



HAL
open science

Assemblages supramoléculaires hiérarchiques de cyclodextrines fonctionnalisées et de siRNA, application à la thérapie antisens

Pierre Evenou

► **To cite this version:**

Pierre Evenou. Assemblages supramoléculaires hiérarchiques de cyclodextrines fonctionnalisées et de siRNA, application à la thérapie antisens. Chimie thérapeutique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066440 . tel-02336551v1

HAL Id: tel-02336551

<https://theses.hal.science/tel-02336551v1>

Submitted on 29 Oct 2019 (v1), last revised 29 Nov 2019 (v2)

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

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

Université Pierre et Marie Curie

ED 406 – Chimie Moléculaire de Paris Centre

Institut Parisien de Chimie Moléculaire – Équipe GOBS

Service de virologie de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière

Assemblages Supramoléculaires Hiérarchiques de

Cyclodextrines Fonctionnalisées et de siRNA

Application à la Thérapie Antisens

Par Pierre Evenou

Thèse de doctorat de chimie

Dirigée par le Professeur Matthieu Sollogoub

et le Professeur Vincent Calvez

Soutenance prévue le 27 Octobre 2017

Devant un jury composé de :

Mme. Luisa De Cola	Professeur, Université de Strasbourg	Rapportrice
M. Jose Manuel García Fernández	Professeur, Université de Séville	Rapporteur
Mme. Sandrine Sagan	Directrice de recherche, Université Pierre et Marie Curie	Examinatrice
M. Yann Ferrand	Chargé de recherche, Université de Bordeaux	Examinateur
M. Matthieu Sollogoub	Professeur, Université Pierre et Marie Curie	Directeur de thèse
M. Vincent Calvez	Professeur, Université Pierre et Marie Curie	Directeur de thèse
M. Mickaël Ménand	Maître de conférences, Université Pierre et Marie Curie	Invité

Ce sont rarement les réponses qui apportent la vérité, mais l'enchaînement des questions

Daniel Pennac

REMERCIEMENTS

Je remercie les Professeurs Luisa De Cola et Jose Manuel García Fernández d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Je remercie également les Docteurs Sandrine Sagan et Yann Ferrand, d'avoir accepté de participer à ce Jury de thèse.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes ayant participé à ce projet. En particulier, je remercie Adélie Gothland avec qui j'ai travaillé lors des expériences de biologie, et qui a réalisé un immense travail dans ce projet de thèse. Merci pour les moments de science vécus ensemble, durant lesquels les échecs et parfois les réussites se sont multipliés, mais aussi pour ces moments où nous avons laissé la science de côté pour parler de choses et d'autres. Grâce à elle, ça a toujours été un plaisir pour moi de venir à l'hôpital et de laisser les colonnes de silices tranquilles.

Je remercie aussi les Professeurs Anne-Geneviève Marcellin et Vincent Calvez pour nous avoir accompagnés avec Adélie dans ce projet de transfection des siRNA.

Un grand merci aussi au Professeur Laurent Bouteiller et à Gaëlle Pembouong pour les expériences d'ITC et de SANS, Claude-Marie Bachelet pour la microscopie de fluorescence confocale et Kyo Young Goo pour avoir travaillé sur ce projet au cours de son stage de Master 2.

J'aimerais remercier, pour leur aide, Aurélie Bernard pour la RMN, Claire Troufflard pour le MALDI-TOF et Omar Khaled pour la spectrométrie de masse. Je remercie également les Docteurs Dmitri Colesnic et Julien Rossignol pour m'avoir appris à travailler avec les cyclodextrines, aussi bien en synthèse qu'en caractérisation. Merci aussi aux gestionnaires, et particulièrement à Sylvie qui fait un très gros travail au sein de l'équipe GOBS.

Je tiens à remercier Mickaël Machicoane, Elena Billi-Rizza, Lionel Morvan, Michaël Bakria, et Carine Asensio pour m'avoir guidé sur la partie valorisation de ce projet de thèse.

Merci à FIP (France Inter Paris), pour leur programmation éclectique et surprenante, qui m'a accompagné durant ces heures passées au labo mais aussi lors de ma rédaction de thèse.

Merci à l'équipe GOBS, et tout l'IPCM de manière générale. En particulier, je tiens à remercier mes voisins de paillasse : Xiaolei pour avoir été la première personne de ce labo avec qui j'ai vraiment partagé des moments, bien que beaucoup de choses nous opposaient (et nous oppose toujours), Jorge pour sa bonne humeur et ses rôlages constants, mais aussi pour m'avoir aidé un grand nombre de fois dans mes préparations de tutorats. Bien sûr un grand merci à Sawsen. Je ne sais même pas comment c'est possible d'être aussi gentille. Merci pour son soutien pendant les moments durs, et je pense que le mot soutenir prend beaucoup de sens dans ce cas. Merci Lorien ! Ah je ne sais pas comment ce serait passé cette fin de thèse sans elle. Je tiens à m'excuser pour toutes les fois où j'ai râlé pendant, avant et après ma rédaction, merci aussi pour son aide, pour son soutien, pour son attention et pour les 4567 fois où elle a voulu me donner des bonbons. Bref, c'était vraiment cool cette troisième année ensemble ! Merci Zhihao, Guangcan, Sha, Changping, Wenting, Martin, Jiang, merci aux anciens et aux nouveaux arrivants !

De manière générale, un grand merci aux permanents de l'équipe. On a la chance d'avoir beaucoup de permanents chez les GOBS, toujours prêts à nous aider et qui ont tous, à un moment donné de ma thèse, apporté quelque chose. Donc merci à Yongmin, Berni, Sylvain, Guillaume, en particulier merci Olivia pour m'avoir supporté en tant que voisin de paillasse durant ma troisième année et pour les discussions que l'on a pu avoir sur à peu près tout et n'importe quoi.

Un grand merci bien évidemment à Mickaël. Tout d'abord pour son encadrement durant cette thèse, pour son esprit critique scientifique et sa capacité à toujours remettre en cause ce que l'on dit ou voit et surtout à poser les bonnes questions pour comprendre les choses dans le fond. Je pense que c'est une vraie qualité, en tant que scientifique de ne pas se contenter des « on dit » mais d'aller toujours plus loin, et je pense avoir beaucoup appris dans ce sens. J'ai aussi apprécié sa rigueur et son perfectionnisme qui m'ont poussé à aller plus loin. Dans quelques semaines, ce sera à lui de défendre sa science pour son HDR et s'il a déjà été un très bon encadrant de thèse, il sera un très bon directeur de thèse et ses futurs doctorants auront de la chance de l'avoir

Bien sûr, un grand merci à Matthieu qui a été un directeur de thèse qui, malgré sa position de chef d'équipe, a toujours été présent pour vraiment m'encadrer et suivre le projet de près. Grâce à lui j'ai bien sûr, beaucoup appris sur la science de manière générale, mais aussi sur la pédagogie à adopter pour la communiquer. J'ai apprécié son aptitude à ne jamais me dévaloriser mais à toujours me mettre en avant pour me pousser à aller plus loin. Son détachement sur les deadlines m'a parfois fait rire, parfois stressé et le plus souvent, finalement rassuré.

De manière générale que ce soit avec Matthieu ou avec Mickaël j'ai apprécié leur proximité, qui a fait qu'on n'hésite pas à venir discuter, de science, mais aussi d'autres choses. Les nombreuses discussions que l'on a pu avoir sur la politique, la société, l'art, le monde scientifique et j'en passe, ont rendu cette thèse plus sympathique et quelque part, cela va me manquer.

Merci à mes amis qui m'ont accompagné durant ces trois années. Un grand merci à mes colocos qui m'ont supporté, Pierre, Anaïs, Sam et j'en profite pour remercier la bande des kinés : Laura et Jean. Bien sûr un grand merci à Ariane et Maud qui ont eu un rôle important pour moi durant ces deux dernières années, merci à mes colocos qui m'ont supporté durant la rédaction. Un merci particulier à jamais sans mon coach (les concernés comprendront), mais aussi à Quentin, Sara, Olivier, Antoine, Christine, et Thomas pour ces discussions scientifiques autour d'un burger le midi (avec ce serveur insupportable), ou lors des matchs de tennis souvent convertis en bière.

Merci à ceux qui sont venus de loin pour me voir soutenir : Sébastien, Alison, Pierre et bien sûr Martin, mon pote d'animation, de voyage, et qui a bien voulu relire en partie ma thèse. Un énorme merci bien sûr à deux amis en particulier qui m'ont soutenu dans la fête mais aussi dans les moments durs, Sylvain et MC.

Bien sûr, un énorme merci à ma famille. Merci à mes grands parents qui sont des exemples pour moi, merci à mon frère, à Bernadette et à ma sœur qui ont toujours été là pour moi. Enfin je termine par remercier mes parents. Merci pour tout. J'ai la chance d'avoir des parents qui feraient tout pour aider leurs enfants. Merci pour m'avoir soutenu avant et pendant ma thèse et je sais que vous serez encore là après, lorsque j'en aurais besoin. Vous êtes toujours présent, que ce soit pendant les moments heureux, comme dans les moments plus difficiles. Vous êtes des parents extraordinaires.

TABLE DES MATIERES

<u>1. LES VIRUS COMME SOURCE D'INSPIRATION POUR LA MISE AU POINT D'AGENT DE TRANSFECTION</u>	5
1.1. LA THERAPIE ANTISENS	6
1.1.1. HISTORIQUE	6
1.1.2. DECOUVERTE ET PRINCIPE DE L'INTERFERENCE PAR ARN	7
1.1.3. LES DIFFERENTES STRATEGIES DE THERAPIE ANTISENS	9
1.1.3.1. ASO RNase H-dépendant	10
1.1.3.2. ASO à omission d'exons	10
1.1.3.3. Anti miRNA et mimes de miRNA	10
1.1.3.4. Transfection de siRNA synthétiques	10
1.2. LES VIRUS : DEFINITIONS, FORMATION ET MODE DE FONCTIONNEMENT	12
1.2.1. CLASSIFICATION	13
1.2.1.1. Classification par type de génome	13
1.2.1.2. Classification structurale	13
Capside icosaédrique à symétrie cubique	14
Capside tubulaires à symétrie hélicoïdale	15
Capside mixte et complexe	15
Enveloppe virale	15
1.2.2. FORMATION DES VIRUS	17
1.2.2.1. Structuration de la capsid	17
1.2.2.2. Assemblage génome-capsid	19
1.2.2.3. Exemple de la formation du virus de la mosaïque du tabac (TMV)	21
1.2.3. MODE DE TRANSFECTION DES VIRUS	22
1.2.3.1. Attachement	22
1.2.3.2. Pénétration	24
1.2.3.3. Echappement endosomal et décapsidation	25
1.3. LES AGENTS DE TRANSFECTION DE siRNA	26
1.3.1. LES VECTEURS VIRAUX DE siRNA	26
1.3.1.1. Rétrovirus/Lentivirus	26
1.3.1.2. Adénovirus	26
1.3.1.3. Virus adéno-associé	27
1.3.2. VECTEURS SYNTHETIQUES DE siRNA	27
1.3.2.1. Contraintes biologiques et défis à relever pour l'utilisation de siRNA	27
Barrières biologiques et solutions	28
Modifications chimiques du squelette des siRNA et conception de la séquence	29
1.3.2.2. Polymères polycationiques	31
1.3.2.3. Liposomes	33

Lipides	34
Cholestérol	35
Ligands	35
Exemples	36
1.3.2.4. Systèmes conjugués	36
1.3.2.5. Système à base de cyclodextrines	37
Polyrotaxanes	38
Conjugués de cyclodextrines dendrimères	39
Cyclodextrines amphiphiles	40
Nanoparticules polymériques de cyclodextrines	42
1.4. CONCLUSION	44
1.5. BIBLIOGRAPHIE	45

2. CONCEPTION ET SYNTHÈSE DE POLYMÈRES SUPRAMOLÉCULAIRES À BASE DE CYCLODEXTRINES **53**

2.1. ETAT DE L'ART	53
2.1.1. POLYMERES SUPRAMOLECULAIRES	53
2.1.1.1. Définitions et propriétés	53
Du polymère covalent au polymère supramoléculaire	53
Mécanismes d'association des polymères supramoléculaires	55
Propriétés des polymères supramoléculaires	56
2.1.1.2. Polymères supramoléculaires en milieu aqueux	58
Polymères supramoléculaires naturels	58
Polymères supramoléculaires synthétiques	60
2.1.1.3. Polymères supramoléculaires en interactions avec les acides nucléiques	64
Assemblage à structure indépendante de la présence d'acides nucléiques.	65
Assemblage dont la structure dépend de la présence d'acides nucléiques (« effet template »).	67
2.1.1.4. Polymères supramoléculaires à base de cyclodextrines	70
Structure, nomenclature et propriétés des cyclodextrines	70
Complexes d'inclusions	71
Méthodes de caractérisation des polymères supramoléculaires à base de cyclodextrines	73
Etat de l'art de polymères supramoléculaire à base de cyclodextrines	80
Fonctionnalisation des cyclodextrines	86
2.1.2. CONCEPTION DU SYSTEME	88
2.2. SYNTHÈSE DE MONOMERES DE CYCLODEXTRINES FONCTIONNALISEES	90
2.2.1. RETROSYNTHÈSE GÉNÉRALE	90
2.2.2. SYNTHÈSE DE MOLECULES CONTRÔLÉES	91
2.2.3. SYNTHÈSE DE MONOMERES MONOSUBSTITUÉS	92
2.2.4. SYNTHÈSE DE MONOMERES DIFONCTIONNALISÉS : BRAS SUCCINIMIDE	93

2.2.5. SYNTHÈSE DE MONOMÈRES DIFONCTIONNALISÉS : BRAS ÉTHYLETHOXYAMINE	95
2.3. CARACTÉRISATION DE L'ASSEMBLAGE SUPRAMOLÉCULAIRE	96
2.3.1. CARACTÉRISATION DE L'ASSEMBLAGE SUPRAMOLÉCULAIRE PAR RMN-ROESY	96
2.3.2. CARACTÉRISATION DE L'ASSEMBLAGE SUPRAMOLÉCULAIRE PAR RMN- ¹ H	99
2.3.3. CARACTÉRISATION DE L'ASSEMBLAGE SUPRAMOLÉCULAIRE PAR ITC	104
2.3.4. CARACTÉRISATION DE L'ASSEMBLAGE SUPRAMOLÉCULAIRE PAR RMN-DOSY	105
2.3.5. CARACTÉRISATION DE L'ASSEMBLAGE SUPRAMOLÉCULAIRE PAR SANS	110
2.4. CONCLUSION	112
2.5. BIBLIOGRAPHIE	113

3. UTILISATION D'ASSEMBLAGES SUPRAMOLÉCULAIRES EN TANT QU'AGENTS DE COMPLEXATION ET DE TRANSFECTION DE SIRNA 121

3.1. ÉTUDES DE COMPLEXATION : ELECTROPHORÈSE SUR GEL D'AGAROSE (ESMA)	121
3.1.1. PRINCIPE ET MÉTHODE	121
3.1.1.1. Principe de l'ESMA	121
3.1.1.2. Méthode	123
3.1.2. RESULTATS ET DISCUSSIONS	123
3.1.2.1. Etude de complexation	123
3.1.2.2. Etude de protection	128
3.2. ÉTUDES DE TRANSFECTION	129
3.2.1. PRINCIPE ET MÉTHODE	129
3.2.2. ÉTUDE DE TOXICITÉ	130
3.2.3. RESULTATS ET DISCUSSION	131
3.3. ÉTUDE PAR CRYO-TEM DE L'ASSEMBLAGE HIÉRARCHIQUE ET COOPÉRATIF CD-SIRNA	134
3.3.1. CONSIDÉRATIONS PRÉLIMINAIRES À L'UTILISATION DE LA CRYO-TEM	134
3.3.1.1. Principe et avantage de la cryo-TEM	134
3.3.1.2. Préparation des échantillons et formation d'artéfacts	135
3.3.1.3. Applications à la cryo-TEM	136
3.3.2. RESULTATS ET DISCUSSION	137
3.3.2.1. Méthode de préparation des échantillons	137
3.3.2.2. Expériences préliminaires	137
3.3.2.3. Etude du ratio N/P	140
3.3.2.4. Rôle de l'oligomérisation de CD dans la formation d'assemblages hiérarchiques : témoin négatif	145
3.3.2.5. Influence du type d'acide nucléique, et de la concatémérisation	146
Différences structurales entre l'ARN et l'ADN	146
siDNA GL3 (avec dT)	147
siDNA GL3 (sans dT) : hypothèse de concatémérisation	151

3.3.3. ANALYSE DES RESULTATS ET PROPOSITION STRUCTURALE	154
3.3.3.1. Proposition structurale	154
3.3.3.2. Influence du ratio N/P	156
3.3.3.3. Contrôle du diamètre des fibres : frustration géométrique de l'assemblage	158
3.4. CONCLUSION	159
3.4. BIBLIOGRAPHIE	160
<u>4. VALORISATION DU PROJET ET CONTEXTE SOCIO-ÉCONOMIQUE</u>	165
4.1. INTRODUCTION	165
4.2. CONTEXTE SOCIO-ECONOMIQUE	167
4.2.1. LA THERAPIE ANTISENS : LE BESOIN DE VECTEURS SOPHISTIQUES	167
4.2.2. RESULTATS CLINIQUES ET ETUDE DE LA CONCURRENCE	168
4.2.3. PLACEMENT DU PROJET	169
4.3. DEMARCHE ACTUELLE DE VALORISATION	170
4.3.1. SOCIOGRAMME DU TRANSFERT DE TECHNOLOGIE ET DE L'INNOVATION EN FRANCE	170
4.3.1.1. Cellules de valorisation internes aux universités	170
4.3.1.2. Sociétés Accélératrices du Transfert de Technologies (SATT)	171
4.3.1.3. Inserm transfert	172
4.3.1.4. Valorisation au sein du CNRS	172
4.3.1.5. Centres Régionaux d'innovation et de transfert de technologie (CRITT)	173
4.3.1.6. Pôles de compétitivité	173
4.3.1.7. Instituts Carnot	174
4.3.1.8. Incubateurs	174
4.3.1.9. Pépinières d'entreprises	174
4.3.1.10. Sociétés de Recherche Contractuelle	174
4.3.1.11. Alliances Thématiques de Recherche	174
4.3.1.12. Sociétés de conseil	175
4.3.2. STRATEGIE EN PROPRIETE INTELLECTUELLE : ANALYSE DE LA DEMANDE DE BREVET.	177
4.4. PHASES DE DEVELOPPEMENT : DU LABORATOIRE A L'INDUSTRIE	180
4.4.1. MATURATION POTENTIELLE DU PROJET	180
4.4.2. PROSPECTION : COMMENT ELABORER UNE FICHE TECHNOLOGIQUE ET PRENDRE CONTACT AVEC DES INDUSTRIELS	181
4.4.3. DEFINITIONS DES DIFFERENTS CONTRATS	183
4.4.3.1. Accord de non divulgation (NDA)	183
4.4.3.2. Accord de transfert de matériel (MTA)	183
4.4.3.3. Contrat de prestation de service / de recherche	183
4.4.3.4. Collaboration de recherche	183

4.4.3.5. Contrat de licence	183
4.4.4. ROLES DES DIFFERENTS ACTEURS DANS L'ETABLISSEMENT DES CONTRATS	184
4.5. ANALYSE CRITIQUE ET CONCLUSION	185
4.6. BIBLIOGRAPHIE	186
<u>5. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES</u>	189
5.1. CONCLUSION GENERALE	189
5.2. PERSPECTIVES	191
5.2.1. MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE	191
5.2.2. FONCTIONNALISATION DES CYCLODEXTRINES PAR UN LIGAND	192
5.2.3. AMELIORATION DU RELARGAGE : BRAS CLIVABLE	193
5.2.4. CONTROLE DE LA LONGUEUR DES FIBRES	194
5.2.5. CRISTALLISATION DES FIBRES	194
5.2.6. EXPERIENCES COMPLEMENTAIRES DE CRYO-MICROSCOPIE	195
5.3. BIBLIOGRAPHIE	196
<u>6. EXPERIMENTAL PART</u>	199
6.1. GENERAL INFORMATION	199
6.2. NOMENCLATURE	200
6.3. SYNTHESIS	201
6.4. BIOLOGICAL EXPERIMENTS	244
6.5. BIBLIOGRAPHY	248

ABBREVIATIONS

σ_g	Ecart type géométrique
ACN	Acétonitrile
Ad	Adamantane
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADV	Virus de la maladie aléoutienne (<i>Aleutian Disease Virus</i>)
AFM	Microscopie à force atomique (<i>Atomic Force Microscopy</i>)
Arg	Arginine
ARN	Acide ribonucléique
ARN _m	Acide ribonucléique messenger
ASO	Oligonucléotide antisens (<i>AntiSens Oligonucleotide</i>)
ATP	Adénosine triphosphate
BET	Bromure d'éthidium
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
br.	Signal large
CD	Cyclodextrine
COSY	Spectroscopie de corrélation (<i>COrrrelation Spectroscopy</i>)
CPP	Peptides pénétrants (<i>Cell Penetrating Peptide</i>)
Cryo-TEM	Cryo-microscopie électronique (<i>Cryogenized Transmission Electron Microscopy</i>)
CuAAC	Cycloaddition alcyne azide au cuivre (<i>Copper Alkyne Azide Cycloaddition</i>)
d	Doublet
dd	Doublet de doublet
DCM	Dichlorométhane
D _g	Diamètre géométrique moyen
DHA	Dehydroascorbic Acid
DIBAL-H	Diisobutylaluminium hydride
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamine
DLS	Diffusion dynamique de la lumière (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMEM	Milieu minimum essentiel de Eagle (<i>Dulbecco/Vogt Modified Eagle's minimal essential Medium</i>)
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOSY	Spectroscopie de diffusion (<i>Diffusion Ordered Spectroscopy</i>)

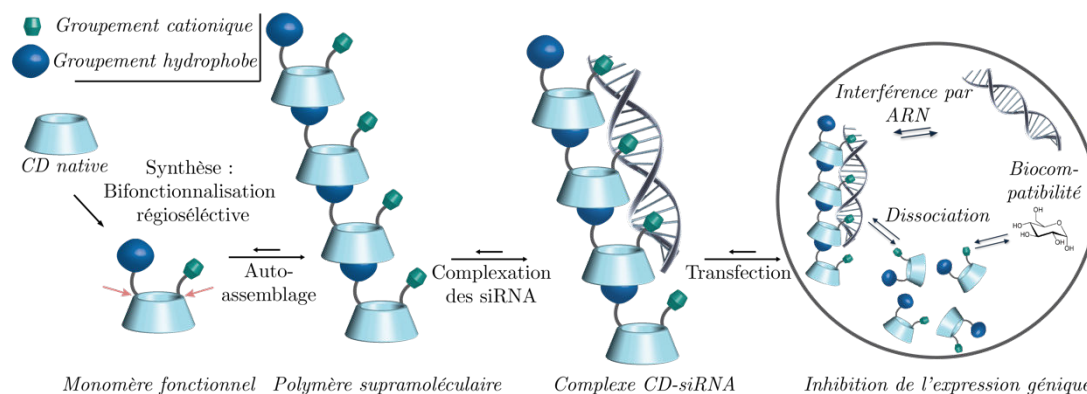
DP	Degré de polymérisation
dsRBP	Protéine de liaisons d'ARN double brins (<i>double-stranded RNA binding protein</i>)
dT	Déoxythymine
EDC	Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	Éthylène Diamine Tétracétique
ESI-TOF	Spectromètre de masse à temps de vol, ionisation par électrospray (<i>ElectroSpray Ionization – Time of Flight</i>)
EMSA	Retard sur gel d'agarose par électrophorèse (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>)
FBS	Sérum de veau fœtal (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
GalNAc	N-Acétalgalactosamine
GDP	Guanosine Diphosphate
GTP	Guanosine Triphosphate
HATU	Hexafluorophosphate de (diméthylamino)-N,N-diméthyl (3H[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yl)oxy)méthaniminium
HIV/VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
HMBC	RMN de corrélation hétéronucléaire bidimensionnelle à plusieurs liaisons (<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>)
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HRMS	Spectrométrie de masse à haute résolution (<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>)
HSQC	RMN de corrélation hétéronucléaire bidimensionnelle à simple quanta (<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>)
HSV	Herpès Simplex Virus
ITC	Titration calorimétrique isotherme (<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>)
IV	Influenza Virus
m	Multiplet
MALDI-TOF	Spectroscopie de desorption-ionisation laser assistée par matrice (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight</i>)
miRNA	Micro ARN (<i>microRNA</i>)
NOESY	Spectroscopie à effet NOE (<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>)
PAMAM	Poly(amidoamine)
Pd/C	Palladium sur Charbon
pDNA	Plasmide
PEG	Polyéthylène Glycol
PEI	Polyéthylèneimine

RLC	Pré-complexe d'extinction induit par l'ARN (<i>RNA-induced silencing Loading Complex</i>)
RV	Rhinovirus
RISC	Complexe d'extinction induit par l'ARN (<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>)
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
(T)-ROESY	Spectroscopie à effet NOE rotationnelle (<i>(Transverse)-Rotating Frame Overhauser Spectroscopy</i>)
r.t.	Température ambiante (<i>room temperature</i>)
s	Singulet
SANS	Diffusion de neutrons aux petits angles (<i>Small Angle Neutron Scattering</i>)
SAXS	Diffusion des rayons X aux petits angles (<i>Small Angle X-rays scattering</i>)
shRNA	Petit ARN en épingle à cheveux (<i>Small Hairpin RNA</i>)
siRNA	Petit ARN interférent (<i>Small Interfering RNA</i>)
snRNA	Petit ARN nucléaire (<i>Small Nuclear Hairpin</i>)
TAT	Trans-activateur de transcription (Trans-Activator of Transcription)
TBE	Tris Borate EDTA
TEM	Microscopie à transmission électronique (<i>Transmission Electronic Microscopy</i>)
TEMPO	(2,2,6,6-Tetraméthylpipéridin-1-yl)oxyl
TFA	Trifluoracétique Acid
THF	Tétrahydrofurane
THPTA	tris(3-hydroxypropyltriazolyméthyle)amine
TMV	Virus de la mosaïque du tabac (<i>Tobacco Mosaic Virus</i>)
TOCSY	Spectroscopie totale de corrélation (<i>Total Correlation Spectroscopy</i>)
VPO	Osmométrie à pression de vapeur (<i>Vapor Pressure Osmometry</i>)
UV	Ultraviolet

INTRODUCTION

Les siRNA sont de courts ARN double brins, capables d'inhiber spécifiquement l'expression d'un gène. Leur découverte a ouvert de nombreuses perspectives thérapeutiques. Leur utilisation en tant que médicament reste cependant complexe. En effet, les obstacles à franchir pour développer des agents de transfection efficaces sont nombreux. Cette thèse vise à construire un système dynamique qui, à l'image des virus, est constitué de briques moléculaires s'emboîtant et interagissant avec des acides nucléiques selon des interactions supramoléculaires.

Dans cet objectif, nous avons utilisé des cyclodextrines comme plateforme afin d'élaborer des polymères supramoléculaires polycationiques, capables d'interagir avec les siRNA, de les complexer et des les transfecter dans les cellules afin d'induire l'interférence par ARN.



Dans un premier temps nous nous intéresserons aux siRNA et au mécanisme de l'interférence par ARN. Les différentes contraintes, inhérentes à la transfection de siRNA, seront alors exposées et nous verrons comment nous pouvons nous inspirer de la nature, et plus particulièrement des virus, pour élaborer des vecteurs de siRNA.

Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons à l'élaboration de polymères supramoléculaires dans l'eau. Les différents obstacles à la mise au point de tels objets dans ce solvant seront alors développés. La synthèse des monomères utilisés dans ce projet ainsi que la caractérisation des polymères supramoléculaires correspondants seront ensuite décrites.

Puis, l'aptitude des polymères supramoléculaires à interagir avec les siRNA sera évaluée, et nous nous intéresserons à la formation de ces assemblages à base d'acides nucléiques. Nous prendrons ensuite un peu de recul par rapport à ce projet, pour comprendre dans quel contexte socio-économique cette thèse s'inscrit et comment elle a été valorisée, pour finalement conclure.

Chapitre 1

Les virus comme source d'inspiration pour la mise au point
d'agents de transfection

1. LES VIRUS COMME SOURCE D'INSPIRATION POUR LA MISE AU POINT D'AGENTS DE TRANSFECTION

La plupart des médicaments sont dirigés vers des protéines comme les enzymes, ou les récepteurs. L'élaboration de tels principes actifs nécessite la compréhension du mode d'action complexe des protéines concernées mais aussi la synthèse de très nombreux candidats pour ne révéler que peu d'élus efficaces. Une autre stratégie thérapeutique consiste à s'intéresser non plus aux protéines mais à la cause de leur production, à savoir l'ADN et les ARNm (ARN messagers). Beaucoup de médicaments dirigés vers l'ADN sont souvent non spécifiques. Ces substances s'intercalent et se lient avec l'ADN, entraînant une distorsion structurale de celui-ci. Cette stratégie, très utilisée en chimiothérapie, s'accompagne d'effets secondaires de par sa non spécificité. Plus récemment, la recherche biomédicale s'est orientée vers une nouvelle stratégie : cibler les oligonucléotides grâce à leur séquence, en transfectant les cellules avec des acides nucléiques.

D'un côté la thérapie génique s'intéresse à l'ADN en réparant ou en modifiant le patrimoine génétique afin de traiter ou prévenir une pathologie. Le concept de la thérapie génique est né en 1950. Il a pourtant fallu attendre 2004 pour qu'un premier médicament soit commercialisé (Gendicine). Depuis, seulement deux médicaments ont reçu une autorisation de mise sur le marché (Glybera – 2012) et (Kymriah – 2017). Les nombreux essais cliniques réalisés ont mis en lumière les problèmes d'application de cette thérapie et les difficultés rencontrées pour transfecter du matériel génétique de manière fiable et sûre. La thérapie génique est néanmoins extrêmement prometteuse, notamment depuis la révolution CRISPR-Cas9,¹ technique permettant d'éditer le génome de manière spécifique et relativement simple comparée aux précédentes méthodes.

D'un autre côté la thérapie antisens cible les ARNm. Le principe de cette méthode est d'introduire un simple brin d'oligonucléotide complémentaire de l'ARNm visé. On dit alors que l'ARNm est le brin sens et l'oligonucléotide complémentaire antisens, d'où le nom de la thérapie. Ces deux brins vont alors s'hybrider spécifiquement, déclenchant divers processus biologiques et permettant ainsi de moduler ou d'inhiber l'expression d'un gène. Cette stratégie thérapeutique est devenue particulièrement prometteuse avec la découverte de l'interférence par ARN, et l'utilisation des siRNA, capables d'inhiber l'expression d'un gène de manière très spécifique et efficace.

Le développement de vecteurs d'acides nucléiques est donc devenu primordial pour le progrès de ces thérapies et suscite un vif intérêt chez les chercheurs. La recherche biomédicale s'est alors tournée vers les objets moléculaires naturels, capables de transfecter du matériel génétique : les virus. Deux types de vecteurs sont alors apparus : les vecteurs viraux et les vecteurs synthétiques, autrement appelés virus artificiels. Cependant, si les premiers cités sont limités par leur toxicité, les deuxièmes le sont par leur faible efficacité. Aujourd'hui, pour l'utilisation de siRNA, les vecteurs viraux ont été en grande partie délaissés au profit des vecteurs synthétiques. Afin d'égaliser l'efficacité des vecteurs viraux, l'élaboration de virus artificiels passe alors par la compréhension des propriétés, de la structure et du mode d'action des virus, pour mieux les imiter.

Dans ce projet de thèse, nous nous sommes attachés à l'élaboration d'un vecteur synthétique de siRNA. Afin d'introduire les différentes notions qui nous sont nécessaires, nous allons voir dans ce premier chapitre, le fonctionnement de la thérapie antisens, puis les enseignements à tirer des virus pour l'élaboration de virus artificiels. Différents exemples majeurs de vecteurs synthétiques de siRNA seront finalement exposés.

1.1. La thérapie antisens

1.1.1. Historique

En 1978, Stephenson et Zamecnik montrent qu'il est possible d'inhiber la prolifération du virus du sarcome de Rous de manière spécifique en introduisant un ADN 13-mer.^{2,3} Les années qui ont suivies cette découverte ont permis de mieux comprendre ce phénomène, et de confirmer le potentiel de ces oligonucléotides antisens appelés ASO.⁴ La reconnaissance des acides nucléiques par les liaisons hydrogène de Watson-Crick permet une très haute spécificité. À titre d'exemple, il est statistiquement possible de ne retrouver qu'une seule séquence identique de 17 nucléotides dans l'intégralité du génome humain.⁵ Par la suite, il a été montré que ce phénomène antisens était naturel et se produisait de manière endogène aussi bien dans les cellules procaryotes que eucaryotes, pour permettre la régulation de l'expression génique.⁶⁻⁸ En 1998, le fomiversen, premier médicament composé d'un ASO, est approuvé pour le traitement de la rétinite à cytomégalo virus.

La même année, Fire et Mello publient un article dans *Nature* décrivant une expérience sur le ver *C. elegans*.⁹ L'expérience réalisée consistait à inhiber l'expression d'un ARNm chez l'embryon du ver. L'ARNm ciblé, responsable de la couleur marron de l'embryon, permettait en cas de décoloration de celui-ci, de conclure quant à la réussite de l'expérience. Lors de l'injection de l'ARN antisens, une légère décoloration a été observée. De manière surprenante, lors de l'injection de l'ARN double brin correspondant, une décoloration totale de l'embryon a été observée (**Figure 1. 1**). Le mode d'action de l'ARN double brin par rapport à l'ARN antisens semble alors différent et bien plus efficace. Cette découverte a permis de mettre en lumière un nouveau phénomène appelé l'interférence par ARN. Ces travaux seront récompensés en 2006 par le prix Nobel de médecine.¹⁰ En 2001 le potentiel thérapeutique de ces double brins sera confirmé lors de la découverte de l'interférence par ARN sur des cellules de mammifères.¹¹

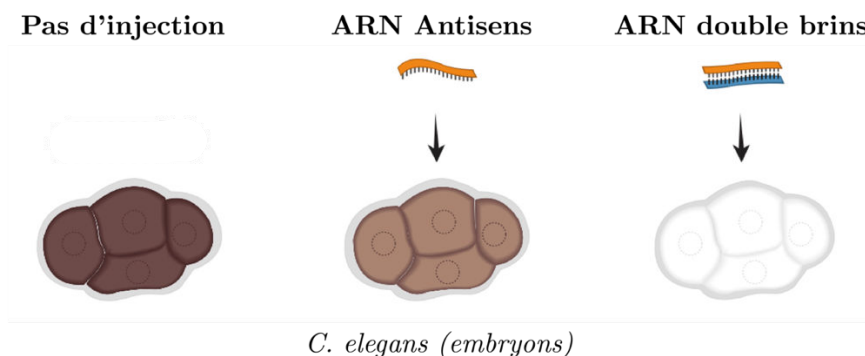


Figure 1. 1 : Observation de l'expression de l'ARNm responsable de la coloration marron des embryons du ver *C. elegans* en fonction de l'injection d'un ARN antisens ou d'un ARN double brin. Figure adaptée.¹⁰

1.1.2. Découverte et principe de l'interférence par ARN

Le mécanisme menant à l'interférence par ARN, fut élucidé plus tard grâce à des expériences *in vitro*¹²⁻¹⁴ puis confirmé *in vivo*.¹⁵ Ces recherches mettent en lumière la présence de courts ARN double brins d'une longueur définie (21-23 nucléotides) dans les cellules transfectées avec de longs ARN double brins. Ces courts ARN double brins sont appelés siRNA pour « small interfering RNA » en anglais (petits brins interférants). Peu après leur découverte, il fut montré que le phénomène d'interférence par ARN est naturel et permet aux cellules de réguler l'expression de leur génome. Elle se traduit par l'expression de miRNA (micro ARN).¹⁶⁻¹⁸ Les miRNA sont des petits ARN en épingle à cheveux, d'une taille semblable à celle des siRNA qui permettent de déclencher l'interférence par ARN de la même manière. Contrairement aux siRNA, les miRNA présentent des mésappariements au sein de la séquence.

Le mécanisme d'interférence par ARN, est aujourd'hui complètement élucidé ([Figure](#)

1. 2) :

- L'interférence par ARN commence par l'introduction dans le cytoplasme de longs ARN double brins. Cette introduction peut être exogène ou bien endogène. Il s'agit dans le deuxième cas de pré-miRNA provenant du noyau synthétisé à partir de l'ADN de la cellule.
- L'ARN double brin, ou le pré-miRNA est ensuite pris en charge par une enzyme à activité RNase appelée Dicer qui reconnaît et coupe cet ARN double brin en un ARN double brin plus court (1). Il s'agit des siRNA ou des miRNA. L'enzyme Dicer coupe de manière bien spécifique les ARN, afin de former de courts ARN (21-23 nucléotides) présentant deux nucléotides non appariés (déoxythymidine) à chaque position 3' terminale.¹⁹ Ces nucléotides non appariés sont appelés « overhangs ».
- Une protéine de la famille Argonaute est alors recrutée par l'enzyme Dicer. L'ARN double brin est alors déplacé au sein de la protéine Argonaute (2). La présence des « overhangs » est essentielle dans la reconnaissance de l'acide nucléique par Argonaute.¹⁹ Une troisième protéine intervient dans la reconnaissance et le transfert de l'acide nucléique. Elle est appelée dsRBP pour « double stranded RNA Binding Domains ». L'ensemble ainsi formé s'appelle RLC pour « RISC-loading complex » (pré-complexe d'extinction induit par l'ARN).
- Une fois l'ARN double brin transféré au sein d'Argonaute, les protéines DICER et dsRBP se détachent d'Argonaute. Argonaute est alors capable de supprimer l'un des deux brins de l'ARN (3). Ce brin est appelé « brin passager ». L'autre brin, appelé « brin guide », est maintenu au sein d'Argonaute et l'ensemble forme le complexe d'extinction induit par l'ARN (RISC).
- RISC est alors capable de repérer les ARNm dont la séquence est complémentaire à celle du brin guide. L'hybridation des deux brins a alors lieu (4). Lorsque la complémentarité des deux brins est moyenne, les deux brins restent liés, induisant une inhibition traductionnelle de l'ARNm (5). Lorsque la complémentarité des deux brins est bonne l'ARNm est alors coupé puis dégradé (6). Le complexe RISC est alors reformé, et peut cibler un nouvel ARNm. Ce processus est ainsi catalytique et devient extrêmement efficace (7). Un autre phénomène a été observé chez les levures *schizosaccharomyces pombe*. Le complexe RISC-ARNm est capable, grâce à une enzyme ARN polymérase dépendante de l'ARN, de produire des ARN double brins (8). Ceux-ci conduiront ensuite à la production de multiples siRNA. Ce phénomène d'amplification n'a pour le moment pas été identifié chez les mammifères.⁵

En conclusion, le phénomène d'interférence par ARN, se révèle plus efficace que l'utilisation d'ASO. En effet, l'aspect catalytique du mécanisme, le rend plus performant et plus prédictible. L'interférence par ARN a ainsi ouvert de considérables opportunités thérapeutiques.

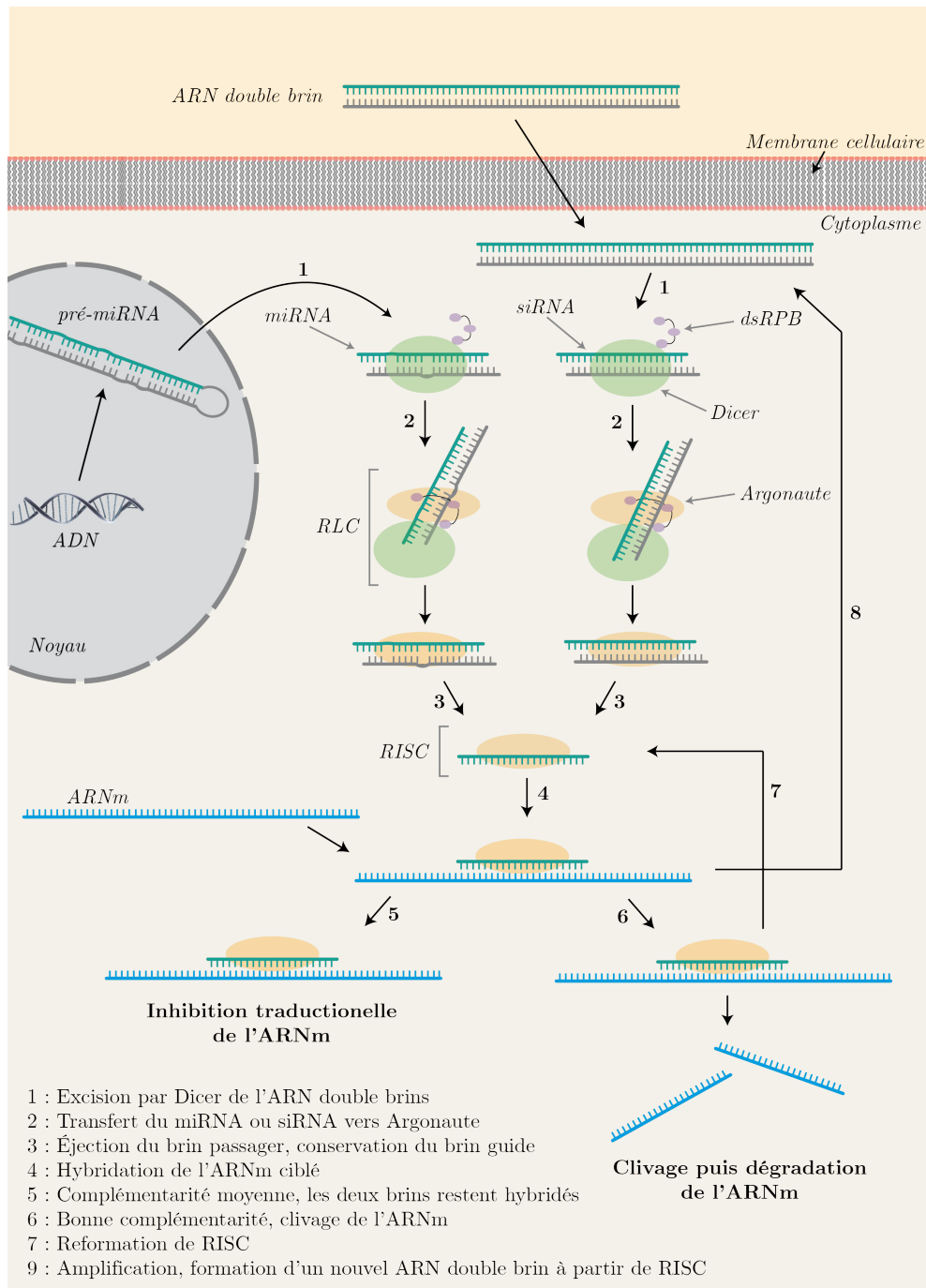


Figure 1. 2 : Mécanisme de l'interférence par ARN

1.1.3. Les différentes stratégies de thérapie antisens

La compréhension des différents mécanismes menant à l'inhibition d'un gène a permis l'élaboration de plusieurs stratégies de thérapie antisens. Il en existe quatre principales : les ASO RNase H-dépendant, les ASO à omission d'exons, l'inactivation des miRNA ou la transfection de mimes de miRNA et la transfection de siRNA synthétiques (Figure 1. 3). Bien que peu de médicaments utilisant la thérapie antisens soient aujourd'hui sur le marché, de nombreuses études cliniques sont actuellement en cours. Dans le chapitre 4, un bref bilan du contexte socioéconomique, dans lequel s'inscrit ce projet, et un résumé des principaux projets prometteurs en thérapie antisens sont dressés.

1.1.3.1. ASO RNase H-dépendant (4)

Cette stratégie consiste à transfecter un oligonucléotide simple brin antisens. Ce simple brin s'hybride à l'ARNm visé et empêche sa transcription ou entraîne sa dégradation par une protéine à activité RNase. Le processus biologique impliqué dans cette stratégie est cependant moins efficace que l'utilisation de siRNA synthétiques. Contrairement aux siRNA, les ASO peuvent pénétrer dans le noyau cellulaire entraînant une dégradation des ARNm avant leur extraction nucléaire.²⁰

1.1.3.2. ASO à omission d'exons (5)

La transcription des ARNm se fait en plusieurs étapes. Dans un premier temps un ARNm précurseur (pré-ARNm) est transcrit dans le noyau de la cellule. Ce pré-ARNm est ensuite épissé, c'est à dire que certaines parties de l'ARNm vont être détruites (introns) par un processus d'excision programmé. Les parties restantes, appelées exons, forment ensuite l'ARNm mature. Cette deuxième stratégie consiste à utiliser des oligonucléotides simple brins pour cibler les jonctions introns-exons à l'intérieur du noyau. L'excision des introns n'a ainsi pas lieu ou alors au niveau d'un autre site de l'ARNm. Cela conduit à la formation d'un nouvel ARNm qui permettra la production d'une autre protéine isoforme. Cela peut permettre de restaurer par exemple la fonction d'un gène muté.²¹

1.1.3.3. Anti miRNA (1) et mimes de miRNA (2)

Les miRNA sont des ARN naturels qui permettent de réguler l'expression du génome *via* le mécanisme d'interférence par ARN (de manière moins efficace que les siRNA). Néanmoins, une dérégulation des miRNA a lieu dans certaines tumeurs et leur inactivation *via* l'utilisation d'ASO permet de lutter contre celles-ci (1). Lorsque leur expression est bien régulée, les miRNA luttent contre certaines tumeurs. Malheureusement, leur production naturelle n'est pas suffisante et la transfection de mimes de miRNA synthétiques peut alors avoir une application en thérapie oncologique (2).

1.1.3.4. Transfection de siRNA synthétiques (3)

Comme nous l'avons vu précédemment, les siRNA sont créés naturellement à partir de longs ARN double brins exogènes après excision par la protéine Dicer. Afin d'imiter ce processus en formant de manière artificielle des RISC dirigés vers des ARNm cibles, la transfection de siRNA synthétiques peut être réalisée (3). Cette stratégie est particulièrement prometteuse, puisqu'elle utilise le processus d'interférence par ARN et est donc beaucoup plus efficace que les ASO. Néanmoins la transfection d'ARN double brins est plus difficile que celle d'ARN simple brins.²² En effet les bases nucléotidiques sont au cœur de l'hélice d'un ARN double brin, les siRNA n'exposent alors vers l'extérieur que des fonctions phosphates. Cela les rend particulièrement hydrophiles et inadaptés pour la traversée de la barrière cellulaire.²³

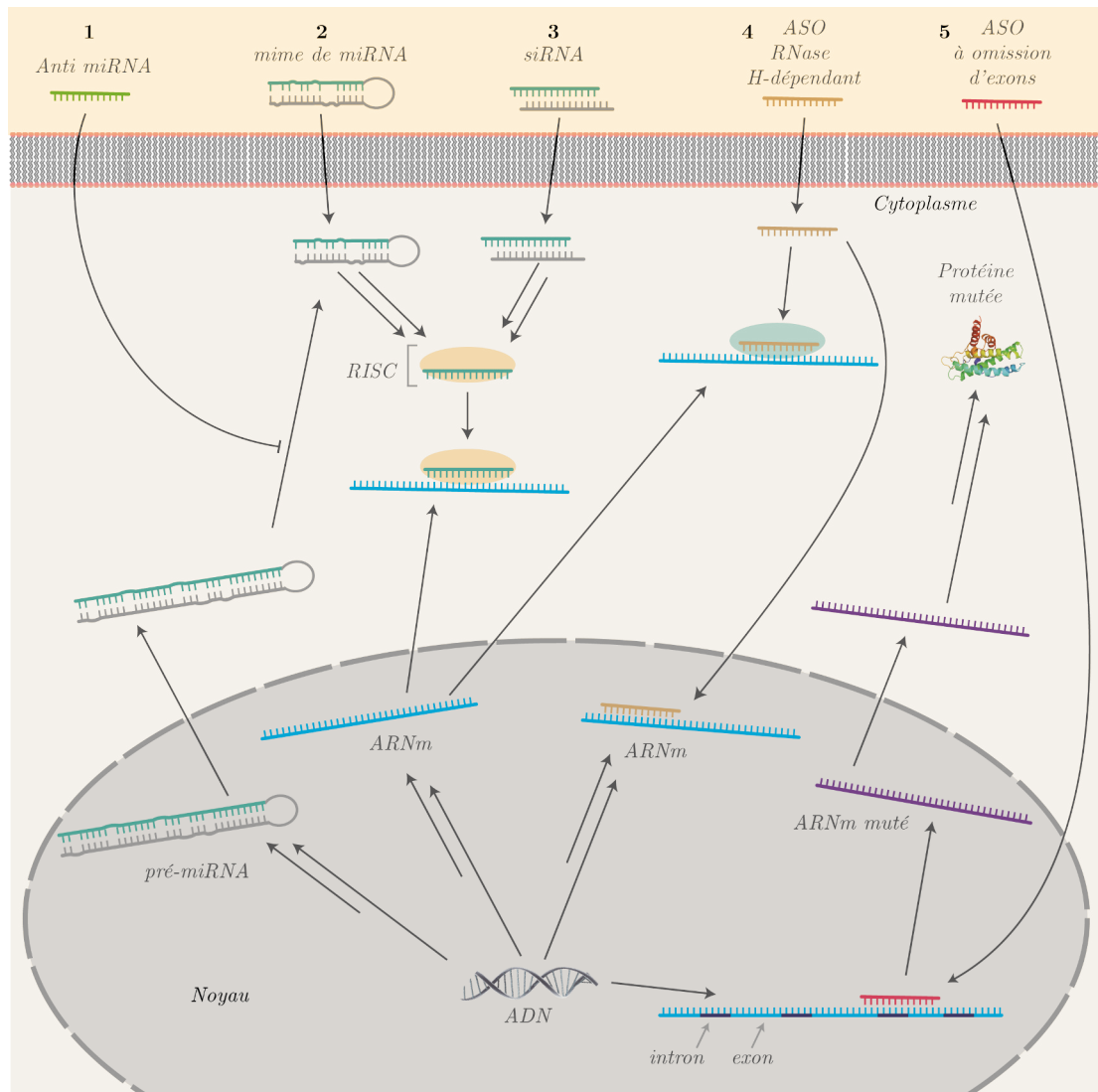


Figure 1. 3 : Les différentes stratégies de thérapie antisens

Dans ce projet, nous nous sommes intéressés à la stratégie de transfection de siRNA. Après la découverte de l'interférence par ARN, l'utilisation des siRNA synthétiques comme nouvelle forme de thérapie antisens paraissait sans limite. Cependant, la mise au point de tels médicaments, s'est révélée plus compliquée qu'initialement prévue à cause des propriétés pharmacocinétiquement défavorables des siRNA.

Afin de pallier ces problèmes de transfection, les chercheurs se sont tournés vers les virus, dont la fonction primaire est justement de transférer du matériel génétique. Afin de s'en inspirer, nous allons maintenant voir les différentes propriétés qui les caractérisent, ainsi que leur formation et leur mode de fonctionnement.

1.2. Les virus : définitions, formation et mode de fonctionnement

Les virus sont des agents infectieux, éventuellement pathogènes, toujours composés d'au moins deux éléments : un type d'acide nucléique (ADN ou ARN) et un manteau protéique, appelé capsid, protégeant le génome du virus. Ils sont incapables de croître et de se diviser de manière autonome. Ainsi, pour se multiplier, un virus nécessite un hôte et sa machinerie cellulaire afin de répliquer son génome et d'exprimer les protéines nécessaires à la construction de sa capsid. Certains virus sont en plus constitués d'une enveloppe qui dérive des constituants de la cellule hôte. La relative simplicité de leur structure, qui les distingue des cellules bactériennes et des cellules eucaryotes, permet, grâce à l'évolution des techniques de Microscopie Électronique à Transmission (TEM) et de tomographie, la connaissance de la composition moléculaire des virus. Leur origine fait l'objet de nombreuses spéculations. Ont-ils été créés à partir de cellules, ou bien parallèlement ? Ont-ils émergé de la soupe prébiotique ? Toujours est-il que les virus sont apparus il y a très longtemps (plusieurs milliards d'années), ce qui leur a permis d'évoluer, de se différencier et d'optimiser leur structure et leur organisation jusqu'à devenir extrêmement efficace dans l'infection des cellules. Il est ainsi possible de classer les virus de par leur lien de parenté, en les rangeant par ordre, famille, sous famille, genre et espèce. C'est la classification officielle établit par l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). Une autre classification (classification de Baltimore) les range selon leurs caractères structuraux et le mode d'expression de l'ARNm viral. La première dichotomie de cette classification est le type de génome (ADN ou ARN). Ils peuvent ensuite être classés selon la structure de leur capsid, et enfin selon leur enveloppe (virus nus ou enveloppés). Une classification simplifiée et non exhaustive de quelques virus est présentée en [Figure 1. 6](#).

1.2.1. Classification

1.2.1.1. Classification par type de génome

Les virus possèdent soit un génome à ARN, soit un génome à ADN. Les génomes à ARN sont principalement monocaténares. On peut différencier les virus à ARN de polarité positive, c'est à dire de même polarité que l'ARNm viral, de ceux à polarité négative, complémentaire de l'ARNm viral. Les génomes à ADN sont eux majoritairement bicaténares.

Une fois transfecté dans la cellule, le matériel génétique du virus doit être transcrit pour exprimer l'ARNm viral, permettant l'expression des protéines nécessaires à l'infection complète de la cellule et à la réplication du génome. En fonction du type de génome, la voie conduisant à la production initiale de cet ARNm viral est différente (Figure 1. 4). Elle passe toujours par l'utilisation d'enzymes de la cellule hôte et parfois par celle d'enzymes apportées par le virus. Quelle que soit sa nature, le génome viral adopte toujours une conformation très compacte.

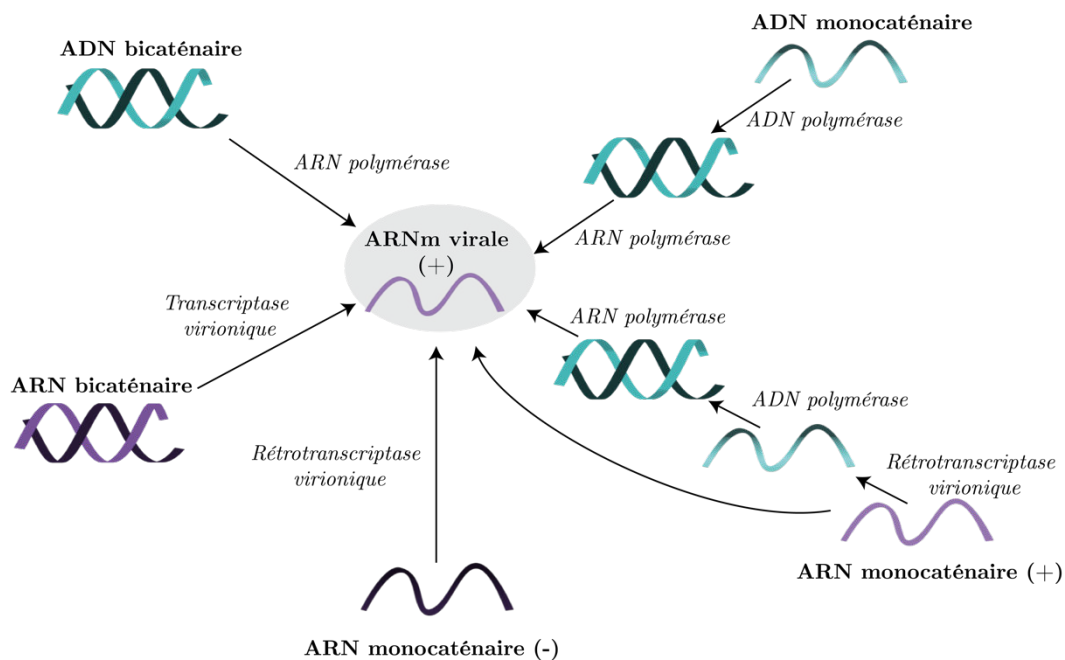


Figure 1. 4 : Schéma des voies conduisant à la production initiale de l'ARNm viral

1.2.1.2. Classification structurale

La capside est la coque qui entoure et protège l'acide nucléique viral. Cette capside est constituée par l'assemblage de sous-unités protéiques répétitives appelées capsomères. Le nombre d'espèces protéiques constituant une capside est réduit du fait de la capacité de codage limitée des génomes viraux. Ces structures sont relativement résistantes et stables. L'ensemble composé de la capside et de son acide nucléique est appelé nucléocapside. Grâce à la microscopie électronique, il a été possible d'identifier deux grands types de structures capsidiales : les particules sphériques (capside icosaédrique à symétrie cubique) et les particules allongées (capside tubulaire à symétrie hélicoïdale).

Capsides icosaoédriques à symétrie cubique

L'icosaèdre est un polyèdre régulier présentant 12 sommets, 30 arêtes, et 20 faces. Chaque face est un triangle équilatéral. L'icosaèdre est une structure réputée pour sa résistance. On retrouve ce type de structure dans la construction de dômes, mais aussi pour la confection des ballons de football, qui sont en réalité des icosaèdres tronqués (**Figure 1. 5. c**).

La taille des virus à capsides icosaoédriques peut varier en fonction du nombre de triangulation, c'est à dire en fonction du nombre de sous-unités qui compose un triangle de l'icosaèdre (**Figure 1. 5. a**).²⁴ Ainsi, la taille de ce type de virus varie d'une vingtaine à plusieurs centaines de nanomètres. Quelques exemples de virus à capside icosaoédrique à symétrie cubique sont présentés en **Figure 1. 6. a, b, f, g**.

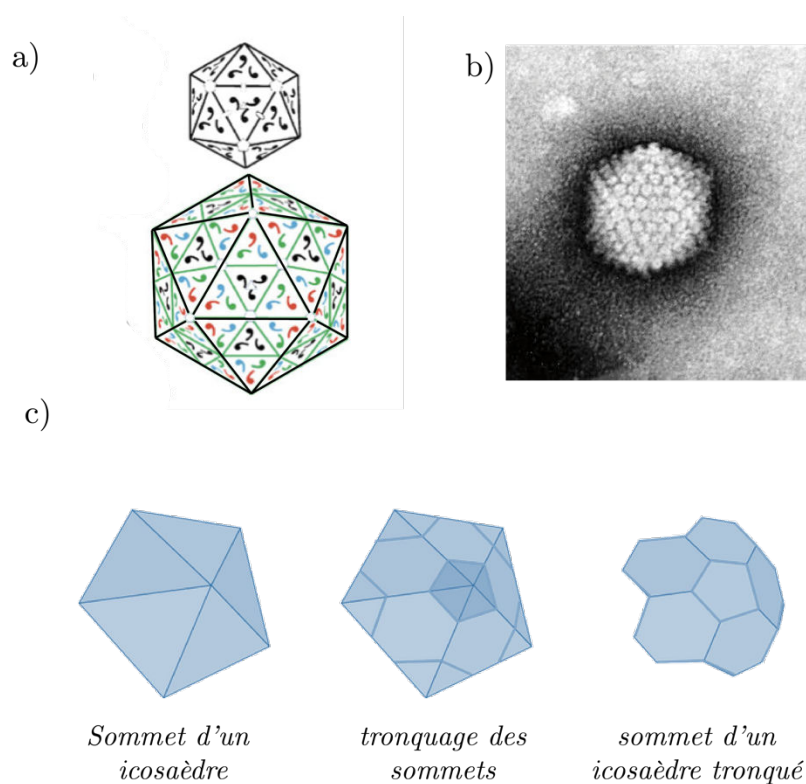


Figure 1. 5 : a) Structure icosaoédrique de virus en fonction du nombre de triangulation T (en noir T = 1, en vert T = 4), b) Image de microscopie à transmission (révélation négative) d'adénovirus, c) Icosaèdre aux sommets tronqués, conduisant à la forme caractéristique d'un ballon de football.

Capsides tubulaires à symétrie hélicoïdale

Les sous-unités protéiques de la capsidite d'un virus peuvent aussi s'arranger plus simplement de manière tubulaire. Contrairement à la symétrie icosaédrique qui implique uniquement des axes de symétrie rotationnelle, la symétrie hélicoïdale implique à la fois une composante rotationnelle mais aussi translationnelle, lui conférant la forme d'une vis. Lorsque ce type de virus n'est pas enveloppé, il s'agit alors essentiellement de virus de plantes comme les tobamovirus. La structure du virus de la mosaïque du tabac (TMV) a été particulièrement étudiée et sera décrite *vide infra*. Les virus d'animaux à capsidite hélicoïdale sont plus complexes et toujours enveloppés. Quelques exemples de virus à capsidite tubulaire à symétrie hélicoïdale sont présentés en [Figure 1. 6. c, d.](#)

Capsides mixtes et complexes

Les capsidites mixtes, moins fréquentes, sont composées à la fois d'une partie icosaédrique et d'une partie hélicoïdale. Les bactériophages, par exemple, possèdent une tête sphérique et un corps tubulaire. Certaines capsidites plus complexes ne présentent pas de symétrie icosaédrique, ni hélicoïdale. Le virus du VIH (sida), par exemple, possède une capsidite de forme plutôt conique. Quelques exemples de virus à capsidite icosaédrique à symétrie cubique sont présentés en [Figure 1. 6. e.](#)

Enveloppe virale

Constitutive de certains virus, l'enveloppe virale dérive par bourgeonnement de la cellule infectée. Après l'assemblage de la nucléocapsidite, le virus, lors de son extraction de la cellule hôte, va recruter divers éléments cellulaires formant une bicouche lipidique à sa surface. Le bourgeonnement peut avoir lieu à différents niveaux de la cellule (membrane nucléaire, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, membrane cytoplasmique). On retrouve à la surface de l'enveloppe des glycoprotéines d'origine virale qui serviront à l'attachement du virus à une future cellule hôte. Héritant de la fragilité des membranes cellulaires, l'enveloppe virale est aussi la faiblesse des virus enveloppés. Par conséquent ceux-ci résistent généralement moins bien que leurs homologues nus, au milieu extérieur. Cela explique que leur transmission entre hôtes infectés se fasse uniquement par contacts rapprochés. Quelques exemples de virus enveloppés sont présentés en [Figure 1. 6. b, d, e, g.](#)

ARN monocaténaire

ADN bicaténaire

Capside icosaédrique,
à symétrie cubique

Capside tubulaire,
à symétrie hélicoïdale

Capside complexe

Capside icosaédrique,
à symétrie cubique

a) Virus nus

b) Virus enveloppés

c) Virus nus

d) Virus enveloppés

e) Virus enveloppés

f) Virus nus

g) Virus enveloppés

Poliovirus (+)
Virus de l'hépatite A (+)
Virus de l'hépatite E (+)

Virus du chikungunya (+)
Virus de la rubéole (+)
Virus de la Dengue (+)
Virus de l'hépatite C (+)

Virus de la
Mosaïque du
Tabac (+)

Virus Ebola (-)
Virus de la rage (-)
Virus de la rougeole (-)
Virus de la grippe (-)

Virus de
l'immunodéficience
humaine (HIV) (+)

Papillomavirus
Adénovirus

Virus de l'hépatite B
Herpès simplex virus
Virus de la varicelle

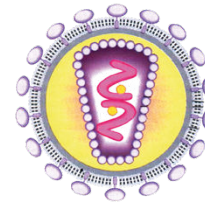
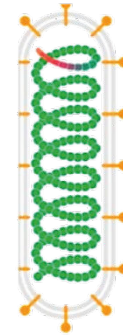
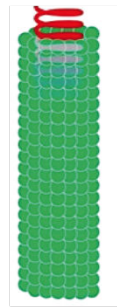


Figure 1. 6 : Classification simplifiée des virus. « Les signes (+) / (-) » symbolisent la polarité de l'ARN monocaténaire

1.2.2. Formation des virus

1.2.2.1. Structuration de la capside

La structuration des capsides filamenteuses est relativement simple et se fait majoritairement par l'assemblage répétitif d'une protéine capsidiale principale. La structure secondaire de ces protéines est souvent gouvernée par des interactions entre hélices α .²⁵ La présence de ces hélices α permet l'emboîtement des différentes sous-unités protéiques *via* un **effet hydrophobe** (Tableau 1. 1).²⁶ Les hélices α sont un agencement stable de chaînes polypeptidiques, formant une hélice droite ayant un pas de 0,54 nm (3,6 acides aminés). Cette structure permet une distribution régulière des **liaisons hydrogènes** (Tableau 1. 1) entre les groupements carbonyles et iminos d'une même chaîne (Figure 1. 7).

Tableau 1. 1 : Liaisons faibles mises en jeu dans les systèmes biologiques (1)

Liaisons faibles (1)
<p>Liaison hydrogène : Les liaisons hydrogène sont des interactions très directionnelles entre deux atomes : un atome donneur d'hydrogène présentant une densité de charge positive et un atome accepteur présentant une densité de charge négative. Elles concernent des atomes d'hydrogènes liés à des atomes plus électronégatifs (azote, oxygène) et des groupements riches électroniquement (oxygène de groupements carbonyles). Leur énergie de liaisons est comprise entre 3 et 7 kcal.mol⁻¹.</p>
<p>Effet hydrophobe : Les molécules d'eau, fortement polaires, présentent une forte tendance à exclure les molécules non polaires qui ne peuvent créer d'interactions favorables avec elles. Afin de limiter la surface de contact entre les molécules hydrophobes et les molécules d'eau, les molécules apolaires préfèrent se rassembler. On appelle ce phénomène l'effet hydrophobe. Il est la conséquence d'un bilan thermodynamique énergétiquement favorable composé de deux facteurs : le facteur entropique et le facteur enthalpique. Lorsque qu'une molécule apolaire est solvatée dans l'eau, les molécules d'eau l'entourant s'organisent de manière défavorable avec un faible degré de liberté. Si deux molécules apolaires solvatées dans l'eau interagissent ensemble, un certain nombre de molécules d'eau va alors être libéré. Celles-ci présenteront un degré de liberté plus important, ce qui va augmenter l'entropie du système. D'un autre côté, ces molécules d'eau vont se réorganiser <i>via</i> des liaisons hydrogènes abaissant ainsi leur niveau d'énergie et diminuant l'enthalpie du système. La variation d'énergie libre qui accompagne cet effet hydrophobe est alors négative et explique l'interaction favorable des molécules apolaires dans l'eau.</p> <div style="text-align: center;"> $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ </div>
<p>L'effet hydrophobe a un rôle primordial dans le repliement des protéines, il est aussi essentiel dans la formation de complexes d'inclusion. Nous aborderons ce type de complexe dans le chapitre 2.</p>

L'agencement des hélices α entraîne le positionnement des chaînes latérales vers l'extérieur de l'hélice. Les chaînes latérales sont alors positionnées idéalement pour interagir avec une autre région de la protéine permettant de la structurer selon plusieurs niveaux (Figure 1. 7. a). Lorsque les chaînes latérales des acides aminés constituant deux hélices α sont majoritairement non polaires (valine, isoleucine, leucine etc.), celles-ci peuvent se rapprocher l'une de l'autre et se surenrouler selon une structure bispiralée appelée superhélice alpha (Figure 1. 7. b).

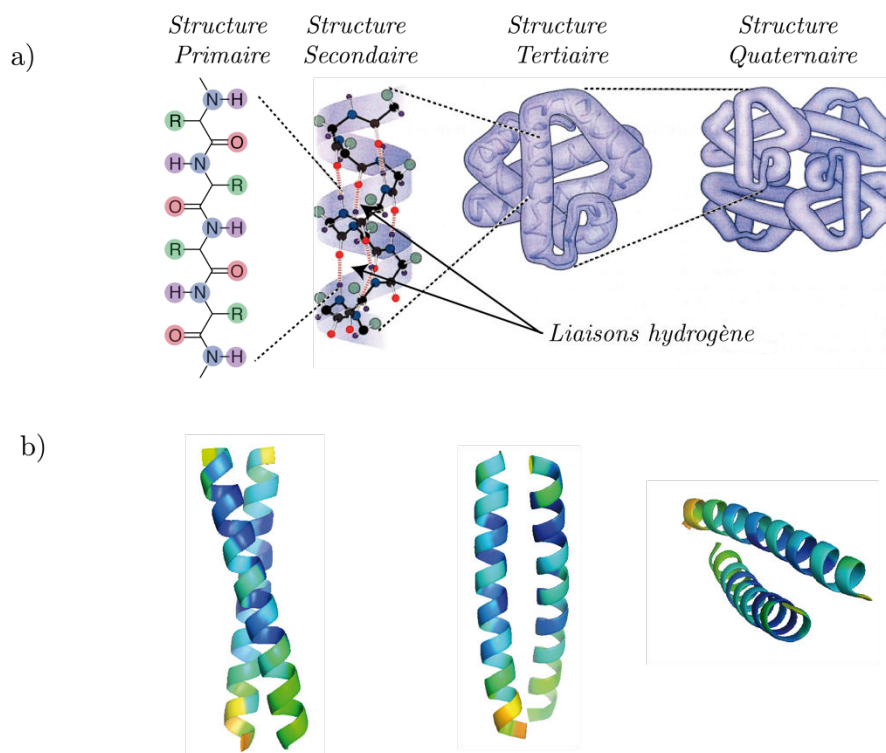


Figure 1. 7 : a) Quatre niveaux de structure des protéines s'arrangeant en hélice α . Figure adaptée.⁵ b) Superhélice α (glissière à leucine GCN4).

Les sous-unités protéiques constituant les capsides de virus sphériques forment aussi des structures secondaires composées d'hélices α et/ou de feuillets β . Les interactions entre ces différentes structures secondaires participent ainsi à la stabilisation des sous-unités protéiques des capsides.

Les feuillets β sont un autre type de structure secondaire que peuvent adopter les chaînes polypeptidiques. Les structures qu'elles forment sont assez étirées. La stabilisation vient de l'alignement de deux régions du polypeptide permettant la formation de liaisons hydrogène entre les groupements carbonyles et iminos de groupes adjacents (**Figure 1. 8**). Classiquement les feuillets bêta sont composés de quatre à six tronçons de polypeptides composés de huit à dix acides aminés. A l'instar des hélices α , les feuillets β se réarrangent souvent en structures tridimensionnelles plus complexes appelées tonneaux β . Les repliements des protéines adoptant une structure tonneau β peuvent se classer selon trois types : « va et vient », « clé grecque » et « gâteau roulé ». Ce dernier mode de repliement est très fréquent dans l'organisation des capsides virales de type sphérique.²⁷

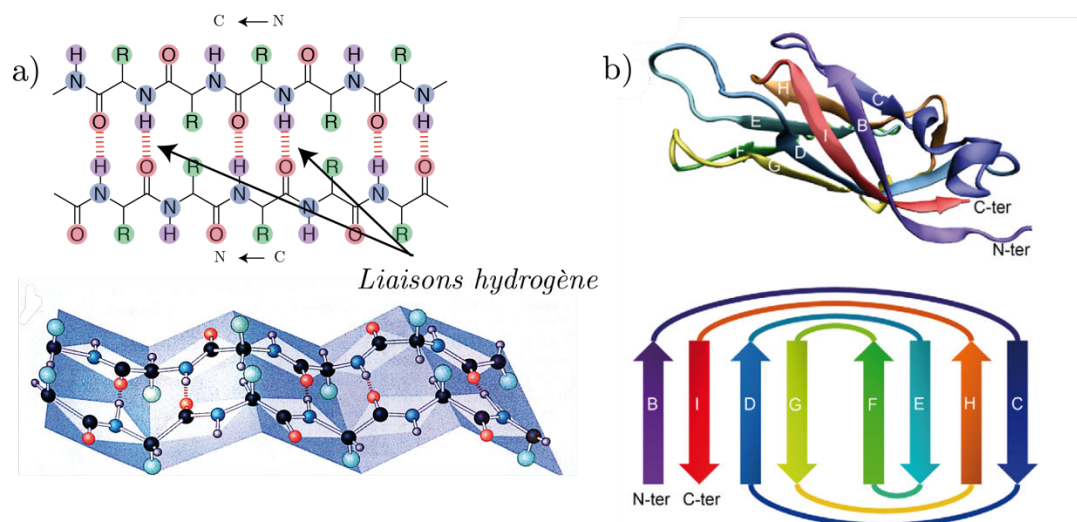


Figure 1. 8 : a) Feuille β vu du dessus et de profil. Les atomes d'oxygène (rouge) et d'azote (bleu) sont liés par des liaisons hydrogènes (rouge). Figure adaptée⁵. b) Repliement caractéristique de huit feuillets β en « gâteau roulé » d'une sous-unité protéique de capside virale. Figure adaptée.²⁷

Ainsi quelle que soit la forme globale des virus (sphérique, tubulaire ou complexe), l'architecture des capsides virales est similaire. Elle est composée de chaînes polypeptidiques repliées pour former une sous-unité de l'assemblage. Cette sous-unité peut alors s'assembler avec d'autres sous-unités pour former une unité et ainsi de suite. On parle alors d'assemblage hiérarchique.

1.2.2.2. Assemblage génome-capside

L'assemblage d'une nucléocapside peut se faire de deux principales manières. Dans le premier cas, la nucléocapside se construit de manière coordonnée, les sous-unités protéiques s'assemblent alors peu à peu autour du génome. Une seconde stratégie consiste en la formation primaire d'une capside immature, suivie de l'insertion du génome au sein de celle-ci.

L'assemblage concerté de la nucléocapside concerne la plupart des virus au génome monocaténaire. La force qui initie alors l'assemblage est dirigée par des **interactions électrostatiques** (**Tableau 1. 2**) entre la capside et le génome. Plusieurs études ont montré que ces interactions se font entre les phosphates des acides nucléiques chargés négativement et les chaînes latérales des arginines des protéines capsidiales.^{28,29} Deux mécanismes ont été identifiés : le mécanisme de nucléation puis d'élongation et le mécanisme dit « en masse ».³⁰ Dans le premier cas, l'assemblage du génome et de quelques protéines forme d'abord le noyau (étape de nucléation). L'assemblage de ces protéines avec le génome induit alors un réarrangement des

sous-unités protéiques favorisant le recrutement d'autres sous-unités. L'élongation est alors rapide, jusqu'au recouvrement complet du génome. Ce mécanisme sera illustré dans le cas du virus de la mosaïque du tabac (*vide infra*). Le mécanisme « en masse » se distingue du fait qu'il soit initié à plusieurs niveaux du génome. Cela est dû à la différence d'intensité d'interactions protéines-protéines et protéines-acide nucléique. Ces deux mécanismes sont par ailleurs en tout point similaire, et conduisent au même résultat. La variation du pH et la concentration en sel peut influencer sur le type de mécanisme favorisé.³⁰ Ces deux mécanismes impliquent une construction de l'assemblage structuré par l'acide nucléique qui en définit donc la taille.

A l'inverse, dans le cas de la formation primaire d'une capsid immature, la taille est définie par l'arrangement des sous-unités protéiques entre elles. Cette construction de la capsid est assistée par des protéines d'assemblage qui sont ensuite éliminées. Cette deuxième stratégie concerne essentiellement les acides nucléiques bicaténaires qui sont introduits dans la capsid grâce à des protéines dites motrices.

