



HAL
open science

Etude de l'interaction de dendrimères phosphorés avec les monocytes humains : recherche de récepteur (s)

Jérémy Le Dall

► **To cite this version:**

Jérémy Le Dall. Etude de l'interaction de dendrimères phosphorés avec les monocytes humains : recherche de récepteur (s). Biologie cellulaire. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2015. Français. NNT : 2015TOU30110 . tel-01320806

HAL Id: tel-01320806

<https://theses.hal.science/tel-01320806>

Submitted on 24 May 2016

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 Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

Discipline ou spécialité :

BIOTECHNOLOGIES, BIOLOGIE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE

Présentée et soutenue par

Jérémy LE DALL

Le Vendredi 18 Septembre 2015

Titre :

*Etude de l'interaction de dendrimères phosphorés avec les monocytes humains;
recherche de récepteur (s).*

Ecole doctorale :

Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

Unité de recherche :

CNRS UPR 8241 / INSERM U1043

Co-Directeurs de Thèse :

Dr. Anne-Marie CAMINADE

Pr. Rémy POUPOT

Rapporteurs :

Dr. Ling PENG

Pr. Giulia CHINETTI

Examineur :

Pr. Jean-Louis REYMOND

Membre(s) du jury :

***Dr. Giulia CHINETTI* (Nice) : Président du Jury**

***Dr. Ling PENG* (Marseille) : Rapporteur**

***Pr. Giulia CHINETTI* (Nice) : Rapporteur**

***Pr. Jean-Louis REYMOND* (Berne) : Examineur**

Dr. Anne-Marie CAMINADE / Pr. Rémy POUPOT (Toulouse) : Co-Directeurs de Thèse

« Le but n'est pas seulement le but, mais le chemin qui y conduit et les gens que l'on y rencontre »

Lao-tseu

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord le Pr. Giulia Chinetti, le Dr. Ling Peng et le Pr. Jean-Louis Reymond d'avoir accepté de juger mon travail en tant que rapporteurs et particulièrement le Pr. Giulia Chinetti qui a accepté de présider le jury de cette thèse.

Je remercie mes directeurs de thèse, le Pr. Rémy Poupot et le Dr. Anne-Marie Caminade de m'avoir fait confiance pendant ces trois années, de m'avoir toujours soutenu et de m'avoir fait découvrir le monde des dendrimères, de leur chimie à leurs applications biologiques.

Je pense au Dr. Cédric-Olivier Turrin et au Dr. Muriel Blanzat. Je les ai considérés comme mes deux autres directeurs de thèse. Je tiens à exprimer ma reconnaissance pour leur patience et tout ce qu'ils m'ont transmis ainsi que pour l'état d'esprit familial qu'ils ont instauré.

Je remercie le Pr. Jean Pierre Salles de m'avoir accueilli dans son équipe ainsi que tous les membres de l'équipe pour toute l'aide apportée notamment lors de nos réunions.

Je remercie le Dr. Séverine Fruchon de m'avoir enseigné la biologie moléculaire ainsi que pour tous ses conseils et son soutien tout au long de cette thèse.

Je remercie Aurélien Hameau, Matthieu Lefay et Marie Bélières pour leur aide sans qui rien n'aurait été possible en chimie et physico-chimie ainsi que pour leur amitié.

Je remercie Nicolas Beton, Michel Baron et Jean-Frédéric Boyer pour leur bonne humeur quotidienne, leur franchise et leurs conseils au jour le jour. Je pense que nous avons formé le meilleur bureau du centre avec entre autres des étagères toujours bien remplies grâce au vendredi soir.

Je remercie tous ceux avec qui j'ai interagi et passé de bons moments de complicité. Je pense à Fabienne, Sanaa, Annie, Jean-Luc, Isabelle, Hugues, Armelle, Régis, Cyrille, Pascal, Béatrice...

A tous ceux avec qui je n'ai pu passer que trop peu de temps et avec qui des liens se sont créés (Julien, Nabil, Hanna, Nidia, Pedro, Nieves, Abdellah, Guillaume, Claire, Marie, Patricia, Camille, Baptiste, Aurélie, Yannick, Caroline, Maëva, Mathilde, Pascal, Mélanie, Régis, Assia, Lilian, Emilie, Charline, Laure...) et tous ceux que j'ai pu oublier.

A la tribu féminine du couloir d'en face dirigée par Mr. Attia qui sont devenus des amis (Mehdi, Julie, Agathe, Véro, Béné, Joanna).

Je remercie Nicolas Fazilleau et Roxane Blattes, des amis qui ont toujours été là pour moi et avec qui j'ai pu être moi-même.

Enfin, cette expérience n'a pu être possible qu'avec le soutien infini de mes parents, de mes sœurs, de mon oncle, d'Emmanuelle et de ma belle-famille.

Résumé

Les dendrimères sont des entités chimiques "arborescentes" multi-ramifiées. Cette famille de polymères non linéaires comporte des applications dans différents domaines. Un dendrimère nommé ABP a montré des propriétés immuno-modulatrices sur le système immunitaire humain *in vitro*. Ce dendrimère comporte le profil d'un nouvel agent thérapeutique pour être utilisé dans le traitement de maladies inflammatoires chez l'homme. Parmi les cellules mononucléaires du sang humain, le dendrimère ABP cible principalement les monocytes et induit une activation anti-inflammatoire de ces cellules. Cette nouvelle étude a visé à comprendre l'interaction entre le dendrimère ABP et les monocytes humains. De manière intéressante, une interaction spécifique a été observée. En utilisant des expériences de modélisation, de physico-chimie et de biologie moléculaire, nous démontrons que le dendrimère ABP induit une activation anti-inflammatoire des monocytes humains par l'intermédiaire d'un ou de récepteur (s).

Abstract

Dendrimers are multi-branched “tree-like” chemical entities. This family of non-linear polymers has already been applied in different fields. A dendrimer named ABP has shown some immuno-modulatory properties toward the Human immune system in vitro. This dendrimer is at the dawn to become a new therapeutic agent by itself for the treatment of inflammatory diseases in Human. Among human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC), the ABP dendrimer selectively targets human monocytes and induces an anti-inflammatory activation of these cells. This new study aims at understanding the interaction between the ABP dendrimer and human monocytes. Interestingly, a specific interaction was observed. Using, biological, physico-chemical and molecular modelling experiments we demonstrated that the ABP dendrimer triggers monocyte activation through receptor(s) recognition.

Table des matières

Liste des abréviations	14
Liste des figures	17
Introduction	21
I- Les dendrimères dans « le monde nano »	22
I.1 «Le monde nano»	22
I.2 Les polymères	23
I.3 Les dendrimères	24
I.3.1 L'histoire	24
I.3.2 La structure	25
I.3.3 La synthèse	25
<i>I.3.3.a Les synthèses de type divergent:</i>	25
Synthèse de type « Lego »	26
Synthèse de type « Click chemistry »	26
<i>I.3.3.b Les synthèses de type convergente :</i>	26
Classique	26
Double stage	27
<i>I.3.3.c La synthèse de type « oignon »</i>	27
II- Caractéristiques des dendrimères	29
II.1 Propriétés physico-chimiques et méthodes d'analyses	29
II.1.1 La composition chimique	29
II.1.2 La multivalence	30
II.1.3 Le coefficient de partition	31
II.1.4 La charge	32
II.1.5 La taille et le poids moléculaire	33
II.1.6 La structure 3D et la modélisation	34
II.2 Paramètres biologiques	35
II.2.1 La biodistribution	36
II.2.2 La toxicité	37
II.2.3 Les cibles cellulaires	39
III- Interactions dendrimères/cellules	42
III.1 Types d'interactions et techniques d'analyse	42
III.1.1 Adsorption	42
<i>III.1.1.a Principes</i>	42
<i>III.1.1.b Applications aux dendrimères</i>	44
III.1.2 Liaison covalente	46
III.1.3 Liaison de type ligand/récepteur	48
III.2 Analyses d'interactions spécifiques	49
III.2.1 Notions de pharmacologie	49
III.2.2 Méthodes d'analyses d'une fixation spécifique	52
<i>III.2.2.a Molécules marquées</i>	52
<i>III.2.2.b Molécules non marquées</i>	55

IV-Applications des dendrimères en biologie	58
IV.1 Dendrimères conjugués	58
IV.1.1 Les dendrimères dans l'imagerie médicale	58
IV.1.1.a Dendrimères comme agents de contraste	58
IV.1.1.b Dendrimères comme molécules fluorescentes	59
IV.1.2 Dendrimères comme agents de transfection : « gene delivery ».	61
IV.1.2.a Agents de transfection	61
IV.1.2.b siRNA	62
IV.1.2.c Application en « gene delivery »	64
IV.1.3 Dendrimères comme transporteurs de médicaments	65
IV.1.3.a La solubilisation de médicaments	65
IV.1.3.b La spécificité d'action	66
IV.1.3.c Diminuer les effets secondaires	67
IV.1.3.d Biodiversité	67
IV.1.3.e Biodistribution	68
IV.1.4 Les dendrimères utilisés en vaccination	69
IV.2 Dendrimères intrinsèquement bioactifs	70
IV.2.1 Dendrimères comme agents antibactériens	70
IV.2.2 Dendrimères ayant une activité antivirale	72
IV.2.3 Dendrimères et maladies neurodégénératives	75
IV.2.3.a Anti prion	75
IV.2.3.b Effets sur les plaques de peptides β -amyloïdes	75
IV.2.4 Dendrimère pro-inflammatoire	76
IV.2.5 Dendrimères anti-inflammatoires	77
IV.2.5.a Dendrimères aux mécanismes d'action connue	77
IV.2.5.b Effets idiopathiques	80
IV.2.5.c Le dendrimère ABP ou AzaBisPhosphonate	80
Historique	80
Mécanismes moléculaires	83
Objectifs de travail	87
Résultats	91
Résultats complémentaires	113
I- Recherche du récepteur au dendrimère ABP par protéomique	114
I.1 Présentation du dendrimère ABP-Biotinylé	114
I.2 Protocole de purification et d'identification des protéines membranaires interagissant avec le dendrimère ABP-Biotinylé	116
I.3 Optimisation du protocole et application sur cellules totales	119
I.4 Discussion	122
II- Criblage des effets de dendrimères aux générations et fonctions terminales différentes	124
II.1 Structures des dendrimères PEG	124
II.2 Innocuité des différents dendrimères sur les PBMCs humains	125
II.3 Activation morphologique et anti-apoptotique des monocytes humains par les dendrimères de type Na et OMe	126

II.4 Activation pro-inflammatoire des monocytes humains par les dendrimères de type Na et OMe	131
II.5 Discussion	133
III- Matériels et méthodes	135
III.1 Préparation des solutions de dendrimères	135
III.2 Purifications des PBMCs et monocytes humains	135
III.3 Viabilité des PBMCs	135
III.4 Analyses des monocytes humains	136
III.5 Méthode de qRT-PCR	136
III.6 Purification des protéines membranaires	137
III.7 Identification des protéines par spectrométrie de masse	137
III.8 Analyse informatique des données	137
Discussion	139
Références bibliographiques	145

Liste des abréviations

ΔH : Variation d'enthalpie

3D : 3 Dimensions

ABC : AzaBisCarboxylate

ABP : AzaBisPhosphonate

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ALDOA : Aldolase A

AMP : Adénosine MonoPhosphate

ARN : Acide RiboNucléique

c-FMS : cellular - Feline McDonough Strain sarcoma virus oncogene homolog

COX : CyclOxygénases

DC : Dendritic Cell

dGPS : Dendrimère Polyglycérol Sulfate

DLS : Dynamic Light Scattering

DPPC : 1,2-DiPalmitoyl-sn-glycero-3-PhosphoCholine

DSC : Differential Scanning Calorimetry

EGF : Epidermal Growth Factor

EMA : European Medicines Agency

FDA : Food and Drug Administration

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

FRET : Förster Resonance Energy Transfer

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GPCRs : G-protein-coupled receptors

H1b : Haemophilus influenza type b

IL-(1, 6, 12) : Interleukines

IR : Infra-Rouge

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

Kd : Constante de dissociation

Ki : Constante d'inhibition
LPS : LipoPolySaccharide
LT : Lymphocyte T
LUV : Large Unilamellar Vesicles
MAP : MultiPrésentation Antigénique
MIP-2 : Macrophage Inflammatory Protein - 2
MLV : Multi Lamellar Vesicles
MTX : MéThotreXate
NAC : N-Acétyl-L-Cysteine
NFATc1 : Nuclear Factor of Activated-T cells, cytoplasmic 1
NF-κB : Nuclear Factor of κB
NK : Natural Killer
PAMAM : Poly(AMidoAMine)
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS : Phosphate Buffered Saline
PC : PhosphatidylCholines
PEG : PolyEthylene Glycol
PEO : PolyEthylene Oxyde
PETIM : PolypropylETherIMine
PLL : Poly-L-(Lysine)
POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
POPG : 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoglycerol
PPH : PolyPhosphorHydrazone
PPI : Poly(Propylenelmine)
PSMA : Prostate-Specific Membrane Antigen
QAC : Ammonium Quaternaires
RANK : Receptor Activator of NF-κB
RISC : RNA-Induced Silencing Complex
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROS : Réactifs Oxygénés

SANS : Small Angle Neutron Scattering

SAXS : Small Angle X-rays Scattering

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate-Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis

SPR : Résonance Plasmonique de Surface

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

STS : STauroSporine

TAM : Tumor Associated Macrophages

TKT : TransKeTolase

TLR : Toll Like Receptor

Tm : Température de transition

TNF- α : Tumor Necrosis Factor - α

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

UV : Ultra-Violet

Liste des figures

Figure 1 : Nombre de citations d'articles comportant le terme « nanotechnology » dans leur titre ou résumé.

Figure 2 : Exemples de nano-objets.

Figure 3 : Structures possibles d'un polymère.

Figure 4 : Synthèse de macromolécules de type starburst-polymer.

Figure 5 : a) Structure d'un dendron. b) Structure d'un dendrimère de génération 4.

Figure 6 : Méthodes de synthèse dites divergente et convergente.

Figure 7 : Synthèse divergente de type « oignon ».

Figure 8 : Exemples de branches utilisées en routine pour la synthèse de dendrimères PAMAM, PPI, PLL ou Phosphorés.

Figure 9 : Mécanismes de liaison possible à un récepteur d'un ligand multivalent.

Figure 10 : Couches successives d'ions entourant une molécule et potentiel zéta (ζ).

Figure 11 : Relation entre génération et taille d'un dendrimère PAMAM.

Figure 12 : Transformation mathématique des mouvements de deux molécules de petite et grande taille en solution via l'équation de Stokes-Einstein.

Figure 13 : Structures in silico obtenues de dendrimères de génération 2, comportant des cœurs et des branches différents.

Figure 14 : Colocalisation d'un dendrimère FITC-G4-OH au niveau des cellules microgliales (cerveau) après injection subarachnoïdienne.

Figure 15 : Schéma de l'activation des cellules microgliales par les dendrimères G4 et G4-C₁₂.

Figure 16 : A → D. De la bicouche lipidique à la structure du glycérophospholipide la composant.

Figure 17 : Courbe typique de DSC et paramètres obtenus.

Figure 18 : Interaction d'un dendrimère PAMAM de génération 3 avec une bicouche lipidique de (a) DPPC et (b) POPG.

Figure 19 : Création de vecteurs cellulaires : des dendrimères fonctionnalisés par « click-chemistry » sont greffés à la surface de cellules immunitaires.

Figure 20 : Extravasation et ciblage cellulaire de dendrimères thérapeutiques.

Figure 21 : Différentes étapes de fixation d'une molécule sur son récepteur.

Figure 22 : Courbe standard d'une fixation spécifique à un seul site de reconnaissance d'un ligand. (K_d : constante de dissociation ; B_{max} : fixation spécifique maximale)

Figure 23 : Principe du FRET entre deux fluorophores.

Figure 24 : Principe de la SPR et détection d'une interaction spécifique.

Figure 25 : Structure simplifiée du dendrimère PolyLysine Gadomer-17.

Figure 26 : Représentation d'un dendrimère PAMAM multimodal : cœur (noir), agents chélateurs (vert), peptide ciblant l'intégrine $\alpha\beta_3$ (orange), fluorophore alexa fluor (rose).

Figure 27 : Mécanismes de l'interférence à ARN.

Figure 28 : (a) Nombre de citations d'articles utilisant des dendrimères comme agents de transfection. (b) Principaux types de dendrimères décrits.

Figure 29 : Structure du dendrimère PAMAM de génération 6 Superfect.

Figure 30 : Structure tripartite du dendrimère tadpole.

Figure 31 : Structure du dendrimère PAMAM de génération 4.5 portant des unités cisplatins.

Figure 32 : Localisation d'un dendrimère PAMAM-FITC dans le cerveau de lapin nouveau-né après injection intra-veineuse.

Figure 33 : Comparaison des parois cellulaires entre bactéries Gram-positives et Gram-négatives.

Figure 34 : Schéma de reconnaissance et de fixation du virus VIH-1.

Figure 35 : Structure du dendrimère Vivagel.

Figure 36 : Dendrimère phosphoré de génération 3 induisant une inhibition d'aggrégation du peptide $A\beta_{1-28}$ (concentration de 0 à 10 μM).

Figure 37 : Evolution du dendrimère développé par le groupe de S.Shaunak. (a) Structure du dendrimère PAMAM-DG en 2004 (b) Structure du dendrimère PETIM-DG.

Figure 38 : Effets inhibiteurs du dendrimère Polyglycérol Sulfate (dGPS) sur l'extravasation leucocytaire et la production d'anaphylatoxines C5a.

Figure 39 : Structure du dendrimère ABP.

Figure 40 : Figure tirée d'un poster de C.O. Turrin, montrant l'activité anti-inflammatoire du dendrimère ABP sur les monocytes humains en fonction du nombre de branches.

Table 1 : Symboles et définitions de paramètres utilisés en pharmacologie.

Table 2 : Description de mécanismes moléculaires et cellulaires d'ABP sur différents types cellulaires.

Introduction

I- Les dendrimères dans « le monde nano »

I.1 «Le monde nano»

La nanoscience est la science basée sur l'étude fondamentale et appliquée de très petits objets ou de matériaux structurés à l'échelle de quelques nanomètres (10^{-9} mètres). La nanoscience est rattachée à différents domaines scientifiques comme la chimie, la biologie ou la physique. La nature des objets appartenant à la nanotechnologie est aujourd'hui discutée et étudiée avec le développement croissant de leurs études et de leurs applications^{1,2} (**Figure 1**).

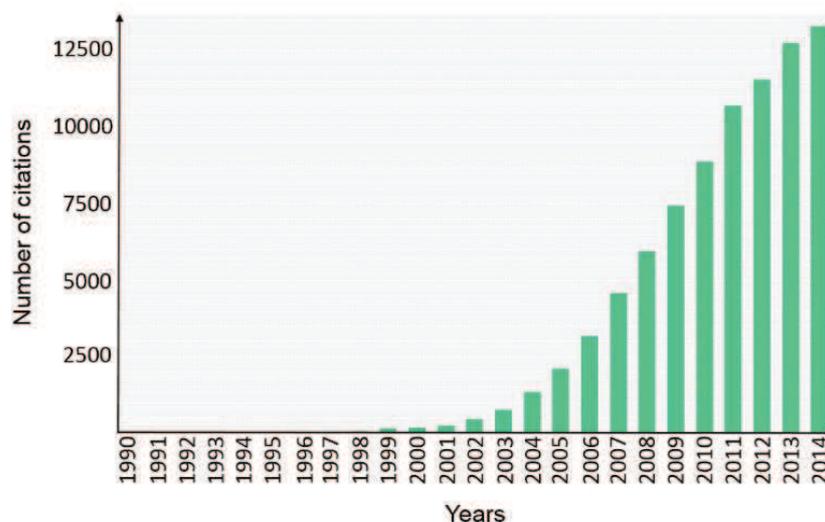


Figure 1 : Nombre de citations d'articles comportant le terme « nanotechnology » dans leur titre ou résumé³.

Les organismes comme la FDA (Food and Drug Administration) aux Etats-Unis ou l'EMA (European Medicines Agency) en Europe, appellent un objet nano-objet lorsque sa taille est comprise entre 1 et 1000 nm ou si sa taille est inférieure à 1000 nm respectivement^{4,5}. Une définition plus détaillée a été formulée par la Commission Européenne. D'après elle, un nano-objet est une entité naturelle, fortuite ou synthétisée, sous forme libre ou agrégée, où au moins 50% de ses composants font entre 1 à 100 nm⁶. Cette gamme de taille est également utilisée par l'association nationale américaine dans leur définition et le développement de nanotechnologies⁷. Ces objets peuvent avoir plusieurs aspects : sphérique ou cylindrique comme les fullerènes, les nanoparticules d'or ou d'argent, étoilés comme les dendrimères ou comporter une coque lipidique ou protéique comme les micelles, les liposomes ou les « virus like particle »⁸ (**Figure 2**).

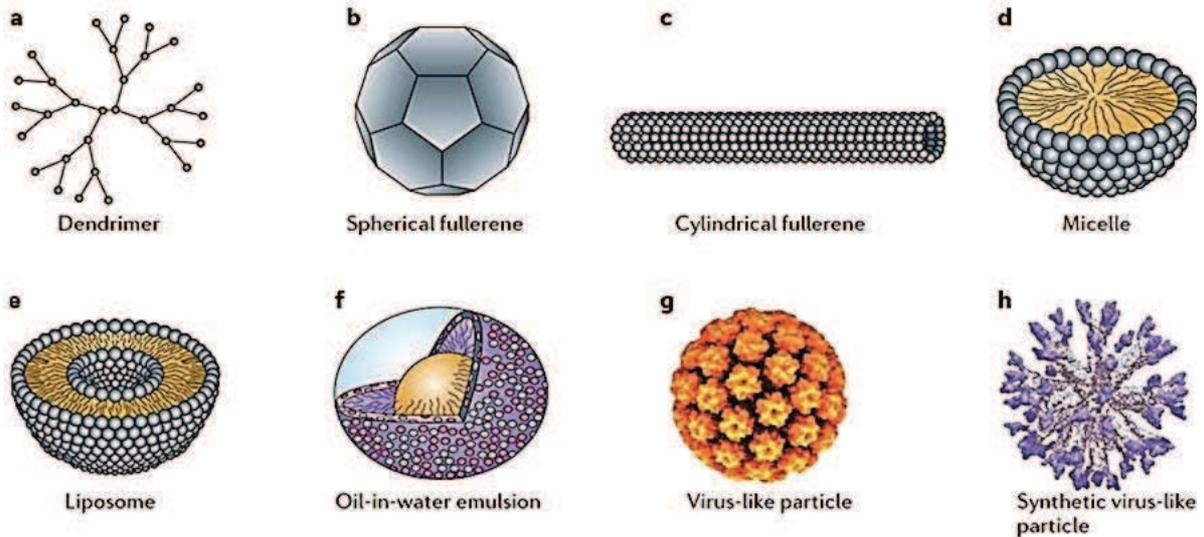


Figure 2 : Exemples de nano-objets⁸.

Il existe différentes familles de nano-objets regroupés suivant leur type (naturel ou synthétique), leur composition (assemblage/particule unique) ou leur synthèse (contrôlée ou non), dont une en particulier, nommée polymère.

1.2 Les polymères

Dans les années 1920, Hermann Staudinger s'intéresse à la famille de composés nommée « macromolécules ». Son premier article intitulé « Uber polymerisation » publié en 1920⁹, décrit une nouvelle manière de constituer des macromolécules comme un assemblage d'entités plus petites. Ce travail continué par Staudinger sur plusieurs années donna naissance à une nouvelle famille de molécules: les polymères¹⁰. En 1953, son travail fut notamment récompensé par le premier prix Nobel dans le domaine des polymères « for his discoveries in the field of macromolecular chemistry »¹¹.

Appelé « Polymer therapeutics »¹², le développement commercial des polymères en médecine commence en 1990 avec le premier polymère approuvé par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux. Ce polymère nommé PEG-ADA est dit de type linéaire et est composé de PolyEthylene Glycol (PEG) conjugué à une protéine. Il est utilisé pour traiter les patients déficients pour une enzyme nommée adénosine désaminase. Ce syndrome est responsable d'une déficience partielle ou totale du système immunitaire¹³.

Ces polymères peuvent comporter une structure linéaire, en peigne ou encore hyperbranchée¹⁴ (Figure 3).

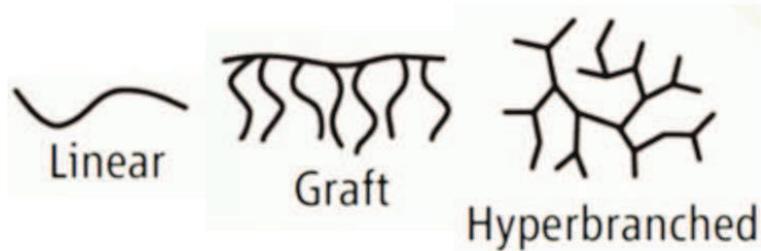


Figure 3 : Structures possibles d'un polymère¹⁴.

Une classe spécifique de polymères appelée dendrimère est apparue dans les années 1970.

I.3 Les dendrimères

I.3.1 L'histoire

Les dendrimères sont une classe de molécules multi-branchées, globulaires ayant une structure en trois dimensions. La source du terme dendrimère vient de sa dénomination grecque où « dendri- » du grec dendros, fait référence à l'arbre et où « -mère » du grec meros correspond à « une partie de ». Le concept de molécule dendritique est décrit par Vögtle en 1978¹⁵. Il s'agit du premier article employant des groupements chimiques de manière répétitive lors d'une synthèse. Cette synthèse a été appelée synthèse en cascade. Les premiers dendrimères en tant que tels ont été synthétisés par deux groupes de chercheurs. Le premier est le groupe de D. Tomalia qui, en 1985, dénomma ses molécules comme « starburst – dendritic macromolecules »¹⁶(figure 4). Le second groupe de G. Newkome les baptisa « arborols »¹⁷.

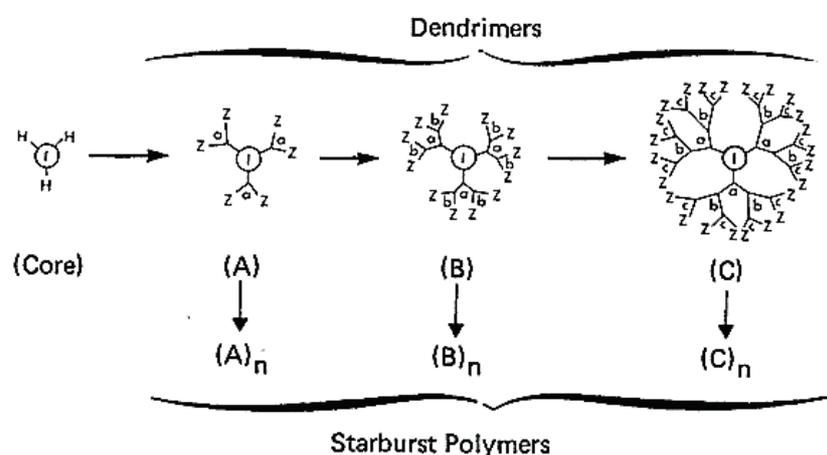


Figure 4 : Synthèse de macromolécules de type starburst-polymer¹⁶.

I.3.2 La structure

Les dendrimères sont composés de 3 parties. De l'intérieur vers l'extérieur, la structure d'un dendrimère est composée d'un cœur, d'une cavité interne où sont présentes les branches et de groupements terminaux en périphérie. Au niveau du cœur, des parties identiques sont branchées, appelées « dendrons ». Leur nombre dépend de la multivalence du cœur utilisé. La jonction entre le cœur et les branches est réalisée par l'intermédiaire de groupements chimiques appelés points de divergence. Des points de divergence sont aussi retrouvés aux extrémités des branches. Ils permettent l'addition itérative d'une seconde série de branches ou le greffage des groupements terminaux. Cette croissance arborescente augmente à chaque cycle le nombre de groupements de surface pouvant être greffés à l'extrémité de la molécule. Le nombre de ramifications successives allant du cœur vers la périphérie de la molécule détermine la génération du dendrimère¹⁸ (Figure 5).

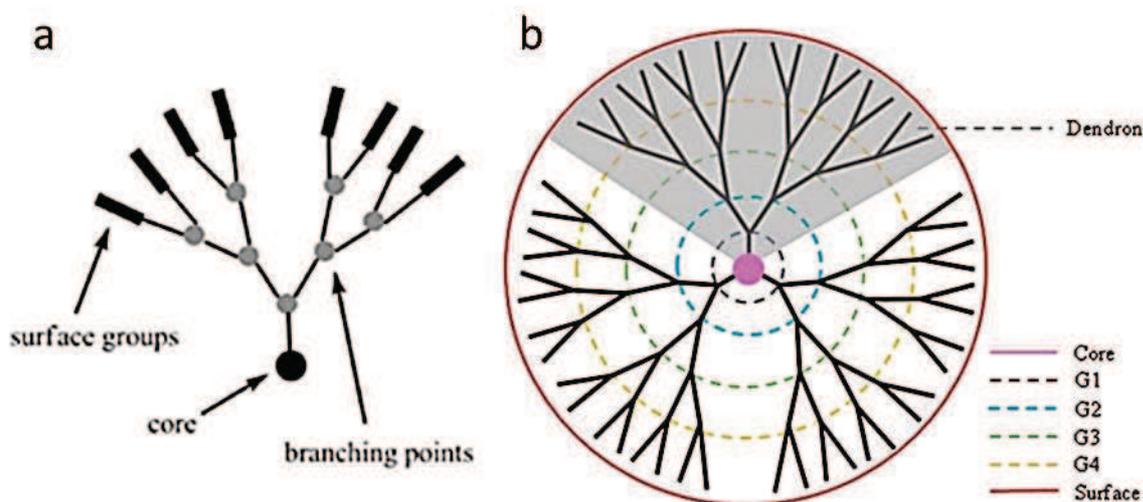


Figure 5 : a) Structure d'un dendron. b) Structure d'un dendrimère de génération 4¹⁸.

I.3.3 La synthèse

La synthèse des dendrimères se fait classiquement suivant deux méthodes.

I.3.3.a Les synthèses de type divergent:

Historiquement, les premières synthèses dite de type divergent ont été développées par D. Tomalia¹⁶ et G. Newkome¹⁷. Elles démarrent à partir d'un cœur multivalent et se caractérisent

par l'ajout d'une ou de plusieurs séries de branches jusqu'à arriver à la génération désirée. Les branches ajoutées comportent d'un côté un groupement réactif et de l'autre 2 à 3 groupements protégés ou non réactifs. Ils seront ensuite activés ou déprotégés afin de continuer la synthèse¹⁹ (**Figure 6**). D'un point de vue pratique, la synthèse divergente nécessite souvent² un excès de réactif ainsi que de nombreuses étapes de purifications.

Afin d'optimiser cette voie, deux méthodes de synthèse divergente ont été imaginées.

Synthèse de type « Lego »

En 2001, l'équipe de A.M. Caminade proposa une stratégie de synthèse appelée « Lego chemistry »²⁰. Cette synthèse se base sur l'utilisation de deux monomères réagissant spontanément, sans passer par des étapes de déprotection ou d'activation. De plus, les groupements réactifs peuvent être placés à différents endroits et en nombre différent sur les monomères, selon la multivalence et la structure finale désirée^{21,22}. Enfin, les seuls produits générés autres que le dendrimère ne sont que de l'H₂O ou du N₂²¹.

Synthèse de type « Click chemistry »

La synthèse de type « click chemistry » se caractérise par l'utilisation de petits groupements réagissant rapidement entre eux²³. En 2005, par réaction itérative entre un groupement azoture et un groupement alkyne, C. Hawker et son équipe réussissent à synthétiser un dendrimère de génération 3²⁴. D'autres groupements réactifs comme les groupements thiole ont aussi prouvé leur efficacité permettant d'obtenir des dendrimères de 4^{ème} génération²⁵.

1.3.3.b Les synthèses de type convergente :

Classique

Une méthode de synthèse imaginée par le groupe de J.M.J. Fréchet, consiste à synthétiser un dendrimère en partant de ses extrémités²⁶. Théoriquement, il s'agit de synthétiser les différentes parties du dendrimère nommées dendrons et de les brancher au niveau du cœur. Cependant, la difficulté d'attacher simultanément ces dendrons de grande taille sur le cœur rend la synthèse de dendrimères de génération importante difficile. Le nombre de sites réactifs plus faible dans ce type de synthèse, augmente la pureté de ces composés²⁷. Il est à

noter qu'il est possible d'utiliser les groupements actifs alkyl/alkyne lors de synthèses convergentes²⁸ (**Figure 6**).

Double stage

Une seconde stratégie de synthèse convergente appelée « double stage » décrite pour la première fois par J.M.J. Fréchet, permet la synthèse de dendrimères de plus grande génération. Il s'agit tout d'abord de réaliser la synthèse de macromonomères de manière convergente. Ils seront ensuite réunis dans une dernière étape de type divergente²⁹.

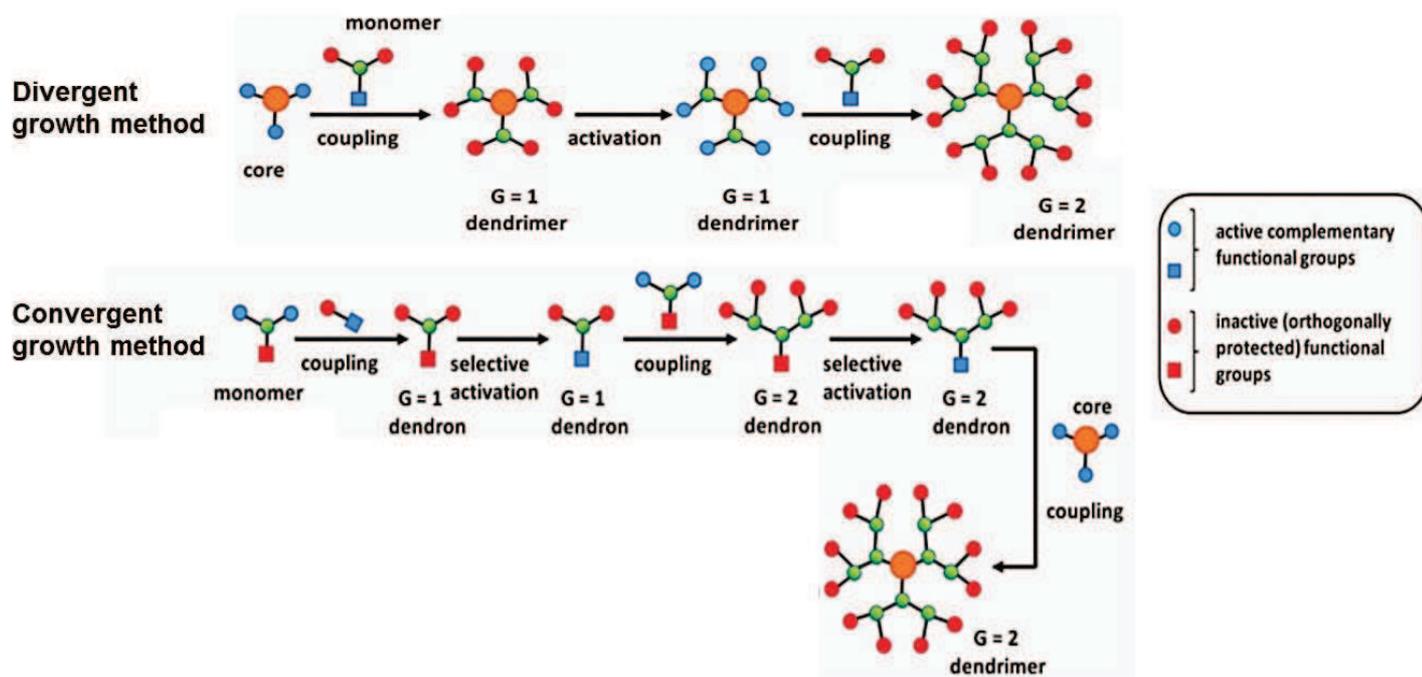


Figure 6 : Méthodes de synthèse dites divergente et convergente³⁰.

1.3.3.c La synthèse de type « oignon »

Un troisième type de synthèse est utilisé depuis quelques années par R. Roy³¹ (**Figure 7**). De manière similaire à la synthèse divergente, des branches sont ajoutées au niveau du cœur. Cependant, celles-ci sont de composition chimique différente à chaque génération. Ce type de synthèse a été nommé synthèse en oignon ou « onion-peel » en référence à cette succession de couches différentes. Il est donc possible de choisir à chaque génération, la branche comportant les paramètres de valence ou de flexibilité désirés. La voie convergente a aussi été utilisée lors de la synthèse de glycodendrimères³². Récemment, des dendrimères

phosphorés de générations 0 à 3 ont été synthétisés pouvant comporter jusqu'à 7 groupements phosphorés différents dans leur structure³³.

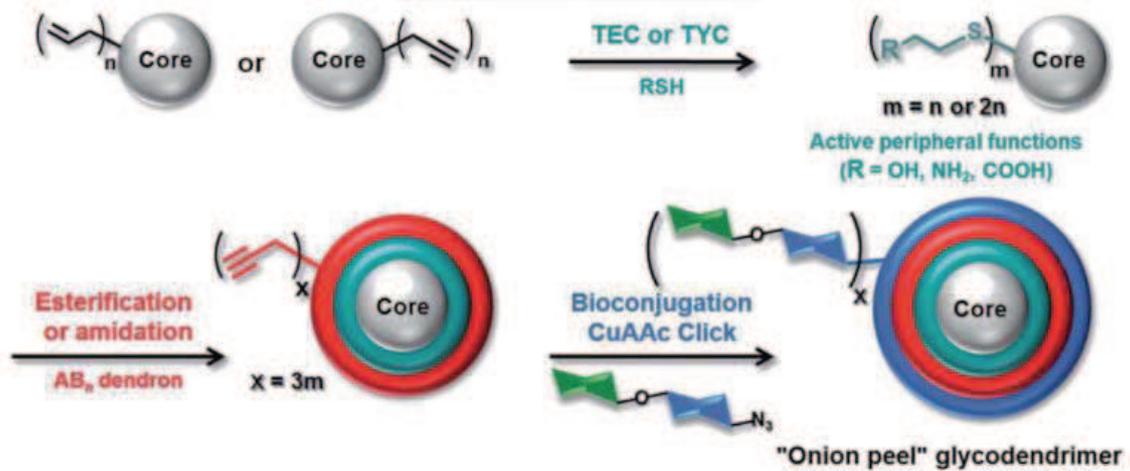


Figure 7 : Synthèse divergente de type « oignon »³¹. TEC : Couplage thiolène. TYC : Couplage thiol-yne.

Les dendrimères sont des molécules qui connaissent un développement rapide. L'intérêt pour cette famille vient de leur structure et de leur synthèse bien contrôlées. Il est possible de synthétiser des molécules bien définies avec des caractéristiques désirées dont certaines peuvent être intéressantes pour des applications notamment biologiques. Caractériser ces paramètres moléculaires est l'étape suivante à leur synthèse pour utiliser au mieux ces molécules nanométriques.

II-Caractéristiques des dendrimères

II.1 Propriétés physico-chimiques et méthodes d'analyses

Suivant le type de synthèse et avec la diversité des groupements chimiques utilisés aux différents niveaux de la molécule (cœur, branches, fonctions terminales), il existe à ce jour un très grand nombre de dendrimères différents. Toutes ces molécules ont des propriétés physiques et chimiques dépendantes de leur structure, qu'il a fallu mesurer, analyser et comprendre.

II.1.1 La composition chimique

Des dendrimères aux compositions chimiques différentes sont utilisés dans le domaine de la biologie. En tenant compte de leur composition chimique interne, il est possible de les classer en plusieurs familles³⁴ (**Figure 8**).

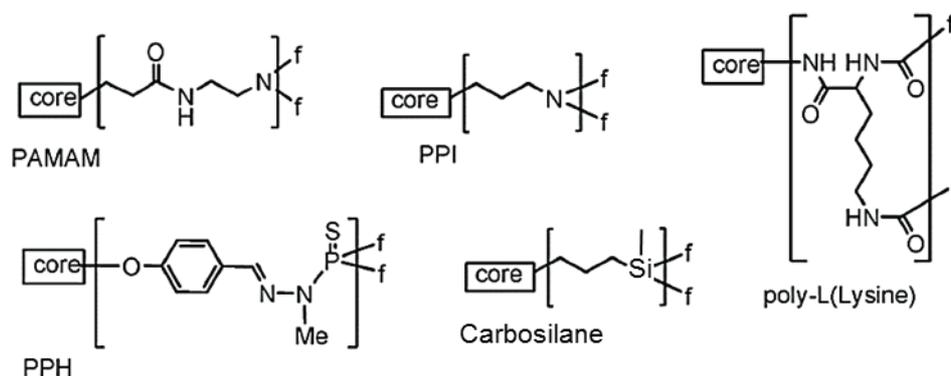


Figure 8 : Exemples de branches utilisées en routine pour la synthèse de dendrimères PAMAM, PPI, PLL ou Phosphorés³⁴.

La famille de dendrimères la plus utilisée en biologie comporte une structure aminée. Ces dendrimères sont composés de groupements Poly(AMidoAMine) et sont couramment appelés des **PAMAMs**. Ils sont généralement synthétisés à partir d'un cœur éthylènediamine et comportent des branches issues du méthyl-acrylate et d'éthylènediamine³⁵. La plupart de ces dendrimères ont des groupements de surface carboxylate ou amine. Ils sont principalement synthétisés par synthèse divergente et peuvent atteindre la 10^{ème} génération³⁶.

D'autres dendrimères appelés **PPI** sont basés sur un cœur de diaminobutane et de branches de Poly(Propylène Imine)³⁷.

Les dendrimères **phosphorés** quant à eux comportent des atomes de phosphore situés aussi bien au niveau du cœur que des branches, voire même au niveau de leurs fonctions terminales³⁸.

Les dendrimères de type **carbosilane** comprennent un cœur composé de groupements silanes et des groupements ammonium ou amine à leur périphérie³⁹.

La famille des **Poly-L-(lysine) (PLL)** est comme leur nom l'indique constituée en grande partie de lysines⁴⁰.

Enfin, plus récemment des dendrimères basés autour de groupements **polyesters**, de **polypeptides** ou de **triazine** ont vu le jour⁴¹.

Chaque étape de leur synthèse est suivie en routine par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)⁴². D'autres techniques permettent aussi de caractériser les dendrimères comme la spectrométrie de masse. L'ajout de chromophores peut être aussi confirmé par analyse du spectre d'absorption de la molécule⁴³.

II.1.2 La multivalence

L'ajout des fonctions terminales termine la synthèse des dendrimères construits par la méthode divergente. Il est possible de suivre cette réaction par RMN mais aussi par spectroscopie Infra-Rouge (IR)⁴². Enormément de groupements chimiques différents ont été utilisés comme fonctions terminales. Ils sont responsables de la plupart des paramètres physico-chimiques de la molécule. Ces fonctions terminales forment à l'extérieur de la molécule une gaine de groupements fonctionnels interagissant avec l'environnement qui les entoure.

Les dendrimères sont des entités multivalentes. Ils offrent une possibilité de multiprésentation de monomères Y qui permet d'obtenir une affinité supérieure à la somme des affinités de chacun des monomères. Sur le principe de « l'union fait la force », cette nouvelle notion d'affinité pour cette famille de ligands multivalents sur leurs récepteurs est appelée avidité⁴⁴.

Les dendrimères peuvent alors se fixer sur des types de récepteurs inadaptés pour des monomères⁴⁵ (**Figure 9**).

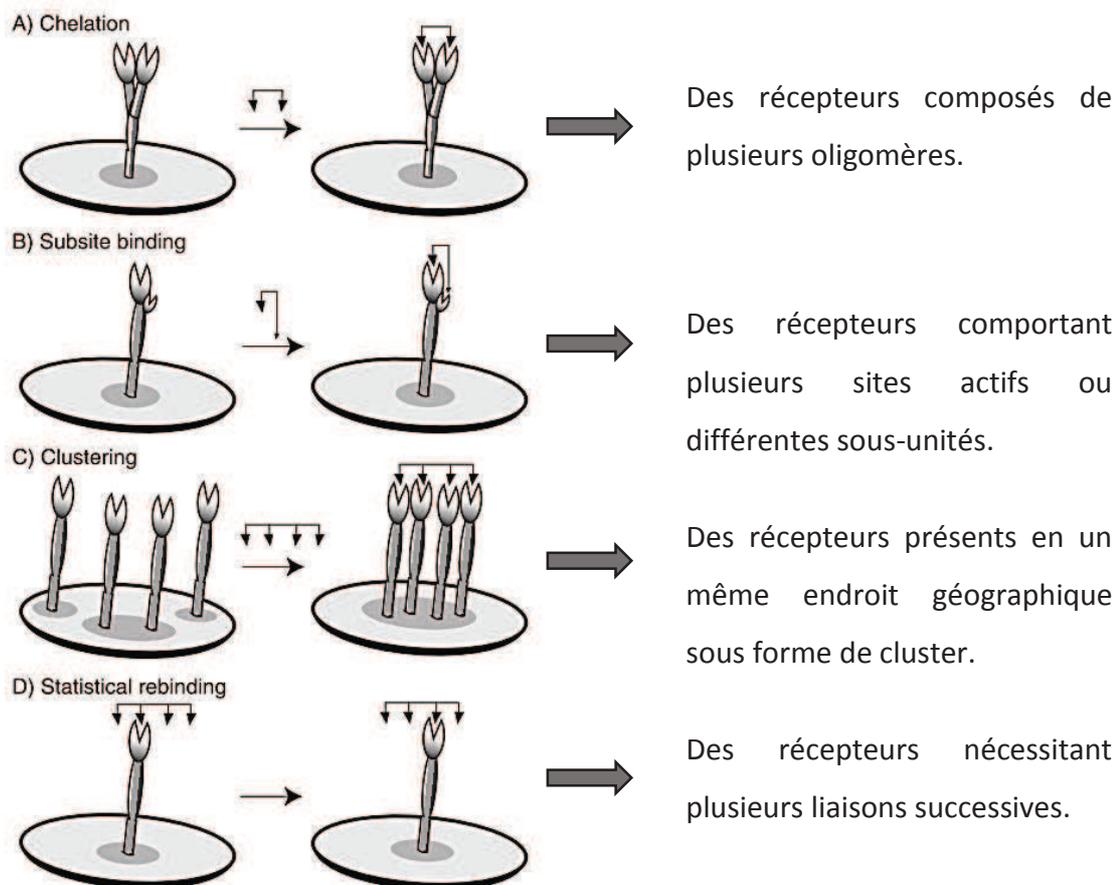


Figure 9 : Mécanismes de liaison possible d'un ligand multivalent sur un récepteur ⁴⁵.

II.1.3 Le coefficient de partition

Une propriété importante des dendrimères est la notion d'hydrophobicité/hydrophilicité. Cette notion permet d'appréhender la solubilité d'une molécule. Cette donnée peut se mesurer en utilisant une expérience dite de Log de P⁴⁶. La molécule va être mise en solution dans un mélange d'eau et d'octanol. L'affinité de la molécule pour l'un ou l'autre solvant déterminera son hydrophobicité. Suivant les groupements présents en surface, il est alors possible de rendre hydrosoluble une cavité hydrophobe permettant l'encapsulation de molécules afin d'augmenter leur solubilité dans les solvants organiques⁴⁷.

II.1.4 La charge

La charge d'un dendrimère est principalement due à ses fonctions périphériques. En solution, la cage de solvatation détermine si la molécule a une charge globale positive, négative ou neutre.

Cette charge globale peut être déterminée par la mesure de son potentiel zêta. Ce potentiel correspond à la charge globale des molécules en solution. En fait, une double couche ionique existe autour de chaque particule. Une première couche appelée couche de Stern, correspond aux ions fortement liés aux fonctions périphériques chargées. Une seconde enveloppe située à l'extérieur de la couche de Stern comprend des ions moins fortement rattachés. La valeur de charge présente au niveau de cette seconde couche correspond au potentiel zêta (**Figure 10**).

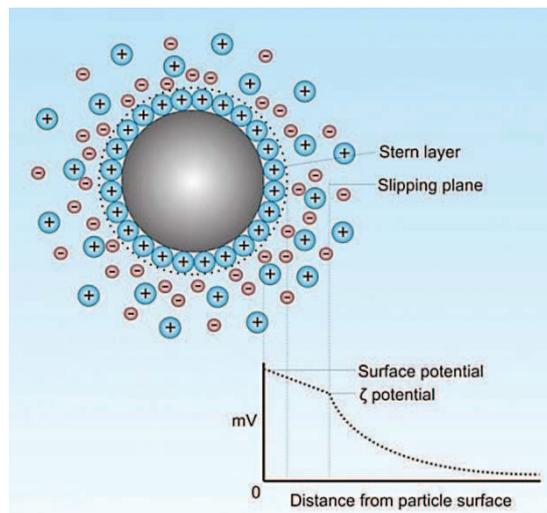


Figure 10 : Couches successives d'ions entourant une molécule et potentiel zêta (ζ).

<http://www.coriolis-pharma.com/contract-analytical-services/zeta-potential/>

Techniquement, une dispersion de l'échantillon va être introduite au sein de l'analyseur. Il s'agit d'une cellule comprenant deux électrodes situées aux deux extrémités de la cuve. L'échantillon va être soumis à un champ électrique. Les particules vont alors migrer vers l'électrode comportant une charge opposée à leur potentiel. Cette vitesse de migration appelée mobilité va être mesurée et transformée par un modèle d'équation en potentiel de charge. La mobilité étant liée à la charge globale des particules, une moyenne des potentiels zêta des molécules en solution est alors calculée⁴⁸.

Suivant la charge du dendrimère, ses interactions avec d'autres composants comme les membranes cellulaires, l'ADN ou les protéines vont être différentes. Des études montrent que leur effet peut dépendre de la charge de la molécule^{49,50}. En faisant varier la charge globale d'un dendrimère, des différences de pénétration tissulaire ont aussi été observées⁵¹.

Inversement, la mesure de la charge du dendrimère permet aussi de connaître la composition de la couche externe de la molécule. Certaines études utilisent des titrations via le potentiel de charge pour déterminer le nombre d'amines primaires présents en surface du dendrimère⁵².

II.1.5 La taille et le poids moléculaire

Le bon contrôle de la synthèse chimique des dendrimères permet de prévoir leur taille. La taille d'un dendrimère varie de 2 à 3 nm à plus de 10 nm, avec un ratio de 1 nm ajouté à chaque génération de dendrimère PAMAM⁵³ (**Figure 11**).

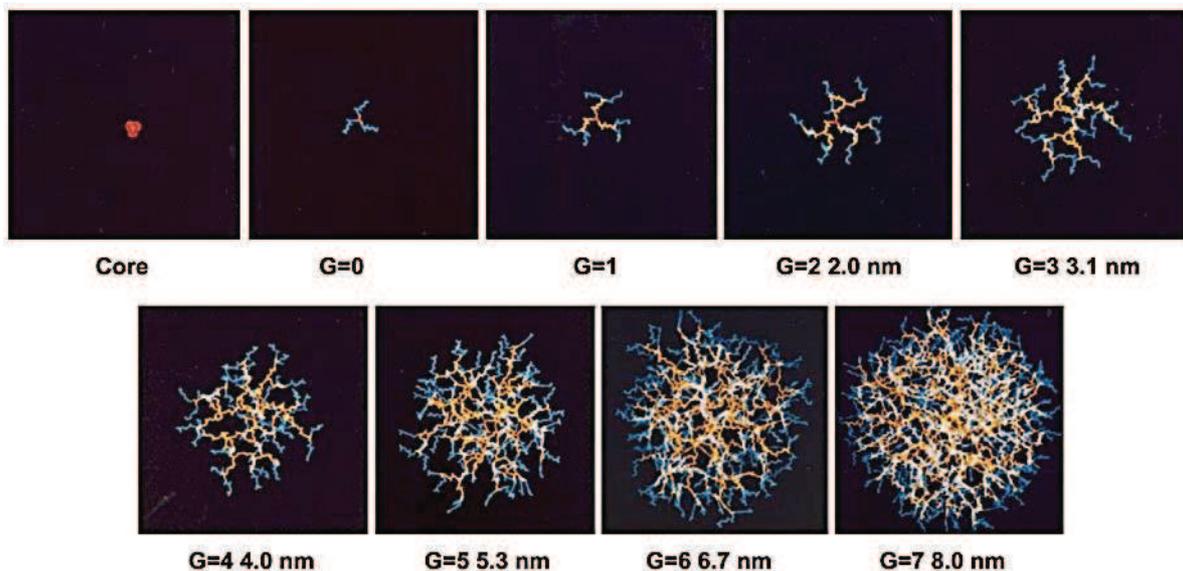


Figure 11 : Relation entre génération et taille d'un dendrimère PAMAM⁵³.

