HAL
open science

Synthèse et caractérisations de nanoparticules d'or pour la vectorisation de principes actifs anticancéreux

Shihong Qiu

To cite this version:

Shihong Qiu. Synthèse et caractérisations de nanoparticules d'or pour la vectorisation de principes actifs anticancéreux. Autre. Université de Limoges, 2016. Français. NNT : 2016LIMO0021 . tel-01334576

HAL Id: tel-01334576

https://theses.hal.science/tel-01334576v1

Submitted on 23 Jun 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.

Thèse de doctorat

Université de Limoges

Université de Limoges

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

Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN)

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Discipline / Spécialité : [Chimie des substances naturelles]

Présentée et soutenue par

Shihong QIU

Le 22 mars 2016

Synthèse et caractérisation de nanoparticules d'or pour la vectorisation de principes actifs anticancéreux

Thèse dirigée par le Professeur Vincent SOL et le Professeur Christelle POUGET

JURY :

Rapporteurs

Dr. Jean Pierre SOUCHARD, Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse III.

Dr. Patrick MARTIN, Professeur, Université d'Artois, IUT de Béthune.

Examinateurs

Dr. Christine BAUDEQUIN, MCF, Université de Rouen.

Dr. Bertrand LIAGRE, Professeur, Université de Limoges.

Dr. Christelle POUGET, Professeur, Université de Limoges.

Dr. Vincent SOL, Professeur, Université de Limoges.

Invités

Dr. Robert GRANET, Ingénieur de recherche - HDR, Université de Limoges

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier, avec le plus de respects, Professeur Vincent SOL, directeur de Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, et mon directeur de thèse, pour 5 ans d'enseignement et pour m'offre l'opportunité de découvert le monde de recherche par une thèse très innovant et passionant. Je tiens à exprimer ma gratitude pour tous les encadrements, tous les formations, tous les conseils et tous les discussions. Je voudrais bien dit merci pour les passage de vos compétences, vos savoir-faires. Merci d'avoir permis de présenter mon travail à pluseurs congrés régionals et internationaux. Finalement , merci
d'avoir corrigé le rapport de ma thèse.

Je tiens à exprimer mes sincières remerciements au Docteur Robert Granet, ingénieur bénévol du LCSN. pour tous ses connaissances sur les nanoparticules et l'idée d'utilisation des herbes de médicine traditionnelle chinoise.

Je tiens également à remercier docteur Christelle Pouget, ma codirectrice pour avoir dirigé ma thèse. Je voudrais mercier votre gentilless et vos compétences.

Je tiens spécifiquement remercier docteur Jean-Pierre Mbakidi et Ludovic Micallef pour ses conseils, discussions et surtout pour avoir réalisé mes tests biologiques.

Je voudrais remercier tous les professeurs du LCSN et d'Université, surtout, Stéphanie Lhez, Pierre Krauz, Vincent Chaleix, Céline Faugeron, Rachida Zerouki, Vincent Gloaguen et Catherine Rioux. Pour d'abord leus formations et leurs enseignements pendant mes études et pour leurs conseils, aides pendant toute ma thèse.

Je voudrais aussi remercier mes amis du labo : Emanuel, Kerim, Mark-Arthure et Olivier, pour leurs amitiés et en même temps, pour leur soutients scientifiques et leurs soutenances de ma vie.

Egalement, je remercie à tous les jeunes chercheurs de ma génération du LCSN pour tous ces jours de travail, pour leurs gentilesses et leurs amities.

Je tiens à remercier les emploiées et les techniciens du LCSN, surtout Sylvie Laval, Michèle Constantin, Dorothée Moine et Christelle Gady. Leurs travail nous facilite à faire la recherche.

Table des matières

Introduction.....1
Chapitre I. Généralité 3
I.1. Généralité sur la cellule 5
I.1.1. La structure de la cellule 5
I.1.1.1 Le cycle cellulaire 6
I.1.1.2 La mort cellulaire : nécrose, apoptose et autophagie.....7
I.2. Le cancer 13
I.2.1. Métabolisme de la cellule cancéreuse 15
I.2.2. Traitement du cancer 16
I.2.3. Photothérapie dynamique (PDT) 17
I.3. Vectorisation..... 23
I.3.1. Ciblage actif 23
I.3.2. Ciblage passif, nanomédecine et nanoparticules .....
27 I.3.3. Les différents nanoobjets .....
30 I.3.4. Polyethylèneimine (PEI).....
37
I.3.5. Les cyclodextrines 38
I.4. Les principes actifs 39
I.4.1. Tanshinones et Salvia miltiorrhiza..... 39
I.4.2. L'α-mangostine..... 43
I.4.3. Photosensibilisateurs d'origine naturelle .....
46
I.5. But du travail 48
Chapitre II. Résultats et discussion 53
II.1. Stratégie de synthèse 53
II.1.1. Synthèse du complexe ionique AuNPs/PEI/CD .....
53
II.1.2. Synthèse du complexe covalent AuNPs/PEI/CD .....
54
II.1.3. Encapsulation des principes actifs 55
II.1.4. Synthèse du complexe AuNPs/PEI/PS..... 56
II.2. Extractions des principes actifs 58
II.2.1. Extraction de tanshinone IIA (**18**) 58
II.2.2. Extraction de α-mangostine (**19**) 61
II.2.3. Synthèse et caractérisation du photosensibilisateur .....
65
II.2.3.1 Extraction de la chlorophylle *a* et hémisynthèse de la purpurine 18 (**14**).....
65
II.2.3.2 Caractérisations de la Pp 18 (**14**) 66
II.3. Modification de la β-cyclodextrine 71
II.3.1. Synthèse de la β-cyclodextrine *per*-iodée (**20**)..... 71
II.3.2. Synthèse de la β-cyclodextrine (β-CD) oxydée (**6**) par le TEMPO .....
72
II.3.3. Caractérisations des cyclodextrine modifiées (**6**) et (**20**) .....
73

II.4. Synthèses et fonctionnalisations des nanoparticules d'or 75
II.4.1. Synthèses des nanoparticules d'or sphériques 75
II.4.1.1 A partir du citrate de sodium 75
II.4.1.1 A partir de l'borohydrure de sodium et l'acide lipoïque ou l'acide thiomalique..... 77
II.4.1.2 Optimisation de la taille des nanoparticules 80
II.4.1.3 Synthèse du complexe AuNPs/PEI. 81
II.4.1.3.1. Synthèse de nanoparticules (**1**) en utilisant la PEI10000..... 82
II.4.1.3.2. Fixation de la fonction thiol sur la PEI 85
II.4.1.3.2.1. Fixation de fonction thiol sur la PEI 1800..... 85 II.4.1.3.2.2. Caractérisation de la PEI thiolée (**3**). 86
II.4.1.3.3. Synthèse des AuNPs en utilisant la PEI modifiée (**4**) 87
II.4.1.4 Couplage des AuNPs/PEI et de la cyclodextrine anionique..... 88
II.4.2. Greffage de la β-cyclodextrine oxydée (**6**) et l'acide thiomalique sur la PEI. 90
II.4.2.1 Couplage de la PEI 1800 et de la cyclodextrine oxydée (**6**) 90
II.4.2.1.1. Caractérisations 91
II.4.2.1 Synthèse de AuNPs avec PEI/CD lié de façon covalente 91
II.4.2.1.1. Caractérisations 91
II.4.3. Encapsulation de principe actif 93
II.4.3.1 Inclusion de la Tanshinone IIA..... 93
II.4.3.2 Inclusion de l'α-mangostine 94
II.4.4. Synthèse du complexe AuNPs/PEI-SH/photosensibilisateur (**16**) 95
II.4.4.1 Fixation de la Pp18 sur la PEI1200 95
II.4.4.2 Caractérisation 96
II.4.4.3 Synthèse des nanoparticules d'or sphériques à partir de la PEI-SH/chlorine (**16**)..... 97
II.4.5. Synthèse de nanoparticules d'or non-sphériques..... 98
II.4.5.1 Synthèse des nanoparticules triangulaires (**24**) en utilisant le CTAC 98
II.4.5.2 Synthèse des nanoparticules triangulaires (**25**) en utilisant le thiosulfate de sodium . 100
II.4.6. Synthèse de complexe AuNPs(T) /PEI-SH/chlorine (**26**) 102
II.4.6.1 Couplage de PEI-SH/chlorine (**16**) et des nanoparticules d'or triangulaires (**25**) 102
II.4.6.2 Caractérisation 102
II.5. Evaluations biologiques..... 104
II.5.1. Evaluations biologiques sur les complexes ioniques AuNPs/PEI/CD (**10**) sur les lignées

cancéreuses prostatiques PC-3 et DU-145..... 104
II.5.1.1 A partir de AuNPs/PEI/CD-tanshinone IIA (**10**) 105
II.5.1.2 A partir de AuNPs/PEI/CD-α-Mangostine (**11**)..... 106 II.5.2. Tests sur les complexes covalents AuNPs/PEI-SH/CD (**9**) sur les lignées cancéreuses
prostatiques PC-3 et DU-145. 107
II.5.2.1 Test de la cytotoxicité du complexe covalent AuNPs/PEI-SH/CD (**9**) 107
II.5.2.1 A partir du complexe covalent AuNPs/PEI-SH/CD-Tanshinone IIA (**12**) 108
II.5.2.2 A partir du complexe covalent AuNPs/PEI-SH/CD-α-Mangostine (**13**) 109
II.5.3. Tests biologiques des complexes covalents **12** et **13** sur les cellules de cancer de colon . 110 II.5.3.1 Etude de la cytotoxicité des nanoparticules **9** sur les lignées HT29 et HCT116 110
II.5.3.2 Etude de la cytotoxicité des complexes (**12**), (**13**), tanshinone IIA (**18**) et α-mangostine
(**19**) 111
II.5.4. Activité photocytotoxicité des complexes AuNPs/PEI-SH/chlorine sphériques (**17**) et triangulaires (**26**) 113
Chapitre III. Conclusion et perspectives..... 117
Chapitre IV. Partie expérimentale 121
Références..... 151
Valorisation de la thèse..... 165

Table des illustrations

Figure 1 La structure de la cellule 6

Figure 2 le cycle cellulaire 7

Figure 3 La mort de la cellule par la voie nécrose et par la voie apoptose 9

Figure 4 Schéma simplifié de la voie de mécanisme d'apoptose..... 10

Figure 5 Mécanisme de l'autophagie..... 12

Figure 6 Mécanisme de carcinogenèse..... 14

Figure 7 Les différences de mécanisme entre cellules normales et les cellules cancéreuses 15

Figure 8 Principe de la PDT..... 18

Figure 9 Les photosensibilisateurs tétrapyrroliques..... 19

Figure 10 Diagramme de Perrin-Jablonski 19

Figure 11 Fraction active de photofrin® 21

Figure 12 A) Foscan; B) Visudyne; C) Tookad 22

Figure 13 La structure de l'acide folique 24

Figure 14 Trois polyamines naturelles 25

Figure 15 Le peptide ATWLPPR (gauche) et le RGD (droite)..... 26

Figure 16 Porphyrine triglucosylées 26

Figure 17 Anticorps monoclonaux, liés à un épitope spécifique. 27

Figure 18 : Effet EPR 28

Figure 19 : Les voies possibles d'internalisation des nanoparticules pour traverser la membrane 29

Figure 20 Structure de liposome de petite taille 30

Figure 21 Structure élémentaire des CNCx 31

Figure 22 Nanoparticules d'oxyde de fer magnétique 32

Figure 23 a : Représentation schématique de quelques phases mésostructurées de la famille SBA-n .. 33

Figure 24 Solution des nanoparticules sphériques..... 34

Figure 25 Théorie de l'effet SPR (Surface Plasmon Resonance) 35

Figure 26 Images MEB des formes non-sphériques des AuNPs 36

Figure 27 PEI linéaire (A) ; ramifiée (B) ; dendrimère (C) 37

Figure 28 a : Structure chimique des cyclodextrines, b : structure 3D de cyclodextrine 38

Figure 29 *Salvia miltiorrhiza* ; Danshen : la racine séchée de *Salvia miltiorrhiza*..... 40

Figure 30 Les différentes tanshinone 40

Figure 31 Tanshinone IIA Sulfonate de sodium (STS) 41

Figure 32 Des molécules de la phase aqueuse lors de l'extraction de Danshen..... 43

Figure 33 Mangoustanier et mangoustan..... 44

Figure 34 Structure de l'α-mangostine 45

Figure 35 Schéma proposé pour l'induction de l'apoptose par l'α-mangostine sur des cellules DLD-1.
..... 46

Figure 36 Structures des photosensibilisateurs de la famille tetrapyrrolique 47

Figure 37 Schéma des complexes AuNPs/PEI/CD fixés de manières covalentes et ioniques..... 48

Figure 38 Le complexe AuNPs/PEI-SH/chlorine 49

Figure 40 Voie II : synthèse des AuNPs par liaison ionique en utilisant les PEIs thiolées 53

Figure 39 Voie I : synthèse de complexe AuNPs/PEI/CD ionique 53

Figure 41 Voie III : Schéma de synthèse de complexe AuNPs/PEI/CD covalent..... 54

Figure 42 Encapsulation des principes actifs 55

Figure 43 Voie IV : Schéma de synthèse de complexe AuNPs/PEI/chlorine (**17**) 56

Figure 44 Spectre UV-Visible de tanshinone IIA (**18**) ($CHCl_3$) 58

Figure 45 Spectre infrarouge de la tanshinone IIA (**18**) 59

Figure 46 Spectre de masse (ESI) haute résolution de la tanshinone IIA (**18**) 61

Figure 47 Spectre UV-Visible de l'α-mangostine (**19**) ($CHCl_3$) 62

Figure 48 Spectre infrarouge de l'α-mangostine (**19**) 63

Figure 49 Le spectre de masse (ESI) de l'α-mangostine (**19**) 65

Figure 50 Absorption UV-Visible de chlorophylle *a* ($CHCl_3$)..... 65

Figure 51 Hémi-synthèse de la Pp18 (**14**) à partir de chlorophylle *a* 66

Figure 52 Spectre UV-Visible de la Pp18 (**14**) ($CHCl_3$). 67

Figure 53 Spectre RMN^{1}H de Pp18 ($CDCl_3$) 68

Figure 54 Schéma de synthèse de la cyclodextrine *per*-iodée 71

Figure 55 le mécanisme de la réaction d'iodation 72

Figure 56 Mécanisme d'oxydation d'alcool primaire par le TEMPO..... 72

Figure 57 Schéma d'oxydation de la β-cyclodextrine 73

Figure 58 Schéma des cyclodextrines modifiées **6** et **20** 73

Figure 59 Spectres IR de la β-CD , de la β-CD iodée (**20**) et de la β-CD oxydée (**6**) 74

Figure 60 Schéma de synthèse des AuNPs en utilisant le citrate de sodium 75

Figure 61 Spectre d'absorption UV-Visible de l'essai 3 (H_2O) 77

Figure 62 Spectre UV-Visible (H_2O) des nanoparticules AuNPs/acide lipoïque synthétisées par échange de ligand. 78

Figure 63 Schéma de synthèse AuNPs avec l'acide lipoïque et l'acide thiomalique 79

Figure 64 Spectre UV-Visible des AuNPs formées à partir de l'acide lipoïque **22** (H_2O)..... 79

Figure 65 Les spectres UV-Visible des sept solutions de nanoparticule (H_2O) 81

Figure 66 Deux nanoparticules **1** et **4** synthétisées en utilisant la PEI..... 81

Figure 67 Schéma général de synthèse des AuNPs en présence de PEI 82

Figure 68 Image de MET des nanoparticules d'or 83

Figure 69 Potentiel zêta du complexe AuNPs/PEI 10 kDa (**1**) 84

Figure 70 L'analyse d'ATG du complexe AuNPs/PEI (**1**) 85

Figure 71 Fixation de 3-acetamidotetrahydro-2-thiophenone sur PEI1800 86

Figure 72 Formule permettant de calculer le D.S du composé **3** à partir des résultats obtenus par analyse élémentaire. 87

Figure 73 Schéma de synthèse du produit **4** en utilisant les PEIs thiolées. 87

Figure 74 Réaction de couplage entre les AuNPs/PEI (**1**) et β-CD anionique (sulfatée) 88

Figure 75 Comportement des solutions du complexe AuNPs/PEI en fonction du volume de solution de
β-CD anioniques ajouté 89

Figure 76 Comparaison du Spectre UV d'AuNPs/PEI/CD$^-$ (**2**) et AuNPs/PEI (**1**) (H_2O) 89

Figure 77 Mesure du potentiel zêta du complexe AuNPs/PEI/CD (**2**)..... 90

Figure 78 Fixation de β-CD oxydée **(6)** sur la PEI 90

Figure 79 Formules permettant de déterminer le degré de substitution de fonction thiol et de cyclodextrine 91

Figure 80 Synthèse du complexe covalent AuNPs/PEI/CD (**9**) 91

Figure 81 Spectre UV-Visible du complexe covalent AuNPs/PEI/CD (**9**) (H_2O) 92

Figure 82 les spectres de DLS et de potentiel zêta du complexe covalent AuNPs/PEI/CD (**9**) 92

Figure 83 Encapsulation des principes actifs 93

Figure 84 Fixation de chlorine sur PEI-SH (**16**) 95

Figure 85 Spectre UV-Visible de la PEI-SH/chlorine **16** ($CHCl_3$) 96

Figure 86 Schéma général de synthèse du complexe AuNPs/PEI-S/chlorine 97

Figure 87 Spectre UV-Visible du complexe AuNPs/PEI-SH/CD (**17**) (H_2O). 97

Figure 88 Synthèse d'AuNPs triangulaire (**24**) en présence de CTAC 99

Figure 89 Spectre UV-Visible d'AuNPs triangulaire **24** en présence de CTAC (H_2O) 99

Figure 90 Schéma de synthèse d'AuNPs (**25**) à partir de thiosulfate de sodium 100

Figure 91 Spectre UV-Visible des AuNPs triangulaires (**25**) d'essai 4 (H_2O) 101

Figure 92 Image de MET d'AuNPs triangulaire (**25**)..... 101

Figure 93 Schéma de synthèse du complexe AuNPs(T)/PEI-SH/chlorine (**26**) 102

Figure 94 Spectre UV-visible du complexe AuNPs(T)/PEI-SH/chlorine (**26**) dans H_2O 103

Figure 95 image de MET du complexe AuNPs (T)/PEI-SH/chlorine (**26**) 103

Figure 96 Viabilité cellulaires (%) du vecteur (**2**) sur les lignées PC-3 et DU-145 104

Figure 97 Structure du composé **10** 105

Figure 98 Viabilité cellulaires (%) en fonction de la concentration de tanshinone IIA 105

Figure 99 Viabilité cellulaire en fonction de la concentration d'α-mangostine seule **19** et d'encapsulée
dans le complexe ionique **11** 106

Figure 100 Viabilité cellulaire en fonction de la concentration en nanoparticules sans principe actif (**9**)
sur les lignées PC-3 et DU-145 108

Figure 101 Viabilité cellulaires en fonction de la concentration de la tanshinone seule (**18)** et encapsulée au sein du complexe covalent de nanoparticules **12** 108

Figure 102 Viabilité cellulaire en fonction de la concentration de la mangostine et du complexe covalent des nanoparticules **13** et mangostine seule **19** 110

Figure 103 Viabilité cellulaire en présence de nanoparticule AuNPs/PEI-SH/CD (**9**) sans principe actif
sur les lignées colorectales HT29 et HCT116 111

Figure 104 Viabilité cellulaires (%) en fonction de la concentration du complexe et principe actif...

111

Figure 105 Structure du complexe AuNPs/PEI-SH/chlorine sphérique (**17**) et triangulaire (**26**) 113

Figure 106 Viabilité cellulaire (%) des différents composés **1**, **16**, **17**, **25** et **26** sur la lignée HT29 à l'obscurité et après 2 h d'illumination 113

Table des tableaux

Tableau 1 Numérotation de la tanshinone IIA et les données RMN^{1}H ($CDCl_3$)..... 60

Tableau 2 Numérotation de l'α-mangostine et ses données RMN^{1}H ($CDCl_3$) 64

Tableau 3 Maximum d'absorption (ε) de chaque longueur d'onde [λ en nm (ε*10^{-3})] 67

Tableau 4 Analyse du spectre de masse (ESI) de la Purpurine 18 68

Tableau 5 les valeurs du RMN^{1}H de la Pp18 ($CDCl_3$)..... 69

Tableau 6 Les corrélation des différentes proportions de Citrate/ $HAuCl_4$ utilisées et les tailles des nanoparticules formées 76

Tableau 7 l'élaboration de taille d'AuNPs..... 80

Tableau 8 Tailles des nanoparticules d'or obtenues par UV-Visible en fonction de la masse molaire de
PEI 82

Tableau 9 résultat d'analyse élémentaire de PEI-SH **(3)** 86

Tableau 10 Corrélation entre la tailles des AuNPs **4** synthétisées en utilisant la PEI thiolée et leur maxima d'absorption en UV-Visible. 87

Tableau 11 Quantité de Tanshinone IIA encapsulée..... 94

Tableau 12 Quantité d'α-mangostine encapsulée 94

Tableau 13 Maxima d'absorption et coefficient d'extrinction molaire de la purpurine 18 et PEI-SH/chlorine (**16**) ($CHCl_3$) 96

Tableau 14 Etude de la variation de la proportion $HAuCl_4/Na_2S_2O_3$ sur la formation de AuNPs triangulaires (**25**)..... 100

Tableau 15 IC_{50}s du complexe ionique AuNPs/PEI/CD/Tan IIA (**10**).....
106

Tableau 16 IC_{50} du complexe ionique AuNPs/PEI/CD-mangostine et α-mangostine (24h) 107

Tableau 17 IC_{50} du complexe covalent AuNPs/PEI/CD-Tan IIA et Tan IIA (48h) 109

Tableau 18 le résultat IC50 de mangostine avec ou sans nanoparticules (48h) 110

Tableau 19 IC_{50} des principes actifs vectorisés par le complexe covalent 112

Liste d'abréviations

ε : coefficient d'absorption molaire λ

: longueur d'onde

5-ALA : acide 5-aminolévulinique

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

ATG : Analyse ThermoGravimétrique

ATP : Adénosine-5′-TriPhosphate

AuNPs : nanoparticules d'or

AuNPs (S) : nanoparticules d'or sphériques

AuNPs (T) : nanoparticules d'or triangulaires

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CD : cyclodextrine

CD^- : cyclodextrine anionique (sulfate)

CIS : Conversion Inter-Système

CNCx : nanocristaux de cellulose

Coll. : collaborateur

CTAC : chlorure d'hexadécyltriméthylammonium

DDQ : 2,3-dichloro-5,6-dicyano-para-benzoquinone

DLS : Diffusion Light scattering

DMF : diméthylformamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

EP : éther de pétrole éq.

: équivalent

ESI : ionisation par électrospray

EPR : Enhanced Permeability and Retention

h : heure

IR : infrarouge

J : constante de couplage

LCSN : Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles m/z

: rapport masse sur charge

MALDI : désorption-ionisation laser assisté par matrice

Mango : mangostine

MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylythiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium

min : minute

MEC : matrice extra-cellulaire

MET : microscopie électronique à transmission

NHS : N-hydroxysuccinimide nm : nanomètre

OMS : organisation mondiale de santé

PDT : photothérapie dynamique

PEG : polyéthylène glycol

PEI : polyéthylèneimine

PEI-SH : polyéthylèneimine avec fonctions thiol

PpIX : protoporphyrine IX ppm : partie par

million

PS : photosensibilisateur

PTT : photothérapie thermique

Rf: rapport frontal

RMN : Résonance magnétique nucléaire

ROS : Reactif Oxygene Species (espèces d'oxygène réactif)

SERS: Surface Enhanced Raman Spectroscopy

SPM : système de phagocytoses mononuclées SPR

: résonance plasmonique de surface (ou RPS)

s : singulet d :

doublet dd :

double doublet q :

quadruplet m :

multiplet

S.M : Spectrométrie de Masse

T1 : Temps de relaxation longitudinal

T2 : Temps de relaxation transversal

Tan IIA : tanshinone IIA

T.A : Température Ambiante

TCA : TriCarboxylic Acid (acide citrique)
TEMPO : (2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl)oxy

UV : ultrat-violet

VEGF : facteur de croissance de l'endothélialium vasculaire

Introduction

Le cancer est actuellement la première cause de la mortalité en Europe et la lutte contre cette maladie est devenue un enjeu de société majeur. Aujourd'hui, grâce aux nombreuses recherches dans ce domaine, cette maladie est de mieux en mieux connue. Les cellules cancéreuses sont issues des cellules saines qui ont subi plusieurs phases de mutation. Elles échappent au contrôle du système immunitaire et forment la tumeur. La croissance du volume de la tumeur nécessite un apport de nutriments et d'oxygène. Pour cela, elle secrète des facteurs de croissance qui induisent la formation des néo-vaisseaux sanguins qui sont beaucoup plus poreux que les vaisseaux normaux. En parallèle, le métabolisme des cellules cancéreuses est modifié à cause de mutations.

Les médecines traditionnelles ont depuis très longtemps utilisés des extraits de plantes sans connaitre précisément les principes actifs ni les mécanismes d'action, et l'effet de ces composés n'est pas bien expliqué par les scientifiques. Actuellement, de plus en plus de recherches pharmaceutiques se réorientent vers la recherche de nouvelles molécules anticancéreuses comme l'atteste le nombre croissant de publications dans ce domaine. Ainsi dans ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à trois molécules d'origine naturelles, la tanshinone IIA issue de la racine de Danshen, l'α-mangostine issue de l'extrait d'épicarpe de mangoustan pour des applications anticancéreuses et un photosensibilisateur issu d'une algue verte *Spirulina maxima* pour des applications en photothérapie dynamique (PDT).

L'activité anticancéreuse de ces trois molécules a été décrite dans la littérature, mais leur fort caractère hydrophobe et leur manque de sélectivité diminuent drastiquement leur potentialité entrainant parfois des effets secondaires indésirables. Afin d'améliorer l'efficacité de ces composés, une stratégie consiste à les véhiculer spécifiquement vers le tissu malade au moyen de nanoobjet comme les nanoparticules d'or qui présentent une toxicité limitée. Nous avons choisi d'orienter ce travail vers l'élaboration de nanoparticules d'or de taille comprise entre 30 et 200 nm qui permettent ainsi de véhiculer les principes actifs et de pénétrer les tumeurs par l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention). Ces nanoparticules ont été élaborées par une méthode simple à partir de sel d'or et de Polyéthylèneimine (PEI) ; polymère azoté qui permet à la fois de stabiliser les particules et de fixer des cyclodextrines qui vont encapsuler les molécules d'intérêt et améliorer la pénétration cellulaire. Tous ces complexes ont été caractérisés par DLS, MET et potentiel zêta. Enfin, l'activité biologique des complexes

finaux a été évaluée. Ainsi, des essais préliminaires *in vitro* sur des lignées cancéreuses prostatiques et colorectales ont été réalisés.

Chapitre 1 :
Introduction et généralités

Chapitre I. Généralités

I.1. Généralités sur la cellule

I.1.1. La structure de la cellule

Les cellules sont considérées comme la base de l'être vivant. Les êtres vivants sont construits soit par une cellule (unicellulaire) ou de nombreuses cellules (pluricellulaires).

Tous les êtres vivants, observés par notre œil, sont pluricellulaires. Un autre type de cellule, nommée procaryote n'existe que dans certains types de bactéries. Elles n'ont pas de noyau cellulaire. Les cellules eucaryotes au contraire possèdent un noyau contenant l'ADN et entouré d'une membrane. L'être humain est constitué de milliards de cellules eucaryotes. Les cellules ont différentes formes et différents caractères. Toutes ces cellules portent le même ADN et sont issues d'une même cellule originale « le zygote ». Elles portent forcément certaines fonctions et structures communes.

La cellule est la base (Figure 1), mais elle est aussi constituée par des parties (les organites) encore plus petites et très complexes. Les organites sont situées dans une « bulle » appelée membrane cellulaire (ou membrane plasmique). On retrouve le noyau, le cytoplasme, les ribosomes, les vésicules, les appareils de Golgi, les mitochondries, les vacuoles, les cytosols, les lysosomes et le centrosome.

L'élément majeur d'une cellule eucaryote est le noyau. Il contient l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique), ou l'information génétique est stockée et elle est très peu modifiée depuis la naissance du zygote. Le noyau est protégé par une double membrane (enveloppe nucléaire). Il existe certains pores nucléaires qui permettent des échanges nucléocytoplasmiques dans les deux sens. Les ARN messagers sont formés dans le noyau, traversent les pores et transportent les informations nécessaires au cytoplasme pour la synthèse de différentes protéines.

Les mitochondries jouent un rôle primordial dans les fonctions physiologiques de la cellule. Dans le cycle métabolique, les énergies viennent directement du glucose ou des acides gras en cas de pénurie de sucre. Le glucose dans le métabolisme de la mitochondrie conduit à la production d'ATP (adénosine-5′-triphosphate) qui constitue l'énergie nécessaire au fonctionnement de l'organisme. On peut considérer l'ATP comme une « monnaie d'énergie cellulaire» et la mitochondrie, « la source de monnaie ».

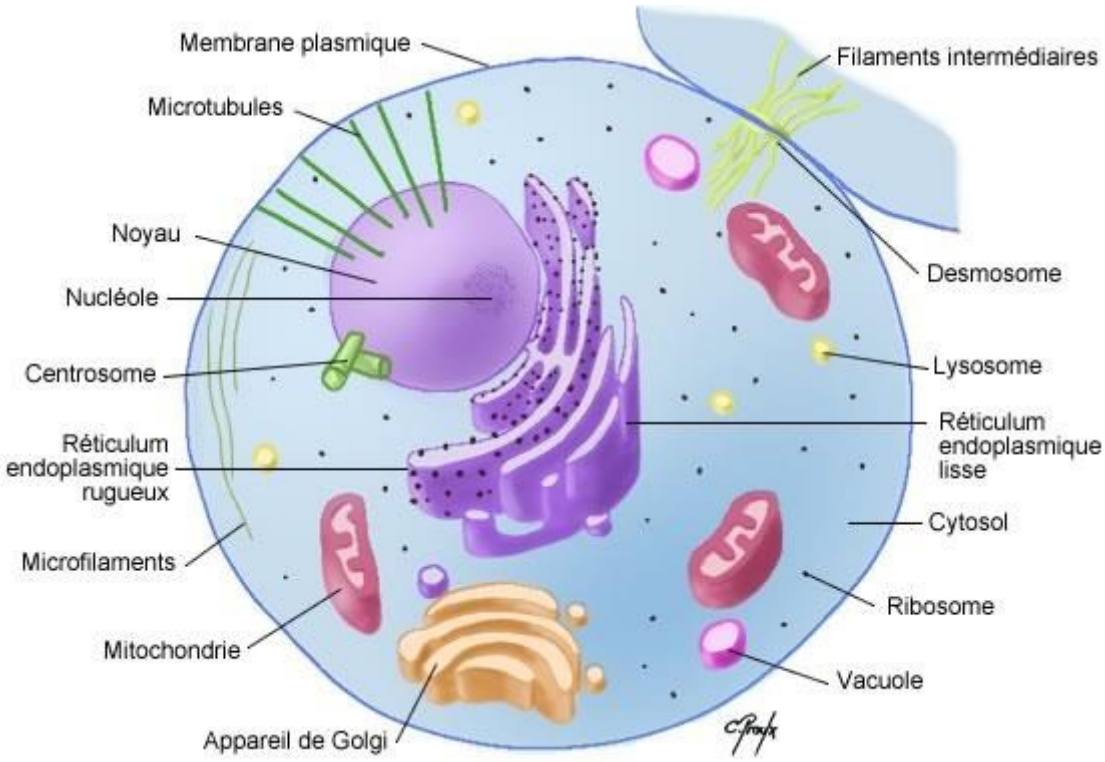


Figure 1 La structure de la cellule

(http://www.cours-pharmacie.com/biologie-cellulaire/cellules-procaryotes-et-cellules-eucaryotes.html)

I.1.1.1 Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire décrit toutes les étapes de la vie cellulaire. Il comprend 5 phases principales de la naissance à la division de la cellule (Figure 2).

1. Phase G0 : Les cellules-filles, dès la sortie de mitose, peuvent entrer en phase G0, stade de non division ou de « quiescence ». La plupart des cellules dans un organisme adulte sont en phase G0.
2. Phase G1 : c'est la phase ou la cellule croit normalement. La cellule synthétise les protéines aux fonctions normales, prépare les matériaux. La cellule s'agrandit jusqu'à une taille critique.
3. Phase S : l'ADN va être entièrement répliqué, grâce à l'ADN polymérase. Dans le chromosome, une chromatide forme deux centrosomes au centre. Les deux centrosomes formés vont s'écarter pour former les deux pôles.

4. Phase G2 : la phase G2 commence après la réplication de l'ADN. La cellule continuera à remplir ses fonctions. Pendant cette phase, les centrosomes se répliquent, ils permettront le bon déroulement de la mitose.
5. Phase M : elle est aussi appelée mitose. La cellule est finalement divisée en deux cellules filles identiques.

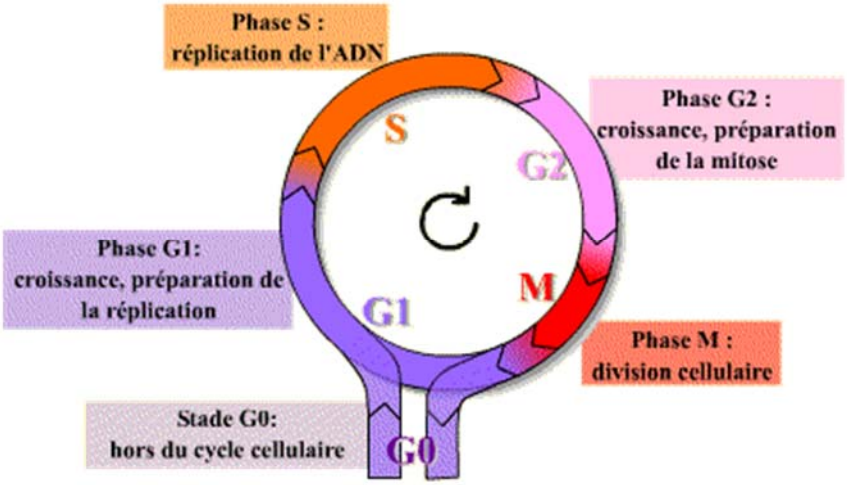


Figure 2 le cycle cellulaire (http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/cyclecellBM/)

I.1.1.2 La mort cellulaire : nécrose, apoptose et autophagie

La mort cellulaire est définie par l'arrêt des fonctions de la cellule et sa destruction. Principalement, il y a deux façons de procéder à la destruction de la cellule, l'apoptose et la nécrose. L'apoptose est aussi appelée « la mort programmée » et la nécrose appelée « la mort non-programmée ». En dehors de ces deux voies il existe l'autophagie qui est à la fois un processus de survie et une voie de mort programmée.

I.1.1.2.1. Nécrose

Le nécrose est une forme de mort cellulaire non-programmée dans la cellule vivante[1]. Elle se distingue de l'apoptose qui est une mort programmée (Figure 3), peu nocive. La nécrose est toujours néfaste. Elle échappe au contrôle de l'organisme et les cellules mortes par nécrose ne sont pas éliminées rapidement par la phagocytose. La destruction de la cellule par nécrose peut engendrer « en cascade » divers effets négatifs. La membrane cellulaire perd son intégralité. Les contenus cellulaires passent à l'extérieur de la cellule et provoquent une réponse inflammatoire dans l'environnement. Les macrophages ne peuvent ni localiser, ni phagocyter

[1] Mazloum-Ardakani M., Hosseinzadeh L., Khoshroo A., *J. Electroanal. Chem.*, **2015**, 757, 58-64.

les « pièces » cellulaires, ce qui aboutit à l'accumulation du tissu mort et des fragments cellulaires auprès du site.

Les causes de nécrose sont très variées. L'infection par des virus ou bactéries, cancer, toxines (venins, armes chimiques…), traumatisme (blessure, compression, brulure, gel…).

I.1.1.2.2. Apoptose

L'apoptose est un processus programmé génétiquement, et activé par un signal. Elle joue un rôle nécessaire à la survie de l'organisme pluricellulaire [2]. Elle n'induit pas de processus inflammatoire. Avant sa mort, la cellule émet un signal qui permettra la phagocytose par des globules blancs, notamment des macrophages. Les causes sont très variées, mais les principales sont suivantes (Figure 3):

- La survie de la cellule est contrôlée par des facteurs de croissance. La perte de ces signaux induit l'apoptose.
- Des dommages de l'ADN (par les rayons UV ou autres radiations) sont signalés. Ces signaux déclenchent l'apoptose. Ce cas se passe souvent sur les cellules potentiellement cancéreuses ou des cellules dysfonctionnelles. La cellule doit être éliminée sans dommage pour le tissu adjacent.
- Le système immunitaire peut donner des signaux qui déclenchent l'apoptose.
- Une apoptose rapide sera activée lorsque les cellules perdent le contact avec la matrice extracellulaire ou les cellules adjacentes. Ce phénomène est aussi appelé anoïkose.

Il y a trois voies possible dans le mécanisme apoptotique : intrinsèque, extrinsèque (Figure 3) et la voie Perforine/granzyme.

[2] Elmore S., *Toxicol. Pathol.*, **2007**, 35, 495-516.

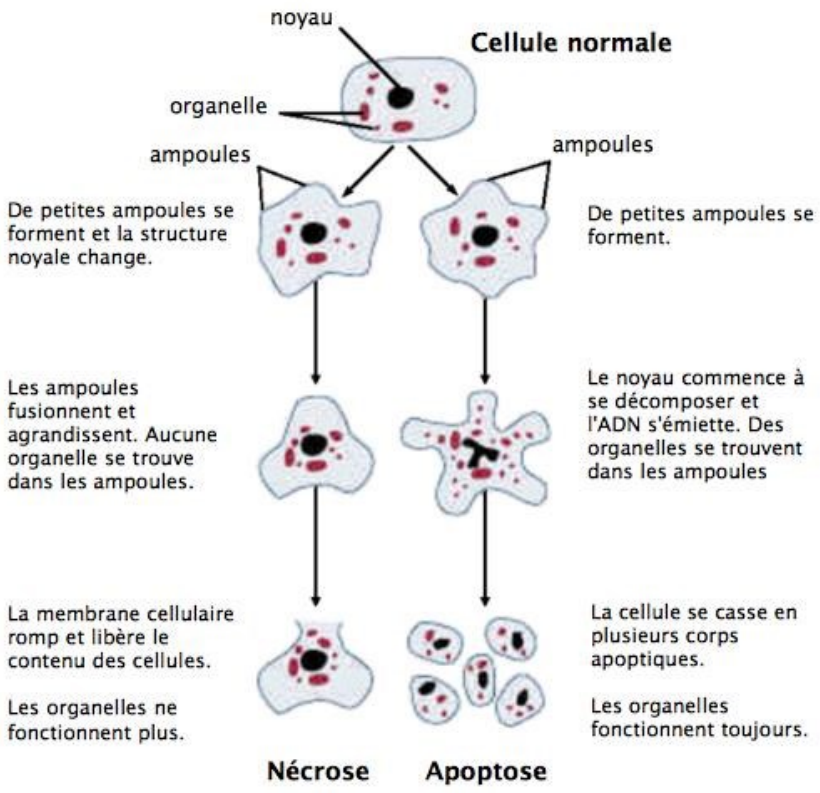


Figure 3 La mort de la cellule par la voie nécrose et par la voie apoptose

(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:N%C3%A9crose_apoptose.png?uselang=fr)

I.1.1.2.2.1. La voie extrinsèque :

La voie extrinsèque est déclenchée par un signal qui vient de l'extérieur de la cellule (Figure 4). Le récepteur Fas (APO-1, CD95) est l'un des récepteurs de « mort », le Fas est une protéine transmembranaire appartenant à la famille du récepteur du TNF (tumor Necrosis Factor). Il peut être activé soit par anti-Fas ou par le ligand de Fas (FasL), soit par des lymphocytes T. Le mécanisme par Fas induit le recrutement d'un complexe DISC (DeathInducing Signaling Complex) composé de molécules adaptatrices FADD (Fas Associated Death Domain) et des procaspases initiatrices -8 et -10 plus DED (Death Effector Domain). Une agrégation de 3 DISC permet un autoclivage des procaspases-8 et -10. Ensuite, Les caspases-8 et -10 sont libérées sous la forme de dimères et elles activent la procaspase-3. La procaspase-3 donne la caspase-3. Puis en cascade conduit à la phase d'exécution d'apoptose. La caspase-8 peut activer aussi la voie intrinsèque par le clivage de la protéine Bid (Figure 4).

I.1.1.2.2.2. La voie intrinsèque :

La voie intrinsèque, au contraire de la voie extrinsèque, est généralement induite par des signaux à intérieur de la cellule (Figure 4). Cette voie est appelée aussi la voie mitochondriale. Les causes sont très variées : radiations, toxines, hyperthermie, virus ou l'accumulation de ROS (espèces d'oxygène réactif) dans la mitochondrie. De plus, lorsque l'ADN est endommagé, la voie peut est déclenchée par une activation de p53. La protéine p53 est activée lorsqu'une anomalie est trouvée sur l'ADN. En passant par 3 phases (phase d'activation, phase de modification et phase de réponse), le cycle cellulaire est arrêté par p53 et la réparation de l'ADN est initiée. Lorsque l'ADN est correctement réparé, p53 retourne à son niveau normal (désactivée). Si ce n'est pas le cas, la cellule entre en apoptose.

La voie d'apoptose intrinsèque commence par une formation des pores (pores de transition de perméabilités mitochondriales (MPT)), au niveau de la membrane mitochondriale, par l'ouverture de PTPC (Permeability Transition Pore Complex). L'ouverture de PTPC provoque une perte de potentiel transmembranaire mitochondrial, induisant un gonflement de la matrice mitochondriale. Le métabolisme énergétique aérobie est bloqué. Les 2 familles de protéines proapoptotiques sont libérées dans le cytosol : cytochrome c, Smac/DIABLO. Le cytochrome se lie et active Apaf-1 et procaspase-9, conduissant à la formation de l'apoptosome. La complexation de la procaspase-9 active la caspase-9. La caspase-9 active la pro-caspase-3 et donne la caspase-3. L'apoptose passe à la phase d'exécution.

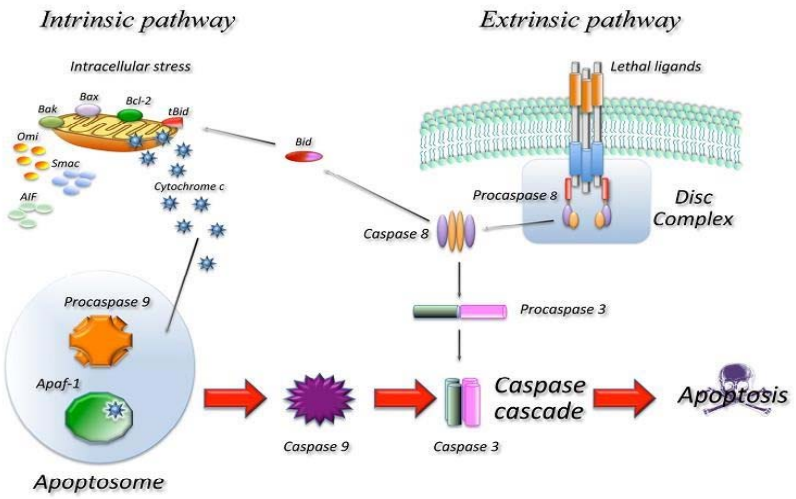


Figure 4 Schéma simplifié de la voie de mécanisme d'apoptose[3]

I.1.1.2.2.3. La voie Perforine/granzyme[4] :

[3] Favaloro B., Allocati N., Graziano V., Di iIlio C., De Laurenzi V., *AGING*, **2012**, 4, 330-349.
[4] Golstein P., *méd. Sci.*, **1995,** 11, 99-104.

Les cellules T peuvent induire l'apoptose *via* la voie extrinsèque par les sites FasL/Fas, mais aussi par une autre voie qui exerce leur effet cytotoxique aux cellules tumorales ou les cellules infectées par les virus. Cette voie implique une sécrétion de la perforine et de la granzyme. La perforine est une protéine cytolytique sécretée par les lymphocytes T $CD8^+$ et les lymphocytes NK. Lors de l'exocytose, la perforine s'insère dans la membrane plasmique de la cellule cible et forme un canal en se polymérisant. La perforine permet aux granzymes d'entrer dans les cibles, où l'enzyme active Bid et caspase-3, et induit la mise en apoptose de la cible.

I.1.1.2.2.4. La phase d'exécution :

La voie extrinsèque, la voie perforine/granzyme et la voie intrinsèque se rejoignent à étape d'activation de caspase-3. L'apoptose entre dans la phase d'exécution. Les caspase-3, -6 et -7 sont considérées comme des « caspases effectrices » qui clivent les substrats comme cytokeratines, PARP… ces étapes finalement induisent des changements morphologiques et biochimiques dans la cellule.

La caspase-3 est activée par les caspases initiatrices comme la caspase-8, -9 et -10. Elle joue un rôle très important (même le rôle central). Elle clive spécifiquement l'endonuléase CAD (Caspase Actived DNAse) dans une cellule non-apoptotique, complexée à son inibiteur (ICAD). La CAD ensuite dégrade les ADN chromosomiques et induit la condensation de la chromatine. La caspase-3 induit aussi une réorganisation du cytosquelette et la désintégration de la cellule. L'apoptose entre dans l'étape de cascade des caspases. Les protéines cytosoliques (keratine, gelsoline, actine) et les protéines nucléaires (lamine, actine) sont clivées et la cellule se scinde en plusieurs corps apoptotiques. Les corps apoptotiques sont finalement « éliminés » par les phagocytes.

I.1.1.2.3. Autophagie

L'autophagie désigne une dégradation d'une partie du cytoplasme de la cellule par ses propres lysosomes [5] . Ce processus permet de décomposer certaines organelles abimées (mitochondrie, Golgi…) et les recycler. Les organelles sont entourées puis enfermées dans les vacuoles (autophagosomes), ensuite fusionnées avec le lysosome (autolysosomes), et finalement

[5] Lin N.-Y., Beyer C., Gibel A., Kireva T., Scholtysek C., Uderhardt S., Munoz L. E., Dees C., Distler A., Wirtz S., Krönke G., Spencer B. Distler O., Schett G., Distler J. H. W., *Ann. Rheum. Dis.*, **2013**, 72, 761-768.

dégradées. Les « pièces » obtenues sont réutilisées pour réparer les autres organelles ou consommées comme des nutriments (Figure 5).

Lorsque la cellule a subi un dégât trop important, le mécanisme d'autophagie conduit à la mort cellulaire.

L'autophagie est souvent déclenchée par des conditions de stress (carence en nutriments, l'absence de facteurs de croissance…). La protéine mTOR (*mammalian target of rapamycin*) joue un rôle-clé dans l'intégration de ces signaux et la régulation de l'autophagie.
Lorsqu'elle est activée, mTor inhibe la voie de l'autophagie, et par conséquent, son inactivation (suite à une carence en nutriments, par exemple) permet de lever l'inhibition et donc de lancer l'autophagie.

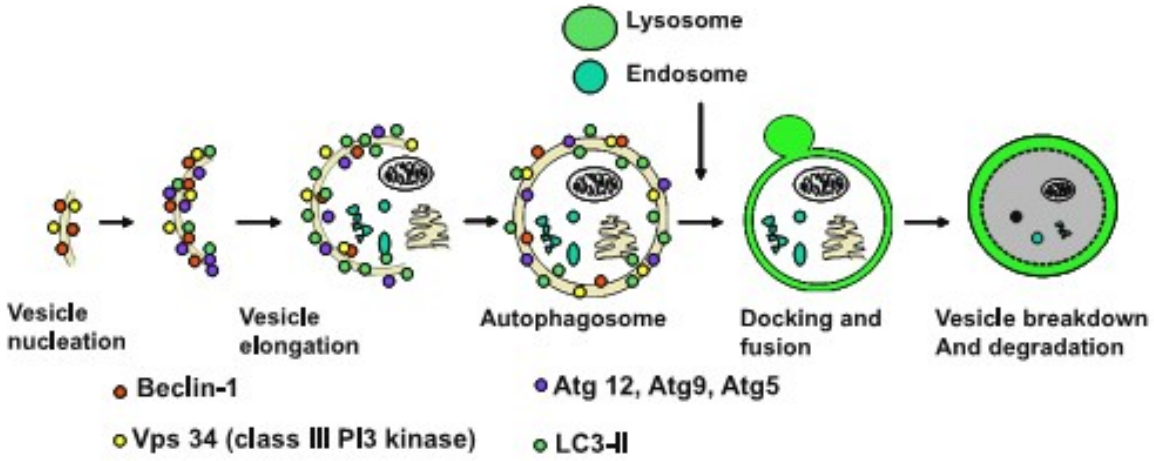


Figure 5 Mécanisme de l'autophagie (http://ajprenal.physiology.org/content/294/4/F777)

I.2. Le cancer

Le cancer est l'une des causes majeures de décès dans le monde. Lancée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'étude Globocan 2008 a enregistré 12,7 millions de nouveaux cas de cancer et 7,6 millions de décès dans le monde en 2008, soit environ 13% de la mortalité mondiale (IARC 2010). D'après les prédictions, la mortalité due au cancer va continuer

d'augmenter pour dépasser, selon les estimations, 13 millions de décès en 2030 dans le monde[6,7].

Le cancer est caractérisé par une prolifération anormalement importante des cellules au sein d'un tissu de l'organisme. Les cellules cancéreuses possèdent des propriétés communes : au contraire de la cellule saine, la prolifération des cellules n'est plus contrôlée par les hormones. La croissance et la division de la cellule est illimitée. Le phénomène d'apoptose a disparu. Des néo-vascularisations (angiogenèse) sont formées pour nourrir les cellules cancéreuses. Finalement, le phénomène de métastase, résulte de l'acquisition par les cellules, de la capacité à migrer vers les autres tissus et permettre au cancer de se développer dans tout l'organisme[8].

Au niveau cellulaire, pour les cellules saines, la capacité de différenciation et de mort cellulaire sont inscrites dans les gènes et sont contrôlées par différentes hormones. Sous certaines conditions extérieures, par exemple pendant la duplication d'ADN de la cellule, l'ADN reproduit est différent de son origine. La modification mineure d'ADN est appelée mutation génétique. La plupart du temps, la mutation active une réparation par les protéines réparatrices. Mais parfois, la mutation est conservée car le système de contrôle est défectueux[8]. Le phénomène de la mutation est 100% naturel et normal. De plus, la mutation est à l'origine de l'évolution de l'organisme et permet l'évolution d'une biodiversité. Mais, parfois, la mutation conduit à des cellules anormales et malignes, hors contrôle et peut finalement induire la mort de l'organisme. Ce processus est nommé carcinogenèse[10]. Il existe plusieurs étapes de mutations, et finalement trois caractères essentiels montrant que la cellule est devenue cancéreuse. Tout d'abord, le régulateur de prolifération devient hyperactif. Puis, les gènes réparateurs d'ADN sont désactivés. Et enfin, les gènes limitant de replication de l'ADN sont inhibés. La cellule cancéreuse n'est plus coordonnée avec les signaux biologiques et perd sa capacité de différenciation (Figure 6).

---

[6] Eisenkop S. M., Spirtos N. M., Lin W.-C.M., *Gynecol. Oncol.*, **2006**, 103, 329-335.
[7] Vergote I., Amant F., Kristensen G., Ehlen T., Reed N. S., Casado A., *Eur. J. Cancer*, **2011**, 47, supplement 3: S88-S92. [8] Hanahan D., Weinberg R. A., *Cell*, **2000**, 100, 57–70.
[8] Sonnenschein C., Soto A. M., *Seminars in Cancer Biology*, **2008**, 18, 372-377. [10] Bergers G., Benjamin L. E., *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, 3, 401 -410.

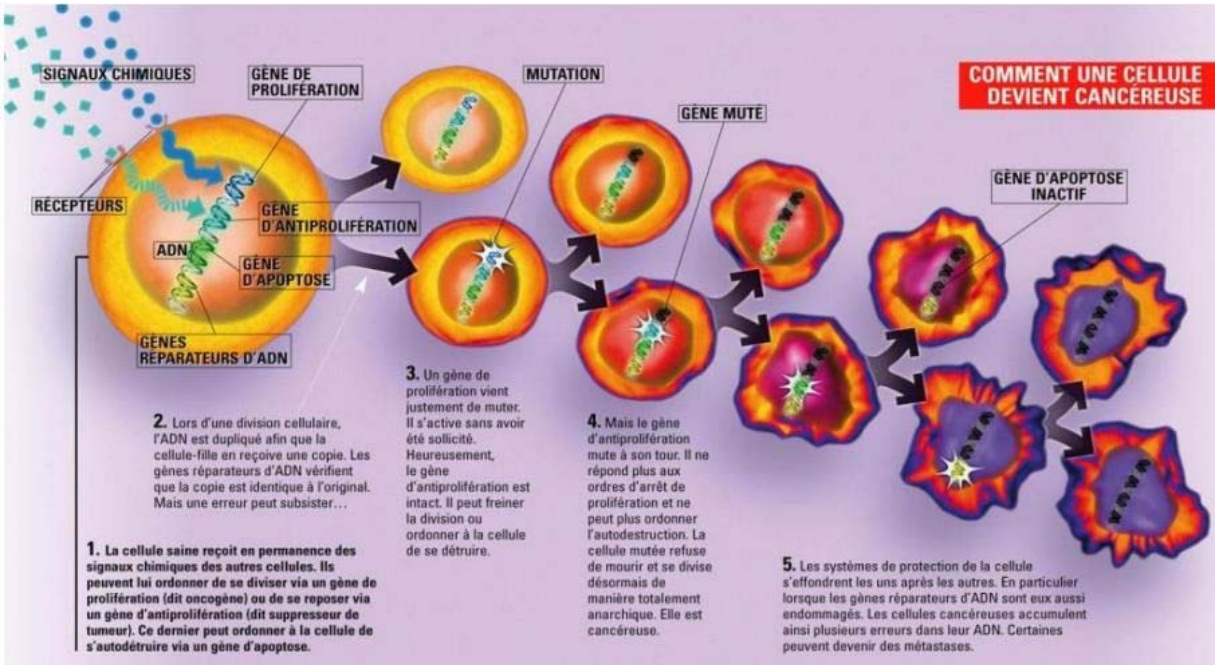


Figure 6 Mécanisme de carcinogenèse (http://tpe-cancerogenese.blogspot.com)

La dernière phase est appelée métastase. Des cellules sont "détachées" du tissu tumoral. Elles migrent vers différents organes, détruisent ou transforment les cellules saines et développent une ou plusieurs nouvelles tumeurs. Après cette étape, le patient devient très faible et le traitement devient très difficile[9]. Une tumeur ne peut pas dépasser la taille 2-3 mm^3 sans développer de nouveaux vaisseaux. Le développement de la néo-vascularisation est appelé angiogenèse. Ce phénomène concerne les étapes suivantes:

- la tumeur est stressée par hypoxie.
- le facteur de croissance pro-angiogenèse (VEGF) est libéré par les cellules endothéliales.
- la stimulation des cellules endothéliales libère l'enzyme pour détruire la matrice extracellulaire, comme l'urokinase, la laminine et le collagène IV.

L'angiogenèse peut être considérée comme un talon d'Achille du cancer[9] et le ciblage de la *neo*-vascularisation peuvent apporter des avantages suivants:

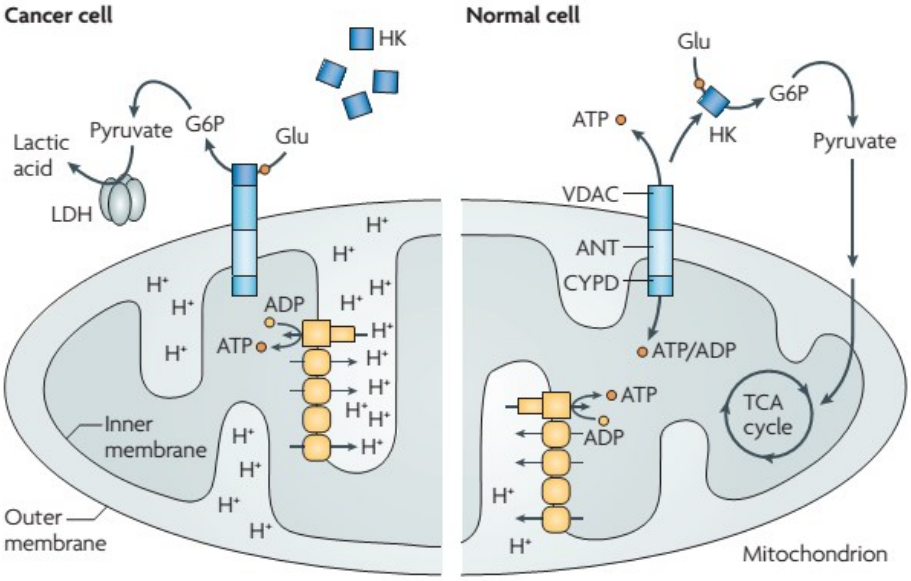
- L'angiogenèse qui est une phase préliminaire, la lutte produira moins d'effets secondaires.
- Le traitement ne devrait pas entrainer de résistances car les cellules endothéliales n'ayant pas d'instabilités génétiques contrairement aux cellules tumorales.

