HAL
open science

# Chimie supramoléculaire de nouveaux ligands multicyclodextrines : développement d'une nouvelle méthodologie de synthèse en milieu dioxyde de carbone supercritique et synthèse d'un nouveau ligand pour la complexation et la vectorisation d'actifs de structure nucléotidique

Michel Wagner

**To cite this version:**

Michel Wagner. Chimie supramoléculaire de nouveaux ligands multicyclodextrines : développement d'une nouvelle méthodologie de synthèse en milieu dioxyde de carbone supercritique et synthèse d'un nouveau ligand pour la complexation et la vectorisation d'actifs de structure nucléotidique. Sciences pharmaceutiques. 2005. hal-01733125

**HAL Id: hal-01733125**

**https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733125**

Submitted on 14 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

T/PH/N/2005/37

UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I

2005

Faculté de Pharmacie

BIBLIOTHEQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

# Chimie supramoléculaire de nouveaux ligands multicyclodextrines : Développement d'une nouvelle méthodologie de synthèse en milieu dioxyde de carbone supercritique et synthèse d'un nouveau ligand pour la complexation et la vectorisation d'actifs de structure nucléotidique

# Thèse

Présentée et soutenue publiquement

le 30 mai 2005

pour obtenir

**le diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

par Michel WAGNER

né le 27 août 1978

D3 31950

Membres du jury

Président : M. Alain MARSURA, Professeur, faculté de Pharmacie, Nancy

Juges : M. Alain NICOLAS, Professeur, faculté de Pharmacie, Nancy

Mme Danièle BARTH, Professeur, ENSIC, Nancy

UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I

**2005**

Faculté de Pharmacie

BIBLIOTHEQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

# Chimie supramoléculaire de nouveaux ligands multicyclodextrines : Développement d'une nouvelle méthodologie de synthèse en milieu dioxyde de carbone supercritique et synthèse d'un nouveau ligand pour la complexation et la vectorisation d'actifs de structure nucléotidique

# Thèse

Présentée et soutenue publiquement

le 30 mai 2005

pour obtenir

**le diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

par Michel WAGNER

né le 27 août 1978

DB 31950

Membres du jury

Président : M. Alain MARSURA, Professeur, faculté de Pharmacie, Nancy

Juges : M. Alain NICOLAS, Professeur, faculté de Pharmacie, Nancy

Mme Danièle BARTH, Professeur, ENSIC, Nancy

BU PHARMA-ODONTOL

104 070393 2

# Membres du personnel enseignant 2004/2005

**Doyen**
Chantal FINANCE

**Vice Doyen**
Anne ROVEL

**Président du Conseil de la Pédagogie**
Pierre LABRUDE

**Responsable de la Commission de la Recherche**
Jean-Claude BLOCK

**Responsable de la Filière officine**
Gérald CATAU

**Responsable de la Filière industrie**
Jeffrey ATKINSON

## DOYEN HONORAIRE

M. VIGNERON Claude

## PROFESSEURS HONORAIRES

Mle BESSON Suzanne
Mle GIRARD Thérèse
M. JACQUE Michel
M. LECTARD Pierre
M. LOPPINET Vincent
M. MARTIN Jean-Armand
M. MORTIER François
M. MIRJOLET Marcel
M. PIERFITTE Maurice

## PROFESSEURS EMERITES

M. BONALY Roger
M. HOFFMAN Maurice

## MAITRES DE CONFERENCES EMERITES

Mme FUZELLIER Marie-Claude
Mle IMBS Marie-Andrée
Mme POCHON Marie-France

## PROFESSEURS

| | | |
|---|---|---|
| M. | ASTIER Alain | Pharmacie clinique |
| M. | ATKINSON Jeffrey | Pharmacologie cardiovasculaire |
| M | AULAGNER Gilles | Pharmacie clinique |
| M. | BAGREL Alain | Biochimie |
| Mle | BATT Anne-Marie | Toxicologie |
| M. | BLOCK Jean-Claude | Santé publique |
| Mme | CAPDEVILLE-ATKINSON Christine | Pharmacologie cardiovasculaire |
| Mme | FINANCE Chantal | Bactériologie -Immunologie |
| Mme | FRIANT-MICHEL Pascale | Mathématiques, physique, audioprothèse |
| Mle | GALTEAU Marie-Madeleine | Biochimie clinique |
| M. | HENRY Max | Botanique, mycologie |
| M. | JOUZEAU Jean-Yves | Bioanalyse du médicament |
| M. | LABRUDE Pierre | Physiologie, orthopédie, maintien à domicile |
| Mme | LAURAIN-MATTAR Dominique | Pharmacognosie |
| M. | LALLOZ Lucien | Chimie organique |
| M. | LEROY Pierre | Chimie physique générale |
| M. | MAINCENT Philippe | Pharmacie galénique |
| M. | MARSURA Alain | Chimie thérapeutique |
| M. | MERLIN Jean-Louis | Biologie cellulaire oncologique |
| M. | NICOLAS Alain | Chimie analytique |
| M. | REGNOUF de VAINS Jean-Bernard | Chimie Thérapeutique |
| M. | RIHN Bertrand (Professeur associé) | Biochimie |
| Mme | SCHWARTZBROD Janine | Bactériologie, parasitologie |
| M. | SIEST Gérard | Biologie, pharmacologie moléculaire |
| M. | SIMON Jean-Michel | Droit officinal, législation pharmaceutique |
| M. | VIGNERON Claude | Hématologie, physiologie |

## MAITRES DE CONFERENCES

| | | |
|---|---|---|
| Mme | ALBERT Monique | Bactériologie - virologie |
| Mme | BANAS Sandrine | Parasitologie |
| M. | BOISBRUN Michel | Chimie Thérapeutique |
| Mme | BOITEUX Catherine | Biophysique, Audioprothèse |
| M. | BONNEAUX François | Chimie thérapeutique |
| M. | CATAU Gérald | Pharmacologie |
| M. | CHEVIN Jean-Claude | Chimie générale et minérale |
| M. | CHILLON Jean-Marc | Pharmacologie |
| M | CLAROT Igor | Chimie analytique |
| Mme | COLLOMB Jocelyne | Parasitologie, conseils vétérinaires |
| M. | COULON Joël | Biochimie |
| M. | DANGIEN Bernard | Mycologie |
| M. | DECOLIN Dominique | Chimie analytique |
| M. | DUCOURNEAU Joël | Biophysique, audioprothèse, acoustique |
| M. | DUVAL Raphaël | Microbiologie clinique |
| Mme | FAIVRE Béatrice | Hématologie |
| M. | FERRARI Luc | Toxicologie |
| Mle | FONS Françoise | Biologie végétale, mycologie |
| M. | GANTZER Christophe | Virologie |
| M. | GIBAUD Stéphane | Pharmacie clinique |
| Mle | HINZELIN Françoise | Mycologie, botanique |
| M. | HUMBERT Thierry | Chimie organique |
| M. | JORAND Frédéric | Santé, environnement |
| Mme | KEDZIEREWICZ Francine | Pharmacie galénique |
| Mle | LAMBERT Alexandrine | Biophysique, biomathématiques |
| M. | LAMPRECHT Alf | Pharmacie galénique |
| Mme | LARTAUD Isabelle | Pharmacologie |
| Mme | LEININGER-MULLER Brigitte | Biochimie |
| Mme | LIVERTOUX Marie-Hélène | Toxicologie |
| Mme | MARCHAL-HEUSSLER Emmanuelle | Communication et santé |
| Mme | MARCHAND-ARVIER Monique | Hématologie |
| M. | MENU Patrick | Physiologie |
| M. | MONAL Jean-Louis | Chimie thérapeutique |
| M. | NOTTER Dominique | Biologie cellulaire |
| Mme | PAULUS Francine | Informatique |
| Mme | PERDICAKIS Christine | Chimie organique |
| Mme | PERRIN-SARRADO Caroline | Pharmacologie |
| Mme | PICHON Virginie | Biophysique |
| Mme | ROVEL Anne | Histologie, physiologie |
| Mme | SAUDER Marie-Paule | Mycologie, botanique |
| Mle | THILLY Nathalie | Santé publique |
| M. | TROCKLE Gabriel | Pharmacologie |
| Mme | WELLMAN-ROUSSEAU Maria-Monika | Biochimie |
| Mme | ZINUTTI Colette | Pharmacie galénique |

## PROFESSEUR ASSOCIE

| | | |
|---|---|---|
| Mme | GRISON Geneviève | Pratique officinale |

## PROFESSEUR AGREGE

| | | |
|---|---|---|
| M. | COCHAUD Christophe | Anglais |

## ASSISTANTS

| | | |
|---|---|---|
| Mme | BEAUD Mariette | Biologie cellulaire |
| Mme | BERTHE Marie-Catherine | Biochimie |
| Mme | MOREAU Blandine | Pharmacognosie, phytothérapie |
| Mme | PAVIS Annie | Bactériologie |

# Serment des Apothicaires

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

Đ'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

Đ'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

Đe ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

# Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier le Professeur Alain Marsura de m'avoir permis d'effectuer cette thèse d'exercice. Votre soutien et votre grande disponibilité (et ce tout au long de mes études) ont été pour moi déterminantes à plus d'un titre. Votre excellent encadrement m'a donné une formation solide, qui continue de me servir au quotidien. Pour toutes ces raisons, veuillez recevoir ma profonde gratitude.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait le Professeur Alain Nicolas en jugeant ce travail et en acceptant de faire partie de mon jury de thèse. Je pèse mes mots puisqu'au fil des années vous avez toujours été présent, d'un grand soutien et de très bon conseil. Je n'oublierai jamais les nombreuses conversations (scientifiques, d'actualité, sérieuses, animées, drôles, les qualificatifs me manquent) que nous avons eues aux heures ouvrées (et non ouvrées…)

Je suis également très touché par l'honneur que me fait Madame le Professeur Danièle Barth en jugeant ce mémoire et en acceptant de faire partie de mon jury de thèse. Une grande partie des études présentées dans ce cadre n'auraient pas pu être réalisées sans que vous m'ayez ouvert les portes de votre laboratoire. Je vous suis reconnaissant pour votre grande disponibilité et la liberté que vous m'avez accordée.

Je voudrais également remercier tous les membres du GEVSM, encore présents ou déjà partis, et tout spécialement Jean-Bernard Regnouf-de-Vains, Francine Kedzierewicz, Stéphane Menuel, Nicolas (et ses mémorables coffee-times), Romain, Philippe, Maxime, Julien, Adel, Michel pour toute la bonne humeur du temps passé avec vous. Bonne continuation à tous.

J'ai par ailleurs une pensée émue pour le Professeur Claude Selve, toujours sympathique et disponible, et grâce auquel j'ai pu intégrer le DEA de Chimie et Physico-chimie moléculaire à la Faculté des Sciences de Vandoeuvre. Cette année a été un facteur d'ouverture à de nombreux égards, tant sur le point de vue scientifique qu'humain. J'aurais sincèrement aimé pouvoir vous remercier pour tout cela.

Au Laboratoire de Thermodynamique des Milieux Polyphasés de l'ENSIC, Dalila, Svetlomir et Hervé m'ont réservé un excellent accueil et m'ont initié aux manipulations en $CO_2$ supercritique. Je les en remercie.

J'ai eu en outre la chance de rencontrer au sein du Laboratoire de Chimie Analytique Igor Clarot. Là où d'autres y voient un enseignant, j'y vois un ami. Merci pour ce que tu m'as apporté.

Je voudrais remercier Dominique Decolin et Emanuelle Marchal-Heussler pour leurs qualités humaines, leur écoute et leurs conseils dans les moments difficiles.

Parmi les autres acteurs du DEA, je veux remercier Rafik, Jean-François « Jeff » Kuntz, David « Dave » Martinot, Marc, Philippe, Thomas, Estelle et Anne pour cette année intense et votre introduction immédiate et inconditionnelle au sein du cercle VCDTC. Malgré le temps et les distances, je ne vous oublie pas.

Quelques personnages récurrents (en plus des précédents) de l'Histoire contemporaine du Grand Nancy ont su s'illustrer et s'imposer ces dernières années. Si certains vous en mentionnent d'autres, ne les croyez pas. Qu'ils s'appellent Pierre, Cyril, Ben, Géraldine, Thomas, Gérald (et affiliées: Alexandra, Carole, Roberto, Silvia,…), Fabien, Ruche, Tairte, Marie-Laurence, Mathieu, Antoine Mougenot, Sophie, Antoine Munier, Pol-Edern, Seb, Christian ou bien Jean-Nicolas, tous auront permis que le quotidien ne soit pas qu'ordinaire.

Les grands films sont faits de nombreux de figurants, de quelques seconds rôles, mais que de rares rôles principaux. Eric Marguet fait partie de ceux-là. Ton ouverture d'esprit, ton humour, ta culture et les nombreuses discussions que nous avons pu avoir ont été incroyablement enrichissantes. Merci.

Pour les mêmes raisons et toujours en contrebas de Brégille, je voudrais te remercier pour ton amitié, Sarah. Tu as été là au bon moment. Adamson, tu n'es pas en reste, je te souhaite un avenir riche et digne de ton talent.

Pour clore le chapitre Bisontin, je me dois de mentionner Eric Brown. Toutes les rencontres extraordinaires que j'ai pu y faire, je te les dois. Good luck, dude.

Thierry A., Laurent B., Franck D., Antoine D., José G., Alain C., Dominique F., Chantal L. et feu Bruno C. ont été présents depuis maintenant un certain temps, et il convient que je leur rende ici hommage.

Je tiens enfin à remercier chaleureusement mes parents pour leur support au long de toutes ces années, et sans lesquels mes études, cette thèse et finalement peu de choses auraient été possibles.

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

# SOMMAIRE

**Introduction** 4

**Partie bibliographique** 5

**Chapitre I : Les cyclodextrines** 6

**Chapitre II : La réaction phosphinimide** 12

**Chapitre III : Les fluides supercritiques** 16

1. Généralités 16

2. Propriétés 18
   2.1. Pouvoir solvant 18
   2.2. Propriétés de transport 21

3. Applications des fluides supercritiques 22

4. Le dioxyde de carbone 24
   4.1. Intérêts 24
   4.2. Solubilité 24
   4.3. Solutions au problème de solubilité 27

5. Le groupement carbonyle 29
   5.1. Le $CO_2$ et le carbonyle comme acide et base de Lewis 29
      5.1.1. Données de la spectroscopie infrarouge 29
      5.1.2. Calculs *ab initio* 30
      5.1.3. Les preuves expérimentales de la $CO_2$-philie du carbonyle 31
   5.2. Application du groupement carbonyle : des polymères aux cyclodextrines 33
      5.2.1. Une interaction en deux points 33
      5.2.2. L'exemple des polymères 34
      5.2.3. L'application aux cyclodextrines 34

**Chapitre IV : Les vecteurs d'actifs nucléotidiques** 36

1. Géneralités 36

2. Les méthodes de transfection 37
   2.1. Les systèmes de transfection viraux et leurs limites 37
   2.2. Les systèmes de transfection non viraux 38

2.2.1. Les lipides cationiques 38
2.2.2. Les polymères cationiques 40
a) Avantages et inconvénients 40
b) Principes généraux 41
c) Les grandes classes de polymères cationiques 42
c.1.) Les polyéthylènimines (PEI) 42
c.2.) Les poly-L-Lysine (PLL) 43
c.3.) Polyamidoamine (PAMAM) ou dendrimères Starburst 44
c.4.) Comparaison 46

3. Les polyplexes comme médicament : de leur administration au noyau de la cellule 47

3.1. Obstacles au niveau systémique 47
3.1.1. Problèmes liés à la charge de surface positive 47
3.1.2. Barrière endothéliale 48
3.1.3. Biodistribution 48
3.1.4. La solution : la stabilisation stérique des complexes 48

3.2. Obstacles au niveau cellulaire 49
3.2.1. La membrane cellulaire 49
3.2.2. La sortie de l'endosome 49
3.2.3. Du cytoplasme au noyau 51
a) Stabilité et mobilité de l'ADN dans le cytoplasme 51
b) L'effet du vecteur 51

3.2.4. L'entrée dans le noyau 52

4. La place des cyclodextrines et l'exemple des travaux de Davis 54
4.1. Relation structure-activité 54
4.1.1. Distance entre les centres cationiques et les cyclodextines 55
4.1.2. Distance entre les centres cationiques et importance du bras espaceur 56

4.2. Conception sur mesure pour une utilisation *in vivo* 57
4.2.1. Stabilisation par PEG 58
4.2.2. Greffage de ligand et ciblage de types cellulaires particuliers 60

**Travaux personnels** 63

1. Synthèse d'uréido-cyclodextrines macrocycliques 64

2. Mise au point de la réaction en milieu supercritique 67

3. Réalisation des premières étapes de synthèse d'un ligand potentiel d'actifs nucléotidiques 68
3.1. Objectifs 68
3.2. Stratégie de synthèse envisagée 68

**Conclusion et perspectives** 72

**Partie expérimentale** 73

1. Méthodes analytiques 74
   1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) 74
   1.2. Spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) 74
   1.3. Spectres infrarouge 74
2. Synthèses 75
3. Montage expérimental utilisé pour les synthèses en fluide supercritique 81

**Bibliographie** 82

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

# Introduction

Les cyclodextrines sont une classe de molécules désormais bien connue et qui ont eu de nombreuses applications dans des domaines variés, de la synthèse organique à la pharmacie galénique en passant par la chimie analytique. De nombreux dérivés ont été synthétisés et certains se sont trouvés être de remarquables ligands. Les dérivés de type urée occupent une place de choix, notamment en raison leurs propriétés de complexation. Pour leur obtention, la réaction phosphinimide a constitué un réel progrès, puisqu'elle a permis de s'affranchir du phosgène, réactif particulièrement toxique et de manipulation délicate, et jusqu'alors indispensable. Une nouvelle méthodologie de synthèse en milieu dioxyde de carbone supercritique a été développée et est présentée ici.

Les propriétés de ligands des cyclodextrines ont également servi à la conception d'un nouveau ligand pour la complexation et la vectorisation d'actifs de structure nucléotidique. Celui-ci se veut une alternative nouvelle et originale à celles déjà existantes.

Une première partie théorique présente les éléments bibliographiques supportant le rationnel des travaux entrepris, en s'appuyant sur quatre thèmes fondamentaux. Les cyclodextrines seront décrites pour leurs caractéristiques essentielles. La réaction phosphinimide et son application aux cyclams sera abordée dans un deuxième volet. Les fluides supercritiques et plus particulièrement le dioxyde de carbone seront présentés dans un troisième temps. Enfin, les concepts généraux de vectorisation d'actifs nucléotidiques et les approches majeures existantes fixeront le cadre pour la conception du ligand envisagé.

Une deuxième partie présentera ensuite les travaux expérimentaux réalisés.

Une troisième partie conclura enfin sur les résultats et dégagera les perspectives.

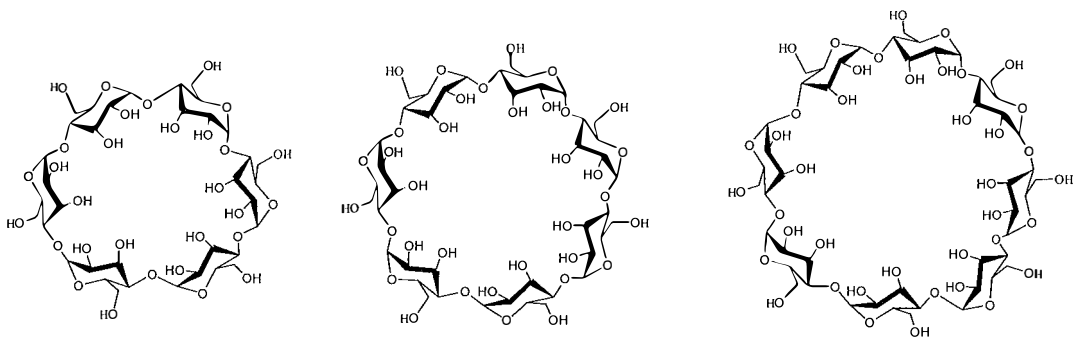
# Partie bibliographique

BIBLIOTHEQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

# Chapitre I :

## Les cyclodextrines

Les cyclodextrines (CDs) sont des oligomères cycliques d' α-glucopyranose en conformation $^4C_1$ et liés en (1-4). Il s'agit d'une famille chimique désormais bien connue, produite industriellement et constituée essentiellement de trois membres :l'α-CD, la β-CD, et la γ-CD, formées respectivement de 6, 7, et 8 unités de glucose.



α-cyclodextrine β-cyclodextrine γ-cyclodextrine

*Figure 1 : les trois cyclodextrines*

Le squelette possède la forme d'un cône tronqué et définit en son centre une cavité hydrophobe. Les hydroxyles secondaires portés par les carbones C2 et C3 sont situés à la base du cône, alors

que les hydroxyles primaires portés par les carbones C6 se trouvent sur la face opposée. L'hydroxyle en C2 d'une unité glucopyranosique peut former une liaison hydrogène avec l'hydroxyle en C3 de l'unité adjacente.

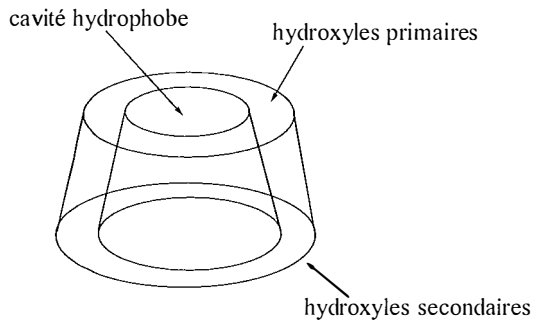



*Figure 2 : aspect tridimensionnel d'une cyclodextrine*

La β-CD réalise ainsi une ceinture de liaisons hydrogènes parfaite, assurant la rigidité de la structure, mais expliquant aussi sa faible solubilité dans l'eau par rapport aux α-CD et γ-CD qui établissent un réseau plus lâche, et sont par là même moins rigides et plus solubles en milieu aqueux. En voici résumées certaines de leurs caractéristiques essentielles :

*Tableau 1 : Quelques caractéristiques des cyclodextrines [1]*

| | *α-CD* | *β-CD* | *γ-CD* |
|---|---|---|---|
| Nombre d'unité de glucose | 6 | 7 | 8 |
| Nombre d'hydroxyles | 18 | 21 | 24 |
| Masse moléculaire ($M_r$, g/mol) | 972 | 1135 | 1297 |
| Solubilité dans l'eau (g/l, T amb.) | 145 | 18,5 | 232 |
| Diamètre de la cavité (Å) | 4,7 – 5,3 | 6,0 – 6,5 | 7,5 – 8,3 |
| Hauteur du cône tronqué (Å) | 7,9 ± 0,1 | 7,9 ± 0,1 | 7,9 ± 0,1 |
| Volume approximatif de la cavité ($Å^3$) | 174 | 262 | 427 |

A l'état solide, les CDs ne sont pas hygroscopiques, mais forment néanmoins des espèces stables d'hydrates. A titre d'exemple, la β-CD sous sa forme hydratée existe à l'état de deux formes cristallines : la β-CD·11 $H_2O$ et la β-CD·12 $H_2O$. Ces molécules d'eau sont pour une part incluses dans la cavité, et pour une autre part font partie intégrante de la structure cristalline. L'élimination de ces molécules d'eau conduit à une structure amorphe, et les variations de

cristinallinité comme une fonction de la déshydratation sont mises en évidence par diffraction des rayons X. La présence de ces molécules d'eau est tout sauf anecdotique, notamment en ce qui concerne la réactivité et la formation de complexes (cf. *infra*).

En outre, les CDs peuvent être fonctionnalisées, les modifications portant sur les hydroxyles. La réactivité de ceux-ci n'est pas équivalente pour une même unité de glucose, la hiérarchie étant : C6-OH > C2-OH > C3-OH. La différence n'est pas très grande, et peut être modulée par les conditions de réaction (température, pH…). On parlera de CD native pour les CDs non modifiées. De très nombreux dérivés ont ainsi été synthétisés, la suite du propos en donnera quelques exemples.

La cavité hydrophobe que définit une CD permet d'y loger une molécule : on forme ainsi un complexe d'inclusion, entre une molécule hôte (la CD) et une molécule invitée et ce par le biais de liaisons faibles (non covalentes.) Ceci donne lieu à un équilibre dynamique association – dissociation, caractérisé par une constante d'équilibre.

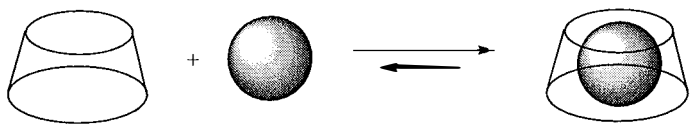



*Figure 3 : un complexe d'inclusion hôte – invité*

La taille et la géométrie de la molécule invitée ainsi que les groupements chimiques qu'elle porte sont des paramètres cruciaux, et de nombreuses topologies de complexes ont pu être obtenues, comme l'illustrent les exemples ci-après.

