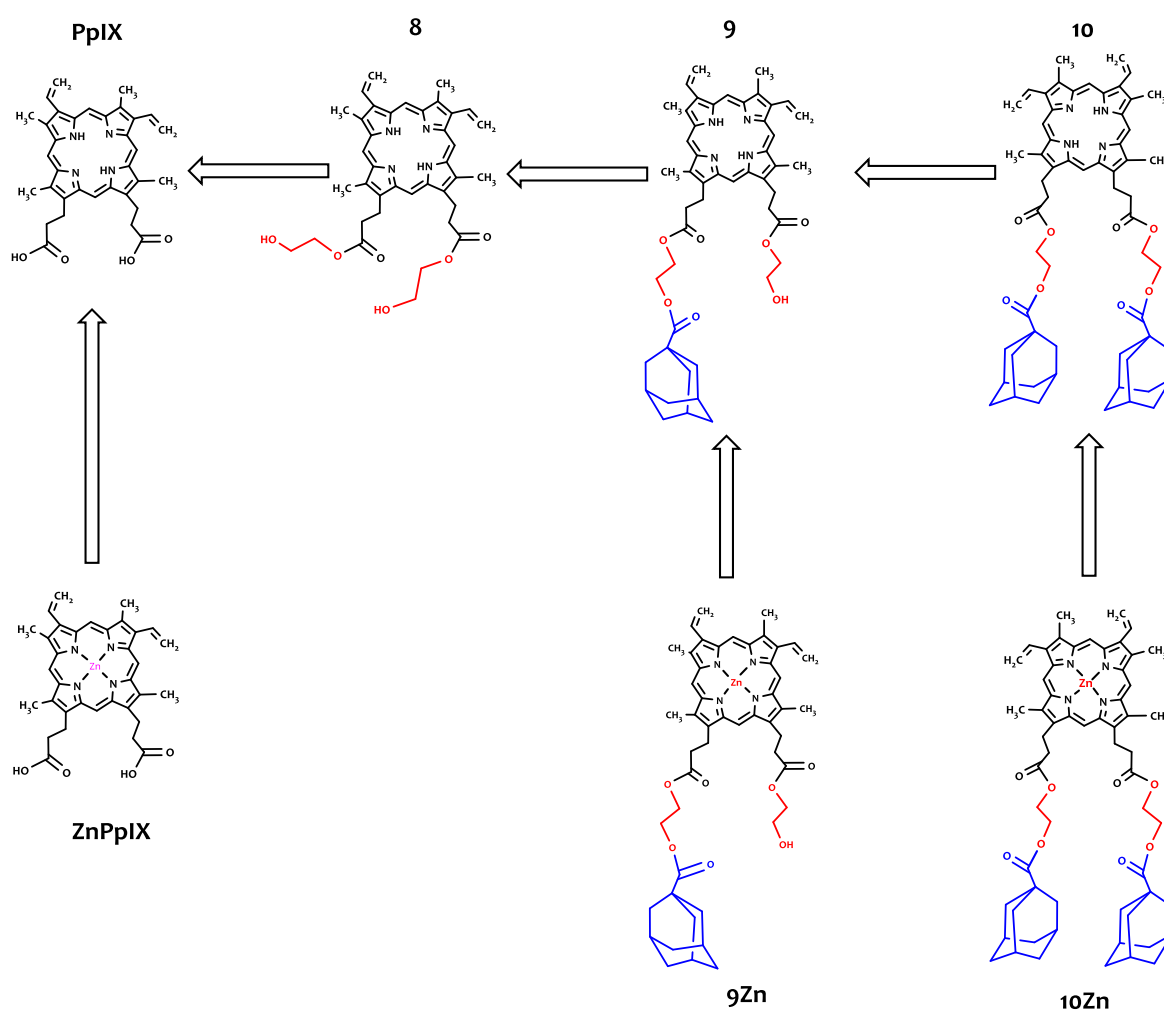


Figure 52 : Schéma retro-synthétique des modifications effectuées sur la PpIX.

II.2.1. Métallation de la protoporphyrine IX

La métallation de la protoporphyrine IX a été réalisée suivant la méthode décrite par A. K. Iyer et coll.²¹⁹ (Figure 53).

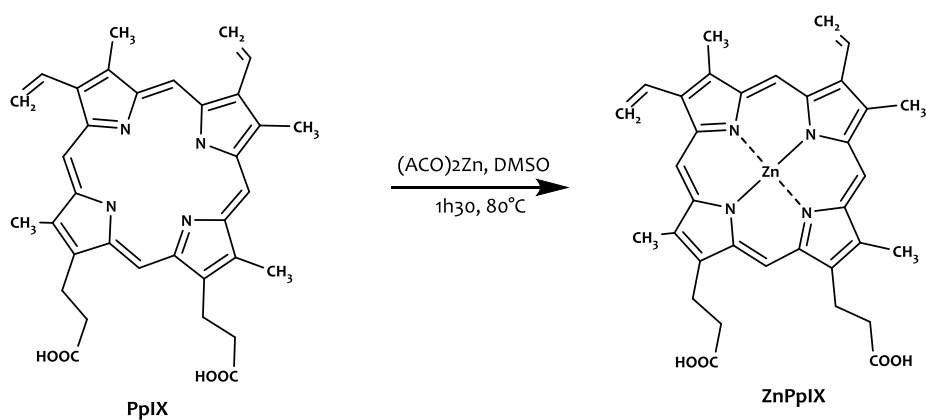


Figure 53 : Synthèse de la protoporphyrine de zinc.

La PpIX est dissoute dans le DMSO puis métallée par ajout de l'acétate de zinc préalablement dissous dans un minimum de DMSO. Le produit métallé **ZnPpIX** est purifié par précipitation après addition d'eau suivie d'une centrifugation. Le rendement de la réaction est quasi quantitatif. Le spectre UV-Visible des produits métallés et non métallés ont été réalisés dans le DMSO (voir Figure 54).

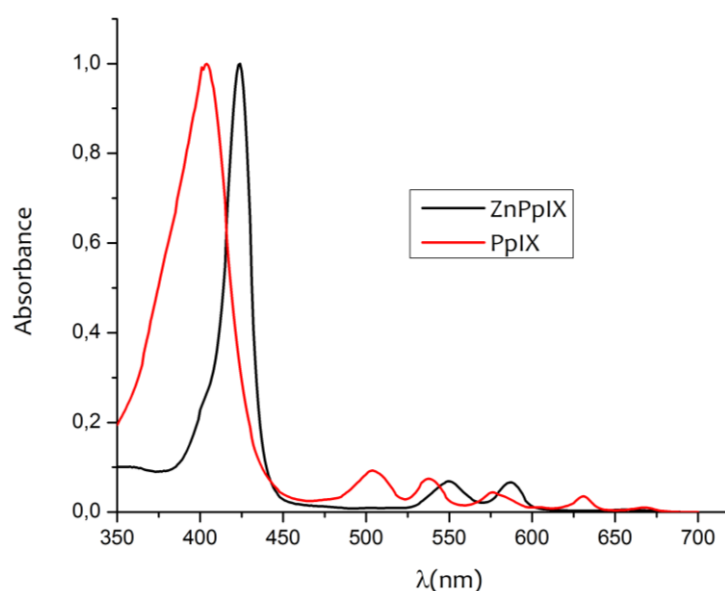


Figure 54 : Spectres UV-Visible de PpIX et ZnPpIX dans le DMSO.

Le spectre UV-Visible de la ZnPpIX montre la disparition des bandes Q1 (630 nm) et Q2 (506 nm). Cette modification du spectre est caractéristique des porphyrines métallées. On observe

²¹⁹ A. K. Iyer, K. Greish, J. Fang, R. Murakami, H. Maeda, *Biomaterials*, 2007, 28, 1871-1881.

également un léger effet bathochrome. Cependant, les essais préliminaires de complexation de la protoporphyrine IX avec la cyclodextrine ont conduit à des complexes « host-guest » instables ayant de trop faibles concentrations en PpIX ou en ZnPpIX. Cet échec nous a amené à greffer sur la PpIX une molécule (adamantane) capable de renforcer cette complexation avec la β -cyclodextrine²²⁰.

II.2.2. Synthèse de la protoporphyrine IX bis (hydroxyl éthyl ester)

Afin d'élaborer des complexes host-guest stables entre la cyclodextrine et la ZnPpIX, nous avons fixé une molécule d'adamantane sur la PpIX. Au cours d'une première approche, nous avons réalisé une réaction d'estérification entre l'adamantanol et la PpIX en présence d'agent de couplage « DCC/DMAP » (Figure 55).

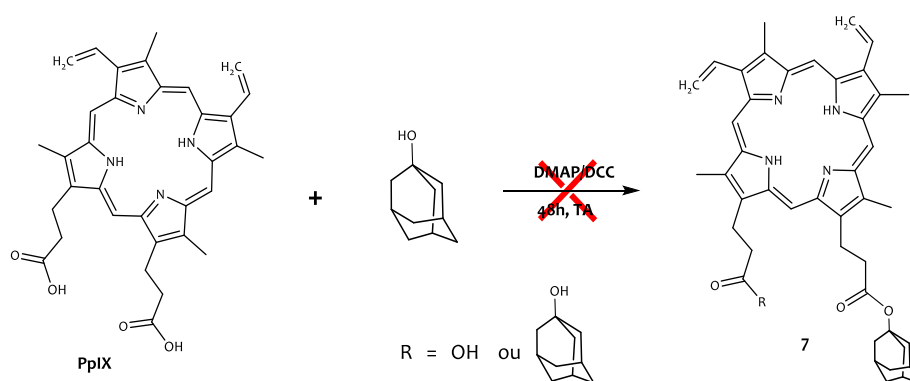


Figure 55 : Synthèse du composé 7.

Après 48h de réaction dans le DMSO et/ou dans le DMF, la réaction n'a pas conduit au produit 7 attendu. La nature de l'alcool (alcool tertiaire) peut expliquer l'échec de la réaction. Suite à cet échec, nous avons décidé de changer à la fois la nature de l'adamantane et surtout de fixer un bras espaceur (éthylène glycol) afin de favoriser le couplage entre l'adamantane et la PpIX (voir Figure 56).

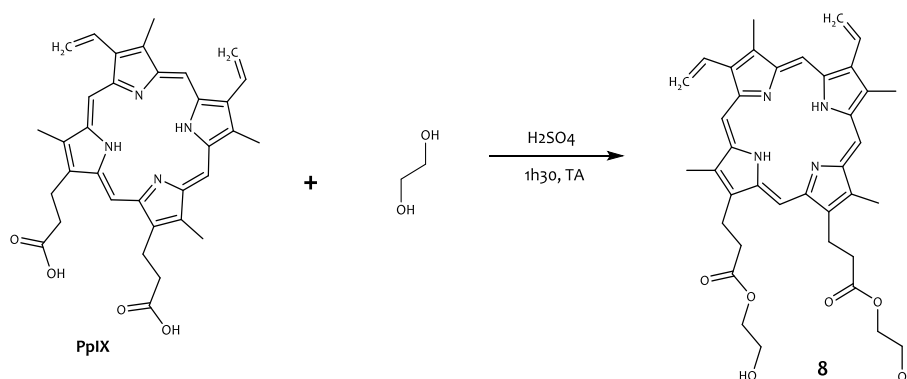


Figure 56 : Synthèse du composé 8.

²²⁰ B. Zhang, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 9353-9354.

La réaction est une solvolysse dans de l'éthylène glycol en présence d'acide sulfurique qui joue le rôle de catalyseur. Après 1h30 de réaction à température ambiante, le milieu réactionnel est repris dans du chloroforme. La phase organique est lavée à l'eau puis séchée puis le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur plaques préparatives de silice. Le produit **8** est obtenu avec un rendement de 90%.

Afin de confirmer la structure du composé attendu, le spectre RMN ^1H du produit **8** a été réalisé dans le CDCl_3 (Figure 57). Il montre la présence des signaux attendus (Tableau 7). On observe également la présence de l'ion M^+ après analyse par spectrométrie de masse Maldi TOF (Tableau 8) et le spectre UV-Visible réalisé dans le chloroforme montre la présence des bandes d'absorption d'une porphyrine base libre (Tableau 9).

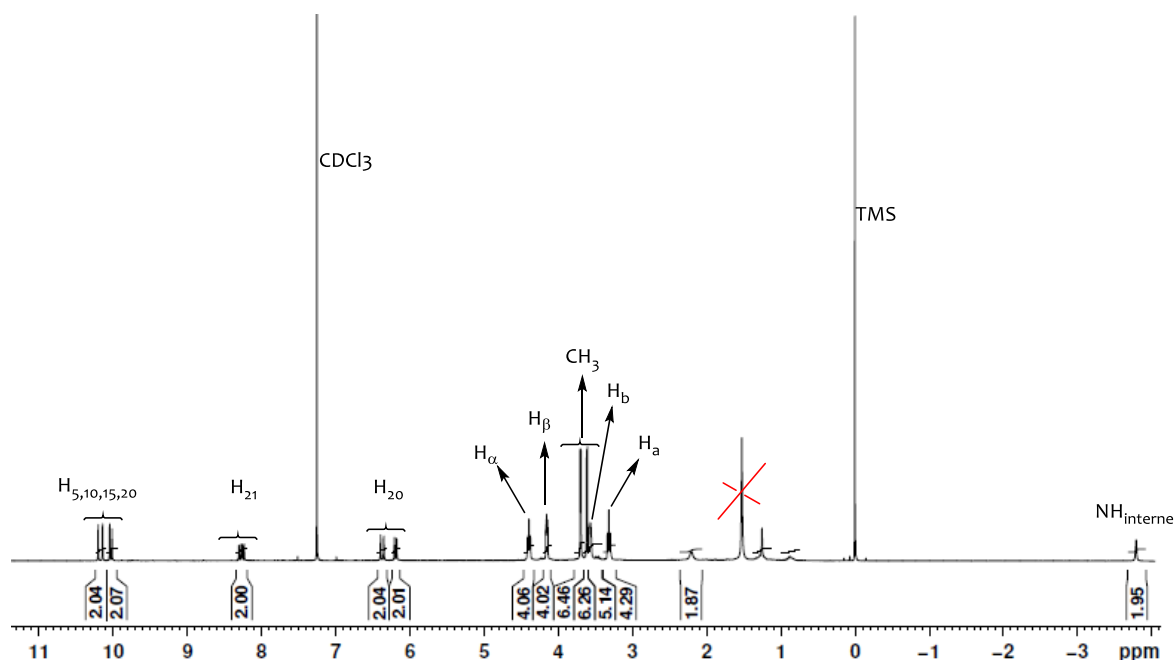


Figure 57 : Spectre RMN ^1H du composé **8** dans le CDCl_3 .

En effet, l'une des caractéristiques principales de la protoporphyrine IX et de ses analogues est que ces composés ne possèdent aucun élément de symétrie. Ce qui fait que l'attribution précise des protons à l'intérieur de chaque groupe de substituant s'avère difficile. De manière générale, les spectres RMN du proton de ces porphyrines se composent des groupes de signaux suivants (Figure 58) :

- les protons *méso* entre 10,02 et 10,19 ppm,
- les protons vinyliques entre 6,0 et 8,5 ppm,
- les protons du bras espaceur et du bras éthylène glycol entre 1,2 et 3,4 ppm,
- les protons méthyles vers 3,5 ppm,

- les protons de l'adamantane vers 1,0 et 1,5 ppm (excepté le composé 8),
- les protons NH pyrroliques internes entre -3,4 et -4,1 ppm.

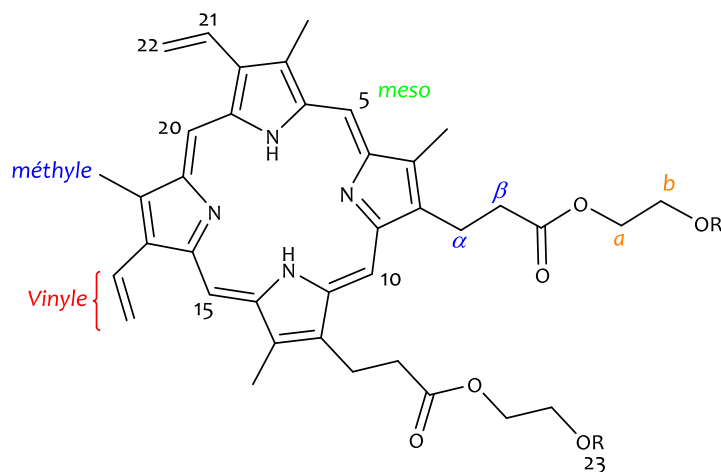


Figure 58 : Numérotation adoptée pour la description des spectres RMN des dérivés protoporphyriniques.

Les déplacements chimiques observés en RMN ^1H sont présentés au Tableau 7. La protoporphyrine IX modifiée (**8**) montre quatre protons H *méso* résonnant entre 10,02 et 10,19 ppm sous la forme de quatre singulets. Les protons CH vinyliques résonnent à 8,28 et à 8,26 ppm sous la forme de double doublets ($J_3 = 17,8$ et $11,5$ Hz). Les protons CH_2 vinyliques, quant à eux, apparaissent sous la forme de double doublets ($J_3 = 17,5$ et $11,5$ Hz) à 6,37 ppm et à 6,18 ppm. Les protons méthyles apparaissent sous la forme de deux singulets à 3,61 ppm (intégrant pour 6H) et à 3,69 ppm (intégrant pour 6H). Les protons H_α et H_β apparaissent respectivement sous forme de triplet à 4,39 ppm ($J = 7,7$ Hz) et sous forme de multiplet à 4,16 ppm. Concernant les protons du bras éthylène glycol, il apparaît à 3,57 ppm un pic sous forme d'un multiplet correspondant aux protons H_b . Par contre les protons H_a résonnent à 3,32 ppm sous forme de triplet ($J = 7,7$ Hz ; 4H). Enfin, les protons internes (NH_{int}), se retrouvant dans le cône d'anisotropie du macrocycle, sont très blindés à -3,79 ppm et apparaissent sous la forme d'un singulet.

Ainsi, la solvolysé a donc conduit à la fixation de deux unités d'éthylène glycol sur la PpIX pour former le composé **8** qui possède deux fonctions alcool primaire disponibles afin de fixer l'adamantane par une liaison ester.

II.2.3. Synthèse de la protoporphyrine IX mono (**8**)- et di- adamantane (**9**)

La fixation d'une ou de deux unités d'adamantane sur le composé **8** a lieu au travers d'une liaison d'estérification en utilisant le chlorure d'adamantane carboxyle (Figure 59).

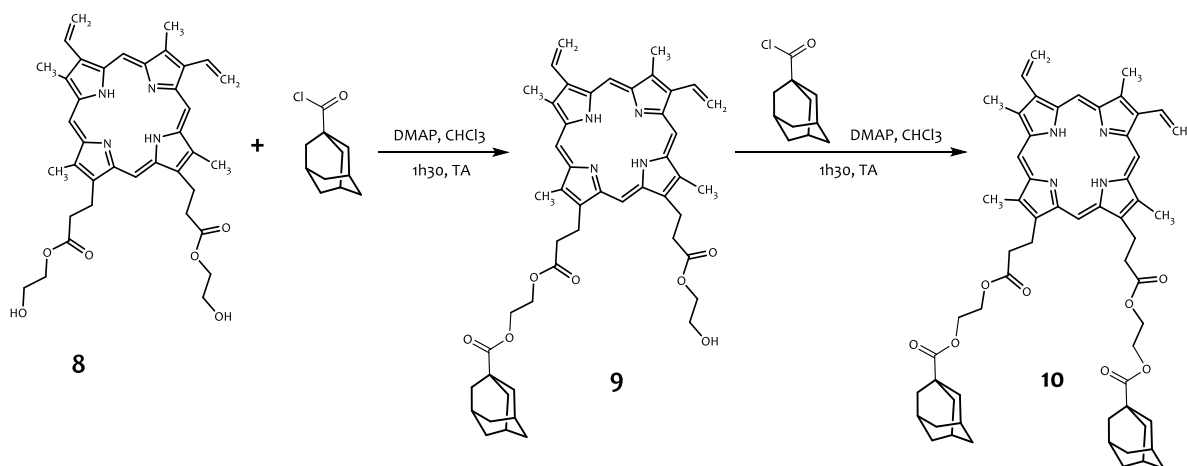


Figure 59 : Synthèse des composés **9** et **10**.

La réaction d'estérification entre la fonction alcool primaire du composé **8** et le chlorure d'adamantane carboxyle a lieu dans le chloroforme en présence de 4-diméthylaminopyridine (ou DMAP) qui joue le rôle de catalyseur. Ce type de réaction est classique de l'activation par le DMAP des fonctions comme l'anhydride ou le chlorure d'acyle de façon à obtenir un ester avec d'excellent rendement. Le mécanisme réactionnel dans ces conditions débute avec l'activation du chlorure d'acyle par la DMAP pour former l'ion acétylpyridinium (cas d'anhydride acétique ou d'éthanoyle). La liaison de l'acétyle avec la DMAP est coupée pour régénérer le catalyseur et former l'ester. La formation de la liaison ester et la coupure de celle de la DMAP avec l'acétyle sont synchrones et concertées (Figure 60).

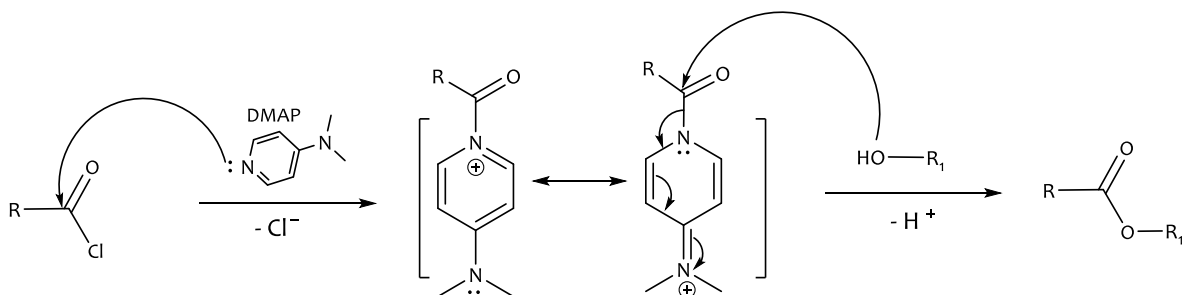


Figure 60: Mécanisme d'estérification catalysée par la DMAP.

Un suivi CCM de la réaction montre que l'utilisation d'un équivalent de chlorure d'acide conduit après 1h30 de réaction à la formation d'une dérivé de PpIX portant un seul adamantane (**9**). Le produit est isolé avec un rendement de 95% puis caractérisé par UV-Visible (voir Figure 62 et Tableau 7), Spectrométrie de masse (Tableau 8) et RMN ¹H (Tableau 7, 8 et 9) confirmant ainsi la fixation d'une seule unité d'adamantane. Le produit **9** isolé et caractérisé est mise à réagir dans les mêmes conditions expérimentales afin d'obtenir le dérivé PpIX portant deux unités adamantane (**10**). Après purification sur plaques préparatives de silice, le composé **10** est obtenu

avec un rendement de 98%. Afin de confirmer la structure, le spectre UV-Visible (Figure 62) montre l'allure caractéristique des porphyrines base libre de type étio avec une bande de Soret à 408 nm et quatre bandes Q d'intensité décroissante en allant vers les plus grandes longueurs d'onde (Tableau 9). L'analyse par MALDI-Tof montre la présence de l'ion moléculaire (Tableau 8) et l'étude du spectre RMN ¹H réalisée dans le CDCl₃ confirme la fixation de la deuxième molécule d'adamantane (Figure 59 et Tableau 7).

Les spectres des dérivés protoporphyriniques synthétisés (**8**, **9** et **10**) sont de type « étio » et sont caractéristiques des porphyrines substituées sur les positions β-pyrroliques. En effet, la bande de Soret est observée à 408 nm et les bandes Q vers 506, 542, 578 et 631 nm (Tableau 9). Ces composés ont été par ailleurs caractérisés par RMN ¹H. Les résultats sont présentés sur le Tableau 7.

Tableau 7 : RMN ¹H des composés **8**, **9** et **10** dans le CDCl₃.

H	8	9	10
<u>Pyrrole</u>			
H méso	10,19 s ; 10,14 s	10,25 s ; 10,19 s	10,18 s ; 10,14 s
	10,05 s ; 10,02 s	10,11 s ; 10,08 s	10,05 s ; 10,03 s
H _{int}	-3,79 s	-3,66 s	-3,79 s
<u>Vinyle</u>			
H ₂₁	8,26-8,28 dd (17,8 -11,5)	8,27-8,34 dd (17,8 -11,5)	8,31-8,24 dd (17,8 -11,5)
H ₂₂	6,37 d (17,8)	6,41 d (17,8)	6,38 d (17,8)
	6,19 d (11,5)	6,22 d (11,5)	6,19 d (11,5)
<u>Méthyle</u>			
CH ₃	3,71 s ; 3,69 s	3,75 s ; 3,73 s	3,71 s ; 3,69 s
	3,62 s ; 3,61 s	3,66 s ; 3,65 s	3,64 s ; 3,62 s
<u>Bras espaceur</u>			
H _α	4,39 t (7,7)	4,44 m	4,41 t (7,5)
H _β	4,16 m	4,13 m	4,29 m
<u>Bras éthylène glycol</u>			
H _a	3,32 t (7,7)	3,27 - 3,37 m	4,32 t (7,6)
H _b	3,57 m	3,45 - 3,35 m	3,61 m
<u>Adamantane</u>			
H ₂₃	-	1,27 - 1,35 m	1,50 m

II.2.4. Métallation des dérivés de PpIX 9 et 10

La métallation des composés **9** et **10** a été réalisée suivant la méthode utilisée au sein du laboratoire afin d'obtenir les composés métallés au zinc (Figure 61).

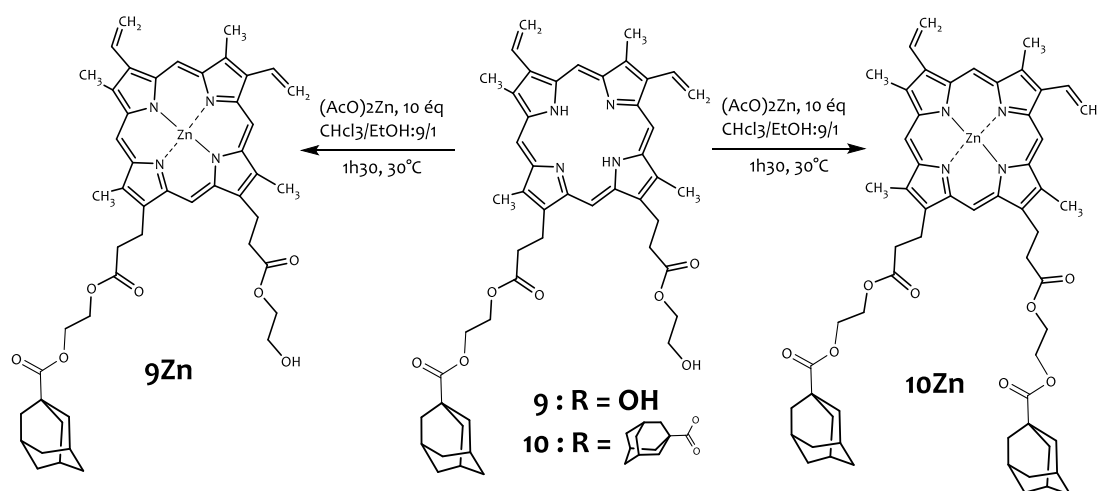


Figure 61 : Synthèse des composés **9Zn** et **10Zn**.

La réaction a lieu dans un mélange « $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (8/2) v/v » en présence d'un excès d'acétate de zinc (10 éq). La réaction est suivie par CCM et après 1h30 de métallation, le solvant est évaporé et le brut réactionnel est purifié par préparative de silice (éluant, $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$: 95/5). Les composés métallés **9Zn** et **10Zn** sont obtenus d'excellent rendement respectivement de 96% et 94%. Les deux molécules ont été caractérisées par spectroscopie UV-Visible et par RMN ^1H . L'analyse des spectres UV-Visible réalisé dans du CHCl_3 (Figure 62 et Tableau 9) montre clairement la modification du spectre d'absorption avec un léger déplacement de la bande de Soret vers des plus fortes longueurs d'onde (408 nm à 415 – 417 nm) et la diminution du nombre de bande Q.

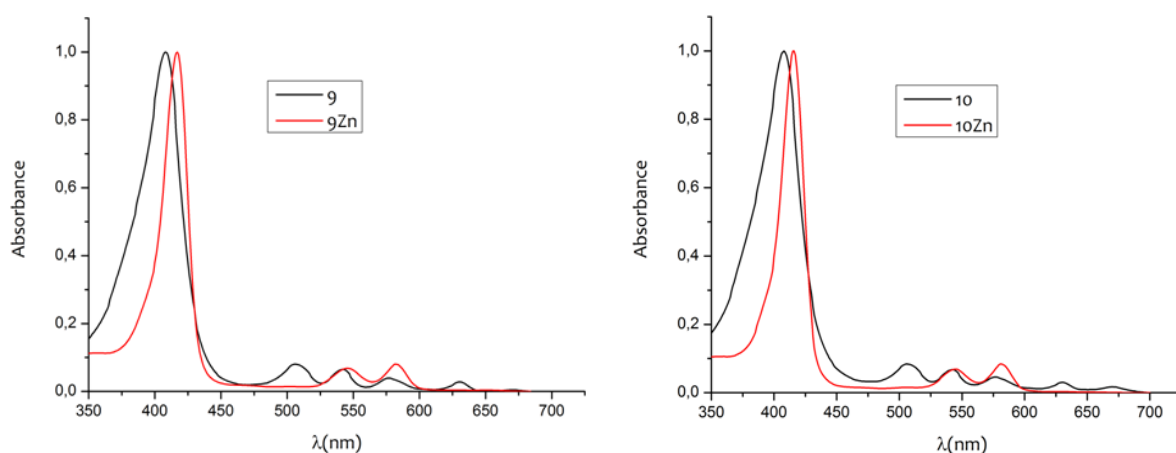


Figure 62 : Spectre UV-Visible des composés **9**, **10**, **9Zn** et **10Zn** dans le CHCl_3 .

L'ensemble de ces modifications est caractéristique de la métallation des photosensibilisateurs.