[9] Yancopoulos G. D., Davis S., Gale N. W., Rudge J. S., Wiegand S. J., Holash *J. Nature*, **2000**, 407, 242248.

- Les principes actifs visant les *neo*-vaisseaux peuvent accéder directement à la tumeur.
- La taille des vaisseaux de la *neo*-vascularisation (500nm) est plus large que le vaisseau capillaire (<20nm) et ils présentent une porosité plus importante.

I.2.1. Métabolisme de la cellule cancéreuse

Dans des conditions normales de pression partielle d'oxygène, les cellules saines empruntent la voie d'oxydation phosphorylante pour la production d'ATP. Les cellules cancéreuses montrent une glycolyse renforcée en dépit de la présence d'oxygène[10,11] (Figure 7). De ce fait, le flux d'électron à travers la chaine respiratoire est très inférieur dans les cellules cancéreuses par rapport à celui les cellules saines. La production d'ATP est réduite, par contre, la majorité du glucose (Glu) est transformée en acide lactique malgré la présence d'oxygène. On l'appelle la glycolyse aérobie. Ceci est avantageux pour les cellules cancéreuses car cela leur permet de survivre quelle que soit la pression partielle d'oxygène.



HK : Hexokinase ; LDH : Lactate déhydrogénase ; CYPD : Cylophiline D ; VDAC : Voltage-Dependant Anions Channel ; ANT : Translocateur de Nucléotides à Adénine

Figure 7 Les différences de mécanisme entre cellules normales et les cellules cancéreuses [12]

De plus, tandis que dans les cellules normales, le pyruvate (produit par la glycolyse) est importé dans la mitochondrie et rentre dans le cycle TCA (Acide TriCarboxyliques) pour la production

[10] Hamanaka R. B., Chandel N. S., *J. Exp. Med.*, **2012**, 209, 211-215.

[11] Brahimi-Horn M. C., Chich J., Pouyssegur J., *Curr. Opin. Cell Biol.* **2007**, 19, 223-229

[12] Fulda S., Galluzzi L., Kroemer G., *Nature reviews*, **2010**, 9, 447.

d'ATP. Dans les cellules cancéreuses, il est préférentiellement converti en lactate, puis acide lactique, et exporté à l'extérieur de la cellule ou il acidifie le milieu extracellulaire (Figure 7)[14].

D'autre part, le cycle TCA étant très perturbé. Il produit une grande quantité de ROS (espèce d'oxygène réactive) [13]. Ce taux élevé de ROS favorise la formation de la cellule cancéreuse car il induit les mutations de l'ADN et l'adaptation rapide des cellules cancéreuses avec conditions du milieu. Cependant, ce taux doit être régulé finement par le système glutathion/NADH pour ne pas dépasser un certain taux qui serait létal pour.

Des cibles potentielles pour la lutte anticancéreuse seront donc soit d'augmenter la production de ROS dans la mitochondrie, ou soit de diminuer la production de glutathion.

I.2.2. Traitement du cancer

La lutte anticancéreuse fait souvent appel à plusieurs possibilités de traitement, dont la plus utilisée est la chirurgie. La radiothérapie ciblée est aussi une option. Cependant, cette dernière doit être couplée à une détection précoce des zones malades afin d'éviter la dissémination des cellules cancéreuses (métastases). La chimiothérapie fait également partie de l'arsenal thérapeutique pour la lutte anticancéreuse. Elle peut être utilisée seule ou associée à l'acte chirurgical ou à la radiothérapie. Cependant ce traitement, bien que très efficace, provoque des effets secondaires importants et actuellement de nombreux travaux tendent à réduire ces effets tout en confortant son efficacité en particulier en augmentant la sélectivité des molécules thérapeutiques utilisées pour la chimiothérapie vis-à-vis des cellules cancéreuses. D'autres approches alternatives sont également utilisées afin de traiter des cancers spécifiques (tumeurs solides), comme la photothérapie anticancéreuse.

I.2.2.1 Chimiothérapie

La chimiothérapie est une méthode du traitement de cancer qui consiste à utiliser des substances chimiques (médicament anticancéreux). Les médicaments utilisés sont cytotoxiques, afin de tuer les cellules tumorales. Mais ils sont également toxiques pour les cellules saines se divisant rapidement car ils ciblent surtout la réplication de l'ADN et les phases de la division cellulaire. Les effets secondaires indésirables sont ainsi souvent liés à ce phénomène.

---

[13] Devasagayam T.P., Tilak J.C., Boloor K.K., Sane K.S., Ghaskadbi S.S., Lele R.D., *J Assoc. Physicians India.* **2004**, 52, 794-804.

Les effets secondaires (ou effets indésirables) du traitement sont reconnus et ils dépendent de chaque médicament utilisé. Les cellules qui se divisent très vite sont souvent les plus touchées, comme les cellules sanguines, les globules blancs ou les cellules de l'appareil digestif. Les effets secondaires le plus fréquents sont :

- L'immunosuppression : tous les traitements peuvent induire la dépression du système immunitaire, en diminuant le nombre de globules blancs.
- L'alopécie (perte des cheveux) : ce phénomène est souvent temporaire. Ainsi après l'arrêt du traitement, on constate une reprise de la pousse des cheveux.
- Le fatigue : pendant le traitement, les globules rouges sont touchés également par le médicament et induisent l'anémie. La fatigue est le premier symptôme de ce phénomène.
- Les autres : infertilité, nausées, vomissements

Afin de limiter ces problèmes, les chimistes cherchent à développer de nouvelles stratégies pour que le médicament reconnaisse spécifiquement les cellules cancéreuses. Cette méthode est aussi appelée chimiothérapie ciblée.

I.2.3. Photothérapie dynamique (PDT)

La photothérapie dynamique [14] est une technique anticancéreuse alternative utilisée depuis les années 1980[15]. Elle consiste à utiliser un photosensibilisateur (PS)[16], qui est inerte en absence de lumière, mais cytotoxique par activation lumineuse afin de traiter les zones tumorales. Le principe de la photothérapie dynamique (Figure 8) est basé sur la destruction sélective des cellules tumorales par l'action combinée d'un photosensibilisateur et d'une lumière focalisée de longueur d'onde appropriée. La première étape en PDT consiste à introduire par voie intraveineuse l'agent photosensibilisateur au sein d'un tissu présentant une tumeur. L'illumination de ce tissu enrichi en photosensibilisateur induit des réactions chimiques oxydatives entrainant des altérations cellulaires irréversibles tout en préservant les tissus sains dépourvus de photosensibilisateur.

---

[14] Dougherty T. J., Gomer C. J., Henderson B. W., Jori G., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Peng Q., *J. Natl. Cancer Inst.*, **1998**, 90, 889-905.
[15] Dougherty T.J., *Plenum Press New York*, **1983**, 3.
[16] Allison R. R., Downie G. H., Cuenca R., Hu X., Childs C. J. H., Sibata C. H., *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **2004**, 1, 27-42.

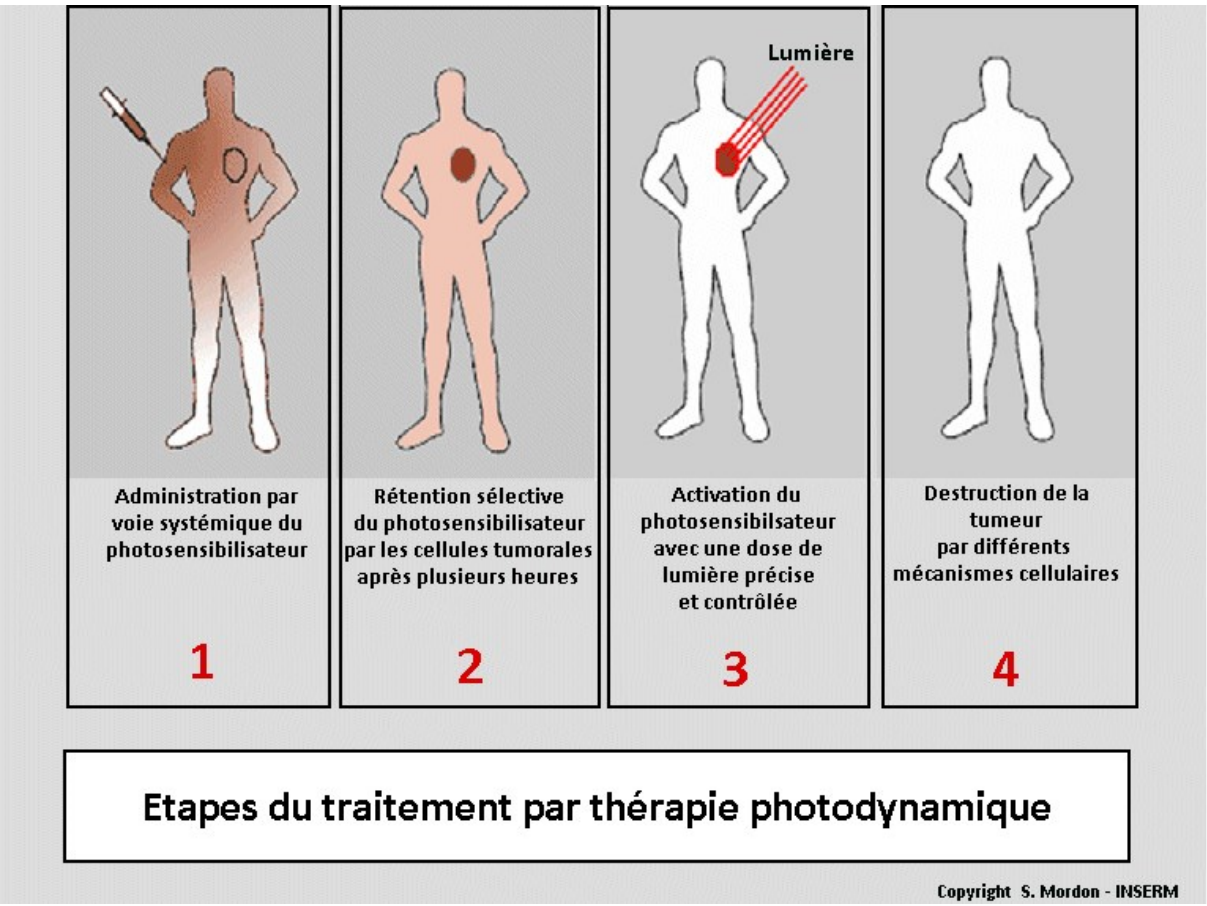


Figure 8 Principe de la PDT

I.2.3.1 Photosensibilisateurs (PS)

De très nombreuses molécules sont photosensibles, mais en PDT, ce sont principalement les photosensibilisateurs de type tétrapyrroles (Figure 9) qui sont utilisés. Cette famille est constituée essentiellement de porphyrines, chlorines (ou bactériochlorines) et phthalocyanines[17].

[17] Nyman E.S., Hynninen P.H., *J. Photochem. Photobiol. B.*, **2004**, 73, 1-28.

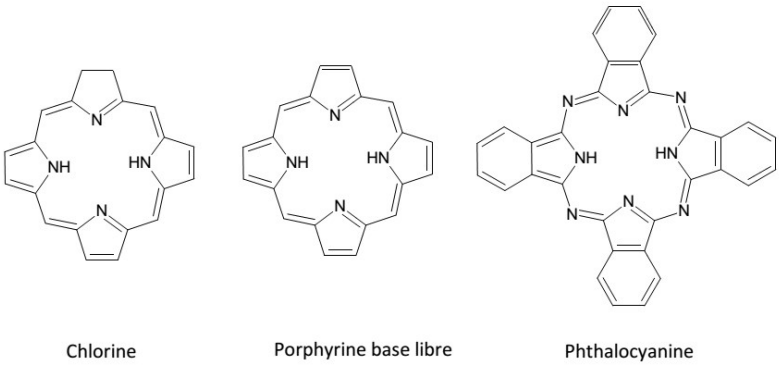


Figure 9 Les photosensibilisateurs tétrapyrroliques

Le mécanisme de la photosensibilisation peut être résumé par le diagramme de PerrinJablonski[18] (Figure 10).

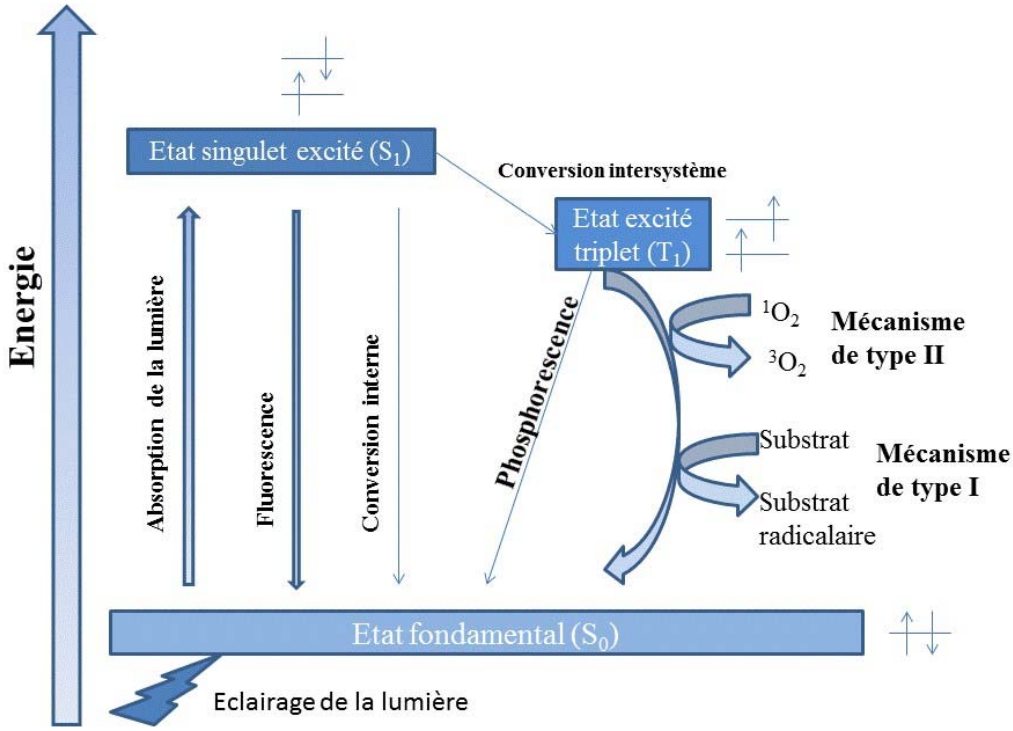


Figure 10 Diagramme de Perrin-Jablonski

Suite à l'éclairage par une onde électromagnétique (U.V, lumière visible) d'une molécule, un électron passe de l'état fondamental à l'état singulet excité. Ce n'est pas un état stable et il n'existe que durant moins d'une nanoseconde. Pour retourner à l'état fondamental,

[18] Jablonski A., *Nature*, **1933**, 10, 839-840.

il y a plusieurs voies. Pour la plupart des molécules, la voie de fluorescence et conversion interne sont les plus fréquentes. L'énergie absorbée est transformée en chaleur ou en lumière.

La particularité du PS est qu'il est capable de passer à un état excité triplet par une transition appelée conversion intersystème (CIS). C'est un état plus stable et capable de stocker l'énergie plus d'une microseconde. Cette situation est possible lorsque l'électron change son état de spin. Ainsi au cours de cette conversion, une partie de l'énergie est libérée dans le milieu. Il existe alors trois voies pour retourner à l'état fondamental. La première consiste à émettre de la phosphorescence. Comme la fluorescence, l'énergie d'excitation est transformée en une émission de la lumière. La seconde voie conduit à la formation d'espèces radicalaires.
Elle est aussi appelée mécanisme de type I. L'énergie d'excitation est utilisée pour dissocier une liaison chimique et former deux radicaux, qui ne sont pas stables. Dans ce cas un radical chimiquement très réactif, réagit spontanément avec les molécules environnantes. La troisième voie, appelée mécanisme de type II, fait intervenir une molécule de dioxygène. Le PS donne alors son énergie en excès à une molécule d'oxygène et retourne à son état fondamental. L'oxygène passe alors à l'état singulet qui est une espèce très réactive. L'oxygène singulet étant peu stable (durée de vie très courte, <1 µs), il réagit très rapidement avec toutes les molécules environnantes (les protéines, l'ADN, les lipides membranaires).
L'ensemble des radicaux et des espèces réactives oxygénées est appelé dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Ils peuvent être très « destructifs », aussi vis-à-vis des PS eux-mêmes. On observe alors une perte de l'effet avec le temps, qui signifie une dégradation du PS par la lumière (photoblanchiment). Les porphyrines (cycle tétrapyrrolique) conduiront principalement à la voie du mécanisme de type II. L'oxygène singulet est donc très toxique vis-à-vis des cellules et induit finalement la mort cellulaire.

L'histoire de l'utilisation de la lumière en médicine remonte à l'antiquité. En effet, le peuple égyptien, il y a 3000 ans, traitait déjà des personnes atteintes du Vitiligo (maladie de la peau caractérisée par une disparition des mélanocytes de l'épiderme) grâce à la photothérapie. Les Egyptiens appliquaient des feuilles écrasées de persil (plante contenant des psoralènes) sur la zone à traiter, et après l'exposition solaire, il en résultait une photosensibilisation des zones cutanées concernées. Ce traitement aboutissait ensuite à une repigmentation des taches blanches. Au début du XXème siècle, grâce au travail de Raab[19] sur l'action de l'acridine et de la lumière sur *Paramecium caudatum,* le principe de la photothérapie est introduit. Un peu plus

[19] Raab O., *Z. Biol*, **1900**, 39, 524-546.

tard, Von Tappeiner[20] démontra le rôle de l'oxygène dans le mécanisme. On parlera alors de photothérapie dynamique. En 1924, Policard[21] a découvert, en éclairant avec une lampe à ultraviolet, qu'une tumeur maligne émet une lumière rouge qui est caractéristique de la présence des porphyrines endogènes. Il s'agit ainsi de la première observation de l'accumulation sélective de PS dans les tumeurs. Puis en 1942, Auler et Banzer [22] notèrent que l'injection d'hématoporphyrine conduisait à son accumulation sélective dans les tumeurs transplantées à des rats. De plus, ils avaient observé que l'exposition de ces tumeurs concentrées en porphyrine à une lumière générée par une lampe à quartz provoquait leur nécrose. En 1948, Figge et Weiland[23] ont confirmé l'affinité de l'hématoporphyrine pour les tissus néoplasiques en mettant en évidence une fluorescence émise au niveau des tumeurs après excitation par une lampe à ultraviolet. En 1954, Rasmüssen-Taxdal [24] confirma chez l'homme l'accumulation de l'hématoporphyrine dans les tumeurs malignes et les tissus lymphatiques. Lipson et coll.[25] ont cherché à optimiser la sélectivité des porphyrines dans les tumeurs. Ils ont proposé un dérivé de l'hématoporphyrine appelé "hématoporphyrine dérivée"(HpD), préparé en traitant l'hématoporphyrine commerciale par un mélange d'acide acétique et d'acide sulfurique, suivi par une hydrolyse alcaline. Ce n'est que dans les années soixante-dix, que la photothérapie dynamique prend son essor à la fois expérimentalement et cliniquement grâce aux travaux de Dougherty et coll.[26].

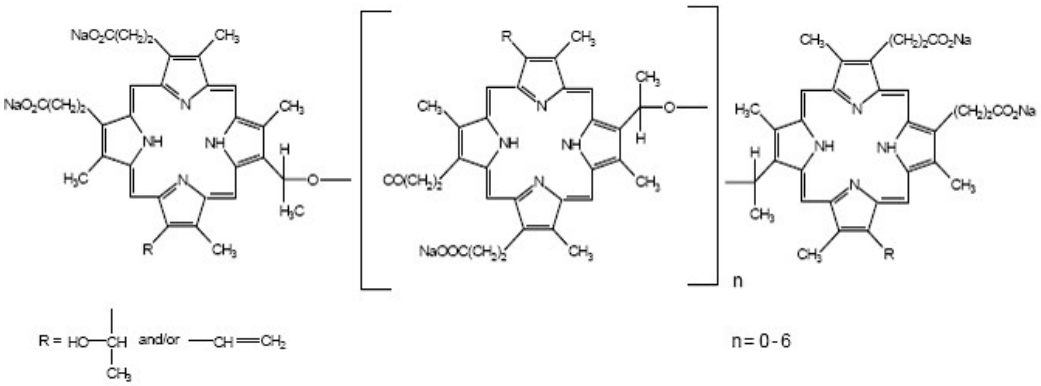


Figure 11 Fraction active de photofrin®

[20] Tappeiner V. H., Jesionek A., *Muench. Med. Wochschr.,* **1903**, 50, 2042-2044.
[21] Policard A., *Soc. Biol.*, **1924**, 91, 1422-1423.
[22] Auler H., Banzer G., *Z. Krebsforschung*, **1942**, 53, 65-68.
[23] Figge F. H. J., Weiland G.S., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1948**, 68, 640-641.
[24] Rasmüssen-Taxdall D., Ward G., Figge F.H.J., *Cancer*, **1955**, 8, 78-81.
[25] Lipson R. L., Ednard J., Baldes D., Olsen A.M. , *J. Natl. Cancer Inst.*, **1961**, 26,1-11.
[26] Dougherty T.J., Grindey G., *J. Natl. Cancer Inst.*, **1975**, 55, 115-121.

En 1983, la fraction active de l'HpD responsable des propriétés photosensibilisantes de ce mélange complexe initial a été identifiée par Dougherty[17] et commercialisée sous le nom photofrin® (Figure 11). Un mélange des oligomères de l'hématoporphyrine[27] issus d'extraits du sang d'animal. En 1987, le photofrin® est autorisé et mis sur le marché. Cependant il possède plusieurs inconvénients :

- la structure précise n'est toujours pas bien définie.
- il n'a qu'une très faible absorption dans la zone de la lumière rouge. o le métabolisme élimine très lentement le photofrin®.
- Ces inconvénients désavantagent l'utilisation de la PDT dans beaucoup de cas.

Pour améliorer l'efficacité de la PDT. Des nouveaux PS, dits de 2ème génération, ont été synthétisés. Ils gardent principalement la même structure, qui donne la capacité d'absorption de la lumière, dérivent des PS tétrapyrroliques. Ces sont des molécules synthétiques et leurs structures sont parfaitement définies. Ces molécules sont commercialisées sous les noms de Foscan®, Visudyne®, Tookad® (Figure 12), par exemple.

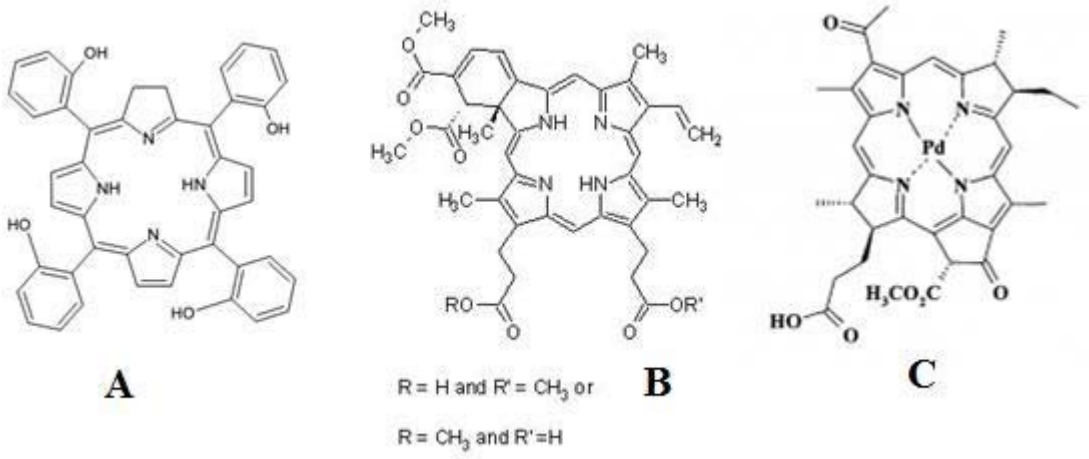


Figure 12 A) Foscan; B) Visudyne; C) Tookad

La 2ème génération concerne des molécules dont la structure est bien définie. Elles sont plus faciles à être éliminées. Cependant, ces PS de deuxième génération présentent aussi des

[27] Salet C., *Biochimie*, **1986**, 68, 865-868.

inconvénients. Comme les molécules ont perdu la sélectivité entre les tissus sains et les tissus tumoraux. Il y a deux conséquences :

1. peu de PS atteignent les cellules tumorales, et peuvent entrainer des effets secondaires.
2. le patient doit être gardé à l'abri, éviter tout éclairage des zones non-tumorales.

Actuellement, la 3ème génération est en cours de développement en partant du concept de « balle magique »[28], c'est à dire que le médicament est amené et véhiculé par un complexe appelé vecteur. Ce vecteur protège le médicament, franchit les barrières physiologiques et libère le médicament au site réactif. Dans notre cas, le vecteur amène le PS dans le tissu tumoral, pénètre dans les cellules tumorales et conduit le PS vers l'ADN ou les mitochondries.

I.3. Vectorisation

Les molécules utilisées en chimiothérapie ciblée sont chimiquement modifiées pour améliorer leur affinité vis-à-vis de la tumeur ou des cellules cancéreuses. Elles sont souvent liées avec une partie de reconnaissance (*e.g* polyamines, peptides ou nanoobjet). Cette partie est appelée vecteur, qui véhicule le principe actif vers la tumeur et/ou vers les cellules cancéreuses. Les vecteurs sont très variés selon les différents besoins. On peut citer les liposomes[29], les micelles de polymère[30], les protéines[31] ou les nanoparticules qui sont ellesmêmes de plusieurs sortes. Idéalement un vecteur doit être non toxique, biocompatible, biodégradable et il ne doit pas activer les défenses immunitaires. La vectorisation des médicaments peut être utilisée pour traiter de nombreuses maladies, comme les maladies cardio-vasculaires ou le diabète. Cependant, l'application la plus importante est le traitement des tumeurs cancéreuses.

---

[28] Aneja P., Rahman M., Beg S., Aneja S., Dhingra V., Chugh R., *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, **2014**, 9, 121-135.

[29] Maruyama K., Ishida O., Takizawa T., Moribe K., Adv. *Drug Delivery Rev*., **1999**, 40, 89-102.

[30] Couvreur P., Vauthier C., *Pharm. Res*., **2006**, 23, 1417-1450.

[31] Embleton M. J., Rowland G. F., Simmonds R. G., Jacobs E., Mardsen C. H., Baldwin R. W., *Br. J. Cancer*, **1983**, 43-49.

I.3.1. Ciblage actif

Le ciblage actif est basé sur l'interaction entre un ligand approprié et le récepteur des cellules tumorales. Les récepteurs ciblés sont surexprimés sur la membrane cellulaire de la tumeur. Le ligand est greffé sur le principe actif, l'interaction entre le ligand et le récepteur favorise la reconnaissance de la cellule tumorale et facilite l'internalisation. Ainsi, les principes actifs ne se concentrent que dans les cellules tumorales.

Le ligand, autrement dit vecteur, est lié de façon ionique ou covalente au principe actif. Le vecteur est souvent une biomolécule hydrophile. Il permet aussi d'améliorer la biocompatibilité et biodisponibilité du principe actif, souvent hydrophobe.

Quelques exemples non-exhaustifs sont trouvés dans la littérature et représentés cidessous :

- **Acide folique**[32]: aussi appelé vitamine B9 (Figure 13). Il est aussi le précurseur d'une coenzyme qui intervient dans la synthèse des bases nucléiques. Les cellules en reproduction rapide ont des besoins énormes de l'acide folique. De très nombreuses lignées de cancer (*e.g* HT29) surexpriment les récepteurs sur leurs membranes.

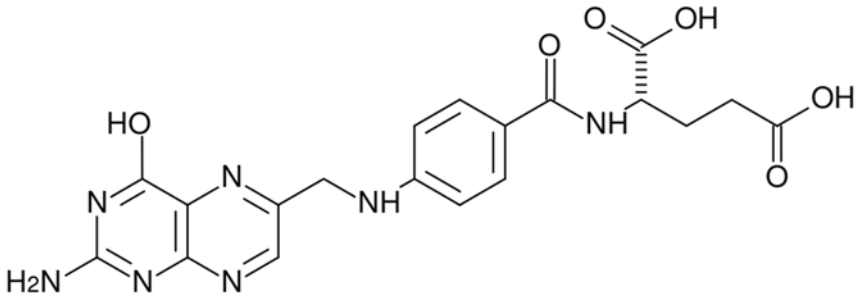


Figure 13 La structure de l'acide folique

- **Polyamines**: la spermidine et la spermine sont des facteurs de croissance qui jouent un rôle très important dans la prolifération de la cellule[33]. La spermidine et la spermine ont été découvertes, en 1678, par van Leeuwenhoek qui les a extraites du liquide séminal humain. Il fallut cependant attendre 1924 pour que leurs structures chimiques soient clairement établies[34]. La spermidine et spermine interviennent surtout au cours des

[32] Sun C., Sze R., Zhang M.Q., *J. Biomed. Mater. Res. PartA*, **2006**, 78A, 550–557.
[33] Pegg A. E., *Cancer Res.*, **1988**, 48, 759-774.
[34] Wallace H. M., Fraser A. V., Hughes A., *Biochem. J.*, **2003**, 376, 1-14. [37]
Bachrach U., *Amino Acids*, **2004**, 26, 307-309.

étapes de prolifération et de différenciation cellulaires[37]. Dans l'organisme, à pH physiologique, les polyamines se protonnent et possèdent ainsi des caractéristiques semblables aux cations inorganiques tels que Ca^{2+} et Mg^{2+}. Cependant, contrairement à ces ions, les charges positives sont distribuées le long de la chaîne aliphatique leur permettant d'interagir spécifiquement avec les composés biologiques chargés négativement. Ainsi les polyamines sont susceptibles de condenser l'ADN. En effet l'agrégation ou la condensation du matériel génétique est important dans la transmission et la protection de l'information génétique[35]. L'ARN est également un site de fixation des polyamines. Celles-ci stabilisent, par exemple, les acides ribonucléiques de transfert (ARNt), qui interviennent lors de la traduction du génome [36]. Au sein du laboratoire, les Docteurs F. Lamarche [37] et G. Garcia [38] ont travaillé particulièrement sur la vectorisation de photosensibilisateur au moyen de la spermine et de la spermidine (Figure 14).

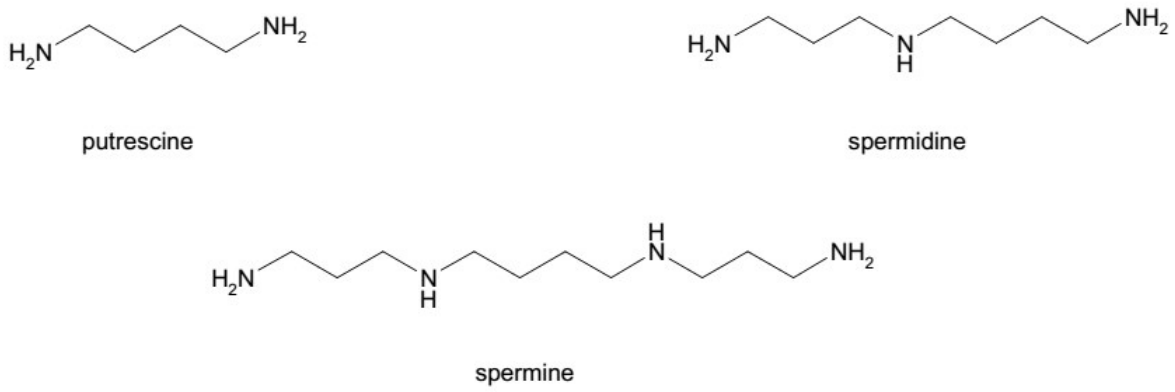


Figure 14 Trois polyamines naturelles

- **Peptide ATWLPPR et RGD**: le tissu tumoral développe des neo-vaisseaux grâce à des facteurs de croissance VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Les récepteurs surexprimés à la surface de la membrane sont VEGFR-1 et VEGFR-2. Les deux ont une

[35] Deng H., Bloomfield V. A., *Biophys. J.*, **1999**, 77, 1556-1561.
[36] Fernandez C. O., Buldain G. , Samejima K., *Biochim. Biophy. Acta*, **2000**, 1476, 324-330.
[37] François Lamarche « Synthèse et Évaluation Biologique de Porphyrines-Polyamines en vue de leur Application en Photothérapie Dynamique des Cancers » **2004,** thèse N°9500297, thèse Université de Limoges France.
[38] Guillaume Garcia « Nouveaux macrocycles tétrapyrroliques et dérivés vectorisables en photothérapie – Porphyrines et chlorines polyaminées et trimères » **2006**, Thèse N° 44-2006, thèse Université de Limoges France.

très bonne affinité avec la séquence de peptide ATWLPPR (AlanineThréonine-tryptophane-Leucine-Proline-Proline-Arginine) (Figure 15). Le peptide RGD est également un autre substituant greffé sur le macrocycle qui cible spécifiquement les intégrines $\alpha v\beta_3$ des néo-vaisseaux formés à la périphérie des tumeurs[39].

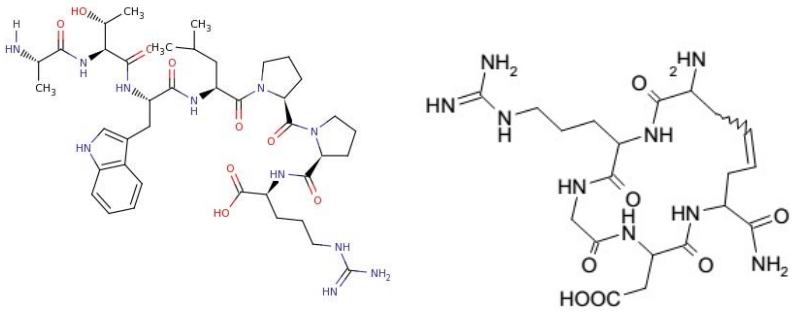


Figure 15 Le peptide ATWLPPR (gauche) et le RGD (droite)

- **Les sucres (oses, saccharides)**: les sucres sont les molécules essentielles au métabolisme respiratoire[40]. Elles sont la source de l'énergie de la cellule, utilisées pour la synthèse de l'ATP, "monnaie" énergétique du vivant. Ils sont également reconnus par des récepteurs spécifiques, des lectines, en surface des cellules cancéreuses. Les photosensibilisateurs vectorisées par des sucres sont étudiés au sein du laboratoire[41] (Figure 16).

[39] Chaleix V., Sol V., Guilloton M., Granet R., Krausz P., *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 5295-5299.
[40] Gottlieb E., *Nat. Cell Biol.*, **2011**, 13, 195–197.
[41] Mbakidi J. P., Drogat N., Granet R., Ouk T.-S., Ratinaud M.-H., Rivière E., Verdier M., Sol V., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, 23, 2486-2490.

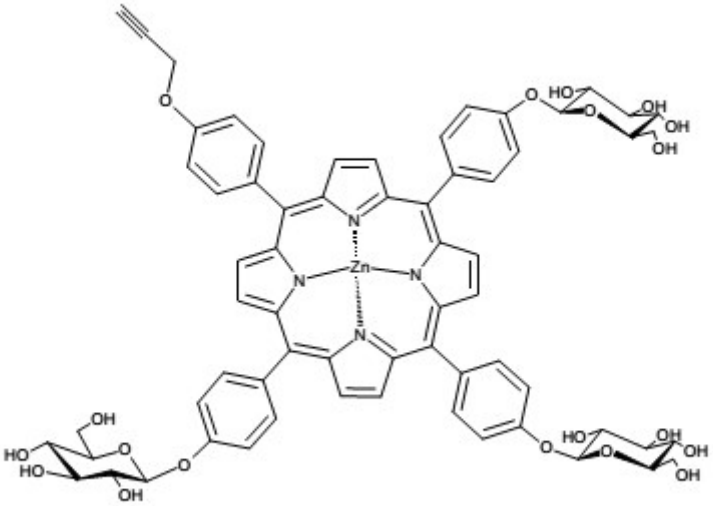


Figure 16 Porphyrine triglucosylées

- **Anticorps monoclonaux (MAb):** une autre option afin de s'affranchir des problèmes de biodistribution et biodisponibilité est de coupler les principes actifs et les anticorps qui peuvent orienter vers les antigènes tumoraux (Figure 17) [42] . La technologie d'hybridome développée en 1975 permet de produire des anticorps spécifiques à un antigène[43]. Un antigène idéal, dans le cas de ciblage, est particulièrement surexprimé par toutes les cellules tumorales et pas du tout par les autres cellules. Actuellement, ce cas est seulement trouvé sur les tumeurs induites expérimentalement. Jusqu'à 2002, la FDA (Food and Drug Administration of USA) autorise 11 molécules conjuguées avec MAb. Plus de 400 médicaments porteurs de MAb sont en phase d'essais cliniques[44].

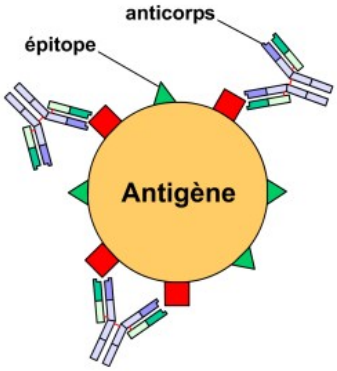


Figure 17 Anticorps monoclonaux, liés à un épitope spécifique.

[42] Van Dongen G. A.M.S., Visser G. W. M., Vrouenraets M. B., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2004**, 56, 31-52.
[43] Köhler G., Milstein C., *Nature*, **1975**, 256, 495-497.
[44] Trikha M., Yan L., Nakada M. T., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2002**, 13, 609-614.

(https://fr.wikipedia.org/wiki/Anticorps#/media/File:Monoclonal.png)

I.3.2. Ciblage passif, nanomédecine et nanoparticules

La nanomédecine est une application des nanotechnologies dans le domaine pharmaceutique et médical. Elle consiste à manipuler le matériel à l'échelle nanométrique pour une application de biosensor, nanomachine biologique[45], vectorisation de médicament. Cependant le problème majeur des nanotechnologies est surtout lié à leur toxicité et leur impact sur l'écosystème. Dans le domaine médical, les nanoparticules les plus couramment utilisées sont souvent :

- les nanoparticules métalliques, qui sont étudiées depuis très longtemps. Elles possèdent des propriétés particulières en fonction du métal utilisé, (*e.g* les propriétés magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer).
- les nanoparticules inorganiques (non-métalliques), tel que la silice mésoporeuse.
- les nanoobjets organiques: des nanostructures d'ADN, des polymères PLA[46] et des polymères naturels.

Ces nanoparticules peuvent directement agir comme principe actif (nanoparticules métallique: argent, fer) et exercer ainsi une toxicité propre ou bien être utilisées afin de transporter des principes actifs. Dans ce cas, les principes actifs sont encapsulés (*e.g* silice mésoporeuse, polymère), ou bien fixés à la surface des nanoparticules au moyen de liaisons ioniques ou covalentes[47].

Les nanoparticules sont utilisées essentiellement pour la vectorisation passive (ou ciblage passif) des médicaments grâce à l'effet EPR[48] (Enhanced Permeability and Retention) (Figure 18). Les nanoobjets, comme les liposomes, les nanoparticules et certaines macromolécules ont tendance à s'accumuler dans le tissu tumoral. L'explication de ce phénomène est liée à la phase d'angiogenèse lors du développement de la tumeur. Lorsque sa taille atteint 200µm, les vaisseaux sanguins de l'organe n'arrivent plus à satisfaire le besoin en oxygène et en nutriments de la tumeur. Le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) est libéré et de nouveaux vaisseaux sanguins sont formés par la tumeur. Les neovaisseaux sont différents en forme et en

---

[45] Yang X., Yang M., Pang B., Vara M., Xia Y., *Chem. Rev.*, **2015**, 115, 10410-10488.
[46] Li Q., Wang Y., Feng N., Fan Z., Sun J., Nan Y. *J. Drug Target*. **2008** 16:725-732
[47] Taissire Benamor « Synthèse et caractérisation de silices mésoporeuses hydrophobes à porosité contrôlée » **2011,** thèse N° tel-00705930, thèse Université de Haute Alsace, France.
[48] Sun T., Zhang Y. S., Pang B., Hyun D. C., Yang M., Xia Y., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014,** 53, 12320-12364.

architecture. Les fenestrations sont largement supérieures (100~800nm) au lieu de quelques nm. Toutes ces propriétés permettent d'avoir un meilleur passage des nanoparticules de taille 100-200nm à travers les parois de ces vaisseaux.

L'effet EPR est important pour la vectorisation passive de nanoparticules vers les tumeurs.

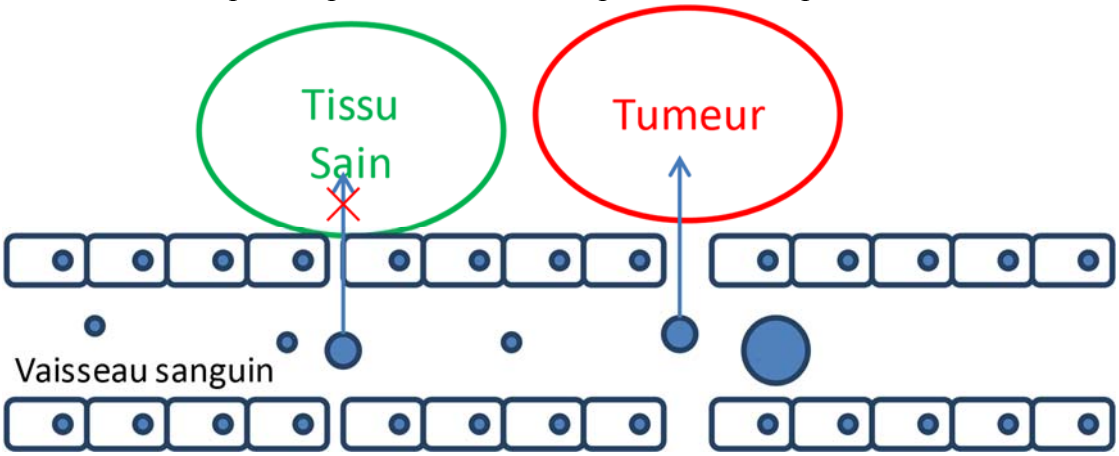


Figure 18 : Effet EPR

La taille est essentielle. Les nanoparticules supérieures à 800nm n'entrent pas dans le tissu tumoral, mais selon la littérature, les nanoparticules entre 30 et 200nm ont la meilleure efficacité[51]. Dans le sang, les nanoparticules supérieures à 200nm sont éliminées très rapidement par la rate. Une fois les nanoparticules dans le tissu tumoral, les petites tailles peuvent traverser et retourner dans le sang et finalement éliminées par le rein. Le compromis de taille se situe entre 30 et 200nm pour une meilleur extravasion et rétention par la plupart des tumeurs solides. Les fonctions fixées à la surface des nanoparticules peuvent intervenir afin d'ajouter un ciblage actif de la tumeur ou des cellules tumorales.

La pénétration cellulaire des nanoparticules a lieu grâce à l'endocytose. Il existe plusieurs voies possibles (Figure 19). Les très petites tailles utilisent plus la pénétration directe par la formation d'un pore, simple diffusion et perméation. Les nanoparticules plus grandes prennent souvent la voie de macropinocytose ou la voie clathrine et caveoline indépendantes [49]. La fonctionnalisation de la surface des nanoparticules peut favoriser une voie de pénétration. Des ligands peuvent activer des récepteurs sur la membrane et favoriser une voie de transport active[50].

[49] Canton I., Battaglia G., *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 2718-2739.
[50] Ding H.-M., Ma Y.-Q., *Small*, **2015**, 11, 1055–1071.

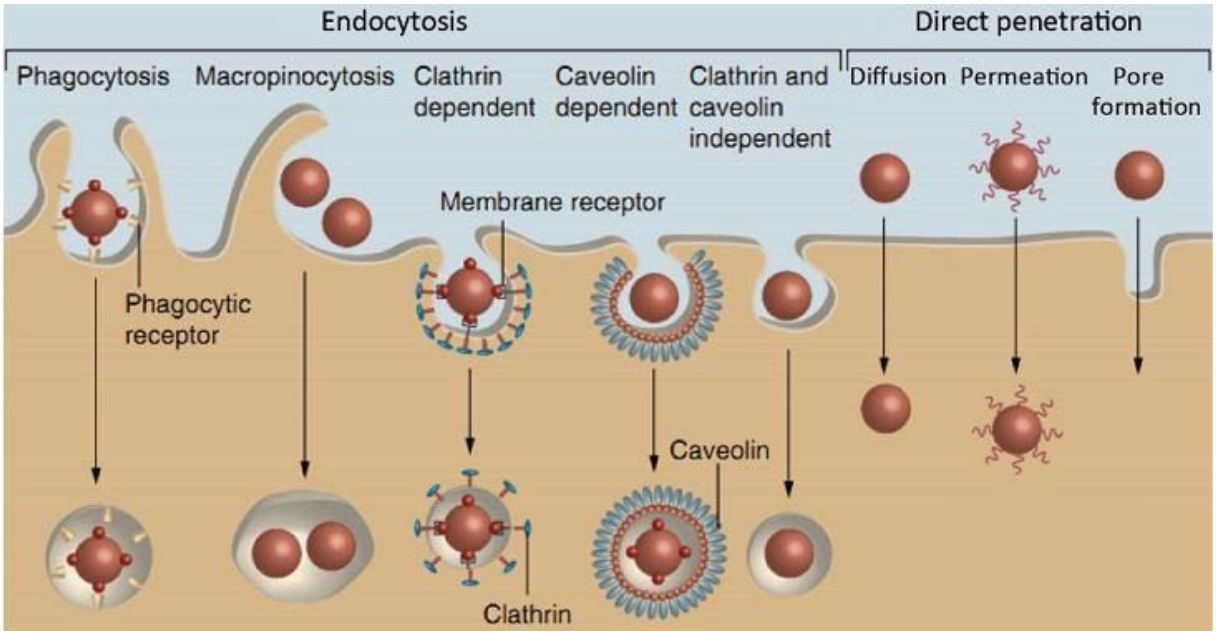


Figure 19 : Les voies possibles d'internalisation des nanoparticules pour traverser la membrane[53]

I.3.3. Les différents nanoobjets

Depuis une dizaine d'années, on constate un développement important du nombre du nanoobjets utilisés dans le domaine médical. Dans ce chapitre, nous allons présenter ici quelques exemples en détaillant plus particulièrement les nanoparticules d'or.

I.3.3.1 Les nanoparticules organiques

- *Les liposomes*

Les liposomes sont des vésicules constituées d'une ou plusieurs doubles couches concentriques de phospholipides et de molécules de cholestérol encapsulant un réservoir aqueux. Leurs caractères biocompatibles et biodégradables ont largement motivé leur développement comme vecteur [51]. Ils se présentent sous la forme de vésicules sphériques constituées d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides, similaires aux phospholipides présents dans les membranes cellulaires. Les liposomes sont synthétisés à partir de films de phospholipides, dispersés en solution aqueuse. Leur diamètre varie de quelques nanomètres à quelques dizaines de microns. On distingue ainsi trois types de liposomes : les liposomes multilamellaires, relativement stables, mais polydisperses (80 nm à 10 µm) ; les liposomes unilamellaires larges de diamètre moyen variant entre 0,2 à 1 µm de plus grande capacité ; le troisième type de liposomes, les

[51] Maruyama K., Ishida O., Takizawa T., Moribe K., *Adv. Drug Delivery Rev.*, **1999**, 40, 89-102.

liposomes unilamellaires de petite taille, de distribution de taille plus étroite (20 à 50 nm), mais de contenance faible. Leur disposition originale s'explique à la fois par leurs caractères hydrophile et hydrophobe, dus respectivement à la portion (glycérol-phosphate) et aux chaînes carbonées qui les composent. (Figure 20)

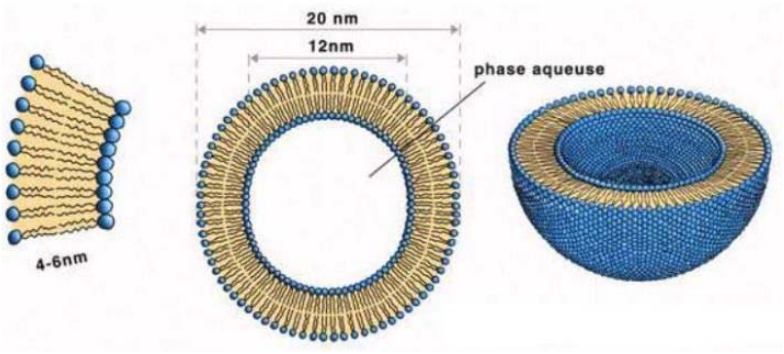


Figure 20 Structure de liposome de petite taille

- *Les nanocristaux de cellulose (CNCx)*

La cellulose est considérée comme le polymère naturel le plus abondant et renouvelable. L'exploitation du produit forestier comme la cellulose est un axe essentiel du laboratoire. Les nanocristaux de cellulose[52] (Figure 21) sont des petits cristallites de cellulose de longueur d'une centaine de nanomètre. Ils sont obtenus par la coupure, à l'aide d'acide concentré, de la zone amorphe de cellulose naturelle. La taille de CNCx varie selon l'acide utilisé et l'origine de la cellulose. Des nanocristeaux de la longueur 100-200nm et d'épaisseur 5-15nm sont obtenus après hydrolyse par l'acide sulfurique concentré (65%) à 45°C[56]. Ces CNCx portent une surface chargée négativement. La charge est due à la fixation d'une fonction sulfate sur certaines fonctions hydroxyles primaire du résidu de glucose. La répulsion de charge permet d'avoir une meilleure stabilisation de CNCx en solution aqueuse.

[52] Drogat N., Granet R., Le Morvan C., Bégaud-Grimaud G., Krausz P., Sol V., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, 22, 3648-3652. 56

Nicolas DROGAT « Elaboration de nanocristaux de cellulose photosensibles : application à la photothérapie dynamique des cancers » **2011**, thèse N° XX-2011, Université de Limoges, France.

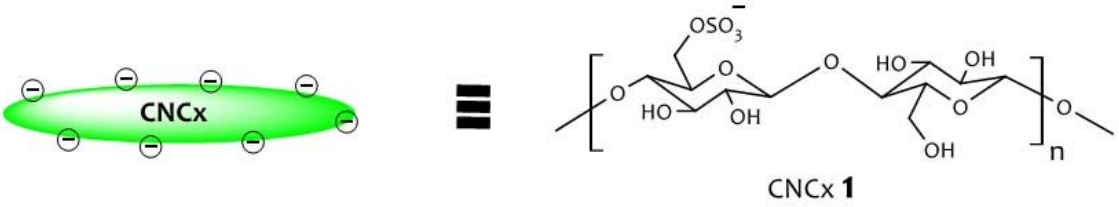


Figure 21 Structure élémentaire des CNCx

I.3.3.2 Les nanoparticules inorganiques

- *Les nanoparticules magnétiques.*

Les nanoparticules magnétiques (Figure 22) les plus couramment rencontrées sont les nanoparticules de Fer, de magnétite (Fe_3O_4) ou de maghemite (Fe_2O_3). Les deux derniers sont aussi appelées Superparamagnetic Iron Oxide Particles (SIOP). Les particules de magnétite sont synthétisées par une co-précipitation d'un mélange de sel de Fer^{II+} et Fer $^{III+}$. Afin d'éviter l'agglomération des nanoparticules, une couche de polymère organique à la surface est nécessaire. Dans la littérature, on retrouve souvent des PEG, des dextranes, des chitosans, des PEI ou des phospholipides. Au laboratoire, nous avons synthétisé des nanoparticules d'oxyde de Fer couvert par des dextranes. Ces nanoparticules sont utilisées pour la vectorisation de porphyrine pour lutter contre le cancer[44,53].

Figure 22 Nanoparticules d'oxyde de fer magnétique[57]

- *Les quantum dots*

Ces sont des nanoparticules semi-conductrices fluorescentes. Leur taille est très petite (2-10nm). Elles sont utilisées dans la vectorisation de principe actif et le diagnostic ou les deux en même temps[54].

[53] Kang B., Opatz T., Landfester K., Wurm F. R., *Chem. Soc., Rev.*, **2015**, 44, 8301-8325.
[54] Simberg D., *ACS Nano*, **2015**, 9, 8647-8650.

Afin de pallier les inconvénients des molécules organiques (dégradation rapide [55], changement d'absorbance selon le milieu...), les "quantum dots" sont développés. Ces vecteurs sont formés de nanocristaux minéraux combinant des éléments des groupes II et VI (CdS, CdSe, CdTe) ou encore des groupes III et V (GaAs, InP). La particularité de ces molécules est d'avoir une longueur d'onde d'émission qui varie uniquement en fonction de leur diamètre. Ils présentent ainsi une variété de couleurs d'émission.

Ces vecteurs (quantums dots) révèlent néanmoins des inconvénients. En effet leur luminescence est « aléatoire » du fait qu'elle disparait et réapparait ; on parle de phénomène de scintillement. Ceci n'est pas adapté pour des observations de longue durée. D'autre part leur application dans le domaine médical est controversée du fait de la présence d'éléments toxiques (le cadmium par exemple) rentrant dans leur composition. Enfin, les modes d'élimination naturelle de ces composés demeurent jusqu'à preuve du contraire méconnus.

- *La silice mésoporeuse organisée*

Les silices mésoporeuses organisées (SMO), depuis leur découverte au début des années 90s[56], ont suscité l'intérêt d'un grand nombre des chercheurs. Cet intérêt se justifie par leurs propriétés particulières telle qu'un arrangement régulier des canaux, une taille de pore modulable de 2 à 30 nm (supérieure aux zéolites)[57], ainsi qu'une surface spécifique élevée parfois supérieure à $1000 m^2 g^{-1}$ (Figure 23).

[55] Song L., Hennink E.J., Young I.T., Tanke H.J., *Biophys. J.*, **1995**, 68, 2588-2600.
[56] Yanasigawa T., Shimizu T., Kuroda K., Kato C., *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **1990**, 63, 988-992.
[57] Zhao D., Feng J., Huo Q., Melosh N., Fredrickson G. H., Chmelka B. F., Stucky G.D., *Science.* **1998**, 279, 548-552.

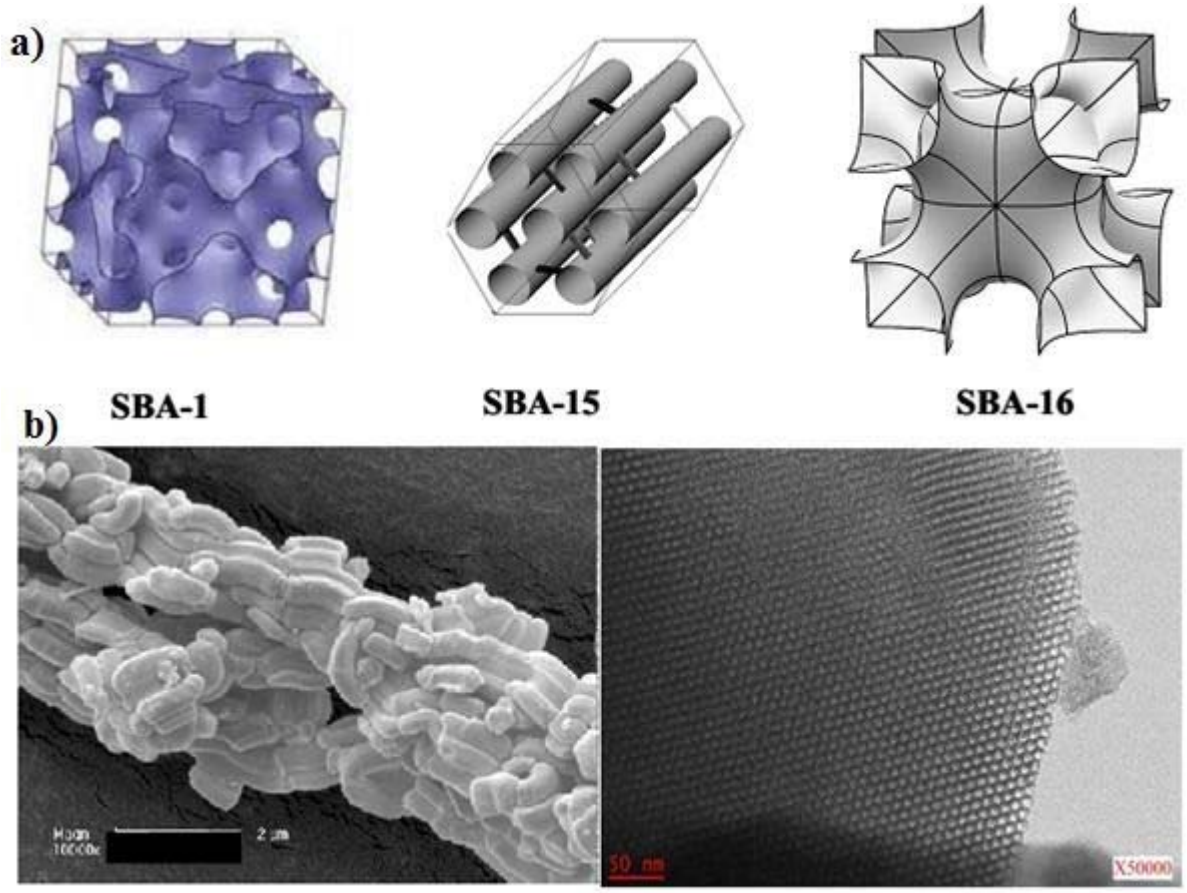


Figure 23 a : Représentation schématique de quelques phases mésostructurées de la famille SBA-n

b : Clichés MEB et MET d'une SMO de type SBA-15[50]

Les caractéristiques physico-chimiques de ces matériaux permettent d'entrevoir leur utilisation dans des domaines divers et variés (la catalyse, l'adsorption, la séparation, la chromatographie, la biochimie comme support pour l'immobilisation d'enzyme ou la libération de médicament)[50].