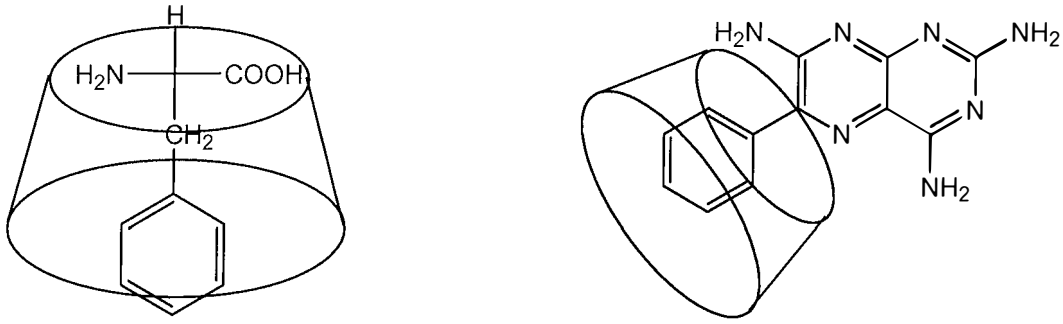



*Figure 4 : Complexes 1 :1 entièrement inclus (phénylalanine, à gauche) et partiellement inclus (triamterene, à droite) [78], [79]*

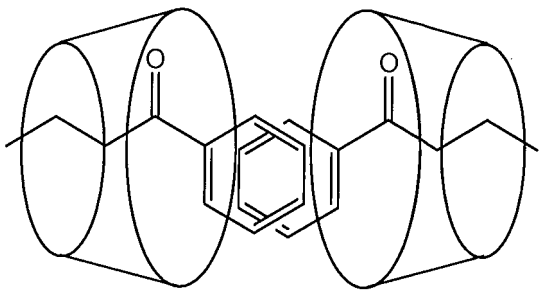



*Figure 5 :*

*Complexe 2:2 de butyrophénone [80]*

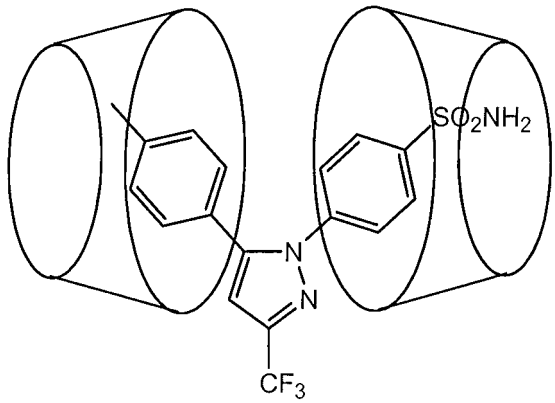



*Figure 6 :*

*Complexe 2 :1 de celecoxib [81]*

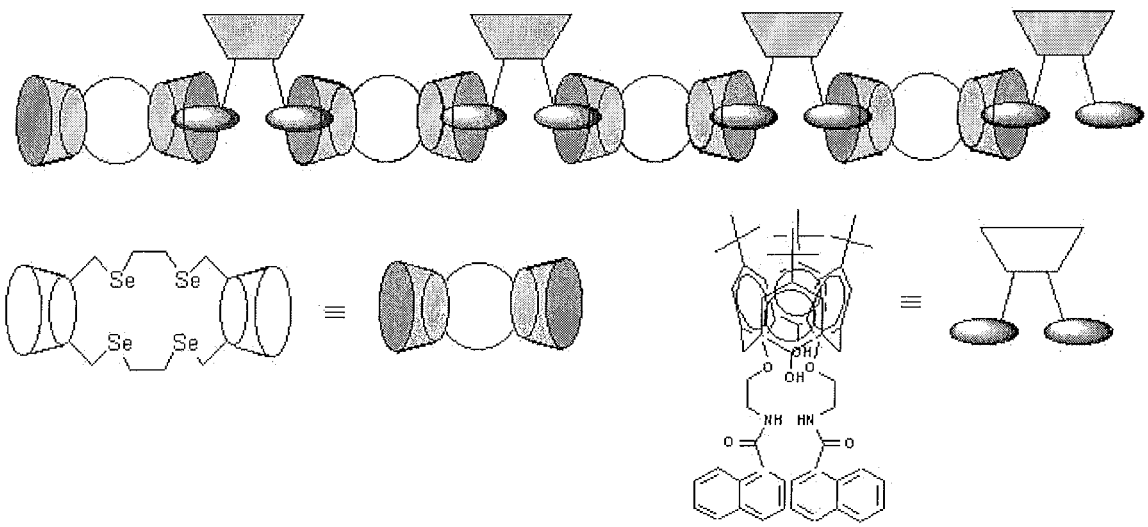



*Figure 7 : nano-ruban [82]*

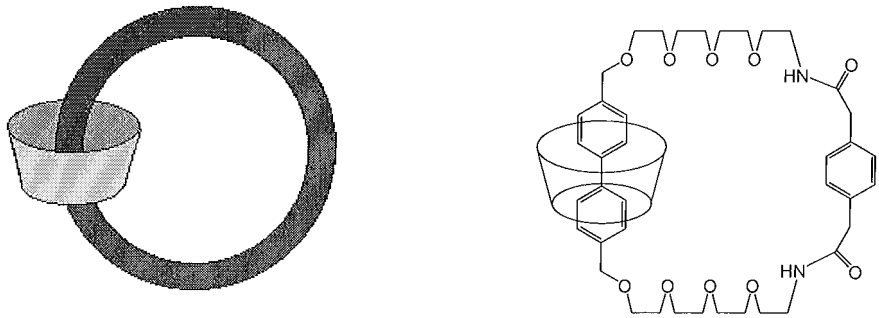



*Figure 8 : Concept général d'un catenane et illustration [83]*

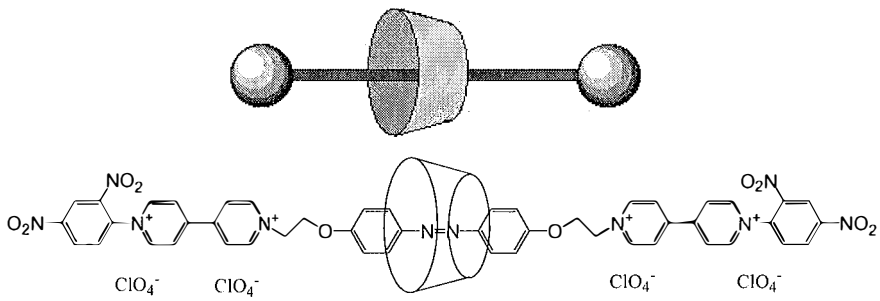



*Figure 9 : Concept général d'un rotaxane et illustration [84]*

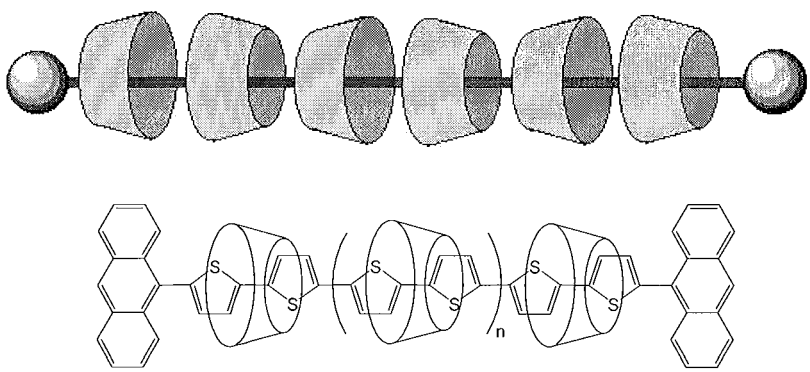



*Figure 10 : Concept général d'un polyrotaxane et illustration [85]*

Ces exemples ne sauraient être exhaustifs, de nombreux travaux ont été réalisés et continuent à l'être. De nombreux développements ont ainsi pu être apportés dans le cadre de la chimie supra moléculaire (mimes d'enzymes, nano-conducteurs et autres dispositifs à l'échelle nanométrique, etc.)

C'est toutefois dans le domaine du médicament que les propriétés de complexation des CDs ont eu le plus grand impact. La bonne solubilité intrinsèque des CDs dans l'eau permet en effet de solubiliser des substances hydrophobes. L'intérêt n'a pas échappé au monde industriel, pour la vectorisation de principes actifs pharmaceutiques peu solubles dans les liquides biologiques. L'enjeu est d'autant plus important que les CDs natives et de certains dérivés sont dépourvus de toute toxicité jusqu'à des doses relativement élevées. Pour de plus amples informations, le lecteur pourra se reporter à la revue de Loftsson [86] qui dresse un état de l'art des utilisations de complexes de CDs administrés par voie orale pour augmenter la biodisponibilité des principes actifs inclus ou à celle d'Hirayama [87], un peu moins récente mais toujours d'actualité.

# Chapitre II :

## La réaction phosphinimide et les uréido-cyclodextrines

Il y a maintenant 86 ans, Staudinger [2] décrivait la réduction d'une fonction azide en amine par la triphénylphosphine, en passant par un intermédiaire phosphinimide.

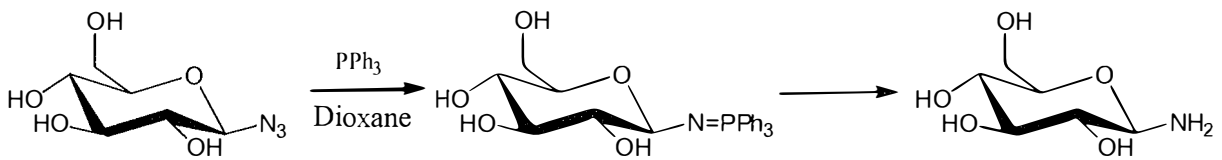



*Schéma 1 : la réaction de Staudinger*

Une évolution a été réalisée par l'équipe de Pintér avec la réaction dite « phosphinimide ».

La réaction originale [3] permettait à partir de monoazido-β-D-glucopyranose et en présence de triphénylphosphine et de dioxyde de carbone l'obtention d'un carbamate cyclique. L'addition d'une amine au milieu réactionnel conduit aux dérivés mono-uréido-saccharidiques [4]. Le mécanisme passe par un intermédiaire phosphinimide sous l'action de la triphénylphosphine, qui,

par réaction avec une amine en présence de $CO_2$, forme l'urée finale. Les calculs théoriques semi-empiriques (PM3, AM1) ont démontré l'existence d'un intermédiaire isocyanate, qui a été isolé par la suite [5,6]. (Schéma 1). Cette réaction a été transposée aux azido-cyclodextrines et aux cyclams par Marsura [7,8]. D'autre part, la synthèse d'uréido-CDs a été réalisée par la réaction phosphinimide sur polymère greffé par $P(Ph)_3$ [9].

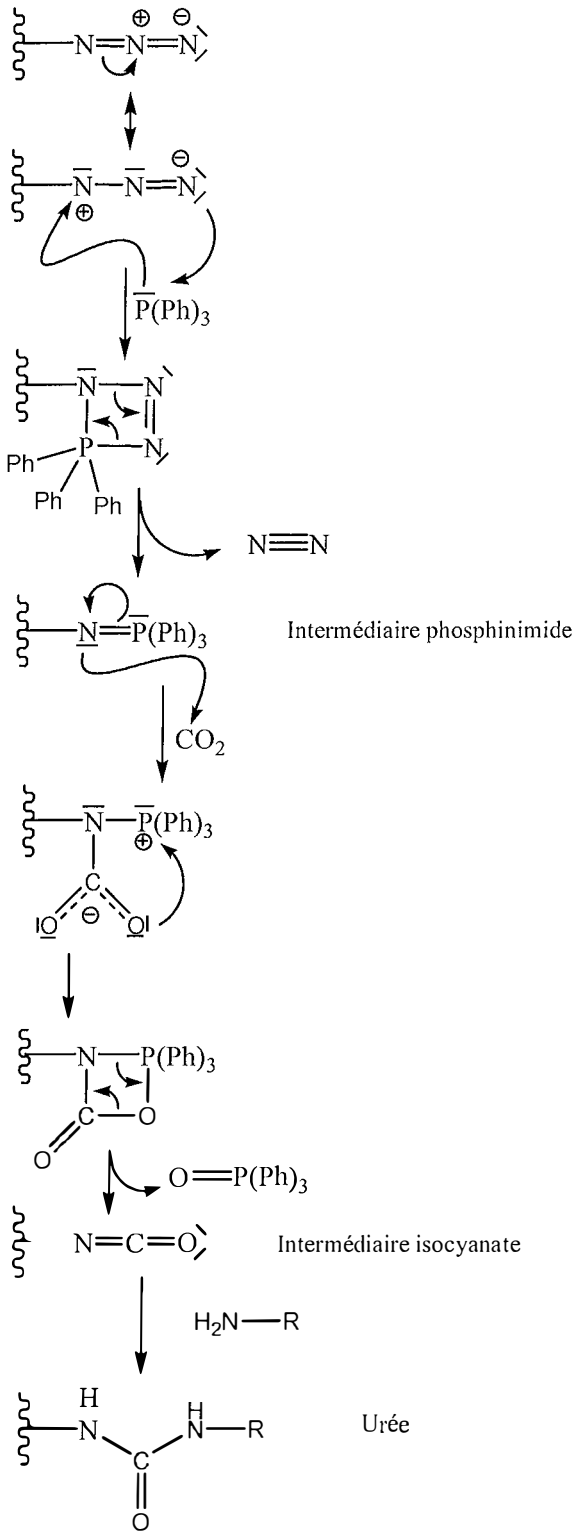



*Schéma 2 : Mécanisme réactionnel de la réaction phosphinimide*

La fin des années soixante a été caractérisée par un intérêt particulier pour les composés macrocycliques. Cette période marque le début des premières synthèses de macrocycles et de la préparation de cryptants. Les travaux fondateurs furent ceux de Pedersen [76] et de Park et Simmons [77], avec, respectivement, la synthèse d'ethers-couronne liant les cations, et celle de diammoniums bicycliques liant les anions. L'idée était l'analogie des systèmes macrocycliques synthétiques avec les systèmes biologiques : il s'agissait de réaliser des modèles synthétiques simples pour l'étude des mécanismes biologiques impliquant des ions (métallo-enzymes en particulier).

Les uréido-CDs greffées sur cyclams offrent un site de coordination métallique (cyclam) et plusieurs cavités hydrophobes (CD) pouvant accueillir une ou des molécules invitées. Leur intérêt dans le cadre de modèles biomimétique de catalyse enzymatique est donc évident.

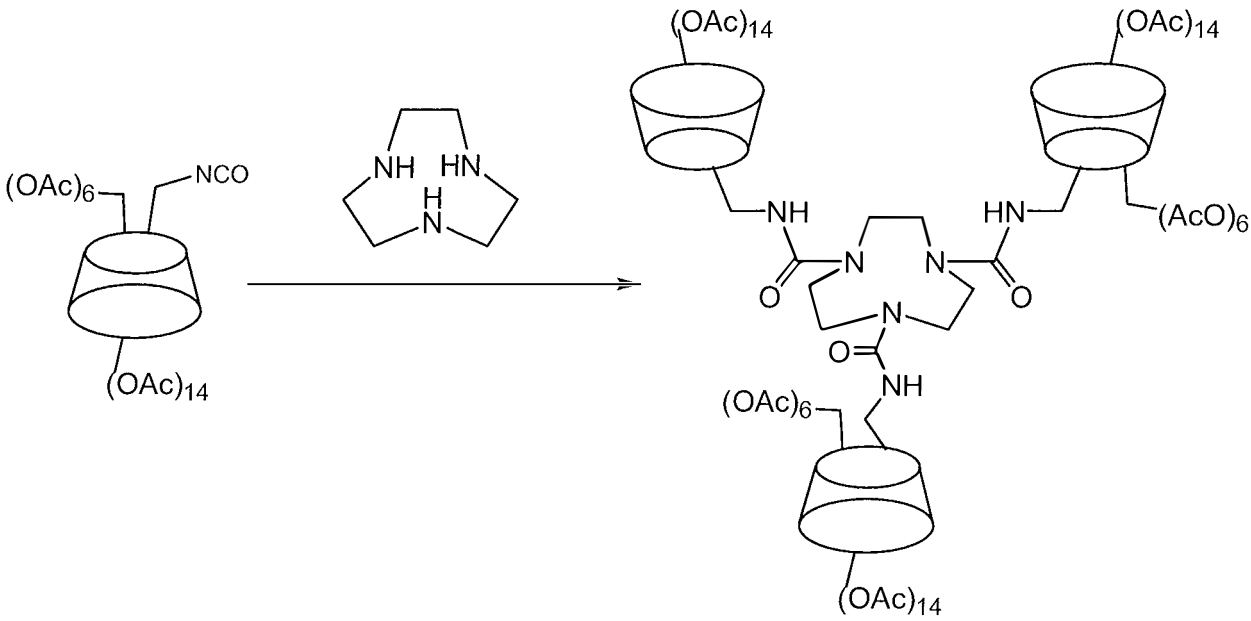



*Schéma 3 : La réaction phosphinimide appliquée aux cyclams*

# Chapitre III :

## Les fluides supercritiques

### 1. Généralités

L'état physique d'une substance pure est caractérisé par un diagramme d'état qui lui est propre. Ce dernier définit, en fonction de la température T et de la pression P :

- trois zones dans lesquelles la substance est dans un état unique (solide, liquide ou vapeur) ;
- trois zones frontières (lignes) entre les précédentes dans lesquelles la substance est présente sous deux états en équilibre (solide/liquide, liquide/vapeur, solide/vapeur) ;
- un point triple au niveau duquel les trois états coexistent ;
-d'un point critique (défini par une température critique $T_c$ et une pression critique $P_c$) au-delà duquel la substance est présente à l'état de fluide : **le domaine supercritique.**

L'état fluide supercritique est un état qui n'est plus ni liquide, ni vapeur. En effet, au-delà du point critique, les masses volumiques des phases liquide et vapeur deviennent égales, et il n'est plus possible de les distinguer. Le tableau 2 présente les coordonnées critiques de quelques corps purs d'intérêt.

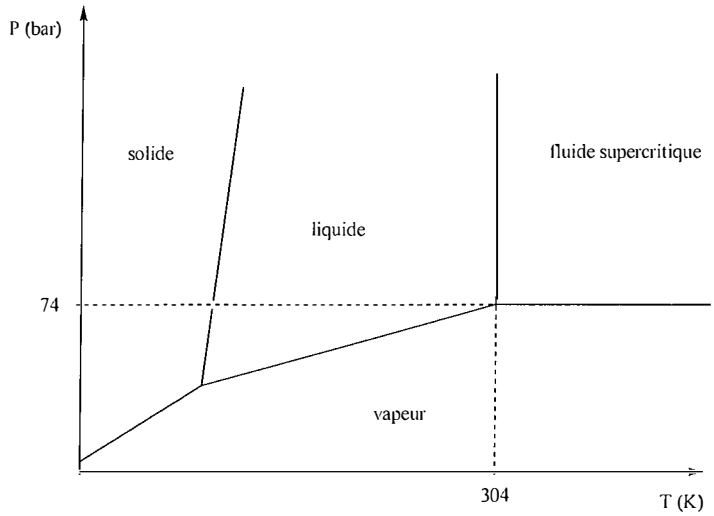



*Figure 11 : Diagramme d'état du dioxyde de carbone [13]*

*Tableau 2 : Coordonnées critiques, polarisabilité et moment dipolaire de quelques corps purs d'intérêt*

| *Corps pur* | *Température critique $T_c$ (K), [10]* | *Pression critique $P_c$ (bar) [10]* | *Polarisabilité $\alpha$ ($Å^3$) [11]* | *Moment dipolaire $\mu$ (Debye) [12]* |
|---|---|---|---|---|
| Dioxyde de carbone | 304,4 | 73,8 | 16,920 | 0 |
| Eau | 647,3 | 221,2 | 10,130 | 1,85 |
| Acétone | 508,2 | 47,02 | 41,140 | 2,880 |
| Ammoniac | 405,5 | 43,9 | 14,190 | 1,47 |
| Méthane | 190,6 | 46,0 | 16,52 | 0 |
| Ethane | 305,4 | 48,8 | 28,520 | 0 |
| Propane | 369,8 | 42,5 | 39,960 | 0,08 |
| Fluoroforme | 299,3 | 48,6 | 19,060 | 0 |
| Hélium | 5,19 | 2,29 | 1,407 | 0 |
| Xénon | 282,3 | 58,4 | 4 | 0 |

## 2. Propriétés

L'engouement qu'ont suscité les fluides supercritiques vient en grande partie de leurs propriétés physico-chimiques particulières, intermédiaires entre celles des liquides (pouvoir solvant) et des gaz (propriétés de transport).

### 2.1. Pouvoir solvant

Le développement de nouveaux systèmes de solvatation a toujours été au centre de la chimie, ainsi que le démontrent les exemples de solvants comme le DMSO, la DMF, l'HMPT,… (effet de milieu dans le cas de mécanismes compétitifs) il y a quelques dizaines d'années et des liquides ioniques à l'heure actuelle. Les fluides supercritiques s'inscrivent dans ce cadre, historiquement pour leurs applications en extraction.

La solvatation d'espèces chimiques est régie par les interactions existant entre les molécules de soluté et de solvant. Il s'agit en particulier des :

- forces de Van der Waals, comprenant :
  - * les forces de Keesom (interactions entre deux dipôles permanents)
  - * les forces de Debye (interactions entre un dipôle permanent et un dipôle induit)
  - * les forces de dispersion ou de London (interaction entre deux dipôles instantanés)
- liaisons hydrogène.

Ces interactions sont elles mêmes déterminées par l'état physique du solvant. En effet, du fait de leurs masses volumiques très différentes, la probabilité d'interaction entre les molécules de soluté et de solvant est largement moindre à l'état gazeux qu'à l'état liquide. De fait, les gaz ne sont généralement pas considérés comme des solvants. Dans le cadre qui nous intéresse, et en première approximation, la solvatation peut donc être mise en relation avec le volume molaire ($V_m$) ou la masse volumique ($\rho = M_r/V_m$) du solvant. La figure 5 illustre les variations de la masse volumique relative $\rho_r = \rho/\rho_c$ (avec $\rho_c$ la masse volumique au point critique) d'un corps pur au voisinage de son point critique.

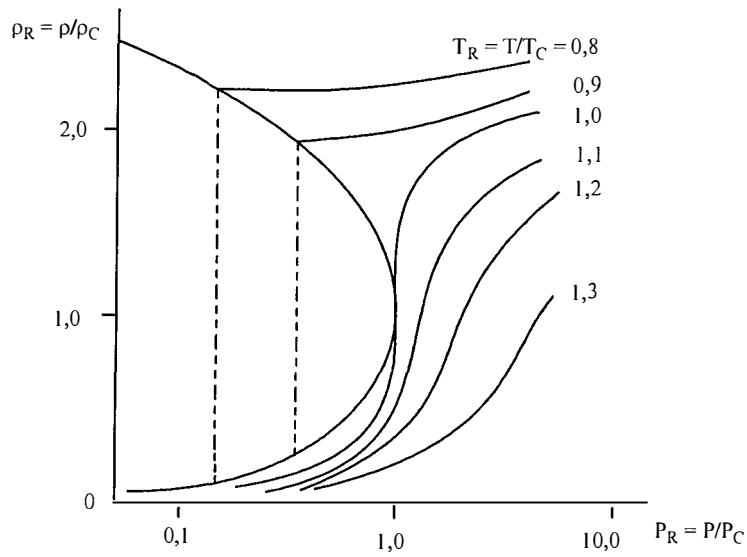



*Figure 12 : Isothermes représentant la variation de masse volumique autour du point critique [13]*

Les isothermes permettent de distinguer deux grands cas de figure :

a) $T < T_c$

Avant le point critique, c'est l'équilibre entre la phase liquide et gazeuse qui prévaut, distinguant de part et d'autre le domaine d'existence exclusive du liquide ($\rho_r \approx 2$) et celui du gaz ($\rho_r \approx 0,1$). La verticale en pointillé rend compte de l'existence de la courbe d'ébullition : le passage d'une phase à l'autre est discontinu pour les masse volumiques.

b) $T \geq T_c$

Au niveau du domaine d'existence de la phase supercritique, au voisinage du point critique :

- les $\rho_r$ sont de l'ordre de celles des liquides : les fluides supercritiques peuvent donc être *a priori* légitimement crédités d'un pouvoir solvant potentiel;
- les $\rho_r$ varient de façon continue avec T et P : le pouvoir solvant des fluides supercritiques peut être aisément modulé avec T et P.

Un exemple classique illustrant d'une part le pouvoir solvant « à géométrie variable » des fluides supercritiques et d'autre part celui de la relation existant entre masse volumique et solubilité est celui de la solubilité du naphtalène dans l'éthylène supercritique ($T_c$ = 9,3°C et $P_c$ = 50,5 bar). L'isotherme à 12°C ($T_r = T/T_c$ = 1,01) montre qu'à P < 50 bar, la solubilité du naphtalène est très faible : c'est celle que l'on attendrait pour un solide dans un gaz. Dès que l'on arrive à 50 bar, soit près du point critique, la solubilité augmente considérablement. Passé 90 bar, la solubilité tend vers une asymptote. Globalement, l'allure de la courbe $S = f(P)_T$ décrivant la solubilité en fonction de la pression à T constant suit tout à fait le profil de celle $\rho_r = f(P_r)_T$.