Il est également admis que la masse moléculaire double pratiquement à chaque génération selon le type de branches utilisé⁵⁴.

La possibilité pour un solvant de pénétrer au sein de la molécule joue un rôle important dans la détermination de la taille du dendrimère en solution⁵⁵. Il est aussi possible de connaître la

dispersité d'un échantillon de molécules en solution, à savoir si les dendrimères sont présents en particules uniques ou sous forme agrégée.

Les techniques utilisées en pratique sont la diffusion dynamique de la lumière (DLS), la RMN, ou encore les techniques de diffraction de la lumière comme le SAXS (Small Angle X-rays Scattering, diffusion des rayons X aux petits angles) ou le SANS (Small Angle Neutron Scattering)⁴².

La DLS est la technique la plus utilisée en routine. La taille d'un dendrimère en solution représente le diamètre moyen de toutes les molécules diffusant au sein de l'échantillon analysé. Les dendrimères, comme toute molécule en solution, se déplacent selon un mouvement aléatoire appelé mouvement Brownien. Cette vitesse est utilisée pour déterminer leur taille. La relation entre taille et vitesse des particules est donnée par la relation de Stokes-Einstein. Plus la molécule est de taille importante, plus son mouvement sera lent. Cette équation permet d'obtenir une moyenne des diamètres hydrodynamiques des molécules en solution (**Figure 12**)⁵⁶.

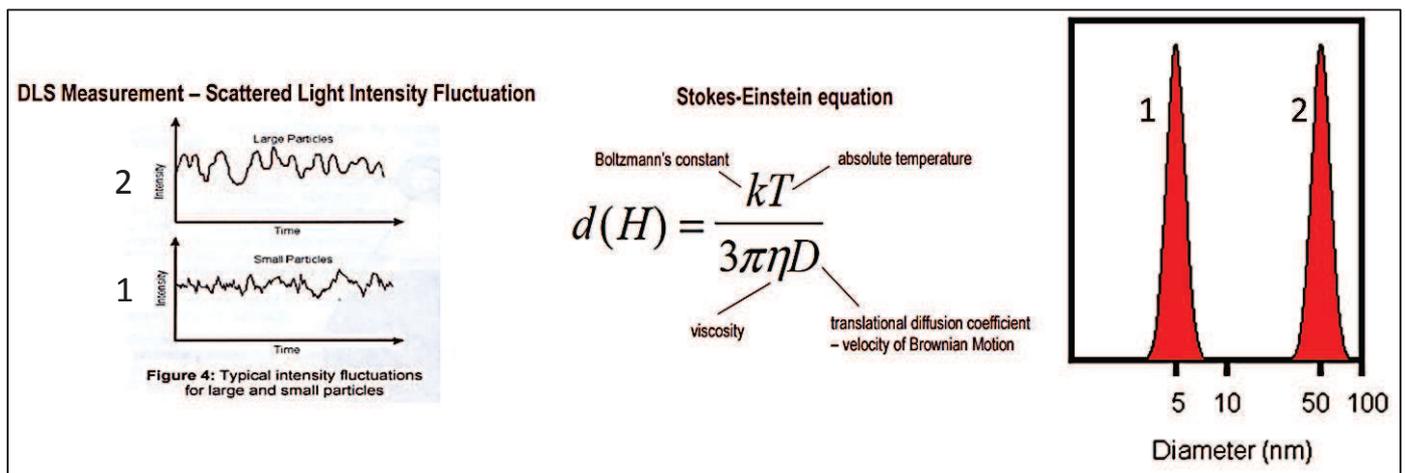


Figure 12 : Transformation mathématique des mouvements de deux molécules de petite (1) et grande (2) taille en solution, via l'équation de Stokes-Einstein⁵⁷.

II.1.6 La structure 3D et la modélisation

Avec le développement des outils informatiques, il est maintenant possible de prévoir la conformation en solution d'un dendrimère ou encore d'analyser ses interactions avec d'autres composants comme l'ADN/ARN ou des médicaments⁵⁸. La première étape est de modéliser la molécule dans un liquide physiologique comme l'eau ou le PBS. La conformation 3D en solution d'un dendrimère dépend de la concentration en sel influant sur sa charge⁵⁹.

Suivant le type de structure interne, les analyses 3D donnent des repliements différents pour des dendrimères de même génération⁵⁸ (**Figure 13**).

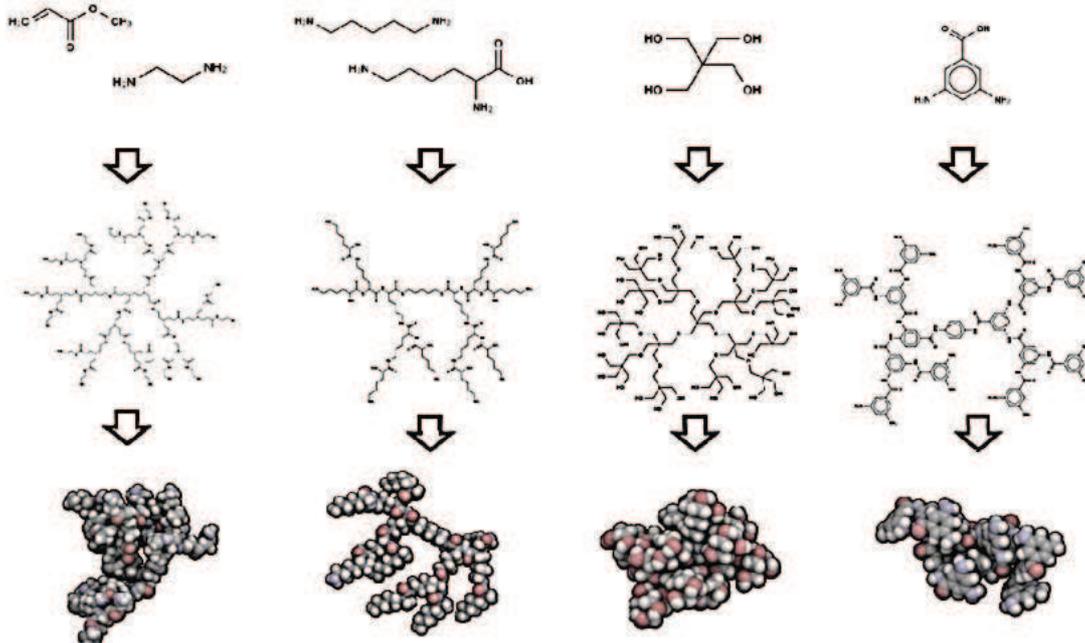


Figure 13 : Structures in silico obtenues de dendrimères de génération 2, comportant des cœurs et des branches différents⁵⁸.

La complexation d'un ARN et d'un dendrimère de type PAMAM a pu être analysée en faisant varier des paramètres comme le pH ou la génération. Les auteurs ont pu démontrer une plus grande affinité entre dendrimères et ARNs à des pH acides, simulant ceux retrouvés dans les endosomes⁶⁰. L'interaction de médicaments comme la famotidine et l'indométhacine avec un dendrimère de génération 5 de type PPI a pu être observée. La modélisation du complexe dendrimère/médicament a montré que la valeur du pH a une influence sur sa stabilité et régule par conséquent la solubilité et le relargage du médicament⁶¹.

II.2 Paramètres biologiques

Les propriétés physico-chimiques des dendrimères jouent un rôle important dans leur application à la biologie. Ils régissent une grande partie des effets directs ou indirects de la molécule. D'un point de vue biologique, différents paramètres sont aussi à analyser pour permettre une utilisation appropriée du dendrimère désiré.

II.2.1 La biodistribution

Pour développer cliniquement une nanoparticule, des tests de biodistribution sont demandés. La molécule peut être couplée à un traceur fluorescent ou radioactif. Ceci permet de suivre le devenir du dendrimère, de connaître sa distribution tissulaire et son temps de rétention avant élimination ou dégradation. Cette notion est appelée demi-vie. Différents types de dendrimères ont été couplés à un isotope radioactif ^{125}I ⁶². Leur suivi par microscopie est utilisé pour observer leur présence dans différents organes chez la souris⁶³.

Les principaux paramètres physico-chimiques à prendre en compte sont la taille (génération) et le type de fonctions terminales induisant la charge globale de la molécule. Il est d'ailleurs bien décrit que la biodistribution des entités nanométriques est directement liée à leur taille. L'effet anti-tumoral de médicaments transportés par des micelles de différentes tailles a été observé. Cette étude a montré une facilité pour les micelles de plus petites tailles à se rendre au sein du tissu tumorale⁶⁴. Utiliser des nanoobjets de petite taille permet donc d'offrir certains avantages en termes de biodistribution.

La taille joue également un rôle important dans l'élimination des dendrimères. Plus le dendrimère a une taille importante, plus son élimination sera lente. Plus le poids moléculaire augmente, plus ses temps de rétention dans les tissus ou dans le système circulatoire seront importants⁶⁵. On retrouve dans la littérature des exemples de molécules de première et de deuxième génération synthétisées dans le but de traverser la barrière épithéliale. De manière remarquable dans cet exemple, la pénétration tissulaire est proportionnelle à leur Log de P⁶⁶. L'hydrophobicité de ces molécules joue aussi un rôle important dans leur élimination par l'organisme. Dans une étude utilisant deux dendrimères PAMAM de structure proche, le dendrimère le plus hydrophobe montre une prédisposition à s'accumuler dans le foie⁶⁷.

Certains dendrimères sont capables d'atteindre des organes difficilement accessibles du fait de la difficulté de diffuser à travers leurs barrières endothéliales. Le premier dendrimère pouvant atteindre le placenta a été décrit en 2011⁶⁸. Les analyses *in vivo* montrent une très faible accumulation des dendrimères au niveau du cerveau⁶⁹. Une étude utilisant un

dendrimère de type PAMAM administré directement au cerveau démontre l'importance du lieu d'administration⁷⁰ (**Figure 14**).

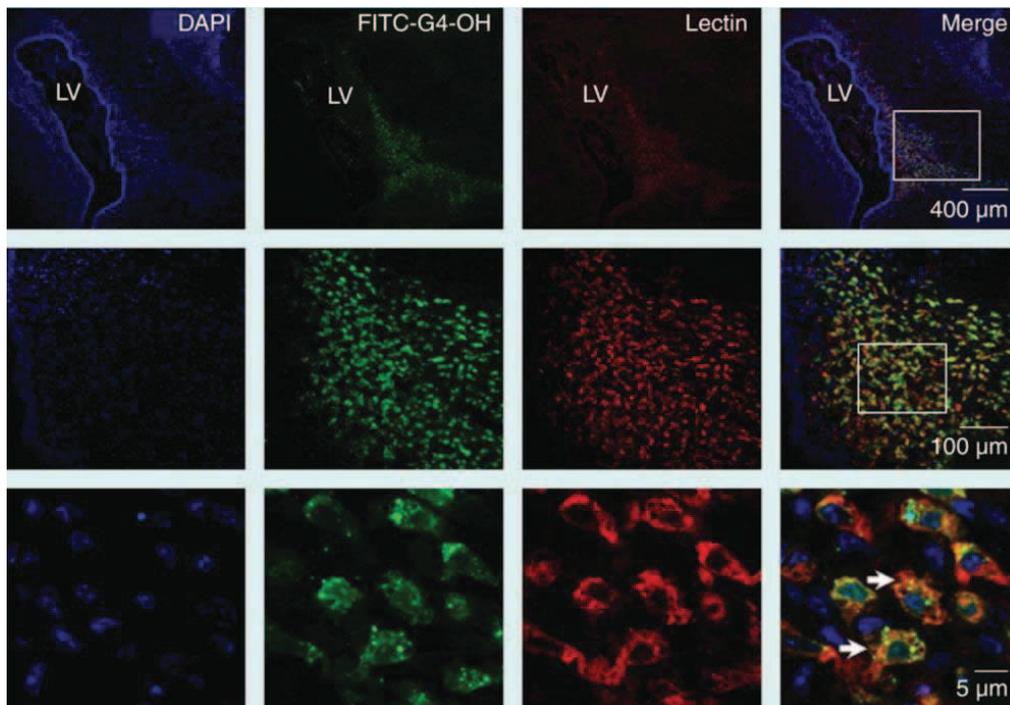


Figure 14 : Colocalisation d'un dendrimère PAMAM de génération 4 (FITC-G4-OH) au niveau des cellules microgliales du cerveau, après injection sous-arachnoïdienne⁷⁰.

Evaluer la répartition d'une molécule dans l'organisme est donc intéressant sur le plan thérapeutique. Cependant, afin d'éviter des effets secondaires potentiels, des tests *in vitro* sont réalisés pour étudier la toxicité des molécules.

II.2.2 La toxicité

Les dendrimères sont de plus en plus utilisés dans des applications biologiques. Leur utilisation chez l'humain a nécessité l'élaboration de tests permettant d'analyser la cytotoxicité de ces molécules. Ces expériences de cytotoxicité peuvent être réalisées sur différents types cellulaires ou sur des organismes entiers.

Classiquement ces tests démarrent par des expériences *in vitro* qui permettent d'obtenir des bases rationnelles afin de passer aux études *in vivo*. Ces tests *in vitro* comprennent l'étude de la viabilité des cellules. Par cytométrie en flux, il est possible de déterminer si un dendrimère induit l'apoptose, la nécrose ou encore un dérèglement du cycle cellulaire⁷¹. Les cellules utilisées sont soit des lignées macrophagiques, lymphocytaires, soit des cellules humaines

purifiées comme des PBMCs (« Peripheral Blood Mononuclear Cell »). Certaines molécules peuvent induire de la toxicité, des réactions anti-inflammatoires ou pro-inflammatoires. Les dendrimères induisant des réactions de types pro-inflammatoires peuvent également conduire à une mort cellulaire.

Ces réponses cellulaires sont dépendantes des caractéristiques physico-chimiques des dendrimères et sont analysées par des tests bien décrits comme ceux analysant la production de réactifs oxygénés (ROS)^{72,73}. La concentration, la génération, les groupements terminaux ainsi que le solvant dans lequel le dendrimère est dissous sont testés⁷⁴. La charge a un effet sur la toxicité *in vivo* de certaines molécules, où les dendrimères cationiques induisent une toxicité plus importante⁷⁵. Récemment, l'identification et la quantification des productions cytokiniques, messagers des réponses intercellulaires émergent comme de bons biomarqueurs d'immunotoxicité⁷⁶.

La toxicité des dendrimères PAMAM a été observée sur des cellules de mammifères démontrant une toxicité de type génération-dépendante⁷⁷. Sur des lignées de macrophages murins (J774.1), des dendrimères PAMAM de grandes générations 4,5 et 6 ont démontré une production de ROS et de cytokines pro-inflammatoires MIP-2, IL-6 et TNF- α ^{78,79}. En comparaison, les dendrimères de type polyester ont aussi été testés et les auteurs ont été agréablement surpris de ne pas observer de production de cytokines inflammatoires par des cellules macrophagiques⁸⁰. Ceci démontre que certaines molécules ont une meilleure biocompatibilité. Partant de ce principe, certains dendrimères sont alors conçus afin de rechercher la structure et/ou formulation induisant un minimum de cytotoxicité.

Un dendrimère PAMAM de génération 4 induit une cytotoxicité (nécrose) au niveau de cellules microgliales *in vitro*. Ce dendrimère a ensuite été fonctionnalisé avec des chaînes lipidiques en C₁₂, changeant sa taille de 3 nm à 3.8 nm et sa charge de +6.06 mV à +0.78 mV. A dose égale, le dendrimère comportant les chaînes lipidiques n'induit plus de cytotoxicité sur les cellules endothéliales et microgliales *in vitro*. Il conserve la propriété de diffuser à travers la barrière hémato-encéphalique et de cibler la microglie. Ce dendrimère induit cependant une surexpression de marqueurs pro-inflammatoires chez ces cellules (**Figure 15**). Il s'agit du premier exemple de dendrimère comportant une toxicité *in vivo* traduite ici par une augmentation de marqueurs inflammatoires⁸¹.

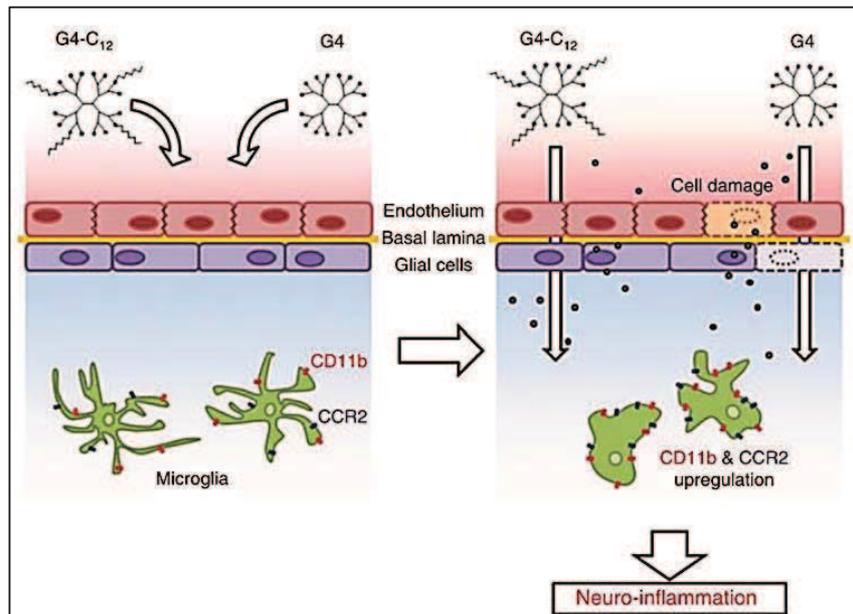


Figure 15 : Activation des cellules microgliales par les dendrimères G4 et G4-C₁₂⁸¹.

De manière générale, la cytotoxicité des dendrimères observée *in vitro* ne permet pas de passer sur un modèle animal. L'utilisation de modèles primates est également possible dans l'idée de se rapprocher au mieux des effets possibles sur l'humain⁸².

II.2.3 Les cibles cellulaires

Pour les tests *in vivo*, le mode d'administration des dendrimères est majoritairement réalisé en intraveineux. Les molécules sont donc directement en contact avec les cellules sanguines. Certains dendrimères comportent des effets sur ces cellules qui peuvent se retrouver dans les tissus.

Globules rouges : Il s'agit des cellules les plus abondantes retrouvées dans le sang. Elles ont comme activité principale de délivrer l'oxygène et de récupérer le CO₂ de tous les organes et de manière plus générale, à tout le corps. Elles peuvent circuler dans le corps pendant 3 mois avant d'être renouvelées⁸³. Leur capacité à atteindre toutes les parties du corps est attribuée à leurs propriétés physiques. De forme biconcave et flexible, elles sont capables de passer dans les plus petits capillaires du corps en se déformant. Un marqueur cellulaire appelé CD47 leur permet d'être reconnu par l'ensemble de l'organisme⁸⁴. Pour ces raisons, les globules rouges peuvent être utilisés afin de délivrer des médicaments de manière ubiquitaire dans tout l'organisme^{85,86}.

Les effets des dendrimères sur ces cellules peuvent être étudiés. Trois paramètres importants sont observés : leur morphologie, leur coagulation ainsi que leur éclatement appelé hémolyse. Différentes équipes utilisent ces cellules afin de réaliser des tests de biocompatibilité^{87,88}.

Monocytes/macrophages : Les monocytes sont des globules blancs présents dans le sang et sont des précurseurs de macrophages⁸⁹. Un pool de monocytes est situé au niveau de la rate. Ils ont ensuite la possibilité de circuler dans le sang⁹⁰. Lorsqu'ils sortent du système circulatoire en traversant la barrière endothéliale, ils rentrent dans les tissus, se différenciant en macrophages⁹¹. Ces deux procédés permettent aux macrophages de réaliser naturellement un repeuplement constant de ces cellules dans les différents tissus. Lors de pathologies ou d'agressions extérieures, les monocytes/macrophages font partie des premières cellules à réagir. Ils appartiennent à la réponse innée de l'organisme. Ils sont capables de traverser toutes les barrières endothéliales et de se rendre rapidement à l'endroit de l'infection ou de l'inflammation⁹². Les macrophages comprennent un grand panel de récepteurs permettant la phagocytose de pathogènes et de débris cellulaires⁹³. Ces cellules sont aussi des médiateurs inflammatoires pouvant s'activer. Leur activation peut suivre deux voies : l'une pro-inflammatoire et la seconde anti-inflammatoire appelées respectivement dans la littérature états M1 et M2^{94,95}.

Leur capacité phagocytaire, de réponse immunitaire et d'adaptabilité environnementale en ont fait des cibles privilégiées pour l'effet de nombreuses nanoparticules dont les dendrimères⁹⁶. Cibler cette population cellulaire par des dendrimères entraîne des analyses cytotoxiques, d'internalisation et d'activation des macrophages⁹⁷.

Lymphocytes : Les lymphocytes T, B et Natural Killers (NKs) sont les globules blancs sanguins appartenant à l'immunité adaptative. Ces cellules ont été divisées en familles, en fonction de leur rôle. Au sein de la famille des lymphocytes T, on retrouve les lymphocytes T cytotoxiques responsables de la destruction des cellules infectées⁹⁸. Les lymphocytes T dits helper permettent la maturation des lymphocytes B et l'activation des lymphocytes T cytotoxiques⁹⁹. Enfin, les lymphocytes T dits mémoires, résidents des tissus permettent une réponse adaptative rapide en retenant les motifs antigéniques précédemment rencontrés lors d'une infection¹⁰⁰. Les lymphocytes B quant à eux, sont les centres de production des anticorps, protéines luttant contre les pathogènes¹⁰¹.

Cibler l'un de ces types cellulaires apparaît nécessaire pour combattre des pathologies telles que les cancers. Ces traitements appelés immunothérapies peuvent utiliser des nanocomposés avec par exemple la synthèse de molécules capables d'induire l'activation des lymphocytes T¹⁰². Certains dendrimères ont montré des effets sur ces types cellulaires, inhibant la prolifération de lymphocytes T CD4 ou inhibant la différenciation des lymphocytes T CD8^{103,104}. Des dendrimères sont aussi capables d'induire la production d'anticorps par les lymphocytes B via la stimulation des lymphocytes NKs^{105,106}.

Cellules dendritiques et plaquettes : D'autres types cellulaires sont présents dans le système circulatoire mais en nombre moins important. Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes induisant l'activation des lymphocytes T. Ces cellules sont ciblées lors de l'élaboration de vaccins principalement car elles possèdent une capacité mémoire induisant une forte réponse immunitaire¹⁰⁷. Certains dendrimères ont été imaginés afin de délivrer spécifiquement des antigènes aux cellules dendritiques¹⁰⁸. D'autres permettent de combattre l'infection par des virus comme le VIH¹⁰⁹.

Les plaquettes présentes en grande quantité dans le sang, ne sont pas considérées comme des cellules. Les plaquettes jouent tout de même un rôle dans la réparation tissulaire, principalement des vaisseaux sanguins. En thérapie, elles peuvent permettre une meilleure cicatrisation des tendons, des os, des muscles¹¹⁰. Des dendrimères ciblent les plaquettes, inhibant leur capacité à s'agréger, diminuant ainsi les risques de formation de caillot sanguin appelée thrombose¹¹¹.

L'utilisation des dendrimères sur des systèmes biologiques passe obligatoirement par un contact entre une cellule et la molécule synthétique. Ce contact peut avoir lieu de différentes manières et comporte dans tous les cas un nombre important de paramètres. Définir les interactions entre un dendrimère et un type cellulaire est donc primordial dans la compréhension de son effet désiré mais peut être aussi une bonne indication sur d'effets néfastes potentiels.

III-Interactions dendrimères/cellules

Pour atteindre leur cible, les dendrimères doivent franchir différents obstacles dont plusieurs barrières biologiques. Les premières barrières rencontrées varient selon le type d'administration (inhalation, oral, intraveineuse)¹¹². Les effets *in vivo* dépendent directement de la capacité pour chacune des molécules à les traverser. La taille joue un rôle important lorsque ces particules sont injectées en intraveineux par exemple. Les particules de moins de 10 nm de diamètre vont de manière passive traverser rapidement l'endothélium ou être éliminées par le rein. Les particules de 10 à 70 nm peuvent encore diffuser dans de très petits capillaires et atteindre certains organes. Au-dessus de 70 nm, les nano-objets restent plus longtemps dans le système circulatoire, sont phagocytés ou passent par la rate avant d'être éliminés^{113,114}.

Les dendrimères sont des nanoparticules de taille généralement inférieure à 10 nm. Ils traversent donc rapidement les barrières biologiques, exception faite pour la barrière hémato-encéphalique, plus difficile à traverser.

Les dendrimères peuvent ensuite interagir passivement avec les membranes des cellules ou être reconnus par certains récepteurs. Différentes techniques ont été élaborées pour analyser ces interactions entre les cellules et les dendrimères.

III.1 Types d'interactions et techniques d'analyse

III.1.1 Adsorption

III.1.1.a Principes

La surface cellulaire est chargée négativement avec la présence de résidus phosphates, carboxylates ou encore d'acides sialiques¹¹⁵. Cette propriété permet aux dendrimères cationiques d'être attirés par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques. Une fois le contact établi, d'autres forces interviennent comme la force de van Der Waals ou les liaisons hydrogènes. La nature hydrophobe et hydrophile des deux entités permet parfois

l'incorporation du dendrimère au sein de la membrane composée en grande partie de phospholipides¹¹⁶ (**Figure 16**).

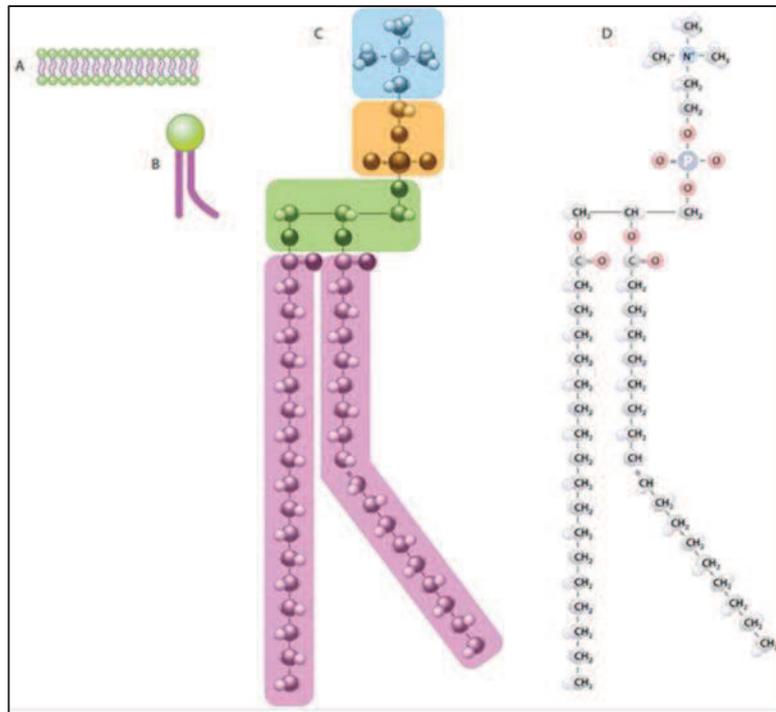


Figure 16 : A à D. De la bicouche lipidique à la structure du glycérophospholipide la composant. Image : Nature éducation

La composition lipidique des membranes des cellules circulantes est très complexe. Des analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées sur les membranes de différentes cellules immunitaires. Il a été possible de connaître le pourcentage de chaque type de phospholipide de cellules composantes les PBMCs. Les auteurs ont observé par exemple une prépondérance de phosphatidylcholines (PC), présents jusqu'à 40% au niveau des monocytes humains¹¹⁷. Pour évaluer la capacité d'un dendrimère à s'insérer de manière passive au sein d'une membrane, des expériences ont été mises au point. L'expérience utilisée en routine est appelée DSC pour Differential Scanning Calorimetry¹¹⁸.

La DSC est un bon moyen d'étude pour analyser l'interaction de composés bioactifs avec des modèles se rapprochant le plus possible des membranes biologiques. Ces modèles de membrane cellulaire simplifiée appelés MLVs pour Multi Lamellar Vesicles, sont composés uniquement de lipides, à la différence des membranes cellulaires. Le lipide le plus couramment utilisé pour la formation de ces bicouches lipidiques formant les liposomes est le 1,2-DiPalmitoyl-sn-glycero-3-PhosphoCholine ou DPPC. Lorsque l'on augmente la température du milieu de ces assemblages lipidiques, une réorganisation spatiale des lipides

au sein de la bicouche s'opère et est appelée transition de phase. Cette transition de phase est spécifique du lipide utilisé. L'analyse de la transition de phase se fait par la mesure de l'énergie nécessaire à cette transition et de la température qu'il faut atteindre pour qu'elle survienne (ΔH et T_m respectivement)¹¹⁹ (**Figure 17**). Ce sont de bons paramètres permettant d'évaluer l'insertion de molécules au sein des bicouches lipidiques.

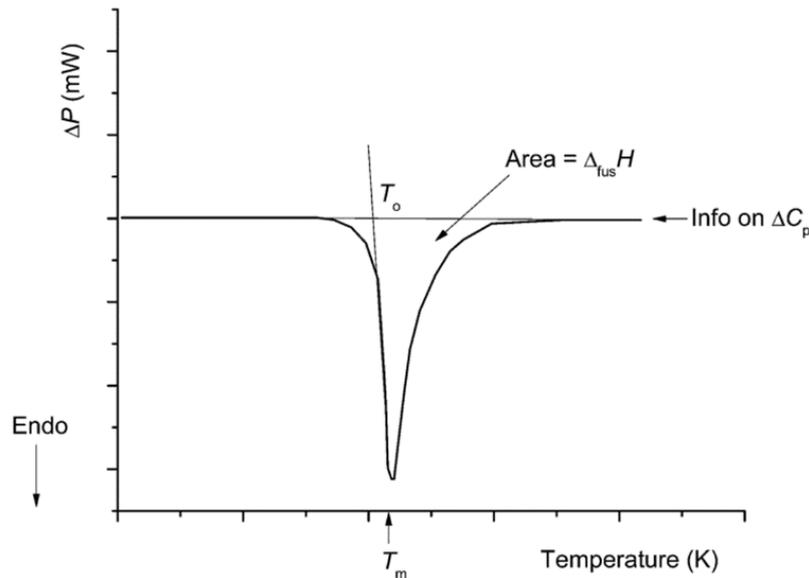


Figure 17 : Courbe typique de DSC et paramètres obtenus : température de transition (T_m), énergie de transition (ΔH), température de début de transition T_o ¹¹⁹.

Des liposomes de tailles différentes et composés de plusieurs sortes de lipides peuvent aussi être synthétisés^{120,121}. Récemment, il a été possible d'ajouter lors de leur formation des protéines d'intérêt¹²². Ceci permet d'analyser leur distribution au sein de la bicouche lipidique et de voir les effets de certains lipides comme le cholestérol¹²³.

Une seconde technique peut être utilisée: la méthode de spectroscopie Raman. Ce système utilise la lumière et plus précisément sa fréquence qui va être modifiée selon la composition du milieu analysé¹²⁴. Cette méthode permet d'obtenir des informations sur les interactions lipidiques notamment au niveau de leurs chaînes alkyles¹²⁵.

III.1.1.b Applications aux dendrimères

Lorsque les dendrimères sont utilisés dans des applications biologiques, il est important de connaître leurs interactions potentielles avec les membranes cellulaires. Différents types de dendrimères ont été testés.

Des dendrimères phosphorés de générations 3 et 4 comportant des atomes de phosphore dans leur structure et des groupements terminaux cationiques ont été synthétisés. Leur insertion dans la bicouche lipidique de liposomes a été observée en faisant varier les ratios dendrimères/vésicules ainsi que la composition en lipides de ces structures¹²⁶. La charge des membranes a aussi été changée, passant de neutre à négative suivant leur composition lipidique. Les auteurs ont pu remarquer que l'interaction entre les dendrimères et les bicouches lipidiques dépendait fortement de ce dernier paramètre¹²⁷. Ces tests permettent entre autre, de prédire une cytotoxicité potentielle et de pouvoir dès à présent adapter la molécule. Dans ce cas, la synthèse de molécules de génération plus petite (génération 2) a permis de réduire leur toxicité sur des lignées cellulaires murines^{128,129}.

Des dendrimères de type carbosilane ont passé des tests de DSC afin d'être utilisés comme transporteurs d'acides nucléiques. Des études sur des molécules de génération 2 ont démontré que ces dendrimères peuvent interagir aussi bien avec la partie hydrophile qu'hydrophobe de la membrane des liposomes. Ces liaisons sont dues principalement à des forces électrostatiques¹³⁰. Ce dendrimère a été couplé à un siRNA. Des vésicules de tailles plus importantes appelées Large Unilamellar Vesicles (LUVs) de charge neutre ou négative ont été créées. Une interaction avec ces vésicules a été observée avec une interaction plus importante les LUVs chargées négativement¹³¹. Ces mêmes dendrimères ont enfin été couplés avec des peptides composant le VIH. Le but de ce complexe dendrimère/peptide est de pouvoir atteindre le cytoplasme des cellules dendritiques. Ces peptides vont être reconnus par ces cellules qui vont créer une mémoire immunitaire pour ces antigènes. Une expérience un peu différente utilisant une monocouche lipidique permet de mesurer l'incorporation des dendrimères en mesurant la variation de la pression exercée sur cette monocouche. Les fortes interactions mesurées entre les lipides et ce complexe dendrimère/peptide suggèrent la capacité pour ces dendrimères de pouvoir délivrer ces peptides aux cellules¹³².

Les dendrimères PAMAM ont généré un grand nombre de publications analysant leur interaction avec des modèles de membranes lipidiques. Des expériences différentes de celles couramment décrites jusqu'à présent peuvent être relevées. Ces dendrimères polyaminés présentent la difficulté de pénétrer profondément au sein des vésicules lipidiques¹³³. Pour pallier à cela, les vésicules ont été synthétisées en incorporant les dendrimères au moment de leur formation. Cette méthode permet de créer des vésicules avec des domaines riches ou

pauvres en dendrimères, démontrant leur capacité à se regrouper au sein des bicouches lipidiques¹³⁴. Cette même équipe a ensuite caractérisé l'effet du pH sur l'insertion des dendrimères PAMAM dans les bicouches lipidiques¹³⁵. Des pH plus acides diminuent la proportion de dendrimères s'insérant dans la membrane, démontrant l'importance des forces électrostatiques. Les études utilisant la DSC ainsi que la spectroscopie Raman permettent d'observer l'insertion membranaire des dendrimères mais aussi de voir les changements de conformation des chaînes alkyles induits par ces molécules¹³⁶. Récemment, la modélisation devient une solution de plus en plus utilisée afin de comprendre les interactions dendrimères/lipides. Cette technique offre la possibilité de créer des bicouches lipidiques de compositions différentes¹³⁷.

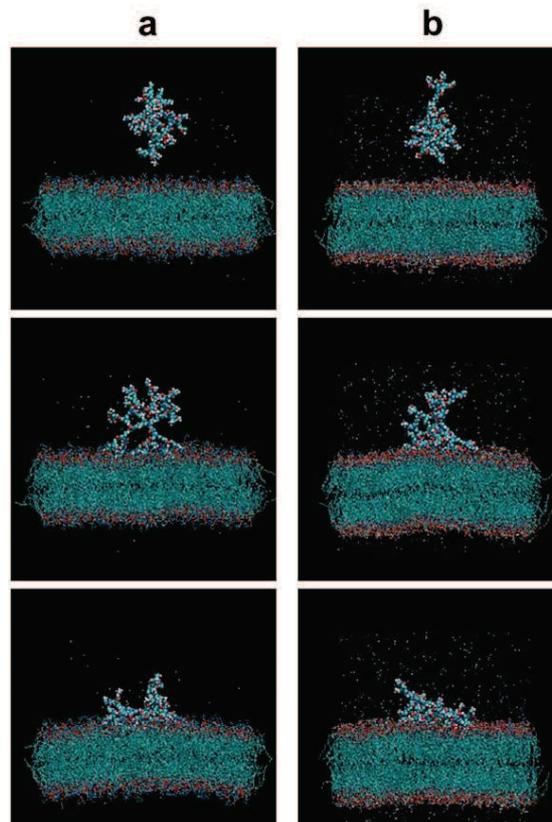


Figure 18 : Interaction d'un dendrimère PAMAM de génération 3 avec une bicouche lipidique de (a) DPPC ou (b) POPG¹³⁷.

III.1.2 Liaison covalente

L'interaction entre une molécule et une cellule peut se faire par l'intermédiaire d'une liaison covalente. Ce type de fixation est généralement utilisé en protéomique pour identifier les cibles protéiques de petits composés chimiques bioactifs. Un groupement chimique servant

de lien entre la protéine et le médicament est inséré dans sa structure. Ces groupements peuvent être de type photo-réactif où le composé va être activé par une lumière Ultra Violette (UV), ou encore de type enzymatique¹³⁸.

Le but ici est d'utiliser les cellules en tant que transporteur de médicaments ou de peptides. Pour réaliser ce greffage cellules/molécules, l'équipe de C.R. Bertozzi proposa une technique nommée chimie bioorthogonale. Cette chimie utilise des oligosaccharides (acides sialiques non-naturels) afin de pouvoir présenter des groupements cétones ou azotures à la surface des cellules^{139,140}. Une réaction bioorthogonale est une réaction chimique réalisée dans un milieu biologique mais qui n'interagit pas avec les systèmes biologiques. Les groupements chimiques doivent donc rester inertes, non toxiques et utilisables pour des expériences *in vivo*¹⁴¹.

D'autres groupements fonctionnels présents à la surface cellulaire sur certaines parties de protéines ou de carbohydrates sont utilisables. Par exemple, des groupements amines (NH₂) ou thiols (SH) portés respectivement par des lysines ou des cystéines permettent de fixer des petites molécules, des polymères ou des nanoparticules par des liaisons covalentes¹⁴². Des lipides ainsi que des particules de 100 à 300 nm de diamètre ont été fixés par une liaison maleimide-thiol au niveau de lymphocytes T vivants, sans compromettre leur survie ou leur fonctionnalité¹⁴³.

Cette théorie étant récente, il existe très peu d'exemples dans la littérature avec des dendrimères. Il est intéressant de retenir le travail du groupe de H. Yang qui traita des macrophages avec du périodate de sodium afin de générer des groupements aldéhydes en surface. Des dendrimères de génération 4.5 portant des groupements amines réagissent avec les aldéhydes et se fixent sur ces cellules. Cette équipe a démontré la possibilité de greffer de manière homogène des dendrimères sur des macrophages¹⁴⁴. Plus récemment, des dendrimères PAMAM de génération 4 ont été fixés toujours à la surface de macrophages par chimie bioorthogonale. Cette fixation a été validée par microscopie. La viabilité et la fonctionnalité cellulaire sont bien conservées. Ce modèle de cellules est utilisé comme transporteur de molécules chimiques. Il permet de délivrer des médicaments anti-cancéreux via ces dendrimères, sans passer par une étape de phagocytose du complexe dendrimère/médicament par les macrophages¹⁴⁵ (**Figure 19**).

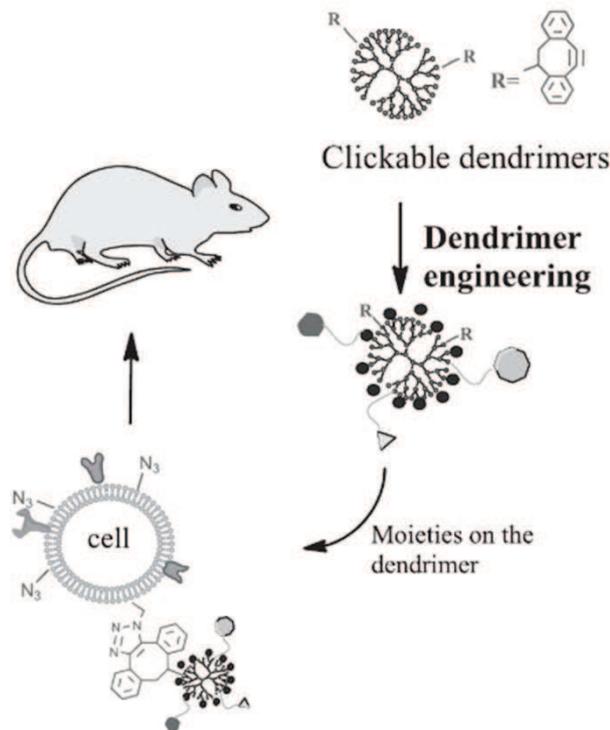


Figure 19 : Création de vecteurs cellulaires : des dendrimères fonctionnalisés par « click-chemistry » sont greffés à la surface de cellules immunitaires¹⁴⁵.

III.1.3 Liaison de type ligand/récepteur

Les avantages d'utiliser une reconnaissance spécifique entre une molécule et un récepteur sont multiples. Cette reconnaissance permet de cibler certains types cellulaires via leurs récepteurs. Il en découle une grande reproductibilité et permet de délivrer une plus grande quantité de médicaments en limitant leurs effets secondaires¹⁴⁶.

Deux propriétés font des dendrimères une bonne structure afin de cibler un récepteur in vivo :

- Pour atteindre rapidement les cellules d'intérêt, les molécules doivent pouvoir circuler rapidement dans l'organisme. Comme expliqué précédemment, la taille joue un rôle prépondérant avec une facilité de biodistribution pour celles d'un diamètre inférieur à 10 nm comme les dendrimères¹⁴⁷.

- Les médicaments comportent rarement une fonction chimique spécifique leur permettant de cibler un seul type cellulaire ou un organe en particulier. Les dendrimères peuvent être utilisés dans le but de porter au sein de leur structure deux groupements, l'un ciblant et l'autre comportant l'effet thérapeutique¹⁴⁶ (**Figure 20**).

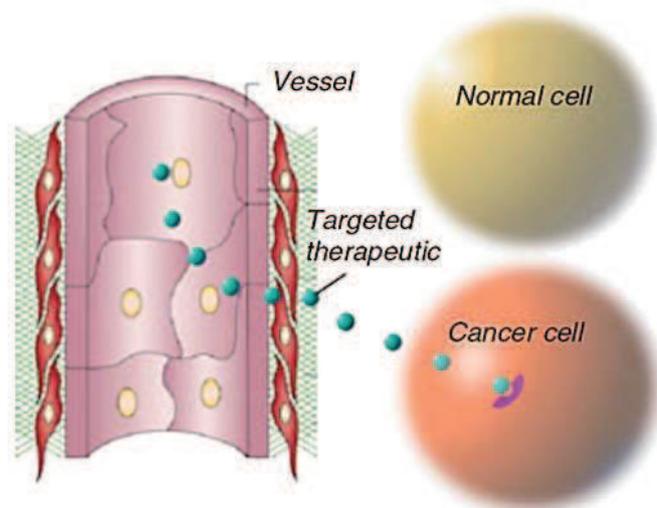


Figure 20 : Extravasation et ciblage cellulaire de dendrimères thérapeutiques¹⁴⁶.

Dans la littérature, on retrouve un grand nombre de dendrimères synthétisés dans le but de reconnaître un récepteur unique. Un des récepteurs les plus ciblés est sans doute le récepteur à l'acide folique, surexprimé par les cellules cancéreuses¹⁴⁸. D'autres dendrimères portent des ligands de récepteurs comme ceux des GPCRs (G-protein-coupled receptors) avec l'exemple de PAMAM présentant des groupements adénosines en surface^{149,150}. Beaucoup de possibilités sont offertes par cette famille de molécules. Des dendrimères ont été synthétisés afin de cibler les lymphocytes T grâce à des anticorps fixés à leur structure¹⁵¹.

Les interactions entre ligands et récepteurs sont des interactions spécifiques complexes. Elles sont régies par des lois physiques et prennent en compte différents paramètres comme leur cinétique d'interaction ou encore leur affinité.

III.2 Analyses d'interactions spécifiques

III.2.1 Notions de pharmacologie

La pharmacologie est une discipline scientifique à part entière née dans les années 1850. Le premier département de pharmacologie a été fondé en 1847 par R. Buchheim dans le but de comprendre les effets de médicaments et de poisons. Le terme de récepteur est né un peu plus tard et a beaucoup évolué jusqu'à nos jours¹⁵².

Dans le but de créer une nomenclature internationale, un comité de pharmacologie a été fondé et propose une classification pour les différents types de récepteurs et de médicaments.

De plus, ils recommandent d'uniformiser internationalement les mêmes notions afin d'utiliser les mêmes termes et symboles en pharmacologie¹⁵³.

Un récepteur est défini comme étant « une macromolécule ou un assemblage de macromolécules concerné directement et spécifiquement dans une voie de signalisation. Combiné à une hormone, un neurotransmetteur, un médicament ou à des messagers intracellulaires, un récepteur va initier un changement de fonction cellulaire »¹⁵³.

La fixation d'une molécule sur son récepteur va comprendre 3 stades : l'association, une étape d'équilibre ou saturation suivie de leur dissociation (**Figure 21**)¹⁵³.

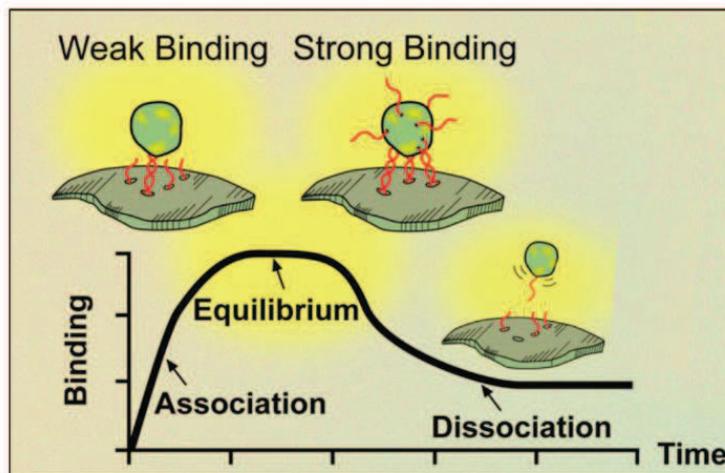


Figure 21 : Les différentes étapes de fixation d'une molécule sur son récepteur¹⁵³.

Depuis la naissance de cette discipline, les scientifiques ont toujours voulu comprendre et définir au mieux ces interactions ligands/récepteurs. Pour cela, un grand nombre de termes, d'équations et de définitions ont été définis par la communauté. Dans le but de comprendre et d'utiliser des termes identiques par la suite, nous reprendrons ici quelques définitions (**Table 1**).

Terme	Symbole	Définition
Concentration	[M]	Il est recommandé d'utiliser la masse molaire d'une substance et de noter sa concentration c_x par la forme [X].
Agoniste		Un ligand agoniste est une entité altérant l'état d'un récepteur induisant une réponse biologique. Les agonistes conventionnels augmentent l'activité d'un récepteur.

Antagoniste		<p>Un antagoniste va réduire l'action d'une autre molécule, généralement un agoniste. En terme fonctionnel on peut différencier deux types d'antagonistes :</p> <p>-les antagonistes directs ou indirects qui vont entrer en compétition pour inhiber la fixation de l'agoniste directement sur son récepteur ou sur une molécule intermédiaire.</p> <p>-les antagonistes physiologiques qui induisent un effet physiologique contraire à celui engendré par l'agoniste via son action sur un autre récepteur.</p>
Modulateur allostérique		Un modulateur allostérique est un ligand qui va diminuer ou accroître l'action d'un agoniste ou d'un antagoniste, en se liant à un site distinct du même récepteur.
EC50	EC50	Concentration molaire à laquelle un agoniste produit 50% de son effet maximal.
IC50	IC50	Concentration molaire à laquelle un antagoniste réduit la réponse maximale d'un agoniste de 50%.
Concentration en récepteurs	$[R]/[R]_T$	$[R]$ pour la concentration en récepteur libre et $[R]_T$ pour la concentration en récepteurs totaux d'un agoniste.
Nombre de récepteurs	N	Nombre total de récepteurs exprimés sur une surface membranaire ou cellulaire.
Constante de dissociation	K_d	Constante de dissociation d'un ligand sur son récepteur mesurée directement par une expérience de fixation à l'aide d'un ligand marqué.
Constante d'inhibition	K_i	Constante d'inhibition de la fixation d'un ligand sur son récepteur mesurée directement par une expérience de compétition à l'aide d'un ligand marqué et d'un antagoniste non marqué.

Table 1 : Symboles et définitions de paramètres utilisés en pharmacologie.

Le K_d d'un ligand indique que la fixation d'une molécule sur un récepteur n'est pas quelque chose de figé, mais plutôt quelque chose de dynamique. Cette propriété est appelée théorie d'occupation. La fixation du ligand est fonction du nombre de récepteurs présents sur une cellule, de son affinité pour celui-ci et de sa concentration molaire¹⁵⁴.

Tous ces paramètres sont à prendre en compte dans l'obtention d'une réponse cellulaire à un médicament. Connaître ces paramètres au préalable est intéressant, en amont d'une utilisation plus poussée et plus onéreuse en biologie. Différents types de tests ont été créés.

III.2.2 Méthodes d'analyses d'une fixation spécifique

III.2.2.a Molécules marquées

Ces techniques ont pour but de démontrer et d'analyser l'interaction entre un récepteur et une molécule. Pour cela, l'utilisation de molécules marquées est intéressante. Deux types de stratégies sont actuellement utilisés :

- l'utilisation de ligands comportant des atomes radioactifs, appelés radioligands.
- l'utilisation de molécules avec des groupements fluorescents.

Les molécules radiomarquées sont les plus utilisées lorsqu'il s'agit d'analyser ce type de liaison. Ces molécules permettent des études très précises d'affinité, de distribution ou de quantification du nombre de sites de liaisons¹⁵⁵.

Les radioligands sont utilisés dans divers protocoles expérimentaux. Les expériences de saturation ont pour principe d'ajouter des doses croissantes de molécules et de mesurer la proportion d'entre elles fixées. Pour simplifier, si le ligand (L) comporte sur la cellule un récepteur unique (R), sa fixation va se faire suivant l'équilibre :



Les concentrations molaires en ligand [L] et surtout en récepteurs [R] peuvent être limitantes. Si la [R] est insuffisante pour satisfaire tous les ligands, on atteint un état d'équilibre appelé état de saturation (**Figure 22**). Les radioligands à un seul site de fixation montrent une courbe de fixation de forme hyperbolique. Une constante de dissociation ou K_d peut être alors déterminée suivant l'affinité du ligand pour ce récepteur. La forte affinité de certaines

molécules induit un K_d d'une valeur très faible. Les radioligands sont des outils stringents car détectables à de très faibles concentrations¹⁵⁶.

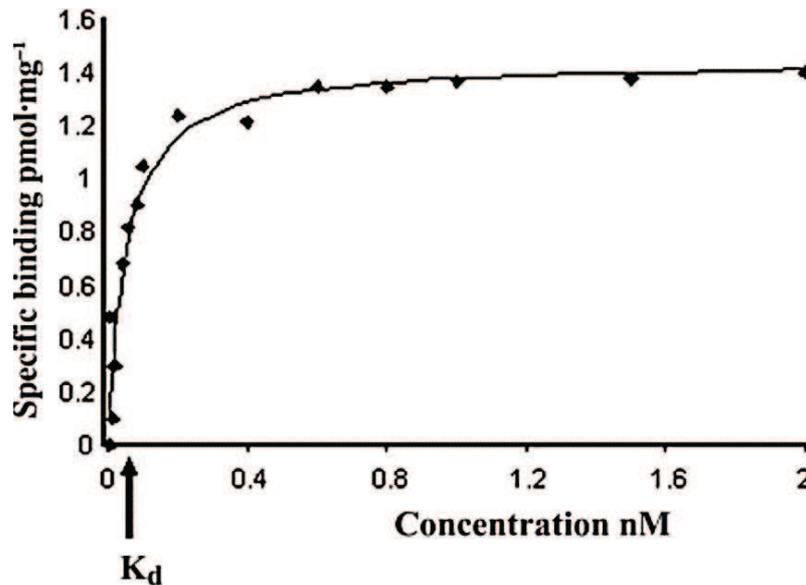


Figure 22 : Courbe standard d'une fixation spécifique à un seul site de reconnaissance pour un ligand¹⁵⁶. (K_d : constante de dissociation)

La synthèse de dendrimères comportant des atomes radioactifs, principalement des ¹²⁵I a déjà été réalisée. Leur utilisation permet de connaître leur affinité pour certains récepteurs. Par exemple un dendrimère PAMAM de génération 5 a été décoré par un anticorps spécifique au récepteur à l'EGF (« Epidermal Growth Factor ») appelé cetuximab. L'affinité se mesure par la radioactivité émise des cellules ayant fixé ce complexe comportant des atomes de ¹²⁵I. Si l'on rajoute dans le milieu le même complexe non radiomarqué, il existe alors une compétition entre les deux molécules. Ce type de protocole est appelé expérience de compétition, donnant accès à la mesure de l'IC₅₀ de la molécule. Par transformation via l'équation de Cheng-Prusoff¹⁵⁷, il est possible d'avoir accès au K_i de la molécule non marquée¹⁵⁸.