Les silices mésoporeuses organisées sont souvent synthétisées selon le mécanisme d'auto-assemblage coopératif, dont le principe consiste à faire polycondenser un précurseur inorganique (SiO_4^-) autour de micelles de tensioactifs en solution aqueuse. Selon la nature du

tensioactif (ionique ou non-ionique) et du milieu réactionnel (acide ou basique), différentes famille de matériaux peuvent être obtenues[58].

I.3.3.3 Les nanoparticules d'or Les nanoparticules d'or sont utilisées depuis des siècles par les artistes en raison de leurs couleurs variées. Récemment, à cause de leur interaction avec la lumière et de leurs propriétés opto-électroniques[59], leurs applications ont évoluées vers les domaines du photovoltaïque organique[60], santé[61], de la catalyse[62] et de l'électronique[63].

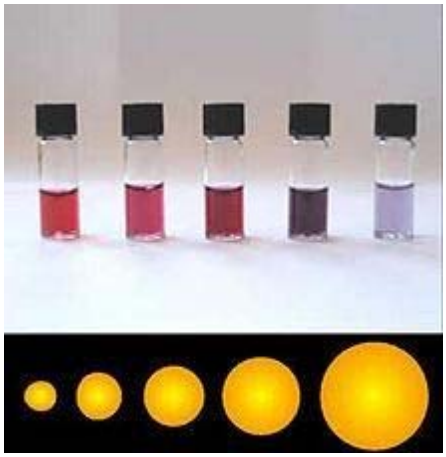


Figure 24 Solution des nanoparticules sphériques

Les nanoparticules d'or existent sous la forme de suspension colloïdale de particules de taille entre 1 et 1000 nm. Elles sont dispersées dans un solvant, souvent dans l'eau. Le couleur de la solution varie selon la forme et la taille des nanoparticules (Figure 24). Pour les nanoparticules sphériques dont la taille est entre 5 et 20 nm, elles sont de couleur rouge foncé. Entre 20 et 100 nm, la couleur est violette. Plus de 100nm, elles sont bleues.

L'histoire des nanoparticules d'or peut remonter à l'époque des alchimistes. Néanmoins, c'est en 1898, que Richard Adolf Zsigmondy a préparé la première solution colloïdale de nanoparticule d'or[64]. Pour la synthèse de la forme sphérique, la méthode la plus simple et la plus utilisée est celle de Turkevich, publiée en 1951[65]. Elle consiste à réduire la solution chaude de sel de Au^{III+} (souvent $HAuCl_4$) par un petit volume de solution de citrate de sodium. Les anions citrate jouent ici alors à la fois le rôle de réducteur et d'agent de stabilisation.

Dans le domaine thérapeutique, actuellement très souvent, les nanoparticules sont prioritairement utilisées comme un système de vectorisation. Les nanoparticules montrent en

---

[58] Trewyn B. G., Nieweg J. A., Zhao Y., Lin V. S.-Y., *Chemical Engineering Journal*, **2007**, 137, 23–29.

[59] Kociak M., Stéphan O., Gloter A., Zagonel L. F., Tizei L. H.G., Tencé M., March K., Blazit J. D., Mahfoud Z., Losquin A., Meuret S., Colliex C., *Comptes Rendus Physique*, **2014**, 15, 158-175.

[60] Bai Y., Butburee T., Yu H., Li Z., Amal R., Lu G.Q., Wang L., *J. Colloid Interface Sci.*, **2015**, 449, 246-251.

[61] He C., Lu J., Lin W., *J. Control. Release*, **2015**, 219, 224-236.

[62] Zhang W., Huang W., Yang, J., *Science China Chemistry*, **2015**, 58, 565-573.

[63] Batista C.A.S., Larson R.G., Kotov N.A., *Science*, **2015**, 350, 1095-9203.

[64] Truong P. L., Mab X., Sim S. J., *Nanoscale*, **2014**, 6, 2307-2315.

[65] Turkevich J., Stevenson P. C., Hillier J., *Discuss. Faraday Soc.*, **1951**, 11, 55-75. [70] West C. M., Barnett G. C., *Genome Medicine,* **2011**, 3, 52.

effet une très bonne biodistribution dans les tissus malades par l'effet EPR[51]. En plus de l'aspect vectorisation, West et coll.[70] montrent une possibilité de combiner la radiation et la chimiothérapie. Les nanoparticules arrivent à la tumeur, et elles sont chauffées par un laser de proche IR. Cette méthode fonctionne mieux avec une ou plusieurs autres thérapies. Il existe aussi des applications dans le domaine du diagnostic. Par l'utilisation de SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy), *in vivo*, il est possible de localiser la zone ou les nanoparticules se concentrent. Ainsi une fois concentrées dans la tumeur par l'effet EPR, il est alors possible de visualiser la tumeur par cette méthode.

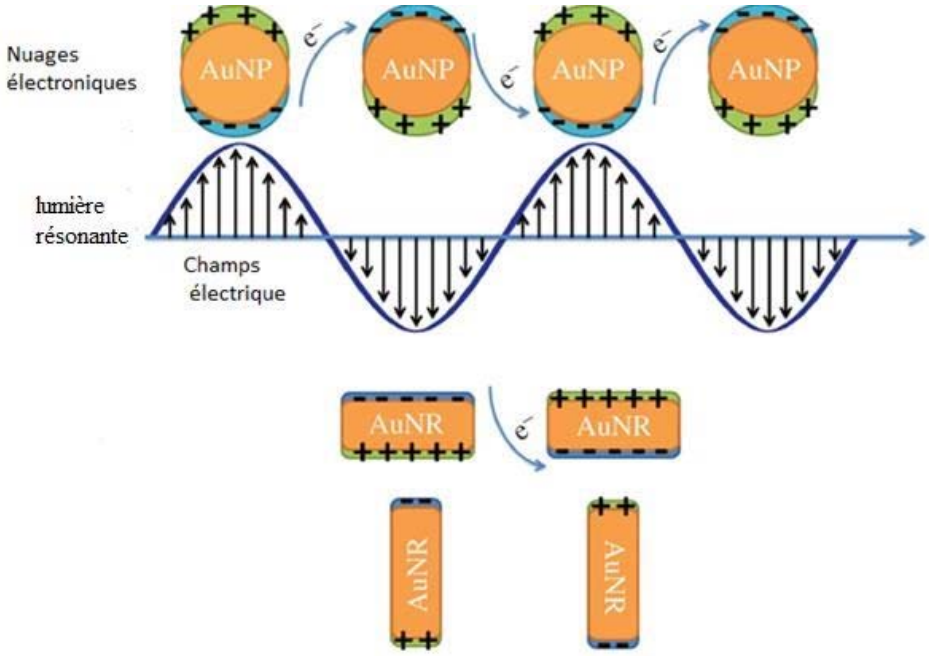


Figure 25 Théorie de l'effet SPR (Surface Plasmon Resonance) adapté de la référence[66]

L'hyperthermie est l'élévation locale de la température de quelques degrés au-dessus de la valeur normale (37 à 37,5 °C), en raison de l'accumulation de chaleur. Elle est connue pour conduire à l'apoptose cellulaire. Les nanoparticules d'or possèdent une propriété appelée SPR (Surface Plasmon Resonance) (Figure 25). L'absorption de la lumière induit une résonnance des électrons périphériques délocalisés, il se crée alors un dipôle à la surface de la nanoparticule. Cette résonnance émet de la chaleur. Une fois que les nanoparticules ont atteint la tumeur, on éclaire la zone tumorale par une lumière de longueur d'onde corresponde à la valeur de

[66] Yasun E., Kang H., Erdal H., Cansiz S., Ocsoy I., Huang Y.-F., Tan W., *Interface Focus*, **2013**, 0006. [72] Huang X., El-sayed M. A., *Alexandria journal of medicine*, **2011**, 47, 1-9.

résonnance. La chaleur produite, induit alors l'apoptose de cellule tumorale. Cette méthode est appelée PTT (PhotoThermal Therapy)[72].

Les nanoparticules peuvent être plus qu'un vecteur simple pour les photosensibilisateurs (PS). En effet, l'interaction entre la radiation incidente et la résonance électromagnétique du métal noble induit un large champ électrique de surface qui, par une augmentation de la section efficace d'absorption, favorise la résonance de plasmon et donc les propriétés radiatives des nanoparticules d'or. Du fait de l'interaction entre les nanoparticules d'or et l'état excité du photosensibilisateur, les électrons libérés du métal oscillent avec ceux du PS associé (phtalocyanine[67], bleu de méthylène[68]), ce qui reproduit le comportement d'un dipôle augmentant l'absorption et les propriétés photophysiques du PS[69].

Les nanoparticules sphériques entre 10 et 100nm ne sont pas très efficaces car la zone d'absorption de la lumière se situe entre 520 et 580nm. De plus, cette longueur d'onde est fortement absorbée par la peau et les tissus. Les nanoparticules les plus efficaces sont les bâtonnets (nanorod) ou les nanoétoiles (nanostar) qui ont une absorption située vers 700800nm dans le proche infrarouge qui induisent une forte élévation de température. Ainsi, les AuNPs non-sphériques[76] (Figure 26) (comme les nanocubes, les nanorods, les nanocage, prisme triangulaire…) sont développées de plus en plus ces dernières années. Elles apportent des propriétés très variées et très différentes par rapport aux AuNPs sphériques dues à leur forme.

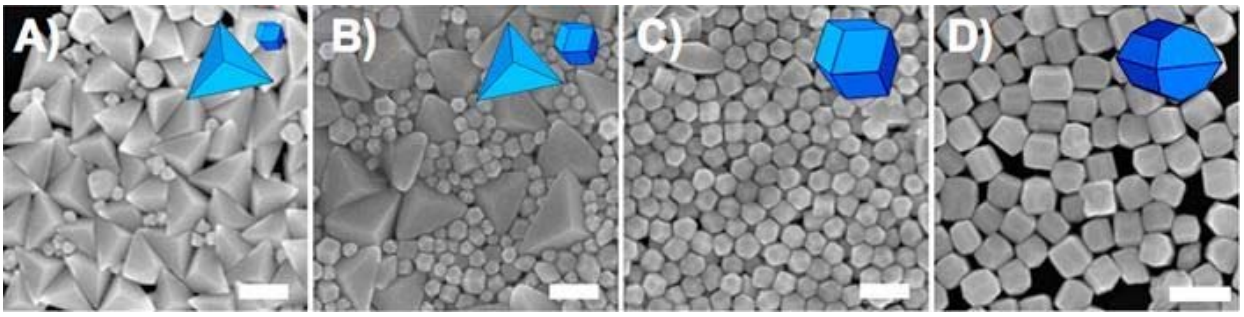


Figure 26 Images MEB des formes non-sphériques des AuNPs[76]

I.3.4. Polyethylèneimine (PEI)

Parmi les agents de ciblage actifs, les polyamines ont montré un réel intérêt pour le ciblage des cellules tumorales[70], parmi ces polyamines, la polyéthylèneimine ou PEI a été très utilisée pour favoriser la pénétration intracellulaire.

---

[67] Nombona N., Maduray K., Antunes E., Karsten A., Nyokong T., *J. Photochem. Photobiol.*, **2012,** 107, 35-44.
[68] Khan S., Alam F., Azam A., Khan A., *Int. J. Nanomedicine,* **2012**, 7, 3245-3257.
[69] SEVE Aymeric "optimization de nanoparticules multifonctioneelles pour une amelioration de l'efficacité photodynamique, de la séléctivité tumorale et de la detection par IRM", 2013, thèse Université de Lorraine. [76] Langille M. R., Personick M. L., Zhang J., Mirkin C. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 14542-14554.
[70] Martin C., Aibani N., Callan J. F., Callan B., *Therapeutic Delivery*, **2016**, 7, 15-31.

La polyéthylèneimine est un polymère construit sur le monomère CH_2CH_2NH. Il existe trois types de PEI : linéaire, ramifiée et dendrimère (Figure 27). Les PEIs sont considérées comme des composés polycationiques et leurs applications sont fortement liés à ce caractère[71].

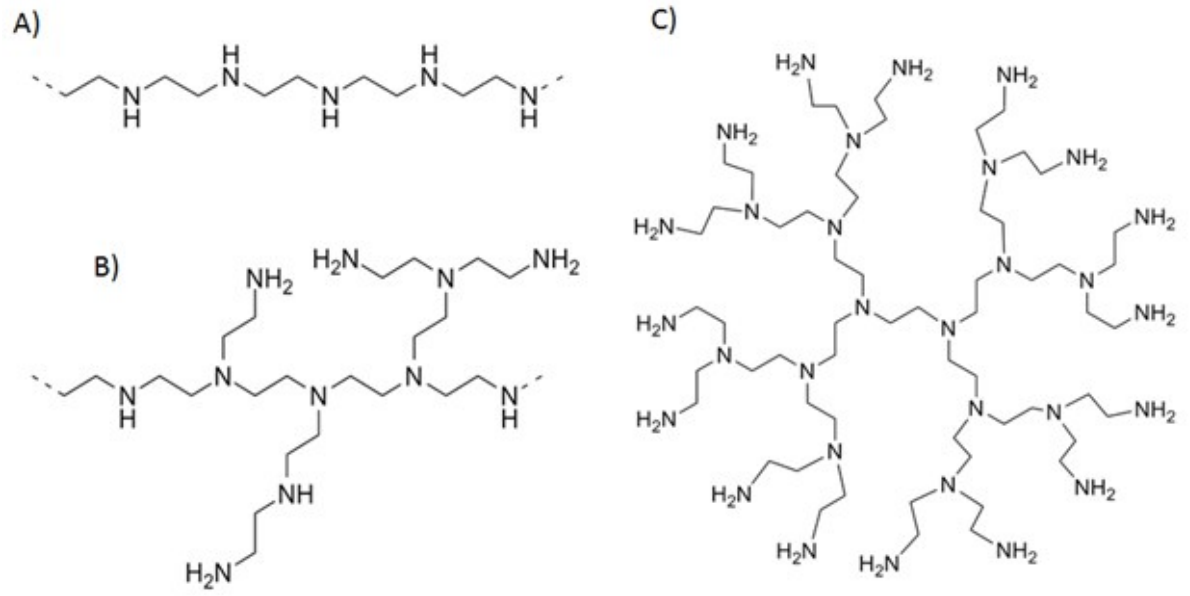


Figure 27 PEI linéaire (A) ; ramifiée (B) ; dendrimère (C)

Les PEIs les plus utilisées sont les PEIs ramifiées, elles se différencient par leurs masses moléculaires. Commercialement, il existe les PEI 600, PEI 1200, PEI 1800, PEI 2000, PEI 10000, PEI 25000, PEI 75000. Leur capacité à former des polycations leur permet d'avoir des interactions avec les charges négatives (phosphates…) présentes à la surface de la membrane cellulaire. Ces interactions favorisent ensuite la pénétration de la PEI au sein de la cellule. De plus, au niveau intracellulaire, des travaux[72] ont montré que les PEIs avaient la capacité de se fixer de manière privilégiée à l'ADN.

Cependant, les PEIs de taille supérieure à 10kDa sont connus pour présenter une certaine toxicité, En effet, les PEIs sont identifiées comme des agents d'apoptose par la voie mitochondriale[73]. L'induction de l'apoptose par les PEIs de masse élevée (25kDa et 75kDa) a été démontrée sur les cellules telles que les hépatocytes, les cellules endothéliales et les lymphocytes. Dans ces cas, un dommage de la membrane est observé par une élévation

[71] Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M. A., Mergny M. D., Scherman D., Demeneix B., Behr J. P., *Proc .Natl. Acad. Sci.* ,**1995**, 92, 7297-7301.
[72] Xie Q.-L., Guo X.-Y., Chen X.-J., Wang Y.-Y., *Cytotechnology,* **2013,** 65, 263–271.
[73] Lee M. H., *Bull. Korean Chem. Soc.* **2007**, 28, 95-98.

significative de niveau du lactate déshydrogénase. On a observé aussi une perte de potentiel de la membrane mitochondriale en fonction du temps, ce qui caractérise un processus apoptotique.

Les PEIs ayant montré une très bonne capacité à pénétrer la cellule cancéreuse, elles sont très utilisées pour transporter des principes actifs vers des cibles thérapeutiques [74]. Ces principes actifs portant souvent une ou plusieurs charges négatives, sont associées aux PEIs par liaisons ioniques. En particulier, les PEIs ont été très largement utilisées pour la transfection de fragment d'ADN ou ARN pour la thérapie génique nonvirale[75].

I.3.5. Les cyclodextrines

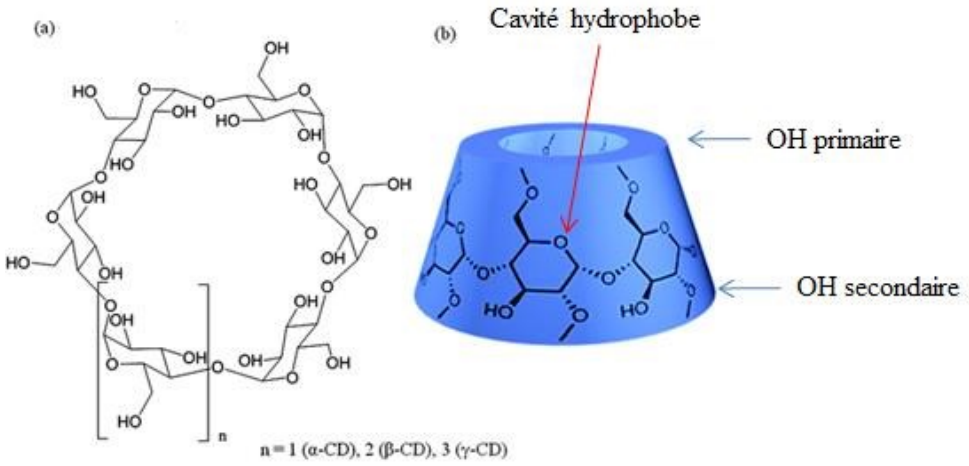


Figure 28 a : Structure chimique des cyclodextrines, b : structure 3D de cyclodextrine[76]

La cyclodextrine ou cycloamylose est une molécule cyclique d'origine naturelle et est utilisé dans de nombreux domaines (agriculture, médical…) [77]. Elles sont obtenues par la dégradation de l'amidon en présence de la bactérie *Bacillus macerans*. La molécule a été découverte en 1891 par Villiers[78]. Il s'agit d'oligosaccharides et ces molécules possèdent de 6 à 8 unités de *D*-glucose liées en α-(1,4) (Figure 28). Il existe essentiellement trois types de cyclodextrines, notées α, β et γ, correspondant respectivement à 6, 7 et 8 unités de *D*glucopyranoside. Les cyclodextrines possèdent une propriété remarquable, il y a une très grande différence entre la face extérieure et la face intérieure du cycle. Au centre, on retrouve le squelette riche en atomes de carbone et d'oxygène impliqué dans des liaisons éthers, qui forment une cavité hydrophobe.

[74] Nam J., Nah J., *Carbohydr. Polym.,* **2016**, 135, 153-161.
[75] Askarian S., Abnous K., Taghavi S., Oskuee R.K., Ramezani M., *Colloids Surf., B*, **2015**, 136, 355-364.
[76] Zhou J., Ritter H., *Polym. Chem.*, **2010**, 1, 1552-1559.
[77] Amin J., Puglisi A., Clarke J., Milton J., Wang M., Paranal R. M., Bradner J. E., Spencer J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, 23, 3346-3348.
[78] Villiers A., *Compt. Rend. Fr. Acad. Sci*., **1891**, 435, 8.

La taille des cavités varie en fonction des tailles des cyclodextrines (α: 0,45nm^3; β: 0,7nm^3; γ: 0,85nm^3). Au contraire, leur surface extérieure présente des fonctions hydroxyles libres qui leur permettent d'avoir une certaine solubilité dans l'eau. Cette propriété permet d'encapsuler les molécules hydrophobes dont la taille correspond à celle de la cavité de la cyclodextrine, le complexe formé est alors soluble dans une solution aqueuse et permet ainsi d'augmenter la biodisponibilité de ces molécules[79]. Les hydrosolubilités varient en fonction de la taille des cyclodextrines (α-cyclodextrine 145g/L; β– cyclodextrine 18,5g/L; γ- cyclodextrine 232g/L). Afin d'améliorer leur solubilité en solution aqueuse, des groupements hydrophiles sont fixées sur les cyclodextrines. Elles sont disponibles commercialement, comme par exemple : les cyclodextrines sulfatées.

I.4. Les principes actifs

Parmi de nombreuses molécules anticancéreuses d'origine naturelle, nous nous sommes intéressés au cours de ce travail à trois molécules issues de la biomasse qui pourraient présenter un très grand intérêt pour la lutte anticancéreuse.

I.4.1. Tanshinones et Salvia miltiorrhiza

Salvia miltiorrhiza (Figure 29) est une plante vivace, à feuilles caduques avec une ramification des tiges allant de 30 à 60 cm de hauteur, avec des feuilles largement espacées. Elle est cultivée au nord de la Chine, au Japon et en Corée et est essentiellement utilisée dans ces pays mais on le trouve également sur le continent Amérique et même dans certains pays européens.

Figure 29 *Salvia miltiorrhiza* (gauche) ; Danshen : la racine séchée de *Salvia miltiorrhiza* (droite).

La racine est connue sous le nom chinois « Danshen » (Figure 29). Elle est utilisée pour le traitement des maladies cardiovasculaires et cérébrovasculaires. La partie racine séchée est

[79] García-Gonzáleza L., Yépez-Mulíab L., Ganem A., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2016**, 81, 113-118.

classée dans la médicine traditionnelle chinoise (CTM)[80]. Elle fait partie d'une combinaison de 5 ingrédients regroupés sur la terme « formule de *tangzhiqing* » qui sont en cours d'étude pour le traitement du diabète[81][82].

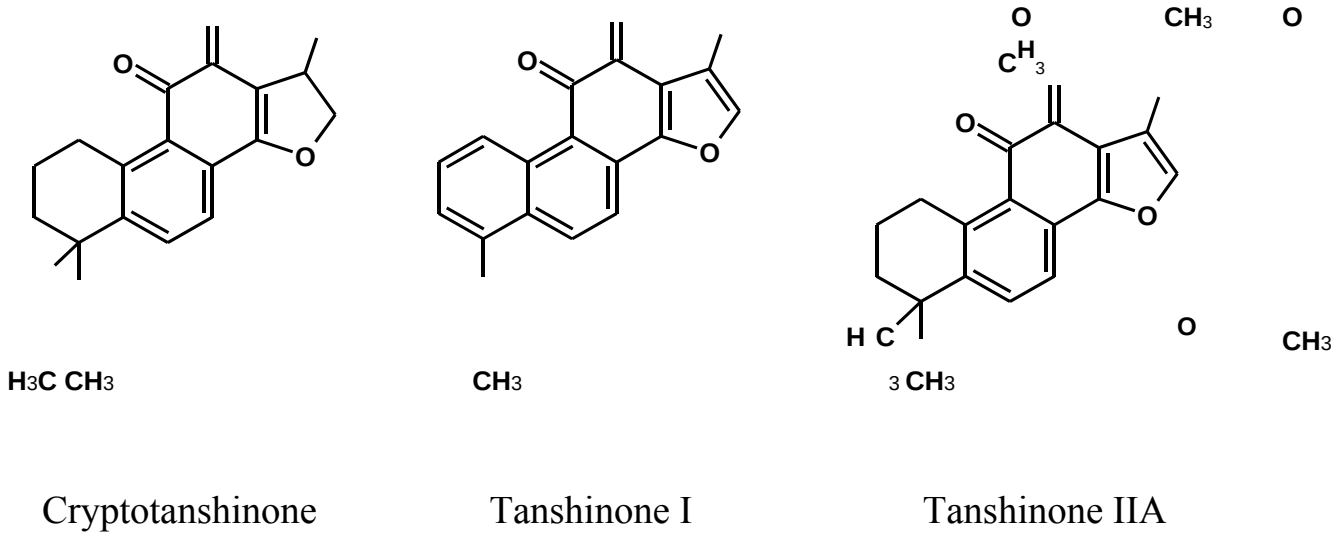


Figure 30 Les différentes tanshinone

Une étude de la littérature montre la composition chimique du Danshen [83]. Les molécules hydrophobes (Figure 30) en particulier, ont été isolées par extraction avec des solvants organiques comme l'acétone, le chloroforme et l'éthanol. Leurs activités biologiques ont été évaluées pour des applications thérapeutiques comme anticancéreux[84], anti-oxydants[85], et anti-inflammatoires[86]…

Les tanshinones ont été isolées, pour la première fois par Nakao et coll. dans les années 1930s[87]. Actuellement, c'est une famille qui comprend 90 composés. Les molécules les plus importantes sont la Cryptotanshinone, la Tanshinone IIA, la Tanshinone I, la dihydrotanshinone I, la Tanshinlactone et la Neo-Tanshinlactone, etc… La Tanshinone IIA (Tan IIA) est le composé le plus abondant parmi toutes ces molécules. Elle possède des propriétés anti-

[80] Lee A.-R., Wu W.L., Chang W.-L., Lin H.-C., King M.-L., *J. Nat. Prod.*, **1987**, 50, 157-160.
[81] Tao W., Deqin Z., Yuhong L., Hong L., Zhanbiao L., Chunfeng Z., Limin H., Xiumei G.. *J. Ethnopharmacol*.,
[82] , 21; 128, 575-582.
[83] Wang X., Morris-Natschke S. L., Lee K.-H., *Med. Res. Rev.,* **2007**, 27, 133-148.
[84] Dong Y., Morris-Natschke S. L., Lee K. H., *Nat. Prod. Rep.,* **2011**, 28, 529–542.
[85] Zhang K.-Q., Bao Y., Wu P., Rosen R.T., Ho C.-T., *J. Agric. Food Chem.*, **1992**, 38, 1194-1197.
[86] Jang S.-I., Jeong S.-I., Kim K.-J., Kim H.-J., Yu H.-H., Park R., Kim H.-M., You Y.-O., *Planta Medica*, **2003**, 69, 1057-1059.
[87] Nakao M., Fukushima T. *Yakugaku Zasshi*. **1934,** 54, 844–858.

inflammatoires et anti-oxydantes[88]. L'activité anticancéreuse de cette molécule a aussi été mise en évidence et montre l'induction du mécanisme apoptotique par la voie intrinsèque mitochondriale[89].

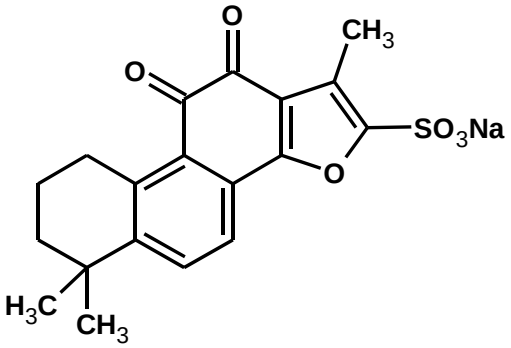


Figure 31 Tanshinone IIA Sulfonate de sodium (STS)

Cependant, les tanshinones sont difficiles à solubiliser dans l'eau à cause de leur fort caractère hydrophobe, limitant ainsi leur biodisponibilité et leur application thérapeutique. Afin d'améliorer leur solubilité en milieu biologique, certaines modifications chimiques ont été apportées. La Tanshinone IIA sulfonate de sodium (STS) (Figure 31) est un dérivé de la Tan IIA [90, 919293]. En effet, l'addition d'une fonction sulfonate, augmente son caractère hydrophile. Le STS est utilisé pour le traitement des maladies cardiovasculaires en Chine depuis une trentaine d'années[98]. En clinique, le STS est efficace pour le traitement de l'angine de poitrine, et de l'infarctus du myocarde, probablement en raison de son effet vasodilatateur [99]. Néanmoins, la modification de la structure chimique de la molécule peut induire des conséquences indésirables ou une diminution de l'activité du principe actif. Une autre approche permettant d'augmenter la biodisponibilité de la Tan IIA est l'utilisation de la β-cyclodextrine (CD). L'inclusion de Tan IIA dans la cavité hydrophobe de cette dernière, conduit à la formation d'un complexe en milieu aqueux sans modifier sa structure[94, 95].

La Tan IIA est la plus étudiée de la famille des tanshinones par son activité antineoplastique dans différentes lignées cancéreuses (*e.g* prostate [96], colon[97], estomac[98]...). Avec une faible concentration, la molécule peut arrêter les différentes phases de proliférations (G_0/G_1, S, G_2/M, selon le type de cancer). A une concentration supérieure, le phénomène apoptotique est induit,

[88] Yin HQ, Kim YS, Choi YJ et coll. (May 2008). *Arch. Pharm. Res.* 31 (5): 659–665.

[89] Chiu T.-L., Su C.-C.. *Int. J. Mol. Med.* **2010**, 25, 231-236.

[90] Long R.,You Y., Li W., Jin N., Huang S., Li T., Liu K., Wang Z., *Life Sciences*, **2015,** 142, 8-18.

[91] Wei B., Li W.-W., Ji J., Hu Q.-H., Ji H., *Atherosclerosis*, **2014**, 235, 318-327.

[92] Fu J., Huang H., Liu J., Pi R., Chen J., Liu P., Eur. *J. Pharmacol.*, **2007**, 568, 213-221.

[93] Jiang B., Zhang L., Wang Y., Li M., Wu W., Guana S., Liu X., Yang M., Wang J., Guo D., *Food and Chemical Toxicology*, **2009**, 47, 1538-1544.

[94] Wang L., Jiang X., Xu W., Li C., *Int. J. Pharm.*, **2007**, 341, 58-67.

[95] Yuexian F., Junfen L., Chuan D., *Spectroc. Acta A*, **2005**, 61, 135-140.

[96] Won S.H.; Lee H.J.; Jeong S.J.; Lu J.; Kim S.H.. *Phytother. Res.*, **2012**, *26*, 669–674.

[97] Su C.C.; Lin Y.H. *Int. J. Mol. Med.*, **2008**, *22*, 847–851.

[98] Chen J., Shi D.Y., Liu S.L., Zhong L. *Oncol. Rep.*, **2012**, *27*, 523–528.

généralement, associé avec une augmentation de P35, P21, Fas, TNFα, Bax/Bcl-2, l'interruption du potentiel de membrane mitochondriale (MMP), libération du cytochrome c, des diminutions de la survivine, Mcl-1L, EGFR et LC3-II, et l'activation de la caspase-8, caspase-9 et la caspase-3, ce qui suggère les implications à la fois des voies d'apoptose intrinsèque (Bax / Bcl-2 / MMP / libération de cytochrome c / caspase-9 / caspase3) et extrinsèques (Fas / TNF-α / caspase-8 / caspase-3)[99].

L'action vis-à-vis du cycle de la mitose pourrait être un autre mécanisme possible d'action de Tan IIA afin de détruire la prolifération des cellules cancéreuses. Zhou et coll. [100] a montré que Tan IIA pouvait arrêter les cellules cancéreuses en phase de mitose (avant la transition métaphase-anaphase) en perturbant le fuseau mitotique, et ensuite induire l'apoptose dépendante des mitochondries. A la différence des médicaments thérapeutiques existants (tels que la vincristine ou le taxol) qui causent un arrêt en phase G2/M par interférence avec la structure des microtubules, la Tan IIA détruit le fuseau mitotique dans les cellules mitotiques plutôt que la structure des microtubules dans les cellules en interphase, ce qui suggère une préférence de Tan IIA pour la destruction des cellules en mitose plutôt que des cellules en interphase. De plus, l'activité pro-apoptose *in vivo* de Tan IIA a également été établie dans les tumeurs de cancers du colon et du sein xénogreffées[107].

Dans la partie du Danshen extraite en phase aqueuse (Figure 32), l'acide rosmarinique, l'acide lithospermique[101], les acides salvianoliques A, B, and C ont été également découverts. Les antioxydants de la famille des acides salvianoliques sont actuellement utilisés pour les traitements de maladies cérébrovasculaires[102].

Récemment, l'extrait aqueux a montré une activité contre l'intégrase de virus HIV-1 *in vitro* et contre la réplication virale *in vivo*. Les acides lithospermiques A et B ont été isolés à partir de l'extrait aqueux. Les études de mécanisme montrent que le produit n'empêche pas l'entrée du virus dans la cellule, mais la réplication du HIV est bien inhibée. De plus les deux acides ne présentent pas, à haute concentration, de toxicité vis-à-vis les cellules noninfectées[103]. Des résultats similaires ont été observés avec l'acide rosmarinique[104].

---

[99] Zhang Y., Jiang P., Ye M., Kim S., Jiang C., Lü J., *Int. J. Mol. Sci.,* **2012**, *13*, 13621-13666

[100] Zhou L.L., Chan W.K., Xu N.H., Xiao K., Luo H.W., Luo K. Q., Chang D. C., *Life Sciences,* **2008**, 83, 394– 403. 107

Mosaddik M. A. *Phytomedicine*, **2003**, 10, 682-685.

[101] Yokozawa T., Lee T.W., Chung H.Y., Oura H., Nonaka G., Nishioka I., *Phyt. Res.*, **1994**, 8, 271-275.

[102] Wang QL, Tao YY, Yuan JL, Liu CH, *BMC Cell Biology,* **2010**, 11-31.

[103] Abd-Elazem I.S., Chen H.S., Bates R.B., Huang R.C.C., *Antiviral Res,* **2002**, 55, 91–106.

[104] Jiang R.-W., Lau K.-M., Hon P.-M., Mak T.C.W., Woo K.-S., Fung K.-P., *Curr. Med. Chem.*, **2005**, 12, 237246.

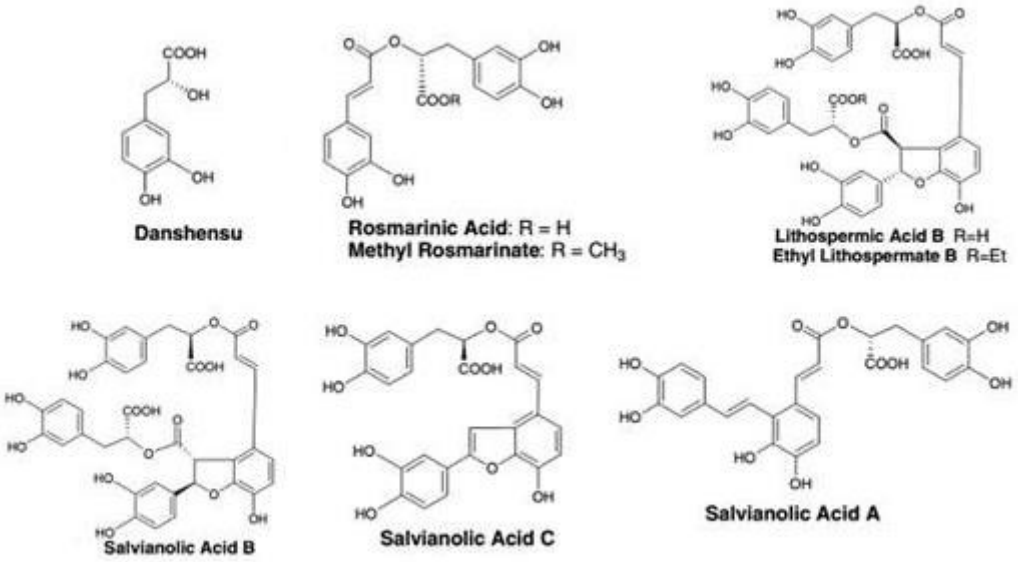


Figure 32 Des molécules de la phase aqueuse lors de l'extraction de Danshen [111]

I.4.2. L'α-mangostine

Le mangoustanier est un arbre du genre *Garcinia* (Figure 33), famille des *Clusiaceae*. La plante est originaire de l'Asie du Sud-Est (Malaisie, Java, Boenéo, Sri Lanka, Thaïlande). Il est également cultivé au sud de la Chine. La taille des mangoustaniers varie de 12 à 20 m, avec beaucoup de ramifications et un bois dur. Le fruit est appelé mangoustan et il est comestible. Il est aussi connu comme fruit des dieux, reine des fruits (en hommage à la reine Victoria). Le mangoustan est un fruit arrondi violacé de la taille d'une balle de golf est dont la peau épaisse, très amère, est appelée péricarpe. Il renferme une chair blanche divisée en 5 ou 6 quartiers. Le goût fin est un mélange d'acidité et de sucré. Les mangoustans sont des fruits très appréciés en Asie et en Afrique centrale pour leurs propriétés curatives[105].

[105] https://fr.wikipedia.org/wiki/Mangoustanier

Figure 33 Mangoustanier et mangoustan

Le péricarpe du mangoustan est utilisé en médecine traditionnelle depuis longtemps pour traiter divers problèmes tels que les inflammations [106]. C'est un des fruits les plus riches en antioxydants naturels, il contient au moins 40 xanthones. Une de ces molécules antioxydante est la mangostine. La molécule de l'α-mangostine (Figure 34) a été isolée en 1855 par Schmid [107] et sa structure élucidée en 1958 par Yates et Stout [108]. Les activités analgésiques [109], anti-allergisantes [110], anti-oxydantes[118] et anti-inflammatoires[117, 111] de l'αmangostine, ont été très étudiées. Récemment, la molécule a prouvé son activité anticancéreuse. Elle provoque la mort cellulaire selon un processus apoptotique. Il a été démontré que ses propriétés sont associées au noyau tricyclique. Elles sont cependant différentes d'une substance à l'autre en fonction de la position des substituants sur le noyau[120].

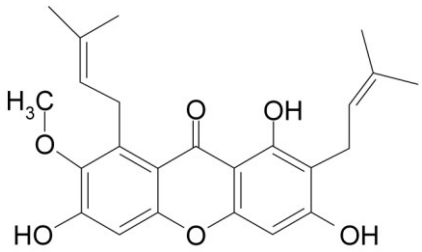


Figure 34 Structure de l'α-mangostine

L'activité anti-cancéreuse a été examinée par Matsmoto et coll. sur la lignée leucémiques HL60[112]. L'apoptose est activée par les caspase-3 et 9. La caspase-8 n'est pas activée, ce qui signifie que la voie d'apoptose est intrinsèque et non pas extrinsèque. Le dysfonctionnement de la mitochondrie, induit la perte du potentiel de la membrane et la diminution intracellulaire de l'ATP. Après quelque heures, l'accumulation de ROS et l'activation de Cyt c/AIF sont observées, mais l'expression de bcl-2 et l'activation de MAP kinase n'est pas affectée.

L'action de la α-mangostine a également été évaluée vis-à-vis de l'effet anti-

[106] Choi Y. H., Han S. Y., Kim Y. J., Kim Y. M., Chin Y. W., *Nutrition Research*, **2014**, 34, 336-345.
[107] Schmid W., *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, **1855**, 93, 83-85.
[108] Yates P., StoutG. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, 80, 1691–1700.
[109] Cui J., Hu W., Cai Z., Liu Y., Li S., Tao W., Xiang H., *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2010**, 95, 166-172.
[110] Nakatani K., Atsumi M., Arakawa T., Oosawa K., Shimura S., Nakahata N., Ohizumi Y., *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25, 1137-1141. 118
Jung H. A., Su B. N., Keller W. J., Mehta R. G., Kinghorn A. D., *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 2077-2082.
[111] Tewtrakul S., Wattanapiromsakul C., Mahabusarakam W. J., *Ethnopharmacol.* **2009**, 121, 379–382. [120] Pedraza-Chaverri J., Cárdenas-Rodríguez N., Orozco-Ibarra M., Pérez-Rojas J. M., *Food Chem. Toxicol.*, **2008**, 46, 3227‑3239.
[112] Matsumoto K., Akao Y., Yi H., Ohguchi K., Ito T., Tanaka T., Kobayashi E., Iinuma M., Nozawa Y., *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 5799–5806.

métastase sur la lignée des cellules cancéreuses prostatique PC-3[113]. Elle inhibe l'adhésion, la migration et l'invasion de cellules cancéreuses. La molécule diminue (dose dépendantce) l'expression de MMP-2, NMP-9 et de l'urokinase-plasminogène activateur (u-PA). La phosphorylation de c-Jun N-terminal kinase (1 et 2) et l'activation de NF-kB, c-Fos et c-Jun sont inhibées. L'effet anti-métastase de l'α-mangostine sur PC-3 est dû à la réduction de l'expression des MMP-2, MMP-9 et u-PA par la suppression de la voie de signalisation JNK1/2 et l'inhibition de NF-kB et AP-1 (Hung *et* coll 2009[114]).

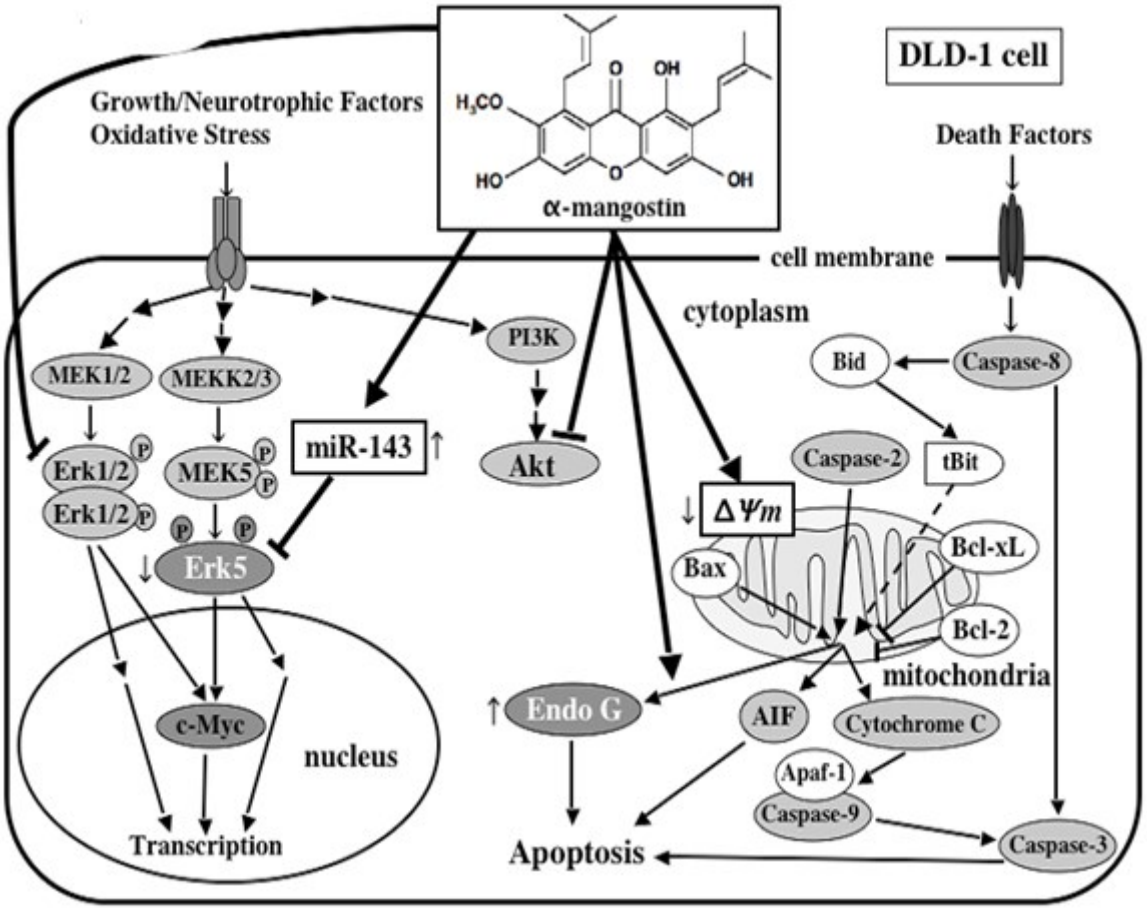


Figure 35 Schéma proposé pour l'induction de l'apoptose par l'α-mangostine sur des cellules DLD-1[115].

Sur les cellules cancéreuses du colon DLD-1, un mécanisme est proposé (Figure 35) [124] . L'α-mangostine active la caspase-9 par l'intermédiaire de la voie mitochondriale intrinsèque d'apoptose. La mangostine provoque la diminution de la production d'ATP et l'accumulation de ROS qui conduit au relargage de cytochrome C dans le cytosol. Celui-ci active la caspase-9 déclenchant le processus apoptotique. Cette cytotoxicité est corrélée à une

[113] Hemshekhar M., Sunitha K., Santhosh M. S., Devaraja S., Kemparaju K., Vishwanath B. S., Niranjana S. R., Girish K. S., *Phytochem Rev*, **2011**, 10, 325-351

[114] Hung S.-H., ShenK.-H., Wu C.-H., Liu C.-L., ShihY.-W., *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, 57, 1291–1298.

[115] Akao Y., Nakagawa Y., Iinuma M., Nozawa Y., *int. J. Mol. Sci.* **2008**, 9, 355-370.

diminution du potentiel membranaire mitochondrial. De plus, il a été démontré que l'αmangostine induit l'arrêt du cycle cellulaire à la phase G1/S[124].

I.4.3. Photosensibilisateurs d'origine naturelle

Les photosensibilisateurs (PS) d'origine naturelle, telle que les chlorophylles et les bactériochlorophylles, sont des macrocycles tétrapyrroliques (Figure 36) de type chlorine qui absorbe fortement aux longueurs d'onde du spectre visible (de 400 à 700 nm). Ces molécules sont entièrement substituées en position β-pyrrolique et présentent une ou deux insaturations en moins par rapport aux porphyrines. La modification de substituants sur le cycle va entraîner l'apparition de molécules telles que les purpurines et les bactériopurpurines, qui sont plus stables que les chlorophylles et bactériochlorophylles. Ces composés sont utilisés en PDT. On peut ainsi citer la protoporphyrine IX, les purpurinimides élaboré par R. K. Pandey et coll.[116] Au sein du LCSN, N. Drogat et coll.[117] ont optimisé la méthode de l'extraction de chlorophylle *a* et l'hémisynthèse de la purpurine 18[127].

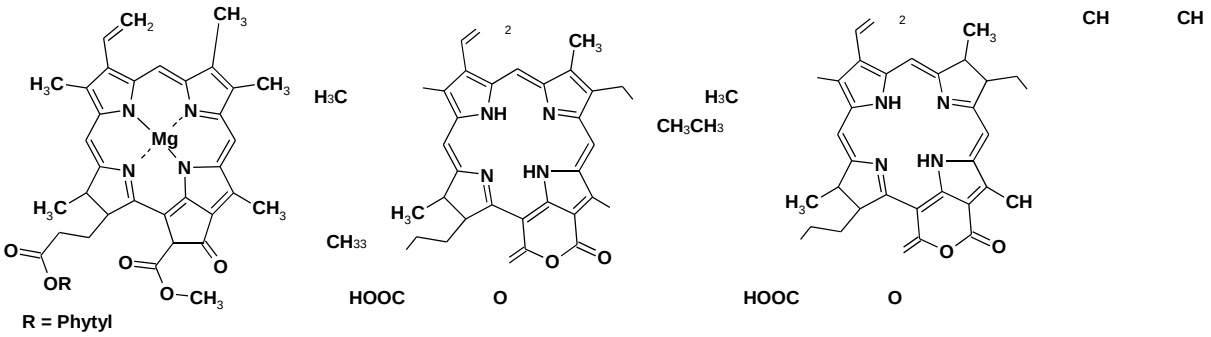


Figure 36 Structures des photosensibilisateurs de la famille tetrapyrrolique

[116] Pandey S. K., Zheng X., Morgan J., Missert R., Liu T. H., Shibata M., Bellnier D. A., Oseroff A. R., Henderson B. W., Dougherty T. J., Pandey R. K., *Mol. Pharm.*, **2007**, 4, 448-464.
[117] Drogat N., Barriere M., Granet R., Sol V., Krausz P., *Dyes and Pigments*, **2011**, 88, 125-127.
[127] Drogat N., Gady C., Granet R., Sol V., *Dyes and Pigments*, **2013**, 98, 609-614.

I.5. But du travail

Au sein du LCSN, un des axes principaux de recherche concerne l'élaboration de biomolécules telle que les photosensibilisateurs pour une application en photothérapie dynamique anticancéreuse, ou des molécules d'origine naturelle comme la curcumine qui est connue pour présenter une activité anticancéreuse[118]. Récemment, de nouveaux composés de types nanoparticules (nanoparticules d'oxyde de fer[44] ou nanocristaux de cellulose[119][120]) ont été élaborés afin de cibler les tumeurs par effet EPR. Dans ce travail, nous nous proposons de développer un autre type de nanoparticules capable de vectoriser des principes actifs vers les cellules cancéreuses: les nanoparticules d'or. Elles ont l'avantage d'être facilement élaborées, d'avoir une taille facilement contrôlable, et d'être fonctionnalisables. Elles présentent également une faible toxicité et peuvent servir de plateforme thérapeutique en combinant une double action: par le principe actif transporté et par l'effet thermique.

Dans la première partie de ce travail, nous nous proposons d'élaborer des nanoparticules d'or de taille entre 20 et 100 nm capable de pénétrer de manière passive les tumeurs grâce à l'effet EPR. Les nanoparticules sont fabriquées et stabilisées par la PEI qui est également utilisée comme un agent de ciblage actif. La combinaison d'AuNPs et PEI permettra d'améliorer la sélectivité et l'internalisation dans les cellules cancéreuses Toutes ces nanoparticules ont été caractérisées par MET (Microscopie Electronique à Transmission), ATG, DLS et potentiel zêta. En parallèle les principes actifs anticancéreux (tanshinone IIA et α-mangostine) sont extraits et caractérisés puis encapsulés[121] dans les cyclodextrines (CD) préalablement fixées de manière covalente ou ionique aux AuNPs (Figure 37).

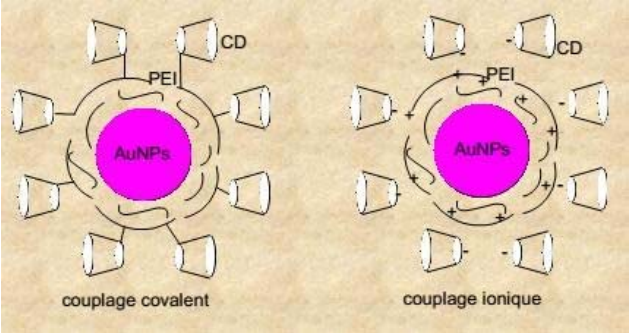


Figure 37 Schéma des complexes AuNPs/PEI/CD fixés de manières covalentes et ioniques

[118] Ndong Ntoutoume G. M. A., Granet R., Mbakidi J. P., Brégier F., Léger D. Y., Fidanzi-Dugas C., Lequart V., Joly N., Liagre B., Chaleix V., Sol V., *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **2016**, 26, 941-945.
[119] Drogat, N., Granet, R., Le Morvan C., Bégaud-Grimaud G., Krausz P. Sol, V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*
[120] , 22, 3648-3652
[121] Fan Y., Li J., Dong C., S*pectrochimica Acta Part A,* **2005**, 6, 135-140.

Dans une seconde partie, et dans le cadre de l'activité de recherche du LCSN sur la photothérapie dynamique anticancéreuse, nous nous proposons d'élaborer des nanoparticules d'or fonctionnalisées par des photosensibilisateurs naturels de type chlorine (Figure 38). Après l'extraction à partir d'une algue verte *Spirulina maxima*, suivie d'une modification chimique, la purpurine 18 (Pp18) est fixée de manière covalente à la PEI. Le composé obtenu est mis à réagir directement avec une solution de $HAuCl_4$ afin de préparer en une seule étape des nanoparticules sphériques fonctionnalisées par des photosensibilisateurs, ou mis en échange avec les nanoparticules triangulaires synthétisées avec thiosulfate de sodium.

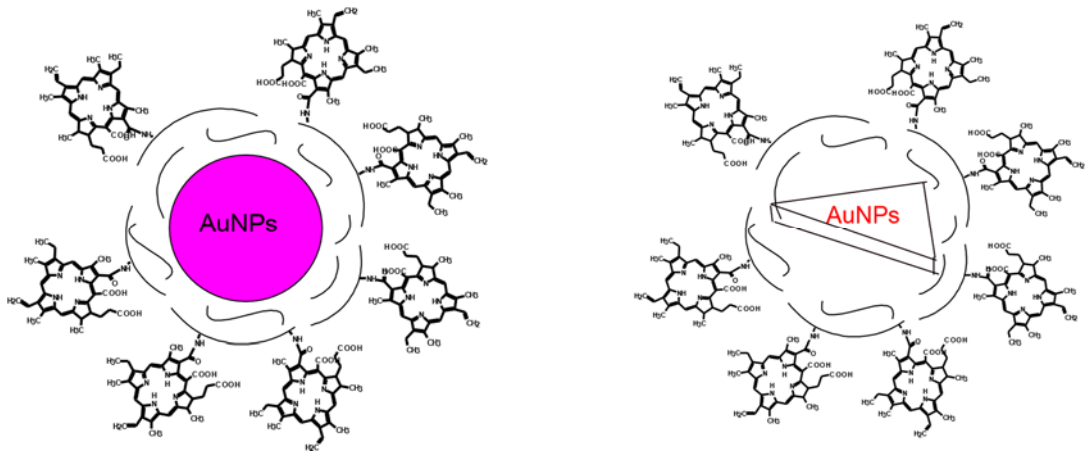


Figure 38 Les deux complexes AuNPs/PEI-SH/chlorine

Afin d'évaluer l'activité cytotoxique ou photocytotoxique des complexes obtenus, des essais biologiques préliminaires *in vitro* ont été réalisés sur certains produits. Ainsi les nanoparticules AuNPs/PEI/CD complexant la tanshinone IIA ou l'α-mangostine ont été évaluées sur les lignées cancéreuses prostatiques DU-145 et PC-3. L'étude de l'activité du complexe AuNPs/PEI portant les photosensibilisateurs a été réalisée sur la lignée colorectale HT29.

Chapitre II :
Résultats et discussion

Chapitre II. Résultats et discussion

II.1. Stratégie de synthèse

Trois stratégies de synthèse sont proposées afin de réaliser des nanovecteurs constitués d'or fonctionnalisés par la PEI et la cyclodextrine pour vectoriser des principes actifs d'intérêts au sein des cellules cancéreuses par effet EPR. Dans un autre part, les nanoparticules de l'or portant des chlorines sont préparées afin d'évaluer leurs photocytotoxicité.

II.1.1. Synthèse du complexe ionique AuNPs/PEI/CD

La première voie de synthèse est basée sur la formation d'une liaison ionique entre les cyclodextrines (CDs) et la PEI. La synthèse d'AuNPs, par réduction à l'aide de la PEI, permet de synthétiser des AuNPs qui possèdent une surface chargée positivement. Les β-CDs sulfatés, ayant une très bonne affinité avec les surfaces cationiques, sont couplées avec ces AuNPs par des forces électrostatiques (Figure 40).