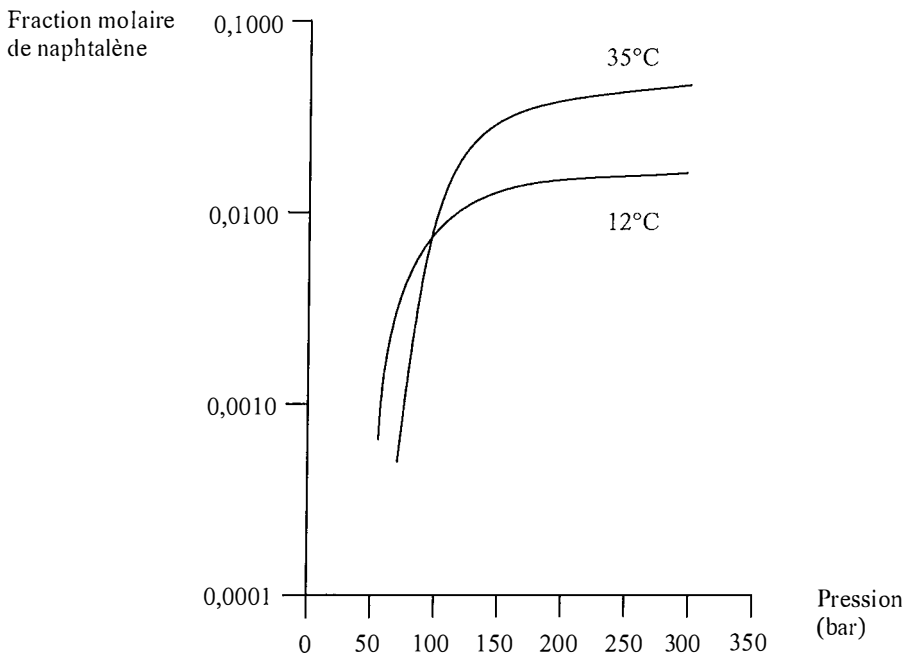



*Figure 13 : Solubilité du naphtalène dans l'éthylène supercritique [13]*

Toutefois, la description thermodynamique des mélanges (systèmes constitués de plusieurs corps purs) est très complexe au voisinage et au delà des points critiques de leurs constituants. Si de nombreux diagrammes de phases ont été décrits pour les mélanges binaires, la prévision des

équilibres reste néanmoins délicate. Chrastil [14] proposa un modèle empirique pour décrire la solubilité de solides dont le mérite est d'être à la fois simple et fiable :

$$C = \rho^{\kappa} \exp (a/T + b)$$

Avec : C, la concentration du soluté dans le fluide supercritique (c'est à dire la solubilité)
a,b et $\kappa$, des constantes empiriques.

Sa relation rend bien compte de la manière dont varie la solubilité :

- elle augmente avec $\rho$ (et donc avec P) à T constante ;
- elle peut augmenter ou diminuer quand T augmente à P constante. En effet, deux effets antagonistes coexistent. L'augmentation de température se traduit par une augmentation de la pression de vapeur du soluté, donc de sa volatilité et par suite de sa solubilité. Parallèlement, la masse volumique du solvant diminue, donc le pouvoir solvant également.

Des modèles de plus en plus complexes (mais aussi de plus en plus spécifiques du système décrit) ont par la suite vu le jour. Dans notre exposé, ils ne présentent pas d'intérêt particulier et il n'en sera fait que mention.

## 2.2. Propriétés de transport

Si les fluides supercritiques sont comparables aux liquides par leur pouvoir solvant, ils sont également à rapprocher des gaz par leurs propriétés de transport. Celles-ci sont essentiellement au nombre de trois :

- *la diffusion*, caractérisée par le coefficient de diffusion D ($m^2/s$), est représentative du transport de molécules dans le cas d'un gradient de concentration;
- *la viscosité*, caractérisée (entre autres) par la viscosité dynamique $\eta$ ($Pa \cdot s$), régit les transports de fluide dans le cas d'un gradient de pression;
- *la conductivité thermique*, caractérisée par la conductivité thermique $\lambda$ ($W \cdot m^{-1} \cdot K^{-1}$), est représentative des transferts d'énergie dans le cas d'un gradient thermique.

De façon générale, ces trois paramètres sont largement plus favorables au transport de molécules dans les fluides supercritiques que dans les liquides correspondants, et sont pour certains de l'ordre de grandeur de ceux des gaz correspondants. Le tableau 3 en donne une illustration.

*Tableau 3 : viscosité dynamique du dioxyde de carbone et coefficient de diffusion du naphtalène dans le dioxyde de carbone.*

| Etat | $\eta_{CO2}$ (Pa·s) | $D_{naphtalène/CO2}$ ($m^2/s$) |
|---|---|---|
| Vapeur (313 K, $10^5$ Pa) | 16 | $5{,}1\cdot10^{-6}$ |
| Supercritique (313 K, $10^3$ Pa) | 17 | $1{,}4\cdot10^{-8}$ |
| Liquide (300 K, $5\cdot10^3$ Pa) | 133 | $8{,}7\cdot10^{-9}$ |

## 3. Applications des fluides supercritiques

Il découle de ces propriétés un certain nombre d'applications possibles:

*- comme solvants d'extraction*

Leur utilisation repose ici sur la possibilité de faire varier en fonction de la température et de la pression le pouvoir solvant du fluide. Ce type d'extraction s'est bien développé à l'échelle industrielle (décaféination du café, du thé,…)

*- comme éluant pour la chromatographie*

La chromatographie en fluide supercritique (SFC) est réalisable à l'échelle analytique ou préparative. Les principes mis en jeu sont ceux de l'extraction précités associés aux mécanismes de rétention sur colonne de la CLHP (chromatographie liquide haute performance). Ainsi, faire un gradient de pression en SFC équivaut à faire un gradient de solvant fort[1] en CLHP.

*- comme milieu réactionnel*

Ce sont essentiellement les propriétés intrinsèques du dioxyde de carbone (non-toxicité, non-inflammabilité, non-oxydant) et celles inhérentes à l'état de fluide supercritique (meilleures propriétés de transport, solubilité ajustable permettant d'orienter les réactions,…), qui en font un

[1] *Dans une phase mobile binaire composée d'un système de deux solvants, le solvant fort est celui étant le plus éluant*

solvant de choix. D'autre part, avec une installation adéquate, le système réactionnel peut être couplé à un système de séparation et de purification, de manière à réaliser un procédé entièrement en ligne.

A titre d'illustration, citons les travaux de Kumar [15], qui ont permis la synthèse de polystyrène de masse moléculaire contrôlée et située dans une étroite plage de distribution. La solubilité du polymère dans le dioxyde de carbone supercritique ($CO_2$ s.c.) est fonction de sa longueur : lorsque celle-ci augmente, la solubilité diminue, et, au-delà d'une masse moléculaire critique, le polymère précipite. La simple variation des conditions de pression permet de moduler la solubilité, et donc la masse moléculaire critique : il est possible d'orienter la réaction.

Le nombre d'exemples croissant de réactions en fluide supercritique ne fait que confirmer le fait qu'il constitue un milieu de réaction particulièrement innovant et riche en perspectives. Dès 1997, Michel Perrut précisait déjà qu'en ce qui concerne les fluides supercritiques, "les années quatre-vingt ont été celles de l'extraction, les années quatre-vingt dix celles des matériaux, et le début de ce siècle sera marqué par les réactions"(traduit de l'anglais).

# 4. Le dioxyde de carbone

## 4.1. Intérêts

Une grande partie de l'intérêt des fluides supercritiques vient des particularités du $CO_2$, qui est de loin le composé le plus utilisé, en raison :

- des coordonnées de son point critique, notamment la température, ce qui permet son utilisation avec des substances thermolabiles ;
- de sa facilité d'élimination, puisqu'une fois le système revenu à pression atmosphérique, le $CO_2$ se retrouve à l'état de gaz. La purification du système se voit donc simplifiée.
- de sa non inflammabilité ;
- de sa stabilité chimique ;
- de son coût modeste et de sa disponibilité en grande quantité avec une excellente pureté ;
- de sa non-toxicité. Il représente une alternative de choix aux solvants organiques (chlorés en particulier), avec des applications marquées dans les milieux pharmaceutiques, alimentaires et cosmétiques. Permettre des applications respectueuses de l'environnement (notion de chimie « verte », ou green chemistry en anglais), c'est là un des grands atouts du $CO_2$, et le lecteur souhaitant des précisions supplémentaires pourra se reporter à deux articles récents de Beckman, l'un dans le domaine de la synthèse [16], particulièrement complet et détaillé, et l'autre plus général dans le domaine des procédés [17].

## 4.2. La solubilité

Les propriétés du $CO_2$ sont cependant bien différentes de celles de l'eau ou des solvants organiques habituels.

Les paramètres gouvernant la solubilité dans le $CO_2$ sont particulièrement complexes. Les premières tentatives de compréhension de ces phénomènes en donnaient une description *physique* en terme de forces intermoléculaires, largement suffisante en première approximation[1]. La solubilité d'une espèces chimique dans un solvant dépend (entre autres) des interactions solvant-soluté, soluté-soluté et solvant-solvant. A ce titre, le potentiel d'énergie intermoléculaire $\Gamma$

[1] *Une description sur le plan chimique apporte dans certains cas des éléments de pertinence supplémentaires (cf. 5.2.2. L'exemple des polymères)*

existant à la température T entre deux espèces chimiques i et j séparées d'une distance r est donné par [18,19] :

$$\Gamma_{ij}(r,T) = \underbrace{- C_1 \frac{\alpha_i\alpha_j}{r^6}}_{1^{er}\text{ terme}} \underbrace{- C_2 \frac{\mu_i^2\mu_j^2}{r^6 KT}}_{2^{ème}\text{ terme}} \underbrace{- C_3 \frac{Q_i^2Q_j^2}{r^{10} KT}}_{3^{ème}\text{ terme}} \underbrace{- C_4 \frac{\mu_i^2Q_j^2}{r^8 KT}}_{4^{ème}\text{ terme}} \underbrace{- C_5 \frac{\mu_j^2Q_i^2}{r^8 KT}}_{5^{ème}\text{ terme}}$$

Avec : $\alpha$, la polarisabilité ;
$\mu$, le moment dipolaire ;
Q, le moment quadrupolaire ;
K, la constante de Boltzman ;
$C_1 - C_5$, des constantes.

Le premier terme de la relation rend compte du rôle des polarisabilités de i et j. La polarisabilité est définie comme la capacité du nuage électronique à se déformer sous l'influence d'un champ électrique. Expérimentalement, elle est mesurée par le rapport du moment dipolaire induit ($\mu_{ind}$) sur le champ électrique qui est à son origine (E) :

$$\alpha = \mu_{ind} / E$$

Toute molécule présente en effet un dipôle instantané dû aux oscillations des électrons qui induit un dipôle dans le voisinage. Ce sont ces interactions qui gouvernent la solubilité d'un soluté non polaire dans un solvant non polaire.

Ce terme est généralement appelé énergie de dispersion ou potentiel d'énergie dipôle induit – dipôle induit. Son indépendance vis à vis de la température et sa proportionnalité à $1/r^6$ (à comparer avec les autres termes) en font le terme dont la contribution à $\Gamma_{ij}(r,T)$ est la plus importante. Dès lors, la polarisabilité apparaît comme la propriété clé au niveau moléculaire qui renseigne sur la force d'un solvant. A l'intérieur d'une classe de molécules, la polarisabilité augmente avec la taille des molécules, puisque plus une molécule a d'électrons, moins ils sont liés. Dans le cas des gaz rares, le xénon est plus gros que l'hélium et est donc plus polarisable.

C'est un des éléments qui permet d'expliquer que le xénon soit un bon solvant en phase supercritique. Dans le cas du $CO_2$, la polarisabilité est faible, de l'ordre de celle du méthane, un solvant non polaire très faible en phase supercritique.

Le deuxième terme traduit l'interaction de deux molécules ayant toutes deux un moment dipolaire permanent. L'interaction a la même relation à la distance r que les forces de dispersion (en $1/r^6$), mais dépend de la température. Ces interactions seront donc d'autant plus importantes que la température est faible. La conséquence est que les molécules très polaires auront une tempéraure critique $T_c$ élevée (exemples : eau, acétone, tableau 2). A l'inverse, le $CO_2$ ne présentant pas de moment dipolaire, ce terme sera nul et il ne sera pas étonnant que sa température critique soit modérée.

Le troisième terme rend compte des contribution des moments quadrupolaires à $\Gamma_{ij}(r,T)$. Celui du $CO_2$ est représenté par le schéma 4 :

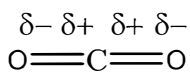



*Schéma 4 : Quadrpole du $CO_2$*

Il a la même dépendance à la température que le précédent, mais son importance décroît beaucoup plus vite quand r diminue (proportionnel à $1/r^{10}$). Sa contribution sera donc relativement faible.

En outre, dipôles et quadrupôles peuvent également interagir entre eux, ce que décrivent les quatrième et cinquième termes. De nouveau, l'absence de moment dipolaire du $CO_2$ rend un des deux termes nuls (selon que $CO_2$ soit i ou j).

Enfin, toute molécule ayant un dipôle ou un quadrupôle permanent génère un champ magnétique qui induit un dipôle temporaire aux molécules environnantes. Pour être tout à fait complète, la relation devrait donc faire apparaître les potentiels d'énergie intermoléculaire induits :

$$- C_6 \frac{\mu_j^2\alpha_i + \mu_i^2\alpha_j}{r^6} - C_7 \frac{Q_j^2\alpha_i + Q_i^2\alpha_j}{r^8}$$

Néanmoins, ces sixième et septième termes sont généralement négligeables et négligés.

Au final, ces sept termes sont de faible importance : les interactions qu'engagera le $CO_2$ avec une seconde espèce chimique seront limitées.

La solubilité d'un soluté i dans un solvant j est le fait de l'équilibre des forces d'interaction intermoléculaires existant entre soluté et soluté ($\Gamma_{ii}$), solvant et solvant ($\Gamma_{jj}$), soluté et solvant ($\Gamma_{ij}$), et qui est quantifié par la quantité E :

$$E = z[\Gamma_{ij} - ½ (\Gamma_{ii} + \Gamma_{jj})]$$

Avec z le nombre de paires ij soluté – solvant.

Il en découle qu'à faible température :

- Le $CO_2$ est un mauvais solvant pour les molécules non polaires. L'énergie E est ici gouvernée par les interactions quadrupolaires du $CO_2$.
- Le $CO_2$ est un mauvais solvant pour les molécules polaires. L'énergie E est ici déterminée par les interactions entre les molécules de soluté.

Il apparaît ainsi que le $CO_2$ présente à la fois des caractéristiques d'un faible solvant polaire et d'un faible solvant non polaire. Il est ainsi habituellement rapproché d'alcanes de faible masse moléculaire. En conséquence, seuls les composés peu polaires y sont solubles de façon notoire et de très fortes pressions sont nécessaires pour dissoudre de très faibles quantités de composés polaires ou de forte masse moléculaire.

## 4.3. Solutions au problème de solubilité

Différentes solutions ont été apportées pour contourner ce problème.

a) L'addition d'un co-solvant

Miscible au $CO_2$, il représente une faible proportion de la composition totale du fluide. Il agirait essentiellement en permettant l'existence d'interactions entre soluté et solvant.

Bien qu'elle soit faiblement soluble dans le $CO_2$, l'eau est de loin le co-solvant le plus utilisé, notamment à l'échelle industrielle (extraction d'actifs végétaux entre autres).

b) Les groupement $CO_2$-philes

Une autre approche a été d'utiliser les surfactants de manière à solubiliser dans le $CO_2$ des substances hydrophiles. Cependant, la grande majorité des surfactants habituels n'y sont pas solubles. A la fin des années quatre-vingt, différentes équipes s'intéressèrent à la conception de substances pouvant se dissoudre dans le $CO_2$ à des pressions significativement plus faibles que les alcanes de même masse moléculaire: ce sont les $CO_2$-philes [20]. Par extension, on parlera de groupement $CO_2$-phile pour celui présentant une affinité pour le $CO_2$ et susceptible de solubiliser la molécule qui le porte.

Les fluorocarbones ont été les premiers à avoir suscité un intérêt. L'équipe de Johnston et Harrison a pu de cette manière obtenir des micro émulsions eau dans $CO_2$ [21], thermodynamiquement stables, à l'aide d'un carboxylate d'ammonium perfluoroéther (PFPE, $CF_3O[CF_2CF(CF_3)O]_3CF_2COO^- NH_4^+$), et solubiliser de l'albumine de sérum bovin (BSA). Leur coût élevé a néanmoins limité leur succès, les rendant incompatibles avec une production à l'échelle industrielle.

## 5. Le groupement carbonyle

### 5.1. Le $CO_2$ et le carbonyle comme acide et base de Lewis

Depuis la fin des années quatre-vingt dix, des études ont été menées afin d'élucider les interactions existant entre le $CO_2$ et les polymères $CO_2$-philes. Ce sont à celles contenant le groupe carbonyle que nous nous intéresserons ici.

Deux démonstrations majeures, l'une expérimentale par spectroscopie infrarouge, l'autre théorique par calculs *ab initio*, furent données de l'existence d'interaction de type acide-base de Lewis entre respectivement le $CO_2$ et le groupe carbonyle.

#### 5.1.1. Données de la spectroscopie infrarouge

La première démonstration, réalisée par l'équipe de Kazarian et Eckert par spectroscopie infrarouge (à transformée de Fourier, IRTF), s'intéressait aux interactions entre le $CO_2$ et plusieurs polymères, dont le poly(méthylméthacrylate), PMMA [22].

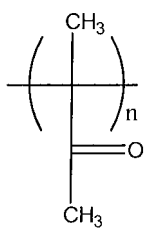



*Schéma 5 : Poly(MethylMethAcrylate), PMMA*

Le spectre infrarouge du $CO_2$ présente une bande à 667 $cm^{-1}$ : il s'agit du mode de vibration normal $\nu_2$ (vibration de déformation, bending).

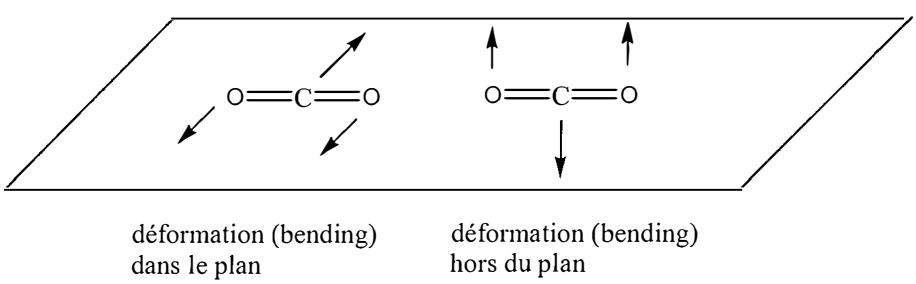



*Schéma 6 : Dégénerescence du mode normal de vibration $\nu_2$ du $CO_2$*

Deux vibrations de déformation y correspondent, l'une dans le plan et l'autre hors du plan. La symétrie axiale ($D_{\infty h}$) de la molécule de $CO_2$ ne permet pas de les distinguer et elles absorbent à la même fréquence : on parle de dégénérescence (schéma 6).

En revanche, en présence de PMMA, cette bande disparaît et laisse place à deux bandes à des fréquences légèrement inférieures (662 et 654 $cm^{-1}$). Le dédoublement de cette bande n'est pas observée avec les polymères ne contenant pas le groupe carbonyle (exemples : polyéthylène et polystyrène). En outre, dans la gamme de températures de 20 à 60°C, le rapport des intensités des deux bandes reste inchangé : il n'existe donc qu'un seul type de site responsable du phénomène à l'intérieur du PMMA. Enfin, le coefficient d'extinction de la bande $\nu_2$ du $CO_2$ en présence du polymère est plusieurs fois supérieur à celui correspondant au $CO_2$ libre. Cette augmentation est caractéristique des transferts partiels de charge observés lors d'interactions de type donneur / accepteur d'électrons.

L'interprétation avancée est l'existence d'interaction de type acide / base de Lewis :

- Le $CO_2$ intervient comme acide de Lewis : l'atome de carbone, portant une charge partielle positive, est accepteur d'électrons.
- Le groupe carbonyle intervient comme base de Lewis : l'atome d'oxygène, de part ses doublets libres, est donneur d'électrons.

Il se forme de cette manière un complexe qui ne présente plus de symétrie axiale. Il est désormais possible de distinguer les vibrations dans et hors du plan : la dégénérescence est levée et la bande se dédouble.

### 5.1.2. Calculs *ab initio*

De leur côté, Nelson et Borkman s'intéressèrent de manière théorique aux complexes obtenus entre le $CO_2$ et cinq composés simples contenant la fonction carbonyle : le formaldéhyde, l'acide acétique, l'acétaldéhyde, l'acétone et l'acétate de méthyle [23]. Leurs calculs rendaient compte, pour les deux configurations possibles ($c_{2v}$ et $c_s$), d'une part de paramètres de la géométrie des complexes, et d'autre part des fréquences du mode normal de vibration $\nu_2$.

Les résultats obtenus concernant les paramètres géométriques montrent que, dans tous les cas, la molécule de $CO_2$ est légèrement courbée, traduisant un transfert de densité électronique de

l'oxygène du carbonyle vers le carbone du $CO_2$. Les analyses de population de Mulliken confirmèrent ce transfert de charge. L'interaction de type acide/base de Lewis se voit donc confirmée.

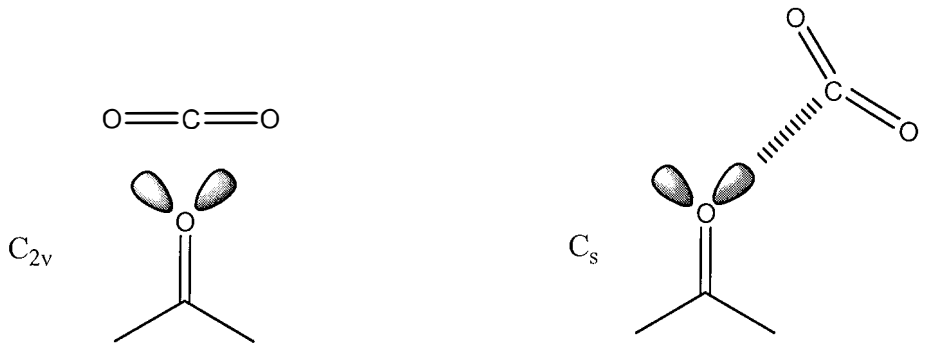



*Schéma 7 : Géométrie $c_s$ : géométrie privilégiée des complexes*

En outre, une configuration de symétrie $c_s$ conduit à un dédoublement de la bande $\nu_2$ présentant un écart $\Delta\nu$ plus important que celui de la configuration $c_{2V}$ : l'interaction est plus forte dans le cas de la symétrie $c_s$, et sera donc celle de plus faible énergie.

Enfin, les fréquences des dédoublements calculées de manière théorique pour la configuration $c_s$ étaient plus proches des valeurs expérimentales (obtenues pour le polymère PMMA, cf. *supra*) que celles de la configuration $c_{2V}$. La configuration favorisée est donc celle de symétrie $c_s$.

### 5.1.3. Les preuves expérimentales de la $CO_2$-philie du carbonyle

Des alternatives ont été recherchées de manière à développer des $CO_2$-philes non fluorés, de coût modéré, compatibles avec une utilisation à large échelle (procédé industriel). A l'heure actuelle, le groupement carbonyle est certainement le plus prometteur.

Le groupe de Beckman s'intéressa à la fonctionnalisation de silicones (polydimethylsiloxanes) par des chaînes latérales [20], et qui représentaient, à l'heure de ses travaux, une des classes de polymères non fluorés les plus solubles dans le $CO_2$. Etaient ainsi comparés les silicones natifs, ceux fonctionnalisés par des chaînes propyl acétate, et ceux par des chaînes n-hexyl. Les solubilités relatives des différents dérivés étaient estimées de manière classique, par les pressions

des points de rosée du binaire (silicone – $CO_2$). Les résultats montrèrent que l'introduction de seulement cinq chaînes ester abaisse de façon spectaculaire la courbe des points de rosée de près de 200 bars par rapport à celle du silicone natif : le comportement est alors proche de celui d'un perfluoroéther. A l'inverse, les chaînes alkyl l'augmentaient.

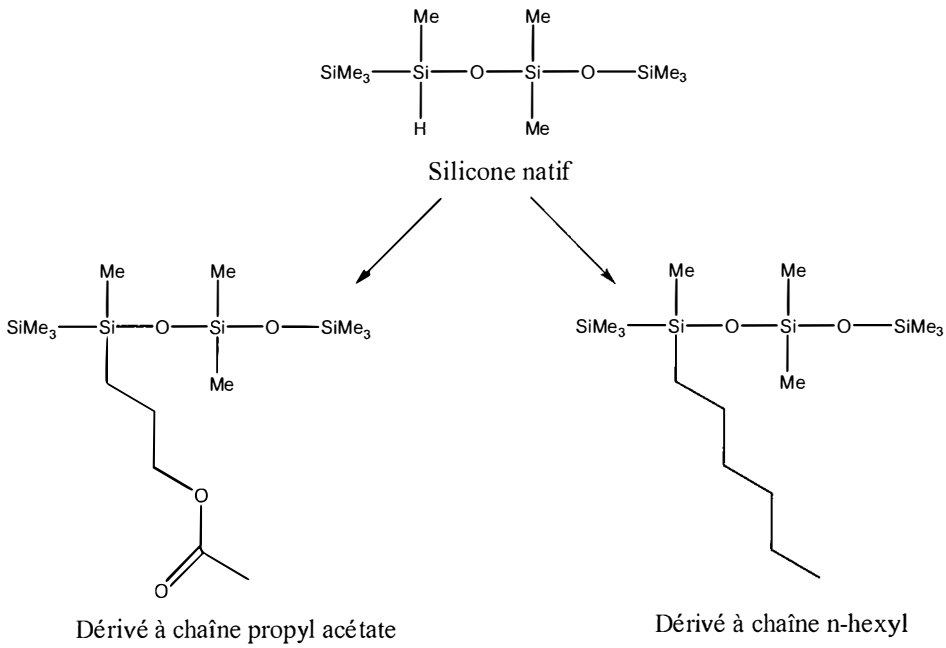



*Schéma 8 : Dérivés silicones synthétisés par Beckman [20]*

Des résultats similaires par leurs conclusions furent obtenus, toujours par Beckman, avec des copolymères de type poly(éther-carbonate) [24] : l'addition d'un seul groupement carbonyle à l'hydroxyle terminal $CO_2$-phobe d'un polymère poly(propylène glycol) suffit à abaisser significativement la courbe des points de rosée, et ce bien plus que n'arrive à le faire une chaîne alcane.