La spectrométrie de masse par MALDI-Tof montre la présence du pic de l'ion moléculaire (voir Tableau 8) et l'étude des spectres de RMN ¹H montre clairement la disparition des protons NH internes (

Tableau 10).

II.2.4.1 Spectroscopie de masse

Les masses théoriques et expérimentales des produits protoporphyriniques sont représentées sur le Tableau 8 ci-dessous :

Tableau 8 : Les masses théoriques et trouvées par spectrométrie de masse par MALDI-Tof.

composés	Masse mono isotopique (Da)	Masse trouvée (u.a) ion moléculaire
8	650,31	650,32
9	812,41	812,42
10	975,52	975,72
ZnPpIX	624,17	-
9Zn	874,32	874,17
10Zn	1036,43	1037,62

Ces résultats sont satisfaisants car les valeurs des masses expérimentales des composés synthétisés sont identiques aux masses calculées.

II.2.4.2 Spectroscopie UV-Visible

Un tableau récapitulatif des paramètres mesurés (coefficient d'extinction molaire et longueur d'onde) lors des dosages UV-Visible de ces produits protoporphyriniques est représenté sur le Tableau 9.

Tableau 9 : Valeurs de coefficients d'extinction molaire des composés (**8**, **9**, **10**, **ZnPpIX**, **9Zn** et **10Zn**)

Composés	Soret	QIV	QIII	QII	QI	ϵ_{II}/ϵ_I
8	409 (109,8)	506 (8,6)	542 (7,5)	578 (5,4)	631 (3,3)	1,6
9	408 (125,6)	506 (10,1)	542 (8,1)	578 (5,0)	631 (3,5)	1,4
10	408 (139,3)	506 (12,1)	542 (10,2)	578 (6,9)	630 (4,6)	1,5
ZnPpIX	423 (118,5)	-	549 (10,7)	586 (10,01)	-	-
9Zn	417 (154,6)	-	546 (10,8)	582 (12,5)	-	-
10Zn	415 (130,2)	-	545 (11,4)	581 (12,8)	-	-

Tableau 10 : RMN ¹H des composés **9Zn** et **10Zn** dans le CDCl₃.

H	9Zn	10Zn
<u>Pyrrole</u>		
H méso	10,01 s ; 9,95 s 9,80 s ; 9,71 s	10,05 s ; 10,00 s 9,86 s ; 9,77 s
H _{Int}	-	-
<u>Vinyle</u>		
H ₂₁	8,29-8,32 m	8,33-8,25m
H ₂₂	6,39 d (17,8) 6,21 d (11,5)	6,36 d (17,8) 6,18 d (11,5)
<u>Méthyle</u>		
CH ₃	3,65 s ; 3,63 s 3,56 s ; 3,55 s	3,57 s
<u>Bras espaceur</u>		
H _α	4,34 m	4,36 m
H _β	4,12 m	4,28 m
<u>Bras éthylène glycol</u>		
H _a	3,27-3,35 m	3,26-3,33 m
H _b		
<u>Adamantane</u>		
H ₂₃	1,35 m	1,57 m

II.3. Synthèses de dérivés de phosphonium.

Dans la littérature²²¹, les dérivés de la triphénylphosphine (TPP) comme les ions triphényl phosphonium, sont décrits comme des molécules capables de cibler spécifiquement la mitochondrie. Dans le cadre de ce travail, nous avons souhaité insérer ce motif triphénylphosphonium sur des CD/CNCx (**3**) afin de cibler des organites essentiels de la cellule : la mitochondrie. Ces molécules fixées sur la plateforme CD/CNCx (**3**) pourront mieux cibler les molécules actives vers l'organite clé de la cellule.

²²¹ Q. Hu, M. Gao, G. Feng and B. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, **53**, 14225-14229.

II.3.1. Synthèse du bromure de 3-hydroxy propyl triphénylphosphonium (11).

Afin de fixer une chaîne carbonée comme espaceur sur la triphénylphosphine (TPP), une réaction de substitution nucléophile a été réalisée entre le 3-bromopropanol et la TPP dans l'éthanol. La réaction est suivie par CCM jusqu'à la disparition du composé de départ. Après 15h de réaction, le composé **11** est obtenu avec un rendement de 71% (Figure 63).

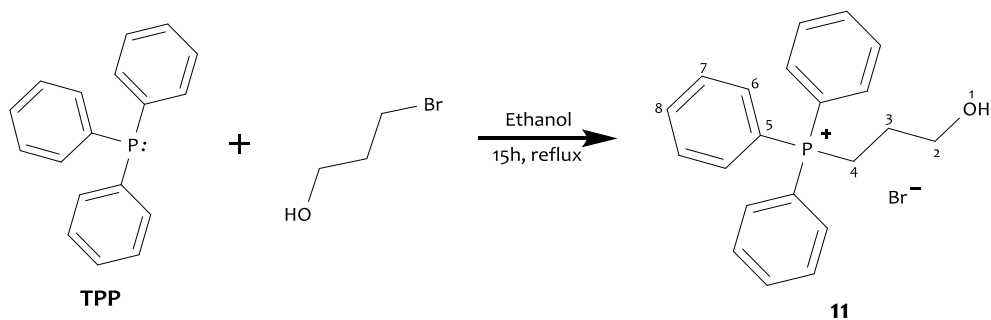


Figure 63 : Synthèse du composé **11**.

II.3.1.1 RMN ¹H.

L'analyse du spectre RMN ¹H permet de distinguer 4 types de protons en fonction de leurs déplacements chimiques (δ ppm) (Figure 64) et est conforme à la littérature²²².

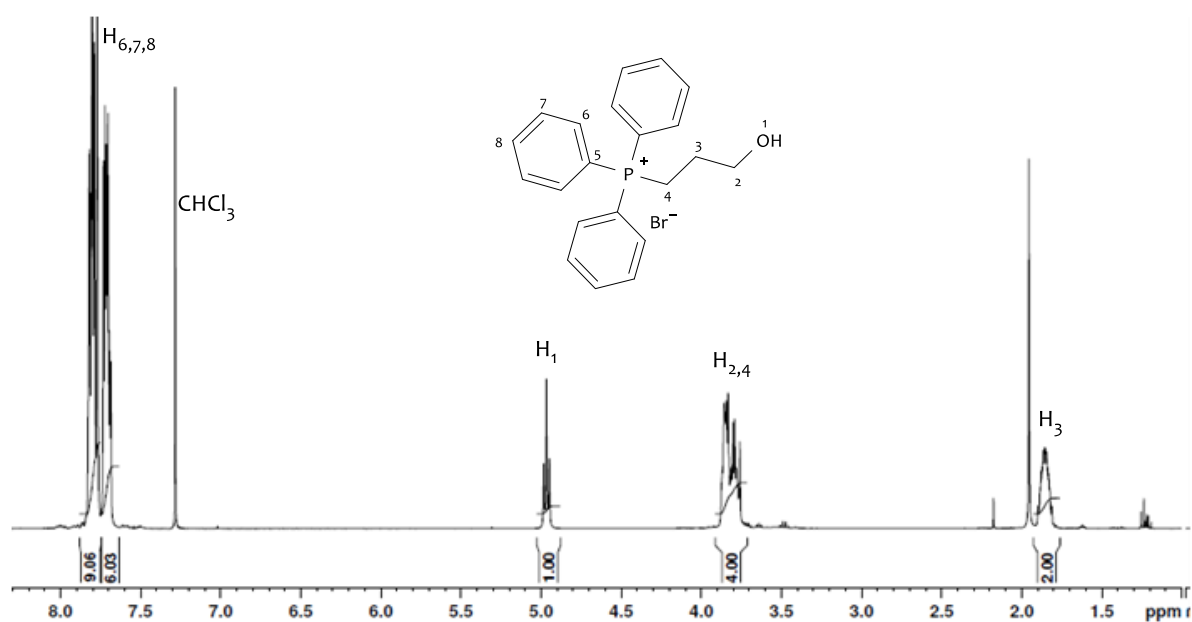


Figure 64 : Spectre RMN ¹H du composé **11** dans CDCl₃.

Nous pouvons ainsi observer un multiplet entre 7,69 et 7,82 ppm (intégrant pour 15H) correspondant aux protons du phényle (H_{6,7,8}). Le déblindage de ces derniers, par comparaison aux protons habituels du benzène ($\delta_{ppm} = 7,15$ ppm), s'explique par la présence de l'atome de

²²² R. K. Pathak, S. Marrache, D. A. Harn and S. Dhar, ACS Chem. Biol., 2014, 9, 1178-1187.

phosphore cationique, dont l'effet inductif attracteur est très important. Le proton de la fonction alcool résonne à 4,96 ppm sous la forme d'un triplet ($J = 6,9$ Hz). Tandis qu'il apparait entre 3,75 et 3,86 ppm, un multiplet (résonnant pour 4H) correspondant aux protons ($H_{2,4}$) et un autre multiplet à 1,85 ppm correspondant aux protons (H_3).

II.3.1.2 RMN ^{13}C .

Le spectre RMN ^{13}C réalisé dans le CHCl_3 permet de confirmer la structure du produit attendu (Figure 65).

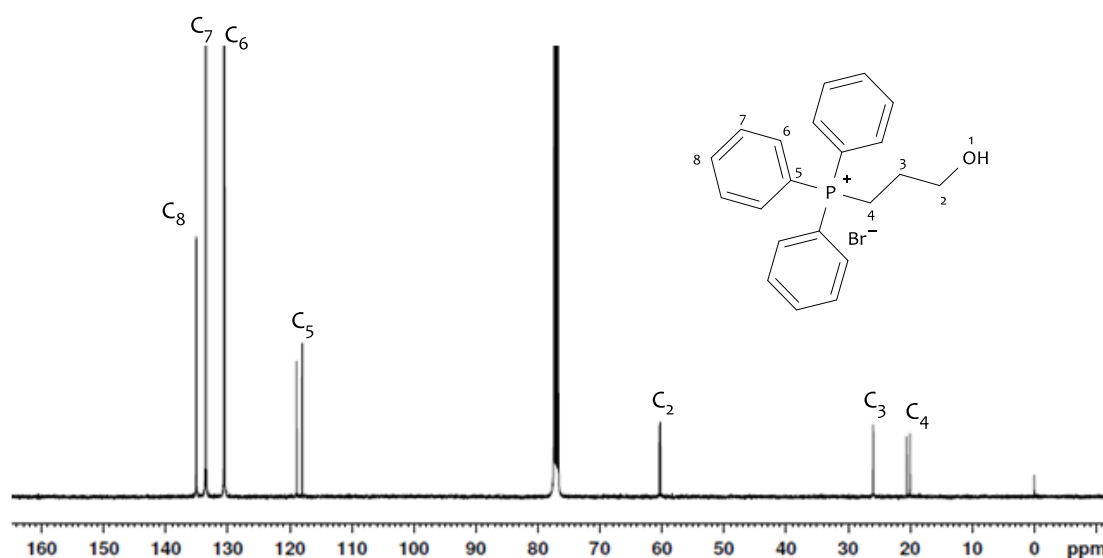


Figure 65 : Spectre RMN ^{13}C du composé **11** dans le CDCl_3 .

Sur ce spectre de RMN ^{13}C , on observe la présence des carbones Csp^2 des trois cycles aromatique (C_6 , C_7 et C_8) entre 130 et 140 ppm ainsi que les carbones quaternaire (C_5) de plus faible intensité à 120 ppm. La fixation de la chaîne alkyle est confirmée par la présence des carbones Csp^3 (C_2 , C_3 et C_4) entre 20 et 60 ppm. On peut remarquer une forte différence de déplacement chimique entre le C_2 et les C_3 et C_4 en raison de l'effet attracteur du cation phosphonium.

II.3.1.3 Infra-rouge.

L'étude du spectre infrarouge, met en évidence la bande caractéristique de vibration d'élongation à 3314 cm^{-1} caractéristique de la fonction alcool (OH-lié), présente sur le composé **11** et absente sur le produit de départ TPP (Figure 66).

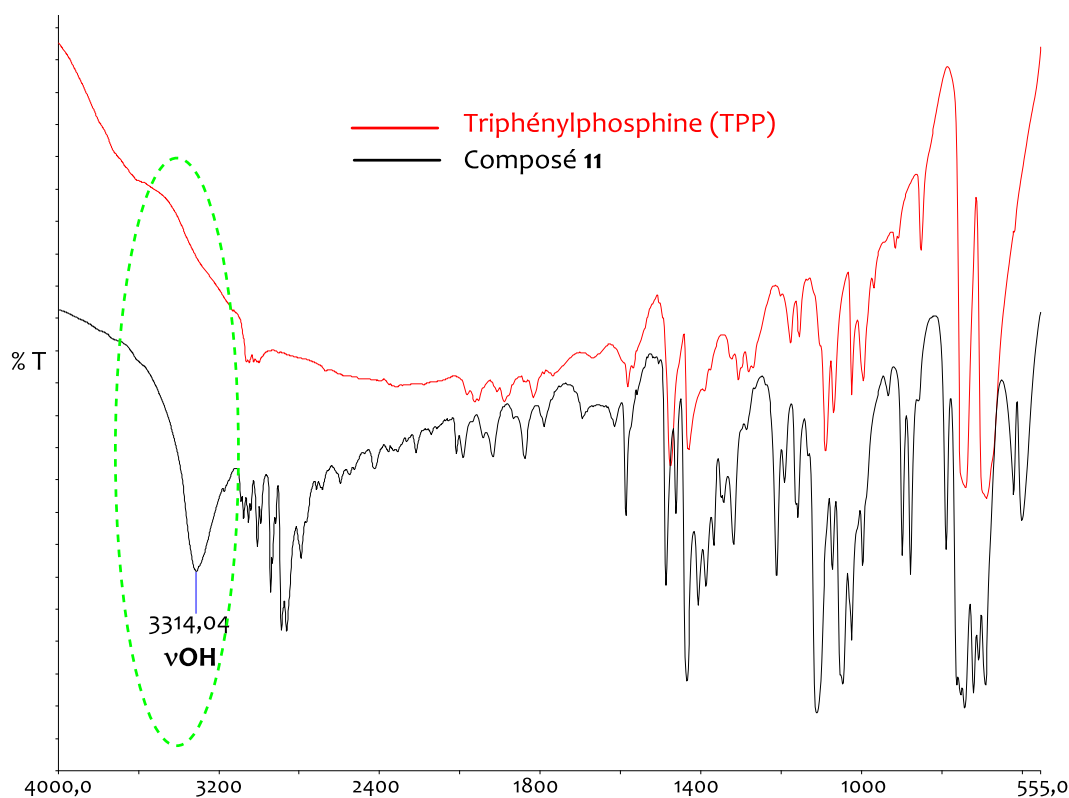


Figure 66 : Spectres IR de TPP et du composé **11**.

II.3.1.4 UV-Visible.

Le spectre UV-Visible a été réalisé dans le chloroforme et nous a permis de déterminer les absorptions spécifiques du cycle phénylique dans le domaine de l'ultraviolet.

Nous nous sommes proposés dans le cadre du ciblage de la mitochondrie, de fixer la molécule d'adamantane sur le composé **11** dans le but de l'encapsuler dans la nanostructure CD/CNCx (**3**) via la réaction de complexation avec la β -cyclodextrine.

II.3.2. Synthèse du bromure d'adamantane carboxylate de 3-propyl triphénylphosphonium.

L'estérification du composé **11** par le chlorure d'adamantane carboxyle est réalisée en présence de DMAP conduit à la formation du produit **12**. Nous avons utilisé comme précédemment le DMAP qui joue le rôle d'agent de couplage et de base (Figure 67).

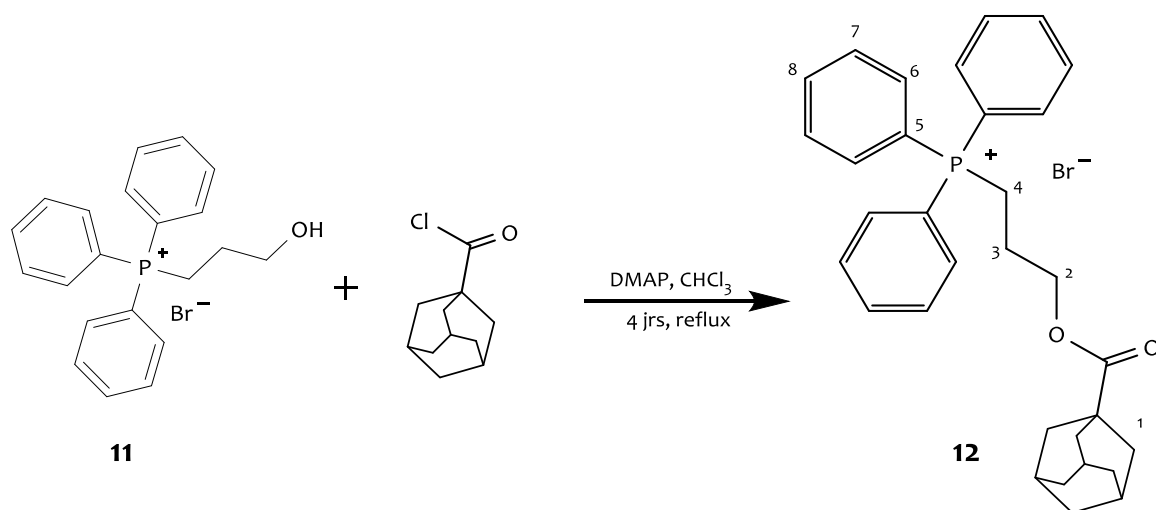


Figure 67 : Synthèse du composé **12**.

La réaction est effectuée à température ambiante durant quatre jours. Après extraction et purification sur plaques préparatives, le composé **12** est obtenu sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 62%. Le composé **12** a été caractérisé par UV-Visible (Figure 68) et par RMN du proton (Figure 68: Spectre UV-Visible des composés **11** et **12** dans le CHCl_3).

On observe ainsi deux maximums d'absorption à 269 nm et à 276 nm.

).

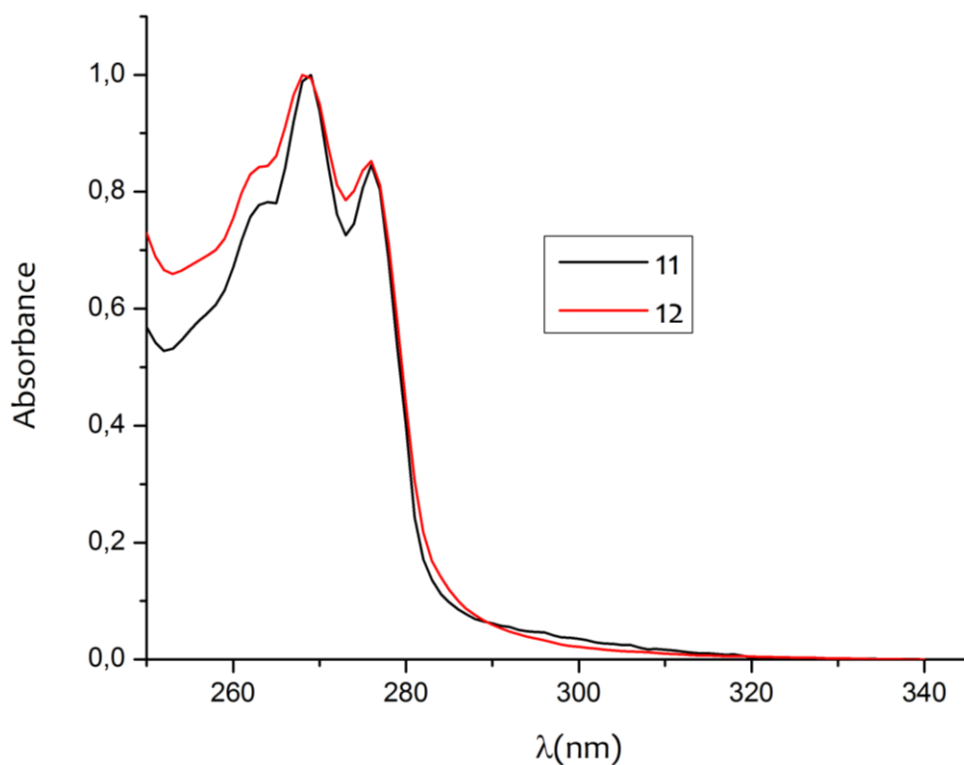


Figure 68: Spectre UV-Visible des composés **11** et **12** dans le CHCl_3 .

On observe ainsi deux maximums d'absorption à 269 nm et à 276 nm.

Afin de mettre en évidence l'atome de phosphore, un spectre RMN ^{31}P du composé **12** a été réalisé à 500 MHz dans le $\text{DMSO-}d_6$. Ce spectre laisse apparaître un pic à 24,6 ppm sous forme d'un singulet caractéristique de la présence du phosphore dans la molécule²²².

II.3.3. Synthèse du bromure de 5-carboxy pentyl triphénylphosphonium (**13**).

Afin de fixer le cation triphénylphosphonium sur des molécules actives comme la curcumine et les porphyrines, l'acide 6-bromo hexanoïque a été couplé à la triphénylphosphine pour former le composé **13** (Figure 69).

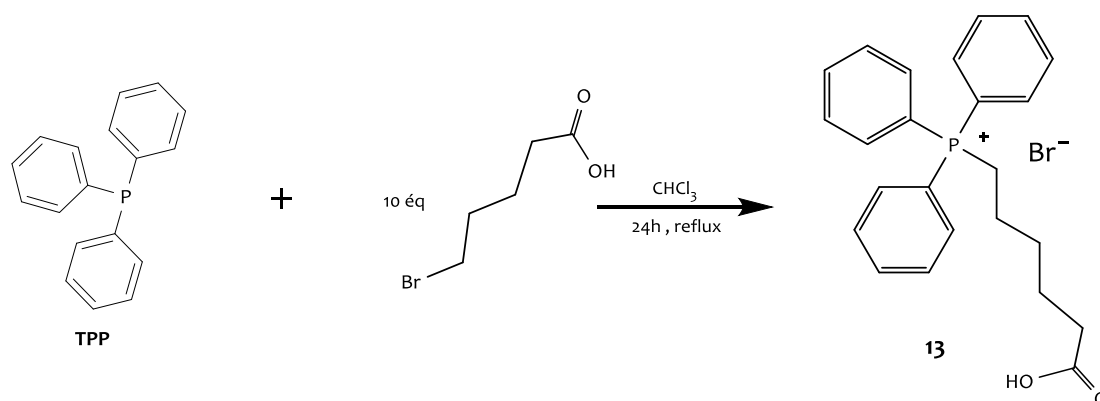


Figure 69 : Synthèse du composé **13**.

De manière similaire à la synthèse du composé **11**, la triphénylphosphine et dix équivalents d'acide 6-bromo hexanoïque sont mis à réagir pour conduire à la formation du produit **13** suivant une réaction de substitution nucléophile d'ordre 2. La réaction a été suivie par CCM ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$: 55/45/12) et après 24h de réaction, le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur plaque préparative. Le composé **13** est obtenu sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 75%. La structure du composé a été confirmée par RMN ^1H et par RMN ^{31}P qui met en évidence un singulet à 24,8 ppm.

Le groupement fonctionnel « acide carboxylique » introduit lors de cette réaction servira de site réactionnel pour coupler le cation phosphonium formé avec les principes actifs porteurs de groupements amine, alcool, etc.

Tableau 11 : RMN ¹H des composés **11**, **12** et **13** dans le CDCl₃ (a) et le DMSO-d₆ (b).

Composé 11 ^a	Composé 12 ^b	Composé 13 ^b
7,69-7,82 ; m ; H _{6,7,8}	7,95 ; dd ; 1,5 Hz ; H ₈	7,90-7,78 ; m ; H _{8,9,10}
4,96 ; t ; 6,9 Hz ; H ₁	7,79 ; m ; H _{6,7}	3,51-3,63 ; m ; H _{2,6}
3,75-3,86 ; m ; H _{2,4}	4,09 ; m ; H ₄	2,15-2,22 ; m ; H _{3,5}
1,85 ; m ; H ₃	3,62 ; m ; H ₂	1,64-1,76 ; m ; H ₄
-	1,16 ; t ; H _{1,3}	-

Chapitre III. Encapsulation des principes actifs

Afin de pouvoir délivrer un principe actif hydrophobe au moyen de nanoparticules de type « nanocristaux de cellulose » et utiliser l'effet EPR, nous avons au cours de ce travail envisagé l'encapsulation du principe actif dans la cavité hydrophobe d'une cyclodextrine qui sera fixée par interaction ionique au vecteur (Figure 70).

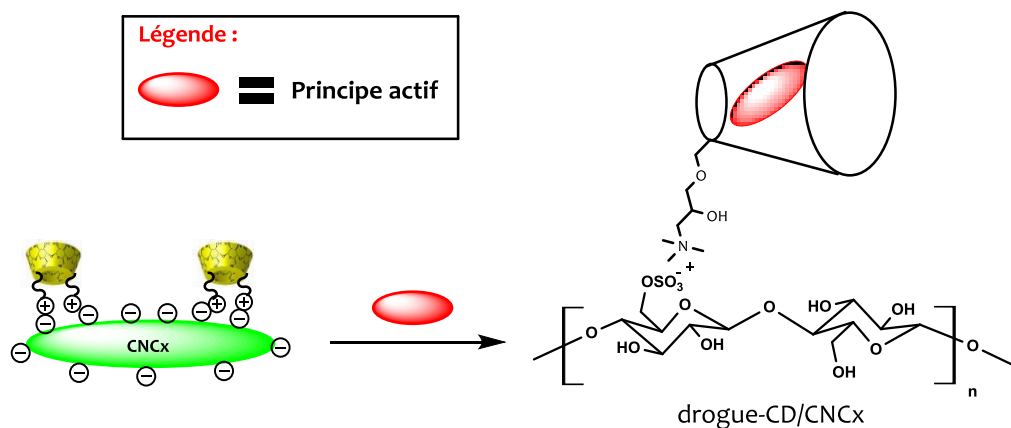


Figure 70 : Schéma général de la synthèse de principe actif lié au composé **3** ou CD/CNCx.

Le produit « principe actif-CD/CNCx » est obtenu par réaction entre le composé **3** et le principe actif considéré pendant 2h à température ambiante sous ultrasons et dans un bain de glace. En effet, chaque biomolécule est diluée dans un minimum d'acétone et additionnée goutte à goutte dans une solution aqueuse contenant le composé **3**. Les fortes interactions répulsives entre les molécules d'eau et la drogue favorisent l'insertion de la drogue dans la cavité hydrophobe de la cyclodextrine conduisant ainsi après centrifugation à la formation d'un complexe « host-guest » stable en milieu aqueux. La quantité de principe actif encapsulée est déterminée par spectroscopie UV-Visible.

III.1. Inclusion de la curcumine I

La réaction entre les CD/CNCx **3** et la curcumine I conduit à la formation du complexe **14** (Figure 71) :

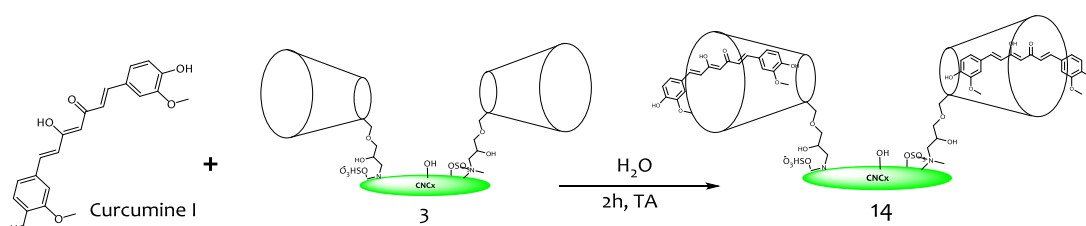


Figure 71 : Synthèse du complexe **14**.

Le complexe **14** est obtenu après centrifugation (8000 rpm, 10 mn) avec une concentration de l'ordre de $6 \times 10^{-4} \text{M}$ (soit un taux de fixation de 96 mg/g CNCx), déterminée par dosage UV-Visible (Figure 72).

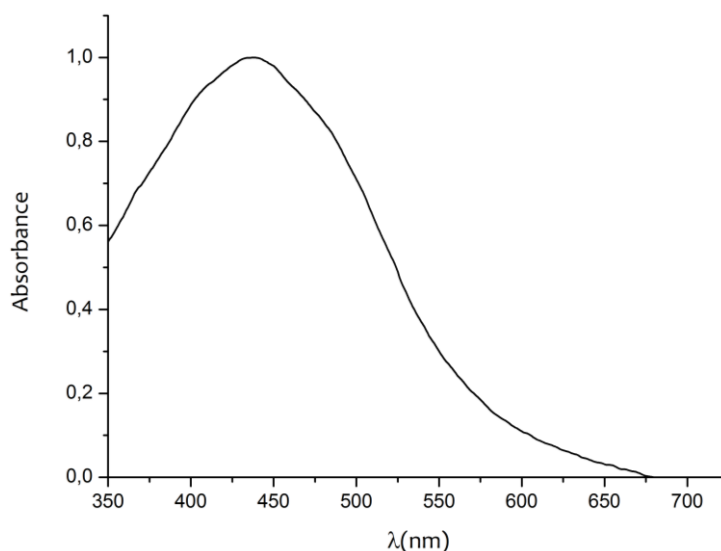


Figure 72 : Spectre UV-Visible du complexe **14** dans l'eau.

L'expérience a été répétée à trois reprises dans les mêmes conditions afin de valider le concept et surtout pour déterminer après extraction au chloroforme, le taux d'insertion et le pourcentage massique en curcumine par gramme de nanocristaux de cellulose (Tableau 12).

Tableau 12 : Taux et pourcentage de fixation de la curcumine sur le composé **3** « CD/CNCx ».

Essais	CNCx (mg)	[Curcumine] dans le CD/CNCx (mol/L)	Taux de curcumine par g de CNCx (mmol/g)	% Fixation (g/g)
1	2	$2,3 \times 10^{-4}$	0.226	8,3 %
2	2	$2,75 \times 10^{-4}$	0.276	10.1 %
3	5	6×10^{-4}	0.24	9,0 %

Les triplicats réalisés nous ont permis de déterminer un pourcentage d'insertion en curcumine par gramme de CNCx. Après dosage par UV-Visible, ce pourcentage varie de 8 à 10%. La caractérisation par DLS a permis d'évaluer la taille du complexe **14**. La taille moyenne de ce dernier est égale à $206,8 \pm 1,6 \text{ nm}$. Avec un indice de polydispersité de 0,288, l'échantillon est relativement homogène. Le potentiel zêta du complexe **14** vaut $-29,6 \pm 1,8 \text{ mV}$ (Figure 73).