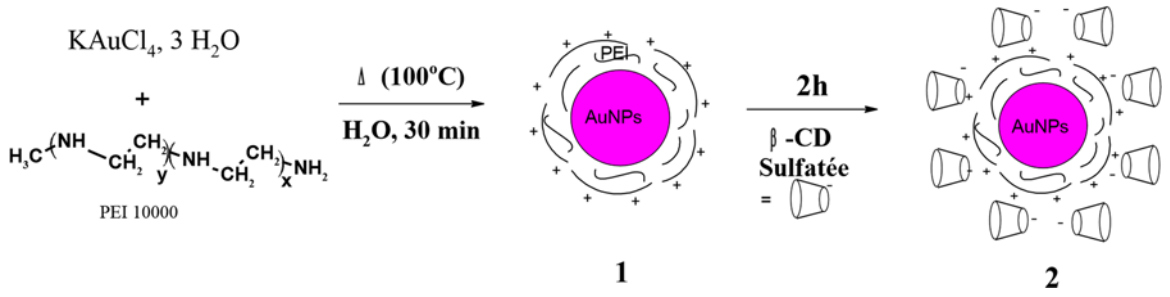


Figure 40 Voie I : synthèse de complexe AuNPs/PEI/CD ionique

Dans une seconde voie, les nanoparticules seront synthétisées à partir de polyéthylèneimine préalablement dérivatisée par des fonctions thiol afin d'améliorer la

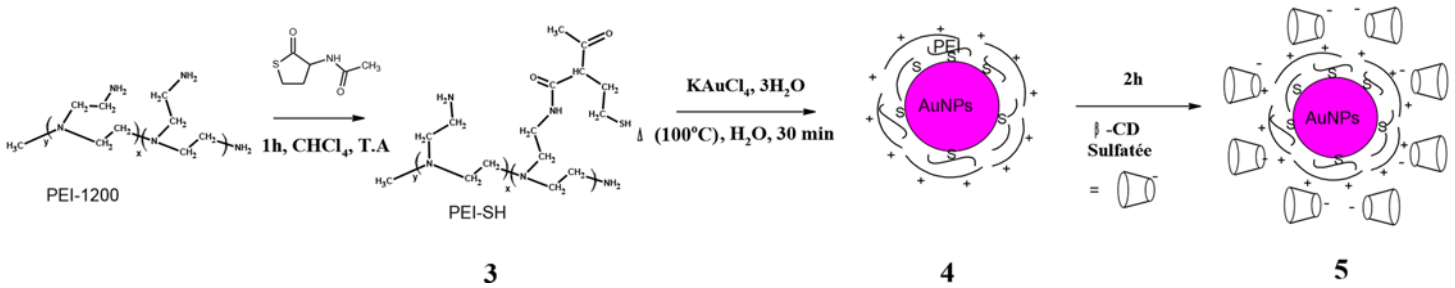
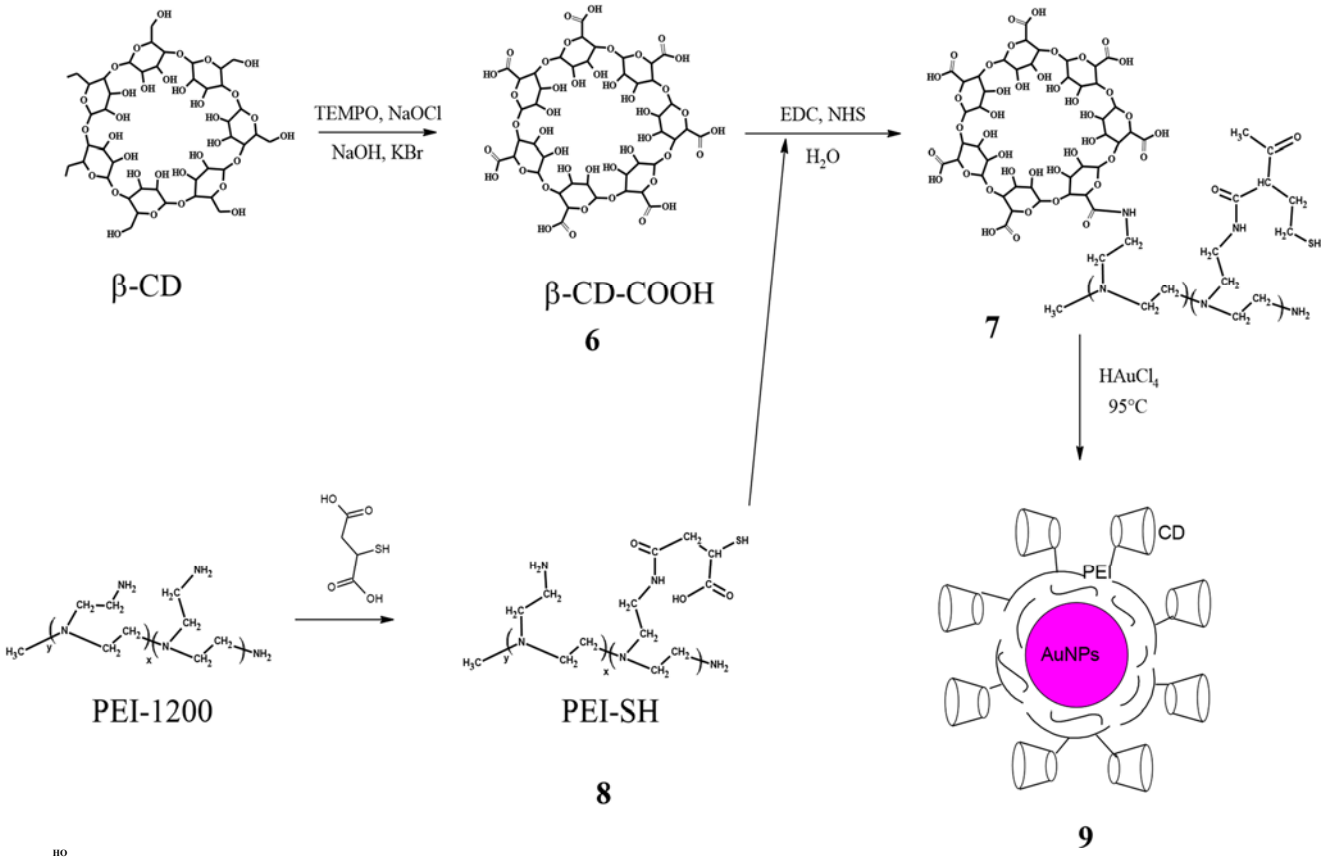


Figure 39 Voie II : synthèse des AuNPs par liaison ionique en utilisant les PEIs thiolées

stabilité des nanoparticules. En effet, les fonctions thiol présentent une meilleure affinité pour l'or que les fonctions amine. Les cyclodextrines sulfatées seront ensuite fixées, comme précédemment, au moyen d'interactions électrostatiques. (Figure 39).

II.1.2. Synthèse du complexe covalent AuNPs/PEI/CD

La troisième voie de synthèse consiste à synthétiser tout d'abord, la cyclodextrine oxydée afin de faire apparaitre des fonctions carboxyliques et la PEI fonctionnalisée par des fonctions thiols (PEI-SH). Ensuite, une liaison amide sera réalisée afin de relier les deux précurseurs et de former le complexe PEI-SH/CD. Finalement, le complexe AuNPs/PEI-SH/CD est synthétisé en utilisant le PEI-SH/CD comme réducteur et agent stabilisant. Par cette méthode, les CDs sont fixées par des liaisons covalentes (Figure 41), permettant d'immobiliser les CDs sur la surface d'AuNPs.



HO

HO

Figure 41 Voie III : Schéma de synthèse de complexe AuNPs/PEI/CD covalent

II.1.3. Encapsulation des principes actifs

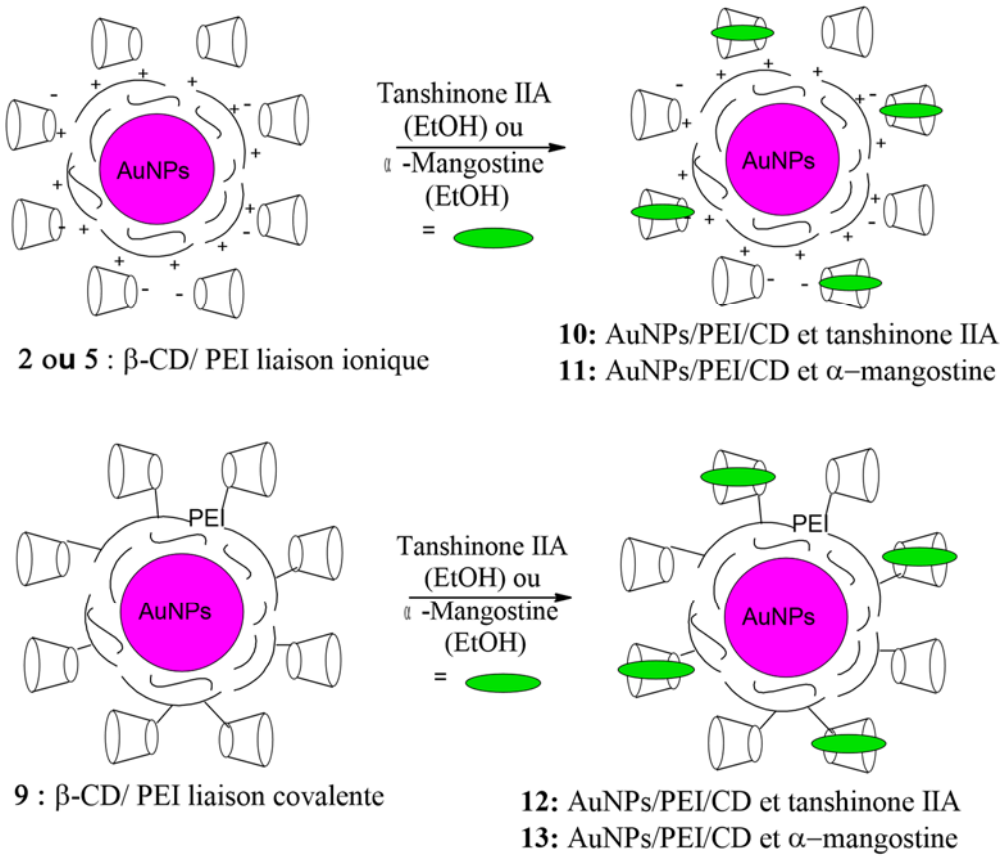
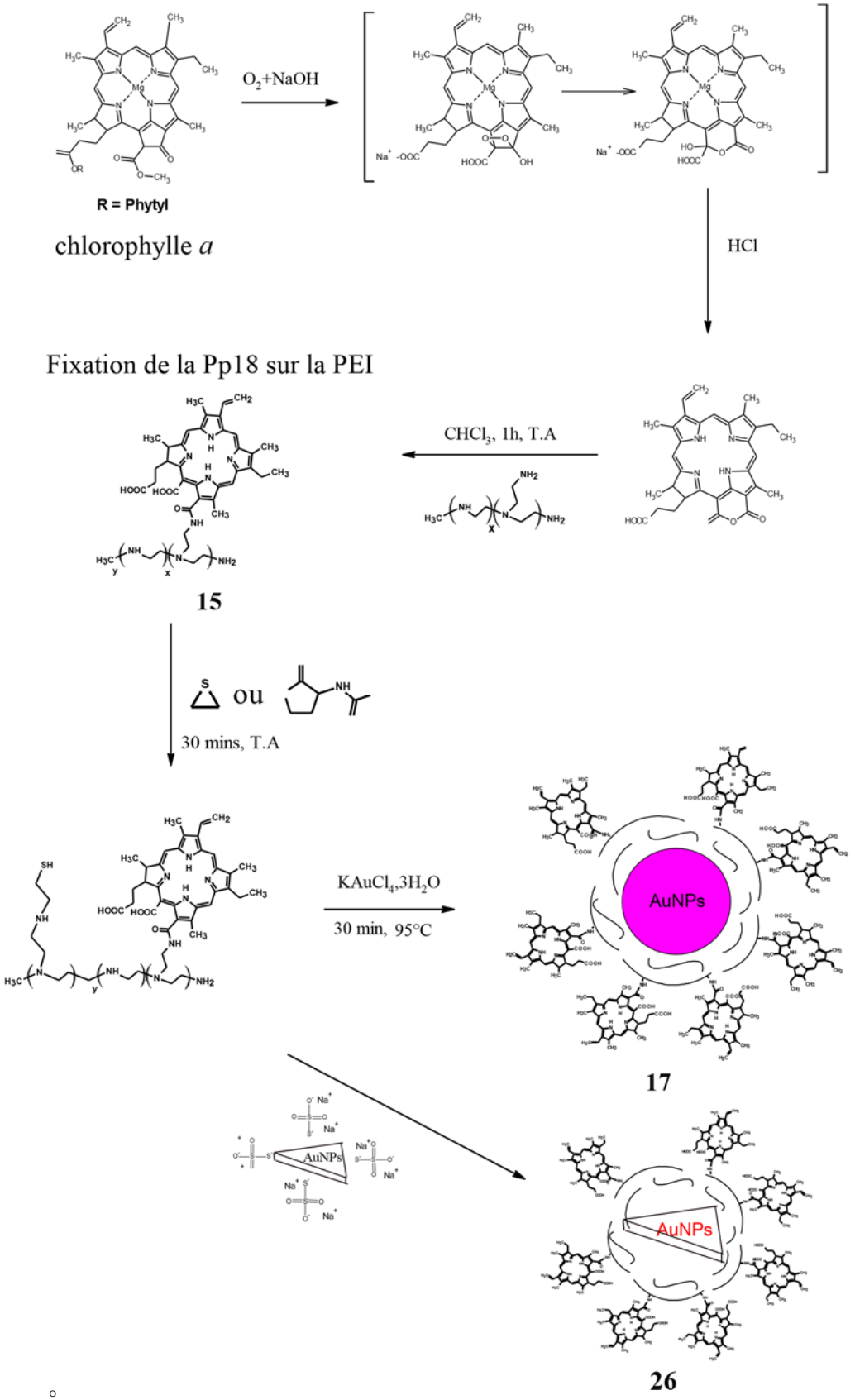


Figure 42 Encapsulation des principes actifs

L'encapsulation de principe actif est identique pour les complexes AuNPs/PEI/CD ioniques (**2** et **5**) et covalent (**9**). La tanshinone IIA et l'α-mangostine sont les deux molécules choisies afin d'être insérées dans la cavité hydrophobe des cyclodextrines (Figure 42).

Hémi-synthèse de la Purpurine18


R = Phytyl
chlorophylle *a*
O_2+NaOH
HCl
Fixation de la Pp18 sur la PEI
$CHCl_3$, 1h, T.A
15
ou
30 mins, T.A
$KAuCl_4,3H_2O$
30 min, 95°C
AuNPs
17
26

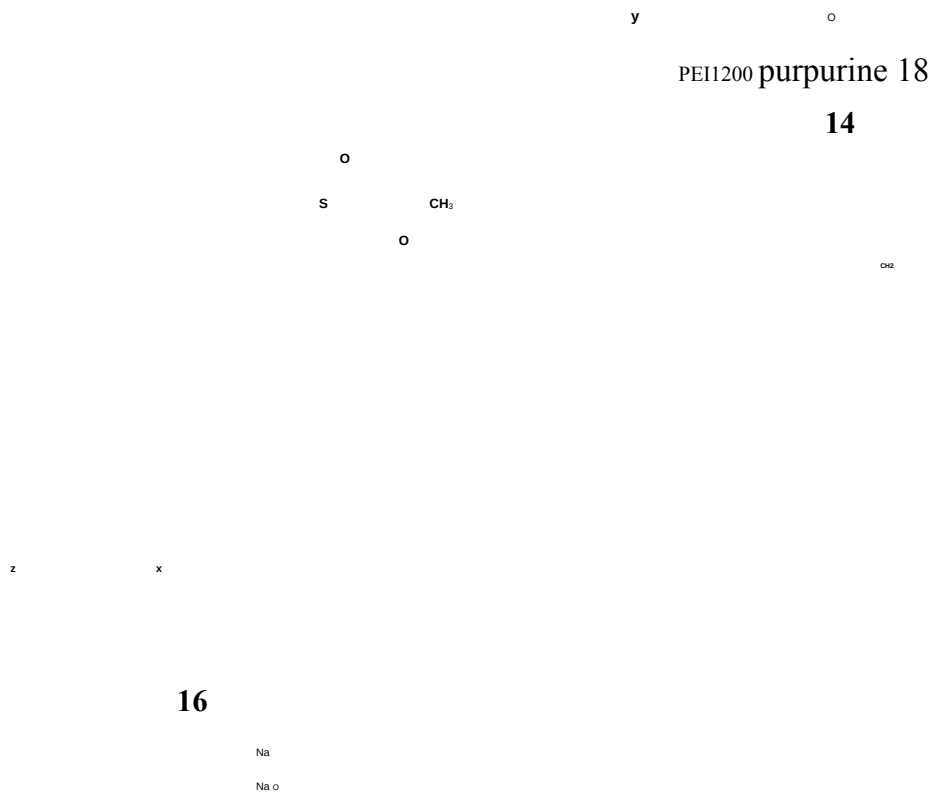


Figure 43 Voie IV : Schéma de synthèse de complexe AuNPs/PEI/chlorine (**17**)

II.1.4. Synthèse du complexe AuNPs/PEI/PS

Le schéma général de synthèse du complexe AuNPs/PEI-SH portant des photosensibilisateurs est représenté sur la Figure 43. Dans un premier temps, la purpurine 18 (Pp18) est obtenue, tout d'abord, par hémisynthèse en deux étapes. La chlorophylle *a* est, tout d'abord, extraite de la spiruline par l'acétone. Puis, en deux étapes « one pot », elle est transformée en Pp18. Une purification par chromatographie sur colonne permet d'isoler cette molécule (**14**)[126]. Elle possède une fonction anhydride exocyclique, très réactive vis-à-vis des nucléophiles tels que les amines présentes dans les PEIs[127]. Ainsi dans un second temps, la PEI, par une attaque nucléophile sur l'anhydride, provoque l'ouverture de l'exocycle et conduit à la formation du complexe PEI-SH/chlorine. Enfin, la PEI est fonctionnalisée par le sulfure d'éthylène ou la DL-N-acétylhomocystéine thiolactone afin de créer des fonctions thiols (**16**).

Dans un troisième temps, les nanoparticules sphériques (**17**) sont synthétisées à partir de sel d'or ($HAuCl_4$ ou $KAuCl_4$) en le chauffant en présence du complexe PEI-SH/chlorine en solution aqueuse (Figure 43). Parallèlement, les nanoparticules triangulaires portant des chlorine (**26**) sont réalisées par une stratégie d'échange d'agent stabilisant.

II.2. Extractions des principes actifs

Trois principes actifs (tanshinone IIA, α-mangostine et Purpurine 18) sont extraites à partir du milieu naturel et caractérisés par RMN, masse, IR et UV-Visible.

II.2.1. Extraction de tanshinone IIA (18)

Les tanshinones se trouvent dans la racine de *Salvia miltiorrhiza*. Dans la littérature, l'extraction des tanshinones et des autres composées hydrophobes sont réalisées en utilisant des alcools (éthanol ou méthanol). Au sein du LCSN, l'utilisation de l'acétone nous a permis de mieux solubiliser et d'extraire un certain nombre de composés hydrophobes[128]. Nous avons donc appliqué cette méthode d'extraction afin d'isoler la tanshinone IIA. Ainsi après des extractions successives à reflux. Le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est purifié d'abord par chromatographie sur colonne, puis par des plaques de gel de silice préparatives avec $CHCl_3$ pur comme éluant. A partir de 200g de racine, le produit **18** de couleur rouge est obtenu (420mg) avec un rendement 0,2%.

Le composé **18** est caractérisé par spectroscopie UV-Visible ($CHCl_3$) (Figure 44). On observe une large bande d'absorption vers 450nm, caractéristique de la tanshinone IIA.

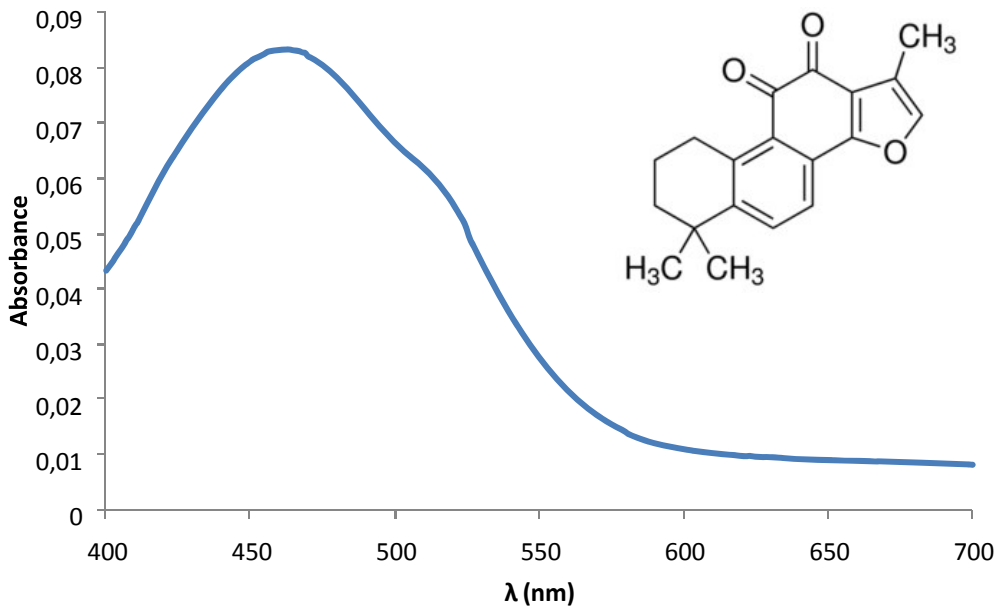


Figure 44 Spectre UV-Visible de tanshinone IIA (**18**) ($CHCl_3$)

Le spectre IR de Tan IIA (Figure 45) met en évidence la présence de deux signaux caractéristiques d'α-quinone (à 1670 et à 1690 cm^{-1} : deux bandes correspondant aux vibrations d'élongation du carbonyle).

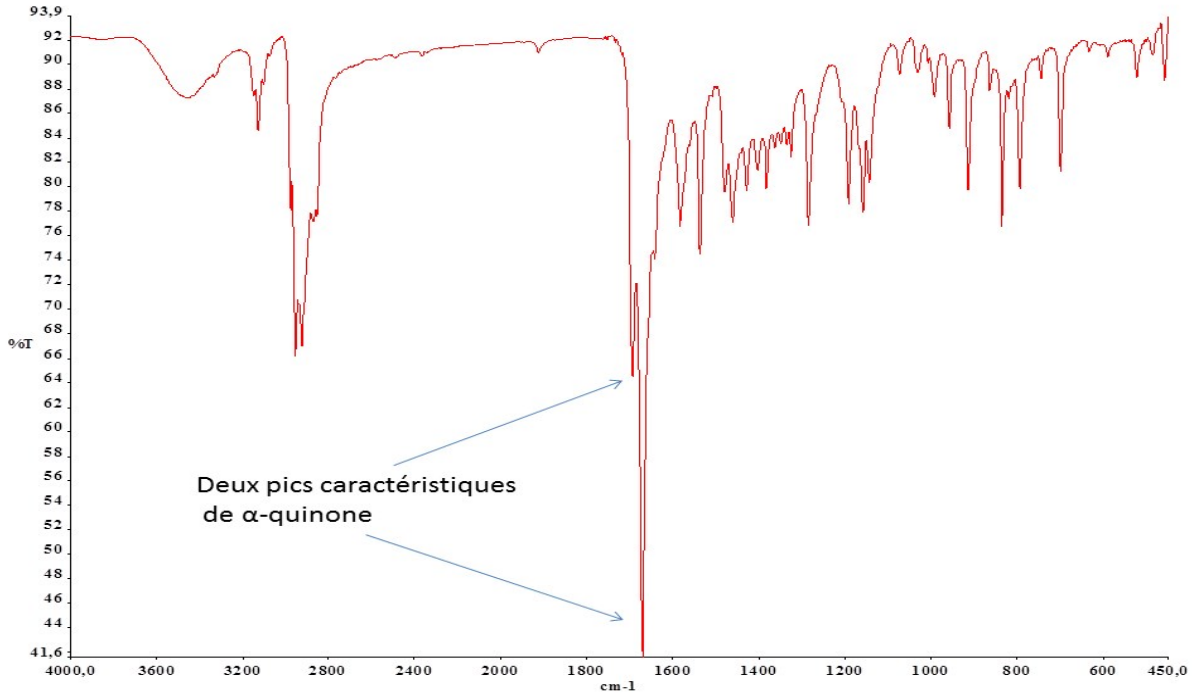
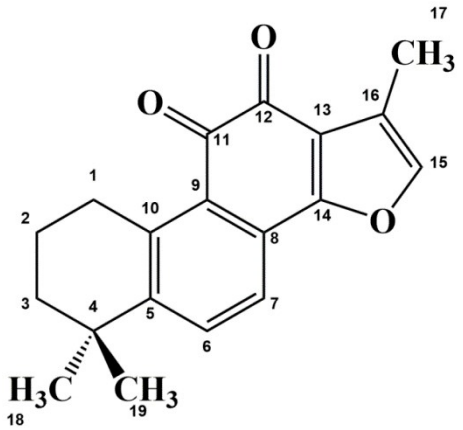


Figure 45 Spectre infrarouge de la tanshinone IIA (**18**)

Les données RMN^{1}H, dans $CDCl_3$ (Tableau 1), confirment également la structure de la molécule et sont conformes à la littérature[122]. On observe ainsi la présence de deux types de protons, les protons aromatiques H6, H7 et H15 avec un déplacement chimique supérieur à 5 ppm. Les protons liés à un carbone sp^3 du cycle entre 1,6 et 3,2 ppm. Les protons de groupes méthyles H18 et H19 résonnent quant à eux à 1,3 ppm sous la forme d'un singulet. Les protons du méthyle H17 qui sont plus déblindés, apparaissent sous la forme d'un singulet et résonnent vers 2,26 ppm.

Tableau 1 Numérotation de la tanshinone IIA (**18**) et données RMN^{1}H ($CDCl_3$)



Déplacement chimique δ (ppm)	Position	Nombre de H	Constant de couplage (Hz)	Figure
$H_{18,19}$ (CH_3)	6H	1,31	-	singulet
H_3 (CH_2)	2H	1,66	-	multiplet
H_2 (CH_2)	2H	1,79	-	multiplet
H_{17} (CH_3)	3H	2,26	-	singulet
H_1 (CH_2)	2H	3,17	6,4	triplet
H_{15}	1H	7,22	-	singulet
H_7	1H	7,53	8,1	doublet
H_6	1H	7,63	8,1	doublet

[122] Wu D., Jiang X., Wu S., *J. Spe. Sci.*, **2010**, 33, 67.

L'analyse par spectrométrie de masse ESI haute résolution (Figure 46) met en évidence la présence au pic m/z à 295,1332 qui correspond à la molécule protonée $[M+H]^+$ (valeur théorique : 295,1251).

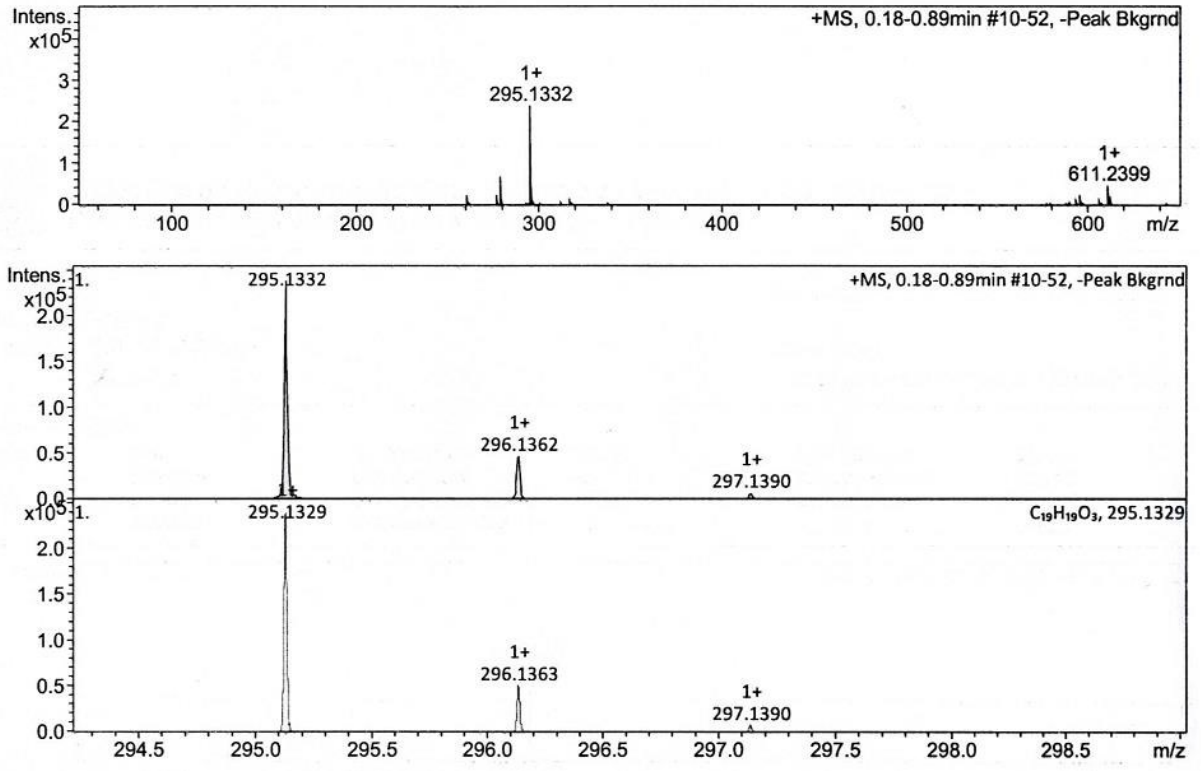


Figure 46 Spectre de masse (ESI) haute résolution de la tanshinone IIA (**18)**

II.2.2. Extraction de α-mangostine (19)

Les mangostines sont des composés hydrophobes qui peuvent être extraits par un solvant organique à partir d'un comprimés (enrichis en mangostine) de l'épicarpe du fruit de mangoustan [123] , fournis par « Nature's plus (USA) ». L'extraction est réalisée comme précédemment dans l'acétone à reflux. Le suivi par CCM (révélée par UV 240 nm) de la phase organique d'extraction permet de visualiser deux mangostines (éluant $CHCl_3$/éthanol : 95/5 ; α-mangostine Rf = 0,37 ; β–mangostine Rf = 0,76). Après évaporation du solvant, le brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice puis par plaques préparatives de silice. A partir de 5g de comprimés, 1g de produit **19** de couleur jaune est obtenu (rendement : 20%).

[123] Nguyen P.T.M., Falsetta M.L., Hwang G., Gonzalez-Begne M., Koo H., *PLoS ONE*, **2014**, 9, e111312.

La caractérisation de l'α-mangostine (**19**) a été réalisée par spectroscopie UV-Visible, spectroscopie IR, spectrométrie de RMN^{1}H et de masse. Les résultats sont conformes à la littérature et permettent de confirmer la structure du composé[124].

L'α-mangostine (**19**) est une molécule aromatique qui absorbe dans l'UV. L'analyse du spectre d'absorption UV-Visible ($CHCl_3$) met en évidence la présence de deux bandes d'absorption caractéristiques de la molécule à 312 nm et à 380 nm (Figure 47).

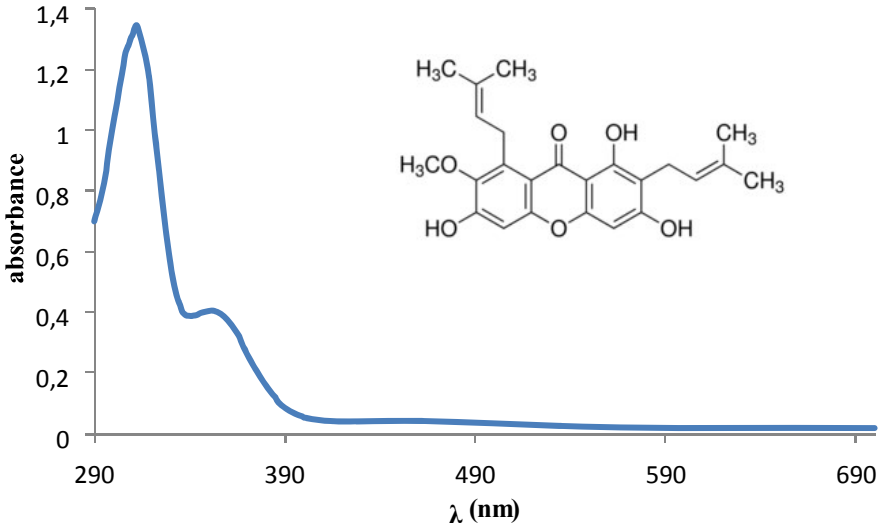


Figure 47 Spectre UV-Visible de l'α-mangostine (**19**) ($CHCl_3$)

Le spectre IR de composé **19** (Figure 48) montre la présence des bandes caractéristiques des fonctions hydroxyles et d'une vibration d'élongation de la fonction cétone de la mangostine. Il existe une liaison H intramoléculaire entre la fonction hydroxyle en position 1 et le C=O en position 9; une vibration d'élongation à 3418 cm^{-1} est spécifique pour ce type de fonction hydroxyle. On observe une bande à 3254 cm^{-1}, qui correspond aux vibrations d'élongation des liaisons O-H phénoliques sans liaison hydrogène en position 3 et 6. La vibration d'élongation de la fonction carbonyle est présente à 1610 cm^{-1} et on observe deux bandes correspondantes aux vibrations de déformation des liaisons O-H (1583 cm^{-1}et 1640 cm^{-1}).

[124] Chen L.-G., Yang L.-L., Wang C.-C., *Food Chem. Toxicol.*, **2008**, 46, 688-693.

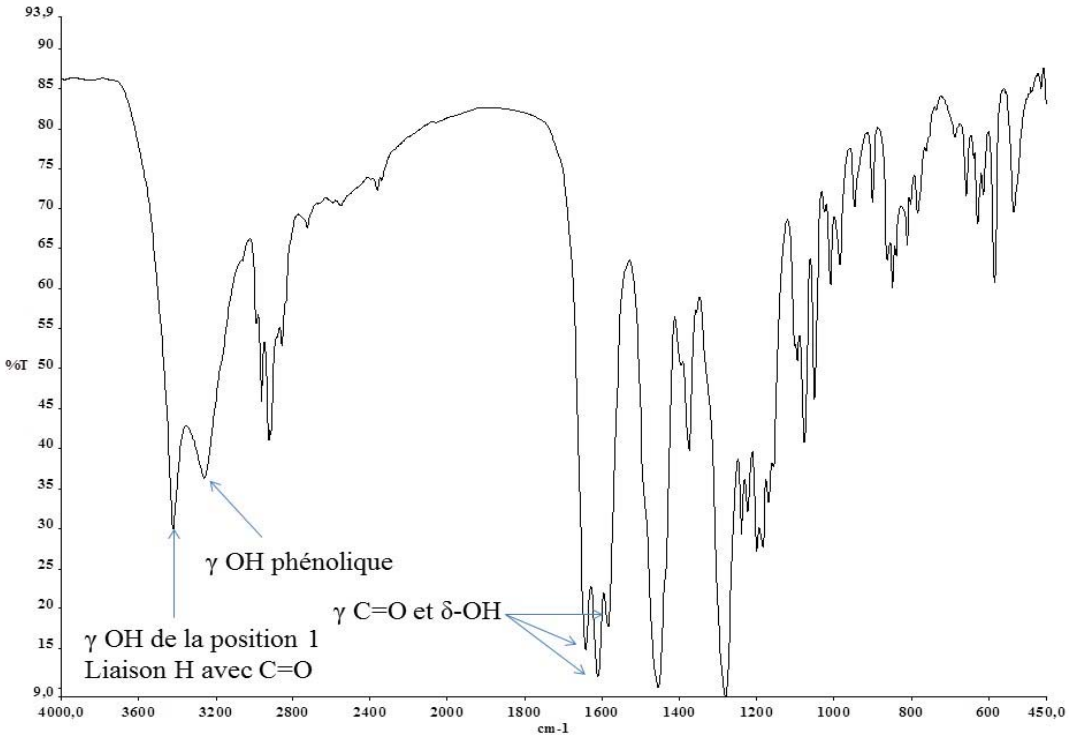
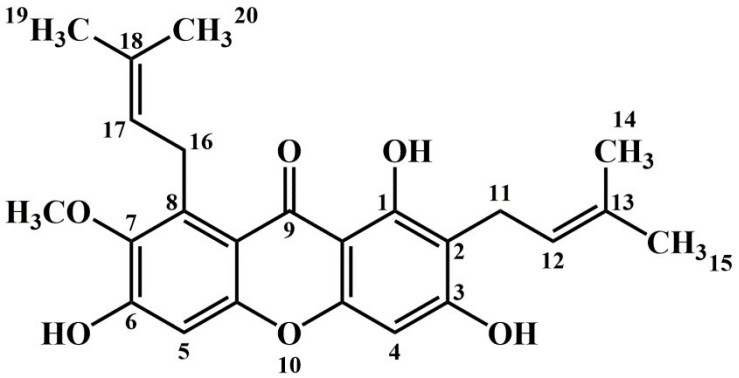


Figure 48 Spectre infrarouge de l'α-mangostine (**19**)

L'étude du spectre RMN^{1}H (Tableau 2) dans $CDCl_3$ de l'α-mangostine (**19**) met en évidence la présence de signaux caractéristiques :

- les protons H4, H5 apparaissent sous la forme d'un singulet et résonnent respectivement à 6,29 ppm et 6,82 ppm.
- le proton d'une seule fonction OH est observé à 13,77 ppm sous la forme d'un singulet. Il correspond à la fonction hydroxyle qui se trouve en β d'une fonction carbonyle et qui forme ainsi une liaison hydrogène intramoléculaire.
- Les protons des groupes méthyles : les protons des groupes méthyles des fonctions méthoxy, les plus déblindés, résonnent sous la forme d'un singulet à 3,81 ppm. Par contre, les protons des quatre méthyles résonnent, quant à eux, entre 1,69 et 1,84 ppm sous la forme de quatre singulets.
- On observe également les protons du CH_2 qui résonnent à 3,45 ppm sous la forme d'un doublet (constante de couplage de 6,6 Hz).

Tableau 2 Numérotation de l'α-mangostine (**19**) et ses données RMN^{1}H ($CDCl_3$)



Position	Nombre de H	Déplacements chimiques δ (ppm)	Constantes de couplage (Hz)	Figures
OH_1	1H	13,77	-	singulet
H_5	1H	6,82	-	singulet
H_4	1H	6,29	-	singulet
H_{17}-H_{12}	2H	5,29	-	multiplet
H_{16}	2H	4,09	5,4	doublet
OCH_3 (7)	3H	3,81	-	singulet
H_{11}	2H	3,45	6,6	doublet
H_{19}	3H	1,84	-	singulet
H_{20}	3H	1,83	-	singulet
H_{14}	3H	1,77	-	singulet
H_{15}	3H	1,69	-	singulet

Le spectre de masse met en évidence la présence d'un pic $[M-H]^-$ à 409,3 (Figure 49) qui correspond au composé **19** (M=410,45) et un pic à 819,5 qui correspond à un dimère noncovalent ionisé du composé **19**.

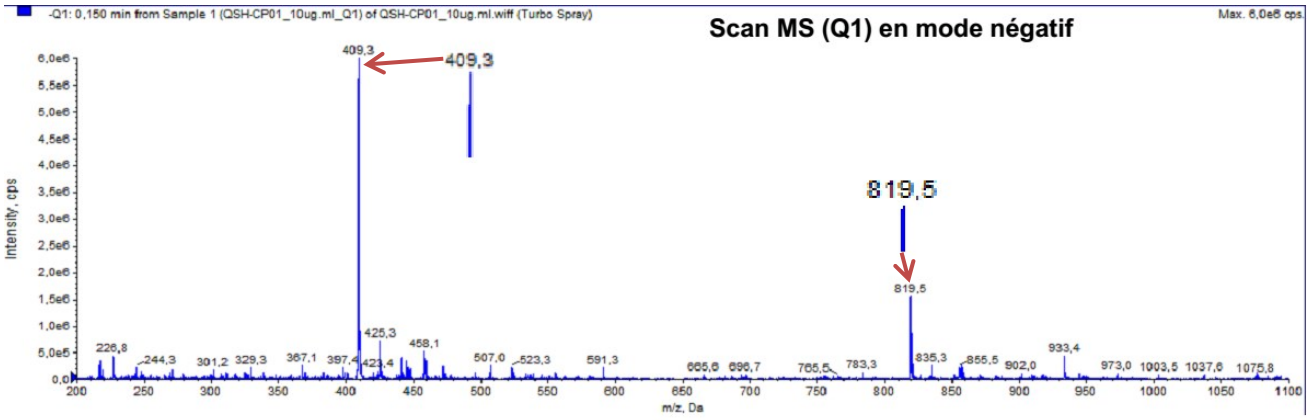


Figure 49 Le spectre de masse (ESI) de l'α-mangostine (**19**)

II.2.3. Synthèse et caractérisation du photosensibilisateur

II.2.3.1 Extraction de la chlorophylle *a* et hémisynthèse de la purpurine 18 (14)

La chlorophylle *a* est une molécule appartenant la famille des macrocycles tétrapyrroliques qui est très abondante dans un grand nombre d'espèces végétales et qui présente dans son spectre d'absorption (Figure 50), une bande de forte intensité à 662 nm. Cette molécule peut ainsi, être une très bonne candidate pour une utilisation comme photosensibilisateur en PhotoThérapie Dynamique (PDT) anti-cancéreuse.

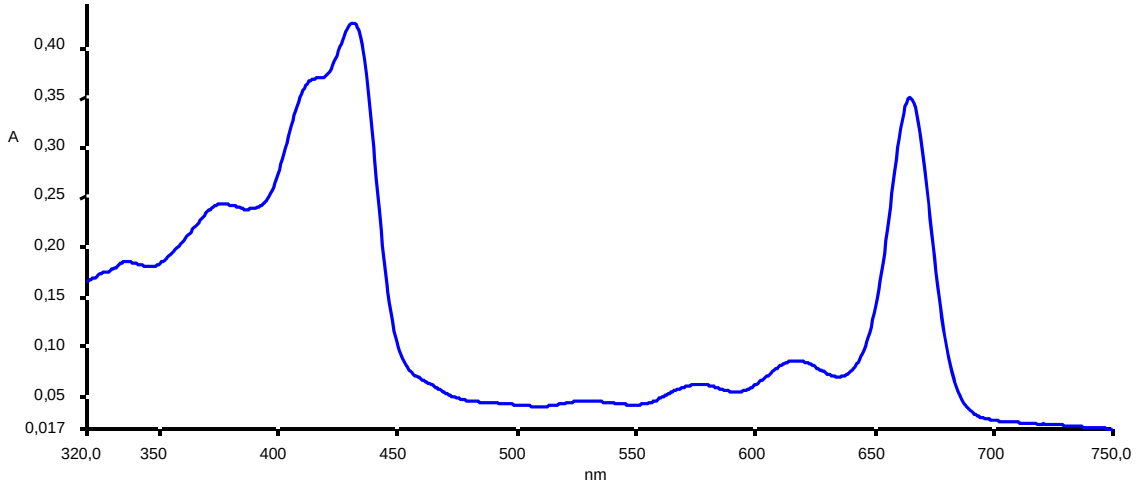


Figure 50 Absorption UV-Visible de chlorophylle *a* ($CHCl_3$)

Cependant, la chlorophylle *a* qui se trouve dans les chloroplastes est entourée par d'autres pigments (caroténoïde, xanthophylles…) qui lui confère sa stabilité. Par contre lorsque

la molécule est isolée de son environnement, on a observé une rapide dégradation en quelque heure. Et, en présence d'acide ou de base, elle forme un produit appelé pyrophéophorbide. En raison de cette instabilité, l'utilisation directe de la chlorophylle *a* en tant que photosensibilisateur en PDT n'est pas possible.

Nous nous sommes ainsi attachés, au cours de ce travail, à réaliser l'extraction puis la modification chimique de la molécule de chlorophylle *a* afin d'obtenir un composé stable capable d'être utilisé en PDT anti-cancéreuse. Grâce aux travaux du Dr. N. Drogat et *coll.* [126], au sein du LCSN, une méthode optimisée a été mise au point. Elle consiste tout d'abord à extraire à partir d'une cyanobactérie ou algue bleue, appelée *Spirulina maxima,* la chlorophylle *a*. Cette dernière est traitée en milieu basique (NaOH) suivie d'une oxydation à l'air. Enfin, une démétallation en milieu HCl conduit à la formation de la purpurine 18 (Pp18) (Figure 51). Ainsi en portant de 30 g de *Spirulina maxima*, 160 mg de Pp18 sont obtenus (0.6% de rendement).

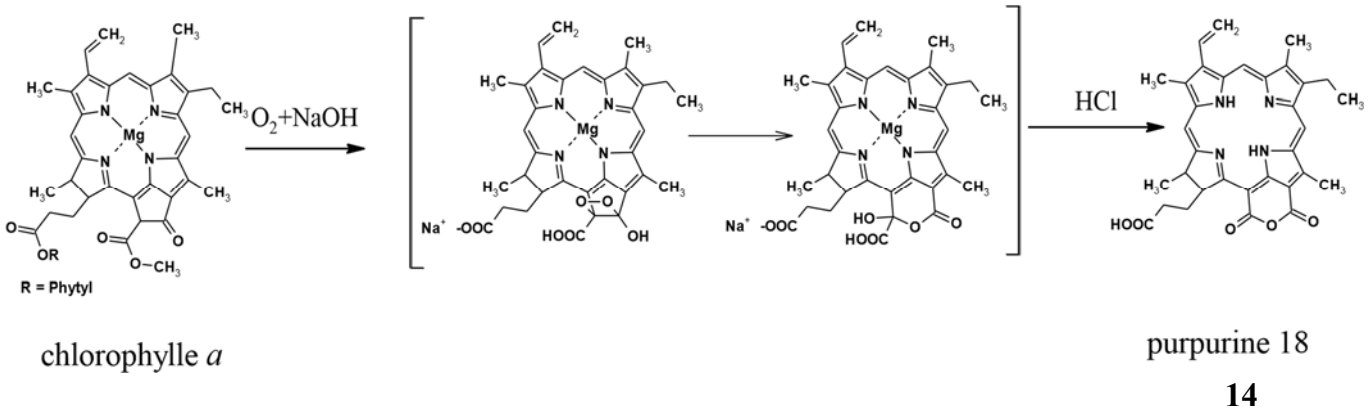


Figure 51 Hémi-synthèse de la Pp18 (**14**) à partir de chlorophylle *a*

II.2.3.2 Caractérisations de la Pp 18 (14)

Le composé **14** a été caractérisé par spectroscopie UV-Visible et spectrométrie de RMN^{1}H et masse.

- **spectre UV-Visible**

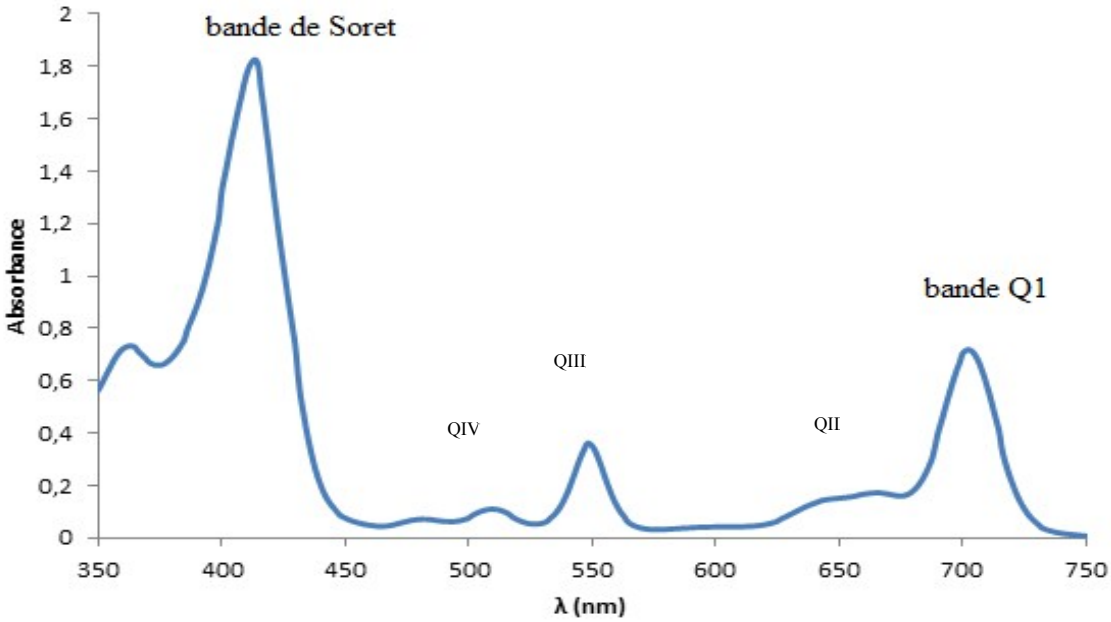


Figure 52 Spectre UV-Visible de la Pp18 (**14**) ($CHCl_3$).

Le spectre UV-Visible de la purpurine 18 est conforme à la littérature (Figure 52)[55]. On observe classiquement une forte bande d'absorption vers 410 nm appelée bande de Soret et quatre bandes de plus faible intensité appelées bandes Q. L'intensité plus importante de la bande QI est caractéristique d'un photosensibilisateur de type chlorine, et un déplacement de sa longueur d'onde d'absorption vers la zone rouge (701 nm au lieu de 662 nm) est caractéristique de la présence d'une contrainte stérique liée à la présence de l'exocycle sur la Pp18 par rapport à la chlorophylle *a*.

Sur le spectre UV-Visible, on observe plusieurs maxima d'absorptions (Tableau 3).

Tableau 3 Maximum d'absorption (ε) de chaque longueur d'onde [λ en nm ($\varepsilon*10^{-3}$)]

	Soret	QIV	QIII	QII	QI
Chl a	418 (111,7)	508 (6,5)	536 (8,1)	608 (9,1)	662 (32,3)
Pp18 (**14**)	413 (108,0)	510(5,8)	548 (21,3)	646 (8,0)	701 (41,4)

- **Spectre de masse**

L'analyse structurelle de la Pp18 (**14**) a été poursuivie par l'étude du spectre de masse (ESI) (Tableau 4). On observe ainsi la présence du pic de produit $[M+H]^+$ à 565,24455 qui est majoritaire.

Tableau 4 Analyse du spectre de masse (ESI) de la Purpurine 18 (**14**)

Photosensibilisateur	Formule brute	Masse molaire	Masse trouvé $[M+H]^+$
Pp 18	$C_{33}H_{32}N_4O_5$	564,63098	565,24455

- **Spectre de RMN^{1}H de la purpurine 18 (14)**

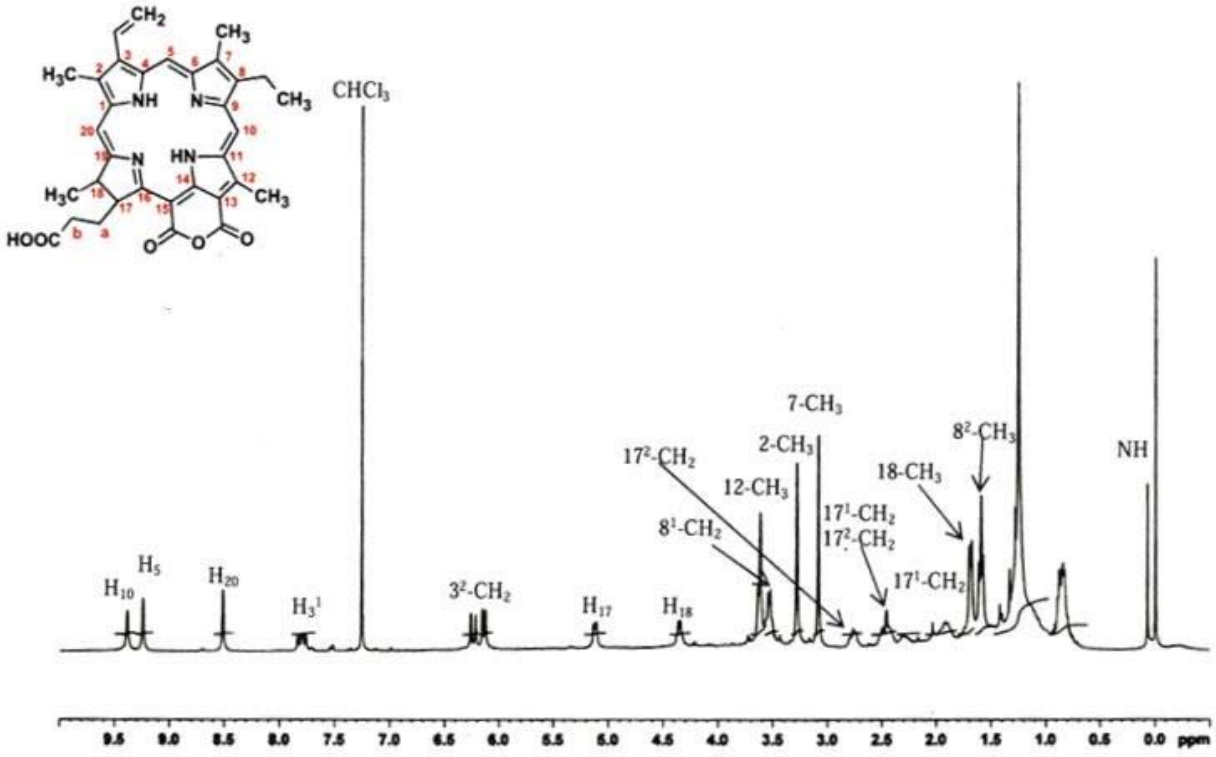


Figure 53 Spectre RMN^{1}H de Pp18 ($CDCl_3$)

A la différence des photosensibilisateurs de synthèse, la Pp18 ne présente pas d'élément de symétrie. De manière générale, le RMN du proton (Figure 53) de ce composé comprend la famille de signaux suivants (Tableau 5):

Tableau 5 les valeurs du RMN^{1}H de la Pp18(**14**) ($CDCl_3$)

Déplacements Constantes Nombre de

Position		H	chimiques (ppm)	de couplage (Hz)	Figures
Pyrrole	**H_5**	1H	9,54	-	s
$H_{méso}$	**H_{10}**	1H	9,33	-	s
	H_{20}	1H	8,55	-	s
Vinyle	**3-CH**	1H	7,86	17,0 et 11,4	dd
	CH_2 (cis)	1H	6,28	17,0 et 1,0	dd
	CH_2 (trans)	1H	6,19	11,4 et 1,0	dd
Ethyle	**CH_2**	2H	3,59	6,6	q
	CH_3	3H	1,65	6,8	t
méthyles	**2-CH_3**	3H	3,32	-	s
	7-CH_3	3H	3,15	-	s
	12-CH_3	3H	3,72	-	s
	18-CH_3	3H	1,73	6	d
CH_{17}	**H_{17}**	1H	5,15		m
CH_{18}	**H_{18}**	1H	4,39	6	q
17-CH_2(a)	**a**	1H	2,7		m
	a	1H	2,46		m
CH_2(b)-COOH	**b**	1H	2,35		m
	b	1H	1,97		m
$NH_{interne}$	**NH**	1H	0,07		s
	NH	1H	0,00		s

- Les protons des positions *méso* résonnent vers 9 ppm ou plus.
- Les protons des positions vinyles sont observés entre 6,0 et 8,0 ppm.
- Les protons des positions éthyliques résonnent entre 1,5 et3,7 ppm.
- Les deux protons de NH internes sont observés entre -3 et 0,2 ppm.

- Les protons des positions méthyliques résonnent entre 1,7 et 3,5 ppm.
- Les autres positions des protons (H-17 et -18).

On a observé, sur le spectre de la purpurine enregistré dans chloroforme deutéré (Tableau 5), des protons des positions *méso* 5, 10, 20, qui résonnent respectivement à 9,54, 9,33, 8,55 ppm sous la forme de trois singulets et les deux protons vinyliques CH_2 qui résonnent sous la forme de double doublet à 6,28 ppm (J =17,0 Hz, 1,0 Hz) et 6,19 ppm (J =11,4Hz ; 1,0Hz). Les deux protons vinylique CH résonnent à 7,86 sous la forme d'un double doublet (J =17,4 Hz, 11,4 Hz). Quant aux protons éthylique, la figure du CH_2 est un quadruplet à 3,59 ppm (J =6,6 Hz) et d'un triplet, pour CH_3, à 1,65 ppm (J =6,8 Hz). Les protons des méthyles résonnent sous la forme de trois triplets (3,72, 3,32, 3,15 ppm) et un doublet à 1,73 ppm (J =6,8 Hz), il est couplé au proton H-18 qui se présente sous la forme d'un quadruplet à 4,39 ppm (J =6,0 Hz). Le proton H-17, résonne quant à lui sous la forme d'un multiplet à 5,15 ppm. Les protons des positions CH_2 de la chaine latérale 17-a et 17-b, apparaissent sous la forme de multiplet à 2,70, 2,46, 2,35, 1,97 ppm. Quant aux NH internes, qui ne sont pas équivalents, ils résonnent sous la forme de deux singulets à 0,07 et 0,00 ppm.

II.3. Modification de la β-cyclodextrine

La molécule de cyclodextrine ne possède que des fonctions alcool. Afin de fixer cette dernière, de manière covalente à la PEI et par conséquent aux nanoparticules d'or, des modifications chimiques de cet oligosaccharide ont été réalisées.

II.3.1. Synthèse de la β-cyclodextrine *per*-iodée (20)

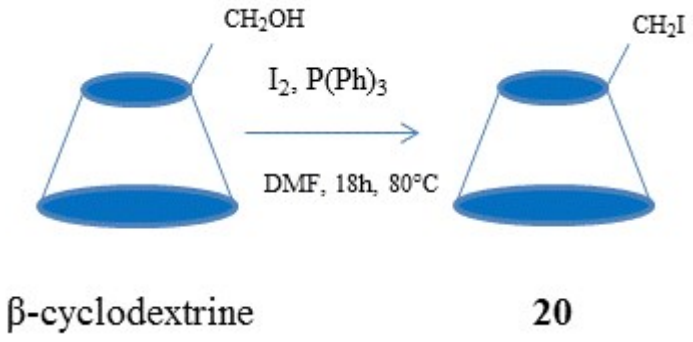


Figure 54 Schéma de synthèse de la cyclodextrine *per*-iodée

Afin de réaliser une substitution nucléophile entre la cyclodextrine et les fonctions amine primaire de la PEI, nous avons choisi de fixer des halogènes sur la β-cyclodextrine. Ainsi,

l'iodation de la β-cyclodextrine a été réalisée [125] en présence de diode et de triphénylphosphine dans le DMF à 80°C, pendant 18h (Figure 54). Cette réaction permet de substituer uniquement les alcools primaires des unités de glucose. Le mécanisme (Figure 55) met en jeu dans une première étape, une attaque nucléophile de la triphénylphosphine conduisant à la formation du composé (**21**). Le sel de phosphonium réagit ensuite avec la fonction alcool primaire du glucose pour conduire à la formation d'un dérivé glucidique iodé, de l'oxyde de triphénylphosphine et HI. Après 18h de réaction, une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol (MeONa/MeOH) permet de neutraliser le milieu réactionnel.