Tableau 1. 2 : Liaisons faibles mises en jeu dans les systèmes biologiques (2)

Liaisons faibles (2)
<p>Interactions électrostatiques : Les liaisons électrostatiques concernent deux atomes présentant une densité de charges opposées. Si les liaisons hydrogènes sont de nature électrostatique, il en existe d'autres types de force variable.</p> <p><u>Interactions ioniques :</u> Ces interactions concernent les espèces présentant une charge nette opposée. Leur force dépend de la distance séparant le site cationique du site anionique. De nombreuses molécules possèdent des groupements ioniques avec des unités anioniques et cationiques. Par exemple les oligonucléotides possèdent des groupements phosphates chargés négativement qui peuvent interagir avec les groupements cationiques de certains acides aminés d'une protéine. Si ces groupements sont généralement neutralisés par des groupements voisins de charge opposées, des forces électrostatiques se créent néanmoins entre ces groupements de charges opposées. L'énergie de liaison de telles interactions en solution aqueuse est de l'ordre de 5 kcal.mol⁻¹.</p> <p><u>Interactions de van der Waals :</u> Les forces de van der Waals viennent de l'attraction non spécifique de deux atomes proches l'un de l'autre. Elles se produisent entre tout type de molécules, polaires comme apolaires et sont la somme de trois types d'interaction : les interactions dipôle-dipôle (force de Keesom), les interactions dipôle-dipôle induit (forces de Debye) et les interactions dipôle induit-dipôle induit (force de London). Ces forces sont généralement très faibles. Les forces de van der Waals mises en jeu pour deux atomes de taille moyenne sont d'environ 1 kcal.mol⁻¹. Ces forces sont efficaces lorsqu'elles sont nombreuses entre deux molécules. Ainsi, deux paramètres gouvernent la force de ces interactions : la complémentarité électrostatique et stérique (la surface de contact entre deux molécules est, par exemple, plus grande lorsqu'elles s'emboitent).</p>
<p>Interactions π : un dernier type de liaison faible existe, il s'agit des interactions π. Ces liaisons ont lieu en présence de groupements riches en électrons π (alcènes, alcynes, aromatiques). Lorsque deux groupements de ce type sont proches l'un de l'autre, un recouvrement orbitalaire a lieu permettant une délocalisation des électrons. On parle alors de « π-stacking ». D'autres types d'interactions π, entre des systèmes π-conjugués et espèces polarisées, existent : les interactions π-cation, les interactions π-anion et les interactions C-H-π. Les interactions π ont une énergie de liaison de l'ordre de 1-20 kcal.mol⁻¹.</p>

1.2.2.3. Exemple de la formation du virus de la mosaïque du tabac (TMV)

Comme nous l'avons vu précédemment, la formation de la nucléocapside d'un virus peut se décomposer en deux parties réalisées de manière concertée ou séparée. La première est la formation de la capsid, essentiellement gouvernée par des interactions hydrophobes ; la seconde est l'assemblage de la capsid et du génome essentiellement dirigé par des interactions électrostatiques. Afin d'illustrer la formation des virus nous allons prendre l'exemple du TMV dont la nucléocapside se forme de manière concertée.

Le TMV est un virus composé d'un ARN monocaténaire et d'une capsid tubulaire à symétrie hélicoïdale. La sous-unité capsidiale du TMV est une protéine repliée selon un empilement compact de quatre hélices α . Les protéines de la capsid peuvent s'assembler ensemble même en l'absence de l'ARN. Seules, elles ne peuvent cependant pas former l'hélice caractéristique du virus, mais seulement un disque composé de deux anneaux, chacun constitué de 17 sous-unités protéiques. Néanmoins l'empilement de deux disques n'est pas favorisé par leur manque de complémentarité géométrique. L'introduction d'un ARN viral à l'intérieur d'un de ces disques permet un réarrangement de celui-ci, et transforme les deux anneaux du disque en courte hélice. Cette étape est la plus coûteuse en énergie. Il s'agit de l'étape de nucléation abordée précédemment. L'assemblage d'un deuxième disque protéique est alors favorisé, et permet une élongation rapide et énergétiquement favorable (Figure 1. 9. a).³¹ En chimie supramoléculaire, on appelle ce phénomène la coopérativité positive. L'empilement des anneaux se poursuit alors (élongation) jusqu'à recouvrement complet du génome du TMV formant un bâtonnet rigide composé de 2130 protéines identiques, de 300 nm de long et 18 nm de diamètre (Figure 1. 9. b).

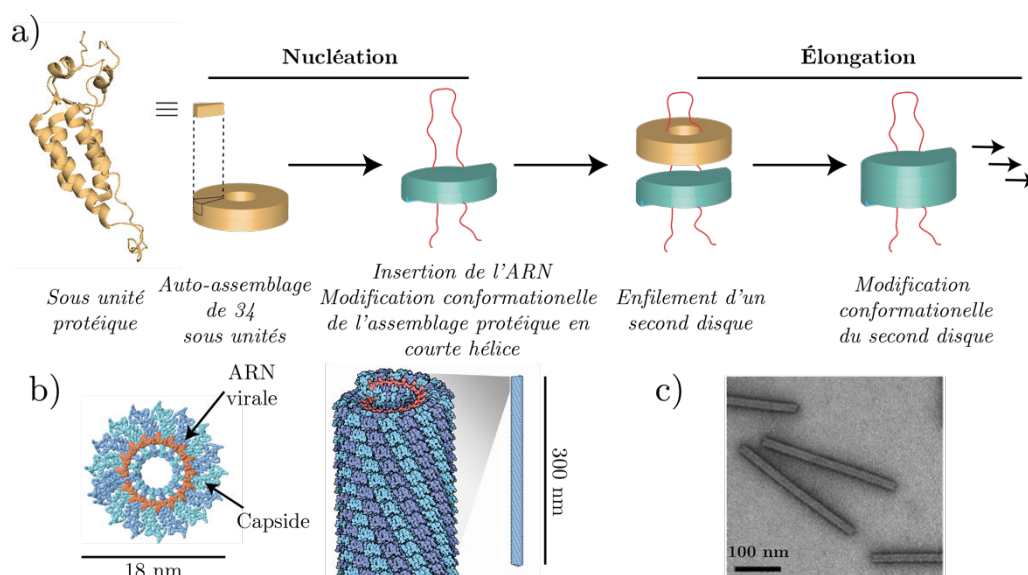


Figure 1. 9 : a) Etapes d'assemblage du virus. b) Structure du TMV. c) Micrographie de microscopie de transmission (révélation négative).³²

Les interactions entre l'ARN et les sous-unités protéiques, permettant le réarrangement conformationnel des disques, sont multiples. Des liaisons hydrogènes, des interactions de van der Waals et des liaisons de type CH- π ont été mises en évidence entre les guanines de l'ARN et certains acides aminés des sous-unités protéiques.³³⁻³⁵ D'autres liaisons

hydrogènes ont été identifiées entre la fonction hydroxyle des riboses de l'ARN et les acides aminés des protéines. Enfin des interactions de type ionique existent entre les résidus chargés (arginines, lysines) de la sous-unité protéique et les groupements phosphate de l'ARN.

1.2.3. Mode de transfection des virus

Les virus ont développé de performantes stratégies pour pénétrer les cellules hôtes, libérer leur matériel génétique et finalement les infecter. Pour l'élaboration de vecteurs de siRNA, le but est de les libérer dans le cytoplasme cellulaire. Par conséquent nous ne nous intéresserons qu'aux premières étapes de l'infection d'une cellule, à savoir : l'attachement, la pénétration, l'échappement endosomal et la libération du matériel génétique (Figure 1. 10).

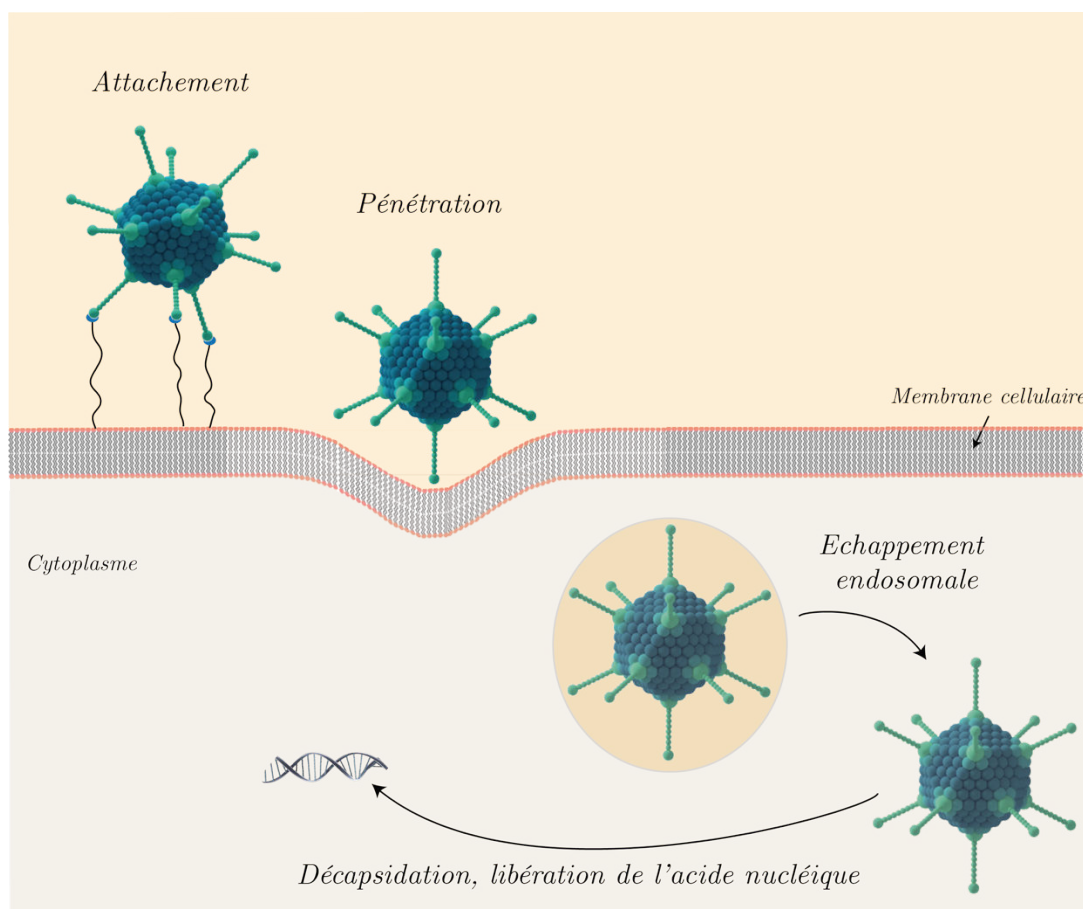


Figure 1. 10 : Les différentes étapes du mode de transfection des virus

1.2.3.1. Attachement

L'attachement du virus à la cellule hôte est la première étape de son infection et est par conséquent déterminante. Elle consiste en une interaction très spécifique entre la surface de la particule virale et celle de la cellule. Elle met en jeu la rencontre de deux zones conformationnelles, virale et cellulaire, présentant une affinité élevée l'une envers l'autre. Plusieurs facteurs entrent en compte et définissent l'efficacité de l'attachement comme le nombre de récepteurs à la surface de la cellule ou la concentration relative des espèces (virus, cellules), bien qu'une seule particule virale soit suffisante pour infecter une cellule.

L'attraction initiale entre la surface du virus et celle de la cellule se produit par des interactions de nature électrostatique. Qu'il s'agisse de virus enveloppés ou de virus nus, leurs surfaces disposent, de manière régulière, de sites d'attache-ments. Il s'agit de protéines ou de glycoprotéines, capables d'interagir avec les récepteurs cellulaires (protéines, glycoprotéines ou oligosaccharides). Ces récepteurs cellulaires ont, en réalité, de véritables fonctions physiologiques. Cela laisse penser que les virus, au cours de leur évolution, se sont adaptés à ces molécules de surface pour accroître leur efficacité de transfection. Toujours afin d'améliorer l'attachement des particules virales à la surface cellulaire, les virus emploient une stratégie dite multivalente.²⁵ On définit la multivalence comme la liaison de deux entités (ou plus) impliquant l'interaction simultanée de multiples fonctions complémentaires (Figure 1. 11).³⁶ Ainsi, la multiplication des ligands à la surface des particules virales permet l'attachement d'un virus à plusieurs récepteurs de la même cellule. Le nombre de sites d'attachement est variable à la surface d'un virus, allant de 12 à plus de 1000.³⁷

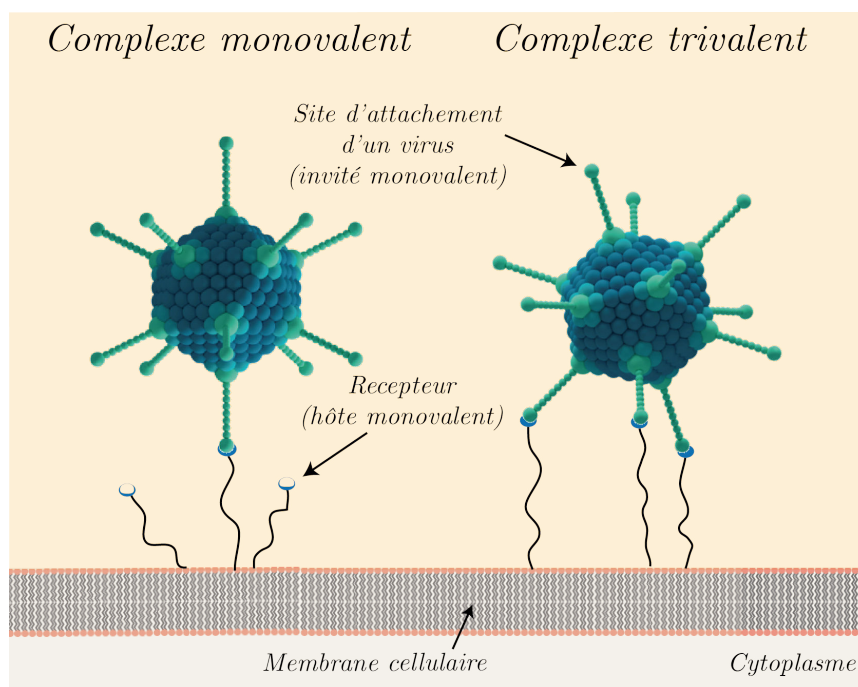


Figure 1. 11 : Notion de multivalence

Par ailleurs, les virus ciblent certains types de cellules en fonction des récepteurs qu'elles portent. Ils infectent donc certains tissus de manière spécifique. Par exemple, le virus du VIH expose en surface une glycoprotéine appelée GP120 qui présente une affinité particulière pour les récepteurs CD4 surexprimés à la surface de certains lymphocytes T. On appelle ce phénomène le tropisme viral.

Certains anticorps, destinés à prévenir l'infection virale interviennent généralement lors de l'étape d'attachement. Ces anticorps, qualifiés de neutralisants, se fixent sur les sites d'attachement viraux et préviennent ainsi leur interaction avec la surface cellulaire. Les vaccins induisent majoritairement la production d'anticorps neutralisants.

1.2.3.2. Pénétration

Immédiatement après la fixation de la particule virale sur la cellule hôte, le virus pénètre dans le cytoplasme de la cellule. Cette étape nécessite, à l'inverse de l'étape d'attachement, un apport d'énergie. Il existe deux grandes voies d'internalisation cellulaire : l'internalisation par endocytose, et l'internalisation par fusion cellulaire. La première est la voie utilisée par la majorité des virus. Il s'agit d'un processus naturel qui permet aux cellules d'absorber les molécules, attachées à leurs surfaces et nécessaires à leur développement. Cette méthode d'internalisation présente de nombreux avantages : l'endosome permet une internalisation rapide jusqu'à la région périnucléaire ; l'acidité des endosomes facilite l'échappement endosomal ; l'internalisation par endocytose induit une faible réponse immunitaire.³⁸ Il existe plusieurs modes d'internalisation par endocytose, les principaux utilisés par les virus sont les suivants :

- L'endocytose clathrine-dépendante, permet l'internalisation rapide de virus sous forme de vésicules enduites de protéines appelées clathrine.³⁹
- L'endocytose par cavéoles, consiste en l'invagination de la membrane plasmique. Celle-ci forme alors une vésicule dirigée vers le réticulum endoplasmique où un certain nombre d'enzymes faciliteront le désassemblage du virus.
- La macropinocytose permet l'internalisation de macromolécules *via* la formation de vésicules de taille plus importante.⁴⁰

Par ailleurs, certains virus enveloppés peuvent grâce à leur enveloppe lipidique fusionner directement avec la membrane plasmique. Pour permettre cette fusion, les virus tirent parti de la présence de protéines de fusion à leurs surfaces. Ces peptides, ancrés dans l'enveloppe lipidique virale, sont essentiels à l'internalisation par fusion cellulaire.⁴¹ Certains virus peuvent être internalisés par endocytose ou par fusion cellulaire à l'image de l'herpès simplex ou du virus du VIH.

Le mode d'internalisation des virus dépend de plusieurs paramètres physiques. La taille des virus ne peut dépasser la taille des vésicules formées par endocytose : 30-200 nm dans le cas l'endocytose clathrine-dépendante, 60-80 nm dans le cas de l'endocytose par cavéoles, et jusqu'à 10 μ m pour la macropinocytose.^{40,42} La forme des virus est une autre propriété physique déterminante dans le choix du mode d'internalisation des virus. Par exemple, les virus de la grippe présentent une capsid de symétrie hélicoïdale de forme variable, allant de particules plutôt sphériques à des particules filamenteuses. Il a été montré que l'internalisation de ce virus se faisait par endocytose clathrine-dépendante dans le cas de particules sphériques, et par macropinocytose dans le cas de particules filamenteuses.⁴³

Les phases d'attachement et de pénétration sont parfois difficilement discernables et font intervenir des protéines qui jouent un rôle dans ces deux phases. Par exemple, les intégrines sont des protéines transmembranaires, jouant un rôle important aussi bien dans l'attachement, que dans le mécanisme de signalisation cellulaire déclenchant l'endocytose de certains virus (herpèsvirus, hantavirus, picornavirus).^{44,45}

1.2.3.3. Échappement endosomal

La plupart des virus pénètrent par endocytose. Les endosomes ainsi formés subissent alors une chute progressive du pH allant de neutre à 6-6,5 puis tendant vers 5-6 dans les endosomes tardifs. Afin d'éviter la dégradation des virus, les particules virales doivent quitter l'endosome pour rejoindre le cytoplasme cellulaire. Les virus utilisent des protéines virales, sensibles à cette variation de pH pour s'extraire de l'endosome. Pour les virus enveloppés, il s'agit de protéines fusiogéniques, qui permettent la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome, libérant ainsi la nucléocapside dans le cytoplasme. Dans le cas des virus nus, il y a généralement translocation directe de la nucléocapside à travers les pores de la membrane endosomale induite par des protéines lytiques.⁴⁶

La décapsidation des virus a ensuite généralement lieu dans le cytoplasme. Ce phénomène reste encore peu connu et il est parfois difficile de le distinguer de l'attachement ou de la pénétration.

Comme nous venons de le voir, le mode de transfection des virus est complexe et nécessite souvent la présence de ligands de type protéique. L'utilisation de telles molécules est extrêmement intéressante dans l'élaboration de vecteurs non viraux. Quelques protéines couramment utilisées dans la mise au point d'agent de transfection sont présentées dans le [Tableau 1. 3.](#)²⁵

Tableau 1. 3 : Exemples représentatifs de peptides utilisés dans l'élaboration de vecteurs non viraux²⁵

Origine et nom du peptide	Séquence
Peptide de ciblage	
RV Glycoprotéine	YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNG
Peptide d'attachement	
HIV-1 TAT (48-60)	GRKKRRQRRRPPQ
HSV-1 VP22 peptide	NAKTRRHERRRKLAIER
Peptide fusiogénique ou lytique	
IV HA-2	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG
IV HA-dérivé E5CA	GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGCA
HSV Glycoprotéine H	GLASTLTRWAHYNALIRAF
IV diIN-7	GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYGC
Peptide de condensation d'acide nucléique	
ADV peptide centrale mu	MRRAHRRRRRASHRR MRGG

Pour certains virus (majoritairement les virus à ARN) la transfection du matériel génétique s'arrête lors de la libération du génome viral dans le cytoplasme. Pour les autres (principalement les virus à ADN), plusieurs étapes restent encore à franchir afin de délivrer le génome viral dans le noyau de la cellule. Tout d'abord, la nucléocapside doit être transportée à travers la cellule jusqu'au noyau. Les endosomes servent alors de transporteurs, et conduisent les virus le long des microtubules jusqu'au noyau. Enfin, pour pénétrer le noyau cellulaire, les virus nucléaires peuvent soit pénétrer à travers les pores du noyau si leur taille le leur permet, soit profiter de la division cellulaire, soit utiliser des protéines virales. Néanmoins, la thérapie antisens, à laquelle nous nous attachons dans ce projet, nécessite la mise au point de vecteur atteignant le cytoplasme. Les critères permettant aux virus de rejoindre le noyau cellulaire, nous importent alors peu. Par conséquent nous ne les détaillerons pas ici.

1.3. Les agents de transfection de siRNA

1.3.1. Les vecteurs viraux de siRNA

Comme nous l'avons vu, les virus, de par leur longue évolution et leur tropisme cellulaire, semblent être devenus des outils particulièrement adaptés à la transfection de matériel génétique. Ils ont donc logiquement été les premiers vecteurs développés. Encore beaucoup utilisés en thérapie génique classique, ils sont à priori capables d'amener dans de multiples cellules des siRNA, ou des gènes permettant leur expression. Durant les quarante dernières années, les techniques permettant la mise au point de vecteurs viraux se sont améliorées afin de produire des virus recombinants. Ces virus modifiés ne possèdent ni les caractéristiques pathogènes ni la capacité de reproduction des virus sauvages, ils gardent néanmoins les propriétés exceptionnelles des virus pour franchir les différentes barrières biologiques. Par ailleurs, la modification de la structure virale et le choix de bons promoteurs viraux, permettent à ce type de vecteurs d'être particulièrement spécifique quant aux cellules et tissus visés. Nous allons voir brièvement les différentes stratégies existantes pour la mise au point de vecteurs viraux.

1.3.1.1. *Rétrovirus/Lentivirus*

Les rétrovirus, portent à l'état sauvage un ARN double brin et une rétrotranscriptase permettant la transcription de l'ARN en ADN proviral. Ils sont impliqués dans diverses pathologies graves comme les leucémies et le SIDA. Une fois modifiés par génie génétique en virus recombinants, ils deviennent des outils de transfection très efficaces. Néanmoins la rétrotranscriptase que portent ces virus est connue pour générer de nombreuses mutations dans le génome transcrit. Si ces erreurs font la force d'un virus comme le VIH, elles deviennent un véritable problème dans le cas de vecteurs thérapeutiques. En effet, elles peuvent engendrer une mutagenèse conduisant à des anomalies cellulaires, et activer des oncogènes. Pour ces raisons, ce type de virus recombinants est essentiellement utilisé pour des applications *in vitro*.⁴⁷

1.3.1.2. *Adénovirus*

Les adénovirus sont responsables de maladies relativement bénignes chez l'homme (conjonctivites, gastroentérites). La faible pathogénicité et leur bonne efficacité de transfection font des adénovirus recombinants de bons vecteurs viraux. Ce type de virus n'intègre pas son génome viral à celui de la cellule hôte, évitant ainsi les mutagenèses. Ils sont par ailleurs faciles à purifier et à obtenir en grande quantité. Néanmoins leur utilisation déclenche une forte réponse immunitaire entraînant la production d'anticorps neutralisants et empêchant l'administration répétée de ce type de vecteur viral.⁴⁷

1.3.1.3. *Virus adéno-associé*

Les virus adéno-associés sont non pathogènes pour l'homme. De plus, les vecteurs viraux construits *via* ce type de virus recombinants ne sont pas intégratifs, et présentent peu de risque de mutation génique. Très efficace, ce type de vecteurs est aujourd'hui considéré comme le meilleur candidat viral pour des applications de transfection. Néanmoins les virus adéno-associés déclenchent aussi la production d'anticorps neutralisants et leur production est coûteuse.⁴⁷

Les vecteurs viraux souffrent de deux inconvénients majeurs : l'intégration d'un exogène de grand taille est complexe et déclenche d'importantes réactions immunitaires⁴⁸ et de carcinogénèses.⁴⁹ Par ailleurs, le développement de tels médicaments à l'échelle industrielle est difficile et très coûteux.⁵⁰ Pour toutes ces raisons, ils ont aujourd'hui été délaissés au profit des vecteurs de siRNA synthétiques qui cherchent à imiter les virus mais de manière artificielle.⁵¹ Ils sont néanmoins encore utilisés pour des applications *in vitro*, et présentent toujours un espoir thérapeutique *via* la transfection de shRNA (« small hairpin RNA ») ou de snRNA (« small nuclear RNA »).^{47,51}

1.3.2. Vecteurs synthétiques de siRNA

1.3.2.1. *Contraintes biologiques et défis à relever pour l'utilisation de siRNA*

L'élaboration de vecteurs synthétiques de siRNA fait face à de nombreux obstacles. Les siRNA sont de trop petites molécules pour éviter la clairance rénale, mais elles sont trop larges pour leur permettre d'entrer simplement par diffusion à travers la membrane d'une cellule. Par ailleurs ce sont des molécules polyanioniques et donc très hydrophiles, qui sont facilement dégradables par des enzymes appelées nucléases. Par conséquent, la mise au point de tels systèmes permettant une transfection efficace des siRNA est difficile et, de l'administration à l'internalisation cellulaire, de nombreuses barrières sont à franchir.

Barrières biologiques et solutions

Les barrières biologiques à franchir *in vivo* et les solutions correspondantes pour l'élaboration de vecteurs synthétiques sont présentées dans le **Tableau 1. 4** et la **Figure 1. 12**.

Tableau 1. 4 : Barrières biologiques à franchir et solutions correspondantes

Approche	Description
1. Administration	
<ul style="list-style-type: none"> - Administration parentérale - Application topicale 	Les siRNA sont fragiles. Afin de minimiser le nombre de barrières biologiques à franchir, une administration parentérale (intraveineuse, intramusculaire, sous cutanée, intradermique) ou une application topicale (sur la peau ou les muqueuse) est indiquée.
2. Clairance rénal	
<ul style="list-style-type: none"> - PEGylation - Conjugaison à des molécules de cholestérol - Nanoparticules 	Afin d'éviter la clairance rénale, la taille minimum des agents de transfection de siRNA doit être supérieure à 20 nm. Les siRNA nus sont directement évacués par clairance rénale. La conjugaison des siRNA avec des motifs PEGylés ou de molécules lipidiques permet d'augmenter leur taille, et améliore le temps de circulation de ces espèces. La taille des nanoparticules permet aussi d'éviter la clairance rénale.
3. Dégradation par les nucléases	
<ul style="list-style-type: none"> - Modification chimique des siRNA - Nanoparticules 	Les siRNA sont sensibles en circulation à certaines enzymes appelées nucléases. ⁵² La modification chimique du squelette des siRNA permet d'éviter leur dégradation (stratégie développée <i>vide infra</i>). La formulation de nanoparticules permet aussi d'éviter l'exposition des siRNA, et donc de les protéger.
4. Immunostimulation	
<ul style="list-style-type: none"> - Modification chimique des siRNA - PEGylation - Nanoparticules 	Les siRNA peuvent être reconnus par le système immunitaire, induisant la production de cytokines et donc une réponse inflammatoire. ⁵³ Une modification chimique du squelette des siRNA permet d'éviter cette reconnaissance. La protection des siRNA permet aussi d'éviter l'immunostimulation, à condition que l'agent de transfection lui-même n'induit pas de réponse immunitaire. La fonctionnalisation des agents de transfection, par des motifs pégylés, permet aussi de limiter les interactions non spécifiques, notamment avec les cellules du système immunitaire. ⁵⁴
5. Extravasation	
<ul style="list-style-type: none"> - Cibler les tissus comportant une bonne porosité vasculaire - Transcytose endothéliale 	Afin d'atteindre les cellules ciblées, les agents de transfection de siRNA doivent s'extraire des vaisseaux sanguins (extravasation). Pour cela, la taille des particules doit être limitée (inférieure à 100-200 nm en fonction des tissus ciblés). Les tissus les plus facilement atteignables sont ceux présentant une bonne porosité vasculaire (foie, rate, tumeur solide ⁵³) ou tout simplement les cellules endothéliales ou sanguines.
6. Internalisation cellulaire	
<ul style="list-style-type: none"> - Ligands - Surface cationique des particules 	La fonctionnalisation des agents de transfection permet d'améliorer l'internalisation cellulaire. Les plus utilisés sont les aptamères, les anticorps, les CPP (« Cell Penetrating Peptides », peptides pénétrants), ou les lipides comme les molécules de cholestérol. ^{22,54,55} Par ailleurs, l'écrantage des charges anioniques par des espèces cationiques permet la formation de particules dont la surface est globalement cationique. Ces particules sont alors capables d'interagir avec les portoglycane de la membrane cellulaire induisant l'internalisation cellulaire. ⁵⁶
7. Echappement endosomal	
<ul style="list-style-type: none"> - Amines déstabilisant la membrane endosomale - Accumulation endosomale 	La principale méthode pour permettre l'échappement endosomal consiste à inclure, au sein des agents de transfection, des amines protonables dans l'endosome (généralement des amines tertiaires). ^{57,58} Néanmoins, même si l'échappement endosomal d'un système est peu efficace, cela peut suffire pour induire une bonne interférence par ARN. En effet, la présence de quelques centaines de siRNA dans le cytoplasme sont suffisants pour induire une totale inhibition de l'expression génique. ²²

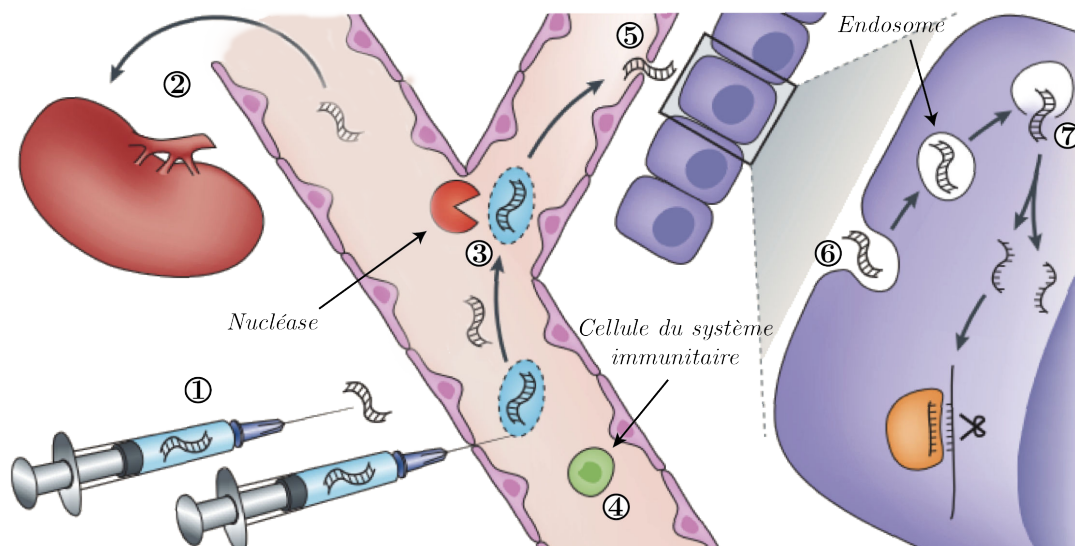


Figure 1. 12 : Barrières biologiques à franchir. 1 : Administration. 2 : Clairance Rénale. 3 : Dégradation par les nucléases. 4 : Immunostimulation. 5 : Extravasation. 6 : Internalisation cellulaire. 7 : Echappement endosomal. Figure adaptée.²²

Modifications chimiques du squelette des siRNA et conception de la séquence

Comme nous venons de le voir, une méthode couramment employée pour s'affranchir d'un certain nombre de problèmes dans la transfection de siRNA est leur modification chimique. Cette méthode est pratiquement toujours employée mis à part dans le cas des liposomes ou des polyplexes. En effet, les particules formées dans ces deux derniers cas permettent de protéger les siRNA et de ne pas les exposer aux différentes molécules et cellules présentes en circulation. L'utilisation de siRNA modifiés chimiquement est cependant indispensable pour les systèmes siRNA-conjugués.

L'incorporation de modifications 2'-O-méthyle sur l'unité de sucre des siRNA permet, par exemple, de réduire l'immunostimulation déclenchée par les siRNA non modifiés et leur confère aussi une bonne résistance aux nucléases.⁵³ Le remplacement des liaisons phosphodiester classiques par des liaisons phosphorothioates, ou l'incorporation d'un fluor en 2' à la place de la fonction hydroxyle améliore la résistance des siRNA aux nucléases.⁵³ Enfin, la modification de la structure même de l'unité de sucre, *via* l'incorporation de LNA pour « locked nucleic acids » ou de UNA pour « Unlocked nucleic acids », permet aussi d'empêcher la dégradation des siRNA par les nucléases (Figure 1. 13).⁵³

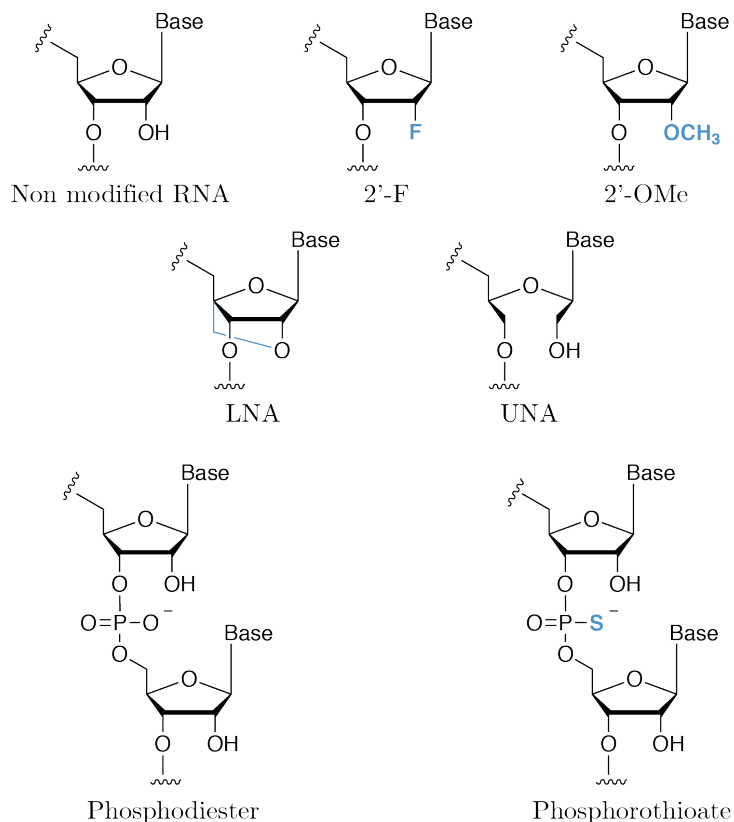


Figure 1. 13 : Modifications chimiques usuelles du squelette des siRNA

Un autre obstacle à l'utilisation des siRNA comme médicament est l'effet « off-target ». On parle d'effet « off-target » lorsqu'un autre ARNm est atteint par RISC. Deux raisons peuvent être responsables de cet effet :

- La sélection du mauvais brin du siRNA (brin passager) lors de la formation du RISC conduit à l'inhibition du mauvais gène
- Une complémentarité partielle avec un ARNm non ciblé peut affecter partiellement son expression.

L'effet « off-target » s'accompagne généralement de toxicité. Il est possible de s'en affranchir grâce aux modifications chimiques des siRNA et au choix de la séquence. Le choix du brin guide par rapport au brin passager lors de la formation du RISC dépend de l'asymétrie des deux brins. En effet, la stabilité thermodynamique des duplexes terminaux en 5' est déterminante : le brin présentant la plus faible stabilité d'hybridation en 5' sera sélectionné pour être le brin guide. L'effet « off-target » peut donc être limité en augmentant l'asymétrie des deux brins, et en choisissant une séquence favorisant le choix du bon brin pour former RISC. La modification chimique du brin passager pour le rendre inapte à être transféré au sein du RISC, permet aussi d'éviter l'effet off-target.⁵⁹

En conclusion, l'élaboration d'un agent de transfection de siRNA synthétiques passe par l'anticipation des barrières biologiques à franchir mais aussi par la minimisation de la toxicité potentielle du système (effet « off-target », immunostimulation, et biocompatibilité de l'agent de transfection).

1.3.2.2. *Polymères polycationiques*

L'utilisation de polymères comme vecteurs synthétiques de siRNA a été beaucoup étudiée. Les polymères ont l'avantage d'avoir des propriétés physico-chimiques diverses et bien caractérisées, ainsi que des structures flexibles et optimisables facilement par modifications chimiques.⁶⁰ Les polymères polycationiques sont connus pour leur capacité à condenser ou complexer les acides nucléiques *via* des interactions électrostatiques. Les polyplexes ainsi formés permettent la protection des siRNA de la dégradation enzymatique. Les paramètres caractérisant ces polymères doivent être finement étudiés et optimisés pour permettre une transfection efficace : masse moléculaire, densité de charges, structure des chaînes secondaires, hydrophobie, ratio siRNA-polymères. Ces polyplexes cationiques sont capables de s'attacher à la surface anionique de la membrane cellulaire et de pénétrer par endocytose non spécifique.⁶¹ Par ailleurs, ces polyplexes comportent généralement diverses fonctions amines, jouant le rôle de tampon, qui facilitent l'échappement endosomal.

L'exemple le plus connu des polymères polycationiques est le PEI (polyéthylèneimine), couramment utilisé pour la transfection d'acides nucléiques.⁶² L'utilisation de PEI branchés avec des masses moléculaires élevées est indiquée pour la transfection de siRNA. Plusieurs autres polymères sont couramment utilisés pour la transfection de siRNA comme les dendrimères de polyamidoamine (PAMAM), les polypropylenimines (PPI), les poly(L-lysine) (PLL), ou les chitosanes (**Figure 1. 14**).⁶³ Une importante toxicité est cependant observée avec ce type de vecteurs. Il est présumé que leur caractère polymérique et cationique augmente la perméabilité de la membrane cellulaire par la formation de pores nanométriques conduisant à une forte cytotoxicité. Par ailleurs, ces espèces cationiques peuvent former des agrégats en complexant certaines protéines dans les fluides biologiques (sang, liquide interstitiel, sécrétions), ce qui affecte grandement leur circulation et leur biodistribution.⁶⁴ De plus, l'interaction de ces polymères cationiques avec des protéines, comme l'immunoglobine ou celle du système du complément, entraîne leur reconnaissance par le système phagocytaire et donc leur clairance rénale.⁶⁴

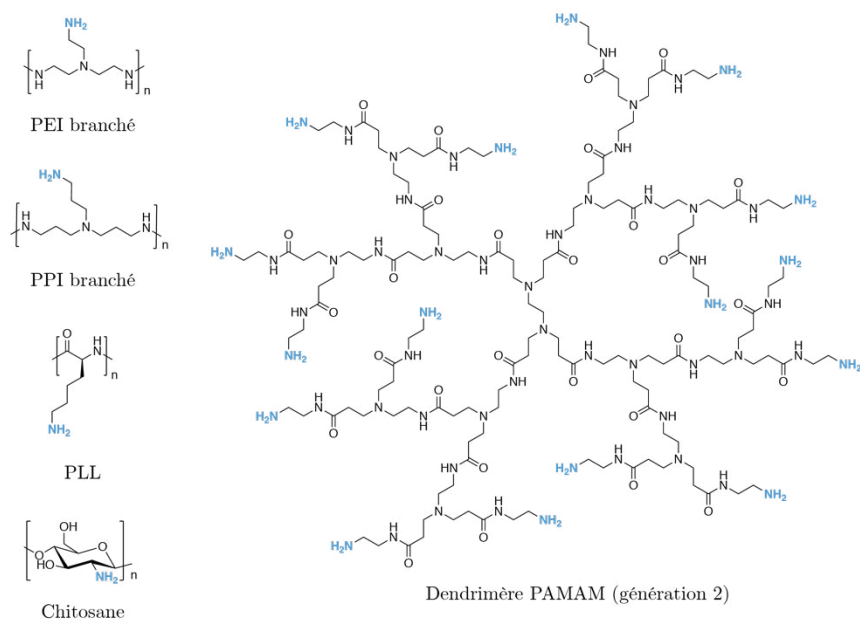


Figure 1. 14 : Structure chimique de différents polymères polycationiques usuels

Pour toutes ces raisons, alors que ces vecteurs de siRNA ont montré une bonne efficacité *in vitro*, leur application *in vivo* s'est vite heurtée aux problèmes de toxicité. Néanmoins, la fonctionnalisation de ces polymères par des motifs PEGylés a permis de réduire les interactions non spécifiques avec les protéines présentes en circulation.⁶⁵ Guo *et al.* ont développé un conjugué amphiphile de poly-L-lysine-acide cholique PEGylé sensible au pH. Le squelette polymérique de ce système est lié à des PEG via un bras imine benzoïque stable à pH physiologique mais clivable dans l'endosome. De cette manière les cations sont masqués par les chaînes PEGylées en circulation mais sont exposés dans l'endosome. Cela permet le relargage des siRNA dans le cytoplasme (Figure 1. 15. a).⁶⁶ Felber *et al.* ont aussi décrit un complexe sensible au pH composé de deux polymères : un dendrimère PAMAM, et un polymère anionique constitué de carboxylates. Une fois internalisé dans l'endosome, les carboxylates sont protonnés, ce qui permet le désassemblage du complexe et libère ainsi les siRNA.⁶⁷ Le groupe de Kataoka a développé de son côté des dérivés de poly(aspartamide), présentant des chaînes secondaires de 1,2-diaminoéthane. Les chaînes secondaires adoptent d'abord un état mono-protonné à pH physiologique et diprotonné lors de l'acidification dans l'endosome provoquant l'échappement endosomal (Figure 1. 15. b).⁶⁸

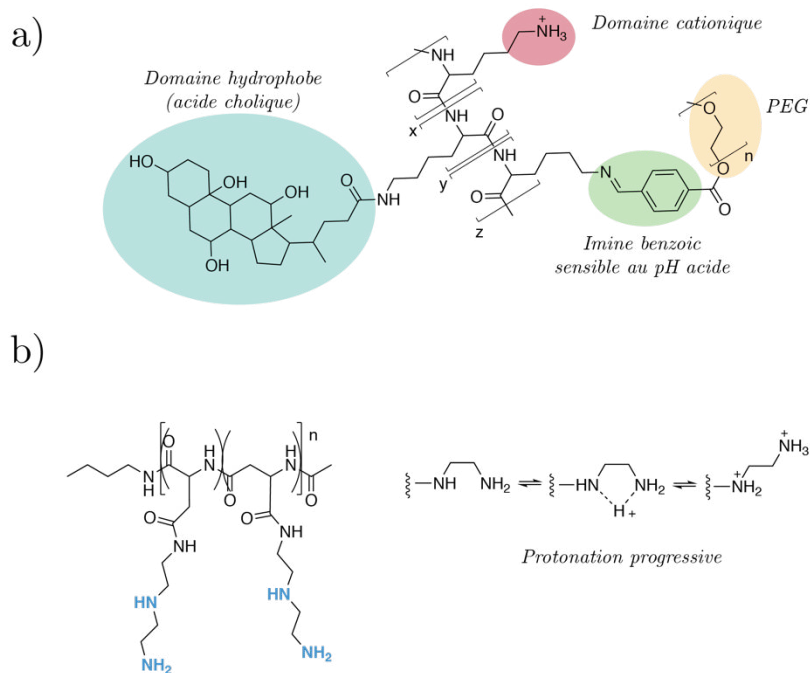


Figure 1. 15 : a) Structure chimique du PLL-acide cholique PEGylés sensible au pH développé par Guo *et al.* b) Système développé par Kataoka *et al.*

1.3.2.3. Liposomes

Les liposomes sont des vésicules formées de manière artificielle constituée d'une bicouche lipidique. Cette bicouche lipidique est formée par des lipides amphiphiles, composés d'une tête hydrophile et d'une queue hydrophobe. La structure ainsi formée est soluble dans l'eau mais permet d'enfermer en son cœur des molécules hydrophiles. Les liposomes sont par conséquent adaptés à la protection des siRNA en circulation. De nombreuses études ont été réalisées afin de permettre aux liposomes de devenir des agents de transfection de siRNA. Ces études ont montré la nécessité de former des liposomes sophistiqués, composés de plusieurs types de molécules comme des lipides cationiques ou ionisables, des lipides PEGylés, des molécules de cholestérol et des ligands (Figure 1. 16). L'élaboration de tels liposomes a donné de premiers résultats probants en 2006 lors d'études précliniques.⁶⁹

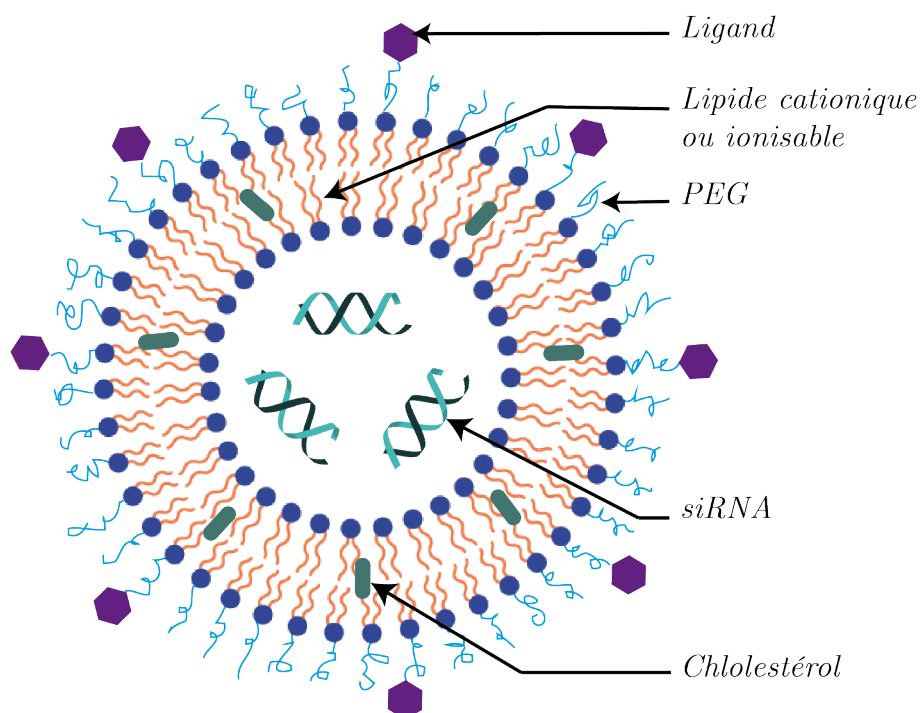


Figure 1. 16 : Structure simplifiée d'un liposome pour la transfection de siRNA

Lipides

La plupart des liposomes utilisés pour la transfection de siRNA sont composés de lipides cationiques ou ionisables. Les charges positives de ces lipides servent à complexer les siRNA, à permettre l'attachement du liposome à la membrane cellulaire puis à l'internaliser et enfin à déclencher l'échappement endosomal. Plusieurs études ont néanmoins montré que les lipides présentant une charge positive nette étaient moins efficaces⁷⁰ et plus toxiques⁷¹ que les lipides ionisables. Ces derniers ne présentent pas de charges nettes en circulation, mais ils sont protonnés dans l'endosome, et permettent ainsi l'échappement endosomal. La structure des lipides ionisables a alors été étudiée afin d'identifier les lipides adaptés à la transfection de siRNA. La taille de la tête hydrophile et la forme de la queue hydrophobe ont notamment une importance quant à la stabilité des liposomes formés. Cette stabilité doit être ajustée finement pour induire une bonne résistance du liposome en circulation mais une déstabilisation aisée du liposome dans l'endosome. Ainsi la structure, la capacité d'ionisation des lipides et la stabilité des liposomes sont des paramètres essentiels pour la mise au point d'agents de transfection efficaces.⁵⁴ Plusieurs exemples de lipides ayant montrés une bonne efficacité sont présentés en [Figure 1. 17](#).

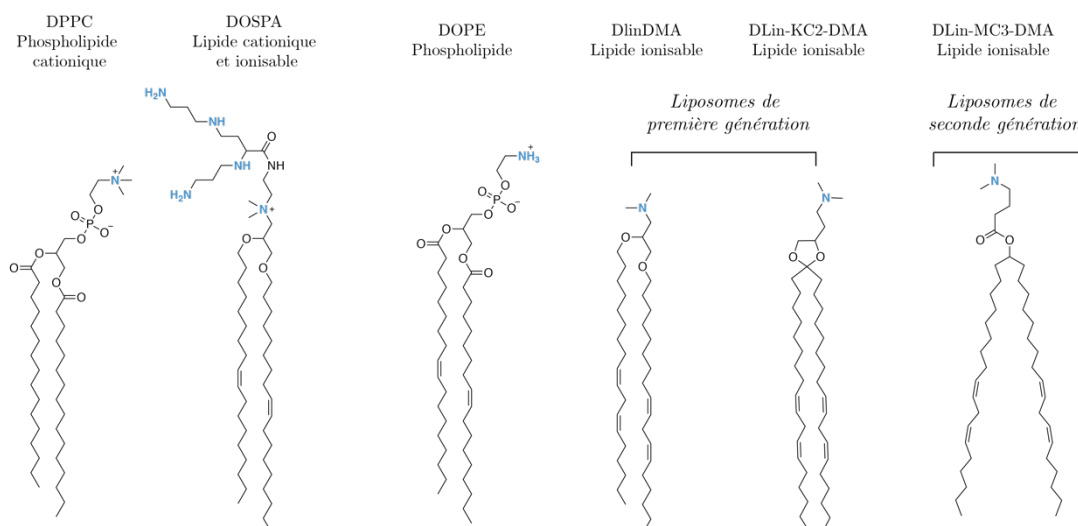


Figure 1. 17 : Quelques exemples de lipides usuels pour la formulation de liposomes de transfection de siRNA. DPPC : Dipalmitoylphosphatidylcholine ; DOSPA (+)-N,N-dimethyl-N-[2-(spermincarboxamido)ethyl]-2,3-bis(dioleoyloxy)-1-ropaniminium pentahydrochloride DOPE : dioleoylphosphatidylethanolamine ; Lipides pour la formulation des liposomes de première et de deuxième génération de type DLinDMA (1,2-dilinoleyloxy-3-diméthylaminopropane).

Afin d'allonger la durée de vie en circulation des liposomes, des lipides fonctionnalisés par des motifs PEGylés sont couramment utilisés. Les motifs PEG servent aussi à réduire la taille des particules formées, à prévenir de l'agrégation des liposomes avec des protéines présentes en circulation, et à éviter les interactions non spécifiques. Néanmoins les liposomes PEGylés sont moins efficaces car les PEG limitent les interactions avec les cellules ciblées et donc l'internalisation cellulaire. Ils préviennent aussi les interactions des liposomes avec la membrane de l'endosome et réduisent donc l'échappement endosomal. Afin de pallier ce dernier problème, la conjugaison des motifs PEG sur les lipides peut se faire via des liaisons clivables dans l'endosome comme les oximes.⁷² C'est généralement le mélange de plusieurs lipides qui permet d'obtenir un liposome avec les propriétés souhaitées.

Cholestérol

La plupart des formulations de liposomes contiennent des molécules de cholestérol qui viennent s'insérer dans la bicouche lipidique. Leur présence permet de moduler la stabilité du liposome, et donc sa résistance en circulation ainsi que sa capacité à libérer les siRNA une fois internalisés.⁷³

Ligands

Afin d'améliorer leur biodistribution, leur internalisation et leur tropisme, les liposomes peuvent être fonctionnalisés par divers ligands. Les ligands peuvent être endogènes, c'est à dire qu'ils se fixent sur le liposome une fois en circulation. Par exemple, les liposomes formulés avec le lipide DLin-KC2-DMA (Figure 1. 17) interagissent avec une lipoprotéine (ApoE), qui facilite ensuite leur internalisation.⁷⁴ L'utilisation de ligand exogène comme l'acide cholique, les folates ou les GalNAc est aussi possible.^{54,75}

Exemples

Le liposome le plus connu pour la transfection de siRNA est très certainement la lipofectamine[®]. Ce liposome cationique est constitué de deux lipides : DOSPA et DOPE (**Figure 1. 17**). Il est aujourd'hui commercialisé et très utilisé pour des applications *in vitro*.⁷⁶ Malheureusement son utilisation *in vivo* n'a pas conduit aux résultats espérés. Cela peut sans doute s'expliquer par l'absence de motif PEGylés, ce qui justifie sans doute la très bonne efficacité de la lipofectamine[®] *in vitro*.

Le liposome de première génération ALN-VSP développé par Alnylam Pharmaceuticals est lui composé des lipides zwitterioniques et ionisables DLin-DMA et DPPC (**Figure 1. 17**), d'un lipide PEGylé, de molécules de cholestérol, et de deux siRNA ciblant deux gènes différents.⁷⁷ Ce liposome a été étudié cliniquement jusqu'en phase I pour le traitement de tumeurs solides du foie.⁷⁸ Alnylam Pharmaceuticals a alors développé de nouveaux liposomes de deuxième génération constitués de lipides comme le DLin-MC3-DMA (**Figure 1. 17**). Ce liposome est actuellement en phase clinique III sous le nom de Patisiran pour le traitement de l'amylose de transthyréline.⁷⁹

1.3.2.4. Systèmes conjugués

L'élaboration de systèmes conjugués composés de siRNA toujours modifiés chimiquement et de ligands est l'approche qui a pour le moment montré les meilleurs résultats de transfection de siRNA. La conjugaison des siRNA et des ligands se fait généralement en 3' ou en 5' du brin sens du siRNA ou en 3' du brin antisens. En effet la position 5' du brin antisens doit être conservée intacte pour permettre sa reconnaissance lors de la formation du RISC.⁸⁰ Cette méthode permet ainsi l'obtention de molécules parfaitement définies et nécessite l'introduction d'un excès de molécules exogènes comme pour les autres méthodes. Les premiers conjugués testés *in vivo* étaient composés de molécules de cholestérol⁸¹ ou d'autres molécules lipophiles.^{80,82} Depuis de nombreux autres conjugués ont été mis au point constitués de divers ligands comme des polymères, des peptides, des anticorps, ou des aptamères.⁸⁰ Deux systèmes se sont néanmoins distingués et sont décrits ci-dessous.

Rozema *et al.* a développé un système dynamique composé d'un poly(vinyl-ether) conjugué d'un côté à des motifs PEG, et des ligands de type GalNAc (N-Acétylgalactosamine) *via* une liaison carboxy diméthylmaléique anhydride (CDM), et d'un autre côté à un siRNA modifié chimiquement *via* un pont disulfure. Une fois internalisés dans l'endosome, les ligands sont libérés formant un polymère polycationique qui facilite l'échappement endosomal. Les liaisons disulfures étant instables dans les milieux réducteurs comme le cytoplasme, le siRNA est à son tour libéré déclenchant ainsi l'interférence par ARN (**Figure 1. 18. a**).⁸³ Ce système a fait l'objet d'études précliniques au sein de l'entreprise Arrowhead.⁸⁴

La société Alnylam a développé un autre système conjugué en 3' du brin sens du siRNA avec un ligand trivalent composé de trois GalNAc. Ce type de ligand avait déjà montré un bon ciblage des hépatocytes.^{85,86} La multivalence des interactions ligands-récepteurs permet, de plus, d'améliorer grandement l'internalisation cellulaire.^{87,88} L'équipe de Rajeev et Manoharan de Alnylam Pharmaceuticals a ainsi montré que ce type de conjugué pouvait induire

efficacement l'interférence par ARN (Figure 1. 18. b).⁸⁹ Aujourd'hui de nombreux candidats sont en développement en études cliniques dont trois en phase III (cf chapitre 4).

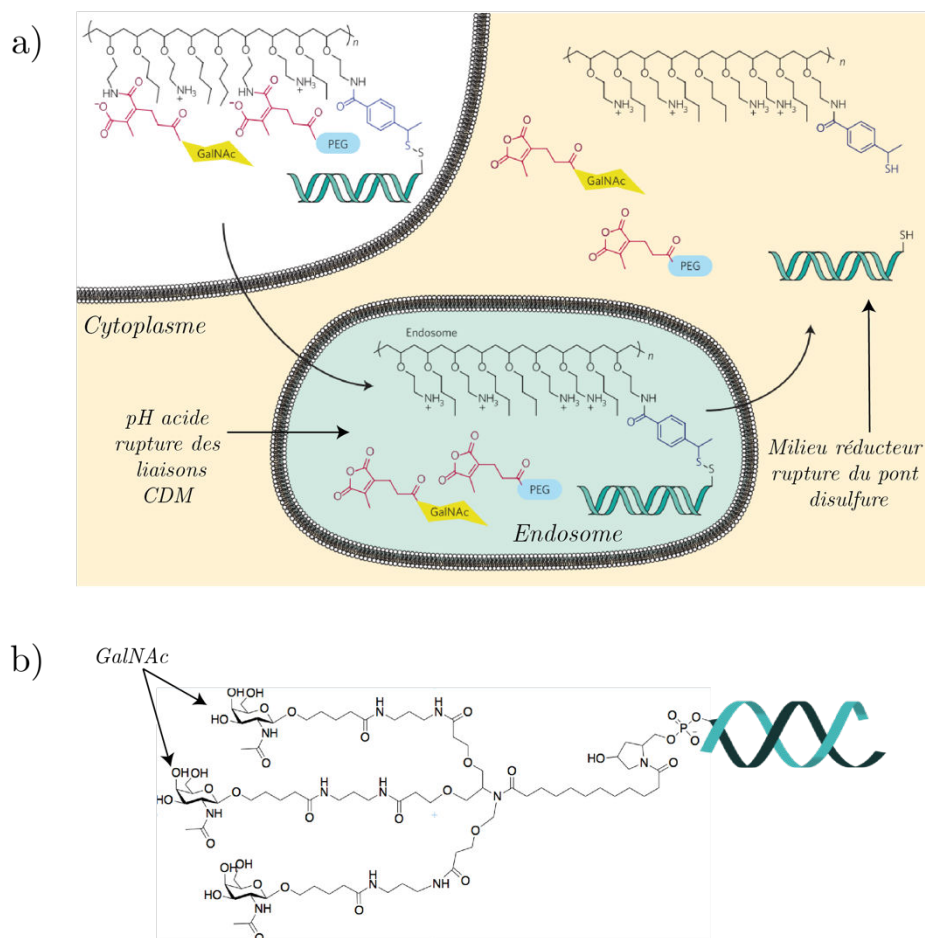


Figure 1. 18 : Exemples de systèmes conjugués. a) Système dynamique composé d'un siRNA conjugué à un polymère. Figure adaptée.⁵⁴ b) Système conjugué composé d'une ligand trivalent constitué de trois GalNAc.

1.3.2.5. Système à base de cyclodextrines

Afin de compléter cet aperçu des différents agents de transfection de siRNA décrit dans la littérature, nous allons aborder maintenant les systèmes composés de cyclodextrines. Comme nous le verrons en détail dans le chapitre 2, les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques en forme de cône, permettant l'accommodation de molécules hydrophobes au sein de leur cavité dans l'eau. La taille des cyclodextrines varie en fonction du nombre d'unités de sucre formant l'oligosaccharide. Les plus usuelles sont composées de 6 (α -CD), 7 (β -CD), ou 8 (γ -CD) unités. Les cyclodextrines sont des plateformes intéressantes pour l'élaboration de nouveaux agents de transfection. On distingue aujourd'hui quatre grands types de vecteurs de siRNA à base de cyclodextrines : les polyrotaxanes, les conjugués de cyclodextrines-dendrimères, les cyclodextrines amphiphiles, et les nanoparticules polymériques de cyclodextrines.

Polyrotaxanes

Les polyrotaxanes de CD sont des architectures supramoléculaires composées de cyclodextrines enfilées de manière non covalentes sur un polymère. Ils possèdent éventuellement des groupements encombrants (appelés « bouchons ») à chaque extrémité du polymère afin d'éviter le désenfilement des CD. L'équipe de Wenz a beaucoup travaillé à l'élaboration de polypseudorotaxanes constitués d'un squelette polymérique de type PEG et d' α -CD polycationiques développés pour la transfection de plasmides. Afin de permettre leur relargage et de minimiser la toxicité de ce polymère polycationique, les « bouchons » à chaque extrémité du polymère ont été conjugués *via* des ponts disulfures. Une fois internalisés, les ponts disulfures sont clivés et le polypseudorotaxane se défait de manière à libérer les monomères de cyclodextrines cationiques et le plasmide.⁹⁰

Le système utilisé par Wenz pour la transfection de siRNA est légèrement différent. Le polypseudorotaxane mis au point est alors composé d'un polymère polycationique constitué de groupes diméthylammonium appelés ionènes, d' α -CD native et de β -CD heptacationiques. L'enfilement d' α -CD sur les ionènes se fait lentement à température élevée (70°C) et le polypseudorotaxane formé est instable. A l'inverse, à température ambiante (25-37°C), le polypseudorotaxane formé est relativement stable (1-10 jours). Par ailleurs, les β -CD s'enfilent et se désenfilent instantanément sur les ionènes. Ainsi, les α -CD jouent ici le rôle de « pseudo-bouchons » et permettent de stabiliser le polyrotaxane pour une durée de vie limitée, afin de permettre le désenfilage des cyclodextrines *in fine* et la libération des siRNA (Figure 1. 19).⁹¹ L'interférence par ARN, déclenchée par ce type de polyrotaxane, dirigée contre des gènes impliqués dans certaines pathologies comme la tuberculose, a par ailleurs été montrée.⁹²

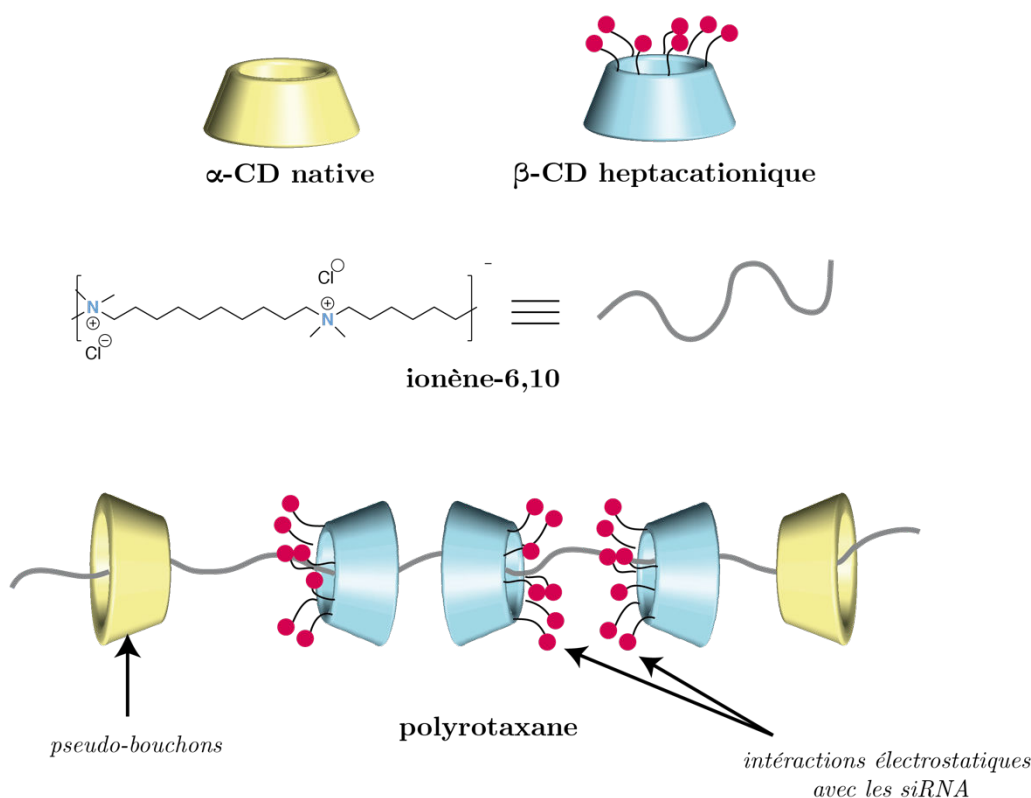


Figure 1. 19 : Structures des polyrotaxanes développés par l'équipe de Wenz pour la transfection de siRNA

Conjugués de cyclodextrines dendrimères

Comme nous l'avons vu précédemment les dendrimères cationiques comme les PAMAM sont de potentiels agents de transfection de siRNA, bien que leur toxicité soit souvent un frein à leur application *in vivo*. L'équipe d'Arima a développé de nombreux conjugués, composés de dendrimères PAMAM et de cyclodextrines, appelés CDE. Leur capacité en tant qu'agent de transfection de plasmide a d'abord été étudiée en variant plusieurs paramètres :

- Le type de cyclodextrine (α , β , γ).
- La structure du dendrimère (plus la génération du dendrimère est élevée plus le nombre de branchement augmente avec par conséquent la taille du dendrimère).
- Le nombre de cyclodextrines par dendrimères.

Ces études ont montré que les dendrimères conjugués à des CD étaient bien plus efficaces pour la transfection de plasmide que les dendrimères seuls.⁹³ En particulier, les α -CDE de troisième génération se sont montrés très efficaces.⁹⁴ L'amélioration de l'efficacité des dendrimères lorsqu'ils sont conjugués à des α -CD peut s'expliquer par la meilleure capacité de ces systèmes à s'échapper de l'endosome, d'une part grâce à l'effet tampon des amines du dendrimère et d'autre part grâce à l'effet perturbateur des α -CD sur la membrane endosomale.⁹⁵ Parallèlement, le même groupe a montré que ce type d' α -CDE de troisième génération permettait aussi de transférer efficacement les siRNA.⁹⁶ En conjuguant ces CDE à divers ligands, ces études ont prouvé que les dendrimères modifiés pouvaient induire l'interférence par ARN pour diverses applications thérapeutiques *in vitro* et *in vivo*. En particulier les α -CDE de troisième génération permettent :

- lorsqu'ils sont lactosylés l'inhibition de la transthyréline dans les cas des neuropathies amyloïdes,⁹⁷
- lorsqu'ils sont conjugués à un motif PEG-acide folique d'avoir une activité antitumorale,^{98,99}
- lorsqu'ils sont conjugués à un mannose, de transférer un siRNA indiqué dans le traitement de l'hépatite fulminante.¹⁰⁰

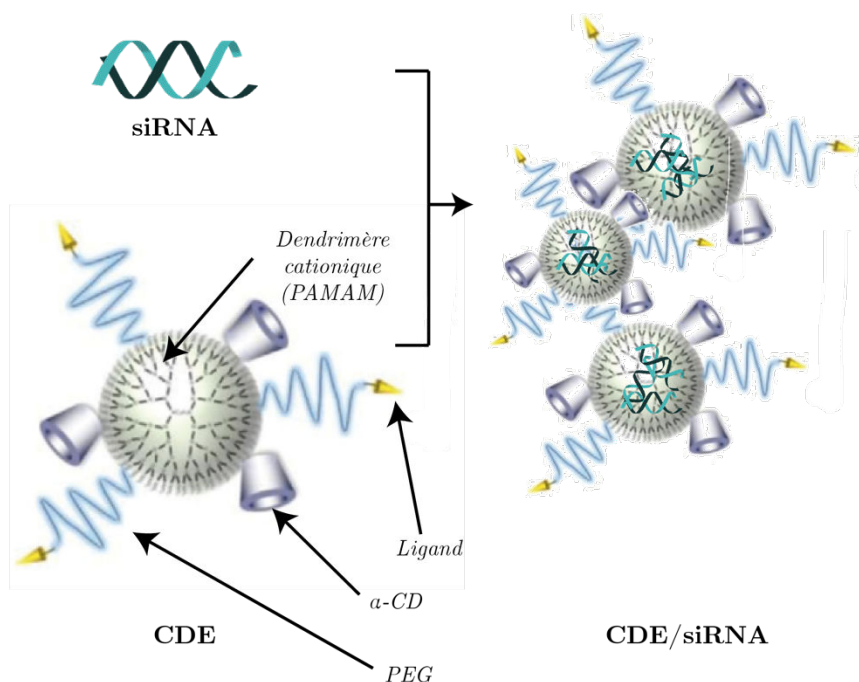


Figure 1. 20 : Formulation de complexes CDE-siRNA. Figure adaptée.¹⁰¹

Les CDE de troisième génération conjugués à un motif PEG-acide folique n'ont malheureusement pas montré une bonne activité *in vivo*. L'équipe d'Arima travaille donc aujourd'hui à la mise au point de CDE de quatrième génération afin d'améliorer la durée de circulation de ces conjugués. Ces CDE ont été fonctionnalisés par des motifs PEG-acide folique et présentent une activité thérapeutique prometteuse.^{102,101}

Cyclodextrines amphiphiles

Les cyclodextrines amphiphiles fonctionnalisées d'un côté par des groupements cationiques, et de l'autre par des chaînes hydrophobes, peuvent, en présence d'acides nucléiques comme les plasmides ou les siRNA, former des CDplexes. L'évaluation des capacités de transfection de ce type de composé a principalement été étudiée par les groupes de O'Driscoll et Darcy d'un côté et de García Fernández et Ortiz Mellet de l'autre.

Les équipes de O'Driscoll et de Darcy ont d'abord travaillé sur la transfection de plasmides sous forme de CDplexes composés de β -CD amphiphiles fonctionnalisées d'un côté par des chaînes lipophiles et de l'autre par des amines cationiques. Quelle que soit le col (primaire ou secondaire) fonctionnalisé par les chaînes lipophiles ou les groupements cationiques, des résultats similaires en transfection ont été obtenus sur des cellules épithéliales de l'intestin (Figure 1. 21, molécules 1 et 2). Bien que les caractéristiques physico-chimiques des deux CDplexes, constitués de CD amphiphiles et de siRNA, soient similaires, seul la CD présentant les chaînes lipophiles sur le col primaire (Figure 1. 21, molécule 2), a montré une réelle efficacité de transfection sur ce type de cellules.¹⁰³ Par la suite les recherches de ces groupes se sont portées sur des cyclodextrines amphiphiles dont la chaîne cationique a été introduite par une réaction de click (Figure 1. 21, molécule 3). Ce type de composé a montré une bonne aptitude à transférer des siRNA sur différents types de cellules, comme les cellules épithéliales de l'intestin,¹⁰⁴ les cellules neuronales,¹⁰⁵ notamment pour l'inhibition du gène responsable de la maladie de Huntington,¹⁰⁶ ou sur des cellules épithéliales des bronches *via* une administration par nébulisation.¹⁰⁷ Dans l'objectif d'améliorer la stabilité des CDplexes en circulation, les groupes de O'Driscoll et de Darcy ont ensuite introduit des chaînes PEGylés par réaction de click (Figure 1. 21, molécule 4).¹⁰⁸ Afin de compenser la diminution d'internalisation induite par l'introduction des chaînes PEGylées, des CDplexes composés d'un mélange de CD amphiphiles avec et sans PEG ont notamment été préparés (Figure 1. 21, molécules 3 et 4).¹⁰⁴ Enfin l'introduction de ligands a aussi été envisagée, particulièrement pour la transfection de cellules tumorales de la prostate, *via* la conjugaison de groupements anisamides à l'extrémité des chaînes PEGylées (Figure 1. 21, molécule 5).¹⁰⁹ Récemment, ces équipes ont montré la transfection de siRNA sur des cellules tumorales de la prostate *via* la formulation de lipoplexes composés de β -CD amphiphiles ou polycationiques, mais aussi d'autres lipides fonctionnalisés par des folates ou des conjugués Adamantane-Anisamide, permettant la post-fonctionnalisation des CDplexes *via* des interactions non covalentes.^{110,111}

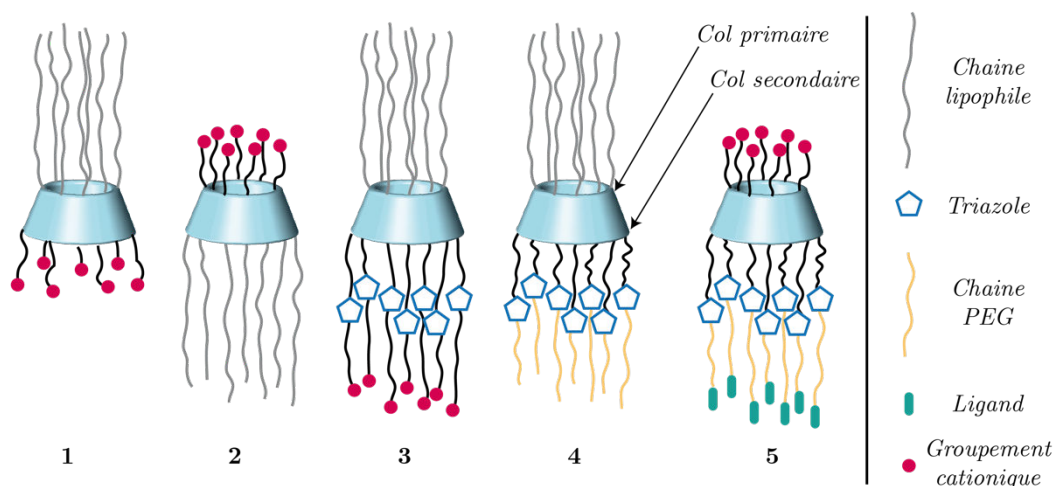


Figure 1. 21 : Différentes β -CD amphiphiles utilisés pour la transfection de siRNA par les équipes de O'Driscoll et de Darcy

Parallèlement, les équipes de García Fernández et Ortiz Mellet ont travaillé sur un autre type de cyclodextrines amphiphiles polycationiques pour la transfection de plasmides. Ces molécules sont aussi composées de cyclodextrines fonctionnalisées par des chaînes lipophiles d'un côté et par des groupements cationiques de l'autre. De nombreuses études de structure-activité ont été réalisées afin de définir les caractéristiques optimales de ces cyclodextrines pour la transfection de plasmides. Ces études ont montré d'une part que les β -CD étaient plus adaptées que les α -CD et les γ -CD.¹¹² D'autre part, la disposition des groupements cationiques sur le col primaire semble aussi être à privilégier.¹¹³ Des études sur l'impact de la longueur des chaînes hydrophobes ont aussi été réalisées.¹¹⁴ Enfin, les différentes recherches ont permis la mise au point de groupements cationiques composés d'une thiourée et d'amines pour interagir avec les acides nucléiques.¹¹⁵ Dans cette étude, la capacité d'un groupement phosphate à se lier avec plusieurs pseudoamides (urée, thiourée, guanidine) a été évaluée. Les résultats obtenus montrent qu'en théorie les groupements cationiques composés d'une thiourée et d'amines peuvent complexer, de manière coopérative et réversible, les groupements phosphates du squelette des acides nucléiques. Ces cyclodextrines amphiphiles polycationiques présentent une aptitude à interagir avec l'ADN de manière électrostatique puis à induire leur compaction et à former des nanoparticules (Figure 1. 22). Les nanoparticules ont notamment été caractérisées par DLS, TEM, et AFM et forment des objets sphériques d'une taille avoisinant les 75-100 nm.^{113,114,116} La transfection de plasmides a par ailleurs été montrée sur plusieurs lignées cellulaires (cellules murines embryonnaires,¹¹⁷ cellules de reins de singes,^{113,114} et cellules humaines de rhabdomyosarcome¹¹³). Très récemment les cyclodextrines amphiphiles polycationiques développées par ces équipes ont été utilisées pour la transfection de siRNA sur des cellules humaines du cancer de l'ovaire,¹¹⁸ des cellules de glioblastome de rat et humaines,¹¹⁹ et des cellules humaines du cancer de la prostate.¹¹⁹

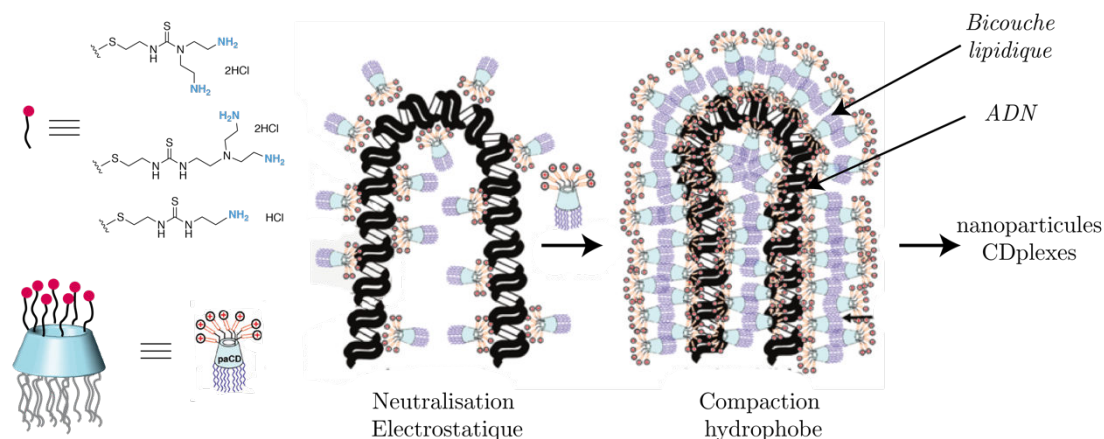


Figure 1. 22 : Exemples de cyclodextrines amphiphiles polycationiques usuelles développées par les équipes de García Fernández et Ortiz Mellet, et représentation schématique de la compaction d'ADN qu'elles induisent. Figure adaptée.¹¹⁴

Nanoparticules polymériques de cyclodextrines

L'équipe de Davis a travaillé à l'élaboration de nanoparticules de polymères de cyclodextrines (CDP), prévus initialement pour la transfection de plasmides. Ce système fut ensuite adapté pour la transfection de siRNA,¹²⁰ et donna de si bons résultats précliniques, que des études cliniques chez l'Homme furent entamées en 2008.¹²¹

Les CDP sont constitués d'oligomères polycationiques de six cyclodextrines reliées entre elles par des groupements amidines. Ces amidines exhibent une forte basicité permettant une complexation efficace des acides nucléiques et notamment des siRNA. Les extrémités de ces polymères sont composées de groupements imidazoles, protonables dans l'endosome, qui facilitent l'échappement endosomal. Afin d'être efficace *in vivo*, les nanoparticules formées par les CDP ont ensuite dû être fonctionnalisées. Pour cela, des conjugués Adamantane-PEG ou Adamantane PEG-Transferrine ont été ajoutés à la formulation des nanoparticules. L'adamantane est une molécule hydrophobe formant un complexe d'inclusion avec la cavité d'une β -CD dans l'eau. Cette méthode permet ainsi une fonctionnalisation des nanoparticules selon des interactions non covalentes (Figure 1. 23).¹²² La décoration des nanoparticules par des motifs PEG a permis d'améliorer leur stabilité en circulation mais de diminuer leur aptitude à pénétrer les cellules. L'ajout du conjugué Adamantane PEG-Transferrine a permis de recouvrir l'efficacité des nanoparticules en permettant leur internalisation par endocytose *via* des interactions multivalentes avec le récepteur cellulaire de la transferrine.