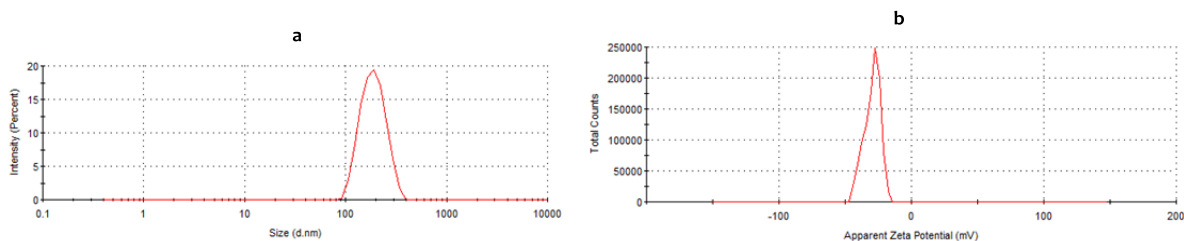


Figure 73 : a) Distribution en taille par DLS du complexe **14** et b) potentiel zêta du complexe **14**.

La valeur du potentiel zêta du complexe **14** est légèrement en hausse par rapport à celle du composé **3** (CD/CNCx) de départ mais cette valeur reste tout de même négative.

III.1.1. Relargage de la curcumine I

Cette étude a nécessité le développement d'un modèle expérimental *in vitro* comparable aux conditions du milieu physiologique. En effet, 0,5 mL (soit $5,0 \times 10^{-8}$ mol de curcumine) de la solution du complexe **14** est ajouté délicatement dans une cuve en quartz contenant 2 mL de CHCl_3 afin d'obtenir une phase organique et une phase aqueuse. Ensuite, sans agitation, la mesure de l'absorbance relative à la diffusion de la curcumine vers la phase organique a été mesurée toutes les heures pendant 8h. Cette expérience est réalisée trois fois pour confirmer la reproductibilité (Tableau 13).

Tableau 13: Pourcentage de relargage de la curcumine contenue dans le composé **14** en fonction du temps.

Temps (h)	3	6	8
Quantité de curcumine diffusée dans le chloroforme (mol)	$1,0 \times 10^{-8}$	$1,1 \times 10^{-8}$	$1,2 \times 10^{-8}$
Taux de relargage de la curcumine dans le chloroforme	0,2	0,22	0,24
Pourcentage de relargage de la curcumine dans le chloroforme	20 %	22 %	24 %

Les pourcentages de relargage (% R) de 20, 22 et 24% en curcumine ont été respectivement obtenus après 3, 6 et 8h de temps. Ce pourcentage de relargage de la curcumine a été calculé suivant la relation :

$$\% R = \frac{m(\text{curcumine})_R}{m(\text{curcumine})_{\text{initiale}}} \times 100$$

Avec $m(\text{curcumine})_R$ et $m(\text{curcumine})_{\text{initiale}}$ qui représentent respectivement la masse de curcumine relarguée et la masse initiale en curcumine dans le complexe **14**. Les résultats obtenus sont conformes à ceux décrits dans la littérature²²³ sur d'autres nanoparticules et nous ont permis de tracer la courbe de relargage de la curcumine en fonction du temps (Figure 74).

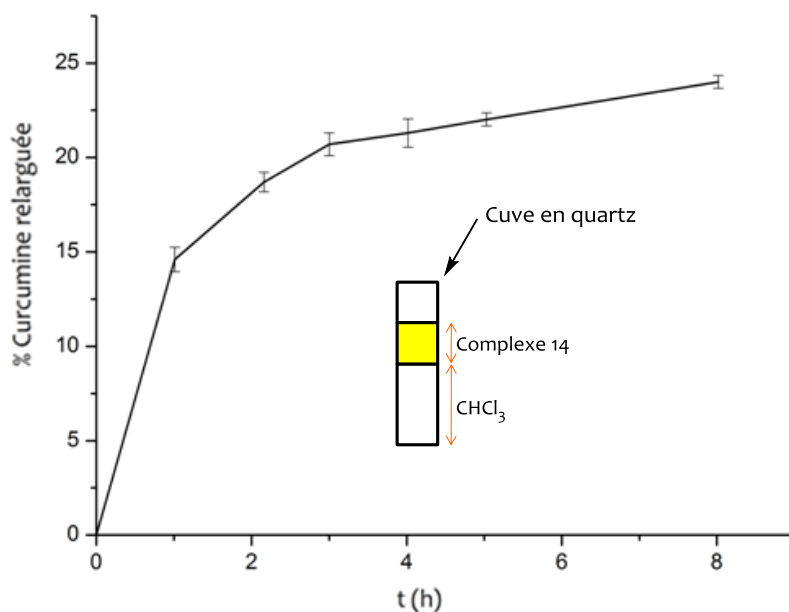


Figure 74 : Pourcentage de curcumine relarguée en fonction du temps.

III.2. Inclusion de la piperlongumine et des composés **9Zn** et **10Zn**.

L'encapsulation des autres principes actifs (piperlongumine, **9Zn** et **10Zn**) s'est faite suivant le même protocole que celui décrit avec le complexe **14**. Les complexes **15**, **16** et **17** obtenus sont représentés sur la Figure 75 ci-dessous :

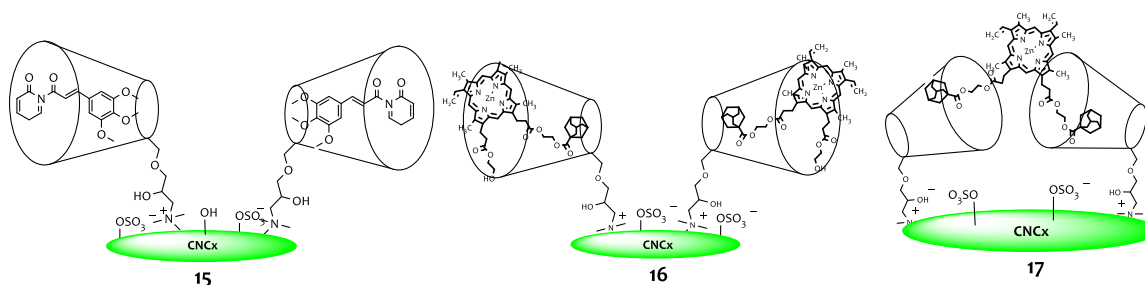


Figure 75 : Structure des complexes **15**, **16** et **17**.

Les résultats de ces différentes réactions d'encapsulation sont représentés sur le Tableau 14.

²²³ M. R. Saboktakin and R. M. Tabatabaee, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2014, **65**, 398-414.

Tableau 14 : Pourcentage de fixation en principe actif sur le composé 3 « CD/CNCx » et potentiel zêta.

Plateforme	15	16	17
Concentration en produit actif dans la solution CD/CNCx (M)	$3,5 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-4}$	10^{-4}
Pourcentage de Fixation (g/g)	11%	10,5%	10,3%
Potentiel zêta (mV)	-41	-41	-41

III.3. Inclusion du bromure d'adamantane carboxylate de 3-propyl triphénylphosphonium.

Parallèlement, nous avons réalisé la synthèse de dérivés phosphonium dans la perspective de cibler la mitochondrie, siège de la production énergétique de la cellule. Les mécanismes d'apoptose nécessaire à l'homéostasie de la cellule ont également lieu dans cet organite²²⁴. De ce fait, la mitochondrie s'avère une cible de choix pour la thérapie anticancéreuse.

La fixation du bromure d'adamantane carboxylate de 3-propyl triphénylphosphonium **12** est réalisée comme pour les autres produits sous ultrason dans un bain de glace. Le bilan réactionnel est représenté sur la Figure 76.

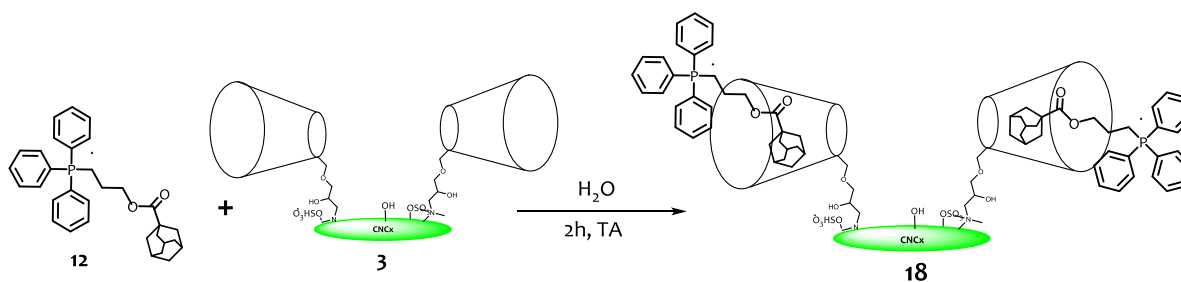


Figure 76 : Synthèse du complexe **18**.

Le composé **12** est dissous dans un minimum d'eau car il n'est pas soluble dans l'acétone. Après 2 heures de réaction, le pourcentage de fixation observé est de 5%. Ce pourcentage est plus faible que ceux obtenus précédemment. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que le cation triphénylphosphonium est beaucoup plus hydrophile que les composés précédents. Le potentiel zêta est positif et vaut + 3,22 mV.

²²⁴ D. L. Johannsen and E. Ravussin, *Curr. Opin.Pharmacol.*, 2009, **9**, 780-786.

III.4. Conclusion

Nous avons ainsi dans ce chapitre mis en place un protocole d'encapsulation de principe actif hydrophobe à l'aide des cyclodextrines fixées par interaction ionique sur les nanocristaux de cellulose. Une étude de relargage de principe actif a été réalisée et montre que ces complexes sont capables de libérer les principes actifs avec des concentrations similaires à la littérature.

Chapitre IV. Nanocristaux de cellulose à base de polyéthylèneimine : transfection

La thérapie génique est une approche prometteuse pour le traitement de différentes pathologies. Elle consiste entre autre en la transfection de petit fragment d'ARN ou siRNA au sein d'une cellule malade. Cependant, l'application clinique de cette approche souffre encore de nombreux obstacles comme la faible internalisation du fragment d'ARN ou sa dégradation par des enzymes avant d'atteindre sa cible. Une des réponses actuelle consiste à vectoriser ce siRNA au moyen de transporteurs permettant d'améliorer l'internalisation et la protection vis-à-vis des enzymes comme les protéases. Néanmoins, ce vecteur doit être si possible peu toxique, peu onéreux et capable de cibler les cellules malades et délivrer le siRNA avec de bon rendement.

Nous avons donc proposé au cours de ce travail, d'utiliser les nanocristaux de cellulose comme nanovecteurs pour la transfection de gène.

IV.1. Stratégie de synthèse

La stratégie adoptée consiste tout d'abord à oxyder certaines unités glucose en surface des nanocristaux en présence de periodate de sodium afin de créer des fonctions aldéhydes.

Dans un deuxième temps, une amination réductrice est réalisée entre les fonctions aldéhydes et un polymère d'amine (PEI 600Da) afin d'apporter les charges positives en surface du nanocristal. Cette PEI permettra également de favoriser l'internalisation du vecteur dans les cellules ciblées.

Enfin, le siRNA est fixé par interaction ionique sur la PEI portée par les CNCx grâce aux charges négatives des groupements phosphate du siRNA (Figure 77).

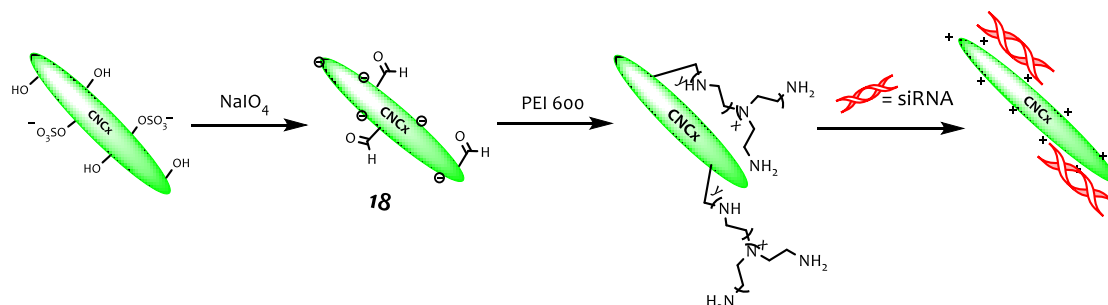


Figure 77 : Schéma général de la stratégie de synthèse 2.

IV.2. Synthèse des nanocristaux de cellulose oxydés CNCox (19)

La conversion d'unités α -diols en dialdéhydes par le periodate de sodium est une méthode utile et largement utilisée dans la dérivation de la cellulose pour activer le polymère à d'autres réactions^{225,226}. Le schéma général et le mécanisme admis pour ce type de réaction est représenté sur la Figure 78.

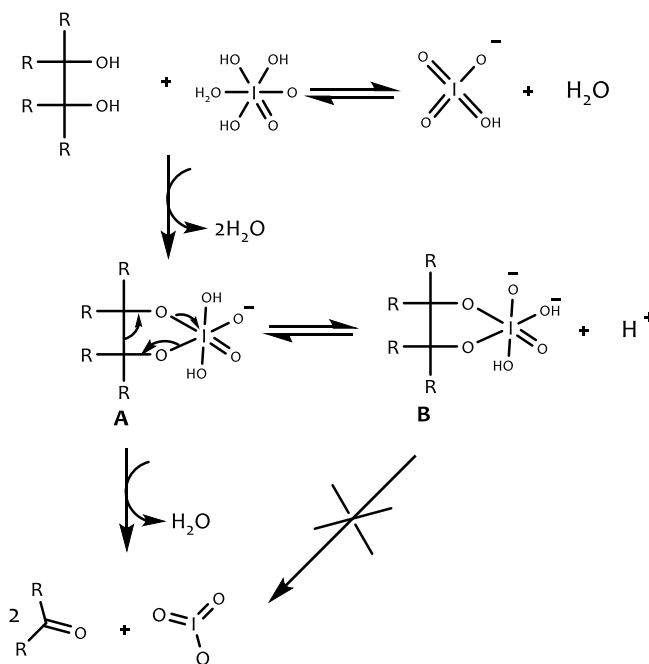


Figure 78 : Mécanisme réactionnel de l'oxydation périodique des α -diols.

Sur cette base, le clivage sélectif de la liaison $\text{C}_2 - \text{C}_3$ du cycle glucopyranose des CNCx (**1**) a conduit à l'obtention des nanocristaux de cellulose oxydés **19** (CNCox). Il est tout de même important de noter que l'oxydation par le periodate de sodium des α -diols est sensible au pH du milieu, à la température et à la lumière²²⁷. Pour ces raisons, cette réaction est souvent effectuée dans des conditions douces c'est-à-dire à température ambiante, à pH7 et à l'abri de la lumière afin d'éviter la photo-décomposition du periodate (Figure 79).

²²⁵ M. L. Malaprade, *C. R. Acad. Sci*, 1928, **186**, 382-384.

²²⁶ Y. H. Xu and C. Huang, *Adv. Mater. Res.*, 2011, **197-198**, 1201-1204.

²²⁷ B. Sun, Q. Hou, Z. Liu and Y. Ni, *Cellulose*, 2015, **22**, 1135-1146.

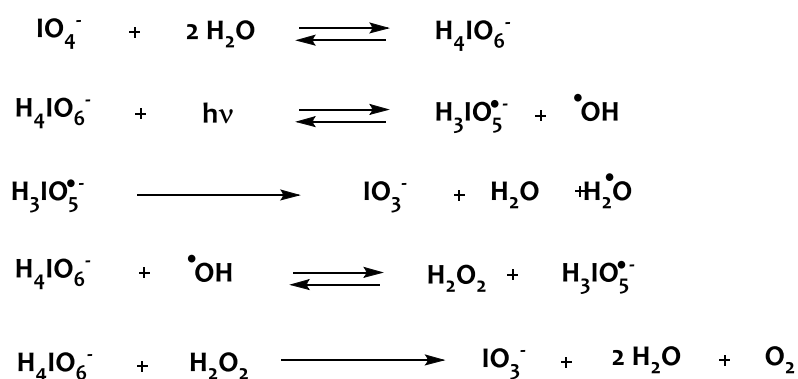


Figure 79 : Photo-décomposition du periodate.

Le bilan réactionnel de l'oxydation des nanocristaux de cellulose est représenté sur la Figure 80.

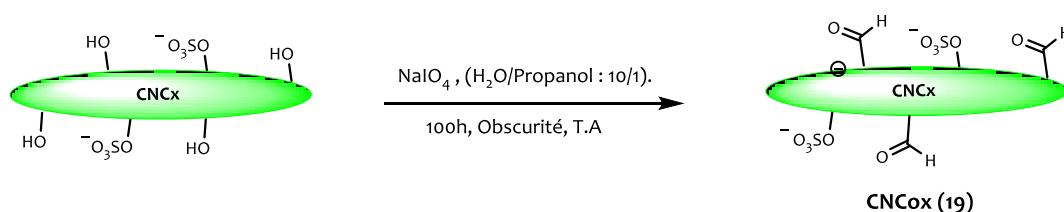


Figure 80 : Synthèse des nanocristaux de cellulose oxydés **19** par NaIO_4 .

Après 100h de réaction et une purification par dialyse (seuil de coupure : 6 à 8 kDa), les nanocristaux de cellulose oxydés (CNCox, **19**) ont été obtenus avec un degré d'oxydation moyen (D.O) d'environ 15%. En effet, il a été montré dans la littérature²²⁸ que le nombre d'unités anhydroglucose (UAG) présent à la surface représente le tiers du total des unités UAG contenus dans le nanocrystal. Parmi ces UAG de surface, seule la moitié est susceptible d'être oxydée compte tenu de l'orientation du cycle pyranose. Ce qui nous conduit à 16% du total des UAG totaux qui peuvent être oxydés. Le résultat obtenu est très proche du maximum d'oxydation possible à la surface des nanocristaux.

IV.2.1. Caractérisations.

IV.2.1.1 Infra rouge.

Afin de caractériser le produit obtenu, un spectre IR des CNCox **19** préalablement lyophilisé a été réalisé et il a été superposé à celui des CNCx (**1**) de départ mettant ainsi en évidence les modifications chimiques apportées par l'oxydation au NaIO_4 . Ces spectres sont représentés sur la Figure 81.

²²⁸ S. Eyley, S. Shariki, S. Bending, F. Marken, W. Thielemans, *Langmuir*, 2012, **28**, 6514-6519.

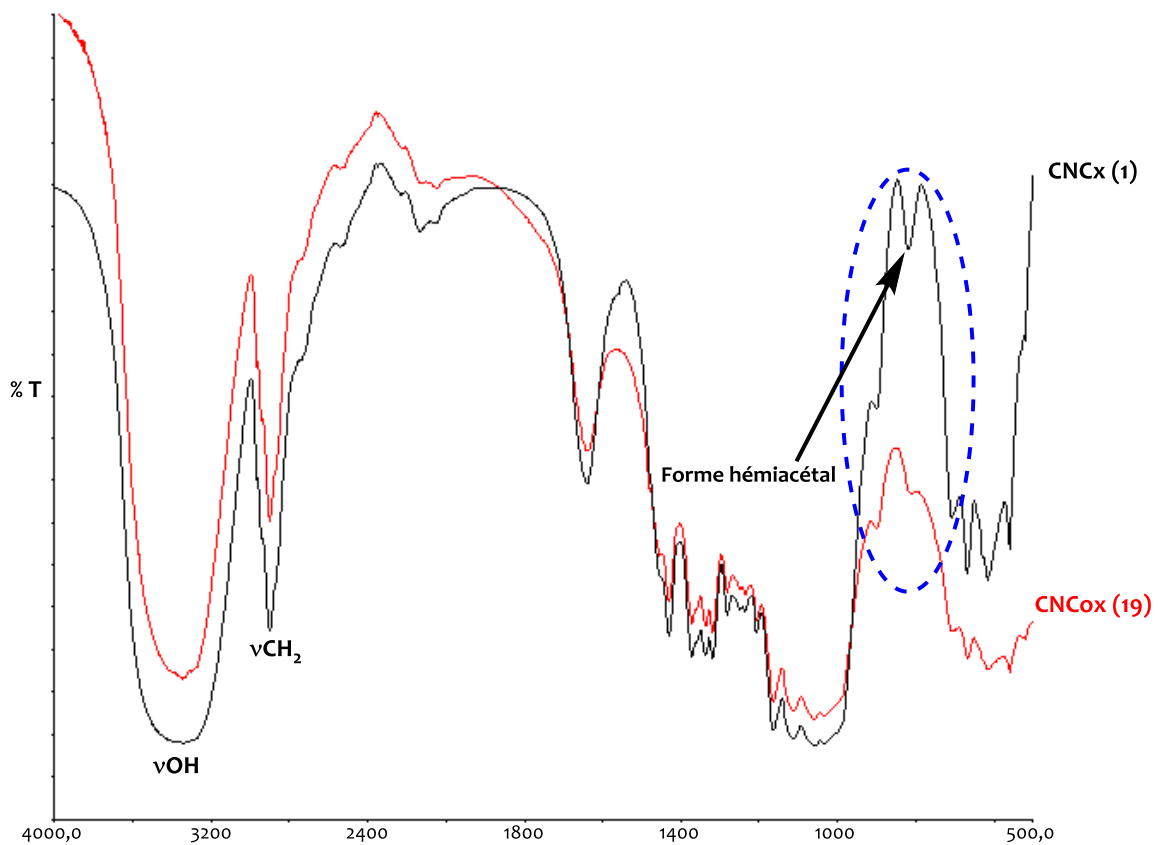


Figure 81 : Spectre IR des CNCx 1 (en noir) et des CNCox 19 (en rouge).

Le spectre IR des CNCox fait apparaître des signaux classiques de la cellulose. La bande à 1735 cm^{-1} caractéristique des aldéhydes n'est presque pas observable. Ceci est lié à la faible quantité d'UAG oxydées. Cependant, la bande à 880 cm^{-1} des CNCox 19 augmente considérablement par rapport à celle des CNCx 1 de départ et présente un léger shift. Elle est attribuable aux formes hydrates et hémiacétal des CNCox 19. En effet, les fonctions aldéhyde ont souvent tendance à s'hydrater en gem-diol pour former des hémialdal (Figure 82) expliquant ainsi l'absence de la bande caractéristique des aldéhydes.

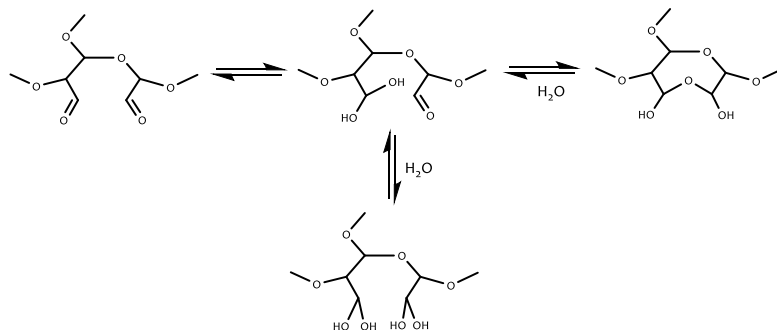


Figure 82 : Formes hydratées des UAGs oxydées.

En réagissant avec les hydroxyles primaires, les groupes aldéhyde des sites C2 ou C3 peuvent également former des réticulations intra- ou interchaîne conduisant à la formation de monomère ou de dimère^{229,230} comme indiqué dans sur la Figure 83.

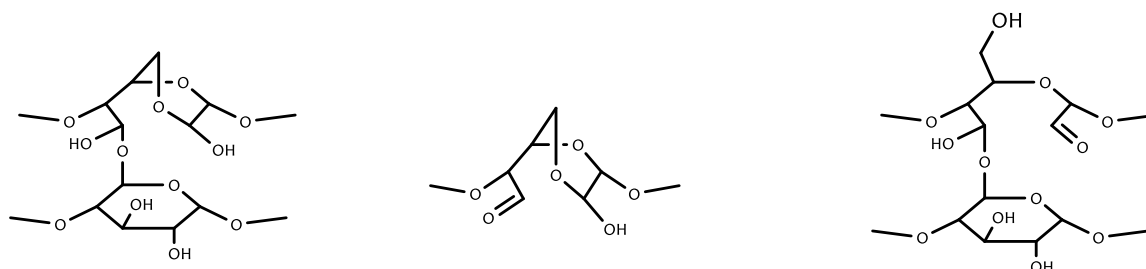


Figure 83 : Structures possibles d'hémiacétal.

IV.2.1.2 DLS et potentiel zêta.

La caractérisation par DLS révèle des CNCox (**19**) de taille moyenne égale à $172,4 \pm 2,6$ nm. Le potentiel zêta du composé **19** vaut $-40,0 \pm 1,1$ mV. Cette valeur négative du potentiel zêta marque la présence des fonctions sulfates qui ne sont pas dénaturées lors de l'oxydation.

Il sera donc possible à la suite de cette réaction d'oxydation de fonctionnaliser les UAG oxydées par un polymère d'amine, la polyéthylèneimine de poids moléculaire 600 Da.

IV.3. Synthèse de nanocristaux de cellulose polyaminés (**20**)

La PEI va être utilisée comme agent d'internalisation et va permettre grâce à ses fonctions amine cationisées de relier les siRNA aux nanocristaux. Pour cela, nous avons au préalable couplé cette PEI aux CNCox **19** suivant le schéma réactionnel ci-dessous (Figure 84).

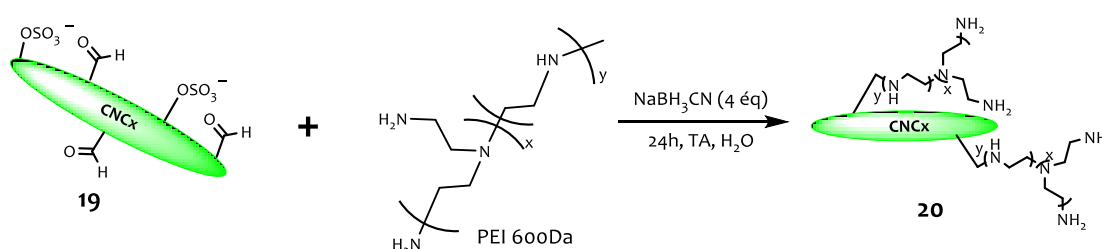


Figure 84 : Synthèse des nanocristaux cationiques **20** « ou PEI-CNCox ».

La fixation covalente de la PEI 600Da s'est faite grâce à la réaction d'amination réductrice entre les fonctions aldéhyde des nanocristaux oxydés **19** et les fonctions amine primaire de la PEI. Après 24h de réaction en milieu aqueux, à température ambiante, et en présence de quatre équivalents de cyanobohydrure de sodium (NaBH_3CN), les dérivés polyaminés de nanocristaux de cellulose

²²⁹ T. Morooka, M. Norimoto and T. Yamada, *J. Appl. Polym. Sci.*, 1989, **38**, 849-858.

²³⁰ A. Codou, N. Guigo, L. Heux and N. Sbirrazzuoli, *Compos. Sci. Technol.*, 2015, **117**, 54-61.

(20) résultant ont été obtenus après purification par centrifugation. Le mécanisme réactionnel mis en jeu est représenté sur la Figure 85.

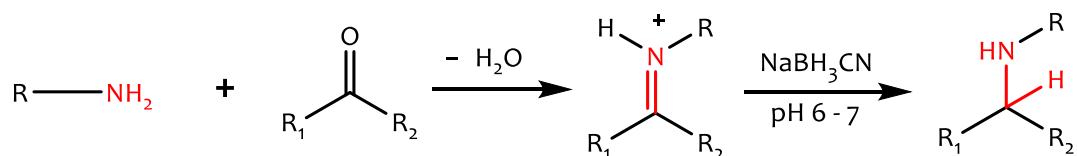


Figure 85 : Mécanisme réactionnel de la réaction d'amination réductrice.

La première étape de la réaction conduit à la formation d'une imine « ou base de Schiff », caractérisée par une double liaison C=N. Celle-ci résulte d'une addition nucléophile suivie d'élimination d'une molécule d'eau. La réduction de l'imine formée (ou sel d'iminium) est une voie aisée d'accès aux amines. En effet, le cyanobohydrure de sodium (NaBH_3CN) en condition douces (pH6-7) est un réducteur approprié pour ce type de transformation.

IV.3.1. Caractérisations.

IV.3.1.1 DLS et potentiel zêta.

Le DLS révèle des nanovecteurs **20** de taille moyenne égale à $175,1 \pm 1,5$ nm. Leur potentiel zêta est maintenant devenu positif ($+26 \pm 1,0$ mV). Il augmente par rapport à celui des CNCox **19** de départ en raison de la présence des fonctions amine de la PEI en surface des nanocristaux. Cette augmentation du potentiel zêta confirme la modification des nanocristaux par la PEI 600 Da.

IV.4. Synthèse de nanocristaux de cellulose siRNA (**21**)

Il est décrit dans la littérature que la polyéthylèneimine fixée sur une nanoparticule forme avec les acides nucléiques des complexes stables ayant une efficacité d'internalisation et d'excellentes propriétés furtives²³¹. Nous avons adapté cette stratégie à notre étude. Le bilan réactionnel est représenté ci-dessous (Figure 86).

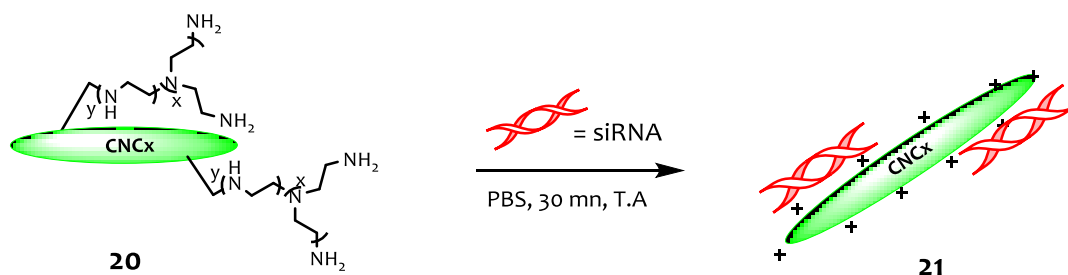


Figure 86 : Synthèse des complexes siRNA-PEI-CNCox (**21**).