Après précipitation de la cyclodextrine halogénée par addition d'éthanol absolu, le produit (**20**) est purifié par une série de dissolutions/précipitations dans le mélange DMF/éthanol. Le rendement de la réaction est de 45%.

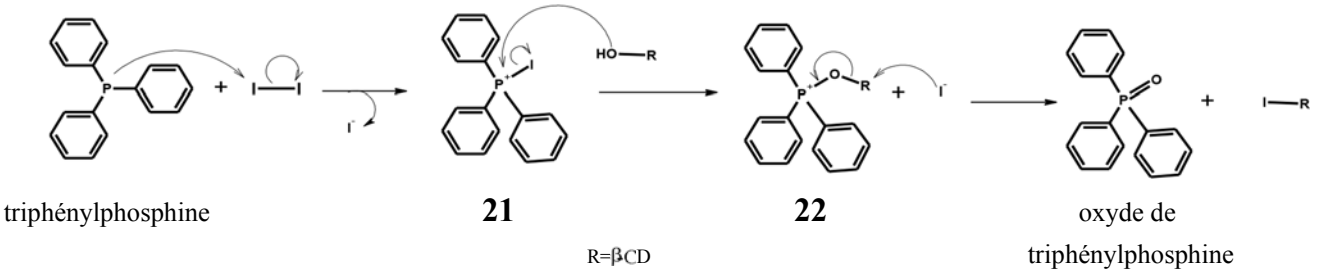


Figure 55 le mécanisme de la réaction d'iodation

La fixation de la cyclodextrine iodée (**20**) sur la PEI est réalisée dans le DMF. Une polymérisation est observée après quelques heures de réaction. Un produit insoluble est finalement obtenu, probablement lié au degré de substitution de l'iodation trop important. La synthèse des AuNPs par cette voie est finalement abandonnée. Par la suite, la voie consistant à oxyder la cyclodextrine par le TEMPO est utilisée afin de remplacer cette méthode.

[125] Adeli M., Kalantari M., Zarnegar Z., Kabiri R., *RSC Adv.*, **2012**, 2, 2756-2758.

II.3.2. Synthèse de la β-cyclodextrine (β-CD) oxydée (6) par le TEMPO

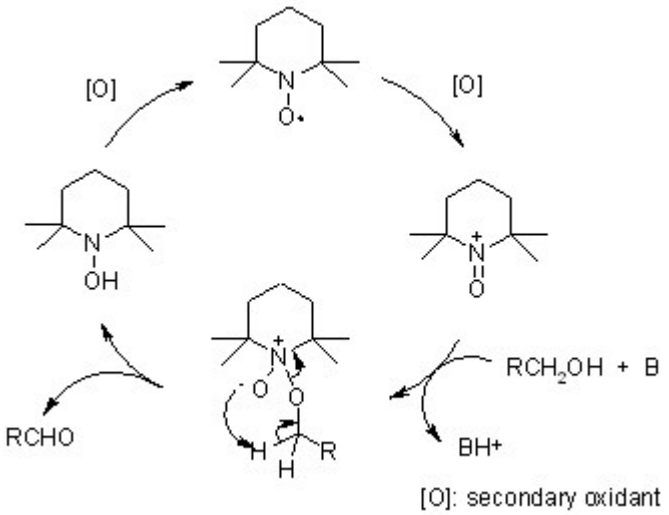


Figure 56 Mécanisme d'oxydation d'alcool primaire par le TEMPO

L'oxydation par le 2,2,6,6–tétraméthylpiperidine–1–oxyl radical (TEMPO) a été réalisée par Lebedev et Kazarnowskii en 1960[126]. Le mécanisme réactionnel est proposé par M. Angelin et coll. (2006)[127]. Le mécanisme est présenté sur la Figure 56. Cette oxydation de la β-CD est régiosélective[137]. Seule la fonction alcool primaire en position 6 est oxydée en fonction acide carboxylique (Figure 57).

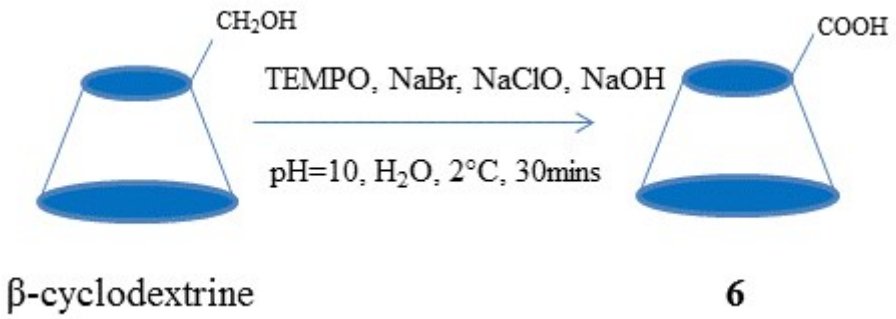


Figure 57 Schéma d'oxydation de la β-cyclodextrine

La β-CD est mise à réagir dans une solution de soude à pH 10 en présence de TEMPO, NaBr, NaClO. Après 30 minutes de réaction à 2°C, le mélange réactionnel est purifié par dialyse pendant 2 jours. La cyclodextrine oxydée (**6**) soluble dans l'eau est obtenue, après évaporation de l'eau, avec un rendement 70%. Le degré de substitution en fonction acide carboxylique est déterminé par un dosage acido-basique. Il permet de montrer que, dans les conditions

[126] Lebedev O. L., Kazarnovskii S. N., *Zhur. Obshch. Khim.* **1960**, 30, 1631–1635.
[127] Angelin M., Hermansson M., Dong H., Ramström O., *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 4323-4326.
[137] Fraschini C., Vignon M. R., *Carbohydr. Res.*, **2000**, 328, 585-589.

expérimentales utilisées, deux unités (sur sept) d'anhydroglucose sont oxydées par molécule de β-cyclodextrine (D.S=2).

II.3.3. Caractérisations des cyclodextrine modifiées (6) et (20)

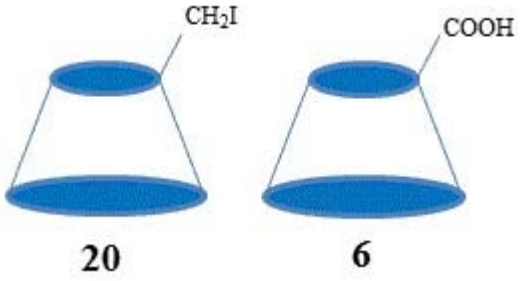


Figure 58 Schéma des cyclodextrines modifiées **6** et **20**

Les deux cyclodextrines modifiées (**6**) et (**20**) (Figure 58) sont caractérisées par spectroscopie Infrarouge (Figure 59) et spectrométrie RMN^{1}H.

➢ Spectre Infrarouge

L'étude de la comparaison des spectres IR de la β-CD et des deux β-CD modifiées (**6**) et (**20**) permet d'observer les bandes d'absorptions suivantes et de mettre en évidence la modification chimique :

- Vers 3300 cm^{-1}, on observe les vibrations d'élongation des fonctions O-H.
- A 2900 cm^{-1}, les vibrations d'élongation des liaisons ν C-H.

- Vers 1650 cm^{-1}, la vibration de déformation δ O-H. Sur le spectre de la β-CD oxydée, on observe l'apparition d'une bande à 1605 cm^{-1}, qui correspond la fonction carboxylate COO$^-$.

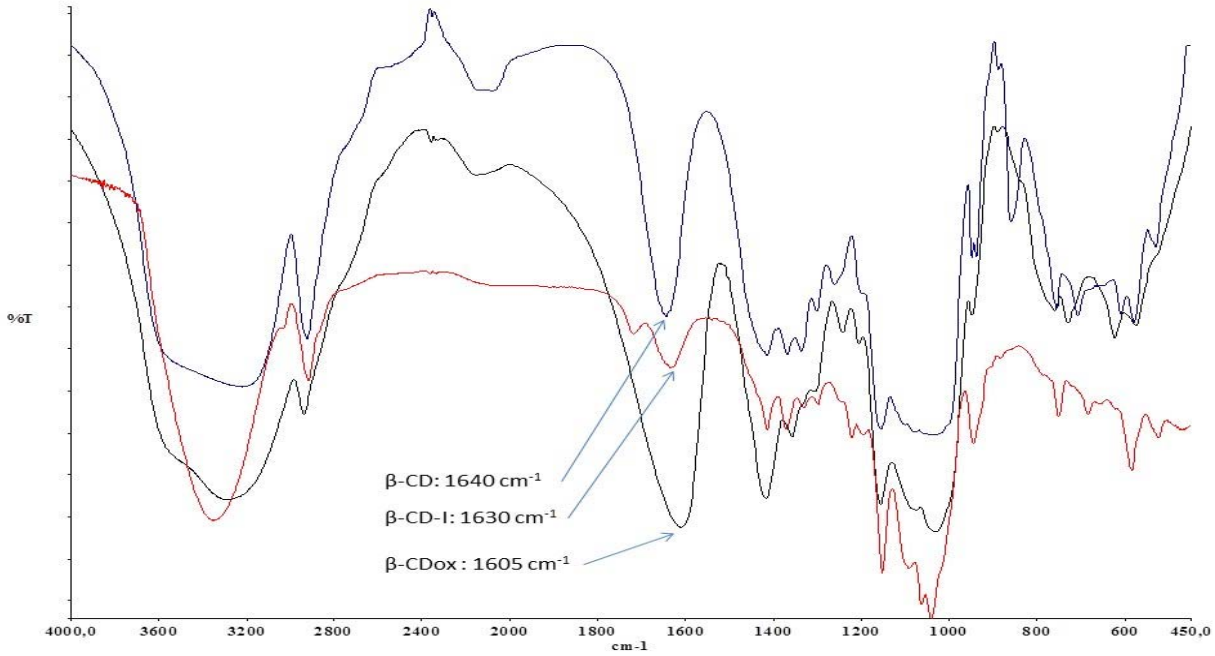


Figure 59 Spectres IR de la β-CD (en bleu), de la β-CD iodée (**20**) (en rouge) et de la β-CD oxydée (**6**) (en noir).

L'observation et la comparaison des spectres RMN^{1}H de la β-CD et de ses dérivés **6** et **20** dans le DMSO deutéré montre très peu de différences significatives. On observe la présence des protons des unités glucidiques pour la cyclodextrine commerciale et le composé iodé (**20**). Néanmoins, l'analyse du spectre oxydé (**6**) montre une modification de l'intégration des protons CH_2 en position 6 qui est de 1,4 pour le composé **6** au lieu de 2 pour le composé commercial. Ce résultat montre que cette diminution du nombre de proton CH_2 traduit une oxydation en moyenne de deux unités glucidiques sur les sept glucoses constituant la βcyclodextrine.

II.4. Synthèses et fonctionnalisations des nanoparticules d'or

La synthèse de nanoparticules d'or consiste tout d'abord à réduire un sel d'or trivalent Au^{III+} en Au^0 par un agent réducteur, puis de maintenir la taille entre 1 et 100 nm en utilisant un agent stabilisant. Les réducteurs couramment utilisés sont le borohydrure de sodium[128], l'hydroxylamine et l'ascorbate de sodium. Les agents stabilisants sont très variés. L'affinité la plus forte est observée pour les fonctions thiol (*ex* acide lipoïque, acide thiomalique). Les fonctions carboxyliques ont aussi de bonnes affinités avec les AuNPs. On trouve également des ammoniums quaternaires comme le CTAB[129], ou le CTAC dans cette catégorie. Certaines

[128] Tréguer-Delapierre M., Majimel J., Mornet S., Duguet E., Ravaine S., *Gold bulletin*, **2008**, 41, 195-207.
[129] Smith D. K., Miller N. R., Korgel B. A., *Langmuir*, **2009**, 25, 9518-9524.

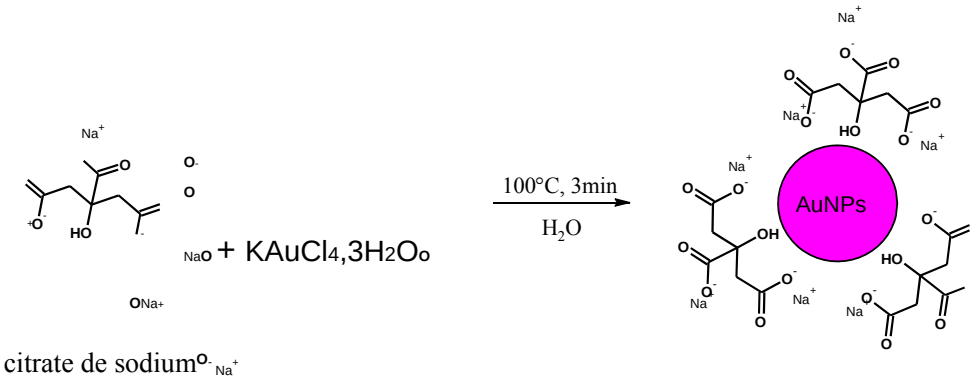
molécules peuvent jouer à la fois le rôle de réducteur et le rôle d'agent stabilisant, comme les polyamines (*e.g* PEI), le thiosulfate de sodium, le citrate de sodium et le chitosan[130].

II.4.1. Synthèses des nanoparticules d'or sphériques

La première synthèse des nanoparticules d'or a été réalisée par la méthode classique qui utilise le citrate de sodium afin de nous permettre par la suite de remplacer ce ligand par des molécules fonctionnalisées.

II.4.1.1 A partir du citrate de sodium

La méthode de synthèse de nanoparticules d'or utilisant le citrate de sodium fait l'objet d'un nombre important de publications [131] . Dans ce travail, nous avons choisi



21

Figure 60 Schéma de synthèse des AuNPs en utilisant le citrate de sodium

d'appliquer la méthode de Frens[132] qui permet de contrôler la taille des nanoparticules d'or en fonction de la proportion Citrate/$HAuCl_4$. Avec cette méthode, il est possible de synthétiser des nanoparticules dont la taille va varier entre 10 et 100 nm. Sur le plan expérimental, la méthode consiste à ajouter le citrate de sodium à une solution aqueuse de $HAuCl_4$ à 100°C (Figure 60). Plusieurs expériences ont été réalisées avec différentes proportions Citrate/$HAuCl_4$ afin d'étudier les caractéristiques des différentes nanoparticules formées. (Tableau 6)

Les spectres UV-Visible des solutions formées, permettent d'observer un maximum

[130] Zhao P., Li N. Astruc D., *Coord. Chem. Rev.*, **2013,** 257, 638-665.
[131] Kumar S., Gandihi, K. S., Kumar R., *Ind. Eng. Chem. Res.,* **2007**, 46, 3128-3136.
[132] Kimling J., Maier M., Okenve B., Kotaidis V., Ballot H., Plech A., *J. Phys. Chem. B*, **2006**, 110, 15700–15707. 143
Haiss W.,Thanh N. T. K.,Aveyard J., Fernig D. G. *Anal. Chem.,* **2007**, 79, 4215-4221.

d'absorption qu'il est possible de corréler à la taille des nanoparticules[143].

Tableau 6 Tailles des nanoparticules en fonction de la proportion de Citrate/ $HAuCl_4$ utilisée

	$HAuCl_4$ Quantité de (mg)	Volume de solution citrate (1%) (mL)	Couleur	λ_{max} (nm)	Tailles (nm)
Essai 1	5	2	Rouge foncée	518	10
Essai 2	5	1	rouge	522	25
Essai 3	5	0,75	rouge	528	42
Essai 4	5	0,5	rose	532	52
Essai 5	5	0,2	Instable (précipité)		

Comme le montre Tableau 6, plus le rapport Citrate/$HAuCl_4$ diminue, plus la taille des nanoparticules augmentent. Nous avons même observé, pour l'essai 5, la formation des AuNPs trop grandes et insolubles. Sur le spectre UV-Visible, de la solution des nanoparticules dans l'eau obtenue dans les conditions de l'essai 3, (Figure 61), le maximum d'absorption à 528 nm est corrélé à une taille de 42 nm, en accord avec la littérature[143].

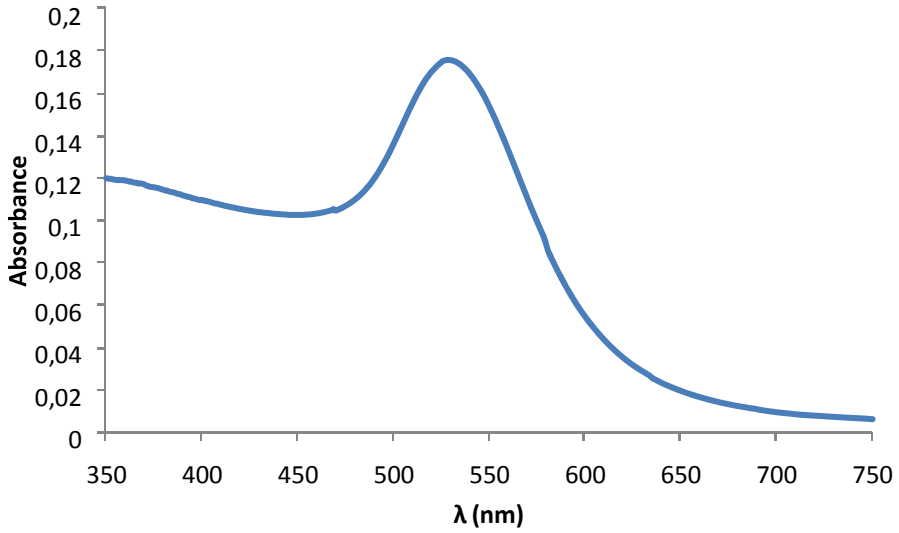


Figure 61 Spectre d'absorption UV-Visible de l'essai 3 (H_2O)

La Figure 61 illustre le spectre UV d'une solution de nanoparticules dans l'eau (essai 3).

Afin de vérifier la mesure de la taille obtenue par UV-Visible, nous avons déterminé le diamètre hydrodynamique des nanoparticules par DLS. Ainsi à partir de la condition de l'essai 3, on obtient par DLS une valeur de 37±5 nm, qui confirme ainsi la bonne corrélation entre l'analyse spectroscopie UV-Visible et la taille des AuNPs.

En parallèle, la mesure du potentiel zêta de -16mV confirme la présence de charge négative en surface de la nanoparticule due aux fonctions carboxylates (COO^-) apportées par le citrate.

II.4.1.1 A partir du borohydrure de sodium et l'acide lipoïque ou l'acide thiomalique

Nous proposons de développer deux voies de synthèse des nanoparticules d'or stabilisées par l'acide lipoïque ou l'acide thiomalique. La première voie consiste à utiliser la complexe AuNPs/citrate [133] synthétisé précédemment, puis d'ajouter simplement l'acide lipoïque ou l'acide thiomalique dans la solution. Il se met en place ainsi un échange avec le citrate car les fonctions thiols ont une meilleure affinité pour l'or. La taille des AuNPs produites par cette méthode varie entre 10 et 100 nm. Sur le spectre UV-Visible, un élargissement du maximum d'absorption est observé (Figure 62), traduisant l'apparition d'un phénomène d'agrégation des nanoparticules.

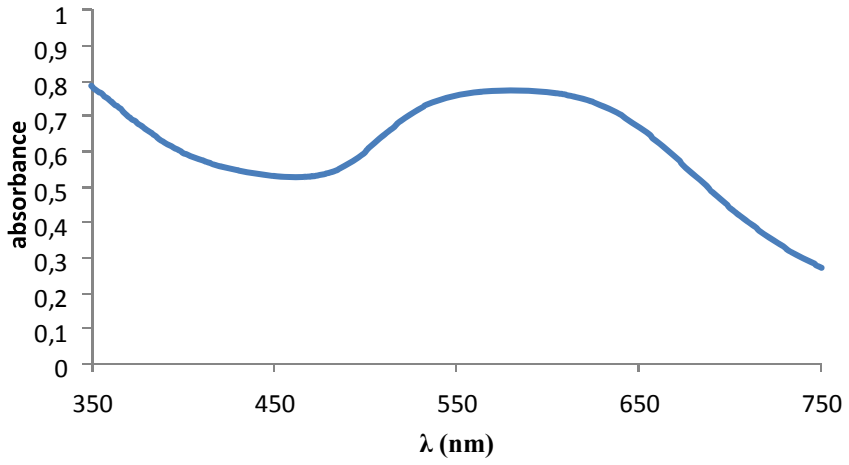


Figure 62 Spectre UV-Visible (H_2O) des nanoparticules AuNPs/acide lipoïque synthétisées par échange de ligand.

[133] Michael Robert Ivanov « Covalently functionalized gold nanoparticles: synthesis, characterization, and integration into capillary electrophoresis », **2011**, these N° 987, Thèse University of Iowa, USA.

La deuxième voie consiste, quant à elle, à réduire $HAuCl_4$ par $NaBH_4$ en présence d'acide lipoïque (ou acide thiomalique) en solution dans l'éthanol [134](Figure 63). Avec cette méthode, les nanoparticules précipitent dans l'éthanol. Une centrifugation permet de séparer les AuNPs et la solution comportant le réactif en excès. Le précipité est ensuite redispersé dans une solution de soude diluée (0,01M). Cette méthode ne produit que de très petites nanoparticules (<10nm), ce qui est confirmé par les valeurs obtenues par DLS : 5±2 nm pour chacune des nanoparticules **22** et **23**. Ces petites AuNPs sont utilisées comme des précurseurs afin de produire des particules de plus grandes tailles.

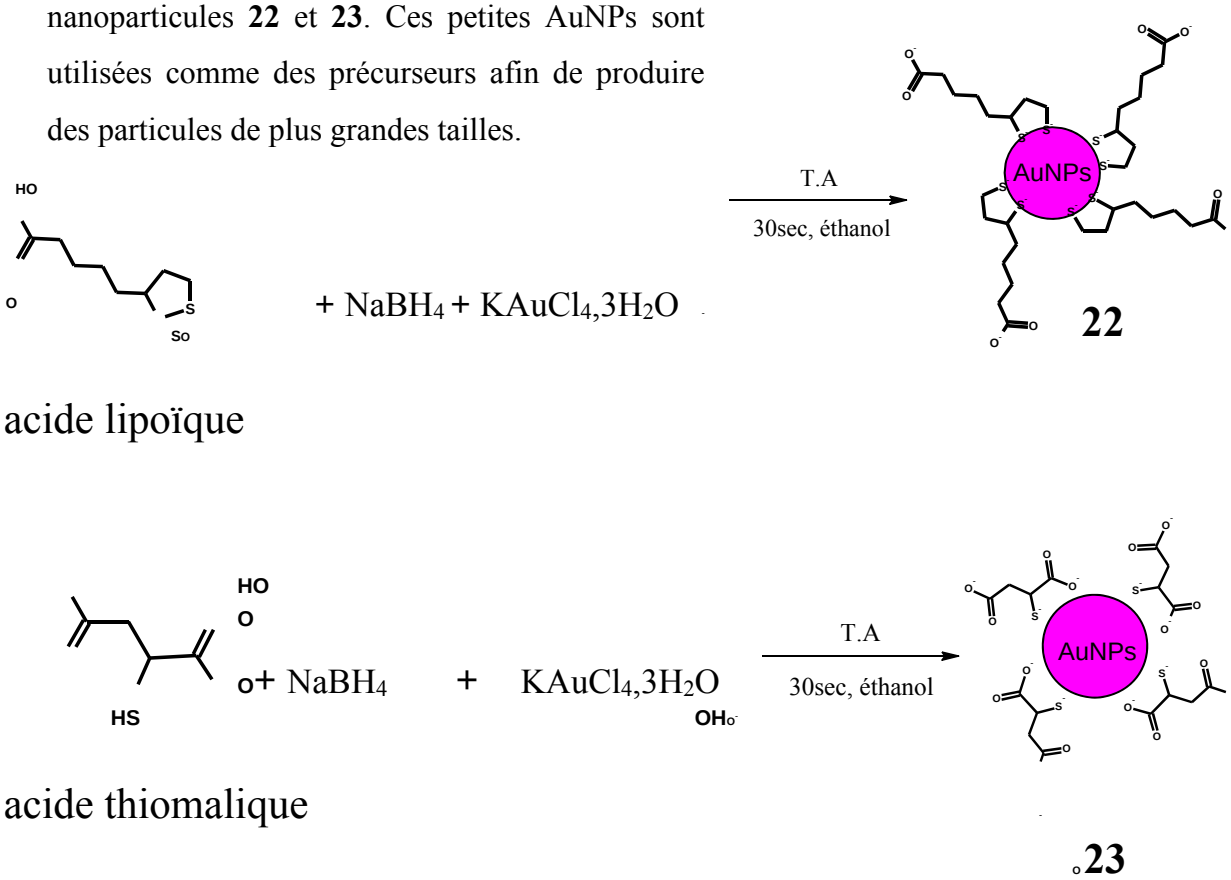


Figure 63 Schéma de synthèse AuNPs avec l'acide lipoïque et l'acide thiomalique

Les caractérisations par mesure du potentiel zêta montrent une valeur très négative (25 mV) ce qui met en évidence la présence de charge négative à la surface des nanoparticules (fonction carboxyliques COO^-). Les AuNPs formées par cette méthode étant petites, la spectroscopie UV-Visible (Figure 64) ne permet pas, dans ce cas, d'observer une bande d'absorption caractéristique, probablement car il y a peu de l'effet SPR (Surface Plasmon Resonance).

[134] Roux S., Garcia B., Bridot J.-L., Salomé M., Marquette C., Lemelle L., Gillet P., Blum L., Perriat P., Tillement O., *Langmuir*, **2005**, 21, 2526–2536.

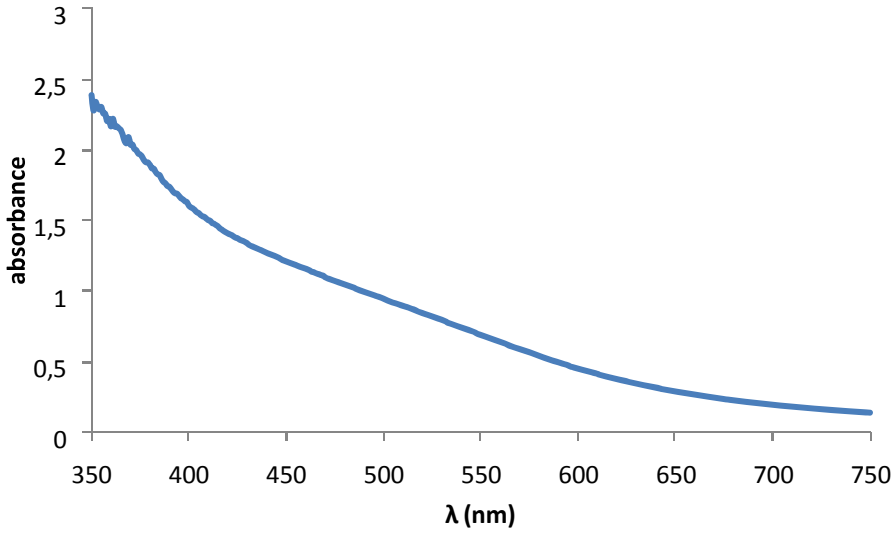


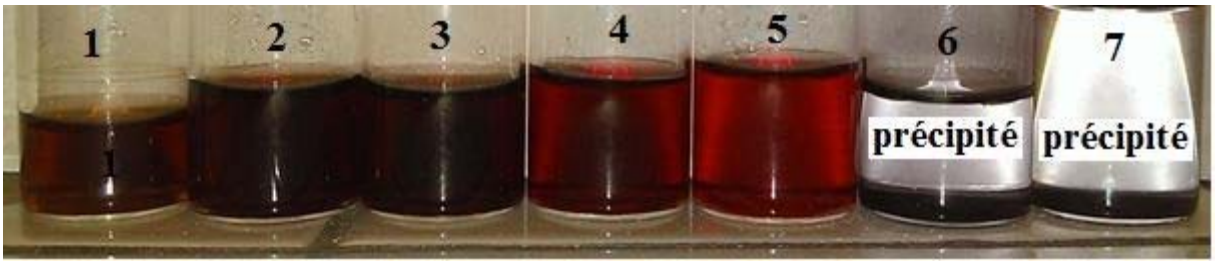
Figure 64 Spectre UV-Visible des AuNPs formées à partir de l'acide lipoïque **22** (H_2O)

II.4.1.2 Optimisation de la taille des nanoparticules

Comme nous l'avons vu précédemment, les nanoparticules d'or obtenues par réduction en présence de $NaBH_4$ sont très petites (<10nm). Elles ne sont pas utilisables pour le ciblage passif (par effet EPR). Afin de résoudre ce problème, nous nous sommes proposés de faire croitre la taille de ces AuNPs afin d'obtenir des tailles qui varient entre 30 et 200 nm.

En présence de réducteur (l'ascorbate de sodium) et des petites nanoparticules **22** (ou **23)**, le sel d'or ($HAuCl_4$) est réduit préférentiellement en surface des AuNPs et la taille augmente au fur et à mesure (Tableau 7).

Tableau 7 Elaboration de taille des AuNPs



Essais	$HAuCl_4$	Ascorbate	λ (nm)	taille
1	0µL	0µL	Pas de pic	<5nm
2	200µl	300µl	Pas de pic	<5nm
3	400µl	300µl	510nm	5nm
4	800µl	300µl	517nm	8nm
5	1200µl	300µl	520nm	15nm
6	1800µl	300µl	précipité	-
7	2200µl	300µl	précipité	-

Sur le tableau 7, nous observons ainsi une augmentation de la longueur d'onde du

maximum d'absorption de la quantité d'$HAuCl_4$. Dans le cas des essais 6 et 7, il se forme un précipité dû à une taille trop importante des AuNPs permettant d'induire des phénomènes d'agrégation.

La Figure 65 représente l'allure du spectre UV-Visible en solution aqueuse des échantillons réalisés. On observe ainsi les modifications liées à l'augmentation de la taille des AuNPs par addition de sel d'or et un déplacement du maximum d'absorption vers les plus grandes longueurs d'onde.

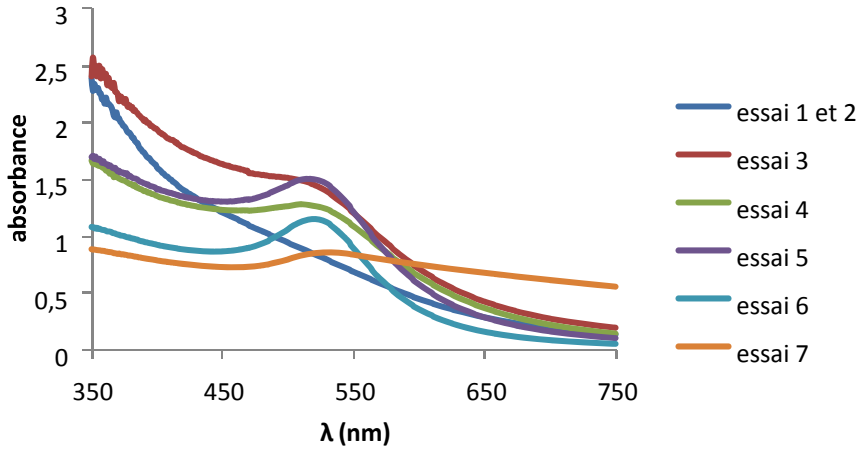


Figure 65 Les spectres UV-Visible des sept solutions de nanoparticule (H_2O)

II.4.1.3 Synthèse du complexe AuNPs/PEI.

Une étude approfondie de la littérature a montré que la méthode de formation de complexe AuNPs/PEI a lieu en deux étapes[135]. La première étape consiste à synthétiser les nanoparticules par un réducteur (comme le citrate de sodium). La deuxième étape consiste à remplacer les citrates par la PEI à la surface des nanoparticules. Récemment, Cho et coll. ont montré que le remplacement du citrate par la PEI n'est pas complet[136]. De plus, des résultats récents ont montré que la PEI, elle-même, est capable de réduire l'acide tétrachloroaurique ($HAuCl_4$) à une température de 100°C et joue en même temps le rôle d'agent stabilisant en solution aqueuse [137]. En tenant compte de ces résultats nous nous sommes proposé de simplifier

[135] Abad M. J., Mertens S. F. L., Pita M., Fernandez V. M., Schiffrin D. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 56895694.
[136] Cho T. J., Pettibone J. M., Gorham J. M., Nguyen T. M., MacCuspie R. I., Gigault J., Hackley V. A. *Langmuir*, **2015**, 31, 7673−7683.
[137] Kreschmer F., Mansfeld U., Hoeppener S., Hager M. D., Schubert U. S., *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 88-90.

la synthèse de ces nanoparticules AuNPs/PEI (**2**). Ainsi la réaction peut se faire en une seule étape et permet de s'affranchir du citrate de sodium (Figure 66).

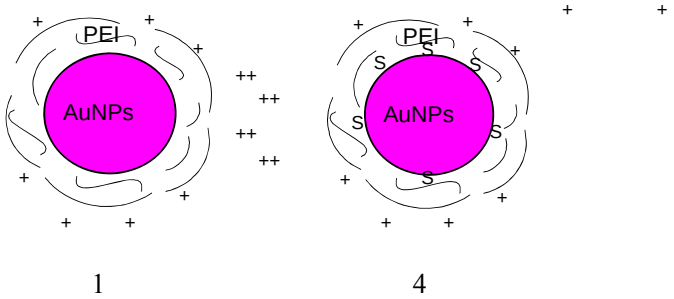


Figure 66 Deux nanoparticules **1** et **4** synthétisées en utilisant la PEI

II.4.1.3.1. Synthèse de nanoparticules (1) en utilisant la PEI10000.

Le simple mélange de PEI et $HAuCl_4$ ne permet pas de former des nanoparticules à froid, mais la complexation d'Au^{III+} par la PEI change la couleur de la solution. La formation d'une solution orange traduit le processus de complexation. La solution est placée au sein d'une étuve à 95°C pendant 30 minutes. La solution devient rouge (ou violet/bleu selon le cas) ce qui signifie la formation de nanoparticules d'or (Figure 67). La taille des AuNPs sphériques peut être déterminée comme précédemment par spectroscopie UV-Visible[143].

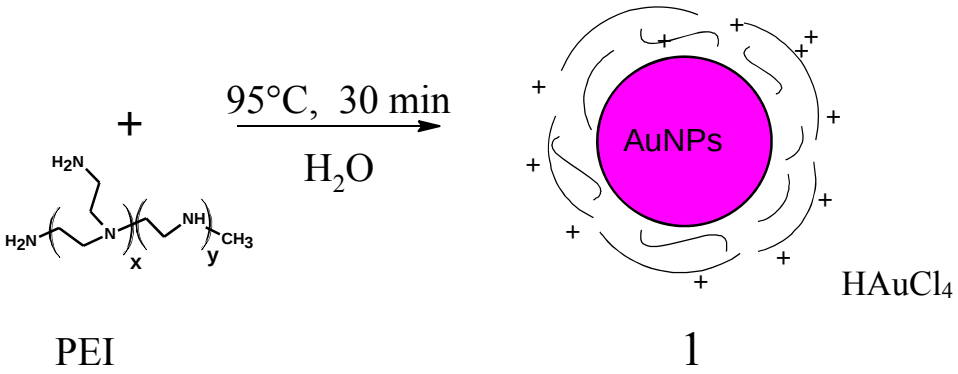


Figure 67 Schéma général de synthèse des AuNPs en présence de PEI

Afin d'établir une relation entre masse molaire des PEI et la taille des nanoparticules formées, plusieurs synthèses avec des PEI de masse molaires différentes ont été réalisées. Ainsi les PEIs 0.6kDa, 2kDa, 10kDa 25kDa et 70kDa ont été utilisées (Tableau 8). Chaque synthèse est répétée trois fois. Pour chaque essai, 5mg de PEI et 5mg de $HAuCl_4$ sont dissous dans 20ml d'eau ultra pure. L'ensemble est placé au sein d'une étuve à 95°C pendant 30 minutes. Ensuite, chaque échantillon est sorti de l'étuve, laissé à température ambiante pour que la solution se stabilise pendant 2h. La spectroscopie UV-Visible est utilisée afin de déterminer la taille des nanoparticules.

Tableau 8 Tailles des nanoparticules d'or obtenues par UV-Visible en fonction de la masse molaire de PEI

Masse molaire		0,6 kDa	2 kDa	10 kDa	25 kDa	70 kDa
Tailles des AuNPs (nm)	essai1	**97**	**66**	**58**	**54**	**56**
	essai 2	**96**	**75**	**56**	**58**	**58**
	essai 3	**94**	**74**	**54**	**54**	**56**

Les valeurs obtenues montrent que les essais sont reproductibles et globalement cohérents. On observe ainsi une diminution de la taille des nanoparticules d'or avec une augmentation de la masse molaire des PEI (de 600 Da à 10000 Da). Les résultats montrent également une stabilité de la taille des nanoparticules formées autour de 60 nm même avec des PEI de haute masse (25000 Da et 75000 Da). L'étude de la stabilité au cours du temps des nanoparticules AuNPs/PEI formées montre que celle synthétisées avec les PEI 600 et 2000 Da précipitent respectivement après 24h et 72h, et les autres nanoparticules sont stables pendant plusieurs mois.

Afin de faire une comparaison entre la stabilité des complexes AuNPs/PEI et leur toxicité potentielle par des applications biologiques. Nous avons choisi de travailler avec les AuNPs/PEI 10 kDa et un ratio de masse 1/1.

II.4.1.3.1.1. Caractérisations des AuNPs/PEI 10 kDa (ratio massique 1/1)

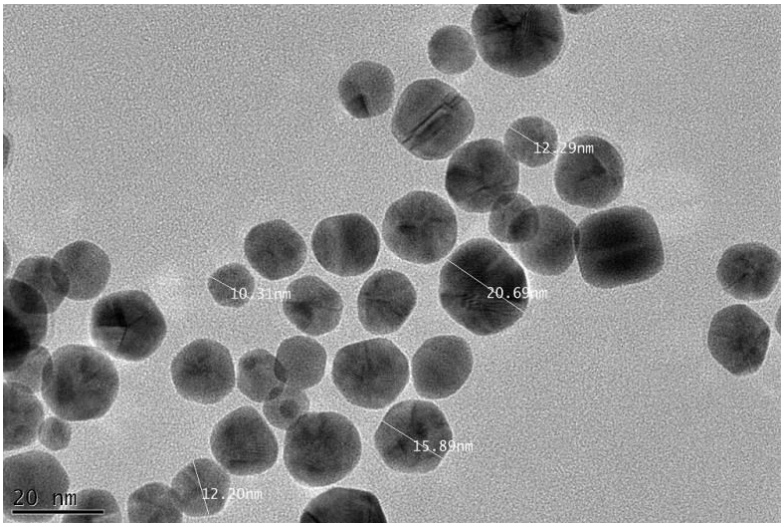


Figure 68 Image de MET des nanoparticules d'or

Une caractérisation de la forme et de la taille des AuNPs/PEI (**1**) par Microscopie Electronique à Transmission (MET) montre que le diamètre moyen déterminé par le MET est

différent (Figure 68), Il est en effet, plus petit que celui obtenu par UV-Visible. Cette caractéristique est normale car la MET mesure le diamètre de la partie inorganique (noyau d'or) alors que l'UV-Visible mesure le diamètre hydrodynamique (noyau+ couche organique). Par contre, la mesure de DLS montre une taille de 60 nm. Confirmant la taille hydrodynamique obtenue par la mesure UV-Visible. En parallèle, le potentiel zêta montre que la surface des nanoparticules est chargée positivement, +20mV (Figure 69), traduisant bien la présence des fonctions amines de la PEI.

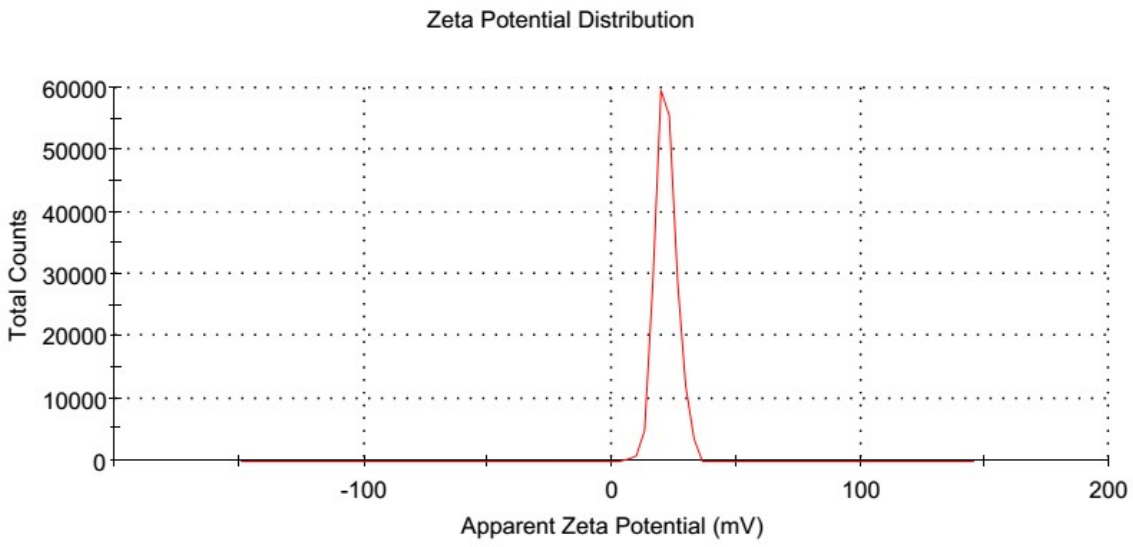


Figure 69 Potentiel zêta du complexe AuNPs/PEI 10 kDa (**1**)

Afin de déterminer le pourcentage de PEI présente à la surface des nanoparticules, une analyse ATG (Analyse ThermoGravimétrique) sur les nanoparticules AuNPs/PEI (avec 10 kDa et ratio massique 1/1) a été réalisée. Ainsi, nous avons enregistré l'évolution de la masse des nanoparticules au cours d'une montée en température sous un gaz inerte (Argon). Les pertes de masse observées en ATG correspondent uniquement à la dégradation de la matière organique. La courbe d'ATG (Figure 70) en bleu présente, en effet un premier saut à 40 °C qui correspond à la désorption des molécules d'eau restantes même après lyophilisation de l'échantillon. La présence d'une couche organique à la surface des nanoparticules est confirmée par une perte de masse de l'ordre de 40 % entre 200 et 600 °C. Cette perte de masse est attribuée aux PEI présents à la surface des nanoparticules. Ainsi la masse de PEI fixée sur les nanoparticules représente 40 % de la masse totale (AuNPs/PEI).

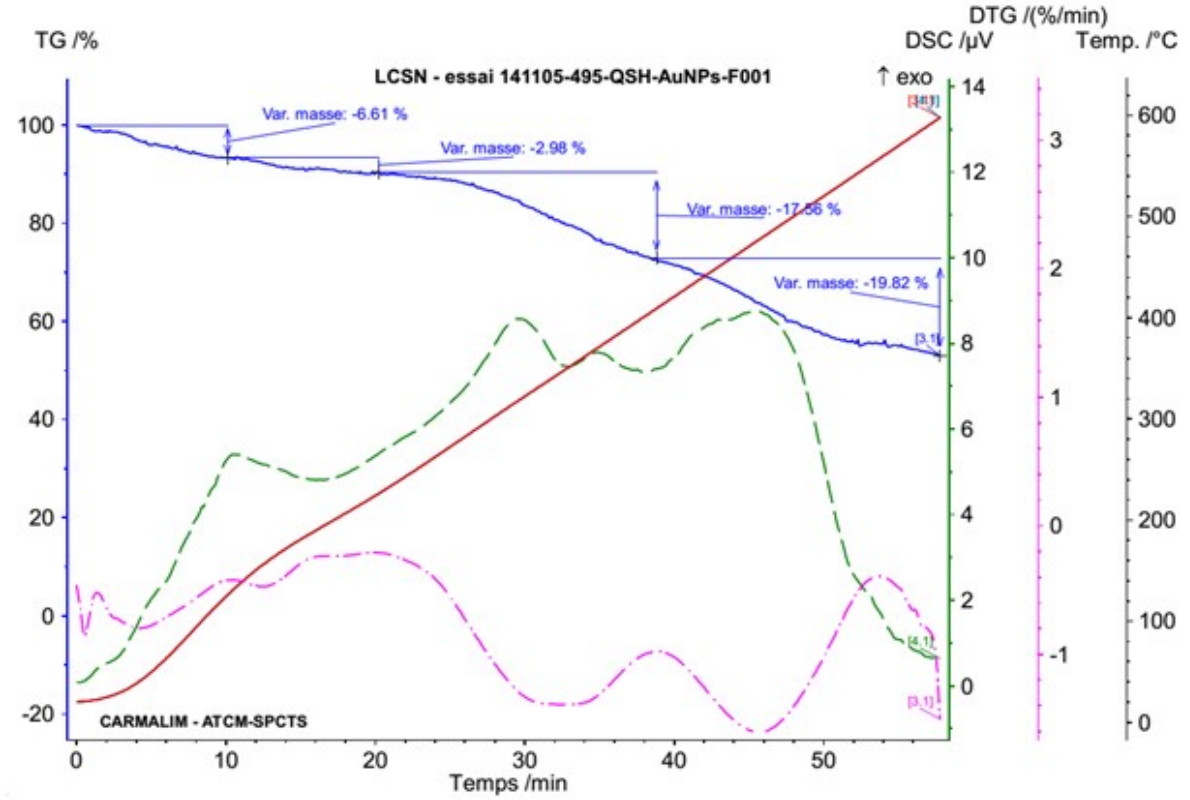


Figure 70 L'analyse d'ATG du complexe AuNPs/PEI (**1**)

II.4.1.3.2. Fixation de la fonction thiol sur la PEI

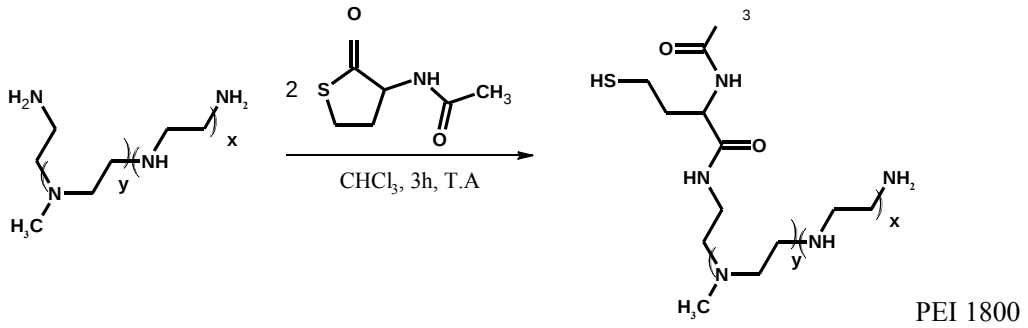
Cependant, malgré ces résultats encourageants qui permettent de former des nanoparticules d'or recouvertes de PEI de manière simple et en une seule étape, nous avons constaté une certaine instabilité des nanoparticules formées à partir des PEI de petite masse moléculaire et une difficulté à les redisperser par la suite. Nous avons donc décidé de fixer de manière "covalente" ces PEI de faible masse molaire sur l'or afin de former de nouvelles AuNPs/PEI plus stables et moins toxiques.

II.4.1.3.2.1. Fixation de fonction thiol sur la PEI 1800.

La 3-acetamidotetrahydro-2-thiophenone (ou *DL-N*-acetylhomocysteine thiolactone) est constituée d'un cycle thiolactone qui est très facile à ouvrir par une attaque nucléophile[138]. Nous allons ainsi utiliser le caractère nucléophile des amines primaires de la PEI de petite masse (1800 Da) afin de les fonctionnaliser par un dérivé portant une fonction thiol (Figure 71).

CH

[138] Ferris C., Casas M., Lucero M. J., de Paz M. V., Jiménez-Castellanos M. R., *Carbohydr. Polym.*, **2014**, 111, 125-132.



3

Figure 71 Fixation de 3-acetamidotetrahydro-2-thiophenone sur PEI1800

Ainsi la PEI 1800 est mise à réagir en présence du N-acetylhomocysteine thiolactone (deux équivalents) dans le chloroforme pendant 3 heures à température ambiante. La réaction est suivie par CCM. Et après trois heures de réaction, la disparition de la thiolactone est observée. La réaction est quantitative, une simple évaporation nous permet de récupérer le produit **3** (PEI-SH) pur.

II.4.1.3.2.2. Caractérisation de la PEI thiolée (3).

Afin de déterminer le taux de fixation ou le degré de substitution des groupements thiol, l'analyse élémentaire du polymère **3** a été réalisée (Tableau 9) :

Tableau 9 Résultats d'analyse élémentaire de PEI-SH **(3)**

C	H	N	S	O
47%	9,1%	25,6%	2,0%	15,5%

L'analyse montre que le polymère **3** contient 2% de soufre. Ce résultat montre la présence de fonctions thiols fixées sur les molécules de PEI 1800. Le produit étant hygroscopique, le rapport %S/%C a été utilisé pour déterminer le degré de substitution en fonction thiol par la formule suivante (Figure 72). Le degré de substitution de la réaction ainsi calculé est de 1,57.

$$D.S = \frac{1008*(\%S/\%C)}{32-160*(\%S/\%C)}$$

1008 : masse totale de carbone dans une mole PEI1800.
32 : masse molaire de soufre.
160 : masse molaire de la *N*-acetylhomocysteine thiolactone.

Figure 72 Formule permettant de calculer le D.S du composé **3** à partir des résultats obtenus par analyse élémentaire.

II.4.1.3.3. Synthèse des AuNPs en utilisant la PEI modifiée (4)

Le greffage de fonction thiol sur la PEI de faible masse molaire (<2000Da) permet de mieux stabiliser les nanoparticules (Figure 73). En utilisant les PEI de faible masse molaire et les mêmes conditions expérimentales décrit précédemment, les nanoparticules formées ne montrent pas d'instabilité.

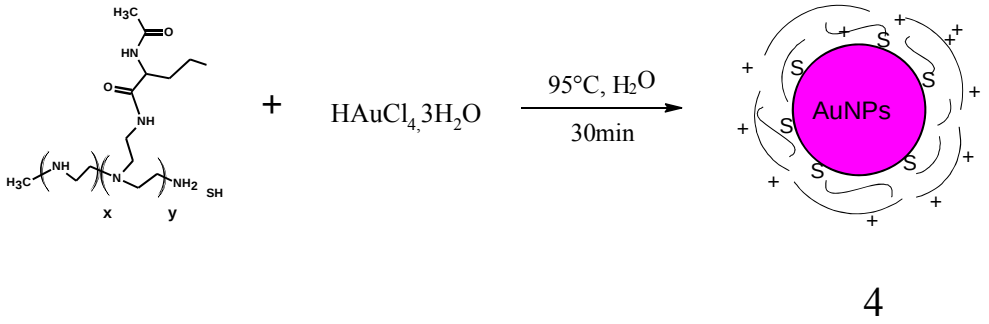


Figure 73 Schéma de synthèse du produit **4** en utilisant les PEIs thiolées.

Les conditions de synthèse sont identiques au produit **1**. Les tailles des nanoparticules sont corrélées aux maxima d'absorption observés en UV-Visible et sont présentés dans le (Tableau 10) ci-dessous :

Tableau 10 Corrélation entre la tailles des AuNPs **4** synthétisées en utilisant la PEI thiolée et leurs maxima d'absorption en UV-Visible.

m_{PEI}/m_{HAuCl_4}(%)	40	50	75	100
λ_{max} (nm)	527	524	520	514
Tailles (nm)	40	30	20	10

Au travers de ces résultats, on constate que, par rapport au produit **1**, en utilisant le même rapport de masse PEI/$HAuCl_4$, les tailles obtenues sont plus petites probablement lié à la fonction thiol. On observe également que les nanoparticules synthétisées par cette méthode sont beaucoup plus stables. Ainsi après 3 mois de conservation des solutions, aucun précipité n'est observé.

Les nanoparticules sont caractérisées par DLS, les tailles mesurées confirment les mesures obtenues par UV-Visible. La mesure du potentiel zêta permet de mettre en évidence

que la surface de ces complexes AuNPs/PEI-SH est chargée positivement avec une valeur de +25mV. Cette valeur est analogue à celle obtenue avec le produit **1**.

II.4.1.4 Couplage des AuNPs/PEI et de la cyclodextrine anionique

Le couplage ionique entre les complexes AuNPs/PEI (**1**) et la cyclodextrine anionique commerciale (Figure 74) est délicat, en effet, un excès de β-CD sulfatée, induit une agrégation entre les nanoparticules et la formation d'un précipité. Afin de déterminer, la quantité maximale de β-CD anionique à utiliser, les essais suivants ont été réalisés : tout d'abord, une solution de nanoparticules d'or est synthétisée selon le protocole utilisé pour le produit **1**, avec

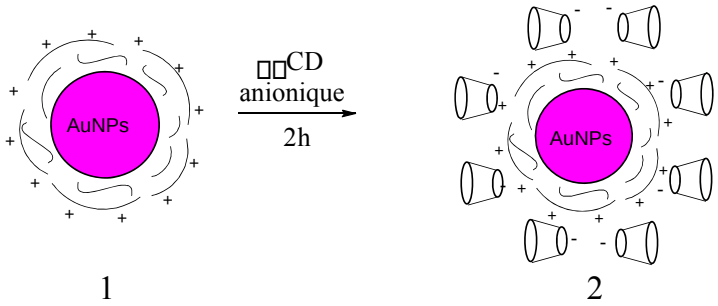


Figure 74 Réaction de couplage entre les AuNPs/PEI (**1**) et β-CD anionique (sulfatée) 5mg de HAuCl4, 5mg de PEI 10 kDa et 20ml de l'eau. En parallèle, une solution aqueuse de β-CD sulfatée est préparée à une concentration de 10mg/mL. Un volume croissant de cette solution est ajouté à la solution du complexe AuNPs/PEI (**1**) (Figure 75).

L'observation des différentes tubes (Figure 75) met en évidence que lors de l'ajout d'un volume de β-CD sulfatée inférieur ou égal à 100µL, la solution reste limpide (Figure 75, tubes 1 à 3). Par contre, après addition de 125µL de la solution de β-CD sulfatée, on observe l'apparition d'un précipité (tubes 4 et5). Ainsi, nous avons choisi d'ajouter 100µL de solution qui correspond à 1mg de β-CD sulfatée.

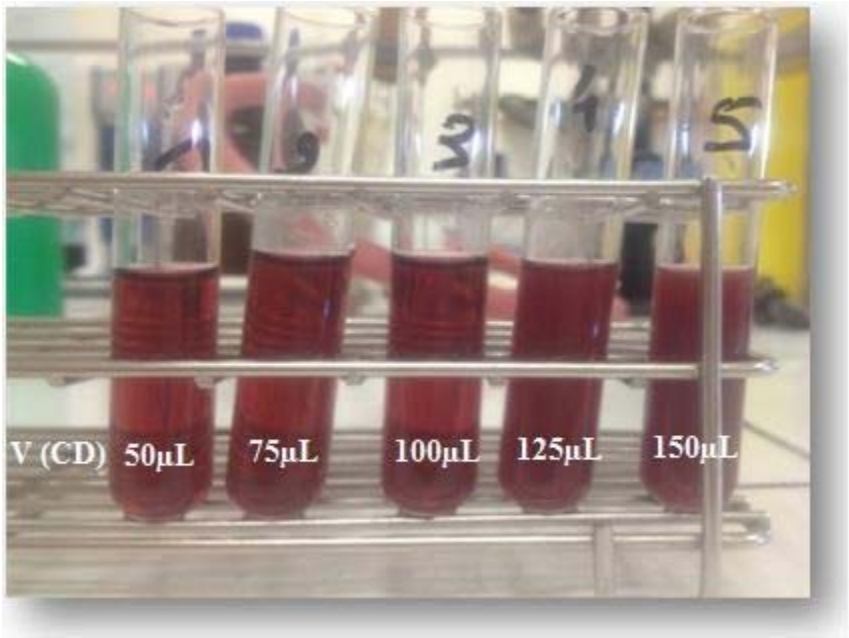


Figure 75 Comportement des solutions du complexe AuNPs/PEI en fonction du volume de solution de β-CD anioniques ajouté

L'analyse du spectre UV-Visible de l'échantillon 3 (Figure 76, courbe bleu) montre un léger effet bathochrome du maximum d'absorption comparé à une solution n'ayant pas fixé de β-CD anionique (Figure 76, courbe rouge). Le décalage vers le rouge traduit une croissance de la taille des nanoparticules qui n'entraine pas une perte de la stabilité de la solution.