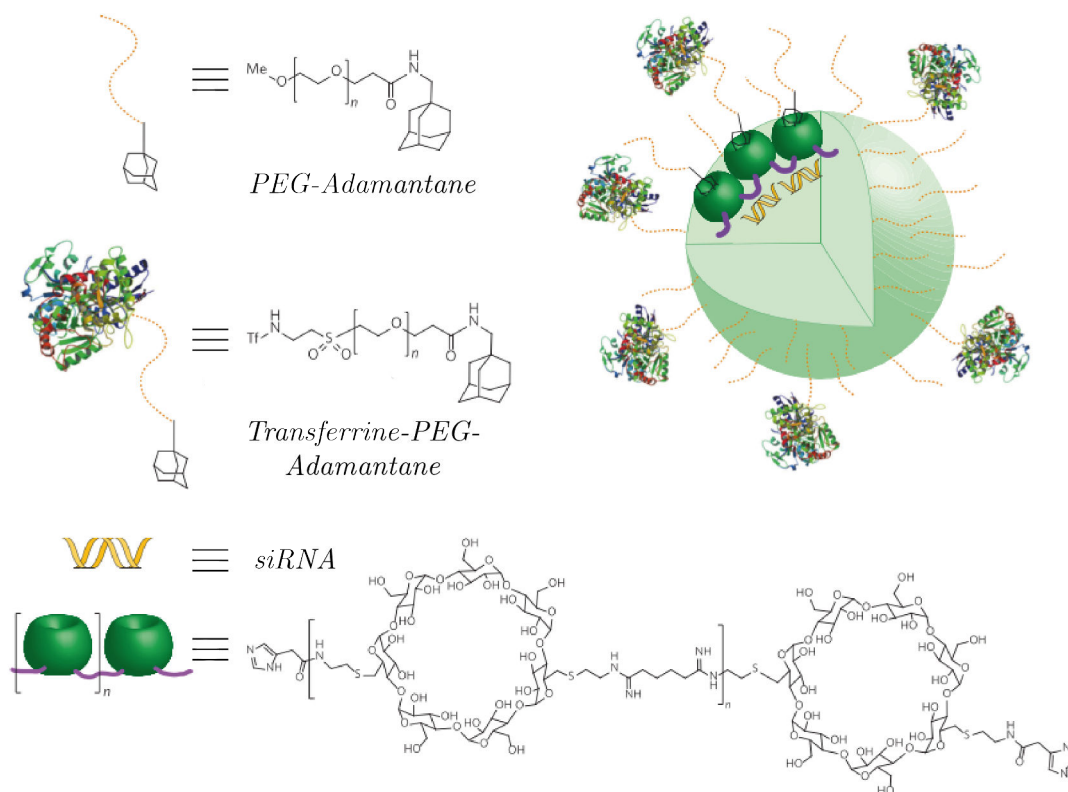


Figure 1. 23 : Composition et formation des CDP. Figure adaptée.⁵⁴

Après plusieurs études *in vivo* montrant l'efficacité des CDP pour le traitement de cancers sur des modèles murins,^{123,124} et une forte tolérance chez le singe,¹²⁵ des études cliniques chez l'Homme ont été entamées pour le traitement de mélanomes.¹²² Malheureusement ces études cliniques n'ont pas été concluantes, et ont donc été stoppées en 2013. Le seuil de toxicité a en effet été atteint chez deux patients. La stabilité du conjugué Adamantane-PEG-Transferrine a été mis en cause par les équipes de recherche, bien que cela n'ait pas été prouvé lors de l'étude clinique.¹²⁶

1.4. Conclusion

Nous avons vu dans ce chapitre que la transfection de siRNA à visée thérapeutique est un réel défi. Les barrières à franchir pour déclencher l'interférence par ARN sans induire une toxicité inacceptable, sont nombreuses. Les virus de par leur capacité à transférer du matériel génétique au sein de leur cellule hôte sont de parfaits exemples dont nous devons tirer les enseignements pour construire des systèmes efficaces. Si leur utilisation en tant que vecteur viral de siRNA, ne semble pas être une solution viable pour une application *in vivo*, l'élaboration de virus artificiels s'inspirant de leur structure et de leur mode d'action est certainement la clé d'un succès futur.

Dans ce projet, nous nous sommes donc attachés à la construction d'un virus artificiel pour la transfection de siRNA. Nous avons vu dans ce chapitre qu'une solution pour la mise au point d'agent de transfection de siRNA est la synthèse de polymères polycationiques. Malheureusement ces systèmes sont généralement toxiques. Afin de résoudre ce problème de toxicité, nous avons essayé de construire un agent de transfection dynamique. À l'image de la capsid d'un virus, composée de sous-unités protéiques s'assemblant de manière supramoléculaire, nous avons mis au point des blocs moléculaires s'assemblant autour des siRNA de manière non covalente. On parle alors de polymères supramoléculaires polycationiques. Pour cela nous avons utilisé les cyclodextrines comme plateformes. En effet, comme nous l'avons montré à la fin de ce chapitre, les cyclodextrines possèdent des propriétés tout à fait intéressantes, et leur utilisation a d'ailleurs permis la mise au point du seul système polymérique ayant fait l'objet d'études cliniques.

Afin de comprendre comment nous avons construit notre système, nous allons voir dans le prochain chapitre ce que sont les polymères, et plus particulièrement les polymères supramoléculaires. Nous allons essayer d'en définir les propriétés et les obstacles physico-chimiques que nous avons dû franchir dans leur élaboration.

1.5. Bibliographie

1. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. & Charpentier, E. A Programmable Dual-RNA – Guided. *Science* **337**, 816–822 (2012).
2. Zamecnik, P. C. & Stephenson, M. L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**, 280–4 (1978).
3. Stephenson, M. L. & Zamecnik, P. C. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**, 285–288 (1978).
4. Uhlmann, E. & Peyman, A. Antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle. *Chem. Rev.* **90**, 543–584 (1990).
5. Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M. & Losick, R. *Biologie moléculaire du gène.* (Pearson, 2012).
6. Inouye, M. Antisense RNA: its functions and applications in gene regulation--a review. *Gene* **72**, 25–34 (1988).
7. Simons, R. W. & Kleckner, N. Biological Regulation By Antisense RNA in Prokaryotes. *Annu. Rev. Genet.* (1988).
8. Plesner, P., Goodchild, J., Kalckar, H. M. & Zamecnik, P. C. Oligonucleotides with rapid turnover of the phosphate groups occur endogenously in eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 1936–1939 (1987).
9. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. & Mello, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811 (1998).
10. Daneholt, B. The discovery of RNA interference. *Karolinska Inst.* 1–10 (2006).
11. Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. & Tuschl, T. Duplexes of 21 ± nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494–498 (2001).
12. Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P. & Sharp, P. a. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. 3191–3197 (1999).
13. Hamilton, A. & Baulcombe, D. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**, 1997–2000 (1999).
14. Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. & Bartel, D. P. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25–33 (2000).
15. Parrish, S., Fleenor, J., Xu, S., Mello, C. & Fire, a. Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol. Cell.* **6**, 1077–1087 (2000).
16. Lau, Nelson C.; Lim, Lee P.; Weinstein, Earl G.; Bartel, D. P. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**, 858–862 (2001).
17. Lee, R. C. & Ambros, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**, 862–4 (2001).
18. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science* **294**, 853–858 (2001).
19. Wilson, R. C. & Doudna, J. A. Molecular Mechanisms of RNA Interference. *Annu. Rev. Biophys.* **42**, 217–239 (2013).
20. Crooke, S. T. Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* **27**, nat.2016.0656 (2017).
21. Aartsma-Rus, A. & van Ommen, G.-J. B. Antisense-mediated exon skipping: a versatile tool with therapeutic and research applications. *RNA* **13**, 1609–24 (2007).
22. Wittrup, A. & Lieberman, J. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 543–52 (2015).
23. Watts, J. K. & Corey, D. R. Silencing disease genes in the laboratory and the clinic. 365–379 (2012).
24. Back, N., Cohen, I. R., Lajtha, A., Lambris, J. D. & Paoletti, R. *Viral molecular machines.* (2012).
25. Ni, R., Zhou, J., Hossain, N. & Chau, Y. Virus-inspired nucleic acid delivery system: Linking virus and viral mimicry. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **106**, 3–26 (2016).
26. Kegel, W. K. & van der Schoot, P. Physical regulation of the self-assembly of tobacco mosaic virus coat protein. *Biophys. J.* **91**, 1501–12 (2006).
27. Cheng, S. & Brooks, C. L. Viral Capsid Proteins Are Segregated in Structural Fold Space. *PLoS Comput. Biol.* **9**, (2013).

28. Ruigrok, R. W. H., Crépin, T. & Kolakofsky, D. Nucleoproteins and nucleocapsids of negative-strand RNA viruses. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 504–510 (2011).
29. Cadena-Nava, R. D., Comas-García, M., Garmann, R. F., Rao, a L. N., Knobler, C. M. & Gelbart, W. M. Self-assembly of viral capsid protein and RNA molecules of different sizes: requirement for a specific high protein/RNA mass ratio. *J. Virol.* **86**, 3318–26 (2012).
30. Prevelige, P. E., Thomas, D. & King, J. Nucleation and growth phases in the polymerization of coat and scaffolding subunits into icosahedral procapsid shells. *Biophys. J.* **64**, 824–835 (1993).
31. Klug, A. From Macromolecules to Biological Assemblies (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **22**, 565–582 (1983).
32. Gulati, N. M., Pitek, A. S., Steinmetz, N. F. & Stewart, P. L. Cryo-electron tomography investigation of serum albumin-camouflaged tobacco mosaic virus nanoparticles. *Nanoscale* **9**, 3408–3415 (2017).
33. Nishio, M. The CH-p hydrogen bond in chemistry. Conformation, supramolecules, optical resolution and interactions involving carbohydrates. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 13873–13900 (2011).
34. Umezawa, Y. & Nishio, M. Ch/?? interactions as demonstrated in the crystal structure of guanine- nucleotide binding proteins, src homology-2 domains and human growth hormone in complex with their specific ligands. *Bioorganic Med. Chem.* **6**, 493–504 (1998).
35. Namba, K., Pattanayek, R. & Stubbs, G. Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus. *J. Mol. Biol.* **208**, 307–325 (1989).
36. Mulder, A., Huskens, J. & Reinhoudt, D. N. Multivalency in supramolecular chemistry and nanofabrication. *Org. Biomol. Chem.* **2**, 3409 (2004).
37. Lauffenburger, D. A. & Linderman, J. J. *Receptors: Models for binding, trafficking and signalling.* (Oxford University Press, 1993).
38. Mercer, J., Schelhaas, M. & Helenius, A. Virus Entry by Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 803–833 (2010).
39. Liu, Y., Joo, K.-I. & Wang, P. Endocytic processing of adeno-associated virus type 8 vectors for transduction of target cells. *Gene Ther.* **20**, 308–317 (2012).
40. Mercer, J. & Helenius, A. Virus entry by macropinocytosis. *Nat. Cell Biol.* **11**, 510–20 (2009).
41. Marsh, M. *Membrane trafficking in viral replication.* (Springer, 2006).
42. Mudhakar, D. & Harashima, H. Learning from the viral journey: how to enter cells and how to overcome intracellular barriers to reach the nucleus. *AAPS J.* **11**, 65–77 (2009).
43. Rossman, J. S., Leser, G. P. & Lamb, R. A. Filamentous influenza virus enters cells via macropinocytosis. *J. Virol.* **86**, 10950–60 (2012).
44. Zhang, Y. & Bergelson, J. M. Adenovirus receptors. *J. Virol.* **79**, 12125–12131 (2005).
45. Stewart, P. L. & Nemerow, G. R. Cell integrins: commonly used receptors for diverse viral pathogens. *Trends Microbiol.* **15**, 500–507 (2007).
46. Lagache, T., Danos, O. & Holcman, D. Modeling the step of endosomal escape during cell infection by a nonenveloped virus. *Biophys. J.* **102**, 980–989 (2012).
47. Imbert, M., Dias-Florencio, G. & Goyenvalle, A. Viral vector-mediated antisense therapy for genetic diseases. *Genes* **8**, (2017).
48. Bessis, N., GarciaCozar, F. J. & Boissier, M.-C. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther.* **11**, 10–17 (2004).
49. Baum, C., Kustikova, O., Modlich, U., Li, Z. & Fehse, B. Mutagenesis and Oncogenesis by Chromosomal Insertion of Gene Transfer Vectors. *Hum. Gene Ther.* **17**, 253–263 (2006).
50. Mintzer, M. A. & Simanek, E. E. Nonviral vectors for gene delivery. *Chem. Rev.* **109**, 259–302 (2009).
51. Li, J. M., Wang, Y. Y., Zhang, W., Su, H., Ji, L. N. & Mao, Z. W. Low-weight polyethylenimine cross-linked 2-hydroxypopyl- β -cyclodextrin and folic acid as an efficient and nontoxic siRNA carrier for gene silencing and tumor inhibition by VEGF siRNA. *Int. J. Nanomedicine.* **8**, 2101–2117 (2013).
52. Layzer, J. M., Mccaffrey, A. P., Tanner, A. K., Huang, Z. a N. & Kay, M. a. In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA* **10**, 766–771 (2004).
53. Kanasty, R. L., Whitehead, K. A., Vegas, A. J. & Anderson, D. G. Action and Reaction: The Biological Response to siRNA and Its Delivery Vehicles. *Mol. Ther.* **20**, 513–524 (2012).
54. Kanasty, R., Dorkin, J. R., Vegas, A. & Anderson, D. Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nat. Mater.* **12**, 967–977 (2013).

55. Bolhassani, A. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* **1816**, 232–46 (2011).
56. Cavallaro, G., Sardo, C., Craparo, E. F., Porsio, B. & Giammona, G. Polymeric nanoparticles for siRNA delivery: Production and applications. *Int. J. Pharm.* **525**, 313–333 (2017).
57. Albertazzi, L., Serresi, M., Albanese, A. & Beltram, F. Dendrimer internalization and intracellular trafficking in living cells. *Mol. Pharm.* **7**, 680–688 (2010).
58. Boas, U. & Heegaard, P. M. H. Dendrimers in drug research. *Chem. Soc. Rev.* **33**, 43–63 (2004).
59. Chen, P. Y., Weinmann, L., Gaidatzis, D., Pei, Y., Zavolan, M., Tuschl, T. & Meister, G. Strand-specific 5'-O-methylation of siRNA duplexes controls guide strand selection and targeting specificity. *RNA* **14**, 263–74 (2008).
60. Wu, Z.-W., Chien, C.-T., Liu, C.-Y., Yan, J.-Y. & Lin, S.-Y. Recent progress in copolymer-mediated siRNA delivery. *J. Drug Target.* **20**, 551–560 (2012).
61. Akhtar, S. & Benter, I. F. Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *J. Clin. Invest.* **117**, 3623–3632 (2007).
62. Ho, W., Zhang, X. Q. & Xu, X. Biomaterials in siRNA Delivery: A Comprehensive Review. *Adv. Healthc. Mater.* **5**, 2715–2731 (2016).
63. Singha, K., Namgung, R. & Kim, W. J. Polymers in Small-Interfering RNA Delivery. *Nucleic Acid Ther.* **21**, 133–147 (2011).
64. Zhang, X. Q., Xu, X., Bertrand, N., Pridgen, E., Swami, A. & Farokhzad, O. C. Interactions of nanomaterials and biological systems: Implications to personalized nanomedicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 1363–1384 (2012).
65. Kim, N., Jiang, D., Jacobi, A. M., Lennox, K. A., Rose, S. D., Behlke, M. A. & Salem, A. K. Synthesis and characterization of mannosylated pegylated polyethylenimine as a carrier for siRNA. *Int. J. Pharm.* **427**, 123–133 (2012).
66. Guo, J., Cheng, W. P., Gu, J., Ding, C., Qu, X., Yang, Z. & O'Driscoll, C. Systemic delivery of therapeutic small interfering RNA using a pH-triggered amphiphilic poly-l-lysine nanocarrier to suppress prostate cancer growth in mice. *Eur. J. Pharm. Sci.* **45**, 521–532 (2012).
67. Felber, A. E., Castagner, B., Elsbahy, M., Deleavey, G. F., Damha, M. J. & Leroux, J. C. SiRNA nanocarriers based on methacrylic acid copolymers. *J. Control. Release.* **152**, 159–167 (2011).
68. Miyata, K., Oba, M., Nakanishi, M., Fukushima, S., Yamasaki, Y., Koyama, H., Nishiyama, N. & Kataoka, K. Polyplexes from poly(aspartamide) bearing 1,2-diaminoethane side chains induce pH-selective, endosomal membrane destabilization with amplified transfection and negligible cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 16287–16294 (2008).
69. Zimmermann, T. S., Lee, A. C. H., Akinc, A., Bramlage, B., Bumcrot, D., Fedoruk, M. N., Harborth, J., Heyes, J. A., Jeffs, L. B., John, M., Judge, A. D., Lam, K., McClintock, K., Nechev, L. V., Palmer, L. R., Racie, T., Röhl, I., Seiffert, S., Shammugam, S., *et al.* RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* **441**, 111–114 (2006).
70. Sato, Y., Hatakeyama, H., Sakurai, Y., Hyodo, M., Akita, H. & Harashima, H. A pH-sensitive cationic lipid facilitates the delivery of liposomal siRNA and gene silencing activity in vitro and in vivo. *J. Control. Release.* **163**, 267–276 (2012).
71. Bottega, R. & Epanand, R. M. Inhibition of Protein Kinase C by Cationic Amphiphiles. *Biochemistry* **31**, 9025–9030 (1992).
72. Kolli, S., Wong, S. P., Harbottle, R., Johnston, B., Thanou, M. & Miller, A. D. PH-triggered nanoparticle mediated delivery of siRNA to liver cells in vitro and in vivo. *Bioconjug. Chem.* **24**, 314–332 (2013).
73. Zhigaltsev, I. V., Maurer, N., Wong, K. F. & Cullis, P. R. Triggered release of doxorubicin following mixing of cationic and anionic liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1565**, 129–135 (2002).
74. Akinc, A., Querbes, W., De, S., Qin, J., Frank-Kamenetsky, M., Jayaprakash, K. N., Jayaraman, M., Rajeev, K. G., Cantley, W. L., Dorkin, J. R., Butler, J. S., Qin, L., Racie, T., Sprague, A., Fava, E., Zeigerer, A., Hope, M. J., Zerial, M., Sah, D. W., *et al.* Targeted Delivery of RNAi Therapeutics With Endogenous and Exogenous Ligand-Based Mechanisms. *Mol. Ther.* **18**, 1357–1364 (2010).
75. Rezaee, M., Oskuee, R. K., Nassirli, H. & Malaekheh-Nikouei, B. Progress in the development of lipopolyplexes as efficient non-viral gene delivery systems. *J. Control. Release.* **236**, 1–14 (2016).
76. Dalby, B., Cates, S., Harris, A., Ohki, E. C., Tilkins, M. L., Price, P. J. & Ciccarone, V. C. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: Primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* **33**, 95–103 (2004).
77. Jayaraman, M., Ansell, S. M., Mui, B. L., Tam, Y. K., Chen, J., Du, X., Butler, D., Eltepu, L., Matsuda, S.,

- Narayananair, J. K., Rajeev, K. G., Hafez, I. M., Akinc, A., Maier, M. A., Tracy, M. A., Cullis, P. R., Madden, T. D., Manoharan, M. & Hope, M. J. Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 8529–8533 (2012).
78. Taberero, J., Shapiro, G. I., LoRusso, P. M., Cervantes, A., Schwartz, G. K., Weiss, G. J., Paz-Ares, L., Cho, D. C., Infante, J. R., Alsina, M., Gounder, M. M., Falzone, R., Harrop, J., White, A. C. S., Toudjarska, I., Bumcrot, D., Meyers, R. E., Hinkle, G., Svrikapa, N., *et al.* First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement. *Cancer Discov.* **3**, 406–417 (2013).
79. Suhr, O. B., Coelho, T., Buades, J., Pouget, J., Conceicao, I., Berk, J., Schmidt, H., Waddington-Cruz, M., Campistol, J. M., Bettencourt, B. R., Vaishnav, A., Gollob, J. & Adams, D. Efficacy and safety of patisiran for familial amyloidotic polyneuropathy: a phase II multi-dose study. *Orphanet J. Rare Dis.* **10**, 109 (2015).
80. Jeong, J. H., Mok, H., Oh, Y. K. & Park, T. G. siRNA conjugate delivery systems. *Bioconjug. Chem.* **20**, 5–14 (2009).
81. Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., John, M., Kesavan, V., Lavine, G., Pandey, R. K., Racie, T., Rajeev, K. G., Röhl, I., Toudjarska, I., Wang, G., *et al.* Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* **432**, 173–178 (2004).
82. Wolfrum, C., Shi, S., Jayaprakash, K. N., Jayaraman, M., Wang, G., Pandey, R. K., Rajeev, K. G., Nakayama, T., Charrise, K., Ndungo, E. M., Zimmermann, T., Kotliansky, V., Manoharan, M. & Stoffel, M. Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1149–1157 (2007).
83. Rozema, D. B., Lewis, D. L., Wakefield, D. H., Wong, S. C., Klein, J. J., Roesch, P. L., Bertin, S. L., Reppen, T. W., Chu, Q., Blokhin, A. V., Hagstrom, J. E. & Wolff, J. A. Dynamic PolyConjugates for targeted in vivo delivery of siRNA to hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 12982–12987 (2007).
84. Wooddell, C. I., Rozema, D. B., Hossbach, M., John, M., Hamilton, H. L., Chu, Q., Hegge, J. O., Klein, J. J., Wakefield, D. H., Oropeza, C. E., Deckert, J., Roehl, I., Jahn-Hofmann, K., Hadwiger, P., Vornlocher, H.-P., McLachlan, A. & Lewis, D. L. Hepatocyte-targeted RNAi therapeutics for the treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Mol. Ther.* **21**, 973–85 (2013).
85. Biessen, E. A. L., Beuting, D. M., van Berkel, T. J. C., Roelen, H. C. P. F., van de Marel, G. A. & van Boom, J. H. Synthesis of Cluster Galactosides with High Affinity for the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor. *J. Med. Chem.* **38**, 1538–1546 (1995).
86. Rensen, P. C. N., Van Leeuwen, S. H., Sliedregt, L. A. J. M., Van Berkel, T. J. C. & Biessen, E. A. L. Design and synthesis of novel N-acetylgalactosamine-terminated glycolipids for targeting of lipoproteins to the hepatic asialoglycoprotein receptor. *J. Med. Chem.* **47**, 5798–5808 (2004).
87. Baenziger, J. U. & Fiete, D. Galactose and N-acetylgalactosamine-specific endocytosis of glycopeptides by isolated rat hepatocytes. *Cell* **22**, 611–620 (1980).
88. Rensen, P. C. N., Sliedregt, L. A. J. M., Ferns, M., Kieviet, E., Van Rossenberg, S. M. W., Van Leeuwen, S. H., Van Berkel, T. J. C. & Biessen, E. A. L. Determination of the Upper Size Limit for Uptake and Processing of Ligands by the Asialoglycoprotein Receptor on Hepatocytes in Vitro and in Vivo. *J. Biol. Chem.* **276**, 37577–37584 (2001).
89. Nair, J. K., Willoughby, J. L. S., Chan, A., Charisse, K., Alam, M. R., Wang, Q., Hoekstra, M., Kandasamy, P., Kelin, A. V., Milstein, S., Taneja, N., Oshea, J., Shaikh, S., Zhang, L., Van Der Sluis, R. J., Jung, M. E., Akinc, A., Hutabarat, R., Kuchimanchi, S., *et al.* Multivalent N -acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 16958–16961 (2014).
90. Wenz, G. Cyclodextrin Polyrotaxanes Assembled from a Molecular Construction Kit in Aqueous Solution. *J. Polym. Sci.* **47**, 6333–6341 (2009).
91. Dandekar, P., Jain, R., Keil, M., Loretz, B., Muijs, L., Schneider, M., Auerbach, D., Jung, G., Lehr, C. M. & Wenz, G. Cellular delivery of polynucleotides by cationic cyclodextrin polyrotaxanes. *J. Control. Release.* **164**, 387–393 (2012).
92. Dandekar, P., Jain, R., Keil, M., Loretz, B., Koch, M., Wenz, G. & Lehr, C.-M. Enhanced uptake and siRNA-mediated knockdown of a biologically relevant gene using cyclodextrin polyrotaxane. *J. Mater. Chem. B*, **3**, 2590–2598 (2015).
93. Arima, H. & Motoyama, K. Recent findings concerning PAMAM dendrimer conjugates with cyclodextrins as carriers of DNA and RNA. *Sensors* **9**, 6346–6361 (2009).
94. Kihara, F., Arima, H., Tsutsumi, T., Hirayama, F. & Uekama, K. In vitro and in vivo gene transfer by an optimized α -cyclodextrin conjugate with polyamidoamine dendrimer. *Bioconjug. Chem.* **14**, 342–350 (2003).
95. Arima, H., Motoyama, K. & Higashi, T. Potential Use of Polyamidoamine Dendrimer Conjugates with Cyclodextrins as Novel Carriers for siRNA. *Pharmaceuticals* 61–78 (2012).

96. Tsutsumi, T., Hirayama, F., Uekama, K. & Arima, H. Evaluation of polyamidoamine dendrimer/ α -cyclodextrin conjugate (generation 3, G3) as a novel carrier for small interfering RNA (siRNA). *J. Control. Release.* 349–359 (2007).
97. Hayashi, Y., Mori, Y., Yamashita, S., Motoyama, K., Higashi, T., Jono, H., Ando, Y. & Arima, H. Potential use of lactosylated dendrimer (G3)/ α -cyclodextrin conjugates as hepatocyte-specific siRNA carriers for the treatment of familial amyloidotic polyneuropathy. *Mol. Pharm.* **9**, 1645–1653 (2012).
98. Arima, H., Arizono, M., Higashi, T., Yoshimatsu, A., Ikeda, H., Motoyama, K., Hattori, K., Takeuchi, T., Hirayama, F. & Uekama, K. Potential use of folate-polyethylene glycol (PEG)-appended dendrimer (G3) conjugate with α -cyclodextrin as DNA carriers to tumor cells. *Cancer Gene Ther.* **19**, 358–366 (2012).
99. Arima, H., Yoshimatsu, A., Ikeda, H., Ohyama, A., Motoyama, K., Higashi, T., Tsuchiya, A., Niidome, T., Katayama, Y., Hattori, K. & Takeuchi, T. Folate-PEG-appended dendrimer conjugate with α -cyclodextrin as a novel cancer cell-selective siRNA delivery carrier. *Mol. Pharm.* **9**, 2591–2604 (2012).
100. Motoyama, K., Mitsuyasu, R., Akao, C., Abu Hashim, I. I., Sato, N., Tanaka, T., Higashi, T. & Arima, H. Potential Use of Thioalkylated Mannose-Modified Dendrimer (G3)/ α -Cyclodextrin Conjugate as an NF- κ B siRNA Carrier for the Treatment of Fulminant Hepatitis. *Mol. Pharm.* **12**, 3129–3136 (2015).
101. Ohyama, A., Higashi, T., Motoyama, K. & Arima, H. Ternary complexes of folate-PEG-appended dendrimer (G4)/ α -cyclodextrin conjugate, siRNA and low-molecular-weight polysaccharide sacran as a novel tumor-selective siRNA delivery system. *Int. J. Biol. Macromol.* **99**, 21–28 (2017).
102. Ohyama, A., Higashi, T., Motoyama, K. & Arima, H. In Vitro and in Vivo Tumor-Targeting siRNA Delivery Using Folate-PEG-appended Dendrimer (G4)/ α -Cyclodextrin Conjugates. *Bioconjug. Chem.* **27**, 521–532 (2016).
103. O'Mahony, A. M., Doyle, D., Darcy, R., Cryan, J. F. & O'Driscoll, C. M. Characterisation of cationic amphiphilic cyclodextrins for neuronal delivery of siRNA: Effect of reversing primary and secondary face modifications. *Eur. J. Pharm. Sci.* **47**, 896–903 (2012).
104. O'Mahony, A. M., Ogier, J., Desgranges, S., Cryan, J. F., Darcy, R. & O'Driscoll, C. M. A click chemistry route to 2-functionalised PEGylated and cationic β -cyclodextrins: co-formulation opportunities for siRNA delivery. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 4954 (2012).
105. O'Mahony, A. M., Godinho, B. M. D. C., Ogier, J., Devocelle, M., Darcy, R., Cryan, J. F. & O'Driscoll, C. M. Click-modified cyclodextrins as nonviral vectors for neuronal siRNA delivery. *ACS Chem. Neurosci.* **3**, 744–752 (2012).
106. Godinho, B. M. D. C., Ogier, J. R., Darcy, R., O'Driscoll, C. M. & Cryan, J. F. Self-assembling modified β -cyclodextrin nanoparticles as neuronal siRNA delivery vectors: Focus on huntington's disease. *Mol. Pharm.* **10**, 640–649 (2013).
107. Hibbitts, A., O'Mahony, A. M. M., Forde, E., Nolan, L., Ogier, J., Desgranges, S., Darcy, R., MacLoughlin, R., O'Driscoll, C. M. M. & Cryan, S. A. A. Early-stage development of novel cyclodextrin-siRNA nanocomplexes allows for successful postnebulization transfection of bronchial epithelial cells. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* **27**, 466–477 (2014).
108. Godinho, B. M. D. C., Ogier, J. R., Quinlan, A., Darcy, R., Griffin, B. T., Cryan, J. F. & Cairnion, M. O. D. PEGylated cyclodextrins as novel siRNA nanosystems: Correlations between polyethylene glycol length and nanoparticle stability. *Int. J. Pharm.* **473**, 105–112 (2014).
109. Guo, J., Ogier, J. R., Desgranges, S., Darcy, R. & O'Driscoll, C. Anisamide-targeted cyclodextrin nanoparticles for siRNA delivery to prostate tumours in mice. *Biomaterials* **33**, 7775–7784 (2012).
110. Fitzgerald, K. A., Malhotra, M., Gooding, M., Sallas, F., Evans, J. C., Darcy, R. & O'Driscoll, C. M. A novel, anisamide-targeted cyclodextrin nanoformulation for siRNA delivery to prostate cancer cells expressing the sigma-1 receptor. *Int. J. Pharm.* **499**, 131–145 (2016).
111. Evans, J. C., Malhotra, M., Guo, J., O'Shea, J. P., Hanrahan, K., O'Neill, A., Landry, W. D., Griffin, B. T., Darcy, R., Watson, R. W. & O'Driscoll, C. M. Folate-targeted amphiphilic cyclodextrin-siRNA nanoparticles for prostate cancer therapy exhibit PSMA mediated uptake, therapeutic gene silencing in vitro and prolonged circulation in vivo. *Nanomedicine Nanotechnology. Biol. Med.* **12**, 2341–2351 (2016).
112. Bienvenu, C., Martínez, Á., Jiménez Blanco, J. L., Di Giorgio, C., Vierling, P., Ortiz Mellet, C., Defaye, J. & García Fernández, J. M. Polycationic amphiphilic cyclodextrins as gene vectors: effect of the macrocyclic ring size on the DNA complexing and delivery properties. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 5570 (2012).
113. Gallego-Yerga, L., Lomazzi, M., Franceschi, V., Sansone, F., Ortiz Mellet, C., Donofrio, G., Casnati, A. & García Fernández, J. M. Cyclodextrin- and calixarene-based polycationic amphiphiles as gene delivery systems: a structure-activity relationship study. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 1708–1723 (2015).
114. Pflueger, I., Charrat, C., Mellet, C. O., García Fernández, J. M., Di Giorgio, C. & Benito, J. M. Cyclodextrin-based facial amphiphiles: assessing the impact of the hydrophilic-lipophilic balance in the self-assembly, DNA complexation and gene delivery capabilities. *Org. Biomol. Chem.* **14**, 10037–10049 (2016).

115. Jiménez Blanco, J. L., Bootello, P., Benito, J. M., Ortiz Mellet, C. & García Fernández, J. M. Urea-, thiourea-, and guanidine-linked glycooligomers as phosphate binders in water. *J. Org. Chem.* **71**, 5136–5143 (2006).
116. Díaz-Moscoso, A., Gourriérec, L. Le, Gómez-García, M., Benito, J. M., Balbuena, P., Ortega-Caballero, F., Guilloteau, N., Giorgio, C. Di, Vierling, P., Defaye, J., Mellet, C. O. & Fernández, J. M. G. Polycationic amphiphilic cyclodextrins for gene delivery: synthesis and effect of structural modifications on plasmid DNA complex stability, cytotoxicity, and gene expression. *Chem. - An Asian J.* **15**, 12871–12888 (2009).
117. Díaz-Moscoso, A., Balbuena, P., Gómez-García, M., Ortiz Mellet, C., Benito, J. M., Le Gourriérec, L., Di Giorgio, C., Vierling, P., Mazzaglia, A., Micali, N., Defaye, J. & García Fernández, J. M. Rational design of cationic cyclooligosaccharides as efficient gene delivery systems. *Chem. Commun.* 2001 (2008).
118. Minnaert, A.-K., Dakwar, G. R., Benito, J. M., García Fernández, J. M., Ceelen, W., De Smedt, S. C. & Remaut, K. High-Pressure Nebulization as Application Route for the Peritoneal Administration of siRNA Complexes. *Macromol. Biosci.* **1700024**, 1–8 (2017).
119. Márquez-miranda, V., Canan, J., Luis, J., Blanco, J. & Mellet, O. Molecular determinants for cyclo- mediated effective siRNA transfection. *Nanomedicine* **12**, 1607–1621 (2017).
120. Gonzalez, H., Hwang, S. J. & Davis, M. E. New class of polymers for the delivery of macromolecular therapeutics. *Bioconjug. Chem.* **10**, 1068–1074 (1999).
121. Davis, M. E. The First Targeted Delivery of siRNA in Humans via a Nanoparticle: From Concept to Clinic. *Mol. Pharm.* **6**, 659–668 (2009).
122. Davis, M. E., Zuckerman, J. E., Choi, C. H. J., Seligson, D., Tolcher, A., Alabi, C. A., Yen, Y., Heidel, J. D. & Ribas, A. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* **464**, 1067–1070 (2010).
123. Bartlett, D. W. & Davis, M. E. Impact of tumor-specific targeting and dosing schedule on tumor growth inhibition after intravenous administration of siRNA-containing nanoparticles. *Biotechnol. Bioeng.* **99**, 975–985 (2008).
124. Hu-Lieskovan, S., Heidel, J. D., Bartlett, D. W., Davis, M. E. & Triche, T. J. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* **65**, 8984–8992 (2005).
125. Heidel, J. D., Yu, Z., Liu, J. Y.-C., Rele, S. M., Liang, Y., Zeidan, R. K., Kornbrust, D. J. & Davis, M. E. Administration in non-human primates of escalating intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 siRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 5715–21 (2007).
126. Zuckerman, J. E., Gritli, I., Tolcher, A., Heidel, J. D., Lim, D., Morgan, R., Chmielowski, B., Ribas, A., Davis, M. E. & Yen, Y. Correlating animal and human phase Ia/Ib clinical data with CALAA-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing siRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 11449–11454 (2014).

Chapitre 2

Conception et synthèse de polymères supramoléculaires à base de cyclodextrines

2. CONCEPTION ET SYNTHÈSE DE POLYMÈRES SUPRAMOLÉCULAIRES À BASE DE CYCLODEXTRINES

2.1. Etat de l'art

2.1.1. Polymères supramoléculaires

2.1.1.1. Définitions et propriétés

Du polymère covalent au polymère supramoléculaire

Les polymères sont définis comme de longues chaînes constituées de petites unités moléculaires répétitives, reliées entre elles par des liaisons covalentes¹. Beaucoup de polymères existent à l'état naturel. Par exemple, l'ADN est un polymère constitué de nucléotides, les protéines sont des polymères constitués d'acides aminés et les polysaccharides, comme l'amidon, la chitine (carapace des animaux), ou la cellulose (végétaux), sont eux, constitués, d'unités de sucre. Si les propriétés de ces polymères naturels ont vite suscité l'intérêt des Hommes, ce n'est qu'au 18^{ème} siècle qu'ils vont s'y intéresser plus particulièrement, notamment avec la vulcanisation du caoutchouc en 1839.

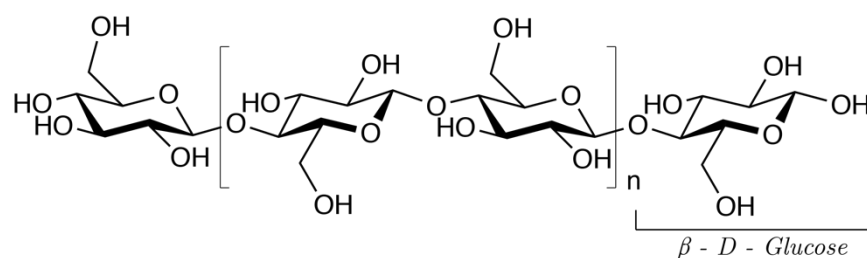
Quelques années plus tard, Carothers publie une célèbre revue où les polymères y sont classés par type de molécules (polyamides, polyamines, polyacétales etc.) et par type de polymérisation (par étape, en chaîne, par ouverture de cycle).² Même si de nouvelles catégories y ont été ajoutées depuis, ce classement reste encore d'actualité. Cette nouvelle classe de matériaux synthétiques ouvre alors de nouvelles opportunités quant à leurs propriétés (élasticité, résistance, légèreté, conductivité, stabilité). Les propriétés macroscopiques qui caractérisent les polymères sont souvent la conséquence d'interactions secondaires entre les différentes chaînes de polymères. Par exemple, la cellulose est un polysaccharide constitué d'unités répétitives de $\beta(1-4)$ -D-glucose (**Figure 2. 1. a**). Les chaînes de cellulose peuvent interagir entre elles via de nombreuses liaisons hydrogène et s'empiler pour former de la cellulose cristalline. Ces liaisons inter-chaînes confèrent alors au polymère un caractère rigide, qui lui permet de participer à la formation de microfibrilles constituant la paroi des cellules végétales (**Figure 2. 1. b**).

Ainsi, la modification chimique d'un monomère permet de moduler les interactions inter-chaînes du polymère correspondant et donc d'en changer les propriétés. Avec l'élaboration croissante de polymères sophistiqués, la compréhension de ces interactions secondaires est devenue nécessaire,³ et pose la question de l'élaboration de polymères uniquement construits sur ces interactions supramoléculaires (**Figure 2. 1. c**).

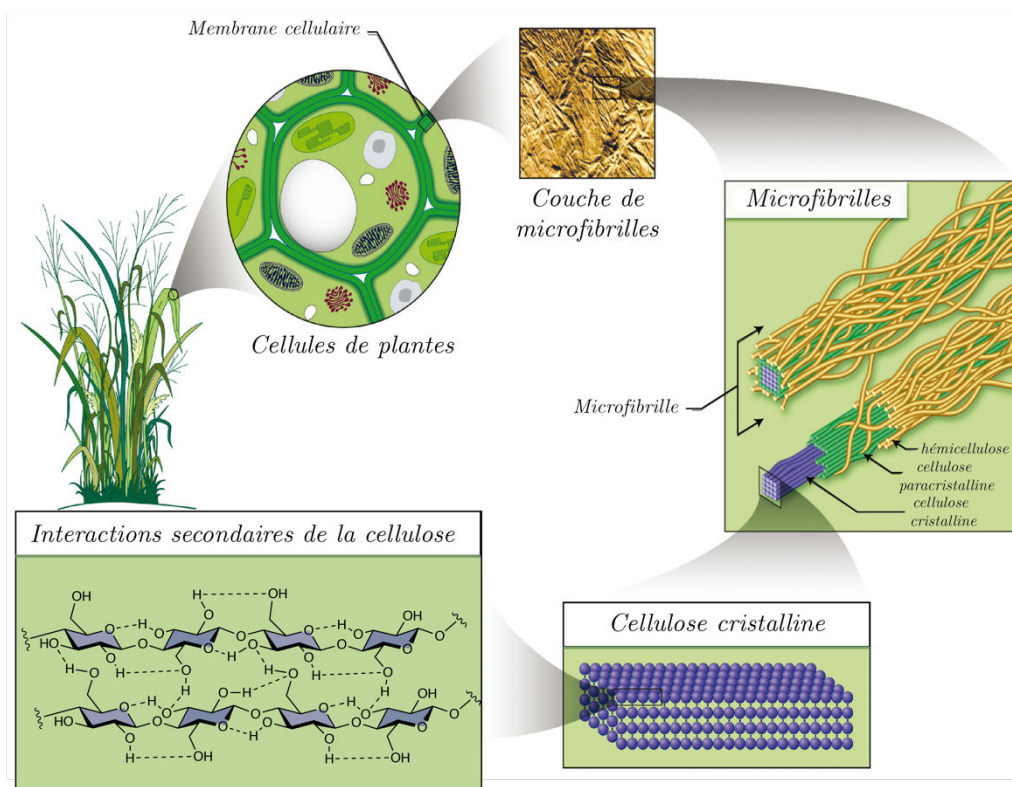
La notion de polymère supramoléculaire est pour la première fois définie par Jean-Marie Lehn en 1990 pour décrire l'assemblage de monomères ditopiques s'assemblant selon des interactions supramoléculaires. On définit plus généralement un polymère supramoléculaire comme un polymère dont les unités moléculaires sont liées entre elles *via* des interactions non covalentes, dirigées et réversibles.⁴

La barrière énergétique pour rompre une liaison covalente est élevée (300-400 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour les plus communes). Par conséquent, l'énergie à fournir pour dépolymériser un polymère de ce type est bien supérieure à celle nécessaire à sa polymérisation. Ainsi la formation de polymère covalent se fait essentiellement sous contrôle cinétique. A l'inverse, les interactions supramoléculaires sont suffisamment faibles pour permettre une réversibilité, conférant à l'ensemble un caractère dynamique, contrôlé par un équilibre thermodynamique. La forme et la taille de ces polymères vont alors dépendre fortement des contraintes thermodynamiques extérieures comme la température, la pression ou la concentration.

a -Polymère covalent - cellulose



b -Interaction secondaire - cellulose



c -Polymère supramoléculaire - dipyrindone

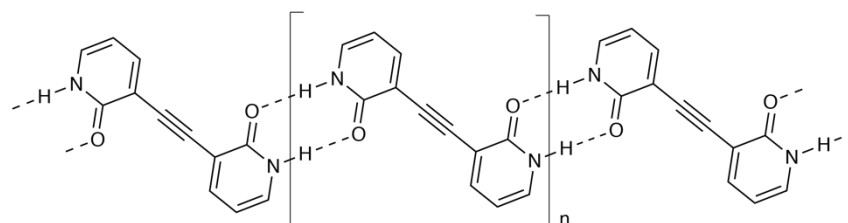
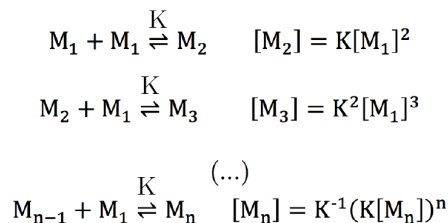


Figure 2. 1 : a) Structure moléculaire de la cellulose. b) Associations intermoléculaires entre les chaînes de cellulose conduisant à la formation de microfibrilles, rigides, et constituant les membranes cellulaires des plantes. Figure adaptée.⁵ c) Exemple de polymère supramoléculaire (dipyrindone).

Mécanismes d'association des polymères supramoléculaires

Il existe trois modes principaux de formation de polymères supramoléculaires : le modèle isodesmique, le modèle « ring-chain », et le modèle coopératif intermoléculaire (**Figure 2. 2**). Afin d'expliquer ces trois modèles, nous prendrons comme exemple une polymérisation de monomères ditopiques linéaires en conditions diluées.

Modèle isodesmique : Une polymérisation supramoléculaire isodesmique se caractérise par une unique constante d'affinité pour chaque étape de formation de l'assemblage. On considère la polymérisation d'un monomère M_1 , dont la constante d'équilibre est K .



L'affinité d'un monomère pour un polymère est alors indépendante de la taille de ce polymère et chaque étape de l'assemblage est alors énergétiquement équivalente (la diminution d'enthalpie libre est la même à chaque étape). Le degré de polymérisation (DP) dépend alors uniquement de la constante d'affinité K et de la concentration initiale en monomère C . Pour ce modèle, il a été montré que $DP \approx \sqrt{KC}$ lorsque $KC \gg 1$.^{3, 6, 7}

Modèle « ring-chain » : La polymérisation supramoléculaire de type « ring-chain » a lieu lorsque la formation d'oligomères linéaires est en équilibre avec celle d'oligomères cycliques. La tendance d'un polymère à adopter une structure cyclique dépend de la molarité effective (EM). La molarité effective est définie comme le rapport entre la constante d'équilibre intramoléculaire et la constante d'équilibre intermoléculaire. Lorsque $EM > 1$, la formation d'espèces cycliques est favorisée, on parle alors de coopérativité intramoléculaire.⁸ À l'inverse, si $EM < 1$, la formation d'espèces linéaires est alors privilégiée. Cet équilibre dépend de paramètres extérieurs : lorsque la concentration initiale en monomère augmente, la formation de composés intermoléculaires est alors favorisée.⁹

Modèle coopératif intermoléculaire : La polymérisation supramoléculaire, selon un modèle de coopérativité intermoléculaire, se déroule en deux phases. La première étape, dite de nucléation, consiste à former un premier oligomère appelé noyau. Cette première étape peut se dérouler selon le modèle isodesmique, ou nécessiter un apport d'énergie (augmentation de l'enthalpie libre). La polymérisation se poursuit jusqu'à atteindre un certain degré de polymérisation où diverses interactions coopératives vont entrer en jeu et favoriser l'addition d'un nouveau monomère (la variation d'enthalpie libre augmente). On entre alors dans la phase d'élongation et on parle de coopérativité positive. Dans le cas contraire, lorsque l'ajout d'un monomère est plus difficile une fois le noyau formé, on parle d'anticoopérativité. L'addition d'un nouveau monomère entraîne alors une diminution de la variation d'enthalpie libre.

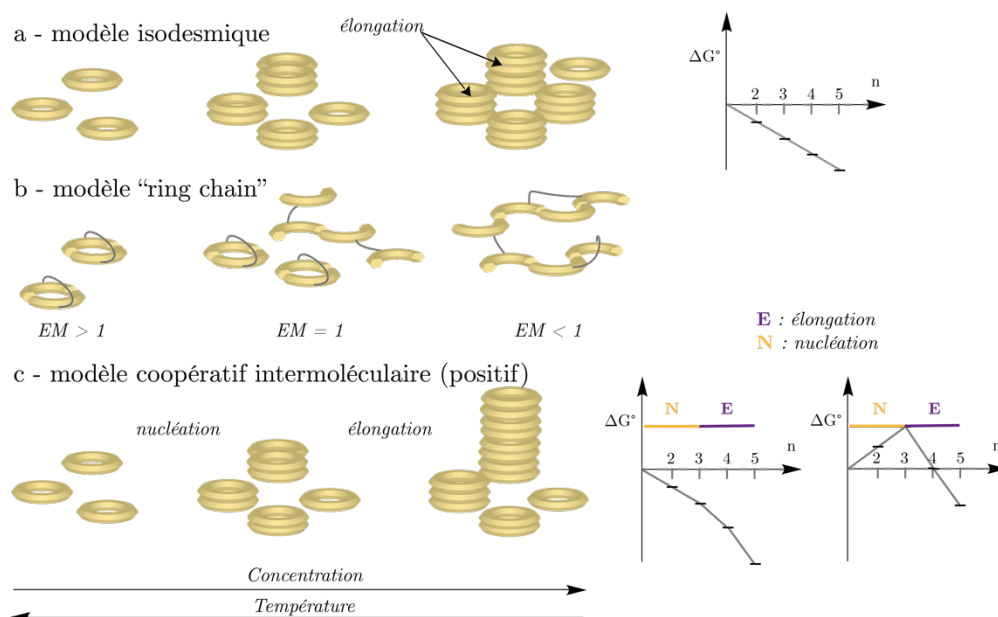


Figure 2. 2 : Modèles d'association de polymères supramoléculaires

Propriétés des polymères supramoléculaires

Les polymères supramoléculaires n'ont donc pas la même structure ni les mêmes modèles de formation que les polymères covalents. Il en est de même pour les propriétés qui les caractérisent. Si les polymères supramoléculaires ne peuvent rivaliser avec leurs homologues covalents sur le plan de la résistance mécanique, de l'élasticité de certains plastiques ou de la stabilité, leur caractère dynamique et réversible leur confère de nouvelles propriétés que ce soit au niveau mécanique, électronique ou biologique.

Propriétés mécaniques : Les propriétés mécaniques d'un polymère (covalent ou non) sont déterminées par les interactions secondaires liant les différentes molécules entre elles. Ce sont aussi ces interactions qui peuvent leur donner un caractère modulable. Dans le cas des polymères supramoléculaires, lorsque la constante d'affinité est suffisamment élevée, il est possible de former des matériaux (plastiques, hydrogels) avec des propriétés macroscopiques s'approchant de celles des polymères covalents. Néanmoins les propriétés mécaniques des polymères supramoléculaires sont d'autant plus modulables que les liaisons inter-chaînes comme intra-chaînes sont réversibles. Ainsi, des polymères supramoléculaires, thermosensibles, pH-sensibles, photosensibles ou bien sensible à la concentration en monomère, ont été décrits.¹⁰⁻¹²

La nature dynamique de ces polymères a permis de développer des matériaux possédant des propriétés uniques d'auto-réparation. Par exemple l'équipe de Harada a mis au point un hydrogel composé de poly(acide acrylique) conjugués à des β -CD ou à des ferrocènes. Des interactions supramoléculaires de type hôte-invité (*cf vide infra*) ont lieu entre les β -CD et les ferrocènes. Lorsque l'hydrogel est coupé en deux parties, ensuite rassemblées, on observe une cicatrisation de la fracture (Figure 2. 3). Le réseau de liaisons secondaires réversibles se reforme alors selon la même disposition.¹³⁻¹⁶

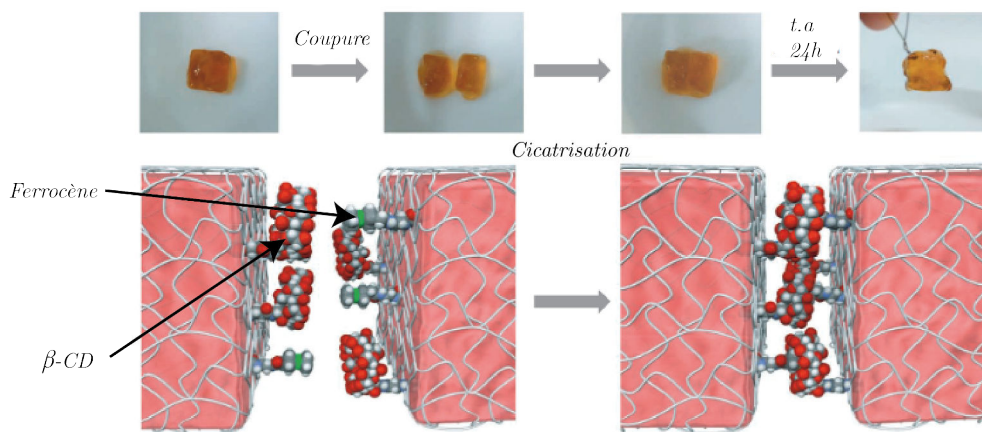


Figure 2. 3 : Cicatrisation d'un hydrogel selon des interactions secondaires de type hôte-invité. Figure adaptée.¹⁶

Propriétés électroniques : La photosynthèse est un processus naturel bioénergétique dont les chercheurs s'inspirent aujourd'hui pour la mise au point de matériaux capables de convertir la lumière en énergie. Les différents composants responsables de la photosynthèse sont des molécules organiques capables de s'organiser selon de multiples interactions supramoléculaires. Elles opèrent alors ensemble de manière synergique pour permettre le flux d'électrons *via* des effets structuraux et orbitaux. Dans l'objectif d'imiter ce processus pour obtenir des matériaux avec des propriétés optoélectroniques, les chercheurs se sont attachés à la mise au point de systèmes organiques où l'arrangement spatial des donneurs et accepteurs d'électrons permet leur transfert photoinduit. Les assemblages supramoléculaires et plus particulièrement les polymères supramoléculaires, possèdent d'intéressantes propriétés pour l'élaboration de tels matériaux. Ils peuvent s'organiser de manière précise à travers l'assemblage supramoléculaire de monomères relativement simples à préparer. Ainsi, la conception de tels systèmes basés sur des monomères de type π -conjugués, dont la topologie, l'assemblage, et les interactions spin-orbitales sont contrôlés, permet l'obtention de matériaux avec d'intéressantes propriétés optoélectroniques.^{17,18}

Propriétés biologiques : Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, les processus biologiques font intervenir des interactions supramoléculaires. Les tissus vivants ne sont pas statiques, ils s'adaptent constamment aux phénomènes et aux conditions qui les entourent. La mise au point d'assemblages capables de réagir à différents stimuli extérieurs, s'adaptant ainsi au dynamisme des milieux biologiques, est essentielle à la conception de biomatériaux. Les polymères supramoléculaires, de par la réversibilité des liaisons qui les composent, sont parfaitement adaptés pour l'élaboration de telles structures. La conception de systèmes supramoléculaires dans l'eau conduit alors à l'obtention de polymères biocompatibles, capables de s'intégrer dans le milieu biologique sans le dégrader ni interférer avec celui-ci, et ouvre de nombreuses applications médicales.¹⁹

Tableau 2. 1 : Comparaison des propriétés des polymères covalents et supramoléculaires

Polymères covalents	Polymères supramoléculaires
- Solides, résistants, souples	- Modulables (solides, gels, liquides)
- Stables (température, lumière, chimie)	- Sensibles aux stimuli extérieurs (température, concentration en monomère, lumière, pH)
- Nature non dynamique	- Nature dynamique et réversible
	- Biocompatible

2.1.1.2. *Polymères supramoléculaires en milieu aqueux*

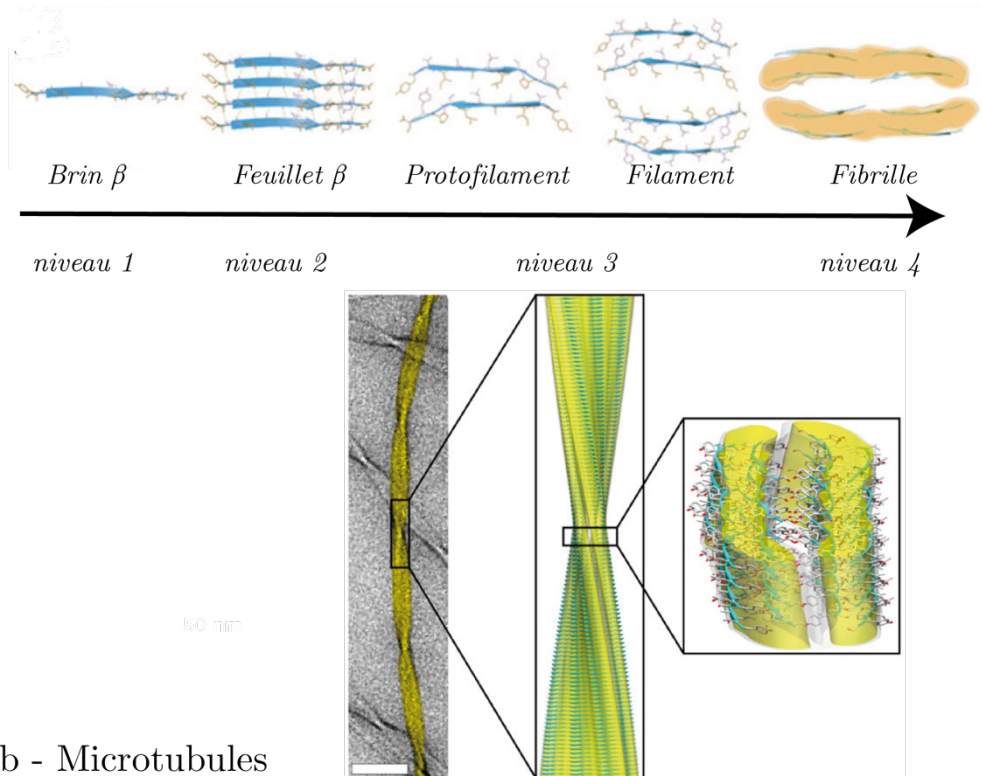
Polymères supramoléculaires naturels

Les propriétés chimiques de l'eau (molécule polaire et amphotère) en font un solvant particulier pour la formation d'assemblages supramoléculaires.²⁰ La connaissance et la maîtrise des interactions non covalentes dans ce milieu sont essentielles pour comprendre et contrôler les différents processus biologiques qui opèrent dans ce solvant. En effet, la nature utilise l'eau comme un élément central, conférant spécificité, adaptabilité et solidité à ces mécanismes. On retrouve ainsi dans la nature de nombreux polymères supramoléculaires naturels formant des objets définis et organisés.

L'amyloïde en est un parfait exemple. Ce bio-polymère supramoléculaire ubiquitaire dans la nature est structurellement constitué d'agrégats de chaînes polypeptidiques interagissant entre elles selon des liaisons hydrogène et des effets hydrophobes. La structure s'organise de manière hiérarchique selon quatre niveaux. Le premier niveau est l'interaction latérale de deux chaînes peptidiques *via* des liaisons hydrogène formant un brin bêta. Ces brins s'empilent alors en feuillet bêta selon un deuxième niveau hiérarchique. Ces feuillets peuvent ensuite s'apparier d'abord par deux (protofilaments), puis par quatre (filaments), grâce à un effet hydrophobe. La polymérisation supramoléculaire et l'élongation de ces agrégats permettent ensuite la formation de fibrilles « twistées » (**Figure 2. 4. a**). Leur formation dans la nature, liée à un mauvais repliement des protéines et donc à leur accumulation dans le réticulum endoplasmique, est observée dans de nombreuses maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson, Alzheimer, ou Creutzfeldt –Jakob.²¹

Les microtubules sont aussi des bio-polymères supramoléculaires présents dans le cytoplasme des cellules eucaryotes et constituant le cytosquelette de celles-ci. Ils participent ainsi au contrôle de la forme et aux mouvements des cellules. Leur rôle est notamment essentiel durant la division cellulaire (mitose). Ils sont formés de manière hiérarchique, dynamique et coopérative,²² par la polymérisation supramoléculaire de deux protéines : les tubuline α et β . La première brique moléculaire de l'assemblage est composée d'un hétérodimère de tubulines α et β . Ces briques s'assemblent alors selon un mode « tête à queue », alternant les sous-unités α et β , et permettant la formation de protofilaments dont l'élongation est dirigée par des effets hydrophobes et des interactions électrostatiques. Un nombre variable de ces protofilaments (généralement aux alentours de 13), liés entre eux latéralement de manière coopérative par des interactions électrostatiques, forme les microtubules, cylindres d'environ 30 nm de diamètre et d'une longueur de plusieurs micromètres (**Figure 2. 4. b**). Dans chaque protofilament, les hétérodimères sont orientés, exposant les sous-unités β vers l'une des extrémités (notée (+)), alors que l'autre extrémité (notée (-)) n'exposera que les unités α . La vitesse d'élongation au niveau de l'extrémité (+) est supérieure à celle de l'extrémité (-).

a - Amyloïde



b - Microtubules

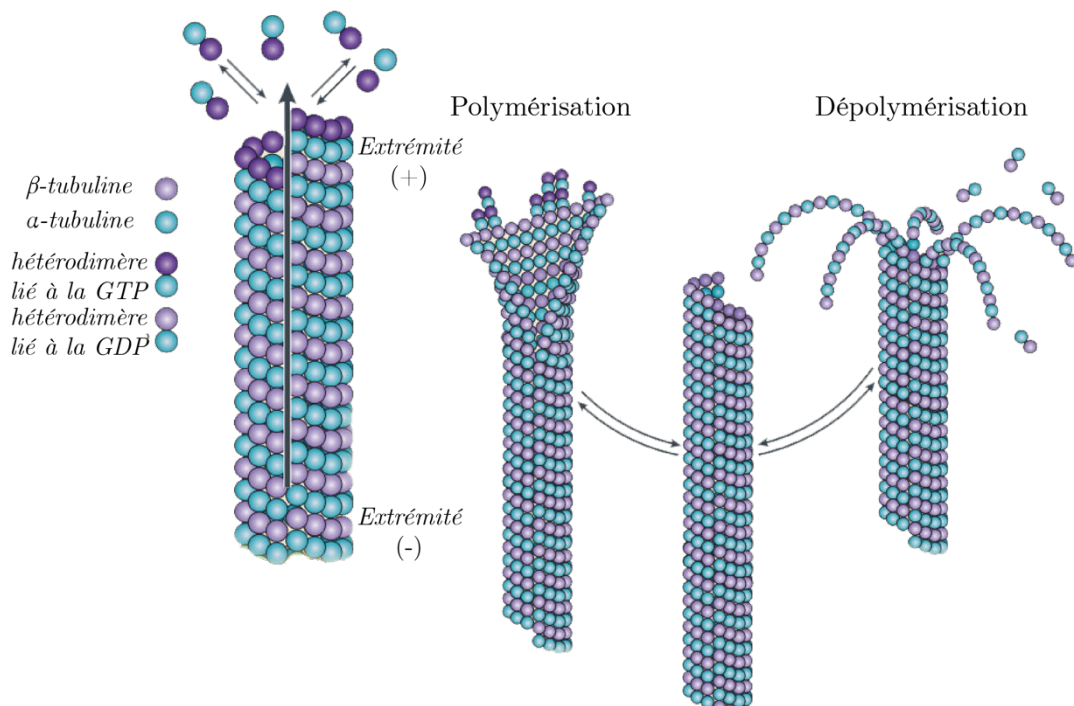


Figure 2. 4 : a) Formation hiérarchique de fibrilles d'amyloïdes et reconstruction de l'architecture à partir d'images de TEM. Figure adaptée.²¹ b) Mécanisme de polymérisation et dépolymérisation des microtubules. Figure adaptée.²³

Le dynamisme des microtubules est dû à des guanines nucléotides (GTP, guanine triphosphate ou GDP, guanine triphosphate). Elles sont présentes au centre de chaque hétérodimère. Leur rôle est essentiel dans le recrutement de nouvelles sous-unités. Lorsqu'un hétérodimère s'ajoute à l'extrémité (+) du microtubule, il est lié à une GTP. La GTP est ensuite hydrolysée en GDP. Les hétérodimères liés à la GTP sont les garants de la stabilité de la

structure du microtubule. Ainsi, tant que le microtubule s'allonge, la proportion d'hétérodimères-GTP est suffisante pour maintenir la stabilité de l'architecture. Lorsque la concentration en hétérodimères est insuffisante dans le milieu, toutes les GTP finissent par être hydrolysées. La structure du microtubule est alors déstabilisée et s'en suit une dépolymérisation irréversible.²²

Polymères supramoléculaires synthétiques

Afin de construire de nouvelles architectures supramoléculaires synthétiques dans l'eau, différents systèmes ont été mis au point que l'on peut classer selon les interactions mises en jeu : les systèmes π -conjugués, les liaisons hydrogène, ou les interactions hôte-invité. Ces dernières seront traitées dans la partie concernant les polymères supramoléculaires à base de cyclodextrines.

Systèmes π -conjugués

L'assemblage supramoléculaire de systèmes π -conjugués dans l'eau présente certaines caractéristiques et avantages qui lui sont propres. Les interactions entre les différents monomères peuvent être très fortes grâce à la combinaison des interactions π - π et de l'effet hydrophobe. Ces interactions sont d'autant plus fortes que la surface π -conjuguée est :

- large, afin d'accumuler les interactions π - π et d'exacerber l'effet hydrophobe,
- plane, pour un empilement π optimal,
- non chargée, pour éviter les répulsions électrostatiques,
- rigide. À l'inverse des systèmes aliphatiques possédant de nombreux degrés de liberté conformationnelle, les systèmes π -conjugués sont rigides et s'empilent de manière hautement organisée.

Par ailleurs, les polymères formés à partir de larges surfaces π -conjuguées sont aussi particulièrement intéressants pour leurs propriétés électroniques dues à la délocalisation possible des électrons π . Enfin, ces conjugués sont capables d'absorber la lumière et les propriétés spectrales de ces molécules sont sensibles à l'agrégation. Cela permet leur investigation par spectroscopie lors du processus de polymérisation supramoléculaire.

Les pérylènes diimides fonctionnalisés par des groupements hydrophiles permettant leur solubilisation dans l'eau (polyéthylène glycol (PEG), amines, cyclodextrines) sont de parfaits candidats à l'élaboration de tels polymères (**Figure 2. 5. a**). Le groupe de Würthner notamment a apporté une grande contribution à leur élaboration,²⁴⁻²⁷ en utilisant les propriétés d'absorbance et le bon rendement quantique de fluorescence des pérylènes. Le groupe de Rybtchinski a exploré la capacité des pérylènes diimides à s'assembler dans l'eau en élargissant leur surface hydrophobe dans le but de stabiliser leur formation, notamment en y ajoutant des chaînes fluorées,²⁸ ou en liant plusieurs pérylènes entre eux.²⁸⁻³⁰ Le groupe de Lee a, quant à lui, décrit de nombreux polymères supramoléculaires biocompatibles constitués de monomères amphiphiles appelés « penta-*p*-phenylène rod » formant une tige aromatique rigide reliée à plusieurs brins hydrophiles (**Figure 2. 5. b**).³¹ D'autres systèmes utilisant des naphthalènes,³² des phénanthrènes³³ ou des coronènes³⁴ ont aussi été développés.

Les hexabenzocoronènes sont une extension symétrique des coronènes présentant donc une surface π -conjuguée plus large et d'intéressantes propriétés optoélectroniques. Si les hexabenzocoronènes fonctionnalisés par des groupes hydrophiles s'empilent en colonnes ordonnées dans l'eau,^{35,36} le groupe d'Aida a montré que dans le dichlorométhane, des hexabenzocoronènes amphiphiles forment des nanotubes monodisperses.³⁷ Lorsque ces nanotubes sont transférés par étape via un échange progressif de solvant, leur structure et leur monodispersité sont conservées (**Figure 2. 5. c**). De plus, la partie hydrophile composée d'isothiuronium peut interagir avec des composés anioniques et ainsi permettre une post-fonctionnalisation des nanotubes comme il l'a été montré avec des poly(4-styrenesulfonate).³⁸

Si les polymères supramoléculaires constitués de π -conjugués présentent de bonnes propriétés électroniques, une autre stratégie très intéressante, notamment pour des applications en imagerie médicale, est le développement de matériaux bioinorganiques comportant aussi des complexes métalliques.^{39,40}

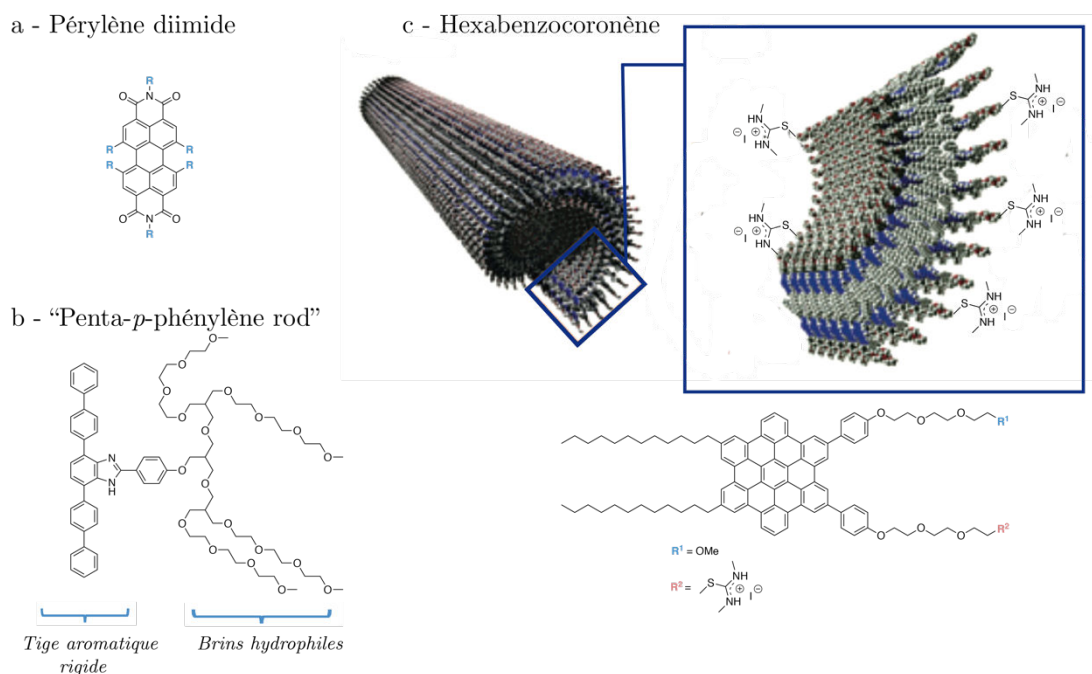


Figure 2. 5 : Différents systèmes π -conjugués. a) Pérylène diimide substitué. b) "penta-*p*-phénylène rod". c) Hexabenzocoronène amphiphile fonctionnalisé par une chaîne alkyle hydrophobe et une chaîne hydrophile, formant des nanotubes monodisperses. Figure adaptée.³⁸

Système formé par liaisons hydrogène

L'élaboration d'assemblages supramoléculaires basés sur des liaisons hydrogène a d'abord été développée dans des solvants apolaires, notamment avec le travail réalisé par Meijer *et al.* portant sur les 2-ureido-4-pyrimidones, impliquant quatre liaisons hydrogène.¹⁴ La formation de ce type d'architecture devient plus complexe dans un solvant polaire comme l'eau. En effet, les liaisons que les molécules d'eau peuvent former avec les 2-ureido-4-pyrimidones entrent en compétition avec celles responsables de la polymérisation, défavorisant ainsi la formation de l'assemblage. Pour résoudre ce problème, les motifs formant ces liaisons hydrogène doivent les protéger, et les envelopper dans un microenvironnement hydrophobe.⁴¹ Plusieurs systèmes ont alors été élaborés, utilisant ces mêmes 2-ureido-4-pyrimidones protégés par des fonctions alkyles.⁴² D'autres assemblages basés sur des motifs benzenetricarboxamide protégés par un microenvironnement hydrophobe, comme des L-phénylalanines fluorées reliées *via* un

espaceur aminobenzoate à des groupements d'intérêts, ont aussi été développés. Ces groupes d'intérêt peuvent être des complexes métalliques permettant l'utilisation de ce type de système en tant qu'agent de contraste pour de l'imagerie à résonance magnétique,⁴³ ou des groupements variablement chargés, induisant des répulsions électrostatiques contrôlant la taille des objets formés.⁴⁴ Les benzenetricarboxamides très largement étudiés pour la formation de polymères supramoléculaires, seront décrits *vide infra* dans un exemple où ils interagissent avec des acides nucléiques.