L'introduction de groupements carbonyles apparaît donc clairement comme un moyen permettant d'obtenir des molécules présentant une solubilité importante dans le $CO_2$ à de faibles pressions.

## 5.2. Le cas du groupement acétate : Des polymères aux cyclodextrines

### 5.2.1. Une interaction en deux points

Les calculs *ab initio* de Raveendran et Wallen montrent que dans le cas de groupements carbonyle portant un hydrogène ou en possédant un en α (acétate par exemple), existe une liaison hydrogène C-H···O, faible mais coopérative, qui renforce l'interaction de type acide-base de Lewis [25].

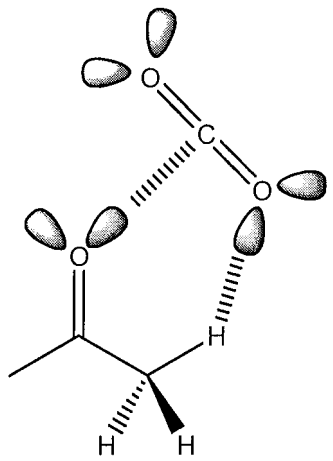
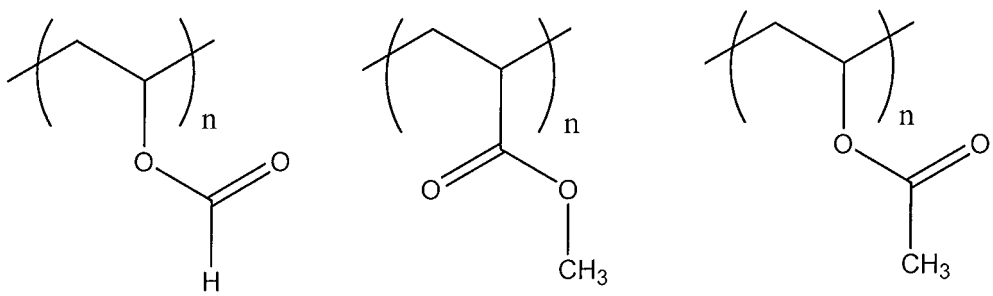



*Schéma 9 : Interaction en deux points $CO_2$ - acétate de méthyle*

Le groupement acétate est ainsi un cas particulier de carbonyle, qui majore sa $CO_2$-philie par des interactions renforcées avec les molécules de solvant.

### 5.2.2. L'exemple des polymères

Parallèlement, les résultats de l'équipe de Shen apportent un argument supplémentaire en faveur de l'acétate [26]. Ils synthétisèrent des polymères vinyliques portant divers groupements carbonyles (Schéma 10).




Poly(vinyl formate), PVF | Poly(methyl acrylate), PMA | Poly(vinyl acétate), PVAc

*Schéma 10 : Trois exemples d'analogues vinyliques synthétisés*

De tous ceux-ci, le PVAc se montre le plus soluble dans le $CO_2$ supercritique. Dans le cas du PVF, les interactions polymère-polymère priment sur celles PVF-$CO_2$, et il ne présente aucune solubilité dans les conditions expérimentales. Le PMA quant à lui possède son groupement carbonyle plus proche du squelette, moins accessible aux molécules de solvant et moins flexible que le PVAc. L'acétate permet donc au final d'une part une solvatation optimale par une interaction en deux points et d'autre part un bon accès aux molécules de $CO_2$.

Il est à remarquer que le *modèle physique* basé sur le potentiel d'énergie intermoléculaire $\Gamma_{ij}$ ne tenait pas compte *d'interactions chimiques* comme celles de type acide-base., et est à ce titre insuffisant pour rendre compte de la solubilité de molécules portant des $CO_2$-philes de type carbonyle.

### 5.2.3. L'application aux cyclodextrines

L'acétylation de composés hydroxylés apparaît donc potentiellement comme un moyen simple et peu coûteux (compte tenu des réactifs mis en œuvre) d'obtenir un $CO_2$-phile. Parmi ceux-ci, les

sucres et leurs dérivés représentent un substrat de choix, puisque disponibles en abondance et à faible coût. Il serait donc légitime de penser qu'une cyclodextrine peracétylée, par le nombre important d'acétate qu'elle renferme, qui représentent autant de sites d'interaction avec le solvant, devrait faire montre d'une solubilité relativement importante dans le $CO_2$ supercritique. Les données cristallographiques obtenues par le groupe de Saenger vont dans ce sens, puisqu'elles montrent que les acétates pointent vers l'extérieur de la cavité, configuration particulièrement favorable pour une solvatation [27].

Le groupe d'Hamilton en donna une confirmation expérimentale [28,29]. Les trois cyclodextrines peracétylées présentent en effet « une grande solubilité dans le $CO_2$ liquide et supercritique » [28] (traduit de l'anglais), la solubilité diminuant avec le nombre d'unités de glucose ($S_\alpha > S_\beta > S_\gamma$) [29].

A 298 K par exemple, et pour les mêmes proportions (5-15 % m/m), un polymère de PVAc (Mr = 2063, n=24, 24 acétates) nécessite une pression 370 bar plus grande qu'une γ-CD (Mr = 2305, 24 acétates) pour être solubilisé.

# Chapitre IV :

## Les vecteurs d'actifs nucléotidiques

---

### 1. Géneralités

L'amélioration spectaculaire des connaissances et les progrès réalisés dans les domaines de la biochimie et de la biologie moléculaire ont permis de s'intéresser aux séquences nucléotidiques (ADN et ARN) non plus comme des éléments propres de la cellule, support du code génétique, mais aussi comme matériel exogène apporté à la cellule. De là, il n'y a qu'un pas à franchir pour les envisager comme médicament : c'est la thérapie génique, ou, plus précisément, thérapie par les gènes [30]. En effet, la thérapie génique vise à corriger un défaut génétique par intervention sur l'ADN, et deux approches sont envisageables. La thérapie des gènes est une correction du génotype *in situ*, par réparation de l'anomalie génétique. Cet objectif est pour l'heure techniquement hors d'atteinte. La thérapie par les gènes est quant à elle une correction du phénotype, par insertion en un site quelconque du génome d'une version normale et fonctionnelle du gène, le gène défectueux restant en place : il s'agit donc en somme d'une « greffe de gène », et sur le plan technique, l'opération est appelée transfection.

## 2. Les méthodes de transfection

Pour être actives, il est nécessaire que les séquences nucléotidiques atteignent leur site d'action : l'ADN nucléaire. A l'exception de quelques cas particuliers (électroporation [31], utilisation d'ultrasons [32]), il n'est pas possible pour l'ADN de pénétrer dans la cellule en l'état. Il lui faut un vecteur pour franchir les membranes biologiques. Ceux-ci sont de deux types : viraux et non viraux. Le matériel transfecté comporte, pour sa part, le gène d'intérêt et des séquences annexes assurant entre autres un bon niveau d'expression.

### 2.1. Les systèmes de transfection viraux et leurs limites

Dans ce mode de transfection, le matériel génétique est intégré dans le génome d'un virus. De nombreux types ont été utilisés, les adénovirus et rétrovirus étant de loin les plus utilisés. De par leur grande efficacité de transfection, ils ont suscité un grand enthousiasme, ce qui explique l'avancée des projets sur le plan clinique, représentant plus des deux tiers des protocoles.

Cependant, la nature virale de ce type de vecteur, étrangère par essence, le fait reconnaître comme tel par le système immunitaire, ce qui n'est sans poser des problèmes. Ainsi, en septembre 1999, l'Institue for Human Gene Therapy de l'Université de Pennsylvanie aux Etats-Unis rendait public le premier décès d'un patient dans un protocole de thérapie génique [33]. Celui-ci utilisait un adénovirus désarmé (c'est à dire privé de capacité de propagation) comme vecteur du gène de l'ornithine transcarbamylase (OTC) pour traiter un déficit partiel en cette même enzyme. Deux points méritent d'être soulignés. En premier lieu, les adénovirus sont réputés pour leur innocuité. Les sérotypes sauvages 4 et 7 sont ainsi utilisés dans l'armée américaine depuis plus de vingt cinq ans comme vaccin oral vivant. Deuxièmement, l'extrême rapidité du décès, intervenu en quatre jours à peine. A la lumière de ces éléments, il est important de prendre conscience du risque important de type de vecteurs, alors qu'ils sont généralement considérés comme inoffensifs. En outre, bien que ce type de constructions soient rendues déficientes pour leur capacité de réplication, une recombinaison avec un virus sauvage, conduisant à des virus doués de réplication et pathogènes, n'est jamais à exclure.

Les rétrovirus, quant à eux, ne peuvent s'intégrer que dans des cellules se divisant (systèmes mitotiques), et leur intégration dans le génome de manière anarchique laisse toujours envisager

un potentiel oncogénique (par activation d'un proto-oncogène ou inactivation d'un anti-oncogène).

De plus, dans les deux cas, la taille de l'insert véhiculé est limitée, et ne dépasse pas, au meilleur des cas, 9 kb pour les adénovirus et 7 kb pour les rétrovirus. Enfin, la production à l'échelle industrielle reste techniquement problématique.

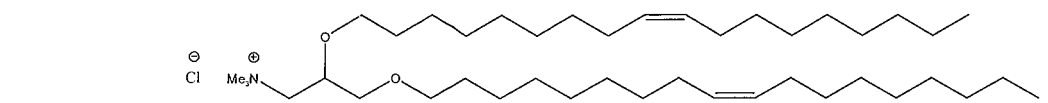
## 2.2. Les systèmes de transfection non viraux

Le risque inhérent aux vecteurs viraux a été à l'origine du développement d'alternatives non virales. Parmi celles-ci, les lipides cationiques et les polymères cationiques sont de très loin les plus utilisées.

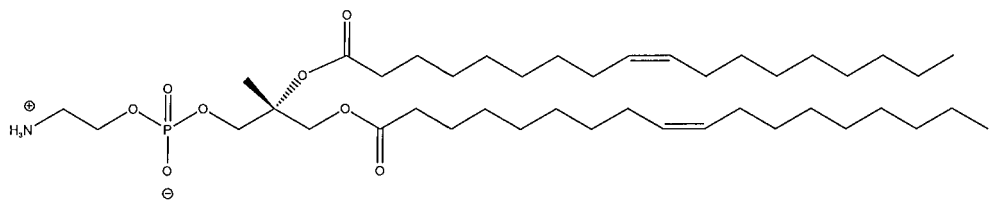
### 2.2.1. Les lipides cationiques

Les structures chimiques de quelques lipides cationiques d'intérêt sont données ci-dessous (schéma 11).

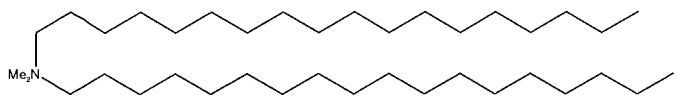
.



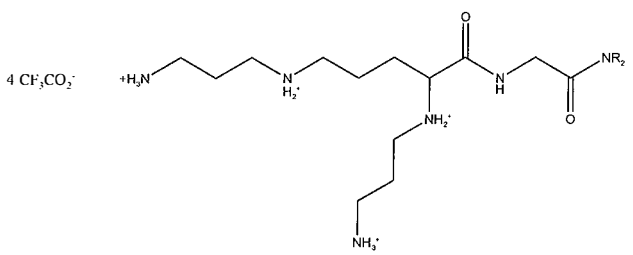
**DOTMA**



**DOPE**

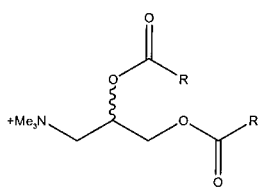


**DDAB**



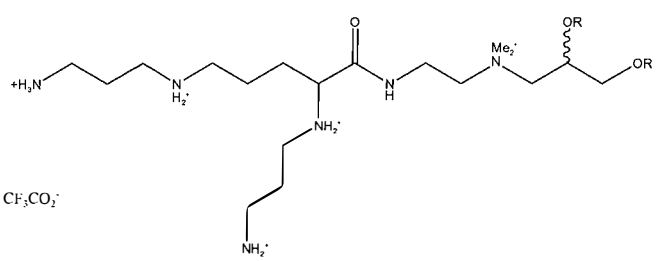
**DOGS**

R = $C_{18}H_{37}$



**DOTAP**

R =



**DOSPA**

R =

Les travaux fondateurs furent ceux de Felgner [34] et de son équipe qui synthétisa le DOTMA, commercialisé ultérieurement sous le nom de Lipofectin®. D'autres formulations l'ont également été ultérieurement (tableau 4), et cette classe de molécule a été à l'origine de nombreux projets.

*Tableau 4 : Quelques lipides cationiques commercialisés [37]*

| *Nom commercial* | *Fabricant* | *Formulation* | *Remarques* |
|---|---|---|---|
| Lipofectin® | Gibco | DOTMA / DOPE (1:) | Synthétisé par P.L. Felgner |
| Transfectam® | Promega | DOGS | Synthétisé par J.P. Behr |
| LipofectAce® | Gibco | DDAB / DOPE (1:2,5) | |
| DOTAP® | Boehringer Mannheim | DOTAP | |
| LipofectAMINE® | Gibco | DOSPA / DOPE (3:1) | |

Les lipides cationiques interviennent en réalisant des bicouches compactant l'ADN au centre de la vésicule qu'elles définissent [35]. Les particules ainsi formées assurent la protection de l'ADN (contre les nucléases en particulier) et son entrée dans la cellule. Le mécanisme proposé de cette dernière [36, 37] consiste en une fusion de la bicouche avec la membrane de la cellule.
Le comportement et les propriétés de cette classe de molécules sont singuliers, et dépassent le cadre de notre exposé. Aussi, ces composés ne seront que cités compte tenu de leur importance comme vecteur non viral, des travaux concernant la synthèse et l'évaluation de nouveaux dérivés étant régulièrement publiés [38].

### 2.2.2. Les polymères cationiques

#### a) Avantages et inconvénients

Par rapport aux vecteurs viraux, les polymères cationiques se distinguent par un risque d'utilisation moins important. Outre leur moindre toxicité, la réponse immunitaire qu'ils déclenchent est bien inférieure, et différentes méthodes ont vu le jour pour les rendre invisibles au système du soi (cf. *infra*, 3.1.4. La solution : la stabilisation stérique des complexes). De plus, ils ne s'intègrent pas dans le génome de la cellule transfectée, avec tous les risques que cela sous entend (cf. *supra*, 2.1. Les systèmes de transfection viraux et leurs limites).

Deuxièmement, la taille de l'insert véhiculé ne subit pas de limitation comme dans le cas des virus.

Troisièmement, leur nature synthétique permet de les concevoir de manière raisonnée et sur mesure pour une application donnée (relations structure-activité, masse moléculaire appropriée, greffage de ligands spécifiques d'un type cellulaire,…) Les travaux de Davis en donnent une bonne illustration (cf. *infra*, 5. La place des cyclodextrines et l'exemple des travaux de Davis). De plus, cette même nature synthétique permet d'en envisager la production à large échelle.

Le tableau aurait été idéal si leur efficacité de transfection (quoique réelle) était généralement bien plus faible que celle des vecteurs viraux, et tout spécialement *in vivo*. Cependant, compte tenu des avantages précités, il ne sera pas surprenant de voir de plus en plus de laboratoires se diriger ou persévérer dans cette voie.

### b) Principes généraux

L'ADN présente en l'état une structure filiforme et fortement chargée négativement (groupements phosphates) : il sera donc d'une part peu stable et ne pourra d'autre part pas prétendre entrer dans la cellule, attendu que sa membrane est elle aussi chargée négativement.

Les polymères cationiques partagent un mécanisme d'action commun. Ils permettent la complexation de l'ADN par interactions électrostatiques entre les charges positives du polymère (généralement un azote protoné) et négatives de l'ADN. L'efficacité de transfection est fonction du rapport des charges +/-, plus généralement exprimé sous la forme *N/P*, c'est à dire le rapport azote sur phosphate, dont il existe une valeur optimale pour un polymère donné. Aussi, l'étape de formulation est capitale, puisque ce rapport est fixé par les concentrations des deux espèces mises en présence. Le polymère assure également la condensation de l'ADN en particules compactes appelées *polyplexes*. Chaque polyplexe contient plusieurs centaines molécules d'ADN et concourt à sa stabilisation (protection contre les nucléases). De plus, la charge de surface positive du polyplexe est désormais compatible avec l'entrée dans la cellule. Les interactions électrostatiques existant entre la membrane de cette dernière et le polyplexe sont en effet un élément clé pour son l'internalisation.

### c) Les grandes classes de polymères cationiques

De très nombreux polymères cationiques ont été synthétisés, et il s'agit en fait d'un terme générique recouvrant plusieurs classes de molécules, et seules les trois principales seront décrites. L'excellente revue de De Smedt [39] en donnera au lecteur un aperçu plus précis, tout en ayant à l'esprit que de nouvelles molécules (quand il ne s'agit pas de nouvelles classes) voient le jour régulièrement.

#### c.1.) Les polyéthylènimines (PEI)

Les molécules de cette classe ont été synthétisés de différentes masses moléculaires, à différents degrés de ramification, et même de structure linéaire. Ils sont disponibles commercialement et parmi les plus utilisés figurent les PEI 800 kDa (Fluka), les PEI 50 kDa (Sigma) et les PEI 25 kDa (Aldrich). Leur efficacité de transfection et leur cytotoxicité dépendent de leur masse moléculaire, la première diminuant et la deuxième augmentant avec celle-ci[41].

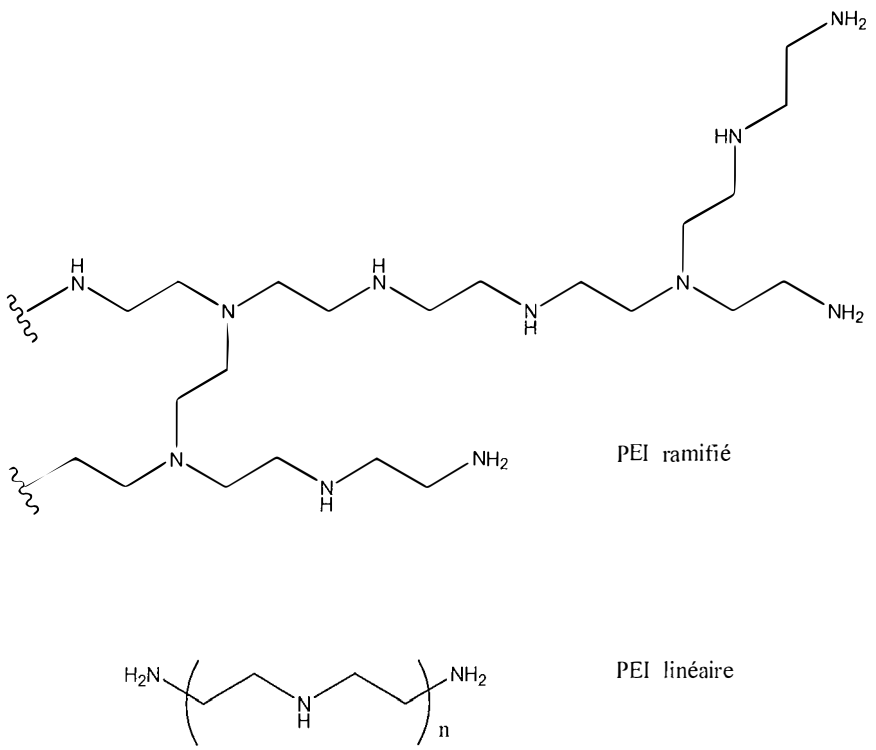



*Schéma 12 : PEI linéaire et ramifié*

Ils sont à l'origine du développement de la théorie de l'éponge à proton (proton sponge theory) [40]. Celle-ci met en relation la présence de groupement basiques protonables pouvant réaliser un effet tampon (à pH=7, quatres amines sur cinq ne sont pas protonées) avec la sortie des vacuoles d'endocytose, et par suite, avec l'efficacité de transfection (cf. 3.2.2. La sortie de l'endosome).
Ils peuvent complexer de grosses molécules d'ADN et forment des particules homogènes d'environ 100 nm. Leur efficacité de transfection, autant *in vitro* qu'*in vivo*, les a imposés comme le standard actuel de vecteur non viral. Cependant, leur toxicité relativement élevée limite leur utilisation *in vivo*. Les PEI linéaires (PEI 22 kDa, ExGen™ 500, Euromedex, France) ont apporté une évolution positive, puisque faisant preuve d'une excellente efficacité et d'une faible toxicité [42].

### c.2.) Les poly-L-Lysine (PLL)

Ces polymères furent parmi les premiers utilisés comme vecteur non viral. Leur structure polypeptidique, biodégradable, les rend théoriquement indiqués pour des applications *in vivo*.

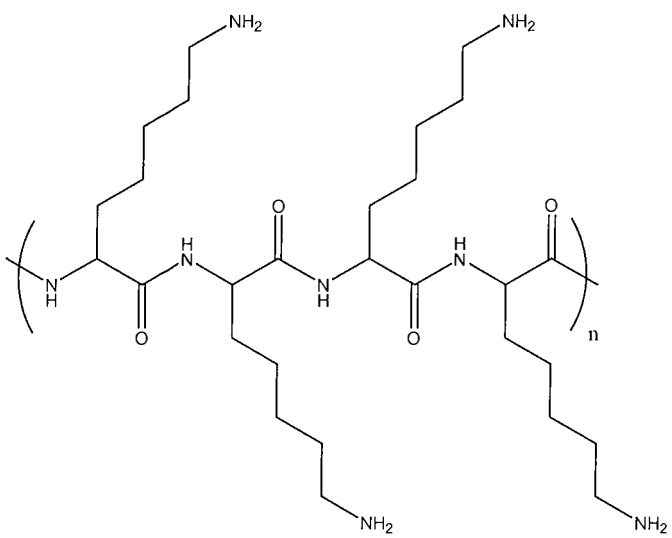



*Schéma 13 : PLL*

Toutefois, en comparaison aux autres polymères, ils font montre d'une toxicité supérieure, de modérée à élevée, et qui est à mettre en relation avec la forte concentration de charges positives.

Leur efficacité de transfection reste de surcroît en deçà de celui des PEI. La théorie de l'éponge à protons en rend tout à fait compte. Le pKa élevé (≈ 9-10) des amines de la chaîne latérale explique que celles-ci soient toutes protonés à pH=7. Ces fonctions ne peuvent donc plus jouer leur rôle de tampon et assurer la sortie de l'endolysosome. Une preuve supplémentaire de cette théorie est apportée par le fait que pour être efficaces, les PLL nécessitent généralement l'utilisation de chloroquine, substance qui a la propriété de tamponner l'acidité de l'endosome [43].

### c.3.) Polyamidoamine (PAMAM) ou dendrimères Starburst

Il s'agit d'entités sphériques hautement ramifiées, le niveau de branchement déterminant la génération [44]. Les plus utilisés sont ceux de sixième génération (Ø = 68 Å, $M_r$ = 43451, 192 $NH_2$ terminaux).

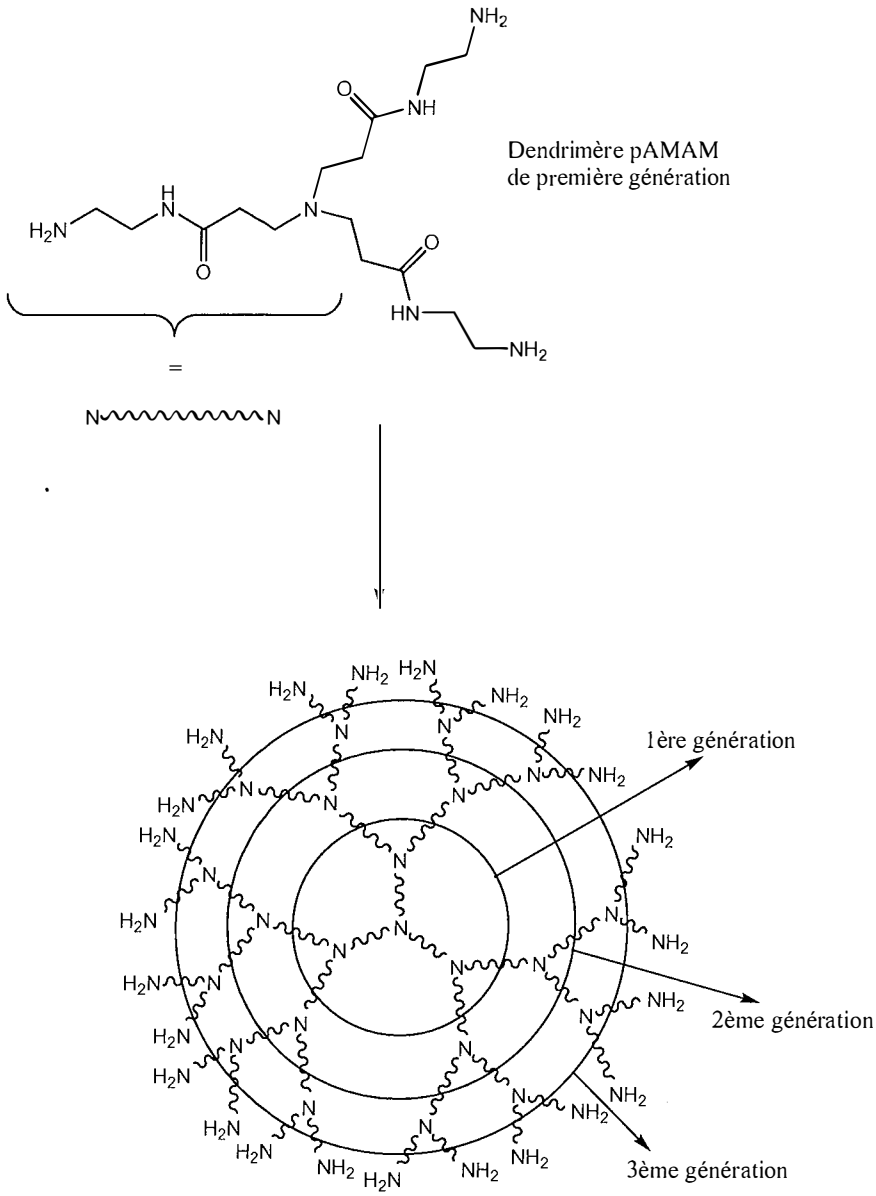



*Schéma 14 : Dendrimère PAMAM*

Il en existe de deux types :

- Les dendrimères dits intacts : ils portent deux nouveaux bras à chaque point de branchement (atome d'azote). Un exemple de produit commercialisé est Polyfect®.