²³¹Y. T. Ko, A. Kale, W. C. Hartner, B. Papahadjopoulos-Sternberg, V. P. Torchilin, *J. Control Release*, 2009, **133**, 132-138.

La fixation des siRNA sur les nanoparticules s'est faite en conditions stériles, en présence d'une solution tampon PBS à température ambiante afin d'éviter la dénaturation des siRNA. La mise en réaction entre les nanoparticules cationiques **20** et les séquences de siRNA killer a conduit à la formation de complexes stables (composé **21**) en solution aqueuse après centrifugation (13000 rpm, 10 mn).

IV.4.1. Saturation des nanoparticules cationiques (**20**) en siRNA.

Une étude de la saturation du composé **20** en siRNA a été réalisée. En effet, pour une quantité constante en siRNA killer (50 μ L ; 0,5 nmol ; 6,5 μ g), des masses décroissantes de nanoparticules cationiques (2 à 0,25 mg) ont été additionnées en maintenant le volume des échantillons constant (1 mL). Après centrifugation (13000 rpm, 10 mn), le dosage par UV à 260 nm des siRNA contenus dans le surnageant nous a permis d'obtenir le spectre représenté sur la Figure 87.

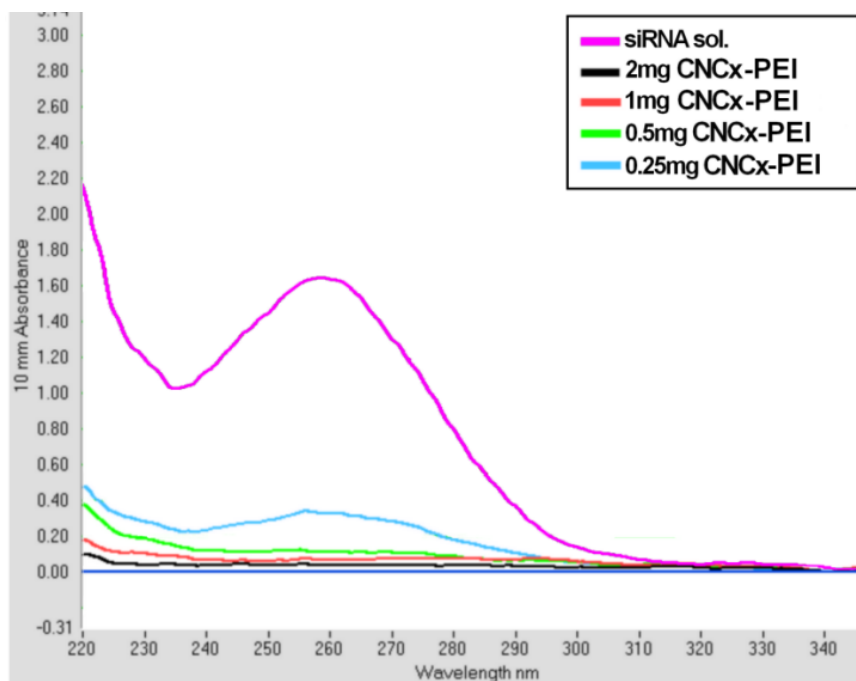


Figure 87 : Spectres UV de siRNA de référence (en rose) et des siRNA contenus dans le surnageant.

Sur ce spectre UV, nous pouvons remarquer que la concentration en siRNA dans le surnageant diminue lorsque la masse en nanoparticules-PEI **20** introduite augmente. La masse de siRNA contenue dans le surnageant « masse (siRNA)_{surnageant} » nous a permis de déduire de celle fixée sur les nanocristaux de cellulose à partir de la relation suivante:

$$\text{masse (siRNA)}_{\text{fixée}} = [6,5 - \text{masse (siRNA)}_{\text{surnageant}}] \text{ (nm)}.$$

Où masse (siRNA)_{fixée}, représente la masse (en µg) des siRNA fixée sur le composé **20**. Ce spectre nous révèle que l'addition de 0,5 mg (courbe en vert) de nanocristaux ne permet pas de détecter les siRNA dans le surnageant. Autrement dit, que la quantité en siRNA non fixée sur les nanocristaux est quasiment nulle. Cet échantillon correspondant à un rapport siRNA/CNCx de 1,4% est celui qui a été retenu pour l'étude biologique. Son potentiel zêta est de +2,55 mV et il présente une taille moyenne de l'ordre 175 nm.

Pour visualiser l'internalisation des nanoparticules dans les cellules, nous avons fixé sur elles un des chromophores le plus utilisé dans les tests biologiques *in vitro* et *in vivo* : la fluorescéine (FTIC).

IV.5. Synthèse de la fluorescéine polyaminée (**22**)

Afin de rendre la fluorescéine soluble dans l'eau, nous l'avons couplée à la polyéthylèneimine. Le bilan de la réaction est représenté ci-dessous (Figure 88) :

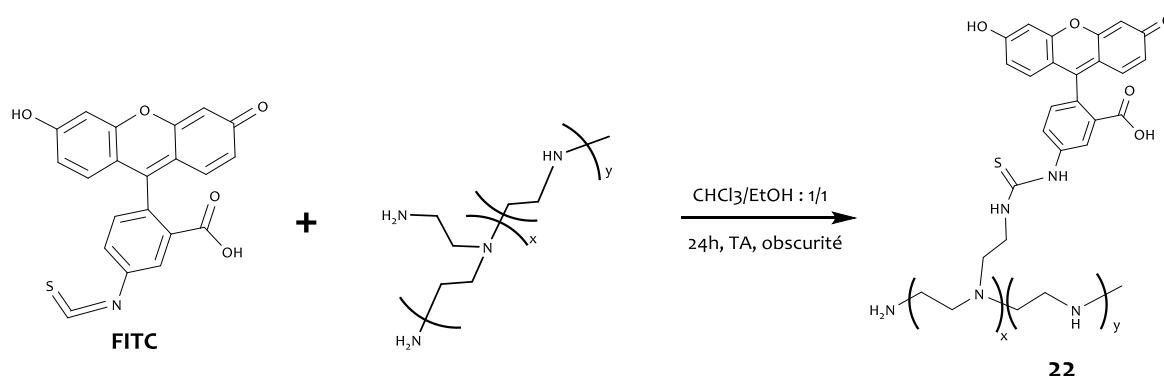


Figure 88 : Synthèse du composé **22**.

La réaction est faite à température ambiante et à l'abri de lumière. Après 24h de réaction, les amines primaires de la PEI ont réagi sur le groupement isothiocyanate de la FITC pour former des thio-urées stables. Les polyéthylèneimines fluorescentes (**22**) ont été caractérisées par UV-Visible (Figure 89). Le coefficient d'extinction molaire du composé **22** est de 26900 M⁻¹. cm⁻¹.

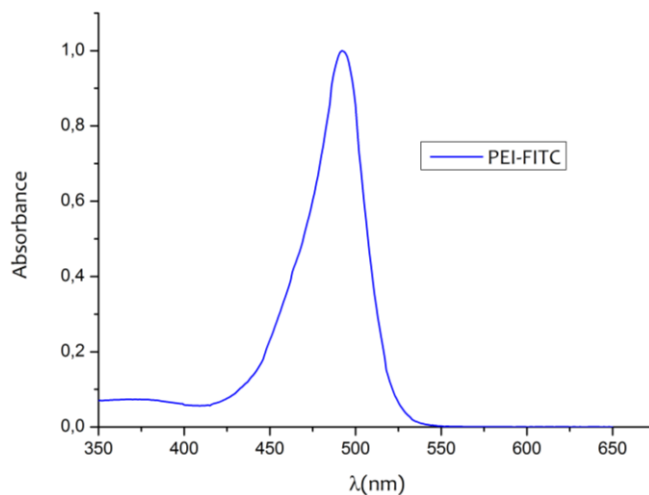


Figure 89 : Spectre UV-Visible du composé **22** dans le CHCl_3 .

Le spectre UV-Visible présente une absorption intense à 502 nm et nous a permis de déterminer grâce à la loi de Beer Lambert une concentration de $2,6 \times 10^{-5}$ M. Ce qui correspond à un rendement de fixation de 64% en FITC. Ce rendement de fixation se calcule à partir de la relation ci-dessous :

$$\text{Rendement de fixation} = \frac{n_{\text{FITC fixée}}}{n_{\text{FITC initiale}}} \times 100$$

Où $n_{\text{FITC initiale}}$ représente la quantité de FITC introduite initialement et $n_{\text{FITC fixée}}$, la quantité de FITC fonctionnalisée par la PEI et déterminée par dosage UV-Visible.

IV.6. Synthèse des nanocristaux de cellulose-FITC (**23**)

La stratégie de fixation de la FITC sur les nanoparticules consiste à fixer les polyéthylèneimines fluorescentes (composé **22**) sur les CNC_{ox} **19** suivant la réaction d'amination réductrice déjà décrite précédemment. Le bilan réactionnel est représenté sur la Figure 90.

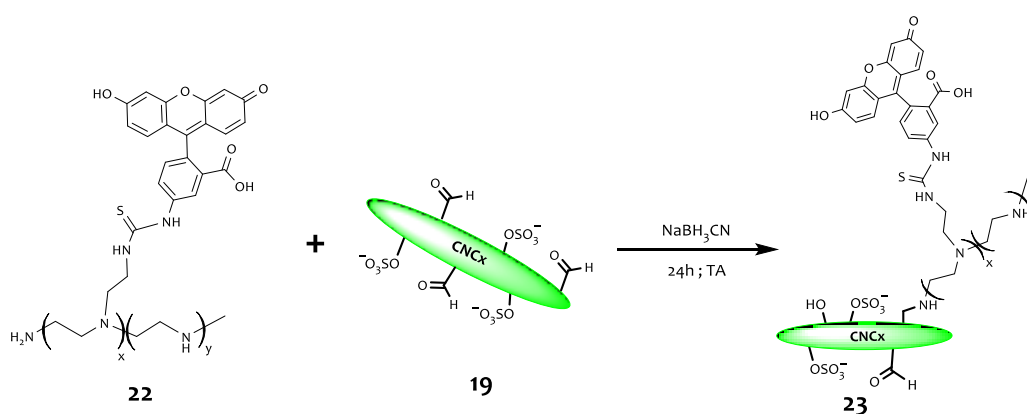


Figure 90 : Synthèse des nanoparticules fluorescentes **23**.

Après purification par dialyse. Le produit est caractérisé par UV-Visible, ce qui nous a permis d'obtenir une concentration de $1,6 \times 10^{-5}$ M, suffisante pour avoir des images exploitables en fluorescence. Le potentiel zêta des nanocristaux fluorescents **23** est de $-22,8$ mV. Il augmente par rapport à celui des CNCox **19** ($-40,0$ mV), ce qui confirme par ailleurs le couplage covalent entre les deux molécules. Le DLS a révélé des nanoparticules fluorescentes de taille de l'ordre de 172 nm.

IV.7. Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons réalisé la fixation par liaison covalente d'un polymère d'amine (PEI 600Da) sur les nanocristaux de cellulose par amination réductrice. Ces complexes chargés positivement ont montré une très bonne capacité de complexation des siRNA avec un rapport siRNA/CNCx de 1,4%.

En parallèle et afin de vérifier l'internalisation de ces nanocristaux dans les cellules, la FITC a été fixée de manière covalente sur les CNCx au moyen de la PEI 600.

Chapitre V. Evaluation biologique.

Suivant les stratégies de synthèse développées au cours de ce projet de thèse, deux types d'évaluations biologiques *in vitro* ont été mis en place afin d'apprécier l'activité antitumorale des produits synthétisés :

- Les composés ou complexes (**3**, **9Zn**, **10Zn**, **14** – **17**, **curcumine I** et **piperlongumine**) pour les lignées cancéreuses du colon et de la prostate.
- Les composés (**19** et **21**), **siRNA** et **siRNA-HiPerFect** pour la lignée myoblastique murine de souris (C2C12).

V.1. Etude cytotoxique des composés **3**, **14**, **15**, **16** et **17**.

Cette partie de l'étude concerne les composés à base de nanocristaux de cellulose fonctionnalisés par la bêta cyclodextrine préalablement cationisée mais également les molécules non encapsulées qui sont utilisées comme contrôle : curcumine I, piperlongumine, **9Zn** et **10Zn**. Les méthodes développées pour évaluer l'activité biologique sont :

- la cytotoxicité directe, en ce qui concerne les composés ou complexes (**3**, **9Zn**, **10Zn**, **14**, **15**, **curcumine I** et **piperlongumine**).
- la cytotoxicité par illumination (PDT) pour les composés (**3**, **9Zn**, **10Zn**, **16**, et **17**).

V.1.1. Cytotoxicité directe.

La cytotoxicité directe a été réalisée sur les lignées cancéreuses du colorectal (HT29) et prostatiques (PC3 et DU145). Ces essais ont été effectués à la fois sur les principes actifs seules et sur leurs produits d'encapsulation. La viabilité cellulaire est évaluée par MTT.

V.1.1.1 Effet de la curcumine I et de son complexe de formation (complexe **14**).

Les tests biologiques ont été réalisés à 24 et 48 heures et en triplicat afin de confirmer la répétabilité des résultats. Les molécules à tester sont représentées sur la Figure 91.

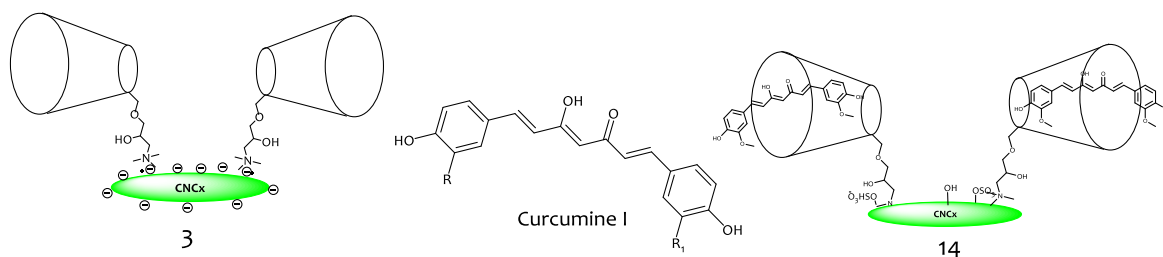
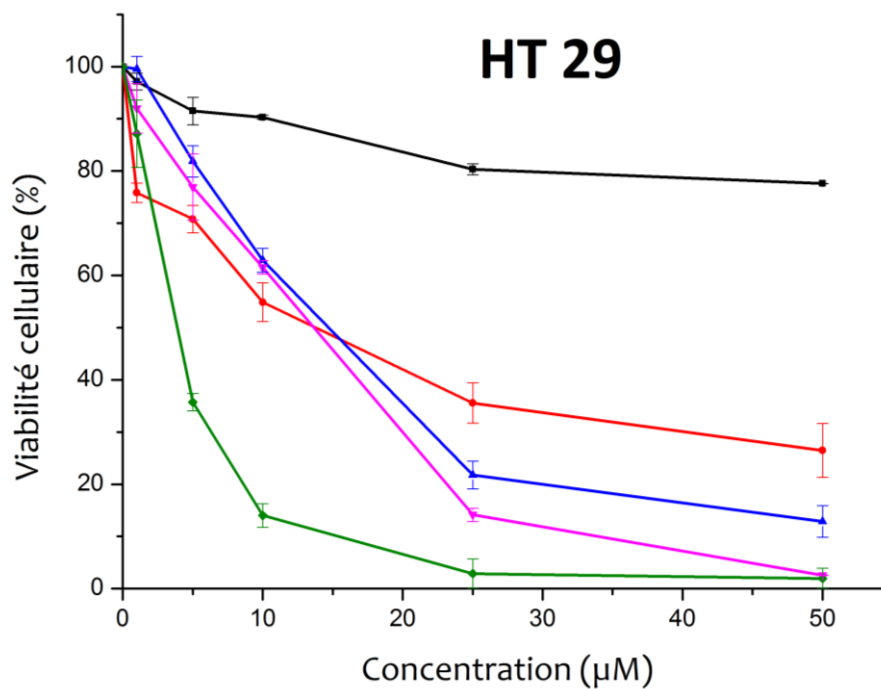
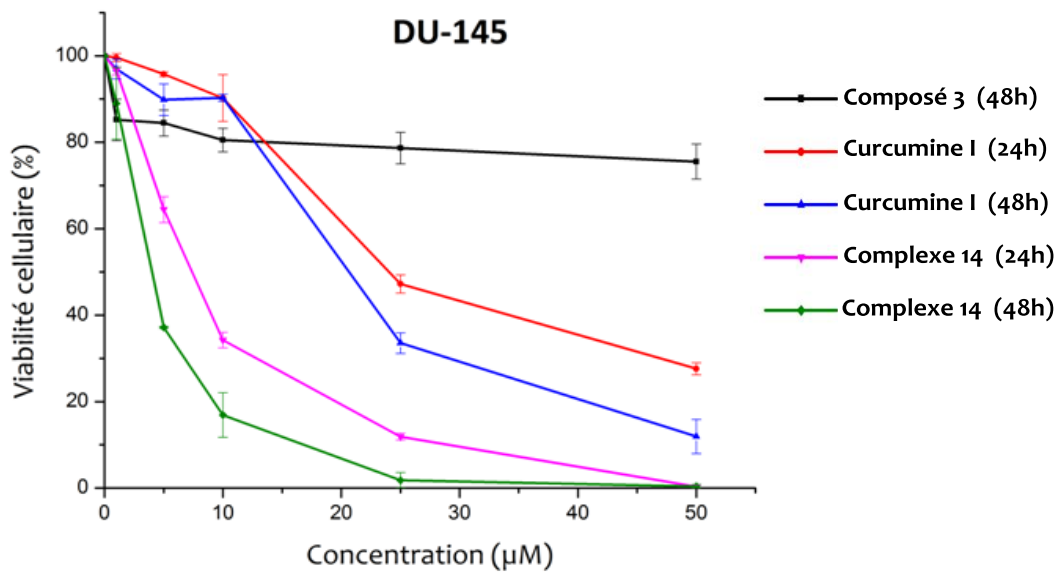


Figure 91 : Représentation du composés **3**, complexe **14** et de la structure de la curcumine I.

Les cellules ont été incubées avec des concentrations croissantes en curcumine. Exprimée en μM , l'efficacité des différentes molécules testées induisant une diminution de 50% de la viabilité cellulaire [IC₅₀].

Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 92.



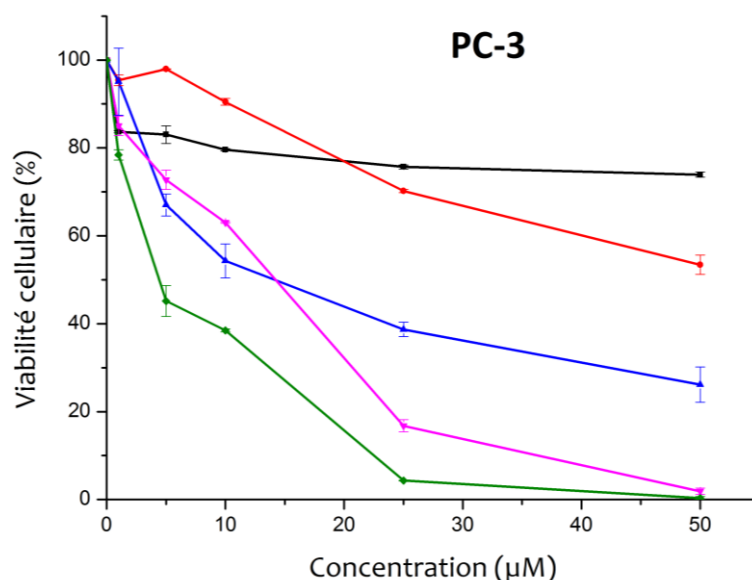


Figure 92 : Etude des effets dose dépendants et antiprolifératifs de la curcumine et des complexes **3** et le complexe **14** sur la viabilité des cellules PC3, DU145 et HT29 à 24h et 48h.

La Figure 92 montre que les nanoparticules (composé **3** ou CD/CNCx) n'entraînent pas d'effet cytotoxique pour les lignées cellulaires cancéreuses utilisées. C'est d'ailleurs un résultat très intéressant puisque un des critères fondamentaux évoqués sur la qualité d'un vecteur est rempli. Les résultats obtenus avec la curcumine I et le complexe **14** nous ont permis d'obtenir les valeurs d'[IC₅₀] dressées sur le Tableau 15ci-dessous :

Tableau 15 : Valeurs d'[IC₅₀] obtenues après 24 et 48h de traitement.

Produits à tester	IC ₅₀ (µM)					
	PC-3		DU-145		HT-29	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Curcumine I	55	10	25	18	12	15
Complexe 14	12,5	7,5	9	5,5	6	4,5

Les faibles valeurs d'[IC₅₀] sont caractéristiques d'effets antiprolifératifs significatives. Le complexe **14** a montré une efficacité plus importante comparé à la curcumine testée seule. Cet important effet cytotoxique du complexe **14** est trois fois plus supérieur à celui obtenu avec la curcumine I seule sur PC-3, DU-145 et HT-29. L'amélioration de l'effet de la curcumine liée aux nanocristaux de cellulose peut-être due non seulement à sa forte solubilisation dans l'eau mais aussi une meilleure pénétration dans les cellules. En thérapie anticancéreuse, la solubilisation et l'encapsulation de la curcumine grâce à des systèmes de nanovecteurs capables de la transporter dans la tumeur via l'effet EPR s'avère capitale pour avoir une activité antiproliférative intéressante. À partir des résultats obtenus, il semble que le complexe **14** présente un effet sur la prolifération des lignées cancéreuses colorectales et prostatique étudiées.

V.1.1.2 Etude de l'internalisation cellulaire par microscopie confocale.

L'absorption cellulaire est étudiée par microscopie confocale (Figure 93). Les lignées cellulaires PC-3, DU-145 et HT-29 sont traitées avec la curcumine libre ou liée au composé **3** (complexe **14**) sur des lamelles de verre (Nalge Nunc International, Rochester, New York) revêtues de gélatine (2%) à une densité de 2×10^5 cellules par puits. Les cellules non traitées représentent le contrôle positif.

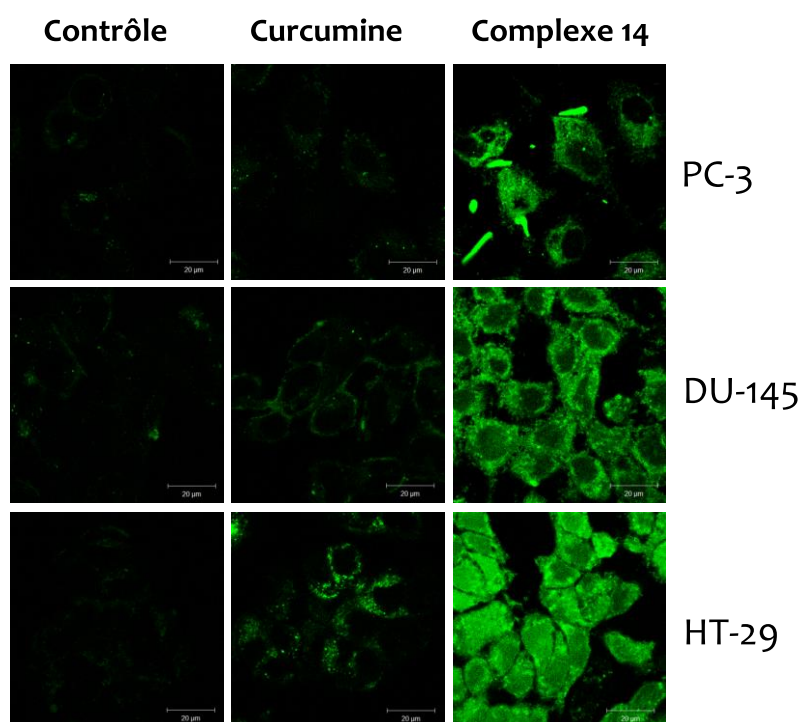


Figure 93 : Images de microscopie confocale des cellules PC-3, DU 145 et HT-29 avant traitement (contrôle) et après 4h de traitement avec la curcumine et le complexe **14**.

Après 4h d'incubation à 37°C en présence de curcumine I seule ou du complexe **14**, le milieu de culture initial est éliminé et les cellules sont lavées trois avec du PBS stérile. Du milieu de culture neuf est ensuite rajouté aux cellules et elles sont observées par microscopie confocal (LSM 510 META, Carl Zeiss, Germany). La fluorescence verte obtenue (ex : 480 –530 nm) résulte de la curcumine et les images obtenues au cours de cette expérience révèlent une accumulation intracellulaire de la curcumine aussi bien dans les cellules traitées avec la curcumine seule que dans les cellules traitées avec le complexe **14**. En outre, nous n'avons pas trouvé de différences entre les différentes lignées cellulaires utilisées dans les conditions de traitement. Mais elle est considérablement améliorée avec le complexe **14**. Ainsi, ces résultats ont donc montré l'intérêt de la vectorisation afin d'augmenter l'accumulation intracellulaire la curcumine et permettent d'expliquer la cytotoxicité trois fois supérieure de la curcumine véhiculée par les nanocristaux.

V.1.1.3 Effet de la piperlongumine et de son complexe de formation (complexe 15).

Les essais biologiques obtenus avec la piperlongumine et son complexe de formation **15** (Figure 94) ont été également réalisés à 24 et 48 heures et en triplicat. La viabilité cellulaire est obtenue par l'utilisation du test MTT.

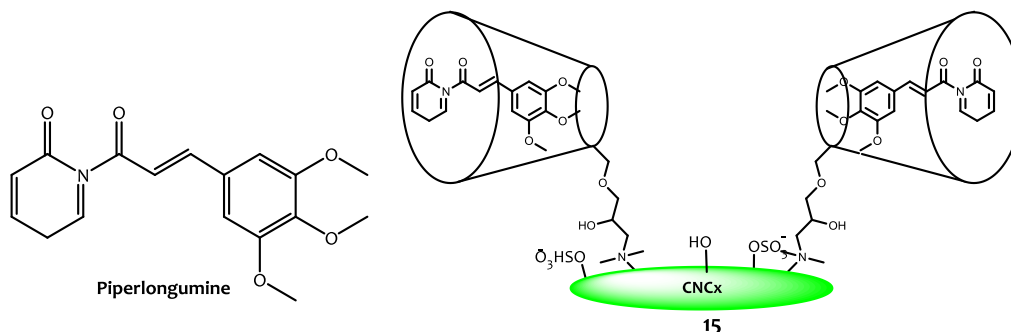
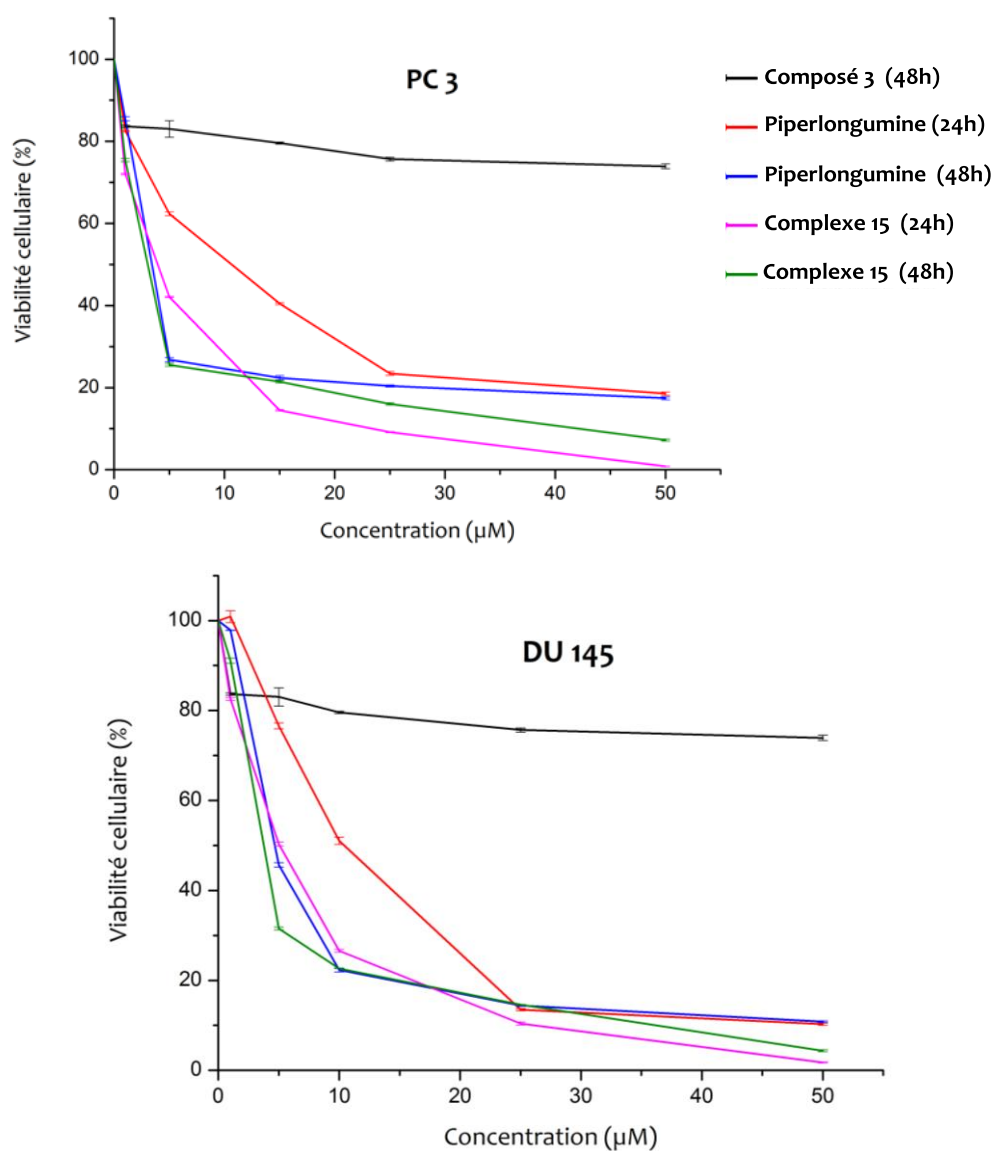


Figure 94: Structure chimique de la piperlongumine et le complexe 15.

Les résultats obtenus avec les molécules sont représentés sur la Figure 95.