Le groupe de Fenniri a reporté la mise au point d'un polymère supramoléculaire s'assemblant dans l'eau selon deux niveaux de hiérarchie. Le monomère utilisé consiste en une purine modifiée comprenant le motif donneur-donneur-accepteur (DDA) de la guanine et celui accepteur-accepteur-donneur (AAD) de la cytosine. Ces monomères s'organisent ainsi en rosettes de six unités, liées entre elles par des liaisons hydrogènes de type Watson-Crick similaires à celles qui lient les bases de l'ADN. Afin de protéger ce réseau de 18 liaisons hydrogènes, des groupements méthyle et éthylène ont été ajoutés, dirigés vers l'extérieur de la rosette afin de créer un microenvironnement hydrophobe. Enfin, une fonction hydrophile (amine, ou éther couronne) a été introduite en surface de la rosette pour permettre la solubilité dans l'eau du système. Ces rosettes s'empilent alors de manière hélicoïdale selon un second ordre hiérarchique (Figure 2. 6).^{45,46} La présence d'éthers couronnes à l'extérieur de l'hélice permet aussi d'accommoder divers invités. De cette manière la chiralité de l'hélice peut être contrôlée en ajoutant soit des L-Alanines, soit des D-Alanines, qui s'incorporent dans les éthers couronnes et induit le sens de l'hélicité du polymère.⁴⁷

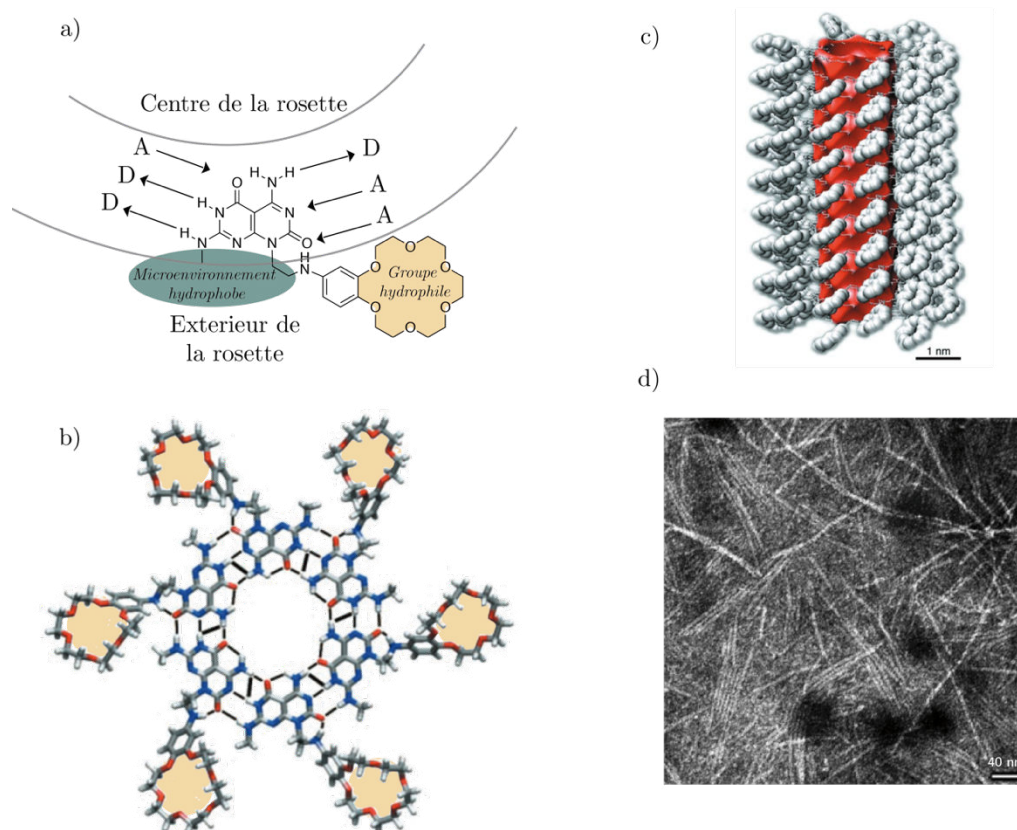


Figure 2. 6 : a) Purine modifiée s'assemblant selon un réseau de liaisons hydrogène de type Watson-Crick, protégée par un microenvironnement hydrophobe et fonctionnalisée en surface par un groupe hydrophile (éther couronne). b) Assemblage de six monomères en rosette. c) Empilement hélicoïdal des rosettes. d) micrographes de transmission électronique de l'empilement formé (révélation négative). Figures adaptées.⁴⁶

D'autres assemblages sophistiqués et modulables, en forme de rosettes formées *via* des motifs semblables aux purines ont été développés plus récemment, notamment par le groupe de Hud^{48,49}.

Le système de reconnaissance des paires de base de Watson-Crick a aussi été utilisé par le groupe de Shimizu pour former de longues fibres linéaires à partir de monomères bolaamphiphiles comportant un cœur hydrophobe (chaîne alkyle⁵⁰ ou aryle⁵¹) et deux thymidines aux extrémités, s'empilant de manière coopérative avec de simples brins d'oligoadenylic acide. Cet exemple est détaillé *vide infra*.

Tuiles et origamis d'ADN

La spécificité et la robustesse des liaisons hydrogène de type Watson-Crick permettent la formation d'architectures prévisibles et programmables dans l'eau. Par ailleurs, la synthèse automatisée de brins d'ADN, permettant d'obtenir la séquence et la longueur désirées à des prix de plus en plus bas a permis la mise au point de structures supramoléculaires plus complexes et mieux définies comme les tuiles ou les origamis d'ADN.

La synthèse de polymères supramoléculaires programmée de tuiles d'ADN a été décrite pour la première fois par le groupe de Winfree.⁵² Ces architectures sont formées à partir de courts double brins d'ADN possédant à chaque extrémité de simples brins non appariés appelés « sticky ends ». Ces « sticky ends », constitués de quelques bases, peuvent ainsi s'hybrider à l'extrémité d'un autre double brin d'ADN possédant une « sticky end » complémentaire. Ces brins d'ADN peuvent alors s'organiser en lamelles, voire en nanotubes d'une longueur pouvant atteindre plusieurs micromètres (**Figure 2. 7. a**). Suite à l'élaboration de ces premières tuiles d'ADN, de nombreuses études ont décrites la formation de polymères tubulaires, en forme de filaments, ou formés à partir de briques moléculaires triangulaires, rondes, ou carrées.⁵³

Afin d'aller encore plus loin dans l'élaboration d'architectures supramoléculaires programmées, Rothemund a décrit en 2006 la mise au point d'origamis d'ADN.⁵⁴ Ces structures massives (plusieurs micromètres) parfaitement définies, sont composées d'un long simple brin d'ADN jouant le rôle de trame, replié de nombreuses fois sur lui-même par hybridation avec de courts simple brins d'ADN, formant ainsi un objet tridimensionnel défini (**Figure 2. 7. b, c**).

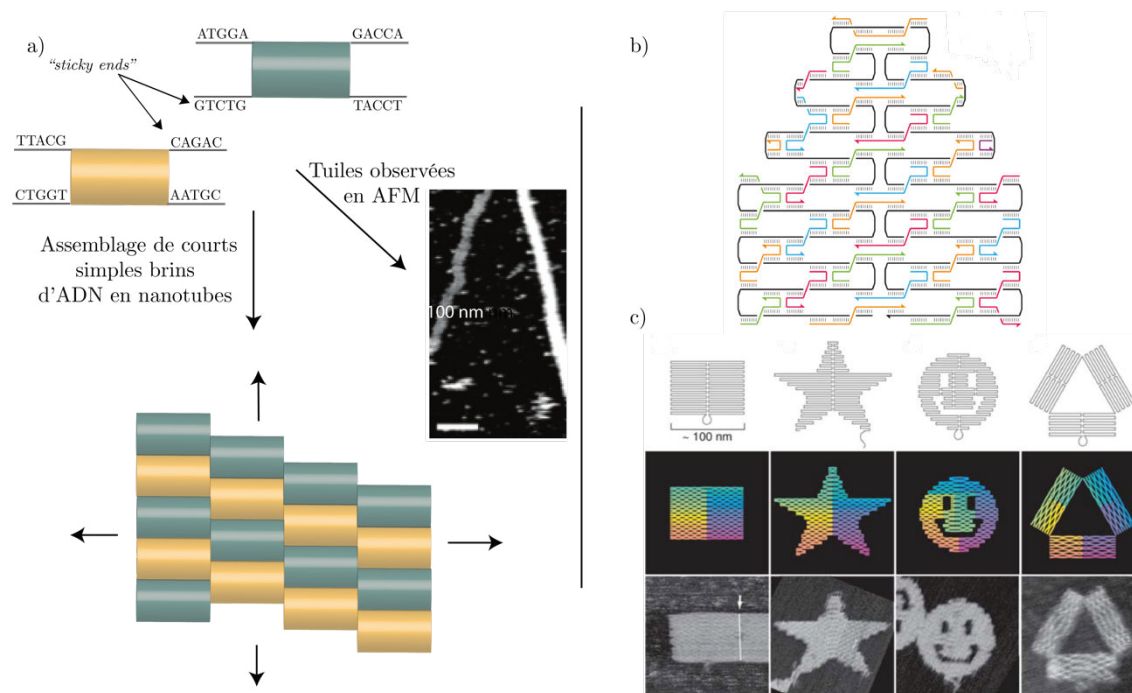


Figure 2. 7 : a) Formation de tuiles d'ADN à partir de deux doubles brins d'ADN différents portant des "sticky ends" complémentaires. b) Schéma d'une origami d'ADN où un long simple brin d'ADN (noir) est replié de manière programmée par son hybridation avec des nombreux simples brins d'ADN plus courts (en couleur). Figure adaptée.⁵⁴ c) Première ligne : différentes trames pour l'élaboration d'origamis d'ADN. Deuxième ligne : Index des courts simple brins d'ADN correspondants, montrant le chemin de repliement suivant les couleurs du spectre visible (le premier simple brin est rouge, le dernier est violet). Troisième ligne : Image d'AFM résultant des schémas correspondants. Figure adaptée.⁵⁴

2.1.1.3. Polymères supramoléculaires en interaction avec les acides nucléiques

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, l'intérêt croissant pour la transfection génique et la thérapie antisens encourage les chercheurs à comprendre comment interagir avec les acides nucléiques. Le développement de polymères supramoléculaires intégrant des ADN ou des ARN fonctionnels est ainsi devenu une thématique de recherche d'intérêt croissant. Les acides nucléiques sont des polyanions. Par conséquent, ces assemblages sont construits majoritairement selon des interactions électrostatiques. Nous pouvons les distinguer selon deux catégories. Les plus simples consistent en des assemblages supramoléculaires préformés, dont l'addition d'un acide nucléique ne viendra pas perturber la structure de l'édifice. Ces systèmes sont souvent organisés de manière hiérarchique mais jamais de manière coopérative. D'autres systèmes possèdent une structure directement influencée par la présence d'un acide nucléique, et se construisent autour de ceux-ci pour former de manière coopérative des architectures hiérarchiques. La taille de ces édifices dépend alors uniquement de celle de l'acide nucléique.

*Assemblage à structure indépendante de la présence d'acides nucléiques*Complexes d'acides nucléiques

Dans l'objectif de protéger les acides nucléiques, de nombreuses recherches ont été réalisées dans le but de les encapsuler en utilisant des molécules cationiques capables de former des complexes par interactions électrostatiques avec ces polyanions. Ces différents systèmes expliqués dans le chapitre 1 pour la transfection de siRNA, peuvent s'appliquer pour l'encapsulation plus générale d'acides nucléiques (Figure 2. 8).

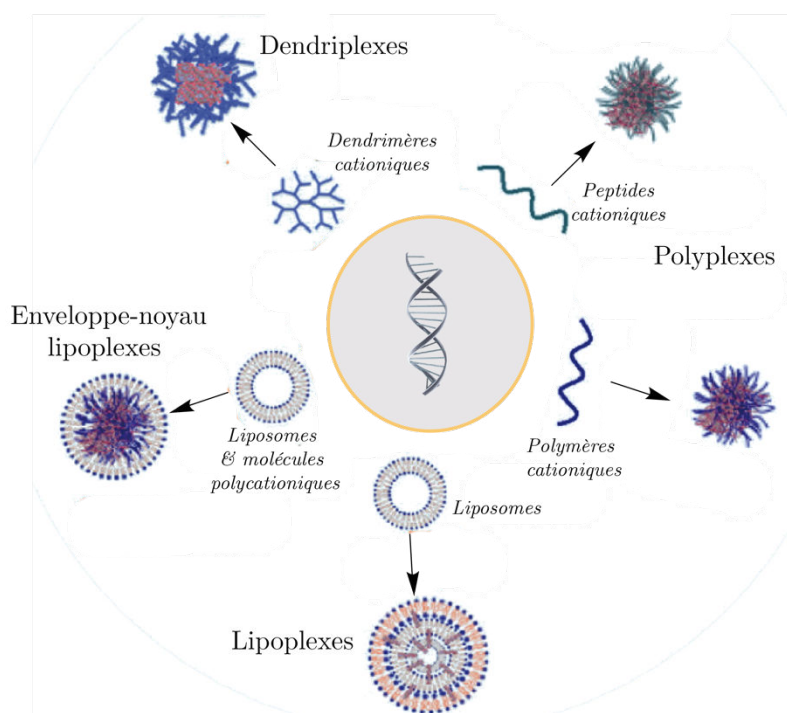


Figure 2. 8 : Différentes architectures de complexes formés avec des acides nucléiques. Figure adaptée.⁵⁵

Systèmes préorganisés

Les complexes d'acides nucléiques exposés précédemment ne présentent pas une structure organisée et définie. À l'inverse, d'autres systèmes préorganisés forment des architectures fibrillaires capables d'interagir avec des acides nucléiques. Un premier exemple est l'utilisation des benzenetricarboxamides cités *vide supra*, développés par le groupe de Meijer.⁵⁶ Les monomères de ces architectures sont constitués de trois parties (Figure 2. 9. a et b). Au centre, un motif benzenetricarboxamide permet l'empilement selon des interactions hydrogènes entre les fonctions amides et des interactions π - π entre les groupes aryles. Ces motifs sont reliés *via* des chaînes hydrophobes (alkyles, fluorées), permettant la protection du réseau de liaisons hydrogène, à des chaînes PEG induisant une solubilité du système. Enfin on retrouve aux extrémités de ces chaînes, diverses fonctions comme des ammoniums pour complexer des acides nucléiques comme les siRNA. La structure de l'assemblage n'est cependant pas modifiée lorsqu'elle interagit avec des siRNA. Par ailleurs, les chaînes PEG peuvent être fonctionnalisées par des fonctions fluorescentes (Cyanine 5) afin de suivre l'internalisation du système. Ce système versatile, s'est aussi révélé capable de transporter de petits composés hydrophobes.⁵⁶

Dans une autre étude, Lee a décrit une méthode pour former des nanostructures supramoléculaires préorganisées, constituées de longues chaînes polypeptidiques (Figure 2. 9. c et d).⁵⁷ Ces chaînes sont composées de plusieurs parties. La première partie est constituée de la répétition des résidus tryptophane-lysine-tryptophane-acide aspartique, créant un réseau de liaisons hydrogène conduisant à la formation de feuillets β et donc à la construction de l'édifice supramoléculaire. Cette première séquence est liée à une séquence dite « connectrice », composée de résidus sérine et glycine, qui confère un caractère flexible à la structure. Ensuite, huit résidus cationiques de lysines, permettent la complexation des siRNA. Enfin une nouvelle séquence connectrice relie un glucose à l'ensemble de la chaîne. Cette unité de sucre permet d'établir des liaisons avec la surface cellulaire à travers des interactions multivalentes. Ce système rappelle ainsi la structure d'un virus. L'assemblage a été caractérisé par TEM. Des expériences de transfection ont aussi été réalisées et ont montré l'aptitude de ces complexes à induire l'interférence par ARN. En effet, les siRNA sont en surface de l'édifice supramoléculaire et peuvent donc être libérés sans que l'assemblage supramoléculaire soit nécessairement défait.

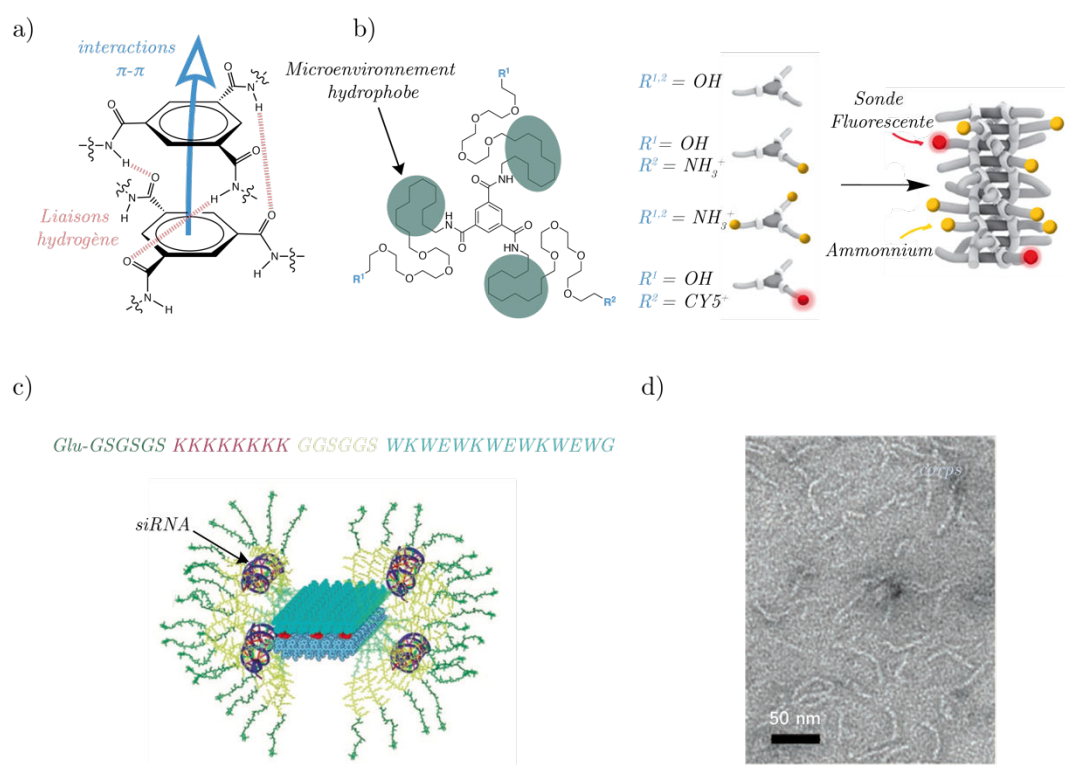


Figure 2. 9 : a) Liaisons hydrogène et interactions π - π mises en jeu par le motif benzenetricarboxamide. b) Exemple d'un monomère de benzenetricarboxamide présentant une chaîne hydrophobe/PEG fonctionnalisée par des groupements d'intérêts permettant la formation d'un polymère supramoléculaire versatile. c) Nanostructure préorganisée à partir d'une chaîne polypeptidique. d) Image TEM d'une nanostructure supramoléculaire formée à partir d'une longue chaîne polypeptidique présentée sur l'image c). Figures adaptées.^{57,56}

Assemblage dont la structure dépend de la présence d'acides nucléiques (« effet template »)

Les deux exemples précédents s'organisent donc de manière hiérarchique mais en aucun cas de manière coopérative. L'architecture de ces assemblages est définie par la structure primaire du polymère. La présence de l'acide nucléique n'induit aucune modification de cette structure et n'engendre donc aucun phénomène de coopérativité intermoléculaire. D'autres systèmes s'organisent de manière coopérative avec les acides nucléiques, limitant ainsi la taille des édifices à celle de l'acide nucléique. Il existe deux types de polymères supramoléculaires s'agencant de cette manière : ceux interagissant avec des acides nucléiques doubles brins *via* des interactions électrostatiques, et ceux interagissant avec des acides nucléiques simple brins à travers des liaisons hydrogène de type Watson-Crick.

Structures s'organisant autour d'acides nucléiques double brins

Trois exemples de virus artificiels ont été décrits. Ces structures sont toutes composées de chaînes peptidiques qui s'arrangent de manière hélicoïdale autour d'un ADN.⁵⁸⁻⁶⁰ Ces chaînes sont fonctionnalisées aux extrémités N et C-terminales. On distingue alors trois parties (**Figure 2. 10**):

- À l'extrémité N-terminale : un segment riche en amines protonnées pour interagir avec l'ADN.
- Un corps peptidique ayant la capacité de s'auto-assembler (feuilletés β , superhélices α). L'assemblage des unités protéiques, et le recrutement des acides nucléiques se font de manière coopérative.
- À l'extrémité C-terminale : une tête composée de chaînes peptidiques hydrophiles ou de motifs PEG pour solubiliser l'ensemble de l'édifice.

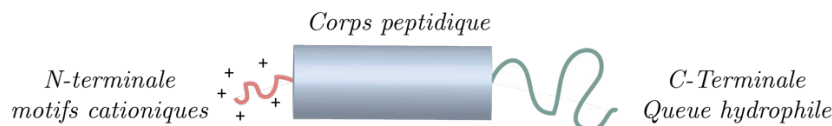


Figure 2. 10 : Structures des chaînes peptidiques fonctionnalisées pour l'élaboration de virus artificiels

Les structures de ces trois édifices sont décrites **Figure 2. 11**. Si les deux premières architectures développées, respectivement par le groupe de Stupp (**Figure 2. 11. a**) et celui de Vries (**Figure 2. 11. b**) sont composées de chaînes de plusieurs dizaines de résidus, celle développée par l'équipe de Chau est composée de courts peptides de 16 résidus. Ce court peptide s'autoassemble seul en nanofibres. Néanmoins, en présence d'ADN, des particules en forme de cocon se forment de manière hautement coopérative (**Figure 2. 11. c**).

Ces trois beaux exemples de virus artificiels présentent malheureusement le désavantage de complexer les ADN au cœur de leur architecture. Ainsi leur capacité à transférer des cellules avec du matériel génétique, lorsqu'elle a été reportée, n'est pas compétitive avec celle d'autres systèmes de transfection non viraux. Un véritable travail reste donc encore à réaliser quant à la dissociation de ce type de structures.

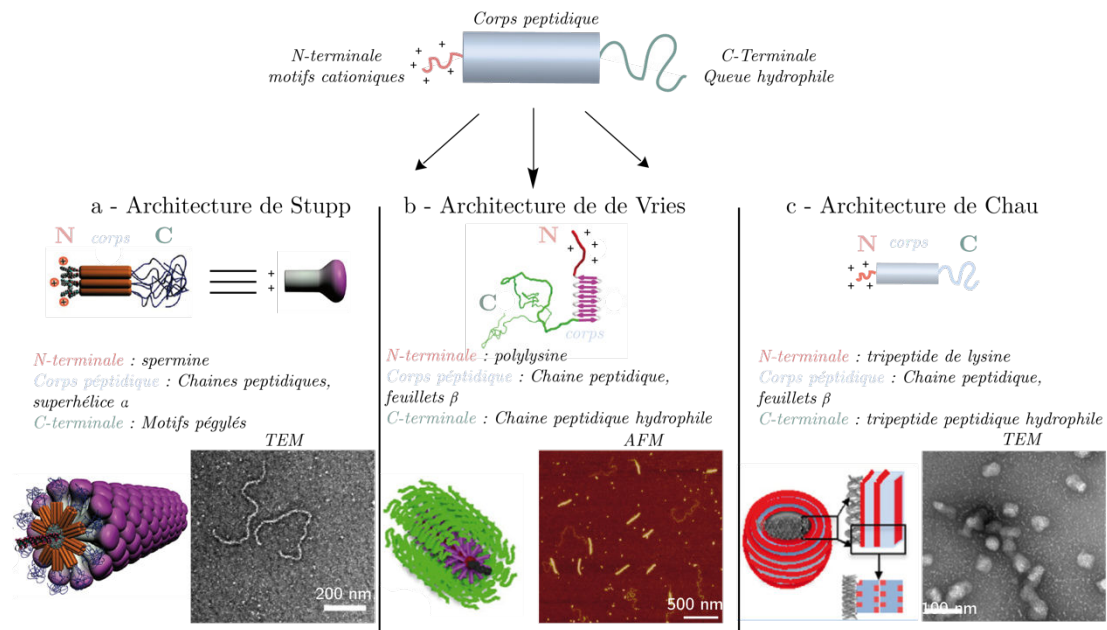


Figure 2. 11 : Structures, compositions et images de TEM ou AFM, de différents virus artificiels développés par les équipes de Stupp (a), de Vries (b), et Chau (c). Figure adaptée.^{55,58,60,61}

Structures s'organisant autour d'acides nucléiques simple brins

Certaines architectures supramoléculaires notamment développées par le groupe de Meijer,^{62,63} s'organisent, à l'image du TMV, autour d'un simple brin d'acide nucléique. Les monomères sont constitués d'une diamino triazine (complémentaire de la thymine), un chromophore et/ou d'un système π -conjugué et des chaînes pégylées. L'assemblage se fait alors de manière hiérarchique. Les différents monomères interagissent entre eux via un système π -conjugué, mais lorsque qu'ils sont placés en présence du simple brin d'oligothymine, ces monomères s'assemblent aussi avec ce dernier *via* des liaisons hydrogène de type Watson-Crick. L'acide nucléique favorise alors la construction de l'assemblage de manière hautement coopérative (Figure 2. 12).

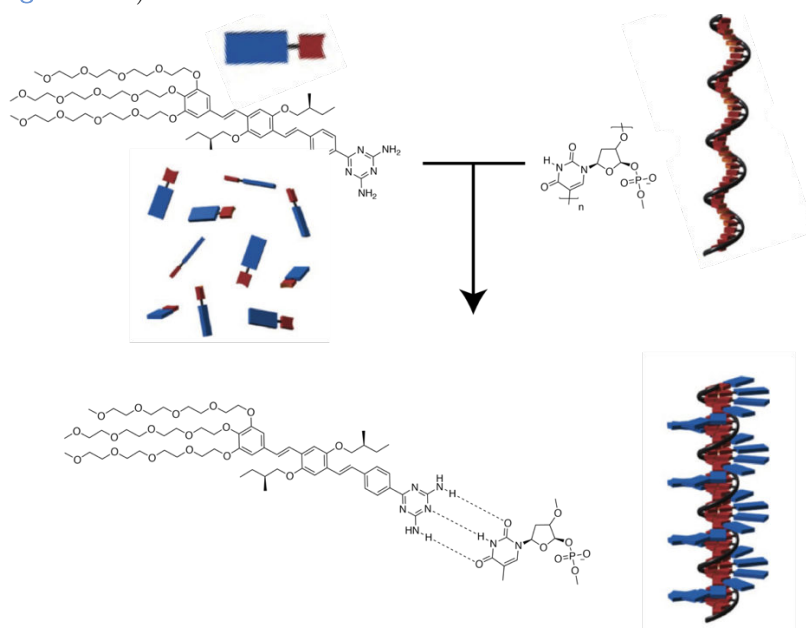


Figure 2. 12 : Architecture supramoléculaire d'oligomères π -conjugués autour d'un simple brin d'acide nucléique *via* des liaisons hydrogène de type Watson-Crick. Figure adaptée.⁶²

La taille de ce type d'architecture dépend donc uniquement de la taille de l'acide nucléique. À notre connaissance, le seul système dont la structure est organisée autour d'un acide nucléique mais dont la taille est indépendante du patron d'oligonucléotide, est celui proposé par l'équipe de Shimizu et Meijer (abordé *vide supra*, **Figure 2. 13. a**).^{50,51} Ces systèmes sont composés de monomères bolaamphiphiles qui interagissent avec deux simple brins d'acide oligoadénylyque. Ces brins peuvent alors s'organiser en quinconce autour des monomères bolaamphiphiles. La taille de l'édifice n'est à ce moment plus définie par la longueur du brin d'acide nucléique, mais est théoriquement infinie selon un mécanisme de type décalé (**Figure 2. 13. b**).

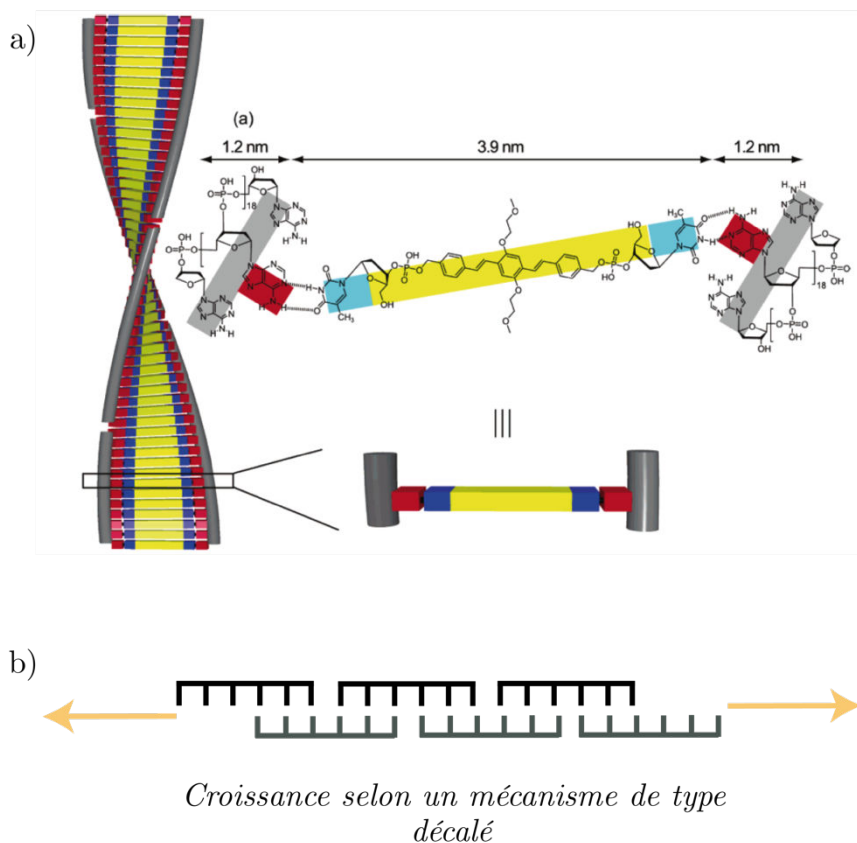


Figure 2. 13 : a) Structure proposée par le groupe de Shimizu du système composé de monomères bolaamphiphiles et de simple brins d'acides nucléiques. Figure reproduite.⁵¹ b) Mécanisme de croissance, supramoléculaire décalé.

Il est important de noter néanmoins que pour les deux derniers systèmes abordés les acides nucléiques utilisés ne comportent qu'un seul type de purines. Ils ne sont donc pas fonctionnels. De plus, si la longueur de l'architecture proposée par Shimizu n'est pas définie par celle de l'acide nucléique, sa largeur est strictement limitée par celle du monomère et des deux brins d'acides nucléiques.

À notre connaissance, il existe donc des polymères supramoléculaires organisés et interagissant avec des acides nucléiques :

- dont la structure (largeur et longueur) est définie par la structure primaire du polymère,
- dont la structure (largeur et longueur) est définie par l'acide nucléique,
- dont la largeur est définie par la largeur de l'acide nucléique et du monomère mais dont la longueur est théoriquement infinie.

Cependant aucun système comportant des acides nucléiques fonctionnels et dont l'architecture se définit uniquement de manière hiérarchique et coopérative n'a, à notre connaissance, été décrit.

2.1.1.4. *Polymères supramoléculaires à base de cyclodextrines*

Nous avons traité précédemment différents exemples de polymères supramoléculaires dont la formation était gouvernée par des interactions de type π -conjuguées, des liaisons hydrogène ou bien des interactions électrostatiques. Il existe cependant un autre type d'interactions utiles à l'élaboration de polymères supramoléculaires dans l'eau : il s'agit des interactions hôte-invité. Ces interactions sont la conséquence d'une somme de liaisons faibles entre un hôte et un invité. Les hôtes les plus courants en solution aqueuse sont les cucurbituriles,⁶⁴ les calixarènes,⁶⁵ les pillararènes,⁶⁶ ou bien les cyclodextrines.⁶⁷ Dans cette partie, nous allons traiter les polymères supramoléculaires construits avec des cyclodextrines.

Structure, nomenclature et propriétés des cyclodextrine

Les cyclodextrines ont été pour la première fois isolées et cristallisées en 1891 par Villiers. En étudiant la dégradation de l'amidon par la bactérie *Bacillus amylobacter*, Villiers met en évidence deux sous-produits aux propriétés physico-chimiques proches de la cellulose.⁶⁸ Les moyens de l'époque ne lui permirent pas de définir la structure de ces molécules, qui étaient vraisemblablement l' α et la β -CD. En 1936 Freudenberg décrit pour la première fois la structure cyclique des cyclodextrines.⁶⁹ Quelques années plus tard les études de French permettront d'établir leur structure chimique exacte.⁷⁰

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques composés de six à plusieurs centaines de motifs glucopyranoses (conformation 4C_1) liés entre eux par des liaisons α -(1,4). Les cyclodextrines, les plus fréquemment utilisées, sont les cyclodextrines α (6 unités), β (7 unités), et γ (8 unités). Elles possèdent une forme conique tronquée, présentant une cavité. On distingue deux cols sur une cyclodextrine : le plus étroit est appelé le col primaire, il est constitué des fonctions hydroxyles primaires ; le plus large est appelé col secondaire, il est constitué des fonctions hydroxyles secondaires ([Figure 2. 14](#)).

La nomenclature utilisée pour les cyclodextrines est similaire à celle utilisée pour les hexoses. Ainsi, chaque atome d'une unité de sucre de la cyclodextrine est numéroté en partant du carbone anomère (C_1) portant l'hydrogène (H_1) correspondant, jusqu'au carbone (C_6) portant l'alcool primaire de l'unité de sucre. Les différentes unités des CD sont ensuite nommées par ordre alphabétique de A à F pour l' α -CD, de A à G pour la β -CD, et de A à H pour la γ -CD. Lorsqu'une CD est fonctionnalisée, l'unité portant la fonction est nommée A. Nous numérotions ensuite les unités en tournant dans le sens antihoraire (vues du col primaire), c'est-à-dire dans le sens des liaisons α -(1,4).

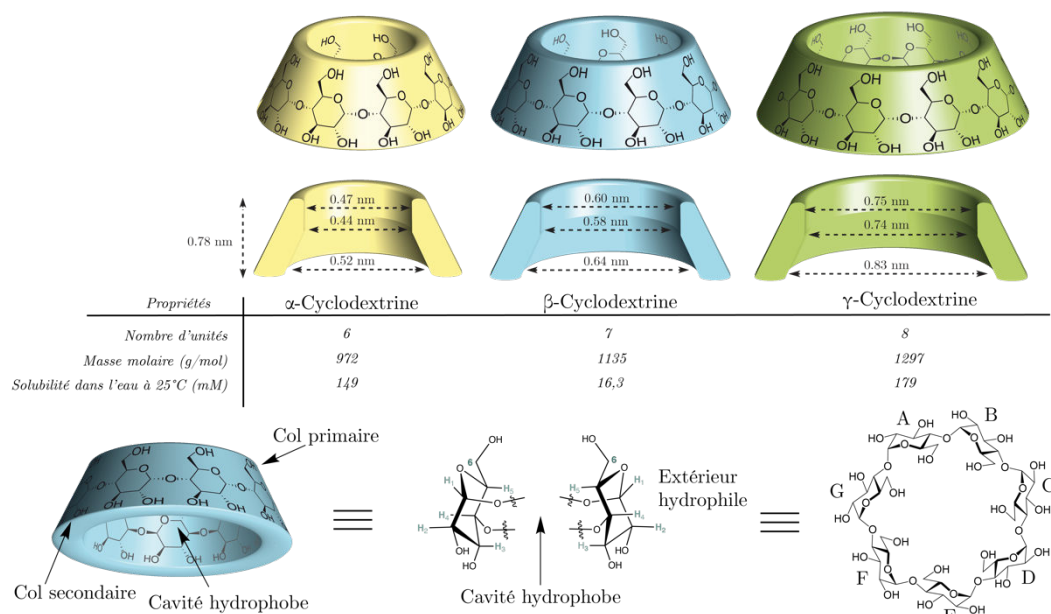


Figure 2. 14 : Caractéristiques physico-chimiques et nomenclature des cyclodextrines α , β , et γ

De par la présence des fonctions hydroxyles dirigées vers l'extérieur de la cavité, les cyclodextrines présentent un caractère hydrophile et sont donc solubles dans l'eau. Néanmoins, les deux hydroxyles du col secondaire, de par leur proximité, interagissent au travers d'un large réseau de liaisons hydrogène intramoléculaires. Dans le cas de la β -CD, la géométrie de la cavité permet une bonne stabilisation de ce réseau et défavorise ainsi l'établissement de liaisons intermoléculaires avec des molécules d'eau. En conséquence, la solubilité de la β -CD est bien inférieure à celle de l' α ou de la γ -CD.

D'autre part, les carbones portant les hydrogènes H_3 et H_5 , pointant vers l'intérieur de la cavité, confèrent aux cyclodextrines un caractère apolaire, permettant l'accommodation, dans l'eau, de molécules hydrophobes. Cette propriété clef des cyclodextrines a permis leur utilisation dans de nombreux domaines comme la cosmétique, la pharmaceutique, l'agroalimentaire,⁷¹ mais aussi dans celui de la science des polymères. Comme nous l'avons vu, les cyclodextrines ont notamment été utilisées pour former des polymères auto-réparants, ou des hydrogels.^{16,67} De plus, composées de plusieurs unités de glucose, les cyclodextrines sont à la fois biocompatibles et biodégradables, permettant l'élaboration de matériaux bioactifs.⁷²

Complexes d'inclusion

Comme mentionné précédemment, les cyclodextrines sont capables de former des complexes d'inclusion dans l'eau avec des molécules hydrophobes, appelées invités. Les différentes forces responsables de la formation de ce type de complexes font toujours débat au sein de la communauté scientifique.⁷³ Néanmoins, en plus de l'aspect stérique (la taille de l'invité doit concorder avec celle de la cavité), on s'accorde à dire qu'il existe deux principaux phénomènes conférant aux cyclodextrines cette propriété : l'effet hydrophobe et les forces de van der Waals.

Forces de van der Waals

Trois types de forces de van der Waals interviennent dans la formation des complexes d'inclusion de cyclodextrines : les forces de London, de Debye et de Keesom. Ce sont néanmoins ces dernières (interactions dipôle-dipôle) qui sont les plus importantes dans le cas d'invités présentant un moment dipolaire. Les cyclodextrines sont des molécules polarisées dont le moment dipolaire est dirigé du col secondaire vers le col primaire.⁷⁴ Ainsi, plus les invités présenteront un moment dipolaire important, plus l'énergie d'interaction résultante sera grande (**Figure 2. 15. a**).

Effet hydrophobe

Nous avons vu dans le chapitre 1 en quoi l'effet hydrophobe consistait. Cet effet est notamment présent lors de la formation des complexes d'inclusion de cyclodextrines. Lorsqu'une cyclodextrine est solubilisée dans l'eau, l'organisation des molécules d'eau au sein de la cavité hydrophobe est déstabilisée. En effet, l'eau interagit mal avec la cavité de la cyclodextrine. De la même manière, l'interaction entre les molécules d'eau et un invité hydrophobe est défavorable. Lorsqu'un invité hydrophobe pénètre dans la cavité d'une cyclodextrine, les molécules d'eau autour de l'invité et à l'intérieur de la cavité se réarrangent selon un bilan enthalpique et entropique, énergétiquement favorable (**Figure 2. 15. b**).⁷³

Exemples d'invités

La formation de complexes d'inclusion avec des cyclodextrines a été étudiée avec de nombreux invités. Rekharsky et Inoue ont recensé un très grand nombre de constantes d'affinité relatives aux cyclodextrines α , β , et γ , avec plusieurs dizaines d'invités.⁷³ Les invités les plus utilisés avec la cyclodextrine α sont les groupements phényles dont la constante d'affinité varie en fonction des groupements substitués entre 10^3 et 10^4 M^{-1} . Les cyclodextrines α sont aussi capables d'accueillir des azobenzènes ($K=10^4 \text{ M}^{-1}$), utilisés notamment pour leur propriété de photosensibilité, des naphthalènes ($K=10^2\text{-}10^3 \text{ M}^{-1}$) ou bien des chaînes alkyles. Pour les cyclodextrines β , les invités les plus utilisés sont les groupements adamantyles dont la constante d'affinité varie de 10^4 jusqu'à $10^{5.04} \text{ M}^{-1}$ pour l'adamantylammonium. Les complexes β -CD-ferrocène ($K=10^{3.7} \text{ M}^{-1}$) sont aussi fréquemment utilisés pour leur propriété d'oxydo-réduction permettant d'avoir des systèmes modulables : l'oxydation du ferrocène mène à la dissociation du complexe.

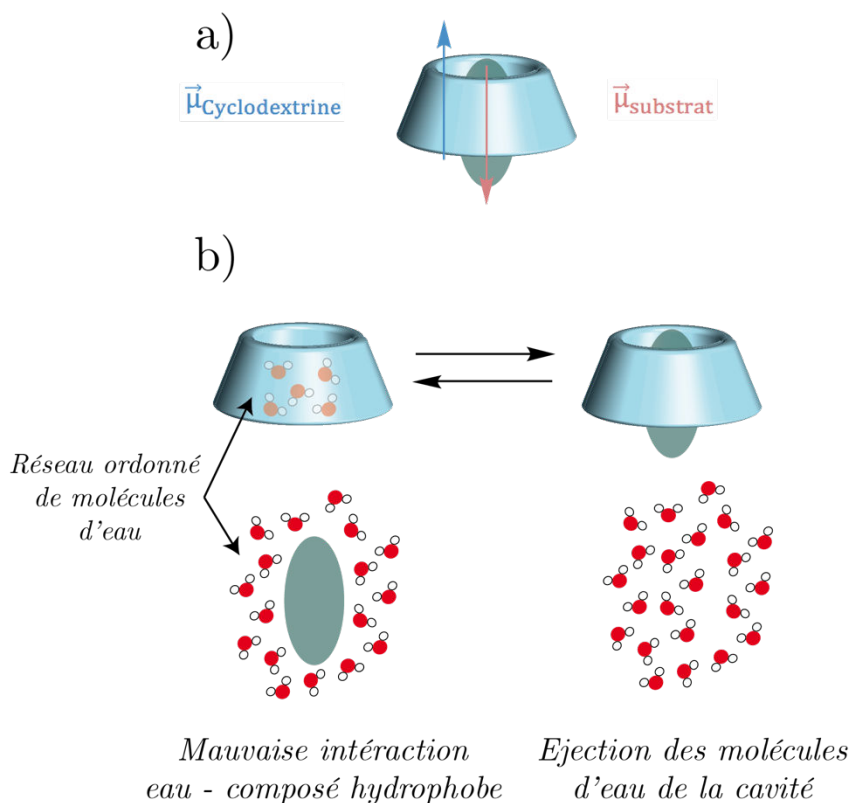


Figure 2. 15 : a) Interactions dipôle-dipôle mises en jeu dans la formation du complexe d'inclusion. b) Effet hydrophobe responsable de la formation du complexe d'inclusion

Méthodes de caractérisation des polymères supramoléculaires à base de cyclodextrines

La nature dynamique des polymères supramoléculaires les rend difficiles à caractériser complètement. Les méthodes de caractérisation de polymères classiques sont souvent inadaptées puisqu'il ne s'agit pas d'identifier la structure d'une seule longue molécule, mais d'un ensemble de monomères liés entre eux par des interactions non covalentes. Plusieurs éléments peuvent mettre en lumière la formation d'assemblages (Tableau 2. 2). Tout d'abord, dans le cas des cyclodextrines, le sens de l'inclusion de l'invité dans la cavité de la cyclodextrine doit être déterminé. Ensuite, la constante d'affinité (K) de l'invité pour la cavité de la cyclodextrine, le degré de polymérisation (DP), et la taille des objets formés peuvent être identifiés par diverses techniques. Enfin, l'observation par microscopie permet de conclure quant à la forme du polymère supramoléculaire.

Tableau 2. 2 : Méthodes d'analyse classiques des polymères supramoléculaires

Eléments à caractériser	Méthodes
- Inclusion	- RMN-ROESY, RMN- ¹ H
- Constante d'affinité (K)	- RMN- ¹ H, ITC
- Degré de polymérisation (DP)	- RMN-DOSY, MS, SANS
- Taille	- RMN-DOSY, DLS, VPO, SANS
- Forme	- TEM, Cryo-TEM, AFM, SANS

RMN-ROESY

En spectroscopie RMN, l'effet Overhauser nucléaire dit effet NOE, naît de l'interaction entre deux spins d'atomes différents, proches dans l'espace. À l'inverse des couplages scalaires classiques qui se font à travers les liaisons chimiques, cet effet est lié à l'interaction dipôle-dipôle des atomes (d'hydrogène généralement) à travers l'espace (distance limitée à 6 Å).

Cette interaction dipolaire a un effet sur la relaxation des spins, et influe sur l'intégration de ces atomes couplés entre eux. Cette influence peut être mesurée par RMN et permet d'identifier les atomes proches dans l'espace. Souvent effectuées en deux dimensions, ces expériences sont appelées RMN-NOESY ou RMN-ROESY. Le principe de ces deux expériences est le même. La RMN-ROESY est utilisée à la place de la RMN-NOESY pour certaines molécules dont le temps de corrélation rotationnelle (τ_c) tombe dans une fourchette de valeur où l'effet NOE n'est plus détectable par RMN-NOESY (Figure 2. 16). En effet l'intensité de la NOE dépend de la fréquence du spectromètre (ω), et du temps de corrélation rotationnelle qui est directement lié à la masse moléculaire. Ainsi, la RMN-NOESY, effectuée sur un 600 MHz, n'est pas adaptée à l'étude des molécules de masse moléculaire allant de 800-1500 g.mol⁻¹.⁷⁵

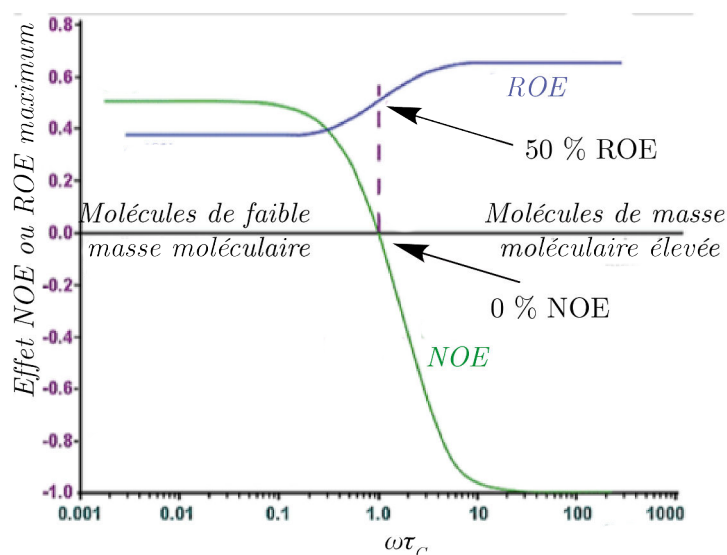


Figure 2. 16 : Effet NOE ou ROE maximum en fonction du temps de corrélation rotationnelle. Figure adaptée.⁷⁶

Comme nous l'avons vu précédemment, les protons H₃ et H₅ des cyclodextrines sont dirigés vers l'intérieur de la cavité. L'étude en RMN-ROESY des corrélations que ces protons peuvent avoir avec ceux de l'invité, permettront de confirmer l'inclusion de l'invité hydrophobe et d'en établir le sens.

RMN-¹H

La RMN-¹H peut mettre en évidence la formation d'édifices supramoléculaires. Tout d'abord, lorsqu'un invité est inclus dans la cavité de la cyclodextrine, l'environnement magnétique de celui-ci est modifié ; alors que l'invité était préalablement au sein d'un environnement aqueux, il se retrouve désormais dans une cavité hydrophobe. En conséquence, les déplacements chimiques des protons de l'invité sont modifiés.

Si l'on considère une complexation complète $\Delta\delta$ et une complexation partielle $\Delta\delta_C$ à une concentration donnée C, il est possible d'avoir une idée approximative du degré de polymérisation selon la relation suivante :⁷⁷

$$DP = \frac{1}{1 - \Delta\delta_C/\Delta\delta}$$

De plus, on observe un élargissement des signaux lorsque les monomères forment des assemblages supramoléculaires. En effet, lorsque la taille d'une espèce croît, le temps de relaxation transversale spin-spin (T_2) diminue en induisant un élargissement du signal.

ITC (Titration calorimétrique isotherme)

L'ITC est une technique qui permet l'étude quantitative des interactions entre deux molécules. Cette méthode consiste à mesurer la chaleur libérée ou bien absorbée par l'association ou la dissociation de ces deux composés.

Le système est composé de deux cellules dans une enceinte calorifugée. Lorsque l'on étudie par exemple l'association de deux composés A et B, une solution de A est placée dans l'une des cellules, alors que l'autre cellule est remplie d'eau et sert de référence. La température de ces deux cellules est maintenue égale. Au-dessus de la cellule contenant le composé A, une microseringue contenant une solution de B, est placée. Un volume donné de B est alors ajouté dans la cellule contenant A. Le dégagement ou l'absorption de chaleur résultant de l'association des composés A et B est alors compensé par l'appareil *via* un courant électrique. En étudiant la variation de ce courant, il est possible de remonter à divers paramètres thermodynamiques comme la constante d'affinité entre A et B.

Il est ainsi possible de caractériser la constante d'affinité d'un hôte pour son invité. De la même manière il est possible d'étudier la dissociation d'un polymère supramoléculaire, en plaçant de l'eau dans la cellule calorifugée et en y ajoutant une solution mère de ce polymère depuis la microseringue, induisant une dilution du système.

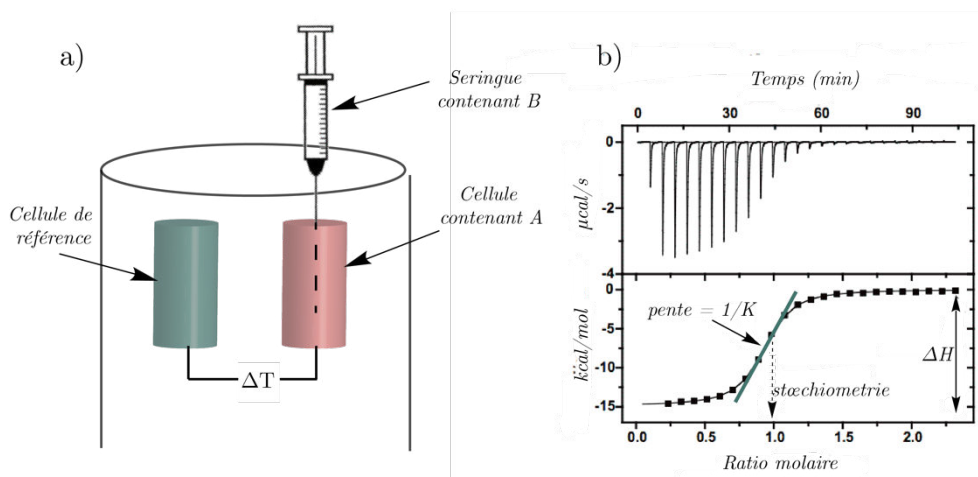


Figure 2.17 : a) Principe d'une expérience d'ITC permettant de caractériser l'association de deux composés A et B. b) Résultats obtenus pour remonter à divers paramètres thermodynamiques

RMN-DOSY

La RMN-DOSY à deux dimensions est une méthode qui permet de mesurer le coefficient de diffusion des espèces en solution. L'auto-diffusion en solution peut être décrite comme le mouvement aléatoire de translation des molécules. Elle dépend de plusieurs paramètres comme la température, la viscosité du solvant, et le rayon hydrodynamique des espèces. On peut l'exprimer selon l'équation de Stokes-Einstein.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$$

Avec :

- D : Coefficient de diffusion ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)
- k : Constante de Boltzmann ($\text{J}\cdot\text{K}^{-1}$)
- T : Température en Kelvin (K)
- η : Viscosité du solvant ($\text{Pa}\cdot\text{s}$)
- R_h : Rayon hydrodynamique (m)

L'expérience de RMN-DOSY commence par une impulsion magnétique de 90° , permettant de placer tous les spins dans le même sens. Un gradient de champ pulsé d'une durée δ est ensuite appliqué le long du tube RMN et induit un déphasage de l'aimantation globale. Autrement dit, l'impulsion magnétique appliquée sera différente en fonction de la position verticale de la molécule dans le tube RMN. Après une durée de $\Delta/2$, appelée délai de diffusion, une impulsion magnétique de 180° permet d'inverser l'aimantation. Après un nouveau délai de diffusion $\Delta/2$, un nouveau gradient de champ pulsé identique au premier permet de rétablir le phasage. L'enregistrement du signal est alors réalisé et dans le cas où il n'y a pas eu de diffusion, l'écho de spin reste le même qu'au début de l'expérience (**Figure 2. 18. a**).

Lorsqu'il y a un phénomène de diffusion, les molécules se déplacent dans le tube et le deuxième gradient de champ pulsé ne permet pas le rephasage, entraînant une diminution du signal enregistré (**Figure 2. 18. b**). Cette diminution de l'intensité étant fonction du coefficient de diffusion, il est possible en réalisant plusieurs expériences et en modifiant seulement le gradient mais en gardant les durées δ et Δ constantes, de remonter à ce coefficient. La relation liant l'intensité et le coefficient de diffusion est la suivante :

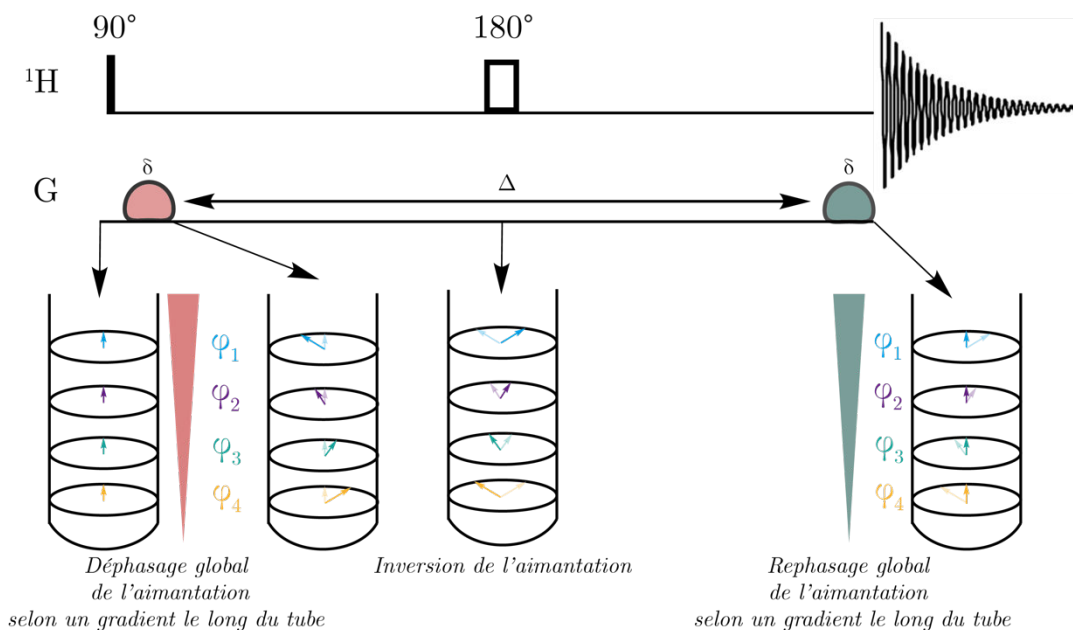
$$I = I_0 e^{(-D\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \frac{\delta}{3}))}$$

Avec :

- I : intensité ou intégrale d'un signal
- g : force des gradients (T^{-2})
- Δ : délai de diffusion (s)
- δ : durée de l'impulsion du gradient (s)
- D : coefficient de diffusion ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)
- γ : rapport gyromagnétique ($\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{T}^{-1}$)

Il est donc possible, en travaillant à température constante, et dans le même solvant, de remonter au rayon hydrodynamique des espèces en solution et donc au degré de polymérisation à partir du coefficient de diffusion.

a - Expérience de RMN-DOSY sans diffusion



b - Expérience de RMN-DOSY avec diffusion

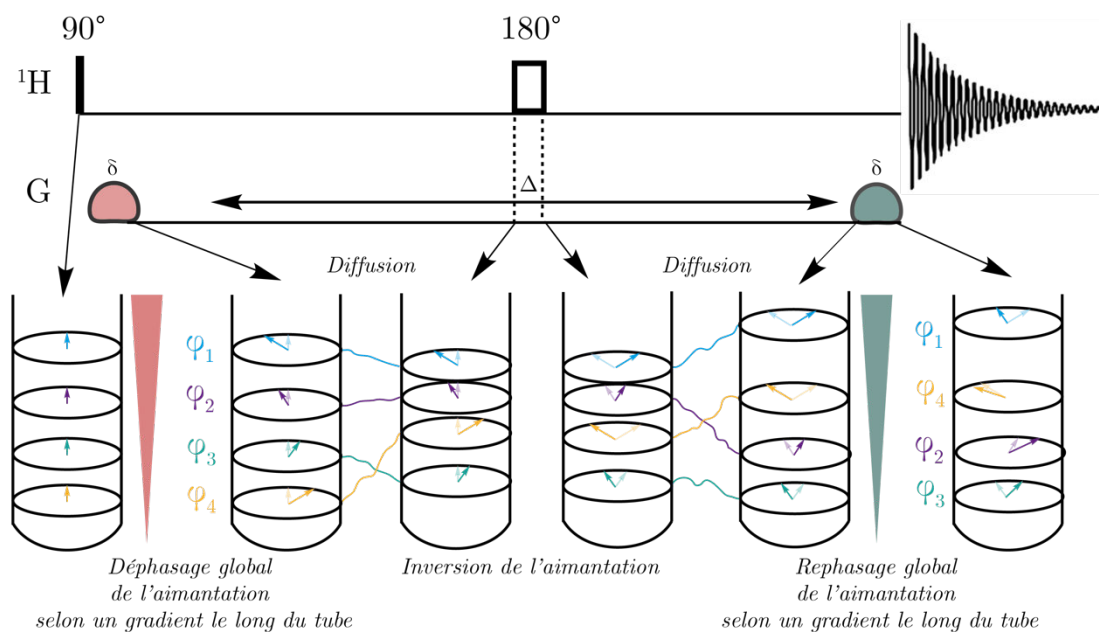


Figure 2. 18 : Expérience de RMN-DOSY sans diffusion (a) et avec diffusion (b)

Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse a été beaucoup utilisée pour la caractérisation chimique de polymères. Malheureusement, l'analyse de la masse molaire de longues molécules comme les polymères ou les biomolécules reste difficile de par leur faible volatilité et leur instabilité thermique. L'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF utilisant une méthode douce d'ionisation a permis de résoudre ce problème. Néanmoins, l'utilisation de cette technique reste un défi lorsqu'il s'agit de polymères supramoléculaires puisque les monomères sont liés entre eux par des liaisons non covalentes. Il est souvent possible de n'observer que des objets de petites tailles, bien qu'il soit parfois possible de caractériser des oligomères supramoléculaires, et d'en déterminer de cette manière, le degré de polymérisation.⁷⁷

Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La DLS est une méthode d'analyse qui utilise la propriété de diffusion des molécules en solution pour mesurer la taille moyenne des particules. Les molécules en solution diffusent selon un mouvement brownien. Plus une particule est large, plus elle diffuse lentement. À l'inverse, les petites particules diffusent plus rapidement. La DLS étudie ce mouvement *via* l'utilisation d'un laser qui illumine l'échantillon liquide et analyse la fluctuation de l'intensité du signal après son passage au travers du liquide contenant les particules. Cette méthode ne donne néanmoins qu'une valeur approchée de la taille des espèces pour une forme sphérique. De plus, cette méthode est beaucoup plus sensible à la présence d'espèces de grande taille ce qui écrante parfois la présence de petites espèces en solution. La présence d'agrégats de cyclodextrines par exemple est un vrai problème pour l'analyse de polymères supramoléculaires par DLS.

Les cyclodextrines sont en effet réputées pour la formation d'agrégats qu'elles produisent grâce à un réseau de liaisons hydrogène entre les cols secondaires des cyclodextrines.⁷¹ La filtration de ces agrégats permet de s'en affranchir. Néanmoins, il a été montré que les β -CD présentaient une tendance à reformer ces agrégats dans le temps. La DLS reste donc une méthode assez peu adaptée à la caractérisation de polymères supramoléculaires à base de β -CD.⁷⁸

Osmométrie à pression de vapeur (VPO)

La détermination de la masse molaire moyenne par VPO repose sur le principe suivant : la pression de vapeur d'une solution constituée d'un solvant et d'un composé non volatile est plus basse que lorsque le solvant est pur. Cette méthode a beaucoup été utilisée, notamment par l'équipe de Harada pour déterminer la masse molaire moyenne de polymères supramoléculaires.⁷⁷ En pratique, lorsque cette technique est utilisée pour la caractérisation de polymères covalents, plusieurs expériences sont réalisées à différentes concentrations initiales en monomère. Par extrapolation, à concentration nulle, il est possible de s'affranchir du bruit résultant des interactions supramoléculaires entre les différentes chaînes de polymères. Cette correction est impossible dans le cas des polymères supramoléculaires. Ainsi, les valeurs obtenues pour les polymères supramoléculaires sont celles de masses molaires apparentes, et présentent une erreur méconnue, notamment à forte concentration.

Diffusion de neutrons aux petits angles (SANS)

Avec une longueur d'onde d'environ 1 nm, la diffusion de neutrons aux petits angles est une technique particulièrement adaptée à la détermination de la taille et de la structure globale des polymères dans différents environnements et notamment en solution aqueuse. L'interaction entre un faisceau de neutrons et un échantillon contenant les molécules à analyser entraîne une diffusion des neutrons. Les rayons diffusés apparaissent sur le récepteur sous la forme d'une tache. L'éloignement de cette tache par rapport au centre du récepteur et l'intensité diffusée sont alors mesurés. Le paramètre essentiel d'un appareil de diffusion de neutrons aux petits angles est le module du vecteur de diffusion q , fonction de l'angle de déviation du rayon incident.

$$q = \frac{4\pi \sin(\theta/2)}{\lambda}$$

Avec :

θ : angle de déviation du rayon incident (rad)

λ : longueur d'onde du rayonnement (m)

L'intensité mesurée en fonction de q permet d'obtenir la section efficace macroscopique des entités analysées. Cette section efficace permet ensuite de remonter à la taille et à la forme des objets. La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) fonctionne de la même manière que la SANS, mettant en jeu cette fois des rayons X.

Microscopie

Différentes méthodes de microscopie existent et permettent de caractériser la forme des polymères supramoléculaires comme la microscopie à force atomique (AFM) et la microscopie électronique en transmission (TEM).

L'AFM est une technique d'analyse qui permet de visualiser la topographie en surface d'un échantillon. L'appareil est constitué d'une sonde locale (en forme de pointe très fine) qui va balayer la surface de l'échantillon, en oscillant à une fréquence propre, permettant ainsi d'en dresser sa cartographie.

La TEM est une technique de microscopie mettant en jeu un faisceau d'électrons transmis à travers un échantillon. L'interaction entre les électrons et l'échantillon donne alors naissance à une image électronique dont la résolution peut atteindre l'angström. Cette image est ensuite traduite en image optique.

Le principal problème de ces deux techniques pour la caractérisation de polymères supramoléculaires en solution aqueuse est l'adsorption initiale sur un support solide impliquant l'évaporation du solvant et une modification potentielle de l'organisation des molécules entre elles. Une autre méthode permet de s'affranchir de l'évaporation du solvant. Il s'agit de la Cryo-TEM. Cette méthode est en tout point similaire à la TEM, excepté la préparation de l'échantillon. En effet en Cryo-TEM, l'échantillon est cryofixé en étant plongé dans de l'éthane liquide. L'échantillon est ainsi congelé en évitant tout phénomène de cristallisation et permet l'observation des espèces telles qu'elles existent en solution. Malheureusement, la résolution de la Cryo-TEM est inférieure à celle de la TEM. La concentration des faisceaux d'électrons sur l'échantillon peut entraîner la fonte de celle-ci. Il est ainsi difficile d'obtenir une résolution inférieure à celle du nanomètre. Cette méthode reste néanmoins la plus adaptée avec la SANS,

pour la caractérisation de polymères supramoléculaires dans l'eau. L'utilisation de la Cryo-TEM sera développée dans le chapitre 3.

Etat de l'art de polymères supramoléculaires à base de cyclodextrines

La capacité des cyclodextrines à former des complexes d'inclusions a été beaucoup utilisée pour l'élaboration de polymères supramoléculaires dans l'eau. Nous allons en voir quelques exemples en les classant selon leur type (**Figure 2. 19**). Nous développerons ici, les polymères de cyclodextrine de type AA-BB puis de type AB.

a - Polymères de type AA



b - Polymères de type AA-BB



c - Polymères de type AB



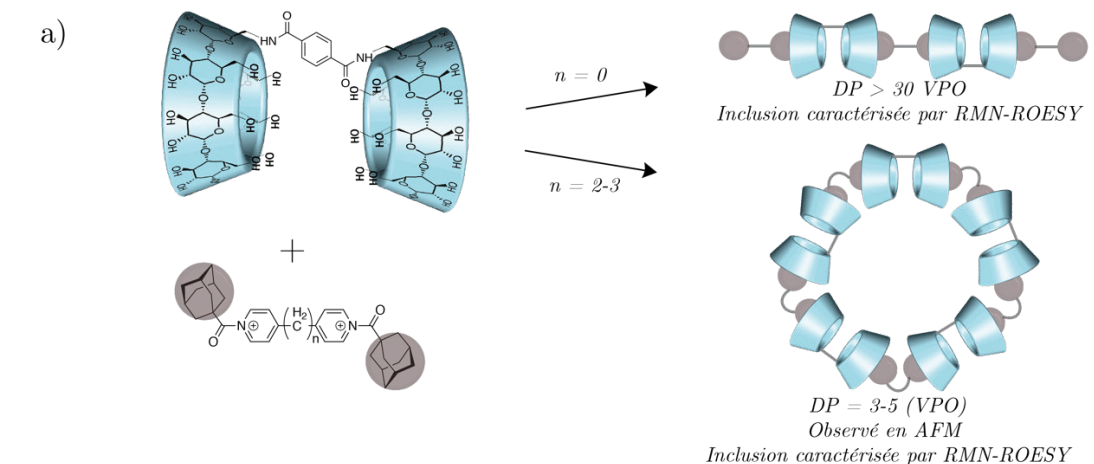
Figure 2. 19 : Illustration schématique des différents types de polymères AA (a), AA-BB (b) et AB (c)

Polymères supramoléculaires de type AA-BB

L'équipe de Harada a décrit un assemblage composé de deux dimères ditopiques, l'un composé de deux β -CD et l'autre de deux groupements adamantyles (ratio 1 : 1).⁷⁹ Il a été observé que la rigidité du bras, reliant les deux adamantyles, influait sur la forme des espèces. Lorsque ce dernier est souple, des oligomères cycliques sont obtenus. La masse molaire de ces espèces, déterminée par VPO (10 000 - 15 000 g.mol⁻¹), correspond à un DP de 3 à 5 dimères de chaque type. Afin de s'affranchir de cette cyclisation, empêchant la formation de longs polymères supramoléculaires, le bras reliant les deux adamantyles a été remplacé par un motif plus rigide conduisant à la formation de polymères supramoléculaires dont le DP, mesuré par VPO, est supérieur à 30. Bien que l'inclusion de l'adamantyle ait été prouvée par RMN ROESY, la forme des espèces n'a pas été caractérisée (**Figure 2. 20. a**).

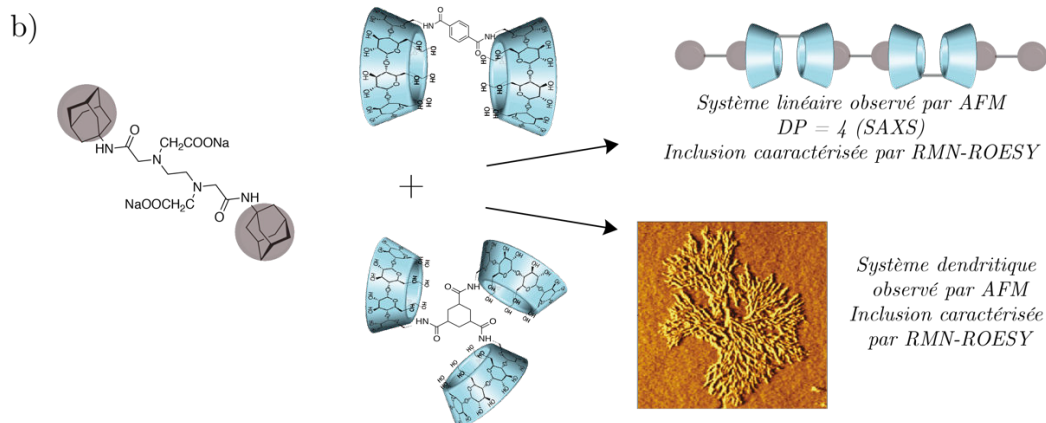
Un assemblage similaire a été développé par Tato composé de dimères d'adamantyles et de dimères ou trimères de β -CD. L'inclusion des groupements adamantyles a aussi été caractérisée par RMN-ROESY. Lorsqu'un dimère de β -CD a été utilisé, des objets de formes linéaires ont été observés par AFM. Cependant, lorsque les dimères de β -CD ont été remplacés par des trimères, des objets de forme dendritique ont été observés.⁸⁰ Tato a ensuite montré dans une autre étude où ce même système a été caractérisé par SAXS (small-angle X-ray) que le degré de polymérisation était de 8 (4 dimères de chaque espèce). L'hypothèse avancée pour justifier ce faible degré de polymérisation est l'agrégation observée des dimères d'adamantyles (**Figure 2. 20. b**).⁸¹

L'équipe de Zhu a aussi développé un système basé sur des dimères ditopiques de β -CD reliés cette fois par une chaîne alkyle et deux triazoles. Ces dimères ont été formulés avec d'autres dimères ditopiques, composés de deux ferrocènes, reliés par une chaîne de polyamines. Cette chaîne cationique a été introduite afin de réaliser des expériences de transfection.⁸² La taille des espèces formées a été caractérisée par DLS (10-100 nm) sans donner d'indication sur la forme des espèces. Si l'inclusion du ferrocène a été montrée par RMN-ROESY, on peut se poser la question d'une inclusion possible des triazoles ou de la chaîne alkyle dans la cavité. Aucune RMN-1H ou RMN-ROESY réalisée dans l'eau ne permet d'écarter cette hypothèse (Figure 2. 20. c). De même, Ritter a décrit l'assemblage de deux dimères ditopiques, dont les bras composés de triazoles, lient deux adamantyles et deux β -CD. L'assemblage a été caractérisé par DLS.⁸³

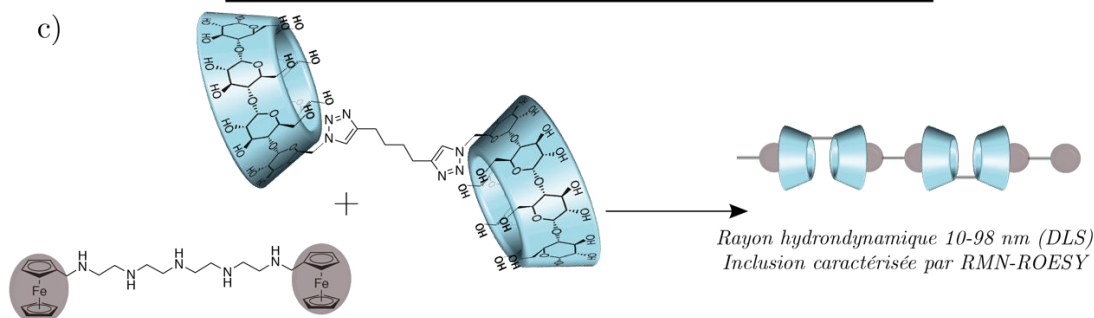


Problème observé : Cyclisation. Solution : bras rigide

Problèmes non abordés : Agrégation des dimères d'adamantyles, Polymères linéaires non observés par AFM



Problèmes observés : Agrégation des dimères d'adamantyles, faibles DP en solution



Problème non abordé : "tumbling"

Figure 2. 20 : Systèmes de polymères supramoléculaires à base de cyclodextrines de type AA-BB décrit par les équipes de Harada (a), Tato (b), et Zhu (c)

En effet, différentes études réalisées sur des dimères de cyclodextrines ont montré par RMN-ROESY qu'un bras hydrophobe entre deux CD pouvait s'auto-inclure par un phénomène appelé « tumbling ». Ce phénomène consiste en un retournement à 360° de l'unité de sucre relié au bras attachant les deux CD (Figure 2. 21). Harada a observé ce phénomène avec des dimères dont le bras consistait en de longues chaînes alkyles.⁸⁴ Terao l'a décrit lors d'études sur des dimères de β -CD per-méthylés reliés *via* un bras rigide portant une porphyrine.⁸⁵ Enfin, Montflier a décrit un phénomène similaire, pour des dimères dont le bras entre les CD présente aussi deux fonctions triazoles.⁸⁶ Ainsi, dans le cas des systèmes de Ritter et de Zhu, présentés précédemment, une auto-inclusion des fonctions triazoles est possible.

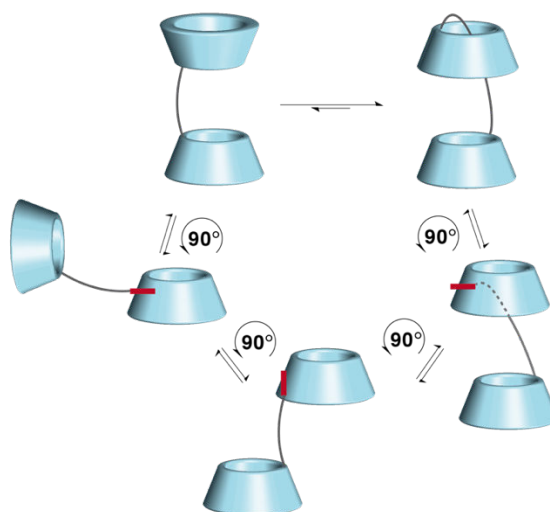


Figure 2. 21 : Mécanisme de "tumbling"

Par ailleurs, l'équipe de Harada a aussi travaillé à l'élaboration de copolymères supramoléculaires composés d'hétérodimères α -CD/ β -CD et d'un invité hétérotopique adamantyle/cinnamoyl.⁸⁷

Polymères supramoléculaires de type AB

Une deuxième possibilité pour former des polymères supramoléculaires à base de cyclodextrines est d'attacher directement l'invité hydrophobe sur la cyclodextrine. Ce type de conjugué permet de former des polymères de type AB. De nombreuses recherches ont été réalisées sur ce type de polymères, notamment par les équipes de Harada⁸⁸, Ritter⁸⁹ et Tato⁹⁰. Ces études mettent en lumière plusieurs difficultés pour l'élaboration de tels polymères. Nous allons les exposer et les analyser au travers de quelques exemples.