- Les dendrimères dits fracturés : ils portent un ou deux nouveaux bras à chaque point de branchement. Un exemple de produit commercialisé est Superfect®.

Ce sont les dendrimères fracturés qui présentent le niveau de transfection le plus élevé (plus de cinquante fois supérieur à celui des dendrimères intacts) [45].

La forte concentration d'amines en périphérie est à rapprocher de leur excellente efficacité de transfection. Elles permettent à la fois la complexation à l'ADN et la sortie du compartiment endolysosomal par effet tampon des amines libres non liées à l'ADN.

### c.4.) Comparaison

Peu d'études se sont intéressées aux comparaisons de toxicité et d'efficacité de vecteurs dans les mêmes conditions expérimentales. L'étude de Gebhardt [46] compare différents vecteurs commerciaux de type polymérique (ExGen 500, PEI 25 kDa, Superfect) et lipidique (Lipofectin, LipofectAMINE, Cellfectin), sur des cellules COS-7 à des rapports N/P optimisés dans chaque cas.

Les lipides, quoique utilisés à des doses de moitié de celles des polymères, se révélèrent plus toxiques que les polymères. De tous les polymères, c'est le dendrimère Superfect qui se révéla le plus efficace.

*Tableau 5: Comparaison des efficacités et toxicités et de différents vecteurs non viraux[46]*

*L'efficacité de transfection est estimée par l'expression du gène de la luciférase. La toxicité a été corrélée avec le pourcentage de protéines cellulaires par rapport au témoin (les deux grandeurs variant en sens inverse).*

| *Système de transfection* | | *ADN (µg/puits)* | *Expression du gène de la luciférase (% de ExGen 500)* | *Protéines cellulaires (% du témoin)* |
|---|---|---|---|---|
| Polymères | ExGen 500 | 0,75 | 100 | 79 |
| | PEI 25 kDa | 0,75 | 39 | 85 |
| | Superfect | 0,75 | 134 | 84 |
| Lipides | Lipofectin | 0,4 | 40 | 63 |
| | LipofectAMINE | 0,4 | 176 | 61 |
| | Cellfectin | 0,4 | 8 | 67 |

## 3. Les polyplexes comme médicament : de leur administration au noyau de la cellule

Idéalement, le complexe vecteur/ADN ne devrait atteindre sélectivement que le tissu cible visé et réaliser son action au niveau du noyau de la cellule. En pratique, depuis l'administration, il existe de nombreux obstacles, que l'on peut classer en deux catégories :

- ceux avant l'entrée dans la cellule : au niveau systémique.
- ceux au niveau cellulaire.

### 3.1. Obstacles au niveau systémique

Par souci de simplification, on considérera le complexe déjà au niveau systémique (administration intraveineuse).

#### 3.1.1. Problèmes liés à la charge de surface positive

La charge de surface positive du polyplexe est à l'origine de nombreuses interactions non spécifiques, responsables de leur demi-vie courte, avec, en particulier:

- Les cellules du sang ;
- l'endothélium ;
- les protéines plasmatiques : albumine, fibronectine, immunoglobulines, facteurs du complément, fibrinogène, …

Parmi ces dernières, l'albumine, le constituant majoritaire, joue un rôle prépondérant : il se forme en effet des agrégats entre celle-ci et les polyplexes, rapidement éliminés de la circulation, vraisemblablement par les cellules du système phagocytaire [47].

D'autre part, le sérum a une activité nucléasique intrinsèque [48]. L'incubation de séquences d'ADN avec 50 % (v/v) de sérum de veau nouveau né (NBCS) conduit à leur dégradation en moins de dix minutes. A l'inverse, l'incubation des mêmes séquences complexées avec des dendrimères PAMAM ne montre aucune dégradation pendant les 25 premières minutes. La protection dépend de la structure du polymère employé et de la formulation du polyplexe (rapport N/P).

### 3.1.2. Barrière endothéliale

L'extravasation dépend de la taille des complexes et de la perméabilité de l'endothélium au niveau des différents sites. Dans la plupart des tissus, l'endothélium réalise un maillage serré. En conséquence, la sortie des polyplexes est fortement entravée. Quelques exceptions sont toutefois à signaler. Il s'agit du foie, de la rate, de la moelle osseuse et de certains tissus tumoraux pour lesquelles le maillage plus large permet l'extravasation de molécules grosses d'environ 0,1 à 1 µm.

### 3.1.3. Biodistribution

La biodistribution des polyplexes obtenus à partir des différents polymères cationiques est similaire. Après une administration intraveineuse de polyplexes, il a été montré dans un premier temps une forte accumulation dans le poumon (environ 80 de la dose injectée). L'étroitesse des capillaires pulmonaires semblerait responsable du piégeage des agrégats des polyplexes avec des cellules sanguines ou protéines plasmatiques.

Ces agrégats sont peu stables, aussi sont ils relargués dans la circulation : une deuxième distribution se produit ensuite, avec de fortes concentration observées dans les cellules de Küpfer au niveau du foie [49].

### 3.1.4. La solution : la stabilisation stérique des complexes

L'agrégation des polyplexes et leur profil général de biodistribution ne sont pas compatibles avec une application thérapeutique *in vivo*. Il est donc nécessaire de trouver une solution pour s'affranchir du phénomène d'agrégation, modifier la biodistribution et prolonger la circulation.

La solution communément adoptée consiste en une stabilisation stérique des polyplexes. L'attachement de polymères hydrophiles en surface permet de réaliser une enveloppe masquant les charges de surface positives et de s'opposer à l'agrégation. Parmi les approches existantes (pHPMA, poly-[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide], transferrine, etc.), les PEG [50,51] (polyethylèneglycols) sont les plus utilisés même si leur utilisation n'est pas sans poser des problèmes, puisque leur greffage peut entraver voire interdire la formation de complexes vecteur/ADN.

### 3.2. Obstacles au niveau cellulaire

Atteindre la cellule ne constitue que la moitié de l'objectif puisque l'ADN doit encore entrer dans le noyau pour réaliser son action. Ici encore différents obstacles existent.

#### 3.2.1. La membrane cellulaire

La membrane est pour l'essentiel une bicouche phospholipidique chargée négativement en surface. Son franchissement est réalisé par endocytose, qui peut se réaliser selon deux modalités. Premièrement de façon non spécifique par interaction électrostatique, le polyplexe étant chargé positivement. Les protéoglycanes associés à la membrane semble jouer un rôle déterminant dans l'adsorption en surface [52, 53]. Le polyplexe sera alors internalisé dans une vacuole d'endocytose.

Par ailleurs, l'entrée peut également se faire de façon spécifique, via des récepteurs en surface de la cellule, pour peu que le polyplexe en porte un ligand. Ce mécanisme a été mis a profit pour cibler des tissus particuliers. Les cellules cancéreuses par exemple, du fait de leur division rapide, ont des besoins plus importants que les cellules saines, et surexpriment en réponse certains récepteurs liant des substrats indispensables à leur développement. C'est le cas de celui de l'acide folique (vitamine B6) et de celui de la transferrine (protéine véhiculant le fer). Le groupe de Zuber synthétisa des lipoplexes recouverts en surface par de l'acide folique. Ceux-ci montrèrent un tropisme sélectif pour des cellules cancéreuses surexprimant le récepteur de l'acide folique [54].

Le groupe de Davis synthétisa quant à lui des polyplexes (dont la structure du polymère incluait des cyclodextrines) présentait en surface des molécules de transferrine [70]. Ceux-ci ont une efficacité de transfection pour des cellules cancéreuses K562 quatre fois supérieure à leurs homologues sans transferrine.

#### 3.2.2. La sortie de l'endosome

Le mécanisme général est illustré par la figure 6. Une fois entrés dans la cellule, les polyplexes suivent le devenir de toute particule endocytée. Leur vacuole va fusionner avec un lysosome pour former un endolysosome. L'environnement de ce dernier (pH ≈ 4-5, nucléases) conduit à terme à

la dégradation des polyplexes. Il est donc indispensable qu'ils s'en échappent pour pouvoir être actifs. En pratique, seule une faible partie y arrive, aussi cette étape est-elle considérée comme le goulot d'étranglement de toute vectorisation non-virale.

L'efficacité de transfection d'un polymère est intimement lié à son pouvoir tampon à pH≈5-7. Celui-ci a pour conséquence d'augmenter l'entrée active de protons et l'entrée passive d'ions chlorure à l'intérieur de l'endolysosome. La pression osmotique augmentant, de l'eau diffuse passivement à l'intérieur de la vésicule. Elle va alors gonfler et finir par éclater : le polyplexe est libéré.

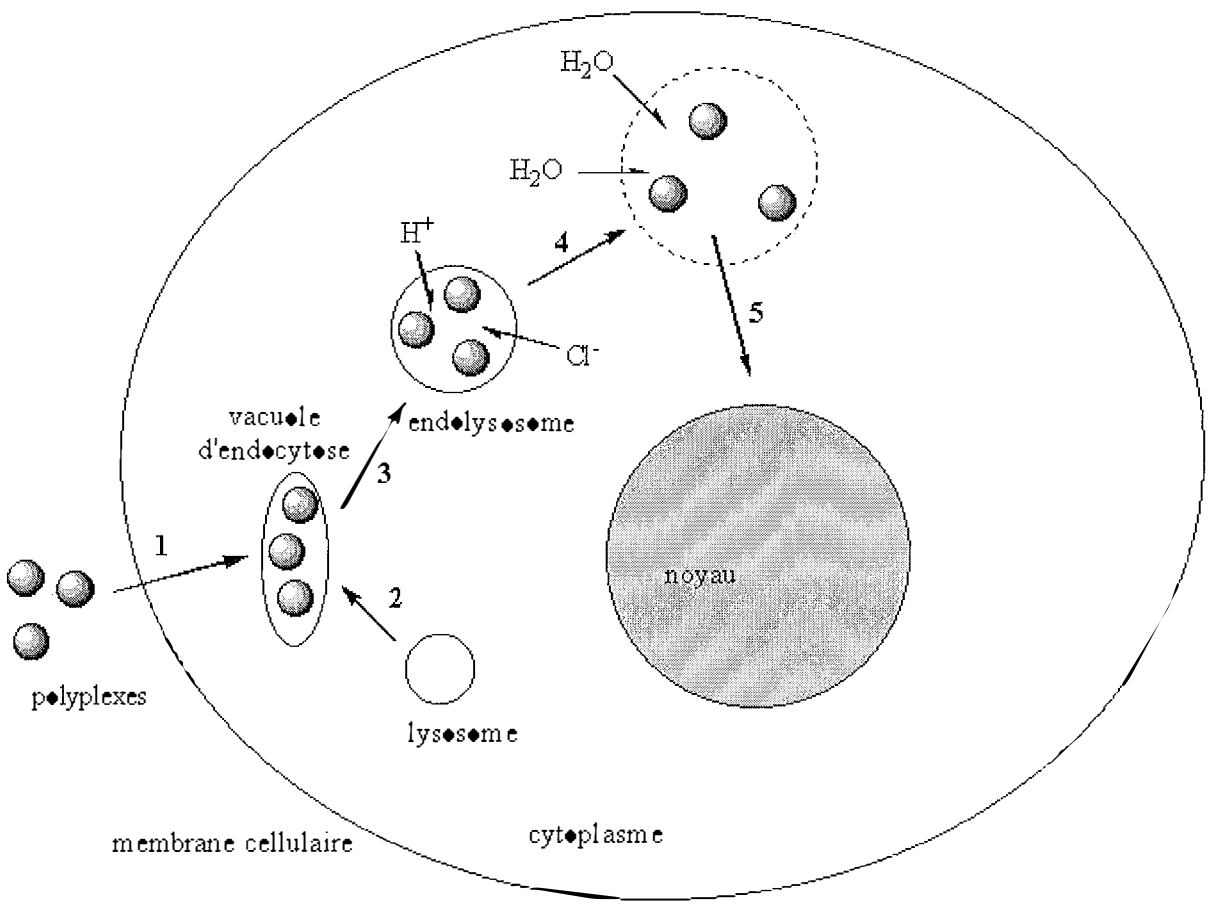



*Figure 14 : sortie de l'endosome*

Cette hypothèse, dite de l'éponge à protons, a été avancée pour expliquer l'efficacité de transfection de polymères comme les PEI[55, 56]. En effet, les PEI n'ont qu'à pH=7 qu'une fonction

amine sur cinq de protonée. Les quatre restantes auront encore la possibilité d'accepter des protons donc de réaliser un pouvoir tampon.

A l'inverse, les PLL, du fait de leur pKa élevé (≈9-10), les fonctions amine de leur chaîne latérale seront quasiment toutes protonées et ne pourront pas accepter de protons supplémentaires. Il n'est donc pas surprenant que ceux-ci nécessitent l'utilisation concomitante de substances comme la chloroquine pour pouvoir être actifs.

Cette hypothèse a été confirmée par le groupe de Kichler, qui démontra que la présence de bafilomycine A1, inhibiteur des pompes à protons, diminue d'un facteur 7 à 74 l'efficacité de transfection de polyplexes de PEI [57]. La sortie de l'endosome est donc un mécanisme sous la dépendance du pH.

Des stratégies ont été développées pour favoriser la sortie de l'endosome. Citons à titre d'exemples l'utilisation de particules de virus inactivés [58] ou de peptides fusogéniques [59], qui, dans les deux cas, concourent à une déstabilisation et à la rupture de la membrane endosomyale.

### 3.2.3. Du cytoplasme au noyau

#### a) Stabilité et mobilité de l'ADN dans le cytoplasme

Il reste à l'ADN à traverser le cytoplasme et à atteindre le noyau. Sa mobilité dans cet environnement est toutefois très faible [60]. La mobilité d'une séquence d'ADN dans le cytoplasme est inversement proportionnelle à sa taille, et, passé 2000 paires de bases, devient très faible voire nulle. Différents facteurs interviennent :

- la viscosité du cytoplasme ;
- l'encombrement moléculaire et les collisions pouvant entraver la diffusion de fragments. Le cytosquelette, en particulier, agirait comme un tamis freinant les molécules de grosse taille ;
- les interactions de l'ADN chargé négativement avec les constituants cytoplasmiques.

#### b) L'effet du vecteur

La complexation à un vecteur tend à compacter la structure de l'ADN et à augmenter la stabilité envers les nucléases [61]. En présence de 25 unités de Dnase 1 ou 2, des polyplexes de PEI ne

montrent aucune dégradation après 24 heures, alors que l'ADN nu est complètement digéré en 3 minutes avec 0,01 unité de Dnase 1 ou en 1 heure avec 0,003 unité de DNase 2.

D'autre part, des experiences de microinjections dans le cytoplasme de cellules de mammifères (COS-7) montrent que les polyplexes de PEI augmentaient l'expression d'un gène par rapport aux mêmes injections sans vecteur [62]. Cet effet est indépendant du rapport de charges N/P, ce qui suggère que le compactage est l'élément déterminant pour la circulation et la stabilité des complexes dans la cellule.

De plus, il semble que les polymères cationiques puissent altérer la structure du cytosquelette en se liant aux filaments d'actine (et vraisemblablement aux autres macromolécules du cytosquelette, comme les microtubules), concourant à leur agrégation en fagots. Les mailles du tamis qu'il réalise seraient donc élargies et la perméabilité de grosses molécules augmentée [63].

### 3.2.4. L'entrée dans le noyau

Le noyau est isolé du cytoplasme par sa membrane, aussi existe-il deux moyens d'entrer dans le noyau :

- pendant la mitose, puisqu'il y désassemblage de la membrane nucléaire
- pendant l'interphase, à travers les pores nucléaires (NPC, Nuclear Pore Complexes). Leur structure est complexe, comptant de 50 à 100 protéines fonctionnellement différentes. Leur rôle essentiel est de réguler la circulation des protéines et des complexes ARN-protéines entre le noyau et le cytoplasme. Les molécules de taille importante nécessitent en effet de porter des séquences de localisation nucléaire (NLS, Nuclear Localization Sequences) pour y entrer, ou des signaux de d'exportation nucléaire (NES, Nuclear export signal) pour en sortir. Dans les conditions physiologiques, l'ADN n'interagit pas avec les NPC et par conséquent, n'entre pas dans le noyau. En conséquence, l'entrée d'ADN dans des cellules ne se divisant pas (systèmes post-mitotiques), comme les neurones, est de probabilité très faible [64].

La présence d'un NLS permet d'augmenter le niveau d'expression d'un plasmide et différentes pistes ont été explorées dans ce sens. L'équipe de Zanta [65] réalisa des expériences de transfections avec différents vecteurs non viraux polymériques (PEI 25-kDa, PEI ExGen 500) lipidiques (Transfectam) et différents matériels nucléotidiques (plasmides natifs et liés de façon

covalente à un NLS, le peptide PKKKRKVEDPYC). Pour les plasmides non greffés, une diminution de la quantité d'ADN (200, 20 et 10 ng) conduit à une baisse de l'efficacité de transfection. Dans le cas de plasmides couplés à un NLS, l'efficacité reste constante et supérieure de 10 à 1000 fois à celles des plasmides nus, et ce quelle que soit la quantité d'ADN. En conséquence, l'attachement d'un NLS à un plasmide permet de passer en terme de quantités nécessaires pour celui-ci à une transfesction efficace de l'échelle de microgrammes à celle de nanogrammes.

## 4. La place des cyclodextrines et l'exemple des travaux de Davis

Par le passé, plusieurs vecteurs de nucléotides de structure dérivée de cyclodextrines ont été synthétisés. Les travaux réalisés au sein du GEVSM pour la vectorisation d'analogues nucléotidiques antiviraux en sont un exemple [88], [89], [90]. Toutefois, pour l'heure, les seuls vecteurs non-viraux incluant des cyclodextrines dans leur structure et utilisés dans un contexte de transfection de gène (polynucléotides) sont ceux synthétisés par Davis. Ses travaux constituent d'une part une remarquable étude de relation structure-activité et d'autre part un exemple éloquent de conception de vecteurs rationnelle et sur-mesure pour une application donnée.

### 4.1. Relation structure-activité

L'idée de Davis fut de synthétiser une nouvelle classe de polymères cationiques, susceptibles de présenter une faible toxicité, et dont la structure contient des β-cyclodextrines. Celles-ci sont en effet réputées très faiblement voire non toxiques [66], ce qui n'a pas été le cas de tous les polymères cationiques développés jusqu'à lors (en particulier les PLL). La fonction chimique retenue pour jouer le rôle de centre cationique est l'amidine. Leur structure générale est présentée sur le schéma 15. Elle autorise deux variations, autour de :

- la distance entre un centre cationique et la cyclodextrine qui le porte (1er bras espaceur)
- la distance entre deux centres cationiques adjacents (2ème bras espaceur).

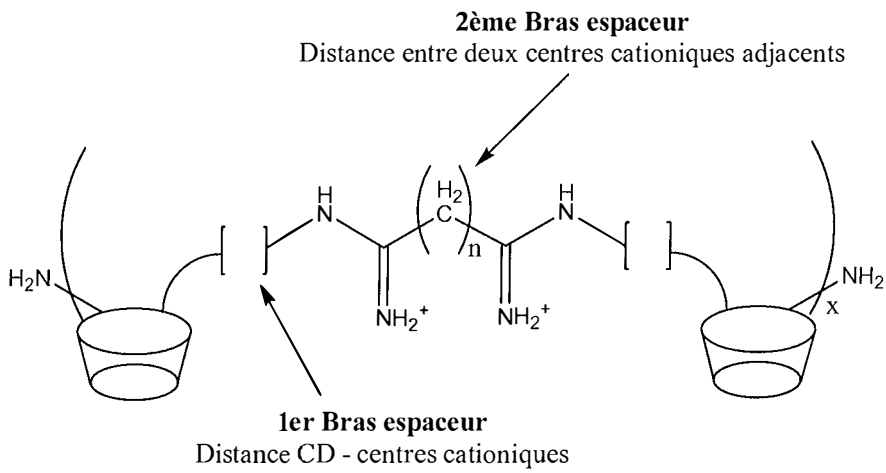
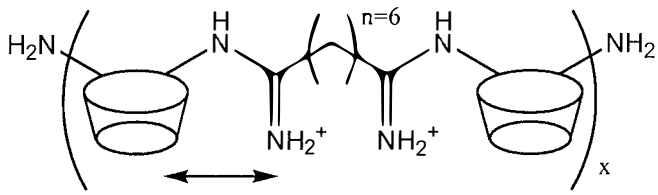



*Schéma 15 : Schéma général des polymères de Davis*

### 4.1.1. Distance entre le centre cationique et la β-cyclodextine [67]

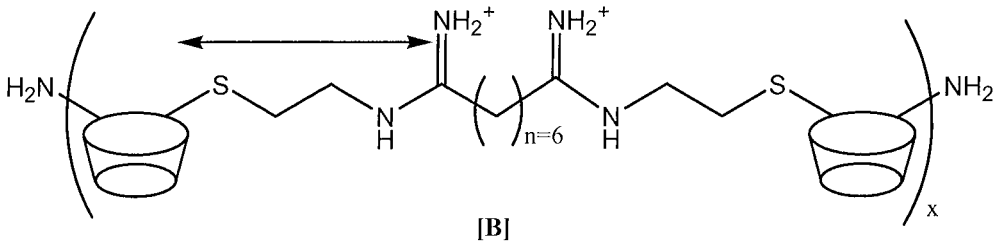
Dans un premier temps, le 2ème bras espaceur fut fixé à six atomes de carbone (-$(CH_2)_6$-).

Dans le cas où la fonction amidine est portée directement par la cyclodextrine (1er bras espaceur absent, polymère [A]), aucune liaison à l'ADN n'est observée. Mais dès lors que le centre cationique et la CD sont suffisament éloignés (polymère [B]), la liaison à l'ADN devient complète (pour des rapport de charges +/- ≥ 1,5). Les deux polymère précités ([A] et [B]) sont représentés par le schéma 16.




**[A]**

Fonction amidine portée directement par la CD




**[B]**

Fonction amidine éloignée de la CD

*Schéma 16 : Distance entre la CD et le centre cationique*

L'efficacité de transfection *in vitro* de [B] pour des cellules BHK-21 et CHO-K1 est comparable à celles de PEI 25 Kda et de Lipofectamine® . Elle est également 100 fois supérieure à celle de Superfect® et 1000 fois à celle de PLL 35 kDa.

L'augmentation du rapport de charges +/- (c'est à dire l'augmentation de la proportion de polymère par rapport à l'ADN) conduit néanmoins à une augmentation de la toxicité. Il a été montré qu'elle est due à l'augmentation du nombre de charges positives et non à la présence de cyclodextrines (qui peuvent solubiliser des constituants de la membrane cellulaire, en particulier

le cholestérol[66]). Aucune toxicité pour les cellules BHK-21 n'est observée dans les conditions expérimentales, qui est, de fait, inférieure à celle des autres vecteurs.

### 4.1.2. Distance entre les centres cationiques et importance du bras espaceur [68]

Sur le modèle de [B], une série d'homologues comportant n= 4, 5, 6, 7, 8 et 10 méthylène entre les centres cationiques adjacents fut synthétisée (appelés respectivement CDP4, CDP5, CDP6, CDP7, CDP8, CDP10). Ils furent testés pour différents paramètres :

a) Protection contre les DNases

Elle dépend de la longueur du bras espaceur, étant totale pour 4, 6, 8 et 10 méthylènes et que partielle pour 5 et 7 méthylènes.

b) Transfection *in vitro*

L'efficacité dépend du rapport +/- et atteint son maximum pour une valeur de 50. Dans ces conditions, l'efficacité est fonction de la distance entre les charges, étant maximale pour un espacement de 6 méthylènes. La dépendance à l'espacement est particulièrement marquée. Ainsi, passer de 6 à 5 méthylènes correspond à réduire la distance de seulement 1,8 Å, mais l'efficacité diminue alors d'un facteur 20.

c) Toxicité *in vitro*

Elle est estimée par la fraction de cellules survivantes et par l'$IC_{50}$. La toxicité augmente avec le rapport +/-. Dans les conditions d'efficacité maximale (+/- = 50), des différences évidentes sont observées entre les polymères, la toxicité dépendant encore de la distance entre les charges. Aucune toxicité n'a été relevée pour 8 méthylènes, mais elle augmente d'autant plus que l'on s'écarte de cette valeur. En outre, l'$IC_{50}$ suit le même profil que la toxicité (celle de CDP6 étant la moitié de CDP8).

d) Affinité de l'ADN pour le polymère

Elle est appréciée par la quantité d'heparan sulfate (chargé négativement) nécessaire pour déplacer l'ADN. L'affinité maximale (c'est à dire la quantité maximale d'heparan sulfate

nécessaire) est obtenue pour CDP6. Elle est à mettre en relation avec son efficacité de transfection, maximale elle aussi.

e) Influence des cyclodextrines

Deux analogues polyamidine de CDP6 furent synthétisés avec en lieu et place des β-cyclodextrines un chaînon linéaire de 6 et 9 méthylènes (respectivement). Le chaînon de 9 méthylènes semble être celui respectant le mieux l'espacement imposé par la β-cylodextrine.