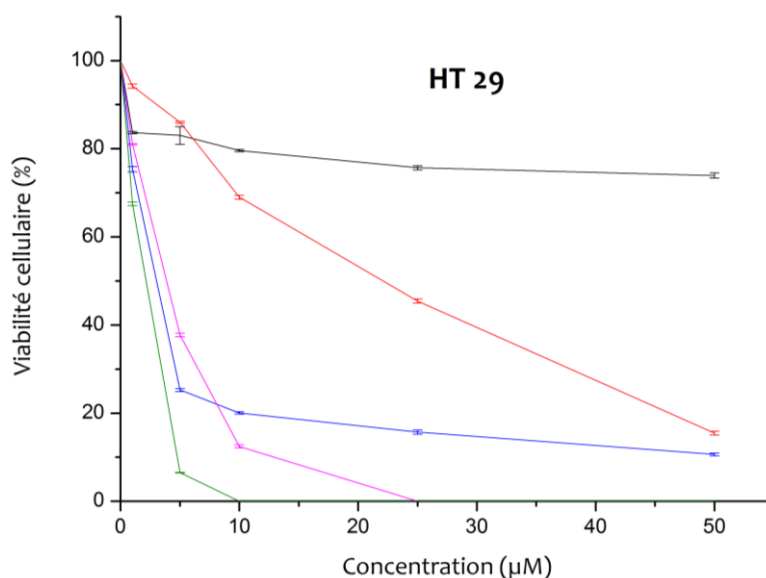


Figure 95 : Etude des effets dose dépendants et antiprolifératif de la piperlongumine et des composés **3** et le complexe **15** sur la viabilité des cellules PC3, DU145 et HT29 à 24h et 48h.

La Figure 95 nous a permis de déterminer les valeurs d'[IC₅₀] de la piperlongumine et son complexe de formation (complexe **15**). Ces valeurs sont dressées sur le Tableau 16 ci-dessous :

Tableau 16 : Valeurs d'[IC₅₀] obtenus après 24 et 48h de traitement.

	IC ₅₀ (µM)					
	PC-3		DU 145		HT-29	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Piperlongumine	10	4	12	6	23	3
Complexe 15	6	4	6	4	6	2

L'activité biologique de la piperlongumine fixée sur les nanocristaux est nettement plus élevée que celle de la piperlongumine seule surtout dans les résultats à 24h. Globalement l'effet cytotoxique de la piperlongumine est plus élevé que celui de la curcumine pour les trois lignées étudiées.

V.1.2. Cytotoxicité par la méthode PDT ou photocytotoxicité

L'évaluation biologique utilisant la technique PDT a été réalisée par le Docteur Jean Pierre MBAKIDI. L'effet photocytotoxique des composés **9Zn**, **10Zn** et les complexes **16** et **17** (Figure 96) est évalué par un test MTT après illumination.

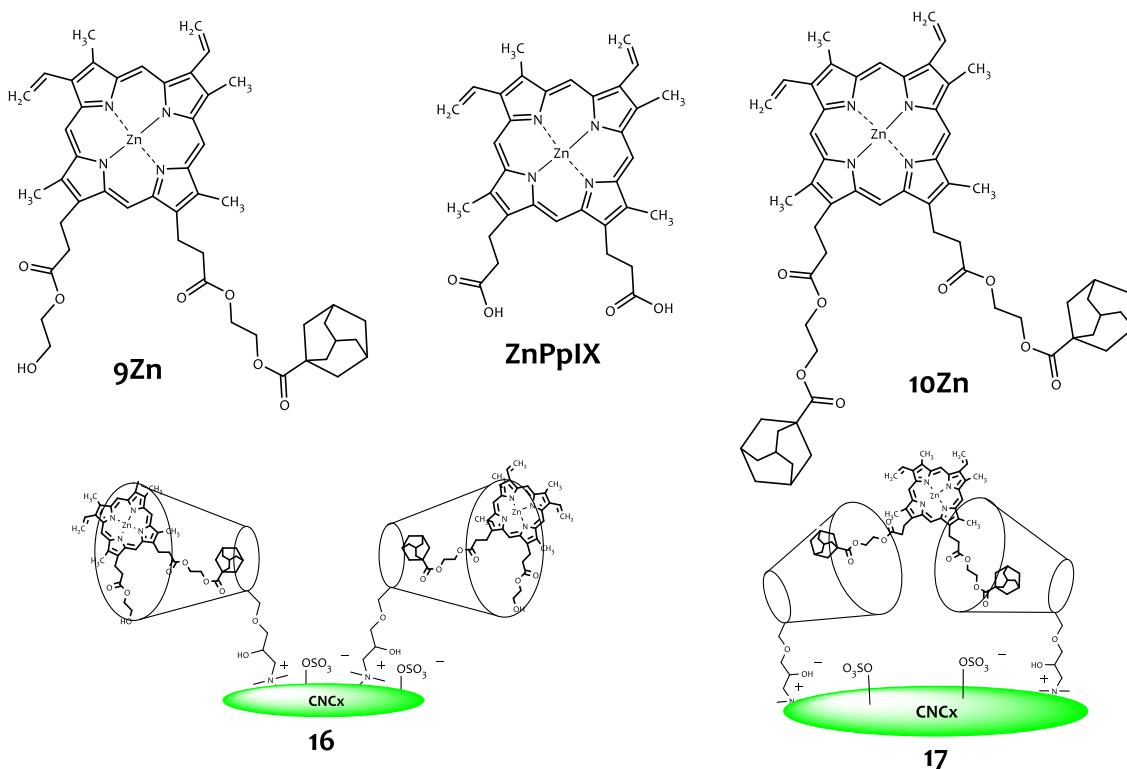


Figure 96 : Structure chimique des composés **9Zn**, **10Zn**, **ZnPPIX** et les complexes **16** et **17**.

Ces tests effectués sur la seule lignée cellulaire cancéreuse du colorectal (HT-29) ont été réalisés en présence ou en l'absence de la lumière. Pour évaluer la cytotoxicité intrinsèque des porphyrines testées, nous avons incubé les photosensibilisateurs à des concentrations allant de 0 à 2,5 μM sans illumination durant 48h. Dans la gamme de concentrations testées, nous observons une légère cytotoxicité à l'obscurité. Cependant, la viabilité cellulaire des cellules HT-29 reste supérieure à 70%, que les composés **9Zn** et **10Zn** soient libres ou complexés au composé **3**. Les résultats sont représentés sur la Figure 97.

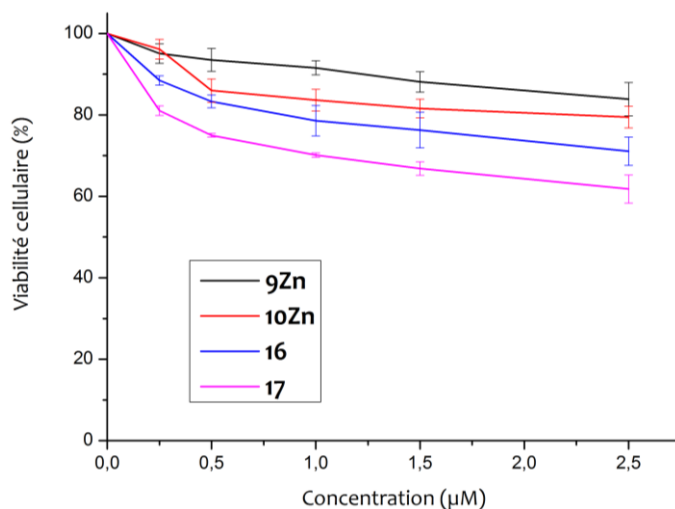


Figure 97 : Effet dose dépendant et antiprolifératif des composés **9Zn**, **10Zn** et les complexes **16** et **17** à l'obscurité à 48h.

La Figure 98 présente la photocytotoxicité des photosensibilisateurs après illumination. Comme cela a été observé au paragraphe V.1.1.1, la fixation des protoporphyrines sur les nanoparticules améliore de façon significative l'activité des protoporphyrines. Cependant, elle est plus importante avec le complexe 17. Ceci peut s'expliquer par une meilleure affinité du composé 10Zn avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire et une meilleure internalisation.

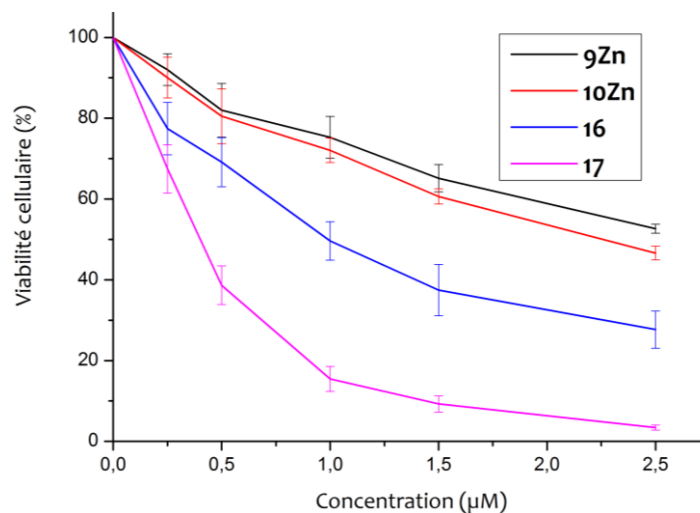


Figure 98 : Effet dose dépendant et antiprolifératif des composés 9Zn, 10Zn, les complexes 16 et 17 éclairés par une lumière blanche avec une fluence de 75 J/cm².

V.2. Etude cytotoxique et transfection des siRNA.

Cette partie de travaux a été réalisé en collaboration étroite avec l'Unité de Génétique Moléculaire Animale (UGMA). L'ensemble des expérimentations biologiques ont été réalisées par le Docteur Vincent GRASSOT.

En thérapie génique, la lipofectamineTM et l'HiPerFectTM sont deux transfectants de siRNA²³² couramment utilisés mais leur coût limite leur usage. Nous avons donc souhaité développer des nouveaux vecteurs nanoparticulaires peu onéreux, ayant une bonne efficacité de transfection et une toxicité faible vis-à-vis des cellules saines. Dans le cadre de ce travail, nous avons fixé les siRNA sur le composé 20 afin d'obtenir une plateforme thérapeutique (21) d'une part et d'autre part, la FITC a été fixée sur les nanocristaux (composé 23) afin de visualiser la capacité de ces nanoparticules à pénétrer dans les cellules (Figure 99).

²³²J. Böttger, K. Arnold, C. Thiel, C. Rennert, S. Aleithe, U. Hofmann, S. Vlaic, S. Sales, A. Shevchenko, M. Matz-Soja, Arch Toxicol, 2015, 89, 1579-1588.

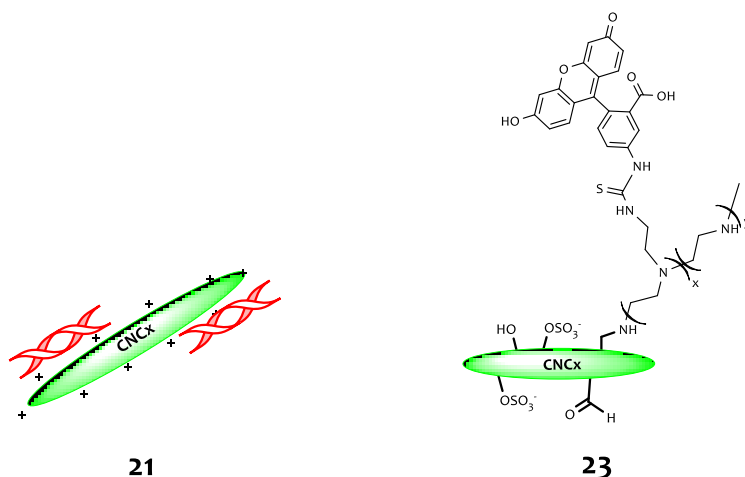


Figure 99 : Structure des composés **21** et **23**.

Après avoir synthétisé les deux plateformes, des essais biologiques *in vitro* ont été réalisés sur les lignées cellulaires C2C12 à 24h et à 72h. Ces tests biologiques ont pour objectif de montrer non seulement que les siRNA sont capables d'induire la mort cellulaire mais aussi que les CNCx :

- sont capables de protéger les siRNA
- internalisent les cellules par endocytose
- relarguent les siRNA dans les cellules.

V.2.1. Stabilité et test de la protection des siRNA par les nanocristaux.

Afin d'évaluer la stabilité des complexes siRNA-PEI-CNCx (**21**) et le rôle protecteur éventuel des PEI-CNCx (**20**) pour le siRNA vis-à-vis des protéases, nous avons utilisé une analyse par électrophorèse (Figure 100).

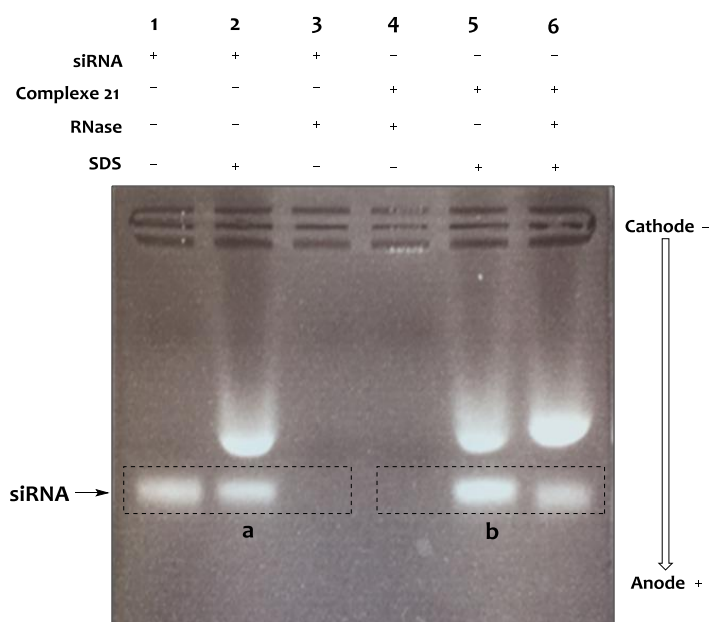


Figure 100: Electrophorèse des siRNA nus (a) et des siRNA complexés aux CNCx (b) sur gel d'agarose après interaction avec le bromure d'éthidium.

Les taches fluorescentes observées sont dues aux interactions entre le bromure d'éthidium et le siRNA. La fluorescence observée sur la ligne 1 permet de déterminer le niveau de migration de siRNA nus. Tandis que l'absence de fluorescence en présence de RNase (ligne 3), met en évidence l'effet dénaturant qu'ont les RNases sur les siRNA. L'absence ou pas de SDS (ligne 1 et 2) n'a pas de conséquence sur l'observation de taches : ce qui revient à dire que le SDS ne présente aucun effet dénaturant sur eux. Ce contrôle positif (compartiment **a**) nous a permis d'aborder l'étude sur le composé **21** (compartiment **b**). En effet, l'absence de fluorescence (ligne 4) indique que le tampon et l'inhibiteur de RNase ne dénaturent pas les siRNA complexés et le traitement avec le SDS (ligne 5) permet de détecter les siRNA complexés. Finalement, la fluorescence obtenue après traitement aux RNases (ligne 6) est caractéristique de la migration des siRNA complexés et montre que les siRNA n'ont pas été dégradés pas les RNases. Au vu des résultats obtenus, il convient de conclure que les nanoparticules élaborées ont un rôle protecteur vis-à-vis des siRNA killer contre la dégradation par les RNases.

Souhaitant étudier le relargage des siRNA complexés après internalisation des complexes **21** par la cellule, nous avons développé une étude en fonction du pH.

V.2.2. Relargage des siRNA complexés en fonction du pH

Les complexes ont été incubés à pH4 (pH endosomal) et à pH7 (pH physiologique). Après 2 heures d'incubation en présence du tampon HEPES, on procède à une centrifugation. Les surnageants des échantillons ont été dosée par nanodrop. Celui réalisé à pH physiologique ne révèle aucun relargage des siRNA, alors que celui de l'échantillon à pH4 nous ont permis d'obtenir un pourcentage de relargage de 45 % en siRNA. Le relargage des siRNA est donc facilité en milieu acide²³³, ce qui pourrait parfaitement correspondre à une internalisation des complexes par le système endosomal.

V.2.3. Internalisation des nanocristaux dans cellules par endocytose

Afin de mettre en évidence la pénétration des nanoparticules sur un type cellulaire de myoblaste murin de souris (C2C12), une étude par microscopie à épi-fluorescence a été réalisée en utilisant des nanocristaux de cellulose fonctionnalisés par la fluorescéine isothiocyanate. Les cellules ont été incubées avec les nanocristaux fluorescents (composé **23**) selon le protocole présenté dans la partie expérimentale. Parallèlement, les noyaux des cellules et les lysosomes ont été marqués respectivement grâce au DAPI et au lysotracker (Figure 101).

²³³L. Han, J. Zhao, X. Zhang, W. Cao, X. Hu, G. Zou, X. Duan, X-J. Liang, *ACS Nano*, 2012, 6, 7340-7351.

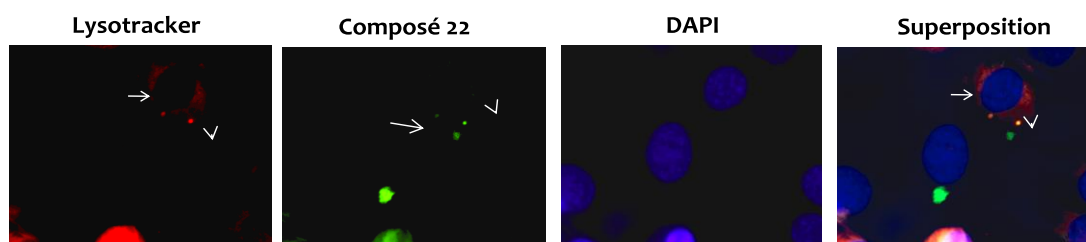


Figure 101 : Pénétration cellulaire des nanocristaux de cellulose dans les cellules C2C12.

Après superposition des clichés, on observe une tache jaune orangé caractéristique d'une colocalisation des composés **23** avec les vésicules endosomales. Ce résultat implique une internalisation des nanoparticules fluorescentes par le système endosomal et conforte l'hypothèse émise au paragraphe précédent. Les nanocristaux de cellulose peuvent donc être utilisés pour la vectorisation des siRNA killer sur les modèles cellulaires étudiés.

V.2.4. Viabilité cellulaire et induction de l'apoptose par les siRNA killer

Les siRNA killer ont été choisis en raison de leur capacité à induire l'apoptose et aussi pour suivre facilement leur relargage. L'effet cytotoxique du composé **21** sur la viabilité cellulaire de la lignée C2C12 a été évalué après 24 et 72h de traitement. Cet effet a simultanément été comparé à celui obtenu avec les siRNA complexés au transfectant commercial, HiPerFect et les cellules non traitées servent de contrôle (Figure 102).

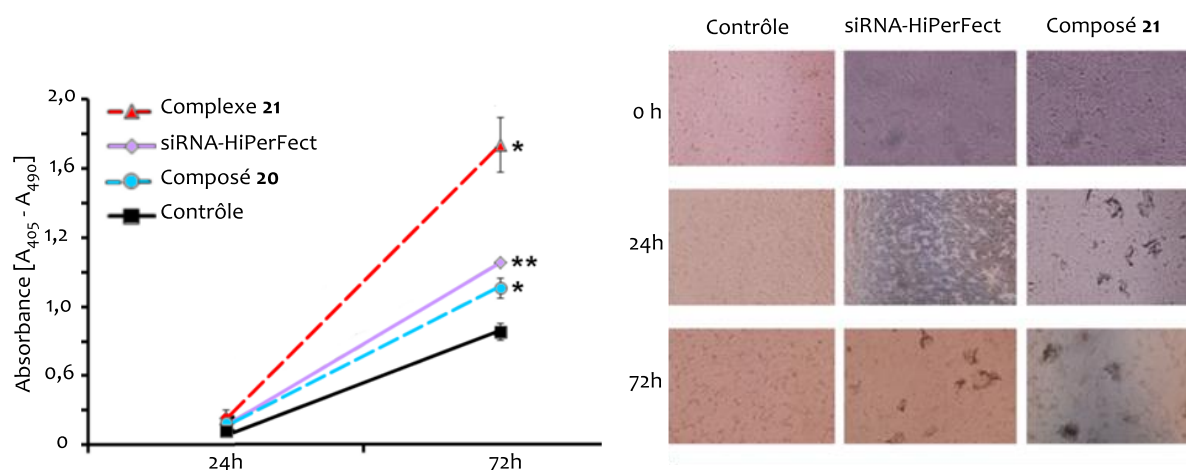


Figure 102 : Mort cellulaire au cours de la cinétique de traitement par rapport aux cellules non traitées.

Les cellules ont été observées avec une lumière blanche, sans coloration et au grossissement x100. La mort cellulaire suite au traitement des cellules avec les complexes de siRNA est observée dès 24h de traitement (> 75%). Ce ralentissement de la vitesse de prolifération cellulaire est significatif après 72h de traitement. Les résultats obtenus ont montré une efficacité des siRNA complexés aux nanocristaux de cellulose plus importante que celle obtenue avec les siRNA associés à l'HiPerFect. Et même si les nanocristaux de cellulose cationiques (composé **20**) de départ induisent un léger effet vis-à-vis des lignées C2C12, cet effet reste tout de même inférieur à

celui obtenu avec les siRNA-HiPerFect. Cette activité cytotoxique du composé **20** peut s'expliquer aussi par la légère toxicité de PEI²³⁴. Ainsi, la mort cellulaire engendrée par le composé **21** pourrait être liée à une meilleure délivrance des siRNA dans les cellules ou à la synergie des effets des siRNA et du vecteur (composé **20**).

Estimant que la mort cellulaire est induite par apoptose, nous nous sommes proposés de déterminer le niveau d'expression de la caspase 8 (caractéristique du mécanisme d'apoptose extrinsèque) et de la caspase 9, caractéristique du mécanisme d'apoptose intrinsèque (voir Figure 103).

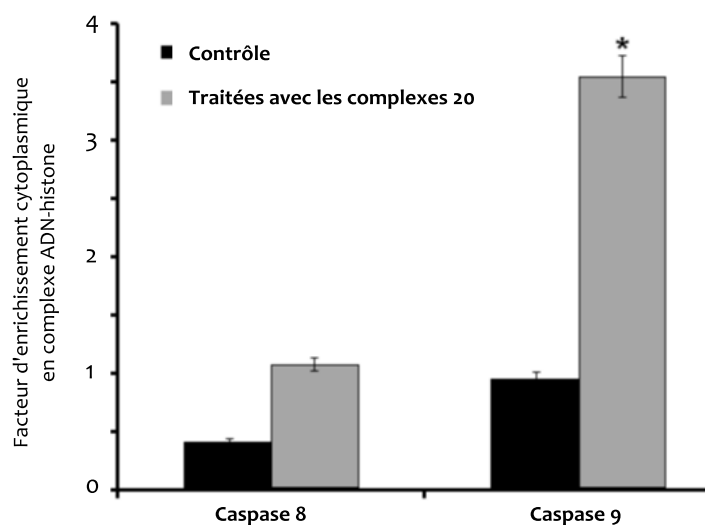


Figure 103 : Expression des caspases en fonction du facteur d'enrichissement.

Les résultats obtenus montrent un pic transcriptomique important de la régulation de gène caspase 9 à 24h comparé à celui de la caspase 8 correspondant à une apoptose induite par la voie intrinsèque. Ce résultat est bien corrélé avec le niveau d'apoptose observé précédemment à 72h.

V.3. Conclusion

Au cours de ces évaluations biologiques, nous avons donc montré que les nanocristaux de cellulose étaient des vecteurs potentiellement intéressants pour le transport de drogue hydrophobes (curcumine, piperlongumine, ZnPPIX) mais également pour la transfection de gène. Ces résultats préliminaires sont ainsi encourageants pour poursuivre le développement de cette nanoplateforme.

²³⁴S. Nimesh, *Current Clinical Pharmacology*, 2012, 7, 121-130.

Conclusion générale & Perspectives

Conclusion et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons, pour la première fois, réalisé la fixation de principes actifs naturels hydrophobes et de siRNA sur les nanocristaux de cellulose issus de la biomasse végétale. Dans une première partie du travail, nous nous sommes attachés à extraire et à modifier chimiquement les principes actifs afin de faciliter leur complexation avec le nanovecteur. Ainsi, les curcumines sont obtenues par extraction à l'acétone et les dérivés métallés de la protoporphyrine IX sont obtenus par une série de modifications : tout d'abord par l'éthylène glycol puis par le chlorure d'adamantane carbonyle avant d'être métallés au zinc. Dans la perspective de ciblage de mitochondrie, la synthèse de cations triphénylphosphonium-adamantane a été réalisée. Les composés purs et modifiés ont été caractérisés par RMN ^1H , spectrométrie de masse, FTIR et spectroscopie UV-Visible.

Les nanocristaux de cellulose (CNCx) sont quant à eux, issus des zones cristallines de la cellulose après hydrolyse acide du coton. Un couplage ionique entre ces derniers et la β -cyclodextrine préalablement modifiée par un ammonium quaternaire a permis de fixer les molécules actives (curcumine, piperlongumine et les dérivés métallés de la PpIX) grâce à une réaction de complexation entre la cavité hydrophobe de la cyclodextrine et chaque actif. Ce qui a conduit à l'élaboration d'une première plateforme thérapeutique (1). En parallèle, la fixation des siRNA killer sur les nanocristaux de cellulose a conduit à l'élaboration de la seconde plateforme 2 du projet. Pour ce faire, nous avons tout d'abord oxydé les CNCx afin d'introduire des fonctions aldéhydes à la surface des nanocristaux. Ensuite, grâce à une réaction d'amination réductrice, la polyéthylèneimine est couplée aux nanocristaux de manière covalente. Les nanocristaux cationiques résultants ont permis de complexer les siRNA killer chargés négativement grâce aux interactions électrostatiques conduisant ainsi à des complexes stables en solution aqueuse.

Les méthodes de purification utilisées (chromatographie, centrifugation, dialyse et précipitation) ont permis d'obtenir des produits purs avec d'excellents rendements. Tous les nanovecteurs ont été caractérisés grâce à l'étude de leur taille (DLS, Microscopie électronique à transmission), de leur charge (potentiel zêta) et des fonctions organiques présentes en surface (FITR).

L'évaluation biologique *in vitro* de ces composés seuls et complexés à la plateforme 1 a ensuite été réalisée par l'étude de la cytotoxicité sur les lignées cancéreuses de la prostate (PC-3 et DU 145) et du colon (HT-29) pour les composés complexant la curcumine et la piperlongumine. L'étude de la phototoxicité des dérivés de protoporphyrines IX de zinc fixées sur la plateforme 1 a été réalisée uniquement sur la lignée HT-29. Les résultats obtenus dans les deux cas de traitement montrent une amélioration très nette de l'effet cytotoxique lorsque les principes actifs sont liés

aux nanocristaux de cellulose. Ce qui peut être dû non seulement à la forte solubilisation des drogues dans l'eau mais aussi à une meilleure pénétration dans les cellules comme le montre les images de microscopie confocale.

Dans un cadre de thérapie génique, la plateforme 2 a été utilisée pour la première fois afin de montrer son potentiel à transférer des gènes, des siRNA à l'intérieur des cellules cancéreuses C2C12 grâce aux charges positives de la polyéthylèneimine. Même si le nanovecteur engendre une légère toxicité, il en résulte tout d'abord que les siRNA killer induisent bien l'apoptose intrinsèque des lignées du myoblaste murin de souris mais il est nécessaire d'affirmer que les nanovecteurs cationiques jouent un rôle protecteur et ont montré une bonne efficacité de relargage des siRNA killer dans les cellules.

Par la suite et afin de compléter l'étude, nous envisageons de réaliser des cinétiques sur des temps plus courts. Nous souhaitons également valider le concept sur d'autres modèles cellulaires. Des tests *in vivo* sur des souris portant des tumeurs xénogreffées seront réalisés pour valider le concept de ciblage des tumeurs par l'effet EPR. Parallèlement, des études de ciblage de la mitochondrie seront réalisées avec les plateformes comprenant à la fois le principe actif et l'agent de ciblage à base de triphénylphosphonium.

Partie expérimentale

V.4. Réactifs et solvants

L'origine des réactifs et des solvants utilisés au cours de ce travail sont représentés sur le tableau 21.

Réactifs et solvants	fournisseurs	Abréviations
Acétate d'éthyle 99%	Carlo Erba	AcOEt
β -cyclodextrine	TCI	β -CD
Acétate de zinc	Acros	(AcO) ₂ Zn
Acide acétique	Prolabo	AcOH
Acide chlorhydrique 37 %	Aldrich	HCl
Acide sulfurique 96 %	VWR	H ₂ SO ₄
Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium	Promega	MTT
chlorure adamantane carbonyle	Alfa Aesar	-
3-bromopropanol	Aldrich	-
acide 6-bromo hexanoïque	Alfa Aesar	-
Glycidyltrimethyl ammonium chloride	Sigma Aldrich	GTAC
Chloroforme 99,9 %	SDS	CHCl ₃
Cyanoborohydrure de sodium 95%	Acros	NaBH ₃ CN
Dichlorométhane 99,8 %	SDS	CH ₂ Cl ₂
Diméthylformamide 99 %	Acros	DMF
4-Diméthylaminopyridine 99%	Acros	DMAP
Diméthylsulfoxyde	Acros	DMSO
Ethylène glycol	Alfa Aesar	-
Fluorescéine isothiocyanate 90%	Aldrich	FITC
Ethanol absolu	VWR	EtOH
Ether de pétrole	VWR	EP
Ether diéthylique	VWR	6
Hydrogénocarbonate de sodium 99 %	Prolabo	-
Hydroxyde d'ammonium 28-30 %	Acros	-
Hydroxyde de sodium 98 %	Alfa Aesar	NaOH
Iodure de potassium	Acros	KI
Méthanol	VWR	MeOH
Polyéthylène imine 600 Da	Alfa Aesar	PEI 600 Da
Periodate de sodium	Sigma-Aldrich	NaIO ₄
Propan-1-ol 99,8%	Rectapur	PrOH
Toluène 99 %	VWR	-
Thiosulfate de sodium \geq 99%	Acros	Na ₂ S ₂ O ₃
Triphénylphosphine	Alfa Aesar	P(Ph) ₃
Adamantanol 98%	Alfa Aesar	-
Protoporphyrine IX \geq 95%	Sigma Aldrich	PpIX

V.5. Chromatographie

V.5.1. Chromatographie sur couche mince : CCM

La pureté des produits ainsi que le suivi des réactions sont contrôlés par CCM, des plaques d'aluminium recouvertes de silice Kieselgel 60F₂₅₄ de 0,2 mm d'épaisseur (MERCK) ont été employées pour la chromatographie en phase normale. La révélation des plaques est effectuée :

- soit par observation directe pour les composés colorés,
- soit sous lampe UV (254 nm) pour les composés conjugués.