Le premier problème qui a été mis en avant par l'équipe de Harada est l'auto-inclusion de l'invité dans la cavité de la cyclodextrine le portant. Cela empêche ainsi la formation d'objets supramoléculaires.⁹¹ Ce type de complexes intramoléculaires a notamment été observé par RMN-¹H lorsqu'un groupement hydrocinnamoyl a été attaché *via* un bras flexible sur le col primaire d'une β -CD (Figure 2. 22. b). Afin de s'affranchir de ce phénomène d'auto-inclusion, la β -CD a été remplacée par une α -CD. Le diamètre du col primaire de l' α -CD étant plus faible que celui de la β -CD, l'auto-inclusion par le col primaire devient impossible. Ainsi, la formation de complexes intramoléculaires n'a pas été observée, et comme attendu, la formation d'objets intermoléculaires (de petite taille) a pu être identifiée par RMN-ROESY (Figure 2. 22. a).

Afin d'éviter ce problème d'auto-inclusion, l'équipe de Tato a mis au point des β -CD fonctionnalisées par un adamantyle lié *via* un bras composé d'une fonction amide. La faible longueur de ce bras évite le phénomène d'auto-inclusion. Le complexe formé a été caractérisé à l'état solide par diffraction des rayons X.⁹⁰

Harada proposa aussi de rigidifier le bras reliant la cyclodextrine et l'invité hydrophobe, de manière à s'affranchir du phénomène d'auto-inclusion.⁹¹ Pour cela, les invités de type hydrocinnamoyl ont été remplacés par un bras portant une double liaison (cinnamoyls). Néanmoins, aucun polymère supramoléculaire n'a été observé avec les β -CD cinnamoyl. En effet, la rigidification du bras rend ce type de composés insoluble dans l'eau (Figure 2. 22. b). Ces résultats expliquent sans doute pourquoi les conjugués développés par Tato, cités précédemment, ont seulement été étudiés à l'état solide. L' α -CD, plus soluble, a donc été utilisée pour former des polymères à partir de cyclodextrines fonctionnalisées par un groupe cinnamoyl (Figure 2. 22. a). La formation de complexes intermoléculaires a été observée par RMN-¹H et VPO. La masse moléculaire moyenne obtenue par VPO suggère la formation de dimères ou de trimères.^{92,93} Lorsque le groupement cinnamoyl a été remplacé par un trinitrobenzène, des trimères cycliques ont été observés par RMN-¹H et par spectrométrie de masse MALDI-TOF.⁹⁴ Ces dernières expériences ont montré que l'inclusion du groupement phényle se fait plus favorablement à travers le col primaire de l' α -CD, ce qui empêche la formation de longs oligomères lorsque le groupement cinnamoyl est attaché sur le col primaire.

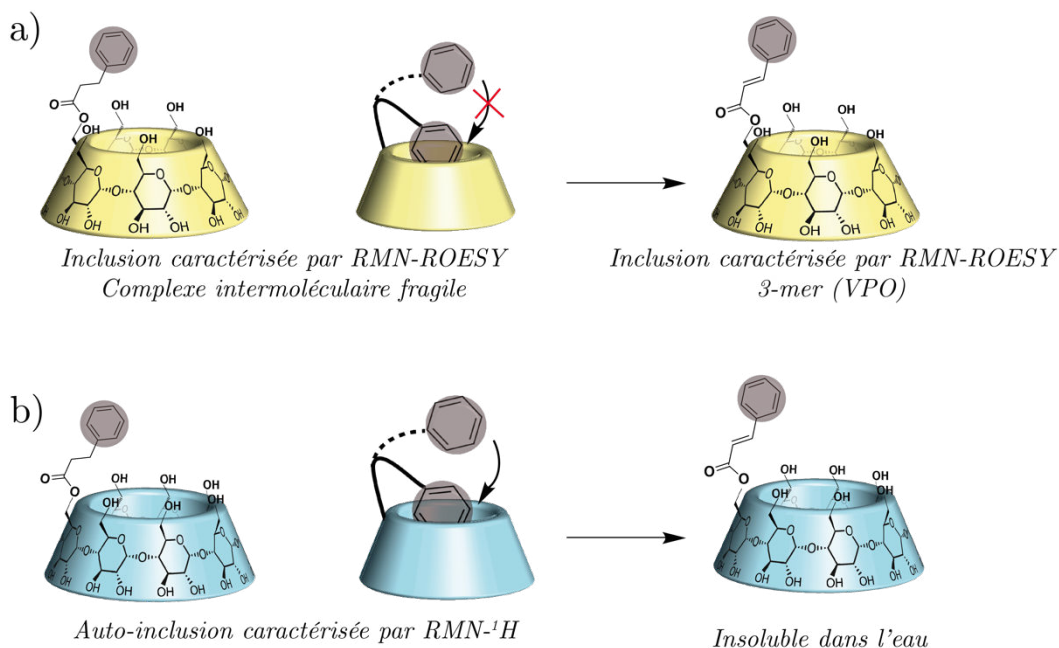


Figure 2. 22 : Systèmes développés par l'équipe de Harada. Conjugués composés d' α -CD (a) ou de β -CD (b) et d'invités de type hydrocinnamoyl ou cinnamoyl, attachés sur le col primaire (a) et (b).

Pour résoudre ce problème, l'équipe de Harada a donc développé des polymères supramoléculaires à base de cyclodextrines fonctionnalisées par un groupement cinnamoyl attaché sur le col secondaire de la cyclodextrine (Figure 2. 23). Des 20-mères ont alors été observés par VPO.⁹³

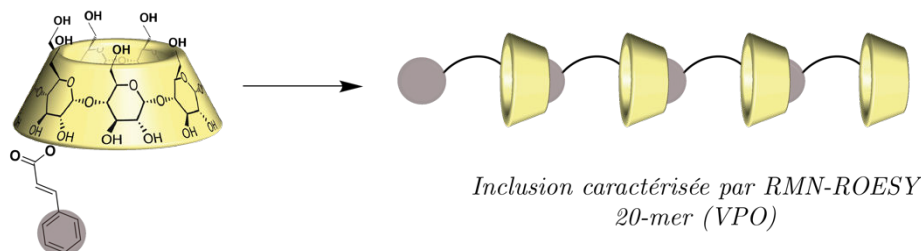


Figure 2. 23 : Systèmes développés par l'équipe de Harada. Conjugués composés d' α -CD et d'invités de type cinnamoyl attachés sur le col secondaire.

L'équipe de Ritter a travaillé à l'élaboration de β -CD fonctionnalisées, *via* une réaction de click, par diverses molécules hydrophobes dont le ferrocène⁸⁹ et l'adamantane.⁸³ L'association de ces objets a été caractérisée principalement par DLS. Les conjugués étudiés semblent former des assemblages dont le rayon hydrodynamique est élevé, ce rayon évolue cependant avec le temps, ce qui suggère la formation d'agrégats.

Dans ce contexte notre laboratoire a travaillé à la synthèse de conjugués de β -CD adamantyle.⁹⁵ Ce type de conjugués a été choisi en raison de la forte constante d'association de l'adamantane pour la cavité de la cyclodextrine. Comme nous l'avons vu, ce type de conjugués a déjà été précédemment étudié, mais des problèmes de solubilité ont souvent été observés lorsqu'un bras rigide a été choisi afin d'éviter le phénomène d'auto-inclusion. La stratégie élaborée lors de cette étude a été de choisir un bras flexible de type succinimide afin d'obtenir des composés solubles. De plus ce bras a été attaché sur le col primaire de la cyclodextrine afin d'éviter la formation d'un complexe auto-inclus. En effet, la molécule d'adamantane est trop volumineuse pour pénétrer la cavité de la β -CD à travers le col primaire.⁹⁶ Ces composés solubles dans l'eau ont ainsi été étudiés par RMN-DOSY. Étonnamment, les coefficients de diffusion obtenus ne sont pas dépendants de la concentration en monomère. Ces résultats indiquent qu'il n'y a pas d'assemblage intermoléculaire. Des études de RMN-ROESY ont alors montré des interactions entre les protons H_3 et H_{c-eq}/H_b et entre les protons H_5 et H_a . Ces résultats indiquent de manière non équivoque que le groupement adamantyle est auto-inclus au sein de la cavité (Figure 2. 24. a). L'hypothèse avancée pour évoquer ce résultat est le phénomène de « tumbling » expliqué précédemment (Figure 2. 24. b).

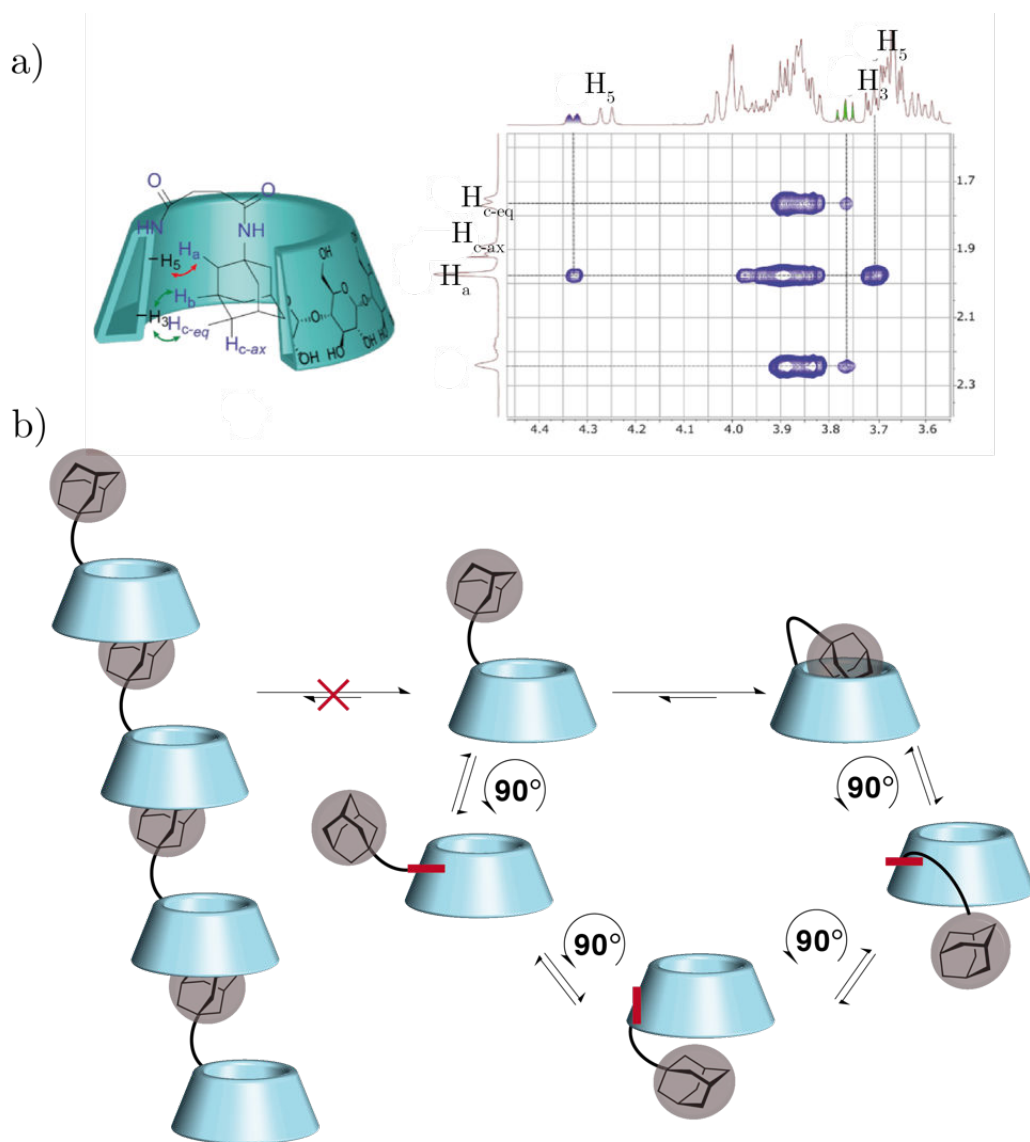


Figure 2. 24 : a) RMN-ROESY du conjugué auto-inclus de β -CD succinimide adamantyle. b) Équilibre compétitif entre le phénomène de "tumbling" (proposé pour expliquer l'auto-inclusion) et la formation d'oligomères.

Fonctionnalisation des cyclodextrines

Les exemples que nous avons vus précédemment montrent qu'il est possible de former des polymères supramoléculaires de type AB à base de cyclodextrines. Ces systèmes nécessitent la mono-fonctionnalisation des cyclodextrines sur le col primaire ou secondaire. Bien que leur fonctionnalisation ne soit pas une tâche aisée, plusieurs méthodes ont été développées, exploitant notamment les différentes réactivités des fonctions hydroxyles des cyclodextrines (**Figure 2. 25**).

Les hydroxyles en position C₆ sont plus nucléophiles (alcools primaires) que les fonctions hydroxyles en position C₂ et C₃ (alcools secondaires). Il est donc possible de fonctionnaliser sélectivement le col primaire de la cyclodextrine en modulant la réactivité des électrophiles utilisés.⁹⁷

Les hydroxyles en positions C₂ sont les plus acides en raison de l'effet inductif attracteur exercé par les oxygènes de la liaison acétalique. Il est ainsi possible de déprotonner sélectivement ces hydroxyles. Les alcoolates résultants deviennent alors plus nucléophiles que les hydroxyles en position C₆ et C₃, permettant leur fonctionnalisation sélective. Néanmoins, la monofonctionnalisation des cyclodextrines en position C₂ reste souvent délicate et conduit à des mélanges.⁹⁸ Une méthode intéressante pour fonctionnaliser les cyclodextrines en position C₂ ou C₆ est l'utilisation des propriétés complexantes de celles-ci. En effet, si l'agent électrophile peut être accommodé dans la cavité de la cyclodextrine, la sélectivité pourra être dictée par son orientation dans la cavité en cas d'une complexation forte, ou par la nucléophilie des hydroxyles en cas d'une complexation faible.⁹⁹

Les hydroxyles en position C₃ sont les plus difficiles à fonctionnaliser sélectivement. Bien que ces hydroxyles soient les moins réactifs, ils restent néanmoins les plus accessibles. Ainsi, certaines méthodes ont été développées permettant la fonctionnalisation régiosélective de la position 3.⁹⁷

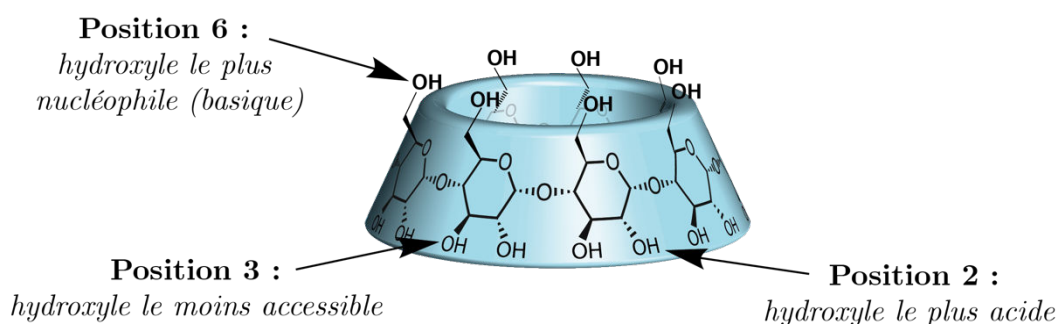


Figure 2. 25 : Réactivité des positions hydroxyles d'une β -CD

Bien que des méthodes plus complexes existent et permettent une di- ou trifonctionnalisation des cyclodextrines, leur polyfonctionnalisation reste délicate. Notre laboratoire a développé un processus de benzylation/débenzylation régiosélective permettant d'obtenir de manière aisée et avec de très bons rendements des cyclodextrines difonctionnalisées sur le col primaire de la CD.^{100,101}

Après protection de toutes les fonctions hydroxyles de la cyclodextrine en présence de chlorure de benzyle et d'hydrure de sodium, la CD perbenzylée correspondante peut être obtenue. Cette dernière est ensuite placée en présence de DIBAL-H dans du toluène à 50°C. Une première réduction a lieu permettant de déprotéger un hydroxyle en position C₆ selon le mécanisme de déprotection des benzyles au DIBAL-H d'un monosaccharide (**Figure 2. 26. a**). L'encombrement stérique apporté par l'aluminosilicate formé entraînera ensuite la réduction de la fonction benzyle placée à l'opposé de la cavité et l'obtention des composés diols AD pour l' α -CD et la β -CD (**Figure 2. 26. b**). Notre équipe a montré récemment que par une succession de protections et déprotections de ce type, il est possible d'obtenir une α -CD hexadifférenciée sur le col primaire.¹⁰²

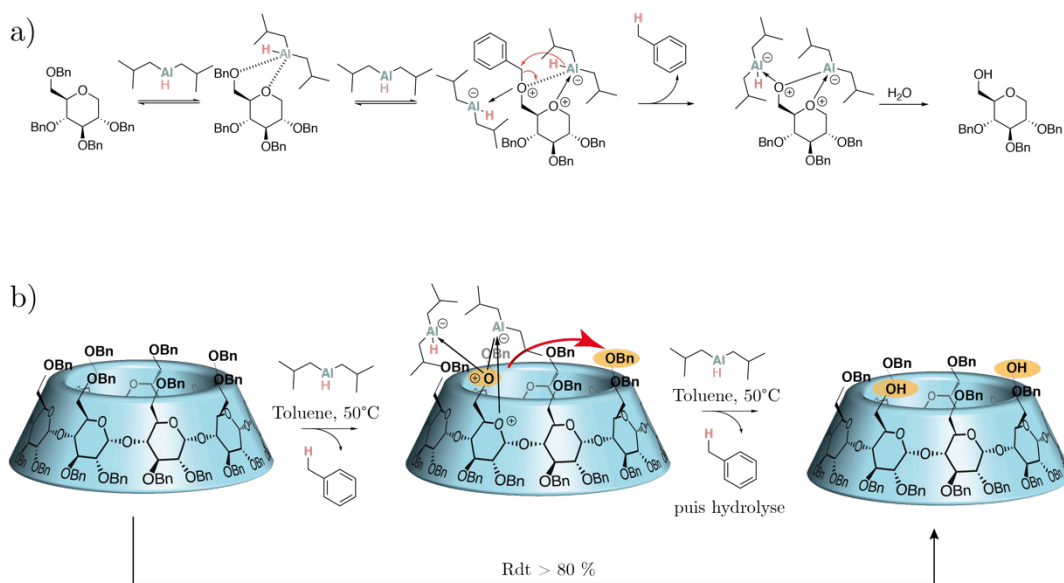


Figure 2. 26 : a) Mécanisme d'une réduction d'un monosaccharide en présence de DIBAL-H. b) Processus de benzylation/débenzylation régiosélective d'une β -CD en présence de DIBAL-H

2.1.2. Conception du système

Dans le premier chapitre, nous avons vu l'intérêt que présentait l'élaboration de vecteurs sophistiqués de siRNA. Les diverses applications dans lesquelles ceux-ci peuvent être utilisés renforcent la nécessité de disposer de vecteurs variés, efficaces et biocompatibles. La nature anionique et donc hydrophile des siRNA ainsi que leur faible taille et leur instabilité dans l'organisme, les rendent particulièrement difficiles à transporter.

Comme nous l'avons abordé précédemment, l'écrantage des charges anioniques des siRNA par des systèmes polycationiques est une solution efficace. Néanmoins, le caractère polymérique de ces vecteurs les rend souvent toxiques *in fine*. Nous nous sommes donc intéressés à l'élaboration d'un polymère supramoléculaire polycationique et hydrosoluble, permettant l'interaction avec le siRNA, formé à partir d'un monomère biocompatible et donc moins toxique.

Nous avons dressé dans le deuxième chapitre un état de l'art des polymères supramoléculaires solubles dans l'eau. Ces systèmes font intervenir des interactions non covalentes qui opèrent dans ce milieu. Dans le but d'élaborer une structure optimale pour le transport de siRNA, nous avons essayé dans ce projet d'imiter la nature et de construire une architecture supramoléculaire définie et contrôlée de manière coopérative et hiérarchique en interaction avec les siRNA.

Pour cela, des briques moléculaires à base de cyclodextrines permettant la formation de polymères de type AB ont été conçues. L'expertise de notre laboratoire concernant la polyfonctionnalisation de cyclodextrines nous a permis d'obtenir des cyclodextrines difonctionnalisées, présentant un groupement hydrophobe et un groupement cationique. Le groupement hydrophobe permet ainsi la formation d'édifices supramoléculaires ; le groupement hydrophile donne un caractère polycationique à notre système permettant la complexation des siRNA et l'interaction avec la surface anionique de la membrane cellulaire et déclenchant l'internalisation du système (Figure 2. 27).

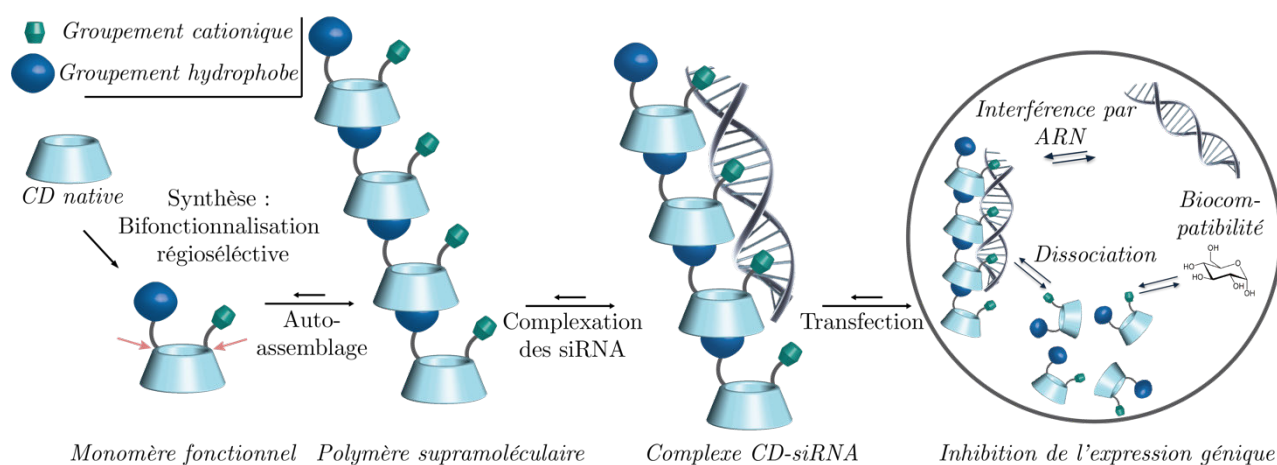


Figure 2. 27 : Conception du système

Nous avons vu précédemment que l'élaboration de polymères à partir de cyclodextrines était délicate. En particulier, les DP généralement observés sont faibles. Par conséquent, nous avons choisi de fonctionnaliser des β -CD par des groupements adamantyles. En effet, la constante d'affinité de l'adamantane pour la β -CD est l'une des plus importantes rapportées.⁷³ Néanmoins, deux problèmes caractérisent ce type de conjugués :

- L'auto-inclusion par « tumbling » de l'adamantyle.
- La faible solubilité du conjugué.

L'une des solutions au premier problème est de rigidifier le bras liant l'adamantyle à la cyclodextrine. Malheureusement, cela diminue généralement la solubilité du conjugué et ne fait qu'exacerber le second problème.

Afin de s'affranchir du phénomène de « tumbling », une méthode de pontage a été développée. Cette méthode consiste à lier deux unités opposées de sucre de la cyclodextrine par le col primaire, créant ainsi une cyclodextrine dite pontée. En plaçant le groupement adamantyle sur ce pont, le retournement de l'unité de sucre portant l'adamantyle devient impossible (Figure 2. 28).

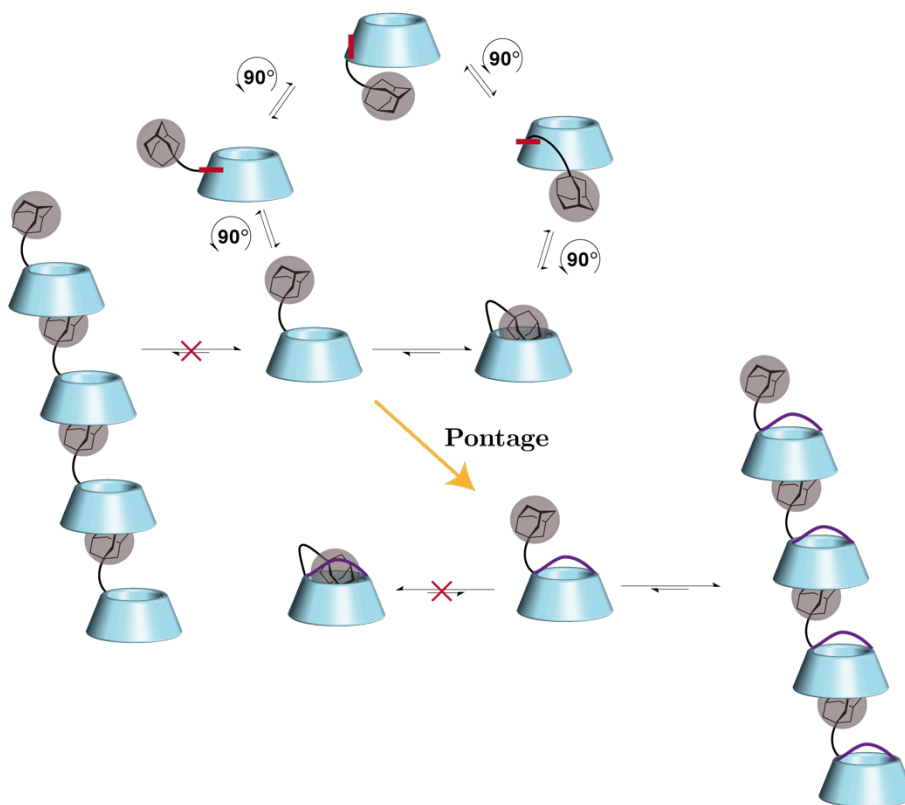


Figure 2. 28 : Méthode de pontage de la cyclodextrine

Enfin, afin d'obtenir un système hydrosoluble, deux amines ont été placées sur le pont, permettant d'ajouter deux charges à pH physiologique. De plus, ces amines permettront de fonctionnaliser le conjugué et de mettre au point des cyclodextrines fonctionnalisées sophistiquées.

2.2. Synthèse de monomères de cyclodextrines fonctionnalisées

2.2.1. Rétrosynthèse générale

Pour la mise au point du système, notre équipe s'est donc orientée vers la synthèse de β -CD pontée par une chaîne alkyle diamine, fonctionnalisée d'une part par un groupement adamantyle, et d'autre part par des groupements chargés. Après une étude de modèles moléculaires, il a été choisi de former des ponts présentant quatre carbones entre les deux amines liées aux C₆ des unités glucoses. Ainsi, la déformation trop importante de la cavité a pu être évitée. La rétrosynthèse suivante a alors été mise au point (**Figure 2. 29**).

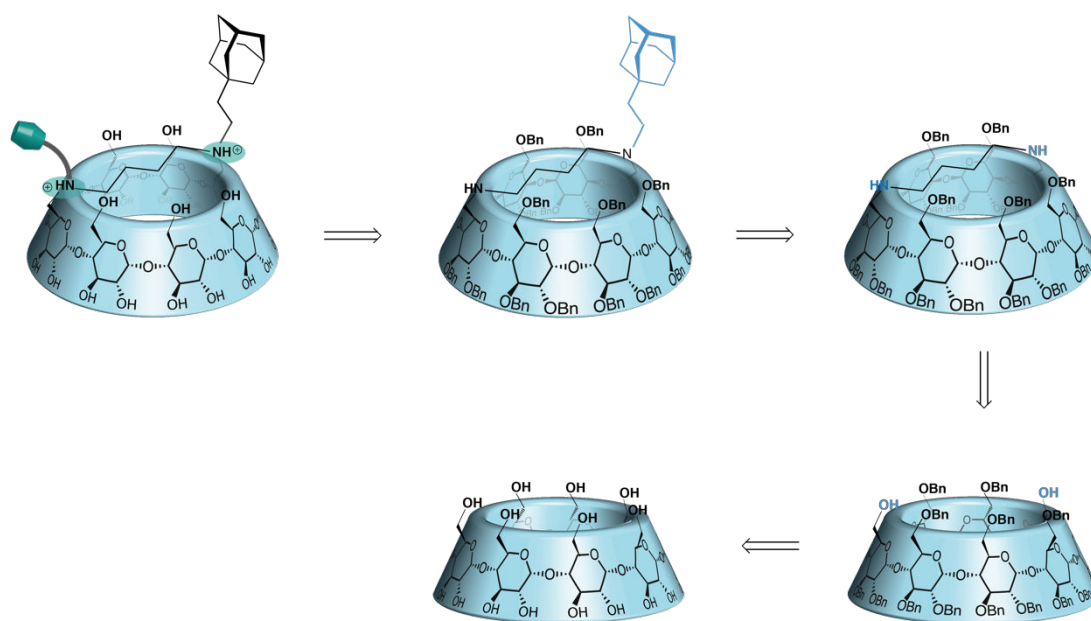


Figure 2. 29 : Retrosynthèse générale de monomères fonctionnalisés de cyclodextrines

Tout d'abord, un groupement fonctionnel peut être placé sur l'une des amines du pont par animation réductrice ou substitution nucléophile. De la même manière, le groupement adamantyle peut être attaché sur la deuxième amine du pont. La β -CD pontée peut être obtenue à partir de la β -CD diol, elle-même obtenue de manière régiosélective à partir de la β -CD native *via* le processus de benzylation/débenzylation au DIBAL-H décrit précédemment.

2.2.2. Synthèse de molécules contrôles

Dans les différentes études qui seront décrites ultérieurement, nous aurons besoin de molécules témoins ne formant pas d'assemblages supramoléculaires. Nous avons pour cela synthétisé deux β -CD fonctionnalisées ne portant pas de groupement hydrophobe. Ces molécules sont les composés (9) et (14) dont la synthèse est décrite Figure 2. 30.

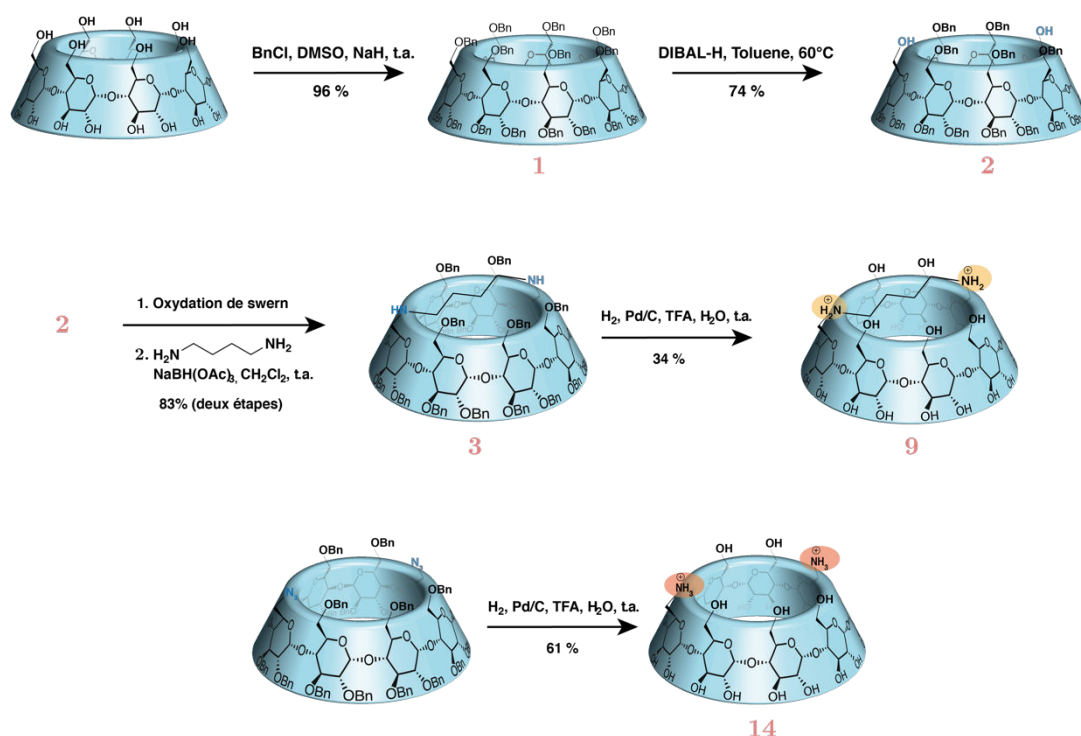


Figure 2. 30 : Synthèse des composés (9) et (14)

La synthèse du composé (9) commence par la benzylation complète de la β -CD en présence de chlorure de benzyle et d'hydruide de sodium. La β -CD (1) a été obtenue avec un rendement de 96 % puis a été engagée dans une réaction de débenzylation régiosélective en présence de DIBAL-H à 50°C dans le DMSO. Le diol (2) a été obtenu avec un rendement de 74%. Une oxydation de Swern a ensuite été réalisée afin d'obtenir le dialdéhyde correspondant. La β -CD pontée (3) a ensuite été obtenue avec un rendement de 83 % sur deux étapes *via* une double amination réductrice en présence de 1,4-diaminobutane. Enfin, une hydrogénation catalytique sur Pd/C a été réalisée afin d'obtenir le composé déprotégé correspondant. Le composé (9) a été obtenu sous forme de chlorhydrate après un passage sur une résine échangeuse d'ions et une purification en phase inverse avec un rendement de 34 %.

La chromatographie sur colonne en phase inverse est nécessaire après toute débenzylation par hydrogénation catalytique de cyclodextrines perbenzylées. En effet, un sous-produit a systématiquement été observé lors de cette dernière étape. En effet, une fraction non négligeable (10-20%) des cyclodextrines du brut de réaction, porte un ou plusieurs benzyles réduits en cyclohexyle. La présence de ce sous-produit a été un problème considérable dans ce

projet. Si les cyclodextrines perbenzylées sont bien souvent difficiles à purifier, les cyclodextrines déprotégées le sont encore plus. Après de nombreuses études de purification par HPLC, nous avons réussi à nous affranchir de ce sous-produit réduit. Par la suite, une méthode de purification sur combi-flash avec des colonnes C-18 prépaquées a été optimisée. Des cyclodextrines fonctionnalisées pures ont ainsi été obtenues avec de meilleurs rendements, bien que toujours faibles.

Le composé (14) a été obtenu à partir de la β -CD diazido perbenzylé (composé synthétisé au laboratoire par Wenting Hu) *via* une hydrogénation catalytique sur Pd/C afin d'obtenir le composé déprotégé correspondant. Le composé (14) a été obtenu sous forme de chlorhydrate après purification et passage sur résine échangeuse d'ions.

2.2.3. Synthèse de monomères monosubstitués

Dans un second temps, nous nous sommes attachés à la synthèse de premiers monomères comportant une fonction adamantyle sur le pont. La synthèse de ces composés est décrite ci-après.

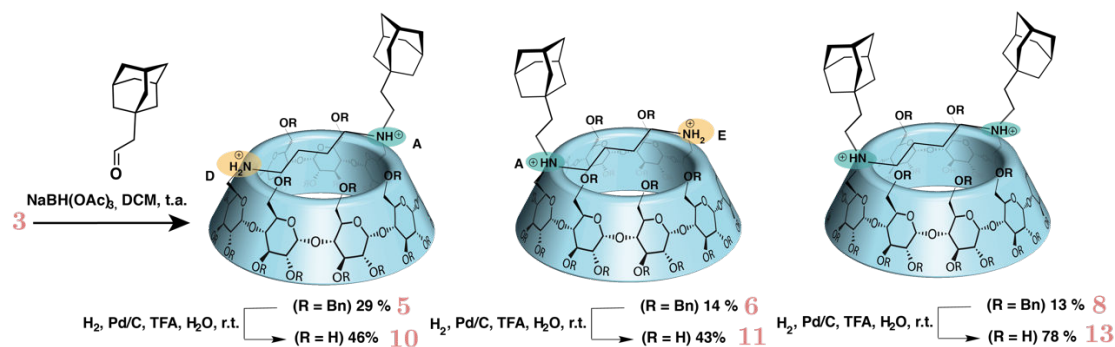


Figure 2. 31 : Synthèse des composés (10), (11), (13)

À partir du composé (3), une amination réductrice a été réalisée en présence d'adamantaneacétaldéhyde (4). Trois composés ont été obtenus : les régioisomères AD et AE ainsi que le composé difonctionnalisé. Le composé difonctionnalisé présente le désavantage de ne permettre aucune post-fonctionnalisation. C'est pourquoi, afin de limiter la quantité obtenue de ce produit, la réaction a été stoppée avant conversion totale du produit de départ. Après purification par chromatographie sur colonne, le composé (5) avec un rendement de 29 %, le composé (6) avec un rendement de 14 %, le composé (8) avec un rendement de 13 %, ont été obtenus, et du produit de départ a été récupéré. Lorsque les composés (5) et (6) n'ont pas été séparés, le mélange de régioisomères (7) a été obtenu avec un rendement de 32 %. Le rapport de ce mélange est de 65 % de régioisomère AD et 35 % de régioisomère AE. Ces divers composés ont ensuite été déprotégés par hydrogénation catalytique sur Pd/C afin d'obtenir les chlorhydrates déprotégés correspondants après purification et résine échangeuse d'ions. Le composé (10) a été obtenu avec un rendement de 46 %, le composé (11) avec un rendement de 43 %, et le composé (13) avec un rendement de 78 %. Enfin, le mélange (7) a permis l'obtention du mélange (12) avec un rendement de 43 %.

2.2.4. Synthèse de monomères difonctionnalisés : bras succinimide

Dans le but de fonctionnaliser les monomères de cyclodextrines par des groupements cationiques, la synthèse du composé (16) a été réalisée (Figure 2. 32).

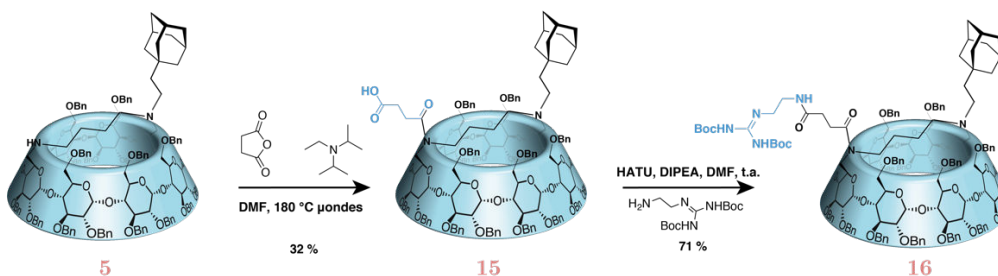


Figure 2. 32 : Synthèse du composé (16)

Afin de pouvoir fonctionnaliser les monomères par couplage peptidique, une amidation a été réalisée sur le composé (5) avec un anhydride succinique en présence de DIPEA. Cette réaction a été réalisée sous irradiation micro-ondes dans le DMF à 180°C. Le produit obtenu s'est révélé délicat à purifier, certainement de par son caractère zwitterionique. Dans un premier temps, le produit brut (15) a été débenzylé par hydrogénation catalytique puis purifié par HPLC. Malheureusement, parce qu'une deuxième HPLC aurait été nécessaire après le couplage peptidique, cette voie de synthèse a été abandonnée. En effet, comme mentionné précédemment, les rendements obtenus après HPLC sont généralement faibles avec nos composés. Ainsi, le composé (15) a finalement été purifié avec un faible rendement (32%). Un couplage peptidique en présence de HATU a été réalisé et le composé (16) a été obtenu avec un rendement de 71%.

Les produits (15) et (16) ont néanmoins été difficiles à caractériser. En effet, la présence de conformères a pu être observée par RMN-1H (Figure 2. 34). Une étude en température a donc été réalisée sur le composé (15) pour confirmer leur présence et valider la pureté des composés. En effet, l'échange entre les deux rotamères d'une liaison amide est lente à l'échelle de temps de la RMN à température ambiante (Figure 2. 33). L'atome d'azote d'une liaison amide est impliqué dans une mésomérie avec le groupe carbonyle adjacent, ce qui lui confère un caractère particulier avec une hybridation sp^2/sp^3 mixte. Par conséquent, la barrière énergétique à franchir pour permettre la rotation est haute, et il est ainsi possible de distinguer les rotamères *cis* et *trans* par RMN.

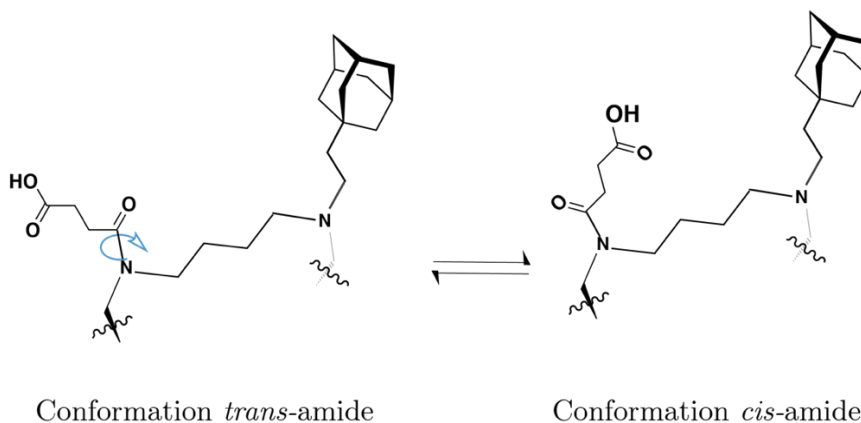


Figure 2. 33 : Rotamères de la liaison amide du composé (15)

Pour cela, le composé (15) a été solubilisé dans du DMSO- d_6 . Des acquisitions de spectres protons à différentes températures allant de 300 K à 360 K ont été réalisées. Les signaux de certains protons isolés (H_1 , $H_{\text{Adamantyle}}$) ont été suivis. À 300 K, on observe un début de coalescence de certains signaux confortant l'hypothèse de la présence de deux rotamères (Figure 2. 34). Il a été possible de déterminer le ratio cis/trans par RMN-NOESY (7 : 3).

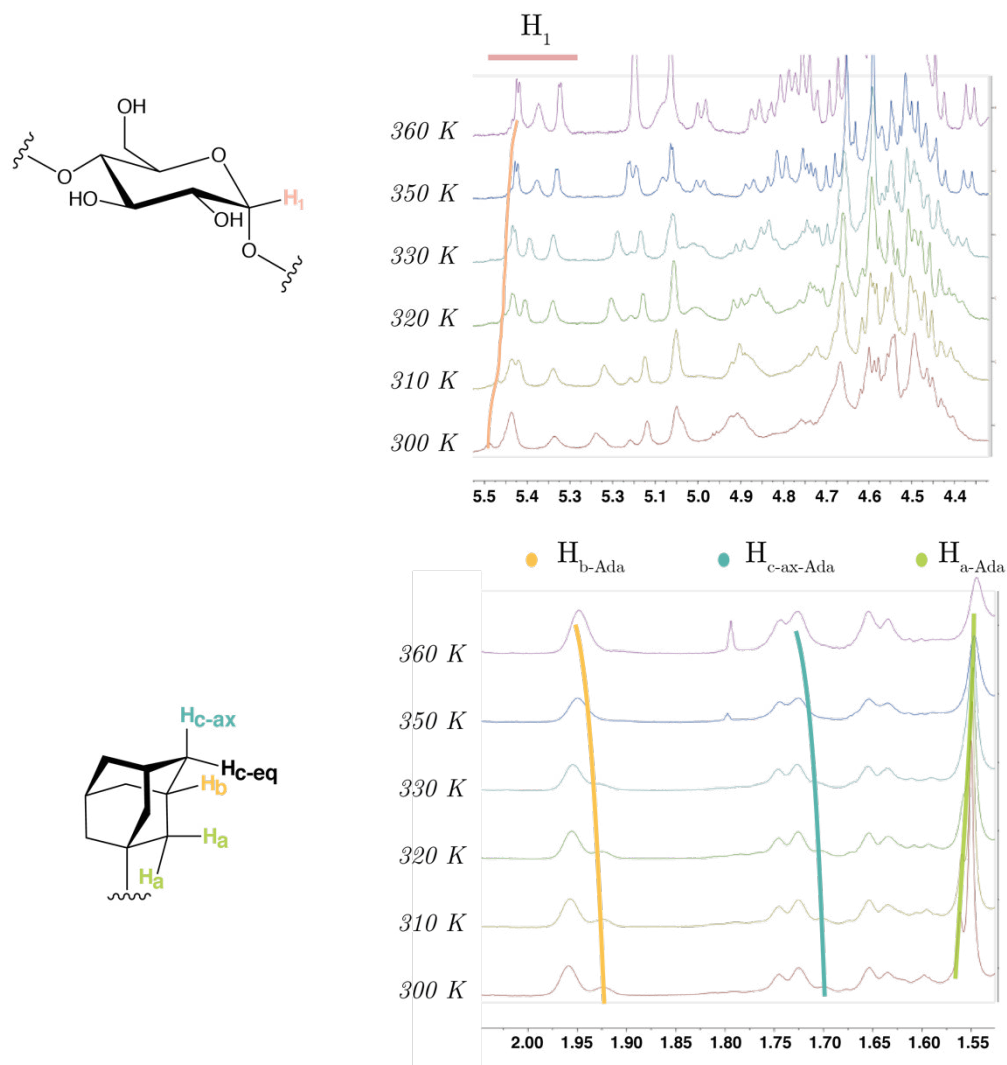


Figure 2. 34 : Suivi en température par RMN- ^1H du composé (15) (DMSO- d_6 , 600 MHz)

Une deuxième étude de difonctionnalisation du pont a été menée en parallèle de celle-ci. Cette étude consiste cette fois à greffer un bras ne comportant pas de liaison amide. À cause des difficultés rencontrées lors de la synthèse des composés (15) et (16) et de leur caractérisation difficile, nous nous sommes concentrés sur cette deuxième étude.

2.2.5. Synthèse de monomères difonctionnalisés : bras ethylethoxyamine

Afin d'obtenir un monomère fonctionnalisé d'un côté par un groupement adamantyle et d'un autre par un groupement cationique, la synthèse d'une cyclodextrine liée à un bras de type ethylethoxamine a été mise au point. Ce bras présente l'avantage d'être constitué d'une amine primaire protégée par un groupement BOC à son extrémité. Il peut être greffé de manière aisée à partir du composé (17) par amination réductrice. Une fois déprotégée, cette amine peut servir de groupement ionisable peu encombré pour l'interaction avec des siRNA, mais peut aussi être utile pour une post-fonctionnalisation *via* couplage peptidique.

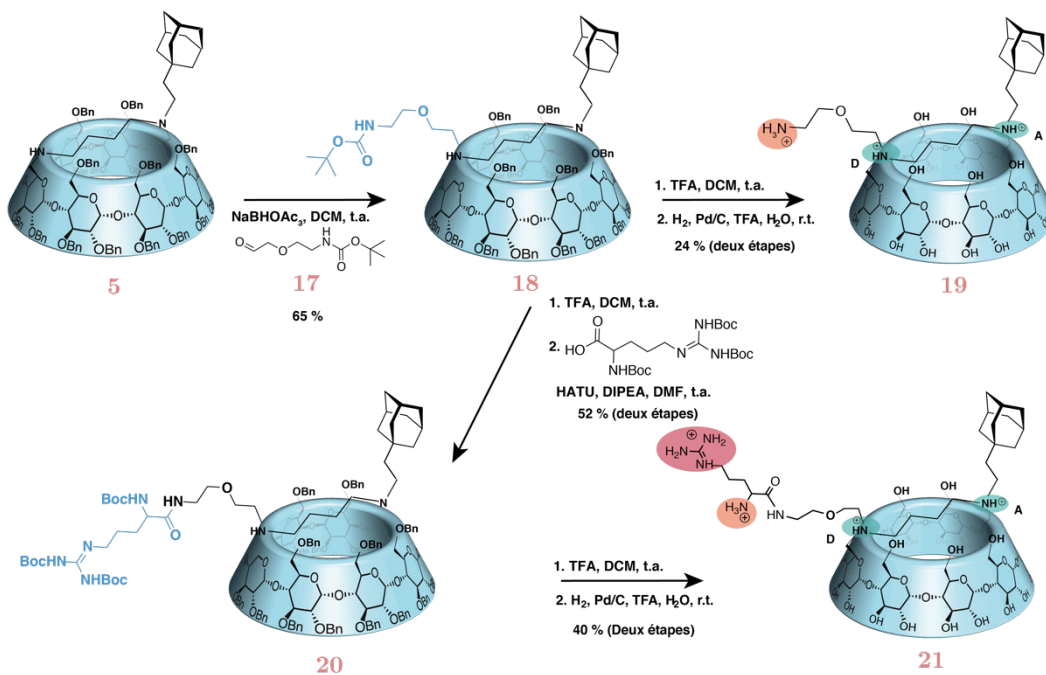


Figure 2. 35 : Synthèse des composés (19) et (21)

Le composé (17) a d'abord été obtenu à partir du 2-(2-aminoethoxy)ethanol disponible commercialement, puis engagé dans une amination réductrice sur le composé (5). Le composé (18) a été obtenu avec un rendement de 65 %. Ce composé a ensuite été déprotégé. D'abord, l'amine correspondante a été obtenue par déprotection du groupement BOC en milieu acide. Puis, une hydrogénation catalytique a été réalisée afin d'obtenir le composé (19) sous forme de chlorhydrate après purification en phase inverse et résine échangeuse d'ions avec un rendement de 24 %.

Parallèlement, le composé (18) a été déprotégé en milieu acide afin d'obtenir l'amine correspondante, engagée ensuite dans un couplage peptidique en présence d'arginine tri-BOC. Le composé (20) a été obtenu avec un rendement de 52 %, puis a été entièrement déprotégé selon la même méthode utilisée pour le composé (19). Le composé (21) a ainsi été obtenu avec un rendement de 40 %.

Ainsi, deux molécules contrôles ont été synthétisées ainsi que quatre monomères fonctionnels de cyclodextrines qui pourront servir de briques moléculaires à l'établissement de polymères supramoléculaires. Le mélange (12) sera aussi étudié (Figure 2. 36).

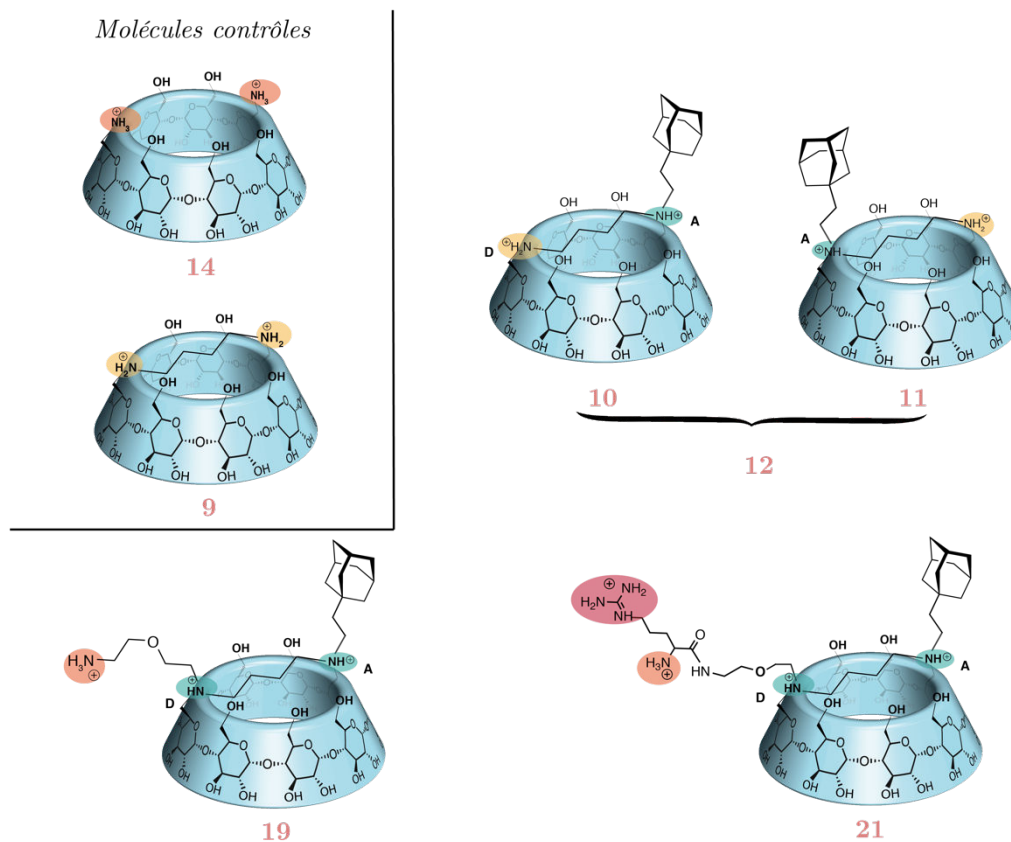


Figure 2. 36 : Molécules finales (9), (10), (11), (14), (19), (21) et le mélange (12)

2.3. Caractérisation de l'assemblage supramoléculaire

2.3.1. Caractérisation de l'assemblage supramoléculaire par RMN-ROESY

Les différentes cyclodextrines synthétisées précédemment ont été étudiées par RMN. Après caractérisation complète (*cf* chapitre 6), il a été possible de confirmer et de caractériser l'inclusion hôte-invité de l'adamantyle dans la cavité de la cyclodextrine par RMN-ROESY. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, cette technique permet de conclure quant au sens de l'inclusion du groupement adamantyle. Dans le cas des molécules (10), (11), (19) et (21), l'auto-inclusion est impossible pour deux raisons :

- Le bras liant le groupement est trop court pour permettre une auto-inclusion classique.
- Un phénomène de « tumbling » est impossible de par la présence du pont qui bloque le retournement de l'unité de sucre portant le groupement adamantyle.

Ainsi, l'observation d'interactions entre les protons de l'adamantyle (dont la nomenclature est rappelée Figure 2. 37) et ceux de l'intérieur de la cavité (H₃, et H₅) peut nous permettre de conclure quant à l'inclusion.

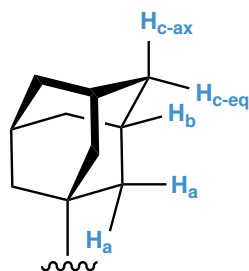


Figure 2. 37 : Nomenclature utilisée pour les groupements adamantyles

Une RMN-ROESY a donc été effectuée avec le composé (10). Malheureusement, plusieurs signaux se superposent sous celui du proton H_a du groupement adamantyle. Il est néanmoins possible d'observer des interactions entre les protons H_c et H_b de l'adamantyle et les protons H_3 de la cyclodextrine. Cela conforte donc l'hypothèse d'une inclusion de type hôte-invité. Il n'a pas été possible néanmoins d'observer des interactions entre les H_5 de la cyclodextrine et les H_b et H_c de l'adamantyle. Ainsi, l'inclusion ne semble pas profonde. Cela peut certainement s'expliquer par la présence du pont induisant une potentielle gêne stérique (Figure 2. 38).

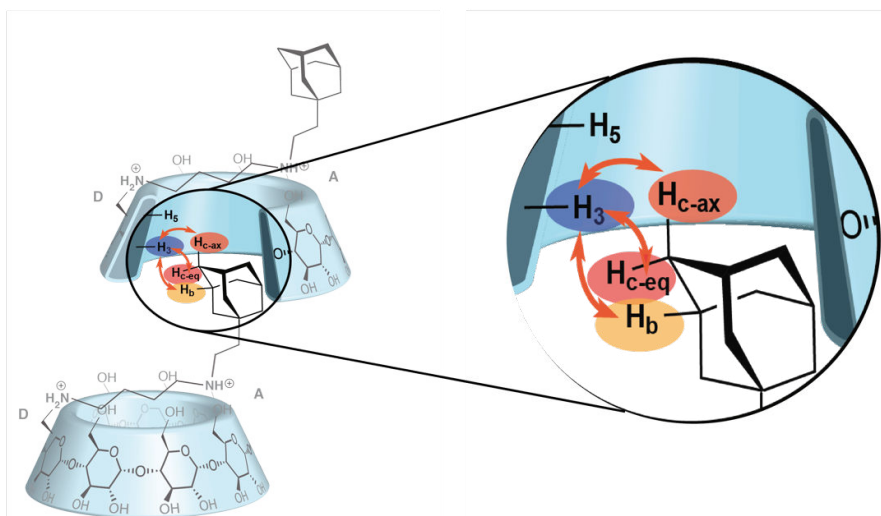
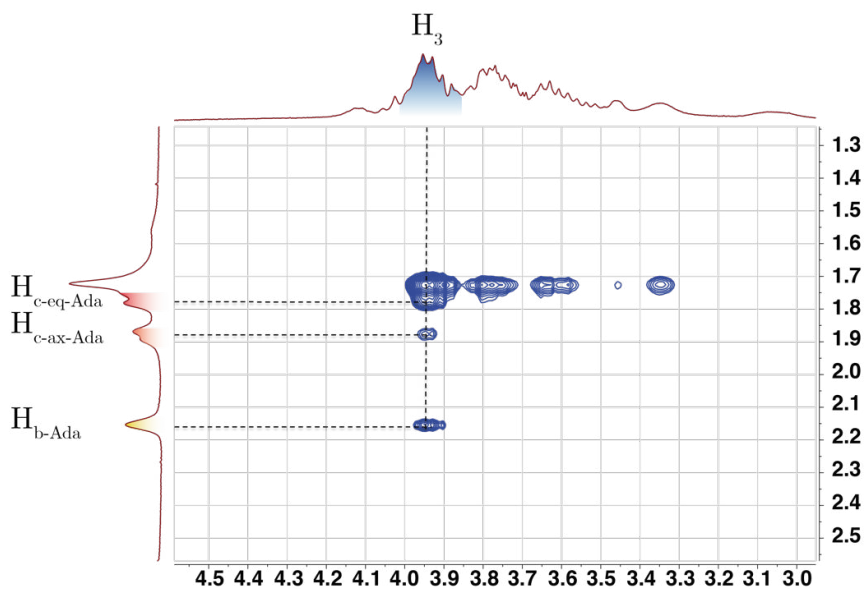


Figure 2. 38 : RMN-ROESY (D_2O , 600 MHz, 300 K) du composé (10)

Des expériences de RMN-ROESY ont aussi été réalisées avec le composé (11) (Figure 2. 39), le composé (19) (Figure 2. 40) et le composé (21) (Figure 2. 41). Des spectres très similaires ont été obtenus permettant de tirer les mêmes conclusions.

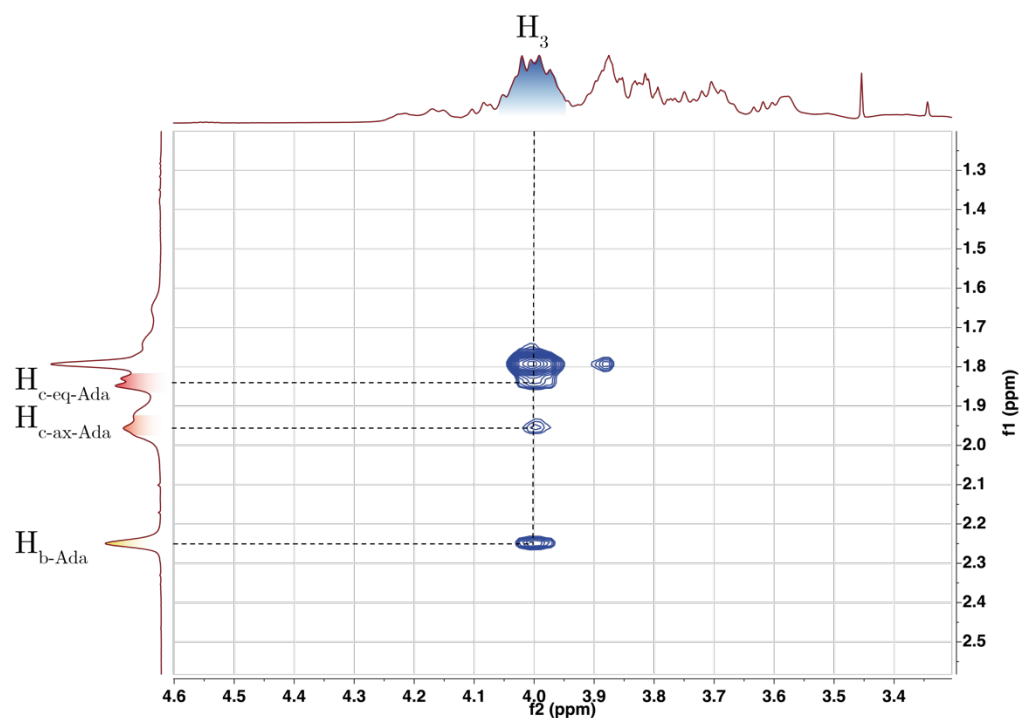


Figure 2. 39 : RMN-ROESY (D_2O , 600 MHz, 300 K) du composé (11)

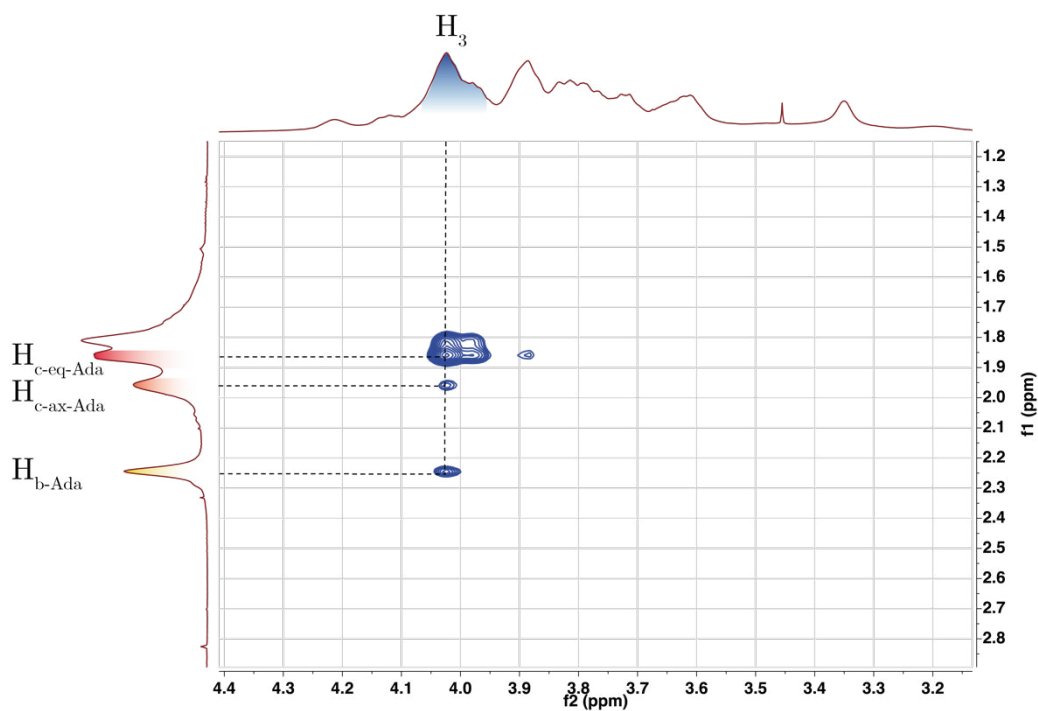
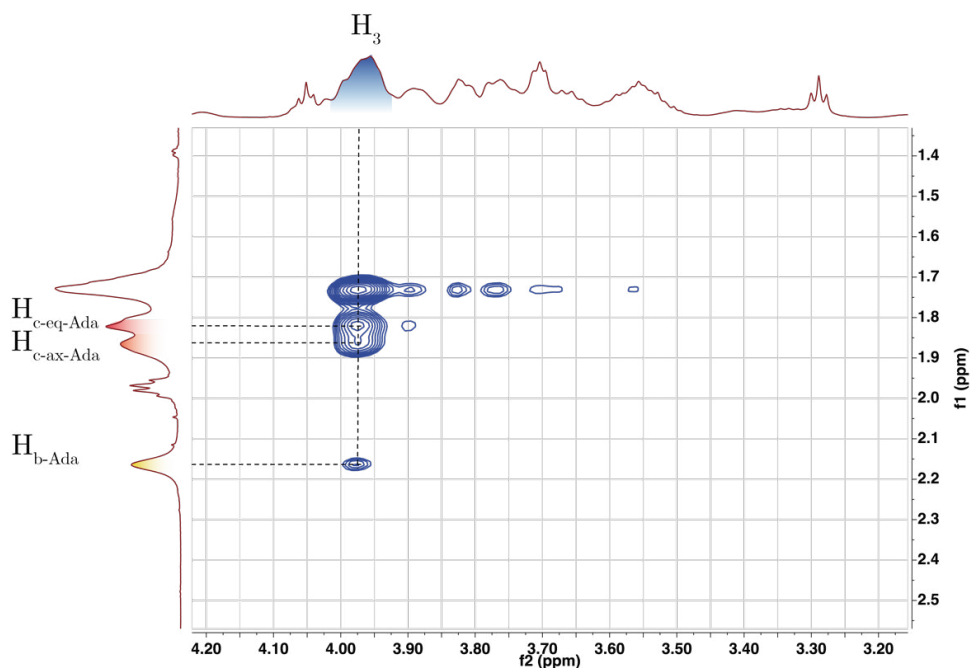


Figure 2. 40 : RMN-ROESY (D_2O , 600 MHz, 300 K) du composé (19)

Figure 2. 41 : RMN-ROESY (D₂O, 600 MHz, 300 K) du composé (21)

2.3.2. Caractérisation de l'assemblage supramoléculaire par RMN-¹H

Il est possible aussi de caractériser la formation d'assemblages supramoléculaires par RMN-¹H. En effet, l'étude de dilution réalisée par RMN-¹H, permet de suivre le comportement des différents protons en fonction de la taille de l'assemblage formé. En effet, dans un modèle isodesmique, le degré de polymérisation est dépendant de la concentration ($DP \approx \sqrt{KC}$). Nous pourrions alors considérer la présence de deux espèces en équilibre, le monomère libre sans adamantyle au sein de sa cavité, et le monomère prenant part à la formation d'un oligomère dont la cavité accommode l'adamantyle d'une autre cyclodextrine. Ainsi, à forte dilution, le spectre obtenu s'approchera de celui du monomère libre (sans adamantyle inclus dans la cavité), alors qu'à forte concentration, nous pouvons espérer former des oligomères. Les protons de nos monomères sont en échange rapide par rapport à l'échelle de temps de la RMN. En faisant l'hypothèse que les oligomères formés sont linéaires, les déplacements chimiques des signaux obtenus seront une moyenne de ces deux espèces pondérées par le ratio monomère libre/monomère non libre (Figure 2. 42).

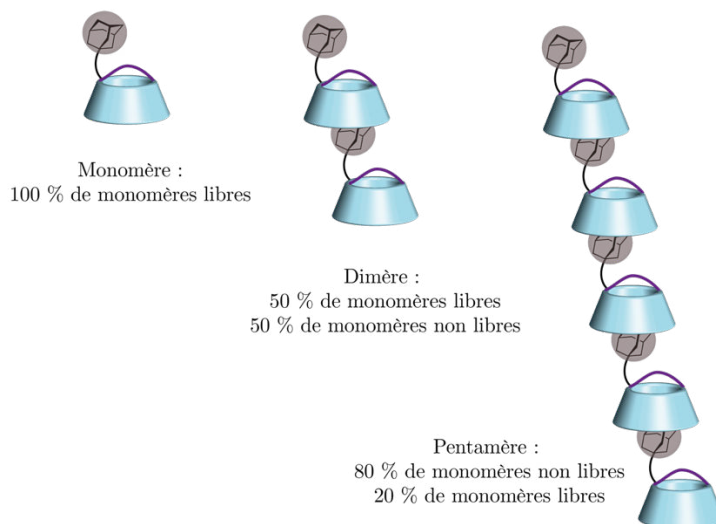


Figure 2. 42 : Pondération des monomères libres ou non en fonction du degré de polymérisation

Ainsi, nous suivrons en particulier les protons de l'invité. En effet, l'environnement électronique au sein de la cavité d'une cyclodextrine est différent de celui à l'extérieur (D_2O). Par conséquent, les déplacements chimiques des différents protons de l'adamantyle, devraient être modifiés en cas de formation d'espèces intermoléculaires.

Nous suivrons aussi l'évolution des protons H_1 de la cyclodextrine. En effet, ceux-ci sont sensibles à l'inclinaison des unités de sucre les portant. Ainsi, l'évolution de leur déplacement chimique peut donner certaines informations quant à la déformation de la cavité. De plus, ces protons sont généralement isolés du reste des protons de la cyclodextrine, ce qui rend leur suivi plus aisé. Nous pourrions par exemple suivre la définition de leur signal en fonction de la concentration. Comme nous l'avons vu précédemment, la largeur des signaux peut donner une idée quant à la taille des espèces. Les signaux d'un monomère seront plus fins que ceux du polymère correspondant.

Dans un premier temps, une étude de dilution a été réalisée sur le composé (9) afin de comprendre comment évoluent les déplacements d'une cyclodextrine pontée ne pouvant s'assembler selon un système hôte/invité (Figure 2. 43). Comme attendu, aucun élargissement des signaux n'a été observé à forte concentration. Néanmoins, une légère variation des déplacements chimiques des H_1 a pu être observée. Il est difficile de conclure quant à l'origine de cette variation. L'une des hypothèses est l'interaction de monomères entre eux via des liaisons hydrogène établies entre les hydroxyles du col secondaire induisant une légère déformation de la cavité.¹⁰³ Néanmoins, une variation du déplacement chimique des H_5 de l'unité de sucre portant le pont a été observée. Ces protons se trouvent proches des deux ammoniums du pont. L'hypothèse avancée pour expliquer cela est une variation du pH influant sur la protonation de ces amines. En effet, le monomère (9) a été introduit en tant que sel. La dilution entraîne donc une variation du pH de la solution, conduisant à une évolution de l'environnement magnétique des H_5 proches de l'ammonium.

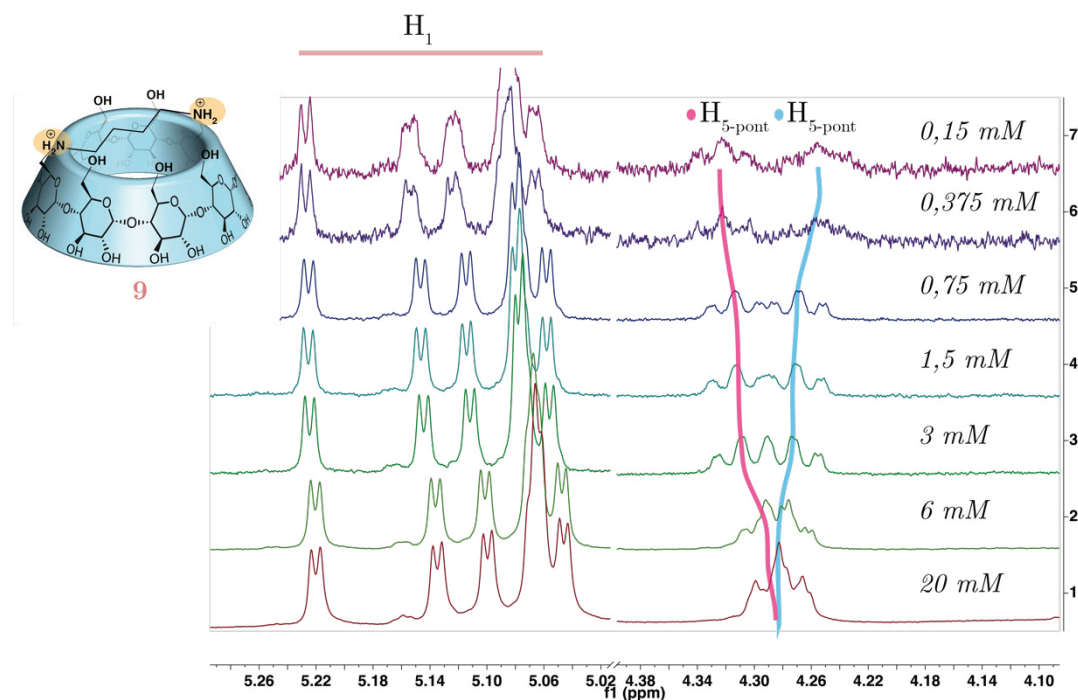


Figure 2. 43 : Etude de dilution par RMN 1H (D_2O , 600 MHz, 300 K) du composé (9)

Une étude de dilution a ensuite été réalisée sur le composé (10) (Figure 2. 44). Alors que les signaux des H_1 sont larges à forte concentration, un affinement est observé à plus faible concentration. Ces résultats vont dans le sens de la formation d'espèces intermoléculaires. L'évolution du déplacement chimique des protons de l'adamantyle conforte cette hypothèse. En effet, alors que le déplacement chimique de ces protons est assez stable entre 4,8 mM et 24 mM, un saut est observé entre 2,4 et 4,8 mM suggérant un changement de l'environnement chimique de l'invité. Ainsi, la contribution de l'adamantyle du monomère libre semble être plus importante à 2,4 mM. De plus, les déplacements chimiques des H_c axiaux et équatoriaux de la fonction adamantyle tendent à converger. En effet, lorsque l'adamantyle est inclus dans la cavité, le H_c équatorial ressent un blindage plus important, alors qu'en dehors de la cavité, l'environnement électronique de ces deux protons H_c devient similaire. Au vu de ces résultats, nous pouvons calculer une valeur approximative de la constante d'association apparente (K_{app}) régissant la formation de l'assemblage. En considérant une complexation totale à 24 mM et une complexation nulle à 1,2 mM, il est possible de calculer le degré de polymérisation (équation (1)) à différentes concentrations, et de remonter à K_{app} selon l'équation $DP \approx \sqrt{KC}$.

$$(1) \quad DP = \frac{1}{1 - \Delta\delta_c / \Delta\delta}$$

Une valeur moyenne de $K_{app} \approx 4500 \text{ M}^{-1}$ est obtenue. Cette valeur est en deçà de la constante d'association de l'adamantyle pour la cavité de la β -CD ($>10^4$).⁷³ Néanmoins, cette méthode reste très approximative. Tout d'abord, il s'agit de la constante d'association apparente ne prenant pas en compte la contribution de l'invité initial présent dans la cavité de la cyclodextrine (ici l'eau). De plus, l'erreur dans la mesure des déplacements chimiques est très importante. Enfin, nous avons fait l'approximation que notre système était entièrement complexé à 24 mM et complètement décomplexé à 1,2 mM, sous estimant ainsi la valeur de K_{app} . Néanmoins l'ordre de grandeur de K_{app} obtenu est le même que celui attendu. Ces résultats semblent donc montrer la formation d'assemblages supramoléculaires.