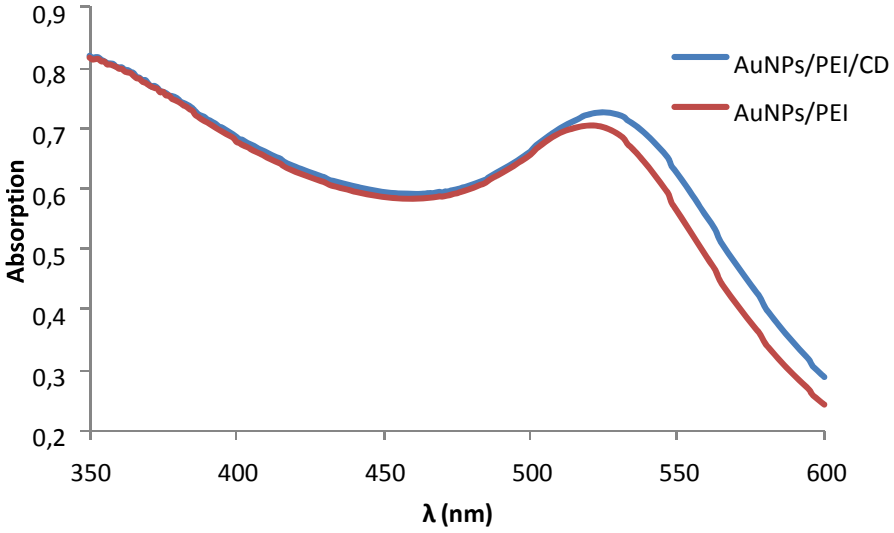


Figure 76 Comparaison du Spectre UV d'AuNPs/PEI/CD$^-$ (**2**) (en bleu) et AuNPs/PEI (**1**) (en rouge) (H_2O)

Afin d'étudier la présence de la β-CD anionique en surface des nanoparticules AuNPs/PEI. La mesure du potentiel zêta a été réalisée. La Figure 77 montre l'allure du potentiel zêta de l'échantillon 3. La valeur de +25mV est très voisine de celle de l'AuNPs/PEI qui ne

possèdent pas de β-CD anionique (produit **1**). Ainsi la fixation des β-CD sulfatée ne modifie pas la charge en surface du complexe.

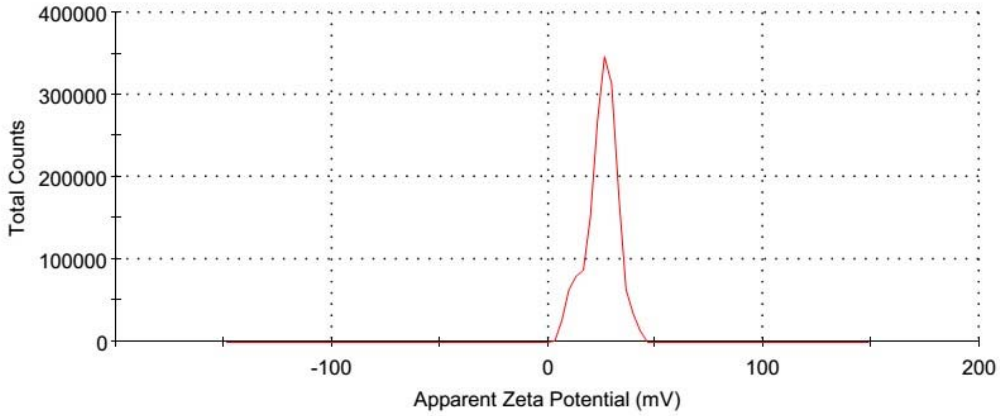


Figure 77 Mesure du potentiel zêta du complexe AuNPs/PEI/CD (**2**)

II.4.2. Greffage de la β-cyclodextrine oxydée (6) et l'acide thiomalique sur la PEI.

II.4.2.1 Couplage de la PEI 1800 et de la cyclodextrine oxydée (6)

Le greffage de cyclodextrine oxydée (**6**) sur la PEI est réalisé par la formation d'une liaison amide (Figure 78). Ainsi, deux équivalents (par rapport à la PEI) de β-CD oxydée (**6**) sont ajoutés. Afin d'améliorer l'affinité avec les nanoparticules d'or, deux équivalents d'acide thiomalique sont également additionnés au milieu réactionnel. Les agents de couplage utilisés sont EDC (5éq) et NHS (5éq). Tous les réactifs sont solubles dans l'eau. Après 16 h de réaction, le milieu réactionnel est purifié par dialyse (membrane seuil de coupure 2 kDa).

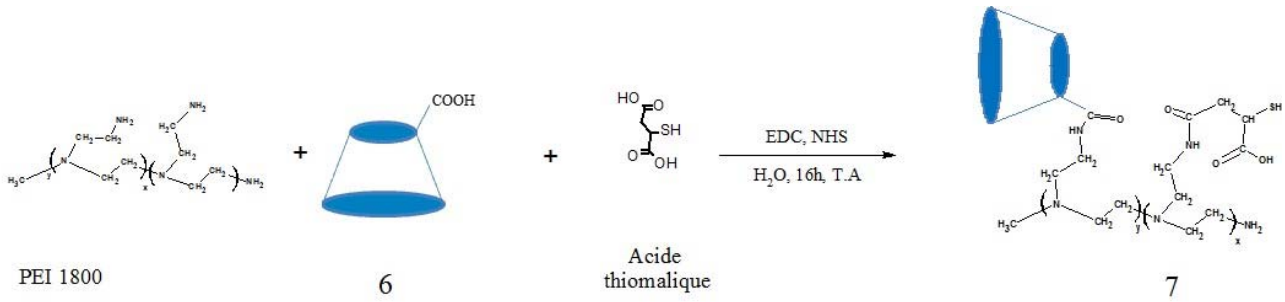


Figure 78 Fixation de β-CD oxydée **(6)** sur la PEI

II.4.2.1.1. Caractérisations

Le produit **7** est caractérisé par analyse élémentaire. Les résultats montrent la présence de 0,2% de S, 18,0% de C, 16,7% de N, 8,3% de H et 26% de O. A partir de ces analyses, le DS a été déterminé en utilisant les formules ci-dessous (Figure 79). Le taux de fixation de

cyclodextrine est voisin de 1,3 cyclodextrine par PEI (DS_{CD}=1,33 ; calculé par %N/%C). Le taux de fixation de l'acide thiomalique est plus faible (DS_S=0,22 ; calculé par %S/%C),

$$DS_{CD} = \frac{588/(\%N/\%C)-1008}{504}$$

$$DS_S = \frac{(\%S/\%C)x12x(42x2+42x1,33)}{32}$$

Figure 79 Formules permettant de déterminer le degré de substitution de fonction thiol et de cyclodextrine

II.4.2.1 Synthèse de AuNPs avec PEI/CD lié de façon covalente

A partir du précurseur PEI-SH/CD (**7**) synthétisé précédemment, nous avons réalisé la synthèse des nanoparticules d'or (**9**). Le protocole est similaire à celui utilisé pour les précédentes synthèses de nanoparticules (Figure 80).

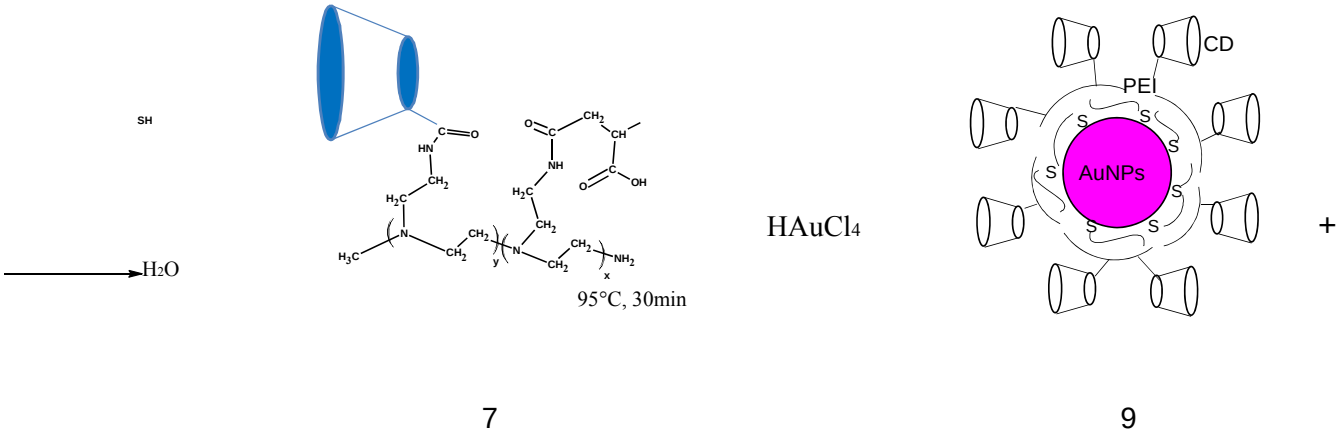


Figure 80 Synthèse du complexe covalent AuNPs/PEI/CD (**9**)

II.4.2.1.1. Caractérisations

Les nanoparticules **9** ont été, dans un premier temps, caractérisées par l'étude de leur spectre UV-Visible (Figure 81).

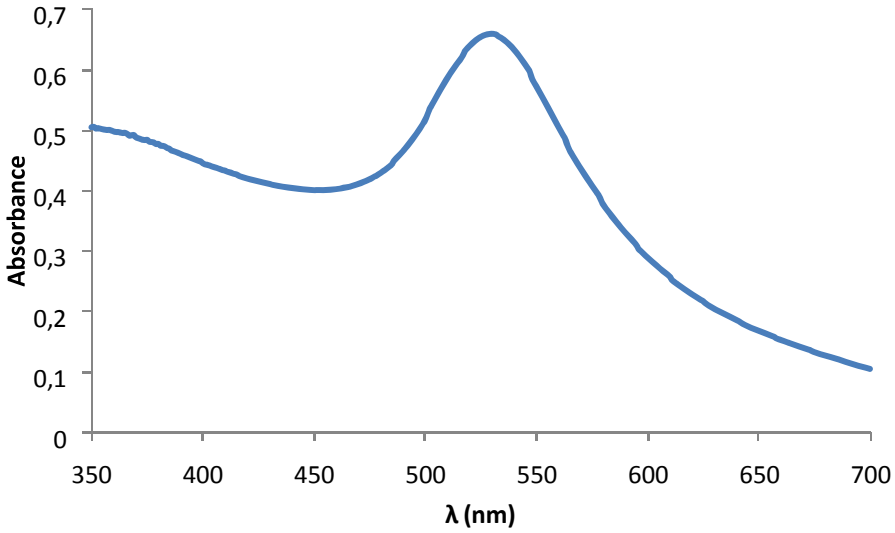


Figure 81 Spectre UV-Visible du complexe covalent AuNPs/PEI/CD (**9**) (H_2O)

L'étude du spectre UV-Visible met en évidence une bande d'absorption à 535 nm qui correspond à une taille du complexe covalent AuNPs/PEI/CD (**9**) d'environ 60 nm (Figure 81). Afin de confirmer cette valeur, la mesure du DLS a été effectuée (Figure 82, gauche) et le résultat obtenu est cohérent avec la taille de 60 nm déterminée par UV-Visible. Néanmoins on observe un autre pic vers 1000 nm, qui traduit la présence d'un autre groupe de nanoparticules issu de l'agrégation partielle des nanoparticules formées par cette méthode. La mesure du potentiel zêta (Figure 82, droite), quant à lui, montre la présence d'une surface chargée positivement (+35mV).

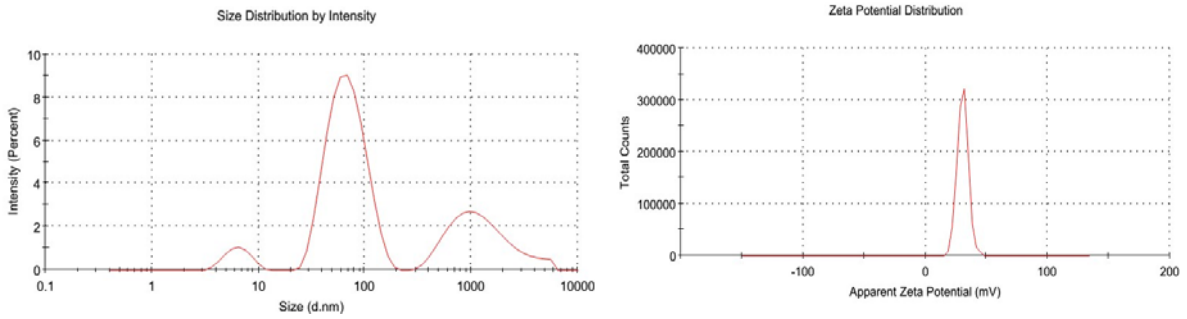


Figure 82 les spectres de DLS et de potentiel zêta du complexe covalent AuNPs/PEI/CD (**9**) Après avoir élaboré les nanovecteurs capable de vectoriser des principes actifs vers des cellulaires tumorales par effet EPR (Enhanced Permeability and Retention). Nous nous sommes attachés à encapsuler les molécules actives au sein des cyclodextrines.

II.4.3. Encapsulation de principe actif

Les deux principes actifs encapsulés sont la tanshinone IIA et l'α-mangostine. Le protocole expérimental utilisé est le même pour les deux composés. Ces produits n'étant pas solubles dans l'eau, ils sont solubilisés dans l'éthanol. Ainsi sous agitation magnétique, un équivalent de principe actif (par rapport à cyclodextrine) et ajouté goutte à goutte à la solution aqueuse de nanoparticules **2** ou **9.** Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation pendant 30 minutes. Une centrifugation permet de séparer les nanoparticules de l'excès des molécules actives présentes dans le surnageant. Le culot est récupéré puis redispersé dans l'eau ultrapure.

II.4.3.1 Inclusion de la Tanshinone IIA

Les fortes interactions répulsives entre les molécules d'eau et le principe actif favorisent l'insertion de cette dernière dans la cavité hydrophobe de la cyclodextrine et conduisent à la formation d'un complexe "host-guest" stable en milieu aqueux. La quantité de principe actif encapsulé est déterminée par spectroscopie UV-Visible (Figure 83).

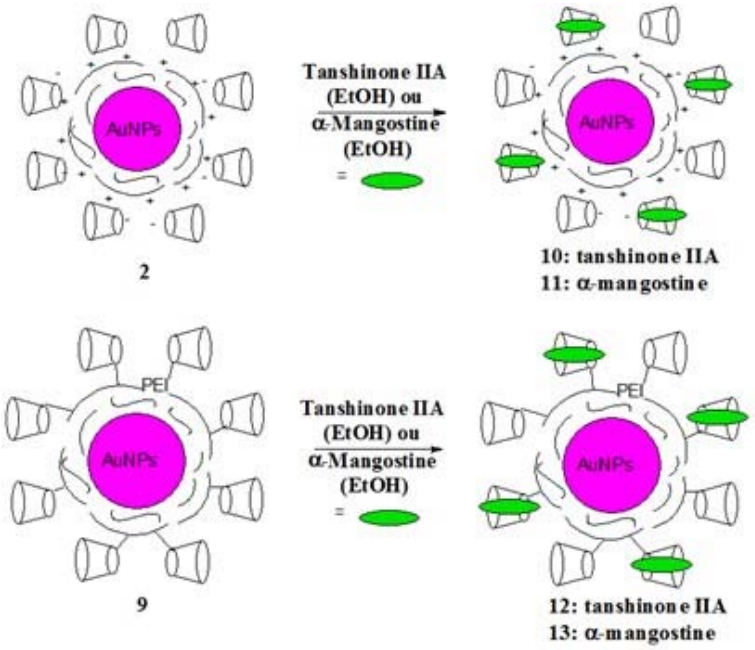


Figure 83 Encapsulation des principes actifs

La réaction entre les nanoparticules **2** et **9** et la tanshinone IIA (**18**) conduit respectivement à la formation respectivement des complexes **10** et **12.** La tanshinone IIA (**18**) est extraite par 3 mL de chloroforme après l'encapsulation. La quantité du principe actif est déterminée par spectroscopie UV-Visible (λ (450 nm) avec ε=2785 L•mol^{-1}cm^{-1}). Après plusieurs essais, le résultat de couplage se stabilise autour de 15±5 mg de tanshinone IIA (**18**)

par gramme du complexe ionique AuNPs/PEI/CD (**2**). En encapsulant la tanshinone IIA (**18**) au sein du complexe covalent (**9**), nous obtenons 31±6 mg du principe actif par gramme de complexe (**9**) (Tableau 11).

Tableau 11 Quantité de Tanshinone IIA (**18**) encapsulée

	Concentration en tanshinone IIA encapsulée	Masse de tanshinone IIA	Masse de Tan IIA encapsulée par gramme de complexe (%)
Complexe ionique (**10**)	$3,2 \cdot 10^{-5}$ mol/L	0,19 mg	15 mg/g (1.5%)
Complexe covalent (**12**)	$6,6 \cdot 10^{-5}$ mol/L	0.39 mg	31 mg/g (3.1%)

II.4.3.2 Inclusion de l'α-mangostine

Le protocole utilisé est identique de celui de la tanshinone IIA. Le dosage de la quantité de mangostine (**19**) inséré se fait comme précédemment par spectroscopie UV-Visible (λ (312 nm) (ε = 23175 $L*mol^{-1}cm^{-1}$)) après extraction au chloroforme, (Tableau 12).

Tableau 12 Quantité d'α-mangostine (**19**) encapsulée

	Concentration en α-mangostine encapsulée	Masse d'α-mangostine encapsulée	Masse de Tan IIA encapsulée par gramme de complexe (%)
Complexe ionique (**11**)	$5,8 \cdot 10^{-5}$ mol/L	0,57 mg	46 mg/g (4,6%)
Complexe covalent (**13**)	$8,7 \cdot 10^{-5}$mol/L	0,72 mg	57 mg/g (5,7%)

On remarque que l'encapsulation de la α-mangostine (**19**) se fait avec un meilleur pourcentage que la tanshinone IIA (**18**).

II.4.4. Synthèse du complexe AuNPs/PEI-SH/photosensibilisateur (16)

II.4.4.1 Fixation de la Pp18 sur la PEI1200

Après l'extraction de chlorophylle *a* à partir de *Spirulina maxima*, la purpurine 18 obtenue par modification chimique, possède la particularité d'avoir une fonction anhydride exocyclique très réactive (Figure 84). Afin d'éviter de fixer un nombre important de photosensibilisateur sur une même molécule de PEI, la solution de Pp18 est ajoutée goutte à goutte à une solution de PEI dans le chloroforme. Au cours de la réaction, on observe un changement de couleur de la solution, qui passe de la couleur violette à la couleur verte. Ce changement de couleur est lié à l'attaque nucléophile de l'anhydride exocyclique conduisant à une modification de la conjugaison du macrocycle.

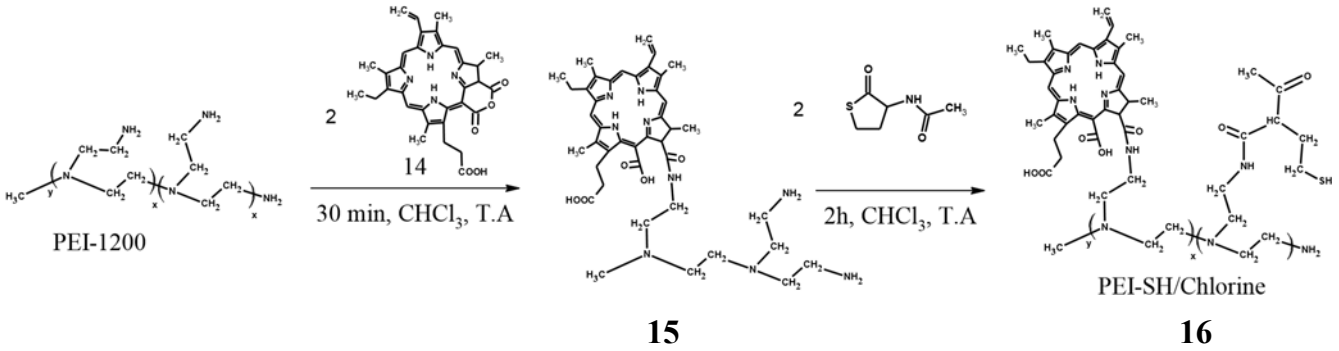


Figure 84 Fixation de chlorine sur PEI-SH (**16**)

Afin d'améliorer l'affinité entre les nanoparticules d'or et les PEIs de faible masse molaire, des fonctions thiols ont été fixées par réaction du sulfure d'éthylène ou du Nacétylhomocystéine thiolactone. Le sulfure d'éthylène est un cycle de trois chainons, il est très réactif vis-à-vis des nucléophiles. Ainsi au cours de cette deuxième étape sans purification du composé **15**, le sulfure d'éthylène était, tout d'abord, mis à réagir pendant 30 minutes.

Cependant, la manipulation de ce produit est délicate et demande la mise en œuvre d'un certain nombre de précautions expérimentales. Afin de faciliter le mode opératoire, nous avons finalement choisi de travailler avec le N-acétylhomocystéine thiolactone. Dans les mêmes conditions que celle utilisées pour le sulfure d'éthylène, c'est-à-dire sans étape de purification du composé **15**, le produit **16** est obtenu avec un rendement quasi quantitatif après purification par dialyse (membrane seuil de coupure 2 kDa).

II.4.4.2 Caractérisation

Le taux de fixation de la Pp18 sur la PEI est déterminé par spectroscopie UV-Visible. Le rendement est quantitatif. En moyenne, deux chlorines sont fixées par molécule de PEI 1200.

Sur le spectre UV-Visible du produit **16** (Figure 85), on observe la bande de Soret à 418 nm et quatre bandes Q.

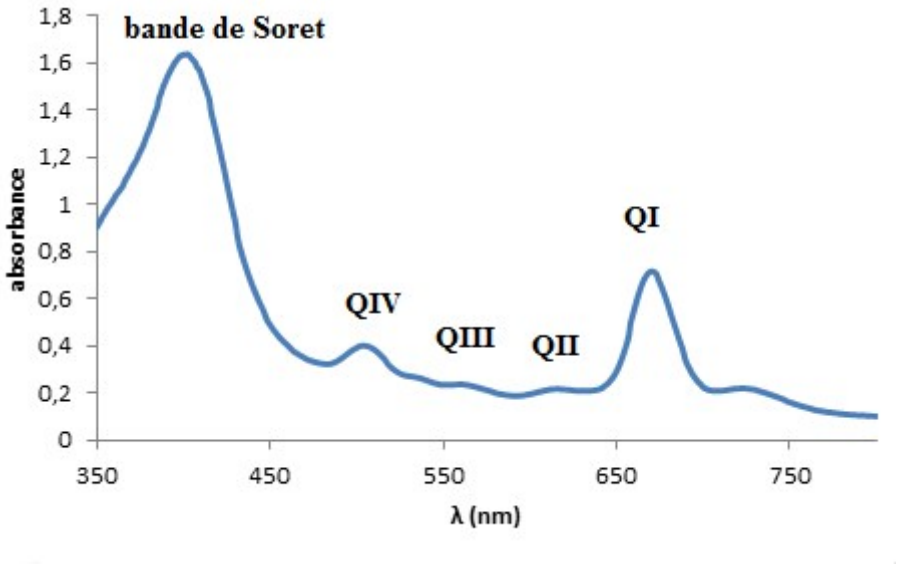


Figure 85 Spectre UV-Visible de la PEI-SH/chlorine **16** ($CHCl_3$)

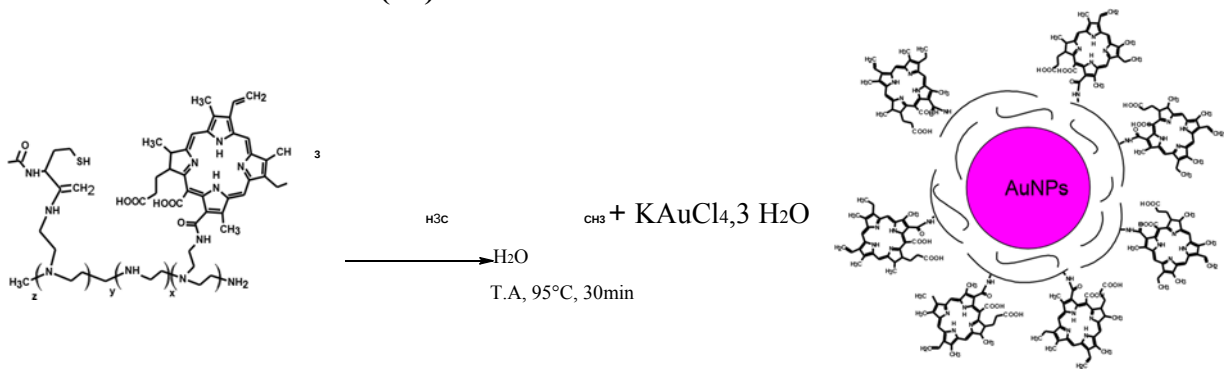
La comparaison des spectres UV-Visible (Tableau 13) de la purpurine 18 (Pp18) (**14**) et de la PEI-SH/chlorine (**16**) montre un déplacement vers le bleu de toutes les bandes ce qui traduit une modification de la conjugaison. En effet, l'ouverture de l'exocycle par la PEI entraine une modification de la contrainte stérique du macrocycle et un effet hypsochrome des maxima d'absorption.

Tableau 13 Maxima d'absorption et coefficient d'extinction molaire de la purpurine 18 (**14**) et PEISH/chlorine (**16**) : λ nm ($\varepsilon*10^{-3}$) ($CHCl_3$)

	Soret	QIV	QIII	QII	QI
Pp18 (**14**)	413 (108,0)	510(5,8)	548 (21,3)	646 (8,0)	701 (41,4)
PEI-SH/chlorine (**16**)	400 (52,4)	502 (6,0)	530 (1,9)	611 (2,4)	665 (14,1)

II.4.4.3 Synthèse des nanoparticules d'or sphériques (17) à partir de la

PEI-SH/chlorine (16)



16 **17**

Figure 86 Schéma général de synthèse du complexe AuNPs/PEI-S/chlorine

Les conditions expérimentales sont identiques à celles utilisées pour l'élaboration des nanoparticules **4** (Figure 86). Ainsi, après purification par dialyse (seuil de coupure 60008000 Da), Le produit **17** obtenu est caractérisé par la spectroscopie UV-Visible, DLS et potentiel zêta.

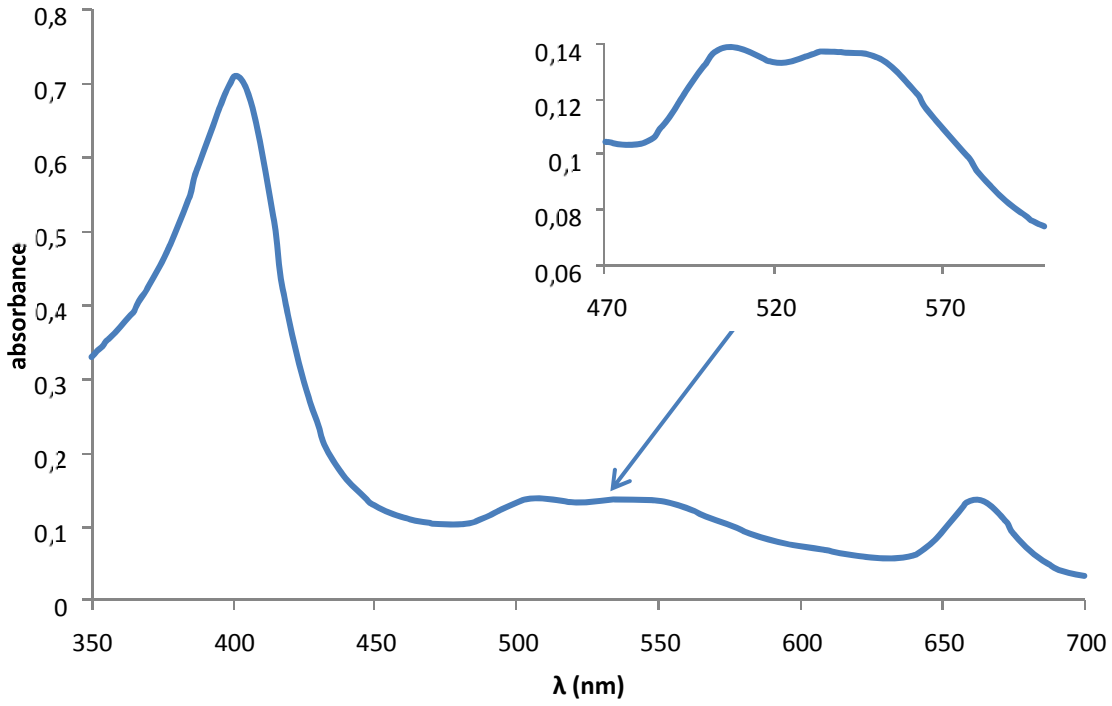


Figure 87 Spectre UV-Visible du complexe AuNPs/PEI-SH/CD (**17**) (H_2O).

L'analyse du spectre UV-Visible montre la présence des bandes du spectre de la PEISH/chlorine (**16**) et celle des AuNPs (Figure 87). L'absorption des AuNPs à 530 nm est confondu avec les bande QIII et QIV. Cependant, on observe une augmentation de l'intensité de ces bandes par rapport au photosensibilisateur seul, mais il ainsi difficile de déterminer la

tailles des AuNPs. L'étude par DLS nous permet de mettre en évidence un diamètre hydrodynamique d'environ 40 nm, le potentiel zêta quant à lui indique une valeur de +25mV. L'addition de chlorine ne modifie pas la répartition des charges en surface du complexe AuNPs/PEI-SH/chlorine (**17**).

II.4.5. Synthèse de nanoparticules d'or non-sphériques

La propriété de l'effet SPR (Surface Plasmon Resonance) des nanoparticules d'or sphériques est liée à leur taille. Comme nous l'avons montré précédemment, il n'est pas possible de synthétiser des AuNPs sphériques stables qui pourraient être excitées avec la lumière rouge ou infrarouge. Afin de contourner cette contrainte, nous nous proposons de synthétiser des nanoparticules de forme non-sphérique (rod[139], prisme triangulaire [140], étoile[141] …), car elles permettent d'absorber également la lumière ayant des fortes longueurs d'onde (rouge et/ou infrarouge)[142].

II.4.5.1 Synthèse des nanoparticules triangulaires (24) en utilisant le CTAC

Les AuNPs triangulaires sont généralement synthétisées en présence du CTAC (Hexadecyltrimethylammonium chloride), du KI, de l'acide ascorbique et de la soude. Le CTAC est l'agent stabilisant. Dans cette réaction, la forme des AuNPs est contrôlée par la concentration de KI. L'acide ascorbique et la soude permettent de former de l'ascorbate de sodium, qui va jouer le rôle de réducteur. Le protocole utilisé est classique et décrit dans la littérature[143] (Figure 88).

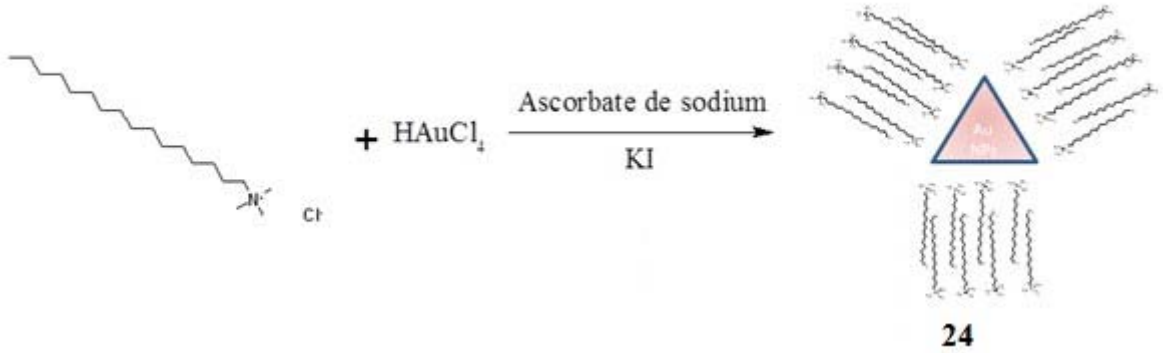


Figure 88 Synthèse d'AuNPs triangulaire (**24**) en présence de CTAC

[139] Murphy C., Gole A. M., Hunyadi S., Orendorff C., *Inorg. Chem.*, **2006**, 45, 7544-7554.
[140] Shankar S., Brargav S., Sastry M., *J. Nanosci. Nanotech.*, **2005**, 5, 1721-1727.
[141] Hao E., Schatz G. C., Hupp J., *J. Org. Chem*, **2004**, 14, 331-341.
[142] Tréguer-Delapierre M., Majimel J., Mornet S., Duguet E., Ravaine S., *Gold Bulletin*, **2008**, 41, 195-207.
[143] Chen L., Ji F., Xu Y., He L., Mi Y., Bao F., Sun B., Zhang X., Zhang Q., *Nano lett.*, **2014**, 14, 7201-7206.

Le produit est caractérisé par la spectroscopie UV-Visible (Figure 89). Il n'y a qu'un seul maximum d'absorption à 623 nm. Cette bande élargie est caractéristique de la forme triangulaire.

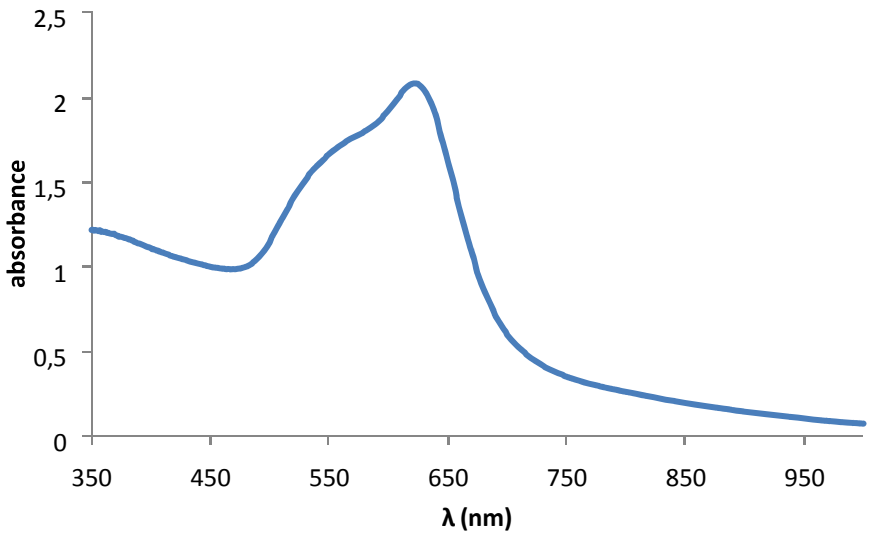


Figure 89 Spectre UV-Visible d'AuNPs triangulaire **24** en présence de CTAC (H_2O)

Le produit **24** est purifié par centrifugation, puis dialyse dans le but d'éliminer l'excès de CTAC. Cependant, l'observation en MET n'a pas pu être réalisée dans de bonnes conditions en raison de l'excès de CTAC présent dans l'échantillon et malgré de nombreuses étapes de purification par la centrifugation et la dialyse. Même si des nanoparticules triangulaires ont été obtenues par cette méthode, nous avons décidé de nous affranchir du CTAC afin de former des nanoparticules triangulaires plus faciles à caractériser, en utilisant du thiosulfate de sodium.

II.4.5.2 Synthèse des nanoparticules triangulaires (25) en utilisant le thiosulfate de sodium

La littérature montre qu'il est possible de synthétiser les AuNPs triangulaires par le thiosulfate de sodium [144]. La réaction requiert une solution de thiosulfate de sodium « fraichement » préparée (Figure 90). Pendant la réaction, il est important de ne pas agiter la solution car cela favorise la formation d'AuNPs sphériques.

[144] Pelaz B., Grazu V., Ibarra A., Magen C., del Pino P., de la Fuente J. M., *Langmuir*, **2012**, 28, 8965-8970.

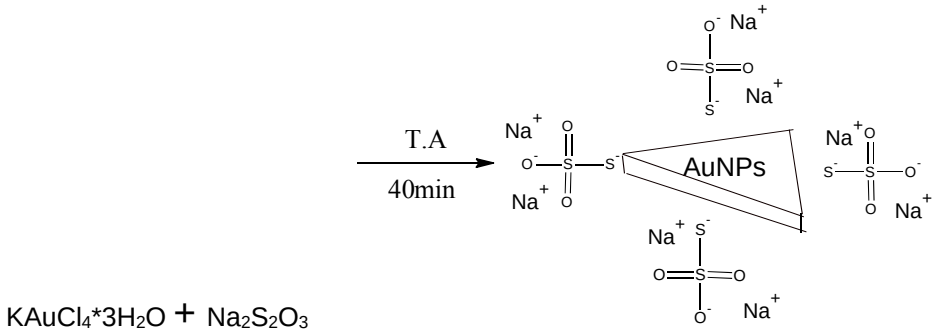


Figure 90 Schéma de synthèse d'AuNPs (**25**) à partir de thiosulfate de sodium

Afin d'obtenir la forme et la longueur du maximum d'absorption désirée, nous avons réalisé une étude en faisant varier la proportion de thiosulfate et d'or. Dans un premier temps, une solution de thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3$) à 0,5 mM et une solution d'acide tétrachloraurique ($HAuCl_4$• 3 H_2O) à 2 mM ont été préparées. Puis nous avons fait varier la quantité de $Na_2S_2O_3$ (200 à 1000µL) qui est ajoutée à 500µL de la solution de $HAuCl_4$ (Tableau 14). L'étude des spectres UV-Visible des échantillons montre qu'il y a un déplacement des maxima d'absorption vers le proche infra-rouge lorsque la quantité de $Na_2S_2O_3$ diminue.

Tableau 14 Etude de la variation de la proportion $HAuCl_4/Na_2S_2O_3$ sur la formation de AuNPs triangulaires (**25**)

Essais	**$HAuCl_4$, 2 mM**	**Volume de $Na_2S_2O_3$ 0,5 mM**	**Maximum d'absorbance**
5	500 µL	1000 µL	702 nm
4		800 µL	768 nm
3		600 µL	881 nm
2		400 µL	>1000 nm
1		200 µL	>1000 nm

Sur le spectre UV-Visible de l'essai 4 (Figure 91), les AuNPs triangulaires (**25**) possèdent deux maxima d'absorption, le premier vers 530 nm et un autre à 768 nm. La solution de $Na_2S_2O_3$ doit être fraichement préparée, car après 24 heures, la solution ne permet plus de former les AuNPs triangulaires. Une seule bande d'absorption vers 530 nm est observée, indiquant ainsi la formation de nanoparticules de forme sphérique.

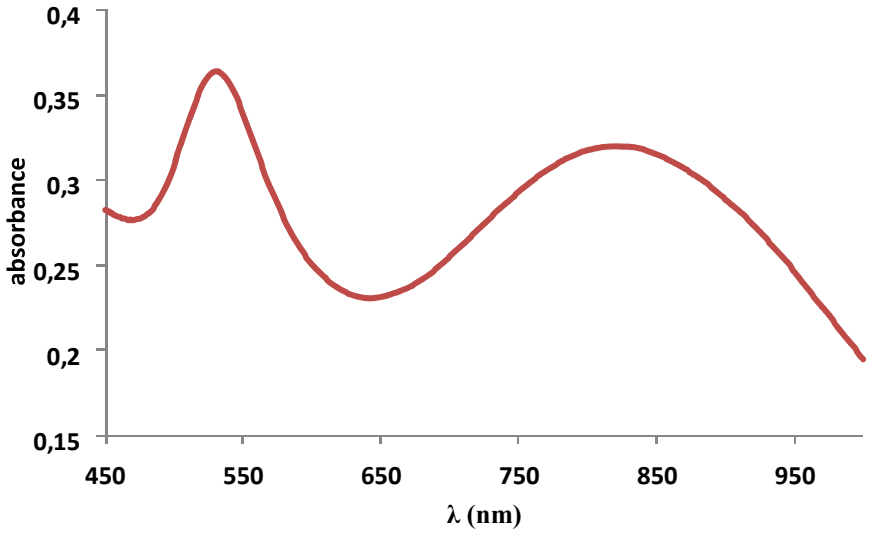


Figure 91 Spectre UV-Visible des AuNPs triangulaires (**25**) d'essai 4 (H_2O)

L'observation par MET (Figure 92) confirme la présence d'un mélange de forme sphérique 15 à 20 nm et de forme triangulaire (côté à 70 nm). La mesure du potentiel zêta (-30mV) met en évidence la présence des charges négatives en surface des nanoparticules **25**.

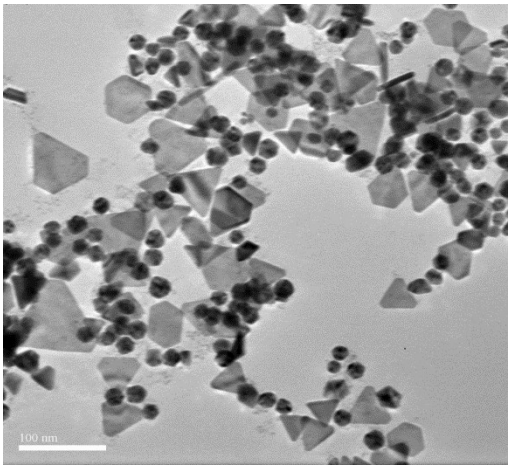


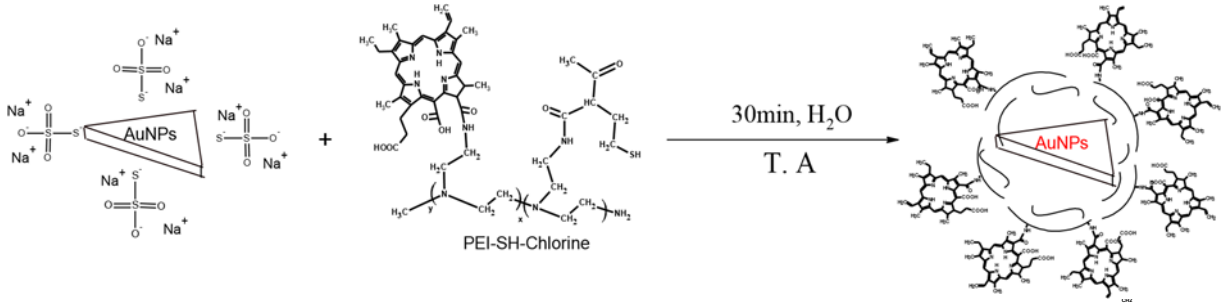
Figure 92 Image de MET d'AuNPs triangulaire (**25**)

II.4.6. Synthèse de complexe AuNPs(T) /PEI-SH/chlorine (26)

II.4.6.1 Couplage de PEI-SH/chlorine (16) et des nanoparticules d'or triangulaires (25)

Le complexe AuNPs/PEI-SH/chlorine est préparé à partir de la méthode de l'échange de l'agent stabilisant (Figure 93) comme décrit dans le chapitre (II.4.1.1). La PEI-SH/chlorine **16**, synthétisée précédemment, est ajoutée sous agitation à la solution des nanoparticules triangulaires. Après 30 minutes de réaction sous agitation magnétique. Le produit final est

purifié par dialyse contre l'eau ultra pure pendant une journée (membrane seuil de coupure 6000-8000Da).



25 **16** **26**

Figure 93 Schéma de synthèse du complexe AuNPs(T)/PEI-SH/chlorine (**26**)

II.4.6.2 Caractérisation

Le produit est caractérisé, tout d'abord, par spectroscopie UV-Visible. L'étude du spectre UV-Visible montre la présence de la bande de Soret et les quatre bandes Q caractéristiques de la présence du photosensibilisateur. On observe également la présence des deux bandes d'absorption à 530 nm et 725 nm qui sont caractéristique des AuNPs sphériques et triangulaires (Figure 94).

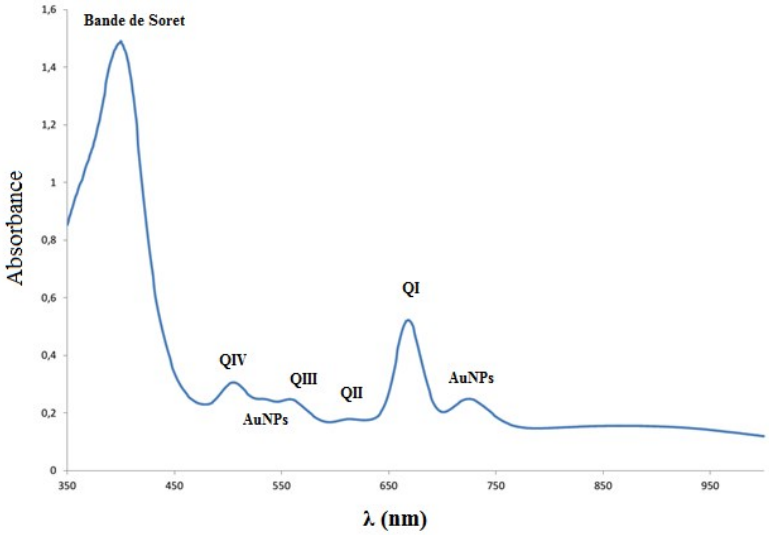


Figure 94 Spectre UV-visible du complexe AuNPs(T)/PEI-SH/chlorine (**26**) dans H_2O

Le spectre UV-Visible nous permet de déterminer une concentration de 10^{-4}M de chlorine fixé sur les nanoparticules. C'est à dire environ 40% de la masse totale. L'observation par MET montre que l'échange d'agent stabilisant ne modifie pas la forme des nanoparticules (Figure 95).

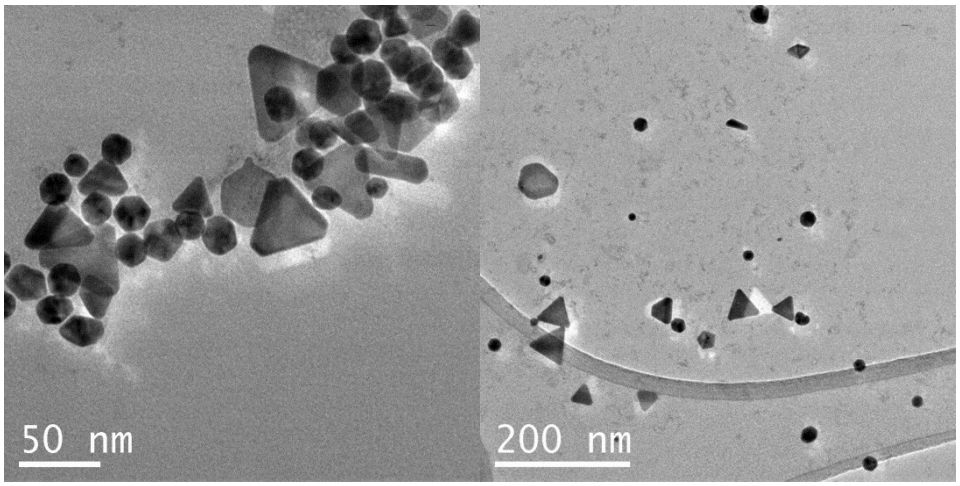


Figure 95 image de MET du complexe AuNPs (T)/PEI-SH/chlorine (**26**)

II.5. Evaluations biologiques

Tous les évaluations biologiques sont réalisé au sein du laboratoire LCSN par Les docteurs Jean-Pierre Mbakidi et Ludövic Micaleff. Les lignées choisies sont deux lignées de cancer prostatiques PC-3 et DU-145 et deux lignées de cancer colorectales HT29 et HCT116. Les viabilités sont révélées par la méthode du MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl tetrazolium bromide] et tous les tests ont été réalisés en triplicats.

II.5.1. Evaluations biologiques sur les complexes ioniques AuNPs/PEI/CD (10) sur les lignées cancéreuses prostatiques PC-3 et DU-145

Avant de réaliser les tests biologiques sur les complexes **10** et **11**, les cytotoxicités du vecteur (**2**) sur PC-3 et DU-145 sont évaluées. Les quantités du vecteur (**10**) testées sont équivalentes aux nanoparticules portant 1µM, 5µM, 10µM et 25µM de tanshinone IIA. Les résultats de viabilité sont révélés après 24h (Figure 96).

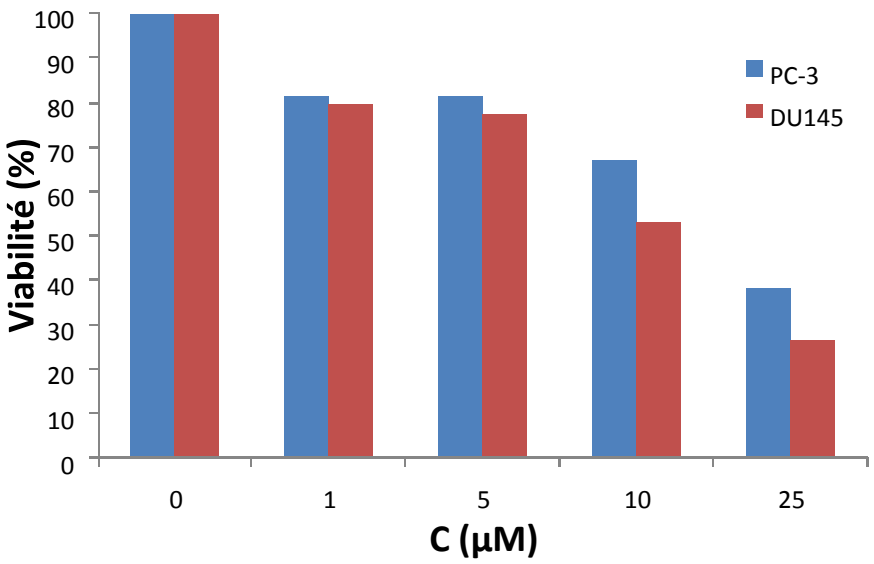
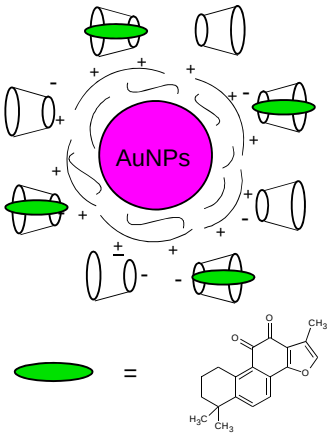


Figure 96 Viabilité cellulaires (%) du vecteur (**2**) sur les lignées PC-3 et DU-145

Ces tests montrent que les nanoparticules (**2**) sont légèrement toxiques. L'IC_{50} sur PC3 est de 18µM et sur DU-145 est de 13µM.

II.5.1.1 A partir de AuNPs/PEI/CD-tanshinone IIA (10)



10

Figure 97 Structure du composé **10**

L'activité cytotoxicique du complexe **10** (Figure 97) portant le tanshinone IIA comme principe actif a été comparée aux activités de la Tan IIA seul (**18**). Les concentrations de la tanshinone IIA choisies sont 1µM, 5µM, 10µM et 25µM. Les cellules testées sont deux lignées cancéreuses prostatiques: PC-3 et DU-145. Les résultats de viabilité sont révélés après 24h.

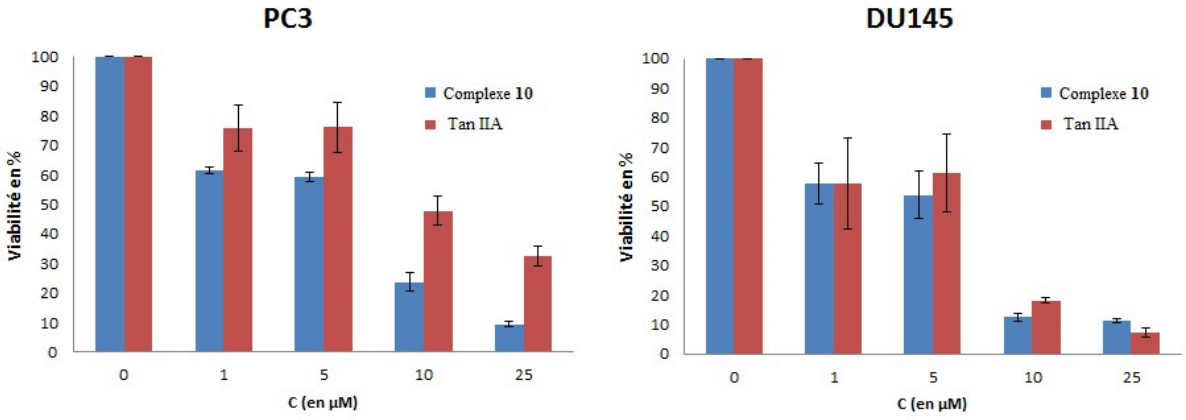


Figure 98 Viabilité cellulaires (%) en fonction de la concentration de tanshinone IIA

On observe que sur les cellules PC-3, l'amélioration de l'effet cytotoxique est plus sensible que sur DU-145 (Figure 98). Dans le cas de PC-3, on observe, pour le complexe **10**, une augmentation de la cytotoxicité d'un facteur deux par rapport à Tan IIA seule (**18)**. Ce qui est important de noter, c'est que pour DU-145, même si le complexe porteur de la Tan IIA n'améliore pas la cytotoxicité par rapport à la Tan IIA seule (**18)**, aucune perte de cytotoxicité n'est observée (Tableau 15).

Tableau 15 IC_{50} du complexe ionique AuNPs/PEI/CD/Tan IIA (**10)**

	IC_{50} (µM)	
	PC-3	DU-145
AuNPs/PEI/CD-Tan IIA (10)	6,0	5,0
Tan IIA (18)	10	5,5

II.5.1.2 A partir de AuNPs/PEI/CD-α-Mangostine (11)

Les conditions expérimentales sont similaires à celles utilisées avec la Tan IIA.

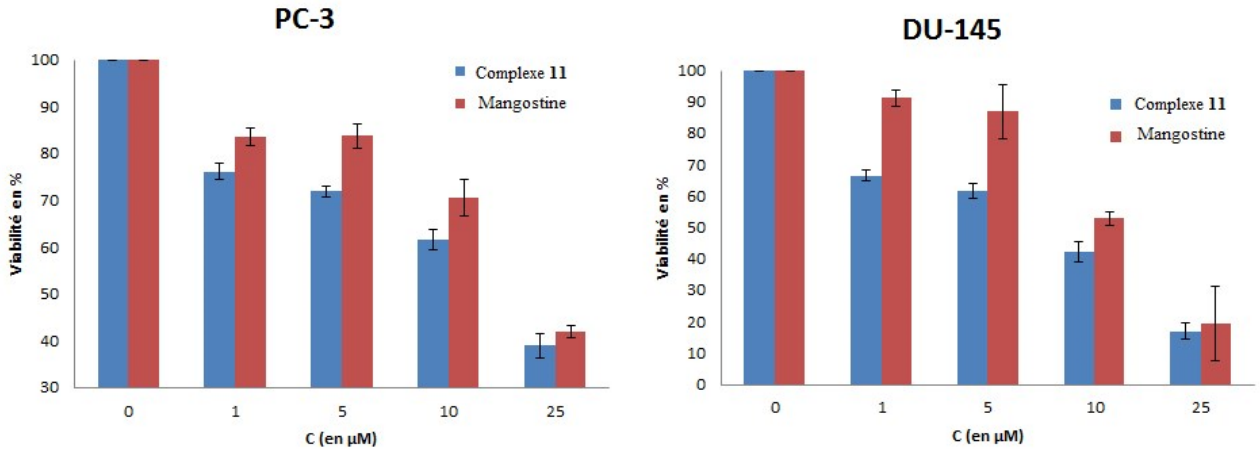


Figure 99 Viabilité cellulaire en fonction de la concentration d'α-mangostine seule **19** et d'encapsulée dans le complexe ionique **11**

L'étude des histogrammes (Figure 99) met en évidence une augmentation de la cytotoxicité par le produit vectorisé **11** par rapport à mangostine seule (**19**). Ce résultat est plus important pour les cellules DU-145 pour lesquelles le gain d'efficacité cytotoxique (IC_{50}) est supérieur à 50%. (Tableau 16)

Tableau 16 IC_{50} du complexe ionique AuNPs/PEI/CD-mangostine (**11**) et α-mangostine (**19**) (24h)

	IC_{50} (µM)	
	PC-3	DU-145
AuNPs/PEI/CD-Mango 11	17,5	6
Mangostine 19	20,8	11,2

Sur les cellules PC-3, on constate une augmentation de la cytotoxicité avec les nanoparticules mais qui est plus faible que sur la lignée Du-145. La lignée DU-145 est plus sensible à l'action de l'α-mangostine que PC-3 et il semblerait que les nanoparticules augmentent l'action de l'α-mangostine en pénétrant plus facilement dans cette lignée cellulaire (Tableau 16).

II.5.2. Tests sur les complexes covalents AuNPs/PEI-SH/CD (9) sur les lignées cancéreuses prostatiques PC-3 et DU-145.

II.5.2.1 Test de la cytotoxicité du complexe covalent AuNPs/PEI-SH/CD (9)

Afin d'évaluer, la cytotoxicité des nanoparticules seules vis-à-vis des lignées PC-3 et DU-145, des tests biologiques sont réalisées avec le complexe covalent AuNPs/PEI-SH/CD (**9**) sans principe actif (Figure 100). A des concentrations inférieures à 10µM, aucune cytotoxicité n'est observée.