V.5.2. Chromatographie sur colonne

Les purifications sont réalisées en phase normale. Les colonnes ont un diamètre de 2 à 5 cm et sont conditionnées sur 20 à 25 cm de hauteur avec de la silice (gel de silice 60 Merck de granulométrie 15 à 40 µm) dispersée dans le mélange choisi.

V.5.3. Chromatographie sur plaques préparatives

Les chromatographies sur plaques sont réalisées par étalement d'un gel de silice (80 g de silice 60 PF₂₅₄ dispersés dans 220 mL d'eau) en une couche de 2 mm d'épaisseur sur six plaques de verre (20 x 20 cm) alignées sur un banc. Après séchage à l'air libre durant 15 heures, les plaques sont finalement activées 2h à l'étuve (100 °C) avant usage.

V.6. Analyses

V.6.1. UV-Visible

Les spectres sont réalisés sur un spectrophotomètre AnalytikaJena SPECORD 210. Tous les spectres sont effectués à l'aide de cellules en quartz de 1 cm de trajet optique. Les longueurs d'onde correspondant aux absorbances maximales λ_{\max} sont exprimées en nm et les coefficients d'absorption molaire en L.mol⁻¹.cm⁻¹ ou M⁻¹.cm⁻¹.

V.6.2. Infrarouge (IR)

Les spectres IR sont réalisés à l'aide d'un appareil Perkin Elmer FTIR Spectrum 1310 sur des échantillons conditionnés en pastilles de KBr (KBr/produit : 180/4 mg) et les nombres d'onde sont exprimés en cm⁻¹.

V.6.3. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un appareil Brücker DPX-400, respectivement à avec une fréquence de 400,13 ou 500,15 MHz pour le proton et de 100,62 pour le carbone, à la plateforme SCRABL de l'institut GEIST de l'Université de Limoges. Les déplacements chimiques

sont exprimés en ppm en prenant le tétraméthylsilane (TMS) comme référence interne, les constantes de couplage sont mesurées en hertz (Hz). Les abréviations retenues sont : **s** (singlet), **d** (doublet), **dd** (double doublet), **dél** (doublet élargie), **t** (triplet), **m** (multiplet).

V.6.4. Spectrométrie de masse (Maldi)

Les spectres de masse ont été effectués à l'Université de Limoges. Les spectres Maldi ont été obtenus grâce à un spectromètre « 4800 MALDI TOF/TOF Analyser » équipé d'un laser de type (ND : YAG) d'une longueur d'onde 355 et de pulsation (3 à 7 ns).

V.6.5. Microscopie électronique à transmission (MET)

Les photos ont été réalisées au SPCTS de l'université de Limoges par Pierre Carles. Elles ont été obtenues à l'aide d'un microscope électronique à transmission JEOL 2010, par observation avec une tension accélératrice de 200 kV. Les suspensions ont été déposées sur une grille de cuivre (300 mesh) avec membrane de carbone et séchées à l'air libre durant 2 heures.

V.6.6. Microscopie confocale

Les photographies ont été obtenues à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (LSM 510 META, Carl Zeiss, Allemagne) à une longueur d'onde d'excitation de 480 nm et à une longueur d'onde d'émission de 530 nm. L'acquisition et l'analyse des images ont été réalisées avec le logiciel Zeiss LSM logiciel Image Browser (Carl Zeiss).

V.6.7. Diffraction des rayons X

Le spectre a été réalisé au SPCTS de l'université de Limoges par le Dr. Laval, à l'aide d'un Diffractomètre à Rayon X, D5000 Brüker.

V.6.8. Analyse élémentaire

L'analyse a été réalisée suivant la méthode CHNS avec un standard de type BBOT grâce à un appareil « THERMO QUEST ». L'hélium Alpha gaz 2 et l'oxygène Alphagaz 2 sont les gaz utilisés au cours de l'analyse.

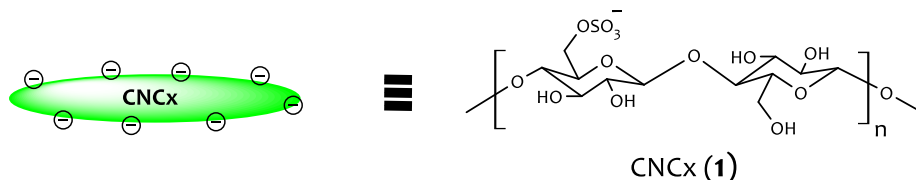
V.6.9. DLS – Potentiel zêta

La distribution en taille, les indices de polydispersité et le potentiel zêta des nanoparticules ont été mesurés au sein du laboratoire grâce à un appareil « Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, Royaume-Uni ». Pour la mesure du DLS, chaque échantillon a été analysé en triple à 20°C et à un angle de diffusion de 173°C. Les données de potentiel zêta à 20°C et 150 Vont été recueillies à partir de la mobilité électrophorétique et en utilisant le modèle de Smoluchowski.

L'eau pure a été utilisée comme milieu de dispersion de référence. L'instrument a été calibré avec un Malvern -68 mV standard avant chaque cycle d'analyse.

V.7. Synthèses

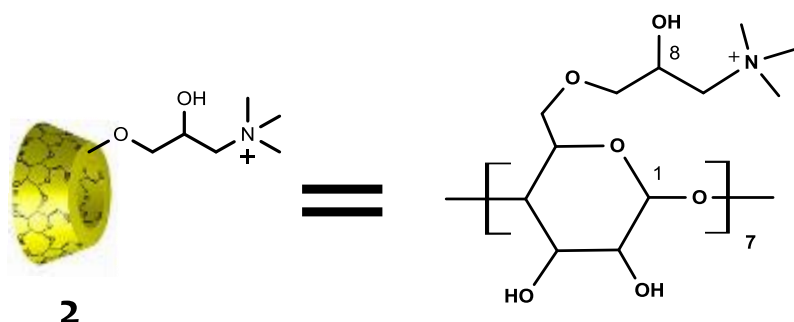
V.7.1. Synthèses des nanocristaux de cellulose (1).



La synthèse des nanocristaux de cellulose (CNCx) est réalisée par hydrolyse acide des zones amorphes de la cellulose du coton. 1 g de coton hydrophile est mis en présence de 20 ml de solution d'acide sulfurique à 64% en masse et porté à 45°C sous agitation magnétique pendant 45 mn. La solution légèrement visqueuse obtenue est refroidie puis diluée dans 150 ml d'eau déminéralisée. Après deux centrifugations successives (3700 rpm, 10 mn), le surnageant obtenu est purifié par dialyse (coupure de membrane, 6-8 kDa). Au bout de 5 jours, la suspension est concentrée à 1 mg/ml. Un aliquot de la suspension est lyophilisé afin de calculer un rendement massique de 60%.

- **IR** (cm^{-1}): 3340 (νOH); 2896 (νCH); 1640 (δOH); 1430 (δsCH_2); 1368 (δCH); 1335 (δOH) (dans le plan); 1317 (CH_2 ou $\delta\text{C-O-H}$); 1282 (δCH); 1280 (SO_3H); 1201 ($\nu\text{sC-O}$: cycle pyranose); 1158 ($\nu_{\text{as}}\text{C-O-C}$: pont); 1104 (δOH : cycle symétrique ou ν_{as} : cycle); 1057 ($\delta\text{C-O-C}$: cycle pyranose); 1032 ($\gamma\text{C-O}$: C-6); 898 (ν_{as} : cycle asymétrique); 825 (SO_3H); 710 (γOH (asymétrique)).
- **Potentiel zêta** : $\zeta = -55,5 \pm 0,7$ mV
- **DLS** : $141,7 \pm 0,2$ nm
- **MET**: $L = 100 - 200$ nm; $l = 10 \sim 20$ nm.

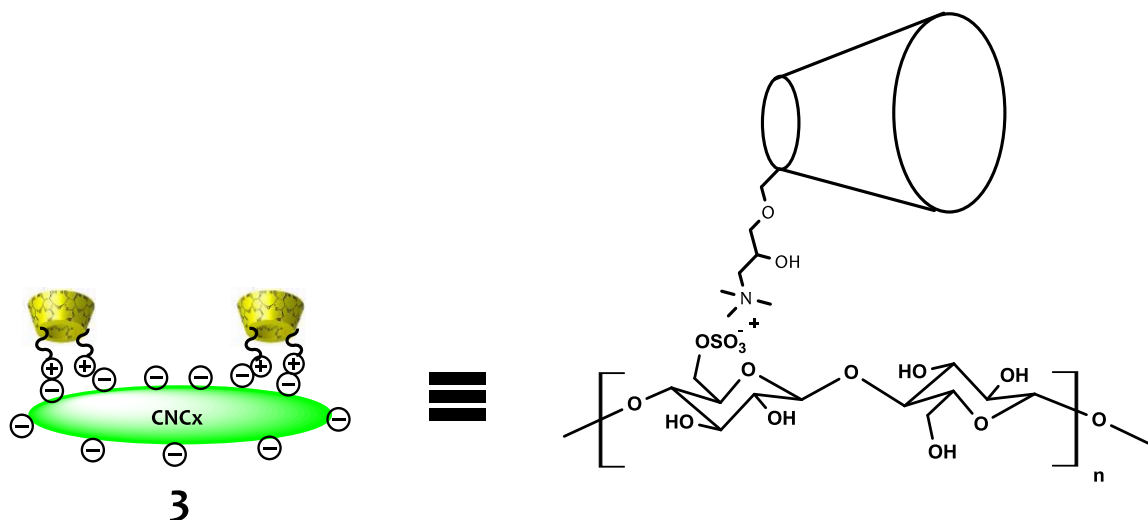
V.7.2. Synthèse de la β -cyclodextrine cationique (2).



Dans un ballon de 100 ml contenant 200 mg β -cyclodextrine (β -CD) dissous dans 10 mL d'eau distillée est ajoutée goutte à goutte une solution de NaOH (2M) jusqu'à pH 12. Ensuite, 1 ml (6,29mmol ; 35 équiv) de glycidyltriméthylammonium chloride (GTAC) est additionné. Le milieu réactionnel est porté sous agitation magnétique à 50°C. Après 4 jours de réaction, le pH est ramené jusqu'à 6 par addition d'une solution d'acide chlorhydrique (2M). Le produit 2 est purifié par dialyse (seuil de coupure 500 Da) pendant 26 heures. Un aliquot de chaque solution est lyophilisé.

- **IR** (cm^{-1}): 3306 (ν_{OH}); 2943 (ν_{CH_2}); 1640 (δ_{OH}); 1478 ($(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$); 1352 (δ_{CH}); 1335 (δ_{OH} (dans le plan)); 1317 (CH_2 ou $\delta_{\text{C-O-H}}$); 1282 (δ_{CH}); 1280 (SO_3H); 1201 ($\nu_{\text{C-O}}$: cycle pyranose); 1147 ($\nu_{\text{as C-O-C}}$: pont); 1102 (δ_{OH} : cycle symétrique ou ν_{as} : cycle); 1046 ($\delta_{\text{C-O-C}}$: cycle pyranose).
- **Analyse Élémentaire** : N (5,5 %), C (46 %), H (8 %) et O + N (42 %).
- **RMN ^1H** (D_2O) : $\delta_{\text{ppm}} = 5,06$ d ($J = 4\text{Hz}$, 1H, H_1); 4,28 dd ($J = 5,6$ et 5,9Hz 1,7H, H_8).

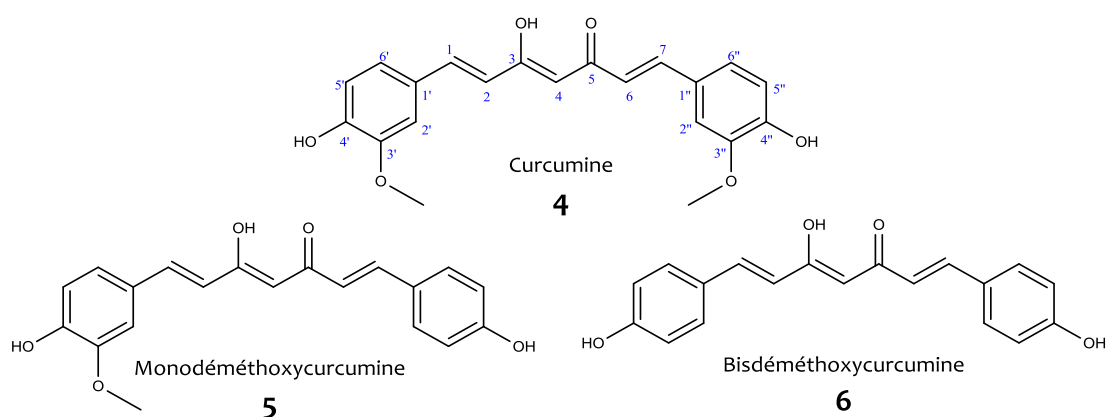
V.7.3. Synthèse des composés Cyclodextrine/Nanocristaux de cellulose (3).



Dans un erlenmeyer de 100 ml contenant 10 mL (soit 10 mg) de la solution aqueuse de β -cyclodextrine cationique, 10 mL (soit 10 mg) de nanocristaux d'une solution de nanocristaux de cellulose **1** sont additionnés. La réaction est agitée à température ambiante. Après 12h de réaction, le produit **3** obtenu est purifié par centrifugation (13000 rpm, 10 mn), le culot est ensuite redispersé dans 10 mL d'eau distillée puis dilué à 1 mg/mL.

- **Potentiel zêta** : $\zeta = -41 \pm 1,5$ mV
- **DLS** : $198,1 \pm 5,1$ nm

V.7.4. Extraction des curcumines (4, 5 et 6).



5 g de poudre séchée de *Curcuma longa* sont additionnés à 100 mL d'acétone. Le mélange est porté à reflux sous agitation magnétique pendant 30 mn. Après filtration, le précipité est à nouveau additionné à 100 mL d'acétone. L'ensemble est porté à reflux sous agitation pendant 30 mn. Les deux filtrats obtenus sont rassemblés et évaporés à sec. Le produit brut obtenu est une huile visqueuse de couleur jaune. Le brut réactionnel est tout d'abord pré-purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice et les curcuminoïdes obtenus sont purifiés par chromatographie sur plaques préparatives (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ 95/5). Les curcumines I, II et III sont obtenues avec des masses respectives de 60, 22 et 11 mg.

- **CCM** ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$: 95/5) :
 - Curcumine I ($R_f = 0,6$), Curcumine II ($R_f = 0,5$) et Curcumine III ($R_f = 0,4$).

- **MSMS, ESI**, mode négatif:

	Masse trouvée (g.mol^{-1})	Masse théorique (g.mol^{-1})
- Curcumine I	: 367,2	368,12
- Curcumine II	: 337,2	337,11
- Curcumine III	: 307,2	307,10

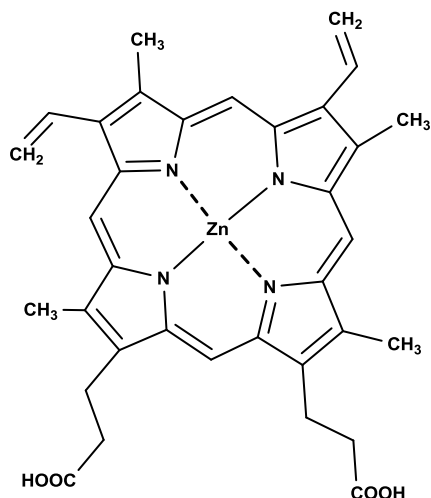
- **UV/Visible** (CHCl_3) λ en nm ($\epsilon \cdot 10^{-4}$) :

- Curcumine I: 422 (2,9)
- Curcumine II : 419 (1,7)
- Curcumine III: 414 (2,2)

- **RMN ^1H** (DMSO):

- Curcumine I : $\delta_{\text{ppm}} = 7,55 \text{ d } (J = 15,8 \text{ Hz, H}_{1,7})$; $7,32 \text{ d } (J = 15,8 \text{ Hz, H}_{2,6})$; $7,15 \text{ dd } (J = 8,0 \text{ Hz et } J = 1,5 \text{ Hz, H}_{6,6'})$; $6,83 \text{ d } (J = 8,5 \text{ Hz, H}_{5,5'})$; $6,75 \text{ s } (H_4)$; $3,83 \text{ s } (2 \times \text{OCH}_3)$.

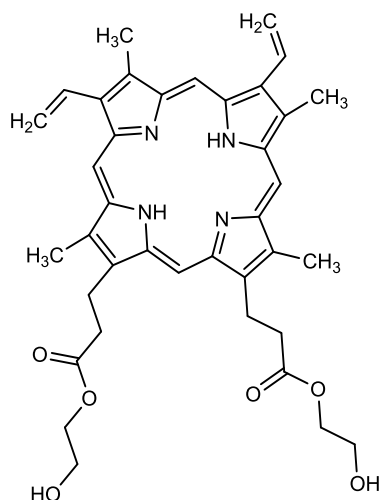
V.7.5. Synthèse de la protoporphyrine de zinc (ZnPpIX).



Dans un ballon de 100 ml, 10 mg (0,0178 mmol) de protoporphyrine IX sont dissous dans 45 ml de DMSO. On introduit ensuite 40 mg d'acétate de zinc (0,178 mmol ; 10 équiv). Le milieu réactionnel est agité à 80°C. Après 1h30 de réaction, le produit métallé est précipité dans un volume de 200 mL d'eau déminéralisée pendant 30 mn et purifié par centrifugation (3700 rpm ; 10 mn). Cette manipulation est répétée deux fois afin d'éliminer les sels. Le rendement de la réaction est quasi quantitatif (11 mg ; 98%).

- **UV/Visible** (DMSO), λ en nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) : 423 (118,5) ; 549 (10,7) ; 586 (10,01).
- **SM, MALDI-Tof** (m/z) : 625,27 g.mol⁻¹.

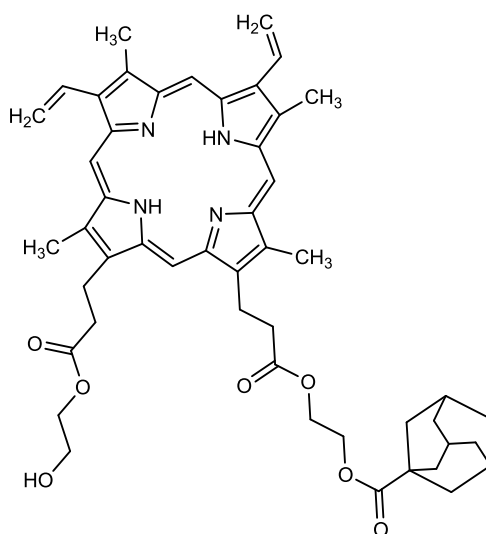
V.7.6. Synthèse de la protoporphyrine IX bis (hydroxy éthyl ester) (8).



100 mg (0,178 mmol) de protoporphyrine IX sont dissous dans un erlenmeyer contenant un excès d'éthylène glycol (5 mL), 100 μ L d'acide sulfurique concentré 96% sont ensuite additionnés. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 1h30. Un volume de 100 mL de chloroforme est additionné au lieu réactionnel. La phase organique est lavée à l'eau (4 x 100 mL) afin d'éliminer l'éthylène glycol en excès. Après évaporation à sec, le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur couche mince préparative ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$: 95/5). Le produit **8** est obtenu avec un rendement de 90%.

- **CCM** : $R_f = 0,59$ ($\text{CHCl}_3 / \text{EtOH}$: 95/5).
- **SM, MALDI-Tof** (m/z) : 650,32 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- **UV/Visible** (CHCl_3) λ en nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) : 409 (109,8), 506 (8,6), 542 (7,5), 578 (5,4), 631 (3,3).
- **RMN ^1H** (CDCl_3) : $\delta_{\text{ppm}} = 10,19$ s (1H, $\text{H}_{\text{mésO}}$) ; 10,14 s (1H, $\text{H}_{\text{mésO}}$) ; 10,05 s (1H, $\text{H}_{\text{mésO}}$) ; 10,02 s (1H, $\text{H}_{\text{mésO}}$) ; 8,27 dd ($J = 17,8$ et 11,5Hz, 2H, H_{21}) ; 6,37–6,19 dd ($J = 17,8$ et 11,5Hz, 2H, H_{22}) ; 4,39 t ($J = 7,7$ Hz, 4H, H_α) ; 4,16 m (4H, H_β) ; 3,71 s (3H, $\text{H}_{\text{méthyle}}$) ; 3,69 s (3H, $\text{H}_{\text{méthyle}}$) ; 3,62 s (3H, $\text{H}_{\text{méthyle}}$) ; 3,61 s (3H, $\text{H}_{\text{méthyle}}$) ; 3,57 m (4H, H_b) ; 3,32 t ($J = 7,7$ Hz, 4H, H_a) . -3,79 s (2H, NH_{int}).

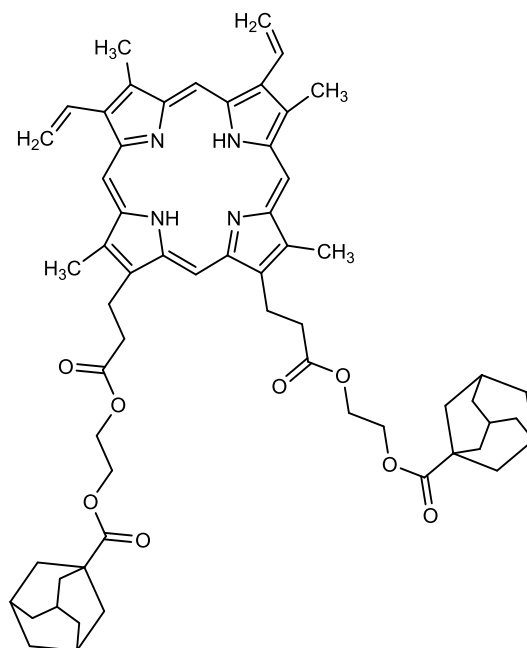
V.7.7. Synthèse de la protoporphyrine IX adamantane carboxy hydroxy éthyl ester (9).



Dans un erlenmeyer de 100 mL, 50 mg (0,077 mmol) du composé **8** sont solubilisés dans 20 mL de chloroforme. Une solution de 2 mL de chlorure d'adamantane carbonylé (15,3 mg ; 0,077 mmol ; 1 équivalent) est ajoutée goutte à goutte en présence de DMAP (94 mg ; 0,77 mmol ; 10 équivalent). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 1h30. Après évaporation du solvant le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur plaque préparative (éluant : CHCl₃/EtOH 95/5). Le produit **9** est obtenu avec un rendement de 95% (60 mg ; 0,073 mmol).

- **CCM** : R_f = 0,68 (CHCl₃ / EtOH: 95/5).
- **SM, MALDI-Tof** (m/z) : 812,42 g.mol⁻¹
- **UV-Visible** (CHCl₃) λ en nm (ε x 10⁻⁴) : 408 (125,6), 506 (10,1), 542 (8,1), 578 (5,0), 631 (3,5).
- **RMN ¹H** (CDCl₃) : δ_{ppm} = 10,25 s (1H, H_{mésos}) ; 10,19 s (1H, H_{mésos}) ; 10,11 s (1H, H_{mésos}) ; 10,08 s (1H, H_{mésos}) ; 8,27 – 8,34 dd (J = 17,8 et 11,5Hz, 2H, H₂₁) ; 6,41–6,22 d (J = 17,8 et 11,5Hz, 2H, H₂₂) ; 4,39 m (4H, H_α) ; 4,13 m (4H, H_β) ; 3,75 s (3H, H_{méthyle}) ; 3,73 s (3H, H_{méthyle}) ; 3,66 s (3H, H_{méthyle}) ; 3,65 s (3H, H_{méthyle}) ; 3,45–4,35 m (4H, H_β) ; 3,27–3,37 m (4H, H_α) ; 1,27 – 1,35 m (17H, H₂₃) ; -3,66 s (2H, NH_{int}).

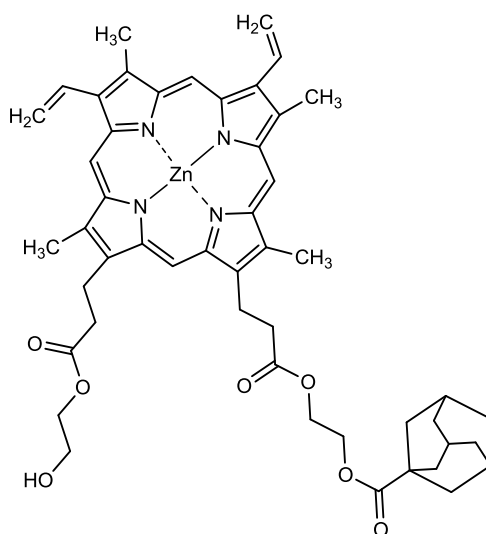
V.7.8. Synthèse de protoporphyrine IX bis (adamantane carboxy éthyl ester) (10).



2 mL de chlorure adamantane carbonyle (2,5 mg ; 0,0123 mmol ; 1 équiv) sont ajoutés goutte à goutte à une solution de chloroforme (10 mL) contenant 10 mg (0,0123 mmol) du composé **9** et 15 mg de DMAP (0,123 mmol ; 10 équiv). Le milieu réactionnel est ensuite agité pendant 1h30 à température ambiante. Le solvant est évaporé à sec et le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur plaque préparative de gel de silice (éluant : CHCl₃/EtOH 95/5). Le composé **10** est obtenu avec un rendement de 98% (11,8 mg ; 0,012 mmol).

- **CCM** : R_f = 0,9 (CHCl₃ / EtOH: 95/5).
- **SM, MALDI-Tof** (m/z) : 974,72 g.mol⁻¹
- **UV/Visible** (CHCl₃) λ en nm (ε. 10⁻³) : 408 (139,3), 506 (12,1), 542 (10,2), 578 (6,9), 630 (4,6).
- **RMN ¹H** (CDCl₃) : δ_{ppm} = 10,18 s (1H, H_{méso}) ; 10,14 s (1H, H_{méso}) ; 10,05 s (1H, H_{méso}) ; 10,03 s (1H, H_{méso}) ; 8,31–8,24 dd (J = 17,8 et 11,5Hz, 2H, H₂₁) ; 6,38–6,19 dd (J = 17,8 et 11,5Hz, 2H, H₂₂) ; 4,41 t (J = 7,5Hz, 4H, H_α) ; 4,29 m (4H, H_β) ; 3,71 s (3H, H_{méthyle}) ; 3,69 s (3H, H_{méthyle}) ; 3,64 s (3H, H_{méthyle}) ; 3,62 s (3H, H_{méthyle}) ; 3,45–4,35 m (4H, H_β) ; 3,32 t (J = 7,5Hz, 4H, H_α) ; 1,50 m (34H, H₂₃) ; -3,79 s (2H, NH_{int}).

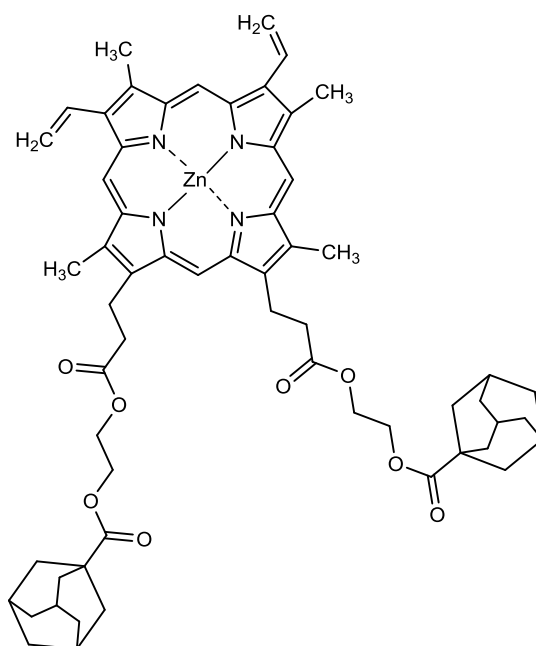
V.7.9. Synthèse de zinc protoporphyrinato IX adamantane carboxy hydroxy éthyl ester (9Zn).



23 mg d'acétate de zinc (0,123 mmol ; 10 équiv) dissous dans 2 mL de CHCl₃/EtOH (1 / 1) sont ajoutés dans un ballon contenant 10 mL (10 mg ; 0,0123 mmol) de composé **9**. Après 1h30 de réaction, la solution est évaporée à sec. Le brut réactionnel est repris dans 10 mL de chloroforme et la phase organique est lavée avec de l'eau (3 x 50 mL). Après évaporation, le brut est purifié par chromatographie sur plaque préparative de gel de silice (éluant : CHCl₃/EtOH 95/5). Le composé **9Zn** est obtenu avec un rendement de 96% (10,5 mg ; 0,0119 mmol).

- **CCM** : R_f = 0,7 (CHCl₃ / EtOH: 95/5).
- **SM, MALDI-Tof** (m/z) : 875,16 g.mol⁻¹
- **UV/Visible** (CHCl₃) λ en nm (ε. 10⁻³) : 417 (154,6), 546 (10,8), 582 (12,5).
- **RMN ¹H** (CDCl₃) : δ_{ppm} = 10,01 s (1H, H_{mésos}) ; 9,95 s (1H, H_{mésos}) ; 9,80 s (1H, H_{mésos}) ; 9,71 s (1H, H_{mésos}) ; 8,29-8,32 m (2H, H₂₁) ; 6,39-6,21 dd (J = 17,8 et 11,5Hz, 2H, H₂₂) ; 4,34 m (4H, H_α) ; 4,12 m (4H, H_β) ; 3,65 s (3H, H_{méthyle}) ; 3,63 s (3H, H_{méthyle}) ; 3,56 s (3H, H_{méthyle}) ; 3,55 s (3H, H_{méthyle}) ; 3,27-3,35 m (8H, H_{a,b}) ; 1,35 m (17H, H₂₃).