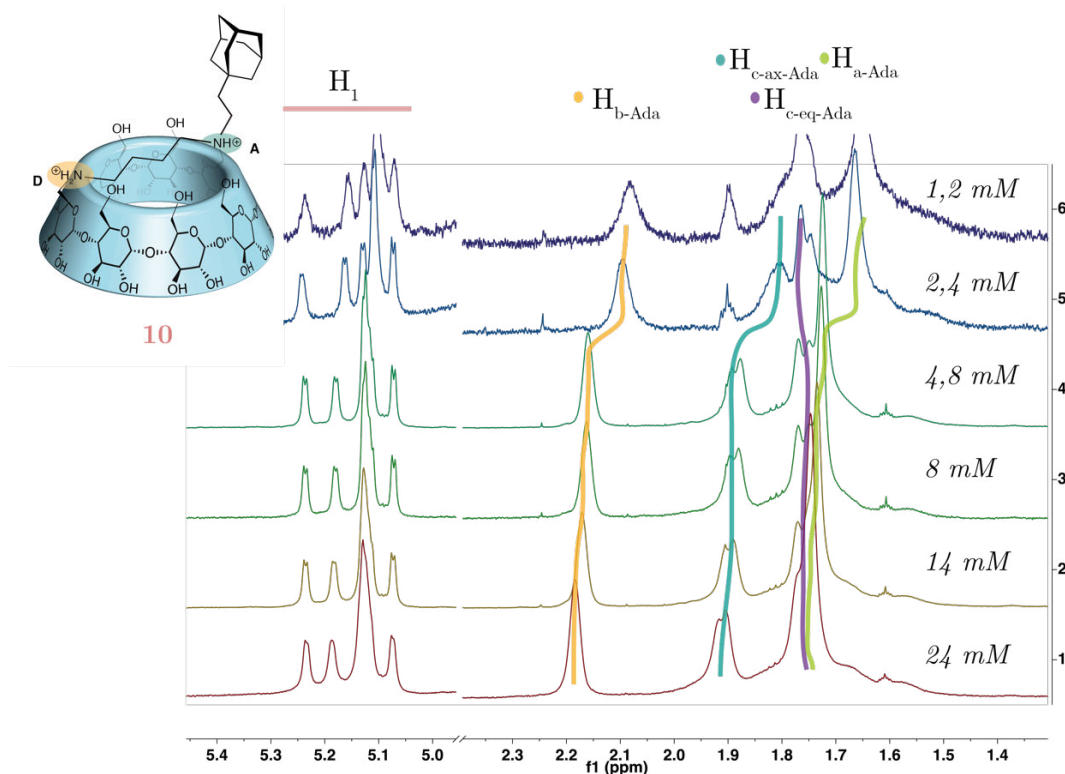


Figure 2. 44 : Etude de dilution par RMN ^1H (D_2O , 600 MHz, 300 K) du composé (10)

Un profil similaire a été obtenu pour l'autre régioisomère (**11**). L'affinement des H_1 est moins évident, à cause de la superposition de certains signaux. Néanmoins, un saut similaire des déplacements chimiques a aussi été observé pour les protons de l'adamantyle entre 2,6 et 7,8 mM. Une constante moyenne $K_{app} \approx 3900 \text{ M}^{-1}$ a été calculée (Figure 2. 45). De même, le composé (**19**) semble former des assemblages supramoléculaires malgré l'ajout d'un bras comportant une amine primaire. Le saut de déplacement chimique des protons de l'adamantyle a lieu entre 1,6 et 6,4 mM et la constante moyenne K_{app} calculée est de 3600 M^{-1} (Figure 2. 46).

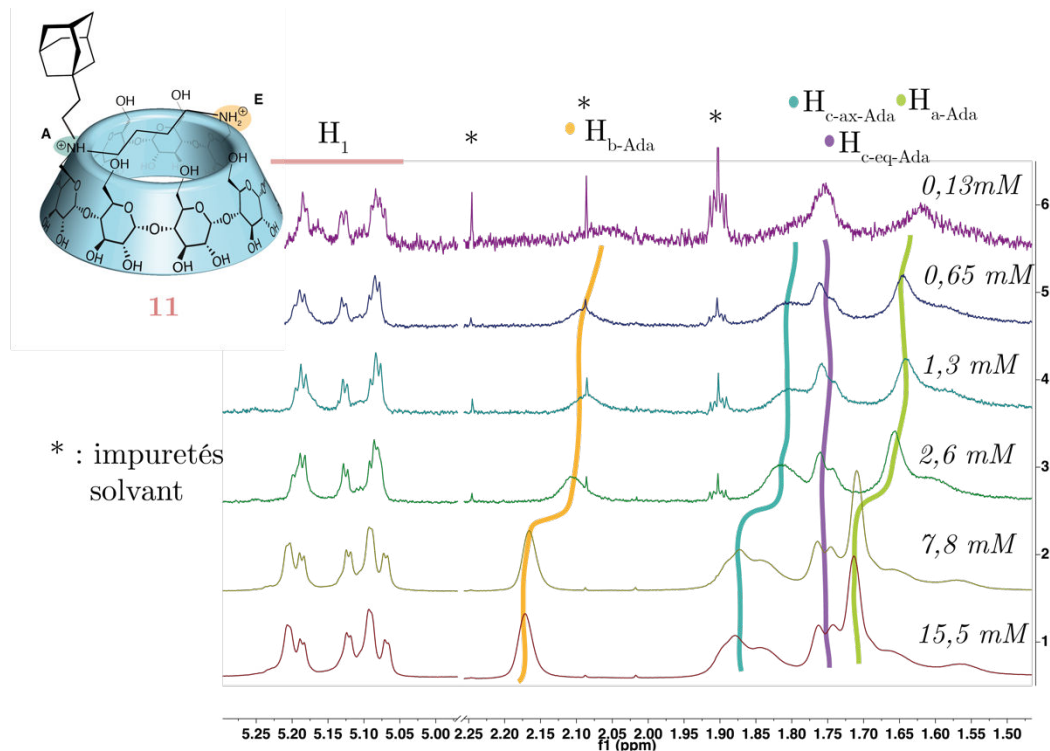


Figure 2. 45 : Etude de dilution par RMN ^1H (D_2O , 600 MHz, 300 K) du composé (**11**)

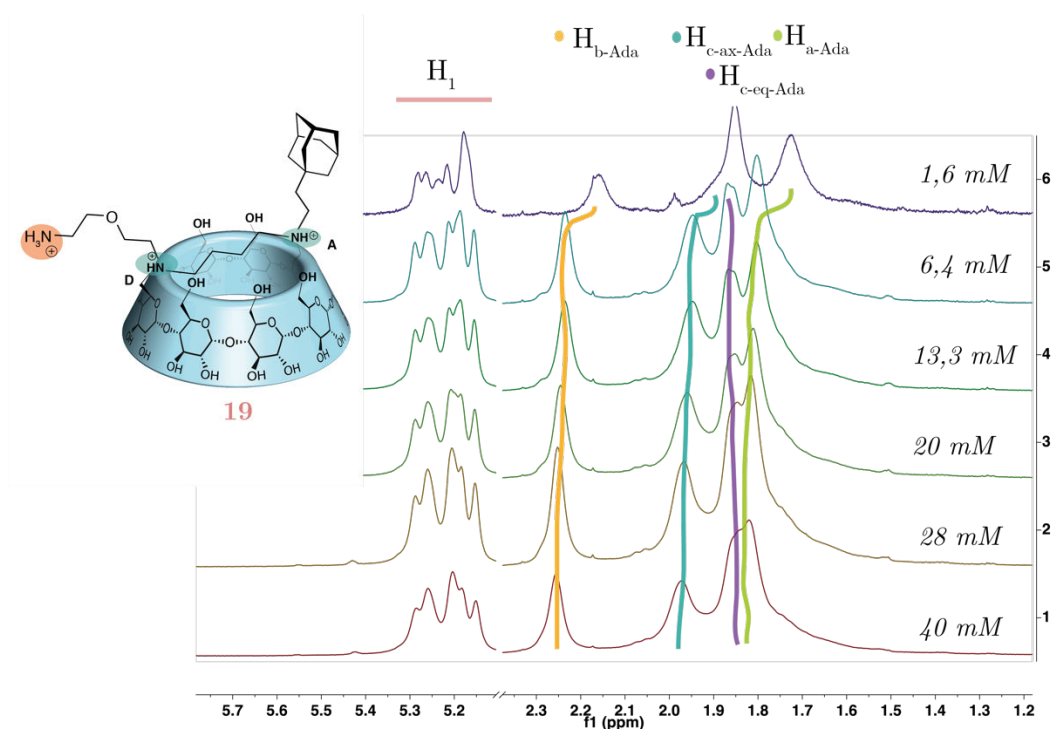


Figure 2. 46 : Etude de dilution par RMN ^1H (D_2O , 600 MHz, 300 K) du composé (**19**)

L'étude de dilution du composé (21) n'a pas permis d'analyser la variation des déplacements chimiques de l'invité en raison des trop nombreux signaux présents dans la région correspondante. Néanmoins, un affinement des signaux relatifs aux H₁ a pu être observé et va dans le sens de la formation d'assemblages supramoléculaires (Figure 2. 47).

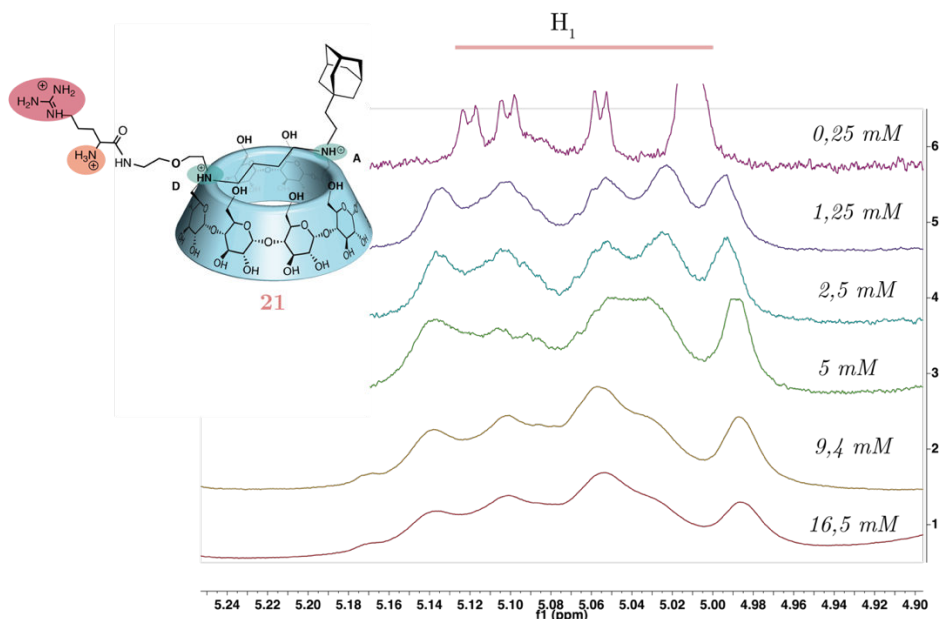


Figure 2. 47 : Etude de dilution par RMN ¹H (D₂O, 600 MHz, 300 K) du composé (21)

Enfin, une étude de compétition a été réalisée avec le composé (10). Pour cela, une solution de (10) dans le D₂O a été dosée par ajouts successifs d'un invité compétiteur. L'adamantane carboxylate a été choisi pour cette étude (Figure 2. 48). Un affinement des signaux relatifs aux H₁ a été observé au fur et à mesure des ajouts d'adamantane carboxylate. Cela témoigne de la formation d'objet de taille plus faible lorsque l'invité compétiteur est ajouté. L'hypothèse avancée est la déconstruction du polymère supramoléculaire au profit de la formation de complexes composés de (10) et de l'adamantane carboxylate.

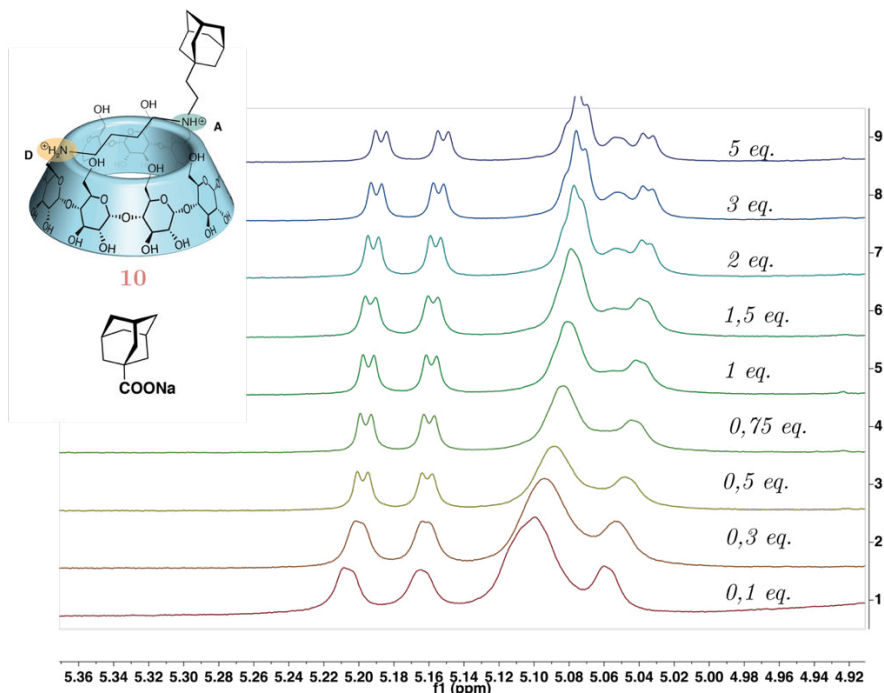


Figure 2. 48 : Etude de dosage par d'adamantyle carboxylate par RMN ¹H (D₂O, 600 MHz, 300 K) du composé (10)

Ainsi, les différentes études réalisées par RMN- ^1H et RMN-ROESY ont montré que les composés (10), (11), (19), et (21) semblent former des espèces supramoléculaires dans l'eau.

2.3.3. Caractérisation de l'assemblage supramoléculaire par ITC

Des mesures d'ITC ont été réalisées afin de pouvoir quantifier cette interaction hôte-invité et calculer la constante d'association des monomères fonctionnalisés. Ces expériences ont été réalisées par Gaëlle Pembouong et Laurent Bouteiller dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Chimie des Polymères de l'IPCM.

Dans un premier temps, deux expériences contrôles ont été réalisées (Figure 2. 49). Tout d'abord une solution du composé (9) ne pouvant pas former d'espèces supramoléculaires a été diluée, produisant un faible échange de chaleur en ITC. À l'inverse un échange de chaleur important a été observé lors de la dilution d'une solution équimolaire de β -CD native et de chlorure d'adamantyle ammonium de manière concentration-dépendante. Ce phénomène est attribué à la dissociation endothermique des complexes adamantyle ammonium/ β -CD native. Un signal similaire a été obtenu avec le composé (10), confirmant la formation de complexes hôtes-invités. L'allure de la courbe obtenue est source d'information quant au mode d'association. En effet dans le cas d'un mode d'association coopératif un plateau est observé en début de dilution. Dans notre cas, aucun plateau n'a été observé : l'association se fait donc selon un modèle isodesmique. Ainsi, en intégrant les courbes obtenues selon ce modèle, une constante d'association de $11\,000\text{ M}^{-1}$ a été obtenue.

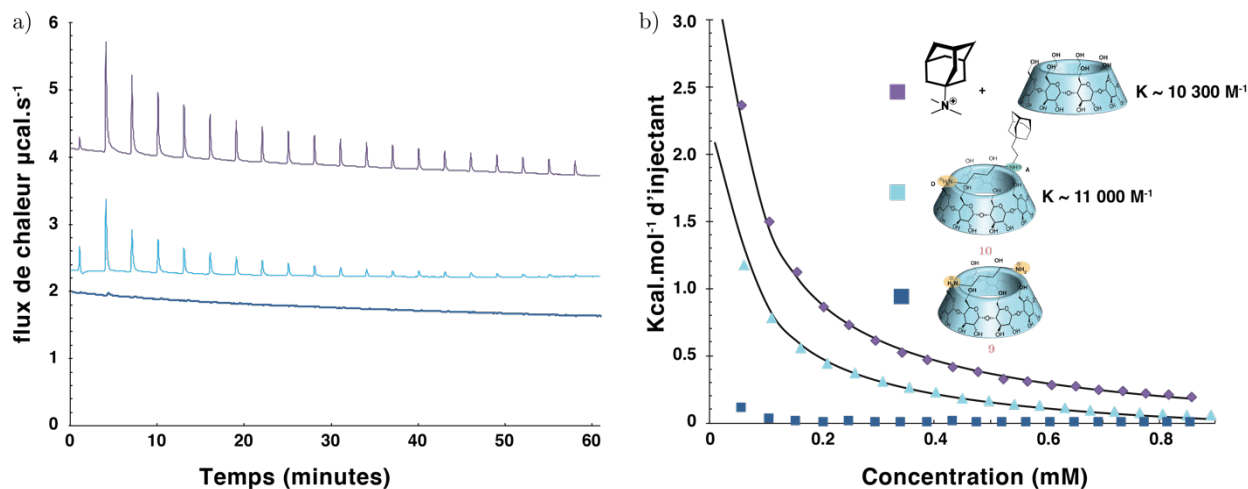


Figure 2. 49 : a) Enthlapogramme et b) Courbes d'ITC obtenues par dilution d'une solution équimolaire de chlorure d'adamantyle ammonium et de β -CD native, et par dilution des composés (9), et (10).

Les molécules (11), (19), (21), et le mélange (12) ont aussi été analysés par ITC. Les constantes d'association obtenues semblent être du même ordre de grandeur que celle obtenue pour le composé (10). Cependant, à cause d'un problème d'appareillage, il n'a pas été possible pour le moment de déterminer ces valeurs précisément. Ces résultats n'ont donc pas été présentés dans ce manuscrit, mais des valeurs précises devraient être obtenues prochainement.

2.3.4. Caractérisation de l'assemblage supramoléculaire par RMN-DOSY

Afin d'évaluer la taille et le comportement des assemblages en solution, des études de RMN-DOSY à deux dimensions ont ensuite été réalisées sur les monomères de cyclodextrines présentés précédemment. L'étude du coefficient de diffusion d'espèces supramoléculaires en fonction de la concentration donne des informations quant au mode d'association des espèces monomériques. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, le coefficient est défini selon la relation :

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$$

D : coefficient de diffusion (m.s^{-1})

k : constante de Boltzmann (J.K^{-1})

T : température en Kelvin (K)

η : viscosité du solvant (Pa.s)

R_h : rayon hydrodynamique (m)

Le rayon hydrodynamique dépend de la taille des espèces en solution et est donc directement proportionnel au degré de polymérisation d'un polymère.

On note alors $DP \propto R_h$, on a donc :

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta a DP}$$

Avec a : constante

Lorsque l'on se place dans un modèle isodesmique, on fait l'approximation que $DP = \sqrt{KC}$, on a alors :

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta a \sqrt{K}} \times \frac{1}{\sqrt{C}}$$

Ainsi, dans une étude de variation de concentration en RMN-DOSY, où l'on se place à température constante dans un solvant uniforme et dont la viscosité est stable, on a :

$$D \propto \frac{1}{\sqrt{C}}$$

Il a en effet été montré qu'une évolution non linéaire était caractéristique de la formation d'oligomères supramoléculaires.¹⁰⁴ À l'inverse, une évolution légèrement décroissante et linéaire est caractéristique de la formation d'agrégats.¹⁰⁵ De plus, il est possible d'avoir une idée du degré de polymérisation à une concentration donnée. Dans l'hypothèse de la formation d'un polymère linéaire, nous pouvons utiliser la relation de Tirado-Garcia de la Torre,¹⁰⁶ permettant de calculer le rapport (p) entre la longueur cylindrique (L) de ce polymère et son diamètre (d) selon la relation suivante :

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta L} \left[\ln\left(\frac{L}{d}\right) + v \right]$$

Et :

$$v = 0.312 + 0.565 \frac{d}{L} - 0.100 \left(\frac{d}{L}\right)^2$$

Avec :

D	Coefficient de diffusion translationnel ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)
k	Constante de Boltzmann ($\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$)
T	Température (K)
η	Viscosité du solvant ($\text{Pa} \cdot \text{s}$)
L	Longueur du cylindre (m)
d	Diamètre du cylindre (m)

On note :

$$p = \frac{L}{d}$$

Ainsi :

$$\frac{3D\pi\eta d}{kT} = \frac{1}{p} \left(\ln(p) + 0.312 + \frac{0.565}{p} - \frac{0.100}{p^2} \right)$$

Il est ensuite possible de tracer la courbe $y = f(p)$, et de calculer en fonction du coefficient de diffusion la valeur du membre de gauche de l'équation. On remonte alors à la valeur de p. Enfin, en considérant que le diamètre d'une β -CD est de 1 nm et sa hauteur d'environ 0,8 nm, nous pouvons calculer le degré de polymérisation à une concentration donnée.

Une étude de RMN-DOSY sur le composé (10) a donc été réalisée. Une augmentation de la concentration (2,4 mM à 4,8 mM) mène à une diminution non linéaire du coefficient de diffusion ($D = 2,3 \cdot 10^{-10}$ à $1,5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), caractéristique de la formation d'oligomères supramoléculaires. À l'inverse, l'évolution des coefficients de diffusion des composés (9) et du composé β -CD-succinyl-adamantyle décrite dans la littérature,⁹⁵ est linéaire. Les coefficients de diffusion restent alors relativement constants et similaires à celle de la β -CD native dans la même gamme de concentration. Ces résultats indiquent que le phénomène d'agrégation n'interfère pas avec celui de la polymérisation supramoléculaire. Cela met en évidence le rôle de la fonction adamantyle dans la formation d'oligomères (Figure 2. 50).

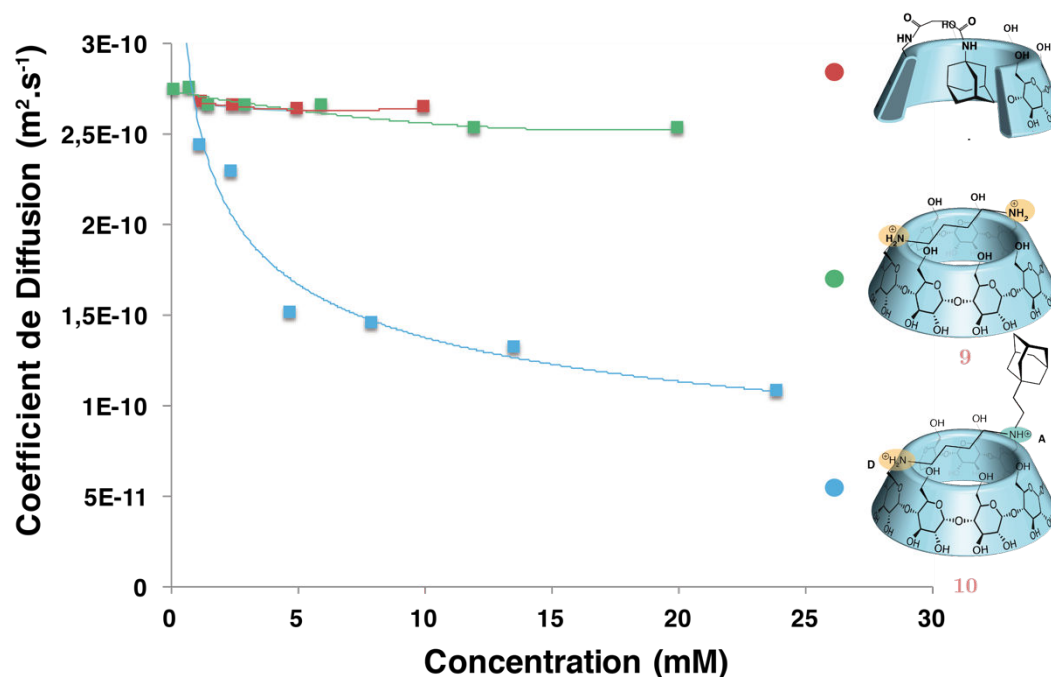


Figure 2. 50 : Evolution des coefficients de diffusion mesurés par RMN-DOSY (D_2O , 600 MHz, 300 K) des composés (9), (10), et du composé auto-inclus décrit dans la littérature.⁹⁵

Plusieurs valeurs de DP pour le composé (10) ont été calculées selon la méthode de Tirado-Garcia de la Torre (exemple à 23,9 mM, Figure 2. 51). Ces valeurs ont été comparées ensuite au DP obtenu selon la relation $DP = \sqrt{KC}$, en prenant $K = 11\ 000\ M^{-1}$ mesuré par ITC (Tableau 2. 3).

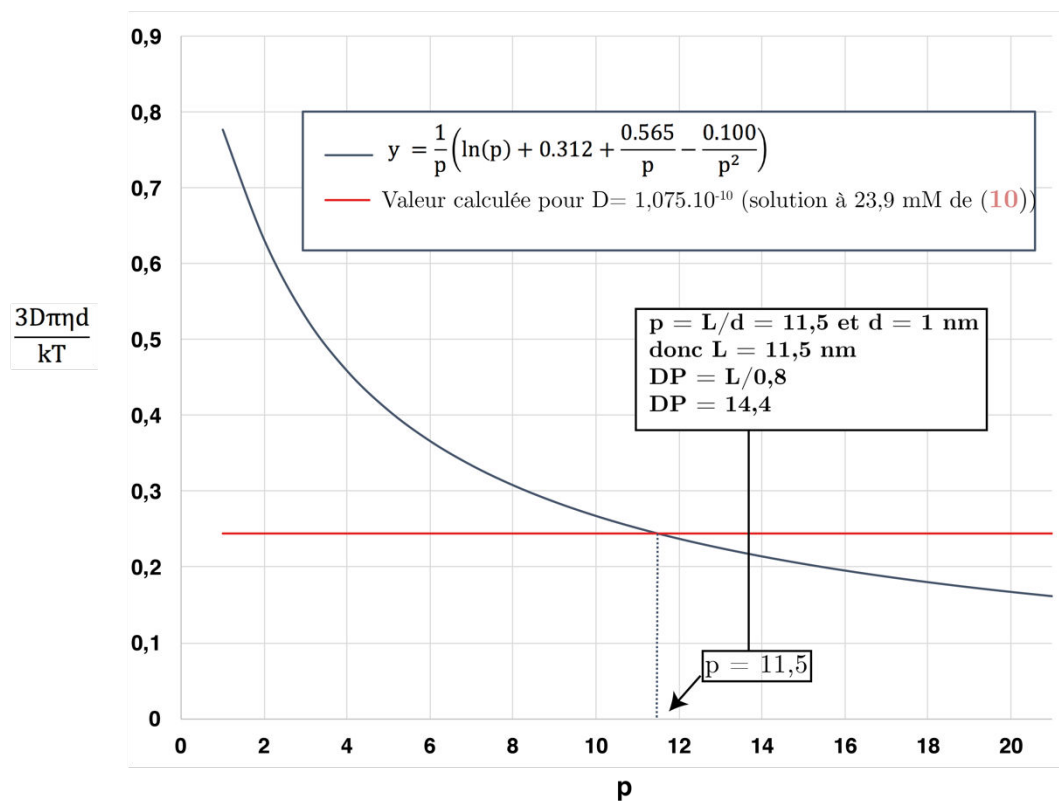


Figure 2. 51 : Exemple du calcul de p pour une solution du composé (10) à 23,9 mM

Tableau 2. 3 : Valeurs de DP calculées pour le composé (10) selon le modèle isodesmique et selon la relation de Tirado-Garcia de la Torre

C (mM)	$p = (L/d)$	DP	$DP = \sqrt{KC}$
1,2	2,3	2,9	3,6
4,8	6,6	8,2	7,3
23,9	11,5	14,4	16,2

On observe que, pour le composé (10), les valeurs de DP obtenues par RMN-DOSY et selon l'équation relative au modèle isodesmique, sont similaires. A forte concentration ce composé forme des oligomères composés de 16 monomères.

Des études semblables ont été réalisées avec les composés (11), (19) et (21). L'allure des courbes est similaire à celle du composé (10). La diminution du coefficient de diffusion est non linéaire et caractéristique de la formation d'oligomères. Les quatre composés semblent s'assembler de manière quasi identique, même si le composé (21) semble avoir des coefficients légèrement plus bas à concentration égale (Figure 2. 52).

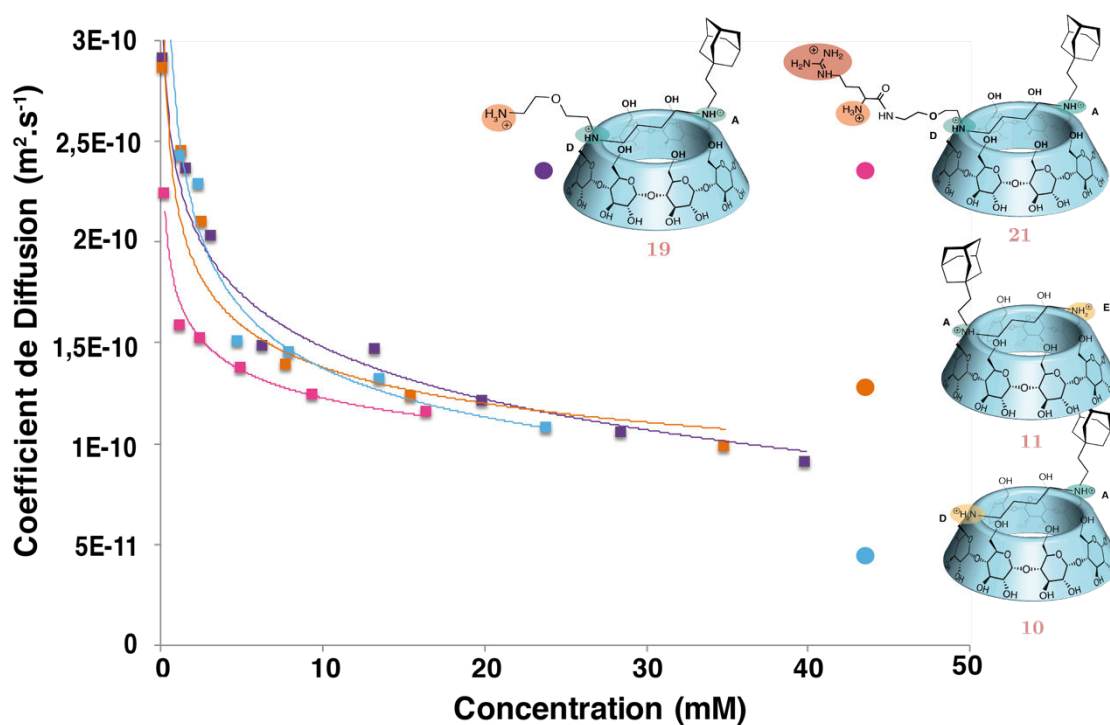


Figure 2. 52 : Evolution des coefficients de diffusion mesurés par RMN-DOSY (D₂O, 600 MHz, 300 K) des composés (10), (11), (19) et (21)

Une étude de RMN-DOSY a aussi été réalisée avec le mélange (12) des régioisomères AD et AE (Figure 2. 53). Étonnamment, les valeurs des coefficients de diffusion obtenues sont plus basses à concentration égale que les régioisomères pris séparément. Il est difficile de conclure quant à l'explication de ce phénomène. Nous pouvons néanmoins faire l'hypothèse que la formation d'un assemblage alternant les deux régioisomères AD et AE est moins consommatrice en énergie et permet l'établissement d'un édifice supramoléculaire plus stable.

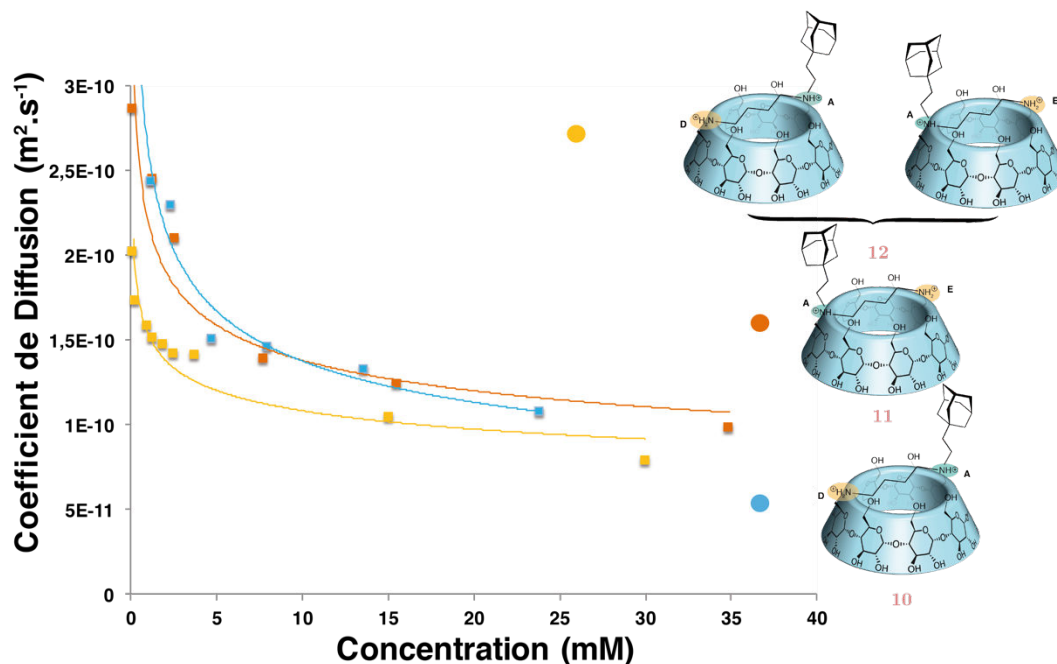


Figure 2. 53 : Evolution des coefficients de diffusion mesurés par RMN-DOSY (D_2O , 600 MHz, 300 K) des composés (10), (11) et du mélange (12)

Les valeurs de plusieurs DP calculées selon les deux méthodes sont résumées dans le **Tableau 2. 4**. Ces résultats montrent la tendance des différents composés à s'assembler. Le comportement en solution semble donc similaire, bien que certaines molécules s'assemblent mieux que d'autres (mélange (12), (21)). Les résultats d'ITC que nous espérons obtenir prochainement devraient permettre de confirmer cette tendance.

Tableau 2. 4 : Valeurs des DP calculés pour les composés (10), (11), (19), (21) selon le modèle isodesmique et selon la relation de Tirado-Garcia de la Torre

Composé	C (mM)	$p = (L/d)$	DP	$DP = \sqrt{KC}$
(10)	1,2	2,3	2,9	3,6
	4,8	6,6	8,2	7,3
	23,9	11,5	14,4	16,2
(11)	1,3	2,3	2,9	Non déterminés
	7,8	7,7	9,6	
	34,9	11,2	14	
(12)	0,13	4	5	Non déterminés
	1,3	6,6	8,2	
	3,8	7,5	9,4	
	30	18,2	22,8	
(19)	1,6	1,6	2	Non déterminés
	6,3	6,9	8,6	
	40	14,8	18,5	
(21)	0,25	3,2	4	Non déterminés
	1,3	6,2	7,8	
	5	7,8	9,8	
	16,5	10,3	12,9	

Enfin, la nature réversible de l'oligomérisation supramoléculaire a été mise en évidence par une expérience de compétition en RMN-DOSY réalisée avec le composé (10). Pour cela une solution à 12 mM a été préparée et dosée par ajouts successifs d'un invité compétiteur (adamantane carboxylate) (Figure 2. 54). L'ajout de seulement 1,5 équivalent d'adamantane carboxylate conduit à une augmentation de $1.13.10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (DP \approx 13) à $2.2.10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (DP \approx 4). Ces résultats confirment l'importance de la fonction adamantyle, et du système hôte-invité, responsable de la formation réversible d'oligomères.

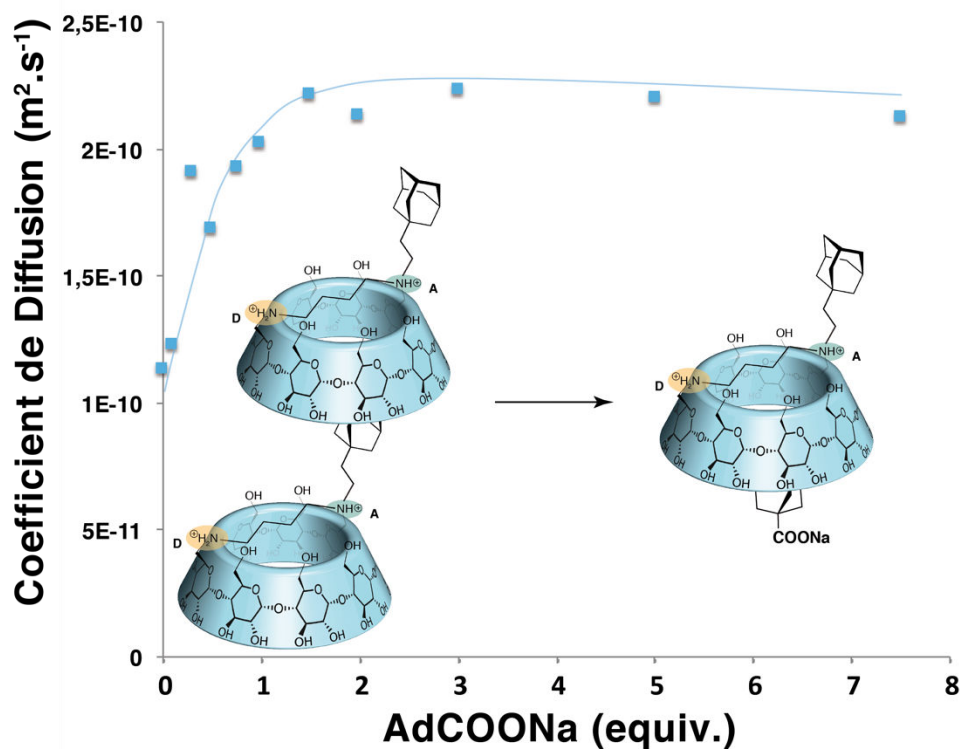


Figure 2. 54 : Evolution du coefficient de diffusion mesuré par RMN-DOSY (D_2O , 600 MHz, 300 K) du composé (10) dosé par ajouts successifs d'équivalents d'adamantane carboxylate.

2.3.5. Caractérisation de l'assemblage supramoléculaire par SANS

Les expériences précédentes nous ont permis de confirmer l'hypothèse de formation d'un assemblage supramoléculaire et d'avoir une idée des DP pour chaque entité à plusieurs concentrations données. Dans l'objectif de savoir la forme des espèces formées et d'en confirmer la taille en solution, des expériences de SANS ont été réalisées.

Ces expériences ont été réalisées par Gaëlle Pembouong et Laurent Bouteiller à l'ILL de Grenoble. Cette technique d'analyse permet de remonter au rayon de giration moyen des espèces en solution selon l'approximation de Guinier (valable pour des valeurs de q faibles) :

$$I(q) = I(0)e^{-\frac{(qR)^2}{3}}$$

Avec :

$I(q)$: intensité diffusée à une distance q du centre de la tache

q : vecteur d'onde (m^{-1})

R : rayon de giration (m)

Une expérience de SANS a été réalisée sur le composé (10) à une concentration de 6,8 mM. Un rayon de giration moyen de 16 Å a été obtenu (Figure 2. 55).

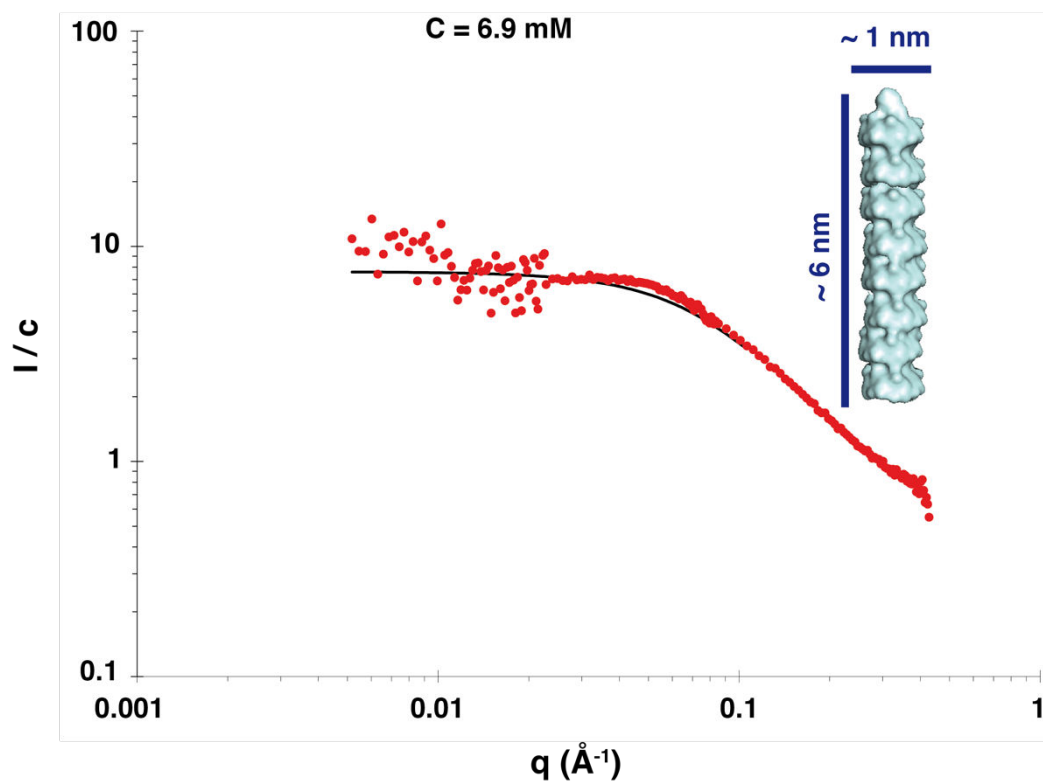


Figure 2. 55 : Valeurs obtenues lors d'une expérience de SANS du composé (10) à 6,9 mM. Les mesures obtenues sont en rouge, la courbe théorique pour un cylindre de rayon 5 Å et de longueur 60 Å en noir.

La valeur du rayon de giration obtenu permet de remonter, à l'aide d'un modèle à la taille et la forme des espèces en solution. En supposant que l'espèce formée est un cylindre, il est possible de tracer la courbe théorique pour un cylindre de rayon de 5 Å (rayon d'une β -CD) et d'une longueur de 60 Å. Cela correspond à un oligomère de 7,5 cyclodextrines fonctionnalisées. À cette concentration l'équation $DP = \sqrt{KC}$ donne un DP de 8,7. Les résultats obtenus en SANS sont donc en accord avec ceux précédemment obtenus et confirment la formation d'oligomères de cyclodextrines.

2.4. Conclusion

Nous avons vu dans ce chapitre que la formation de polymères supramoléculaires était délicate (compétition des interactions dans l'eau, solubilité), mais pouvait se révéler utile dans divers domaines. Dans l'objectif de former des polymères de type AB à base de cyclodextrines, notre équipe a mis au point un système ponté fonctionnalisé par un groupement adamantyle. Ce type de conjugué répond à un problème visible dans la littérature concernant les assemblages de β -CD souvent insolubles ou bien auto-inclus.

Afin d'obtenir des conjugués cationiques pour interagir avec des acides nucléiques, des groupements chargés ont ensuite été insérés. Quatre composés ont été synthétisés et caractérisés. Des assemblages supramoléculaires ont été obtenus et confirmés par RMN-1H, RMN-ROESY, ITC, et RMN-DOSY. Le composé (10) a aussi été étudié par SANS ce qui a montré la formation de courts cylindres correspondant à des oligomères de 7/8 unités de cyclodextrines fonctionnalisées, à une concentration de 7 mM.

Si nous avons confirmé l'aptitude de ces conjugués à s'auto-assembler en solution, nous allons voir maintenant s'ils peuvent aussi complexer des acides nucléiques, et plus particulièrement des siRNA.

2.5. Bibliographie

1. Staudinger, H. Über Polymerisation. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft.* **53**, 1073–1085 (1920).
2. Carothers, W. H. Polymerization. *Chem. Rev.* **8**, (1931).
3. De Greef, T. F. A., Smulders, M. M. J., Wolfs, M., Schenning, A. P. H. J., Sijbesma, R. P. & Meijer, E. W. Supramolecular polymerization. *Chem. Rev.* **109**, 5687–5754 (2009).
4. Sijbesma, R. & Swager, T. Supramolecular Polymers. *Chem. Rev.* 5–8 (2012).
5. Program, U. S. D. of E. G. S. Cellulose Structure and Hydrolysis Challenges.
6. Martin, R. B. Comparisons of Indefinite Self-Association Models. *Chem. Rev.* **96**, 3043–3064 (1996).
7. Knoben, W., Besseling, N. A. M., Bouteiller, L. & Stuart, C. M. a. Dynamics of reversible supramolecular polymers: independent determination of the dependence of linear viscoelasticity on concentration and chain length by using chain stoppers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **7**, 2390–2398 (2005).
8. von Krbek, L. K. S., Schalley, C. A. & Thordarson, P. Assessing cooperativity in supramolecular systems. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 2622–2637 (2017).
9. Hunter, C. A. & Anderson, H. L. What is cooperativity? *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 7488–7499 (2009).
10. Choi, H. S., Ooya, T., Sasaki, S. & Yui, N. Control of Rapid Phase Transition Induced by Supramolecular Complexation of β -Cyclodextrin-Conjugated Poly(ϵ -lysine) with a Specific Guest. *Macromolecules* **36**, 5342–5347 (2003).
11. Choi, H. S., Huh, K. M., Ooya, T. & Yui, N. pH- and thermosensitive supramolecular assembling system: Rapidly responsive properties of β -cyclodextrin-conjugated poly(ϵ -lysine). *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6350–6351 (2003).
12. Deng, W., Yamaguchi, H., Takashima, Y. & Harada, A. A chemical-responsive supramolecular hydrogel from modified cyclodextrins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 5144–5147 (2007).
13. Herbst, F., Döhler, D., Michael, P. & Binder, W. H. Self-healing polymers via supramolecular forces. *Macromol. Rapid Commun.* **34**, 203–220 (2013).
14. Sijbesma, R. P., Beijer, F. H., Brunsveld, L., Folmer, B. J., Hirschberg, J. H., Lange, R. F., Lowe, J. K., Meijer, E. W., Hilger, C., Dräger, M., Stadler, R., Aggeli, A., Lehn, J.-M., Bladon, P., Griffin, A. C., Pourcain, C. B. St., Griffin, A. C., Lillya, C. P., Ducharme, Y., *et al.* Reversible polymers formed from self-complementary monomers using quadruple hydrogen bonding. *Science* **278**, 1601–4 (1997).
15. Cordier, P., Tournilhac, F., Soulié-Ziakovic, C. & Leibler, L. Self-healing and thermoreversible rubber from supramolecular assembly. *Nature* **451**, 977–80 (2008).
16. Nakahata, M., Takashima, Y., Yamaguchi, H. & Harada, A. Redox-responsive self-healing materials formed from host-guest polymers. *Nat. Commun.* **2**, 511 (2011).
17. Yamamoto, Y., Fukushima, T., Suna, Y., Ishii, N., Saeki, A., Seki, S., Tagawa, S., Taniguchi, M., Kawai, T. & Aida, T. Photoconductive Coaxial Nanotubes of Molecularly Connected Electron Donor and Acceptor Layers. *Science* **314**, 1761–1764 (2006).
18. Peurifoy, S. R., Guzman, C. X. & Braunschweig, A. B. Topology, assembly, and electronics: three pillars for designing supramolecular polymers with emergent optoelectronic behavior. *Polym. Chem.* **6**, 5529–5539 (2015).
19. Zhang, S. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1171–1178 (2003).
20. Oshovsky, G. V., Reinhoudt, D. N. & Verboom, W. Supramolecular chemistry in water. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 2366–2393 (2007).
21. Fitzpatrick, A. W. P., Debelouchina, G. T., Bayro, M. J., Clare, D. K., Caporini, M. A., Bajaj, V. S., Jaroniec, C. P., Wang, L., Ladizhansky, V., Müller, S. A., MacPhee, C. E., Waudby, C. A., Mott, H. R., De Simone, A., Knowles, T. P. J., Saibil, H. R., Vendruscolo, M., Orlova, E. V., Griffin, R. G., *et al.* Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- β amyloid fibril. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 5468–73 (2013).
22. Nogales, E. Structural Insights Into Microtubules Function. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 277–302 (2001).
23. Conde, C. & Cáceres, A. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 319–332 (2009).
24. Zhang, X., Chen, Z. & Wu, F. Morphology Control of Fluorescent Nanoaggregates by Co-Self-Assembly of Wedge- and Dumbbell-Shaped Amphiphilic Perylene Bisimides. *J. Am. Chem. Soc.* 4886–4887 (2007).
25. Rehm, S., Stepanenko, V., Zhang, X., Rehm, T. H. & Würthner, F. Spermine-functionalized pen lene bisimide dyes-highly fluorescent bola-amphiphiles in water. *Chem. - An Asian J.* **16**, 3372–3382 (2010).
26. Zhang, X., Rehm, S., Safont-Sempere, M. M. & Wuerthner, F. Vesicular perylene dye nanocapsules as supramolecular fluorescent pH sensor systems. *Nat. Chem.* **1**, 623–629 (2009).

27. Zhang, X., Görl, D., Stepanenko, V. & Wurthner, F. Hierarchical growth of fluorescent dye aggregates in water by fusion of segmented nanostructures. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 1270–1274 (2014).
28. Baram, J., Shirman, E., Ben-Shitrit, N., Ustinov, A., Weissman, H., Pinkas, I., Wolf, S. G. & Rybtchinski, B. Control over self-assembly through reversible charging of the aromatic building blocks in photofunctional supramolecular fibers. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 14966–14967 (2008).
29. Krieg, E., Shirman, E., Weissman, H., Shimoni, E., Wolf, S. G., Pinkas, I. & Rybtchinski, B. Supramolecular gel based on a perylene diimide dye: Multiple stimuli responsiveness, robustness, and photofunction. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 14365–14373 (2009).
30. Ustinov, A., Weissman, H., Shirman, E., Pinkas, I., Zuo, X. & Rybtchinski, B. Supramolecular Polymers in Aqueous Medium: Rational Design Based on Directional Hydrophobic Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 16201–16211 (2011).
31. Huang, Z., Lee, H., Lee, E., Kang, S., Nam, J. & Lee, M. of aqueous nanofibres. *Nat. Commun.* **2**, 455–459 (2011).
32. Kumar, M., Brocorens, P., Tonnelé, C., Beljonne, D., Surin, M. & George, S. J. A dynamic supramolecular polymer with stimuli-responsive handedness for in situ probing of enzymatic ATP hydrolysis. *Nat. Commun.* **5**, 5793 (2014).
33. Winiger, C. B., Li, S., Kumar, G. R., Langenegger, S. M. & Häner, R. Long-distance electronic energy transfer in light-harvesting supramolecular polymers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 13609–13613 (2014).
34. Rao, K. V., Jayaramulu, K., Maji, T. K. & George, S. J. Supramolecular hydrogels and high-aspect-ratio nanofibers through charge-transfer-induced alternate coassembly. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 4218–4222 (2010).
35. Wu, J., Li, J., Kolb, U. & Müllen, K. A water-soluble hexa-peri-hexabenzocoronene: synthesis, self-assembly and role as template for porous silica with aligned nanochannels. *Chem. Commun.* 48–50 (2006).
36. El Hamaoui, B., Zhi, L., Pisula, W., Kolb, U., Wu, J. & Mullen, K. Self-assembly of amphiphilic imidazolium-based hexa-peri-hexabenzocoronenes into fibrous aggregates. *Chem. Commun.* 2384–2386 (2007).
37. Hill, J. P., Jin, W., Kosaka, A., Fukushima, T., Ichihara, H., Shimomura, T., Ito, K., Hashizume, T., Ishii, N. & Aida, T. Hexa- peri -hexabenzocoronene Graphitic Nanotube. *Science* **304**, 1481–1483 (2004).
38. Zhang, G., Jin, W., Fukushima, T., Kosaka, A., Ishii, N. & Aida, T. Formation of water-dispersible nanotubular graphitic assembly decorated with isothiuronium ion groups and its supramolecular functionalization. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 719–722 (2007).
39. Kemper, B., Hristova, Y. R., Tacke, S., Stegemann, L., van Bezouwen, L. S., Stuart, M. C. A., Klingauf, J., Strassert, C. A. & Besenius, P. Facile synthesis of a peptidic Au(I)-metalloamphiphile and its self-assembly into luminescent micelles in water. *Chem. Commun.* **51**, 5253–5256 (2015).
40. Mauro, M., Aliprandi, A., Septiadi, D., Kehr, N. S. & De Cola, L. When self-assembly meets biology: luminescent platinum complexes for imaging applications. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 4144–66 (2014).
41. Hirschberg, J. H. K. K.; Brunsveld, L.; Ramzi, Ai.; Vekemans, J. A. J. M.; Sijbesma, R. P.; Meijer, E. W. Helical self-assembled polymers from cooperative stacking of hydrogen-bonded pairs. *Nature* **407**, 167–170 (2000).
42. Dankers, P. Y. W., Hermans, T. M., Baughman, T. W., Kamikawa, Y., Kieleyka, R. E., Bastings, M. M. C., Janssen, H. M., Sommerdijk, N. A. J. M., Larsen, A., Van Luyn, M. J. A., Bosman, A. W., Popa, E. R., Fytas, G. & Meijer, E. W. Hierarchical formation of supramolecular transient networks in water: A modular injectable delivery system. *Adv. Mater.* **24**, 2703–2709 (2012).
43. Besenius, P., Heynens, J. L. M., Straathof, R., Nieuwenhuizen, M. M. L., Bomans, P. H. H., Terreno, E., Aime, S., Strijkers, G. J., Nicolay, K. & Meijer, E. W. Paramagnetic self-assembled nanoparticles as supramolecular MRI contrast agents. *Contrast Media Mol. Imaging.* **7**, 356–361 (2012).
44. Besenius, P., Portale, G., Bomans, P. H. H., Janssen, H. M., Palmans, A. R. A. & Meijer, E. W. Controlling the growth and shape of chiral supramolecular polymers in water. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 17888–17893 (2010).
45. Fenniri, H., Mathivanan, P., Vidale, K. L., Sherman, D. M., Hallenga, K., Wood, K. V & Stowell, J. G. Helical Rosette Nanotubes: Design, Self-Assembly, and Characterization. 3854–3855 (2001).
46. Fenniri, H., Deng, B., Ribbe, A. E., Hallenga, K., Jacob, J. & Thiyagarajan, P. Entropically driven self-assembly of multichannel rosette nanotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 6487–6492 (2002).
47. Fenniri, H., Deng, B., Ribbe, A. E. & Lafayette, W. Helical Rosette Nanotubes with Tunable Chiroptical Properties Induced Supramolecular Chirality in the Rosette Nano-. 11064–11072 (2002).
48. Cafferty, B. J., Avirah, R. R., Schuster, G. B. & Hud, N. V. Ultra-sensitive pH control of supramolecular polymers and hydrogels: pK a matching of biomimetic monomers. *Chem. Sci.* **5**, 9–10 (2014).
49. Cafferty, B. J., Gállego, I., Chen, M. C., Farley, K. I., Eritja, R. & Hud, N. V. Efficient self-assembly in water of long noncovalent polymers by nucleobase analogues. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 2447–2450 (2013).

50. Iwaura, R., Yoshida, K., Masuda, M., Ohnishi-Kameyama, M., Yoshida, M. & Shimizu, T. Oligonucleotide-templated self-assembly of nucleotide bolaamphiphiles: DNA-like nanofibers edged by a double-helical arrangement of A-T base pairs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 1009–1012 (2003).
51. Iwaura, R., Hoeben, F. J. H., Masuda, M., Schenning, A. P. H. J., Meijer, E. W. & Shimizu, T. Molecular level helical stack of a nucleotide appended Oligo(p-phenylenevinylene) Directed by Supramolecular Self-Assembly with a Complementary Oligonucleotide as a Template. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 13298–13304 (2006).
52. Rothmund, P. W. K., Ekani-Nkodo, A., Papadakis, N., Kumar, A., Fyngenson, D. K. & Winfree, E. Design and characterization of programmable DNA nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 16344–16352 (2004).
53. Aldaye, F. A., Lo, P. K., Karam, P., McLaughlin, C. K., Cosa, G. & Sleiman, H. F. Modular construction of DNA nanotubes of tunable geometry and single- or double-stranded character. *Nat. Nanotechnol.* **4**, 349–352 (2009).
54. Rothmund, P. W. K. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* **440**, 297–302 (2006).
55. Ni, R., Zhou, J., Hossain, N. & Chau, Y. Virus-inspired nucleic acid delivery system: Linking virus and viral mimicry. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **106**, 3–26 (2016).
56. Bakker, M. H., Lee, C. C., Meijer, E. W., Dankers, P. Y. W. & Albertazzi, L. Multicomponent Supramolecular Polymers as a Modular Platform for Intracellular Delivery. *ACS Nano*. **10**, 1845–1852 (2016).
57. Lim, Y. B., Lee, E., Yoon, Y. R., Lee, M. S. & Lee, M. Filamentous artificial virus from a self-assembled discrete nanoribbon. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 4525–4528 (2008).
58. Ruff, Y., Moyer, T., Newcomb, C. J., Demeler, B. & Stupp, S. I. Precision templating with DNA of a virus-like particle with peptide nanostructures. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 6211–6219 (2013).
59. Hernandez-Garcia, A., Kraft, D. J., Janssen, A. F. J., Bomans, P. H. H., Sommerdijk, N. A. J. M., Thies-Weesie, D. M. E., Favretto, M. E., Brock, R., de Wolf, F. A., Werten, M. W. T., van der Schoot, P., Stuart, M. C. & de Vries, R. Design and self-assembly of simple coat proteins for artificial viruses. *Nat. Nanotechnol.* **9**, 698–702 (2014).
60. Ni, R. & Chau, Y. Structural mimics of viruses through peptide/DNA Co-assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 17902–17905 (2014).
61. Hernandez-Garcia, A., Kraft, D. J., Janssen, A. F. J., Bomans, P. H. H., Sommerdijk, N. A. J. M., Thies-Weesie, D. M. E., Favretto, M. E., Brock, R., de Wolf, F. A., Werten, M. W. T., van der Schoot, P., Stuart, M. C. & de Vries, R. Design and self-assembly of simple coat proteins for artificial viruses. *Nat. Nanotechnol.* **9**, 698–702 (2014).
62. Janssen, P. G. A., Vandenbergh, J., Van Dongen, J. L. J., Meijer, E. W. & Schenning, A. P. H. J. ssDNA templated self-assembly of chromophores. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 6078–6079 (2007).
63. Surin, M., Janssen, P. G. A., Lazzaroni, R., Leclere, P., Meijer, E. W. & Schenning, A. P. H. J. Supramolecular Organization of ssDNA-Templated pi-Conjugated Oligomers via Hydrogen Bonding. *Adv. Mater.* **21**, 1126–1130 (2009).
64. Barrow, S. J., Kaseira, S., Rowland, M. J., Del Barrio, J. & Scherman, O. A. Cucurbituril-Based Molecular Recognition. *Chem. Rev.* **115**, 12320–12406 (2015).
65. Guo, D.-S. & Liu, Y. Calixarene-based supramolecular polymerization in solution. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 5907 (2012).
66. Zhang, H. & Zhao, Y. Pillararene-based assemblies: Design principle, preparation and applications. *Chem. - An Asian J.* **19**, 16862–16879 (2013).
67. Schmidt, B. & Barner-Kowollik, C. Dynamic Macromolecular Material Design - The Versatility of Cyclodextrin Based Host/Guest Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2–22** (2017).
68. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. *Compt. Rend. Hebd.* **112**, 536 (1891).
69. Freudenberg, K., Blomqvist, G., Ewald, L. & Soff, K. Hydrolyse und acetolyse der starke und der schardinger-dextrin. *Ber. Dtsch. Chem. Ges* 1258–1266 (1936).
70. French, D., Levine, M. L., Pazur, J. H. & Norberg, E. Studies on the schardinger dextrins. The preparation and solubility characteristics of alpha, beta and gamma dextrins. 353–356 (1949).
71. Crini, G. Review: A history of cyclodextrins. *Chemical Reviews* **114**, 10940–10975 (2014).
72. Cheng, M. J., Wang, Y., Yu, L. L., Su, H. J., Han, W. D., Lin, Z. F., Li, J. S., Hao, H. J., Tong, C., Li, X. L. & Shi, F. Macroscopic Supramolecular Assembly to Fabricate 3D Ordered Structures: Towards Potential Tissue Scaffolds with Targeted Modification. *Adv. Funct. Mater.* **25**, 6851–6857 (2015).
73. Rekharsky, M. V. & Inoue, Y. Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* **98**, 1875–1918 (1998).
74. Minoru Sakurai, Masaki Kitagawa, Hajime Hoshi, Yoshio Inoue, R. C. A molecular orbital study of cyclodextrin (cyclomalto- oligosaccharide) inclusion complexes. Iii, dipole moments of cyclodextrins in various types of inclusion complex. *Carbohydr. Res.* **198**, 181–191 (1990).

75. Bothner-By, A. A., Stephens, R. L., Lee, J. M., Warren, C. D. & Jeanloz, R. W. Structure Determination of a Tetrasaccharide: Transient Nuclear Overhauser Effects in the Rotating Frame. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 811–813 (1984).
76. Otter, A. & Kotovych, G. The solution conformation of the synthetic tubulin fragment Ac-tubulin- α (430–441)-amide based on two-dimensional ROESY experiments. *Can. J. Chem.* **66**, 1814 (1988).
77. Liu, Y., Wang, Z. & Zhang, X. Characterization of supramolecular polymers. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 5922–5932 (2012).
78. González-Gaitano, G., Rodríguez, P., Isasi, J. R., Fuentes, M., Tardajos, G. & Sánchez, M. The aggregation of cyclodextrins as studied by photon correlation spectroscopy. *J. Incl. Phenom.* **44**, 101–105 (2002).
79. Ohga, K., Takashima, Y., Takahashi, H., Kawaguchi, Y., Yamaguchi, H. & Harada, A. Preparation of supramolecular polymers from a cyclodextrin dimer and ditopic guest molecules: Control of structure by linker flexibility. *Macromolecules* **38**, 5897–5904 (2005).
80. Hugo, V., Tellini, S., Jover, A., Garca, J. C., Galantini, L., Mejjide, F., Tato, J. V., Hugo, V., Tellini, S., Jover, A., Garcı, J. C., Galantini, L. & Mejjide, F. Thermodynamics of Formation of Host - Guest Supramolecular Polymers Thermodynamics of Formation of Host - Guest Supramolecular Polymers. *J. Am. Chem. Soc.* 5728–5734 (2006).
81. Leggio, C., Anselmi, M., Nola, A. Di, Galantini, L., Jover, A., Mejjide, F., Pavel, N. V., Hugo, V., Tellini, S., Chimica, D., Uni, V., Sapienza, L., Moro, P. A., March, R. V., Re, V., Recci, M. & May, V. Study on the Structure of Host - Guest Supramolecular Polymers. *Macromolecules* 5899–5906 (2007).
82. Dong, R., Su, Y., Yu, S., Zhou, Y., Lu, Y. & Zhu, X. A redox-responsive cationic supramolecular polymer constructed from small molecules as a promising gene vector. *Chem. Commun.* **49**, 9845 (2013).
83. Munteanu, M., Choi, S. & Ritter, H. Supramolecular structures based on dimeric combinations of cyclodextrin and adamantane via click chemistry. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **62**, 197–202 (2008).
84. Yamauchi, K., Miyawaki, A., Takashima, Y., Yamaguchi, H. & Harada, A. Switching from *altro- α* -Cyclodextrin dimer to pseudo[1]rotaxane dimer through tumbling. *Org. Lett.* **12**, 1284–1286 (2010).
85. Terao, J., Konoshima, Y., Matono, A., Masai, H., Fujihara, T. & Tsuji, Y. Synthesis of an organic-soluble π -conjugated [3]rotaxane via rotation of glucopyranose units in permethylated β -cyclodextrin. *Beilstein J. Org. Chem.* **10**, 2800–2808 (2014).
86. Manuel, S., Azaroual, N., Landy, D., Six, N., Hapiot, F. & Monflier, E. Unusual inversion phenomenon of β -cyclodextrin dimers in water. *Chem. - An Asian J.* **17**, 3949–3955 (2011).
87. Dimers, H. G., Takahashi, H., Takashima, Y., Yamaguchi, H. & Harada, A. Selection between Pinching-Type and Supramolecular Polymer-Type Complexes by *r*-Cyclodextrin - *r*-Cyclodextrin Hetero-Dimer and. 4878–4883 (2006).
88. Harada, A., Hashidzume, A. & Takashima, Y. Cyclodextrin-based supramolecular polymers. *Adv. Polym. Sci.* **201**, 1–43 (2006).
89. Munteanu, M., Kolb, U. & Ritter, H. Supramolecular Nanocycles Comprising β -Cyclodextrin-click-Ferrocene Units: Rings of Rings of Rings. *Macromol. Rapid Commun.* **31**, 616–618 (2010).
90. Tellini, V. H. S., Jover, A., Galantini, L., Mejjide, F. & Vázquez Tato, J. Crystal structure of the supramolecular linear polymer formed by the self-assembly of mono-6-deoxy-6-adamantylamide- β -cyclodextrin. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci.* **60**, 204–210 (2004).
91. Harada, A., Kawaguchi, Y. & Hoshino, T. Supramolecular polymers formed by modified cyclodextrins. *J. Incl. Phenom.* **41**, 115–121 (2001).
92. Harada, A., Miyauchi, M. & Hoshino, T. Supramolecular Polymers Formed by Cinnamoyl Cyclodextrins. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **41**, 3519–3523 (2003).
93. Miyauchi, M., Kawaguchi, Y. & Harada, A. Formation of supramolecular polymers constructed by cyclodextrins with cinnamamide. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **50**, 57–62 (2004).
94. Hoshino, T., Miyauchi, M., Kawaguchi, Y., Yamaguchi, H. & Harada, A. Daisy chain necklace: Tri[2]rotaxane containing cyclodextrins [21]. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 9876–9877 (2000).
95. Tran, D. N., Colesnic, D., Adam de Beaumais, S., Pembouong, G., Portier, F., Queijo, Á. A., Tato, J. V., Zhang, Y., Ménand, M., Bouteiller, L. & Sollogoub, M. Cyclodextrin-adamantane conjugates, self-inclusion and aggregation versus supramolecular polymer formation. *Org. Chem. Front.* **1**, 703–706 (2014).
96. Carrazana, J., Jover, A., Mejjide, F., Soto, V. H. & Tato, J. V. Complexation of adamantyl compounds by β -cyclodextrin and monoaminoderivatives. *J. Phys. Chem. B.* **109**, 9719–9726 (2005).
97. Khan, A. R., Forgo, P., Stine, K. J. & D'Souza, V. T. Methods for Selective Modifications of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* **98**, 1977–1996 (1998).
98. Rong, D. & D'Souza, V. T. A convenient method for functionalization of the 2-position of cyclodextrins.

Tetrahedron Lett. **31**, 4275–4278 (1990).

99. Convenient preparation and effective separation of the C-2 and C-3 tosylates of α -cyclodextrins. *Tetrahedron Lett.* **25**, 5673–5676 (1984).
100. Lecourt, T., Herault, A., Pearce, A. J., Sollogoub, M. & Sinaÿ, P. Triisobutylaluminium and diisobutylaluminium hydride as molecular scalpels: The regioselective stripping of perbenzylated sugars and cyclodextrins. *Chem. - An Asian J.* **10**, 2960–2971 (2004).
101. Pearce, A. J. & Sinaÿ, P. Diisobutylaluminum-promoted regioselective de-O-benylation of perbenzylated cyclodextrins: A powerful new strategy for the preparation of selectively modified cyclodextrins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 3610–3612 (2000).
102. Wang, B., Zaborova, E., Guieu, S., Petrillo, M., Guitet, M., Blériot, Y., Ménand, M., Zhang, Y. & Sollogoub, M. Site-selective hexa-hetero-functionalization of α -cyclodextrin an archetypical C6-symmetric concave cycle. *Nat. Commun.* **5**, 5354 (2014).
103. He, Y., Fu, P., Shen, X. & Gao, H. Cyclodextrin-based aggregates and characterization by microscopy. *Micron* **39**, 495–516 (2008).
104. Wang, F., Zhang, J., Ding, X., Dong, S., Liu, M., Zheng, B., Li, S., Wu, L., Yu, Y., Gibson, H. W. & Huang, F. Metal coordination mediated reversible conversion between linear and cross-linked supramolecular polymers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 1090–1094 (2010).
105. Valente, A. J. M., Carvalho, R. A. & Söderman, O. Do Cyclodextrins Aggregate in Water? Insights from NMR Experiments. *Langmuir* **31**, 6314–6320 (2015).
106. De La Torre, J. G., Martinez, M. C. L. & Tirado, M. M. Dimensions of short, rodlike macromolecules from translational and rotational diffusion coefficients. Study of the gramicidin dimer. *Biopolymers* **23**, 611–615 (1984).

Chapitre 3

Utilisation d'assemblages supramoléculaires en tant qu'agents de complexation et de transfection de siRNA

3. UTILISATION D'ASSEMBLAGES SUPRAMOLÉCULAIRES EN TANT QU'AGENTS DE COMPLEXATION ET DE TRANSFECTION DE siRNA

Dans le chapitre 2, nous avons montré que les conjugués de cyclodextrines fonctionnalisées pontées pouvaient former des édifices supramoléculaires polycationiques. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, les espèces polycationiques présentent une certaine aptitude à complexer les acides nucléiques, et à les transférer. Nous allons donc dans ce chapitre 3 mesurer l'efficacité de notre système à interagir avec les siRNA.

Dans un premier temps nous allons étudier la capacité de notre système à complexer les siRNA. En effet, afin de mettre au point un système efficace de transfection, il est important d'une part d'écranter les charges des siRNA pour leur permettre de franchir la barrière cellulaire, mais aussi de les protéger, notamment des RNAses. Pour ce faire, des études d'électrophorèse sur gel d'agarose ont été réalisées. Dans un second temps nous avons procédé à des études de transfection. Ces études d'électrophorèse et de transfection ont été effectuées à l'hôpital de la Pitié Salpêtrière, et en partie réalisée par Adélie Gothland, ingénieur d'études. Enfin nous avons observé et caractérisé ces assemblages par cryo-microscopie.

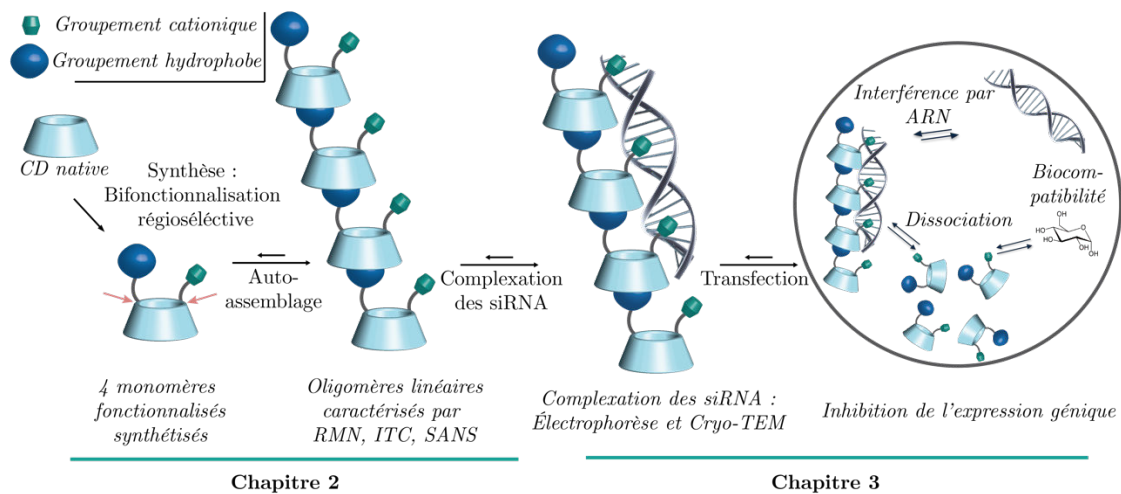


Figure 3. 1 : Conception du système : objectifs réalisés et à venir

3.1. Etudes de complexation : Electrophorèse sur gel d'agarose

3.1.1. Principe et méthode

3.1.1.1. Principe de l'Électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique de séparation des macromolécules en fonction de leur propriété intrinsèque (taille, charge électrique, conformation). Lors d'une électrophorèse, les molécules traversent un gel sous l'impulsion d'un courant électrique.

L'énergie motrice de cette technique est ainsi la tension appliquée par des électrodes placées de part et d'autre du gel.

En fonction de leurs charges, les espèces chargées électriquement vont, soit migrer vers la cathode, soit vers l'anode (**Figure 3. 2**). A titre d'exemple à pH neutre les phosphates des ADN ou des ARN sont chargés négativement, et migreront en conséquence de la cathode vers l'anode. Cette méthode est utilisée classiquement pour séparer et identifier des macromolécules biologiques comme les ADN, ARN, ou les peptides. La séparation des molécules par électrophorèse dépend de deux paramètres : la charge et la masse des molécules. Lorsqu'une molécule est appliquée sur un gel et soumise à un champ électrique, celle-ci va être attirée en fonction de sa charge par l'une des électrodes. La force de friction du gel joue alors le rôle de tamis moléculaire et permet de séparer les molécules par taille : plus une espèce est petite plus celle-ci pourra migrer facilement à travers le gel d'agarose.

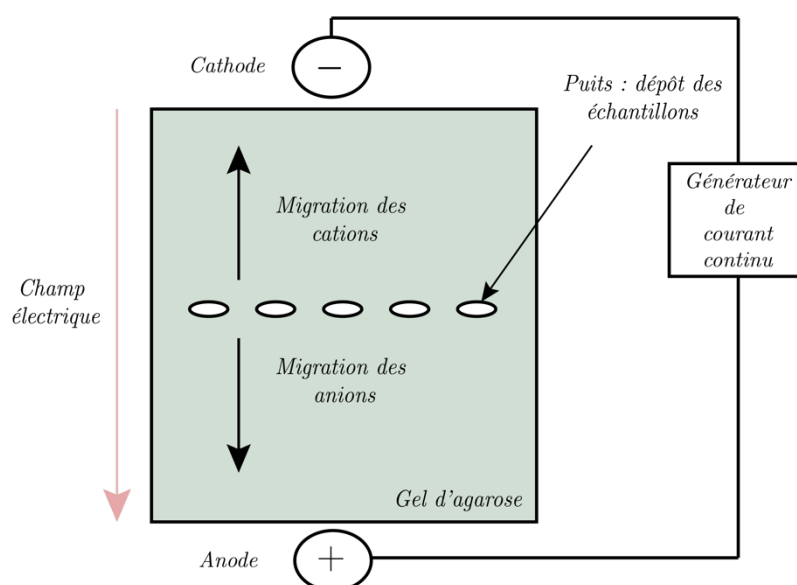


Figure 3. 2 : Principe de l'électrophorèse sur gel d'agarose

Lorsqu'une tension est appliquée sur un gel, un gradient de potentiel noté E peut être exprimé selon :

$$E = \frac{V}{d}$$

Avec :

V : tension en volts

d : distance en cm entre les électrodes

Une force notée F est alors générée et est responsable de la poussée des molécules vers une électrode :

$$F = E \cdot q$$

Avec :

q : charge en coulomb de la molécule

Il existe aussi une certaine résistance de friction qui ralentit le déplacement des molécules. Elle dépend de plusieurs paramètres comme la taille hydrodynamique de la molécule, sa forme, la taille des pores du gel, et la viscosité du tampon. On note alors la vitesse v des molécules soumises à un champ électrique :

$$v = \frac{Eq}{f}$$

Avec :

f : coefficient de friction

On note alors la mobilité électrophorétique M d'un ion tel que :

$$M = \frac{v}{E} = \frac{q}{f}$$

Ainsi lorsqu'une différence potentielle est appliquée, les molécules vont être séparées en fonction de leur mobilité électrophorétique.