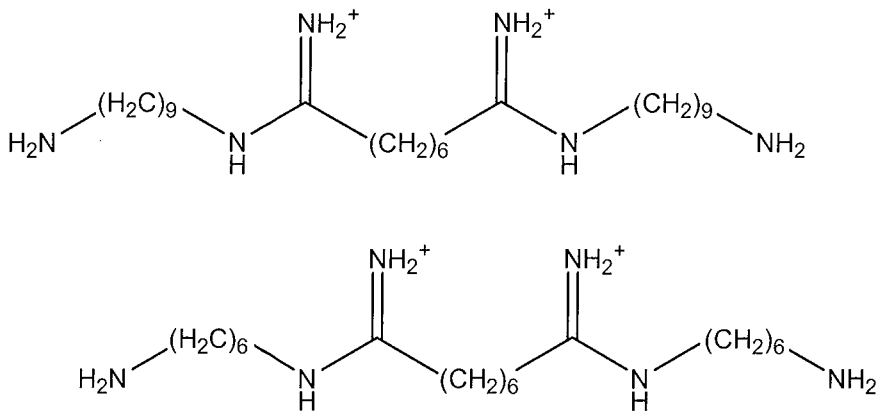



*Schéma 17 : Analogues polyamidines*

Les polyplexes correspondants ont une $IC_{50}$ 100 à 1000 fois plus faible que celle de CDP8. L'incorporation de cyclodextrine permet donc de réduire grandement la toxicité.

## 4.2. Conception sur mesure pour une utilisation *in vivo*

Comme il été dit plus haut, les formulations de polyplexes optimisées pour une utilisation *in vitro* ne sont typiquement pas utilisables en l 'état pour une application *in vivo*. En conséquence, les polyplexes de Davis furent modifiés pour permettre de :

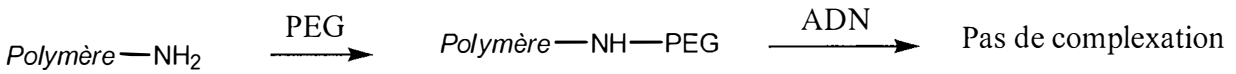
- s'affranchir des phénomènes d'agrégation et d'interactions non spécifiques (stabilisation par PEG).
- cibler spécifiquement des cellules (attachement d'un ligand).

Cette démarche illustre bien la possibilité des vecteurs non-viraux à pouvoir être conçus sur-mesure pour une application précise, ce qui n'est pas du tout le cas pour un virus.

### 4.2.1. Stabilisation par PEG [69]

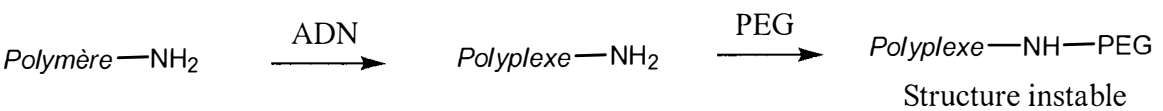
Dans un premier temps, l'incorporation de PEG dans la structure a été envisagée par liaison covalente aux extrémités amino-terminales du polymère. Deux cas sont possibles:

1° Avant la complexation de l'ADN




Les polymères formés ne sont pas capables de complexer l'ADN.

2° Après la complexation de l'ADN




Ce sont ici les polyplexes qui vont être greffés par les PEG. La particule formée est instable et se réarrange. En effet, le polycation est utilisé en excès par rapport à l'ADN, et tous ne sont pas couplés aux PEG. L'ADN est alors déplacé des polycations greffés vers ceux non modifiés, de manière à obtenir des polyplexes sans PEG et des polycations greffés libres en solution. Ces résultats ne sont pas réellement surprenants, puisqu' avec d'autres vecteurs non viraux, les greffages de PEG n'ont pas toujours été sans problèmes.

Une alternative a donc été développée, mettant à profit les propriétés d'inclusion des cyclodextrines. Parmi toutes les molécules pouvant donner lieu à un complexe hôte-invité, l'adamantane fait figure de modèle et a souvent été cité comme exemple. Ses dimensions proches de celle de la cavité de la β-CD et sa constante d'association pour la β-cyclodextrine élevé ($K_a \approx 10^4 - 10^5$) permet d'obtenir des complexes très stables. Le schéma 18 illustre l'inclusion du dérivé synthétisé dans la cavité de la β-CD. Le schéma 19 illustre quant à lui le principe dans son ensemble.

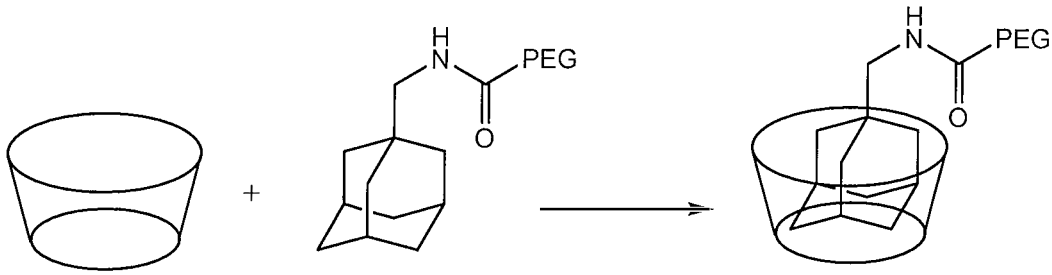



*Schéma 18 : Les complexes d'adamantane*

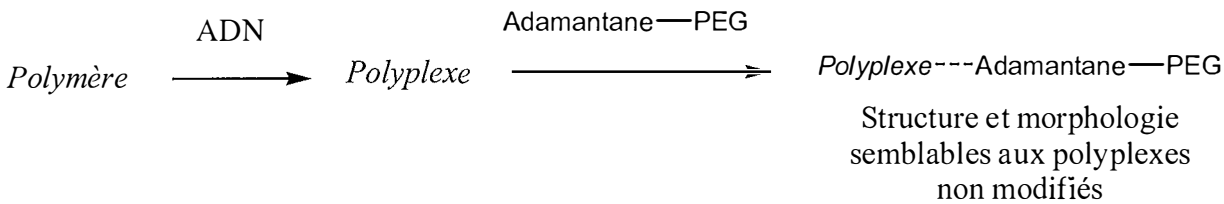



*Schéma 19 : Troisième approche : conjugaison de PEG par inclusion*

Le suivi du diamètre moyen des polyplexes par diffusion de lumière dynamique (DLS, Dynamic Light Scattering) après addition de PBS (pour arriver à une concentration en sels de 50 mM) montre qu'il existe une longueur critique pour le PEG en dessous de laquelle il n'y a pas de stabilisation : la taille des particules augmente avec le temps (il y a agrégation). Le $PEG_{5000}$ permet de conserver un diamètre constant alors que le $PEG_{3400}$ n'est pas assez long pour y parvenir (tableau 6).

*Tableau 6 : Diamètre moyen des particules déterminé par DLS en fonction du temps*

| *Polyplexe* | *t = 0* | *t = 10 minutes* |
|---|---|---|
| CDP6 | ≈ 60 nm | 272 nm |
| CDP6 + $PEG_{5000}$ libre en solution | ≈ 60 nm | 278 nm |
| CDP6- AD-$PEG_{3400}$ | ≈ 60 nm | 204 nm |
| CDP6- AD-$PEG_{5000}$ | ≈ 60 nm | 95 nm |

En outre, la présence de PEG seul (c'est à dire libre en solution) ne suffit pas à la stabilisation, et c'est uniquement l'inclusion de l'AD-PEG dans la cavité de la cyclodextrine qui le permet (tableau 7). La stabilisation est par ailleurs fonction de la densité en PEG (c'est à dire en pratique

de la proportion de AD- $PEG_{5000}$ utilisée). Cela est à rapprocher de la diminution de la charge en surface (estimée par le potentiel zeta de la particule) avec la proportion de PEG ajoutée.

*Tableau 7 : Diamètre moyen des particules déterminé par DLS au bout de 10 minutes en fonction de la proportion de AD-$PEG_{5000}$*

| AD- $PEG_{5000}$ (%) | 0 | 50 | 100 | 150 | 200 |
|---|---|---|---|---|---|
| Ø moyen approximatif (nm) | 270 | 150 | 95 | 75 | 70 |

Les polyplexes non PEG-ylées apparaissent en microscopie électronique à transmission (MET) comme des particules discrètes, uniformes, d'un diamètre d'environ 100 nm. Suite à l'addition de PBS (concentration en sels de 50 mM) les particules s'agrègent, et plus aucune entité discrète n'est observée. A l'inverse, les polyplexes modifiés par $PEG_{5000}$ ne s'agrègent pas et restent stables en conservant la même taille (particules discrètes d'environ 110 nm de diamètre) et la même forme : l'inclusion ne modifie pas la morphologie du complexe. Les deux techniques (DLS et TEM) conduisent donc à des résultats homogènes.

Au final, les cavités des cyclodextrines permettent la PEG-ylation des polyplexes par inclusion d'AD-PEG, sans modification de la morphologie des particules. Le procédé permet de stabiliser leur surface, mais les PEG doivent être suffisamment longs et en densité suffisante.

### 4.2.2. Greffage de ligand et ciblage de types cellulaires particuliers [70]

Dès lors que les polyplexes ont pu être rendus stables et potentiellement adaptés à une utilisation *in vivo*, l'étape suivante consiste à cibler spécifiquement leur action à un type cellulaire. Les cellules tumorales, à division rapide, ont des besoins accrus en fer pour leur croissance, et surexpriment en conséquence le récepteur de la transferrine, glycoprotéine fixant et véhiculant le fer dans l'organisme. Celle-ci est un ligand des tissus tumoraux qui a été bien étudié. Elle existe sous deux formes :

- l'apo-transferrine, (apo-)Tf, avant qu'elle ne fixe le fer
- l'holo-transferrine, (holo-)Tf, ayant fixé le fer.

L'(holo-)Tf est reconnue et se lie à un récepteur en surface des cellules. Elle est alors internalisée par endocytose, et la diminution du pH consécutive à la fusion avec un lysosome provoque le

relargage du fer. L'endolysosome fusionne alors avec la membrane cellulaire (recyclage des membranes), et l'(apo-)Tf est libérée à la surface de la cellule, n'ayant que peu d'affinité pour le récepteur.

Sur le même modèle que le précédent, un dérivé de l'adamantane conjugué à la transferrine a été préparé (Schéma 20).Le schéma réactionnel retenu lie l'extrémité libre du $PEG_{5000}$ à l'amine de la chaîne latérale des résidus lysine de la transferrine, et conduit aux tansferrines mono-, bi- et triubstituées( (AD-PEG)-Tf, $(AD\text{-}PEG)_2$-Tf, $(AD\text{-}PEG)_3$-Tf), qui ont été séparées par CLHP.

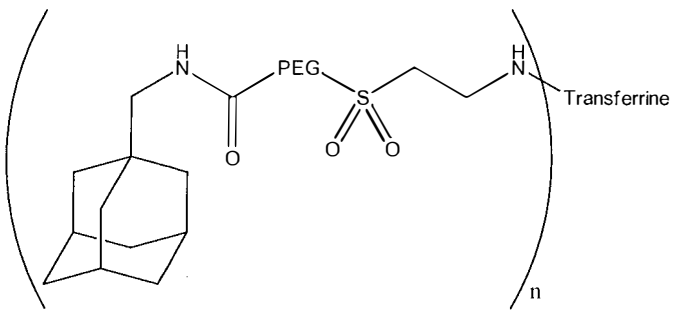



*Schéma 20 : Ligand $(AD\text{-}PEG)_x$-Tf dérivé de l'adamantane conjugué à la transferrine*

Pour les trois conjugués, la transferrine reste tout à fait fonctionnelle puisque sa capacité à fixer le fer reste inchangée par rapport à la transferrine native.

L'affinité aux récepteurs est appréciée par le déplacement de transferrine marquée avec de la fluorescéine de la surface de cellules PC-3 et K562. Le dérivé mono-substitué est celui présentant l'affinité la plus élevée, comparable à celle de l'(holo-)Tf native (respectivement 3,6 et 0,6 % de fluorescence résiduelle pour les cellules PC-3). L'affinité diminue avec le nombre de chaînes de PEG (dérivés di- et tri-substitués), vraisemblablement pour des raisons de gêne stérique.

La stabilité des particules a été suivie par DLS (Dynamic Light Scattering) et dépend de la formulation. En deçà de 1% de (AD-PEG)-Tf, les particules restent stables et ne s'agrègent pas (diamètre moyen d'environ 70 nm). A partir de 1%, on observe une agrégation lente : le ligand va alors à l'encontre de l'effet d'enveloppe créé par le PEG.

Enfin, l'efficacité de transfection *in vitro* a été testée sur des cellules leucémiques K562, réputées difficiles à transfecter. Les polyplexes conjugués à l'(AD-PEG)-Tf obtiennent des résultats 4 fois

supérieurs à ceux des conjugués à l'(AD-PEG) seul. L'addition de transferrine libre en excès (10 équivalents) aux complexes conjugués à la transferrine annule toute augmentation d'efficacité, qui est comparable à celle obtenue avec l'(AD-PEG). Cela prouve l'entrée dans la cellule via le récepteur de la transferrine.

Enfin, aucune toxicité n'a été observée dans les conditions expérimentales.

# Travaux personnels

Trois directions de recherche ont été retenues:

- la synthèse d'uréido-cyclodextrines macrocycliques;
- la mise au point d'une nouvelle méthodologie de synthèse par la réaction phosphinimide en fluide supercritique
- la conception d'un nouveau ligand potentiel de structures nucléotidiques.

## 1. Synthèse d'uréido-cyclodextrines macrocycliques

Le parti a été pris de reprendre les synthèses d'uréido-CD greffées sur cyclams réalisées précédemment par F. Charbonnier.

Deux voies de synthèse à partir d'azido-CD avaient été explorées, respectivement en une (méthode « one-pot », à savoir la réaction phosphinimide) ou deux étapes.

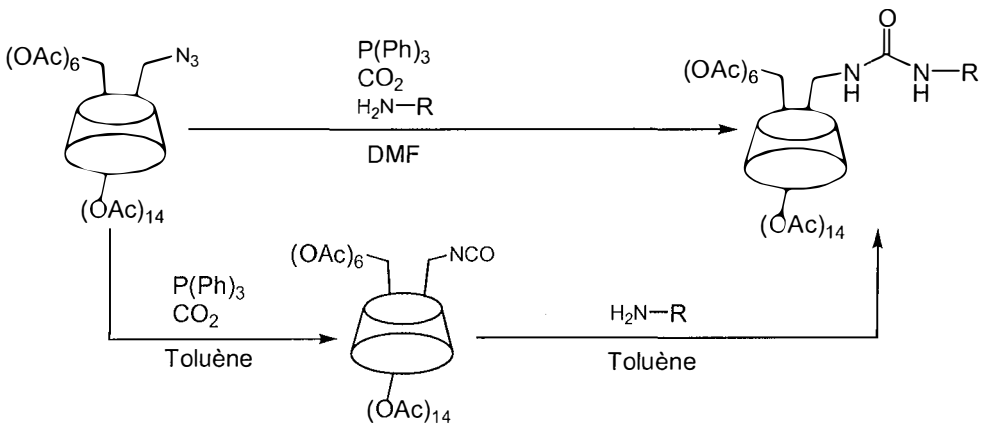



*Schéma 21 : Les deux voies de synthèse d'uréido-cyclodextrines*

Malgré la simplicité apparente de la méthode « one-pot », c'est la méthode en deux étapes qui a été retenue pour ses meilleurs rendements dans une stratégie de synthèse à l'échelle préparative.

La première étape de synthèse est la substitution nucléophile d'une 6-monotosyl-CD par l'azidure de sodium [71]. Dans une deuxième étape, l'azido-CD est acétylée dans un mélange pyridine / acide acétique (2 :1). La peracétylation de la cyclodextrine vise a simplifier les processus ultérieurs de purification. La structure du produit a été vérifiée par IRTF et RMN $^{13}C$. Dans un troisième temps est préparé l'intermédiaire isocyanate de la deuxième voie de synthèse, à partir de la perazido-CD, dans le toluène anhydre par action de la triphénylphosphine en présence de

$CO_2$. Il est indispensable de procéder au préalable à une distillation azéotropique de la perazido-CD, faute de quoi les molécules d'eau présentes dans le solide (hydrate de β-CD) risqueraient d'hydrolyser l'isocyanate R-N=C=O en acide carbamique R-NH-COOH, qui lui-même se décompose en amine R-$NH_2$ par décarboxylation. Pour les mêmes raisons, la réaction se déroule sous atmosphère inerte (argon).

Le produit est obtenu par précipitation par le cyclohexane. Sa structure a été vérifiée par IRTF et RMN $^{13}C$. L'IRTF montre la disparition complète de la bande correspondant à la vibration de l'azide ($N_3$, 2106 $cm^{-1}$) et l'apparition de celle caractéristique de la fonction isocyanate (N=C=O, 2267 $cm^{-1}$). La RMN $^{13}C$ met bien en évidence le signal à 125 ppm correspondant au carbone de la fonction isocyanate.

Par ailleurs, la présence résiduelle de triphénylphosphine nous a conduit à établir une nouvelle procédure de purification de l'isocyanate. Celui-ci a été mis en suspension dans le cyclohexane à reflux pendant une heure puis filtré. L'isocyanate est alors condensé sur les différents cyclams dans le toluène anhydre sous atmosphère inerte (argon). Les produit sont obtenus par précipitation par le cyclohexane, avec de bons rendements(supérieurs à 85%).

Un nouveau protocole de désacétylation des hydroxyles de la CD est actuellement en cours d'étude de manière à remplacer celui de Zemplèn [72] (désacétylation catalytique par le méthanolate de sodium dans le méthanol, nécessitant une neutralisation consécutive sur résine).

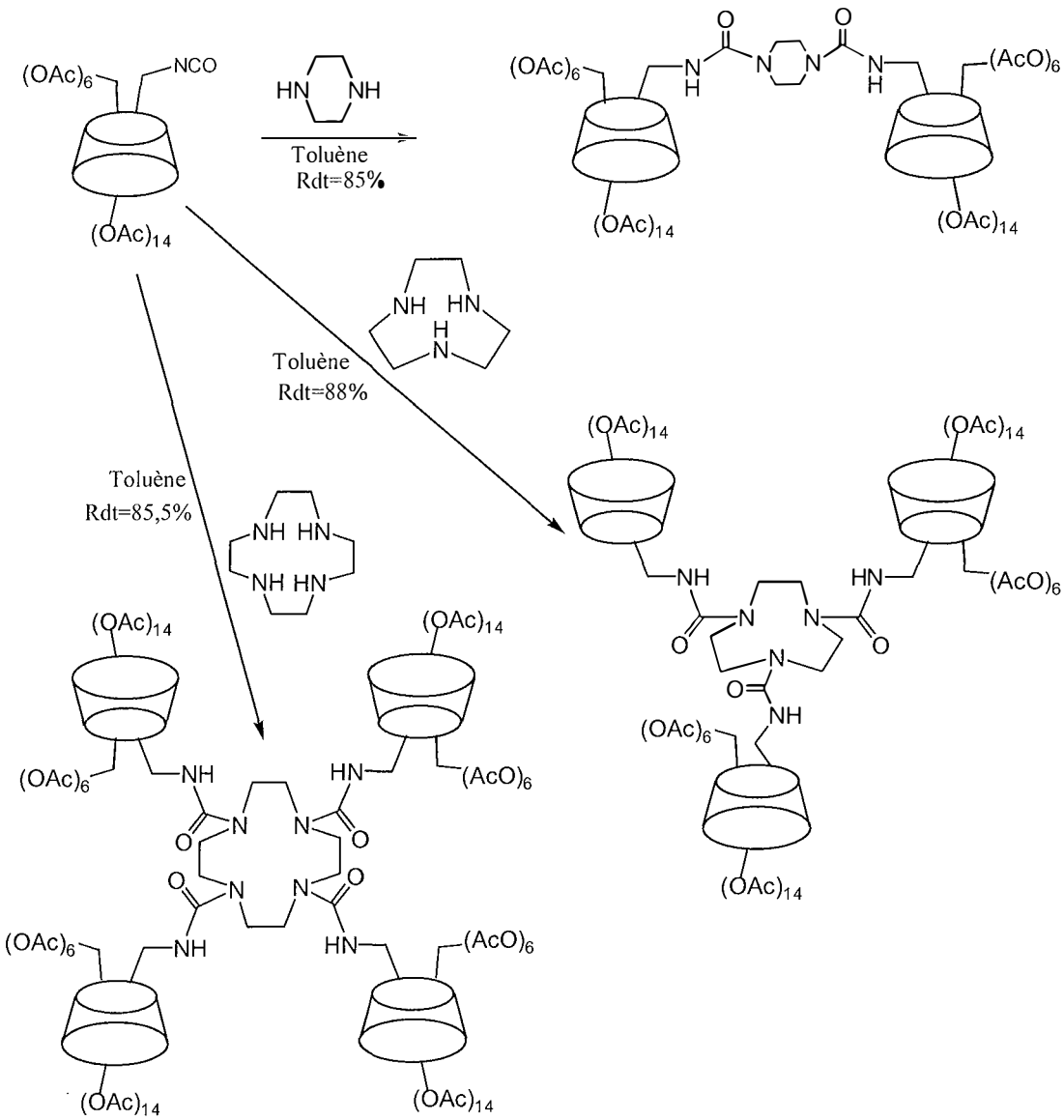



*Schéma 22 : Condensation de l'isocyanate sur les trois cyclams*

## 2. Mise au point de la réaction phosphinimide en milieu supercritique

Menée de façon classique, elle conduit à partir d'un azide et d'une amine à la formation de l'urée correspondante, en une étape, par action de la triphénylphosphine en présence de dioxyde de carbone. La transposition du schéma réactionnel aux cyclodextrines avait déjà été démontrée [75]. D'autre part, la synthèse de thiouréido-β-CD dans $CS_2$ [73], qui peut être vue comme un analogue de $CO_2$, avait été établie avec succès. Enfin, l'équipe d'Hamilton [28, 29] et celle de Dahmen [74] ont réalisé des études qui montraient des solubilités très satisfaisantes pour des cyclodextrines peracétylées et pour la triphénylphosphine en $CO_2$ s.c. Il semblait donc intéressant d'étendre la réaction en $CO_2$ s.c., le solvant jouant également le rôle de réactif.

La réaction en milieu $CO_2$ a été réalisée à partir de la monoazido-peracétyl-β-CD avec comme nucléophile la benzylamine [9] (schéma 23). Bien que l'on ne puisse préjuger des solubilités respectives des espèces en mélange, le choix des quantités de réactifs mis en jeu et des conditions de réaction (pression et température) furent guidées (tout au moins pour la monoazido-peracétyl-β-CD et la triphénylphosphine, n'ayant pas de données concernant la benzylamine) par les valeurs obtenues par Hamilton [28, 29] et Dahmen [74].