Il est possible d'utiliser des molécules radiomarquées connues pour avoir une affinité pour un récepteur et de mettre en compétition un dendrimère désiré. Il a ainsi pu être démontré qu'un dendrimère possédait une fixation simultanée sur deux récepteurs de type GPCRs, possédant deux agonistes différents au sein de sa structure¹⁵⁹.

Les dendrimères peuvent porter des groupements fluorescents pour analyser leur liaison à un récepteur. Pour mesurer la fluorescence cellulaire, la technique de cytométrie en flux peut être utilisée. Elle permet d'utiliser les expériences décrites pour les radioligands, avec des molécules fluorescentes. Un gros travail de E. Kozma afin d'utiliser la cytométrie en flux lors

d'expériences de fixation a été fait sur les récepteurs à l'adénosine^{160,161}. Suivant notre expertise, aucune expérience similaire utilisant directement des dendrimères fluorescent n'a été réalisée. Les expériences de cytométrie en flux utilisant des dendrimères avec un fluorochrome dans leur structure sont simplement des expériences d'internalisation¹⁶². Une étude montrant une compétition de fixation entre un anticorps fluorescent et un dendrimère a été observée récemment¹⁶³. Cependant, l'utilisation de la cytométrie pour déterminer l'affinité d'une molécule avec certaines cellules reste quelque chose de très récent et comportant un nombre de biais important qu'il a fallu comprendre¹⁶⁴.

La présence de fluorochrome dans la structure d'un dendrimère permet d'utiliser des techniques comme le FRET. Le FRET pour « Förster Resonance Energy Transfer » est une technique nécessitant au moins deux fluorochromes et dépend de plusieurs paramètres. Elle nécessite une superposition de deux spectres de deux fluorochromes, l'un d'émission et l'autre d'absorption et d'une distance de moins de 100 Å entre les deux fluorochromes. Une longueur d'onde d'excitation sera envoyée au premier fluorochrome. Ce fluorochrome va émettre à sa longueur d'onde d'émission qui correspond également à la longueur d'onde d'absorption du second fluorochrome. Celui-ci va ensuite émettre une lumière comportant une troisième longueur d'onde spécifique. Si un dendrimère est couplé à un fluorochrome, il est possible en combinant les fluorochromes adaptés, d'utiliser des anticorps ciblant des récepteurs afin d'étudier leur proximité (<10 nm)¹⁶⁵ (**Figure 23**).

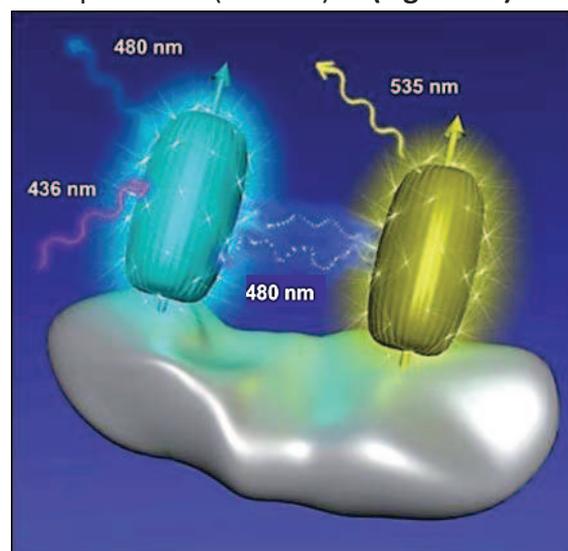


Figure 23 : Principe du FRET entre deux fluorophores¹⁶⁵.

En 2006, un dendrimère phosphoré fluorescent et des anticorps anti-TLR ont été utilisés afin d'étudier leur proximité pouvant être due à une interaction spécifique. Le récepteur TLR2

montre une proximité géographique avec ce dendrimère sur la membrane des monocytes humains¹⁶⁶.

III.2.2.b Molécules non marquées

D'autres molécules peuvent être utilisées sans comporter de moyens de détection. La technique la plus utilisée dans ce genre d'expérience est appelée SPR pour Résonance Plasmonique de Surface. Cette technique utilise une surface électromagnétique sur laquelle est fixée un récepteur. On rajoute la molécule à tester qui ira se fixer en fonction du temps et de son affinité sur ce récepteur. La fixation entre ces deux entités est mesurée grâce à la lumière réfléchie réémise par la plaque électromagnétique. L'angle de réflexion de cette lumière satisfaisant les paramètres de résonance va changer en fonction du degré de saturation des récepteurs présents sur la plaque¹⁶⁷. Il est ainsi possible de connaître l'affinité d'un dendrimère avec un récepteur et de pouvoir tester un grand nombre de molécules (Figure 24).

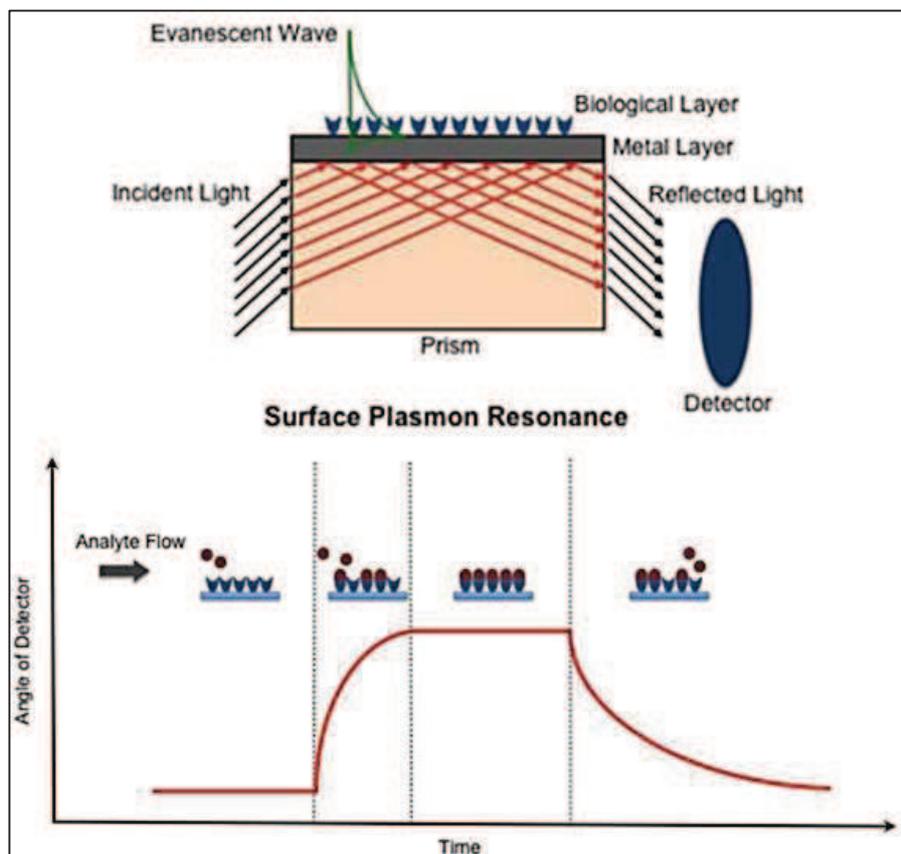


Figure 24 : Principe de la SPR et détection d'une interaction spécifique¹⁶⁷.

Des dendrimères ont été synthétisés dans le but de se fixer sur un récepteur cellulaire nommé DC-SIGN. Ce récepteur reconnaît des résidus oligosaccharidiques ou glycoconjugués qui sont présents à la surface de nombreux pathogènes comme les virus Ebola, le VIH ou de bactéries comme *M.tuberculosis* ou *S.pneumoniae*. En 2011, des dendrimères de type PAMAM démontrent une grande capacité à inhiber la fixation d'un modèle de virus Ebola. Les expériences de SPR démontrent d'ailleurs un IC50 de l'ordre du nanomolaire¹⁶⁸. Quelques années plus tard, différentes structures de dendrimères furent criblées afin d'augmenter l'affinité de ces composés pour le récepteur DC-SIGN, toujours mesurée en SPR¹⁶⁹.

Des tests permettent d'observer l'activation spécifique d'un récepteur sur des cellules vivantes *in vitro*. Ces expériences impliquent principalement la famille de récepteurs appelés GPCRs. En général, la signalisation à travers ces récepteurs se fait par la régulation du niveau d'AMP cyclique, de calcium ou d'inositol triphosphate, trois seconds messagers qui vont retranscrire l'activation au sein de la cellule. En visualisant ces concentrations cellulaires avec l'utilisation d'agonistes ou d'antagonistes du récepteur ciblé, il est possible d'observer les effets de molécules d'intérêt sur l'activation de ces récepteurs. Il s'agit là d'expériences indirectes prouvant la présence d'une reconnaissance spécifique via un récepteur d'une molécule comme un dendrimère¹⁷⁰.

En routine, un récepteur est surexprimé sur une lignée cellulaire comme les lignés HEK29T ou CHO. Certains dendrimères PAMAM ont ainsi pu montrer une forte sélectivité et une activité supérieur à 200 fois par rapport à son dendron, sur des récepteurs à l'adénosine¹⁷¹. Des études utilisent aussi ces expériences d'essais fonctionnels afin de déterminer les constantes d'affinités pour différents récepteurs. Des dendrimères ont pu être optimisés afin de cibler les récepteurs à adénosine 1, 2 ou 3 et ainsi amplifier leur effet protecteur sur des cellules¹⁷².

La synthèse des dendrimères réalisée par étapes et est bien contrôlée. Cela en fait des molécules synthétisables à façon. Leurs caractéristiques physico-chimiques en font des outils utilisables dans différents domaines, dont la biologie. Nous venons de voir que ces entités synthétiques peuvent avoir différents types d'interactions avec les systèmes biologiques. Certaines peuvent être spécifiques et peuvent donc être utilisées pour induire des effets précis. Du coup, des dendrimères ont été pensés, fabriqués et appliqués dans l'idée d'obtenir

cet effet désiré. Certains d'entre eux ont montré les conséquences attendues ou voulues, d'autres ont induit des résultats néfastes ou surprenants dont certains mécanismes d'action restent encore incompris.

IV-Applications des dendrimères en biologie

Il est possible de synthétiser ces outils moléculaires à façon suivant l'activité ou le but recherché. Deux procédés sont présents dans la littérature. Certains dendrimères ont été synthétisés dans un but précis : pour se lier à une autre molécule, à un type cellulaire ou encore pour traiter une pathologie. D'autres par contre, ont montré une activité par hasard, ou non attendue, qu'il faut ensuite comprendre et utiliser.

IV.1 Dendrimères conjugués

IV.1.1 Les dendrimères dans l'imagerie médicale

IV.1.1.a Dendrimères comme agents de contraste

L'IRM est une méthode d'imagerie médicale basée sur le temps de relaxation de protons qui dépend en grande partie de la densité du tissu où ils se trouvent. La majeure partie de ces protons sont des constituants de l'eau contenue dans tous les tissus humains. Les différences de concentration en protons de ces tissus étant relativement faibles, l'utilisation d'agents de contraste amplifiant ces différences est nécessaire³⁴.

Communément, des ions gadolinium Gd^{3+} sont utilisés. Du fait de leur toxicité en tant qu'ions libres, ils sont liés à des chélateurs. Les chélateurs les plus souvent utilisés sont appelés DOTA, DO^3 ou encore EPTPA. Ils présentent pour certains des cycles tetraazacyclododecanes à l'intérieur desquels viendront s'insérer les ions gadolinium. Leur mauvaise distribution et leur élimination rapide par l'organisme nécessitent l'administration d'une forte dose de ces produits.

Le premier travail utilisant un dendrimère comme agent de contraste a été décrit par Wiener en 1994. Dans cet article, les auteurs ont conjugué des chélateurs d'ions gadolinium aux extrémités d'un dendrimère PAMAM permettant de présenter jusqu'à 170 de ces ions Gd^{3+} . L'analyse *in vivo* a démontré une demi-vie multipliée par 10 pour le dendrimère comparé au chélateur utilisé indépendamment¹⁷³.

Les dendrimères utilisés sont souvent de génération importante. Un dendrimère PAMAM de génération 6 est utilisé afin de mieux visualiser le système lymphatique. Il est possible de visualiser ce système chez de petits et grands modèles d'animaux¹⁷⁴. Des groupements DTPA protégés en tert-butyle ont été greffés à des générations différentes de dendrimères PPI. Après déprotection des terminaisons à l'aide d'acide trifluoroacétique, les dendrimères de 5 à 6 nm démontrent des propriétés supérieures à l'agent DTPA utilisé seul, en tant qu'agent de contraste¹⁷⁵. D'autres dendrimères couplés à des chélateurs de manganèse permettent d'offrir une alternative aux personnes chez qui les ions gadolinium seraient contraindiqués¹⁷⁶.

Un autre dendrimère de type PolyLysine nommé Gadomer-17 (dû à sa masse molaire de 17 KDa) a attiré l'attention des sociétés pharmaceutiques notamment pour son utilisation dans l'imagerie tumorale¹⁷⁷. La société Schering AG, maintenant Bayer Schering Pharma, le produit et le développe (phase clinique II) chez l'humain (**Figure 25**).

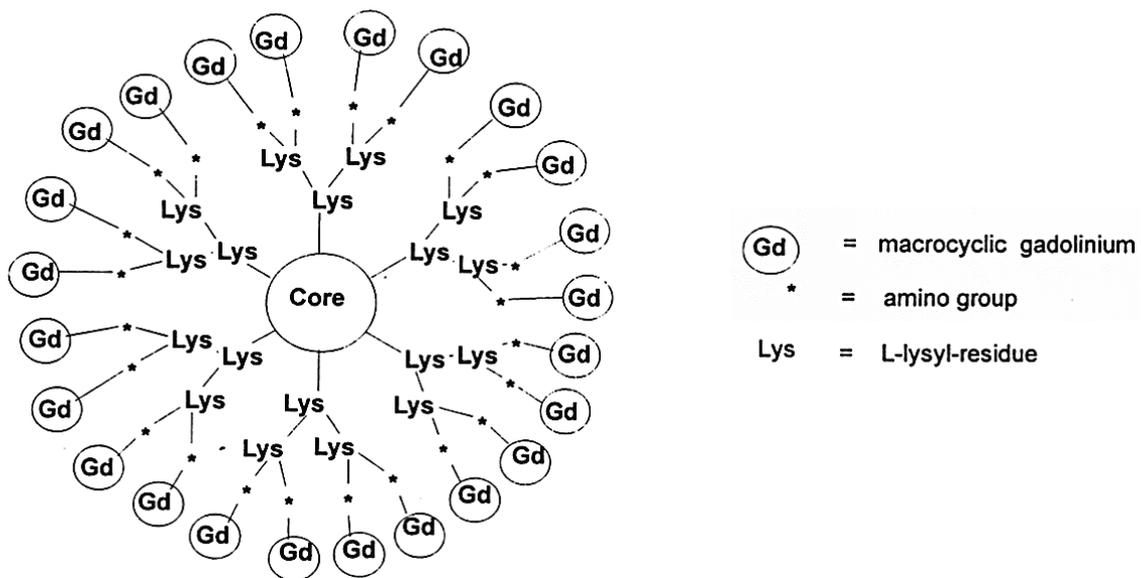


Figure 25 : Structure simplifiée du dendrimère PolyLysine Gadomer-17¹⁷⁸.

IV.1.1.b Dendrimères comme molécules fluorescentes

D'autres dendrimères utilisés en IRM peuvent être couplés à des fluorochromes. Ces PAMAM de génération 2 à 6 ont permis d'obtenir des images *in vivo* des nœuds lymphatiques et des tumeurs ovariennes chez la souris^{179,180}. Un autre dendrimère PAMAM a été synthétisé afin de cibler l'intégrine $\alpha\beta3$ présente au niveau des cellules tumorales. Des fluorochromes et des groupements permettant une visualisation en IRM ont été greffés. Ce dendrimère a été synthétisé dans le but d'obtenir un agent macromoléculaire multimodal pour l'imagerie.

La visualisation de cellules tumorales *in vitro* a montré de bons résultats. Cependant, l'observation de cellules tumorales *in vivo* montre des limites du fait de sa faible pénétration tissulaire liée à sa taille importante¹⁸¹ (Figure 26).

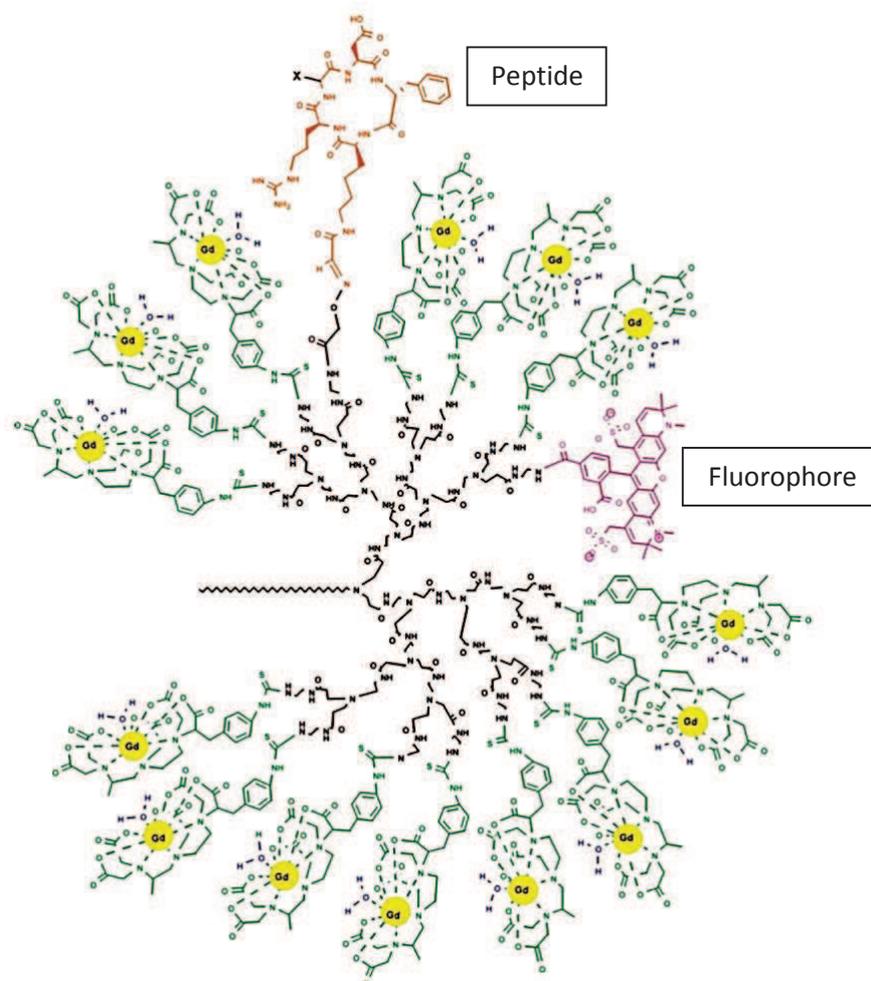


Figure 26 : Représentation schématique d'un dendrimère PAMAM multimodal : cœur (noir), agents chélateurs (vert), peptide ciblant l'intégrine $\alpha\beta3$, fluorophore alexa fluor¹⁸¹.

Des groupements folates ont pu être ajoutés aux extrémités d'un dendrimère PAMAM de 4^{ème} génération comportant un groupement de fluorescence cyanine 5. Le dendrimère permet alors d'observer et d'identifier *in vivo* les tissus infectés par des bactéries ainsi que les lieux d'inflammation¹⁸². Des dendrimères PEG ayant des propriétés anti-inflammatoires sont couplés à des fluorochromes et sont aussi utilisés pour identifier en quelques minutes les zones d'inflammation¹⁸³. Un dendrimère phosphoré a été synthétisé en plaçant un chromophore sur le cœur de la molécule. Cette stratégie a permis d'accroître la solubilité du fluorophore et de tirer parti de l'absence de toxicité observée pour ce type de dendrimère. Ce

traceur soluble dans l'eau a ainsi pu être utilisé *in vivo* pour visualiser des vaisseaux sanguins chez le rat après injection intraveineuse¹⁸⁴.

IV.1.2 Dendrimères comme agents de transfection : « gene delivery ».

IV.1.2.a Agents de transfection

Ce sont les dendrimères de type PAMAM qui ont été utilisés pour la première fois comme agents de transfection. En 1993, la transfection de plasmides via ces dendrimères a été étudiée sur des lignées cellulaires *in vitro*. Une forte différence d'efficacité est observée entre les dendrimères de générations 4 et 5. Le ratio entre la quantité de dendrimère et d'ADN est aussi à prendre en considération ainsi que le PKa des groupements terminaux¹⁸⁵.

Les acides nucléiques et les membranes étant deux structures biologiques anioniques, les dendrimères utilisés sont en général cationiques. De 2005 à 2012, le nombre d'articles décrivant l'utilisation de dendrimères comme agents de transfection ou comme agents de « gene delivery » n'a fait qu'augmenter. Pratiquement tous les types de dendrimères connus à ce jour ont montré des applications dans ce champ d'utilisation¹⁸⁶ (**Figure 28**).

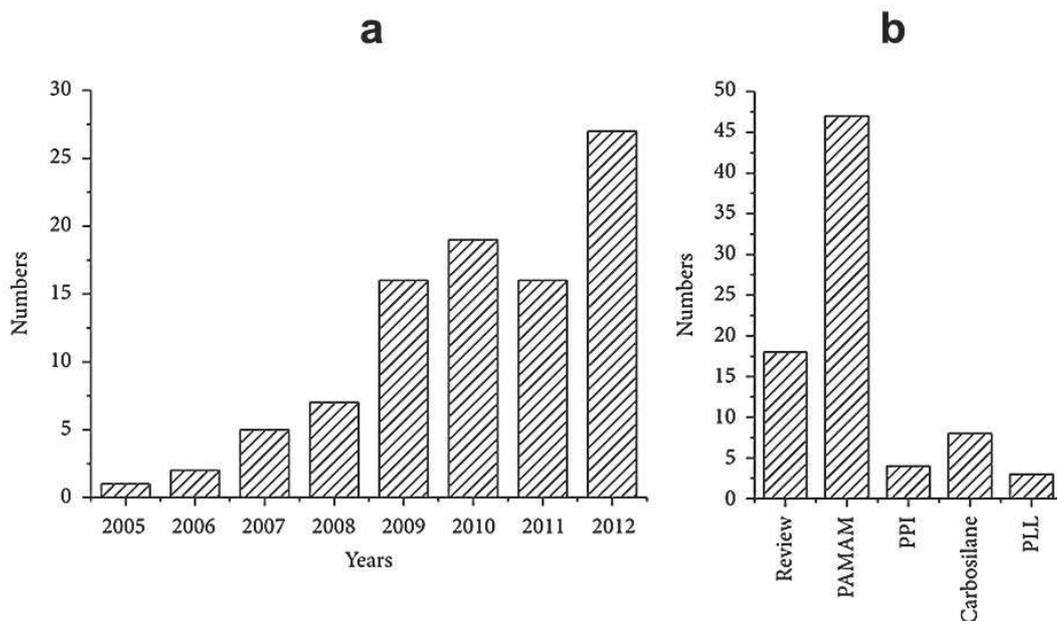


Figure 28 : (a) Nombre d'articles publiés utilisant des dendrimères comme agents de transfection. (b) Principaux types de dendrimères décrits entre 2005 et 2012¹⁸⁶.

Les dendrimères couramment utilisés étant donc cationiques, ils peuvent induire une cytotoxicité au niveau cellulaire. Leurs terminaisons sont parfois adaptées. La modification des groupements de surface amines en groupements amides permet de diminuer la cytotoxicité de certains dendrimères PAMAM¹⁸⁷.

La taille du dendrimère est aussi déterminante pour les dendrimères de type PPI. Même si la capacité de liaison au siRNA est meilleure pour les dendrimères de forte génération, ce sont les dendrimères de deuxième génération qui ont montré le rapport transfection/cytotoxicité le plus avantageux¹⁸⁸.

Enfin, d'autres dendrimères hyperbranchés présentant un grand nombre de groupements terminaux sont capables de fixer l'ADN¹⁸⁹. Ils sont maintenant développés comme agents de transfection. Starpharma en collaboration avec « Dendritic Nanotechnologies » commercialise un dendrimère dans un kit de transfection nommé « NanoJuice Transfection Kit ». Un second dendrimère PAMAM de génération 6 qui aura été préalablement fracturé par chauffage, est lui commercialisé par Quiagen sous le nom de Superfect (**Figure 29**)¹⁹⁰.

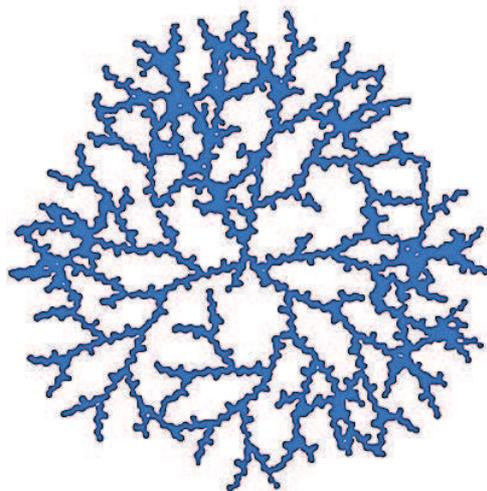


Figure 29 : Représentation du dendrimère PAMAM de génération 6 Superfect.

Source : QIAGEN.

V.1.2.b siRNA

En 1998, l'équipe de Fire et Mello décrivait pour la première fois le principe de l'interférence à l'ARN¹⁹¹. Elle induit une atténuation de l'expression de gènes dans les cellules. On sait maintenant qu'un double brin d'ARN va être clivé en petits ARNs simple brin nommés siRNAs

via l'endoribonucléase DICER. Ce siRNA va être pris en charge par un complexe nommé RISC (RNA-Induced Silencing Complex).

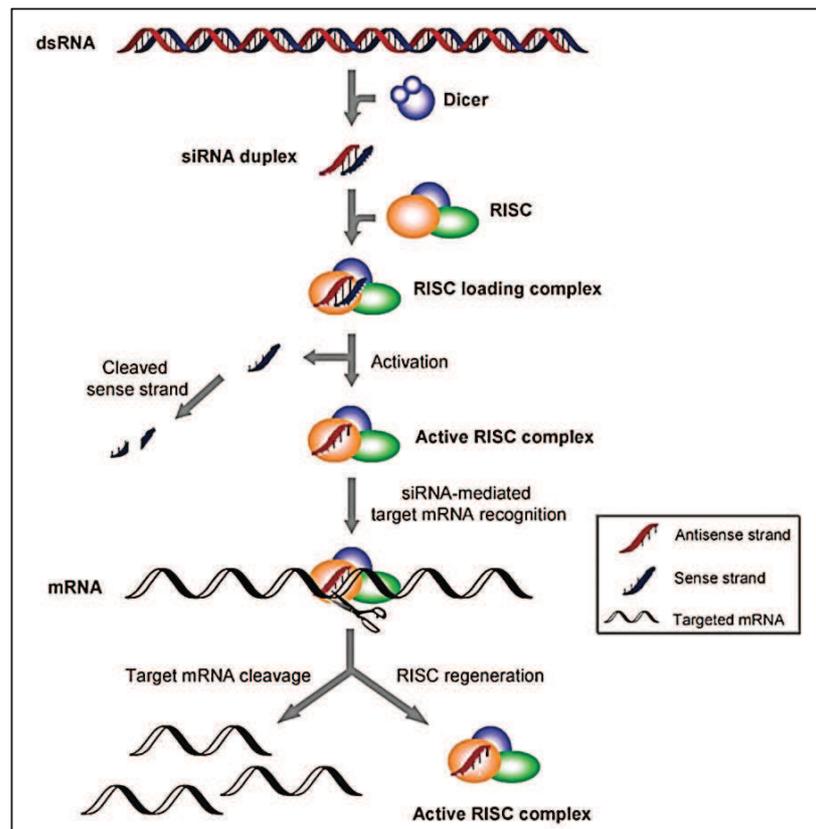


Figure 27 : Mécanismes de l'interférence à ARN¹⁹².

Le complexe siRNA-RISC va alors reconnaître le brin d'ARNm complémentaire au siRNA et induire sa dégradation. De manière directe, la diminution de cet ARNm codant pour une protéine va induire la diminution partielle ou totale de l'expression de celle-ci¹⁹² (**Figure 27**).

Depuis, différents procédés permettant d'amener un siRNA au sein d'une cellule ont été inventés¹⁹³.

Un transporteur de siRNA a plusieurs rôles :

- il doit protéger le siRNA de toute dégradation.
- il doit délivrer l'ARN aux cibles cellulaires, limitant ses effets secondaires.
- il doit permettre l'internalisation du siRNA et son accessibilité par la machine cellulaire¹⁹².
- Ces transporteurs doivent donc se lier aux ARN mais aussi leur permettre de traverser les membranes cellulaires.

IV.1.2.c Application en « gene delivery »

L'utilisation des dendrimères comme agents de transfection a offert la possibilité de les utiliser dans des modèles de thérapie génique *in vivo*.

Certains dendrimères démontrent une capacité à délivrer un siRNA dans des lignées de cellules immunitaires *in vitro*¹⁹⁴. Pour des applications *in vivo*, certaines modifications de leur structure sont nécessaires. Un dendrimère de type PAMAM a été synthétisé à partir d'un cœur 5-triethanolamine et permet de délivrer au sein d'une xénogreffe un siRNA diminuant la prolifération des cellules tumorales¹⁹⁵.

Certaines molécules sont plus élaborées et peuvent comprendre trois parties différentes. C'est le cas d'un dendrimère nommé tadpole qui est composé d'un dendrimère PAMAM de génération 4 comportant 32 charges positives à sa surface, permettant de lier le siRNA. L'autre côté de la molécule est lié via un « crosslinker » PEG à un peptide reconnaissant spécifiquement un type cellulaire, ici les cellules musculaires cardiaques. Ce dendrimère a été couplé à un siRNA ciblant un récepteur à l'angiotensine. L'absence de toxicité du complexe ainsi que sa spécificité d'action permettent à ce dendrimère de préserver l'organe d'effets secondaires lors de l'utilisation d'angiotensine en chirurgie¹⁹⁶ (**Figure 30**).

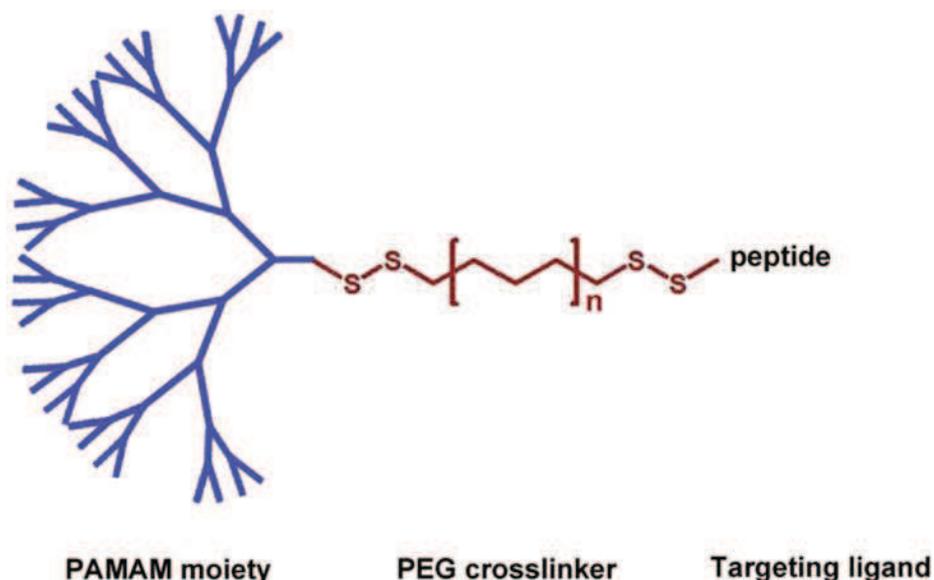


Figure 30 : Structure tripartite du dendrimère tadpole¹⁹⁶.

Des dendrimères de types différents comme des dendrimères poly(L-lysine) composés d'un cœur β -alanine et de points de divergences L-Lysine sont utilisés. Un dendrimère PLL permet par exemple l'apport d'un siRNA contre l'apo-lipoprotéine B au niveau du foie, protéine nécessaire pour la formation de petites vésicules lipidiques. Cela induit une diminution de la proportion de vésicules lipidiques dans le serum¹⁹⁷. Ce dendrimère a été couplé à un fluorochrome ce qui a permis d'analyser son passage au niveau du cerveau. Les auteurs ont pu démontrer la possibilité pour ce complexe de franchir la barrière hémato-encéphalique. De plus, ses propriétés de transfection sur des cellules astrocytaires humaines permettent d'imaginer un traitement ciblant ces cellules directement au niveau du cerveau¹⁹⁸.

IV.1.3 Dendrimères comme transporteurs de médicaments

Plusieurs techniques existent permettant de délivrer un médicament sur son site d'action. Nous discutons ici des avantages d'utiliser ces molécules dendritiques dans cette application.

IV.1.3.a La solubilisation de médicaments

La structure interne du dendrimère forme des cavités et peut permettre une encapsulation de molécules. Ces molécules vont être stabilisées dans la structure interne du dendrimère en grande partie grâce aux liaisons hydrogènes. D'autres médicaments peuvent être fixés de manière covalente au niveau des groupements terminaux. Evidemment, la taille et la composition des dendrimères permettront de transporter un nombre variable de médicaments.

Ainsi, des dendrimères peuvent solubiliser certains types de médicaments jusque-là très peu solubles. Des études comparent la capacité pour différentes sortes de dendrimères d'augmenter la solubilité de médicaments couramment utilisés¹⁹⁹. L'équipe de M.M. De Villiers a démontré que la présence en solution de dendrimères PAMAM de faible génération (0.5 à 2.5) permet d'augmenter la solubilité de médicaments comme la nifedipine²⁰⁰. Quelques années plus tard, ils démontreront qu'outre le fait d'utiliser des dendrimères de faibles génération (<G4), il faut aussi tenir compte du médicament en lui-même ou plutôt de son état ionique. Cette propriété prend une place importante dans l'équilibre du complexe, observé au niveau de complexes furosémide/PAMAM²⁰¹.

IV.1.3.b La spécificité d'action

La nature des groupements périphériques pour la spécificité d'action d'un dendrimère est importante. Les cellules tumorales, pour s'adapter à leur environnement et continuer à proliférer, évoluent métaboliquement et morphologiquement. Cela se traduit par l'expression en surface de récepteurs spécifiques. Certains de ces récepteurs sont ciblés pour délivrer spécifiquement la molécule pharmaceutique aux cellules tumorales. Le récepteur à l'acide folique ou vitamine B9 est surexprimé par la plupart des cellules cancéreuses. En 2005, un dendrimère de 5^{ème} génération synthétisé par l'équipe de J. Baker comprend en surface de l'acide folique (ligand du récepteur au folate) et du méthotrexate (MTX). Ce support dendritique de 5^{ème} génération de type PAMAM est lié à 10 MTX en surface. Il a démontré une forte affinité en SPR pour le récepteur à l'acide folique. Cette étude montre qu'un dendrimère permet d'augmenter l'affinité d'un médicament seul, ici de 4300 fois, démontrant la puissance de la multi présentation^{202,203}. Les auteurs ont démontré que la présence d'acide folique en périphérie du dendrimère permet de cibler les cellules tumorales chez la souris. Une présentation multivalente de MTX greffé à un dendrimère permet d'amplifier l'action de ce médicament avec une diminution significative du volume des tumeurs induisant une meilleure survie des animaux²⁰⁴. Ce récepteur au folate est aussi surexprimé au niveau des macrophages présents sur les sites inflammatoires comme dans l'arthrite rhumatoïde. L'utilisation de PAMAM couplé au folate est possible pour cibler les zones inflammatoires^{205,206}.

D'autres dendrimères utilisant toujours le MTX comme molécule effectrice, ciblent un antigène présent sur des cellules cancéreuses de la prostate. Reconnaisant le « Prostate-Specific Membrane Antigen » (PSMA), un dendrimère avec en surface du glutamate urée, un ligand de cet antigène, peut délivrer du MTX aux cellules cibles. Le dendrimère induit la mort des cellules présentant ce récepteur²⁰⁷. Leur rôle de transporteur a été comparé à d'autres systèmes comme les vésicules lipidiques dans la solubilisation de la dexaméthasone par exemple. Les résultats *in vitro* suggèrent que les dendrimères sont plus efficaces que les liposomes, à en juger par l'effet accru de la dexaméthasone sur les cellules^{208,209}.

IV1.3.c Diminuer les effets secondaires

Les dendrimères permettent de diminuer la toxicité de certaines molécules transportées. Dans les années 1960, B. Rosenberg découvrait l'activité biologique du dérivé cis-dichlorodiammineplatinum II ou cisplatine, un complexe efficace contre les cancers²¹⁰. Le potentiel de ce complexe est limité à cause de ses effets secondaires observés sur des reins de rats²¹¹. En 1999, Duncan proposa d'utiliser un dendrimère PAMAM de génération 3.5 conjugué à du cisplatine. Injecté *in vivo*, l'effet anti-tumoral fut observé pour ce complexe et pour le cisplatine seul²¹². L'utilisation de dendrimères de types PAMAM de génération 4.5 comportant 128 groupements de surface de type carboxylate, a permis de greffer jusqu'à 40 unités de cisplatine²¹³ (**Figure 31**).

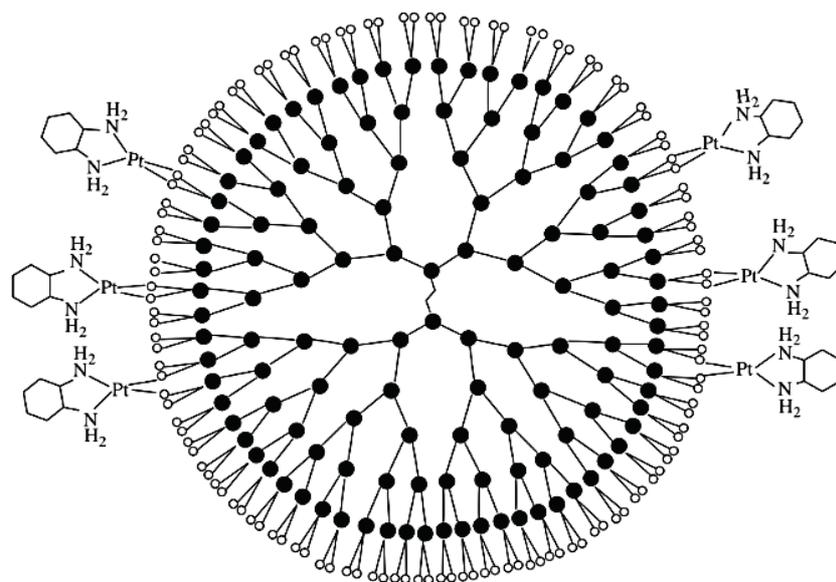


Figure 31 : Structure du dendrimère PAMAM de génération 4.5 portant des unités cisplatine²¹³.

IV1.3.d Biodispersité

Certaines thérapies nécessitent une application journalière. Des gels délivrant un médicament sur une période donnée doivent être utilisés dans certaines pathologies. Un dendrimère de génération 4 a été utilisé au sein d'un hydrogel libérant sur un temps imposé un antibiotique nommé amoxicilline. La caractérisation du gel a été menée ainsi que des tests de stabilité en DLS et en imagerie, démontrant l'importance de la formulation. Des tests *in vivo* sur des cochons d'inde ont suivi ces tests *in vitro* montrant l'efficacité conservée du dendrimère²¹⁴.

IV1.3.e Biodistribution

En principe, un dendrimère de moins de 10 nm a la propriété physique de se rendre dans tous les compartiments de l'organisme. Le N-acétyl-L-cystéine ou NAC est un agent anti-inflammatoire et antioxydant couramment utilisé en clinique. Plusieurs dendrimères PAMAM de 3^{ème} et 4^{ème} génération, anioniques et cationiques furent testés pour stabiliser et transporter ce médicament. Le principe est de conjuguer les groupements NAC sur les fonctions terminales du dendrimère à l'aide de liaisons disulfides^{215,216}. Lorsque la molécule est internalisée, le pont disulfide va se rompre et délivrer cet agent anti-inflammatoire. Cela a pu être observé sur des cellules microgliales où les molécules de NAC couplées au dendrimère induisent une activité anti-oxydante et anti-inflammatoire plus importante que la molécule libre²¹⁷. La biodistribution a été observée à l'aide d'un fluorochrome couplé au dendrimère. Le dendrimère PAMAM de 4^{ème} génération, de 5.4 nm et de potentiel zêta de -10.6 mV a démontré des activités anti-oxydatives et anti-inflammatoires dans un modèle de lapins nouveau-nés, atteints d'infirmité motrice cérébrale. Cette étude prouve que les dendrimères sont capables de délivrer des médicaments même dans les organes les plus difficilement accessibles comme le cerveau et d'induire l'effet désiré suivant la molécule transportée²¹⁸ (Figure 32).

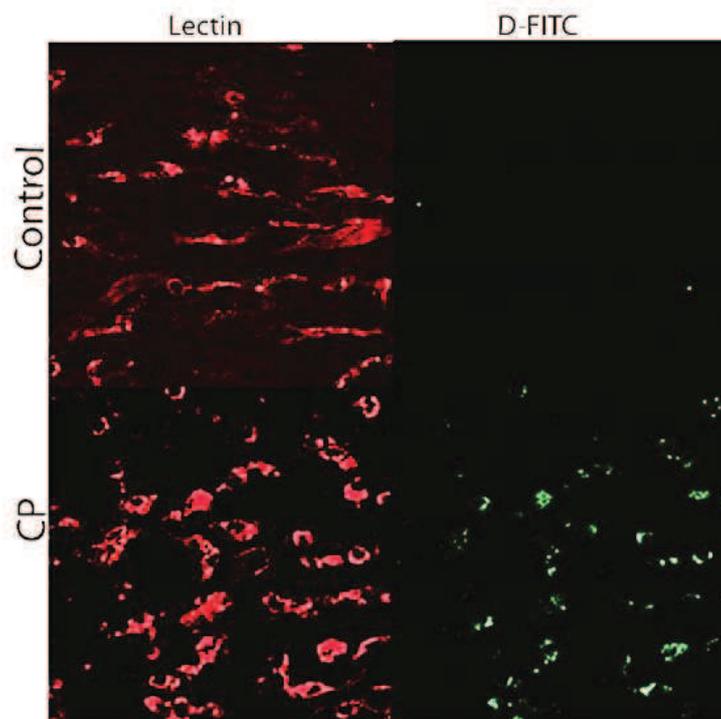


Figure 32 : Localisation d'un dendrimère PAMAM-FITC dans le cerveau de lapin nouveau-né atteints ou non d'infirmité motrice cérébrale (CP) après injection intra-veineuse²¹⁸.

IV.1.4 Les dendrimères utilisés en vaccination

Un champ d'application utilisant des dendrimères conjugués connaît de grandes avancées. Il s'agit des dendrimères utilisés comme agent de vaccination. L'idée d'utiliser ces molécules comme agent multivalent présentant des antigènes en surface a débuté dans les années 1988. Cette approche élaborée par J. Tam a été appelée MAP pour système de MultiPrésentation Antigénique. Il a utilisé un dendrimère composé de lysines et terminé par des groupements amines. Les groupements périphériques ont ensuite été décorés par des peptides de 9 à 16 acides aminés. 6 structures différentes ont permis d'induire la production d'anticorps chez la souris et le lapin⁴⁰.

Une seconde étude réalisée en 1997 par Cantacuzène utilisa l'antigène peptidique Tn greffé au bout d'une structure de lysine. L'antigène Tn est une entité glucidique présente au niveau des cellules tumorales. Cette synthèse fut finalisée en greffant trois entités Tn au bout de chaque fonction périphérique. Ce multi peptide va induire la production d'anticorps spécifiques anti-Tn. Cette réponse immunitaire adaptative permet aux animaux de se prémunir contre l'apparition de tumeurs²¹⁹.

L'utilisation d'un squelette glycosylé a permis l'utilisation de dendrimères au sein de vaccins. Le premier dendrimère utilisé en évaluation clinique de phase I dans un programme de vaccination fut publié en 2004. Ce dendrimère aux structures répétées polysaccharidiques présente en périphérie des motifs similaires à ceux de la capsule du virus Haemophilus influenzae de type b (Hib). L'inoculation à une cohorte d'une centaine d'enfants prouva que la molécule ne comportait pas de risque sanitaire et induisait une reconnaissance du système immunitaire à l'encontre du pathogène²²⁰. La présence de résidus sucrés dans les dendrimères est de nouveau retrouvée dans la vaccination ayant pour cible le virus du sida. Des dendrimères au squelette phosphoré développés dans l'équipe d'A.M. Caminade ont été testés comme adjuvant d'une réponse anti-VIH ciblant les cellules dendritiques. Des dendrimères cationiques comportant des atomes de phosphore dans leur structure ont été associés à des peptides anti-VIH. Ces dendrimères de générations 2 et 3 ont montré une capacité à délivrer ces peptides aux cellules dendritiques. Cependant, n'induisant pas la réponse immunitaire attendue, d'autres études doivent être réalisées²²¹.

IV.2 Dendrimères intrinsèquement bioactifs

IV.2.1 Dendrimères comme agents antibactériens

Les bactéries sont des organismes procaryotes d'une taille de quelques micromètres. Très présentes chez l'homme et principalement au niveau du colon, elles sont très utilisées en industrie pharmaceutique ou dans le domaine agro-alimentaire. Cependant, certaines bactéries produisent des substances toxiques pouvant induire des conséquences importantes sur l'économie ou sur l'hygiène. Ceci rend nécessaire l'utilisation de produits bactéricides.

Il existe deux types de bactéries qui diffèrent selon la structure de leur paroi. Les parois de toutes les bactéries sont composées de peptidoglycanes et de lectines. Cependant la présence ou non de membrane extérieure divise les bactéries en Gram négative ou positive respectivement²²² (Figure 33).

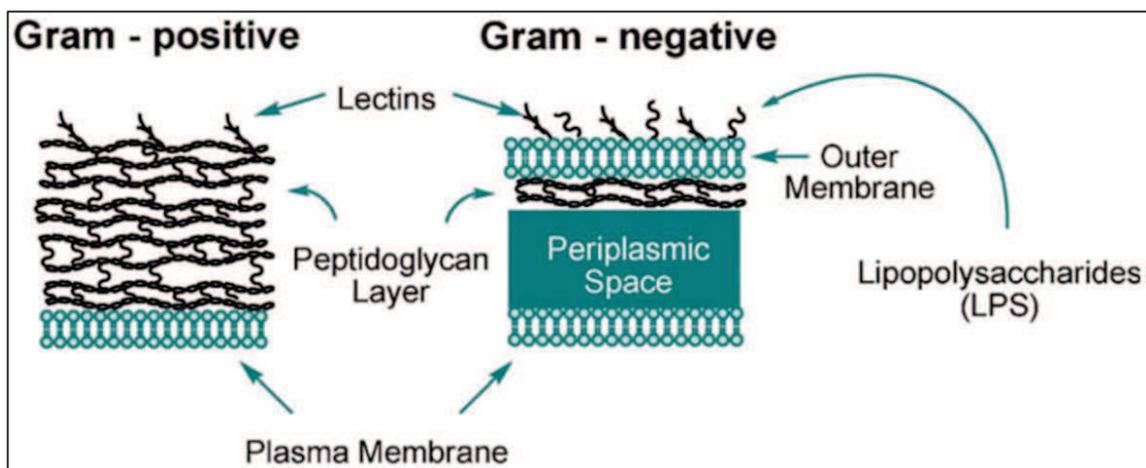


Figure 33 : Comparaison des parois cellulaires entre bactéries Gram-positives et Gram-négatives²²².

En 2000, l'équipe de S.L. Cooper utilisa comme support dendritique des dendrimères de type PPI. Les dendrimères utilisés vont de la génération 1 à la génération 4. A la génération 4, les dendrimères présentent des amines primaires en surface qui ont été transformées en 32 groupements ammonium quaternaires (QAC). L'effet bactéricide de ces dendrimères a été observé sur des bactéries Gram positive et négative. Ils ont démontré que cette activité était dépendante de la génération du dendrimère, de la taille des chaînes QAC ainsi que des contre ions amenant une charge différente²²³. En 2012, des résidus maltoses ont été greffés sur un

dendrimère de génération 4 à hauteur de 0 à 100% des groupements terminaux. Une activité microbicide a pu être observée pour tous les dendrimères dont le dendrimère PPI « nu ». Il est remarquable de noter que l'ajout des groupements maltose permet d'une part de préserver une activité bactéricide mais permet aussi de cibler un seul type de bactérie. L'ajout de ces résidus en surface permet aussi de diminuer la cytotoxicité des dendrimères PPI sur les cellules primaires²²⁴.

Des dendrimères de type PAMAM eux aussi comportant des terminaisons amines primaires ont montré des activités bactéricides en 2007. L'équipe de Chengzhi Cai a démontré qu'un dendrimère PAMAM de génération 5 avec des terminaisons NH₂ avait une activité bactéricide très importante aux alentours de 1 à 1.5 µg/mL. (PPI utilisés à 4 µg/mL). De plus, ce dendrimère PAMAM agit aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les Gram négatives. Cependant, le dendrimère induit une toxicité sur des cellules. Le greffage de groupements PEG a permis de diminuer cette cytotoxicité sur les cellules épithéliales, tout en préservant son activité bactéricide sur les bactéries gram négative. L'effet sur les bactéries de types Gram + n'est pas discuté dans cette publication²²⁵. En 2009, la même équipe synthétisa les dendrimères de générations 3 à 5. Le changement de génération n'induit pas d'augmentation de l'effet bactéricide. Cependant, l'ajout des terminaisons PEG est nécessaire pour réduire la cytotoxicité des molécules, proportionnellement à leur génération²²⁶. Pour résumer, ces études essayent d'optimiser le design des molécules afin de trouver l'équilibre entre activité et cytotoxicité.

Des dendrimères carbosilanes ont eux aussi été synthétisés présentant des groupements ammonium en surface. L'effet anti-bactérien a pu être observé sur les bactéries de type gram positive et négative avec un maximum d'effet observé pour les dendrimères de première et seconde génération^{227,228}. En 2014, des carbosilanes cationiques aux groupements terminaux NH₃, NMe et éthylalcool ont montré une activité anti-bactérienne en fonction de leur génération de 1 à 3. La présence proche de la surface, d'atomes de Soufre participe à cet effet²²⁹.

Des dendrimères phosphorés de génération 0 ou 1 constitués de viologènes ont été testés. Différents tests de cytotoxicité montrent l'innocuité de ces molécules envers certaines lignées cellulaires mais ils sont toxiques pour des cellules cancéreuses. Lorsqu'ils sont utilisés comme

agents antimicrobiens, tous les dendrimères montrent de bonnes aptitudes contre les bactéries de type Gram-positif. Certains dendrimères comportant un plus important nombre de groupements de surface positifs, limitent également la prolifération des bactéries Gram-négative²³⁰.

IV.2.2 Dendrimères ayant une activité antivirale

En 2013, il y avait 35 millions de personnes vivant avec le virus du sida dans le monde. Cette année-là, 2.1 millions de personnes ont été nouvellement infectées par ce virus. De nouveaux virus très virulents posent de nos jours des problèmes de santé mondiale. Le 27 octobre 2014, 13 703 cas du virus Ebola en Afrique ont été confirmés avec déjà près de 4900 morts avant 2015. Le développement d'outils antiviraux demeure donc à ce jour un enjeu majeur. Source UNAIDS.

Les dendrimères sont utilisés comme molécules antivirales contre certains virus en particulier. Les dendrimères anti-VIH sont les molécules les plus répandues dans la littérature. Ici, nous nous focaliserons sur ces dendrimères.