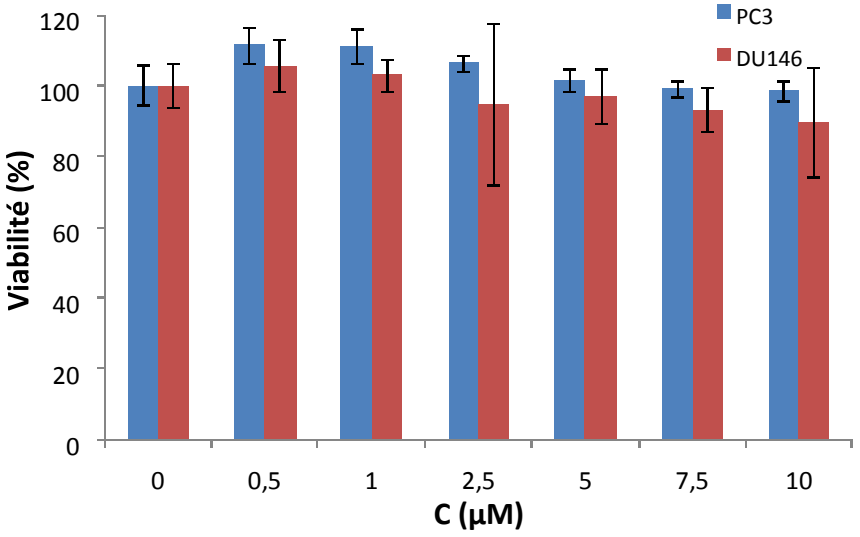
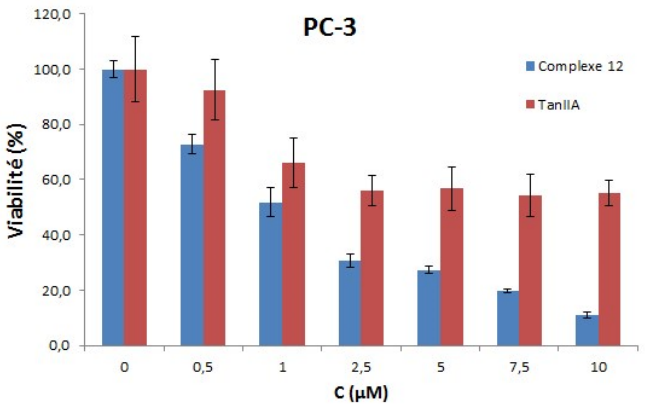


Figure 100 Viabilité cellulaire en fonction de la concentration en nanoparticules sans principe actif (**9**) sur les lignées PC-3 et DU-145

II.5.2.1 A partir du complexe covalent AuNPs/PEI-SH/CD-Tanshinone IIA (12)

Ces essais biologiques ont été réalisés *in vitro* au sein du LCSN par le docteur Ludovic MICALLEF. L'activité cytotoxicité du complexe avec le principe actif **12** est comparée à l'activité du principe actif seul. Les concentrations en tanshinone IIA sont respectivement 0,5µM, 1µM, 2.5µM, 5µM et 10µM. Comme précédemment, les lignées cellulaires cancéreuses sont PC-3 et DU-145. Les pourcentages de viabilité ont été révélés après 48h d'incubation.



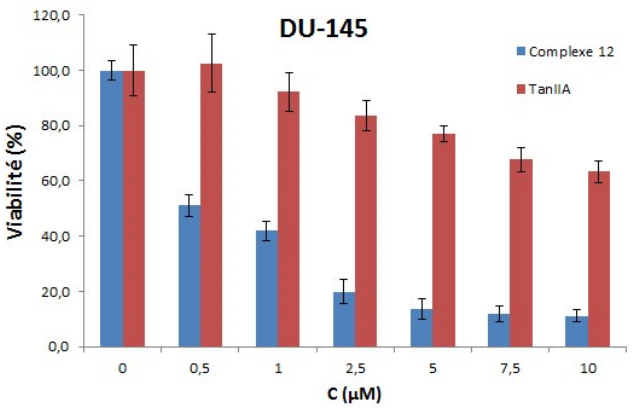


Figure 101 Viabilité cellulaires en fonction de la concentration de la tanshinone seule (**18)** et encapsulée au sein du complexe covalent de nanoparticules **12**

L'observation des histogrammes (Figure 101) montre tout d'abord une activité cytotoxique de la tanshinone IIA sur les deux lignées, mais on constate une cytotoxicité beaucoup plus importante lorsque la Tan IIA (**18**) est encapsulée au sein du complexe covalent AuNPs/PEI-SH/CD (**4)**.

Ainsi les IC_{50} de la Tan IIA seule (**18**) sur les deux lignées est supérieur à 10µM, alors que l'IC50 dans le cas du complexe (**12**), est inférieur ou égale à 1µM (Tableau 17). Par comparaison avec l'activité cytotoxique de la Tan IIA encapsulée au sein du complexe ionique AuNPS/PEI/CD (**2**) étudié précédemment, on observe une cytotoxicité plus importante pour le complexe **12** qui possède un lien covalent**.** Ce résultat peut s'expliquer par une stabilité plus importante de ces nanoparticules.

Tableau 17 IC_{50} du complexe covalent AuNPs/PEI-SH/CD-Tan IIA (**12**) et Tan IIA (**18**) (48h)

	IC_{50} (µM)	
	PC-3	DU-145
AuNPs/PEI/CD-TanIIA 12	1,1	0,5
Tan IIA 18	10	>10

L'effet beaucoup plus important que précédemment peut s'expliquer par une pénétration beaucoup plus efficace du principe actif car les nanoparticules liées de façon covalente sont plus stables.

II.5.2.2 A partir du complexe covalent AuNPs/PEI-SH/CD-αMangostine (13)

L'activité biologique de la mangostine a été évaluée selon le même protocole décrit précédemment avec la tanshinone IIA (Figure 102).

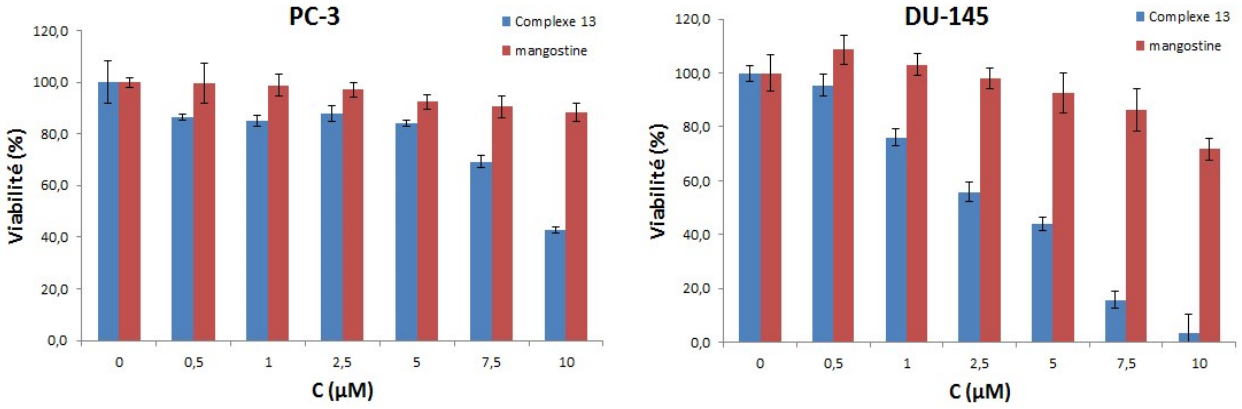


Figure 102 Viabilité cellulaire en fonction de la concentration de la mangostine et du complexe covalent des nanoparticules **13** et mangostine seule **19**

Sur la lignée PC-3 et DU-145, l'α-mangostine seule n'a pas un effet cytotoxicité très important. Par contre, les nanoparticules favorisent l'internalisation. Ainsi, on observe un IC_{50} l'IC_{50} de 9,2 µM pour la lignée PC-3 et 3,8 µM pour la lignée DU-145. On constate que la lignée DU-145 est plus sensible que la lignée PC-3 (Tableau 18)

Tableau 18 IC_{50} de l'α-mangostine encapsulée (**13**) comparée l'α-mangostine (**19**) (48h)

	IC_{50} (µM)	
	PC-3	DU-145
AuNPs/PEI/CD-Mango 13	9,2	3,8
Mangostine 19	>10	>10

II.5.3. Tests biologiques des complexes covalents 12 et 13 sur les cellules de cancer de colon

II.5.3.1 Etude de la cytotoxicité des nanoparticules 9 sur les lignées HT29 et HCT116

Les nanoparticules AuNPS/PEI-SH/CD covalents (**9**) ont également été testées sur les lignées cancéreuses du colon HT29 et HCT116. Les concentrations du principe actif encapsulées varient de 0.5µM à 10µM. la viabilité cellulaire est révélée par la méthode de MTT après 48h d'incubation.

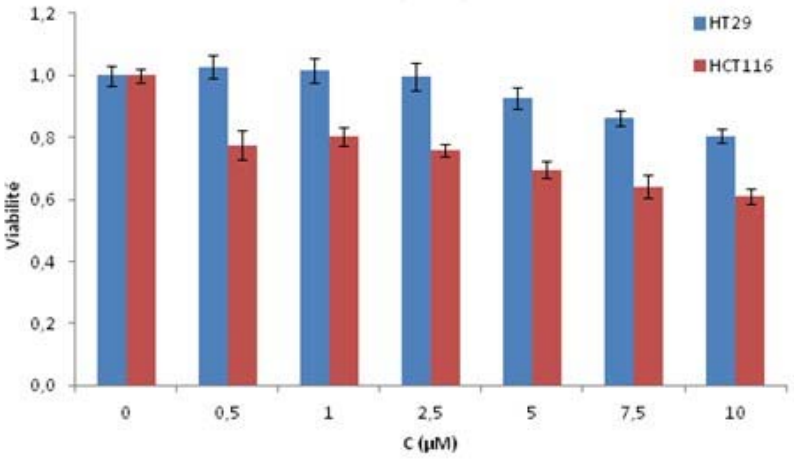


Figure 103 Viabilité cellulaire en présence de nanoparticule AuNPs/PEI-SH/CD (**9**) sans principe actif sur les lignées colorectales HT29 et HCT116

Tout d'abord, la cytotoxicité éventuelle du vecteur seul est évaluée (Figure 103). On observe une légère cytotoxicité sur les lignées HT29 et HCT116, les IC_{50} sont supérieures à la concentration maximale testée (>10µM). La lignée HCT116 est plus sensible que la lignée HT29.

II.5.3.2 Etude de la cytotoxicité des complexes (12), (13), tanshinone IIA (18) et α-mangostine (19)

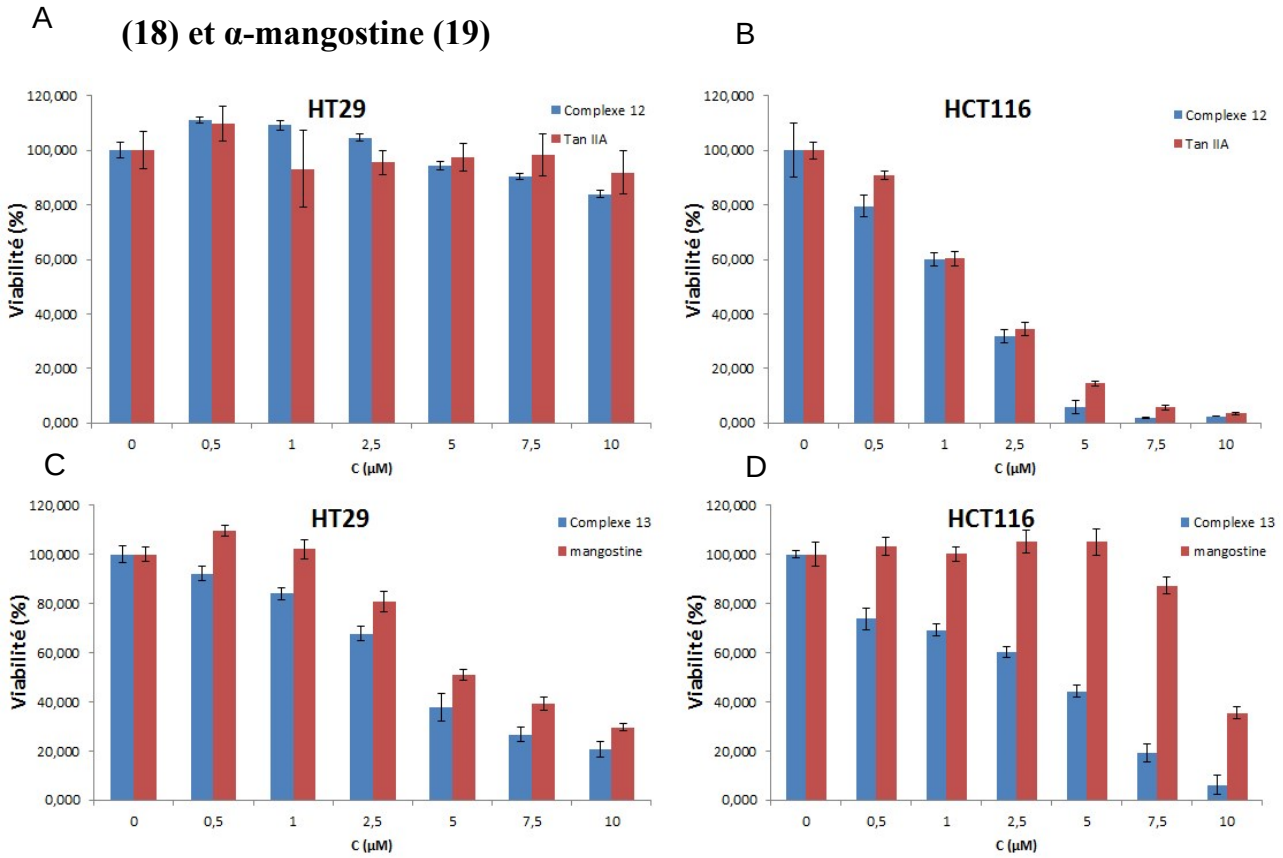


Figure 104 Viabilité cellulaires (%) en fonction de la concentration du complexe et principe actif

La tanshinone IIA, avec (**12**) ou sans nanoparticules (**18**), n'a pas montré de cytotoxicité sur la lignée HT29 (Figure 104, A). Par contre, elle présente une cytotoxicité importante sur la lignée HCT116 (Figure 104, B), avec un IC_{50} de l'ordre de 2 µm. Cette cytotoxicité est obtenue par la Tan IIA (**18**) seule ou encapsulée (**12**) dans les nanoparticules. En ce qui concerne l'α-mangostine (**19**) (Figure 104, C et D). Elle montre une cytotoxicité vis à vis de la lignée HT29 qui est quasi identique, que l'α-mangostine soit seule (**19**) ou encapsulée (**13**). Vis à vis de la lignée HCT116, on observe par contre une cytotoxicité beaucoup plus important lorsque qu'elle est encapsulée dans le complexe AuNPs/PEI-SH/CD
(**9**) qu'utilisée seule (IC50: 4,6 µM *vs* 9 µM) (Tableau 19).

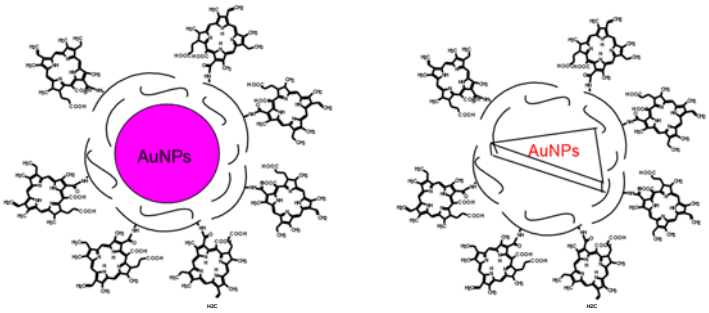
Tableau 19 IC_{50} des principes actifs vectorisés par le complexe covalent

Composés	IC_{50} (µM) HT29	HCT116
AuNPs (**9**)	>10	>10
Tanshinone IIA (**18**)	>10	1,5
AuNPs/PEI-SH/CD-Tan IIA (**12**)	>10	1,5
α-Mangostine (**19**)	5	9
AuNPs/PEI-SH/CD- Mangostine (**13**)	4,2	4,6

Ces résultats semblent montrer que le complexe covalent AuNPs/PEI-SH/CD favorise la pénétration du principe actif à travers les membranes cellulaires et tout particulièrement pour HCT116.

II.5.4. Activité photocytotoxicité des complexes AuNPs/PEI-SH/chlorine sphériques (17) et triangulaires (26)

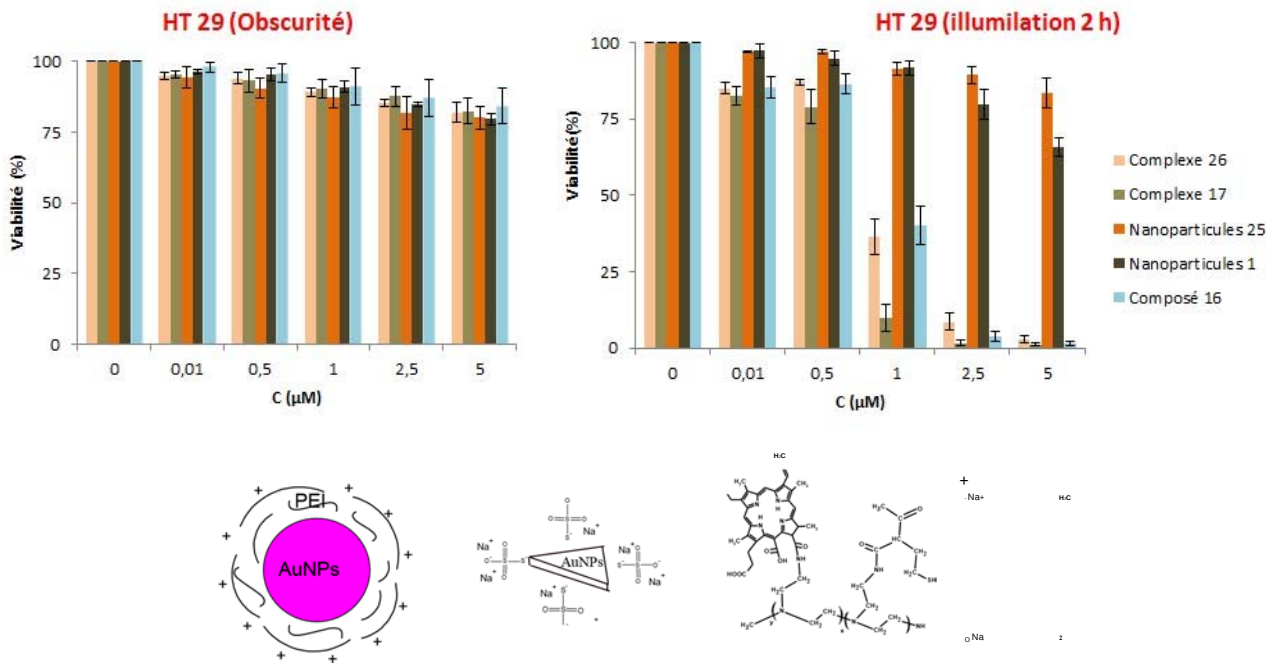
L'objectif de ces essais est d'évaluer l'activité en photothérapie dynamique des complexes d'or portant des photosensibilisateurs (PS) sur la lignée colorectale HT29.



17 **26**

Figure 105 Structure du complexe AuNPs/PEI-SH/chlorine sphérique (**17**) et triangulaire (**26**)

Deux formes de nanoparticules (sphérique et triangulaire) (Figure 105) ont été testées avec le même protocole. La concentration en PS a été déterminée par spectroscopie d'absorption UV-Visible. Les tests sont réalisés à l'obscurité et sous illumination pendant 2 h (une fluence de 25 J/cm^2 fournie par une lampe de lumière blanche de 18 W), sur la lignée de cancer colorectale HT29 (Figure 106).



1 **25** **16**

Figure 106 Viabilité cellulaire (%) des différents composés **1**, **16**, **17**, **25** et **26** sur la lignée HT29 à l'obscurité et après 2 h d'illumination

Dans un premier temps, la cytotoxicité de l'ensemble des composés a été évaluée en absence de la lumière sur la lignée HT29 (Figure 106, gauche). Après 24 h d'incubation, tous les produits ont montré une très faible cytotoxicité. En présence de la lumière (2 h) (Figure 106, droite), par contre, nous observons une photocytotoxicité très importante pour les nanoparticules d'or portant le photosensibilisateur (**17** et **26**) (IC_{50} : 0,7 µM pour complexe **26** et 0,4 µM pour **17**). Le complexe PEI-SH/chlorine sans nanoparticules (**16**) présente, quant à lui, également un IC_{50} de même ordre : 0,7µM. Ces résultats, très encourageant, montrent que

les nanoparticules d'or sphériques ou triangulaires recouvert de PEI sont capables d'être internalisées de manière analogue au complexe PEI/PS sans nanoparticules et nous permettent d'envisager une évaluation *in vivo* afin de vérifier le rôle de l'effet EPR des nanoparticules.

Chapitre III :
Conclusion et perspectives

Chapitre III. Conclusion et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons réalisé la synthèse de différentes tailles de nanoparticules d'or fonctionnalisées pour la vectorisation de deux principes actifs naturels ainsi que d'un photosensibilisateur. Tout d'abord, les nanoparticules d'or ont été préparées à partir de l'acide chloraurique et de polyéthylèneimines. Elles ont été caractérisées par UV, MET, ATG, DLS et potentiel zêta. Des cyclodextrines ont ensuite, été fixées à la surface des nanoparticules par des liaisons covalentes ou ioniques. En parallèle, trois principes actifs, la tanshinone IIA, l'α-mangostine et la chlorophylle *a* ont été extraites à partir de produits naturels. Puis la tanshinone et la mangostine ont été encapsulées dans la cavité des cyclodextrines fixées à la surface des nanoparticules. La chlorophylle *a*, quant à elle, est extraite à partir d'une algue, *Spirulina maxima* conduit à la formation de la purpurine 18. Afin de fixer ce photosensibilisateur sur les nanoparticules d'or, nous avons couplé, dans un premier temps, la purpurine 18 et la PEI, puis, réalisé la synthèse des nanoparticules d'or en utilisant ce complexe PEI/photosensibilisateur.

Afin de valider l'activité anti-cancéreuse de ces nanoparticules, les tests biologiques préliminaires *in vitro* ont été réalisés sur différentes lignées cancéreuses humaines : deux lignées cancéreuses prostatique (PC-3 et DU-145) ; deux lignées cancéreuses colorectales (HT29 et HCT116). Les deux principes actifs vectorisés par le complexe ionique AuNPs/PEI/CD **(2)** ont été testés sur PC-3 et DU-145. Pour la tanshinone IIA, un renforcement de la cytotoxicité est observé sur PC-3, mais pas sur DU-145. Pour l'αmangostine, le produit vectorisé est toujours plus efficace que le produit seul. Les principes actifs vectorisés par le complexe covalent AuNPs/PEI/CD sont également testés sur PC-3 et DU-145. Les nanoparticules d'or favorisent l'internalisation cellulaire dans tous les cas. De plus, l'activité biologique est évaluée sur deux lignées cancéreuses colorectales HT29 et HCT116. Au contraire des lignées prostatiques, les nanoparticules d'or ne favorisent que la pénétration de l'α-mangostine sur la lignée HCT116.

Pour le photosensibilisateur, nous avons réalisé des tests, avec deux types de nanoparticules (sphérique et triangulaire) portant de la chlorine, sur les cellules cancéreuses colorectales HT-29. Nous avons observé une amélioration de l'efficacité en présence de lumière essentiellement avec la forme sphérique.

En perspective, nous envisageons de poursuivre l'étude du complexe AuNPs/PEISH/CD lié de manière covalente et encapsulant des principes actifs afin de mieux comprendre les mécanismes

d'internalisation et de cytotoxicité et d'appréhender les voies de signalisation et de mort cellulaire impliquées. En ce qui concerne l'activité PDT, la présence de nanoparticules d'or sphériques et triangulaires recouvertes de PEI 1200 et fonctionnalisées par des photosensibilisateurs naturels ont montré une photocytotoxicité très importante (IC50 varie de 0,4 µM à 0,7 µM) et nous souhaiterions étudier le couplage de l'action photothermique avec l'activité PDT.

Enfin, dans tous les cas, il nous parait intéressant de valider ces différentes activités cytotoxiques par des essais *in vivo* afin de vérifier l'intérêt d'utiliser des nanoparticules d'or pour le ciblage passif par effet EPR.

Chapitre IV :
Partie expérimentale

Chapitre IV. Partie expérimentale

IV.1. Matériel et méthodes

IV.1.1. Liste des produits

Réactifs et solvants	fournisseurs	Abréviation
Acide chlorhydrique 97%	Aldrich	
Polyéthylèneimine 600 Da	Alfa aesar	PEI 600
Polyéthylèneimine 1200 Da	Alfa aesar	PEI 1200
Polyéthylèneimine 1800 Da	Alfa aesar	PEI 1800
Polyéthylèneimine 10000 Da	Alfa aesar	PEI 10 k
Polyéthylèneimine 25000 Da	Alfa aesar	PEI 25 k
Polyéthylèneimine 75000 Da	Alfa aesar	PEI 75 k
Iodure de potassium	Acros	
Acétone 99%	VWR	
Thiosulfate de sodium >99%	Acros	
Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tetrazolium	promega	MTT
Chloroforme	SDS	
N,N-Diméthylformamide	SDS	DMF
Hydroxyde de sodium	Alfa aeser	
Méthanol	VWR	MeOH
Ethanol	VWR	EtOH
N-hydroxysuccinimide 98 %	Acros	NHS

Acide ascorbique 99+%	Alfa aeser	
chlorure d'hexadécyltriméthylammonium >95%	TCI	CTAC
Iode	Prolab	
1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide	Aldrich	EDC
Triphénylphosphine	Alfa aeser	
(2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl) oxy	Acros	TEMPO
hypochlorite de sodium	Carlo erba	
acide tétrachloraurique 99.99%	Alfa aeser	
borohydrure de sodium	Aldrich	
Bromure de sodium	Aldrich	
DL-N-acetylhomocysteine thiolactone	TCI	
Sulfure d'Ethylène	aldrich	
Citrate de sodium	Alfa aeser	
Acide lipïque	Alfa aeser	
Acide thiomalique	TCI	
β-cycldextrine β-cycldextrine sulfate	TCI	β-CD
	aldrich	β-CD sulfatée
Ether de pétrole	VWR	E.P
Méthanolate de sodium 0,5M	acros	
Danshen (*Salvia miltiorrhiza*)	Tianqitang (China)	

Comprimé d’écorce de mangoustan	Nature's Plus (USA)

IV.1.2. Matériaux des analyses

IV.1.2.1 Chromatographie

IV.1.2.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM est utilisée pour suivre l'avancement de la réaction. La plaque CCM contient une couche de silice déposée sur une plaque d'aluminium (silice déposée sur plaque d'aluminium : gel de silice 60 F254 Merck de 0,2 mm d'épaisseur). La révélation des plaques est effectuée,

- Soit par observation directe pour les composés colorés,
- Soit sous lampe UV (254 nm) pour les composés conjugués,
- Soit par vaporisation d'une solution à 1 % d'orcinol dans l'acide sulfurique à 20 % suivie d'un chauffage à 100 °C dans le cas des glucides,
- Soit par vaporisation d'une solution de ninhydrine suivie d'un chauffage à 100 °C pour les produits aminés.

IV.1.2.1.2. Chromatographie sur la plaques préparatives

La chromatographie sur plaques préparatives similaire à la CCM, mais une plaque en verre (20*20cm) est utilisée comme support du gel de silice. La silice est 60 PF254. Cette méthode est utilisé afin de purifier les produits de réaction.

Les plaques préparatives sont préparées par six. 80g de silice est dispersée dans 220 mL d'eau. Une couche de 2 mm d'épaisseur est déposée sur les plaques. Après un séchage à l'air, les plaques sont mises dans une étuve chauffée à 100 °C pendant 2 h avant usage.

Les méthodes de révélation de produit sont souvent les deux suivantes :

- Par l'œil nu pour les produits colorés
- Par une lampe UV (254 nm) pour les produits aromatiques et conjugués.

IV.1.2.1.3. Chromatographie sur la colonne

Selon la quantité de produit brut à purifier, on choisit la bonne dimension de colonne en verre. Une colonne de taille 1,5m*80mm est utilisée pour les grandes quantités et une colonne de 0.8m*40mm pour les petites quantités. La silice est particulière pour la colonne (silica gel 60 0.015-0.040mm). L'éluant dépend de la polarité de produit à purifier.

IV.1.2.2 Analyses

IV.1.2.2.1. Spectroscopie UV-Visible

Les spectres UV –Visibles en solution ont été réalisés sur un spectrophotomètre Perkin Elmer Lambda 25 et ont été effectués dans des cellules de quartz de 1 cm de trajet optique. Tous les spectres ont été réalisés à une concentration voisine de 10^{-5}– 10^{-6} M dans le solvant adéquat. Les longueurs d'onde λ, correspondantes aux absorbances maximales sont exprimées en nm et les coefficients d'absorption molaire ε, en M^{-1}•cm^{-1}.

IV.1.2.2.2. Spectroscopie infrarouge

Les spectres IR ont été réalisés sur un Perkin Elmer FT – IR spectrometer SPECTRUM 1000 sur des échantillons conditionnés en pastilles de KBr. Les nombres d'onde υ sont exprimés en cm^{-1}.

IV.1.2.2.3. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un Brücker DPX-400, respectivement à une fréquence de 400,13 MHz pour le proton au service commun de l'Université de Limoges.

IV.1.2.2.4. Spectrométrie de masse

Les spectres de masse ont été effectués à l'IPCM (UMR 7201 CNRS) de l'Université Pierre Marie Curie, Paris VI par le Dr. Sandra Alves. Les spectres MALDI ont été obtenus par désorption laser avec un spectromètre à temps de vol Voyager Elite (Framingham MA, USA) équipé d'un laser d'azote 337 nm (VSL 337ND). Les spectres ESI ont été réalisés en mode positif avec un spectromètre à capture 158 d'ions Esquire 3000 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) équipé d'une source ESI (Analytica Bradford, CT, USA). Les spectres HRMS sont réalisés à l'ICOA (UMR 6005 CNRS) de l'Université d'Orléans.

IV.1.2.2.5. Microscopie électronique à transmission (MET)

Les images de MET sont réalisées au SPCTS de l'Université de Limoges. Elles sont prises avec un modèle JEOL2010, par observation avec une tension accélératrice de 200 kV. Les produits sont déposés sur grille de cuivre (300mesh) avec une membrane de carbone.

IV.1.2.2.6. Analyse élémentaire (µ-analyse)

L'analyse a été réalisée suivant la méthode CHNS avec un standard de type BBOT grâce à un appareil « THERMO QUEST ». L'hélium Alpha gaz 2 et l'oxygène Alphagaz 2 sont les gaz utilisés au cours de l'analyse.

IV.1.2.2.7. DLS – Potentiel zêta

La distribution en taille, les indices de polydispersité et le potentiel zêta des nanoparticules ont été mesurés au sein du laboratoire grâce à un appareil « Zetasizer NanoZS, Malvern Instruments, Royaume-Uni ».Pour la mesure du DLS, chaque échantillon a été analysé en triple à 20°C et à un angle de diffusion de 173°C. Les données de potentiel zêta à 20°C et 150 Vont été recueillies à partir de la mobilité électrophorétique et en utilisant le modèle de Smoluchowski. L'eau pure a été utilisée comme milieu de dispersion de référence.
L'instrument a été calibré avec un Malvern –68 mV standard avant chaque cycle d'analyse.

IV.1.2.2.7.1.1. Analyse thermogravimétrique (ATG)

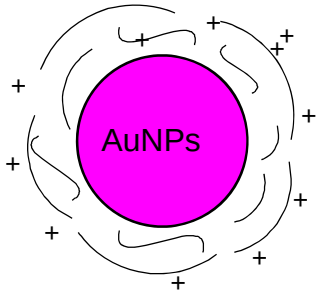
Les spectres ATG des nanoparticules synthétisées ont été réalisés sur un appareil SETARAM série Setys 2400 à l'école nationale superieure d'ingénieur de limoges ENSIL (figure 127). Tous les spectres ont été obtenus pour une montée en température de 10 °/min allant de 25 °C jusqu'à 600 °C sous balayage d'argon, utilisant l'alumine calcinée comme référence inerte.

IV.1.2.2.7.1.2. Nettoyage des traces d'or

Les verreries utilisées pour la synthèse de nanoparticules d'or sont nettoyées avant et après par l'eau régale (HNO_3/HCl : 1/3 v/v). Et puis, les verreries sont racées par l'eau déionisée afin de neutraliser l'eau régale.

IV.2. Synthèses

Complexe AuNPs /PEI (1)



Avant les manipulations, toutes les verreries sont lavées avec l'eau régale. Dans un erlenmeyer de 50 mL, 10 mg de $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ (29,4 µmol) sont dissous dans 20 mL d'eau

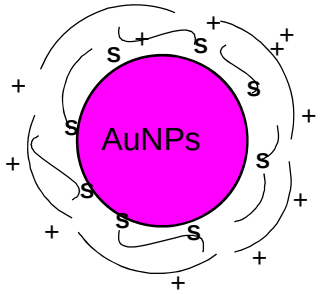
ultra-pure. 1mL de solution PEI à 1% est ajouté. La solution est agitée pour obtenir une solution orange homogène. L'erlenmeyer est mis dans une étuve chauffée à 95°C pendant 30min. Une dialyse est utilisée pour éliminer les PEI en excès. Une solution rouge est obtenue (la couleur varie selon la proportion Au/PEI).

UV-Visible (H_2O): λ_{max}=530 nm

DLS (H_2O): 40 nm

Potentiel zêta (H_2O) : +25 mV

Complexe AuNPs /PEI-SH (4)



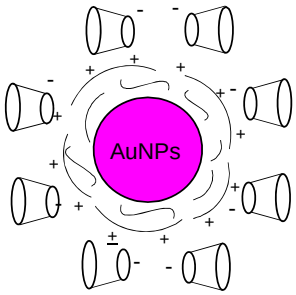
Dans un erlenmeyer de 50 mL, 10 mg de $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ (29,4 µmol) sont dissous dans 20 mL d'eau ultra-pure. 1mL de solution PEI_{1800}-SH à 1% est ajouté. La solution est agitée pour obtenir une solution orange homogène. L'erlenmeyer est mis dans une étuve chauffée à 95°C pendant 30min. Une dialyse est utilisée pour éliminer les PEI en excès. Une solution rouge est obtenue (la couleur varie selon la proportion Au/PEI).

UV-Visible (H_2O): λ_{max}=520 nm

DLS (H_2O): 20 nm

Potentiel zêta (H_2O) : +25 mV

Complexe ionique AuNPs (S)/PEI/CD (2 et 5)



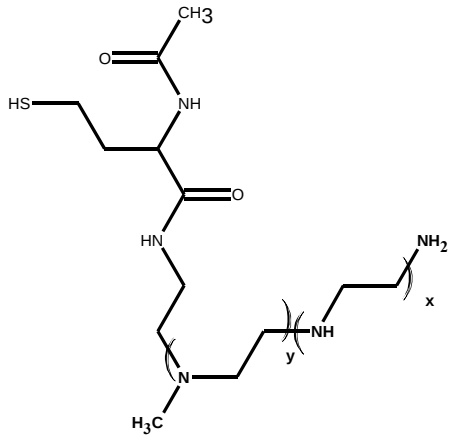
Dans un erlenmeyer qui contient des AuNPs synthétisées (**1**)**,** on ajoute, sous agitation, et goutte à goutte, 1mL solution aqueuse de β-cyclodextrine sulfate de sodium 10 mg/mL. La solution est agitée pendant 30min. Pour éliminer l'excès de cyclodextrine, on réalise une centrifugation à 10000 rpm pendant 5mins. Puis le culot est redispersé dans 20 mL d'eau ultra-pure.

UV-Visible (H_2O) : λ_{max}=533 nm

DLS (H_2O) : 100 nm

Potentiel zêta (H_2O) : +25 mV

PEI 1800 portant de la fonction thiol (3)

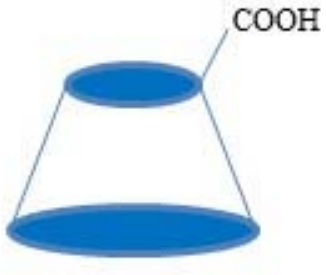


Dans un erlenmeyer de 250 mL, on dissout 500 mg (270µmol, 1éq) de PEI1800 Da dans 100 ml de $CHCl_3$. 88 mg (550µmol, 2éq) de DL-N-acetylhomocysteine thiolactone sont dissous dans 10 mL de chloroforme et la solution est ajoutée goutte à goutte dans la solution de PEI. La réaction est poursuivie à température ambiante, pendant 3 h, sous agitation. On suit la réaction par la disparition de DL-N-acetylhomocysteine thiolactone par CCM.

Après la réaction, le milieu réactionnel est mis dans un ballon de 250 mL et le solvant est évaporé sous vide. On obtient un produit visqueux jaune avec un rendement quantitatif.

Analyse élémentaire (en%) **:** N (25,6) ; C (47,8) ; H (9,1) ; S (1,9) ; O (15,6)

β-cyclodextrine carboxylée (6)



Dans un ballon de 500 mL, 1,134 g (1 mmol, 1éq) de β-CD, 20 mg de TEMPO (0,13 mmol, 0,13éq) et 0,5 g NaBr (4,9 mmol, 5éq) sont dissous dans 300 ml de l'eau distillée. 2,86 mL d'hypochlorite de sodium 13,7% (5,16 mmol, 5éq) est ajouté dans le ballon et le pH est ajusté à 10 par HCl 4 M. La température de réaction est maintenue à 0°C pendant toute la réaction. Après 4 h, le produit est mis en dialyse pendant 48 h contre l'eau distillée dans une

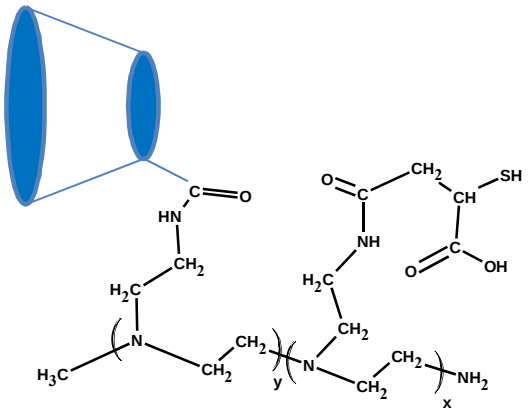
membrane de seuil de coupure 500 Da. Après l'évaporation de l'eau. 800 mg de solide blanc est obtenu. Le rendement est 70%.

IR (cm^{-1}) : 1608 (COO^-).

Analyse élémentaire (en%) **:** C (32,0) ; H (5) ; O (63,0)

RMN^{1}H (D_2O) : δ_{ppm}= 5,1 (1H, m, H-1) ; 3,7-3,5 (2H, m, H-2,4) ; 3,8-3,9 (1H, m, H-3) ; 3,94 (2H, m, H-5,6).

PEI portant de la cyclodextrine et la fonction thiol (7)

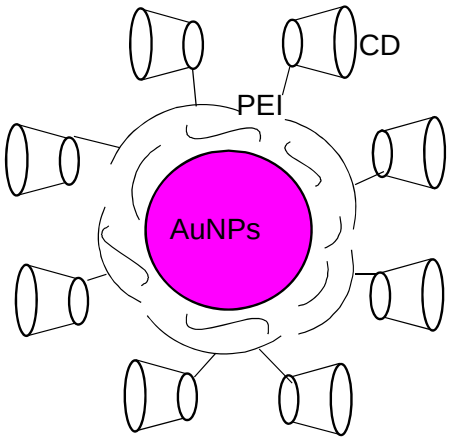


Dans un ballon de 100 mL, 100 mg (0,05 mmol, 1 éq) de PEI1800 et 17 mg (0,1 mmol, 2 éq) d'acide thiomalique et 120 mg (0,1 mmol, 2 éq) de cyclodextrine oxydée (**5**) sont dissous dans 30 mL d'eau distillée. 25 µL (0,15 mmol, 3 éq) d'EDC (1-éthyl-3-(3diméthylaminopropyl) carbodiimide) et 16 mg (0,15 mmol, 3 éq) de NHS (*N*hydroxysuccinimide) sont utilisés comme agents de couplage. La réaction est mise à température ambiante, sous agitation pendant 24 h. Le produit final est isolé par la dialyse contre l'eau distillée avec une membrane 2000 Da. Après évaporation de l'eau, on obtient 200 mg de solide blanc avec un rendement 84%.

IR : 1608 (γ COO^-).

Analyse élémentaire (en%) **:** N (16,7%) ; C (48,0%) ; H (8,4%) ; S (0,2%) ; O (26,7%)

Complexe covalent AuNPs (S)/PEI/CD (9)



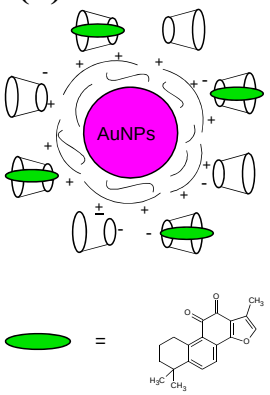
Dans un pilulier de 30 mL, 10 mg de $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ (29,4 µmol) sont dissous dans 20 mL d'eau ultra-pure. 1,5 mL de solution du complexe PEI-SH/CD (**7**) 1,5% est ajouté. La solution est mise sous agitation pour obtenir une solution orange homogène. L'erlenmeyer est mis dans une étuve chauffée à 95 °C pendant 30mins. Une dialyse sur membrane 2000 Da est utilisée pour éliminer la PEI en excès.

UV-Visible (H_2O) : λ_{max}=533 nm

DLS (H_2O) : 57 nm

Potentiel zêta (H_2O) : +20 mV

Complexe ionique AuNPs (S)/PEI/CD-tanshinone IIA (10)



Encapsulation de tanshinone IIA :

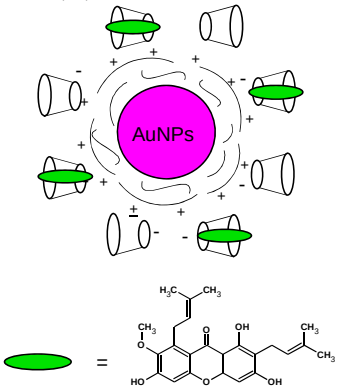
1,2mg de tanshinone IIA (**18**) (1équivalent par rapport la cyclodextrine) est dissous dans minimum d'éthanol et est ajouté goutte à goutte dans 20 mL de solution, sous agitation magnétique, des nanoparticules (**2** ou **5**).

Après une centrifugation à 13000 rpm, le culot est récupéré et redispersé, à l'aide de ultrasons, dans l'eau ultra-pure.

Dosage des tanshinone IIA :

3ml de chloroforme est ajouté pour extraire la Tan IIA. La concentration de Tan IIA est dosée par la spectroscopie UV-Visible, avec l'epsilon de Tan IIA (ε=2785 L/mol^{-1}cm^{-1}). La quantité massique encapsulée est calculée en utilisant le résultat de dosage UV-Visible. 15 mg de tanshinone est fixées sur 1g d'AuNPs (1,5%).

Complexe ionique AuNPs (S)/PEI/CD- α-mangostine (11)



Encapsulation de α-mangostine:

Une solution d'α-mangostine (**19**) dissoute dans minimum d'éthanol est préparée; avec de la quantité correspondante à 1 équivalent (1.7mg) par mole cyclodextrine. Celles-ci est

ajoutée goutte à goutte à 20 mL de solution de nanoparticules (**2** ou **5**), sous agitation magnétique.

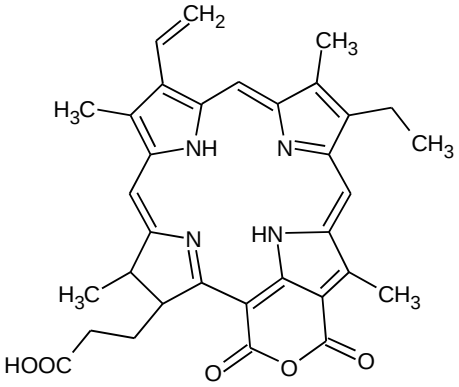
Après une centrifugation à 13000 rpm, le culot est récupéré et redispersé, à l'aide des ultrasons, dans l'eau ultra-pure.

Dosage des α-mangostine :

Puis, le dosage de la quantité de principe actif inséré se fait par spectroscopie UVVisible, après centrifugation à 13000 rpm et extraction au chloroforme du culot. Pour mangostine, ε = 23175 $L/mol^{-1}cm^{-1}$.

46 mg de mangostine sont encapsulées dans 1 g de nanoparticules. Soit 4,6% de la masse totale.

Purpurine 18 (14)



Purpurine 18

Dans un erlenmeyer de 250 mL, 5 g de *Spirulina maxima* sont mis en présence de 100 mL d'acétone. Après 30 minutes à reflux, sous agitation, à l'abri de lumière, l'extrait est filtré et le solide est extrait une deuxième fois. Après filtration les volumes des extraits sont ressemblés et est réduit à 100 mL puis mis à réagir avec 20 mL d'une solution de NaOH 6M durant 3 heures, à température ambiante, sous agitation et sous bullage d'air comprimé. 10mL d'acide chlorhydrique 37% sont ensuite ajoutés goutte à goutte et la solution est refroidie à température ambiante durant 30 minutes. La solution est filtrée et la phase organique, récupérée par décantation puis évaporée.

Le brut réactionnel est repris dans chloroforme et l'ajout d'éther de pétrole permet de cristalliser le produit désiré.

Le composé pur est obtenu par une chromatographie sur la colonne de silice en utilisant l'éluant ($CHCl_3$/EtOH : 90/10). 31mg de solide violet est obtenu avec un rendement de 0,6%.

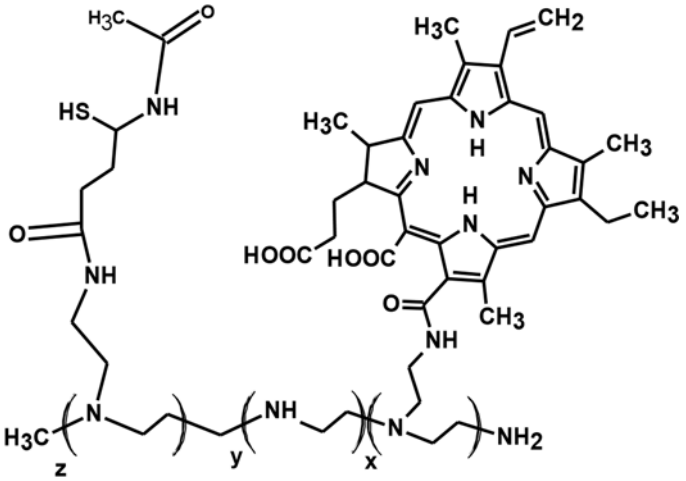
Rf = 0,56 ($CHCl_3$/EtOH : 90/10).

UV-Visible ($CHCl_3$), λ en nm ($\varepsilon x10^{-3}$) : 413 (108,0) ; 481 (3,9) ; 510 (5,8) ; 548 (21,3) ; 646 (8,0) ; 701 (43,4).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : voir Tableau 5

SM (ESI-MS) : m/z = 565,2445 $[M + H]^+$.

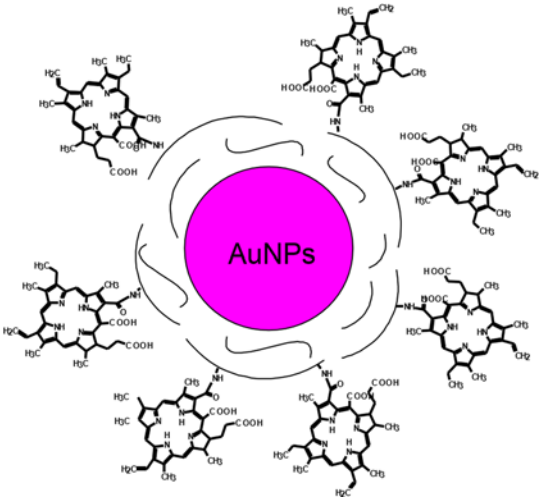
PEI 1200 portant de la chlorine et de la fonction thiol (16)



10 mg (16 µmol, 2 éq) de purpurine 18 (**14**) sont mis à réagir avec 10 mg (8 µmol, 1 éq) de PEI 1200 dans 5 ml chloroforme pendant 1h à température ambiante puis 2,4 mg (16 µmol, 2éq) de N-acetylhomocysteine thiolactone sont ajoutés afin de fixer des fonctions thiol sur la PEI. Le solvant est évaporé. Le produit est mis en dialyse contre l'eau distillée avec une membrane de 2000 Da. Le rendement est quantitatif.

UV-Visible ($CHCl_3$), λ nm (εx10^{-3}) : 400 (52,4) ; 502 (6,0) ; 530 (2,8) ; 552 (1,9) ; 611 (2,4) ; 665 (14,1).

Complexe AuNPs (S)/PEI-SH/chlorine (17)



Dans un pilulier de 30 mL, 10 mg de HAuCl4•3H2O (29,4 µmol) sont dissous dans 20 mL de l'eau ultra-pure. 1,5 mL de solution du complexe PEI-SH/chlorine (**16**) 1% est ajouté. La solution est mise sous agitation pour obtenir une solution orange homogène. L'erlenmeyer est mis dans une étuve chauffée à 95°C pendant 30 minutes. Une dialyse avec membrane 6000 Da est utilisée pour éliminer les réactifs en excès.

Dosage de chlorine par UV-Visible :

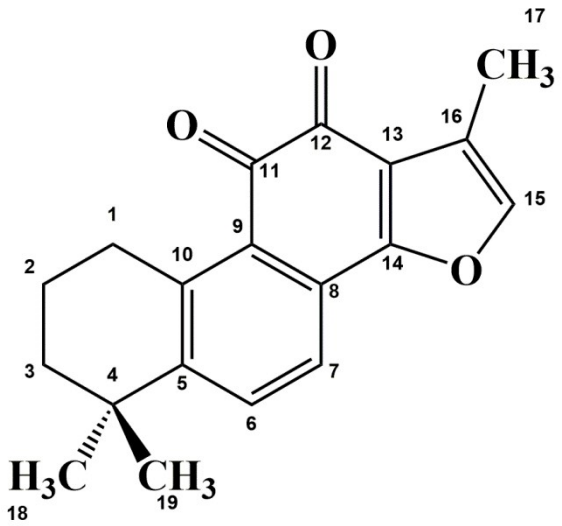
La solution obtenue est dosée par spectroscopie UV-Visible avec l'ε de la chlorine (ε=14100). La concentration de chlorine est 1*10^{-4} M. La chlorine compte 30% de masse totale.

UV-Visible (H_2O): λ_{max}=400 nm, 508 nm, 535 nm, 668 nm

DLS (H_2O) : 41 nm

Potentiel zêta (H_2O) : +25.5 mV

Tanshinone IIA (18)



Dans un ballon de 2 L, 200 g de copeaux de racines séchées de *Salvia miltiorrhiza (Danshen)* sont mis en présence de 1 L d'acétone. Après 1 h à reflux, l'extraits est filtré sur papier filtre et les solides sont extraits par l'acétone une deuxième fois. Après la deuxième filtration, les filtrats sont ressemblés l'acétone est évaporée sous vide.

L'extrait est purifié par une chromatographie sur colonne de gel de silice. L'éluant utilisé est ($CHCl_3$/éther de pétrole : 50/50). 450 mg de solide rouge (tanshinone IIA) est obtenue.

Le produit est ensuite purifié sur plaques préparatives avec l'éluant ($CHCl_3$ pur). 450mg de produit rouge-orange est obtenu. Le rendement est 0,2%

IR (cm^{-1}) : 1670 (ν α-quinone); 1692 (ν α-quinone)

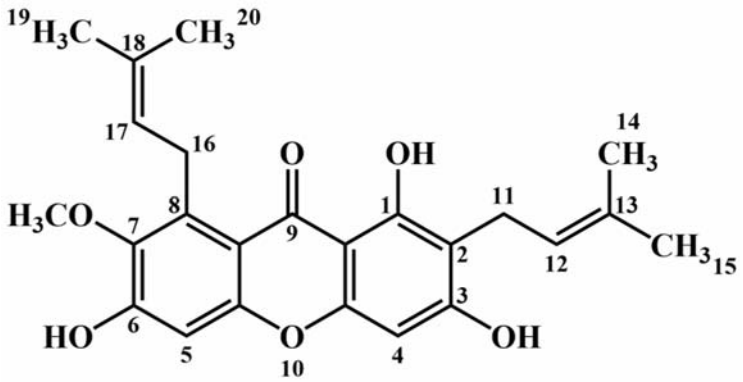
Rf = 0,50 ($CHCl_3$)

UV-Visible ($CHCl_3$), λ nm (εx10^{-3}) : 462 (2,8).

RMN1H (CDCl3) : δ_{ppm}= 7,63 (1H, d, ^3J=8.1Hz, H-6) ; 7,53 (1H, d, ^3J=8.1 Hz, H-7) ; 7,22 (1H, s, H-15) ; 3,17 (2H, t, ^3J=6.38 Hz, H-1) ; 2,26 (3H, s, H-17) ; 1,79 (2H, m, , H-2) ; 1,66 (2H, m, H-3) ; 1,31 (6H, s, H-18,19) .

SM (ESI): m/z=295,1332 **$[M+H]^+$**

α-mangostine (19)



Dans un ballon de 500 mL surmonté d'un réfrigérant, 4 g de comprimé d'écorce de mangoustan enrichie en mangostine sont mélangés à 200 mL d'acétone. Le mélange est porté à reflux dans un bain d'huile et maintenu sous agitation pendant 30 minutes.

La solution est filtrée et le solide est repris dans 200 mL d'acétone. Le tout est à nouveau chauffé à reflux à 120°C pendant 30 minutes. Une seconde filtration est réalisée. Les filtrats sont rassemblés et l'acétone est évaporée à l'évaporateur rotatif afin de récupérer le solide.

Les 3,52 g de solide brut obtenus sont ensuite purifiés par chromatographie sur colonne gel de silice (dépôt liquide : dans CH_2Cl_2 ; éluant : CH_2Cl_2/EP, gradient allant de :
60/40 à 100/0 ; puis CH_2Cl_2/MeOH : 99/1 à 98/2).

Une purification sur plaques de silice préparatives permet d'isoler le produit pur. Le produit désiré est obtenu sous la forme d'un solide jaune orangé (m = 1,14g). Le rendement est 25%.

IR (cm^{-1}) : 3418 (ν O-H phénolique, liaison H); 3254 (ν O-H phénolique) ; 1640 (ν cabonyl); 1610 (δ O-H phénolique); 1583 (δ O-H phénolique) ***Rf***
= 0,3 (CH_2Cl_2/MeOH : 95/5).

UV-Visible ($CHCl_3$), λ en nm (ε$x10^{-3}$) : 313 (23,2).

RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ_{ppm}= 13,77 (1H, s, OH-1) ; 6,82 (1H, s, H-5) ; 6,29 (1H, s, H-4) ; 5,29 (2H, dd, ^3J=4.7 Hz, ^4J=1.2 Hz, H-12,17) ; 4,09 (1H, ^3J=5.4 Hz, H-16) ; 3.81 (1H, OCH_3-7) ; 3,45 (2H, ^3J=6.6 Hz, H-11) ; 1,84 (3H, s, H-19) ; 1,83 (3H, s, H-20); 1,77 (3H, s, H14) 1,69 (3H, s, H-15).

SM (ESI-MS) : m/z = 409,3 $[M + H]^+$.

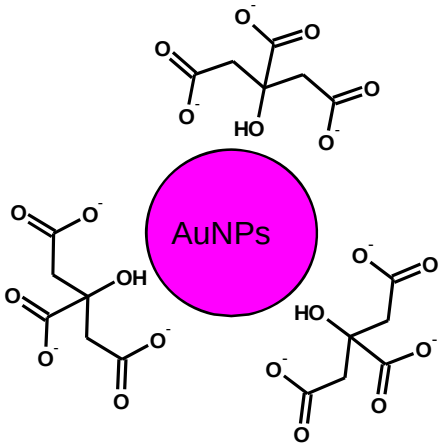
Cyclodextrine iodée (20)

On ajoute 1,134 g (1mmol, 1 éq) de β-cyclodextrine dans une solution de DMF contenant 5 g (20µmol, 19 éq) de triphénylphosphine et 5 g (20mmol, 20 éq) de diiode. Le mélange est chauffé à 80°C sous argon. Le volume de solvant est réduit de moitié après 18 h de réaction. 200 ml de méthanol sont ajoutés et le précipité obtenu récupéré par filtration. Le produit est finalement séché à l'air libre. Le rendement est de 45%. Ce produit est caractérisé par RMN.

Analyse élémentaire (en %): C (28,1) ; H (3,8).

RMN^{1}H (DMSO) : δ_{ppm}= 4,98 (1H, H-1) ; 3,29 (1H, H-2) ; 3,79 (1H, H-3) ; 3,35 (1H, H-4) ; 3,57 (1H, H-5) ; 3,66 (2H, H-6).