3.1.1.2. Méthode

Les siRNA sont des courts ARN, composés de phosphate, et donc chargés négativement en milieu tamponné. Libres, leur mobilité électrophorétique permettra leur déplacement vers l'anode. À l'inverse, en présence d'espèces cationiques, un complexe neutre peut se former. Il est donc possible de distinguer par électrophorèse les siRNA complexés et non complexés.

Pour ces études nous utiliserons un gel d'agarose à 0,8 % tamponné à pH = 8,3 par du TBE (Tris Borate EDTA) afin de s'assurer que les phosphates des siRNA soient déprotonnés, et à l'inverse que les amines et/ou arginines des espèces cationiques soient protonnées. Enfin les siRNA seront révélés au BET (Bromure d'éthidium). Le BET est un agent d'intercalation qui lorsqu'il est exposé aux ultraviolets, devient fluorescent. L'intensité de la fluorescence du BET est vingt fois plus intense lorsqu'il est lié à un acide nucléique.

3.1.2. Résultats et discussions

3.1.2.1. Etude de complexation

Plusieurs études menées sur des polymères polycationiques comme les polyéthylènimines ont montré que les amines primaires interagissaient plus facilement avec les acides nucléiques, comparées aux amines secondaires et tertiaires.^{1,2} Dans la littérature, on considère souvent qu'à pH physiologique, les amines primaires sont totalement protonnées, les amines secondaires en partie, et les amines tertiaires peu voire pas du tout.³ Les amines tertiaires sont d'ailleurs souvent utilisées comme fonction tampon, facilitant la déstabilisation de l'endosome (pH=4-5) après internalisation et donc l'évasion endosomale^{4,5}. D'autre part, l'accessibilité des amines va en décroissant avec leur degré de substitution. Les interactions électrostatiques coulombiennes formées entre les acides nucléiques et les amines sont donc plus fortes avec des amines primaires, puis secondaires et enfin tertiaires. Afin de rendre plus lisibles les résultats de complexation d'acide nucléique, on définit alors un ratio N/P⁶ tel que :

$$\frac{N}{P} = \frac{\text{nombre de moles de cations} \cdot \text{nombre de charges par molécules}}{\text{nombre de moles de siRNA} \cdot \text{nombre de paires de bases} \times 2}$$

Pour les polymères covalents de type cationiques, on considère pour le calcul de ce ratio, uniquement les amines primaires. Les composés synthétisés dans ce projet ne possèdent cependant pas toujours d'amines primaires. Afin de clarifier la définition du ratio N/P qui sera utilisée dans ce manuscrit, un dosage du composé (10) nous a permis d'avoir une idée des pKa des amines secondaires et tertiaires du pont. L'amine secondaire possède un pKa d'environ 9 et l'amine tertiaire un pKa compris entre 6,8 et 8. Ainsi les amines secondaires du pont sont toujours protonnées à pH physiologique (pH = 7,4). Les amines tertiaires sont quant à elles partiellement chargées, et donc partiellement ionisables dans l'endosome. Cela présente un avantage certain pour faciliter l'échappement endosomal. Il est cependant difficile de déterminer un ratio N/P précis pour notre système. Nous ferons donc l'approximation que toutes les amines du pont sont protonnées, sous estimant donc très certainement le ratio N/P.

L'aptitude à interagir avec les siRNA des différents composés synthétisés précédemment a donc été évaluée par électrophorèse. Afin d'être homogène avec les expériences de transfection, des siRNA GL3 (20 µM) dirigés contre l'expression de luciférase ont été utilisés.

Dans un premier temps, les composés (9) et (14) ont été mélangés avec des siRNA à différentes concentrations en CD allant de 0 à 7,5 mM. Aux concentrations étudiées, aucune interaction entre les composés (9) et (14) et les siRNA n'a pu être observée par électrophorèse. En effet, la migration des siRNA est constante et aucun retard de migration n'a lieu (Figure 3. 3). Une expérience similaire a alors été réalisée avec les composés (10) et (11) (Figure 3. 4). Un retard de migration est clairement observable pour le composé (10) à partir de 0,2 mM et une complexation totale des siRNA a lieu à 0,4 mM. Des résultats similaires ont été obtenus pour le composé (11), bien qu'un léger décalage soit observé. Néanmoins, les concentrations auxquelles la complexation est observée, sont trop proches pour pouvoir conclure quant à une différence d'efficacité des deux composés.

3. UTILISATION D'ASSEMBLAGES SUPRAMOLÉCULAIRES EN TANT QU'AGENTS DE COMPLEXATION ET DE TRANSFECTION DE siRNA

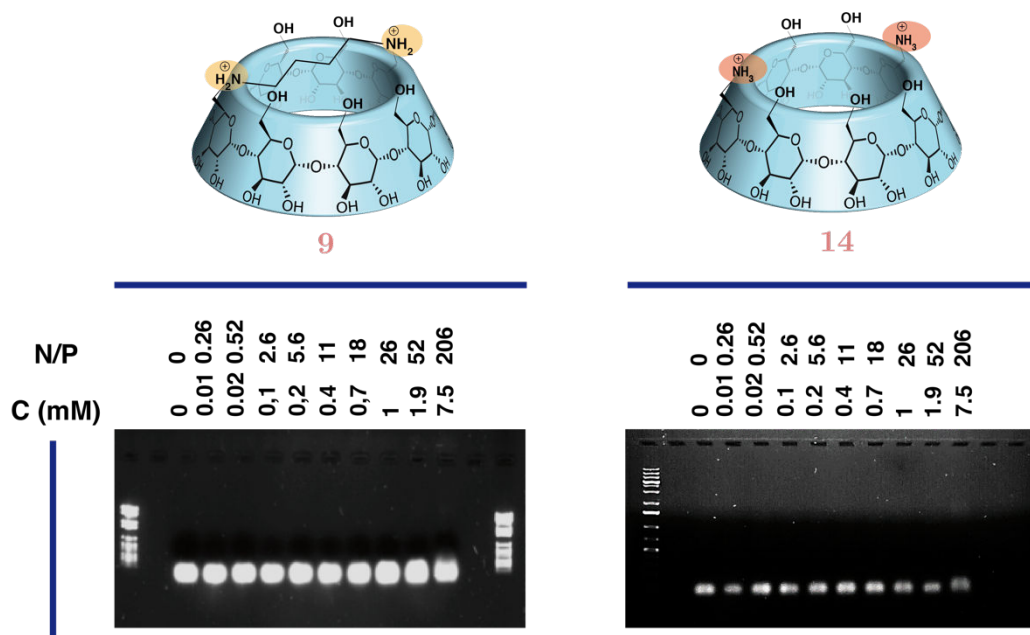


Figure 3. 3 : Etude de complexation par électrophorèse des composés (9) et (14), à concentration fixe en siRNA : [siRNA] = 1,72 μ M.

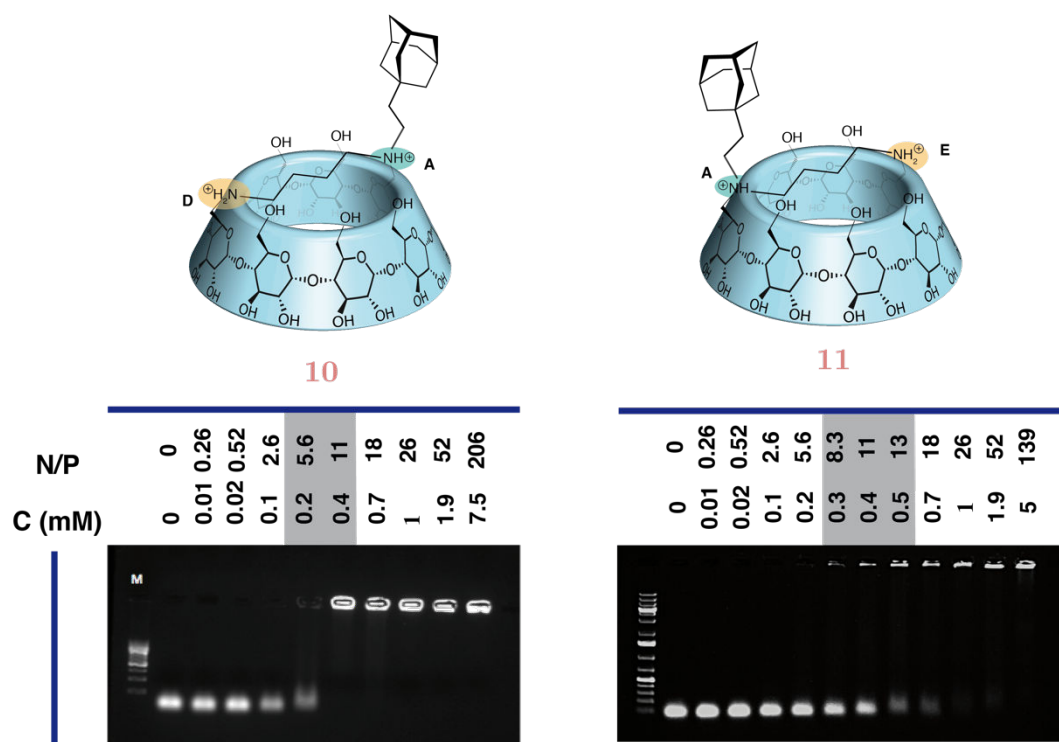


Figure 3. 4 : Etude de complexation par électrophorèse des composés (10) et (11)

Ces résultats montrent que l'efficacité des composés (10), et (11) comparée à celle des composés (9) et (14) fait intervenir un autre phénomène que l'interaction électrostatique. L'hypothèse avancée expliquant ce phénomène est la suivante : Les espèces (9) et (14) ne portent pas de fonction adamantyle, et ne peuvent par conséquent former d'assemblages supramoléculaires. Ainsi, les espèces en solution sont des dications interagissant partiellement avec les siRNA. A l'inverse les espèces (10) et (11) forment des assemblages supramoléculaires, augmentant ainsi la concentration locale en cyclodextrine et donc la densité de charges autour du siRNA. On peut alors considérer que l'espèce complexante n'est plus un dication, mais un polyélectrolyte, formé d'espèces faiblement chargées mais capable de complexer les siRNA (Figure 3. 5). Par ailleurs, la complexation des siRNA par les composés (10) et (11) est complète à environ 0,5 mM. À cette concentration, le degré de polymérisation ($DP = \sqrt{KC}$) calculé suite aux résultats obtenus par ITC (cf chapitre 2) est d'environ 2. Ainsi, en présence de siRNA, la formation d'oligomères semble favorisée par un phénomène de coopérativité.

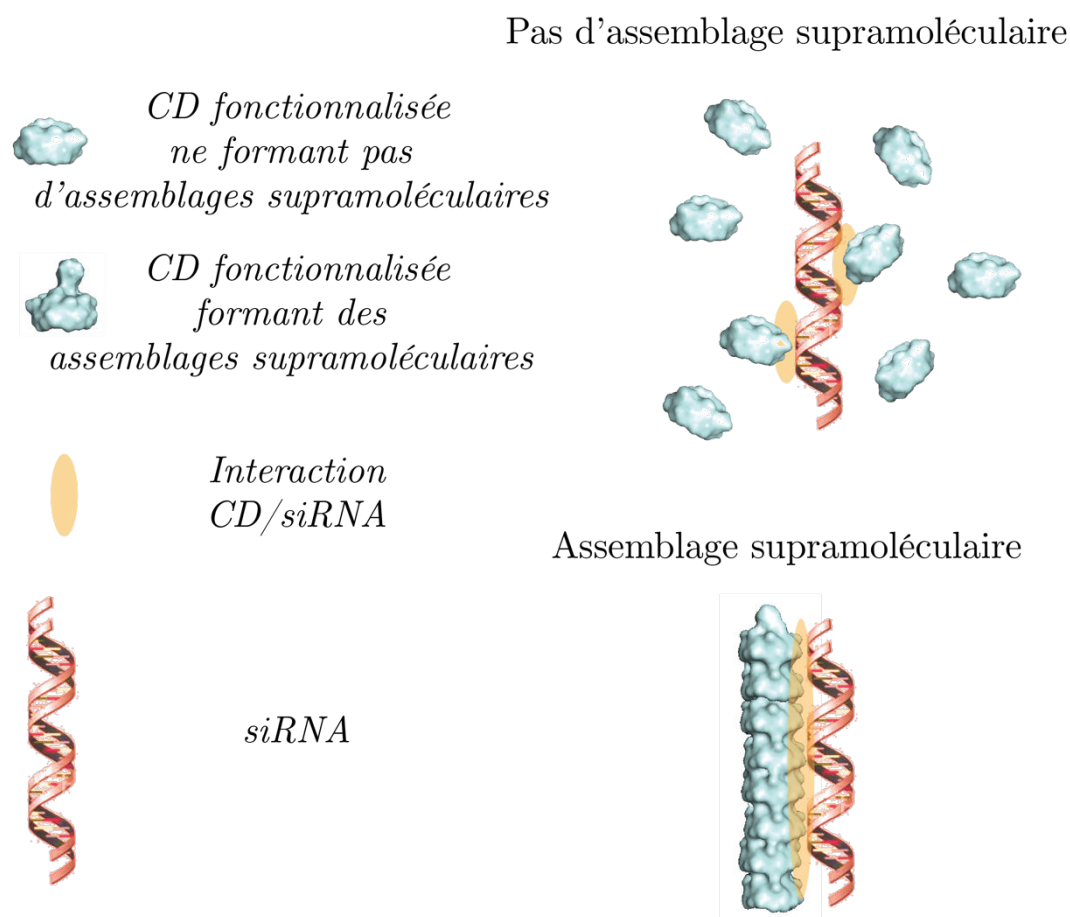


Figure 3. 5 : Hypothèse de la complexation de siRNA en présence d'assemblages supramoléculaires polycationiques

Afin de mettre en évidence l'importance de l'auto-assemblage de CD pour l'association CD/siRNA, une étude de compétition a été réalisée sur le composé (10) (Figure 3. 6). Comme précédemment, cette étude consiste à ajouter plusieurs équivalents d'adamantane carboxylate pour défaire les oligomères de CD. Deux concentrations en CD auxquelles la complexation des siRNA est totale (2 et 5 mM) ont été choisies. Puis une quantité variable d'invité compétiteur (adamantane carboxylate) a été ajoutée aux mélanges (0, 2, et 8

équivalents). Lors de l'ajout de 2 équivalents d'adamantane carboxylate, une très grande partie des siRNA sont décomplexés et, à 8 équivalents, tous les siRNA sont libérés et aucun retard de migration n'est observé. Cela confirme en partie l'hypothèse émise précédemment mettant en avant l'importance de la formation d'assemblages supramoléculaires pour permettre la complexation des siRNA. Ces résultats concordent avec les résultats obtenus en RMN-DOSY (cf chapitre 2), et confirment le caractère dynamique et réversible des oligomères formés.

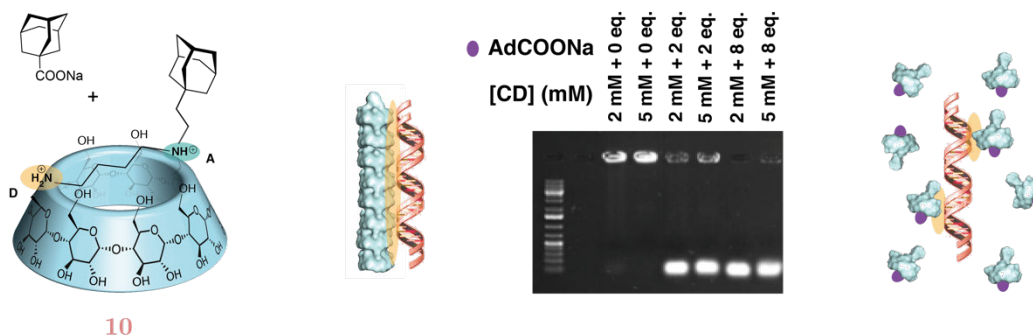


Figure 3. 6 : Étude de compétition par électrophorèse du composé (10) avec de l'adamantane carboxylate

Afin d'étudier et de rationaliser le comportement des deux régioisomères (10) et (11) en présence de siRNA, des électrophorèses ont été réalisées avec différents ratios en régioisomères AD et AE (75/25%, 50/50%, et 25/75%). Les trois ratios testés complexent les siRNA à des concentrations entre 0,2 et 0,7 mM (N/P = 5-18). Le mélange équimolaire semble être légèrement moins efficace, mais il est difficile de conclure quant à une réelle influence de ce ratio tant les concentrations de début de complexation sont proches (Figure 3. 7).

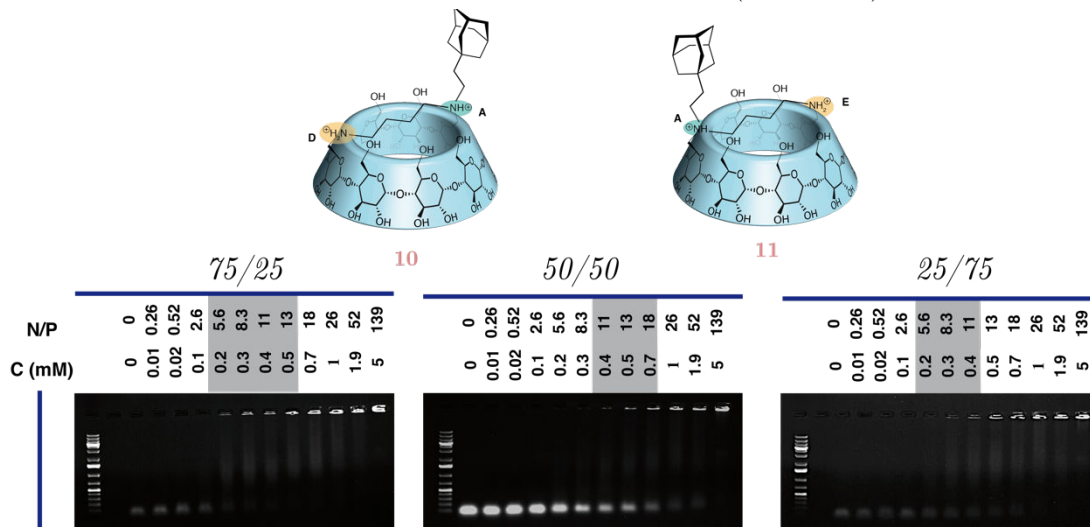


Figure 3. 7 : Étude de complexation par électrophorèse de mélanges de (10) et (11)

Enfin des études de complexation par électrophorèse ont été réalisées sur les composés (19) et (21). Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, ces conjugués forment des assemblages supramoléculaires en solution. De plus ces espèces sont plus chargées. En effet, le composé (19), en plus des deux amines tertiaires du pont, porte une amine primaire particulièrement accessible pour interagir avec les phosphates des siRNA. Le composé (21) porte quant à lui, les deux amines tertiaires du pont, une amine primaire, et un groupement guanidinium. Les groupements guanidinium, de par leur disposition, peuvent chélater deux oxygènes des groupements phosphates, et sont par conséquent, de très bons complexants des acides nucléiques⁷⁻⁹.

Un début de complexation des siRNA à partir de 0,05 mM (N/P = 2,1), et une complexation totale à 0,08 mM (N/P = 3,3) ont été observées pour le composé (19). Ce composé est donc un meilleur complexant que les composés testés précédemment. Le composé (21) a montré des résultats encore meilleurs, avec une zone de complexation s'étendant de 0,01 à 0,05 mM (N/P = 0,5-2,8) (Figure 3. 8).

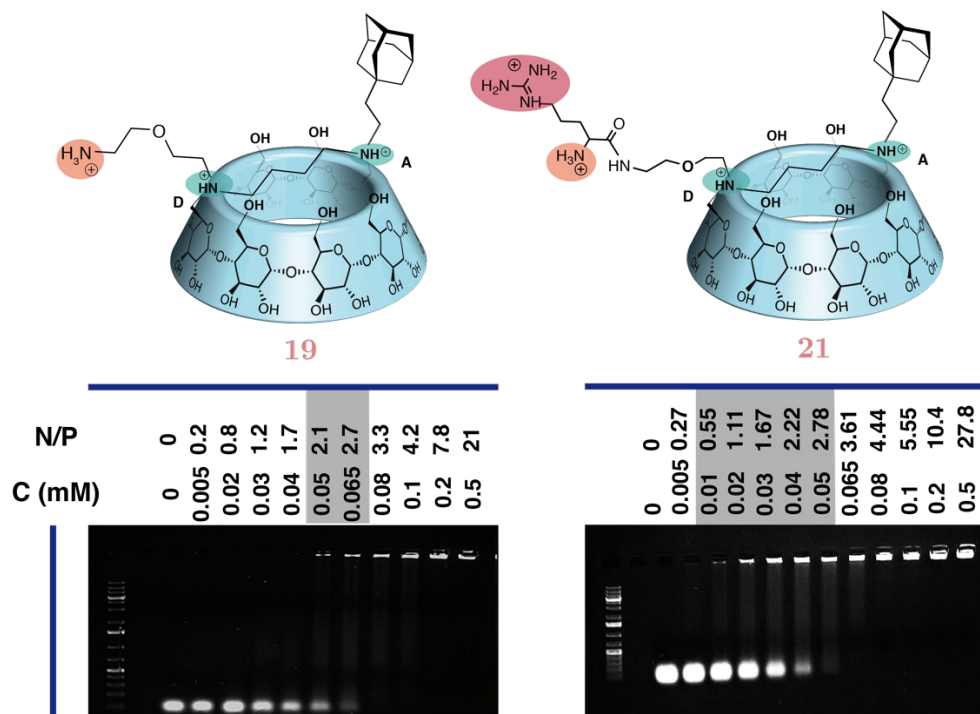


Figure 3. 8 : Étude de complexation par électrophorèse des composés (19) et (21)

3.1.2.2. Étude de protection

Les conjugués de CD s'auto-assemblent sont donc capables de complexer efficacement les siRNA. Pour confirmer leur aptitude à protéger les siRNA des RNases, de nouvelles expériences d'électrophorèse ont été réalisées. Ces expériences consistent dans un premier temps à former les complexes CD-siRNA à un ratio N/P où la complexation des siRNA est totale selon les précédentes expériences d'électrophorèse. Ces complexes sont ensuite incubés pendant 30 minutes à 37°C en présence de nucléases. Si les complexes CD-siRNA ne sont pas capables de protéger les siRNA, ces derniers seront alors dégradés. Les RNases sont alors désactivées en refroidissant le mélange à 4°C.¹⁰ Afin de vérifier l'état des siRNA, ceux-ci sont libérés des complexes en introduisant de l'héparine, qui en tant que polyanion, va neutraliser les cyclodextrines cationiques et permettre la décomplexation de l'assemblage. Le mélange est alors analysé par électrophorèse. Si une bande nette est obtenue, les siRNA n'ont pas été dégradés.

Les composés (9), (10), et (21) ont été soumis à ce type d'expérience. De manière surprenante, tous les composés semblent protéger efficacement les siRNA des RNases (Figure 3. 9). Pour les composés (10) et (21), nous pouvions nous attendre à de tels résultats, puisqu'ils sont capables de complexer les siRNA. Pour la molécule contrôle (9), bien que la complexation de siRNA n'ait pas été observée par électrophorèse précédemment, aucune dégradation de siRNA n'a été observée. Ainsi cette molécule dicationique interagit suffisamment avec les siRNA

pour bloquer l'accès aux nucléases, mais pas assez pour les complexer et induire une rétention en électrophorèse.

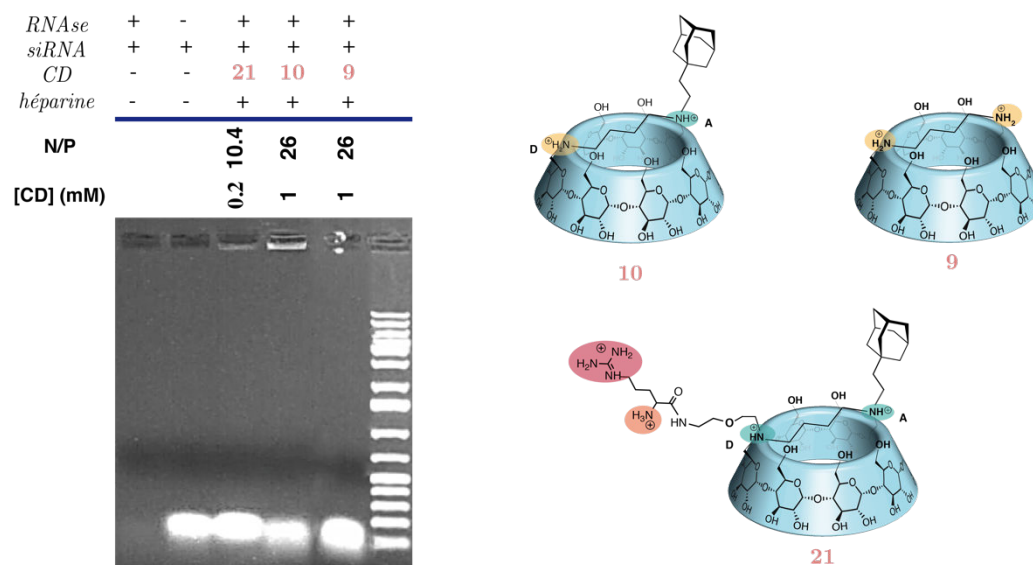


Figure 3. 9 : Expérience de protection des siRNA contre les RNAses avec les composés (10), (21) et (9).

3.2. Etudes de transfection

3.2.1. Principe et méthode

Nous avons démontré précédemment que les conjugués synthétisés étaient capables de complexer et de protéger efficacement les siRNA. Afin de mesurer l'aptitude de nos composés à transfecter les cellules avec des siRNA et à induire le phénomène d'interférence par ARN, des expériences d'inhibition de l'expression d'une enzyme appelée luciférase ont été réalisées.

Pour cela des cellules de reins d'embryons humains (HEK 293), modifiées génétiquement afin d'exprimer constitutivement la luciférase, ont été utilisées. L'objectif de ces expériences est d'inhiber l'expression de cette enzyme en utilisant des siRNA (GL3) dirigés contre son expression. Deux causes peuvent expliquer une diminution de celle-ci : la mortalité des cellules, et l'interférence par ARN. Ainsi la viabilité des cellules et l'expression de l'enzyme luciférase seront analysées conjointement. En cas de transfection efficace, l'expression de luciférase doit diminuer sans impacter la viabilité des cellules.

La quantification de la viabilité cellulaire ou de l'expression de luciférase se fait grâce à une réaction de bioluminescence. Cette réaction consiste en la mono-oxygénation d'un substrat appelé luciférine, catalysée par la luciférase en présence d'ATP, d'oxygène et de magnésium. Cette réaction produit notamment de l'oxyluciférine dans un état électronique excité, qui retourne à l'état stable *via* l'émission d'un photon (lumière) et la formation d'une molécule de CO₂.

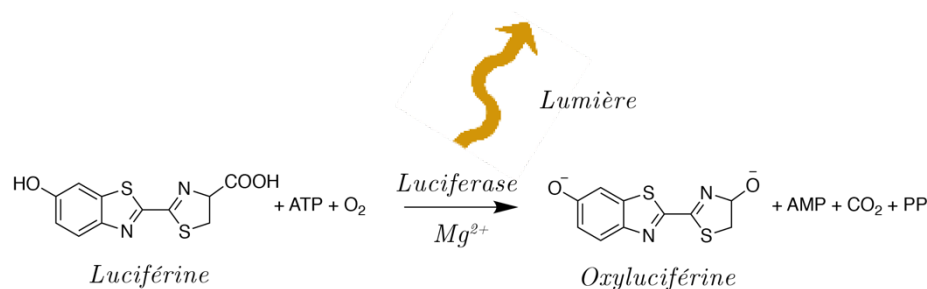


Figure 3. 10 : Réaction de bioluminescence de luciférase

Pour mesurer l'expression de luciférase, le kit One-Glo™ (Promega) a été utilisé. Ce kit est composé notamment de la 5'-Fluoroluciférine. En présence de luciférase, une réaction similaire à celle présentée **Figure 3. 10** est alors obtenue. Il est alors possible de quantifier cette présence de luciférase dans les cellules à l'aide d'un luminomètre. Plus la quantité de luciférase est importante dans les cellules, plus la luminescence résultante de cette réaction sera importante. Afin de mesurer l'influence des complexes CD-siRNA sur l'expression de luciférase, celle-ci sera comparée à des puits contrôles dans lesquels aucun complexe ne sera introduit.

D'un autre côté, la viabilité sera mesurée grâce au kit CellTiter-Glo®. Cette méthode consiste à mesurer le nombre de cellules viables en quantifiant la présence d'ATP, marqueur des cellules métaboliquement actives. La réaction de bioluminescence utilisée est toujours celle présentée en **Figure 3. 10**. Il s'agit alors d'introduire le substrat luciférine ainsi qu'une enzyme recombinante de luciférase (Ultra-Glo™). Ainsi la réaction de bioluminescence a lieu en présence d'ATP et indépendamment de la présence de luciférase produite par les cellules. De la même manière que précédemment, des puits contrôles permettent de conclure quant à la toxicité des complexes CD-siRNA.

Ces deux expériences permettent ainsi d'évaluer l'efficacité de la transfection réalisée indépendamment de la toxicité potentielle des complexes.

3.2.2. Etude de toxicité

Lors des premiers essais de transfection, les conjugués étaient formulés sous forme de sel de TFA. Une toxicité non négligeable a alors été observée. Les sels de TFA sont connus pour induire une certaine toxicité sur les cultures cellulaires.¹¹ Afin de vérifier cette hypothèse, des expériences de toxicité ont été réalisées sur des cellules HEK 293. Deux types de sels d'ammoniums ont été testés : les sels de diéthylammonium et de butane-1,4-diammonium. Les chlorures et les sels d'acide trifluoroacétique correspondants ont été préparés et incubés à différentes concentrations avec les HEK 293 dans les mêmes conditions que celles utilisées en transfection. Aucune toxicité n'a été observée à des concentrations inférieures ou égales à 1 mM. Une toxicité plus importante des sels de TFA a été observée à 10 mM en particulier pour le sel de butane-1,4-diammonium (**Figure 3. 11**). Bien que les expériences de transfection ne soient pas réalisées à des concentrations si élevées, nous avons fait le choix de préparer les conjugués sous la forme de chlorure.

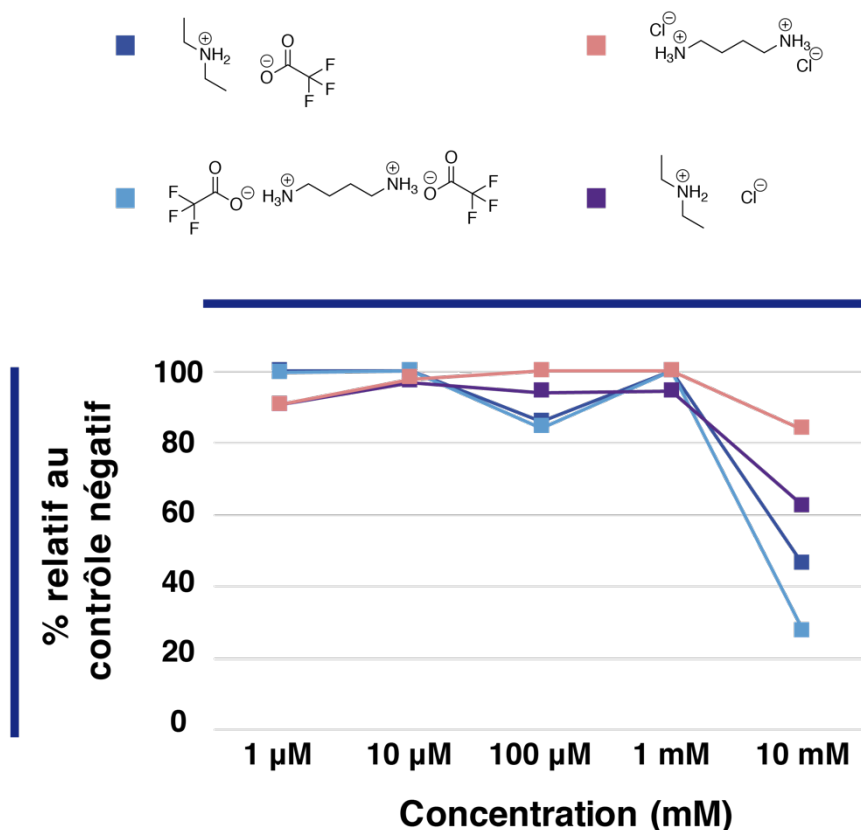


Figure 3. 11 : Etude de toxicité sur des cellules HEK293 (mesure de l'ATP)

3.2.3. Résultats et discussion

Des expériences de transfection ont été ainsi réalisées sur les différents conjugués. Dans un premier temps, la capacité du composé (10) à transférer a été évaluée. Ce composé, qui forme des assemblages supramoléculaires et complexe les siRNA, induit une baisse de l'expression de luciférase à partir de 2 mM, allant jusqu'à environ 50 % d'efficacité à la concentration la plus élevée expérimentée. Un effet-dose est clairement visible aux vues de ces résultats. De plus, ce composé n'a montré aucune toxicité notable dans la gamme de concentrations expérimentées. Bien que ces concentrations soient relativement élevées, ce premier résultat s'avère être prometteur. En parallèle, les composés (9) et (14), ne formant pas d'assemblages supramoléculaires et n'ayant pas montré d'aptitude à complexer les siRNA, ont été testés en transfection selon le même protocole. Une diminution de l'expression de luciférase a aussi été observée, mais elle est corrélée avec la baisse de la viabilité cellulaire. Ainsi l'inhibition de l'expression de luciférase n'est pas attribuée à une transfection efficace des siRNA mais à une mortalité des cellules (Figure 3. 12).

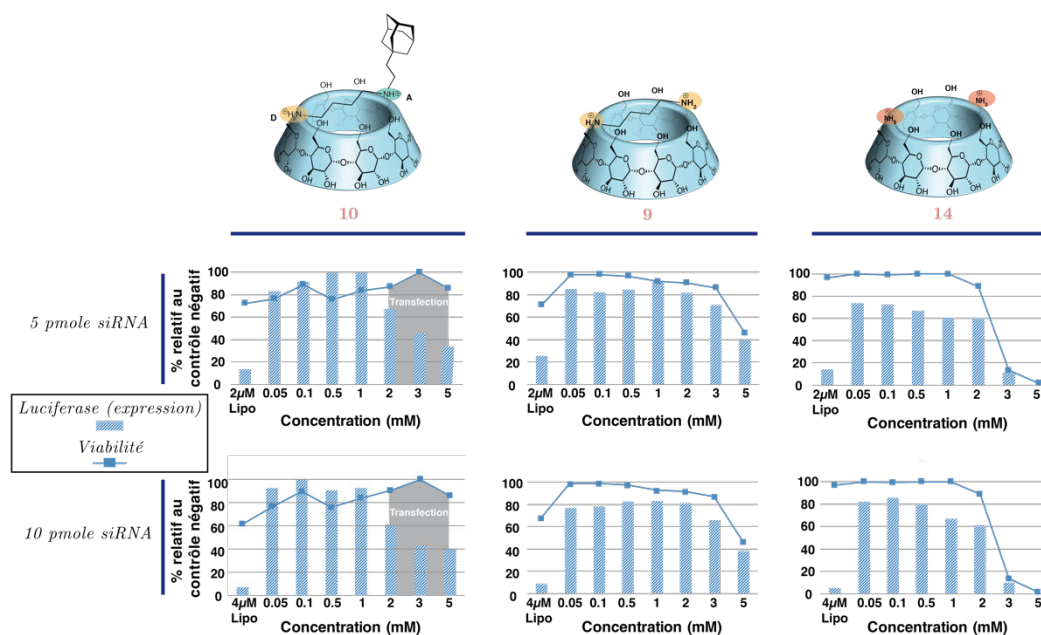


Figure 3. 12 : Etude de transfection de siRNA GL3 sur HEK293 avec les composés (10), (9), et (14)

La capacité de transfection des composés (19) et (21) a également été évaluée. Ces composés ont montré tout comme le composé (10) une capacité à former des assemblages supramoléculaires. De plus ils possèdent un nombre de charges plus élevé et ont montré une bonne capacité à complexer les siRNA en électrophorèse à des ratios N/P relativement bas (~ 1-2).

Le composé (19) semble montrer une légère efficacité (~ 20-30 %) dès les plus basses concentrations (0,005 mM). Cependant l'augmentation de la concentration en conjugué de CD n'entraîne pas de diminution drastique de l'expression de luciférase comme observée avec le composé (10). Un léger effet dose est malgré tout observé entre 0,005 mM et 1 mM (variation d'efficacité ~ 30 %). Au-dessus de 1 mM, une forte toxicité est observée (Figure 3. 13).

De même, le composé (21) a été testé en transfection. Cette fois-ci aucune efficacité n'a été observée. En effet, la diminution de l'expression de luciférase est corrélée avec la toxicité et aucun effet dose n'est observé. Ces résultats sont décevants au regard des résultats de complexation obtenus par électrophorèse (Figure 3. 13).

Le conjugué (21) composé d'une arginine, forme des assemblages supramoléculaires, ainsi, il devrait former en solution des polyarginines supramoléculaires. Ces composés sont particulièrement intéressants pour deux raisons. D'une part les arginines sont réputées pour interagir de manière efficace avec les protéoglycanes de la membrane cellulaire et donc faciliter leur internalisation, à l'image des CPP comme le TAT.¹² D'autre part, les arginines complexent efficacement les siRNA et donc devraient permettre la conception d'agents de protection efficaces. L'hypothèse proposée pour expliquer ces résultats décevants obtenus en transfection, est une trop forte interaction conjugué/siRNA, induisant donc un mauvais relargage et bloquant par conséquent l'interférence par ARN.

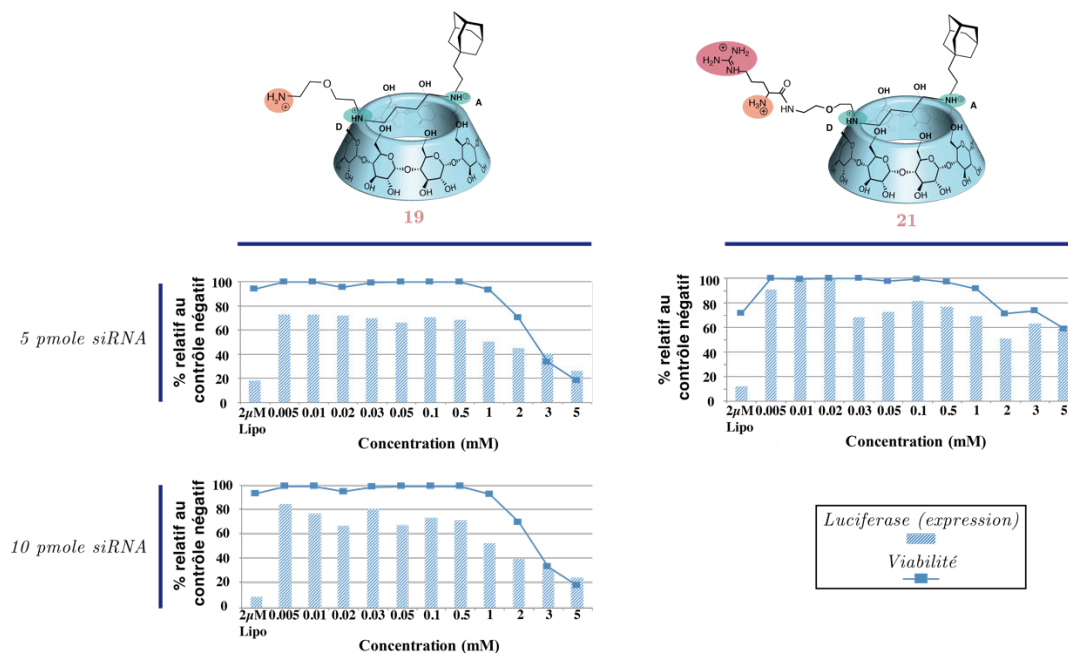


Figure 3.13 : Etude de transfection de siRNA GL3 sur des HEK293 avec les composés (19), et (21)

Enfin une expérience de compétition a été réalisée avec le composé (10) ayant montré les meilleurs résultats en transfection. L'invité compétiteur utilisé est l'adamantane carboxylate. Deux concentrations de CD ont été choisies (2 et 5 mM), auxquelles ont été ajoutés deux équivalents d'adamantane carboxylate. Nous avons préalablement montré que deux équivalents de cet invité permettaient de défaire l'assemblage supramoléculaire (cf chapitre 2) mais aussi de décomplexer les siRNA (cf expériences d'électrophorèse *vide supra* (Figure 3.6)). Ainsi nous nous attendions à observer une forte diminution de l'efficacité en transfection. Malheureusement, bien qu'une légère diminution d'efficacité ait effectivement été observée, la toxicité de l'adamantane carboxylate rend les résultats peu lisibles et donc peu pertinents (Figure 3.14).

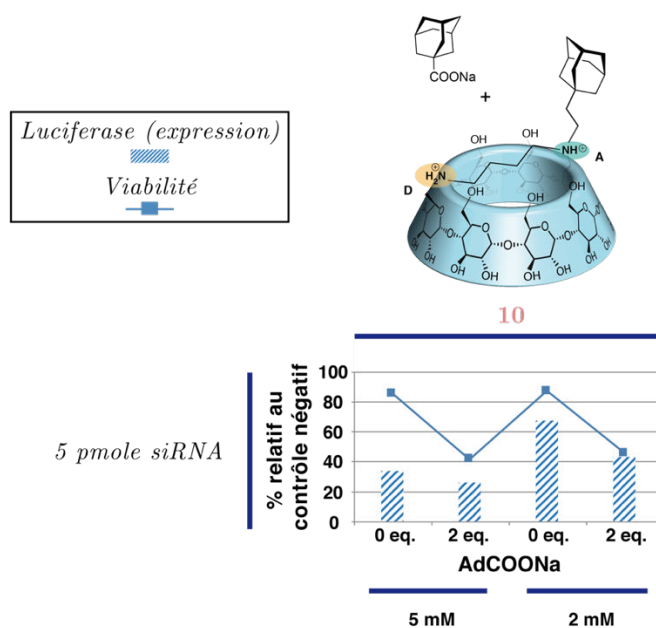


Figure 3.14 : Etude de transfection de siRNA GL3 sur HEK293 avec les composés (10), et de l'adamantane carboxylate

Ainsi les conjugués de CD s'auto-assemblant sont d'une part, capables de complexer les siRNA et d'autre part, de les protéger des nucléases. Par ailleurs, l'un des composés synthétisés induit le phénomène d'interférence par ARN en transfectant les siRNA *in vitro*. Plusieurs hypothèses peuvent cependant être posées pour expliquer la mauvaise efficacité des autres composés : mauvaise internalisation du système, échappement endosomal difficile ou mauvais relargage des siRNAs. Ces différents points sont, par conséquent, à étudier dans le but d'améliorer nos agents de transfection. Nous nous sommes par la suite attachés à l'observation des assemblages CD-siRNA. En effet, si les oligomères de cyclodextrines ont été caractérisés dans le chapitre 2, nous pouvons nous demander quelle taille et forme ont ces assemblages en présence de siRNA. Dans cet objectif, des expériences de cryo-microscopie ont ensuite été réalisées.

3.3. Etude par cryo-TEM de l'assemblage hiérarchique et coopératif CD-siRNA

3.3.1. Considérations préliminaires à l'utilisation de la cryo-TEM

3.3.1.1. Principe et avantage de la cryo-TEM

La cryo-microscopie électronique, brièvement abordée dans le chapitre 2 est une puissante méthode pour l'analyse d'échantillon chimique¹³ ou biologique¹⁴. Si l'AFM ou la STM sont devenus des outils performants pour l'étude en surface d'échantillons, la microscopie de transmission (TEM) est une technique de choix pour l'analyse de la structure et de la morphologie même de ceux-ci.

Lors d'analyses conventionnelles par TEM, les échantillons sont déposés et séchés sur une fine lamelle de carbone (10-30 nm) supportée sur une grille de métal. Les échantillons sont généralement mélangés à une solution composée de sels riches en métaux lourds permettant d'améliorer le contraste et la visualisation de la structure. On appelle cette méthode la coloration ou révélation négative. Néanmoins ces étapes de séchage et de coloration affectent la structure et la morphologie des échantillons en solution.¹⁵ En effet, lors de l'évaporation du solvant, la concentration de l'échantillon augmente et conduit à l'agrégation des espèces en solution.

Afin de pouvoir observer en microscopie des adénovirus dans leur état natif, l'équipe de Dubochet a développé en 1984, une nouvelle méthode d'analyse consistant à refroidir un échantillon très rapidement dans de l'éthane liquide.¹⁶ En effet l'éthane liquide, lorsqu'on le maintient loin de son point d'ébullition (-88,5°C) mais proche de son point de fusion (-182,5°C), possède une haute conductivité thermique. Ainsi en plongeant rapidement un échantillon aqueux dans de l'éthane refroidi par de l'azote liquide, à une température avoisinant les -180°C, celui-ci entre directement en contact avec l'éthane liquide sans formation d'une couche de gaz protectrice (qui réduirait considérablement le transfert de chaleur). L'échantillon est alors vitrifié en évitant par conséquent la cristallisation des molécules d'eau.¹³ L'eau garde alors les mêmes propriétés amorphes qu'à l'état liquide. Durant le procédé de vitrification, les objets étudiés restent suspendus dans le milieu, et leur arrangement temporel et spatial est alors préservé.

Lors de l'analyse de l'échantillon, celui-ci doit être gardé en dessous de sa température de dévitrification. Malheureusement, la concentration du faisceau d'électrons au travers de l'échantillon provoque, à fort grossissement, un dégagement de chaleur incompatible avec l'utilisation de solutions vitrifiées. Ainsi, avec l'introduction de la cryo-TEM, il est ainsi devenu possible d'observer des objets en solution avec une résolution allant jusqu'au nanomètre, et non jusqu'à l'angström comme il est possible de le faire en TEM classique.

3.3.1.2. Préparation des échantillons et formation d'artefacts

La bonne préparation d'un échantillon de cryo-TEM est essentielle afin de minimiser la présence d'artefacts et permettre une bonne lecture du micrographe. Plusieurs paramètres comme l'humidité ou la température ambiante de la pièce de préparation doivent être rigoureusement contrôlés.

Dans un premier temps une goutte de quelques microlitres est déposée sur une grille perforée, de carbone supportée. L'excès de solution est ensuite enlevé à l'aide d'un papier buvard de manière à obtenir un film très fin de solution (100-200 nm), en surface de la grille, afin d'avoir une meilleure surface d'échange avec l'éthane liquide. Néanmoins, à température ambiante, ces conditions entraînent une évaporation rapide du solvant. C'est pourquoi la grille est plongée sans attendre et très rapidement ($1,5-2 \text{ m.s}^{-1}$) dans de l'éthane liquide, entraînant la vitrification instantanée de l'échantillon. Lorsque le refroidissement de l'échantillon est trop lent, des cristaux hexagonaux de glace peuvent se former (Figure 3. 15. a). La grille est enfin transférée à une température inférieure à celle de dévitrification (-140°C) dans le microscope. Lorsque la température dépasse celle de dévitrification, des cristaux cubiques de glace peuvent être observés (Figure 3. 15. b). Il est fréquent aussi d'observer des artefacts provoqués par la déposition de vapeur d'eau sur l'échantillon (Figure 3. 15. c, d, e).¹⁵

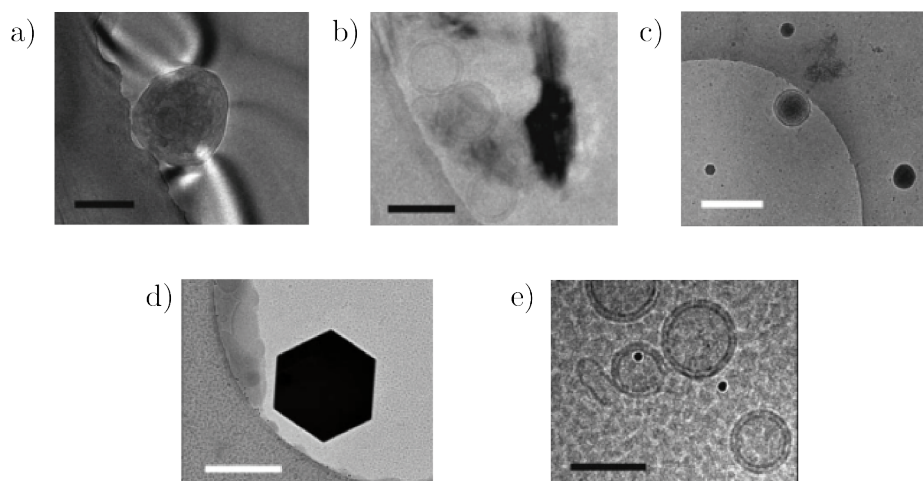


Figure 3. 15 : Artefacts dus à la préparation de l'échantillon, observables en Cryo-TEM.¹⁵ Barre d'échelle noire = 100 nm, barre d'échelle blanche = 500 nm. a) Agrégats de polymère en présence de glace hexagonale formée lors d'un refroidissement trop lent de l'échantillon. b) Vésicules lipidiques en présence de glace cubique formée lors de la dévitrification. c) Agrégats de polymère en présence de particules de glaces dû à un dépôt de vapeur d'eau. d) Cristal hexagonal de glace dû à un dépôt de vapeur d'eau. e) Eau vitrifiée sur toute la surface, à cause d'un dépôt de vapeur d'eau.

3.3.1.3. Applications à la cryo-TEM

La cryo-TEM est ainsi devenue un outil de choix pour l'analyse de divers objets dans l'eau comme les micelles, les liposomes,¹⁷ les polymères supramoléculaires¹⁸ etc. Son utilisation permet aussi la compréhension de processus biologiques comme la fusion ou fission cellulaire,¹³ le comportement des microtubules,¹⁹ ou l'observation de virus.²⁰ Plus récemment, la projection d'images obtenues par cryo-TEM, a permis la modélisation en trois dimensions des structures hautement complexes.¹⁵ Ainsi la structure de certains virus a pu être déterminée par cryo-TEM. Cette technique a ouvert de nouvelles perspectives en médecine et notamment en virologie.^{21,22} C'est pourquoi, l'observation à la fois des oligomères supramoléculaires présentés dans le chapitre 2, mais aussi des assemblages de nos conjugués avec les siRNA, sera réalisée par cryo-TEM afin d'étudier le comportement en solution du système développé dans ce projet.

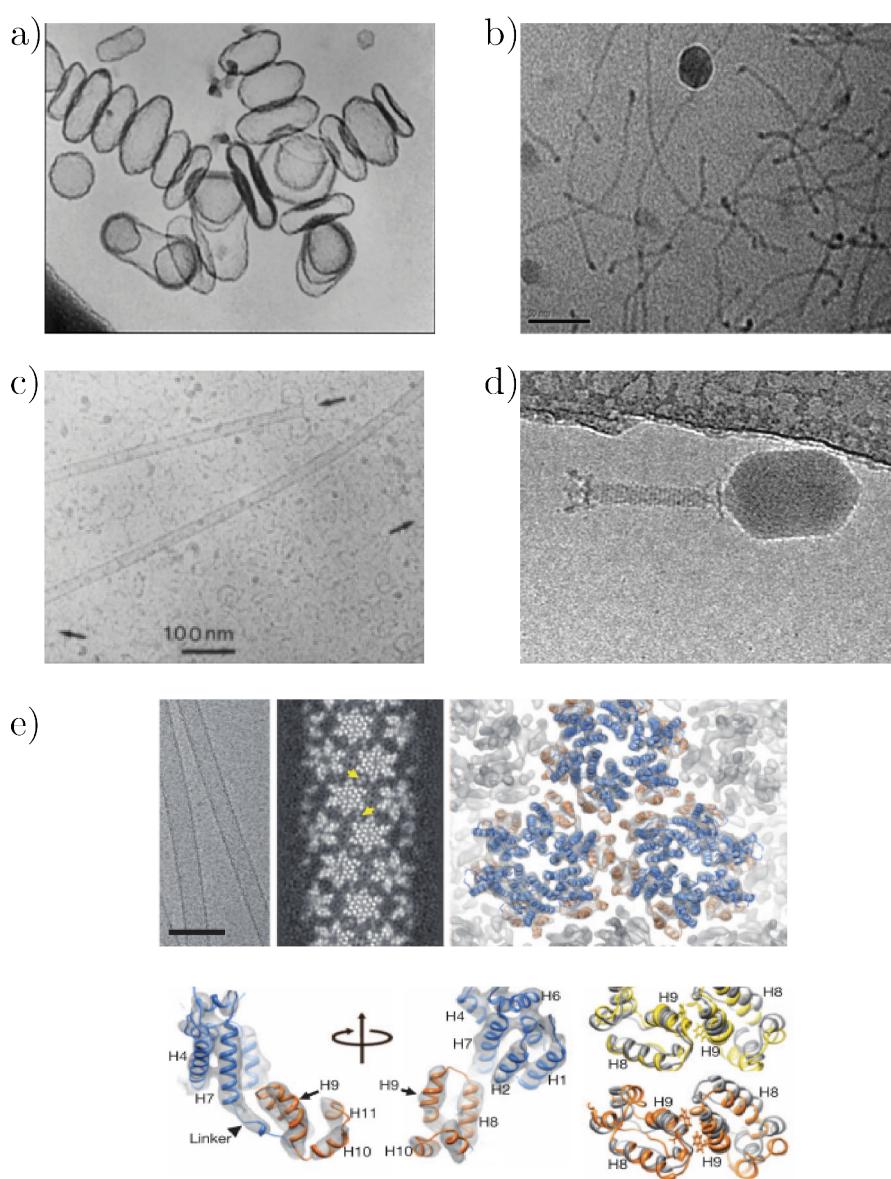


Figure 3. 16 : Divers exemples d'objets moléculaires observés par Cryo-TEM : a) Liposome.¹⁷ b) Polymères supramoléculaires de type Benzenetricarboxamide.²³ c) Microtubules.¹⁹ d) Bactériophage (EC1 virus).²⁰ e) Reconstruction de la structure du HIV-1 par Cryo-TEM.²²

3.3.2. Résultats et discussion

3.3.2.1. Méthode de préparation des échantillons

Tous les échantillons de cryo-TEM composés de siRNA ont été préparés dans une solution tampon aqueuse de TBE (Tris Borate EDTA). Le pH de la solution est ainsi tamponné à pH ~ 8 de manière à se placer dans des conditions similaires à celles de l'électrophorèse et à favoriser les interactions phosphate/ammonium.

Les siRNA GL3 dirigés contre l'expression de luciférase ont été utilisés. Ils ont été décongelés quelques minutes avant d'être mélangés avec une solution de conjugués de cyclodextrines. De la même manière que pour les expériences d'électrophorèse et de transfection, les mélanges CD/siRNA ont été incubés pendant vingt minutes à température ambiante avant d'être plongés dans de l'éthane liquide.

Dans ces expériences de cryo-TEM seulement deux composés ont pu être étudiés pour le moment :

- Le composé (10), dont la formation d'oligomères supramoléculaires a été prouvée par RMN, ITC, et SANS. De plus ce composé a montré une capacité à complexer et à transférer les siRNA.
- Le composé (14), qui présente deux fonctions amines primaires mais ne peut former d'assemblages supramoléculaires, a aussi été étudié comme témoin négatif.

3.3.2.2. Expériences préliminaires

Dans un premier temps, le composé (10) et les siRNA GL3 ont été observés séparément. Une solution concentrée (15 mM) du conjugué (10) a été préparée afin de caractériser la forme et la taille des oligomères se formant à cette concentration. Au vu des résultats obtenus dans le chapitre 2, le DP des espèces présentes en solution devrait être d'environ 11-13. Par ailleurs il a été montré que les β -CD natives formaient des agrégats observables en Cryo-TEM à partir de 2-3 mM.^{24,25} Ces agrégats forment des globules polyédriques branchées de plusieurs centaines de nanomètres à 3 mM (Figure 3. 17. a) et de grands feuillets de plusieurs micromètres à 6 mM (Figure 3. 17. b).²⁴ En observant une solution à 15 mM de (10), nous pouvions ainsi potentiellement observer des agrégats empêchant ou gênant l'observation d'assemblages supramoléculaires.

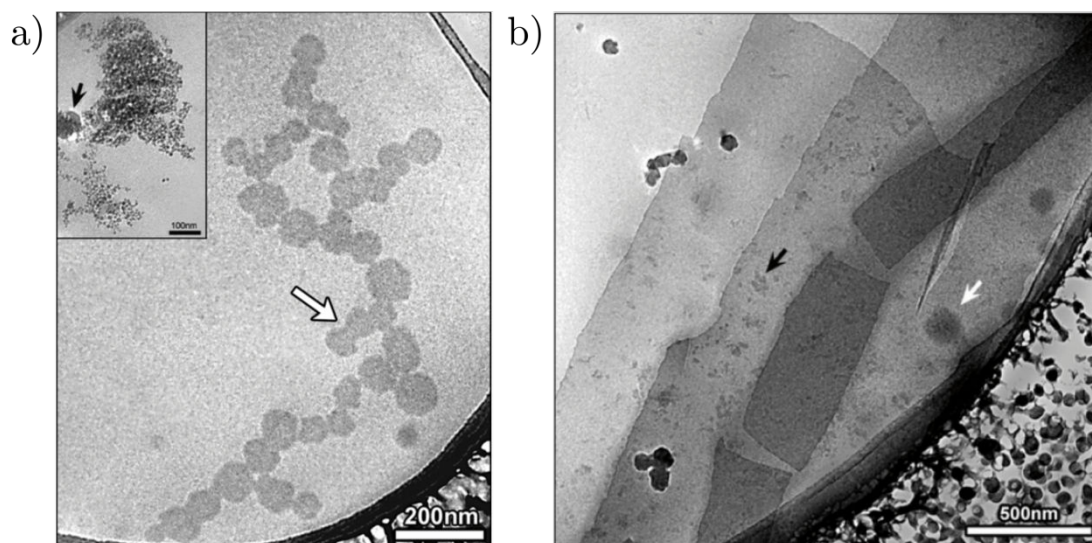


Figure 3. 17 : Agrégats de β -CD native.²⁴ a) Agrégats formés à 3 mM. Flèche blanche : globules polyédriques branchés. Flèche noire : artéfacts. b) Agrégats en forme de feuillets observés à 6 mM. Flèche blanche : agrégat discoïdal. Flèche noire : particules globulaires.

De petites particules globulaires ont pu être observées lors de l'analyse en cryo-TEM d'une solution à 15 mM du composé (10) (Figure 3. 18. a). La dispersité du diamètre des particules a été analysée en traçant la loi log normale centrée sur un diamètre de 15,295 nm (moyenne géométrique). L'écart type géométrique permettant de se rendre compte de la polydispersité des mesures est de 1,30 nm (Figure 3. 18. b). Ainsi les objets formés en solution ont une taille uniforme et cohérente avec la valeur attendue pour des espèces supramoléculaires d'un DP = 11-13 (11-13 nm)(Figure 3. 18. b). Il est néanmoins difficile de conclure quant à la forme des espèces. Pour des espèces de petites tailles, la cryo-TEM n'a pas toujours une résolution suffisante pour distinguer une forme différente que celle de points circulaires. Aucun agrégat de cyclodextrine n'a été observé. Cela peut s'expliquer par la présence des deux fonctions amines sur le pont du composé (10), améliorant la solubilité du conjugué et défavorisant donc la formation d'agrégats.

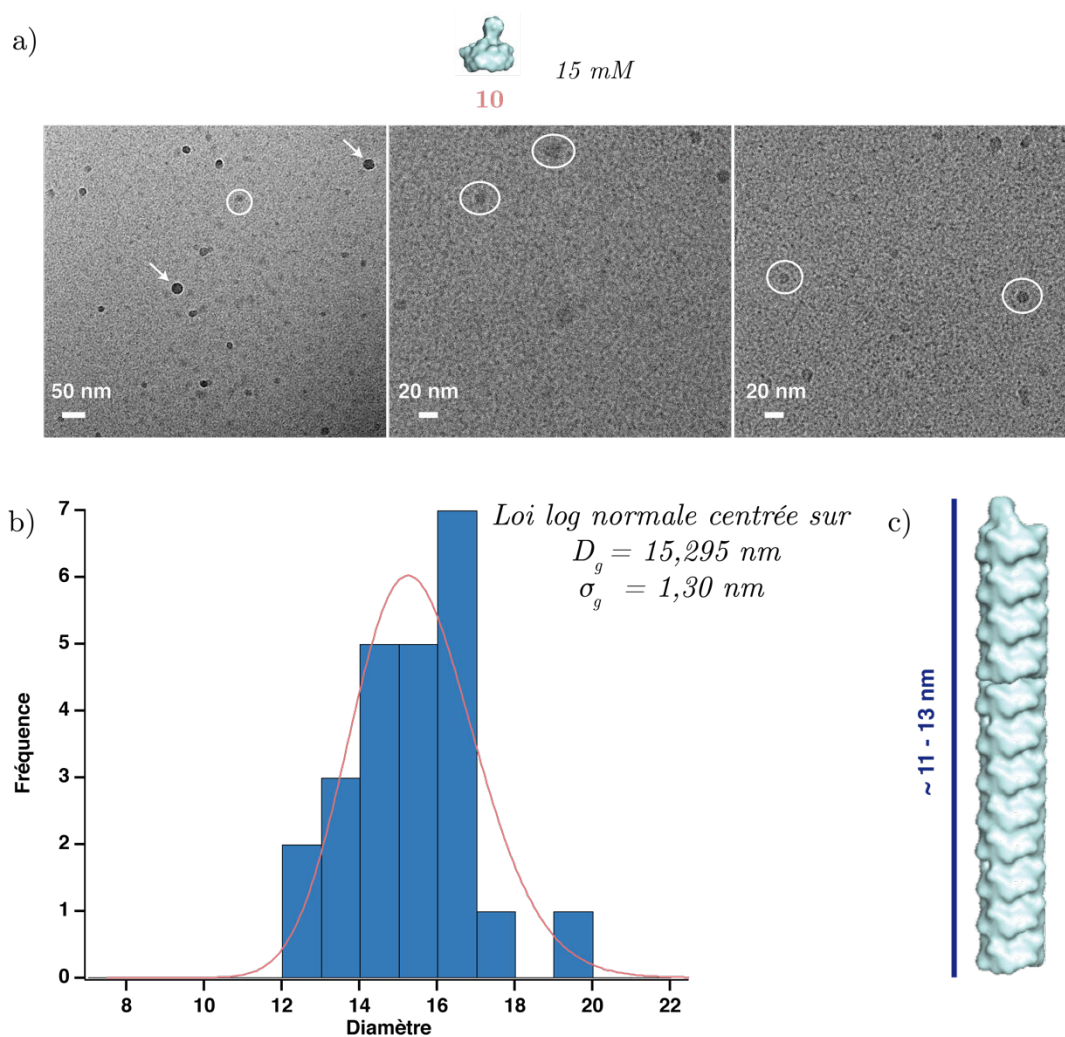


Figure 3. 18 : a) Micrographes de Cryo-TEM d'une solution à 15 mM de (10). Observation de particules globulaires (quelques particules sont encerclées en blanc). Flèches blanches : artéfacts dus à des cristaux de glaces. b) Histogramme représentant la dispersité du diamètre des particules et ajustement par une loi log-normale centrée sur un diamètre $D_g = 15,263 \text{ nm}$ avec un écart type géométrique de $\sigma_g = 1,30 \text{ nm}$ (taille de la population = 24). c) Oligomère de CD (DP = 12).

De la même manière, une solution concentrée (20 μM) de siRNA GL3 a été préparée et observée en cryo-microscopie. Seulement de petits globules d'une taille de 6-8 nm ont été observés correspondant aux siRNA libres (Figure 3. 19).

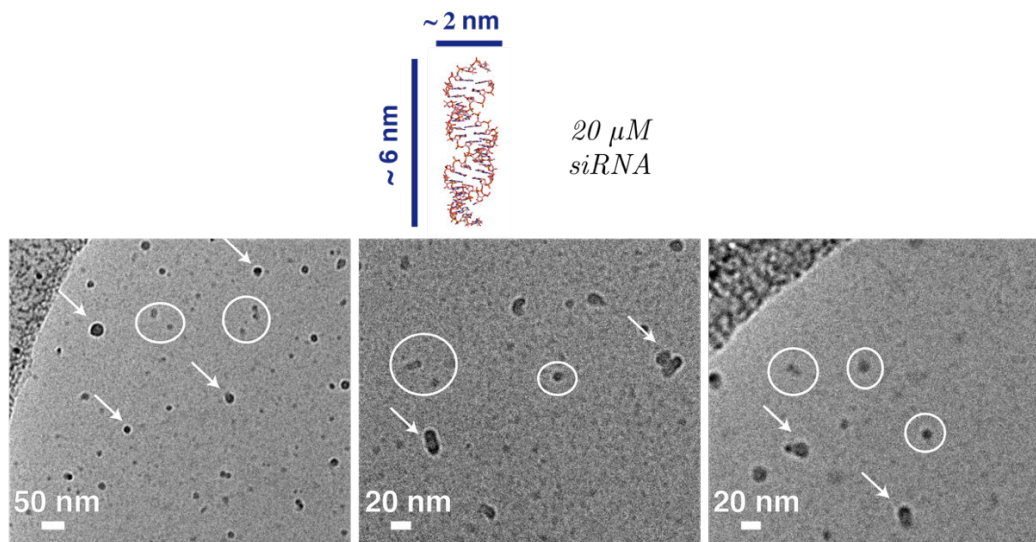


Figure 3. 19 : Micrographes de Cryo-TEM d'une solution à 20 μM de siRNA GL3. Observation de particules globulaires (quelques particules sont encerclées en blanc). Flèches blanches : artéfacts dus à des cristaux de glaces

3.3.2.3. Etude du ratio N/P

Par la suite, les siRNA et le composé (10) ont été mélangés afin d'obtenir une solution de complexes CD/siRNA à différentes concentrations et ratio N/P. Une première solution de complexes CD/siRNA a été analysée en Cryo-TEM dans des conditions similaires au puit le plus concentré utilisé en électrophorèse ($[\text{10}] = 5 \text{ mM}$, $[\text{siRNA}] = 1,72 \mu\text{M}$, $\text{N/P} = 139$). De nombreuses petites particules globulaires similaires à celles obtenues dans les expériences préliminaires ont été observées (Figure 3. 20). Les tailles des particules observées sont comprises entre 6 et 10 nm. Aucune étude de polydispersité n'a été réalisée car il est difficile de savoir s'il s'agit de siRNA, d'oligomères de CD ou bien de complexes CD-siRNA.

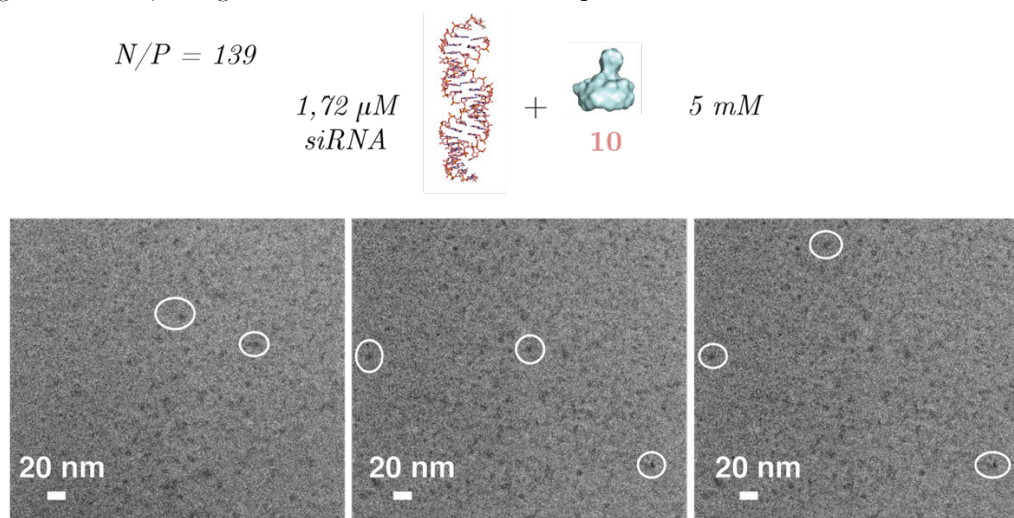


Figure 3. 20 : Micrographes de Cryo-TEM d'une solution de complexes CD/siRNA ($[\text{10}] = 5 \text{ mM}$, $[\text{siRNA}] = 1,72 \mu\text{M}$, $\text{N/P} = 139$). Observation de particules globulaires (quelques particules sont encerclées en blanc).

À notre grande surprise, en diminuant le ratio N/P par 10 environ ($[10] = 2,75 \text{ mM}$, $[\text{siRNA}] = 10 \text{ }\mu\text{M}$, $N/P = 13,1$), nous avons observé de longues fibres rigides avec une longueur de plusieurs centaines de nanomètres (Figure 3. 21). La dispersité du diamètre des fibres a été analysée en traçant la loi log normale centrée sur un diamètre $D_g = 12,277 \text{ nm}$. L'écart type géométrique calculé est de $1,42 \text{ nm}$ sur une population de 137 fibres. Le diamètre des fibres formées est donc monodisperse.

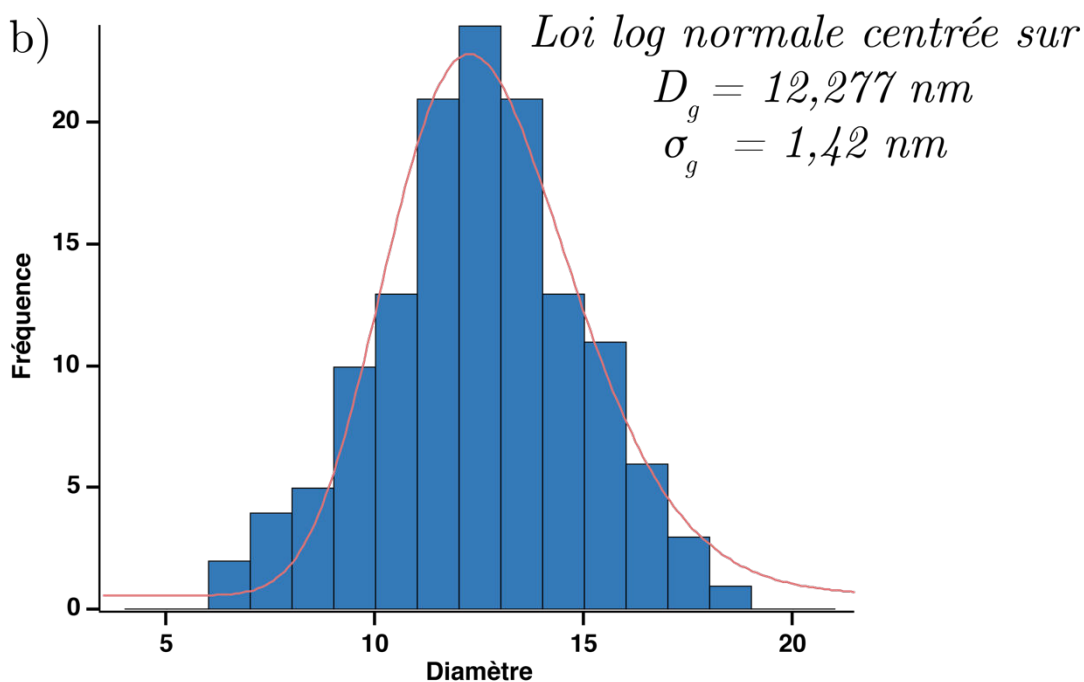
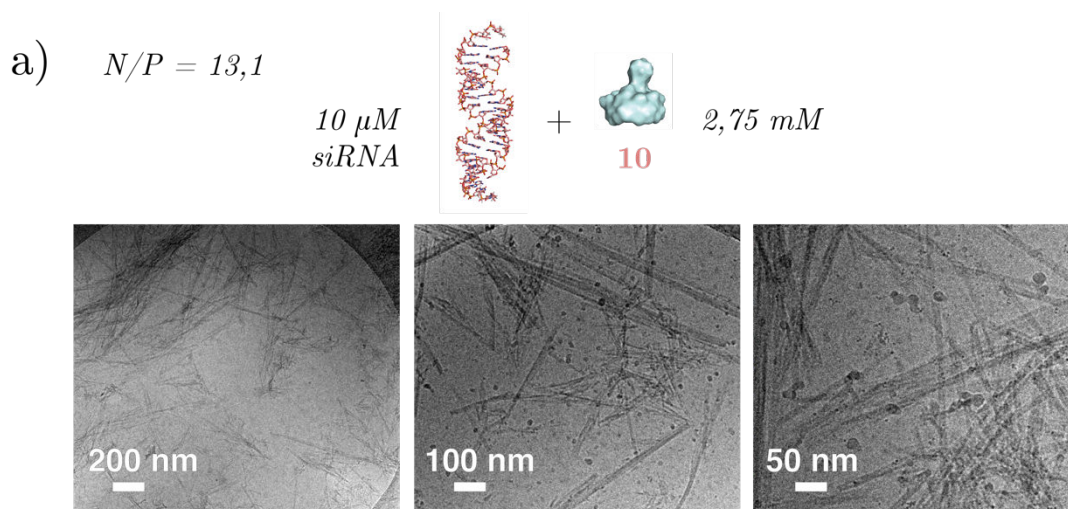


Figure 3. 21 : a) Micrographes de Cryo-TEM d'une solution de complexes ($[10] = 2,75 \text{ mM}$, $[\text{siRNA}] = 10 \text{ }\mu\text{M}$, $N/P = 13,1$). Observation de structures de type fibrillaires d'une longueur de plusieurs centaines de nanomètres. b) Histogramme représentant la dispersité du diamètre des fibres, et ajustement par une loi log-normale centrée sur un diamètre $D_g = 12,277 \text{ nm}$ avec un écart type géométrique de $\sigma_g = 1,42 \text{ nm}$ (taille de la population = 137).

La diminution de la proportion CD/siRNA a donc permis la formation de fibres. Par conséquent le ratio N/P a encore été diminué ($[10] = 0,7 \text{ mM}$, $[\text{siRNA}] = 5 \text{ }\mu\text{M}$, $N/P = 6,4$). Le même type d'architecture a alors pu être observée. Cependant, alors que le diamètre des fibres reste semblable à l'expérience précédente ($D_g = 13,235$ et $\sigma_g = 1,35$), la longueur de celles-ci a augmenté de manière considérable atteignant plusieurs micromètres (Figure 3. 22).