Ils peuvent agir à deux niveaux. Le premier en tant qu'inhibiteur d'adhésion et donc de pénétration du virus dans les cellules immunitaires. Les dendrimères peuvent aussi agir sur la réplication du virus en inhibant la production de nouveaux ARNs viraux. Rapidement, le virus VIH se fixe sur le récepteur CD4 des cellules immunitaires via sa protéine d'enveloppe appelée gp120. Des récepteurs de chimiokines CXCR4 et CXCR5 vont venir former un complexe avec CD4/gp120. La protéine gp41 du virus va ensuite induire l'internalisation du génome viral par fusion membranaire²³¹ (**Figure 34**).

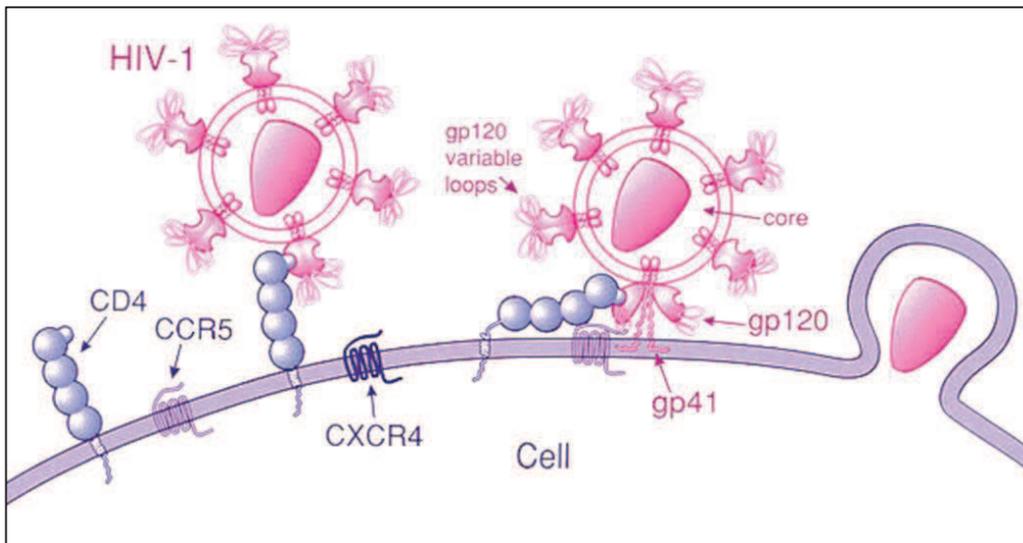


Figure 34 : Schéma de reconnaissance et de fixation du virus VIH-1.

En 2000, Pannecouque et son groupe décrivent une série de dendrimères PAMAM polycationiques. Deux d'entre eux, l'un fonctionnalisé par l'acide phényldicarboxylique et le second par l'acide naphthyldisulfonique, permettent d'inhiber la fixation entre le virus VIH et les cellules. Le second dendrimère a la capacité d'entrer par perméation dans les cellules MT-4 et d'induire une inhibition de la réplication du virus au sein de ces cellules²³².

Des dendrimères carboxyliques ont montré après des tests de modélisation et de biocompatibilité, une activité d'inhibition d'infection par le virus du sida. Cette étude montre l'importance de la structure interne où les molécules contenant des atomes de phénol au niveau du cœur se sont révélées plus toxiques²³³.

Des dendrimères phosphorés ont aussi été synthétisés comme agents anti-VIH. En 2005, des dendrimères cationiques de première et deuxième génération portant des groupements galactosylcéramides induisent une diminution de l'infection des cellules par le virus VIH²³⁴. Une seconde étude utilisant un support central phosphoré a été réalisée avec la présence au niveau des fonctions terminales de chaînes alkyle en C₃ et C₁₀. L'effet maximal a été observé pour le dendrimère comportant une chaîne alkyle en C₃²³⁵.

Une stratégie connue pour diminuer l'infection par le VIH est d'inhiber sa fixation avec un autre récepteur appelé DC-SIGN. Ce récepteur est présent à la surface de cellules appelées cellules dendritiques. Des glycodendrimères ont été synthétisés avec des valences différentes dans leur structure interne et des terminaisons carbohydrates ou glucidiques. L'affinité de ces

différents dendrimères a été observée par SPR et leur activité d'inhibition de l'infection observée in vitro sur des lignées cellulaires¹⁶⁹. Le dendrimère le plus développé comportant une fonction antivirale est commercialisé sous le nom de VivaGel par la firme australienne Starpharm. D'un point de vue chimique il s'agit d'un dendrimère composé d'une structure de poly-L-Lysine comportant 32 groupements amines en surface²³⁶ (Figure 35).

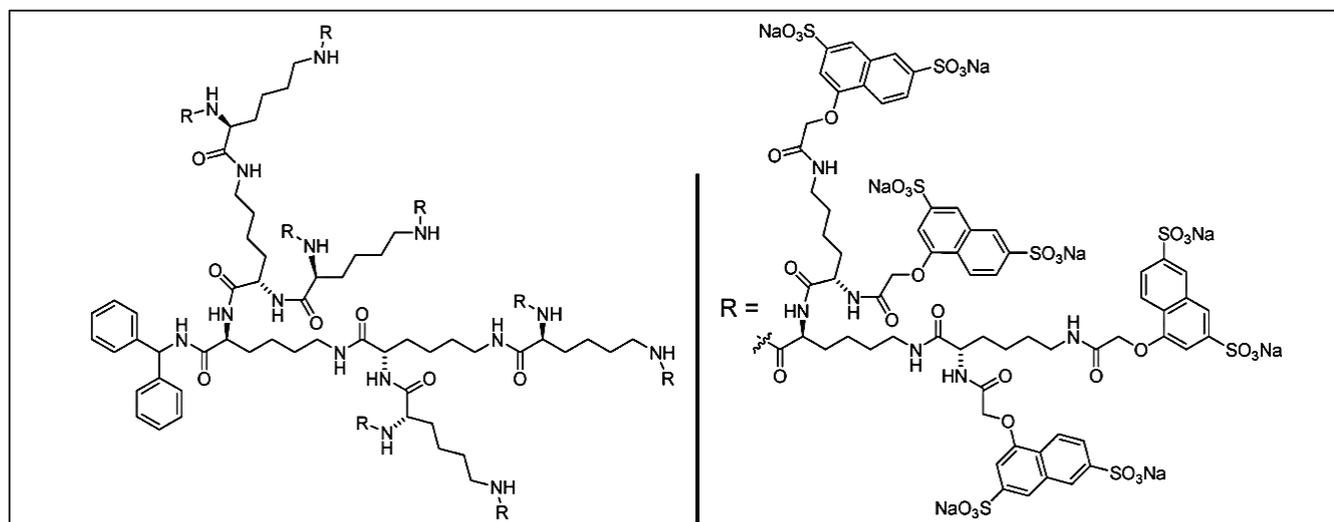


Figure 35 : Structure du dendrimère Vivagel²³⁶.

La molécule a ensuite été décorée par 32 groupements naphthalène. Ce dendrimère a été solubilisé dans un gel à pH physiologique compatible pour l'usage chez l'homme. Les études in vitro ont démontré une inhibition de l'infection du VIH et du virus de l'herpès dans plusieurs types cellulaires comme les macrophages humains, des cellules épithéliales etc...

Des études cytotoxiques et d'activité ont aussi été réalisées chez des modèles de macaques, permettant de développer cette molécule chez l'homme²³⁷.

D'autres études portant sur des virus moins virulents et plus banals ont aussi été menées. La première étape d'infection de certains virus comme celui de la grippe commence par la reconnaissance de résidus sialosides à la surface des cellules cibles. Des dendrimères comportant une structure composée de poly-L-lysine présentant des terminaisons d'acides sialiques ont montré une aptitude à inhiber l'hémagglutination des globules rouges par le virus de la grippe A²³⁸. Partant de cette observation, des dendrimères de types différents furent ensuite synthétisés avec ces groupements afin de limiter l'infection de cellules primaires par le virus de la grippe. Les auteurs ont pu conclure que leur fonction était liée à la génération et au nombre de groupements fonctionnels²³⁹.

IV.2.3 Dendrimères et maladies neurodégénératives

IV.2.3.a Anti prion

L'accumulation au niveau du cerveau d'un isoforme d'une protéine appelée Prion peut induire différentes pathologies comme la maladie de Creutzfeldt-Jakob chez l'homme ou des encéphalopathies spongiformes chez certains animaux comme les bovins. Cette protéine correspond à une variation de repliement de la protéine normale qui la rend résistante aux protéases induisant son accumulation. Des molécules ont été synthétisées dans le but d'éliminer ces accumulations protéiques.

En 1999, l'équipe de M. Scott et de S. Prusiner étudia la possibilité pour des dendrimères polyamines d'éliminer ces protéines anormales du prion in vitro. Au niveau de cellules de neuroblastomes (lignées cellulaires correspondant à des cellules du cerveau) produisant la forme anormale de la protéine du prion, l'utilisation de dendrimères polyamines permet leur élimination. Cet effet a été observé pour des dendrimères de différents types comme des PPI ou encore des PEI. De manière générale, les dendrimères présentant un grand nombre de groupements terminaux amines induisent le meilleur effet pour l'élimination des protéines, les générations 4 comportant l'effet maximum²⁴⁰. La suite de l'étude réalisée en 2001 démontre que les dendrimères PAMAM et PPI de génération 4 permettent d'éliminer la protéine en induisant leur dénaturation. Ils inhibent leur agrégation avec un ratio d'un dendrimère pour environ 30 protéines²⁴¹. De manière notable, un dendrimère phosphoré de 4^{ème} génération démontra une aptitude à inhiber l'accumulation de cette protéine in vivo, induisant une réduction de 88%²⁴². Des dendrimères de types PPI et des glycodendrimères démontrent aussi l'importance d'une forte densité de groupements réactifs en surface. Les dendrimères auraient la capacité de rendre moins stable la protéine anormale, la rendant protéolysable²⁴³.

IV.2.3.b Effets sur les plaques de peptides β -amyloïdes

Des protéines peuvent dans certaines pathologies comporter des changements structuraux induisant la formation d'agrégats protéiques. L'accumulation d'un peptide comme le peptide β -amyloïde peut s'organiser en plaques et créer des troubles neurologiques. L'inhibition de la

formation de ces plaques est une hypothèse envisagée dans le but de traiter la maladie d'Alzheimer.

L'inhibition de la formation de plaques formées par le peptide amyloïde a été observée en présence de dendrimère PAMAM de génération 3, comportant des fonctions amines primaires. Une modulation des plaques de peptide β -amyloïde a été observée avec ce dendrimère²⁴⁴. L'effet générationnel a aussi été observé, les plus grandes générations étant plus efficaces²⁴⁵. La même équipe en collaboration avec l'équipe de A.M. Caminade, a testé l'utilisation de dendrimères phosphorés cationiques de génération 3 et 4. Ils ont montré une capacité à diminuer l'agrégation des peptides amyloïdes, avec un effet différent suivant la génération et le nombre de groupements de surface²⁴⁶ (**Figure 36**). Il est aussi à noter que des dendrimères de types PPI et Poly-L-Lysine ont montré des effets similaires.

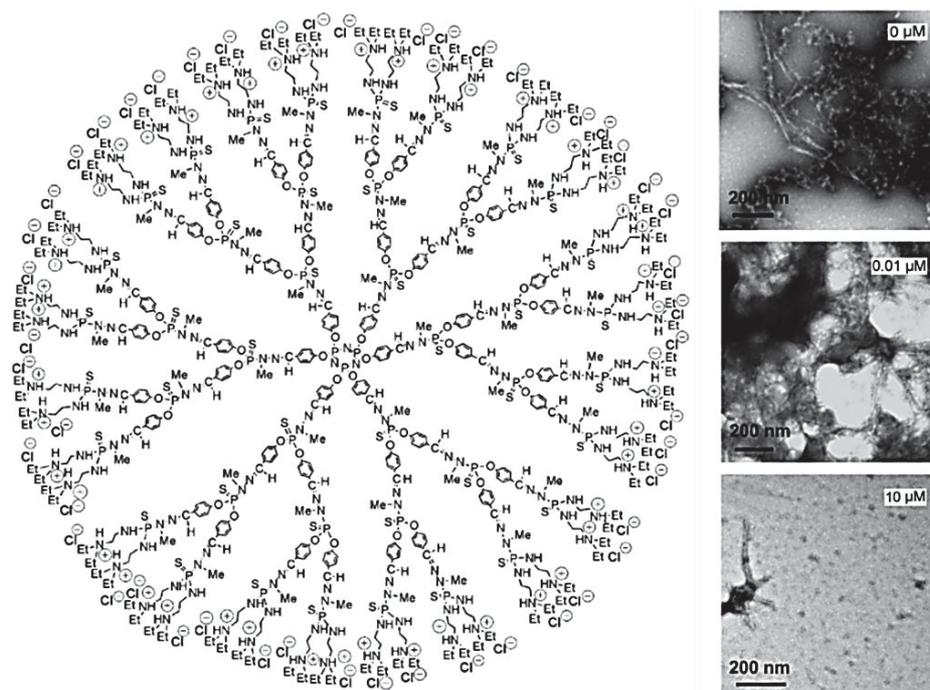


Figure 36 : Dendrimère phosphoré de génération 3 induisant une inhibition d'agrégation du peptide $A\beta_{1-28}$ (concentration de 0 à 10 μM)²⁴⁶.

IV.2.4 Dendrimère pro-inflammatoire

Un dendrimère de 2^{ème} génération de type carbosilane, déjà utilisé pour son affinité pour les acides nucléiques^{247,248} a été utilisé sur des macrophages et des lymphocytes T CD8. L'analyse globale de l'expression de ces cellules montre que le dendrimère induit une différence de différenciation des lymphocytes et une activation des macrophages^{104,249}. En 2014, la toxicité

des générations 1 à 3 de ce dendrimère a été testée sur des macrophages différenciés de monocytes humains. Le dendrimère de 3^{ème} génération a montré une toxicité sur les cellules. Seul les dendrimères de génération 1 et 2 ont un intérêt biologique. Le dendrimère de seconde génération permet d'induire une polarisation de type pro-inflammatoire chez les macrophages de type M2²⁵⁰.

IV.2.5 Dendrimères anti-inflammatoires

Une réaction inflammatoire correspond à une réponse immunitaire protectrice du corps contre une agression extérieure. Elle peut survenir après certains stress physiques (brûlures, blessures...) ou biologiques (infection de pathogènes...). Le type de réponse varie suivant la nature, le lieu et les effecteurs cellulaires de l'inflammation. Lorsqu'un trouble au niveau de cette réponse immunitaire existe avec par exemple une reconnaissance d'éléments du soi comme éléments étrangers ou encore par une réponse trop importante, des maladies inflammatoires peuvent se déclarer. Ces maladies peuvent se déclarer dans différents endroits du corps comme au niveau des articulations (Arthrite) ou encore du cerveau (sclérose en plaque). L'utilisation de médicaments anti-inflammatoires permet de réduire les effets de la maladie mais ne permettent pas sa guérison.

IV.2.5.a Dendrimères aux mécanismes d'action connue

En 2004, le groupe de S. Shaunak décrit l'utilisation d'un dendrimère anionique de type PAMAM et de génération 3,5 comme molécule immunomodulatrice. Neuf conjugués aminosaccharides de glucosamine et de glucosamine-6-sulfate (PAMAM-DG) ont été greffés sur les 64 groupements terminaux d'acides carboxyliques. Outre l'absence d'effets secondaires et de cytotoxicité sur différents types cellulaires, la culture de cellules immunitaires humaines en présence du dendrimère glucosamine permet de réduire leur réponse inflammatoire. Le dendrimère comportant les fonctions glucosamine-6-sulfate a quant à lui démontré une activité anti-angiogénique in vitro validée sur un modèle in vivo de glaucome chez le lapin, diminuant la production de tissu cicatriciel après chirurgie²⁵¹. Les auteurs ont émis l'hypothèse que le dendrimère agirait comme un inhibiteur du complexe de la réponse inflammatoire LPS-TLR2. Le complexe TLR4/MD-2 reconnaît spécifiquement un LipoPolySaccharide bactérien LPS et induit une réponse inflammatoire via les macrophages

principalement. La structure de ce complexe étant bien décrite, les auteurs ont voulu optimiser la molécule d'intérêt afin d'augmenter son effet et de réduire sa taille. De manière générale, les dendrimères de petite génération sont préférés et recherchés car ils comportent une meilleure biodistribution²⁵². De même, les dendrimères de grande taille présentent une plus grande rigidité²⁵³ ainsi qu'une toxicité plus importante⁷⁹. En 2011, ils décrivent une méthode couplant modélisation, synthèse chimique et tests biologiques afin de créer une molécule aux propriétés biologiques similaires. Ils inscrivent la taille, la flexibilité et la densité de charge comme critères à prendre en compte dans l'élaboration de la nouvelle molécule^{252,254}. Une molécule de 3.3 kDa de type PETIM (Polypropyletherimine) a été synthétisée et ses effets comparés au dendrimère PAMAM-DG de 13.6 kDa. Les effets de ces dendrimères furent observés sur un modèle d'infection bactérienne chez le lapin. Les deux molécules inhibent la production de cytokines pro-inflammatoires, préservant l'épithélium intestinal de dommages et limitant la prolifération du pathogène¹⁶³. Les effets de ce « baby-dendrimer » similaire à celui de 13.6 kDa, montrent la possibilité d'utiliser des dendrimères de tailles différentes. Ils démontrent ici l'adaptabilité de cette famille de molécules façonnables suivant l'organe à atteindre et les effets secondaires à éviter (**Figure 37**).

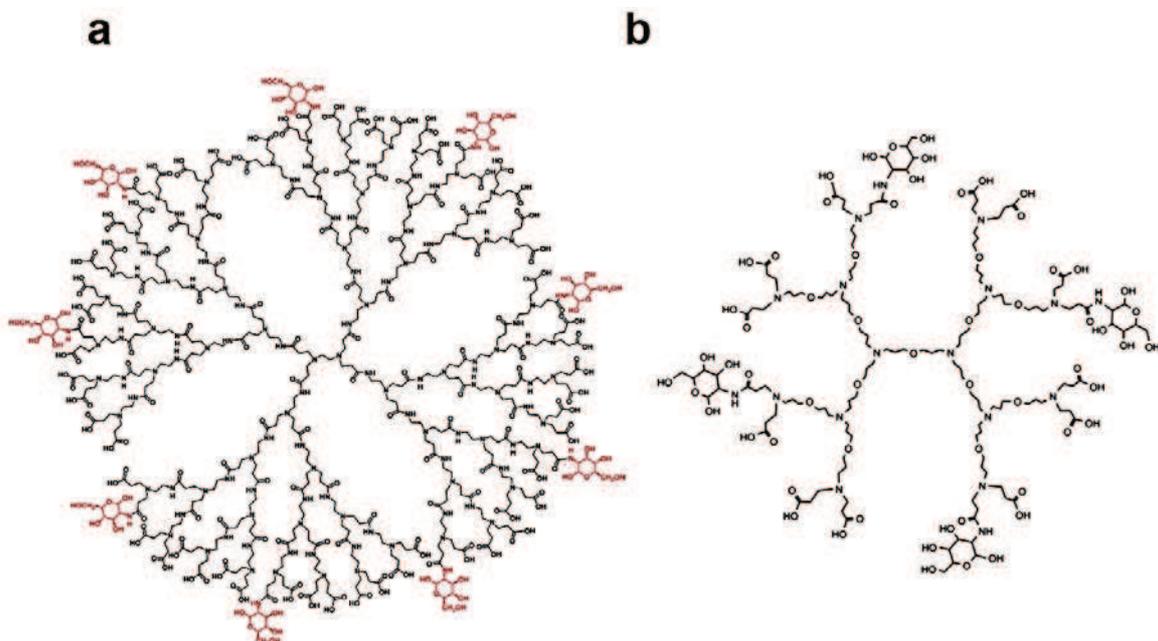


Figure 37 : Evolution du dendrimère développé par le groupe de S. Shaunak. (a) Structure du dendrimère PAMAM-DG en 2004²⁵¹ (b) Structure du dendrimère PETIM-DG¹⁶³.

Une équipe travaillant depuis quelques années sur des dendrimères de polyéthylène glycol a synthétisé des dendrimères se liant spécifiquement à des récepteurs appelés sélectines^{255,256}.

Ces récepteurs permettent à la cellule de reconnaître et d'adhérer aux cellules endothéliales présentes au niveau des vaisseaux sanguins et permettent l'extravasation vers un site d'action, comme une région inflammatoire. Une première étude utilisant des terminaisons de galactose a été réalisée montrant un blocage de ces selectines²⁵⁷. Dans l'idée d'optimiser leur molécule, de nouveaux dendrimères comportant un nombre différent de groupements de surface de type sulfate ont été réalisés. Ces groupements sulfates ont été choisis via l'action sulfate-dépendante d'un médicament agissant sur ces récepteurs, appelée héparine²⁵⁸. Des tests de fixation ont pu définir la molécule comportant l'affinité la plus forte envers ces récepteurs. L'importance de la taille, du degré de sulfatation de la molécule ainsi que l'importance de sa multivalence a été notée. Des tests chez des souris atteintes de dermatite ont pu confirmer leur effet anti-inflammatoire²⁵⁹ (**Figure 38**).

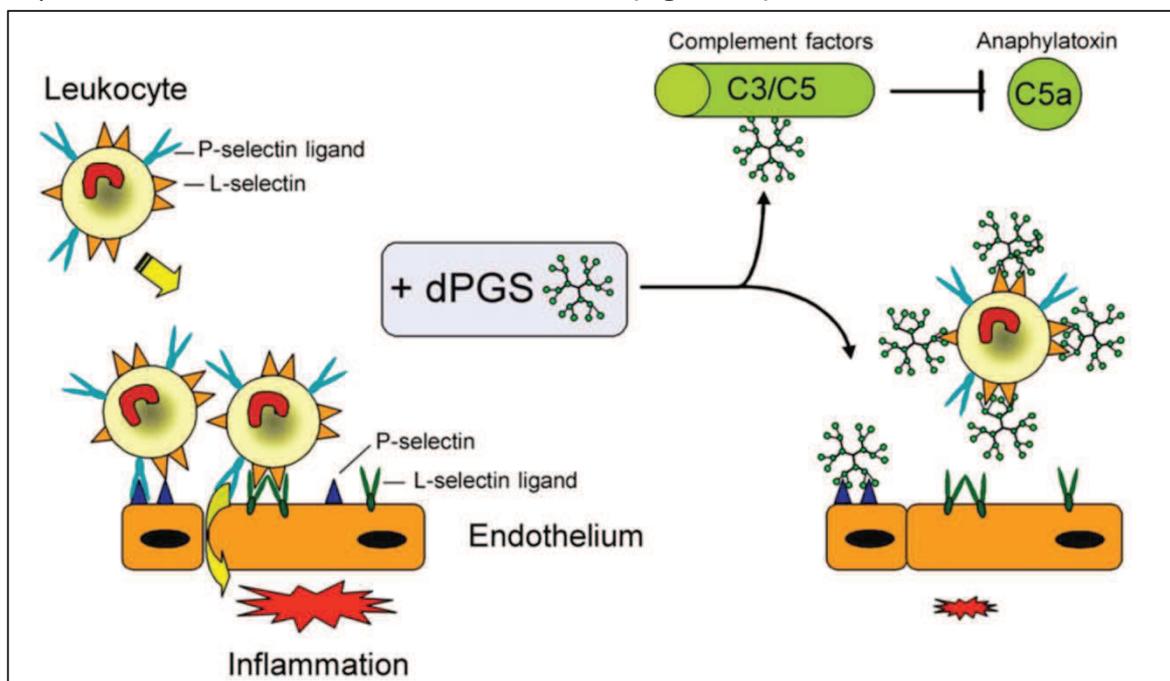


Figure 38 : Effets inhibiteurs du dendrimère Polyglycérol Sulfate (dGPS) sur l'extravasation leucocytaire et la production d'anaphylatoxines C5a²⁵⁹.

Synthétisant des dendrimères de taille, de charge ou de poids moléculaire différents, les auteurs induisent une variation de leur internalisation et de leur biocompatibilité²⁶⁰. Un second dendrimère de type PEO avait aussi été synthétisé dans le but d'inhiber l'action de ces L et P-selectines utilisant des terminaisons SO₃ greffées sur des terminaisons saccharidiques. Ces dendrimères ont montré une activité anti-inflammatoire, génération et valence dépendante. Le dendrimère actif était un dendrimère de seconde génération²⁶¹. Une molécule

utilisable en imagerie a été synthétisée à partir de ce dendrimère polyglycérol à terminaisons sulfatées ciblant les tissus inflammatoires in vivo²⁶².

D'autres comparaisons existent quant aux rôles de la génération et des fonctions terminales des dendrimères. Des glycodendrimères comportant un cœur amide et des branches triazoles, synthétisés par click chemistry ont montré une activité anti-inflammatoire dose et génération dépendante via l'inhibition de la lyse des érythrocytes²⁶³.

Des dendrimères ont été synthétisés dans le but de mimer une structure bioactive capable d'activer un récepteur de cellules dendritiques appelé DC-SIGN. Ces dendrimères construits à partir d'unités de poly(phosphorhydrazone) présentent des mannoses en périphérie. Les dendrimères de générations 1 à 4 ont été testés. Les affinités pour le récepteur cible ainsi que les effets anti-inflammatoires in vivo les plus importants ont été observés pour les molécules de plus grande génération 3 et 4 comportant deux ou trois groupements mannoses sur chaque fonction de surface²⁶⁴. Sur un modèle de pancréatite chez la souris, ce sont de nouveau des dendrimères PAMAM de génération 4.5 et 5 qui ont démontré un effet protecteur anti-inflammatoire²⁶⁵.

IV.2.5.b Effets idiopathiques

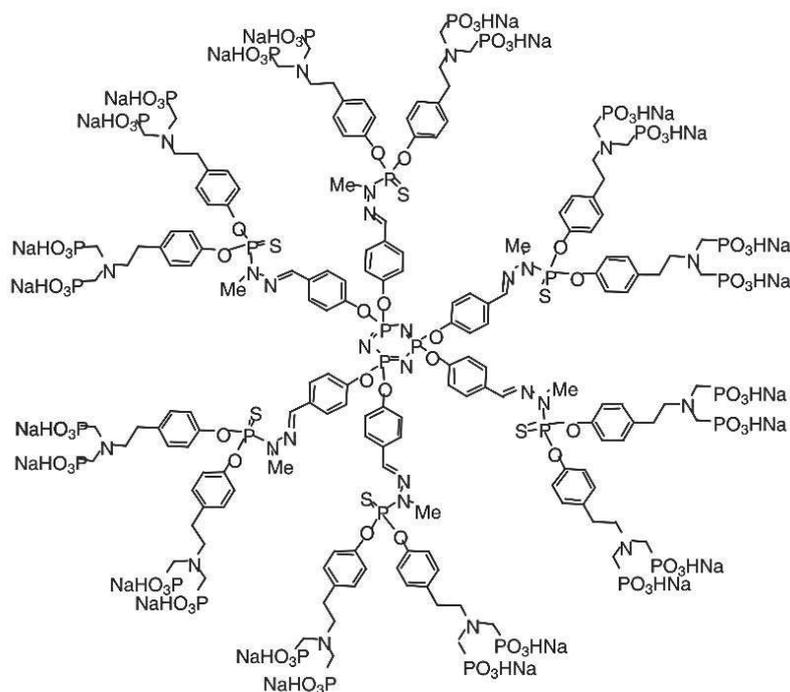
Un dendrimère utilisé pour solubiliser et délivrer une drogue appelé indométacine^{266,267} a démontré des propriétés immunomodulatrices par lui-même. Cette molécule de type PAMAM de 4^{ème} génération comprend des groupements de surface amines ou hydroxyles. L'effet anti-inflammatoire a été observé de manière fortuite lors d'une étude utilisant le dendrimère seul, le médicament seul et le complexe dendrimère-indométacine²⁶⁸. Une inhibition de médiateurs pro-inflammatoires comme les cycloxygénases 1 et 2 (COX-1, COX-2), enzymes amplifiant l'inflammation, a été observée sur des macrophages. Cependant, les mécanismes d'actions de ce dendrimère demeurent inconnus.

IV.2.5.c Le dendrimère ABP ou AzaBisPhosphonate

Historique

En 2006, un dendrimère de première génération a été nommé ABP pour ses fonctions terminales AzaBisPhosphonates (**Figure 39**). Le dendrimère ABP est utilisé pour ses effets

immuno-modulateurs et a été comparé à un nombre important de dendrimères phosphorés comportant des cœurs, des branches ou des groupements de surface différents. Aucun d'entre eux n'a montré d'effets similaires¹⁶⁶. Il induit principalement une activation anti-



inflammatoire des monocytes humains²⁶⁹.

Figure 39 : Structure du dendrimère ABP²⁷⁰.

Des phosphoantigènes ont la capacité d'activer un sous-groupe de lymphocyte T circulant²⁷¹. Le groupement pyrophosphate présent sur ces antigènes joue un rôle central dans leur action. L'idée était alors de présenter ce groupement pyrophosphate de manière multivalente en surface de structures dendritiques. Ne pouvant pas réaliser la synthèse d'une molécule présentant ces groupements, des dendrimères avec des groupements aza(mono/bis)phosphonates furent testés⁴⁴. Sur la base d'un cœur cyclotriphosphazène, le nombre de groupements de surface fut varié avec la synthèse de dendrimères de première génération comportant de 4 à 24 phosphonates en surface. En 2008, notre équipe a montré que le dendrimère ABP devait être composé d'au moins 4 branches complètes afin d'induire un effet anti-inflammatoire sur les monocytes humains (**Figure 40**)²⁷². Cette étude a permis la synthèse de nouvelles molécules dérivées du dendrimère ABP où l'une des 6 branches a été remplacée par des groupements fonctionnels de type fluorochrome ou biotine permettant certaines expériences biologiques.

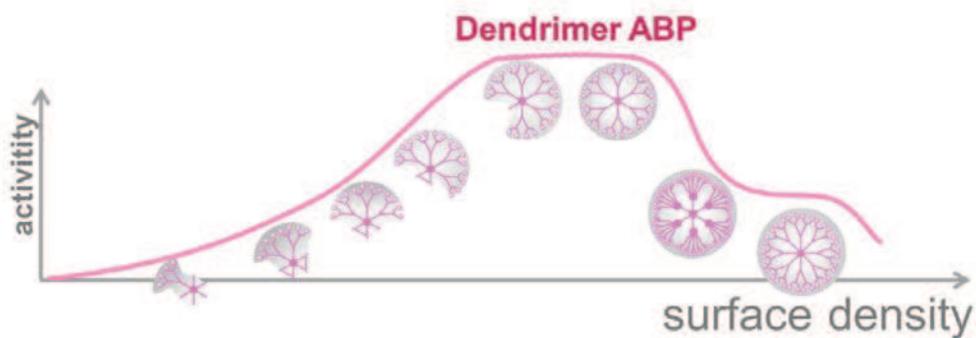


Figure 40 : Figure tirée d'un poster de C.O. Turrin, montrant l'activité anti-inflammatoire du dendrimère ABP sur les monocytes humains en fonction du nombre de branches.

Le dendrimère ABP agit également sur d'autres types de cellules immunitaires humaines. Il induit une baisse de la prolifération cellulaire des lymphocytes T CD4 humains¹⁰³. A l'inverse, il permet d'augmenter celle des cellules Natural Killers (NKs)²⁷³. Il induit également l'inhibition de la maturation des cellules dendritiques en réponse à un facteur bactérien pro-inflammatoire²⁷⁴.

Notre équipe s'est plus particulièrement intéressée à l'effet du dendrimère ABP sur les monocytes. Une étude *pan-génomique* montre que le dendrimère ABP induit une surexpression de gènes synonymes d'une réponse anti-inflammatoire des monocytes humains²⁶⁹. Cet effet anti-inflammatoire a pu être appliqué à des modèles de souris atteintes de polyarthrite rhumatoïde. Le dendrimère ABP permet de réduire de manière globale la maladie chez ces rongeurs en ciblant aussi bien le niveau inflammatoire que la dégradation osseuse²⁷⁰. Toujours au niveau *in vivo*, ce dendrimère induit une diminution de l'inflammation chez des rats atteints d'uvéïte. Son effet est d'ailleurs comparable au traitement à la dexaméthasone, traitement standard pour cette pathologie²⁷⁵. En vue d'un développement clinique chez l'homme, des tests de toxicité ont été réalisés sur un modèle de primate. Cette étude où le dendrimère ABP est administré en intraveineuse de manière répétée chez ces animaux n'induit pas de toxicité ou d'effets secondaires visibles. Des tests complets biochimiques, hématologiques, immunologiques et physiologiques ont pu paramétrer et attester de l'innocuité de la molécule dans ce modèle⁸².

Dans le cadre d'une application ultérieure chez l'homme, la compréhension des mécanismes impliqués dans la réponse cellulaire au dendrimère ABP est indispensable sur plusieurs points. Cela permet de prévoir des effets secondaires non visibles sur des modèles animaux dus par

exemple à la barrière de l'espèce. Cela permettrait de prévoir des complications de traitements à long terme ou encore de pouvoir cibler d'autres pathologies.

Si l'on se focalise sur les mécanismes moléculaires déjà décrits dans la littérature afin d'expliquer l'effet du dendrimère ABP, plusieurs expériences peuvent être relevées.

Mécanismes moléculaires

Il est possible de réaliser un tableau des différents effets observés d'un point de vue morphologique, d'activation cellulaire ou de fixation. Ces mécanismes moléculaires ont déjà été étudiés sur différents types cellulaires. Ces résultats sont résumés en **Table 2**.

Année	Modèle/Cellules	Types de mécanismes observés	Détails
2006 ¹⁶⁶	Humain/Monocytes	Fixation et internalisation	Fixation rapide en quelques secondes suivie d'une internalisation rapide en quelques minutes. Fixation cellulaire pouvant être déplacée par ajout d'ABP froid. Suit la voie phagolysosomale après internalisation.
		Activation cellulaire	Augmentation de la taille et de la granulosité des monocytes. Relocalisation nucléaire du facteur de transcription NF-KB. Diminution de l'expression cellulaire des marqueurs CD14 et HLA-DR
		Phagocytose	Augmente la capacité de phagocytose.
		Apoptose	Induit la survie cellulaire.
		Récepteur	TLR2 participe à la reconnaissance d'ABP.
2009 ²⁶⁹	Humain/Monocytes	Activation cellulaire	78 gènes surexprimés, 62 sous-exprimés. Surexpression d'ARNm de gènes anti-inflammatoires: MRC1, IL1-RN, IL-10, CCL18, CD23, CCL5 Expression du récepteur MRC1 augmentée.
2009 ¹⁰³	Humain/LT CD4	Fixation	Fixation spécifique sur les LT CD4 ⁺ (Kd = 5.07 µM). Compétition avec le dendrimère ABP froid.
	Humain/LT CD8	Fixation	Fixation spécifique (Kd = 0.54 µM).
	Humain/NKs	Fixation	Fixation spécifique (Kd = 2.83 µM).
2011 ²⁷⁰	Souris/Précurseurs d'ostéoclastes	Activation cellulaire	Inhibition de leur différenciation en ostéoclastes.
	Souris/Monocytes	Activation cellulaire	Diminution de l'expression protéique de c-FMS, RANK et NFATc1. Diminution de l'expression de l'ARNm de c-FMS.
	Humain/Monocytes	Activation cellulaire	Diminution de l'expression protéique de c-FMS, RANK et NFATc1.
	Humain/DC	Activation cellulaire	Inhibition de leur différenciation en ostéoclastes.

Table 2 : Description de mécanismes moléculaires et cellulaires d'ABP sur différents types cellulaires.

Au vue des différents mécanismes cellulaires observés depuis 2006, différentes hypothèses sur la présence d'un récepteur spécifique au dendrimère ABP ont été émises. Quelques récepteurs ont déjà été testés comme les couples TLR1/TLR2 ou TLR2/TLR6¹⁶⁶. D'autres noms de récepteurs ont aussi été proposés comme le récepteur à la sphingosine-1-Phosphate pouvant réguler la prolifération des lymphocytes T¹⁰³. Cependant jusqu'à présent, aucune piste majeure ne fait consensus. La présence d'un récepteur spécifique au dendrimère ABP est néanmoins probable sur les monocytes humains du fait d'une fixation rapide en quelques secondes, de son internalisation en quelques minutes et de l'amplitude de la réponse cellulaire. Le but de cette thèse est d'étudier le type d'interaction de cette molécule synthétique sur les monocytes humains. Il a fallu tout d'abord déterminer les paramètres physico-chimiques définissant ce dendrimère, comprendre l'importance des groupements AzaBisPhosphonates impliqués dans l'interaction cellule/dendrimère et enfin définir le type de fixation du dendrimère ABP pour ces cellules.

Nos travaux dans ces domaines sont présentés dans les chapitres suivants.

Objectifs de travail

Les maladies inflammatoires chroniques telles que le psoriasis, la sclérose en plaque ou encore l'arthrite rhumatoïde sont des maladies très répandues. Par exemple, la polyarthrite rhumatoïde touche 0.3 % de la population en France. Les solutions curatives sont encore limitées et de nouvelles avancées thérapeutiques sont nécessaires pour le traitement de ces pathologies.

La nanomédecine est une science récente. Elle utilise des objets de taille nanométrique pour traiter différentes pathologies. La synthèse de ces composés est complexe. Il est souvent nécessaire de combiner plusieurs types d'objets nanométriques comme de petites molécules, des macromolécules ou des nanoparticules pour obtenir l'effet désiré. Cet effet peut être parfaitement contrôlé mais peut également provoquer des effets secondaires.

Parmi ces nano-objets, une famille de molécules globulaires à la structure dendritique parfaitement définie appelée dendrimère a participé et participe au développement de la nanomédecine. Le nombre de dendrimères comportant une activité propre reste cependant restreint. Si l'on se focalise sur les composants de cette famille démontrant une activité anti-inflammatoire par eux-mêmes, moins d'une dizaine de molécules ont été décrites.

Dans notre équipe, un grand nombre de dendrimères basés sur la chimie du phosphore ont été synthétisés. Les dendrimères phosphorés de type Poly(PhosphorHydrazone) (PPH) peuvent, par l'intermédiaire d'une grande diversité de groupements de surface, interagir avec des composants du domaine du vivant comme les virus ou encore l'ADN. Parmi ceux-ci, un dendrimère nommé ABP pour ses fonctions terminales AzaBisPhosphonates, a montré des effets immunomodulateurs. Cette molécule comporte des propriétés activatrices envers les monocytes humains. Une étude *pan*-génomique a prouvé que le dendrimère ABP induit une réponse anti-inflammatoire des monocytes humains. Cet effet anti-inflammatoire a pu être observé chez des modèles de souris atteintes de polyarthrite rhumatoïde. Le dendrimère ABP permet de réduire de manière globale la maladie chez ces rongeurs en ciblant aussi bien le niveau inflammatoire que la dégradation osseuse. Les effets cellulaires de ce composé ont été bien décrits par notre équipe. Une fixation rapide en quelques secondes suivie d'une internalisation sur les monocytes humains a même été observée. Cependant, les mécanismes moléculaires ainsi que les types d'interactions permettant à ce dendrimère phosphoré d'induire une activité sur ces cellules immunitaires restent inconnus.

L'objectif de ce travail a tout d'abord été d'identifier le type de fixation entre le dendrimère ABP et les monocytes humains. Pour cela, un dendrimère comportant des groupements isostères AzaBisCarboxylates a été synthétisé. Ce dendrimère nous permet d'avoir deux molécules aux caractéristiques physico-chimiques très proches, où seuls les phosphores des groupements de surface ont été remplacés par des carbones. Des analyses comparatives entre ces deux molécules par des expériences de DSC et de modélisation moléculaires nous ont permis d'observer leur interaction avec une bicouche lipidique. La synthèse de leurs analogues fluorescents a permis des analyses biologiques. Le but de ces expériences sur les monocytes humains, a été de créer un protocole issu de techniques de pharmacologie afin de pouvoir isoler les différents paramètres impliqués dans l'interaction entre ces molécules synthétiques et ces cellules immunitaires. Les reconnaissances dites spécifique ou non spécifique suivant que la molécule soit reconnue ou non, peuvent être alors mesurées.

La suite de ce travail a porté sur la recherche d'un ou de récepteurs au dendrimère ABP. Connaître le récepteur sur lequel une molécule se fixe permet de mieux connaître les effets cellulaires qu'il engendre et ainsi de mieux prévoir ses effets secondaires potentiels. Un dendrimère ABP biotinylé a été utilisé pour purifier les protéines membranaires se liant spécifiquement au dendrimère. Pour cela, des expériences d'isolement de fractions membranaires de monocytes humains en conditions non dénaturantes ont été réalisées. Les analyses protéomiques couplés à cette purification permettrait de découvrir le complexe fixant le dendrimère ABP, par lequel il induit cette réponse cellulaire.

Enfin, l'expertise de notre équipe obtenue au sujet des dendrimères par 10 ans d'applications biologiques, nous permettent de cribler de nouvelles molécules. Neuf nouvelles molécules de générations 1 à 3 avec des groupements de surface différents ont pu être testées. A travers des expériences de cytotoxicité, d'analyses morphologiques ou des réponses pro ou anti-inflammatoires des monocytes humains, les effets de ces différentes molécules ont pu être comparés.

De la synthèse chimique de nouveaux dendrimères jusqu'à leur application sur des cellules humaines purifiées, ce travail permet de mettre en évidence le travail nécessaire à la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques. Ce travail a également pour but de comprendre la spécificité d'action d'un candidat médicament nommé ABP en vue d'une possible application ultérieure chez l'humain.

Résultats



Cite this: DOI: 10.1039/c5nr03884g

Interaction studies reveal specific recognition of an anti-inflammatory polyphosphorhydrazone dendrimer by human monocytes†

Jérémy Ledall,^{a,b} Séverine Fruchon,^{a,b} Matteo Garzoni,^c Giovanni M. Pavan,^c Anne-Marie Caminade,^b Cédric-Olivier Turrin,^{*b} Muriel Blanzat^{*d} and Rémy Poupot^{*a}

Dendrimers are nano-materials with perfectly defined structure and size, and multivalency properties that confer substantial advantages for biomedical applications. Previous work has shown that phosphorus-based polyphosphorhydrazone (PPH) dendrimers capped with azabisphosphonate (ABP) end groups have immuno-modulatory and anti-inflammatory properties leading to efficient therapeutic control of inflammatory diseases in animal models. These properties are mainly prompted through activation of monocytes. Here, we disclose new insights into the molecular mechanisms underlying the anti-inflammatory activation of human monocytes by ABP-capped PPH dendrimers. Following an interdisciplinary approach, we have characterized the physicochemical and biological behavior of the lead ABP dendrimer with model and cell membranes, and compared this experimental set of data to predictive computational modelling studies. The behavior of the ABP dendrimer was compared to the one of an isosteric analog dendrimer capped with twelve azabiscarboxylate (ABC) end groups instead of twelve ABP end groups. The ABC dendrimer displayed no biological activity on human monocytes, therefore it was considered as a negative control. In detail, we show that the ABP dendrimer can bind both non-specifically and specifically to the membrane of human monocytes. The specific binding leads to the internalization of the ABP dendrimer by human monocytes. On the contrary, the ABC dendrimer only interacts non-specifically with human monocytes and is not internalized. These data indicate that the bioactive ABP dendrimer is recognized by specific receptor(s) at the surface of human monocytes.

Received 12th June 2015,
Accepted 29th July 2015

DOI: 10.1039/c5nr03884g

www.rsc.org/nanoscale

1 Introduction

Dendrimers are non-linear, hyperbranched, and multivalent polymers that have enriched the fields of nanobiology and nanomedicine.¹ Indeed, the control of their size and structure during the synthesis affords tunable isomolecular compounds. Dendrimers are built starting from a central core to which are linked one or several series of radial monomers (the so-called

branches). Each monomer ends with a point of divergence, enabling the dendritic growth of the molecule by addition of the next generation of branches. The synthesis ends with the addition of functional groups at the outermost series of branches. The multivalency of dendrimers is a fundamental property for biomedical applications as polyvalent interactions are ubiquitous in biology.² Therefore, it was commonly thought that the chemical composition and the number of the surface groups were the key determinants of the bioactivity of dendrimers. However, six Critical Nanoscale Design Parameters (CNDPs) for dendrimers (size, shape, surface chemistry, flexibility/rigidity, architecture, and elemental composition) have been proposed recently.³ It is worth noting that among the CNDPs, at least three (size, flexibility/rigidity, and architecture) are directly related to the internal dendritic structure. Recently we have demonstrated unambiguously that the dendritic scaffold is not an inert carrier of the surface groups of the molecules as the overall three-dimensional conformation induced by the entire structure (including the core and the branches) is crucial for the efficiency of dendrimer

^aINSERM, UMR1043, CNRS, U5282, Université de Toulouse, UPS, Center of Physiopathology of Toulouse-Purpan, CHU Purpan, BP 3028, Toulouse F-31300, France. E-mail: remy.poupot@inserm.fr

^bCNRS, UPR 8241, Université de Toulouse, UPS, INPT, Laboratoire de Chimie de Coordination, 205 route de Narbonne, BP 44099, Toulouse F-31077, France. E-mail: cedric-olivier.turrin@lcc-toulouse.fr

^cDepartment of Innovative Technologies, University of Applied Sciences and Arts of Southern Switzerland, Galleria 2, Manno 6928, Switzerland

^dLaboratoire IMRCP, CNRS UMR 5623, Université de Toulouse, UPS, 118 route de Narbonne, Toulouse F-31062, France. E-mail: blanzat@chimie.ups-tlse.fr

†Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5nr03884g

nanodrugs.⁴ For example, to increase the ability of the dendrimer to establish multivalent interactions, the number of surface groups is not the unique important variable, but it is essential that the dendrimer can re-orient and gather the surface functionalities to increase the density of active groups. This clearly pertains to the flexibility/rigidity of the internal scaffold, and to the overall conformation that the dendrimer assumes in the solvent. In particular, Poly(PhosphorHydrazone) (PPH) dendrimers ending with phosphonate groups have the required directional conformation which enables their immuno-modulatory properties toward the human immune system *in vitro*.^{5–9} Moreover, the anti-inflammatory properties of a first generation PPH dendrimer functionalized at its surface with twelve azabisphosphonate groups (dendrimer **1**, Fig. 1) have been challenged *in vivo* in animal models of chronic and acute inflammatory diseases. The dendrimer **1** has proven its efficacy in rodent models of both experimental arthritis (chronic disease)¹⁰ and endotoxin-induced uveitis (acute disease).¹¹ This unique molecule is a promising drug-candidate for the treatment of inflammatory diseases in human¹² as it does not show any general or immunological sub-chronic toxicity in a non-human primate model after repeated intravenous injections.¹³ Among human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC), we have shown that the dendrimer **1** primarily targets monocytes and activates them toward an anti-inflammatory pathway.^{5,6}

Herein, by combining chemistry with computational, physicochemical, and biological studies, we disclose new results related to the understanding of the interactions between the dendrimer **1** and human monocytes *in vitro*. The physicochemical and biological behavior of dendrimer **1** has been compared to those of an isosteric analog bearing twelve azabisphosphonate groups (dendrimer **2**, Fig. 1) which had been synthesized previously.¹⁴ In a first step, computational analyses has provided the molecular description of the non-specific adsorption of both dendrimers on a phospholipidic bilayer. Then, physicochemical studies have confirmed the computational assessments, showing very weak non-specific interactions of both dendrimers with models of phospholipidic bilayers. In a last step, biological experiments have shown that, contrary to dendrimer **1**, dendrimer **2** is unable to activate human monocytes *in vitro*. On the same track, experimental biochemical studies have indicated that dendrimers **1**

and **2** have different abilities to bind to human monocytes *in vitro*, resulting in the internalization of the former, unlike the latter.

2 Materials and methods

2.1 General procedures

All reactions were carried out in the absence of air using standard Schlenk techniques and vacuum-line manipulations when carried out in organic solvents. Commercial samples were used as received. All solvents were dried and distilled according to routine procedures before use. Thin layer chromatography was carried out on Merck Kieselgel 60F254 pre-coated silicagel plates. Preparative chromatography was performed on Merck Kieselgel. ¹H, ¹³C, ³¹P NMR, HMQC and HMBC measurements were performed on Bruker ARX 250, DPX 300, AV 400 and AV 500. Coupling constants are reported in Hz and chemical shifts in ppm/TMS for ¹H and ¹³C. Chemical shifts for ³¹P spectra are calibrated with phosphoric acid as an external reference. The first-order peak patterns are indicated as s (singlet), d (doublet), t (triplet), and q (quadruplet). Complex non-first-order signals are indicated as m (multiplet). ¹³C NMR signals were assigned using HMQC and HMBC sequences when required. The numbering used for NMR assignment is depicted in Scheme 1. The following compounds have been prepared according to the published procedures: julolidine-cored dendrimer **3**,¹⁵ dendrimer **1**,⁹ dendrimer **2**,¹⁴ and dendrimer **6**.¹⁵ The preparation of the *tert*-butoxy-protected aminobiscarboxylate phenol derived from tyramine was adapted from the described procedure.¹⁴

Dendrimer 7. To a solution of dendrimer **3** (200 mg, 0.104 mmol) in THF (10 mL) was added aminobis(*tert*-butyl acetate)tyramine¹⁴ (416 mg, 1.14 mmol) and cesium carbonate (708 mg, 2.17 mmol). The solution was stirred and maintained at room temperature (RT) for 72 h. The supernatant was centrifuged, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The resulting crude material was diluted in THF (1 mL) and precipitated with a large amount of pentane (150 mL). The suspension was stirred for 1 h at RT then the supernatant was removed by filtration. This step was repeated 5 times to afford dendrimer **7** as a yellow powder (420 mg, 65%).

³¹P-{¹H} NMR (CDCl₃, 202.5 MHz): δ = 8.38 (s, N₃P₃); 63.11 (s, P=S); 63.22 (s, P=S).

¹H NMR (CDCl₃, 500.3 MHz): δ = 1.45 (s, 180H, O-CH₃); 1.95 (m, 4H CH₂-CH₂-CH₂-N); 2.75 (m, 24H, Ph-CH₂-CH₂-N and CH₂-CH₂-CH₂-N); 2.92 (m, 22H, Ph-CH₂-CH₂-N and CH₂-CH₂-NH); 3.29 (s, 19H, N-CH₃ and CH₂-CH₂-CH₂-N);

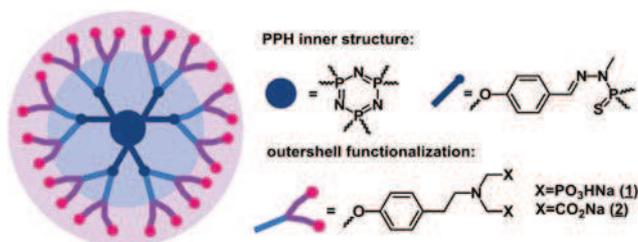
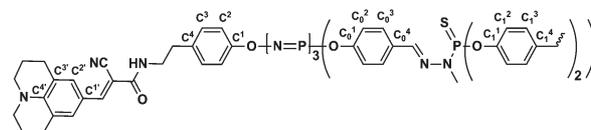


Fig. 1 Structure of dendrimers **1** and **2**. Complete two-dimensional structures of dendrimers **1** and **2** are given in Fig. S1.†



Scheme 1 Numbering scheme for NMR assignments.

3.45 (s, 42H, N-CH₂-CO and CH₂-CH₂-NH); 6.94–7.12 (m, 54H, C²-H, C₀²-H, C³-H, C₁²-H, C₁³-H); 7.41 (s, 2H, C^{2'}-H); 7.61–7.66 (m, 15H, CH=N and C₀³-H); 7.95 (s, 1H, HC=C-CN).

¹³C{¹H} (CDCl₃, 125.8 MHz): δ = 21.2 (s, CH₂-CH₂-CH₂-N); 27.6 (s, CH₂-CH₂-CH₂-N); 28.2 (s, O-CH₃); 33.0 (s, N-CH₃); 34.2 (s, Ph-CH₂-CH₂-N and CH₂-CH₂-NH); 41.5 (s, CH₂-CH₂-NH); 50.1 (s, CH₂-CH₂-CH₂-N); 56.0 (s, N-CH₂-CO, and Ph-CH₂-CH₂-N); 77.0 (t, O-CH₃); 80.9 (s, C(CH₃)₃); C≡N signal could not be observed; 120.7 (s, C₀² and C³); 121.3 (m, C₁²-H and C²); 128.2 (s, C₀³-H); 129.8 (s, C₁³-H); 131.0 (s, C³); 132.1 (s, C₀⁴, C¹ and C^{2'}); 135.7 (s, C⁴); 137.1 (s, C₁⁴-H); 138.7 (broad s, CH=N); 147 (s, C⁴); 148.9 (d, C₁¹); 151.2 (broad s, C₀¹ and C¹); 152.2 (s, HC=C-CN); 170.6 (s, CO₂) ppm.