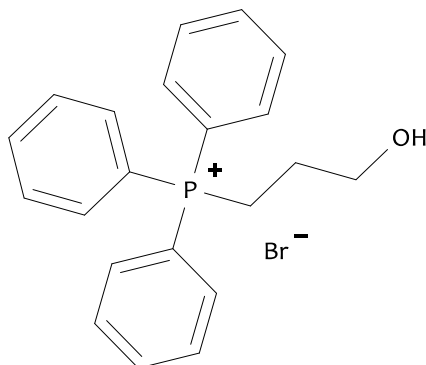
V.7.10. Synthèse de zinc protoporphyrinato IX bis (adamantane carboxy éthyl ester) (10Zn).



En partant de 10 mg (0,0102 mmol) du composé **10** et en utilisant le même protocole expérimental que celui de la synthèse du composé **9Zn**, on obtient le composé **10Zn** avec un rendement de 94%.

- **CCM** : $R_f = 0,88$ (CHCl_3 / EtOH: 95/5).
- **SM, MALDI-Tof** (m/z) : 1037,62 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- **UV/Visible** (CHCl_3) λ en nm ($\epsilon \times 10^{-3}$) : 415 (130,2), 545 (11,4), 581 (12,8).
- **RMN ^1H** (CDCl_3) : $\delta_{\text{ppm}} = 10,05$ s (1H, $\text{H}_{\text{més0}}$) ; 10,00 s (1H, $\text{H}_{\text{més0}}$) ; 9,86 s (1H, $\text{H}_{\text{més0}}$) ; 9,77 s (1H, $\text{H}_{\text{més0}}$) ; 8,33-8,25 m (2H, H_{21}) ; 6,36-6,18 dd ($J = 17,8$ et 11,5Hz, 2H, H_{22}) ; 4,36 m (4H, H_α) ; 4,28 m (4H, H_β) ; 3,57 s (12H, $\text{H}_{\text{méthyle}}$) ; 3,26-3,33 m (8H, $\text{H}_{\text{a,b}}$) ; 1,57 m (34H, H_{23}).

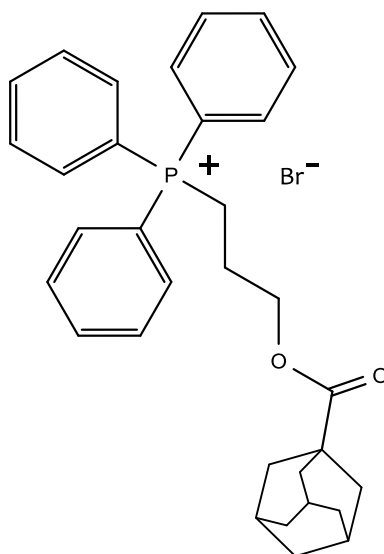
V.7.11. Synthèse du bromure de 3 – hydroxy propyl triphénylphosphonium (11).



Dans un bicol de 500 mL, 1,5 g (0,0057 mol ; 1équiv) de triphénylphosphine sont mises à réagir avec un excès de 3-bromopropanol (7,5 mL ; 0,057 mol ; 10 équiv) dans 20 mL éthanol à reflux. La réaction est suivie par CCM (éther diéthylique 100%) jusqu'à la disparition totale de la triphénylphosphine. Après 24h de réaction, le brut réactionnel est d'abord extrait par précipitation dans l'éther diéthylique puis purifié par chromatographie sur plaques préparatives de gel de silice (éluant, CHCl₃/MeOH: 80/20). Le produit **11** est obtenu avec un rendement de 71% (1,3 g ; 0,004 mol).

- **CCM:** R_f = 0,67 (CHCl₃/MeOH: 80/20).
- **IR** (cm⁻¹): 3314 (νOH).
- **UV/Visible** (CHCl₃) λ en nm (ε x 10⁻³): 269 (2,8), 276 (2,3).
- **RMN ¹H** (CDCl₃): δ ppm = 7,69-7,82 m (15H_{6,7,8}; phényl); 4,96 t (J = 6,9Hz, 1H₁); 3,75 – 3,86 m (4H_{2,4}); 1,85 m (2H₃).
- **RMN ¹³C** (CDCl₃): δ_{ppm} = 135,09 d (J = 11,7Hz, 3C, C₈); 133,49 d (J = 40,0Hz, 6C, C₇); 130,58 d (J = 49,6Hz, 6C, C₆); 60,41 d (J = 65,8Hz, 1C, C₂); 25,94 d (J = 16,9Hz 1C, C₃); 118,4 d (J = 342,4Hz, 1C, C₅); 20,28 d (J = 208,3Hz, 1C, C₄).

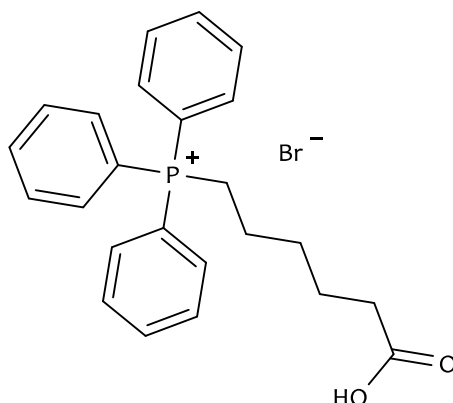
V.7.12. Synthèse du bromure d'adamantane carboxylate de 3 – propyl (triphényl phosphonium) (12).



Dans un bicol de 500 mL, 795 mg (4 mmol ; 8 équiv) de chlorure d'adamantane carbonyle et 489 mg (4 mmol ; 8 équiv) de DMAP sont dissous dans 20 mL de chloroforme. 200 mg (0,623 mmol, 1 équiv) du composé **11** sont ajoutés à la solution. Le milieu réactionnel est maintenu à température ambiante et la réaction est suivie par CCM ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$: 55/45/12) jusqu'à la disparition quasi-totale du composé **11**. Après 4 jours de réaction, le solvant est évaporé à sec, le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur plaques de gel de silice (éluant, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$: 55/45/12). Le produit **12** est obtenu avec un rendement 60%.

- **CCM:** $R_f = 0,6$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$: 55/45/12).
- **IR** (cm^{-1}): 1700 ($\nu_{\text{C=O}}$).
- **RMN ^1H (CDCl_3):** δ ppm = 7,95 d ($J = 1,5$ Hz ; H_8) ; 7,79 m ($\text{H}_{6,7}$) ; 4,09 m (H_4) ; 3,62 m (H_2) ; 1,16 t ($\text{H}_{1,3}$).
- **RMN ^{31}P :** $\delta_{\text{ppm}} = 24,8$ s.

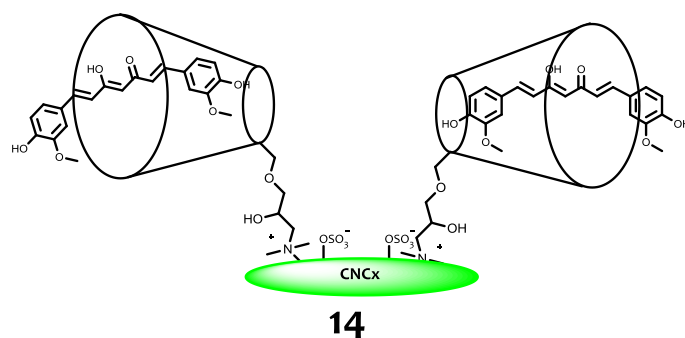
V.7.13. Synthèse du bromure de 5 – carboxy pentyl triphényl phosphonium (13).



Dans un bicol de 500 mL, 1,5 g ($5,7 \times 10^{-3}$ mol, 1éq) de triphénylphosphine sont mises à réagir avec un excès d'acide 6-bromo hexanoïque (7,5 mL ; 0,057 mol ; 10 équiv) dans 20 mL de chloroforme à reflux. La réaction est suivie par CCM (éter diéthylique 100%) jusqu'à la disparition totale de la triphénylphosphine. Après 24h de réaction, le brut réactionnel a été purifié par chromatographie sur plaque préparative ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$: 55/45/12). Le produit **13** est une huile jaune obtenue avec un rendement de 75% (1,62 g).

- **CCM:** $R_f = 0,7$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$: 60/44/12).
- **RMN ^{31}P :** $\delta_{\text{ppm}} = 24,6$ s
- **RMN ^1H :** $\delta_{\text{ppm}} = 7,90\text{--}7,78$ m ($\text{H}_{8,9,10}$, phényl) ; $3,51\text{--}3,63$ m ($\text{H}_{2,6}$) ; $2,15\text{--}2,22$ m ($\text{H}_{3,5}$) ; $1,64\text{--}1,76$ m (H_4).

V.7.14. Encapsulation de la curcumine.



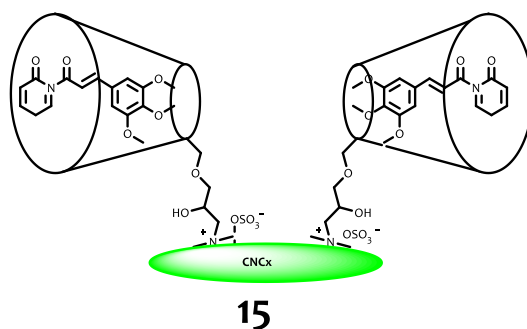
1,5 à 2 mg de curcumine, préalablement dissous dans un minimum d'acétone (100 μ L), sont introduits dans 2 mL d'une solution aqueuse de CD/CNCx (3). Après 2h de réaction à température ambiante, sous ultrasons et dans un bain de glace, la solution est centrifugée (8000 rpm, 10 mn). Le culot est prélevé puis redispersé dans 2 mL d'eau distillée. La quantité de curcumine incorporé est obtenue par dosage spectroscopique et après extraction de la solution le chloroforme. Le complexe **14** résultant est obtenu avec des concentrations en curcumine d'environ 6×10^{-4} M (soit 8 à 10% en masse de curcumine I par rapport aux nanocristaux de cellulose).

- **UV/Visible** (H_2O) λ en nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) : 422 (2,9)
- **Potentiel zêta** : $\zeta = -29,6 \pm 1,8$ mV
- **DLS** : $206,8 \pm 1,6$ nm

V.7.14.1 Relargage de la curcumine

Un modèle expérimental *in vitro* comparable à celui des conditions du milieu physiologique est développé pour réaliser le relargage de la curcumine incluse dans le composé **3**. En effet, 0,5 mL ($5,0 \times 10^{-8}$ mol en curcumine) d'une solution de complexe **14** est ajouté délicatement dans une cuve en quartz contenant 2 mL de chloroforme. Après trois essais répétitifs dans les mêmes conditions, les pourcentages de relargage obtenus en curcumine sont de 20, 22 et 24% respectivement pour 3, 6 et 8h.

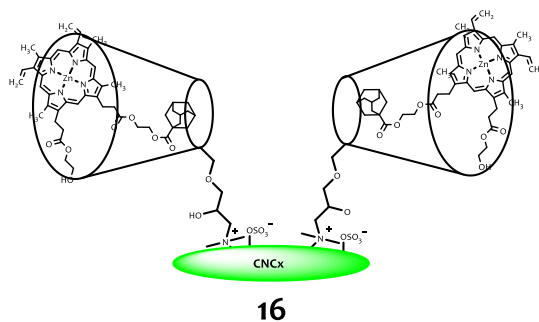
V.7.15. Encapsulation de la piperlongumine (15)



En utilisant le même protocole que celui décrit avec le complexe **14**, le composé **16** est obtenu avec une concentration de $3,5 \times 10^{-4}$ M en piperlongumine (soit 11% en masse de piperlongumine par rapport aux nanocristaux de cellulose).

- **UV/Visible** (H_2O) λ en nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) : 330 (13,9).
- **Potentiel zêta** : $\zeta = -41$ mV

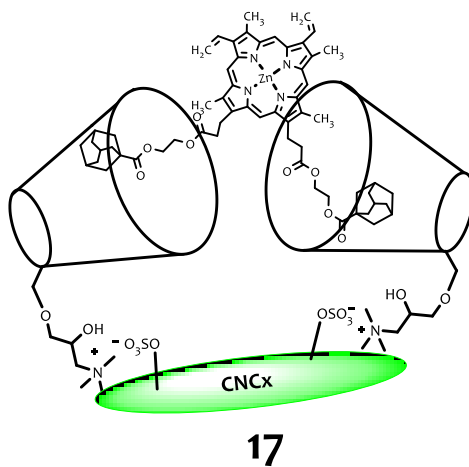
V.7.16. Encapsulation de **9Zn** (**16**)



En partant de 2 mg du composé **9Zn** et en utilisant le même protocole que celui décrit avec le complexe **14**, le complexe **17** est obtenu avec une concentration de $1,2 \times 10^{-4}$ M (soit 10,5% en masse de composé **9Zn** par rapport aux nanocristaux de cellulose).

- **UV/Visible** (H₂O) λ en nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) : 417 (154,6).
- **Potentiel zêta** : $\zeta = -41$ mV

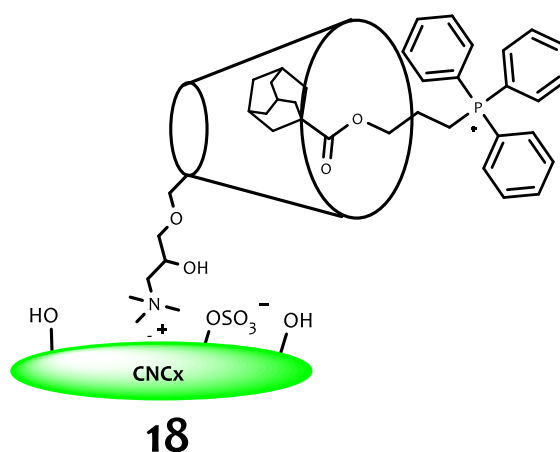
V.7.17. Encapsulation de 10Zn (17)



En partant de 2 mg du composé **10Zn** et en utilisant le même protocole que celui décrit avec le complexe **14**, le complexe **17** est obtenu avec une concentration de 10^{-4} M (soit 10,3% en masse de composé **10Zn** par rapport aux nanocristaux de cellulose).

- **UV/Visible** (H₂O) λ en nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) : 415 (65,1).
- **Potentiel zêta** : $\zeta = -41$ mV

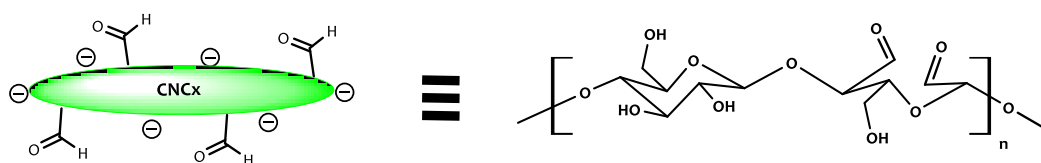
V.7.18. Encapsulation de 12 (18)



Dans 2 mL de solution CD/CNCx contenant 2 mg de nanocristaux de cellulose, on ajoute 0,64 mg (1,36 μmol) du composé 12 dilué dans 200 μL d'eau. On laisse 2h sous agitation ultrasons dans un bain de glace. La solution est centrifugée et le culot est extrait par du chloroforme. Le dosage par UV-Visible de l'extrait permet de calculer le pourcentage de fixation du composé 12 qui est de 5% en masse par rapport au nanocristaux de cellulose.

- **UV/Visible** (H_2O) λ en nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) : 276 (2,3).
- **Potentiel zêta** : $\zeta = + 3,22$ mV

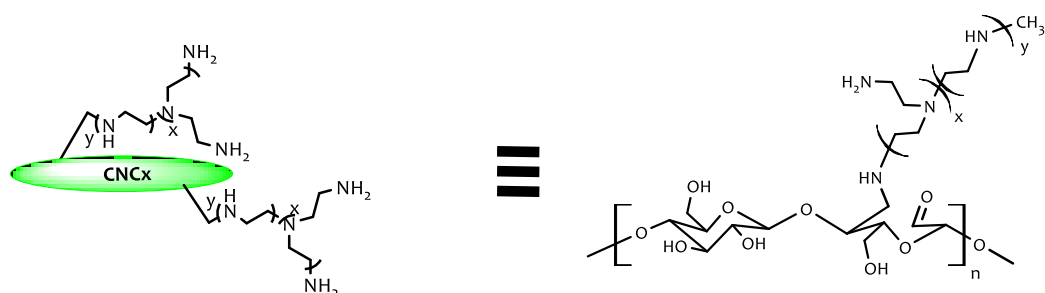
V.7.19. Synthèse des nanocristaux de cellulose oxydée (19)



Dans un erlenmeyer de 500 mL, 100 mL de la solution de CNCx (1) en présence de 10 mL de propanol, sont mis à réagir avec deux équivalents de periodate de sodium (263 mg ; 1,23 mol) à température ambiante et à l'abri de la lumière. Un excès d'éthylène glycol (1 mL) est ajouté après 100 h de réaction. Le brut réactionnel est purifié par dialyse (seuil de coupure 6-8 kDa). Plusieurs dosages iodométriques de la solution de CNCox **19** ont révélé un taux d'oxydation de l'ordre 16%.

- **IR** (cm^{-1}) : 3340 (νOH) ; 2900 (νCH) ; 1634 (δOH) ; 1430 (δsCH_2) ; 1368 (δCH) ; 1335 (δOH) (dans le plan) ; 1317 ($\delta\text{C-O-H}$) ; 1282 (δCH) ; 1280 (SO_3H) ; 1201 ($\nu_{\text{sC-O}}$: cycle pyranose) ; 1158 ($\nu_{\text{asC-O-C}}$: pont) ; 1104 (δOH : cycle symétrique) ; 1057 ($\delta\text{C-O-C}$: cycle pyranose) ; 1032 ($\gamma\text{C-O}$: C-6) ; 898 (δOH : cycle asymétrique) ; 885 (forme hémiacétal) ; 825 (SO_3H) ; 710 (γOH : asymétrique).
- **Potentiel zêta** : $\zeta = -40,0 \pm 1,1$ mV
- **DLS** : $172,4 \pm 2,6$ nm
- **MET** : $L = 100 \sim 200$ nm ; $l = 10 \sim 20$ nm.

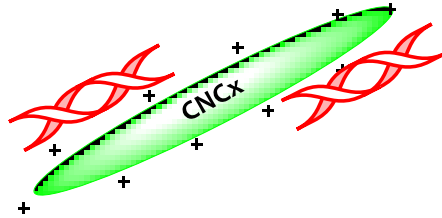
V.7.20. Synthèse des nanocristaux de cellulose polyaminée (20).



2 mg de polyéthylène imine PEI 600 Da ($3,7 \times 10^{-6}$ mmol, 0,18 équiv) sont dissous dans un erlenmeyer avec 8 mL d'eau distillée. Ensuite, 20 mL de la solution de CNCox **19** (20 mg, $2,06 \times 10^{-5}$ mol, UAG oxydées de surface) sont ajoutés goutte à goutte à l'aide d'une ampoule à brome à l'abri de la lumière et sous ultrasons dans un bain de glace. Après 1h d'agitation à température ambiante, quatre équivalents de NaBH₃CN (2 mg) sont additionnés au mélange. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation ultrasonique dans un bain de glace pendant 3h puis sous agitation magnétique pendant 24h. Le produit réactionnel est purifié par centrifugation (8000 rpm, 10 mn) et la solution est diluée à 1 mg/mL.

- **Potentiel zêta** : $\zeta = +26,0 \pm 1,0$ mV
- **DLS** : $175,1 \pm 1,5$ nm.

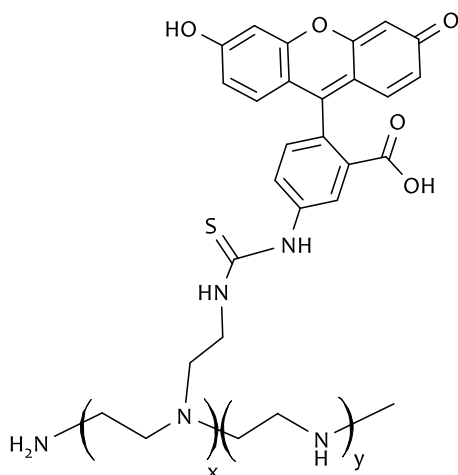
V.7.21. Synthèse des nanocristaux de cellulose siRNA (21)



Des masses décroissantes (1 mg à 0,25 µg) en nanocristaux cationiques **20** ont été additionnées dans quatre tubes contenant une même quantité de siRNA killer (50µL ; 0,5 nmol, 6,5 µg) en présence d'une solution tampon PBS. Les échantillons ont été agités à 240 rpm à température ambiante. Après 30 mn de réaction, le milieu réactionnel est purifié par centrifugation (13000 rpm, 10 mn) et le surnageant de chacun des échantillons a été dosé. L'addition de 0,5 mg de nanocristaux ne nous a pas permis de détecter les siRNA sinon de détecter une masse très négligeable (0,3 µg) dans le surnageant. Le composé **21** ainsi formé est obtenu un rapport massique siRNA/CNCx de 1,4%.

- **Nanodrop** (H₂O) : $\lambda = 260$ nm.
- **Potentiel zêta** : $\zeta = -22,8 \pm 0,5$ mV
- **DLS** : $172,4 \pm 2,6$ nm.

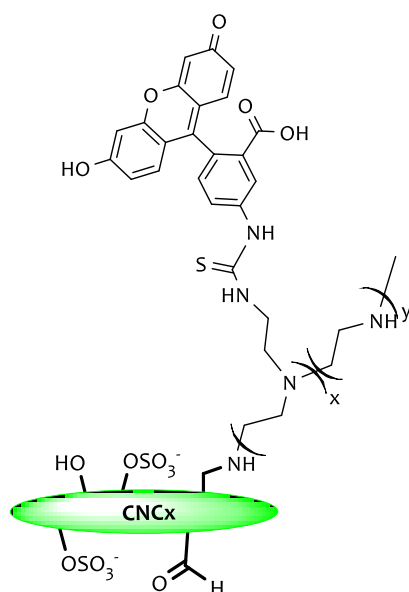
V.7.22. Synthèse de la fluorescéine polyaminée (22).



5 mg de PEI 600 Da ($8,73 \times 10^{-6}$ mol) ont été mis à réagir avec un équivalent (3,2 mg) de FITC dans 20 mL de $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (1/1, v/v). Le mélange est agité à température ambiante pendant 24h et à l'abri de la lumière. Après évaporation à sec du solvant, le produit **22** obtenu est récupéré dans 50 mL d'eau. Le rendement de la réaction est de 64%.

- **UV/Visible:** (H_2O) λ en nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) : 502 (26,9).

V.7.23. Synthèse des nanocristaux de cellulose fluorescéine (23)



Dans un erlenmeyer contenant 8 mL du composé **21** ($5,2 \times 10^{-7}$ mol, 0,026 équiv) sont ajoutés goutte à goutte 20 mL de solution de CNCox **19** (20 mg, 2×10^{-5} mol, UAG). Le milieu réactionnel est agité sous ultrasons pendant 2h puis quatre équivalents de NaBH_3CN sont additionnés et le mélange est maintenu sous agitation magnétique à température ambiante. Après 24h de réaction, le brut réactionnel est centrifugé et le composé **23** est obtenu avec un rendement de 74% grâce au dosage par UV-Visible.

- **Potentiel zêta** : $\zeta = -22,8 \pm 0,5$ mV
- **DLS** : $172,4 \pm 2,6$ nm
- **UV/Visible**: (H_2O) λ en nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) : 502 (29,6).

Evaluation biologique

V.8. Culture cellulaire des PC-3, DU-145 et HT-29

Les cultures cellulaires sont effectuées dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire. Les cellules sont maintenues dans une atmosphère (37°C, 5% CO₂ et 95% d'humidité) et contrôlées quotidiennement à l'aide d'un microscope à contraste de phase. Les lignées colorectales (HT-29) sont entretenues dans un milieu spécifique DMEM GlutamaxTM supplémenté avec du Sérum de veau fœtal (SVF) et de la pénicilline streptomycine. Les lignées prostatiques (PC-3 et DU-145) sont quant à elles cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute).

V.8.1. Principe

L'effet cytotoxique ou photocytotoxique est évalué par un test MTT. Le test MTT (Mosmann, 1983) est une technique colorimétrique basée sur la transformation du MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) en cristaux bleus de formazan par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. La quantité de cristaux de formazan formés est proportionnelle au nombre de cellules viables. De plus, les cristaux de formazan sont solubilisés par le DMSO et sont détectables par spectrophotométrie à $\lambda = 595 \text{ nm}$.

V.8.2. Méthodologie

V.8.2.1 Cytotoxicité directe

Les trois lignées cellulaires (PC-3, DU-145 et HT-29) sont mises en cultures dans des plaques 96 puits (en triplicat) à raison de 100 μL de suspension cellulaire à $0,5 \times 10^5$ cellules/mL et sont laissées à incubation à 37°C et à 5% de CO₂ pour leur permettre d'adhérer au support et être en phase exponentielle de croissance au moment du traitement. Après 24h de culture, les surnageants sont éliminés. Ensuite, les cellules sont traitées pendant 24h ou 48h avec différents actifs (curcumine, piperlongumine, **9Zn**, **10Zn** et les composés **3**, **14**, et **15**) avec des concentrations allant de 0 à 50 μM .

V.8.2.2 Cytotoxicité par la méthode PDT ou Phototoxicité

Dans ce paragraphe, seule la lignée cellulaire colorectale HT-29 a été traitée avec les molécules (**9Zn**, **10Zn**, **ZnPPIX** et les composés **16** et **17**). Après 24h ou 48h d'incubation, le milieu de culture contenant les cellules HT-29 traitées avec les molécules a été lavé trois fois avec du PBS stérile (Phosphate Salin Buffer) (Sigma[®]) puis remis dans le milieu de culture. Les cellules sont ensuite irradiées avec une lumière blanche (à une fluence de 25J/cm² fournie par une lampe de 18 W). Les cellules sont de nouveau incubées à 37°C sous atmosphère contrôlée. Après une nuit

d'incubation, 15 µl de solution de MTT (Promega) sont ajoutés dans chaque puits à une concentration finale de 0,4 mg/ml.

V.8.3. Test MTT

Après 24h ou 48h de traitement, 15 µL de MTT (Promega) concentré à 0,4 mg/mL sont ajoutés dans chaque puits et les cellules sont laissées à incuber pendant 3h sous atmosphère contrôlée. Les plaques 96 puits sont ensuite centrifugées à 4000 rpm à température ambiante pendant 15 minutes afin de culotter les cellules ainsi que les cristaux de formazan formés. Le milieu de chaque puits est retiré et les cristaux de formazan sont solubilisés par 100 µL de DMSO puis les plaques sont incubées toute la nuit à 37 °C. L'absorbance est mesurée à 595 nm à l'aide d'un lecteur de plaques (TRIAD, Dynex Technologies). Les résultats sont présentés en pourcentage par rapport au contrôle négatif (cellules non-incubées avec les molécules citées) :

$(DO \text{ moyenne des cellules traitées} / DO \text{ moyenne des cellules contrôles}) \times 100 \pm \text{écart-type}$ ou présentés sous forme de courbes traçant l'évolution de l'absorbance à 595nm (activité déshydrogénase résiduelle) en fonction du temps.

Pour chaque principe actif, la valeur IC₅₀ (concentration nécessaire pour diminuer de 50 % la viabilité cellulaire) est obtenue après une analyse par régression non-linéaire.

V.8.4. Etude de l'internalisation cellulaire de la curcumine par microscopie confocale

V.8.4.1 Méthodologie

L'autofluorescence de la curcumine (480 à 530 nm) a été utilisée pour mesurer l'absorption de la curcumine dans les cellules HT29, DU 145 et PC3 par microscopie confocale. En effet, les cellules ont étéensemencées sur des lamelles de verre (Nalge Nunc International, Rochester, New York) revêtues de gélatine (2%) à une densité de 2 x 10⁵ cellules par puits et cultivées pendant une nuit. Le jour suivant, le milieu de culture a été éliminé et remplacé par du milieu contenant de la curcumine ou le composé **14** à une concentration de curcumine finale de 50 µM. Après incubation à 37 °C pendant 4h, les milieux ont été enlevés, les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS stérile et le milieu de culture frais a été ajouté avant visualisation au moyen d'un microscope confocal à balayage laser (LSM 510 META, Carl Zeiss, Allemagne). L'acquisition et l'analyse des images ont été réalisées avec le logiciel Zeiss LSM logiciel Image Browser (Carl Zeiss). Chaque expérience a été réalisée en double et répétée deux fois.

V.9. Culture cellulaire des C2C12

Les cellules de la lignée C2C12 sont des myoblastes murins, issus de souris C3H, et fournies par ATCC (American Type Culture Collection) sont mises en culture dans un milieu de prolifération constitué de Dubelco's Modified Eagle's Medium (DMEM), complémenté avec 10% (V/V) de sérum de veau foetal (Eurobio, Courtaboeuf, France), 50 Unités/mL de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine. Les cellules sont cultivées dans des conditions stériles sous hotte à flux laminaire et sont maintenues dans une atmosphère contrôlée (37°C, 5% CO₂ et 80% d'eau).

V.9.1. Apoptose – expression des gènes (caspases 8 et 9)

Le niveau d'apoptose a été évalué à l'aide du "Cell Death Detection Elisa Plus" Kit, un kit d'apoptose fabriqué par Roche. La lignée cellulaire C2C12 est mise en culture dans des plaques 24 puits (en triplicat) à 37°C et à 5% CO₂ jusqu'à environ 80% de confluence. Les cellules sont ensuite traitées avec ou sans les molécules (siRNA, composés **20**, **23** et siRNA-HiPerFect) pendant 24 et 72h. Les milieux de culture sont entretenus toutes les 48h excepté les cultures traitées avec les molécules. Après 24 et 72h de traitement, les cellules C2C12 ont été suspendues dans du PBS afin d'utiliser le protocole décrit par Roche. Les ARN totaux sont extraits grâce au RNeasy mini Kit (Qiagen). Une puce micro-fluidique est utilisée pour mesurer la qualité et la quantité des ARNs totaux (Agilent 2100 Bioanalyser, Agilent) et 1 µg est converti en DNAc grâce à l'usage du High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) et de la carboxy fluorescéine comme récepteur.

L'expression des gènes (Caspase 8 et Caspase 9) est quantifiée à partir de 50 ng d'ADNc par QRT-PCR sur ABI Prism 7900 Sequence Detector System en utilisant une chimie à base de sonde TaqMan (Applied Biosystems), avec la 6-carboxyfluorescéine (FAM) en tant que rapporteur.