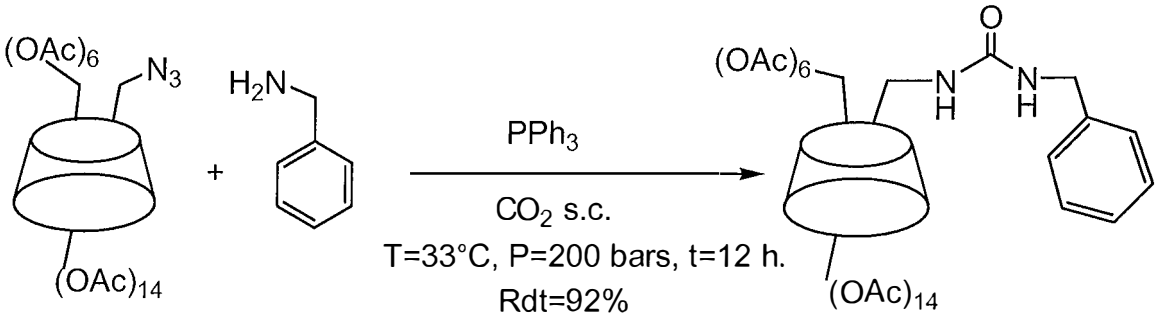



*Schéma 23 : La réaction phoshinimide en $CO_2$ supercritique R=92%*

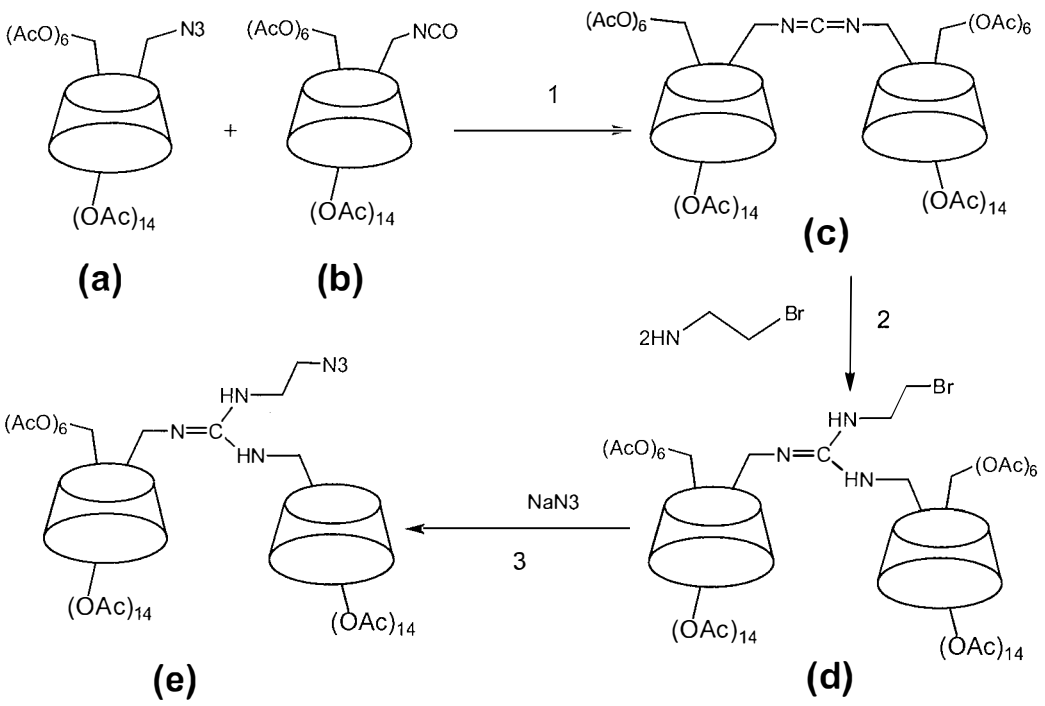
Les premiers résultats ont montré de très bons rendements, et un temps de réaction diminué, (divisé par deux par rapport à la même réaction menée sur polymère greffé par de la triphénylphosphine ou en solution dans le DMF).

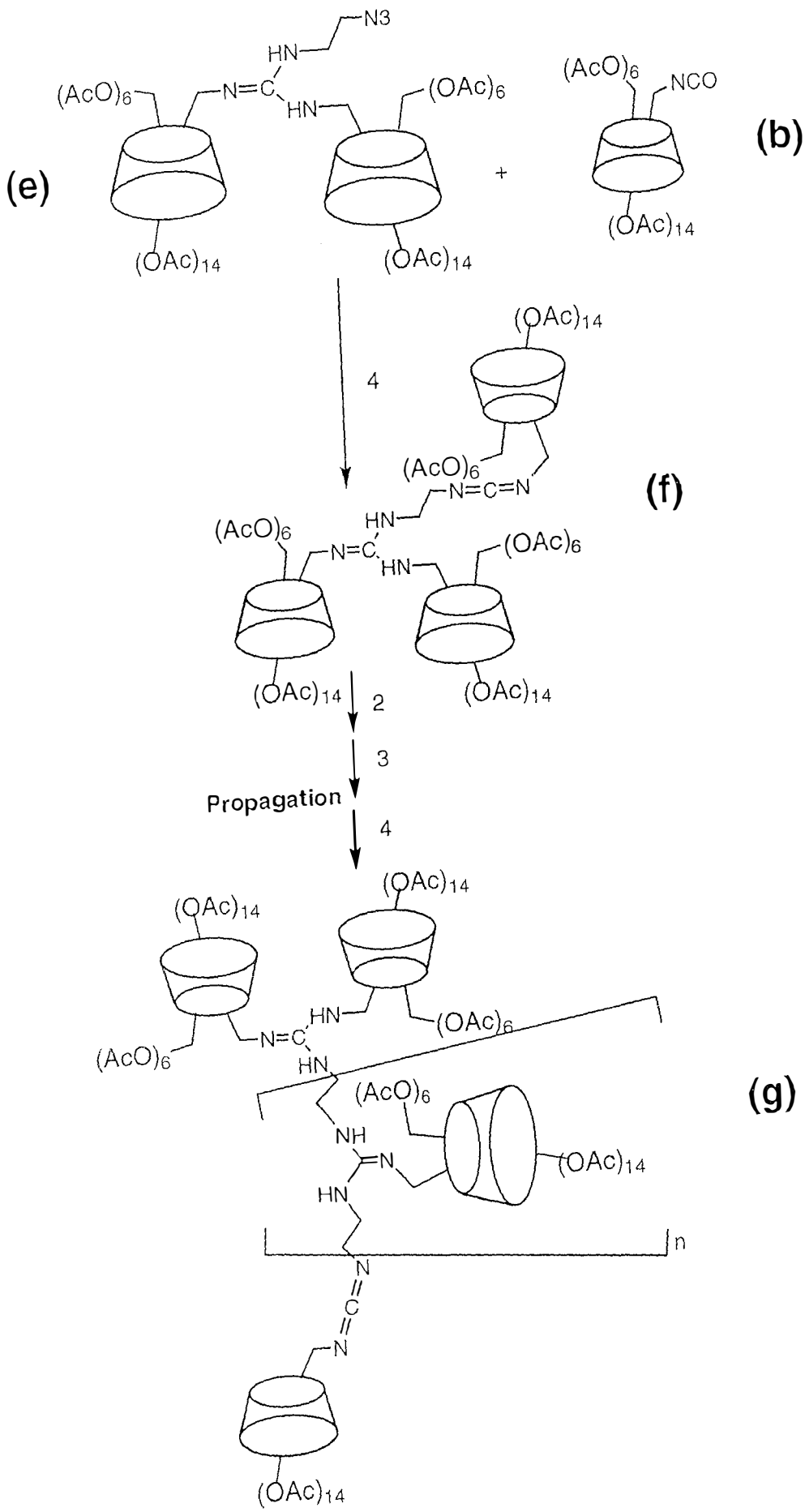
## 3. Réalisation des premières étapes de synthèse d'un ligand potentiel d'actifs nucléotidiques

### 3.1. Objectifs

En référence aux travaux réalisés sur le sujet, nous nous proposons de synthétiser un nouveau ligand potentiel de nucléotides. La stratégie de synthèse choisie se fonde sur la possibilité de contrôler à chaque étape le nombre de cavités cyclodextrines à introduire, le nombre de sites cationiques (guanidinium) et celui du dimensionnement des bras espaceurs entre les cavités. L'objet supramoléculaire issu d'une telle stratégie sera à classer parmi la famille des "foldamères", son auto-assemblage devant mettre en jeu d'une part les interactions entre les charges cationiques et anioniques du ligand et des phosphates nucléotidiques (respectivement), et d'autre part celles entre les bases des nucléotides et la cavité de la cyclodextrine. Il vise à l'obtention d'une entité discrète et définie, et non une particule comme tous les polyplexes obtenus jusqu'à lors. La synthèse est en outre pensée de manière à pouvoir être transposée en milieu dioxyde de carbone supercritique (chimie « verte »).

### 3.2. Stratégie de synthèse envisagée




(e)
N3
HN
(AcO)6
N=C
HN
(OAc)6
(OAc)14
(OAc)14
+
(AcO)6
NCO
(OAc)14
(b)
4
(OAc)14
(AcO)6
N=C=N
(f)
HN
(AcO)6
N=C
HN
(OAc)6
(OAc)14
(OAc)14
2
3
Propagation
4
(OAc)14
(OAc)14
HN
(OAc)6
N=C
(AcO)6
HN
(AcO)6
NH
N
(OAc)14
HN
n
N
C
N
(OAc)14
(g)

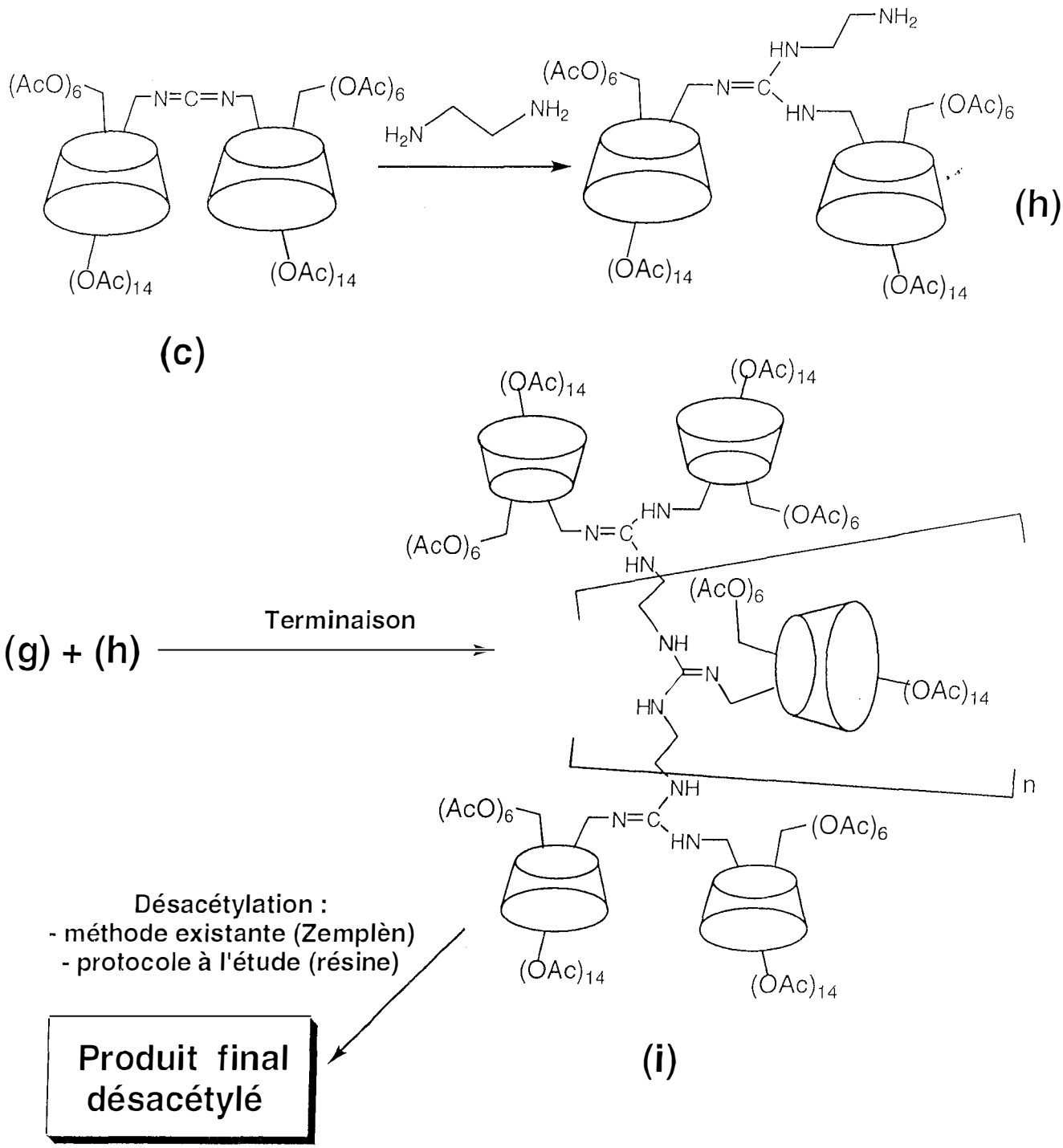



*Schéma 24 : Stratégie de synthèse du foldamère*

Pour l'heure, seule la première étape de synthèse a été réalisée, conduisant par réaction entre l'azide et l'isocyanate précédemment synthétisés au dérivé carbodiimide :

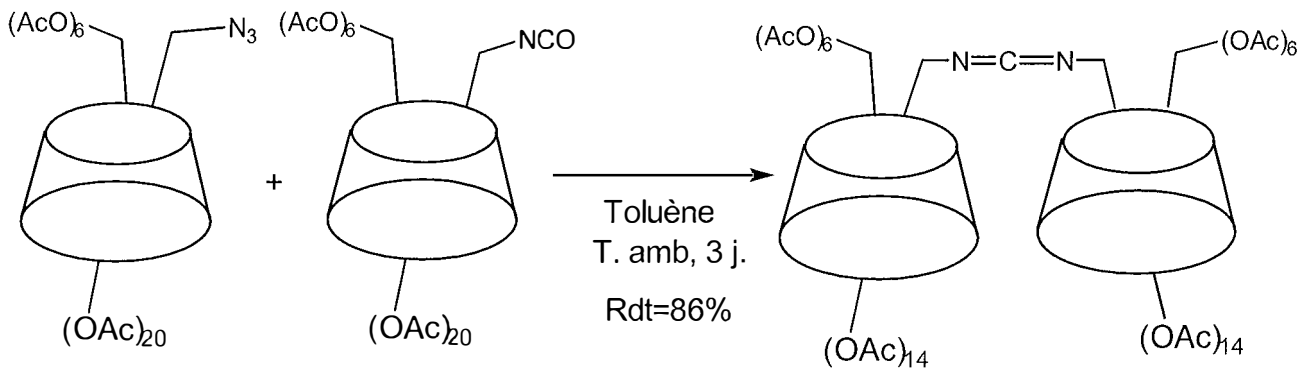



*Schéma 25 : Synthèse du carbodiimide*

La méthodologie retenue est celle précédemment développée par Marsura et Pinter [8].

La structure du produit est conforme à celle attendue comme le montre la spectroscopie infrarouge (disparition de la bande de vibration correspondant à la fonction isocyanate (2267 $cm^{-1}$) et à l'apparition de celle correspondant à la fonction carbodiimide (2139 $cm^{-1}$)) et la spectroscopie RMN du $^{13}C$ (signal du carbone de la fonction carbodiimide à 132 ppm).

Le produit est obtenu par précipitation par le cyclohexane, avec de bons rendements (86 %).

# Conclusion et perspectives

Trois uréido-cyclodextrines macrocycliques ont été synthétisées à l'échelle préparative. La stratégie de synthèse en deux étapes à partir de l'azide a montré des rendements supérieurs à une stratégie "one-pot" (rendements supérieurs à 85%). Il reste toutefois à mettre au point un nouveau protocole de désacétylation pour remplacer celui de Zemplèn et s'affranchir de ses contraintes.

La réaction phosphinimide a pu être transposée avec succès en milieu dioxyde de carbone supercritique. En comparaison avec la réaction en milieu solvant (DMF) et assistée sur polymère, nous avons observé une augmentation du rendement et une diminution du temps de réaction. De futurs travaux viseront à transposer la réaction sur polymère greffé en milieu $CO_2$ supercritique de manière à aboutir à une voie de synthèse sans résidu de solvants.

La première étape de synthèse du foldamère aboutissant au carbodiimide a été réalisée avec un rendement de 86%. La suite de la stratégie reste ensuite à mettre en œuvre de manière à obtenir le ligand final. Les propriétés de complexation et de vectorisation de ce dernier seront alors explorées.

BIBLIOTHEQUE PHARMACIE MONTPELLIER MARCH

# Partie experimentale

BIBLIOTHEQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY



# 1. Méthodes analytiques

## 1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Elles sont réalisées sur gel de silice (Kieselgel 60, 0,063-0,200 nm (70-230 mesh), Merck

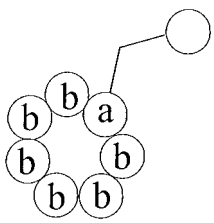
Deux méthodes de révélation sont utilisées:

- lampe U.V. ($\lambda$=245 nm)
- le mélange acide sulfurique/méthanol à 5% suivi d'un chauffage à 300°C.

## 1.2. Spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de RMN $^{1}H$ et $^{13}C$ ont été enregistrés par M$^{me}$ Eppiger (service commun de RMN de l'UHP) sur un appareil Bruker-DRX fonctionnant à 100 et 400 MHz.

Pour l'attribution des signaux RMN des carbones et des protons des cyclodextrines, la notation adoptée est celle présentée ci-dessous :



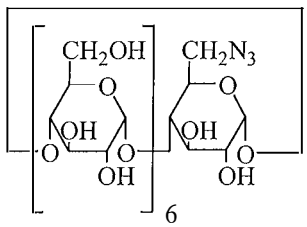

- Les carbones notés en Ca sont ceux du résidu glucosyle de la cyclodextrine substituée en C6
- Les carbones notés en Cb sont ceux du résidu glucosyle de la cyclodextrine non substituée en C6.

## 1.3. Spectres infrarouge

Les spectres infrarouges ont été enregistrés en dispersion dans KBr, sur un appareil IRTF Bruker Vector 22.

## 2. Synthèses

**6-monoazido-6-monodéoxy-β-cyclodextrine 1**



Formule brute : $C_{42}H_{69}N_3O_{34}$

Mr=1160 g/mol

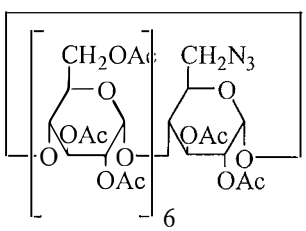
0,778 mmol (1 eq., m=1,002 g, Mr=1288 g/mol) de 6-mono-O-(*p*-toluènesulfonyl)-β-cyclodextrine sont dissoutes dans 10 ml de DMF anhydre. 0.970 mmol d'azidure de sodium (1,25 eq., m=63.1 mg, Mr=65,01 g/mol) sont ajoutés à la solution.

L'ensemble est chauffé pendant 1 heure à 100°C ,puis précipité à température ambiante par de l'acétone anhydre. Le précipité est filtré sur fritté et séché sous pression réduite (dessicateur.)

Le composé **1** attendu est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

Rdt=98 % (m=882,1 mg.) **CCM** ($CH_3CN$ / $H_2O$, 70/30) : Rf=0,48

**(2,3-di-O-acétyl-6-déoxy-6-azido)-hexakis-(2,3,6-tri-O-acétyl)-cyclomaltoheptaose 2**



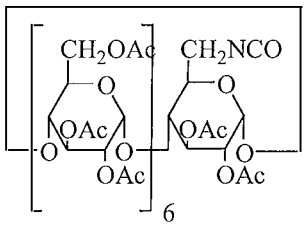
Formule brute : $C_{82}H_{109}N_3O_{54}$

Mr=1160 g/mol

120 ml d'un mélange 1/2 anhydride acétique / pyridine sont ajoutés à 3,466 mmol (m=4,020g, Mr=1160 g/mol) du composé **1**. La solution est chauffée à 80°C pendant 3h40, sous agitation, puis évaporée. Le résidu est lavé et évaporé 3 fois au toluène et 3 fois au méthanol. Le résidu est alors mis en suspension dans l'eau et filtré sur fritté. Le précipité est séché sous pression réduite (dessiccateur.)

Rdt=79% (m=5,478 g) CCM (AcOET / Acétone, 70/30) : Rf=0.62 IR (KBr, $\nu$=cm$^{-1}$) : 2106 ($N_3$) ; 1749 (C=O) **RMN $^{13}$C ($CDCl_3$, 25°C ; $\delta$=ppm) :** 171-169 (CO) ; 97-96 (C1a, C1b) ; 77-76 (C4a, C4b) ; 71-69 (C2a, C3a, C5a, C2b, C3b, C5b) ; 63-62 (C6b) ; 51 (C6a)

**(2,3-di-O-acétyl-6-déoxy-6-isocyanato)-hexakis-(2,3,6-tri-O-acétyl)-cyclomaltoheptaose 3**




Formule brute : $C_{83}H_{109}NO_{55}$

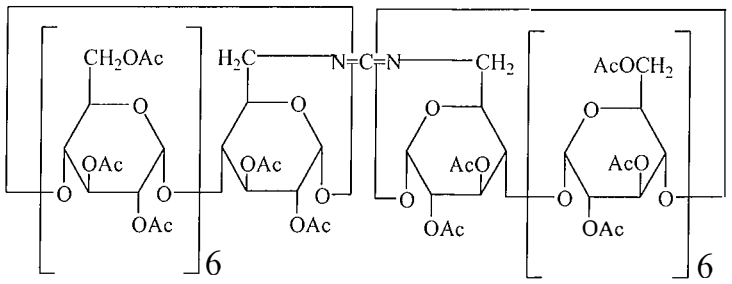
Mr=2000,8 g/mol

1,494 mmol (m=2,999g, Mr= 2000.8) du composé **2**) sont dissoutes dans 90 ml de toluène anhydre et sont séchées par distillation azéotropique à pression atmosphérique. La solution est ramenée à température ambiante et un courant de $CO_2$ sec est mis à buller pendant ½ heure. Une solution de 2,164 mmol (m=567,6 mg, Mr=262,3 g/mol) de $PPh_3$ dans 25 ml de toluène anhydre sont alors ajoutés au goutte à goutte pendant 1 heure, sous agitation et sous le courant sec de $CO_2$. Ce dernier est maintenu pendant 21 heures. La solution est ensuite précipitée par du cyclohexane, la suspension filtrée sur fritté et rincée par le même solvant. Le solide obtenu est mis en suspension dans le cyclohexane à reflux pendant une heure pour purification.

Une poudre blanche est obtenue, qui sera séchée sous pression réduite sur des pastilles de NaOH.

Rdt=95% (m=2,882 g) **IR (KBr, $\nu$=cm$^{-1}$) :** 2267 (N=C=O) ; 1750 (C=O) **RMN $^{13}$C ($CDCl_3$, 25°C ; $\delta$=ppm) :** 171-169 ($COCH_3$) ; 97-96 (C1a, C1b) ; 77-76 (C4a, C4b) ; 71-69 (C2a, C3a, C5a, C2b, C3b, C5b) ; 62 (C6b) ; 41 (C6a) ; 21-20 ($CH_3CO$) ; 125 (NCO)

**(2,3-di-O-acétyl-6-déoxy-6-carbodiimido)-hexakis-(2,3,6-tri-O-acétyl)-cyclomaltoheptaose 4**



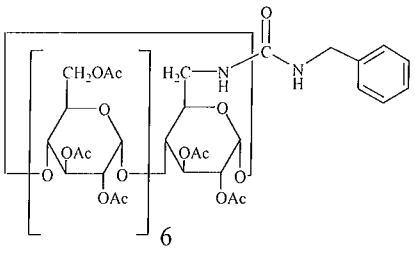
Formule brute : $C_{165}H_{218}N_2O_{108}$

Mr=3957,5 g/mol

0,149 mmol (m=300,0 g, Mr= 2000.8) du composé **2** sont dissoutes dans 25 ml de toluène anhydre et sont séchées par distillation azéotropique à pression atmosphérique. La solution est ramenée à température ambiante ,puis 0,150 mmol de **3** (m=300,8 mg, Mr=2000,8 g/mol) sont ajoutés. Une solution de 0.193 mmol (m=50,8 mg, Mr=262,3) de $P(Ph)_3$ dans 5 ml de toluène anhydre est versée au goutte à goutte au mélange, sous agitation. L'ensemble est laissé pendant 3 jours à température ambiante. La solution est alors précipitée au cyclohexane. Le précipité est laissé 1 heure sous agitation, filtré sur fritté, et séché sous pression réduite (dessiccateur) sur pastilles de NaOH.

Rdt=86% (m=511,2 mg) **CCM (AcOEt / Acétone, 4/1) :** Rf=0,48 **IR (KBr, ν=cm$^{-1}$) :** 2139 (N=C=N) ; 1750 (C=O) **RMN $^{13}$C ($CDCl_3$, 25°C ; δ=ppm) :** 171-169 ($COCH_3$) ; 132 (N=C=N) ; 97-96 (C1a, C1b) ; 77-76 (C4a, C4b) ; 71-69 (C2a, C3a, C5a, C2b, C3b, C5b) ; 62 (C6b) ; 46 (C6a) ; 21-20 ($CH_3CO$)

**[hexakis-(2,3,6-tri-O-acétyl)]-(2,3-di-O-acétyl)-cyclomaltoheptaosyl-6-déoxy-6-uréido-benzylamine 5**



Formule brute : $C_{90}H_{118}N_2O_{55}$

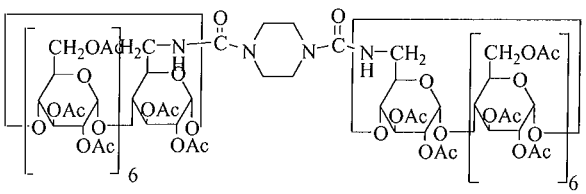
Mr=2107,9 g/mol

4,65 µmol (m=9,3 mg, Mr= 2000.8) du composé **2** et 186 µmoles (m=48,8 mg, Mr=262,3) de $P(Ph)_3$ sont placées et intimement mélangées à l'intérieur d'une cellule à fenêtre de saphir. 45,82

μmoles (10 μl, d=0,982, Mr=107,16) sont ajoutées à l'ensemble. La cellule est alors fermée de façon étanche, et remplie de $CO_2$ liquide. La température de la cellule est dans un premier temps amenée à 33°C, puis après stabilisation de la pression, celle-ci est portée à 200 bars, de manière à atteindre les conditions supercritiques. Le système est laissé en l'état pendant 12 heures. Après une détente préalable, le contenu de la cellule est récupéré. L'ensemble est mis en suspension dans l'hexane, sous agitation, pendant 10 minutes. Le précipité est filtré sur fritté, pour être ensuite chromatographié sur gel de silice ($CH_2Cl_2$ / MeOH, 97 / 3.) Une poudre blanche pure est obtenue.