Dendrimer 8. Dendrimer 7 (300 mg, 0.058 mmol) was solubilized in a solution of TFA (20% in dichloromethane, 16.5 mL). The reaction mixture was stirred at RT for 1 h and evaporated to dryness. Then ethyl acetate (15 mL) was added, stirred for 10 min at RT and evaporated to dryness. This step was repeated 8 times. The resulting powder was suspended in AcOEt (15 mL) and treated with 1 M HCl/Et₂O (1 mL) for 30 min at RT. The mixture was triturated with Et₂O (100 mL) for 15 minutes to afford a yellowish precipitate. The supernatant was removed by filtration. The resulting crude material was triturated in AcOEt (15 mL) for 30 min at RT and evaporated to dryness. This step was repeated 3 times until the complete removal of TFA (¹⁹F NMR) to afford dendrimer 8 (220 mg, 93%) as a yellow powder.

³¹P-{¹H} NMR (DMSO, 202.5 MHz): δ = 8.47 (s, N₃P₃); 62.98 (s, P=S); 63.28 (s, P=S).

¹H NMR (DMSO, 500.3 MHz): δ = 1.82 (s, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-N); 2.61 (s, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-N); 2.71 (s, 2H, CH₂-CH₂-NH); 2.89 (m, 20H, Ph-CH₂-CH₂-N); 3.25–3.36 (m, 37H, Ph-CH₂-CH₂-N, N-CH₃ and CH₂-CH₂-NH); 3.86 (s, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-N); 4.03 (s, 42H, N-CH₂-CO); 6.80 (d, 2H, C^{3'}-H); 6.94 (d, 4H, C²-H); 7.07 (s, 30H, C₀²-H, C₁²-H); 7.22 (s, 22H, and C₁³-H and C³-H); 7.33 (s, 2H, C^{2'}-H); 7.66 (m, 10H, C₀³-H); 7.92 (d, 5H, CH=N); 8.14 (s, 1H, HC=C-CN).

¹³C{¹H} (DMSO, 125.8 MHz): δ = 21.1 (s, CH₂-CH₂-CH₂-N); 27.5 (s, CH₂-CH₂-CH₂-N); 28.2 (s, O-CH₃); 30.3 (s, Ph-CH₂-CH₂-N); 33.5 (d, N-CH₃); 34.7 (s, CH₂-CH₂-NH); 40.1 (s, CH₂-CH₂-NH); 49.8 (s, CH₂-CH₂-CH₂-N); 54.8 (s, N-CH₂-CO); 56.8 (s, Ph-CH₂-CH₂-N); 118.1 (s, CN); 120.8 (s, C² and C³); 121.5 (s, C₀² and C₁²); 128.7 (s, C₀³); 130.6 (s, C₁³ and C³); 132.6 (broad, C₀⁴, C^{2'} and C¹); 135.2 (s, C₁⁴ and C⁴); 140.8 (broad s, CH=N); 148.4 (s, C⁴); 149.2 (m, C₁¹); 151.0 (broad, C₀¹, C¹, HC=C-CN); 169.2 (s, CO₂) ppm.

Dendrimer 9. Dendrimer 8 (220 mg, 0.054 mmol) was suspended in water (10 mL). Then a solution of sodium hydroxide (0.2 mol L⁻¹, 5.4 mL) was added dropwise at 0 °C. The resulting solution was filtered (20 μm) and freeze-dried to obtain dendrimer 9 as a yellow powder (220 mg, 90%).

³¹P-{¹H} NMR (D₂O/CD₃CN, 4 : 1, 202.5 MHz): δ = 9.51 (d, N₃P₃); 63.16 (s, P=S); 63.47 (s, P=S).

¹H NMR (D₂O/CD₃CN, 4 : 1, 500.3 MHz): δ = 1.69 (broad, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-N); 2.41 (s, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-N); 2.78 (s,

2H, CH₂-CH₂-NH); 3.03 (m, 22H, Ph-CH₂-CH₂-N, CH₂-CH₂-NH); 3.30–3.53 (m, 39H, Ph-CH₂-CH₂-N, N-CH₃ and CH₂-CH₂-N); 3.83 (s, 40H, N-CH₂-CO); 6.74–6.88 (m, 16H, C^{3'}-H, C²-H, C₀²-H and C^{2'}-H); 7.10 (s, 20H, C₁²-H); 7.23 (s, 20H, C₁³-H); 7.38 (d, 2H, C³-H); 7.59 (s, 10H, C₀³-H); 7.87 (m, 5H, CH=N).

¹³C{¹H} (D₂O/CD₃CN, 4 : 1, 125.8 MHz): δ = 29.1 (s, CH₂-CH₂-CH₂-N, CH₂-CH₂-CH₂-N, CH₂-CH₂-NH, CH₂-CH₂-NH); 32.8 (s, N-CH₃); 56.5 (s, CH₂-CH₂-CH₂-N); 57.4 (s, N-CH₂-C); C≡N signal could not be observed; 121.5 (s, C₀², C₁², C², C³); 128.5 (m, C₀², C₀³); 130.5 (s, C₁³-H, C³); 133.9 (s, C¹, C^{2'}, C₀⁴, C⁴, C₁⁴); CH=N signal could not be observed; 149.4 (m, C₀¹, C₁ and C₁¹); 150.7 (s, HC=C-CN); 169.7 (s, CO₂, CO) ppm.

2.2 Computational methods

The entire simulation work was carried out using the AMBER 12 simulation package.¹⁶ The molecular models for dendrimers 1 and 2 were created as already described.⁴ Their interaction with the biomolecular target was parameterized according to a validated strategy.^{17–19}

We built and simulated a molecular model of a POPC lipid bilayer membrane according to a validated procedure.²⁰ The membrane model was composed of 144 POPC lipids with the CHARMM-GUI membrane builder^{21,22} and solvated with TIP3P explicit water molecules. A suitable number of Na⁺ and Cl⁻ ions were added into the system to reproduce the experimental ionic strength of 150 mM NaCl. The POPC lipid molecules were parameterized according to the Lipid11 force field.²⁰ The parameters used in the simulations are consistent with what has been reported previously in the literature for similar systems.²⁰ After initial minimization, the POPC lipid bilayer model was initially heated to 310 K (37 °C) during 100 ps of MD simulation under NVT (constant number of N: atoms, V: volume, and T: temperature in the system) periodic boundary conditions. During this phase the solute was maintained as fixed. All restraints were then removed and the membrane model was equilibrated for 300 ns of MD under NPT periodic boundary conditions at the experimental temperature of 37 °C and 1 atm of pressure using semi-isotropic pressure scaling. A constant surface tension of γ = 17 dyne cm⁻¹ with interfaces in the xy plane was applied during the MD run. During the MD simulation, the POPC bilayer reached the equilibrium showing good consistency with the experiments (area per lipid of ≈64–67 Å² per lipid).^{20,23}

As a next step, the pre-equilibrated dendrimers 1 and 2 were put in proximity to the pre-equilibrated POPC membrane, and the obtained complex systems were again solvated in explicit water and counter ions from 150 mM NaCl. After initial minimization and heating (as described previously), the complex systems underwent 500 ns of MD simulation under NPT periodic boundary conditions at 37 °C of temperature and 1 atm of pressure (under the conditions described above). All MD runs used a time step of 2 femtoseconds, the Langevin thermostat and an 8 Å cutoff. The long-range electrostatic effects were treated according to the particle mesh Ewald

(PME) approach.²⁴ The SHAKE algorithm was used to treat all bonds involving hydrogen atoms.²⁵ During the MD runs, the dendrimers interacted with the POPC bilayer. The time evolution of the interaction between the dendrimers and the membrane model was monitored with the *ptraj* module of AMBER 12. In particular, the number of contacts between dendrimers 1 and 2 with the POPC bilayer, and the distance between the atoms of the dendrimers (surface and core) from the lipid bilayer center were used to study the interactions and their equilibration. After ≈ 350 ns of simulation both systems reached equilibrium. Additionally, the radial distribution functions – $g(r)$ – of the dendrimer center of mass calculated with respect to the lipid bilayer center was also obtained with the *ptraj* module of AMBER 12.

2.3 Multi-lamellar vesicles

MLV were prepared according to a procedure described in the literature.²⁶ In a round bottom flask the DPPC or DPPC/POPC = 75/25 powder was dissolved in pure chloroform. The solvent was evaporated to dryness under reduced pressure at RT. The resulting dried film of phospholipids was rehydrated with an appropriate amount of PBS solution and was cooled in liquid nitrogen until frozen and then heated at a temperature of 52 °C (above the main transition temperature) for 30 minutes. This protocol was performed five times in a row; the resulting suspension was then stored at 4 °C. Under normal physiological conditions, monocytes present an average diameter superior to 15 micrometers⁵ whereas generation 1 PPH dendrimers have a mean diameter around 2–3 nm in aqueous solutions. The order of magnitude of the average size and the concentrations of MLV in the buffer medium were then determined so as to be as relevant as possible, taking into account the size of monocytes and the dendrimer concentration used in a typical monocyte activation experiment, *i.e.*, 20 μM *ex vivo*. The Dynamic Light Scattering (DLS) technique was employed to measure the hydrodynamic radius of the MLV in 10-fold, 15-fold and 20-fold diluted samples of DPPC and DPPC/POPC = 75/25 suspensions. The systems were found to be highly heterogeneous, showing the presence of a population with an average size between 3.5 and 4.5 μm , and the presence of populations with sizes superior to 10 μm , which is the instrumental limit of detection. Despite this heterogeneity, the difference was considered as acceptable for this model system. In a 30 mM suspension, the concentration of vesicles measured with a hemocytometer by optical microscopy was found to be of the order of 10^8 vesicles per mL. Assuming a monocyte concentration of 1.5 million cells per mL in monocyte activation experiments typically run at a 20 μM dendrimer concentration,⁵ the final dendrimer/monocyte ratio in *ex vivo* cultures was supposed to be about 10^{-14} mol per cell. A suitable dendrimer/MLV ratio of 3×10^{-14} mol per vesicle was obtained with 30 mM suspensions of phospholipids containing 10% molar ratio (3×10^{-6} mol mL⁻¹) of dendrimer.

2.4 Differential scanning calorimetry

Prior to DSC analyses, MLV suspensions were diluted with PBS (to register thermograms of pure MLV) or with dendrimer-buffer solutions (to investigate MLV–dendrimer systems) to a DPPC or DPPC/POPC = 75/25 final concentration of 30 mM. The DSC technique was first optimized on pure DPPC suspensions in order to determine the DPPC concentration at which the main transition peak is strong enough to allow retrieval of reliable calorimetric data. A 30 mM concentration of DPPC and of DPPC/POPC = 75/25 in the sample was found to be optimal to study the transition signal during heating to the maximal temperature at $\nu = 1^\circ \text{min}^{-1}$ (T_m). The extrapolated maximal temperature at $\nu = 0^\circ \text{min}^{-1}$ ($T_m, \nu = 0$) and endothermic ΔH were measured as the area under the curve for each heating cycle and normalized per mole of phospholipid. Main DSC experiments were run on 30 μL of phospholipid suspensions and dendrimer–phospholipid mixtures at 10% molar ratio; samples were put in aluminum crucibles, sealed with a lid; an empty crucible was used as a reference. All analyses were performed with a Perkin-Elmer Differential Scanning Calorimeter, in a temperature range between 10 °C and 60 °C; six heating/cooling cycles were programmed, the first two at a scanning rate of 20°min^{-1} and 10°min^{-1} (for sample equilibration and exemption of thermal history) and the subsequent four at a rate of 1°min^{-1} ; isothermic steps of 10 min at 10 °C were also programmed between heating/cooling cycles. Thermograms and calorimetric data were elaborated and calculated by Perkin Elmer “Pyris Series” software.

2.5 PBMC purification

Fresh blood samples were collected by the “Etablissement Français du Sang”, the only institution accredited for blood sampling in France. Scientific experimentation with human material was conducted according to EU treaties ETS No. 164 of 04/04/1997 and ETS No. 168 of 12/01/1998 (additional protocol), regulating the protection of human rights and dignity of the human being in biology and medicine. Accordingly, informed consent of healthy donors for research purpose was obtained, and the identity as well as any other type of information regarding blood donors has been treated as strictly confidential. Procedures to ensure protection and confidentiality of data were based on the anonymity of samples.

PBMC were prepared on a Ficoll-Paque density gradient (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) by centrifugation (800g, 30 min at RT). Collected PBMC were washed twice and finally diluted at 1.5 million cells per mL in complete RPMI 1640 medium, *i.e.*, supplemented with penicillin and streptomycin, both at 100 U per mL (Cambrex Bio Science, Verviers, Belgium), 1 mM sodium pyruvate and 10% heat-inactivated fetal calf serum (both from Invitrogen Corporation, Paisley, UK).

2.6 Monocyte purification and culture

Highly pure CD14⁺ monocytes (over 95%, as checked by flow cytometry) were negatively selected from PBMC by magnetic

cell sorting (Dynabeads Untouched Human Monocytes, Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway) according to the manufacturer's instruction manual. Purified monocytes were diluted at 1.5 million cells per mL in complete RPMI 1640 medium.

2.7 Bioactivity of dendrimers

2×10^5 monocytes were cultured in 200 μL of complete RPMI 1640 medium in a 96-well plate for 72 to 96 h. Dendrimers **1** (positive control), **2**, **6** or **9** were added at the beginning of the cultures at the specified concentrations, between 1 and 50 μM . Morphological changes, and thus activation of monocytes, were analyzed by flow cytometry using a FACS-Scan cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

2.8 Quantification of the binding of dendrimers on monocyte cell surface

To assess the total binding of dendrimers, purified monocytes were incubated for 30 min at 4 $^\circ\text{C}$ with fluorescent dendrimers **6** or **9** at the specified concentrations. Binding was quantified by flow cytometry as the mean fluorescence intensity (mfi) of the monocytes (FACS-Scan cytometer). The mfi base line was quantified with purified monocytes incubated with dendrimers **1** or **2** under the same conditions. This mfi value was subtracted from the mfi measured on monocytes incubated with fluorescent dendrimers.

Non-specific binding was quantified as follows: in a first step, purified monocytes were incubated for 15 min at 4 $^\circ\text{C}$ with 200 μM of dendrimers **1** or **2**, and then the specified concentrations of dendrimers **6** and **9** were added for 15 min at 4 $^\circ\text{C}$. Cells were extensively washed before flow cytometry analysis which was used for quantification of mfi.

The specific binding was calculated by subtracting the non-specific binding from the total binding.

For the competition binding: in a first step, purified monocytes were incubated for 15 min at 4 $^\circ\text{C}$ with 50 μM of dendrimer **6**, then the specified concentrations (between 10 nM and 1 mM) of dendrimer **1** were added for 15 min at 4 $^\circ\text{C}$. Cells were extensively washed before flow cytometry analysis which was used for quantification of mfi.

2.9 Internalization of dendrimers by monocytes

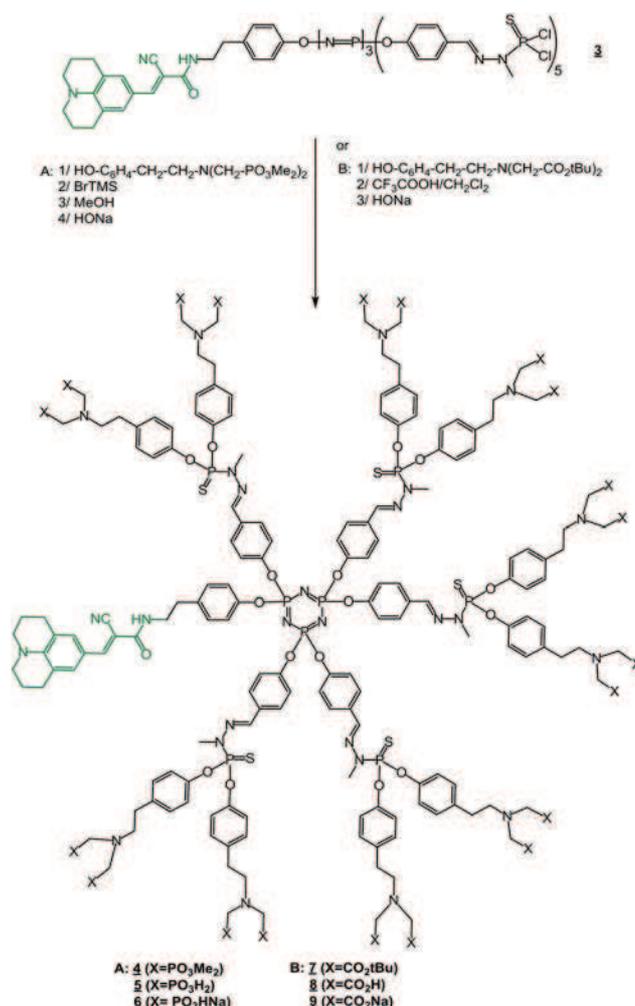
Purified monocytes were incubated for 30 min at 37 $^\circ\text{C}$ with fluorescent dendrimers **6** or **9** at 20 μM . Internalization was assessed using an LSM 510 confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with a 63 \times lens (ON 1.4 Plan-Apo) with a ($\times 2$) numeric zoom. Images were captured with LSM Image Browser software.

3 Results and discussion

3.1 Chemical syntheses of relevant fluorescent nanomolecular tools

Fluorescently labelled dendrimers **6** and **9**, which are the analogues of dendrimers **1** and **2** respectively, have been designed to visualize the interactions of PPH dendrimers with the cell

membrane of monocytes. For this purpose, a common strategy consists of grafting stochastically a fluorescent probe onto the surface of the dendrimer target, resulting in the production of a population of dendrimers.²⁷ This stochastic approach, albeit time-saving, suffers from two major drawbacks which include (i) the obtaining of stochastic objects which are not easily characterized, and (ii) the presence of the fluorescent probe on the biologically interacting surface of the dendrimer which might alter the biological response. In contrast, the core labelling strategy that has been developed in previous synthetic approaches might appear much more tedious to achieve,²⁸ but this option results in perfectly defined dendrimeric molecules. Consequently, we have designed dendrimer **9**, the fluorescent analogue of dendrimer **2**, using the strategy which has been used to design dendrimer **6**, the fluorescent analogue of dendrimer **1** (Scheme 2).¹⁵ The synthetic approach relies on a fluorescent dendrimeric synthon **3** having a julolidine derivative at the core and PSCl₂ surface functions. Dendrimer **3** is obtained from hexachlorocyclotriphosphazene by controlling the number of nucleophilic substitution of the chlorine atoms with a



Scheme 2 Synthesis of fluorescent analogues of dendrimers **1** (dendrimer **6**) and **2** (dendrimer **9**).

phenol bearing a julolidine-derived tag.¹⁵ Its surface is modified by nucleophilic substitution of the chlorine atoms by a *tert*-butoxy-protected carboxylic acid-based phenol derived from tyramine in the presence of cesium carbonate in THF. The reaction is easily monitored by ³¹P NMR, as for other PPH dendrimers.²⁹ The dissymmetry of the dendrimer 7 is evidenced on the ³¹P NMR spectrum by the presence of two singlets at 63.1 (major) and 63.2 (minor) ppm in almost a 3 to 2 ratio, corresponding to the phosphorus atoms located at the divergent points and occupying the two half spaces defined on either side of the cyclotriphosphazene ring which is a plane cycle. A significant broadening of typical signals of the thiophosphorhydrazone branches is also observed on the ¹H and ¹³C-{¹H} NMR spectra. Following *tert*-butoxy deprotection, the dissymmetry is also traduced on the ³¹P NMR spectrum of the resulting polycarboxylic acid dendrimer 8, and its sodium salt 9, by a set of two singlets at 62.98 and 63.28 ppm, and 63.16 and 63.47 ppm, respectively. As described in a previous study,¹⁴ the PPH scaffold is not affected by the *tert*-butoxy removal procedure. Contrarily, the julolidine moiety was found to be rather sensitive to the conditions of the reaction. As a consequence, we were unable to completely remove the *tert*-butoxy groups. Approximately 3% of *tert*-butoxy groups were found to be uncleaved following the optimized procedure of deprotection, as traduced by the presence of a typical signal at 1.39 ppm on the ¹H NMR spectrum of 8.

3.2 All-atom MD simulations show superficial adsorption of the PPH dendrimers with a lipid bilayer

To obtain a predictive description of the interaction between the dendrimers and a lipid bilayer at a detailed molecular level, we have employed all-atom Molecular Dynamics (MD) simulations of dendrimers 1 and 2 in the presence of a POPC membrane model. We have recently reported all-atom MD simulations of dendrimer 1 in solution at 37 °C in the presence of explicit water molecules and NaCl (150 mM).⁴ A similar molecular model of dendrimer 2 was created for the study (Fig. 2). A molecular model of a portion of membrane composed of 144 POPC lipids was initially equilibrated for 300 ns of MD simulation in NPT (constant number of N: atoms, P: pressure, and T: temperature in the system) periodic boundary conditions in a solution containing explicit water molecules and the suitable number of Na⁺ and Cl⁻ ions to reproduce the physiological and experimental NaCl concentration of 150 mM. During this time, the POPC membrane reached the equilibrium with good stability, and converged to an area per lipid of $\approx 64\text{--}67 \text{ \AA}^2$ per lipid (Fig. S3[†]), in optimal consistency with the experimental values.^{20,23} Dendrimers 1 and 2, pre-equilibrated in solution, were put in proximity to the pre-equilibrated POPC bilayer as shown in Fig. 2a, and the obtained complex systems were again solvated with explicit water molecules, and Na⁺ and Cl⁻ ions. Both systems underwent 500 ns of unbiased all-atom MD simulation in NPT conditions. All systems reached the equilibrium in the MD regime after ≈ 350 ns of simulation. During the MD runs, dendrimers 1 and 2

interact with the lipid bilayer (Fig. 2b): first intermittently, during the first ≈ 150 ns, and then more stably, as it is demonstrated in Fig. 2c by the number of intermolecular POPC-dendrimer contacts as a function of simulation time. In fact, after ≈ 150 ns both dendrimers undergo structural rearrangement attempting to fit their hydrophobic core in the interior of the lipid bilayer, and leaving the hydrophilic and negatively charged surface groups exposed to the external solution. Since this behavior is revealed during unbiased MD simulations, this is representative of the spontaneous interaction of the dendrimers with the POPC membrane.

Fig. 2b and d show similar mechanisms of penetration for both dendrimers based on local adsorption of the hydrophobic core into the bilayer. This effect was quantified by extracting from the MD trajectories the average distances between the dendrimer surface (red) and core (blue) atoms from the center of the lipid bilayer (height equal to 0 in Fig. 2e and f). It is interesting to compare the displacement of the surface and core atoms with the position of the lipid phosphorylated head groups (Fig. 2e and f: black). The data provide a picture of the structural reorganization occurring after $\approx 150\text{--}200$ ns of MD simulation, where the hydrophobic core is locally absorbed in the POPC membrane. The negatively charged surface groups of the dendrimers (Fig. 2b and d: red) act as “umbrellas”, limiting the dendrimer penetration into the membrane. Since the surface groups of dendrimer 2 are smaller than those of dendrimer 1, this produces a slightly deeper penetration of dendrimer 2 in the bilayer, albeit this difference is very subtle.

The radial distribution functions $g(r)$ of the dendrimer center of mass with respect to the bilayer surface (phosphorylated head groups) were also calculated from the MD trajectories (Fig. S4[†]). The $g(r)$ of dendrimers 1 and 2 with respect to the lipid bilayer center is found to be very similar, suggesting that the non-specific interactions of the two dendrimers with the POPC membrane are nearly the same, and that these are, in general, very weak.^{17,18,30} Thus, the MD simulations depict the non-specific interaction between the dendrimers and the lipid bilayer as local and superficial.

3.3 DSC experiments confirm only weak non-specific interaction of the PPH dendrimers with lipid bilayers

The different surface functions generated on the four dendrimers could evidently affect the physicochemical behavior thereof as well as the cell/dendrimer interaction phenomenon. Therefore, we have undertaken physicochemical characterization of the four dendrimers involved in this study. The zeta potential of the dendrimer is considered to be essential for the adsorption on the negative cell membrane.³¹ We have determined a strong negative zeta potential of -55 mV for dendrimers 1 and 6 and -35 mV for dendrimers 2 and 9. Since most biological cells have negative zeta potentials, it is likely that the four dendrimers also with significantly negative zeta potentials are not able to stick non-specifically to cells but can most probably interact through a receptor-mediated interaction that allows their binding only when the receptor-ligand

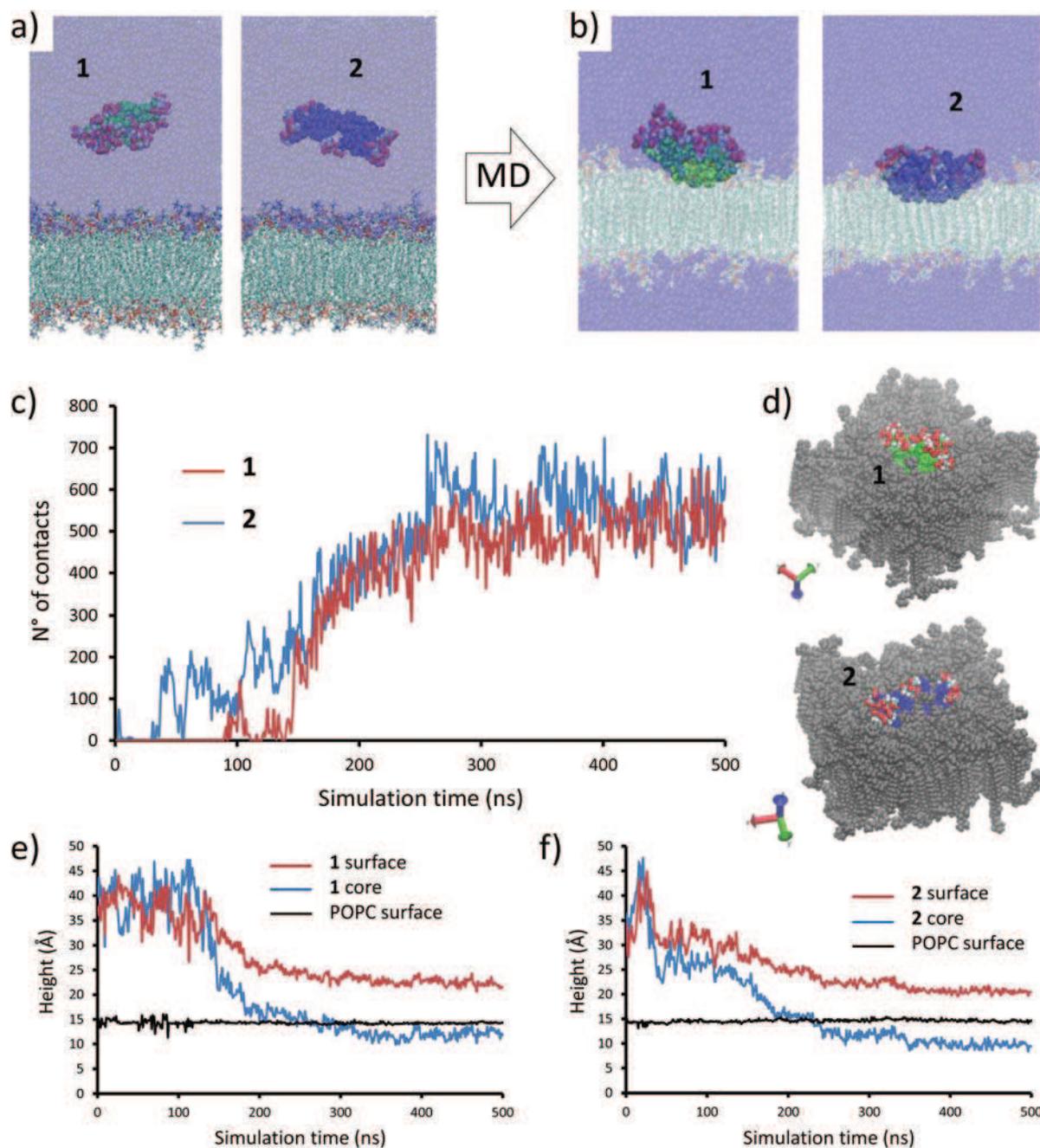


Fig. 2 Modeling the non-specific interaction between dendrimers and lipid bilayer in solution. (a) Initial configurations of the complex simulated systems containing dendrimers 1 and 2 in the presence of a portion of POPC membrane (transparent blue). (b) Equilibrated (final) configurations of the simulated systems. (c) Number of contacts between the dendrimers and the POPC membrane model at variance of the simulation time. (d) Top view of the interaction site (dendrimer 1 in green, dendrimer 2 in blue). (e, f) Assessing the mechanisms of interaction: after initial intermittent interaction, the two dendrimers are adsorbed on the POPC bilayer surface. In black: average height of the lipid heads (center of mass). In particular, the hydrophilic surface groups stay exposed to the solvent, while the hydrophobic core is locally adsorbed inside the lipid bilayer.

interaction is strong enough to overcome electrostatic repulsions. Moreover, these values combined with the measurement of the mean hydrodynamic diameters, at around 4 and 6 nm in solution for all dendrimers, show that they all have a good stability in solution and do not aggregate at the concentrations used for biological experiments. Then, information regarding

the interactions of dendrimers 1 and 2 with phospholipid bilayers were evaluated from the modifications in the thermotropic behavior of pure DiPalmitoyl PhosphatidylCholine (DPPC) and mixed DPPC/POPC = 75/25 (POPC: 1-Palmitoyl, 2-Oleoyl PhosphatidylCholine) multi-lamellar vesicles (MLV) measured by Differential Scanning Calorimetry (DSC, Table 1).

Table 1 Main transition calorimetric data^a for MLV suspensions of DPPC/POPC = 75/25 (30 mM) alone, and with dendrimers **1**, **2**, **6** or **9** (3 mM)

	Scan number	T_m (°C)	ΔH^b
MLV alone	1 st	37.93	-4.37
	4 th	37.96	-4.30
MLV + 1	1 st	37.99	-3.72
	4 th	38.04	-3.65
MLV + 6	1 st	37.33	-3.66
	4 th	37.54	-3.72
MLV + 2	1 st	38.07	-3.57
	4 th	38.15	-3.63
MLV + 9	1 st	38.50	-3.75
	4 th	38.65	-3.75

^a Values are given for heating cycles. Cooling cycles gave comparable absolute values. ^b ΔH : transition enthalpy normalized per mole of phospholipid. Unit is kcal mol⁻¹.

DSC is a technique used to probe alterations of the bilayer structure induced by external substances, such as possible dendrimer incorporation. These alterations include variations in spacing among polar head groups and penetration into the lipophilic environment composed of alkyl chains.³² They result in the modification of the calorimetric values such as the maximal temperature (T_m) and the endothermic variation of the enthalpy of transition (ΔH) accompanying the transition from the gel phase to the liquid crystal phase. The optimal concentration of phospholipids used to prepare MLV was determined at 30 mM, and the ratio between phospholipids and dendrimers at 10 to 1 (see experimental details). Whatever the dendrimer added to MLV, the main transition peak is weakly affected (Fig. S2†), as shown by very low thermotropic changes in T_m and small enthalpy changes of the gel to liquid-crystalline phase transition of the bilayers. No variation of the thermodynamic values is observed between the 1st and the 4th scan, both in pure DPPC (Table S1†) and DPPC/POPC = 75/25 MLV (Table 1). Moreover, the reduction of ΔH from 4.30 kcal mol⁻¹ for DPPC/POPC = 75/25 MLV alone to about similar values of 3.70 ± 0.05 kcal mol⁻¹ for all the MLV/dendrimer mixtures is very low compared to previous work with PAMAM dendrimer incorporation in DPPC lipid bilayers.³² These results tend to demonstrate that the non-specific interactions between the four dendrimers and a simplified model of the cell membrane are very weak or that the dendrimers do not deeply penetrate into the phospholipidic bilayer. Hence, these experimental data are consistent with the predictive all-atom MD simulations performed with dendrimers **1** and **2**.

3.4 Biological binding studies demonstrate specific interaction of the ABP-capped PPH dendrimer with monocytes

In order to screen the biological properties of these dendrimers, a biological test for monitoring the activation of human monocytes *in vitro* has been developed. Monocytes are white blood cells playing multiple roles in the immune system, particularly in response to anti-inflammatory signals.³³ One of the

first morphological features indicating the activation of monocytes is an increase of their size and granularity.³⁴ These changes appear within a few days in *in vitro* cultures of monocytes, and can be visualized by flow cytometry. We have conducted this test with the four dendrimers at concentrations between 1 and 50 μ M (Fig. 3). Dendrimers **1** and **6** activate human monocytes at the concentration of 5 μ M and above, a slight shift toward the higher concentration may be noticed with dendrimer **6**. Conversely, dendrimers **2** and **9** do not activate these cells as no morphological change is induced, even though activated monocytes can be observed occasionally, depending on the donor. Regarding the stimulus they sense, monocytes commit to either an inflammatory or an anti-inflammatory activation. These are characterized by specific changes at the transcriptional,³⁵ phenotypical,⁵ and functional levels.³⁶

When monocytes are triggered by dendrimers **1** and **6**, we show that typical markers of an anti-inflammatory activation, namely mannose receptor MRC1 and interleukin (IL)-10, are significantly up-regulated at the mRNA level, whereas IL-12 (a typical inflammatory cytokine) is not modified. On the contrary, dendrimers **2** and **9** do not modify the level of expression of these markers (Fig. 4a). The same dichotomy between dendrimers **1** and **6**, and dendrimers **2** and **9** is observed regarding the phenotype of monocytes which significantly down-regulate the expression of proteins such as HLA-DR (MHC class II molecules) and CD14 when they are activated by azabisphosphonate dendrimers (Fig. 4b), as we have already shown.^{5,15} Thus, altogether, these results show that dendrimers **1** and **6** induce an anti-inflammatory activation of human monocytes *in vitro*, as expected. In contrast, dendrimers **2** and **9** are inactive on these cells. Therefore, they constitute negative controls of the bio-active dendrimers for the binding experiments on human monocytes.

For saturation binding assays, human monocytes have been incubated with the fluorescent dendrimers **6** and **9** in increasing concentrations, at 4 °C to avoid internalization of the molecules. This has been checked by confocal microscopy (data not shown). The binding of these probes at the surface of monocytes has been quantified by flow cytometry, measuring the mean fluorescence intensity (mfi) of the cell population. For each of the three independent donors that have been tested, dendrimer **6** and dendrimer **9** show quite different pattern of binding (Fig. 5).

The total binding of dendrimer **6** fits a logarithmic curve, unlike that of dendrimer **9**. Nevertheless, binding of dendrimer **6** does not reach a saturation asymptote, suggesting that both specific and non-specific binding components are involved. To discriminate between both, we have performed a second binding assay in which the surface of monocytes is saturated with dendrimer **1**, and then dendrimer **6** is added with increasing concentrations. In this setting the non-specific binding of dendrimer **1** is displaced by dendrimer **6**, therefore it can be quantified by flow cytometry. Then, the level of the non-specific binding is subtracted from the mfi of the total binding to give the specific binding (Fig. 5). The calculated

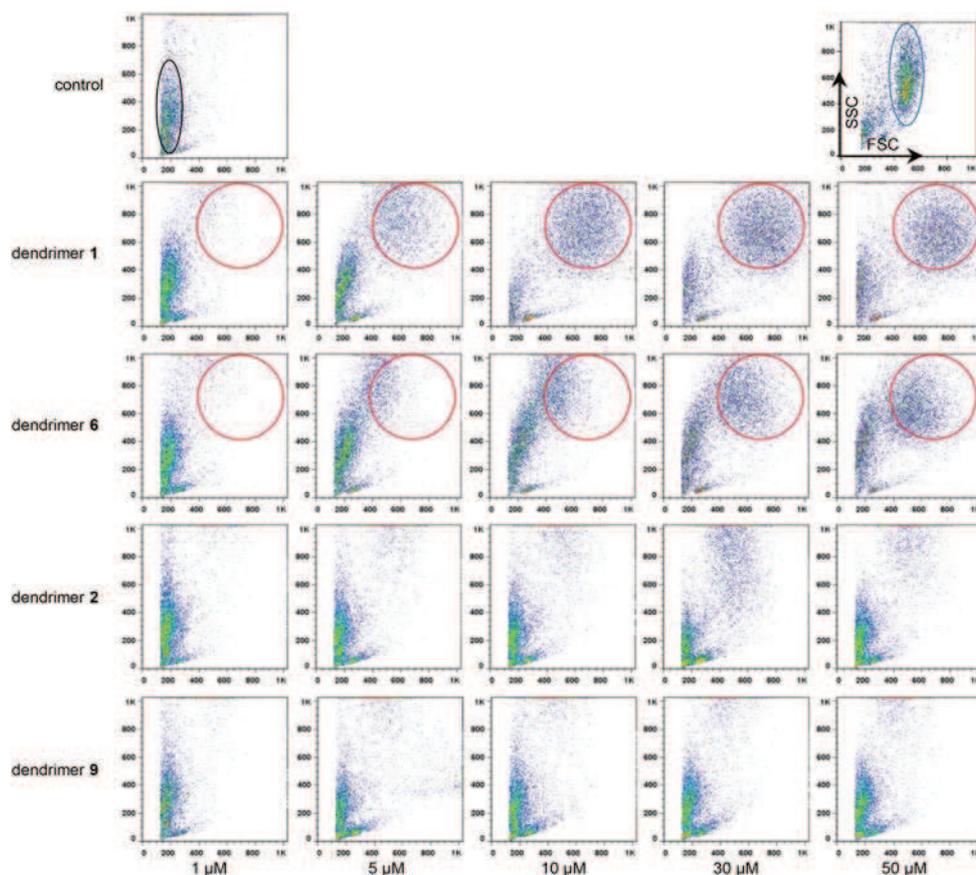


Fig. 3 Flow cytometry analyses of morphological changes (size – the Forward Scatter (FSC) parameter on the x-axis – and granularity – the Side Scatter (SSC) parameter on the y-axis – criteria) in purified human monocytes in the presence of the different dendrimers at the indicated concentrations. The monocytes purified at day 0 are shown in the upper right dot plot (surrounded in the blue ellipse). At day 6, the black ellipse in the upper left dot plot identifies died or dying monocytes, while the activated monocytes are circled in red. Data are from one representative experiment out of three.

curve for dendrimer 6 fits with a typical saturation asymptote reflecting a specific binding component, likely mediated by surface receptor(s). The K_d of dendrimer 6 is estimated thereof at 16 μM . Using the same experimental setting with dendrimers 2 and 9, we show that the non-specific binding corresponds to the total binding for these inactive molecules (Fig. 5). Finally, a competitive binding assay between dendrimer 6, incubated in a first step, and dendrimer 1, added with increasing concentrations in a second step, is performed. If the concentration of dendrimer 1 is plotted as decimal logarithm, the typical sigmoid curves that are obtained (Fig. 6) enable the determination of the K_i of dendrimer 1 ($K_i = 12 \mu\text{M}$).³⁷ This K_i value can be considered the K_d of dendrimer 1. Overall, dendrimers 1 and 6 have similar biological properties and comparable K_d values. These points confirm the relevance of designing an analogue of dendrimer 1 by grafting a fluorescent tag on the core of the molecule, far from the surface.

Using confocal microscopy, we show that dendrimer 6 is internalized by human monocytes, whereas dendrimer 9 is not. The latter stays bound at the membrane (Fig. 7 and ESI movies†). Consequently, the specific binding followed by the

internalization of dendrimers 1 and 6 by human monocytes leading to anti-inflammatory activation of cells can be unambiguously correlated to the presence of azabisphosphonate groups at the periphery of the dendritic scaffold. On the contrary, the carboxylate terminated PPH dendrimers 2 and 9 do not specifically bind to the cell surface of monocytes, they are not internalized and do not activate monocytes.

4 Conclusion

We have used a multidisciplinary approach to prove that an anti-inflammatory PPH dendrimer capped with azabisphosphonate end groups (dendrimer 1) interacts both non-specifically and specifically with human monocytes. The non-specific interaction is due to a weak, local, and superficial adsorption of the molecule on the phospholipidic bilayer; it also occurs with an inactive PPH dendrimer (capped with azabisphosphonate end groups, dendrimer 2). The specific interaction occurs with a K_d value of 12 μM and leads to recognition by and activation of human monocytes. Therefore, this specific reco-

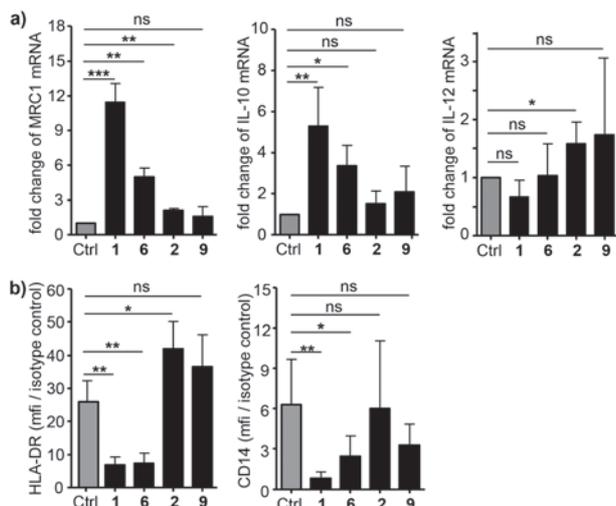


Fig. 4 (a) qRT-PCR of mRNA expression for MRC1, IL-10 and IL-12 in monocytes stimulated with dendrimers 1, 6, 2 and 9. Expression levels are normalized to the GAPDH mRNA. Relative expressions are calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method, and the results represent the n -fold regulation induced by dendrimers in comparison with non-stimulated control monocytes ($n = 1$). Data are expressed as mean \pm SD from 3 independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, one-tail paired Student's t -test. (b) Flow cytometry analysis of the cell-surface expression of HLA-DR and CD14. Data are expressed as medians \pm SD from 5 independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (the Mann-Whitney test).

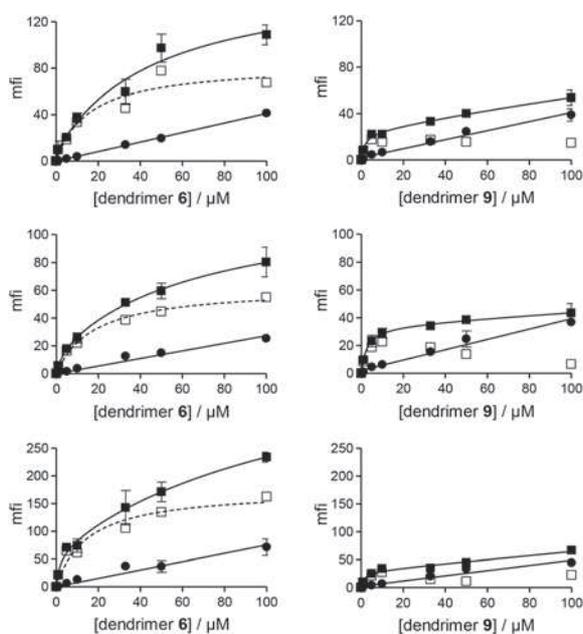


Fig. 5 Black squares show the total binding of dendrimers 6 (left graphs) and 9 (right graphs) on monocytes of three independent donors (the two graphs for one donor are on a row). Black circles show the non-specific binding, and white squares show the calculated specific binding of dendrimer 6. For each donor and concentration, the symbols represent the mean \pm SD of triplicates.

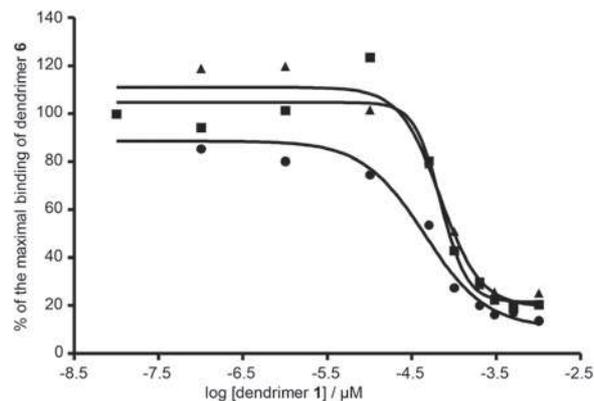


Fig. 6 Competitive binding assay between dendrimer 6 and dendrimer 1 on human monocytes. Results are expressed as means of triplicates from three independent donors.

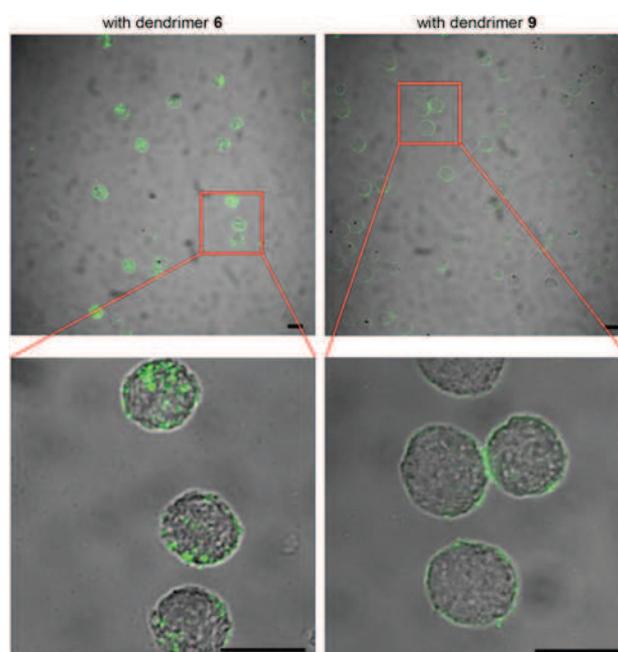


Fig. 7 Confocal microscopy shows internalization of dendrimer 6 (upper left image and zoom below) whereas dendrimer 9 binds non-specifically to monocytes and is not internalized (upper right image and zoom below). The dark bars represent 10 μm .

gnition involves one or several receptor(s), the identification of which is ongoing. Several types of dendrimers have shown anti-inflammatory properties *per se*.^{38–43} In most cases, the receptors involved in the recognition of these nanomolecules remain unknown. This is not the case when dendrimers are rationally designed to target and be recognized by a given receptor^{40,42} or a given cluster of receptors.³⁹ Isolation, purification and identification of the receptor(s) involved in the recognition of azabisphosphonate-capped PPH dendrimers by human monocytes is a challenging ongoing issue.

Abbreviations

DLS	Dynamic light scattering
DPCC	DiPalmitoyl PhosphatidylCholine
DSC	Differential scanning calorimetry
FSC	Forward scatter
IL	Interleukin
MLV	Multi-lamellar vesicles
MD	Molecular dynamics
NPT	Constant number of N: atoms, P: pressure, and T: temperature
NVT	Constant number of N: atoms, V: volume, and T: temperature
POPC	1-Palmitoyl, 2-Oleyl PhosphatidylCholine
RT	Room temperature
SSC	Side scatter

Acknowledgements

CNRS, INSERM, and University Paul Sabatier of Toulouse are acknowledged for institutional funding. We thank Sophie Allart for technical assistance at the cellular imaging facility of INSERM 1043, Toulouse. This research work was supported by the French "Fondation pour la Recherche Médicale" (FRM), 2011 "Chemistry for Medicine" project DCM20111223039.