Complexe AuNPs/citrate de sodium (21)



Dans un erlenmeyer de 100 mL, on introduit 50 ml de solution de $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ (C=0,25 M) (15µmol). La solution est chauffée jusqu'à ébullition. 0,5 mL de la solution de citrate de sodium (1%) est ajouté rapidement. En 30 secondes, la couleur de la solution passe

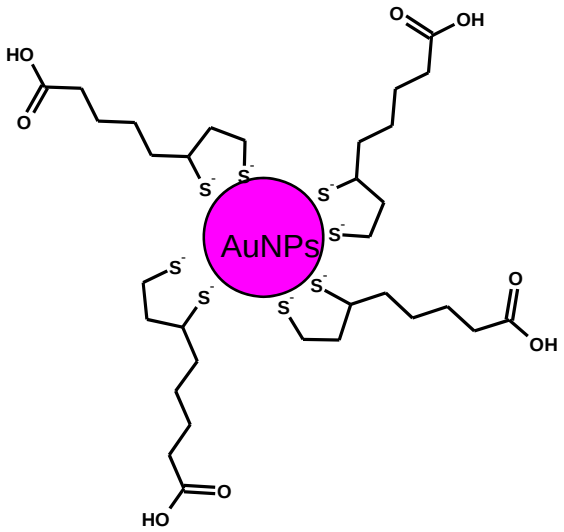
de jaune à bleu-noir. Puis après une minute, la couleur se stabilise au rouge brillant. La solution est laissée pendant 16 h pour qu'elle se stabilise avant de l'utiliser.

UV-Visible (H_2O) : λ_{max}=522 nm

DLS (H_2O) : 37 nm

Potentiel zêta (H_2O) : -16 mV

Complexe AuNPs/acide lipoïque par la méthode d'échange d'agent stabilisant (22)



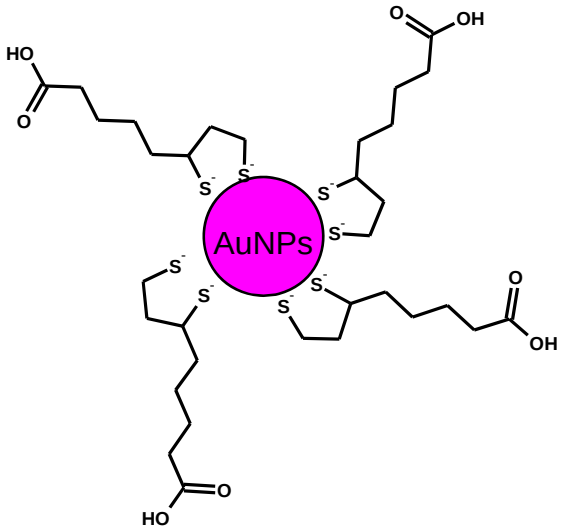
2 mg d'acide lipoïque sont dissous dans 5mL d'eau ultra-pure et cette solution est ajoutée goutte à goutte, sous agitation, dans la solution d'AuNPs (**21**) synthétisée précédemment. L'agitation est poursuivie pendant 30 minutes. Les AuNPs sont purifiées par dialyse avec une membrane de 6000 Da, contre l'eau.

UV-Visible (H_2O) : 527 nm

DLS (H_2O) : 42 nm

Potentiel zêta (H_2O) : -20 mV

Complexe AuNPs / acide lipoïque (22)



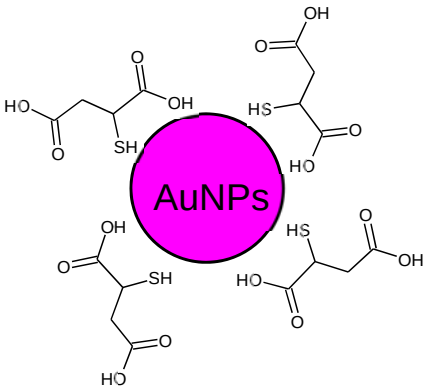
Dans un erlenmeyer, 5 mg (15 µmol) de $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ sont dissous dans 20 mL d'éthanol. 3 mg d'acide lipoïque est ajouté dans la solution. La solution devient incolore. 1mL de solution de $NaBH_4$ (1 mg/mL) (26 µmol) est ajouté goutte à goutte. La précipité est récupéré par une centrifugation (4000 rpm ; 5 min). Le culot est récupéré et redispersé dans une solution de soude (0,001 M).

UV-Visible (H_2O) : pas de pic

DLS (H_2O) : 6 nm

Potentiel zêta (H_2O) : -25 mV

Complexe AuNPs/acide thiomalique (23)



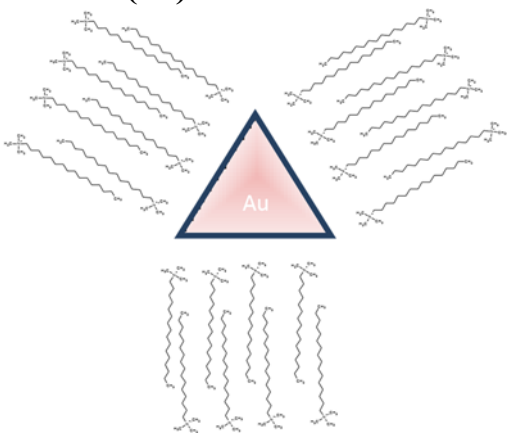
Dans un erlenmeyer, 5 mg (15µmol) de $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ est dissous dans 20 mL d'éthanol. 3 mg d'acide thiomalique sont ajoutés dans la solution. La solution devient incolore. 1mL de solution de $NaBH_4$ (1 mg/mL) (26 µmol) est ajouté goutte à goutte. La précipité est récupéré par une centrifugation (4000 rpm ; 5 min). Le culot est séché et redispersé dans une solution de soude (0,001 M).

UV-Visible (H_2O) : pas de pic

DLS (H_2O) : 5 nm

Potentiel zêta (H_2O) : -25 mV

Complexe AuNPs/CTAC (24)

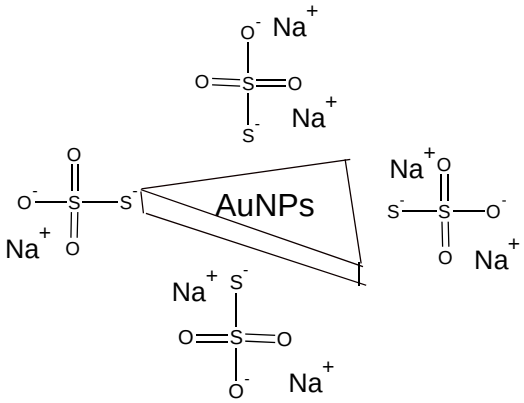


Dans un erlenmeyer de 20 mL, 1,6 mL de CTAC (0,1 M) sont dilués dans 8 mL de l'eau ultra-pure. Ensuite, 75 µL d'une solution de KI 0,01 M, et 80 µL de solution $HAuCl_4$ 25,4 mM sont ajoutés dans l'erlenmeyer sous agitation modeste. 80 µL de solution aqueuse d'acide ascorbique est injectée sous agitation très douce jusqu'à décoloration de la solution.
25 µL de solution de soude 0,1 M sont ajoutés dans l'erlenmeyer sous 2 secondes d'agitation. La couleur passe de incolore à rouge, violet et finalement, bleu. La réaction dure 15 minutes environ.

UV-Visible (H_2O) : λ_{max}=630 nm

Potentiel zêta (H_2O) : +41 mV

Complexe AuNPs (T)/thiosulfate de sodium (25)

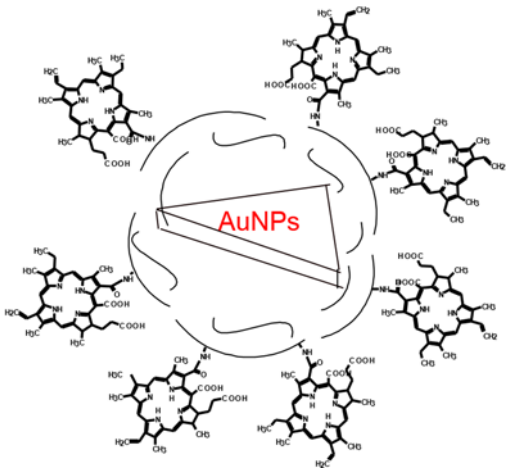


Deux solutions sont fraichement préparées : une solution aqueuse de $HAuCl_4$ 2 mM et une solution de thiosulfate de sodium 0,5 mM, 170 mL de $Na_2S_2O_{3(aq)}$ sont mélangés avec 100 mL de $HAuCl_{4(aq)}$. La réaction est laissée sans agitation pendant 40 minutes. Une solution violette est formée. La solution est ensuite centrifugée, puis le culot est redispersé dans l'eau ultra-pure

UV-Visible (H_2O): λ_{max}=530 nm; 706 nm

Potentiel zêta (H_2O) : -40 mV

Complexe AuNPs (T)/PEI-SH/chlorine (26)



Dans un erlenmeyer de 500 mL, on ajoute, sous agitation, la solution de PEI-SH/chlorine (**16**) dans la solution des AuNPs (T) (**25**) synthétisée précédemment. L'agitation continue pendant 30 minutes, et puis, les AuNPs sont purifiées par une dialyse avec membrane 6000-8000 Da.

Dosage de chlorine par UV-Visible :

La solution obtenue est dosée par spectroscopie UV-Visible avec ε de chlorine (ε=14100). La concentration de chlorine est $2,6*10^{-4}$ M. La chlorine compte 40% de masse totale.

UV-Visible (H_2O) : λ_{max}=400 nm, 505 nm, 557 nm, 613 nm, 668 nm, 725 nm. ***Potentiel zêta*** (H_2O) : +15 mV

IV.3. Tests biologiques

IV.3.1. Culture cellulaire de PC-3, DU-145, HCT116 et HT29

Les cultures cellulaires sont effectuées dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire. Elles sont maintenues dans une atmosphère (37°C, 5% CO_2 et 95% d'humidité) et contrôlées quotidiennement à l'aide d'un microscope à contraste de phase. Les lignées colorectales (HT-29, HCT116) sont entretenues dans un milieu spécifique DMEM Glutamax™ supplémenté avec du Sérum de veau fœtal (SVF) et de la pénicilline streptomycine. Les prostatiques (PC-3 et DU-145) sont quant à elles cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute).

IV.3.2. Principe

L'effet cytotoxicité (ou photocytotoxicité) est évalué par un test MTT[145]. C'est une technique colorimétrique basée sur la transformation de MTT en cristaux bleu de Formazan par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. La quantité de cristaux est proportionnelle à la quantité des cellules viables. La quantité de cristaux de Formazan est mesurée par spectrophotométrie à $\lambda = 595$ nm.

IV.3.3. Méthodologie

IV.3.3.1 Cytotoxicité

Les lignées cellulaire (PC-3 et DU-145) sont mises en culture dans des plaques 96 puits (en triplicat) à raison de 100 µL de suspension cellulaire à $0{,}5 \cdot 10^{-5}$ cellules/mL et sont laissées à incubation à 37°C et à 5% de CO_2 pour leur permettre d'adhérer au support et être en phase exponentielle de croissance au moment du traitement. Après 24h de culture, les surnageants sont éliminés. Ensuite, les cellules sont traitées pendant 24h avec différents actifs (produits **18,19, 10, 11, 12, 13**) avec les concentrations (0M, 1µM, 5µM, 10µM et 25 µM).

IV.3.3.2 Photocytotoxicité en PDT

Seule la lignée cellulaire colorectale (HT29) a été traitée avec les molécules (**16, 17, 25, 26**) et avec les concentrations (0M, 0,01µM, 0,5µM, 1µM et 2,5 µM et 5µM). Après 24h d'incubation, le milieu de culture contenant les HT29 traitées avec les molécules a été lavées trois avec du PBS stérile (Phosphate Salin Buffer) (Sigma®) puis remis dans un nouveau milieu

[145] Mosmann T., *J Immunol Methods.,* **1983,** 16, 55-63.

de culture. Les cellules sont ensuite irradiées avec une lumière blanche (à une fluence de 25J/cm^2 fournie par une lampe de 18 W) et les cellules sont de nouveau incubées à 37°C sous atmosphère contrôlée. Après une nuit d'incubation, 15 µl de solution de MTT (Promega) sont ajoutés dans chaque puits à une concentration finale de 0,4 mg/ml.

IV.3.4. Test MTT

Après 24h ou 48h de traitements, 15 µL de solution de MTT (Promega) sont ajoutés dans chaque puits et les cellules sont laissées à incuber pendant 3h sous atmosphère contrôlée. Les plaques 96 puits sont ensuite centrifugées à 4000 rpm à température ambiante pendant 15 minutes afin de culotter les cellules ainsi que les cristaux de Formazan formés. Le milieu de chaque puits est retiré et les cristaux de Formazan sont solubilisés par 100 µL de DMSO puis les plaques sont incubées toute la nuit à 37 °C. L'absorbance est mesurée à 595 nm à l'aide d'un lecteur de plaques (TRIAD, Dynex Technologies). Les résultats sont présentés en pourcentage par rapport au contrôle négatif (cellules non-incubées avec les molécules citées) : (DO moyenne des cellules traitées / DO moyenne des cellules contrôles) x 100 ± écart-type ou présentés sous la forme de courbes traçant l'évolution de l'absorbance à 595 nm (activité déshydrogénase résiduelle) en fonction du temps.

Pour chaque principe actif, la valeur IC_{50} (concentration inhibitrice médiane) est déterminée pour comparer les efficacités.

Références

1. Mazloum-Ardakani M., Hosseinzadeh L., Khoshroo A., *J. Electroanal. Chem.*, **2015**, 757, 58-64.
2. Elmore S., *Toxicol. Pathol*., **2007**, 35, 495-516.
3. Favaloro B., Allocati N., Graziano V., Di iIlio C., De Laurenzi V., *AGING*, **2012**, 4, 330-349.
4. Golstein P., *méd. Sci.*, **1995,** 11, 99-104.
5. Lin N.-Y., Beyer C., Gibel A., Kireva T., Scholtysek C., Uderhardt S., Munoz L. E., Dees C., Distler A., Wirtz S., Krönke G., Spencer B. Distler O., Schett G., Distler J. H. W., *Ann. Rheum. Dis.*, **2013**, 72, 761-768.

6. Eisenkop S. M., Spirtos N. M., Lin W.-C.M., *Gynecol. Oncol.*, **2006**, 103, 329-335.

7. Vergote I., Amant F., Kristensen G., Ehlen T., Reed N. S., Casado A., *Eur. J. Cancer*, **2011**, 47, supplement 3: S88-S92.

8. Hanahan D., Weinberg R. A., *Cell*, **2000**, 100, 57–70.

9. Sonnenschein C., Soto A. M., *Seminars in Cancer Biology*, **2008**, 18, 372-377.

10. Bergers G., Benjamin L. E., *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, 3, 401 -410.

11. Yancopoulos G. D., Davis S., Gale N. W., Rudge J. S., Wiegand S. J., Holash *J. Nature*, **2000**, 407, 242-248.

12. Hamanaka R. B., Chandel N. S., *J. Exp. Med.*, **2012**, 209, 211-215.

13. Brahimi-Horn M. C., Chich J., Pouyssegur J., *Curr. Opin. Cell Biol.* **2007**, 19, 223-229

14. Fulda S., Galluzzi L., Kroemer G., *Nature reviews*, **2010**, 9, 447.

15. Devasagayam T.P., Tilak J.C., Boloor K.K., Sane K.S., Ghaskadbi S.S., Lele R.D., *J Assoc Physicians India.* **2004**, 52, 794-804.

16. Dougherty T. J., Gomer C. J., Henderson B. W., Jori G., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Peng Q., *J. Natl. Cancer Inst.*, **1998**, 90, 889-905.

17. Dougherty T.J., *Plenum Press New York*, **1983**, 3.

18. Allison R. R., Downie G. H., Cuenca R., Hu X., Childs C. J. H., Sibata C. H., *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **2004**, 1, 27-42.

19. Nyman E.S., Hynninen P.H., *J. Photochem. Photobiol. B.*, **2004**, 73, 1-28.

20. Jablonski A., *Nature*, **1933**, 10, 839-840.

21. Raab O., *Z. Biol*, **1900**, 39, 524-546.

22. Tappeiner V. H., Jesionek A., *Muench. Med. Wochschr.*, **1903**, 50, 2042-2044.

23. Policard A., *Soc. Biol.*, **1924**, 91, 1422-1423.

24. Auler H., Banzer G., *Z. Krebsforschung*, **1942**, 53, 65-68.

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

26. Rasmüssen-Taxdall D., Ward G., Figge F.H.J., *Cancer*, **1955**, 8, 78-81.

27. Lipson R. L., Ednard J., Baldes D., Olsen A.M. , *J. Natl. Cancer Inst.*, **1961**, 26,1-11.

28. Dougherty T.J., Grindey G., *J. Natl. Cancer Inst.*, **1975**, 55, 115-121.

29. Salet C., *Biochimie*, **1986**, 68, 865-868.

30. Aneja P., Rahman M., Beg S., Aneja S., Dhingra V., Chugh R., *Recent Patents on AntiInfective Drug Discovery*, **2014**, 9, 121-135.

31. Maruyama K., Ishida O., Takizawa T., Moribe K., Adv. *Drug Delivery Rev.*, **1999**, 40, 89-102.

32. Couvreur P., Vauthier C., *Pharm. Res.*, **2006**, 23, 1417-1450.

33. Embleton M. J., Rowland G. F., Simmonds R. G., Jacobs E., Mardsen C. H., Baldwin R. W., *Br. J. Cancer*, **1983**, 43-49.

34. Sun C., Sze R., Zhang M.Q., *J. Biomed. Mater. Res. PartA*, **2006**, 78A, 550–557.

35. Pegg A. E., *Cancer Res.*, **1988**, 48, 759-774.

36. Wallace H. M., Fraser A. V., Hughes A., *Biochem. J.*, **2003**, 376, 1-14.

37. Bachrach U., *Amino Acids*, **2004**, 26, 307-309.

38. Deng H., Bloomfield V. A., *Biophys. J.*, **1999**, 77, 1556-1561.

39. Fernandez C. O., Buldain G. , Samejima K., *Biochim. Biophy. Acta*, **2000**, 1476, 324330.

40. François Lamarche « Synthèse et Évaluation Biologique de Porphyrines-Polyamines en vue de leur Application en Photothérapie Dynamique des Cancers » **2004,** thèse N°9500297, thèse Université de Limoges France.

41. Guillaume Garcia « Nouveaux macrocycles tétrapyrroliques et dérivés vectorisables en photothérapie – Porphyrines et chlorines polyaminées et trimères » **2006**, Thèse N° 442006, thèse Université de Limoges France.

42. Chaleix V., Sol V., Guilloton M., Granet R., Krausz P., *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 5295-5299.

43. Gottlieb E., *Nat. Cell Biol.*, **2011**, 13, 195–197.

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

45. Van Dongen G. A.M.S., Visser G. W. M., Vrouenraets M. B., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2004**, 56, 31-52.

46. Köhler G., Milstein C., *Nature*, **1975**, 256, 495-497.

47. Trikha M., Yan L., Nakada M. T., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2002**, 13, 609-614.

48. Yang X., Yang M., Pang B., Vara M., Xia Y., *Chem. Rev.*, **2015**, 115, 10410-10488.

49. Li Q., Wang Y., Feng N., Fan Z., Sun J., Nan Y. *J. Drug Target*. **2008** 16:725-732

50. Taissire Benamor « Synthèse et caractérisation de silices mésoporeuses hydrophobes à porosité contrôlée » **2011,** thèse N° tel-00705930, thèse Université de Haute Alsace, France.

51. Sun T., Zhang Y. S., Pang B., Hyun D. C., Yang M., Xia Y., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014,** 53, 12320-12364.

52. Canton I., Battaglia G., *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 2718-2739.

53. Ding H.-M., Ma Y.-Q., *Small*, **2015**, 11, 1055–1071.

54. Maruyama K., Ishida O., Takizawa T., Moribe K., *Adv. Drug Delivery Rev*., **1999**, 40, 89-102.

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

56. Nicolas DROGAT « Elaboration de nanocristaux de cellulose photosensibles : application à la photothérapie dynamique des cancers » **2011**, thèse N° XX-2011, Université de Limoges, France.

57. Kang B., Opatz T., Landfester K., Wurm F. R., *Chem. Soc., Rev.*, **2015**, 44, 8301-8325.

58. Simberg D., *ACS Nano*, **2015**, 9, 8647-8650.

59. Song L., Hennink E.J., Young I.T., Tanke H.J., *Biophys. J.*, **1995**, 68, 2588-2600.

60. Yanasigawa T., Shimizu T., Kuroda K., Kato C., *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **1990**, 63, 988992.

61. Zhao D., Feng J., Huo Q., Melosh N., Fredrickson G. H., Chmelka B. F., Stucky G.D., *Science.* **1998**, 279, 548-552.

62. Trewyn B. G., Nieweg J. A., Zhao Y., Lin V. S.-Y., *Chemical Engineering Journal*, **2007**, 137, 23–29.

63. Kociak M., Stéphan O., Gloter A., Zagonel L. F., Tizei L. H.G., Tencé M., March K., Blazit J. D., Mahfoud Z., Losquin A., Meuret S., Colliex C., *Comptes Rendus Physique*, **2014**, 15, 158-175.

64. Bai Y., Butburee T., Yu H., Li Z., Amal R., Lu G.Q., Wang L., *J. Colloid Interface Sci.*, **2015**, 449, 246-251.

65. He C., Lu J., Lin W., *J. Control. Release*, **2015**, 219, 224-236.

66. Zhang W., Huang W., Yang, J., *Science China Chemistry*, **2015**, 58, 565-573.

67. Batista C.A.S., Larson R.G., Kotov N.A., *Science*, **2015**, 350, 1095-9203.

68. Truong P. L., Mab X., Sim S. J., *Nanoscale*, **2014**, 6, 2307-2315.

69. Turkevich J., Stevenson P. C., Hillier J., *Discuss. Faraday Soc.*, **1951**, 11, 55-75.

70. West C. M., Barnett G. C., *Genome Medicine,* **2011**, 3, 52.

71. Yasun E., Kang H., Erdal H., Cansiz S., Ocsoy I., Huang Y.-F., Tan W., *Interface Focus*, **2013**, 0006.

72. Huang X., El-sayed M. A., *Alexandria journal of medicine*, **2011**, 47, 1-9.

73. Nombona N., Maduray K., Antunes E., Karsten A., Nyokong T., *J. Photochem. Photobiol.*, **2012,** 107, 35-44.

74. Khan S., Alam F., Azam A., Khan A., *Int. J. Nanomedicine,* **2012**, 7, 3245-3257.

75. SEVE Aymeric "optimization de nanoparticules multifonctioneelles pour une amelioration de l'efficacité photodynamique, de la séléctivité tumorale et de la detection par IRM", 2013, thèse Université de Lorraine.

76. Langille M. R., Personick M. L., Zhang J., Mirkin C. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 14542-14554.

77. Martin C., Aibani N., Callan J. F., Callan B., *Therapeutic Delivery*, **2016**, 7, 15-31.

78. Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M. A., Mergny M. D., Scherman D., Demeneix B., Behr J. P., *Proc .Natl. Acad. Sci*. ,**1995**, 92, 7297-7301.

79. Xie Q.-L., Guo X.-Y., Chen X.-J., Wang Y.-Y., *Cytotechnology,* **2013,** 65, 263–271.

80. Lee M. H., *Bull. Korean Chem. Soc.* **2007**, 28, 95-98.

81. Nam J., Nah J., *Carbohydr. Polym.,* **2016**, 135, 153-161.

82. Askarian S., Abnous K., Taghavi S., Oskuee R.K., Ramezani M., *Colloids Surf., B*, **2015**, 136, 355-364.

83. Zhou J., Ritter H., *Polym. Chem.*, **2010**, 1, 1552-1559.

84. Amin J., Puglisi A., Clarke J., Milton J., Wang M., Paranal R. M., Bradner J. E., Spencer J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, 23, 3346-3348.

85. Villiers A., *Compt. Rend. Fr. Acad. Sci*., **1891**, 435, 8.

86. García-Gonzáleza L., Yépez-Mulíab L., Ganem A., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2016**, 81, 113118.

87. Lee A.-R., Wu W.L., Chang W.-L., Lin H.-C., King M.-L., *J. Nat. Prod.*, **1987**, 50, 157160.

88. Tao W., Deqin Z., Yuhong L., Hong L., Zhanbiao L., Chunfeng Z., Limin H., Xiumei G.. *J. Ethnopharmacol*., **2010**, 21; 128, 575-582.

89. Wang X., Morris-Natschke S. L., Lee K.-H., *Med. Res. Rev.,* **2007**, 27, 133-148.

90. Dong Y., Morris-Natschke S. L., Lee K. H., *Nat. Prod. Rep.,* **2011**, 28, 529–542.

91. Zhang K.-Q., Bao Y., Wu P., Rosen R.T., Ho C.-T., *J. Agric. Food Chem.*, **1992**, 38, 1194-1197.

92. Jang S.-I., Jeong S.-I., Kim K.-J., Kim H.-J., Yu H.-H., Park R., Kim H.-M., You Y.-O., *Planta Medica*, **2003**, 69, 1057-1059.

93. Nakao M., Fukushima T. *Yakugaku Zasshi*. **1934,** 54, 844–858.

94. Yin HQ, Kim YS, Choi YJ et coll. (May 2008). *Arch. Pharm. Res.* 31 (5): 659–665.

95. Chiu T.-L., Su C.-C.. *Int. J. Mol. Med.* **2010**, 25, 231-236.

96. Long R.,You Y., Li W., Jin N., Huang S., Li T., Liu K., Wang Z., *Life Sciences*, **2015,** 142, 8-18.

97. Wei B., Li W.-W., Ji J., Hu Q.-H., Ji H., *Atherosclerosis*, **2014**, 235, 318-327.

98. Fu J., Huang H., Liu J., Pi R., Chen J., Liu P., Eur. *J. Pharmacol.*, **2007**, 568, 213-221.

99. Jiang B., Zhang L., Wang Y., Li M., Wu W., Guana S., Liu X., Yang M., Wang J., Guo D., *Food and Chemical Toxicology***, 2009**, 47, 1538-1544.

100. Wang L., Jiang X., Xu W., Li C., *Int. J. Pharm.*, **2007**, 341, 58-67.

101. Yuexian F., Junfen L., Chuan D., *Spectroc. Acta A*, **2005**, 61, 135-140.

102. Won S.H.; Lee H.J.; Jeong S.J.; Lu J.; Kim S.H.. *Phytother. Res*., **2012**, *26*, 669–674.

103. Su C.C.; Lin Y.H. *Int. J. Mol. Med*., **2008**, *22*, 847–851.

104. Chen J., Shi D.Y., Liu S.L., Zhong L. *Oncol. Rep*., **2012**, *27*, 523–528.

105. Zhang Y., Jiang P., Ye M., Kim S., Jiang C., Lü J., *Int. J. Mol. Sci.,* **2012**, *13*, 1362113666

106. Zhou L.L., Chan W.K., Xu N.H., Xiao K., Luo H.W., Luo K. Q., Chang D. C.*, Life Sciences,* **2008**, 83, 394–403.

107. Mosaddik M. A. *Phytomedicine*, **2003**, 10, 682-685.

108. Yokozawa T., Lee T.W., Chung H.Y., Oura H., Nonaka G., Nishioka I., *Phyt. Res.*, **1994**, 8, 271-275.

109. Wang QL, Tao YY, Yuan JL, Liu CH, *BMC Cell Biology,* **2010**, 11-31.

110. Abd-Elazem I.S., Chen H.S., Bates R.B., Huang R.C.C., *Antiviral Res,* **2002**, 55, 91–106.

111. Jiang R.-W., Lau K.-M., Hon P.-M., Mak T.C.W., Woo K.-S., Fung K.-P., *Curr. Med. Chem.*, **2005**, 12, 237-246.

112. https://fr.wikipedia.org/wiki/Mangoustanier

113. Choi Y. H., Han S. Y., Kim Y. J., Kim Y. M., Chin Y. W., *Nutrition Research*, **2014**, 34, 336-345.

114. Schmid W., *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, **1855**, 93, 83-85.

115. Yates P., StoutG. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, 80, 1691–1700.

116. Cui J., Hu W., Cai Z., Liu Y., Li S., Tao W., Xiang H., *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2010**, 95, 166-172.

117. Nakatani K., Atsumi M., Arakawa T., Oosawa K., Shimura S., Nakahata N., Ohizumi Y., *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25, 1137-1141.

118. Jung H. A., Su B. N., Keller W. J., Mehta R. G., Kinghorn A. D., *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 2077-2082.

119. Tewtrakul S., Wattanapiromsakul C., Mahabusarakam W. J., *Ethnopharmacol.* **2009**, 121, 379–382.

120. Pedraza-Chaverri J., Cárdenas-Rodríguez N., Orozco-Ibarra M., Pérez-Rojas J. M., *Food Chem. Toxicol.*, **2008**, 46, 3227‑3239.

121. Matsumoto K., Akao Y., Yi H., Ohguchi K., Ito T., Tanaka T., Kobayashi E., Iinuma M., Nozawa Y., *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 5799–5806.

122. Hemshekhar M., Sunitha K., Santhosh M. S., Devaraja S., Kemparaju K., Vishwanath B. S., Niranjana S. R., Girish K. S., *Phytochem Rev*, **2011**, 10, 325-351

123. Hung S.-H., ShenK.-H., Wu C.-H., Liu C.-L., ShihY.-W., *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, 57, 1291–1298.

124. Akao Y., Nakagawa Y., Iinuma M., Nozawa Y., *int. J. Mol. Sci.* **2008**, 9, 355-370.

125. Pandey S. K., Zheng X., Morgan J., Missert R., Liu T. H., Shibata M., Bellnier D. A., Oseroff A. R., Henderson B. W., Dougherty T. J., Pandey R. K., *Mol. Pharm.*, **2007**, 4, 448-464.

126. Drogat N., Barriere M., Granet R., Sol V., Krausz P., *Dyes and Pigments*, **2011**, 88, 125-127.

127. Drogat N., Gady C., Granet R., Sol V., *Dyes and Pigments*, **2013**, 98, 609-614.

128. Ndong Ntoutoume G. M. A., Granet R., Mbakidi J. P., Brégier F., Léger D. Y., FidanziDugas C., Lequart V., Joly N., Liagre B., Chaleix V., Sol V., *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **2016**, 26, 941-945.

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

130. Fan Y., Li J., Dong C., S*pectrochimica Acta Part A,* **2005**, 6, 135-140.

131. Wu D., Jiang X., Wu S., *J. Spe. Sci.*, **2010**, 33, 67.

132. Nguyen P.T.M., Falsetta M.L., Hwang G., Gonzalez-Begne M., Koo H., *PLoS ONE*, **2014**, 9, e111312.

133. Chen L.-G., Yang L.-L., Wang C.-C., *Food Chem. Toxicol.,* **2008**, 46, 688-693. 134. Adeli M., Kalantari M., Zarnegar Z., Kabiri R., *RSC Adv.,* **2012**, 2, 2756-2758.

135. Lebedev O. L., Kazarnovskii S. N., *Zhur. Obshch. Khim.* **1960**, 30, 1631–1635.

136. Angelin M., Hermansson M., Dong H., Ramström O., *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 43234326.

137. Fraschini C., Vignon M. R., *Carbohydr. Res.*, **2000**, 328, 585-589.

138. Tréguer-Delapierre M., Majimel J., Mornet S., Duguet E., Ravaine S., *Gold bulletin*, **2008**, 41, 195-207.

139. Smith D. K., Miller N. R., Korgel B. A., *Langmuir*, **2009**, 25, 9518-9524.

140. Zhao P., Li N. Astruc D., *Coord. Chem. Rev.*, **2013,** 257, 638-665.

141. Kumar S., Gandihi, K. S., Kumar R., *Ind. Eng. Chem. Res.,* **2007**, 46, 3128-3136.

142. Kimling J., Maier M., Okenve B., Kotaidis V., Ballot H., Plech A., *J. Phys. Chem. B*, **2006**, 110, 15700–15707.

143. Haiss W.,Thanh N. T. K.,Aveyard J., Fernig D. G. *Anal. Chem.,* **2007**, 79, 4215-4221.

144. Michael Robert Ivanov « Covalently functionalized gold nanoparticles: synthesis, characterization, and integration into capillary electrophoresis », **2011**, these N° 987, Thèse University of Iowa, USA.

145. Roux S., Garcia B., Bridot J.-L., Salomé M., Marquette C., Lemelle L., Gillet P., Blum L., Perriat P., Tillement O., *Langmuir*, **2005**, 21, 2526–2536.

146. Abad M. J., Mertens S. F. L., Pita M., Fernandez V. M., Schiffrin D. J., *J. Am. Chem. Soc.,* **2005**, 127, 5689-5694.

147. Cho T. J., Pettibone J. M., Gorham J. M., Nguyen T. M., MacCuspie R. I., Gigault J., Hackley V. A. *Langmuir,* **2015**, 31, 7673−7683.

148. Kreschmer F., Mansfeld U., Hoeppener S., Hager M. D., Schubert U. S., *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 88-90.

149. Ferris C., Casas M., Lucero M. J., de Paz M. V., Jiménez-Castellanos M. R., *Carbohydr. Polym.*, **2014**, 111, 125-132.

150. Murphy C., Gole A. M., Hunyadi S., Orendorff C., *Inorg. Chem.*, **2006**, 45, 7544-7554.

151. Shankar S., Brargav S., Sastry M., *J. Nanosci. Nanotech.*, **2005**, 5, 1721-1727.

152. Hao E., Schatz G. C., Hupp J., *J. Org. Chem*, **2004**, 14, 331-341.

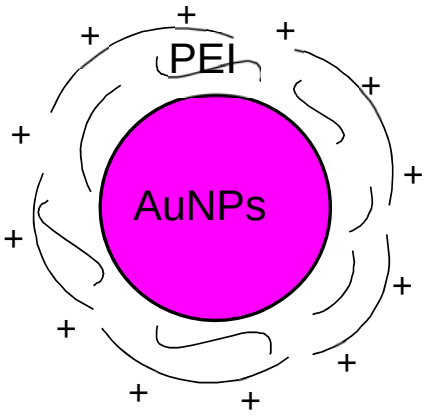
153. Tréguer-Delapierre M., Majimel J., Mornet S., Duguet E., Ravaine S., *Gold Bulletin*, **2008**, 41, 195-207.

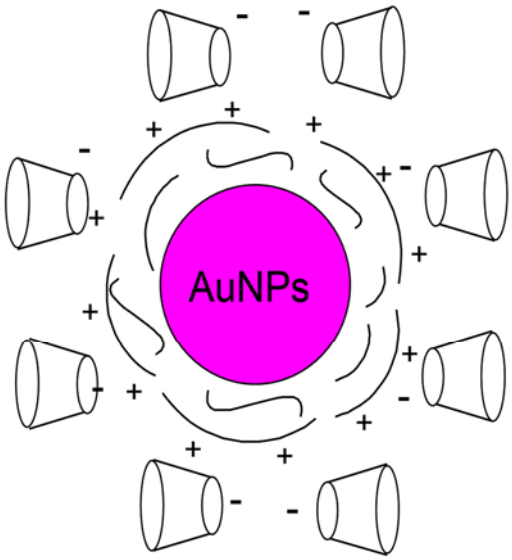
154. Chen L., Ji F., Xu Y., He L., Mi Y., Bao F., Sun B., Zhang X., Zhang Q., *Nano lett.*, **2014**, 14, 7201-7206.

155. Pelaz B., Grazu V., Ibarra A., Magen C., del Pino P., de la Fuente J. M., *Langmuir*, **2012**, 28, 8965-8970.

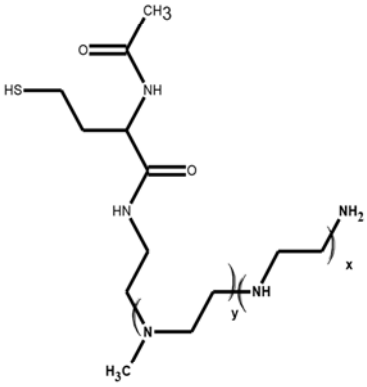
156. Mosmann T., *J Immunol Methods.,* **1983,** 16, 55-63.

Liste des produits synthétisés

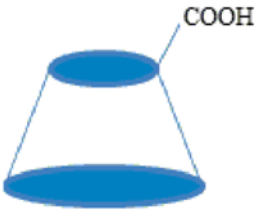




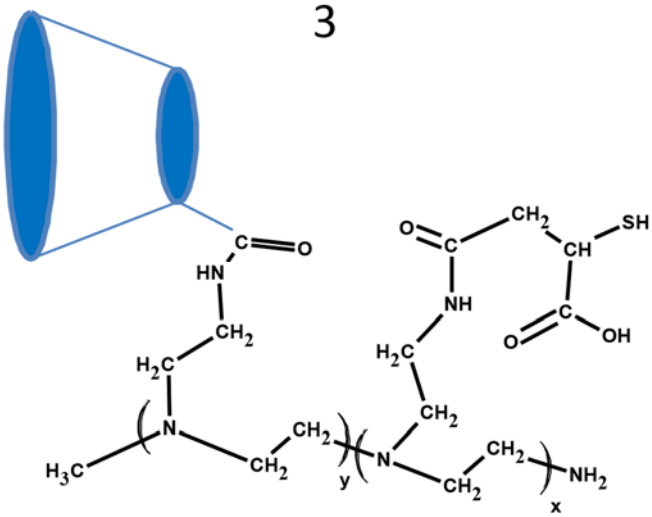
2 ou 5



3

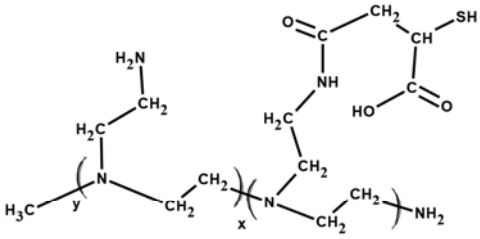


6



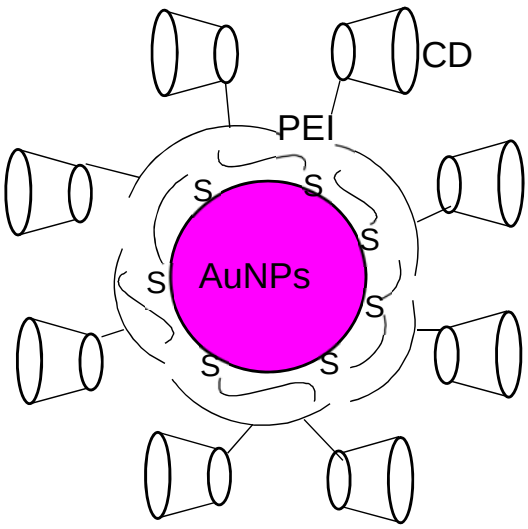
7

1 ou 4

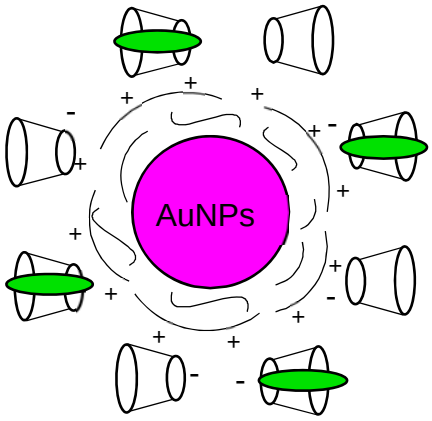


PEI-SH

8

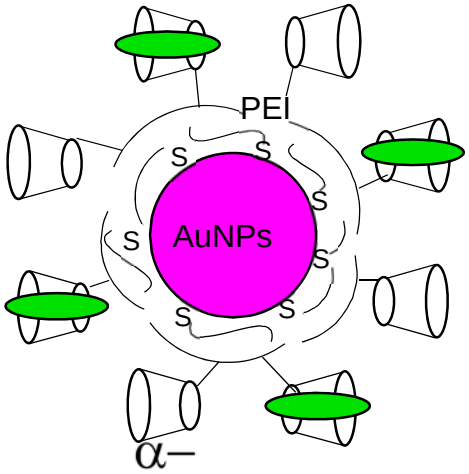


9

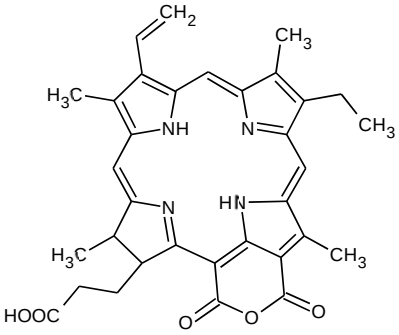


10: tanshinone IIA

11: α–mangostine



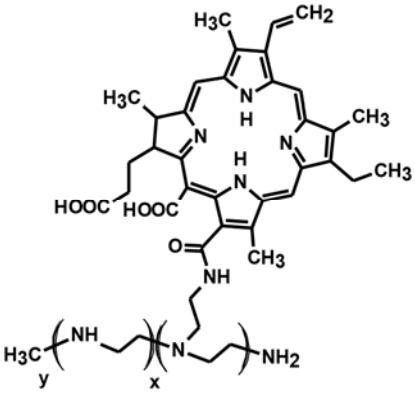
mangostine 14



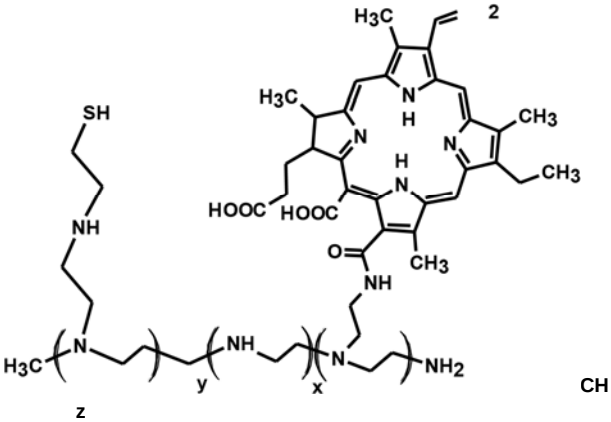
12:

tanshinone IIA

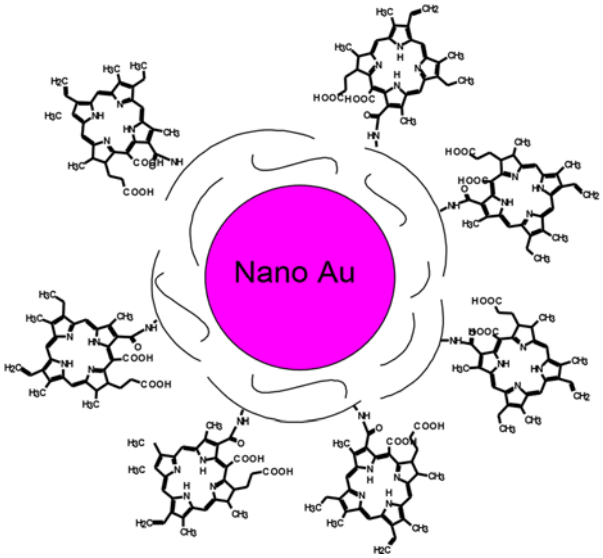
13:



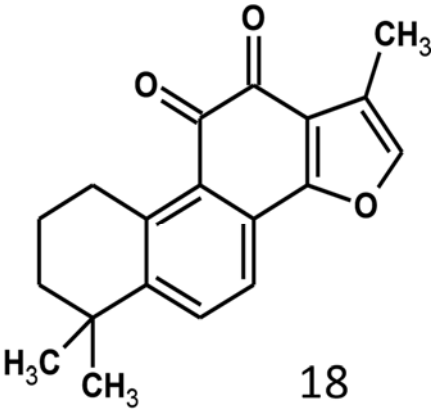
15



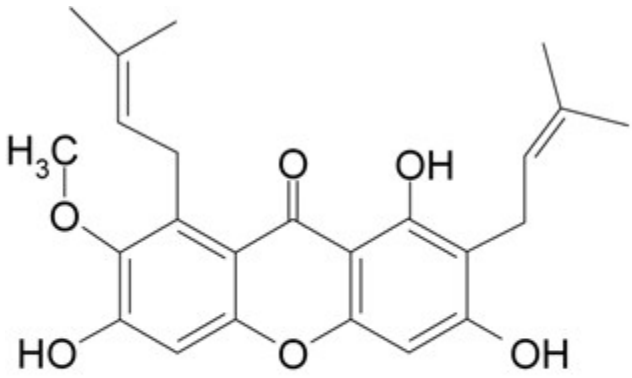
16



17

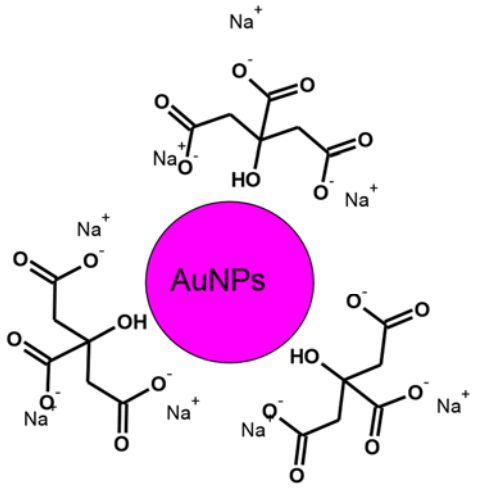


18

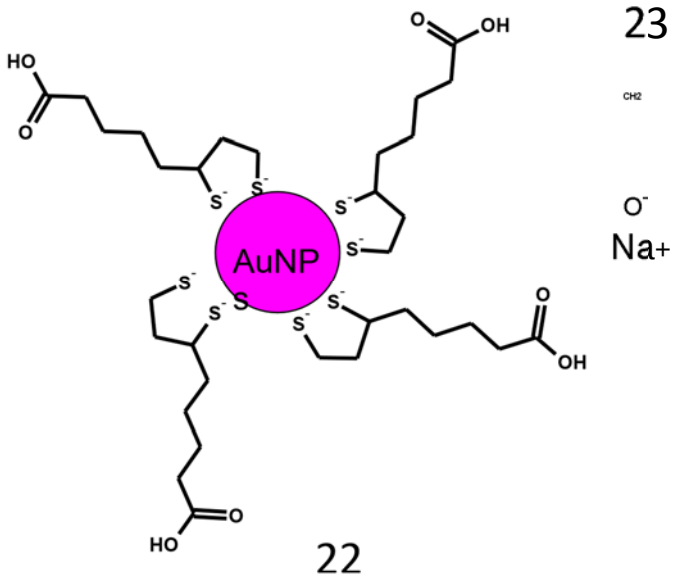


19

20

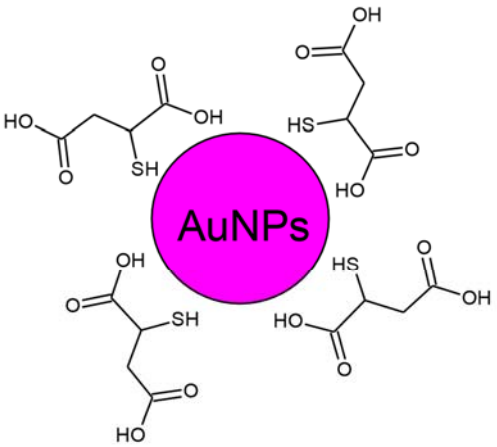


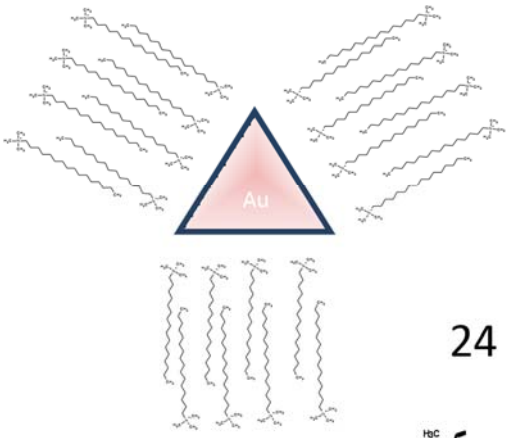
21



22

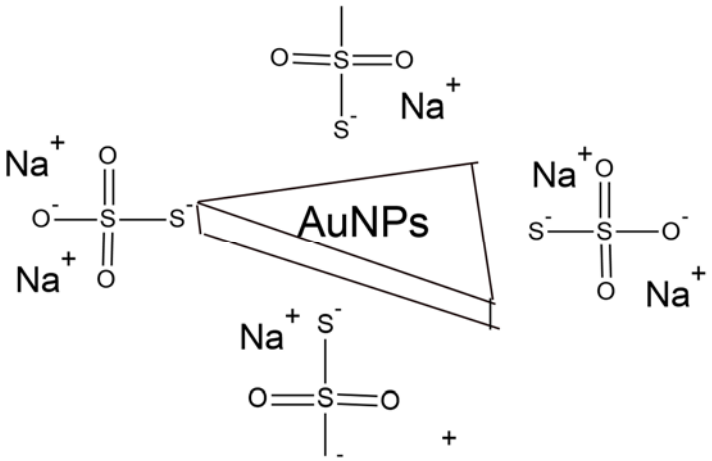
23

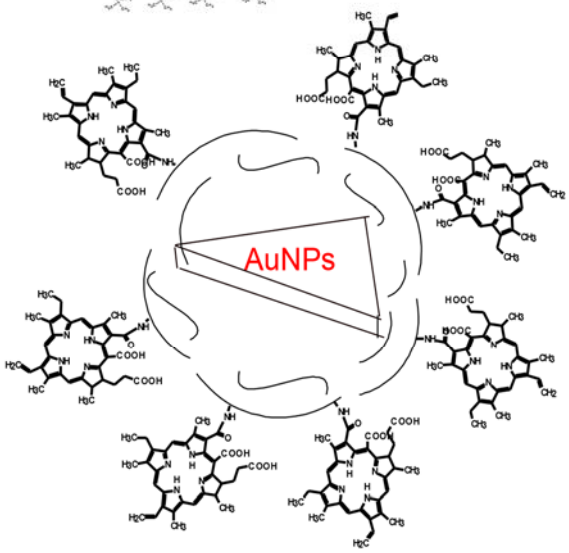




24

25





26

Valorisation de la thèse

Productions scientifiques

Publications internationales à comité de lecture (acceptées) : 1
Publications internationales à comité de lecture (soumises) : 1
Publications internationales à comité de lecture (en cours de préparation) : 1
Communications orales : 2
Communications par affiches : 3

a- Publications soumises

Synthesis and Conformation of a Novel Fluorescein-Zn-Porphyrin Dyad and Intramolecular Energy Transfer
Olivier Rezazgui, Patrick Trouillas, Shihong Qiu, Benjamin Siegler, Johannes Gierschner, Stéphanie Leroy-Lhez.
New J. Chem. (acceptée)

Delivery of Tanshinone IIA and α-mangostin in a Cyclodextrin/PEI/Gold nanoparticle platform for prostate cancer therapy.
Shihong Qiu, Robert Granet, Jean-Pierre Mbakidi, Frédérique Brégier, Christelle Pouget, Ludovic Micallef, Tan Sothéa Ouk, David Y. Leger, Bertrand Liagre, Vincent Sol.
Bioorg. Med. Chem. Lett. (soumise)

b- Publication en préparation

Chlorin/PEI - Cellulose Nanocrystals Hybrids: Synthesis and Biological Evaluation *in vitro* and *in vivo* of these New Potential Anticancer Agents for Application in Photodynamic Therapy.
Nicolas Drogat, Frédérique Brégier, Shihong Qiu, Gautier Ndong Ntoutoume, Chloé Fidanzi, Fabrice Lalloué, Claude Couquet, Gaelle Begaud-Grimaud, Caroline Le Morvan, David Léger, Bertrand Liagre, Robert Granet, Vincent Sol.
Biomacromolecules

c- Communications orales

Qiu S., Pouget C., Sol V.
Synthèse et caractérisation de nouveaux photosensibilisateurs polyaminés pour une application en PDT.
Journées scientifiques de la section régionale centre-ouest de la société chimique de France 30 et 31 janvier 2014.

Qiu S., Granet R., Pouget C., Sol V.
Vectorisation des photosensibilisateurs par des nanoparticules d'or pour une application en PDT anticancéreuse
SyCOCAL IX , 17– 19 Septembre ***2014****, Tours – France*

d- Communications par affiches

Drogat N., Brégier, F Granet R., Bégaud G., Le Morvan C., Qiu S., Ndong Ntoutoume G M-A., Léger D., Fidanzi C., Lalloué F., Couquet C. Liagre B. , Sol V.

Chlorin/PEI - Cellulose Nanocrystals Hybrids: Synthesis, characterization and their in Vivo Evaluation as New Potential Anticancer Agents for Application in Photodynamic Therapy.

*Quand l'imagerie rencontre les nanotechnologies, Workshop Cancérolole GSO, 3-4 décembre **2014**, Bordeaux-France.*

Qiu S., Granet R., Pouget C., Sol V.

Vectorisation d'un principe actif hydrophobe au moyen des nanoparticules d'or fonctionnalisées

*SyCOCAL IX , 17– 19 Septembre **2014**, Tours – France.*

Qiu S., Sol V., Granet R., Chaleix V., Pouget C.

Synthèse et caractérisation de nouveaux photosensibilisateurs polyaminés pour une application en PDT.

*Journées scientifiques de la section régionale centre-ouest de la société chimique de France 30 et 31 janvier **2014** Limoges-France.*

Qiu S., Mbakidi J-P., Granet R., Pouget C., Leger D. Y., Liagre B., Sol V.

Delivery of Natural active compounds by Cyclodextrin / gold nanoparticles complex

*51èmes Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique 1-3 juillet **2015**, Avignon-France*

Synthèse et caractérisations de nanoparticules d'or pour la vectorisation de principes actifs anticancéreux

Augmenter l'activité cytotoxique d'un principe actif, tout en diminuant les effets secondaires pendant le traitement anticancéreux est l'un des plus grands sujets médicaux d'aujourd'hui. Dans ce travail, deux principes actifs, la tanshinone IIA et l'α-mangostine, qui possèdent une forte activité anticancéreuse, ont été extrait à partir de produit naturels. Afin d'améliorer leur solubilité dans les milieux biologiques, nous avons réalisé une série de synthèses pour élaborer un nouveau système de vectorisation. Ce système consiste à utiliser les nanoparticules d'or comme véhicule et qui vont se concentrer spécifiquement dans le tissu tumoral par l'effet EPR. Ce ciblage passif évite de toucher les cellules saines par le principe actif, et diminue ainsi les effets secondaires. Ces complexes synthétisés sont constitués d'un cœur d'or recouvert de PEI sur laquelle sont fixées des cyclodextrines capable d'encapsuler les principes actifs. Ils ont été caractérisés par IR, UV-Visible, ATG, MET, DLS et Potentiel zêta. Des évaluations biologiques « *in vitro* » sont réalisées sur deux lignées de cancer prostatique PC-3, DU-145 et deux lignées de cancer colorectal HT29, HCT116. Les résultats montrent une augmentation de la cytotoxicité lorsque les produits sont fixés sur les nanoparticules. Le même système est utilisé pour vectoriser un photosensibilisateur issu de chlorophylle *a*. La chlorine ainsi obtenue a été fixée sur la
PEI1200 à la surface des nanoparticules d'or sphériques (ou triangulaires). Les caractérisations par IR, UVVisible, MET, DLS et potentiel zêta sont réalisés sur ce complexe. Les tests biologiques pour l'application en
PDT réalisés sur les cellules HT29, montrent une amélioration de l'effet photocytotoxique lorsque les nanoparticules sont utilisées comme vecteur.

Mots-clés : cancer ; nanoparticules d'or ; cyclodextrine ; PEI ; tanshinone ; mangostine ; photosensibilisateur ; PDT.

Synthesis and characterizations of gold nanoparticles for the vectorization of anticancerous compounds

Today, in the anti-cancerous treatment, the increase of the cytotoxic activity of natural active compounds and the decrease of side-effects during the treatment remain one of the greatest medical problems. In this work, two natural active compounds, which have great interest in anticancer-applications, are extracted from plants. To increase their water-solubility, a new drug delivery nanovector based on gold nanoparticles has been synthesized with several steps. The nano-drug-delivery-vector, between 30 and 200 nm, can be concentrated to the tumor tissue only, by EPR effect. The nanovector is built on a core of gold nanoparticles covered by PEI, bearing anchored cyclodextrin, in which the drug is encapsulated. Accidental killing of healthy cells by the drug is avoided by this way. The system is characterized by IR, UV-Visible, GTA, TEM, DLS and zeta potential. "*in vitro*" tests are realized on two prostate cancer cell-lines PC-3, DU-145 and two colon cancer lines HT29, HCT116. The results show an improvement of the activity of the natural compound by using gold nanovector. The same system is used to deliver a photosensitizer. A chlorin obtained from chlorophyll *a* is fixed onto the surface of spherical or triangular nanoparticles. The same characterizations are used as the former delivery nanosystem. Their photocytotoxic effet is tested on HT29 cancer line. An improvement of the activity by using nanoparticles is also observed.

Keywords : cancer ; gold nanoparticles ; cyclodextrin ; PEI ; tanshinone ; mangostin ; photosensitizer ; PDT.