Rdt=92% ±10% (m=9,0 mg) **CCM (AcOEt / Acétone, 7/3) :** Rf=0.62 **IR (KBr, ν=cm$^{-1}$) :** 1751 (C=O, acétate) ; 1655 (C=O, urée) **RMN $^{13}$C ($CDCl_3$, 25°C ; δ=ppm) :** 171-169 ($COCH_3$) ; 97-96 (C1a, C1b) ; 77-76 (C4a, C4b) ; 71-69 (C2a, C3a, C5a, C2b, C3b, C5b) ; 62 (C6b) ; 46 (C6a) ; 21-20 ($CH_3CO$)

**<u>bis-{hexakis-2,3,6-tri-O-acétyl)]-2,3-di-O-acétyl-cyclomaltoheptaosyl-6-déoxy-6-uréido}-pipérazine, 6</u>**



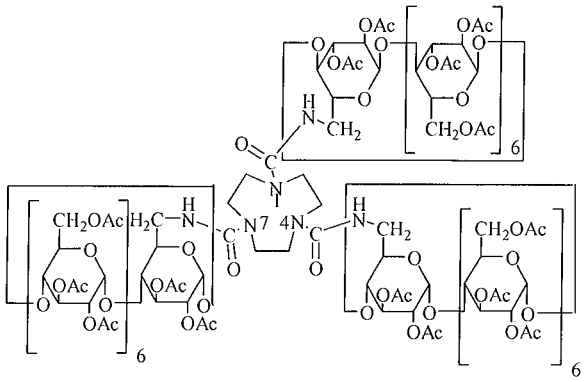
Formule brute : $C_{170}H_{228}N_4O_{110}$

Masse Moléculaire : 4085,24 g.mol$^{-1}$

0.226 mmol (2 eq., m=451,6 mg, Mr=2000,8 g/mol) du composé **3** sont mis en solution dans environ 30 ml de toluène anhydre. Une solution de 0,116 mmol (1 eq., m=10,0mg, Mr=86,1 g/mol) de pipérazine dans 50 ml de toluène anhydre est ajoutée au goutte à goutte. Le mélange est agité 24 heures à température ambiante, précipité par le cyclohexane, filtré sur fritté, et enfin séché sous pression réduite au dessicateur.

Rendement : R= 85% (m= 389,4 mg) **CCM (AcOEt / Acétone, 7/3) :** Rf = 0,26 **IR (KBr, ν=cm$^{-1}$) :** 1751 (C=O, acétate) ; 1655 (C=O, urée) **RMN $^{13}$C ($CDCl_3$, 25°C ; δ=ppm) :** 171-169 (*C*$OCH_3$) ; 158 (-NH-*C*O-NH-); 97-96 (C1a, C1b) ; 77 (C4a, C4b) ; 71-69 (C2a, C3a, C5a, C2b, C3b, C5b) ; 63-62 (C6b) ; 53 (C6a) ; 43-41 $CH_2$ pipérazine); 21 (*C*$H_3CO$)

**Tris-{[hexakis-(2,3,6-tri-O-acétyl)]-2,3-di-O-acétyl-cyclomaltoheptaosyl-6-déoxy-6-uréido}-1,4,7-triazacyclononane 7**



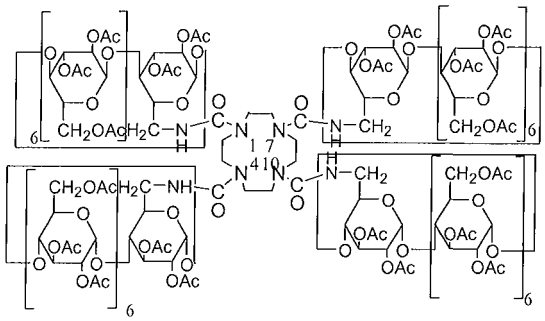
Formule brute : $C_{255}H_{342}N_6O_{165}$

Masse Moléculaire : 6127 $g.mol^{-1}$

0.37 mmol (3 eq., m=751,6 mg, Mr=2000,8 g/mol) du composé **3** sont mis en solution dans environ 35 ml de toluène anhydre. Une solution de 0,128 mmol (1 eq., m=16,5mg, Mr=129,2 g/mol) de 1,4,7-triazacyclononane dans 70 ml de toluène anhydre est ajoutée au goutte à goutte. Le mélange est agité 24 heures à température ambiante, précipité par le cyclohexane, filtré sur fritté, et enfin séché sous pression réduite au dessicateur.

Rdt= 88% (m= 674,4 mg) **CCM (AcOEt / Acétone, 7/3) :** Rf = 0,44 **IR (KBr, ν=cm$^{-1}$) :** 1749 (C=O, acétate) ; 1648 (C=O, urée) **RMN $^{13}$C ($CDCl_3$, 25°C ; δ=ppm) :** 171-169 (*C*O$CH_3$) ; 158 (-NH-*C*O-NH-); 97-96 (C1a, C1b) ; 77 (C4a, C4b) ; 71-69 (C2a, C3a, C5a, C2b, C3b, C5b) ; 63-62 (C6b et $CH_2$ cyclam) ; (C6a) ; 21 (*C*$H_3$CO)

**Tétra-{[hexakis-(2,3,6-tri-O-acétyl]-2,3-di-O-acétyl-cyclomaltoheptaosyl-6-uréido}-1,4,7,10-tétraazacyclododécane 9**



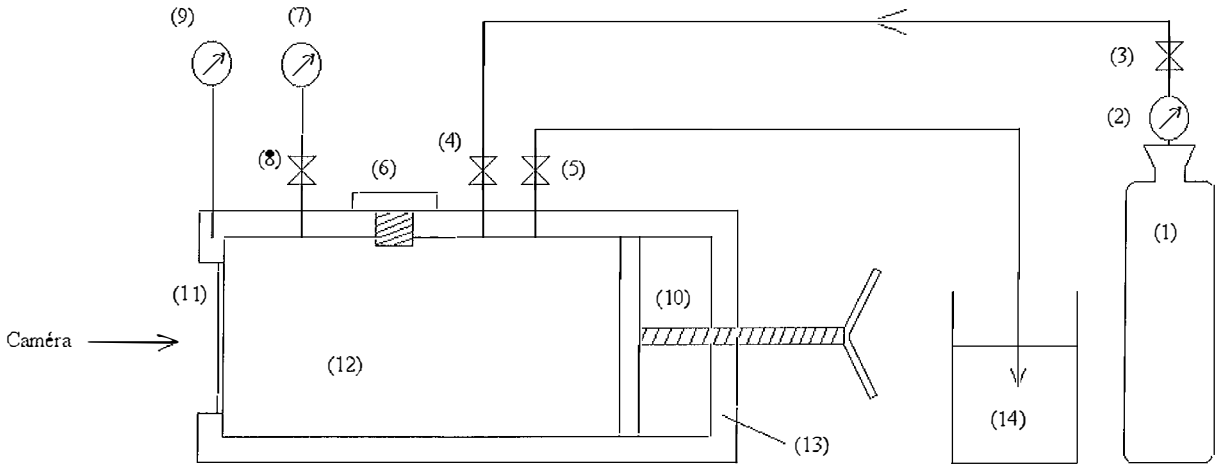
Formule brute : $C_{340}H_{456}N_8O_{220}$

Masse Moléculaire : 8170,50 $g.mol^{-1}$

0.259 mmol (4eq., m=519 mg, Mr=2000,8 g/mol) du composé **3** sont mis en solution dans environ 35 ml de toluène anhydre. Une solution de 63,27 µmol (1 eq., m=10,9 mg, Mr=172,27 g/mol) de 1,4,7,10-tétrazacyclononane dans 30 ml de toluène anhydre est ajoutée au goutte à goutte. Le mélange est agité 24 heures à température ambiante, précipité par le cyclohexane, filtré sur fritté, et enfin séché sous pression réduite au dessicateur.

Rendement : R= 85,5 % (m= 453,3 mg) **CCM (AcOEt / Acétone, 7/3) :** Rf = 0,44 **IR (KBr, ν=cm$^{-1}$) :** 1750 (C=O, acétate) ; 1655 (C=O, urée) **RMN $^{13}$C ($CDCl_3$, 25°C ; δ=ppm) :** 171-169 (*C*$OCH_3$) ; 158 (-NH-*C*O-NH-); 97-96 (C1a, C1b) ; 77 (C4a, C4b) ; 71-69 (C2a, C3a, C5a, C2b, C3b, C5b) ; 63-62 (C6) ; 40 (C6a) ; 37 ($CH_2$ cyclen); 31 ($CH_2$ cyclen); 21-20 (*C*$H_3$CO)

## 3. Montage expérimental utilisé pour les synthèses en fluide supercritique




(1) Bouteille de $CO_2$
(2) Détendeur et manomètre
(3) Vanne de sortie du $CO_2$ de la bouteille
(4) Vanne d'entrée du $CO_2$ dans la cellule
(5) Vanne de détente de la cellule
(6) Bouchon de fermeture de la cellule
(7) Capteur de pression
(8) Vanne du capteur de pression
(9) Thermomètre
(10) Piston permettant de faire varier le volume de la cellule
(11) Fenêtre en saphir
(12) Intérieur de la cellule
(13) Enceinte adiabatique thermostatée
(14) Bouteille d'eau permettant de visualiser la sortie du $CO_2$ lors de la détente

Volume minimal de la cellule : 1,7 ml

Volume maximal de la cellule : 12 ml

Diamètre interne : 14 mm

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

# Bibliographie

[1] K.H. Fromming, J. Szejtli, Cyclodextrins in pharmacy, Kluwer Acedemic Publishers, 1993, 224p.

[2] H. Staundinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta*, **1919,** *2*, 635

[3] J. Kovàcs, I. Pinter, G. Toth, Z. Györgydeak and P. Köll, *Carbohydrate Res.*, **1993**, *239*, 95

[4] I. Pinter, J. Kovacs, G. Toth, Carbohydrate Res., **1995**, *273*, 99

[5] P. Friant-Michel, A. Marsura, J. Kovács, I. Pinter, J.L. Rivail, *Theochem.*, **1997**, *61*, 395

[6] J. Kovács, I. Pintér, P. Mészáros, M. Kajtár-Peredy, L. Jicsinsky, *Polish J. Chem.*, **1999,** *73*, 1037

[7] F. Charbonnier, T. Humbert, A. Marsura, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 3481

[8] F. Charbonnier, A. Marsura, K. Roussel, J. Kovács, I. Pintér, *Helv. Chim. Acta*, **2001**, *84*, 535

[9] S. Porwanski, B. Kryczka, A. Marsura, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 8441

[10] http://www.flexwareinc.com/gasprop.htm, consulté le 01/09/04

[11] Computational Chemistry Comparaison and Benchmark Database, II.D.9. Polarizabilty, http://srdata.nist.gov/cccbdb, consulté le 01/09/04

[12] Computational Chemistry Comparaison and Benchmark Database, II.D.7. Electric dipole moment, http://srdata.nist.gov/cccbdb, consulté le 01/09/04

[13] M.A. McHugh, V.J. Krokonis, Supercritical fluid extraction, 2nd Edition, Butterworth-Heinemann, p. 8-16

[14] J. Chrastil, *J. Phys. Chem.*, **1982**, *86*, 3016

[15] S.K. Kumar, U.W. Suter, *Polymer preprints*, **1986**, *28*, 286

[16] E.J. Beckman, *J. Of Supercritical Fluids*, **2004**, *28*, 121

[17] E.J. Beckman, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2003**, *42*, 1598

[18] M.A. McHugh, V.J. Krukonis, Supercritical Fluid Extraction, 2nd Edition, Butterworth-Heinemann, p. 99

[19] F. Rindfleisch, T.P. DiNoia, A. McHugh, *J. Phys. Chem*, **1996**, *100*, 15581

[20] R. Fink, D. Hancu, R. Valentine, E.J. Beckman, *J. Phys. Chem. B.*, **1999**, *103*, 6441

[21] K.P. Johnston, K.L. Harrison, M.J. Clarke, S.M. Howdle, M.P. Heitz, F.V. Bright, C. Carlier, T.W. Randolf, *Science*, **1996**, *271*, 624

[22] S.G. Kazarian, M.F. Vincent, F.V. Bright, C.L. Liotta, C.A. Eckert, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 1729

[23] M.R. Nelson, R.F. Borkman, *J. Phys. Chem. A*, **1998**, *102*, 7860

[24] T. Sarbu, T. Styranec, E.J. Beckman, *Nature*, **2000**, *405*, 165

[25] P. Raveendran, S.L. Wallen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 7274

[26] Z. Shen, M.A. McHugh, J. Xu, J. Belardi, S. Kilic, A. Mesiano, S. Bane, C. Karnikas, E. Beckman, R. Enick, *Polymer*, **2003**, *44*, 1491

[27] M. Anibarro, K. Gessler, I. Uson, G. Sheldrick, K. Harata, K. Uekama, F. Hirayama, Y. Abe, W. Saenger, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 11854

[28] V.K. Potluri, J. Xu, R.M. Enick, E.J. Beckman, A.D. Hamilton, *Organic Letters*, **2002**, *4*, 2333

[29] V.K. Potluri, A.D. Hamilton, C.F. Karanikas, S.E. Bane, J. Xu, E.J. Beckman, R.M. Enick, *Fluid Phase Equilibria*, **2003**, *211*, 211

[30] J.C. Kaplan, M. Delpech, Biologie moléculaire et médecine, chapitre 17: la thérapie génique, Ed. Flammarion Médecine Sciences, 1993, 2ème édition, 790p.

[31] K. Ohtani, M. Nakamura, S. Saito, K. Nagata, K. Sugamura, Y. Hinuma, *Nucleic Acids Research*, **1989**, *17*, 1589

[32] C.N. Newman, A. Lawrie, A.F. Brisken, D. Cumberland, *Echocardiography*, **2001**, *18* , 339

[33] S. Lehrıman, *Nature*, **1999**, *401*, 517

[34] P.L. Felgner, T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold, M. Danielson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, *84*, 7413

[35] J.P. Behr, *Bioconjugate Chem.*, **1994**, *5*, 382

[36] Y. Xu, F.C. Szoka Jr, *Biochemistry*, **1996**, *35*, 5616

[37] A.D. Miller, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 1768

[38] A.J. Kirby, P. Camilleri, J.B.F.N. Engberts, M.C. Feiters, R.J.M. Nolte, O. Söderman, M. Bergsma, P.C. Bell, M.L. Fielden, C.L. Garcia Rodriguez, P. Guédat, A. Kremer, C. McGrego, C. Perrin, G. Ronsin, M.C.P. van Eijk, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 1448

[39] S.C. De Smedt, J. Demeester and W.E. Hennink, *Pharm. Res.*, **2000**, *17*, 113

[40] J.S. Remy, B. Abdallah, M.A. Zanta, O. Boussif, J.P. Behr, B. Demeneix, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1998**, *30*, 85

[41] D. Fischer, T. Bieber, Y. Li, H.P. Elsässer, T. Kissel, *Pharm. Res.*,**1999**, *16* (8), 1273

[42] L. Wightman, R. Kicheis, V. Rossler, S. Carotta, R. Ruzicka, M. Kursa, E. Wagner, *J. Gene Med.*, **2001**, *3*, 362

[43] M. Cotten, E. Wagner, K. Zatloukal, S. Phillips, D.T. Curiel, M.L. Birnstiel, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **1992**, *89*, 6094

[44] J. Haensler, F.C. Szoka, *Bioconjugate Chem.*, **1993**, *4*, 372

[45] M.X. Tang, C.T. Redemann, F.C. Szoka, *Bioconjugate Chem.*, **1996**, *7*, 703

[46] C.L. Gebhardt, A.V. Kabanov, *J. Controlled Release*, **2001**, *73*, 401

[47] P.R. Dash, M.L. Read, L.B. Barrett, M.A. Wolfert, L.W. Seymour, *Gene Ther.*, **1999**, *6*, 643

[48] I.R.C. Hill, M.C. Garnett, F. Bignotti, S.S. Davis, *Anal. Biochem.*, **2001**, *291*, 62

[49] F.J. Verbaan, C. Oussoren, I.M. van Dam, Y. Takakura, M. Hashida, D.J.A. Crommelin, W.E. Hennink, G. Storm, *Int. J. Pharm*, **2001**, *214*, 99

[50] K. Kunath, A. Von Harpe, H. Petersen, D. Fischer, K. Voigt, T. Kissel, U. Bickel, *Pharm. Res.*, **2002**, *19* (6), 810

[51] P. Erbacher, T. Bettinger, P. Belguise-Valladier, S. Zou, J.L. Coll, J.P. Behr, J.S. Remy, *J. Gene Med.*, **1999**, *1*, 210

[52] K.A. Mislick, J.D. Baldeschwieler , *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **1996**, *93*, 12349

[53] L.C. Mounkes, W. Zhong, G. Cipres-Palacin, T.D. Heath, R.J. Debs, *J. Biol. Chem.*, **1998**, *40* (2), 26164

[54] G. Zuber, L. Zammut-Italiano, E. Dauty, J.P. Behr, Angew. Chem. Int. Ed., 2003, 42, 2666

[55] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. Antonietta Zanita, M.D. Mergny, D. Sherman, B. Demeneix, J.P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **1995**, *92*, 7297

[56] J.S. Remy, B. Abdallah, M. Antonietta Zanita, O. Boussif, J.P. Behr, , B. Demeneix, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **1998**, *30*, 85

[57] A. Kichler, C. Leborgne, E. Coeytaux, O. Danos, *J. Gene Med.*, **2001**, *3*, 135

[58] M. Cotten, E. Wagner, K. Zatloukal, S. Phillips, D.T. Curiel, M.L. Birnstiel, *Proc. Natl. Acad· Sci. USA*, **1992**, *89*, 6094

[59] E. Wagner, C. Plank, K. Zatloukal, M. Cotten, M.L. Birnstiel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, *89*, 7934

[60] G.L. Lukacs, P. Haggie, O. Seksek, D. Lechardeur, N. Freedman, A.S. Verkman, *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275* (3), 1625

[61] W.T. Godbey, M.A. Barry, P. Saggau, K.K. Wu, A.G. Mikos, *J. Biomed. Mater. Res.*, **2000**, *51*, 321

[62] H. Pollard, J.S. Remy, G. Loussouarn, D. Demolombe, J.P. Behr, D. Escande, *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273* (13), 7507

[63] J.X. Tang, PA. Janmey, *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271* (15), 8556

[64] H. Salman, D. Zbaida, Y. Rabin, D. Chatenay, M. Elbaum, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **2001**, *98* (13), 7247

[65] M.A. Zanta, P. Belguise-Valladier, J.P. Behr, *Proc. Natl. Acad· Sci USA*, **1999**, *96*, 91-96

[66] T. Irie, K. Uekama, *J. Pharm. Sci.*, **1997**, *86* (2), 147

[67] H. Gonzalez, S.J. Hwang, M.E. Davis, *Bioconjugate Chem.*, **1999**, *10*, 1068

[68] S.J. Hwang, N. Bellocq, M.E. Davis, *Bioconjugate Chem.*, **2001**, *12*, 280

[69] S. Hwang Pun, M.E. Davis, *Bioconjugate Chem.*, **2002**, *13*, 630

[70] N. Bellocq, S. Hwang Pun, G.S. Jensen, M.E. Davis, *Bioconjugate Chem.*, **2003**, *14*, 1122

[71] L. Jicsinszky, *J. Incl. Phenom.*, **1994**, *18*, 247

[72] P. Collins, R. Ferrier, Monosaccharides, Ed. Wiley (1995)

[73] F. Charbonnier, A. Marsura and I. Pinter, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, *40*, 6581

[74] K.D. Wagner, N. Dahmen and E. Dinjus, *J. Chem. Eng. Data*, **2000**, *45*, 672

[75] F. Charbonnier, T. Humbert, A. Marsura, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 3481

[76] C.J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, *89*, 7017

[77] C.H. Park, H.E. Simmons, *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, *90*, 2431

[78] P. Sompornpisut, N. Deechalao, J. Vongsvivut, *Science Asia*, **2002**, *28*, 263

[79] A.P. Mukne and M.S. Nagarsenker, *AAPS PharmSciTech*, **2004**; *5(1),* Article 19 (http://www.aapspharmscitech.org, consulté le 02/05/2005).

[80]T.J. Brett, J.J. Stezowski, *Chem. Commun.*, **2000**, 857

[81] M..N. Reddy, T. Rehana, S. Ramakrishna, K.P.R. Chowdary, P.V. Diwan, AAPS PharmSci, **2004**, *6(1)*, Article 7 (http://www.aapspharmscitech.org, consulté le 02/05/2005).

[82] Yu Liu, Li Li, Zhi Fan, Heng-Hi Zhang, Xue Wu, Xu-Dong Guan, Shuang-Xi Liu, *Nano Lett.*, **2002**, *2(4)*, 257

[83] D. Armspach, P. R. Ashton, R. Ballardini, V. Balzani, A. Godi, C. P. Moore, N. Spencer, J. F. Stoddart, M. S. Tolley, T. J. Wear and D. J. Williams, *Chem. Eur. J.* **1995**, *1*, 33.

[84] D. Armspach, P. R. Ashton, C. P. Moore, N. Spencer, J. F. Stoddart, T. J. Wear and D. J. Williams, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 854.

[85] M. van den Boogaard, Cyclodextrin-containing Supramolecular Structures From pseudo-polyrotaxanes towards molecular tubes, insulated molecular wires and topological networks, Thèse d'Université, Université de Groningen, Pays-Bas, 2003, 156 p.

[86 ] T. Loftsson, M.E. Brewster, M. Masson, *Am. J. Drug. Deliv.*, **2004**, *2(4)*, 1

[87 ] F. Hirayama, K. Uekama, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1999**, *36*, 125

[88 ] S. Abdou, J. Collomb, F. Sallas, A. Marsura, C. Finance, *Archiv. Virol.*, **1997**, *142*, 1585

[89] C. Nicolazzi, S. Abdou, J. Collomb, A. Marsura, C. Finance, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2001**, *9*, 275

[90] C. Nicolazzi, V. Venard, A. Le Faou, C. Finance, *Antiviral Research*, **2002**, *54*, 121

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

FACULTE DE PHARMACIE UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I

# DEMANDE D'IMPRIMATUR

| | |
|---|---|
| **DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**<br><br>Présenté par **Michel WAGNER**<br><br>Sujet :<br>Chimie supramoléculaire de nouveaux ligands multicyclodextrines :<br>Développement d'une nouvelle méthodologie de synthèse en milieu dioxyde de carbone supercritique et synthèse d'un nouveau ligand pour la complexation et la vectorisation d'actifs de structure nucléotidique<br><br>Jury :<br>Président : M. Alain MARSURA, Professeur<br>Juges : M. Alain NICOLAS, Professeur<br>Mme Danielle BARTH, Professeur | Vu,<br><br>Nancy, le 09 mai 2005<br><br>Le Président du Jury et Directeur de thèse<br><br>**M. Alain MARSURA,**<br>Professeur |
| Vu et approuvé,<br><br>Nancy, le 9 mai 2005<br><br>Doyen de la faculté de Pharmacie de l'Université Henri Poincaré – Nancy I,<br><br>**Chantal FINANCE** | N°2205<br>Vu,<br><br>Nancy, le 16 mai 2005<br><br>Le Président de l'Université Henri Poincaré – Nancy I,<br><br>**Jean-Pierre FINANCE** |

N° d'identification : PH Nancy oi n° 37

## TITRE

Chimie supramoléculaire de nouveaux ligands multicyclodextrines :
Développement d'une nouvelle méthodologie de synthèse en milieu dioxyde de carbone supercritique et synthèse d'un nouveau ligand pour la complexation et la vectorisation d'actifs de structure nucléotidique

Thèse soutenue le 30 mai 2005

Par Michel WAGNER

## RESUME :

Les cyclodextrines sont une classe de molécules desormais bien connues et qui ont donné lieu à la synthèse de nombreux dérivés. Parmi ceux-ci, les dérivés de type urée ont montré d'intéressantes propriétés de complexation. La réaction phosphinimide est à l'heure actuelle la méthode de choix pour leur obtention. Le présent mémoire présente les travaux qui ont été réalisés dans ce cadre.
Le dioxyde de carbone supercritique a permis de remplacer les solvants organiques classiques dans certaines applications et a ouvert la voie à une chimie dite « verte ». Ses propriétés générales et particulières au contexte seront détaillées ainsi que le développement d'une nouvelle stratégie d'obtention de dérivés urée dans ce milieu.
La thérapie génique a fait naître beaucoup d'espoirs en proposant l'idée que l'on puisse guérir les maladies génétiques en transfectant aux cellules la version fonctionnelle du gène qui fait défaut dans une pathologie donnée. La place des vecteurs non viraux sera présentée, ainsi qu'une revue de leurs principaux représentants. Par ailleurs, un nouveau vecteur non viral, incluant dans sa structure des unités cyclodextriniques, a été imaginé. Les stratégies de synthèse envisagées et les premiers résultats seront avancés.

**MOTS CLES :** Cyclodextrine, réaction phosphinimide, dioxyde de carbone supercritique, vectorisation, vecteur non-viral

| Directeur de thèse | Intitulé du laboratoire | Nature |
|---|---|---|
| M. Alain MARSURA, Professeur | G.E.V.S.M., Unité Mixte de Recherche du CNRS 7565, Structure et Réactivité des systèmes moléculaires complexes, faculté de pharmacie, NANCY | Expérimentale ☒<br>Bibliographique ☐<br>Thème ☐ |

**Thèmes**

1- Sciences fondamentales
2- Hygiène/Environnement
3- Médicament
4- Alimentation – Nutrition
5- Biologie
6- Pratique professionnelle