References

- 1 V. Wagner, A. Dullaart, A. K. Bock and A. Zweck, The emerging nanomedicine landscape, *Nat. Biotechnol.*, 2006, **24**, 1211–1217.
- 2 M. Mammen, S. K. Choi and G. M. Whitesides, Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1998, **37**, 2754–2794.
- 3 R. M. Kannan, E. Nance, S. Kannan and D. A. Tomalia, Emerging concepts in dendrimer-based nanomedicine: from design principles to clinical applications, *J. Intern. Med.*, 2014, **276**, 579–617.
- 4 A. M. Caminade, S. Fruchon, C. O. Turrin, M. Poupot, A. Ouali, A. Maraval, M. Garzoni, M. Maly, V. Furer, V. Kovalenko, J. P. Majoral, G. M. Pavan and R. Poupot, The key role of the scaffold on the efficiency of dendrimer nano-drugs, *Nat. Commun.*, 2015, **6**, 7722.
- 5 M. Poupot, L. Griffe, P. Marchand, A. Maraval, O. Rolland, L. Martinet, F. E. L'Faqihi-Olive, C. O. Turrin, A. M. Caminade, J. J. Fournié, J. P. Majoral and R. Poupot, Design of phosphorylated dendritic architectures to promote human monocyte activation, *FASEB J.*, 2006, **20**, 2339–2351.
- 6 S. Fruchon, M. Poupot, L. Martinet, C. O. Turrin, J. P. Majoral, J. J. Fournié, A. M. Caminade and R. Poupot, Anti-inflammatory and immunosuppressive activation of human monocytes by a bioactive dendrimer, *J. Leukocyte Biol.*, 2009, **85**, 553–562.
- 7 D. Portevin, M. Poupot, O. Rolland, C. O. Turrin, J. J. Fournié, J. P. Majoral, A. M. Caminade and R. Poupot, Regulatory activity of azabisphosphonate-capped dendrimers on human CD4+ T cell proliferation enhances *ex vivo* expansion of NK cells from PBMCs for immunotherapy, *J. Transl. Med.*, 2009, **7**, 82.
- 8 P. Marchand, L. Griffe, M. Poupot, C. O. Turrin, G. Bacquet, J. J. Fournié, J. P. Majoral, R. Poupot and A. M. Caminade, Dendrimers ended by non-symmetrical azadiphosphonate groups: synthesis and immunological properties, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, **19**, 3963–3966.
- 9 L. Griffe, M. Poupot, P. Marchand, A. Maraval, C. O. Turrin, O. Rolland, P. Métivier, G. Bacquet, J. J. Fournié, A. M. Caminade, R. Poupot and J. P. Majoral, Multiplication of human natural killer cells by nanosized phosphonate-capped dendrimers, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**, 2523–2526.
- 10 M. Hayder, M. Poupot, M. Baron, D. Nigon, C. O. Turrin, A. M. Caminade, J. P. Majoral, R. A. Eisenberg, J. J. Fournié, A. Cantagrel, R. Poupot and J. L. Davignon, A phosphorus-based dendrimer targets inflammation and osteoclastogenesis in experimental arthritis, *Sci. Transl. Med.*, 2011, **3**, 81ra35.
- 11 S. Fruchon, A. M. Caminade, C. Abadie, J. L. Davignon, J. M. Combette, C. O. Turrin and R. Poupot, An azabisphosphonate-capped poly(phosphorhydrazone) dendrimer for the treatment of endotoxin-induced uveitis, *Molecules*, 2013, **18**, 9305–9316.
- 12 X. Bosch, Dendrimers to treat rheumatoid arthritis, *ACS Nano*, 2011, **5**, 6779–6785.
- 13 S. Fruchon, S. Mouriou, T. Thiollier, C. Grandin, A. M. Caminade, C. O. Turrin, H. Contamin and R. Poupot, Repeated intravenous injections in non-human primates demonstrate preclinical safety of an anti-inflammatory phosphorus-based dendrimer, *Nanotoxicology*, 2015, **9**, 433–441.
- 14 O. Rolland, C. O. Turrin, G. Bacquet, R. Poupot, M. Poupot, A. M. Caminade and J. P. Majoral, Efficient synthesis of phosphorus-containing dendrimers capped with isosteric functions of amino-bismethylene phosphonic acids, *Tetrahedron Lett.*, 2009, **18**, 2078–2082.
- 15 O. Rolland, L. Griffe, M. Poupot, A. Maraval, A. Ouali, Y. Coppel, J. J. Fournié, G. Bacquet, C. O. Turrin, A. M. Caminade, J. P. Majoral and R. Poupot, Tailored control and optimisation of the number of phosphonic acid termini on phosphorus-containing dendrimers for the *ex vivo* activation of human monocytes, *Chem. – Eur. J.*, 2008, **14**, 4836–4850.
- 16 D. A. Case, T. A. Darden, T. E. Cheatham III, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, R. C. Walker, W. Zhang, K. M. Merz, B. Roberts, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, J. Swails, A. W. Götz, I. Kolossváry, K. F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, R. M. Wolf, J. Liu, X. Wu, S. R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M. J. Hsieh, G. Cui, D. R. Roe, D. H. Mathews, M. G. Seetin, R. Salomon-Ferrer, C. Sagui,

- V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko and P. A. Kollman, *AMBER 12*, University of California, San Francisco, 2012.
- 17 D. A. Torres, M. Garzoni, A. V. Subrahmanyam, G. M. Pavan and S. Thayumanavan, Protein-triggered supramolecular disassembly: insights based on variations in ligand location in amphiphilic dendrons, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 5385–5399.
- 18 G. M. Pavan, Modelling the interaction between dendrimers and nucleic acids: a molecular perspective through hierarchical scales, *Chem. Med. Chem.*, 2014, **9**, 2623–2631.
- 19 M. Garzoni, K. Okuro, N. Ishii, T. Aida and G. M. Pavan, Structure and shape effects of molecular glue on supramolecular tubulin assemblies, *ACS Nano*, 2014, **8**, 904–914.
- 20 A. A. Skjevik, B. D. Madej, R. C. Walker and K. Teigen, LIPID11: a modular framework for lipid simulations using amber, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 11124–11136.
- 21 S. Jo, J. B. Lim, J. B. Klauda and W. Im, CHARMM-GUI Membrane Builder for mixed bilayers and its application to yeast membranes, *Biophys. J.*, 2009, **97**, 50–58.
- 22 E. L. Wu, X. Cheng, S. Jo, H. Rui, K. C. Song, E. M. Dávila-Contreras, Y. F. Qi, J. M. Lee, V. Monje-Galvan, R. M. Venable, J. B. Klauda and W. Im, CHARMM-GUI Membrane Builder toward realistic biological membrane simulations, *J. Comput. Chem.*, 2014, **35**, 1997–2004.
- 23 N. Kucerca, M. P. Nieh and J. Katsaras, Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature, *J. Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 2011, **1808**, 2761–2771.
- 24 J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman and D. A. Case, Development and testing of a general amber force field, *J. Comput. Chem.*, 2004, **25**, 1157–1174.
- 25 W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey and M. L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *J. Chem. Phys.*, 1983, **79**, 926–935.
- 26 B. Klajnert, J. Janiszewska, Z. Urbanczyk-Lipkowska, M. Bryszewska and R. M. Epand, DSC studies on interactions between low molecular mass peptide dendrimers and model lipid membranes, *Int. J. Pharm.*, 2006, **327**, 145–152.
- 27 D. G. Mullen, A. M. Desai, J. N. Waddell, X. M. Cheng, C. V. Kelly, D. Q. McNerny, I. J. Majoros, J. R. Baker Jr., L. M. Sander, B. G. Orr and M. M. Banaszak Holl, The implications of stochastic synthesis for the conjugation of functional groups to nanoparticles, *Bioconjugate Chem.*, 2008, **19**, 1748–1752.
- 28 G. Franc, S. Mazères, C. O. Turrin, L. Vendier, C. Duhayon, A. M. Caminade and J. P. Majoral, Synthesis and properties of dendrimers possessing the same fluorophore(s) located either peripherally or off-center, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 8707–8715.
- 29 A. M. Caminade, R. Laurent, C. O. Turrin, C. Rebut, B. Delavaux-Nicot, A. Ouali, M. Zablocka and J. P. Majoral, Phosphorus dendrimers as viewed by ³¹P NMR spectroscopy; synthesis and characterization, *C. R. Chim.*, 2010, **13**, 1006–1027.
- 30 D. Chandler, *Introduction to Modern Statistical Mechanics*, Oxford University Press, New York, NY, 3rd edn, 1987.
- 31 Y. Zhang, M. Yang, J. H. Park, J. Singelyn, H. Ma, M. J. Sailor, E. Ruoslahti, M. Ozkan and C. Ozkan, A surface-charge study on cellular-uptake behavior of F3-peptide-conjugated iron oxide nanoparticles, *Small*, 2009, **5**, 1990–1996.
- 32 K. Gardikis, S. Hatziantoniou, K. Viras, M. Wagner and C. A. Demetzos, DSC and Raman spectroscopy study on the effect of PAMAM dendrimer on DPPC model lipid membranes, *Int. J. Pharm.*, 2006, **318**, 118–123.
- 33 F. Ginhoux and S. Jung, Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis, *Nat. Rev. Immunol.*, 2014, **14**, 392–404.
- 34 L. L. Shafer, J. A. McNulty and M. R. Young, Brain activation of monocyte lineage cells: brain-derived soluble factors differentially regulate BV2 microglia and peripheral macrophage immune functions, *Neuroimmunomodulation*, 2002, **10**, 283–294.
- 35 F. O. Martinez, S. Gordon, M. Locati and A. Mantovani, Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression, *J. Immunol.*, 2006, **177**, 7303–7311.
- 36 C. Schebesch, V. Kodelja, C. Muller, N. Hakij, S. Bisson, C. E. Orfanos and S. Goerdts, Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4⁺ T cells in vitro, *Immunology*, 1997, **92**, 478–486.
- 37 Y. Cheng and W. H. Prusoff, Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction, *Biochem. Pharmacol.*, 1973, **22**, 3099–3108.
- 38 M. Hayder, S. Fruchon, J. J. Fournié, M. Poupot and R. Poupot, Anti-inflammatory properties of dendrimers per se, *Sci. World J.*, 2011, **11**, 1367–1382.
- 39 I. Teo, S. M. Toms, B. Marteyn, T. S. Barata, P. Simpson, K. A. Johnston, P. Schnupf, A. Puhar, T. Bell, C. Tang, M. Zloh, S. Matthews, P. M. Rendle, P. J. Sansonetti and S. Shaunak, Preventing acute gut wall damage in infectious diarrheas with glycosylated dendrimers, *EMBO Mol. Med.*, 2012, **4**, 66–81.
- 40 E. Blattes, A. Vercellone, H. Eutamène, C. O. Turrin, V. Théodorou, J. P. Majoral, A. M. Caminade, J. Prandi, J. Nigou and G. Puzo, Mannodendrimers prevent acute lung inflammation by inhibiting neutrophil recruitment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2013, **110**, 8795–8800.
- 41 Y. Tang, Y. Han, L. Liu, W. Shen, H. Zhang, Y. Wang, X. Cui, Y. Wang, G. Liu and R. Qi, Protective Effects and Mechanisms of G5 PAMAM Dendrimers against Acute Pancreatitis Induced by Caerulein in Mice, *Biomacromolecules*, 2015, **16**, 174–182.

- 42 S. M. Rele, W. Cui, L. Wang, S. Hou, G. Barr-Zarse, D. Tatton, Y. Gnanou, J. D. Esko and E. L. Chaikof, Dendrimer-like PEO glycopolymers exhibit anti-inflammatory properties, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 10132–10133.
- 43 A. S. Chauhan, P. V. Diwan, N. K. Jain and D. A. Tomalia, Unexpected in vivo anti-inflammatory activity observed for simple, surface functionalized poly(amidoamine) dendrimers, *Biomacromolecules*, 2009, **10**, 1195–1202.

Interaction studies reveal specific recognition of an anti-inflammatory polyphosphorhydrazone dendrimer by human monocytes

Jérémy Ledall,^{a,b} Séverine Fruchon,^{a,b} Matteo Garzoni,^c Giovanni M. Pavan,^c Anne-Marie Caminade,^b Cédric-Olivier Turrin,^{*b} Muriel Blanzat^{*d} and Rémy Poupot^{*a}

^a INSERM, UMR1043, CNRS, U5282, Université de Toulouse, UPS, Center of Physiopathology of Toulouse-Purpan, CHU Purpan, BP 3028, Toulouse F-31300, France

^b CNRS, UPR 8241, Université de Toulouse, UPS, INPT, Laboratoire de Chimie de Coordination, 205 route de Narbonne, BP 44099, Toulouse F-31077, France

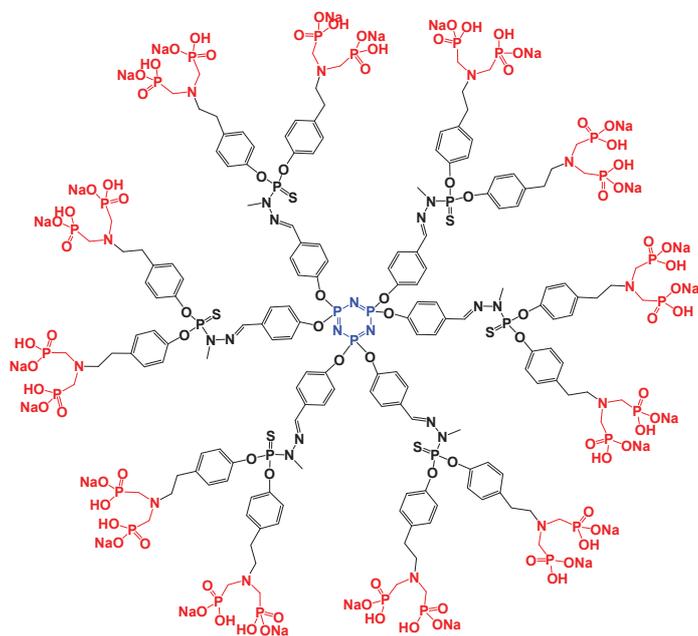
^c Department of Innovative Technologies, University of Applied Sciences and Arts of Southern Switzerland, Galleria 2, Manno 6928, Switzerland

^d Laboratoire IMRCP, CNRS UMR 5623, Université de Toulouse, UPS, 118 route de Narbonne, Toulouse F-31062, France.

* Corresponding authors. E-mail addresses: cedric-olivier.turrin@lcc-toulouse.fr, blanzat@chimie.ups-tlse.fr, remy.poupot@inserm.fr

Keywords: phosphorous-based dendrimers; human monocytes; immuno-modulation; molecular simulations; binding; nanobiotechnology; membrane interaction.

(a)



(b)

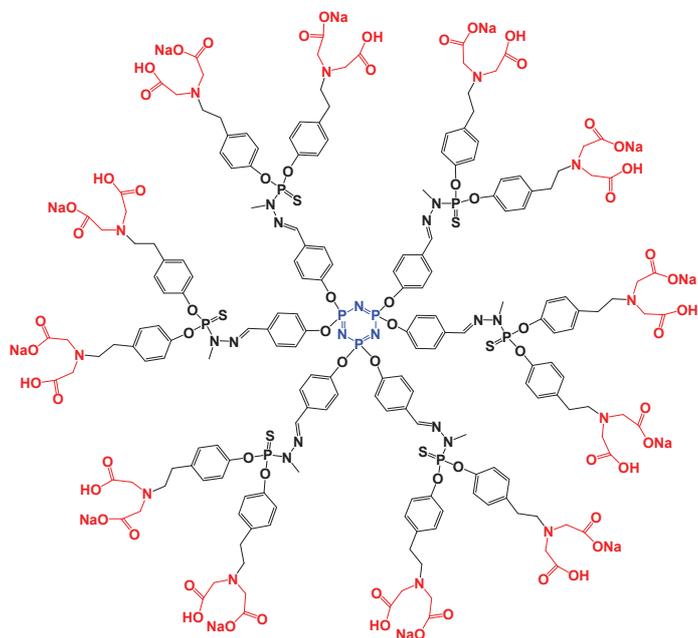


Fig. S1 Two-dimensional structures of (a) dendrimer 1 (ABP) and (b) dendrimer 2 (ABC).

Table S1

Main transition calorimetric data^[a] for MLV suspensions of pure DPPC (30 mM) alone, and with dendrimers **1**, **2**, **6** or **9** (3 mM).

	Scan number	T _m (°C)	ΔH ^[b]
MLV alone	1 st	40.99	-8.87
	4 th	41.04	-8.96
MLV + 1	1 st	41.03	-7.48
	4 th	41.05	-7.48
MLV + 6	1 st	41.01	-7.24
	4 th	41.02	-7.38
MLV + 2	1 st	41.06	-7.31
	4 th	41.10	-7.47
MLV + 9	1 st	40.90	-7.33
	4 th	40.97	-7.47

[a] Values are given for heating cycles. Cooling cycles gave comparable absolute values. [b] ΔH: transition enthalpy normalized per mole of DPPC. Unit is kcal.mol⁻¹.

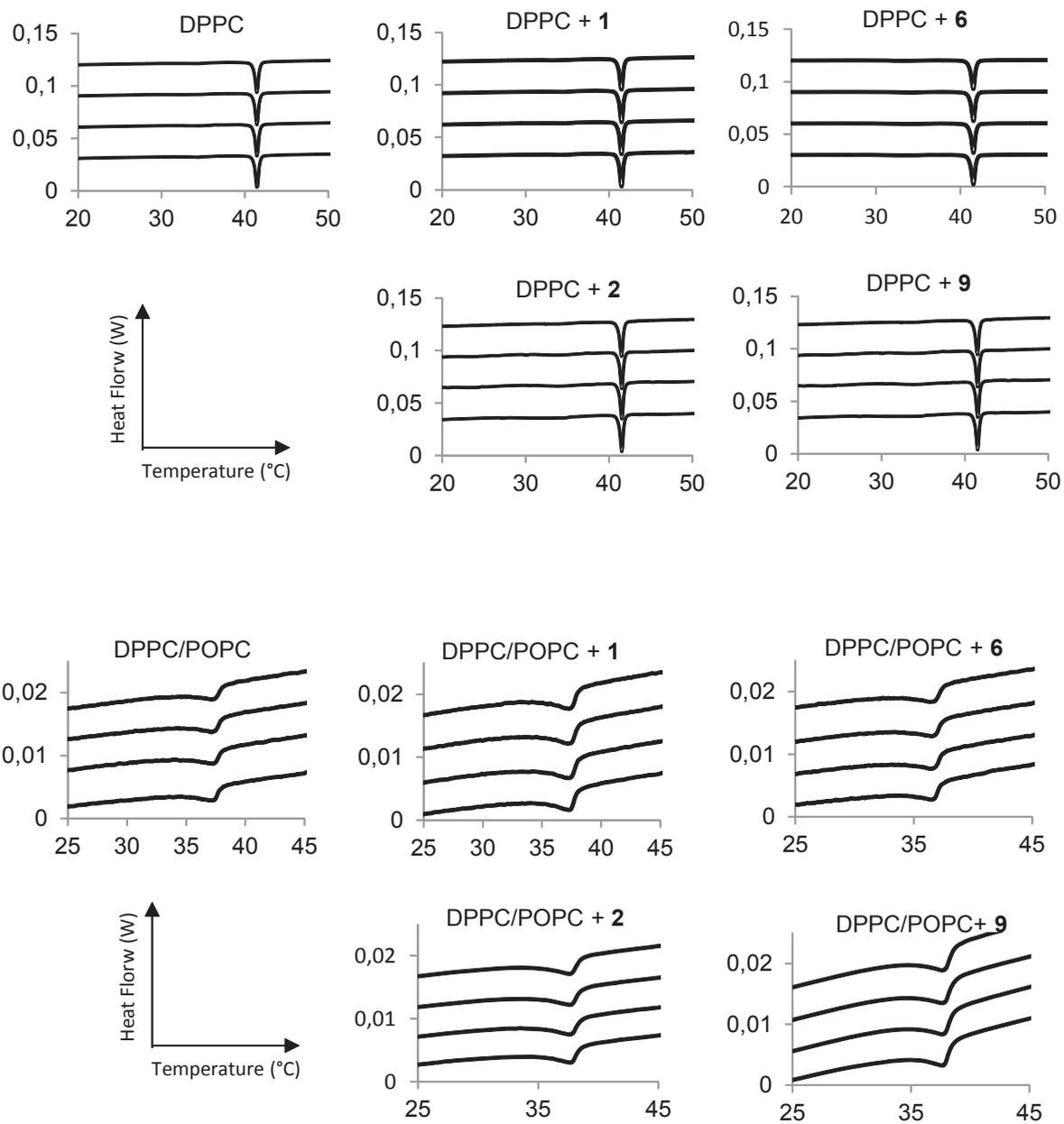


Fig. S2 DSC scans for pure DPPC and DPPC/POPC (30 mM) MLV suspensions in the presence of dendrimers **1**, **2**, **6** or **9** (3 mM).

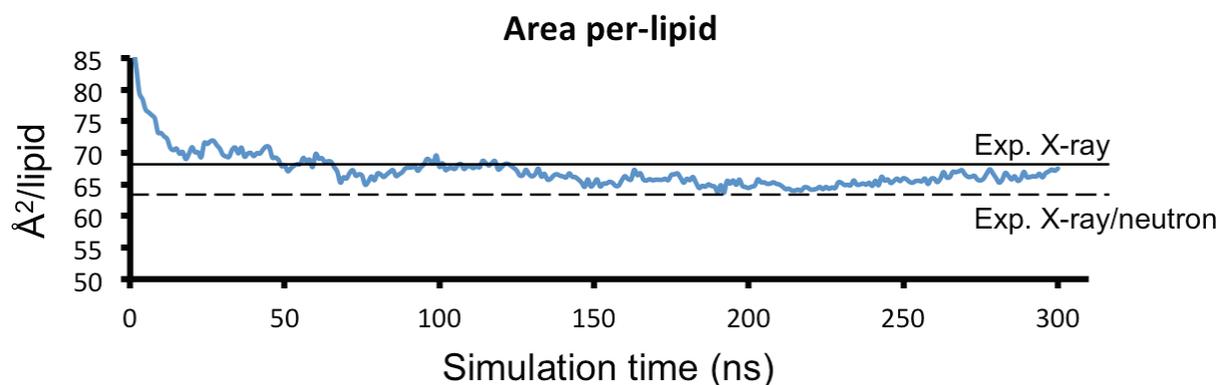


Fig. S3 Area per lipid for the POPC model extracted from the MD simulation as a function of simulation time. The simulation data (blue) is in good agreement with the experimental results (dotted and solid black lines).^{1,2}

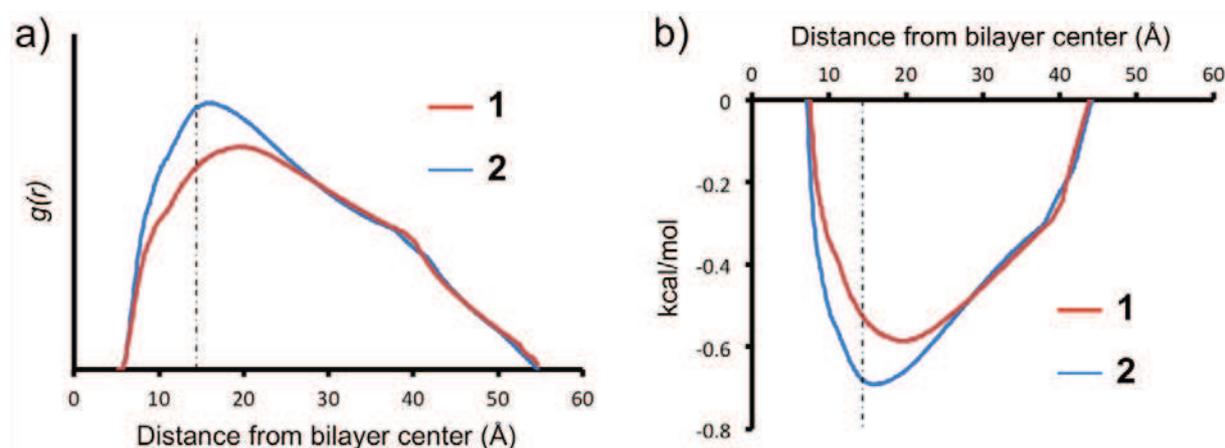


Fig. S4 Dendrimers absorption onto the POPC membrane. (a) Radial distribution functions of the centres of mass of dendrimers **1** (red) and **2** (blue) calculated respect to the lipid bilayer centre (origin of the x axis). (b) Free energy of absorption (ΔA) extracted from the $g(r)$ data as $A = -kT \ln(g(r))$.³⁻⁵ The dotted lines identify the lipid bilayer surface (centres of mass of the lipid heads).

References

- 1 A. A. Skjevik, B. D. Madej, R. C. Walker and K. Teigen, LIPID11: a modular framework for lipid simulations using amber, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 11124–11136.
- 2 N. Kucerca, M. P. Nieh and J. Katsaras, Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature, *J. Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 2011, **1808**, 2761–2771.
- 3 D. Chandler, Introduction to Modern Statistical Mechanics, 3rd ed.; Oxford University Press: New York, NY, 1987.
- 4 D. A. Torres, M. Garzoni, A. V. Subrahmanyam, G. M. Pavan and S. Thayumanavan, Protein-triggered supramolecular disassembly: insights based on variations in ligand location in amphiphilic dendrons, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 5385–5399.
- 5 G. M. Pavan, Modelling the interaction between dendrimers and nucleic acids: a molecular perspective through hierarchical scales, *Chem. Med. Chem.*, 2014, **9**, 2623–2631.

Résultats complémentaires

I- Recherche du récepteur au dendrimère ABP par protéomique

I.1 Présentation du dendrimère ABP-Biotinylé

Pour réaliser des expériences de purification, un groupement biotine a été ajouté au niveau du cœur du dendrimère ABP. Ce groupement chimique comporte une forte affinité pour un second groupement appelé streptavidine. Lorsque la streptavidine est fixée sur une bille, elle permet de récupérer par affinité le dendrimère biotinylé. La synthèse du dendrimère ABP-Biot a été réalisée en 2008. Le lot utilisé est le MS054. La RMN du composé a été faite en septembre 2014 et est conforme au produit final initial, sans présence de signaux de dégradation. (Schéma 1).

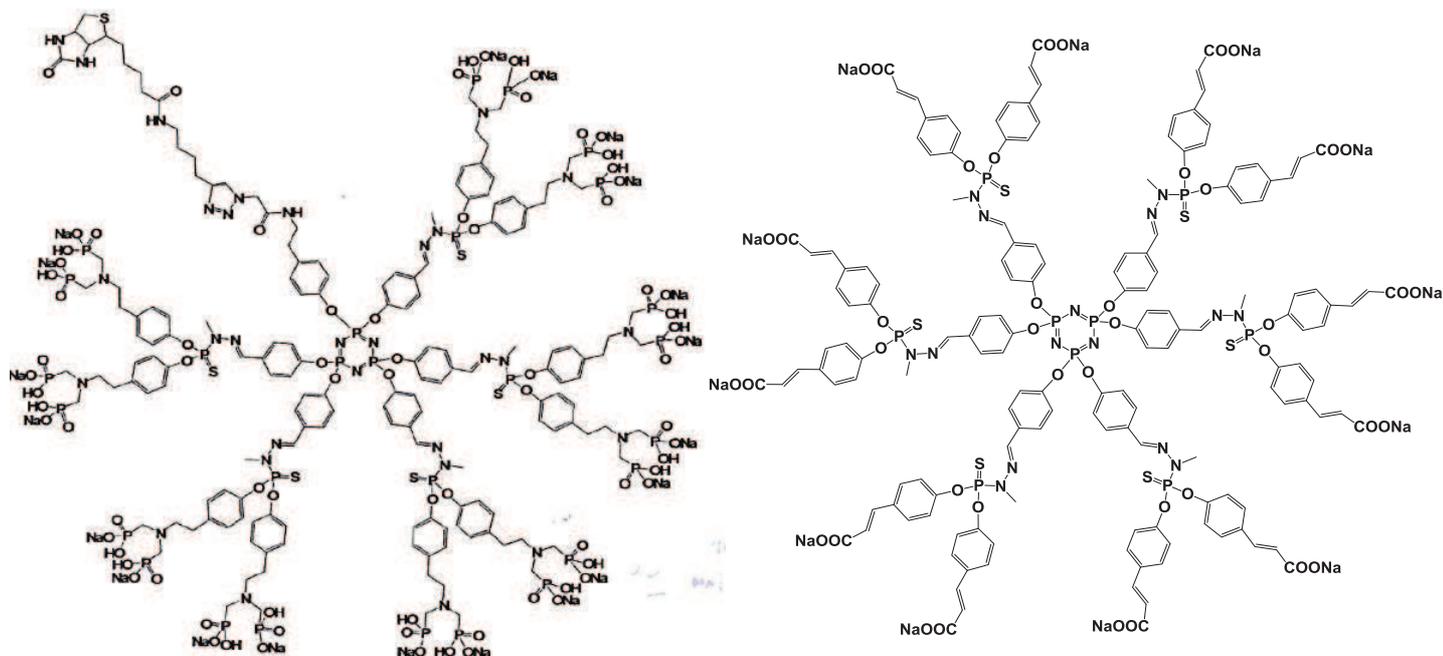


Schéma 1 : Structures des dendrimères utilisés dans cette étude : ABP-Biotinylé (à gauche) et COO (à droite).

Dans cette étude, l'activité du dendrimère ABP-Biot a été testée sur les monocytes. Pour cela, l'augmentation de taille et de granulosité des cellules induite par le dendrimère ABP a été utilisée comme contrôle positif et un dendrimère. Les monocytes ont été incubés pendant 5 jours avec des concentrations croissantes de 1 à 50 μM de dendrimère COO comme contrôle négatif (schéma 1), d'ABP, d'ABP-Biotinylé et d'ABP-Julo.

On remarque que tous les dendrimères aux terminaisons ABP induisent une augmentation de taille et de granulosité des monocytes humains purifiés (**Figure 1**).

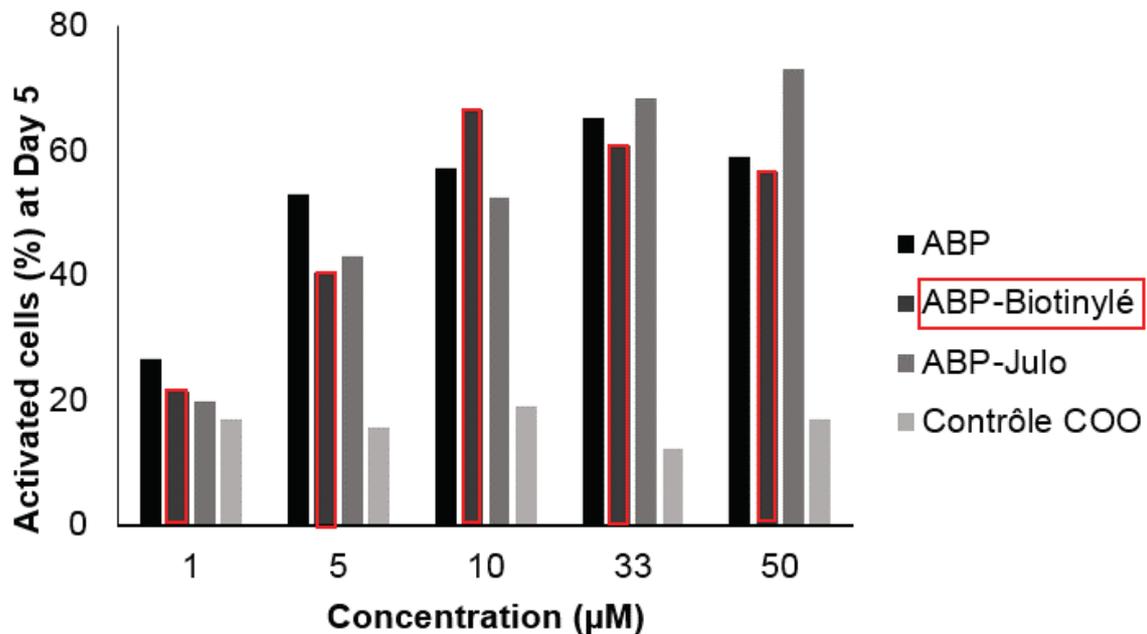


Figure 1 : Activation des monocytes humains par les dendrimères ABP, ABP-Biotinylé et ABP-Julo. Culture de monocytes humains sur 5 jours avec 20 μM des différents dendrimères. La morphologie des cellules a été analysée et le pourcentage de cellules comportant un phénotype de cellules activées a été mesuré par cytométrie en flux.

Les pourcentages de cellules activées par le dendrimère ABP-Biotinylé sont comparables à ceux du dendrimère ABP et sont fonctions de la concentration en dendrimère utilisé. Pour le dendrimère COO utilisé en contrôle négatif, le pourcentage de cellules considérées comme activées reste constant et inférieur à 20%. Le dendrimère ABP-Biotinylé comporte donc un groupement biotine dans sa structure tout en conservant une activité similaire à son analogue ABP. Il a pu être utilisé dans des expériences d'affinité dans le but de purifier des protéines membranaires interagissant avec le dendrimère ABP.

I.2 Protocole de purification et d'identification des protéines membranaires interagissant avec le dendrimère ABP-Biotinylé

Pour purifier les protéines à partir d'extraits membranaires de monocytes humains, un protocole a été mis au point. 20 millions de cellules se sont révélées nécessaires afin d'obtenir une quantité protéique suffisante pour la réalisation de ce protocole (**Figure 2**). Les monocytes humains ont été purifiés puis centrifugés. Le culot cellulaire est repris dans 1.5 mL de tampon Tris/HCl/MgCl₂ aidant à la perméabilisation des cellules. Les monocytes subissent alors un choc thermique dans de l'azote liquide jusqu'à congélation. Ils sont ensuite rapidement remis à température ambiante.

Afin de ne pas utiliser de conditions dénaturantes trop puissantes, les cellules sont lysées par lyse mécanique en utilisant une seringue à insuline de 300 µL. Cette étape permet de préserver les conformations des protéines ainsi que certains complexes membranaires. Après une vingtaine d'allers-retours, le lysat est centrifugé à faible vitesse (900g). Les noyaux ainsi que les fractions cellulaires encore intactes sont éliminées. Cette étape permet de ne récupérer que les fractions ayant été lysées et présentes dans le surnageant. Ce surnageant est alors centrifugé à très grande vitesse (100 000g) pendant 45min. Le culot est récupéré et comprend les fractions membranaires des monocytes lysés appelé « crude membrane ». Le dendrimère ABP-Biotinylé est alors ajouté à cette fraction membranaire et incubé pendant 30 min à 4 ou 37°C. Le dendrimère ABP va former un complexe avec les protéines membranaires le reconnaissant. Ce complexe va ensuite être placé sur une colonne contenant des billes de streptavidine qui vont retenir le dendrimère par son groupement biotine et par conséquent, les protéines liées. Ces protéines vont être décrochées de la colonne à l'aide d'une solution de guanidine 8M. L'éluat est recueilli en plusieurs fractions puis concentré à l'aide d'un filtre Amicon de 3 KDa. Enfin, le précipité est déposé sur gel SDS-PAGE. Pour chacun des 3 donneurs, 8 bandes majoritaires sont visibles ainsi que des bandes moins intenses correspondant à des protéines de petit poids moléculaires. Les protéines de petites tailles situées en dessous de la ligne rouge (20 kDa) ne sont pas prises en compte. Il s'agit de protéines clivées ainsi que de la fraction résiduelle récupérée lors de l'élution de la colonne de purification. Ces bandes n'ont pas été prélevées, possédant le risque élevé d'obstruer la colonne de chromatographie durant l'analyse de masse. Les autres bandes ont été découpées. Les protéines ont été extraites puis digérées à la trypsine afin d'être analysées par spectrométrie de masse.

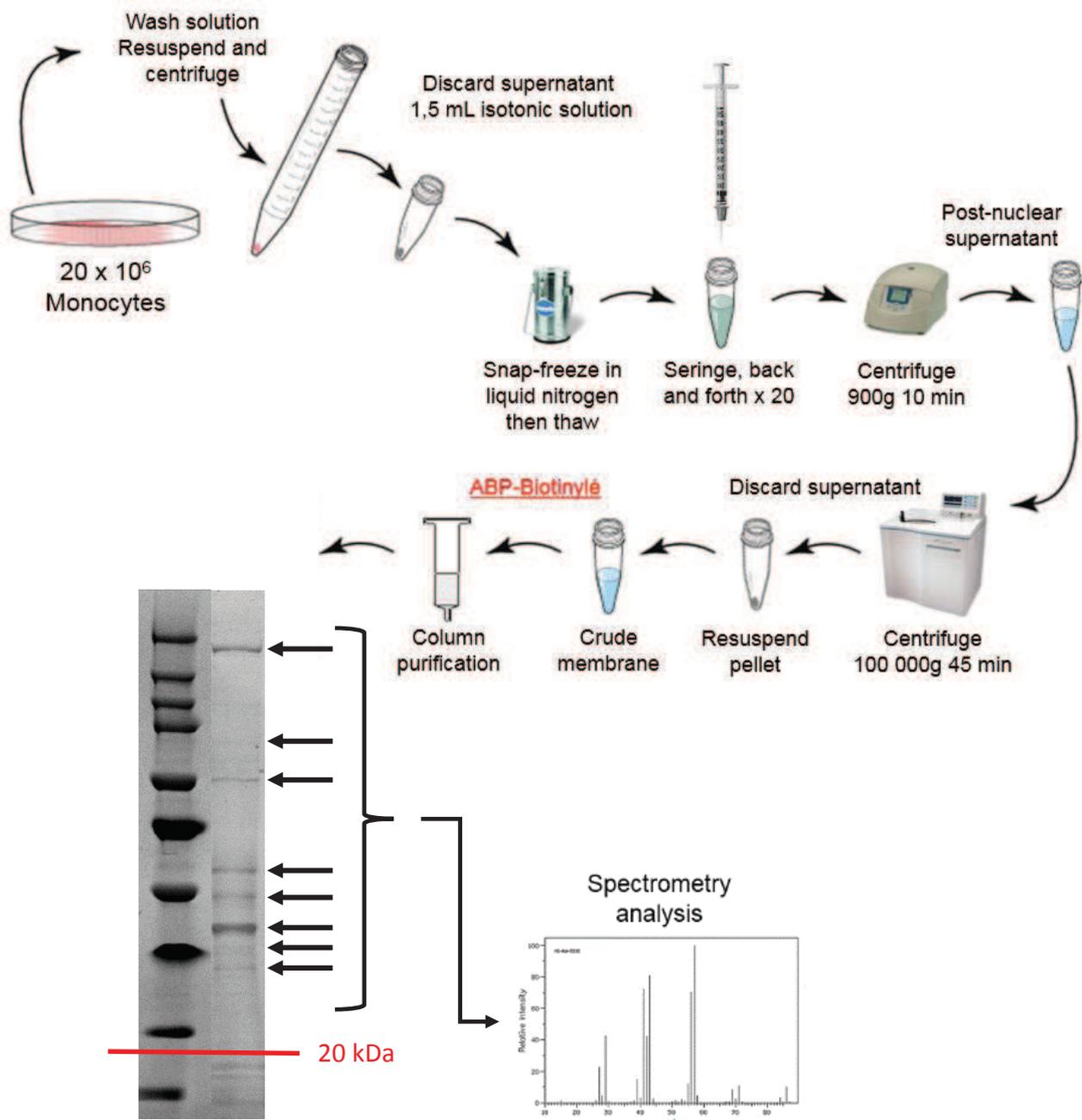


Figure 2 : Protocole de purification des protéines membranaires se liant au dendrimère ABP-Biot. Les monocytes humains sont purifiés et leur fraction membranaire extraite. Les protéines se liant au dendrimère ABP sont récupérés par colonne d'affinité biotine/streptavidine et identifiées par spectrométrie de masse. 1 donneur représentatif de 3.

Mitochondrie

60S ribosomal protein
40S ribosomal protein
Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix mitochondrial
Prohibitin-2
Dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial
Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial
2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial
Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial
Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial
Malate dehydrogenase, mitochondrial
ATP synthase subunit gamma, mitochondrial

Protéines membranaires :

Brain acid soluble protein 1
HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-1 beta chain
HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-7 beta chain
HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain
Ventricular zone-expressed PH domain-containing protein homolog

Canaux ioniques:

Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial
Vacuolar proton pump subunit E 1
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1

Réponse immunitaire :

Ig kappa chain C region

Métabolisme du fer :

Ceruloplasmin
Lactotransferrin precursor - Homo sapiens (Human)
Fermitin family homolog 3
Catalase - Homo sapiens (Human)

Phagocytose :

Coronin-1A OS=Homo sapiens
Coronin-1C OS=Homo sapiens

Granules azurophiles (neutrophiles) :

Azurocidin
Myeloblastin
Leukocyte elastase inhibitor

Myeloperoxidase

Neutrophil elastase

Famille annexin :

Annexin A2

Calcium dépendant :

Protein S100-A9

Gelsolin
F-actin-capping protein subunit alpha-1
Complement C3

Molécules solubles (sang/plaquettaires) :

Fibrinogen alpha chain
Thrombospondin-1 precursor - Homo sapiens (Human)
Vitronectin

Tableau 1 : Analyse en spectrométrie de masse des 8 bandes obtenues avec le protocole de purification présenté en **Figure 2**. Les protéines ont été classées suivant leur répartition au sein de la cellule et de leur fonction.

Lors de l'analyse réalisée sur ces 8 bandes, une centaine de protéines ont pu être identifiées. Parmi celles-ci, plusieurs d'entre elles avaient déjà été identifiées lors d'analyses préliminaires quelques années auparavant. Les protéines comme la lactotransferrine, la myéloperoxidase ou des protéines de la famille S100, et spécifiquement la protéine S100A9, ont été retrouvées

lors de ce protocole (**Tableau 1, protéines encadrées en rouge**). Il est également trouvé des récepteurs comme le complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2 (CMHII), des composants de canaux ioniques, mais aussi de nombreuses protéines mitochondriales ou de granules. Les protéines déjà observées valident le protocole utilisé, se rapprochant des résultats obtenus par d'autres manipulateurs. Ces protéines peuvent être intéressantes mais ne sont pas décrites dans la littérature en tant que récepteurs présents sur la membrane cellulaire des monocytes. La présence de protéines cytoplasmiques en nombre important laisse à penser que le protocole peut être amélioré afin de ne cibler que les protéines membranaires ne reconnaissant que le dendrimère ABP-Biotinylé. L'absence de conditions contrôles empêche de discriminer les protéines se liant spécifiquement au dendrimère parmi celles retenues non spécifiquement par la colonne d'affinité.

Afin d'améliorer le protocole, des contrôles négatifs ont été ajoutés afin de pouvoir éliminer les protéines ayant naturellement de l'affinité pour la colonne de streptavidine. D'autres protéines peuvent aussi se fixer de manière non spécifique au dendrimère ABP-Biotinylé. Ajouter du dendrimère ABP froid en excès permettrait d'identifier ces protéines. Ces contrôles mettraient en évidence les protéines se fixant non spécifiquement. Un nouveau protocole intégrant ces deux contrôles négatifs a été élaboré. Les résultats ont été décevants. Aucune différence expérimentale suivant les différentes conditions n'a pu être observée en réalisant toujours le protocole présenté en **figure 2**.

I.3 Optimisation du protocole et application sur cellules totales

L'affinité du dendrimère ABP ayant été mesurée à environ 15 μ M, l'affinité pour son récepteur est catégorisée comme faible. Travailler sur des fractions membranaires ayant été extraites et lysées doit faire décroître cette affinité. Le protocole a donc été adapté. Le nombre de cellules utilisé a été diminué passant de 20 à 3 millions de monocytes. Le dendrimère ABP-Biot est directement mis en contact des monocytes humains purifiés avec la présence ou non de dendrimère ABP en excès. Les dendrimères sont laissés soit 60 min à 4°C, soit 15 min à 37°C (**Figure 3**). Cette technique permet d'induire une fixation prolongée du dendrimère sur les cellules jusqu'à atteindre un début d'internalisation. Cette incubation à 37°C est utilisée sur différents temps afin d'identifier des complexes de récepteurs^{276,277}. Reprenant la même

méthode que celle utilisée dans le protocole précédent, les cellules sont lysées puis la fraction cellulaire est directement passée sur la colonne d'affinité de streptavidine. L'éluât est déposé sur gel SDS-PAGE puis coloré. Il existe des variations d'intensité au niveau de plusieurs bandes suivant les conditions réalisées.

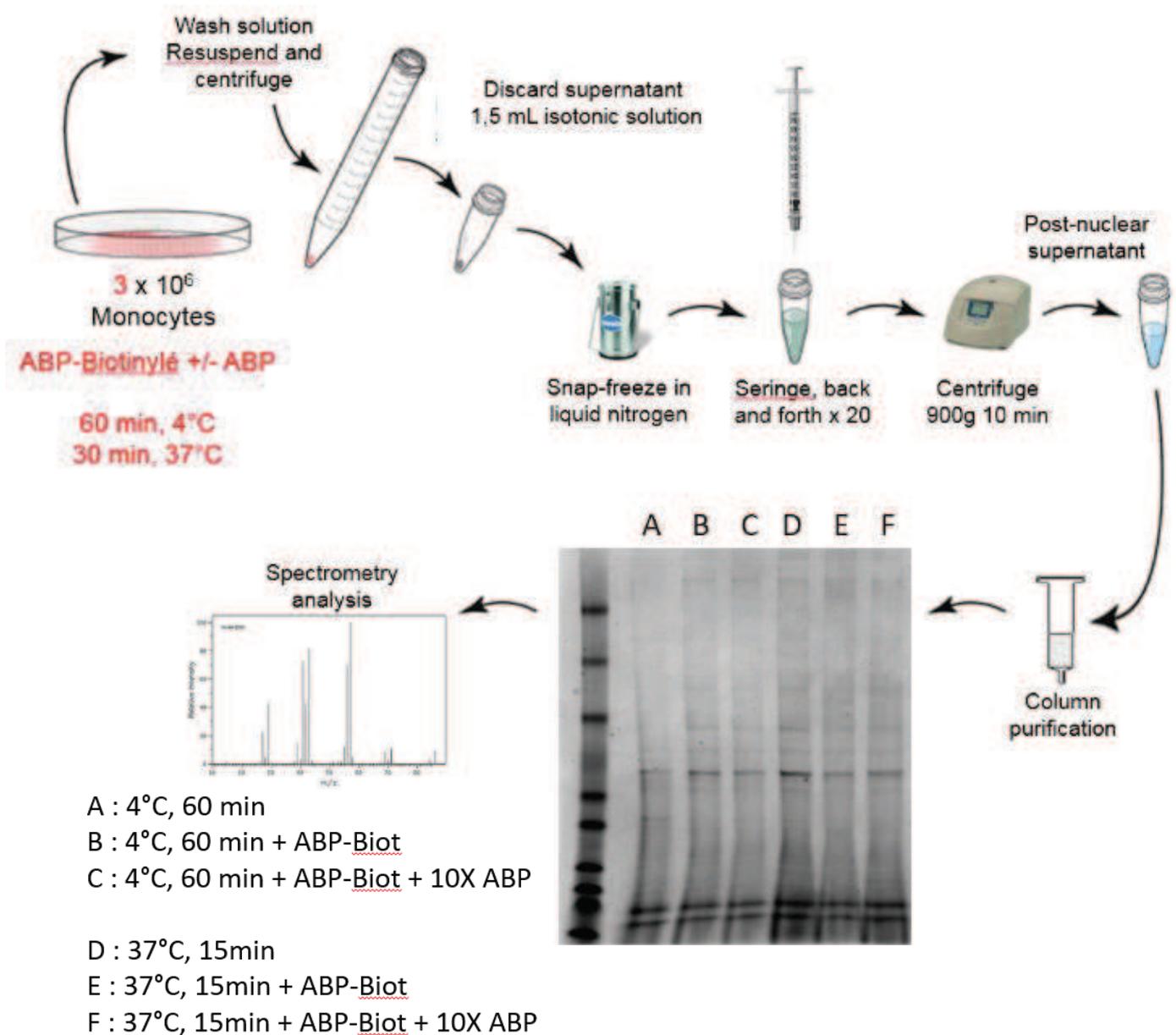


Figure 3 : Protocole de purification des protéines totales se liant au dendrimère ABP-Biot. Les monocytes humains sont purifiés et les protéines se liant au dendrimère ABP sont récupérées par colonne d'affinité biotine/streptavidine et identifiées par spectrométrie de masse.

Certaines d'entre elles ont été analysées en spectrométrie de masse sans donner de résultats satisfaisant. Les protéines ont été concentrées en une seule bande afin de passer l'ensemble des protéines de chaque condition en spectrométrie de masse.

Il est maintenant possible de ne sélectionner que les protéines présentes lors de l'expérience ABP-Biot et absentes des contrôles négatifs : sans dendrimère et dendrimère ABP en excès. Si l'on ne considère que ces protéines, seulement 8 d'entre elles remplissent ces critères : La coronine 1A, la transketolase, l'aldolase A, l'actine gamma 1, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, la défensine alpha 1, la moésine et enfin l'EF1A1, facteur d'élongation de l'ADN. Un logiciel nommé STRING a été utilisé permettant d'identifier des liens entre plusieurs protéines. Seulement trois d'entre comportent une relation directe entre elles. Il s'agit de la GAPDH, de la transketolase (TKT) et de l'aldolase A (ALDOA) (**Figure 4**). Ces protéines appartiennent à la voie métabolique des pentoses/phosphates. La GAPDH a également été décrite comme un récepteur à la transferrine²⁷⁸. Cette expérience met en évidence des voies métaboliques potentielles qui pourraient être impliquées dans l'induction du signal anti-inflammatoire par le dendrimère ABP. Une kinase telle qu'Akt a été testée et est activée après 15 min de stimulation des monocytes humains purifiés par le dendrimère ABP. Ces résultats préliminaires offrent donc des perspectives intéressantes.

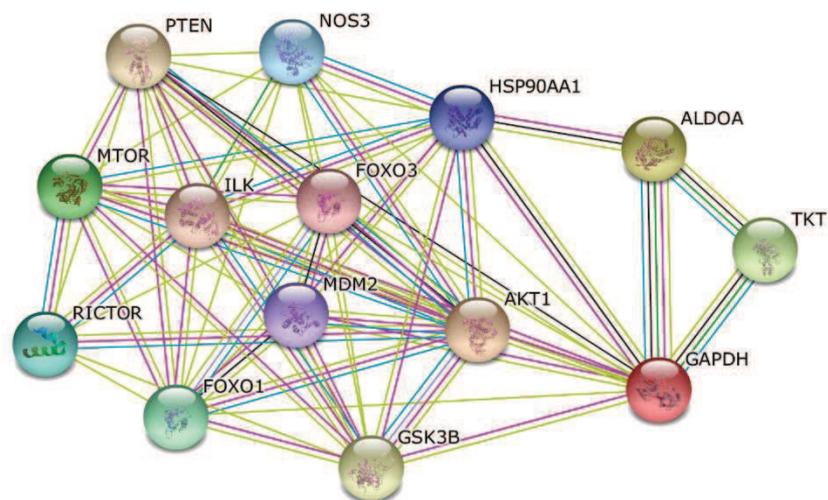


Figure 4 : Analyse des interactions entre les protéines ALDOA, TKT et GAPDH. Les noms des trois protéines sont rentrés dans le logiciel STRING. Leur niveau et type d'interaction sont visibles sur le graphique, chaque trait coloré montre la présence d'une interaction, d'un lien expérimental ou d'une implication dans une même voie métabolique.

I.4 Discussion

Cette étude a demandé l'utilisation de dendrimères aux terminaisons AzaBisPhosphonates où un groupement chimique (fluorescent, biotine) a été greffé au cœur de la molécule, remplaçant l'une des 6 branches. Un dendrimère ABP-Julolidine a permis de démontrer une fixation spécifique sur les monocytes humains par cytométrie en flux. La seconde molécule couplée à un groupement biotine a permis de réaliser des expériences de purifications de protéines membranaires. Cependant, les résultats obtenus par spectrométrie de masse après purification des protéines membranaires se liant au dendrimère ABP biotinylé sont difficiles à interpréter. En effet, le fait d'obtenir des protéines cytoplasmiques montre que le protocole peut être encore amélioré. Cependant, la présence redondante de protéines liées au métabolisme du fer comme la lactotransferrine ou la GAPDH sont des résultats prometteurs. Il existe de grandes disparités au niveau du métabolisme du fer chez les monocytes-macrophages suivant leur type d'activation. Lors de la polarisation des macrophages en type 1 (M1 ou pro-inflammatoire) ou en type 2 (M2 ou anti-inflammatoire), les cellules présentent des phénotypes différents notamment avec une différence d'expression au niveau des protéines impliquées dans la phagocytose et le stockage du fer. Pour simplifier, les macrophages de type 1 comportent un faible nombre de récepteurs impliqués dans le métabolisme du fer comme le récepteur CD163 ou les récepteurs à la transferrine 1, 2 ou 3 (GAPDH). Pour les macrophages de type 2, la proportion de récepteurs est augmentée et permettent une plus grande captation du fer²⁷⁹. Le dendrimère ABP pourrait avoir la propriété de stimuler ces récepteurs comme le récepteur GAPDH et pourrait engager les monocytes dans une voie de type anti-inflammatoire. Cribler les récepteurs liés au métabolisme du fer en les exprimant dans une lignée cellulaire par exemple permettrait de savoir si le dendrimère ABP se fixe sur l'un d'entre eux.

Lors de réponses physiologiques, de nombreux ligands se fixent spécifiquement sur un récepteur. Dans le but de capturer le récepteur spécifique d'un ligand, plusieurs techniques ont été développées récemment dans la littérature. Un outil appelé TRICEPS est composé comme son nom l'indique de trois parties. Il va tout d'abord permettre de greffer le ligand d'intérêt sur l'une de ses trois branches. Une fonction hydrazine va par la suite être activée afin de pouvoir capturer le ou les récepteurs du ligand. Finalement, un groupement biotine va

permettre la purification du complexe entier²⁸⁰. Les groupements chimiques permettant une liaison covalente entre le ligand et son récepteur peuvent être portés directement par le ligand lui-même. En 2014, un « photocrosslinker » a été greffé sur la molécule appelée Inflachromene. Cette méthode a permis aux auteurs de pouvoir identifier le récepteur à l'Inflachromene sur les cellules microgliales et de comprendre l'effet anti-inflammatoire induit par ce médicament²⁸¹. Greffer une fonction chimique réactive sur le dendrimère ABP afin de pouvoir créer une liaison covalente avec son récepteur augmenterait l'affinité du complexe dendrimère/récepteur. Cela permettrait d'obtenir de meilleurs résultats lors des expériences de purification. Ce groupement serait ajouté en surface, augmentant la possibilité d'interagir avec les groupements reconnaissant le dendrimère ABP. Des tests de « crosslinking » en utilisant le groupement Julolidine présent au cœur de la molécule ABP-Julolidine a été activé par UV. Cette expérience préliminaire n'a pas montré de résultats satisfaisant.

L'affinité du dendrimère ABP pour les monocytes humains entiers a été mesurée aux environs de 10^{-5} M. L'affinité faible du dendrimère ABP envers les monocytes humains oblige l'utilisation de protocoles dans des conditions dénaturantes douces afin de limiter les changements de conformation des protéines membranaires. Pour donner une échelle de valeur, l'affinité de la biotine pour le groupement streptavidine se situe aux environs de 10^{-15} M et les anticorps les plus affins reconnaissent leur cible avec une affinité de $10^{-9}/10^{-10}$ M (Source : site PerkinElmer). L'utilisation d'une lyse mécanique a été la méthode choisie pour limiter la perte d'affinité entre le dendrimère et son ou ses récepteurs spécifiques. Une seringue à insuline a été utilisée. Une technique appelée « French Press » aurait été aussi intéressante. Elle permet d'induire une pression croissante sur les cellules jusqu'à atteindre la pression désirée. L'éclatement des cellules peut être alors partielle, n'induisant pas de dispersion des complexes membranaires et évite l'utilisation de détergents²⁷⁷. Réaliser le même protocole en induisant la lyse cellulaire par ce système pourrait donner de meilleurs résultats.

II- Criblage des effets de dendrimères aux générations et fonctions terminales différentes

II.1 Structures des dendrimères PEG

Les dendrimères utilisés dans cette étude ont été synthétisés par le Dr. Eduardo Fernandez-Megia (Departamento de Química Orgánica, Centro de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares (CIQUS), Universidad de Santiago de Compostela, SPAIN).