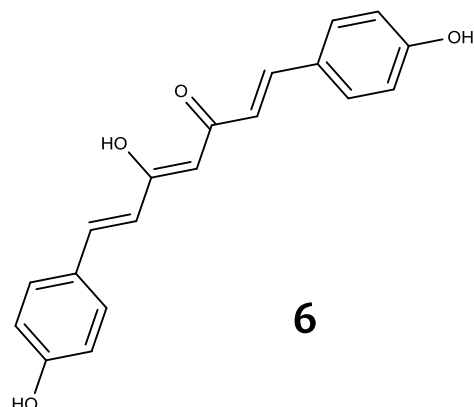
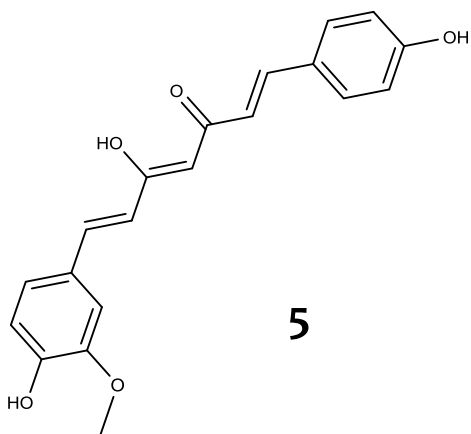
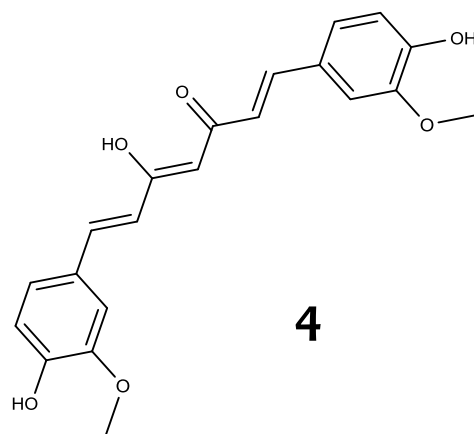
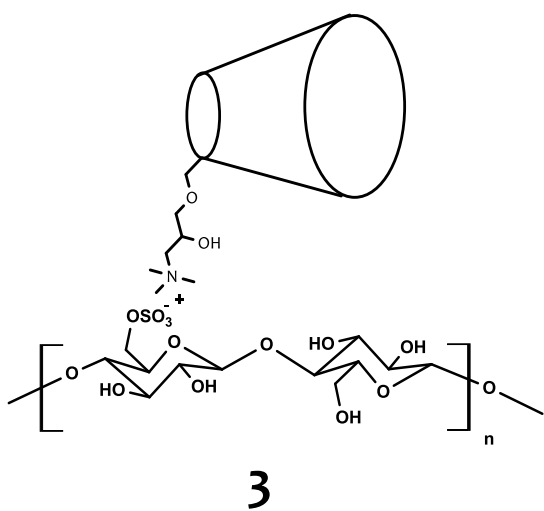
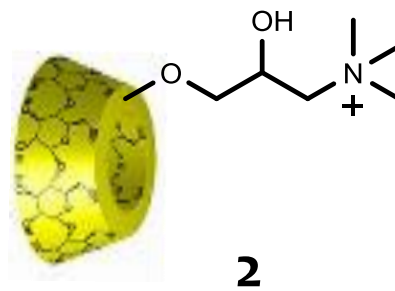
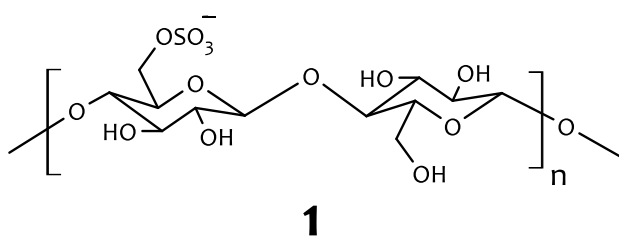
V.9.2. Etude de l'internalisation des lignées C2C12 des nanocristaux par microscopie épi-fluorescence

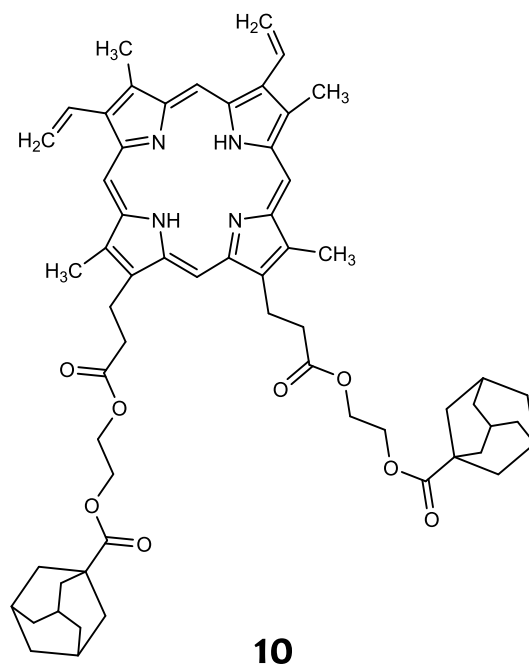
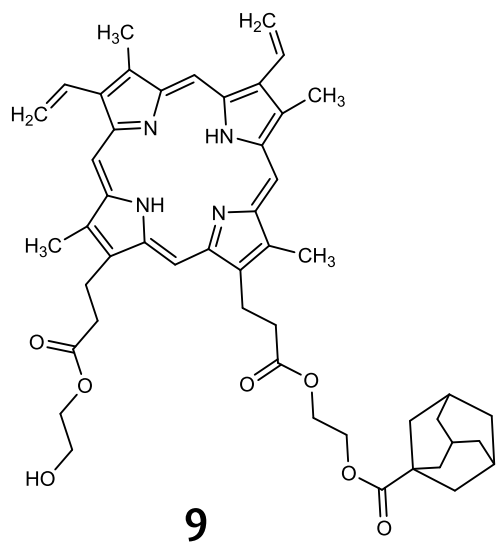
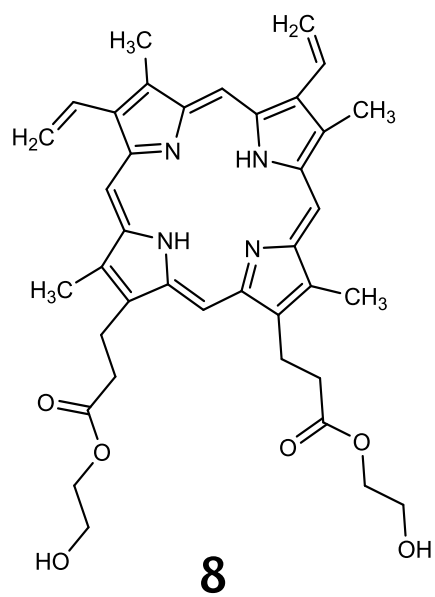
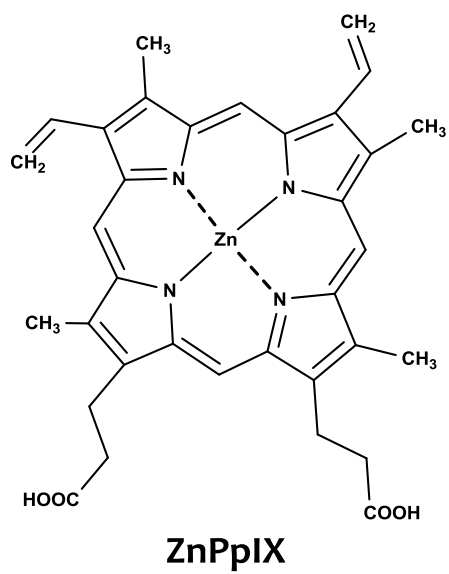
Pour étudier l'absorption cellulaire, les lignées C2C12 sontensemencées sur des lamelles rondes de verre à raison de 5000 cellules/cm² jusqu'à environ 80% de confluence et sont incubées à 37°C et à 5% CO₂ dans un milieu de croissance auquel est ajouté 300 ng du composé **22**. Après 2h d'incubation, le lysotracker® (Life technologies) est ajouté pendant 30 mn afin de marquer le système endomembranaire. Ensuite, les cultures cellulaires sont lavées 2 fois avec du PBS et le paraformaldehyde concentré à 4% est fixé sur les cellules. Après les lavages, les noyaux sont marqués avec une solution de DAPI pendant 10 mn à température ambiante. Les cellules sont encore lavées avant l'observation microscopique.

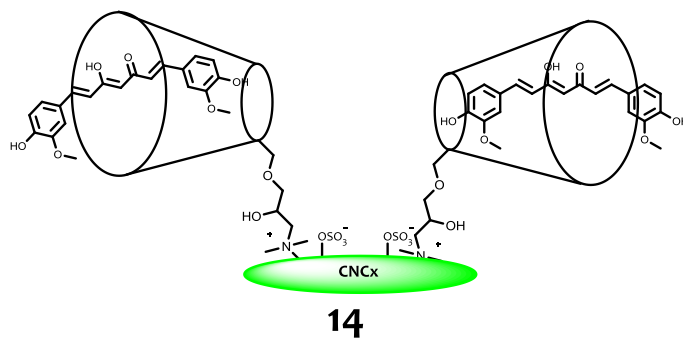
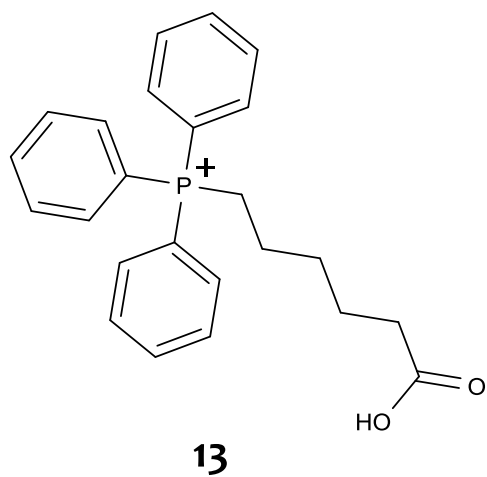
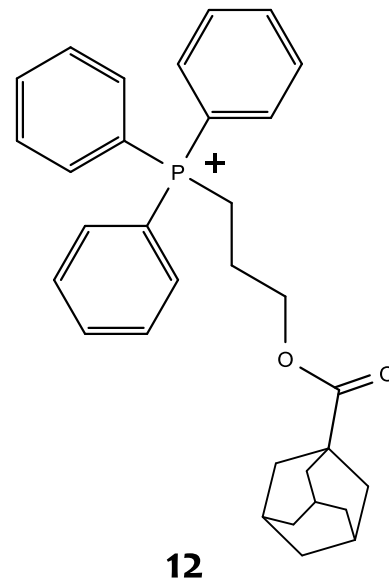
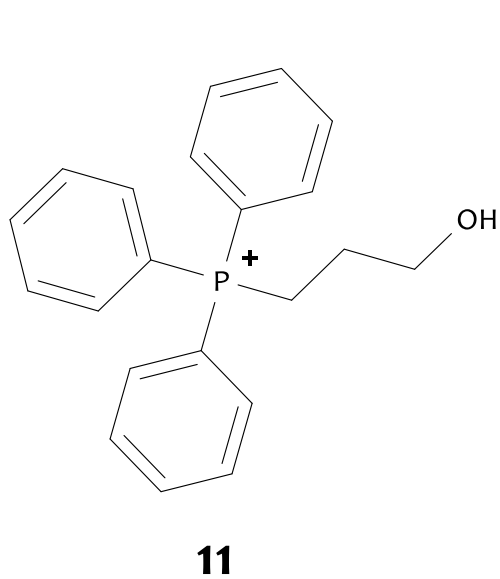
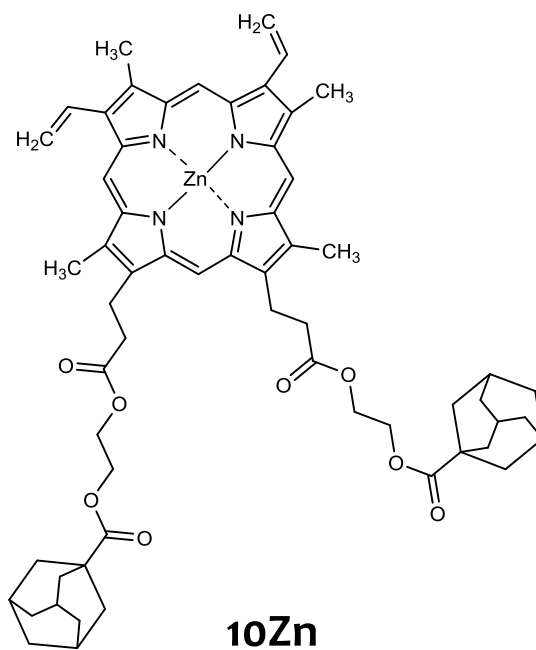
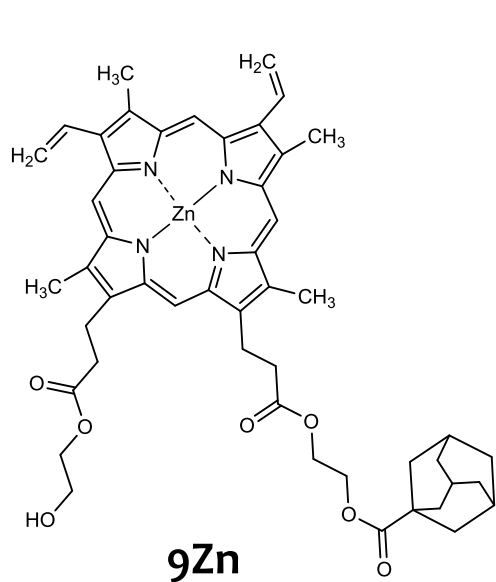
V.9.3. Evaluation de la protection de siRNA par le composé 20 (PEI–CNCox).

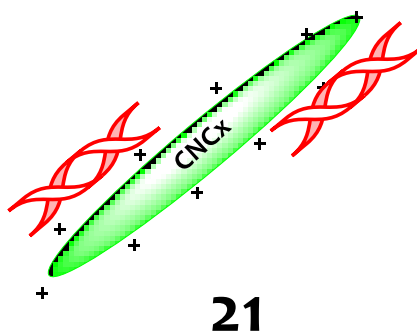
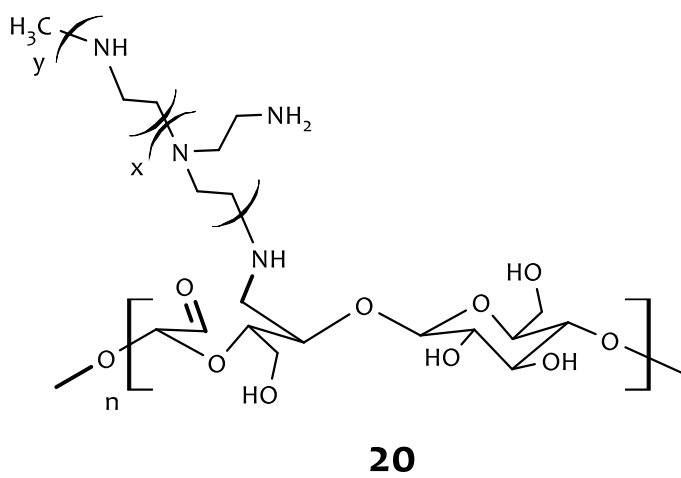
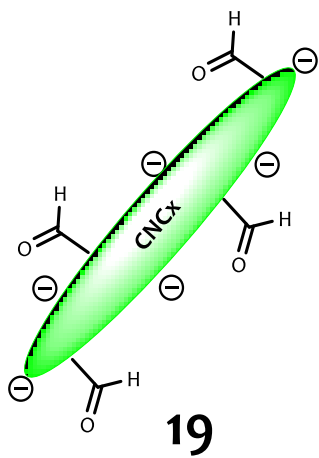
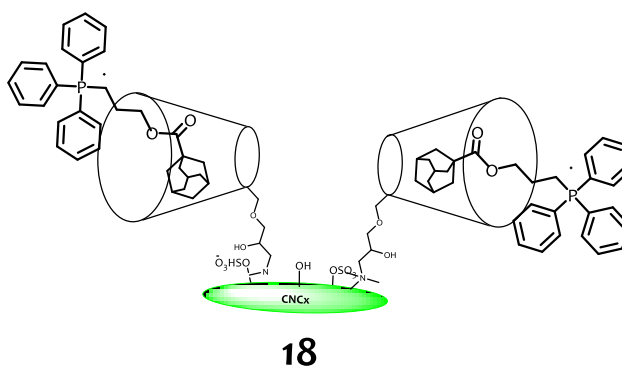
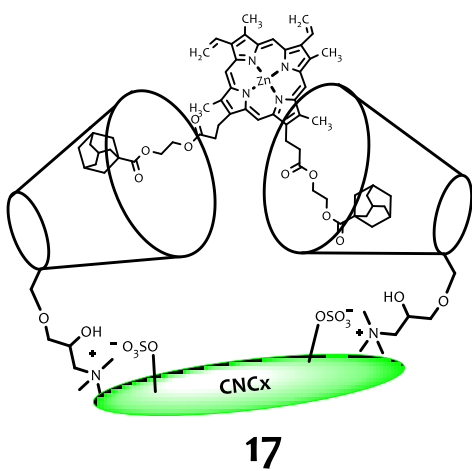
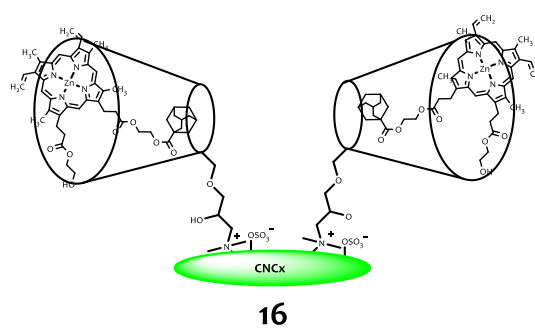
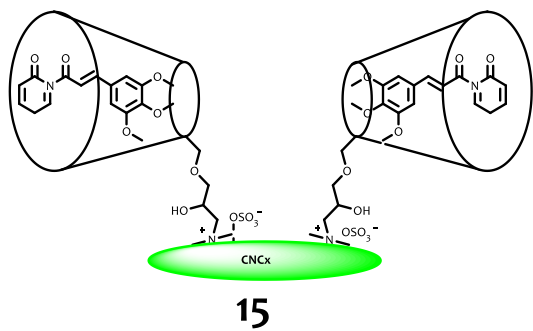
Pour cette étude, 50 ng de siRNA ou 300 ng du composé **21** sont traités ou pas avec 100 ng de RNase A pendant 30 mn. Ensuite, 120 unités d'inhibiteur de RNase (RnaseOut, Invitrogen) sont ajoutées. L'addition de 1% de SDS (w/v) est utilisée pour relarguer les siRNA du complexe **21** avant l'analyse électrophorétique de 20 mn à 100 mV sur gel d'agarose concentré à 3% (w/v). Le SDS utilisé pour décrocher les siRNA du composé **21** interagit avec le bromure d'éthidium conduisant à une tache fluorescente sur le gel d'agarose.

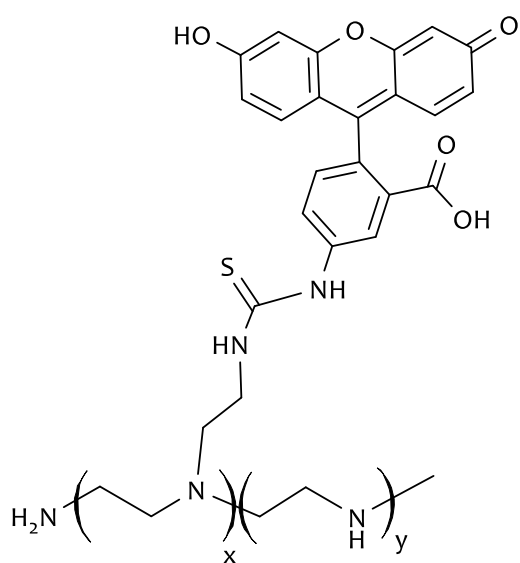
Liste des produits synthétisés



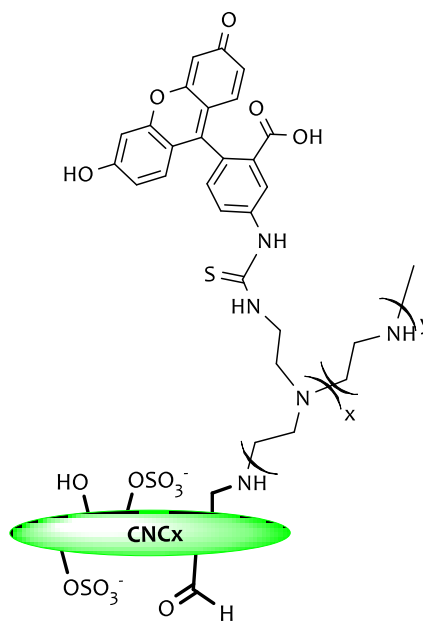








22



23

Valorisations des travaux de thèse

Productions scientifiques

Publications internationales à comité de lecture (soumises) : 2

Publications internationales à comité de lecture (en cours de préparation) : 1

Communications orales : 5

Communications par affiches : 6

a- Publications soumises et/ou publiées

Gautier M.A. Ndong Ntoutoume, Robert Granet, Jean Pierre Mbakidi, Frédérique Brégier, David Leger, Chloë Fidanzi, Vincent Lequart, Nicolas Joly, Bertrand Liagre, Vincent Chaleix and Vincent Sol

Development of Curcumin-Cyclodextrin/Cellulose Nanocrystals Complexes: New Delivery Anticancer Drug systems

Référence : G. M. A. Ndong Ntoutoume et al, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2016, 26, 941-945.

Gautier M.A. Ndong Ntoutoume, Vincent Grassot, Julien Chabanais, Jean-Michel Petit, Robert Granet, Vincent Sol

PEI-Cellulose Nanocrystals Hybrids and their use as siRNA Delivery Agents
Carbohydrate Polymers

b- Publication en préparation

Nicolas Drogat, Robert Granet, Frédérique Brégier, Shihong Qiu, Gautier M.A. Ndong Ntoutoume, Jean Pierre Mbakidi, Chloé Fidanzi, Youness Limani, Fabrice Lalloué, Claude Couquet, Gaëlle Begaud-Grimaud, Caroline Le Morvan, David Léger, Bertrand Liagre, Vincent Chaleix, Vincent Sol
Chlorin-p6/PEI - Cellulose Nanocrystals Hybrids: their *in Vivo* Evaluation as New Potential Anticancer Agents for Application in Photodynamic Therapy.
Biomacromolecules

c- Communication orales

Frédérique Brégier, Nicolas Drogat, Robert Granet, Gaëlle Bégaud, Caroline Le Morvan, Gautier Mark-Arthur Ndong Ntoutoume, Fabrice Lalloué, Vincent Sol.

Synthèse de nanocristaux de celluloses fonctionnalisées par un photosensibilisateur d'origine naturel : application en photothérapie dynamique des cancers (PDT)

9^{ème} journées Cancéropôle Grand Sud-Ouest (CGSO) 16 – 18 Octobre 2013, Limoges.

Gautier Mark-Arthur Ndong Ntoutoume, Robert Granet, Vincent Sol

Elaboration de nanocristaux de cellulose pour la vectorisation et le ciblage d'agents anticancéreux : curcumine et protoporphyrine IX de zinc.

Journées de la Section Régionale Centre-Ouest Société Chimique de France 30-31 Janvier 2014 – Limoges (France).

Gautier Mark-Arthur Ndong Ntoutoume, Robert Granet, David Léger, Bertrand Liagre Vincent Sol

Synthesis and functionalization of cellulose nanocrystal for the vectorization of anticancer drugs
SyCOCAL IX, 17– 19 Septembre 2014, Tours – France

Gautier Mark-Arthur Ndong Ntoutoume, Jean Pierre Mbakidi, David Léger, Nicolas Joly, Bertrand

Liagre, Robert Granet, Vincent Sol

Nanocristaux de cellulose : vers le développement d'un nouveau système de délivrance de molécules bioactives.

Journées de la Section Régionale Centre-Ouest Société Chimique de France 18-20 Février 2015 – Orléans (France).

Gautier Mark-Arthur Ndong Ntoutoume, Vincent Grassot, Julien Chabanais, Jean-Michel Petit, Robert Granet, Vincent Sol

Les nanocristaux de cellulose : un nouveau vecteur de siRNA

2eme journée GEIST, 04 septembre 2015 Limoges

d- Communications par affiches

Drogat N., Brégier, F Granet R., Bégaud G., Le Morvan C., Qiu S., Ndong Ntoutoume G M-A., Léger D., Fidanzi C., Lalloué F., Couquet C. Liagre B. , Sol V.

Chlorin/PEI - Cellulose Nanocrystals Hybrids: Synthesis, characterization and their in Vivo Evaluation as New Potential Anticancer Agents for Application in Photodynamic Therapy.

Quand l'imagerie rencontre les nanotechnologies, Workshop Cancéropôle GSO, 3-4 décembre 2014, Bordeaux

Gautier Mark-Arthur Ndong Ntoutoume, Robert Granet, David Leger, Bertrand Liagre, Vincent Sol.

Development of cellulose nanocrystals for the vectorization of anticancer Drugs

RCOM 8, 8ème rencontre de Chimie Organique de Marseille – 12, 13 juin 2014, Marseille

Gautier Mark-Arthur Ndong Ntoutoume, Robert Granet, Vincent Sol.

Elaboration de complexes curcumine-cyclodextrine cationique fixés sur les nanocristaux de cellulose pour le ciblage des cellules cancéreuses.

9^{ème} journées Cancéropôle Grand Sud-Ouest (CGSO) 16 – 18 Octobre 2013, Limoges.

Frédérique Brégier, Nicolas Drogat, Robert Granet, Gaëlle Bégaud, Caroline Le Morvan, Gautier Mark-Arthur Ndong Ntoutoume, Fabrice Lalloué, Vincent Sol.

Synthèse de nanocristaux de celluloses fonctionnalisées par un photosensibilisateur d'origine naturel : application en photothérapie dynamique des cancers (PDT)

9^{ème} journées Cancéropôle Grand Sud-Ouest (CGSO) 16 – 18 Octobre 2013, Limoges.

Gautier Mark-Arthur Ndong Ntoutoume, Robert Granet, Frédérique Brégier, Vincent Sol
Elaboration de nanocristaux de cellulose pour le transport d'agents thérapeutiques et le ciblage des cellules cancéreuses *Glucidoc 2013* 8 – 11 avril **2013**, Landéda (France)

Gautier Mark-Arthur Ndong Ntoutoume, Robert Granet, Vincent Sol
Elaboration de nanocristaux de cellulose à motifs porphyriniques pour une application en photothérapie dynamique des cancers.
Journées de la Section Régionale Centre-Ouest Société Chimique de France 12 – 14 décembre **2012** – Poitiers (France)

Participation à des manifestations scientifiques

- Fête de la science (Limoges, 2013 et 2014)
- Speed searching (Nuit européenne du chercheur, Limoges 2014).

Résumé

La vectorisation et le ciblage d'agents anticancéreux représentent des axes de recherche majeurs au sein du LCSN. En effet, la plupart des molécules actives utilisées en thérapie anticancéreuse sont peu sélectives des tumeurs et sont toxiques pour les cellules saines. L'élaboration de nanobiomatériaux aptes à cibler spécifiquement les tumeurs par effet EPR mais également capables de les détruire par l'action de la drogue transportée s'avère capital. Le nanovecteur utilisé est élaboré à partir des nanocristaux de cellulose (CNCx) issus de l'hydrolyse acide du coton. Une première approche a consisté à élaborer la nanoplateforme thérapeutique suivant la technique "layer by layer" qui consiste à fixer la curcumine, la piperlongumine et deux dérivés de protoporphyrine IX de zinc sur les CNCx par l'intermédiaire de la β -cyclodextrine chargée positivement. La seconde stratégie a consisté à fixer des siRNA (small interfering RNA) sur les CNCx par l'intermédiaire de la polyéthylèneimine grâce à un couplage électrostatique entre les siRNA chargés négativement et la PEI chargée positivement. Enfin, nous avons fixé le cation triphénylphosphonium dans le but de cibler spécifiquement la mitochondrie. Tous les nanovecteurs ont été caractérisés grâce à l'étude de leur taille (DLS, Microscopie électronique à transmission), de leur charge (potentiel zêta) et des fonctions organiques présentes en surface (FTIR). Pour évaluer la cytotoxicité des principes actifs seuls ou liés aux nanocristaux, des essais biologiques *in vitro* ont été réalisés sur une lignée murine du myoblaste de souris et sur des lignées cellulaires cancéreuses de la prostate. Les tests biologiques réalisés sur les cellules du colon ont été effectués en présence ou en absence d'irradiation.

Mots clés: Cancer, vectorisation, curcumine, piperlogumine, protoporphyrine IX, siRNA, nanoparticules, nanocristaux de cellulose, plateformes thérapeutiques, cyclodextrine, complexation, polyéthylèneimine.

Abstract

Targeting and drug delivery are major areas of research within the LCSN. Indeed, most of the active molecules used in cancer therapy are not very selective against tumors and are toxic to healthy cells. The development of nanobiomaterials able to specifically target tumors by EPR effect but also capable of destroying them by the action of the drug transported turns capital. In this work we achieved the binding of triphenylphosphonium cation (to target the mitochondria), hydrophobic active ingredients and a nucleic acid on cellulose nanocrystals issued from the acid hydrolysis of cotton. The first therapeutic platform synthesized according to the technique "layer by layer" is to set curcumin, piperlongumine, the triphenylphosphonium cation and two derivatives of zinc protoporphyrin IX on CNCx through the cationic β -cyclodextrin complexation reaction. The second drug platform developed is to set siRNA (small interfering RNA) on CNCx previously covered by polyethyleneimine through an electrostatic coupling between the siRNA negatively charged and PEI positively charged. All nanocarriers were characterized through their size study (DLS, transmission electron microscopy), their charge (zeta potential) and the organic functions present on the surface (FTIR). To assess the cytotoxicity of the active ingredients alone or linked to the nanocrystals, the *in vitro* bioassays were carried out on a murine myoblast cell line of mouse and prostate cancer cell lines. Biological tests carried out colon cells were performed in the presence or absence of irradiation.

Keywords: Cancer, vectorization, curcumin, piperlogumine, protoporphyrin IX, siRNA, nanoparticles, cellulose nanocrystals, therapeutics platforms, cyclodextrin, complexation, polyethyleneimine.