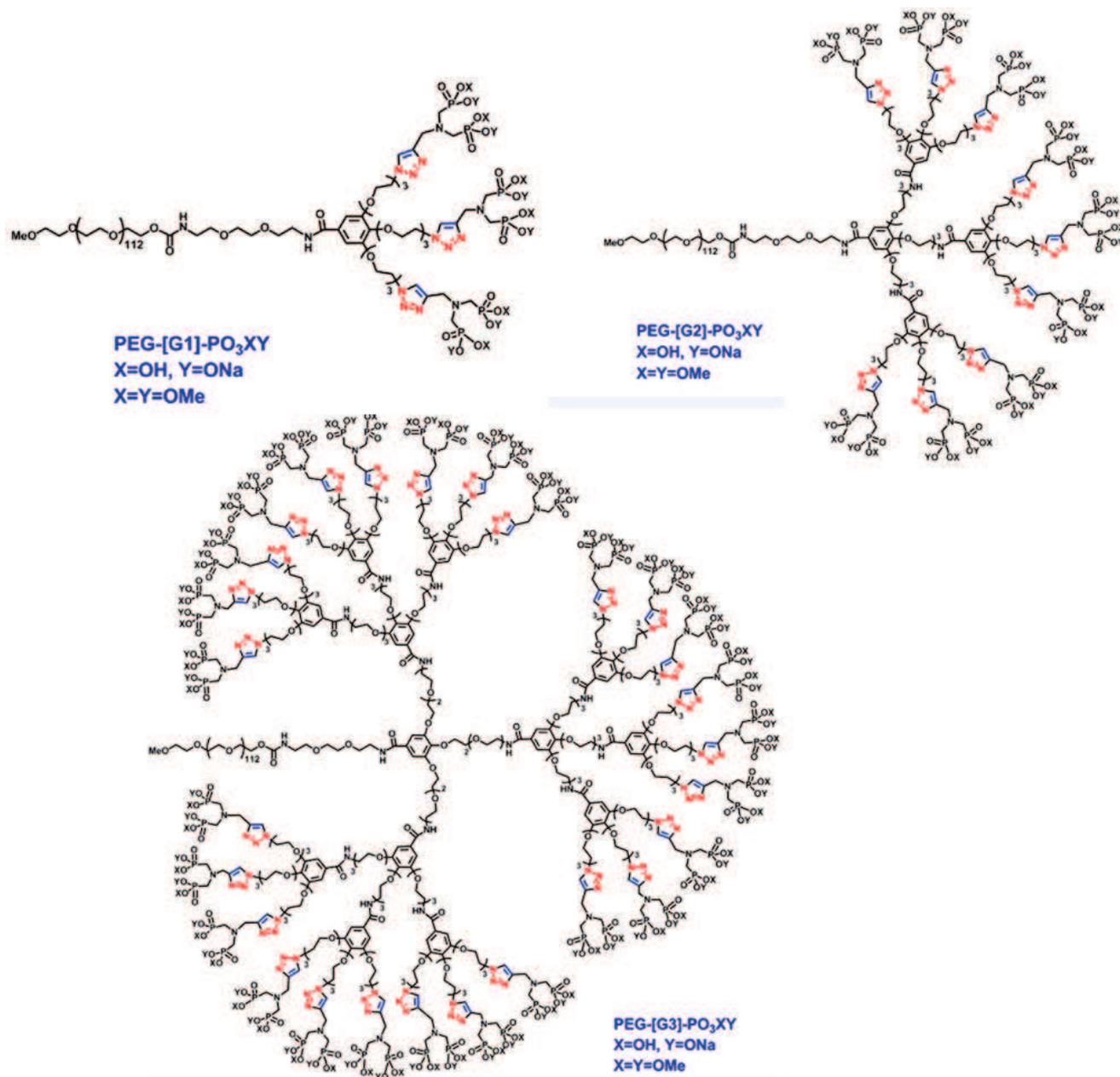


Schéma 1 : Structures des dendrimères PEG de générations 1 à 3, aux terminaisons N₃, OMe et Na.

Les dendrimères aux terminaisons N₃ ne portent pas les fonctions de surface Azabisphosphorés mais présentent des terminaisons azotures (en rouge).

Au total, 9 nouveaux dendrimères ont servi durant cette analyse. Ces molécules sont divisées en 3 familles comportant des terminaisons différentes : N₃, Na ou OMe (**Schéma 1**). Au sein de chacune de ces familles, les dendrimères de génération 1, 2 et 3 ont été synthétisés et testés lors d'expériences biologiques. Enfin, des contrôles ont été réalisés avec le dendrimère ABP ainsi qu'avec les fonctions terminales de ces 9 dendrimères non greffées : NPONa et NPOMe.

II.2 Innocuité des différents dendrimères sur les PBMCs humains

La toxicité potentielle de tous les dendrimères a été testée. Des PBMCs de donneurs sains ont été purifiés et incubés pendant 1 ou 3 jours avec des concentrations de 0.2, 2, 20 ou 200 µM de chaque molécule.

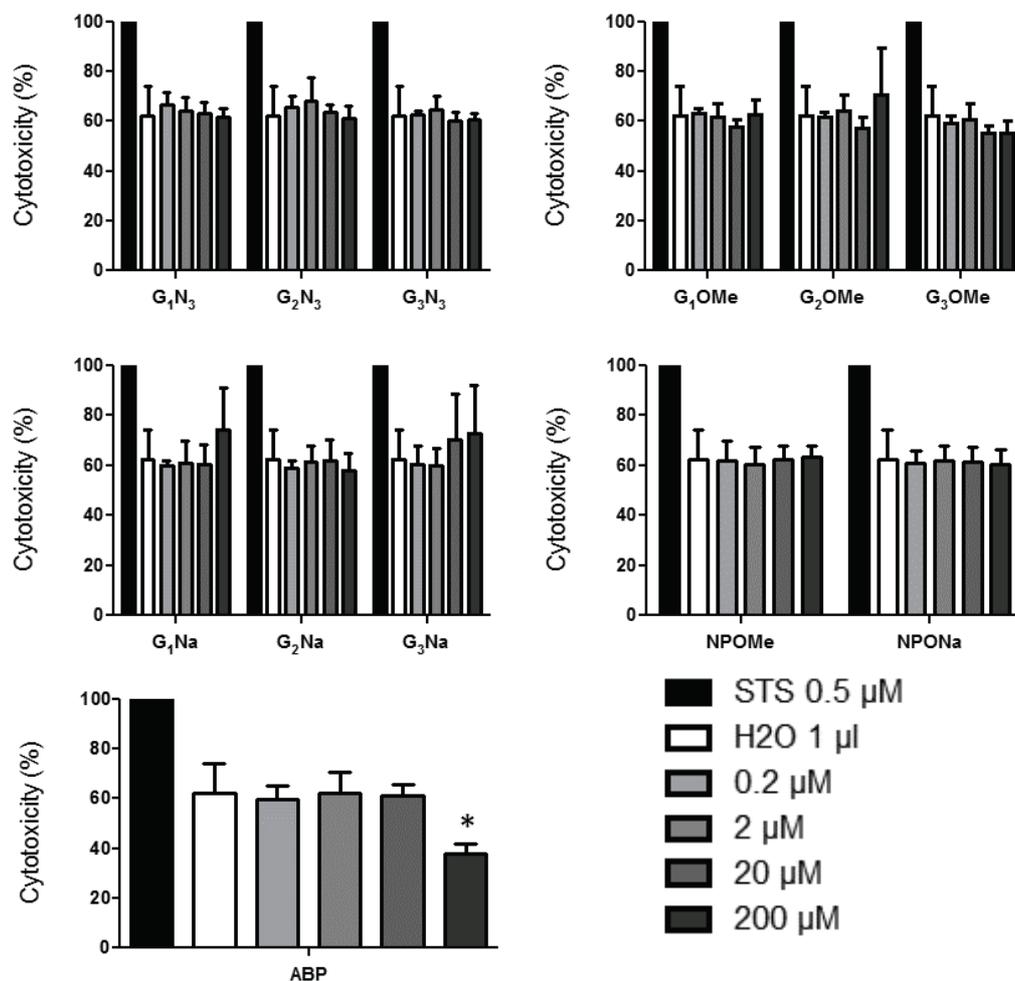


Figure 1 : Innocuité des dendrimères N₃, OMe, Na et ABP sur des PBMCs humains. Mesures de cytotoxicité réalisées sur 3 donneurs avec 0.2, 2, 20 ou 200 µM de chaque dendrimer ajouté pendant 24h. Contrôle positif : staurosporine (STS), négatif : H₂O. Stats vs H₂O : t-test paired, two tailed.

La cytotoxicité induite a été mesurée et comparée à celle de la toxine nommée staurosporine (STS) et au contrôle H₂O à jour 1 (**Figure 1**) et 3 (**Data supp fig.2**). La toxicité induite par le contrôle positif STS a été utilisée comme référence pour chacun des donneurs et placée à 100% de cytotoxicité. Aucune cytotoxicité induite par les différents dendrimères à jour 1 ou à jour 3 n'est observable, exception faite pour le dendrimère G₃OMe au troisième jour de culture. Ces résultats montrent que nous sommes en présence de dendrimères pouvant être utilisés au contact de cellules immunitaire humaines sans induire de cytotoxicité.

II.3 Activation morphologique et anti-apoptotique des monocytes humains par les dendrimères de type Na et OMe

Des monocytes humains ont été purifiés et placés en culture pendant 3 jours avec chacun des dendrimères ajoutés à 0.2, 2 ou 20 µM. Afin de visualiser un effet sur ces cellules, la morphologie des monocytes a été observée par cytométrie en flux (**Figure 2**). Sur le donneur présenté ici (1 représentatif de 4), l'ajout du dendrimère ABP induit une augmentation de taille et de granulosité des monocytes en fonction de sa concentration. Sur ce donneur, on observe que les dendrimères de type Na de première, deuxième et troisième génération ajoutés à 20 µM induisent une variation de la taille et de la granulosité des monocytes. Dans une moindre mesure, les dendrimères G₁Na et G₃Na à 2 µM et les dendrimères G₁OMe et G₂OMe à 20 µM induisent aussi la même réponse phénotypique. Cependant, ces changements morphologiques sont différents de ceux induits par le dendrimère ABP. Les tailles et granulosités des monocytes activés par les dendrimères Na et OMe sont inférieures à celles des monocytes activés par le dendrimère ABP. L'activation des monocytes chez 4 donneurs en fonction du type de groupements terminaux, de la génération et de la concentration en dendrimère utilisé peut être résumée dans le tableau ci-dessous (**Tableau 1**). Les fenêtres de cytométrie utilisées pour réaliser ce tableau sont présentées en supplément (**Data supp fig.3**). Les dendrimères aux terminaisons Na sont les dendrimères présentant la plus grande capacité à activer les monocytes humains suivis par les dendrimères aux terminaisons OMe. Les fonctions terminales NPONa et NPOMe n'induisent aucun changement visible sur les monocytes. Elles ont été par la suite retirées de l'étude.

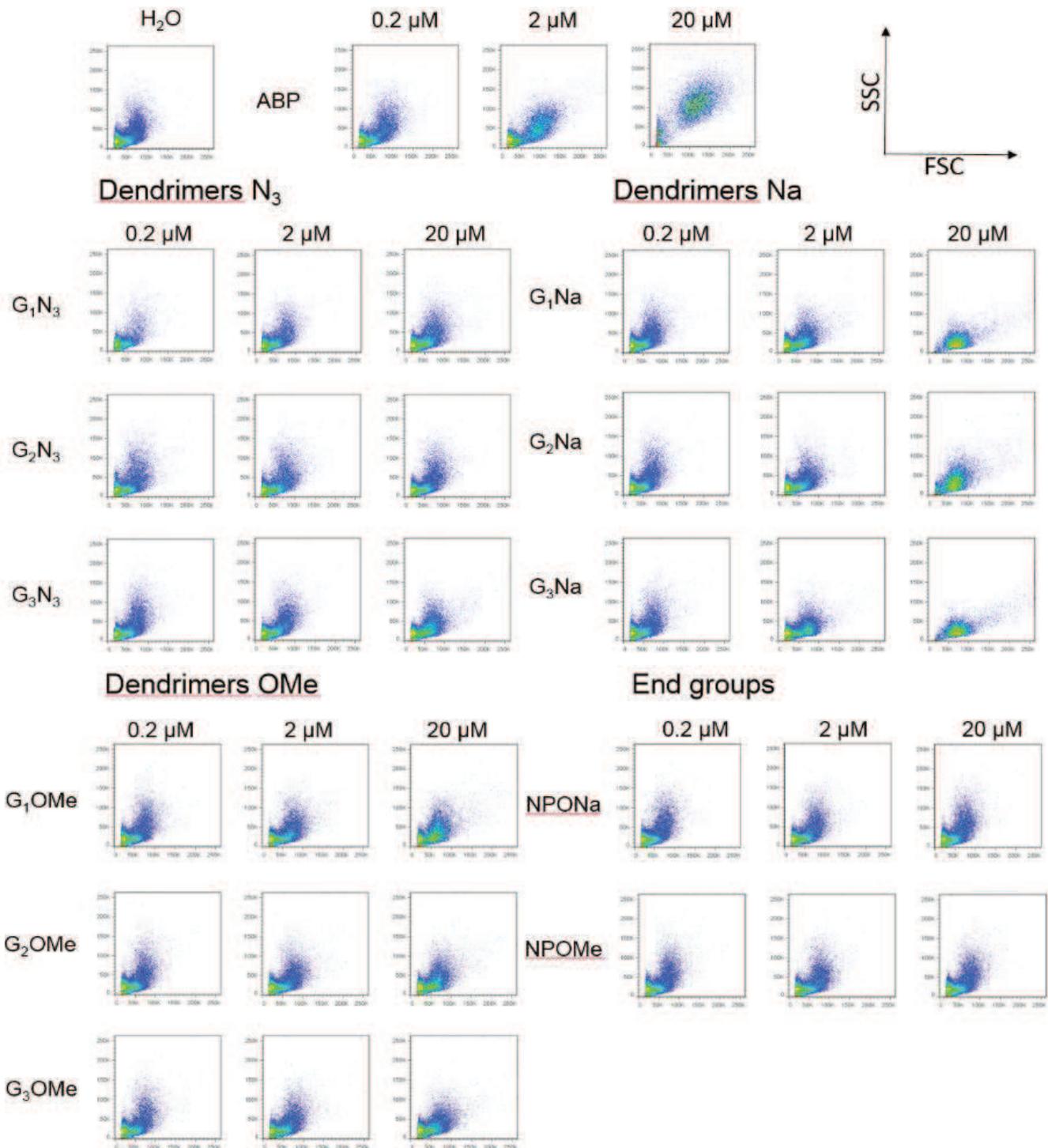


Figure 2 : Activation des monocytes humains par les dendrimères OMe, Na et ABP. Les monocytes humains purifiés ont été mis en culture pendant 3 jours avec 0.2, 2 ou 20 μM des dendrimères de type N_3 , Na ou OMe, des groupements terminaux NPONa ou NPOMe ou avec le dendrimère ABP. Fenêtres réalisées par cytométrie en flux montrant la taille des cellules (Forward-Scattered light ou FSC) en fonction de leur granulosité (Side-Scattered light ou SSC). 1 donneur représentatif de 4. Contrôle H_2O .

	Dendrimers	Concentrations (μ M)	Activation on X donors
Dendrimers N ₃	G ₁ N ₃	0.2	∅
		2	∅
		20	++
	G ₂ N ₃	0.2	∅
		2	∅
		20	∅
	G ₃ N ₃	0.2	∅
		2	∅
		20	+
Dendrimers Na	G ₁ Na	0.2	∅
		2	+++
		20	++++
	G ₂ Na	0.2	∅
		2	+++
		20	++++
	G ₃ Na	0.2	∅
		2	++++
		20	++++
Dendrimers OMe	G ₁ OMe	0.2	∅
		2	∅
		20	++++
	G ₂ OMe	0.2	∅
		2	∅
		20	++++
	G ₃ OMe	0.2	∅
		2	∅
		20	++
End groups	NPONa	0.2	∅
		2	∅
		20	∅
	NPOMe	0.2	∅
		2	∅
		20	∅
ABP	ABP	0.2	+
		2	++++
		20	++++

Tableau 1 : Activation des monocytes humains purifiés par les différents dendrimères. L'activation visible en cytométrie en flux des monocytes chez un donneur est représentée par une croix +.

L'activation est visualisée sur Dot plot suivant le type dendrimère et la concentration utilisée. Chaque condition a été réalisée sur 4 donneurs. Le symbole ∅ correspond à une absence d'activation chez les 4 donneurs.

L'activation des monocytes en réponse au dendrimère ABP a déjà pu être associée à une diminution du nombre de cellules rentrant en apoptose à 3 et 6 jours de culture¹⁶⁶. Ici, les monocytes ont été mis en culture pendant 3 jours avec chacun des différents dendrimères à 0.2, 2 ou 20 μM (**Figure 3**). Sur ce donneur (1 représentatif de 2), le dendrimère ABP induit une diminution de la proportion de cellules rentrant en apoptose passant de 72% chez le contrôle H₂O à 13% dans la condition à 20 μM d'ABP. Pour les dendrimères aux terminaisons Na, la proportion de cellules positives descend en dessous des 10% pour toutes les générations, à la concentration de 20 μM . Pour les dendrimères OMe, seul le dendrimère de génération 3 ne semble pas avoir d'effets là où les dendrimères OMe de générations 1 et 2 sont actifs à une concentration de 20 μM . Enfin, les dendrimères aux terminaisons N₃ n'induisent aucune variation du marquage par l'annexine V, n'affectant pas la proportion de monocytes humains rentrant en apoptose. Certains de ces dendrimères induisent une réponse des monocytes. L'activation bien que visible sur les monocytes humains est différente de celle observée par le dendrimère ABP sur le plan morphologique mais est similaire quant à la proportion de monocytes rentrant en apoptose, diminuée dans tous les cas.

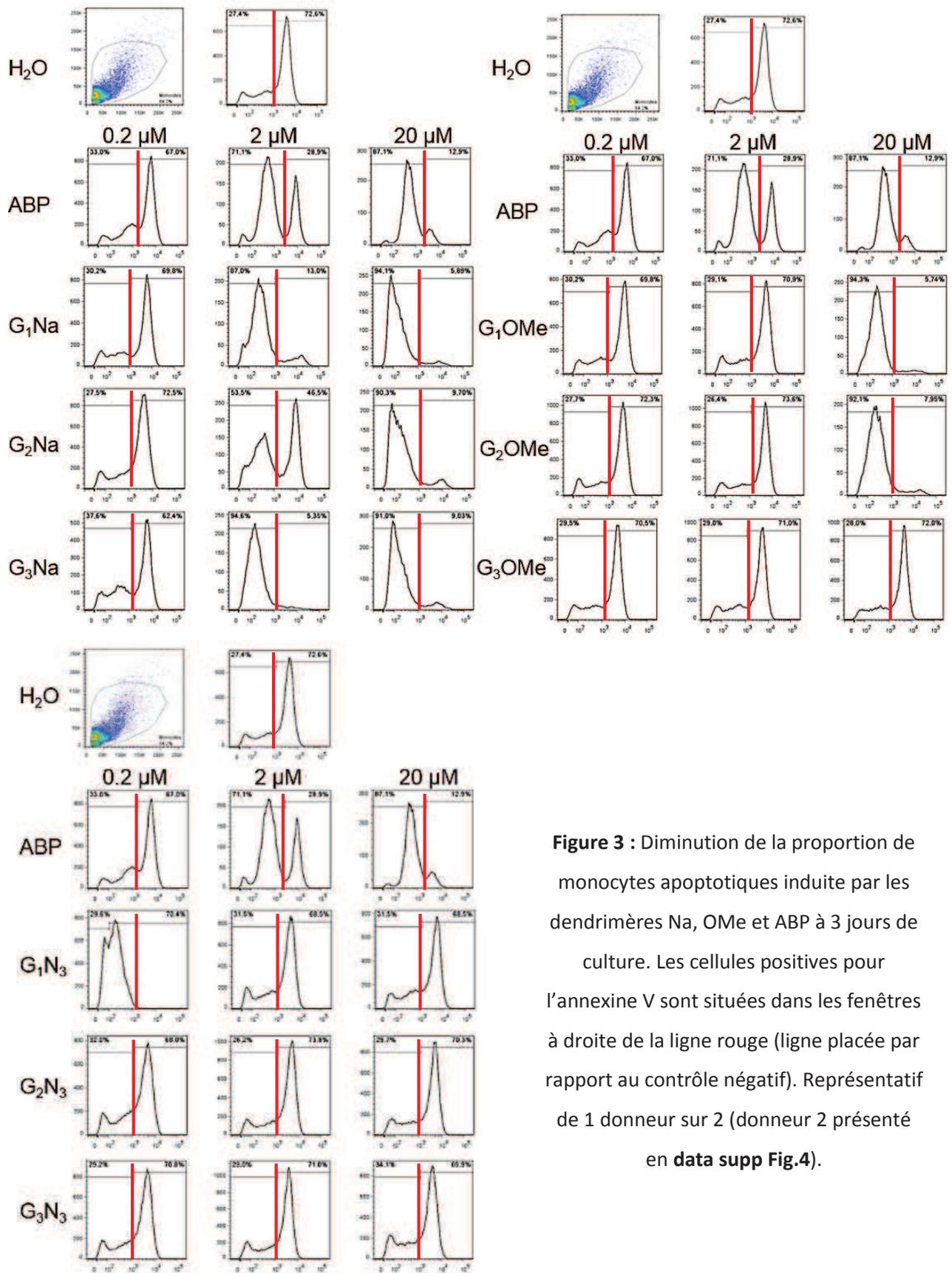


Figure 3 : Diminution de la proportion de monocytes apoptotiques induite par les dendrimères Na, OMe et ABP à 3 jours de culture. Les cellules positives pour l'annexine V sont situées dans les fenêtres à droite de la ligne rouge (ligne placée par rapport au contrôle négatif). Représentatif de 1 donneur sur 2 (donneur 2 présenté en **data supp Fig.4**).

II.4 Activation pro-inflammatoire des monocytes humains par les dendrimères de type Na et OMe

Les monocytes ont la possibilité de s'activer en monocytes de types pro ou anti-inflammatoire suivant le stimulus reçu. Le dendrimère ABP induit une activation anti-inflammatoire des monocytes humains. ABP induit une surexpression de gènes anti-inflammatoires comme MRC1 ou IL-10, sans augmenter l'expression de gènes pro-inflammatoires que sont par exemple les gènes codant les cytokines IL-1 β , IL-6 ou IL-12²⁶⁹. Ici, l'expression des gènes MRC1, IL-10, IL-1 β , IL-6 et IL-12 a été mesurée par qPCR. Les monocytes humains purifiés ont été incubés 6h avec 20 μ M de chaque dendrimère. Si l'on se focalise sur l'expression des gènes anti-inflammatoires MRC1 et IL-10 chez 3 donneurs (**Figure 4a**), ABP induit la surexpression de ces deux gènes par 15 et 8 respectivement. Cette surexpression reste en accord avec ce qui avait été préalablement décrit dans l'équipe. Pour les 9 autres dendrimères, seul le dendrimère G₃Na induit une surexpression du gène MRC1 de 3 à 12 fois selon le donneur. Le gène IL-10 est quant à lui surexprimé par les molécules aux terminaisons Na d'un ratio de 10 à 60 selon le donneur et le dendrimère. Il est d'ailleurs intéressant d'observer que la surexpression de cette cytokine se fait de manière génération dépendante : G₁<G₂<G₃. Enfin, les dendrimères N₃ n'induisent pas de surexpression du gène à l'IL-10, surexprimé modérément par les dendrimères OMe (de 2 à 8 fois).

Les gènes pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et IL-12 ne sont pas surexprimés pas ABP excepté sur le donneur B où la surexpression reste minime pour ces gènes (< 10) (**Figure 4b**). Idem pour les dendrimères de type N₃ qui n'induisent pas de surexpression de ces marqueurs pro-inflammatoires. Les dendrimères Na et OMe induisent quant à eux une forte expression des gènes à l'IL-1 β et à l'IL-6. Cette surexpression, plus importante pour les dendrimères Na (x100 à x8000), semble également se faire de manière génération dépendante. Enfin, l'activation par les dendrimères de type OMe est inversement proportionnelle à leur génération. L'expression des gènes IL-1 β et IL-6 passe d'une surexpression x100 pour la première génération à une augmentation multipliée seulement par 10 voire 5 pour la troisième génération selon les donneurs. De manière surprenante, le gène à l'IL-12 étant également une cytokine de type inflammatoire n'est pas surexprimé.

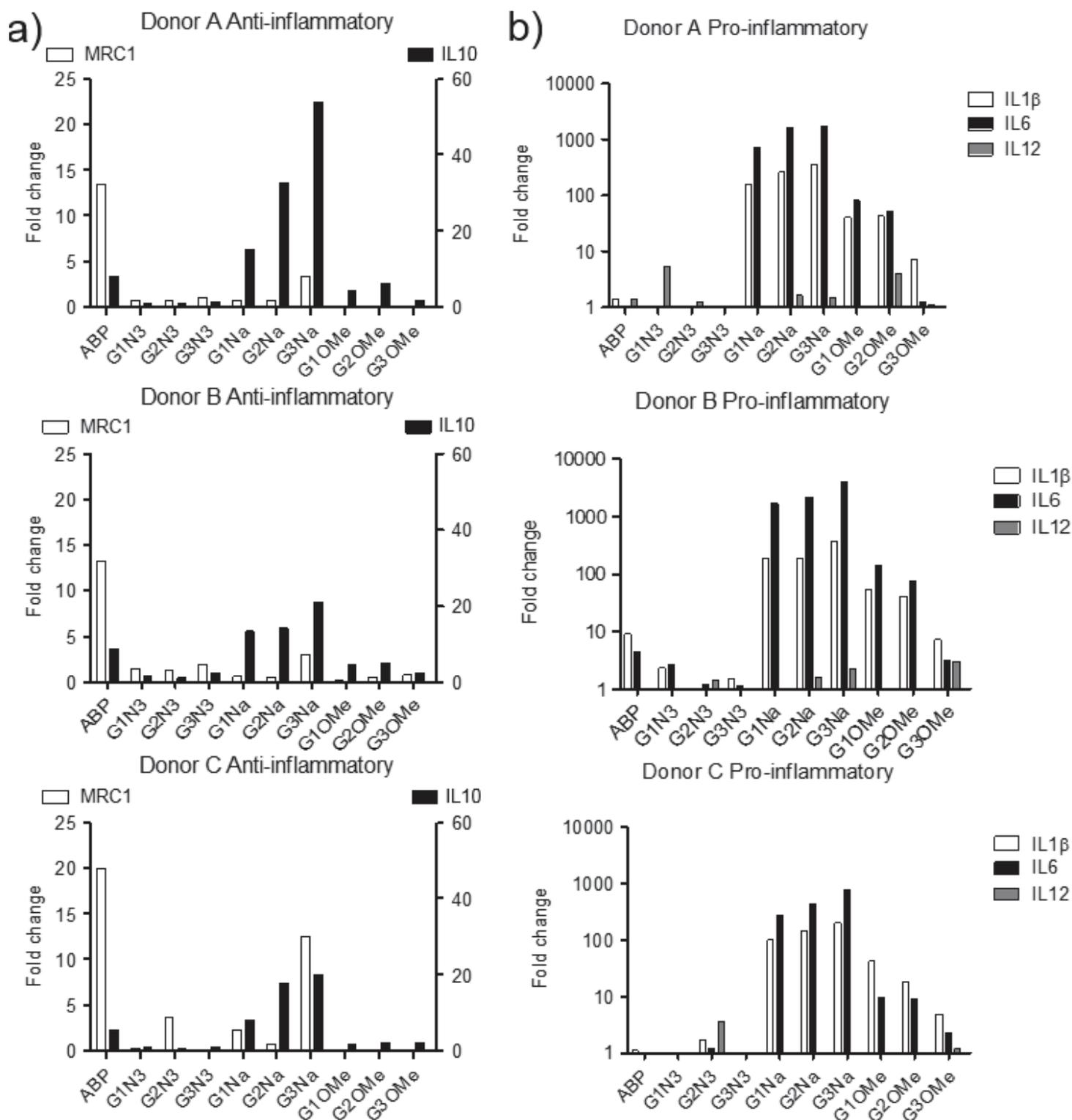


Figure 4 : Surexpression des gènes à l'IL-10, IL-1β et IL-6 par les dendrimères Na et OMe chez les 3 donneurs A, B et C. Les monocytes humains purifiés ont été incubés 6h avec 20 μM des différents dendrimères. L'expression des gènes a été mesurée par qPCR. **a)** Expression des gènes anti-inflammatoires MRC1 et IL-10. **b)** Expression des gènes pro-inflammatoires IL-1β, IL-6 et IL-12.

II.5 Discussion

Pendant cette étude, nous avons étudié l'effet de 9 nouveaux dendrimères aux générations allant de 1 à 3 et aux terminaisons OMe, Na et N₃ sur les monocytes humains. Une activation est visible pour certains d'entre eux, observée par un changement morphologique des monocytes ainsi que par une survie cellulaire prolongée visualisée par une diminution de l'apoptose de ces cellules. Cette activation diffère de la réponse anti-inflammatoire induite par le dendrimère ABP. Avec les dendrimères Na et OMe, les monocytes sont plus petits, moins granuleux et surexpriment les gènes pro-inflammatoires IL-1 β et IL-6. Ceci est corrélé avec une surexpression de la cytokine pro-inflammatoire IL-10. Les monocytes font partie de l'immunité innée et forment la première ligne de défense de l'organisme contre des attaques d'éléments extérieurs comme les bactéries. Les monocytes peuvent alors rapidement produire une cytokine pro-inflammatoire appelée TNF- α qui va devenir le principal médiateur de la réponse inflammatoire. Elle va notamment induire la production d'autres cytokines pro-inflammatoires que sont l'IL-1 β et l'IL-6 par les monocytes²⁸². Enfin, il est décrit depuis longtemps qu'une seconde phase va se mettre en place avec la production d'une cytokine anti-inflammatoire qu'est l'IL-10. Cette production d'IL-10 est détectable après 8h de stimulation par des éléments bactériens comme des LipoPolySacharides (LPS) de membranes de bactéries Gram négatifs²⁸³. L'IL-10 a un rôle immuno-modulateur afin de limiter dans le temps cette réaction pro-inflammatoire. Nous présentons dans cette étude deux séries de dendrimères aux terminaisons ONa et OMe capables d'induire une activation pro-inflammatoire des monocytes humains. Cette activation est similaire pour la surexpression des gènes IL-10, IL-1 β et IL-6 à celle observée par le LPS sur ces cellules. Démontrer la production rapide de TNF- α et l'induction d'une réponse TLR4 dépendante permettrait d'expliquer l'effet de ces molécules au niveau de ces cellules immunitaires²⁸⁴. Seulement un dendrimère a montré dans la littérature une capacité à induire une réponse pro-inflammatoire chez des cellules de la lignée myéloïde²⁸⁵. Nous venons de présenter ici deux familles de dendrimères aux terminaisons ONa et OMe induisant une réponse pro-inflammatoire des monocytes humains. Ces nouveaux outils pourraient être utilisés pour inverser l'activation d'une population macrophagique appelée TAM (Tumor-associated macrophages). Les TAMs sont des macrophages présents dans l'environnement tumoral. Il s'agit de cellules saines, parmi les plus présentes dans cette pathologie. Leur phénotype indique qu'ils sont présents

sous une forme activée de type anti-inflammatoire, appelée polarisation pro-tumorale²⁸⁶. Ces macrophages vont diminuer les réponses de l'organisme envers les cellules tumorales, vont augmenter l'angiogenèse au sein de la masse tumorale et vont augmenter l'extravasation des cellules tumorales, faisant progresser la pathologie²⁸⁷. Par conséquent, ces cellules pourraient être ciblées par des traitements contre le cancer. Stimuler ces cellules afin de les repolariser en macrophages pro-inflammatoires pourrait être à la base d'une régression tumorale. Les dendrimères ONa ou OMe seraient utilisés pour induire cette réponse pro-inflammatoire désirée. Cependant, cibler cette population macrophagique que sont les TAMs reste le principal obstacle à contourner. Récemment, un peptide a montré la capacité de cibler ce type cellulaire²⁸⁸. Fonctionnaliser ces dendrimères avec ce peptide est envisageable. Il faudrait alors optimiser leur nombre en surface afin d'obtenir un ratio sélectivité/activité optimal. Ces dendrimères offrent donc de nouvelles possibilités dans l'élaboration de nouveaux traitements anti-cancéreux.

III- Matériels et méthodes

III.1 Préparation des solutions de dendrimères

Tous les dendrimères et fonctions terminales ont été mis en suspension à 2 mM dans de l'eau purifiée puis filtrés à 0,22 µm avant utilisation.

III.2 Purifications des PBMCs et monocytes humains

Les PBMCs et les monocytes ont été purifiés chaque jour à partir de sang humain de donneurs sains provenant de l'Établissement Français du Sang (EFS, Toulouse, France). Rapidement, Les PBMCs sont récupérés à l'aide d'un gradient de densité avec une solution de Pancoll (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) par centrifugation (800g, 20min, température ambiante). Les monocytes sont purifiés par sélection négative avec des anticorps dirigés contre toutes les cellules du sang excepté les monocytes, suivant les instructions du protocole fourni par Invitrogen (Untouched Human Monocytes, Invitrogen, Dynal As, Oslo, Norway). Une pureté supérieure à 90% est confirmée pour chaque donneur par cytométrie en flux (FACSCalibur BD Bioscience, San Diego, CA, USA) avec un anticorps anti-CD14 (HD14, Biolegend, San Diego, CA, USA) et avec son isotype comme contrôle négatif. Toutes les données de cytométrie ont été analysées par le logiciel FlowJo (TreeStar Inc, Ashland, OR, USA).

III.3 Viabilité des PBMCs

Les PBMCs fraîchement purifiés à partir de 3 donneurs ont été resuspendus dans une plaque 96 puits à fond U, pendant 1 et 3 jours à 37°C, à 1.5 million par mL dans du RPMI 1640 medium, pénicilline et streptomycine à 100 U/mL et 10 % de SVF (les deux provenant de Invitrogen Corporation, Paisley, UK). Toutes les molécules ont été ajoutées au début des cultures aux concentrations de (0.2 ; 2 ; 20 ; 200 µM) ainsi que l'H₂O et la staurosporine (STS) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Mo, USA) à 0.5 µM. La viabilité cellulaire est quantifiée par le kit CellTox™ Green Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, WI, USA). Les cellules sont divisées en deux volumes dans des plaques noires 96 puits. L'une des plaques est traitée avec un volume de CellTox™ Green Dye, se liant à l'ADN des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire. L'autre plaque est utilisée pour mesurer l'autofluorescence des cellules qui peut être

augmentée suivant le dendrimère ajouté. La fluorescence a été mesurée avec un Varioskan™ Flash Multimode Reader (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). Le pourcentage de cytotoxicité a été calculé à l'aide de la formule suivante :

Fluorescence due à la cytotoxicité = (Fluorescence de l'échantillon traité – autofluorescence du même échantillon)

Cytotoxicité (%) = Fluorescence due à la cytotoxicité x (100/Fluorescence en condition STS)

III.4 Analyses des monocytes humains

Les monocytes humains fraîchement purifiés de 4 donneurs indépendants ont été utilisés. Ils ont été resuspendus dans une plaque 48 puits pendant 1 et 3 jours à 1 millions par mL dans du RPMI 1640 medium, pénicilline et streptomycine à 100 U/mL et 10 % de SVF (les deux provenant de Invitrogen Corporation, Paisley, UK). Toutes les molécules ont été ajoutées au début des cultures aux concentrations de (0.2 ; 2 ; 20 μ M) ainsi que l'H₂O. La morphologie des monocytes a été analysée par cytométrie en flux avec un cytomètre LSR-II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Les analyses avec de l'annexine-V et de l'iodure de propidium ont été réalisées avec le kit : Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Bioscience, San Diego, CA, USA) en suivant le protocole de BD Biosciences sur deux 2 donneurs différents. Les monocytes ont été cultivés pendant 3 jours avec 0.2, 2 ou 20 μ M des différents dendrimères, marqués et analysés par un cytomètre LSR-II.

III.5 Méthode de qRT-PCR

Les monocytes de 3 donneurs différents ont été incubés pendant 6 heures avec 20 μ M de chaque dendrimère. Comme décrit en 2009²⁶⁹, l'ARN total a été extrait de 6 millions de monocytes par méthode au Trizol décrite par Invitrogen. L'analyse de la qualité des ARNs par Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, CA USA) a été réalisée à chaque expérience. 2 μ g d'ARN ont été utilisés pour obtenir les ADN complémentaires. Pour les PCR quantitatives, des amorces sont utilisées de séquences identiques à celles de 2009. Une amplification de 30 à 40 cycles a été réalisée sur un thermal cycler (Roche Diagnostics) avec pour chaque cycle : 95°C pendant 15 s, 60°C pendant 60 s, et 72°C pendant 60 s.

III.6 Purification des protéines membranaires

Pour chaque expérience, 3 ou 20 millions de monocytes purifiés de donneurs sains ont été nécessaires. Les cellules sont reprises, rincées au PBS, centrifugées et suspendues dans 1.5 mL de tampon Tris/HCl/MgCl₂. Les cellules sont plongées de dans l'azote liquide pendant quelques secondes puis resuspendues à l'aide d'une seringue à insuline (20x aller-retours). Le surnageant est récupéré après centrifugation. Cette fraction est ensuite centrifugée à 100 000g pendant 45min. Le surnageant est récupéré et incubé à 37°C ou 4°C pendant 15 ou 60 min respectivement, avec 20 µM de dendrimère ABP-Biotinylé. Ce surnageant est ensuite passé sur une colonne de billes de streptavidine en utilisant le protocole du fournisseur (Pierce™ Avidin Agarose, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). Les protéines présents sur la colonne d'affinité sont éluées à l'aide de guanidine 8 M (8 M Guanidine-HCl Solution, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA).

III.7 Identification des protéines par spectrométrie de masse

L'éluât est recueilli en plusieurs fractions puis concentré à l'aide d'un filtre Amicon de 3 KDa (Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Germany). Les protéines sont déposées sur un gel SDS-PAGE afin d'être concentrées suivant le protocole du fournisseur. Les bandes sont excisées et envoyées à une plateforme de protéomique (UMR 1037 INSERM CRCT, Oncopôle, Toulouse) où les bandes sont traitées et analysées.

III.8 Analyse informatique des données

Les protéines obtenues ont été rentrées dans le programme STRING afin de voir leur niveau et type d'interaction, qui sont visibles sur le graphique, chaque trait coloré montre la présence d'une interaction, d'un lien expérimental ou d'une implication dans une même voie métabolique.

Discussion

Les dendrimères sont des entités chimiques multi-branchées apparues dans les années soixante-dix¹⁵. De forme globulaire, ils sont composés de trois parties principales. Ces molécules sont formées d'un cœur entouré d'une ou de plusieurs séries de branches puis enfin de fonctions terminales situées en périphérie. Les dendrimères sont synthétisés par étapes successives. Plusieurs types de synthèses bien définies existent à ce jour comme les synthèses de type divergent ou convergent. Ces synthèses parfaitement contrôlées permettent d'obtenir des dendrimères de poids moléculaire, de taille ou de structure désirées³⁰.

La possibilité de pouvoir contrôler parfaitement la synthèse de ces objets nanométriques a permis leur développement exponentiel dans les années 1990. Par la suite, les dendrimères ont montré des applications dans différents domaines. De nos jours, leurs applications dans le domaine biomédical comme l'imagerie ou leur utilisation en thérapie en tant que transporteurs de médicaments sont de plus en plus fréquentes²⁸⁹.

Les dendrimères sont divisés en plusieurs familles. Ces familles sont déterminées en fonction du type de branches utilisées lors de leur synthèse. Dans cette étude, les dendrimères étaient pour la plupart des dendrimères phosphorés de type poly-phosphorhydrazone (PPH), synthétisés et utilisés par l'équipe de A.M. Caminade³⁸. Les dendrimères phosphorés ont été utilisés avec succès dans trois domaines différents. Leur utilisation en catalyse permet de réutiliser ses catalyseurs phosphorés au moins 11 fois, sans altérer leurs capacités réactionnelles²⁹⁰. La création d'une start-up DendrisTM dans le domaine des « bio-arrays » démontre leur intérêt dans le domaine des matériaux (www.dendris.fr). Enfin en biologie, des dendrimères phosphorés aux propriétés anti-inflammatoires ont déjà été utilisés *in vivo*^{264,270}. Un de ces dendrimères utilisé en biologie, est un dendrimère portant des groupements terminaux AzaBisPhosphonates. Il a été nommé ABP. Le dendrimère ABP a montré des propriétés immuno-modulatrices sur le système immunitaire humain *in vitro*¹⁶⁶. Ce potentiel anti-inflammatoire a été testé *in vivo* dans des modèles murins de maladies inflammatoires chroniques ou aiguës^{270,275}. De plus, aucune toxicité n'a été détectée sur un modèle de primates non-humains, après injections répétées par voie intraveineuse⁸². Ce dendrimère comporte le profil pour devenir un nouvel agent thérapeutique dans le traitement de maladies inflammatoires chez l'homme. Parmi les cellules mononucléées du sang humain, le dendrimère ABP cible principalement les monocytes et induit une activation anti-

inflammatoire de ces cellules²⁶⁹. Cette nouvelle étude a visé à comprendre l'interaction entre le dendrimère ABP et les monocytes humains.

L'interaction spécifique du dendrimère ABP sur les monocytes humains a été démontrée expérimentalement et est discutée dans l'article présenté dans la partie résultats. Des expériences visant à identifier le ou les récepteurs reconnaissant le dendrimère ABP ont donc été entreprises. Une stratégie globale à l'aide d'un dendrimère couplé à un groupement biotine est en cours. Les résultats sont présentés et discutés dans la première partie des résultats complémentaires. Une seconde étude globale avec le criblage des différentes voies d'activation a été réalisée avec l'observation des différentes kinases phosphorylées sous stimulus par le dendrimère ABP. Par comparaison, les kinases impliquées dans les voies d'activation induites par l'IL-4 et l'IL-10 ont aussi été analysées. L'IL-10, les glucocorticoïdes ou l'IL-4 sont les principaux signaux induisant une réponse cellulaire des monocytes-macrophages de type anti-inflammatoire. Le dendrimère ABP induit également un phénotype de ce type. Comparer l'activation des monocytes entre ces 3 stimuli était donc intéressant. Beaucoup de similitudes sont apparues entre ces 3 conditions, sans vraiment permettre de mettre en évidence une voie d'activation spécifique au dendrimère ABP. L'IL-4 est connue pour induire sa réponse via STAT6 alors que le signal à l'IL-10 passe par la kinase STAT3²⁹¹. Les quelques différences existantes entre ces différentes voies d'activations anti-inflammatoires des monocytes devraient être ciblées pour mieux caractériser l'effet du dendrimère ABP. Cette expérience de « kinase Array » nous donne une vision globale de l'activation des monocytes par ABP. Ce test existe également pour la production de cytokines²⁹². L'étude des monocytes ou des macrophages préalablement différenciés en macrophages de type 1 et 2 lors d'une réponse au dendrimère ABP en ciblant leurs marqueurs de surface ainsi que leurs cytokines excrétées serait également intéressant.

Par opposition à ces stratégies globales, des stratégies ciblant des candidats récepteurs précis ont été élaborées.

En 2009, lors de l'étude *pan*-génomique réalisée sur des monocytes humains activés par ABP, l'intérêt pour un récepteur appelé SCARF1 a été mentionné²⁶⁹. Il est décrit dans cet article comme étant un récepteur surexprimé chez les monocytes activés par ABP. Cependant, il reste en-dessous du seuil fixé par les auteurs pour sélectionner les gènes significativement

surexprimés par ABP. SCARF1 est un récepteur de phagocytose présent sur les monocytes humains. Il permet la phagocytose de cellules apoptotiques induisant une réponse immunosuppressive avec notamment la production de cytokines anti-inflammatoires. Précédemment, ce récepteur avait été identifié comme récepteur à des entités lipidiques appelées LDL acétylés²⁹³. Les lipoprotéines sont des complexes lipidiques et protéiques rapidement internalisés par les monocytes. Une expérience de compétition a été réalisée opposant les AclLDL et le dendrimère ABP. Si le dendrimère ABP se fixe sur le récepteur SCARF1, les AclLDL devraient inhiber cette fixation²⁹⁴. Aucune variation de la fixation du dendrimère ABP-J n'a été observée suivant la dose de LDL acétylés ajoutée. La fixation du dendrimère ABP ne passe donc pas par le récepteur SCARF1.

Le récepteur TREM-2 est un récepteur exprimé par les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules microgliales et les ostéoclastes. Il a été décrit récemment qu'une mutation de ce récepteur est un facteur de risque important impliqué dans la maladie d'Alzheimer^{295,296}. TREM-2 reconnaît des ligands anioniques et permet de phagocyter des neurones apoptotiques et des bactéries²⁹⁷. TREM-2 protège l'organisme d'une réponse inflammatoire exacerbée. Il est alors suggéré qu'il puisse inhiber une réponse inflammatoire, notamment au niveau du cerveau via les cellules microgliales²⁹⁸. Une expérience a été réalisée dans le but de diminuer l'expression du récepteur TREM-2 à la surface des monocytes humains afin d'observer si la fixation du dendrimère ABP-Julo en est affectée. La technique choisie a été d'utiliser un siRNA anti-TREM-2. Le siRNA est introduit à l'intérieur des monocytes humains afin de réduire la quantité d'ARNm codant pour le récepteur TREM-2. La présence du récepteur TREM-2 au niveau de la membrane monocyttaire a été diminuée mais aucune variation de fixation du dendrimère ABP-Julo n'a pu être observée.

Un troisième et dernier récepteur a été testé. Le FPR2 pour « Formyl Peptide Receptor 2 » reconnaît des peptides et des lipides anioniques bactériens. Ce récepteur permet d'induire sous certains stimuli une réponse anti-inflammatoire des monocytes²⁹⁹. De plus, des protéines de la famille des annexines liées à la réponse anti-inflammatoire des monocytes induite par les récepteurs de type FPR ont été identifiées lors des expériences de protéomiques (**Résultats complémentaires, tableau 1**)³⁰⁰. Un peptide de quelques acides-aminés appelé Boc-2 (BOC-PHE-LEU-PHE-LEU-PHE) a été utilisé. Il s'agit d'un antagoniste aux récepteurs de type FPR et

se lie notamment au récepteur FPR2. De la même manière que pour les autres récepteurs testés, cet inhibiteur n'induit pas de diminution de la fixation du dendrimère ABP-Julo.

Malgré les difficultés rencontrés dans ce travail notamment sur l'identification du ou des récepteur(s) monocytaires au dendrimère ABP, cette molécule synthétique continue son développement en tant que candidat médicament. De plus, les dendrimères phosphorés en général ont connu une mise en avant importante ces dernières années avec des publications dans des journaux de renommée internationale et ceci dans différents domaines³⁰¹. Cette observation est valable pour des dendrimères de différents types. Il existe d'ailleurs un nombre important d'effets *in vivo* obtenus par certains dendrimères, aujourd'hui en phase préclinique. Cependant, le nombre de dendrimères, tous types confondus, atteignant les phases d'essais cliniques est minime. Un seul dendrimère est à l'heure actuelle en phase clinique de phase III³⁰². Si l'on tient compte du fait que ces molécules sont synthétisées depuis une quarantaine d'année, il existe à ce jour un écart entre le nombre de molécules synthétisées et leur absence en tant que traitement. Ce « cul-de-sac » pharmaceutique est aujourd'hui soumis à réflexion avec l'objectif principal de mettre en relation dès le départ les chercheurs, les industries pharmaceutiques et les cliniciens³⁰³.

De nouvelles applications continuent tout de même de voir le jour et suivent directement l'évolution des techniques actuelles en modélisation ou en biologie par exemple. Un modèle expérimental de canaux ioniques a été utilisé pour observer le passage d'un dendrimère PAMAM de générations 1 à 5 en particule unique. Une étude importante de modélisation et de dynamique moléculaire leur ont permis de décrire la part importante prise par la taille et la flexibilité de la molécule lorsque celui-ci rentre en contact avec des éléments cellulaires comme des nanopores³⁰⁴. Des techniques développées en routine depuis peu de temps sont également utilisées pour comprendre l'effet de certains dendrimères. L'utilisation de RNA-seq a permis de mieux comprendre les changements cellulaires au niveau transcriptionnel en réponse à une stimulation à un dendrimère PAMAM³⁰⁵. Ces approches utilisant des techniques de pointes montrent toujours l'intérêt de ces nanomolécules pour de futures applications. Ces connaissances permettraient d'analyser, de contrôler et même d'optimiser l'effet de certains dendrimères qui montrent déjà des effets remarquables.

Références bibliographiques

1. Wacker, M. G. Nanotherapeutics - Product development along the nanomaterial discussion. *J. Pharm. Sci.* **103**, 777–784 (2014).
2. Kreyling, W. G., Semmler-Behnke, M. & Chaudhry, Q. A complementary definition of nanomaterial. *Nano Today* **5**, 165–168 (2010).
3. Roco, M. C., Mirkin, C. a & Hersam, M. C. *Nanotechnology research Directions for Societal Needs in 2020*. (2010).
4. Fda. Guidance Documents - Guidance for Industry: Safety of Nanomaterials in Cosmetic Products. 1–16 (2012).
5. EMA. Reflection Paper on Nanotechnology-Based Medicinal Products for Human Use. *Technology* 7–10 (2006).
6. Potocnik, J. Commission recommendation. in 2010–2012 (2011).
7. US National Nanotechnology. What is Nanotechnology ? (2015).
8. Smith, D. M., Simon, J. K. & Baker, J. R. Applications of nanotechnology for immunology. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 592–605 (2013).
9. Staudinger, H. Über Polymerisation. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **53**, 1073–1085 (1920).
10. Ringsdorf, H. Hermann Staudinger and the future of polymer research jubilees - Beloved occasions for cultural piety. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 1064–1076 (2004).
11. Duncan, R., Ringsdorf, H. & Satchi-Fainaro, R. Polymer therapeutics: Polymers as drugs, drug and protein conjugates and gene delivery systems: Past, present and future opportunities. *Adv. Polym. Sci.* **192**, 1–8 (2006).
12. Duncan, R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 347–360 (2003).
13. Fuertges, F. & Abuchowski, A. The clinical efficacy of poly(ethylene glycol)-modified proteins. *J. Control. Release* **11**, 139–148 (1990).
14. Matyjaszewski, K. Chemistry. Architecturally complex polymers with controlled heterogeneity. *Science* **333**, 1104–1105 (2011).
15. Buhleier, E., Wehner, W. & Vögtle, F. ‘ Cascade’-and‘ Nonskid-Chain-like’ Syntheses of Molecular Cavity Topologies. *Synthesis* **02**, 155–158 (1978).
16. Tomalia, D. a. *et al.* A new class of polymers: Starburst-dendritic macromolecules. *Polymer J.* **17**, 117–132 (1985).
17. Newkome, G. R., Yao, Z., Baker, G. R. & Gupta, V. K. Cascade Molecules: A New Approach to Micelles. A [27]-Arborol. *J. Org. Chem.* **50**, 2003–2004 (1985).

18. Wu, L., Ficker, M., Christensen, J. B., Trohopoulos, P. N. & Moghimi, S. M. Dendrimers in Medicine: Therapeutic Concepts and Pharmaceutical Challenges. *Bioconj. Chem.* (2015). doi:10.1021/acs.bioconjchem.5b00031
19. Newkome, G. R. & Shreiner, C. D. Poly(amidoamine), polypropylenimine, and related dendrimers and dendrons possessing different 1 - 2 branching motifs: An overview of the divergent procedures. *Polymer*. **49**, 1–173 (2008).
20. Brauge, L., Magro, G., Caminade, A.-M. & Majoral, J.-P. First Divergent Strategy Using Two AB₂ Unprotected Monomers for the Rapid Synthesis of Dendrimers. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6698–6699 (2001).
21. Pyzowski, J., Caminade, A. & Majoral, J. ' Lego ' Chemistry for the Straightforward Synthesis of Dendrimers. *J. Org. Chem* **68**, 6043–6046 (2003).
22. Maraval, V., Caminade, A. M., Majoral, J. P. & Blais, J. C. Dendrimer design: How to circumvent the dilemma of a reduction of steps or an increase of function multiplicity? *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 1822–1826 (2003).
23. Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chemie* **40**, 2004–2021 (2001).
24. Joralemon, M. J. *et al.* Dendrimers clicked together divergently. *Macromolecules* **38**, 5436–5443 (2005).
25. Killops, K. L., Campos, L. M. & Hawker, C. J. Robust, efficient, and orthogonal synthesis of dendrimers via thiol-ene 'click' chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 5062–5064 (2008).
26. Hawker, C. J. & Frechet, J. M. J. Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 7638–7647 (1990).
27. Mintzer, M. a & Grinstaff, M. W. Biomedical applications of dendrimers: a tutorial. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 173–190 (2011).
28. Wu, P. *et al.* Efficiency and fidelity in a click-chemistry route to triazole dendrimers by the copper(I)-catalyzed ligation of azides and alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 3928–3932 (2004).
29. Hawker, C. J., Lee, R. & Frechet, J. M. J. One-Step Synthesis of Hyperbranched Dendritic Polyesters. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 4583–4588 (1991).
30. Singh, U., Dar, M. M. & Hashmi, A. A. Dendrimers : Synthetic Strategies , Properties and Applications. *Orient. J. Chem.* **30**, 911–922 (2014).
31. Sharma, R. *et al.* 'Onion peel' dendrimers: a straightforward synthetic approach towards highly diversified architectures. *Polym. Chem.* **5**, 4321 (2014).
32. Sharma, R. *et al.* A highly versatile convergent/divergent 'onion peel' synthetic strategy toward potent multivalent glycodendrimers. *Chem. Commun.* **50**, 13300–13303 (2014).

33. Katir, N. *et al.* Synthesis of Onion-Peel Nanodendritic Structures with Sequential Functional Phosphorus Diversity. *Chem. Eur. J.* **21**, 6400–6408 (2015).
34. Rolland, O., Turrin, C.-O., Caminade, A.-M. & Majoral, J.-P. Dendrimers and nanomedicine: multivalency in action. *New J. Chem.* **33**, 1809 (2009).
35. Tomalia, D. *et al.* Dendritic Macromolecules: Synthesis of Starburst Dendrimers. *Macromolecules* **19**, 2466–2468 (1986).
36. Bryant, L. H. *et al.* Synthesis and relaxometry of high-generation (G = 5, 7, 9, and 10) PAMAM dendrimer-DOTA-gadolinium chelates. *J. Magn. Reson. Imaging* **9**, 348–352 (1999).
37. Berg, E. M. M. D. B. Den & Meijer, E. W. Poly(propylene imine) Dendrimers: Large-Scale Synthesis by Heterogeneously Catalyzed Hydrogenations. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **32**, 1308–1311 (1993).
38. Launay, N., Caminade, A., Lahana, R. & Majoral, J. P. A general synthetic strategy for neutral phosphorus-containing dendrimers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **4**, 1589–1592 (1994).
39. Van der Made, A. W., van Leeuwen, P. W. N. M., de Wilde, J. C. & Brandes, R. a. C. Dendrimeric silanes. *Adv. Mater.* **5**, 466–468 (1993).
40. Tam, J. P. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 5409–5413 (1988).
41. Shcharbin, D. *et al.* How to study dendrimers and dendriplexes III. Biodistribution, pharmacokinetics and toxicity in vivo. *J. Control. Release* **181**, 40–52 (2014).
42. Caminade, A. M., Laurent, R. & Majoral, J. P. Characterization of dendrimers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 2130–2146 (2005).
43. Ma, C. Q., Mena-Osteritz, E., Wunderlin, M., Schulz, G. & Bäuerle, P. 2,2':3',2''-Terthiophene-based all-thiophene dendrons and dendrimers: Synthesis, structural characterization, and properties. *Chem. Eur. J.* **18**, 12880–12901 (2012).
44. Hayder, M., Fruchon, S., Fournié, J.-J., Poupot, M. & Poupot, R. Anti-inflammatory properties of dendrimers per se. *ScientificWorldJournal.* **11**, 1367–1382 (2011).
45. Kiessling, L. L., Gestwicki, J. E. & Strong, L. E. Synthetic multivalent ligands as probes of signal transduction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 2348–2368 (2006).
46. Sangster, J. Octanol-Water Partition Coefficients of Simple Organic Compounds. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **18**, 1111–1229 (1989).
47. Ashootosh V. Ambade, E. N. S. & Thayumanavan, S. Dendrimeric micelles for controlled drug release and targeted delivery. *Mol. Pharm.* **29**, 997–1003 (2005).
48. Instruments, M. Zeta potential: An Introduction in 30 minutes. *Zetasizer Nano Serles Tech. Note. MRK654-01* **2**, 1–6 (2011).

49. Dobrovolskaia, M. A. *et al.* Nanoparticle size and surface charge determine effects of PAMAM dendrimers on human platelets in vitro. *Mol. Pharm.* **9**, 382–393 (2012).
50. Nomani, A. *et al.* Physicochemical and biological properties of self-assembled antisense/poly(amidoamine) dendrimer nanoparticles: The effect of dendrimer generation and charge ratio. *Int. J. Nanomedicine* **5**, 359–369 (2010).
51. Yang, Y. *et al.* Effect of size, surface charge, and hydrophobicity of poly(amidoamine) dendrimers on their skin penetration. *Biomacromol.* **13**, 2154–2162 (2012).
52. Majoros, I. J., Myc, A., Thomas, T., Mehta, C. B. & Baker, J. R. PAMAM dendrimer-based multifunctional conjugate for cancer therapy: Synthesis, characterization, and functionality. *Biomacromol.* **7**, 572–579 (2006).
53. Svenson, S. & Tomalia, D. A. Dendrimers in biomedical applications - Reflections on the field. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 2106–2129 (2005).
54. Bosman, a W., Janssen, H. M. & Meijer, E. W. About Dendrimers: Structure, Physical Properties, and Applications. *Chem. Rev.* **99**, 1665–1688 (1999).
55. Leclair, J., Coppel, Y., Caminade, A. M. & Majoral, J. P. Nanometric Sponges Made of Water-Soluble Hydrophobic Dendrimers. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 2304–2305 (2004).
56. Mattison, K., Morfesis, A. & Kaszuba, M. A Primer on Particle Sizing Using Dynamic Light Scattering. *Am. Biotechnol. Lab.* 20 – 22 (2003). at <http://frontpage.okstate.edu/nanotech/Assignments/Readings/DSL/dynamiclightscatteringbasics.pdf>
57. Washington University in St Louis. Dynamic Light Scattering (DLS) <http://www.nano.wustl.edu/doc/Instrument%20Manuals%20and%20Protocols/DLS%20Final.pdf>.
58. Martinho, N. *et al.* Molecular Modeling to Study Dendrimers for Biomedical Applications. *Molecules* **19**, 20424–20467 (2014).
59. Tian, W. De & Ma, Y. Q. Molecular dynamics simulations of a charged dendrimer in multivalent salt solution. *J. Phys. Chem. B* **113**, 13161–13170 (2009).
60. Ouyang, D., Zhang, H., Parekh, H. S. & Smith, S. C. The effect of pH on PAMAM dendrimer-siRNA complexation - Endosomal considerations as determined by molecular dynamics simulation. *Biophys. Chem.* **158**, 126–133 (2011).
61. Jain, V., Maingi, V., Maiti, P. K. & Bharatam, P. V. Molecular dynamics simulations of PPI dendrimer–drug complexes. *Soft Matter* **9**, 6482 (2013).
62. Malik, N. *et al.* Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125 I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *J. Control. Release* **65**, 133–148 (2000).
63. Zhao, H., Gu, W., Ye, L. & Yang, H. Biodistribution of PAMAM dendrimer conjugated magnetic nanoparticles in mice. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **25**, 769–776 (2014).

64. Cabral, H. *et al.* Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 815–823 (2011).
65. Gillies, E. R., Dy, E., Fréchet, J. M. J. & Szoka, F. C. Biological evaluation of polyester dendrimer: Poly(ethylene oxide) 'bow-tie' hybrids with tunable molecular weight and architecture. *Mol. Pharm.* **2**, 129–138 (2005).
66. Kalhapure, R. S. & Akamanchi, K. G. Oleodendrimers: A novel class of multicephalous heterolipids as chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery. *Int. J. Pharm.* **454**, 158–166 (2013).
67. Kobayashi, H. *et al.* Novel liver macromolecular MR contrast agent with a polypropylenimine diaminobutyl dendrimer core: Comparison to the vascular MR contrast agent with the polyamidoamine dendrimer core. *Magn. Reson. Med.* **46**, 795–802 (2001).
68. Menjoge, A. R. *et al.* Transfer of PAMAM dendrimers across human placenta: prospects of its use as drug carrier during pregnancy. *J. Control. Release* **150**, 326–338 (2011).
69. Nigavekar, S. S. *et al.* 3H dendrimer nanoparticle organ/tumor distribution. *Pharm. Res.* **21**, 476–483 (2004).
70. Dai, H. *et al.* Intrinsic targeting of inflammatory cells in the brain by polyamidoamine dendrimers upon subarachnoid administration. *Nanomedicine (Lond)*. **5**, 1317–1329 (2010).
71. Jones, C. F. & Grainger, D. W. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 438–456 (2009).
72. Ilinskaya, a. N. & Dobrovolskaia, M. a. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of engineered nanomaterials. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 3988–4000 (2014).
73. Fadeel, B. & Garcia-Bennett, A. E. Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 362–374 (2010).
74. Öztürk, K., Ertürk, A. S., Sarisözen, C., Tulu, M. & Çalış, S. Cytotoxicity and in vitro characterization studies of synthesized Jeffamine-cored PAMAM dendrimers. *J. Microencapsul.* **31**, 127–136 (2014).
75. Thiagarajan, G., Greish, K. & Ghandehari, H. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Charge affects the oral toxicity of poly (amidoamine) dendrimers. **84**, 330–334 (2013).
76. Elsabahy, M. & Wooley, K. L. Cytokines as biomarkers of nanoparticle immunotoxicity. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 5552–76 (2013).
77. Mukherjee, S. P., Lyng, F. M., Garcia, A., Davoren, M. & Byrne, H. J. Mechanistic studies of in vitro cytotoxicity of poly(amidoamine) dendrimers in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **248**, 259–268 (2010).

78. Mukherjee, S. P. & Byrne, H. J. Polyamidoamine dendrimer nanoparticle cytotoxicity, oxidative stress, caspase activation and inflammatory response: Experimental observation and numerical simulation. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **9**, 202–211 (2013).
79. Naha, P. C., Davoren, M., Lyng, F. M. & Byrne, H. J. Reactive oxygen species (ROS) induced cytokine production and cytotoxicity of PAMAM dendrimers in J774A.1 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **246**, 91–99 (2010).
80. Feliu, N. *et al.* Stability and biocompatibility of a library of polyester dendrimers in comparison to polyamidoamine dendrimers. *Biomaterials* **33**, 1970–1981 (2012).
81. Bertero, a *et al.* Surface functionalisation regulates polyamidoamine dendrimer toxicity on blood-brain barrier cells and the modulation of key inflammatory receptors on microglia. *Nanotoxicology* **8**, 158–168 (2014).
82. Fruchon, S. *et al.* Repeated intravenous injections in non-human primates demonstrate preclinical safety of an anti-inflammatory phosphorus-based dendrimer. *Nanotoxicology* **9**, 433–441 (2015).
83. Muzykantov, V. R. Drug delivery by red blood cells: vascular carriers designed by Mother Nature. *Expert Opin. Drug Deliv.* **7**, 403–427 (2011).
84. Disher, R. P. D. Minimal ‘Self’ Peptides That Inhibit Phagocytic Clearance and Enhance Delivery of Nanoparticles. *Science* **339**, 971–975 (2013).
85. Fraternali, a. *et al.* Macrophage protection by addition of glutathione (GSH)-loaded erythrocytes to AZT and DDI in a murine AIDS model. *Antiviral Res.* **56**, 263–272 (2002).
86. Rossi, L. *et al.* Macrophage depletion induced by clodronate-loaded erythrocytes. *J. Drug Target.* **13**, 99–111 (2005).
87. Chen, H. T., Neerman, M. F., Parrish, A. R. & Simanek, E. E. Cytotoxicity, hemolysis, and acute in vivo toxicity of dendrimers based on melamine, candidate vehicles for drug delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 10044–10048 (2004).
88. Wrobel, D. *et al.* Interaction of cationic carbosilane dendrimers and their complexes with siRNA with erythrocytes and red blood cell ghosts. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1838**, 882–889 (2014).
89. Gordon, S. & Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 953–964 (2005).
90. Swirski, F. K. *et al.* Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. *Science* **325**, 612–616 (2009).
91. Imhof, B. a & Aurrand-Lions, M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 432–444 (2004).
92. Shi, C. & Pamer, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 762–774 (2011).

93. Taylor, P. R. *et al.* Macrophage receptors and immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 901–944 (2005).
94. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 958–969 (2008).
95. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 23–35 (2003).
96. Owais, M. & Gupta, C. M. Targeted drug delivery to macrophages in parasitic infections. *Curr. Drug Deliv.* **2**, 311–318 (2005).
97. Kumar, P. V., Asthana, A., Dutta, T. & Jain, N. K. Intracellular macrophage uptake of rifampicin loaded mannosylated dendrimers. *J. Drug Target.* **14**, 546–556 (2006).
98. Barry, M. & Bleackley, R. C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 401–409 (2002).
99. Mosmann, T. R. & Sad, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* **17**, 138–146 (1996).
100. Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 745–763 (2004).
101. Lebien, T. W. & Tedder, T. F. ASH 50th anniversary review B lymphocytes : how they develop and function. *Am. Soc. Hematol.* **112**, 1570–1580 (2008).
102. Sunshine, J. C. & Green, J. J. Nanoengineering approaches to the design of artificial antigen-presenting cells. *Nanomedicine* **8**, 1173–89 (2013).
103. Portevin, D. *et al.* Regulatory activity of azabisphosphonate-capped dendrimers on human CD4+ T cell proliferation enhances ex-vivo expansion of NK cells from PBMCs for immunotherapy. *J. Transl. Med.* **7**, 82 (2009).
104. Gras, R. *et al.* Carbosilane dendrimer 2G-NN16 represses Tc17 differentiation in primary T CD8 + lymphocytes. *Mol. Pharm.* **9**, 102–110 (2012).
105. Hulikova, K., Benson, V., Svoboda, J., Sima, P. & Fiserova, A. N-Acetyl-D-glucosamine-coated polyamidoamine dendrimer modulates antibody formation via natural killer cell activation. *Int. Immunopharmacol.* **9**, 792–799 (2009).
106. Hulikova, K., Svoboda, J., Benson, V., Grobarova, V. & Fiserova, A. N-Acetyl-D-glucosamine-coated polyamidoamine dendrimer promotes tumor-specific B cell responses via natural killer cell activation. *Int. Immunopharmacol.* **11**, 955–961 (2011).
107. Lubong Sabado, R. & Bhardwaj, N. Dendritic-cell vaccines on the move. *Nature* **519**, 300–301 (2015).
108. Córdoba, E. V. *et al.* Glycodendrimers as new tools in the search for effective anti-HIV DC-based immunotherapies. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **9**, 972–984 (2013).

109. García-Vallejo, J. J. *et al.* Multivalent glycopeptide dendrimers for the targeted delivery of antigens to dendritic cells. *Mol. Immunol.* **53**, 387–397 (2013).
110. Mishra, A., Harmon, K., Woodall, J. & Vieira, A. Sports medicine applications of platelet rich plasma. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **13**, 1185–95 (2012).
111. Durán-Lara, E. *et al.* PAMAM dendrimer derivatives as a potential drug for antithrombotic therapy. *Eur. J. Med. Chem.* **69**, 601–608 (2013).
112. Petros, R. a & DeSimone, J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 615–627 (2010).
113. Vinogradov, S. V., Bronich, T. K. & Kabanov, A. V. Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: Preparation, properties and interactions with cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 135–147 (2002).
114. Moghimi, S. M., Hunter, a. C. & Andresen, T. L. Factors Controlling Nanoparticle Pharmacokinetics: An Integrated Analysis and Perspective. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **52**, 481–503 (2012).
115. Weiss, L. & Zeigel, R. Cell surface negativity and the binding of positively charged particles. *J. Cell. Physiol.* **77**, 179–186 (1971).
116. Spector, a a & Yorek, M. a. Membrane lipid composition and cellular function. *J. Lipid Res.* **26**, 1015–1035 (1985).
117. Leidl, K., Liebisch, G., Richter, D. & Schmitz, G. Mass spectrometric analysis of lipid species of human circulating blood cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1781**, 655–664 (2008).
118. O’neill, M. The Analysis of a Temperature-Controlled Scanning Calorimeter. *Anal. Chem.* 1238–1245 (1964).
119. Gaisford, S. Evaluation of Analytical Instrumentation. Part XXV: Differential Scanning Calorimetry. *Anal. methods* **7**, 1240–1248 (2015).
120. Walde, P., Cosentino, K., Engel, H. & Stano, P. Giant Vesicles: Preparations and Applications. *ChemBioChem* **11**, 848–865 (2010).
121. Attwood, S. J., Choi, Y. & Leonenko, Z. Preparation of DOPC and DPPC supported planar lipid bilayers for atomic force microscopy and atomic force spectroscopy. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 3514–3539 (2013).
122. Yao, X., Bunt, C., Cornish, J., Quek, S.-Y. & Wen, J. Preparation, optimization and characterization of bovine lactoferrin loaded liposomes and solid lipid particles modified by hydrophilic polymers using factorial design. *Chem. Biol. Drug Des.* 560–575 (2013).
123. Yoneda, J. S., Rigos, C. F., de Lourenço, T. F. A., Sebinelli, H. G. & Ciancaglini, P. Na,K-ATPase reconstituted in ternary liposome: The presence of cholesterol affects protein activity and thermal stability. *Arch. Biochem. Biophys.* **564**, 136–141 (2014).

124. Edwards, H. G. M. *Modern Raman Spectroscopy—A Practical Approach. Journal of Raman Spectroscopy* **36**, (2005).
125. Huang, C., Mason, J. T. & Levin, I. W. Raman spectroscopic study of saturated mixed-chain phosphatidylcholine multilamellar dispersions. *Biochemistry* **22**, 2775–2780 (1983).
126. Wrobel, D. *et al.* Interactions of phosphorus-containing dendrimers with liposomes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1811**, 221–226 (2011).
127. Ionov, M. *et al.* Interaction of cationic phosphorus dendrimers (CPD) with charged and neutral lipid membranes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **82**, 8–12 (2011).
128. Lazniewska, J. *et al.* Mechanism of cationic phosphorus dendrimer toxicity against murine neural cell lines. *Mol. Pharm.* **10**, 3484–3496 (2013).
129. Lazniewska, J. *et al.* Promising low-toxicity of viologen-phosphorus dendrimers against embryonic mouse hippocampal cells. *Molecules* **18**, 12222–12240 (2013).
130. Wrobel, D. *et al.* Cationic carbosilane dendrimers-lipid membrane interactions. *Chem. Phys. Lipids* **165**, 401–407 (2012).
131. Ionov, M. *et al.* siRNA carriers based on carbosilane dendrimers affect zeta potential and size of phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1818**, 2209–2216 (2012).
132. Ionov, M. *et al.* Biochimica et Biophysica Acta Dendrimers complexed with HIV-1 peptides interact with liposomes and lipid monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* **1848**, 907–915 (2015).
133. Bertoluzza, a., Bonora, S., Fini, G., Francioso, O. & Morelli, M. a. Interaction of bipyridilium herbicides with model membranes. *Chem. Phys. Lipids* **75**, 137–143 (1995).
134. Klajnert, B. & Epan, R. M. PAMAM dendrimers and model membranes: Differential scanning calorimetry studies. *Int. J. Pharm.* **305**, 154–166 (2005).
135. Klajnert, B., Janiszewska, J., Urbanczyk-Lipkowska, Z., Bryszewska, M. & Epan, R. M. DSC studies on interactions between low molecular mass peptide dendrimers and model lipid membranes. *Int. J. Pharm.* **327**, 145–152 (2006).
136. Gardikis, K., Hatziantoniou, S., Viras, K., Wagner, M. & Demetzos, C. A DSC and Raman spectroscopy study on the effect of PAMAM dendrimer on DPPC model lipid membranes. *Int. J. Pharm.* **318**, 118–123 (2006).
137. Kim, Y., Kwak, Y. & Chang, R. Free energy of PAMAM dendrimer adsorption onto model biological membranes. *J. Phys. Chem. B* **118**, 6792–6802 (2014).
138. Park, J., Koh, M. & Park, S. B. From noncovalent to covalent bonds: a paradigm shift in target protein identification. *Mol. Biosyst.* **9**, 544–50 (2013).
139. Mahal, L. K., Yarema, K. J. & Bertozzi, C. R. Engineering chemical reactivity on cell surfaces through oligosaccharide biosynthesis. *Science* **276**, 1125–1128 (1997).

140. Saxon, E. & Bertozzi, C. R. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science* **287**, 2007–2010 (2000).
141. Sletten, E. M. & Bertozzi, C. R. From mechanism to mouse: A tale of two bioorthogonal reactions. *Acc. Chem. Res.* **44**, 666–676 (2011).
142. Stephan, M. T. & Irvine, D. J. Enhancing Cell therapies from the Outside In: Cell Surface Engineering Using Synthetic Nanomaterials. *Nano Today* **6**, 309–325 (2011).
143. Stephan, M. T., Moon, J. J., Um, S. H., Bershteyn, A. & Irvine, D. J. Therapeutic cell engineering using surface-conjugated synthetic nanoparticles. *Nat. Med.* **16**, 1035–1041 (2010).
144. Holden, C. A., Yuan, Q., Yeudall, A. W., Lebman, D. A. & Yang, H. Surface engineering of macrophages with nanoparticles to generate a cell-nanoparticle hybrid vehicle for hypoxia-targeted drug delivery. *Int. J. Nanomedicine* **5**, 25–36 (2010).
145. Xu, L., Zolotarskaya, O. Y., Yeudall, W. A. & Yang, H. Click Hybridization of Immune Cells and Polyamidoamine Dendrimers. *Adv. Healthc. Mater.* **3**, 1430–1438 (2014).
146. Baker, J. R. Why I believe nanoparticles are crucial as a carrier for targeted drug delivery. *Nanomedicine and Nanobiotechnology* **5**, 423–429 (2013).
147. Heneweer, C., Gendy, S. E. & Peñate-Medina, O. Liposomes and inorganic nanoparticles for drug delivery and cancer imaging. *Ther. Deliv.* **3**, 645–656 (2012).
148. Yu, B., Tai, H. C., Xue, W., Lee, L. J. & Mee, R. J. Receptor-targeted nanocarriers for therapeutic delivery to cancer. *Mol. Membr. Biol.* **27**, 286–298 (2013).
149. Jacobson, K. A. Functionalized Congener Approach to the Design of Ligands for G Protein-Coupled Receptors (GPCRs). *Bioconjug. Chem.* **20**, 1816–1835 (2009).
150. Kecskés, A., Tost, D. K., Wei, Q., Gao, Z.-G. & Jacobson, K. A. GPCR Ligand Dendrimer (GLiDe) Conjugates: Adenosine Receptor Interactions of a Series of Multivalent Xanthine Antagonists. *Bioconjug. Chem.* **22**, 1115–1127 (2011).
151. Fahmy, T. M., Schneck, J. P. & Saltzman, W. M. A nanoscopic multivalent antigen-presenting carrier for sensitive detection and drug delivery to T Cells. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **3**, 75–85 (2007).
152. Rang, H. P. The receptor concept: pharmacology's big idea. *Br. J. Pharmacol.* **147 Suppl**, S9–S16 (2006).
153. Neubig, R. R., Spedding, M., Kenakin, T. & Christopoulos, A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **55**, 597–606 (2003).
154. Kenakin, T. Principles: Receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 186–192 (2004).
155. Fang, Y. Ligand-receptor interaction platforms and their applications for drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **7**, 969–988 (2012).

156. Hulme, E. C. & Trevethick, M. a. Ligand binding assays at equilibrium: Validation and interpretation. *Br. J. Pharmacol.* **161**, 1219–1237 (2010).
157. Cheng, Y. & Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099–3108 (1973).
158. Wu, G. *et al.* Site-Specific Conjugation of Boron-Containing Dendrimers to Anti-EGF Receptor Monoclonal Antibody Cetuximab (IMC-C225) and Its Evaluation as a Potential Delivery Agent for Neutron Capture Therapy. *Bioconjug. Chem.* **15**, 185–194 (2004).
159. Tosh, D. K. *et al.* Polyamidoamine (PAMAM) dendrimer conjugates of ‘clickable’ agonists of the A₃ adenosine receptor and coactivation of the P₂Y₁₄ receptor by a tethered nucleotide. *Bioconjug. Chem.* **21**, 372–384 (2010).
160. Kozma, E. *et al.* Characterization by flow cytometry of fluorescent, selective agonist probes of the A₃ adenosine receptor. *Biochem. Pharmacol.* **85**, 1171–1181 (2013).
161. Kozma, E. *et al.* Novel fluorescent antagonist as a molecular probe in A₃ adenosine receptor binding assays using flow cytometry. *Biochem. Pharmacol.* **83**, 1552–1561 (2012).
162. Perumal, O. P., Inapagolla, R., Kannan, S. & Kannan, R. M. The effect of surface functionality on cellular trafficking of dendrimers. *Biomaterials* **29**, 3469–3476 (2008).
163. Teo, I. *et al.* Preventing acute gut wall damage in infectious diarrhoeas with glycosylated dendrimers. *EMBO Mol. Med.* **4**, 866–881 (2012).
164. Marti, G. E. *et al.* *Fluorescence Calibration and Quantitative Measurement of Fluorescence Intensity ; Approved Guideline I/LA24-A.* **24**, (2004).
165. Lohse, M. J., Nuber, S. & Hoffmann, C. Fluorescence / Bioluminescence Resonance Energy Transfer Techniques to Study G-Protein-Coupled Receptor Activation and Signaling. *Pharmacol. Rev.* **64**, 299–336 (2012).
166. Poupot, M. *et al.* Design of phosphorylated dendritic architectures to promote human monocyte activation. *FASEB J.* **20**, 2339–2351 (2006).
167. Daghestani, H. N. & Day, B. W. Theory and applications of surface plasmon resonance, resonant mirror, resonant waveguide grating, and dual polarization interferometry biosensors. *Sensors* **10**, 9630–9646 (2010).
168. Luczkowiak, J. *et al.* Pseudosaccharide functionalized dendrimers as potent inhibitors of DC-SIGN dependent ebola pseudotyped viral infection. *Bioconjug. Chem.* **22**, 1354–1365 (2011).
169. Varga, N. *et al.* A multivalent inhibitor of the DC-SIGN dependent uptake of HIV-1 and Dengue virus. *Biomaterials* **35**, 4175–4184 (2014).
170. Tardieu, J.-L. Selecting a cyclic AMP kit for assaying GPCR target activation. *Nat. Methods* **5**, iii–iv (2008).

171. Wan, T. C. *et al.* Polyamidoamine (PAMAM) dendrimer conjugate specifically activates the A3 adenosine receptor to improve post-ischemic/reperfusion function in isolated mouse hearts. *BMC Pharmacol.* **11**, 11 (2011).
172. Keene, A. M., Balasubramanian, R., Lloyd, J., Shainberg, A. & Jacobson, K. a. Multivalent dendrimeric and monomeric adenosine agonists attenuate cell death in HL-1 mouse cardiomyocytes expressing the A3 receptor. *Biochem Pharmacol* **80**, 188–196 (2010).
173. Wiener, E. C. *et al.* Dendrimer-based metal chelates: a new class of magnetic resonance imaging contrast agents. *Magn. Reson. Med.* **31**, 1–8 (1994).
174. Sena, L. M. *et al.* Magnetic resonance lymphangiography with a nano-sized gadolinium-labeled dendrimer in small and large animal models. *Nanomedicine* **127**, 358–366 (2012).
175. Langereis, S., de Lussanet, Q. G., van Genderen, M. H. P., Backes, W. H. & Meijer, E. W. Multivalent Contrast Agents Based on Gadolinium–Diethylenetriaminepentaacetic Acid-Terminated Poly(propylene imine) Dendrimers for Magnetic Resonance Imaging. *Macromolecules* **37**, 3084–3091 (2004).
176. Zhu, J., Gale, E. M., Atanasova, I., Rietz, T. a. & Caravan, P. Hexameric Mn II Dendrimer as MRI Contrast Agent. *Chem. Eur. J.* **20**, 14507–14513 (2014).
177. Hamzah, J. *et al.* Vascular normalization in Rgs5-deficient tumours promotes immune destruction. *Nature* **453**, 410–414 (2008).
178. Misselwitz, B., Schmitt-Willich, H., Ebert, W., Frenzel, T. & Weinmann, H. J. Pharmacokinetics of Gadomer-17, a new dendritic magnetic resonance contrast agent. *Magn. Reson. Mater. Physics, Biol. Med.* **12**, 128–134 (2001).
179. Xu, H. *et al.* Preparation and preliminary evaluation of a biotin-targeted, lectin-targeted dendrimer-based probe for dual-modality magnetic resonance and fluorescence imaging. *Bioconjug. Chem.* **18**, 1474–1482 (2007).
180. Talanov, V. S. *et al.* Dendrimer-based nanoprobe for dual modality magnetic resonance and fluorescence imaging. *Nano Lett.* **6**, 1459–1463 (2006).
181. Boswell, C. A. *et al.* Synthesis , Characterization , and Biological Evaluation of Integrin alphavBéta3 -Targeted PAMAM Dendrimers. *Mol. Pharm.* **5**, 527–539 (2008).
182. Benchaala, I. *et al.* Folate-functionalized dendrimers for targeting Chlamydia-infected tissues in a mouse model of reactive arthritis. *Int. J. Pharm.* **466**, 258–265 (2014).
183. Licha, K. *et al.* Fluorescence imaging with multifunctional polyglycerol sulfates: Novel polymeric near-IR probes targeting inflammation. *Bioconjug. Chem.* **22**, 2453–2460 (2011).
184. Krishna, T. R. *et al.* Water-soluble dendrimeric two-photon tracers for in vivo imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 4645–4648 (2006).
185. Haensler, J. & Szoka, F. C. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug. Chem.* **4**, 372–379 (1993).

186. Wu, J., Huang, W. & He, Z. Dendrimers as carriers for siRNA delivery and gene silencing: A review. *Sci. World J.* **2013**, (2013).
187. Patil, M. L. *et al.* Surface-modified and internally cationic polyamidoamine dendrimers for efficient siRNA delivery. *Bioconjug. Chem.* **19**, 1396–1403 (2008).
188. Zinselmeyer, B. H., Mackay, S. P., Schatzlein, a. G. & Uchegbu, I. F. The lower-generation polypropylenimine dendrimers are effective gene-transfer agents. *Pharm. Res.* **19**, 960–967 (2002).
189. Teixeira, L. a, Fricke, C. H., Bonorino, C. B., Bogo, M. R. & Nardi, N. B. An efficient gene transfer system for hematopoietic cell line using transient and stable vectors. *J Biotechnol* **88**, 159–165 (2001).
190. Tolia, G. T. & Choi, H. H. The Role of Dendrimers in Topical Drug Delivery. *Drug Deliv.* **2008**, (2008).
191. Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811 (1998).
192. Liu, X., Rocchi, P. & Peng, L. Dendrimers as non-viral vectors for siRNA delivery. *New J. Chem.* **36**, 256 (2012).
193. Castanotto, D. & Rossi, J. J. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature* **457**, 426–433 (2009).
194. Jensen, L. B. *et al.* Comparison of polymeric siRNA nanocarriers in a murine LPS-activated macrophage cell line: Gene silencing, toxicity and off-target gene expression. *Pharm. Res.* **29**, 669–682 (2012).
195. Liu, X. *et al.* Efficient delivery of sticky siRNA and potent gene silencing in a prostate cancer model using a generation 5 triethanolamine-core PAMAM dendrimer. *Mol. Pharm.* **9**, 470–481 (2012).
196. Liu, J. *et al.* Functionalized dendrimer-based delivery of angiotensin type 1 receptor siRNA for preserving cardiac function following infarction. *Biomaterials* **34**, 3729–3736 (2013).
197. Watanabe, K. *et al.* In vivo siRNA delivery with dendritic poly(L-lysine) for the treatment of hypercholesterolemia. *Mol. Biosyst.* **5**, 1306–1310 (2009).
198. Serramía, M. J. *et al.* In vivo delivery of siRNA to the brain by carbosilane dendrimer. *J. Control. Release* **200**, 60–70 (2015).
199. Koç, F. E. & Şenel, M. Solubility enhancement of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) using polypolypropylene oxide core PAMAM dendrimers. *Int. J. Pharm.* **451**, 18–22 (2013).
200. Devarakonda, B., Hill, R. a. & De Villiers, M. M. The effect of PAMAM dendrimer generation size and surface functional group on the aqueous solubility of nifedipine. *Int. J. Pharm.* **284**, 133–140 (2004).

201. Devarakonda, B., Otto, D. P., Judefeind, A., Hill, R. a. & de Villiers, M. M. Effect of pH on the solubility and release of furosemide from polyamidoamine (PAMAM) dendrimer complexes. *Int. J. Pharm.* **345**, 142–153 (2007).
202. Thomas, T. P. *et al.* Polyvalent dendrimer-methotrexate as a folate receptor-targeted cancer therapeutic. *Mol. Pharm.* **9**, 2669–2676 (2012).
203. Bharathi, S., Kukowska-Latallo, J. & Jr, J. R. B. Design and In vitro Validation of Multivalent Dendrimer Methotrexates as a Folate-targeting Anticancer Therapeutic. *Curr. Pharm. des* **19**, 6594–6605 (2013).
204. Kukowska-Latallo, J. F. Nanoparticle Targeting of Anticancer Drug Improves Therapeutic Response in Animal Model of Human Epithelial Cancer. *Cancer Res.* **65**, 5317–5324 (2005).
205. Chandrasekar, D., Sistla, R., Ahmad, F. J., Khar, R. K. & Diwan, P. V. The development of folate-PAMAM dendrimer conjugates for targeted delivery of anti-arthritis drugs and their pharmacokinetics and biodistribution in arthritic rats. *Biomaterials* **28**, 504–512 (2007).
206. Chandrasekar, D. Folate coupled poly(ethyleneglycol) conjugates of anionic poly(amidoamine) dendrimer for inflammatory tissue specific drug delivery. *J. Biomed. Mater. Res. A* **81**, 771–780 (2007).
207. Huang, B., Otis, J., Joice, M., Kotlyar, A. & Thomas, T. P. PSMA-Targeted Stably Linked ‘Dendrimer-Glutamate Urea-Methotrexate’ as a Prostate Cancer Therapeutic. *Biomacromol.* **15**, 915–923 (2014).
208. Young Kim, J. *et al.* Dexamethasone conjugation to polyamidoamine dendrimers G1 and G2 for enhanced transfection efficiency with an anti-inflammatory effect. *J. Drug Target.* **20**, 667–677 (2012).
209. Choksi, A. *et al.* Comparative anti-inflammatory activity of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimer-dexamethasone conjugates with dexamethasone-liposomes. *Int. J. Pharm.* **449**, 28–36 (2013).
210. Rosenberg, B., VanCamp, L., Trosko, J. E. & Mansour, V. H. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* **222**, 385–386 (1969).
211. Leibbrandt, M. E., Wolfgang, G. H., Metz, a L., Ozobia, a a & Haskins, J. R. Critical subcellular targets of cisplatin and related platinum analogs in rat renal proximal tubule cells. *Kidney Int.* **48**, 761–770 (1995).
212. Malik, N., Evagorou, E. G. & Duncan, R. Dendrimer-platinite: a novel approach to cancer chemotherapy. *Anticancer. Drugs* **10**, 240–252 (1999).
213. Howell, B. a. & Fan, D. Poly(amidoamine) dendrimer-supported organoplatinum antitumour agents. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **466**, 1515–1526 (2010).
214. Navath, R. S. *et al.* Injectable PAMAM Dendrimer À PEG Hydrogels for the Treatment of Genital Infections : Formulation and in Vitro and in Vivo Evaluation. *Mol. Pharm.* 1209–1223 (2011).

215. Navath, R. S. *et al.* Dendrimer-drug conjugates for tailored intracellular drug release based on glutathione levels. *Bioconjug. Chem.* **19**, 2446–2455 (2008).
216. Kurtoglu, Y. E. *et al.* Poly(amidoamine) dendrimer-drug conjugates with disulfide linkages for intracellular drug delivery. *Biomaterials* **30**, 2112–2121 (2009).
217. Wang, B., Navath, R. S., Romero, R., Kannan, S. & Kannan, R. Anti-inflammatory and anti-oxidant activity of anionic dendrimer-N-acetyl cysteine conjugates in activated microglial cells. *Int. J. Pharm.* **377**, 159–168 (2009).
218. Kannan, S. *et al.* Dendrimer-Based Postnatal Therapy for Neuroinflammation and Cerebral Palsy in a Rabbit Model. *Sci. Transl. Med.* **4**, 130ra46–130ra46 (2012).
219. Lo-Man, R. *et al.* Anti-tumor immunity provided by a synthetic multiple antigenic glycopeptide displaying a tri-Tn glycotope. *J. Immunol.* **166**, 2849–2854 (2001).
220. Verez-Bencomo, V. *et al.* A synthetic conjugate polysaccharide vaccine against Haemophilus influenzae type b. *Science* **305**, 522–525 (2004).
221. Córdoba, E. V. *et al.* HIV-Antigens Charged on Phosphorus Dendrimers as Tools for Tolerogenic Dendritic Cells-Based Immunotherapy. *Curr. Med. Chem.* **21**, 31077 (2013).
222. Castonguay, A., Ladd, E., van de Ven, T. G. M. & Kakkar, A. Dendrimers as bactericides. *New J. Chem.* **36**, 199 (2012).
223. Chen, C. Z. *et al.* Quaternary ammonium functionalized poly(propylene imine) dendrimers as effective antimicrobials: structure-activity studies. *Biomacromol.* **1**, 473–480 (2000).
224. Felczak, A. *et al.* Antimicrobial activity of poly(propylene imine) dendrimers. *New J. Chem.* **36**, 2215 (2012).
225. Calabretta, M. K., Kumar, A., McDermott, A. M. & Cai, C. Antibacterial activities of poly(amidoamine) dendrimers terminated with amino and poly(ethylene glycol) groups. *Biomacromol.* **8**, 1807–1811 (2007).
226. Lopez, A. I., Reins, R. Y., McDermott, A. M., Trautner, B. W. & Cai, C. Antibacterial activity and cytotoxicity of PEGylated poly(amidoamine) dendrimers. *Mol. Biosyst.* **5**, 1148–1156 (2009).
227. Rasines, B. *et al.* Water-stable ammonium-terminated carbosilane dendrimers as efficient antibacterial agents. *Dalton Trans.* 8704–8713 (2009).
228. Ortega, P. *et al.* Hyperbranched polymers versus dendrimers containing a carbosilane framework and terminal ammonium groups as antimicrobial agents. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 5238–5248 (2011).
229. Fuentes-Paniagua, E. *et al.* Carbosilane cationic dendrimers synthesized by thiol–ene click chemistry and their use as antibacterial agents. *RSC Adv.* **4**, 1256 (2014).
230. Ciepluch, K. *et al.* Biological properties of new viologen-phosphorus dendrimers. *Mol. Pharm.* **9**, 448–457 (2012).

231. Wyatt, R. & Sodroski, J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* **280**, 1884–1888 (1998).
232. Witvrouw, M. *et al.* Polyanionic (i.e., polysulfonate) dendrimers can inhibit the replication of human immunodeficiency virus by interfering with both virus adsorption and later steps (reverse transcriptase/integrase) in the virus replicative cycle. *Mol. Pharmacol.* **58**, 1100–1108 (2000).
233. Galán, M. *et al.* Synthesis of new anionic carbosilane dendrimers via thiol–ene chemistry and their antiviral behaviour. *Org. Biomol. Chem.* **12**, 3222 (2014).
234. Blanzat, M. *et al.* Dendritic cationic assemblies: In vitro anti-HIV activity of phosphorus-containing dendrimers bearing Gal β 1cer analogues. *ChemBioChem* **6**, 2207–2213 (2005).
235. Pérez-Anes, A. *et al.* Phosphonate terminated PPH dendrimers: influence of pendant alkyl chains on the in vitro anti-HIV-1 properties. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 3491–3498 (2009).
236. McCarthy, T. D. *et al.* Dendrimers as drugs: Discovery and preclinical and clinical development of dendrimer-based microbicides for HIV and STI prevention. *Mol. Pharm.* **2**, 312–318 (2005).
237. Rupp, R., Rosenthal, S. L. & Stanberry, L. R. VivaGel™ (SPL7013 Gel): A candidate dendrimer - Microbicide for the prevention of HIV and HSV infection. *Int. J. Nanomedicine* **2**, 561–566 (2007).
238. Roy, R., Zanini, D., Meunier, S. J. & Romanowska, A. Solid-phase synthesis of dendritic sialoside inhibitors of influenza A virus haemagglutinin. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1869 (1993).
239. Reuter, J. D. *et al.* Inhibition of viral adhesion and infection by sialic-acid-conjugated dendritic polymers. *Bioconjug. Chem.* **10**, 271–278 (1999).
240. Supattapone, S., Nguyen, H. O., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. & Scott, M. R. Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 14529–14534 (1999).
241. Supattapone, S. *et al.* Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells. *J. Virol.* **75**, 3453–3461 (2001).
242. Solassol, J. *et al.* Cationic phosphorus-containing dendrimers reduce prion replication both in cell culture and in mice infected with scrapie. *J. Gen. Virol.* **85**, 1791–1799 (2004).
243. McCarthy, J. M. *et al.* Influence of surface groups on poly(propylene imine) dendrimers antiprion activity. *Biomacromol.* **14**, 27–37 (2013).
244. Klajnert, B., Cortijo-Arellano, M., Bryszewska, M. & Cladera, J. Influence of heparin and dendrimers on the aggregation of two amyloid peptides related to Alzheimer's and prion diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **339**, 577–582 (2006).
245. Klajnert, B., Cortijo-Arellano, M., Cladera, J. & Bryszewska, M. Influence of dendrimer's structure on its activity against amyloid fibril formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**, 21–28 (2006).

246. Wasiak, T. *et al.* Phosphorus Dendrimers Affect Alzheimer ' s (AB 1 – 28) Peptide and MAP-Tau Protein Aggregation. *Mol. Pharm.* **9**, 458–469 (2011).
247. Chonco, L. *et al.* Water-soluble carbosilane dendrimers protect phosphorothioate oligonucleotides from binding to serum proteins. *Org. Biomol. Chem.* **5**, 1886–1893 (2007).
248. Bermejo, J. F. *et al.* Water-soluble carbosilane dendrimers: Synthesis biocompatibility and complexation with oligonucleotides; evaluation for medical applications. *Chem. Eur. J.* **13**, 483–495 (2007).
249. Gras, R. *et al.* Changes in gene expression pattern of human primary macrophages induced by carbosilane dendrimer 2G-NN16. *Pharm. Res.* **26**, 577–586 (2009).
250. Perisé-Barrios, A. J. *et al.* Use of carbosilane dendrimer to switch macrophage polarization for the acquisition of antitumor functions. *Nanoscale* **7**, 3857–3866 (2015).
251. Shaunak, S. *et al.* Polyvalent dendrimer glucosamine conjugates prevent scar tissue formation. *Nat. Biotechnol.* **22**, 977–984 (2004).
252. Barata, T. *et al.* Computational design principles for bioactive dendrimer based constructs as antagonists of the TLR4-MD-2-LPS complex. *Biomaterials* **32**, 8702–8711 (2011).
253. Tomalia, D. a. In quest of a systematic framework for unifying and defining nanoscience. *J. Nanoparticle Res.* **11**, 1251–1310 (2009).
254. Barata, T. S., Teo, I., Brocchini, S., Zloh, M. & Shaunak, S. Partially glycosylated dendrimers block MD-2 and prevent TLR4-MD-2-LPS complex mediated cytokine responses. *PLoS Comput. Biol.* **7**, (2011).
255. Sunder, A., Mülhaupt, R., Haag, R. & Frey, H. Chiral hyperbranched dendron analogues. *Macromolecules* **33**, 253–254 (2000).
256. Sunder, A., Hanselmann, R., Frey, H. & Mülhaupt, R. Controlled synthesis of hyperbranched polyglycerols by ring-opening multibranching polymerization. *Macromolecules* **32**, 4240–4246 (1999).
257. Papp, I., Dervedde, J., Enders, S. & Haag, R. Modular synthesis of multivalent glycoarchitectures and their unique selectin binding behavior. *Chem. Commun.* 5851–5853 (2008).
258. Wang, L., Brown, J. R., Varki, A. & Esko, J. D. Heparin's anti-inflammatory effects require glucosamine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L- and P-selectins. *J. Clin. Invest.* **110**, 127–136 (2002).
259. Dervedde, J. *et al.* Dendritic polyglycerol sulfates as multivalent inhibitors of inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 19679–19684 (2010).
260. Paulus, F. *et al.* The effect of polyglycerol sulfate branching on inflammatory processes. *Macromol. Biosci.* **14**, 643–654 (2014).

261. Rele, S. M. *et al.* Dendrimer-like PEO glycopolymers exhibit anti-inflammatory properties. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 10132–10133 (2005).
262. Gröger, D. *et al.* Synthesis and biological evaluation of radio and dye labeled amino functionalized dendritic polyglycerol sulfates as multivalent anti-inflammatory compounds. *Bioconjug. Chem.* **24**, 1507–1514 (2013).
263. Rajakumar, P. & Anandhan, R. Synthesis and In-vitro anti-inflammatory activity of novel glycodendrimers with benzene 1,3,5 carboxamide core and triazole as branching unit. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 4687–4695 (2011).
264. Blattes, E. *et al.* Mannodendrimers prevent acute lung inflammation by inhibiting neutrophil recruitment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 8795–800 (2013).
265. Tang, Y. *et al.* Protective Effects and Mechanisms of G5 PAMAM Dendrimers against Acute Pancreatitis Induced by Caerulein in Mice. *Biomacromol.* **16**, 174–182 (2015).
266. Chauhan, A. S. *et al.* Dendrimer-mediated transdermal delivery: Enhanced bioavailability of indomethacin. *J. Control. Release* **90**, 335–343 (2003).
267. Chauhan, A. S., Jain, N. K., Diwan, P. V. & Khopade, A. J. Solubility enhancement of indomethacin with poly(amidoamine) dendrimers and targeting to inflammatory regions of arthritic rats. *J. Drug Target.* **12**, 575–583 (2004).
268. Chauhan, A. S., Diwan, P. V., Jain, N. K. & Tomalia, D. a. Unexpected in vivo anti-inflammatory activity observed for simple, surface functionalized poly(amidoamine) dendrimers. *Biomacromol.* **10**, 1195–1202 (2009).
269. Fruchon, S. *et al.* Anti-inflammatory and immunosuppressive activation of human monocytes by a bioactive dendrimer. *J. Leukoc. Biol.* **85**, 553–562 (2009).
270. Hayder, M. *et al.* A phosphorus-based dendrimer targets inflammation and osteoclastogenesis in experimental arthritis. *Sci. Transl. Med.* **3**, 81ra35 (2011).
271. Belmont, C. *et al.* A chemical basis for recognition of nonpeptide antigens by human gd T cells. *FASEB J.* **12**, 1669–1670 (2000).
272. Rolland, O. *et al.* Tailored control and optimisation of the number of phosphonic acid termini on phosphorus-containing dendrimers for the ex-vivo activation of human monocytes. *Chem. Eur. J.* **14**, 4836–4850 (2008).
273. Griffe, L. *et al.* Multiplication of human natural killer cells by nanosized phosphonate-capped dendrimers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 2523–2526 (2007).
274. Degboe, Y. *et al.* Modulation of pro-inflammatory activation of monocytes and dendritic cells by aza-bis-phosphonate dendrimer as an experimental therapeutic agent. *Arthritis Res. Ther.* **16**, R98 (2014).
275. Fruchon, S. *et al.* An azabisphosphonate-capped poly(phosphorhydrazone) dendrimer for the treatment of endotoxin-induced uveitis. *Molecules* **18**, 9305–9316 (2013).

276. Florentinus, A. K., Jankowski, A., Petrenko, V., Bowden, P. & Marshall, J. G. The Fc receptor-cytoskeleton complex from human neutrophils. *J. Proteomics* **75**, 450–468 (2011).
277. Jankowski, A., Zhu, P. & Marshall, J. G. Capture of an activated receptor complex from the surface of live cells by affinity receptor chromatography. *Anal. Biochem.* **380**, 235–248 (2008).
278. Raje, C. I., Kumar, S., Harle, A., Nanda, J. S. & Raje, M. The macrophage cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a novel transferrin receptor. *J. Biol. Chem.* **282**, 3252–3261 (2007).
279. Cairo, G., Recalcati, S., Mantovani, A. & Locati, M. Iron trafficking and metabolism in macrophages: Contribution to the polarized phenotype. *Trends Immunol.* **32**, 241–247 (2011).
280. Frei, A. P., Moest, H., Novy, K. & Wollscheid, B. Ligand-based receptor identification on living cells and tissues using TRICEPS. *Nat. Protoc.* **8**, 1321–36 (2013).
281. Lee, S. *et al.* A small molecule binding HMGB1 and HMGB2 inhibits microglia-mediated neuroinflammation. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 1055–1060 (2014).
282. Byrne, A. & Reen, D. J. Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J. Immunol.* **168**, 1968–1977 (2002).
283. De waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G. & De Vries, J. E. Interleukin 10(IL-10) Inhibits Cytokine Synthesis by Human Monocytes: An Autoregulatory Role of IL-10 Produced by Monocytes. *J. Exp. Med.* **174**, 1209–1220 (1991).
284. Grütz, G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J. Leukoc. Biol.* **77**, 3–15 (2005).
285. Perisé-Barrios, A. J. *et al.* Use of carbosilane dendrimer to switch macrophage polarization for the acquisition of antitumor functions. *Nanoscale* **7**, 3857–3866 (2015).
286. Biswas, S. K. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* **11**, 889–896 (2010).
287. Noy, R. & Pollard, J. W. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity* **41**, 49–61 (2014).
288. Cieslewicz, M. *et al.* Targeted delivery of proapoptotic peptides to tumor-associated macrophages improves survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 15919–24 (2013).
289. Astruc, D., Boisselier, E. & Ornelas, C. Dendrimers designed for functions: From physical, photophysical, and supramolecular properties to applications in sensing, catalysis, molecular electronics, photonics, and nanomedicine. *Chem. Rev.* **110**, 1857–1959 (2010).
290. Keller, M. *et al.* Pyrene-tagged dendritic catalysts noncovalently grafted onto magnetic Co/C nanoparticles: An efficient and recyclable system for drug synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 3626–3629 (2013).
291. Sica, A. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* **122**, 787–795 (2012).

292. Fleming, B. D. *et al.* The generation of macrophages with anti-inflammatory activity in the absence of STAT6 signaling. *J. Leukoc. Biol.* **98**, (2015).
293. Ramirez-Ortiz, Z. G. *et al.* The scavenger receptor SCARF1 mediates apoptotic cell clearance and prevents autoimmunity. *Nat. Immunol.* **127**, 358–366 (2012).
294. Herrmann, M. *et al.* Clearance of fetuin-A-containing calciprotein particles is mediated by scavenger receptor-A. *Circ. Res.* **111**, 575–584 (2012).
295. Jonsson, T. *et al.* Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer’s disease. *N Engl J Med* **368**, 107–116 (2013).
296. Guerreiro, R. *et al.* TREM2 variants in Alzheimer’s disease. *N. Engl. J. Med.* **368**, 117–27 (2013).
297. Daws, M. R. *et al.* Pattern recognition by TREM-2: binding of anionic ligands. *J. Immunol.* **171**, 594–599 (2003).
298. Rivest, S. TREM2 enables amyloid β clearance by microglia. *Cell Res.* **25**, 535–536 (2015).
299. Dufton, N. & Perretti, M. Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists. *Pharmacol. Ther.* **127**, 175–188 (2010).
300. Pujalis, D., Goetsch, J., Kottas, D. J., Gerke, V. & Rescher, U. Annexin A1 released from apoptotic cells acts through formyl peptide receptors to dampen inflammatory monocyte activation via JAK/STAT/SOCS signalling. *EMBO Mol. Med.* **3**, 102–114 (2011).
301. Caminade, A.-M., Ouali, A., Laurent, R., Turrin, C.-O. & Majoral, J.-P. The dendritic effect illustrated with phosphorus dendrimers. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 3890–3899 (2015).
302. Kannan, R. M., Nance, E., Kannan, S. & Tomalia, D. a. Emerging concepts in dendrimer-based nanomedicine: From design principles to clinical applications. *J. Intern. Med.* 579–617 (2014).
303. Svenson, S. The dendrimer paradox – high medical expectations but poor clinical translation. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 4131–4144 (2015).
304. Ficici, E., Andricioaei, I. & Howorka, S. Dendrimers in Nanoscale Confinement: The Interplay between Conformational Change and Nanopore Entrance. *Nano Lett.* (2015).
305. Feliu, N. *et al.* Next-Generation Sequencing Reveals Low-Dose Effects of Cationic Dendrimers in Primary Human. *ACS Nano* **9**, 146–163 (2015).