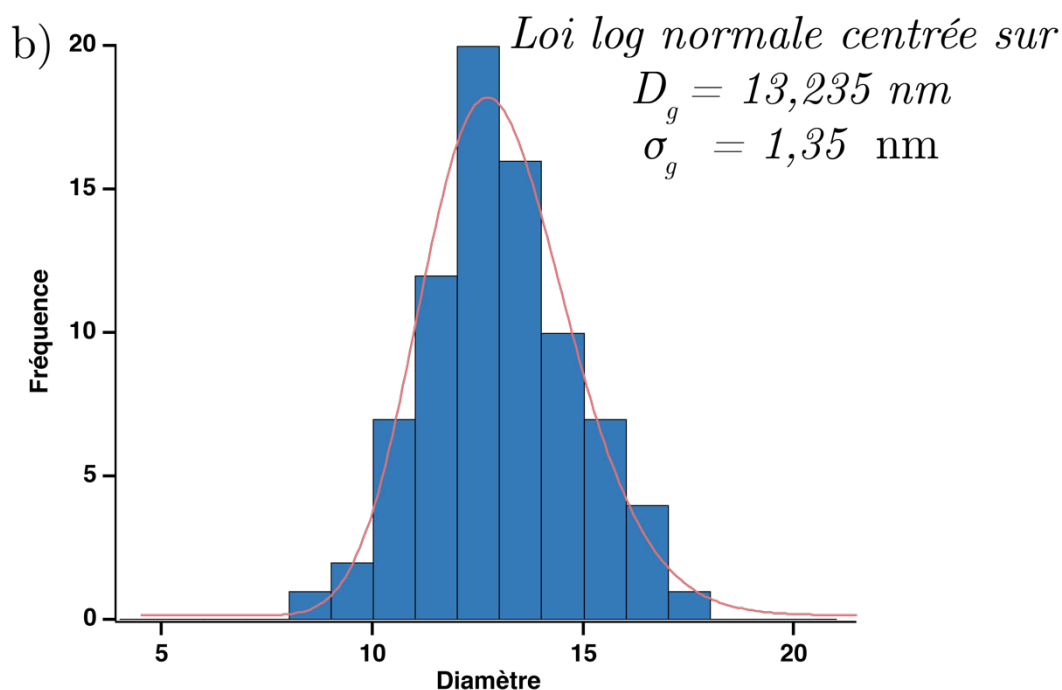
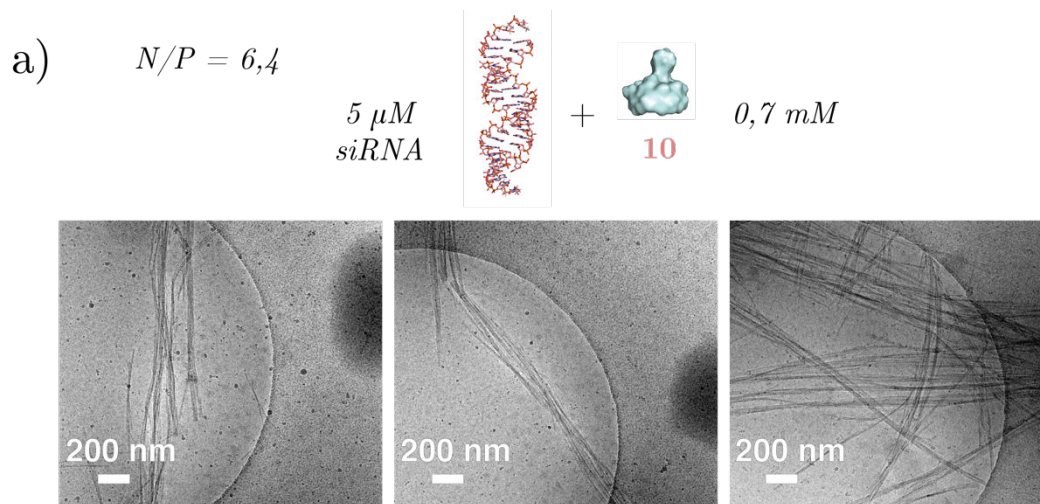


Figure 3. 22 : a) Micrographes de Cryo-TEM d'une solution de complexes ($[10] = 0,7 \text{ mM}$, $[\text{siRNA}] = 5 \text{ }\mu\text{M}$, $N/P = 6,4$). Observation de structures de type fibrillaires d'une longueur de plusieurs micromètres. b) Histogramme représentant la dispersité du diamètre des fibres, et ajustement par une loi log-normale centrée sur un diamètre $D_g = 13,235 \text{ nm}$ avec un écart type géométrique de $\sigma_g = 1,35 \text{ nm}$ (taille de la population = 80).

En comparant la taille d'un siRNA (2 x 6 nm), la taille d'une CD (0,8 x 1 nm) ou même la taille d'un oligomère de CD (1 x 6 nm à la concentration la plus élevée) avec la taille des fibres obtenues, nous pouvons déduire qu'un phénomène hautement coopératif a lieu.

Par la suite, des études de variation de concentration en CD et siRNA ont été réalisées. Pour cela le ratio N/P a été maintenu constant tel que $N/P = 13,1$. Nous avons vu précédemment que dans les conditions $[10] = 2,75$ mM, $[siRNA] = 10$ μ M, $N/P = 13,1$, des fibres d'une longueur de plusieurs centaines de nanomètres et d'un diamètre monodisperse ($D_g = 12,277$ nm et $\sigma_g = 1,42$) étaient obtenues. En divisant les concentrations par deux mais en maintenant le même ratio N/P ($[10] = 1,375$ mM, $[siRNA] = 5$ μ M, $N/P = 13,1$), des fibres d'une longueur et d'un diamètre similaire ($D_g = 12,704$ nm et $\sigma_g = 1,31$) ont été observées (Figure 3. 23). En divisant à nouveau les concentrations par cinq ($[10] = 0,275$ mM, $[siRNA] = 1$ μ M, $N/P = 13,1$), aucune fibre n'a alors pu être observée (Figure 3. 24).

Ainsi une concentration minimum en CD et en siRNA semble nécessaire à la formation des fibres. À une concentration de 0,275 mM, le composé (10) ne forme à priori pas d'oligomères selon la relation relative au modèle isodesmique ($DP = \sqrt{KC}$), alors qu'à une concentration de 1,375 mM ou 2,75 mM, des oligomères avec un DP de 3-4 ou de 4-5 respectivement peuvent être attendus en solution. Ainsi, nous pouvons avancer l'hypothèse postulant que la formation de petits oligomères de CD est nécessaire à la construction de l'édifice supramoléculaire donnant lieu aux fibres observées.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, la première étape d'une polymérisation supramoléculaire selon un modèle coopératif intermoléculaire est la nucléation. La nucléation peut nécessiter un certain apport d'énergie. Dans le cas présent, l'apport d'énergie nécessaire est certainement apporté par l'oligomérisation préalable des CD. Lorsque la concentration en monomères de CD est trop faible, l'oligomérisation préliminaire des CD est impossible, et la nucléation n'a alors pas lieu.

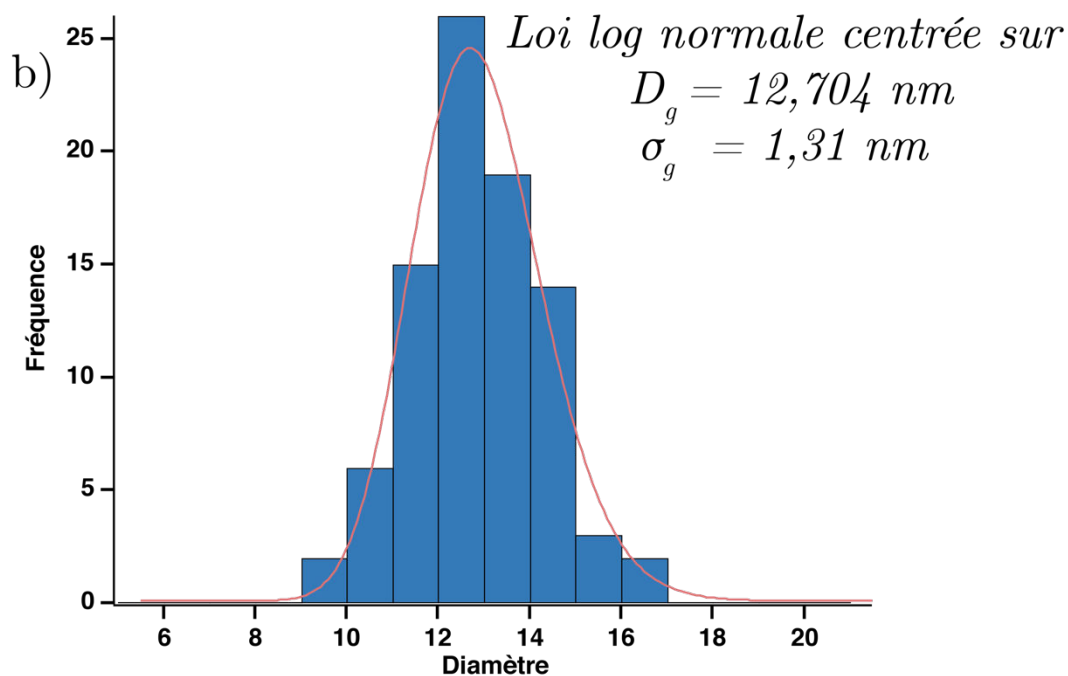
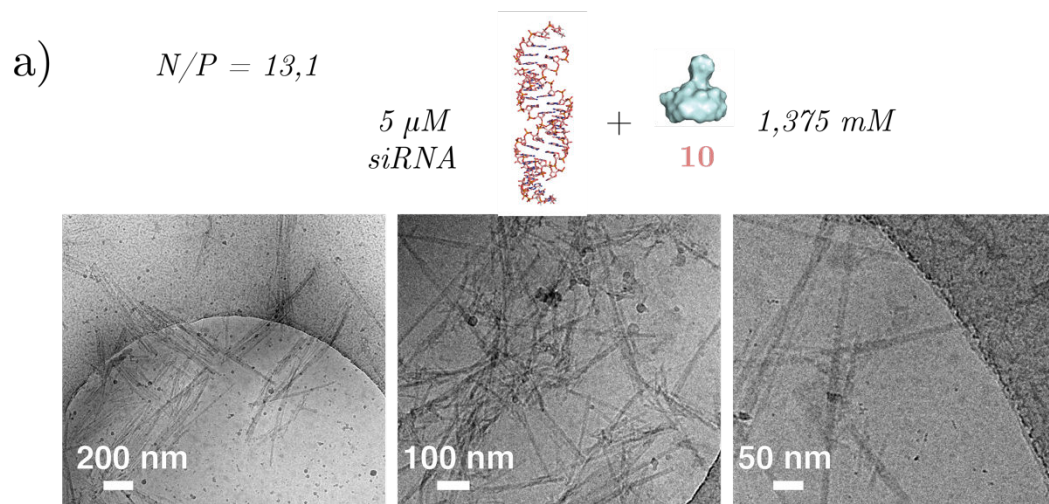


Figure 3. 23 : a) Micrographes de cryo-TEM d'une solution de complexes ($[10] = 1,375 mM$, $[siRNA] = 5 \mu M$, $N/P = 13,1$). Observation de structures de type fibrillaires d'une longueur de plusieurs centaines de nanomètres. b) Histogramme représentant la dispersité du diamètre des fibres et ajustement par une loi log-normale centrée sur un diamètre $D_g = 12,704 nm$ avec un écart type géométrique de $\sigma_g = 1,31$ (taille de la population = 87).

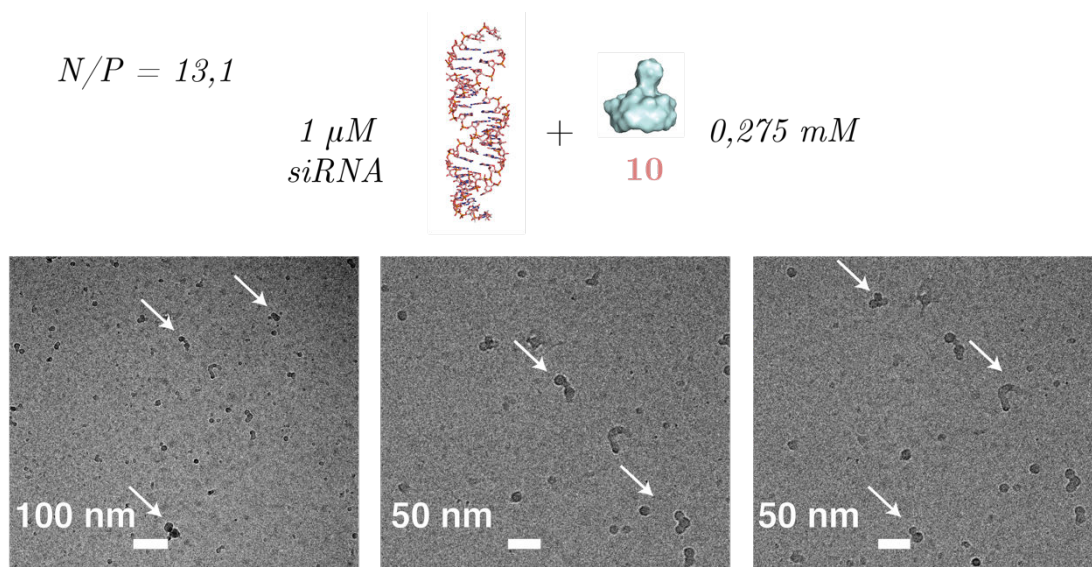


Figure 3. 24 : Micrographes de cryo-TEM d'une solution de complexes $[10] = 0,275 \text{ mM}$, $[\text{siRNA}] = 1 \mu\text{M}$, $N/P = 13,1$. Flèches blanches : artéfacts dus à des cristaux de glaces.

3.3.2.4. Rôle de l'oligomérisation de CD dans la formation d'assemblages hiérarchiques : témoin négatif

Afin de confirmer le rôle de l'oligomérisation supramoléculaire de CD dans la formation des fibres observées précédemment, une solution du composé diamine (**14**) qui ne forme pas d'assemblages supramoléculaires, a été préparée en présence de siRNA dans les mêmes proportions que précédemment : $[14] = 2,75 \text{ mM}$, $[\text{siRNA}] = 10 \mu\text{M}$, $N/P = 13,1$. Aucune fibre n'a alors été observée, confirmant le rôle essentiel de l'assemblage supramoléculaire de CD *via* des interactions hôtes-invités dans la formation des fibres (Figure 3. 25).

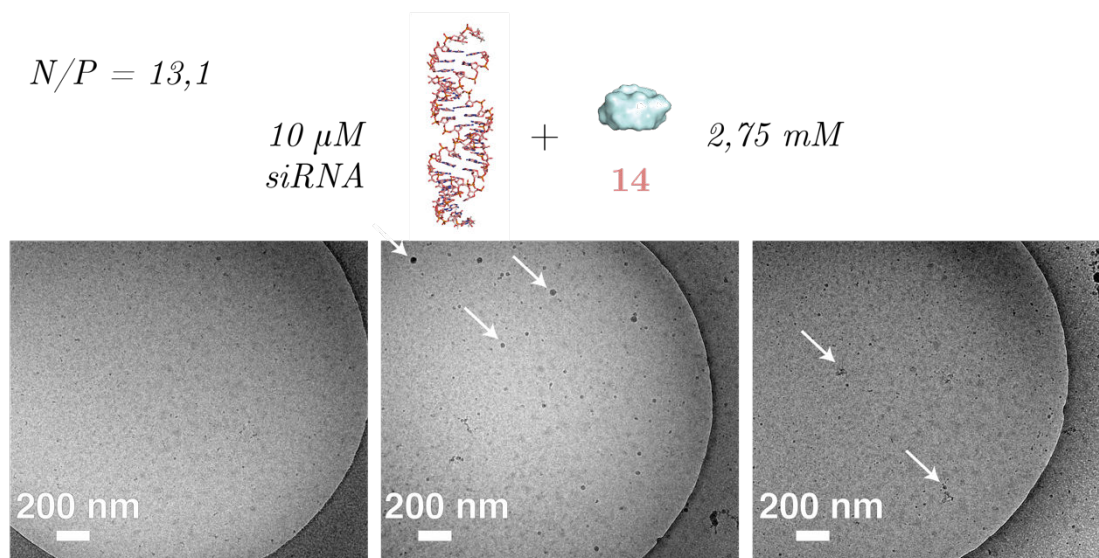


Figure 3. 25 : Micrographes de Cryo-TEM d'une solution composé de $[14] = 2,75 \text{ mM}$, $[\text{siRNA}] = 10 \mu\text{M}$, $N/P = 13,1$. Flèches blanches : artéfacts dus à des cristaux de glaces.

3.3.2.5. Influence du type d'acide nucléique, et de la concatémérisation

Afin d'aller plus loin dans la compréhension de la formation des fibres observées, nous nous sommes demandés si le type d'acide nucléique utilisé avait une importance. Autrement dit, est ce qu'un ADN présentant la même structure que le siRNA GL3 peut, en présence du conjugué (10), former des structures supramoléculaires similaires ? Nous appellerons cet ADN siDNA GL3. Les ADN, de par leur stabilité chimique plus importante que les ARN bicaténaires correspondants, sont plus faciles à manipuler et leur utilisation ouvrirait de nouvelles perspectives dans ce projet.

Différences structurales entre l'ARN et l'ADN

L'ARN se distingue de l'ADN de trois façons. Tout d'abord, le squelette des ARN contient un ribose au lieu d'un 2'-désoxyribose. Cette fonction 2'OH a une forte incidence sur la stabilité des ARN. D'un point de vue chimique, cette fonction hydroxyle rend l'ARN sensible à l'hydrolyse alcaline et peut aussi provoquer une cyclisation via la fonction phosphate entraînant une rupture de la chaîne ribose-phosphate.²⁶ Deuxièmement, les ARN possèdent des uraciles à la place des thymines. L'uracile est une base azotée similaire à la thymine, mais elle ne présente pas de fonction méthyle en position 5. Finalement les ARN sont à l'état naturel monocaténaire, bien que dans notre cas les siRNA soient double brins.

Ces différences ont un impact sur la conformation de la double hélice des ARN et ADN. En effet, les acides nucléiques peuvent s'arranger selon plusieurs conformations. Elles sont appelées A, B et Z (**Figure 3. 26**). La conformation B, est celle rencontrée très majoritairement pour l'ADN en milieu physiologique. Elle présente dix paires de bases par tour d'hélice. Son grand sillon est large alors que son petit sillon est plutôt étroit. La conformation A, est rencontrée pour l'ADN dans les milieux pauvres en eau. Cette conformation se rapproche beaucoup de celle des ARN bicaténaire : elle présente 11 paires de bases par tour d'hélice et possède un grand sillon plus étroit et profond que celui de la conformation B, alors que son petit sillon est plus large et moins profond. Si les deux conformations précédentes s'enroulent vers la droite, la dernière conformation possible, appelée ADN (Z), s'enroule vers la gauche. Cette dernière structure de l'ADN est moins fréquente et n'est observée que dans des milieux riches en sodium. Les conformations A et B sont des structures idéales. En réalité, la double hélice des acides nucléiques n'est pas aussi régulière. Néanmoins nous pouvons considérer dans notre cas que le siRNA GL3 aura très certainement une structure tendant vers la conformation A et le siDNA GL3 vers la conformation B.

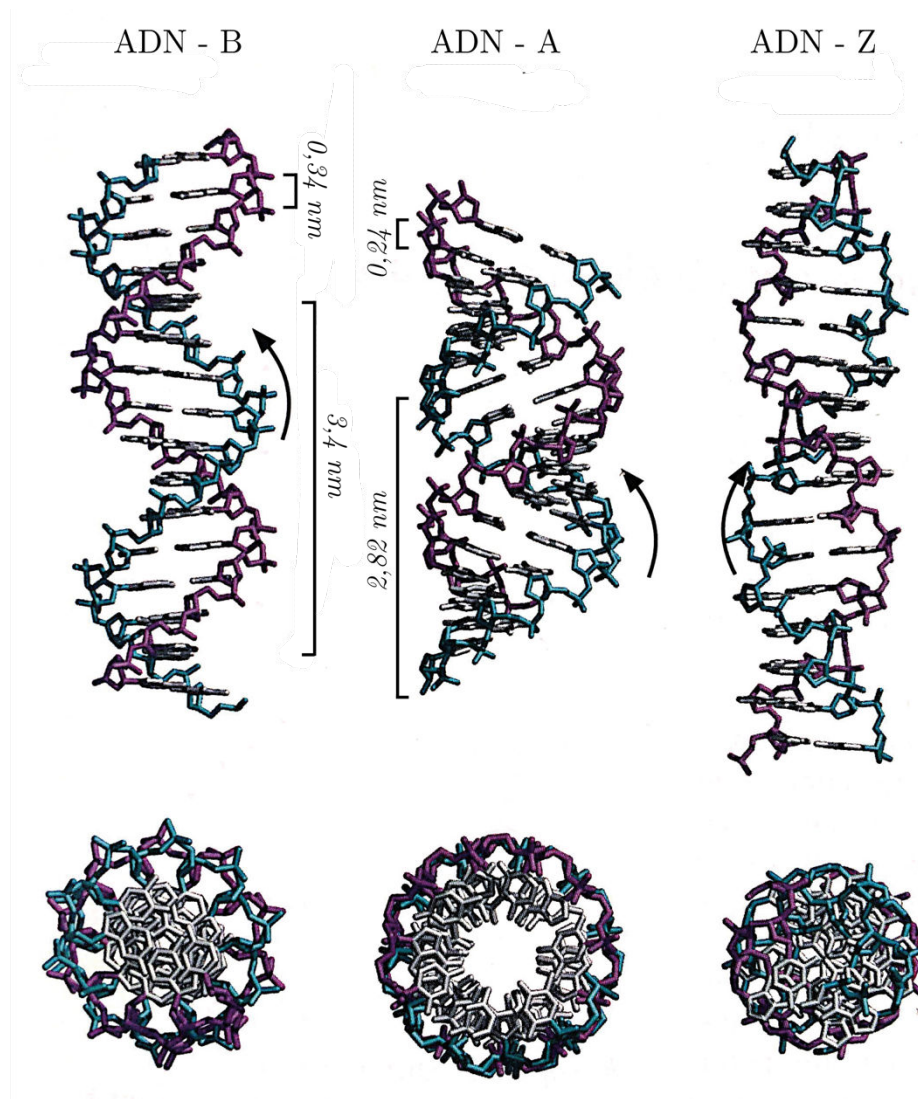


Figure 3. 26 : Comparaison des différentes structures de l'ADN²⁷

siDNA GL3 (avec dT)

Ainsi plusieurs solutions de complexes ont été préparées, composées du conjugué (10) et d'ADN double brins siDNA GL3 présentant une séquence similaire aux siRNA GL3 (Figure 3. 27).

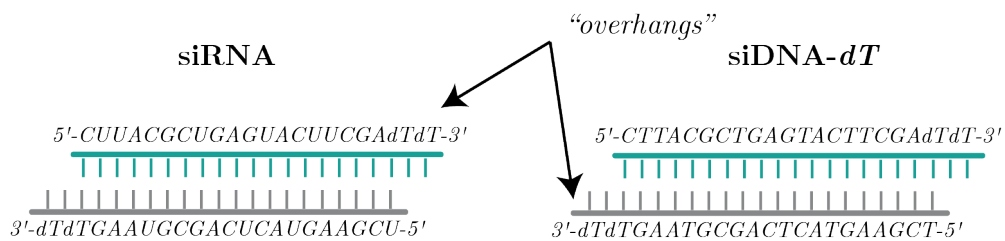


Figure 3. 27 :Structures des siRNA et siDNA-*dT*

Dans un premier temps, une solution composée de ($[10] = 0,7 \text{ mM}$, $[\text{siDNA-}dT] = 5 \mu\text{M}$, $N/P = 6,4$) a été étudiée. Dans ces conditions, de longues fibres d'une longueur de plusieurs micromètres et d'un diamètre monodisperse d'environ 13 nm avaient été observées en présence du siRNA GL3. Le même type d'architecture a alors pu être observé avec les siDNA. En effet, le diamètre des fibres ($D_g = 12,126$ et $\sigma_g = 1,34$) et leur longueur (quelques micromètres) restent relativement (Figure 3. 28). Néanmoins, le nombre de fibres par puit a considérablement diminué. Alors que plusieurs fibres étaient présentes dans chaque puit lors de l'expérience avec les siRNA, la majorité des puits étaient vides lors de l'observation des complexes CD/siDNA.

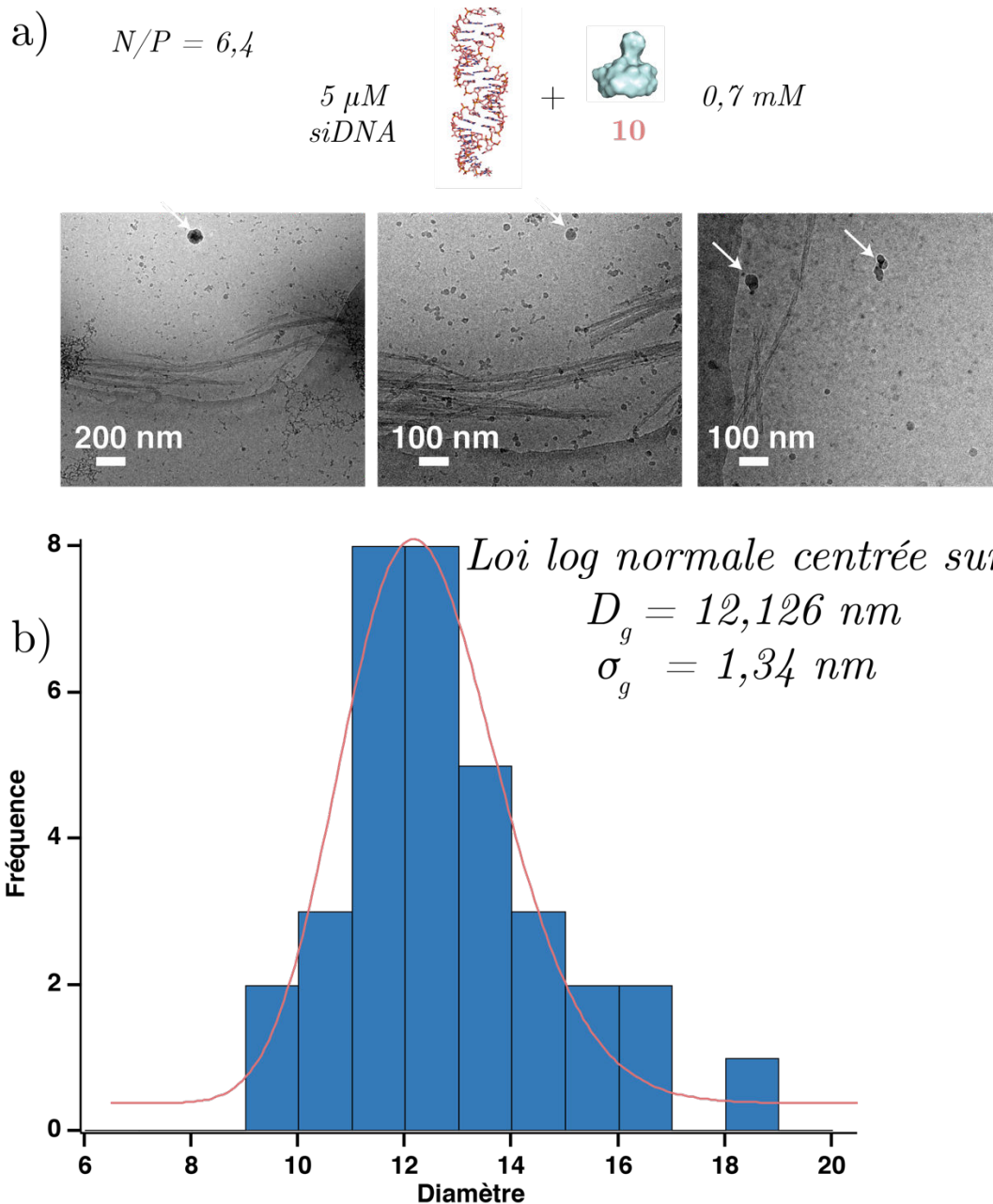


Figure 3. 28 : a) Micrographes de Cryo-TEM d'une solution de complexes ($[10] = 0,7 \text{ mM}$, $[\text{siDNA-}dT] = 5 \mu\text{M}$, $N/P = 6,4$). Observation de structures de type fibrillaires d'une longueur de plusieurs micromètres. b) Histogramme représentant la dispersité du diamètre des fibres, et ajustement par une loi log-normale centrée sur un diamètre $D_g = 12,126 \text{ nm}$ avec un écart type géométrique de $\sigma_g = 1,34 \text{ nm}$ (taille de la population = 34).

Ainsi la conformation de l'acide nucléique ne semble pas influencer sur la structure des fibres formées. Néanmoins, pour expliquer le faible nombre de fibres observées, on peut poser l'hypothèse que l'étape de nucléation est plus couteuse en énergie avec les siDNA qu'avec les siRNA. Cela expliquerait pourquoi, lorsque cette étape est franchie, la structure des fibres est la même, mais la quantité de fibres obtenue est considérablement diminuée.

Afin de confirmer l'hypothèse selon laquelle, le ratio N/P influencerait sur la longueur des fibres, une solution de complexe ($[10] = 0,7 \text{ mM}$, $[\text{siDNA-}dT] = 2,5 \text{ }\mu\text{M}$, $N/P = 12,8$) a été observée en cryo-microscopie (Figure 3. 29). À concentration en CD (10) constante mais avec un ratio N/P multiplié par deux, la longueur des fibres observées a diminué (plusieurs centaines de nanomètres). Le diamètre des fibres reste cependant, relativement constant et monodisperse ($D_g = 11,136 \text{ nm}$ et $\sigma_g = 1,38 \text{ nm}$).

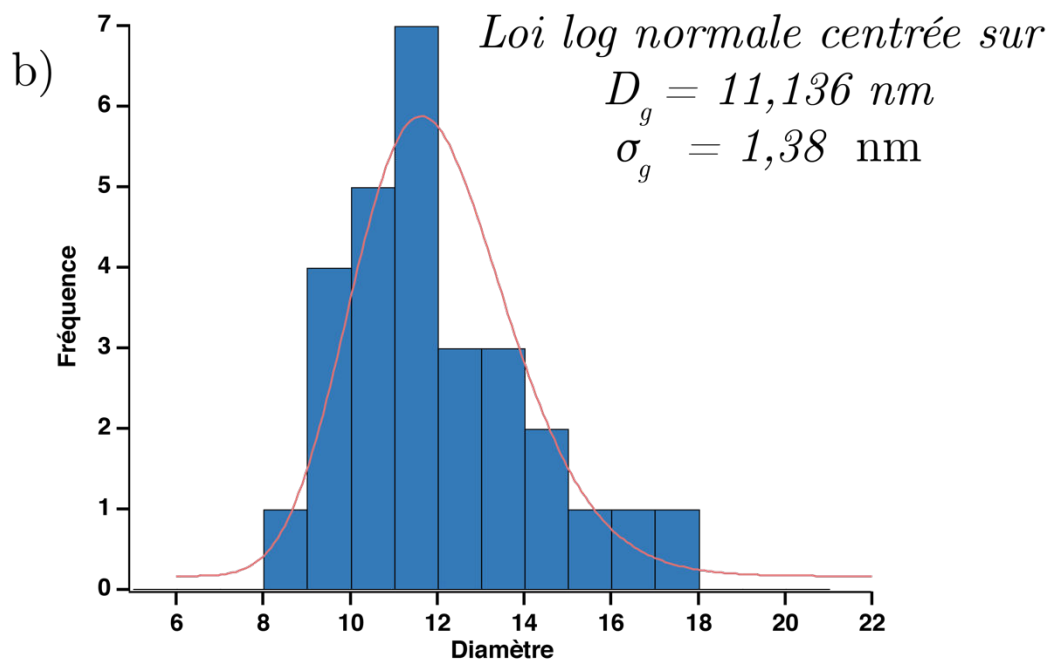
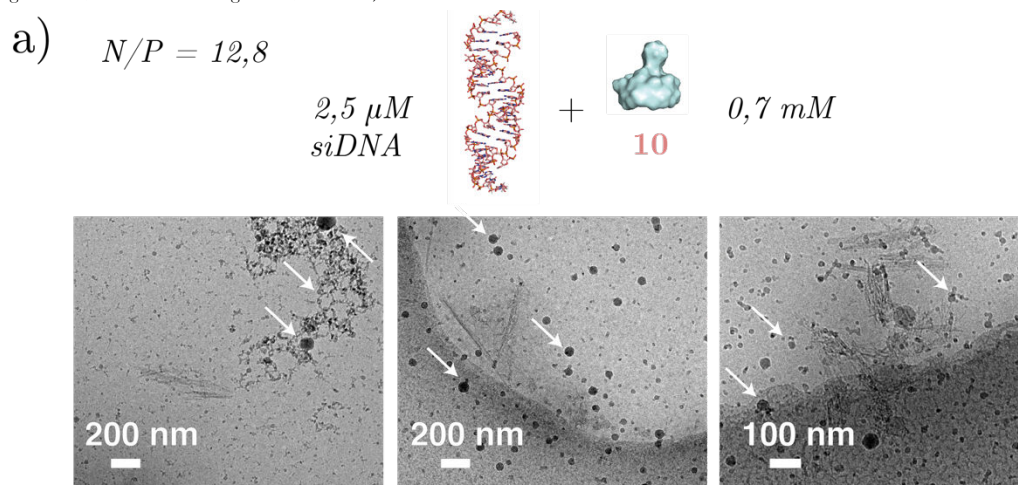


Figure 3. 29 : a) Micrographes de Cryo-TEM d'une solution de complexes ($[10] = 0,7 \text{ mM}$, $[\text{siDNA-}dT] = 2,5 \text{ }\mu\text{M}$, $N/P = 12,8$). Observation de structures de type fibrillaires d'une longueur de plusieurs centaines de nanomètres. b) Histogramme représentant la dispersité du diamètre des fibres, et ajustement par une loi log-normale centrée sur un diamètre $D_g = 11,136 \text{ nm}$ avec un écart type géométrique de $\sigma_g = 1,38 \text{ nm}$ (taille de la population = 28).

Enfin une solution de complexes ($[10] = 0,7 \text{ mM}$, $[\text{siDNA-}dT] = 32 \text{ }\mu\text{M}$, $N/P = 1$) a été observée en cryo-microscopie. Dans ces conditions, la concentration en CD (10) a été maintenue constante mais celle en siDNA-*dT* a été augmentée afin d'arriver à un ratio N/P égal à 1. Aucune fibre n'a alors été observée. Cependant des globules sphériques d'un diamètre de 200 à 400 nanomètres ont été observés dans chaque puit (Figure 3. 30). Ainsi les acides nucléiques et les CD s'assemblent toujours, mais sans aucune directionnalité. Par conséquent, un excès de CD semble nécessaire pour régir la directionnalité de l'assemblage.

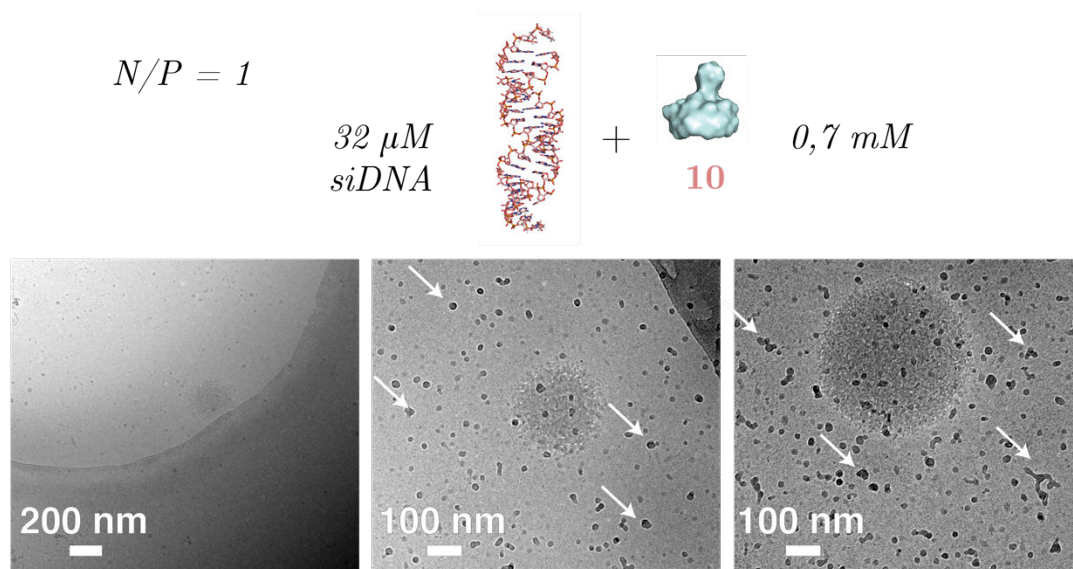


Figure 3. 30 : Micrographes de Cryo-TEM d'une solution composé de $[10] = 0,7 \text{ mM}$, $[\text{siDNA-}dT] = 32 \text{ }\mu\text{M}$, $N/P = 1$. Flèches blanches : artéfacts dus à des cristaux de glaces.

siDNA GL3 (sans dT) : hypothèse de concatémérisation

Pour terminer nous nous sommes demandé si un phénomène de concatémérisation ne participait pas à la formation de l'assemblage. On définit un concatémère comme une longue molécule d'acide nucléique composée de multiples copies de la même séquence placée en série à la suite les unes des autres. L'équipe de Behr a notamment travaillé sur la concatémérisation de siRNA.²⁸ Leur recherche partait du constat que les siRNA de par leur petite taille interagissait de manière moins efficace avec les polycations. Ainsi leur complexation par des PEI est plus difficile, et les objets formés, de plus petites tailles, interagissent de manière moins efficace avec les protéoglycanes de la membrane cellulaire. Par conséquent, l'internalisation de ces systèmes PEI-siRNA est plus faible que dans le cas des PEI-pDNA. Ainsi, le groupe de Behr a étudié la capacité de transfection des PEI avec des concatémères de siRNA. Ces concatémères sont composés de siRNA, liés entre eux *via* des « sticky-ends » complémentaires, constitués de 5 à 8 déoxyadénosines d'un côté et de 5 à 8 thymidines (Figure 3. 31). Les résultats obtenus ont montré la formation de complexes stables, capables de se désassembler dans le cytoplasme et d'induire le phénomène d'interférence par ARN.

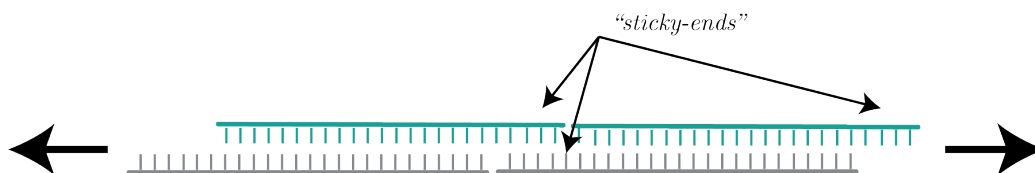


Figure 3. 31 : Concatémères de siRNA

Compte tenu de la structure linéaire des fibres observées précédemment, nous avons posé l'hypothèse que la proximité des « overhangs » des siRNA composant ces assemblages, pouvait permettre des interactions entre ces extrémités non appariées et participer ainsi à la formation des fibres. Bien que les nucléosides composant les siRNA utilisés dans ce projet ne soient pas complémentaires (thymidines de chaque côté), il a été montré que des paires de bases TT pouvaient s'apparier avec une certaine stabilité.^{29,30}

Ainsi, afin de mettre en évidence une potentielle participation de l'interaction des « overhangs » dans la formation des fibres, nous avons voulu, observer par cryo-microscopie des siRNA sans « overhangs ». Ne disposant pas de siRNA sans « overhangs » au laboratoire, nous avons réalisé ces expériences avec des siDNA GL3 sans « overhangs » notés siDNA-*xdT* (Figure 3. 32). En effet, comme les siDNA-*dT*, ont montré dans les conditions ($[10] = 0,7 \text{ mM}$, $[\text{siDNA-}dT] = 2,5 \text{ }\mu\text{M}$, $N/P = 12,8$) la capacité à former des fibres, l'observation d'une solution composée de ($[10] = 0,7 \text{ mM}$, $[\text{siDNA-}xdT] = 2,5 \text{ }\mu\text{M}$, $N/P = 14,1$) devrait nous permettre de conclure quant à cette hypothèse.

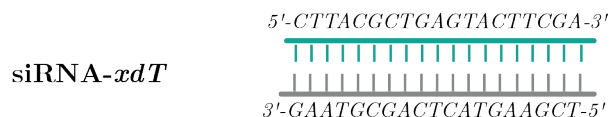


Figure 3. 32 : Structure de siRNA-*xdT*

Lors de l'observation en cryo-TEM des espèces formées en solution de ce mélange, des fibres ont été identifiées (Figure 3. 33). Leur longueur est similaire à l'expérience avec le siDNA-*dT* (plusieurs centaines de nanomètres), et le diamètre des fibres reste en accord avec toutes les expériences réalisées préalablement ($D_g = 13,026 \text{ nm}$ et $\sigma_g = 1,31 \text{ nm}$). Par conséquent aucun phénomène de concatémérisation ne semble avoir lieu, ou du moins, il ne participe pas à la formation des fibres.

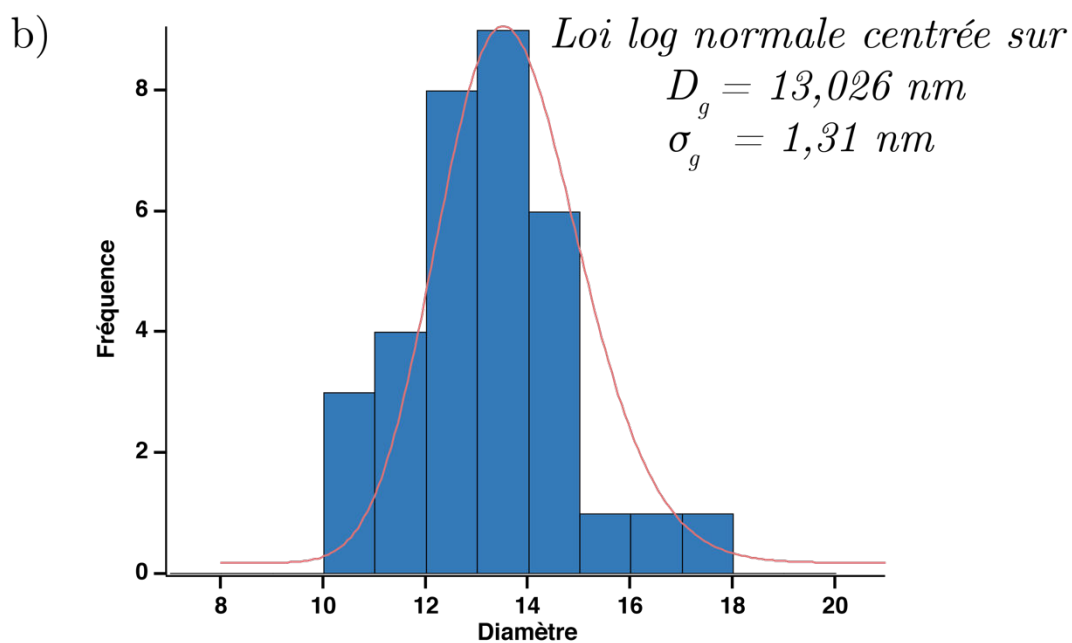
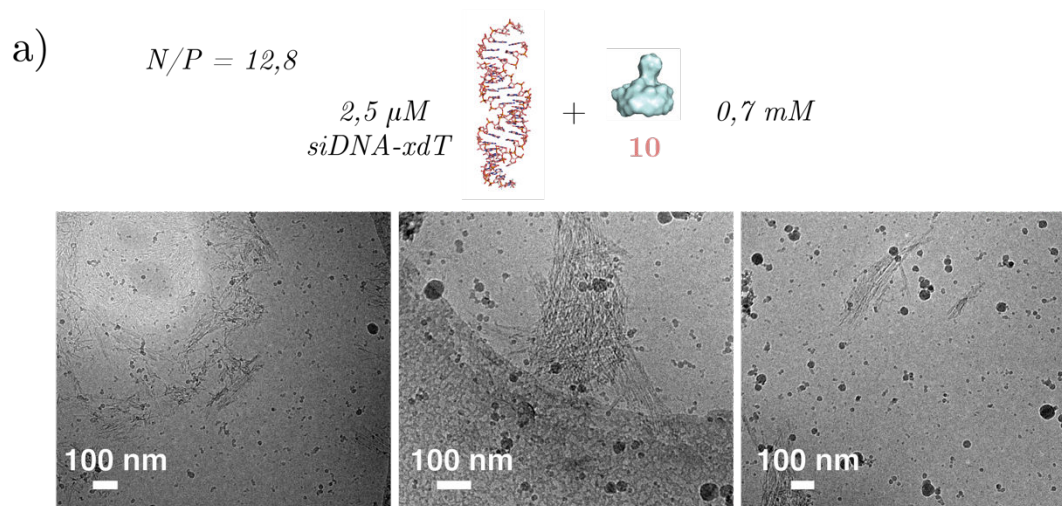


Figure 3. 33 : a) Micrographes de Cryo-TEM d'une solution de complexe ($[10] = 0,7 \text{ mM}$, $[siDNA-xdT] = 2,5 \mu\text{M}$, $N/P = 12,8$). Observation de structures de type fibrillaires d'une longueur de plusieurs centaines de nanomètres. b) Histogramme représentant la dispersité du diamètre des fibres et ajustement par une loi log-normale centrée sur un diamètre $D_g = 13,026 \text{ nm}$ avec un écart type géométrique de $\sigma_g = 1,31 \text{ nm}$ (taille de la population = 33).

3.3.3. Analyse des résultats et proposition structurale

3.3.3.1. Proposition structurale

Ainsi grâce aux expériences de cryo-TEM réalisées, nous avons découvert que le conjugué (10) en présence de siRNA (ou de siDNA avec ou sans « overhangs ») pouvait former des fibres d'un diamètre monodisperse (12-13 nm) et d'une longueur allant de 100 nm jusqu'à plusieurs micromètres. Nous avançons en **Figure 3. 35** une proposition de structure des fibres afin d'expliquer leur taille et leur longueur.

1 : Dans un premier temps les CD interagissent avec les siRNA. Les siRNA de par leur caractère polyanionique augmentent la concentration locale de CD autour d'eux et favorisent l'oligomérisation des CD de manière coopérative.

2 : De cette manière les CD peuvent complexer et écranter totalement les charges des siRNA à des concentrations basses en CD ; concentration auxquelles les CD ne devraient former en solution que des 3-5mères. Cette hypothèse est confortée par les résultats obtenus en électrophorèse, où une complexation des siRNA totale est observée à des concentrations où seuls des monomères ou dimères de CD devraient être obtenus. Ainsi, d'après la modélisation réalisée en trois dimensions, un maximum de six cylindres de CD peut théoriquement entourer les siRNA et former des fibrilles.

3 : Pour recouvrir totalement un siRNA, il faut en principe 6 oligomères de 8 CD, soit 48 CD. Un siRNA possède 42 charges anioniques, il y a donc un excès de charges positives (48 à 96 cations en fonction de la proportion d'amines tertiaires protonnées). Le recrutement d'un autre siRNA de manière latérale est donc possible. Par ailleurs, le recrutement d'autres CD est aussi possible au bout des chaînes d'oligomères préalablement formées et favorise d'autant plus le recrutement d'un autre siRNA.

4 : Le recrutement d'un siRNA peut alors se faire de manière légèrement décalée. Ce siRNA favorise alors l'oligomérisation des autres chaînes de CD de manière hautement coopérative. L'oligomérisation de ces CD favorise également le recrutement d'un autre siRNA. L'assemblage croît alors de manière longitudinale selon un mécanisme de type décalé (**Figure 3. 34**). On rencontre notamment ce type de mécanisme dans la formation d'assemblage supramoléculaire naturel. Les microfibrilles de collagène s'assemblent notamment de manière décalée pour former des fibrilles.³¹



Croissance selon un mécanisme de type décalé

Figure 3. 34 : Mécanisme de type décalé. Le mélange de deux espèces de même taille permet leur assemblage de manière décalée et donc le recrutement alterné des espèces, entraînant une croissance coopérative de l'assemblage théoriquement infinie.

5 : Le recrutement des siRNA et des CD se poursuit alors de manière latérale et longitudinale. La croissance est limitée uniquement par le non recrutement d'une espèce (siRNA ou CD).

6 : Afin de former les fibres d'un diamètre d'environ 12 nm, observées en cryo-TEM, approximativement 7 siRNA et 24 cylindres de CD par niveau sont nécessaires. De manière hautement coopérative et hiérarchique, ces fibres peuvent alors s'étendre et former des faisceaux (7) d'une longueur allant jusqu'à plusieurs micromètres.

Le système hexagonal présenté en **Figure 3. 35** est idéal. On s'attend en réalité à avoir un mélange d'espèces avec une géométrie moins régulière.

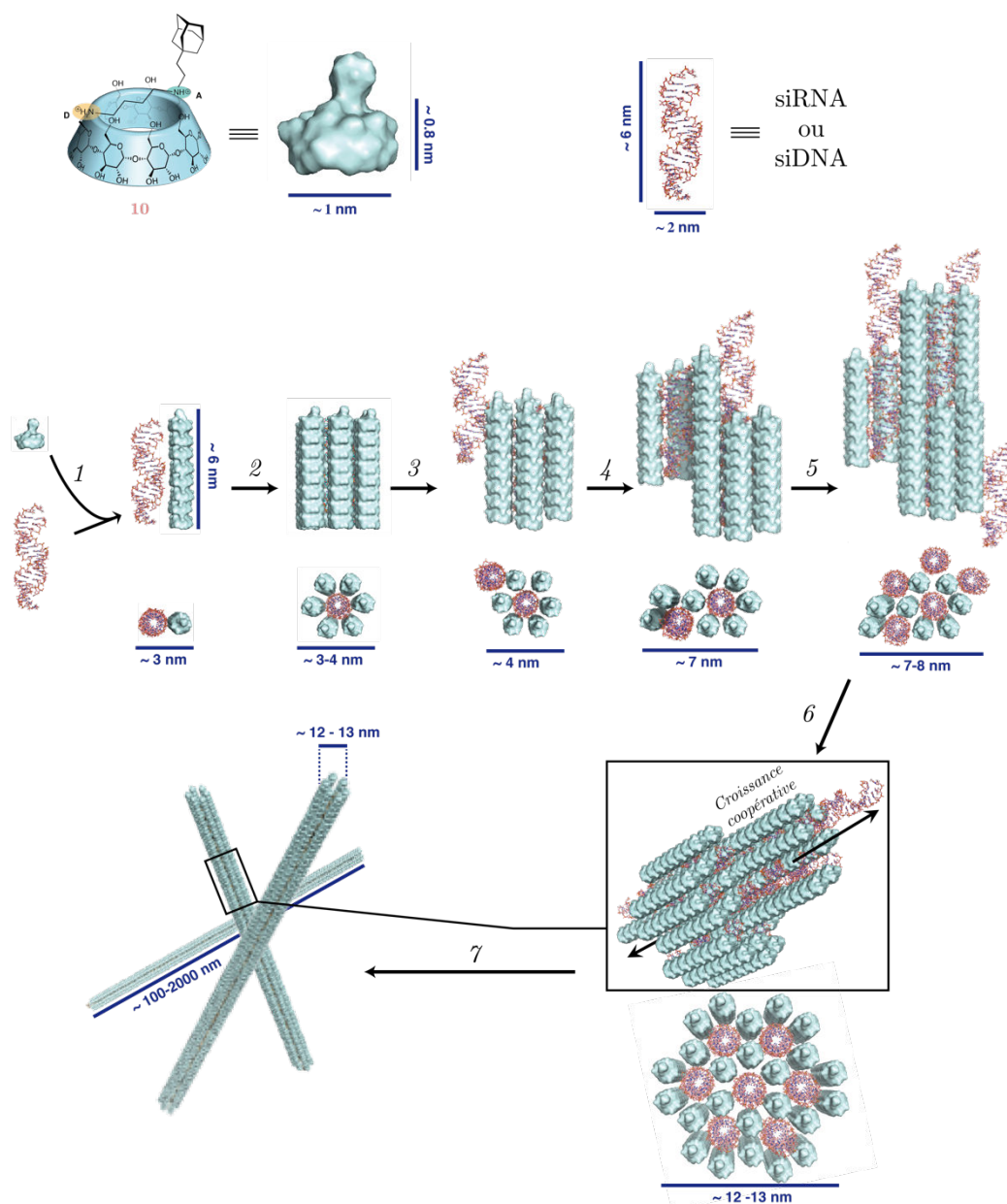


Figure 3. 35 : Proposition structurale pour la formation des fibres

3.3.3.2. Influence du ratio N/P

Nous avons de plus constaté que la variation de ratio N/P influait de manière non négligeable sur la structure des objets formés. En tenant compte des divers résultats obtenus, nous avons tenté de comprendre comment et pourquoi ce ratio dirigeait la forme de l'assemblage (**Figure 3. 36**). En effet lorsqu'un large excès de CD cationiques est utilisé ($N/P \gg 1$), aucune fibre n'est observée. Nous avons alors fait l'hypothèse qu'un excès de monomères de CD cationiques induisait une répulsion électrostatique, prévenant ainsi de la formation d'architectures supramoléculaires.

Cependant lorsque les CD ne sont pas en excès, de larges particules sphériques, d'un diamètre allant de 200 à 400 nm, sont observées. Comme nous l'avons vu avec les expériences de concatémérisation, bien que les siRNA favorisent très certainement l'oligomérisation des CD, aucune interaction des siRNA entre eux ne semble participer à la formation des fibres. Ainsi il semblerait que la directionnalité de la structure soit donnée par l'oligomérisation des CD. Lorsque trop de siRNA sont en solution, l'oligomérisation rigide des CD est certainement perturbée, la complexation des siRNA devient alors anarchique.

Finalement un léger excès de CD semble nécessaire pour la formation des fibres. Néanmoins la longueur de celles-ci semble directement dépendre du ratio N/P. Plus celui-ci s'approche de 1, plus le recrutement des siRNA est facile, favorisant de ce fait l'oligomérisation coopérative des CD et donc l'élongation des fibres.

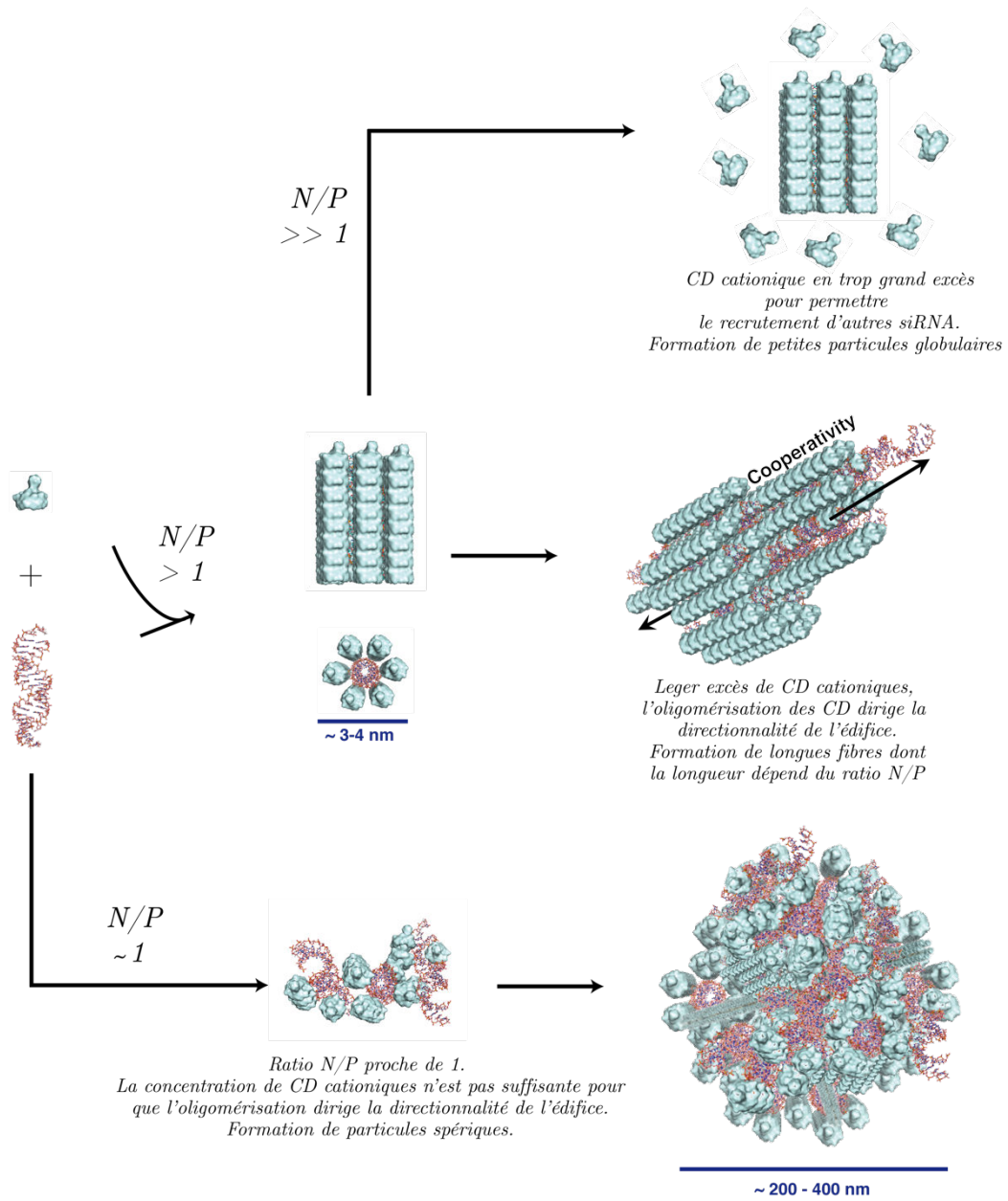


Figure 3. 36 : Hypothèses concernant l'influence du ratio N/P sur la structure de l'assemblage

3.3.3.3. Contrôle du diamètre des fibres : frustration géométrique de l'assemblage

La croissance longitudinale des fibres semble dirigée par un mécanisme de type décalé, limitée par le recrutement des espèces et donc en partie contrôlable par le ratio N/P. Cependant, quelles que soient les conditions utilisées, lorsque des fibres ont été obtenues, un diamètre monodisperse d'environ 12-13 nanomètres a été observé. La croissance latérale des fibres se fait alors selon des interactions électrostatiques relativement faibles, dues à la dispersion des charges. Une frustration dans l'empilement peut également limiter de manière précise la croissance latérale des fibres.

De nombreuses structures supramoléculaires naturelles présentent de telles frustrations géométriques. Ces espèces sont composées de fibrilles chirales qui s'organisent alors en fibres, conduisant à des architectures enroulées ou bien entortillées sur elle-mêmes.^{32,33} Cependant, cette hélicité chirale des fibrilles défavorise en théorie stériquement leur assemblage en fibres. Ainsi deux phénomènes entrent en compétition : l'attraction électrostatique des fibrilles et leur répulsion stérique due à leur hélicité. Pour s'assembler, les fibrilles doivent alors se désentortiller partiellement, créant une distorsion élastique qui s'oppose à la croissance latérale électrostatique de l'assemblage. La compétition entre l'attraction et la répulsion des fibres est optimale pour un certain diamètre.³⁴ Grason a beaucoup étudié ce phénomène de frustration géométrique des assemblages tubulaires, notamment pour les système hexagonaux.³⁵

Bien qu'il soit difficile de l'affirmer de manière certaine, la formation des fibres obtenues dans ce projet semble être gouvernée par ce type de frustration géométrique. En effet, la structure des fibrilles proposée précédemment est composée de siRNA (double hélice chirale) et d'un régioisomère CD fonctionnalisée (présentant aussi une forme de chiralité). Ainsi il ne serait pas étonnant que ces fibrilles exhibent une chiralité de type hélicoïdale. Deux types de motifs sont alors possibles : fibres isotropiques ou anisotropiques (Figure 3. 37). Compte tenu des micrographes obtenus en microscopie, il est probable que des fibres présentant une morphologie de type isotropique aient été formées. Il est néanmoins impossible d'affirmer la structure fine des fibres. Idéalement, des cristaux de ces complexes nous permettraient de vérifier les hypothèses avancées.

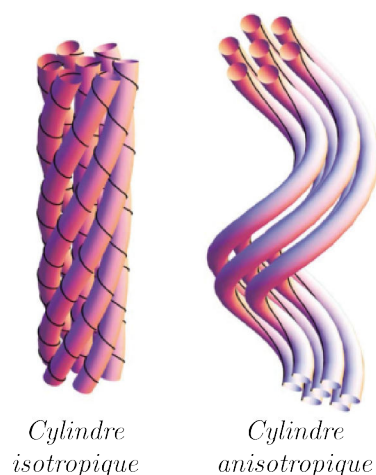


Figure 3. 37 : Morphologie de fibres régies par une frustration géométrique³⁵

3.4. Conclusion

Nous avons montré dans cette partie que les CD cationiques synthétisées étaient capables de complexer et protéger de manière efficace les siRNA. L'assemblage formé en solution a été observé et caractérisé en cryo-microscopie. Des fibres ont été obtenues sur une gamme de ratio N/P définis.

La formation de l'assemblage semble régie par deux phénomènes. En longueur, la croissance des fibres se fait de manière hautement coopérative selon un mécanisme de type décalé. En largeur, le diamètre est défini par une frustration dans l'empilement. Les contraintes élastiques et les interactions électrostatiques CD-siRNA se compensent et un diamètre optimal d'environ 12-13 nanomètres a été observé sur l'ensemble des expériences réalisées. Ainsi des fibres sont formées selon plusieurs niveaux de hiérarchie (assemblage de CD, assemblage CD-siRNA, formation de fibrilles et formation de fibres). La formation d'objets supramoléculaires synthétiques de ce type n'existe pas à notre connaissance. En effet, nous avons découvert ici l'organisation d'assemblages supramoléculaires à base d'acides nucléiques, dont la taille en longueur et en largeur n'est, ni définie par celle des oligomères de CD, ni par celle de l'acide nucléique. La taille et la forme des espèces semble ainsi régie par la coopérativité des interactions CD-siRNA et contrôlée uniquement par des phénomènes supramoléculaires.

Nous avons aussi montré que ces assemblages pouvaient induire le phénomène d'interférence par ARN. Ainsi ce système unique constitué de nombreux siRNA et de monomères de CD dicationiques auto-assemblés met en lumière des structures définies, qui rappellent la structure, la taille et la fonction d'un virus.

3.4. Bibliographie

1. Tang, M. X. & Szoka, F. C. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther.* **4**, 823–832 (1997).
2. Ketola, T., Hanzl, M., Leppä, L., Ravin, M., Bishop, C. J., Green, J. J., Urtti, A., Lemmetyinen, H., Yliperttula, M. & Vuorimaa-laukkanen, E. Independent versus Cooperative Binding in Polyethylenimine - DNA and Poly(L-lysine) -DNA Polyplexes. *J. Phys. Chem. B.* (2013).
3. Monteagudo, S., Perez Martinez, F. C., Perez Carrion, M. D., Guerra, J., Merino, S., Sanchez Verdu, M. P. & Cena, V. Inhibition of p42 MAPK using a nonviral vector- delivered siRNA potentiates the anti-tumor effect of metformin in prostate cancer cells. *Nanomedicine* **7**, 493–506 (2012).
4. Albertazzi, L., Serresi, M., Albanese, A. & Beltram, F. Dendrimer internalization and intracellular trafficking in living cells. *Mol. Pharm.* **7**, 680–688 (2010).
5. Boas, U. & Heegaard, P. M. H. Dendrimers in drug research. *Chem. Soc. Rev.* **33**, 43–63 (2004).
6. Metwally, A. A., Pourzand, C. & Blagbrough, I. S. Efficient gene silencing by self-assembled complexes of siRNA and symmetrical fatty acid amides of spermine. *Pharmaceutics* **3**, 125–140 (2011).
7. Pantos, A., Tsogas, I. & Paleos, C. M. Guanidinium group: A versatile moiety inducing transport and multicompartimentalization in complementary membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1778**, 811–823 (2008).
8. Suga, K., Watanabe, N. & Umakoshi, H. Effect of Stearylguanidinium-Modified POPC Vesicles on the Melting Behavior of tRNA Molecules. *J. Phys. Chem. B.* **120**, 5662–5669 (2016).
9. Onda, M., Yoshihara, K., Koyano, H., Ariga, K. & Kunitake, T. Molecular recognition of nucleotides by the guanidinium unit at the surface of aqueous micelles and bilayers. A comparison of microscopic and macroscopic interfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 8524–8530 (1996).
10. Monteagudo, S., Pérez-Martínez, F. C., Pérez-Carrión, M. D., Guerra, J., Merino, S., Sánchez-Verdú, M. P. & Ceña, V. Inhibition of p42 MAPK using a nonviral vector-delivered siRNA potentiates the anti-tumor effect of metformin in prostate cancer cells. *Nanomedicine* **7**, 493–506 (2012).
11. Cornish, J., Callon, K. E., Lin, C. Q., Xiao, C. L., Mulvey, T. B., Cooper, G. J. & Reid, I. R. Trifluoroacetate, a contaminant in purified proteins, inhibits proliferation of osteoblasts and chondrocytes. *Am. J. Physiol.* **277**, E779–E783 (1999).
12. Bechara, C. & Sagan, S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett.* **587**, 1693–1702 (2013).
13. Danino, D. Current Opinion in Colloid & Interface Science Cryo-TEM of soft molecular assemblies. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **17**, 316–329 (2012).
14. Bai, X., McMullan, G. & Scheres, S. H. W. How cryo-EM is revolutionizing structural biology. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 49–57 (2015).
15. Friedrich, H., Frederik, P. M., De With, G. & Sommerdijk, N. A. J. M. Imaging of self-assembled structures: Interpretation of TEM and Cryo-TEM images. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 7850–7858 (2010).
16. Adrian, M., Dubochet, J., Lepault, J. & McDowell, A. W. Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature* **308**, 32–36 (1984).
17. Almgren, M., Edwards, K. & Karlsson, G. Cryo transmission electron microscopy of liposomes and related structures. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **174**, 3–21 (2000).
18. Krieg, E., Bastings, M. M. C., Besenius, P. & Rybtchinski, B. Supramolecular Polymers in Aqueous Media. *Chem. Rev.* **116**, 2414–2477 (2016).
19. Mandelkow, E. M. Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo- electron microscopy study. *J. Cell Biol.* **114**, 977–991 (1991).
20. Green, S. I., Kaelber, J. T., Ma, L., Trautner, B. W., Ramig, R. F. & Maresso, A. W. Bacteriophages from ExPEC Reservoirs Kill Pandemic Multidrug-Resistant Strains of Clonal Group ST131 in Animal Models of Bacteremia. *Sci. Rep.* **7**, 46151 (2017).
21. Earl, L. A. & Subramaniam, S. Cryo-EM of viruses and vaccine design. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 8903–8905 (2016).
22. Zhao, G., Perilla, J. R., Yufenyuy, E. L., Meng, X., Chen, B., Ning, J., Ahn, J., Gronenborn, A. M., Schulten, K., Aiken, C. & Zhang, P. Mature HIV-1 capsid structure by cryo-electron microscopy and all-atom molecular dynamics. *Nature* **497**, 643–646 (2013).
23. Besenius, P., Portale, G., Bomans, P. H. H., Janssen, H. M., Palmans, A. R. A. & Meijer, E. W. Controlling the growth and shape of chiral supramolecular polymers in water. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 17888–17893 (2010).

24. Bonini, M., Rossi, S., Karlsson, G., Almgren, M., Lo Nostro, P. & Baglioni, P. Self-assembly of beta-cyclodextrin in water. Part 1: Cryo-TEM and dynamic and static light scattering. *Langmuir* **22**, 1478–1484 (2006).
25. He, Y., Fu, P., Shen, X. & Gao, H. Cyclodextrin-based aggregates and characterization by microscopy. *Micron* **39**, 495–516 (2008).
26. Markham, R. & Smith, J. D. The structure of ribonucleic acids. 1. Cyclic nucleotides produced by ribonuclease and by alkaline hydrolysis. *Biochem. J.* **52**, 552–557 (1952).
27. Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M. & Losick, R. *Biologie moléculaire du gène*. (Pearson, 2012).
28. Bolcato-Bellemin, A.-L., Bonnet, M.-E., Creusat, G., Erbacher, P. & Behr, J.-P. Sticky overhangs enhance siRNA-mediated gene silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 16050–5 (2007).
29. Martin, F. H. Base-base mismatches. Thermodynamics of double helix formation for dCA3XA3G + dCT3YT3G (X, Y = A,C,G,T). *Nucleic Acids Res.* **13**, 4811–4824 (1985).
30. Pan, S., Sun, X. & Lee, J. K. Stability of complementary and mismatched DNA duplexes: Comparison and contrast in gas versus solution phases. *Int. J. Mass Spectrom.* **253**, 238–248 (2006).
31. Mouw, J. K., Ou, G. & Weaver, V. M. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 771–785 (2014).
32. Grason, G. M. Perspective: Geometrically frustrated assemblies. *J. Chem. Phys.* **145**, 1–17 (2016).
33. Hall, D. M., Bruss, I. R., Barone, J. R. & Grason, G. M. Morphology selection via geometric frustration in chiral filament bundles. *Nat. Mater.* **15**, 727–732 (2016).
34. Aggeli, A., Nyrkova, I. A., Bell, M., Harding, R., Carrick, L., McLeish, T. C. B., Semenov, A. N. & Boden, N. Hierarchical self-assembly of chiral rod-like molecules as a model for peptide β -sheet tapes, ribbons, fibrils, and fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 11857–11862 (2001).
35. Grason, G. M. Braided bundles and compact coils: The structure and thermodynamics of hexagonally packed chiral filament assemblies. *Phys. Rev.* **79**, 1–15 (2009).

Chapitre 4

Valorisation du projet et contexte socio-économique

4. VALORISATION DU PROJET ET CONTEXTE SOCIO-ÉCONOMIQUE

Ce chapitre a été rédigé suite à l'écriture d'un mémoire pour obtenir le Diplôme Universitaire de Génie Biologique et Médicale (DU.GBM) portant sur la valorisation de la recherche et de l'innovation biomédicale. Il traite donc de la valorisation de ce projet de thèse qui a fait l'objet d'une demande de brevet. On y abordera aussi, à la fois le contexte socio-économique dans lequel ce projet s'inscrit, mais aussi comment s'organise la valorisation de la recherche en France.

4.1. Introduction

Par la valeur du Produit Intérieur Brut (PIB) nominal, la France est aujourd'hui la 6^{ème} puissance mondiale.¹ Si elle est un des pays qui investit le plus dans la recherche (2,26 % de son PIB en 2016),¹ elle est pourtant classée 13^{ème} quant à la qualité de sa recherche scientifique, 6^{ème} ou 7^{ème} en matière de recherche (mesuré en fonction du nombre de publications scientifiques et de citations), et entre la 16^{ème} et 20^{ème} place en matière d'innovation.² Ces quelques chiffres mettent en avant le problème de la France, qui malgré une recherche de haut niveau, reste un « suiveur » dans le domaine de l'innovation et peine à transférer sa recherche vers des applications commerciales de biens ou de produits. Nous allons voir comment ont évolué les politiques visant à améliorer la valorisation de la recherche en France, pour finalement aboutir, aujourd'hui, à un environnement complexe. Nous prendrons l'exemple d'un projet de recherche développé à l'UPMC et en cours de valorisation.

En 1998, un constat est dressé sur la valorisation de la recherche en France. Si des politiques, mettant en valeur la recherche et la technologie, ont été mises en place dans les décennies d'après guerre, ce n'est qu'à la fin des années 90 qu'une véritable politique d'innovation a été mise place. En effet, les dispositifs visant à valoriser la recherche sont alors peu diversifiés et pour la plupart venant directement des ministères. Les financements directs et indirects de la R&D sont alors décroissants ([Figure 4. 1](#)).

La loi de 1999 sur la recherche et l'innovation, dite loi Allègre,³ a été un premier pas vers une politique encourageant la valorisation de la recherche publique. Cette loi permet notamment aux universitaires et aux chercheurs de créer leur entreprise et déposer des brevets, dans le but de briser ce clivage entre la recherche publique et la recherche privée. Parallèlement, le ministère chargé de la recherche lance un appel à projet en mars 1999 qui donnera suite à la naissance des incubateurs. De 1999 à 2008, de nombreux dispositifs destinés à développer la coopération entre les différents acteurs de l'innovation et à valoriser la recherche publique, sont alors créés (incubateurs en 1999, label Carnot en 2006). De nouveaux opérateurs publics en charge de financer la recherche voit le jour (OSEO en 2005, ANR - Agence Nationale de la Recherche - en 2006), et des modifications du CIR (Crédit Impôt Recherche) en 2004 et 2006 incitent fiscalement le développement de la recherche en France.

En dépit de toutes ces mesures, un rapport de l'inspection générale des finances et de l'administration de l'éducation nationale et de la recherche est rendu en 2007 et dresse le constat suivant : la valorisation de la recherche en France ne progresse pas.⁴ En effet, malgré une augmentation du nombre de dépôts de brevet par la recherche publique et une meilleure sensibilisation des chercheurs aux opportunités de valorisation de leur travaux, force est de

constater que les contrats de recherche se concentrent auprès de certains établissements comme le CEA ou les grandes écoles. De plus, les brevets ne servent principalement qu'à la protection et non à la valorisation proprement dite, qui se caractérise par la création d'entreprise, l'établissement de collaborations ou de licences avec le secteur privé.

La R&D privée évolue elle aussi de manière préoccupante ; la faiblesse du nombre de chercheurs dans les entreprises françaises pose le problème de la faible capacité d'absorption des connaissances acquises par la recherche publique. De plus, l'organisation atypique de la recherche publique française, avec la séparation des établissements d'enseignement supérieur, des organismes de recherche, et les grandes écoles, ainsi que la faible autonomie des universités pour développer des politiques de valorisation, complexifie la situation.

Suite à ce constat et après la crise subie en 2008, on assiste à un développement important de nouveaux dispositifs, notamment dans le cadre du programme d'investissement d'avenir mis en place en 2010 et toujours en cours aujourd'hui. Ce programme, doté d'un financement conséquent (57 milliards d'euros en 7 ans), a pour objectif de participer à la relance économique du pays en valorisant l'innovation et notamment en visant à accroître les retombées économiques de la recherche publique. Les IRT (Instituts de Recherche et Technologique), les IHU (Instituts Hospitalo-Universitaire) et les SATT (Société Accélétratrice du Transfert de Technologie) ont alors été créés. Parallèlement, une nouvelle réforme du CIR permet d'augmenter considérablement le poids des incitations fiscales pour la recherche.

Bien que les diverses politiques abordées précédemment ne sont pas exhaustives, on peut néanmoins constater que beaucoup de dispositifs ont été créés, mais peu supprimés. L'environnement socio-économique de la valorisation est-il trop complexe pour être efficace ?

C'est dans ce cadre que le projet de transfection de siRNA via l'utilisation de polymères supramoléculaires, a été valorisé par une demande de brevet déposé en collaboration avec la SATT Lutec.⁵ Nous allons voir dans ce chapitre quels sont les enjeux d'un tel projet et comment il s'inscrit dans le contexte de la valorisation de la recherche en France.

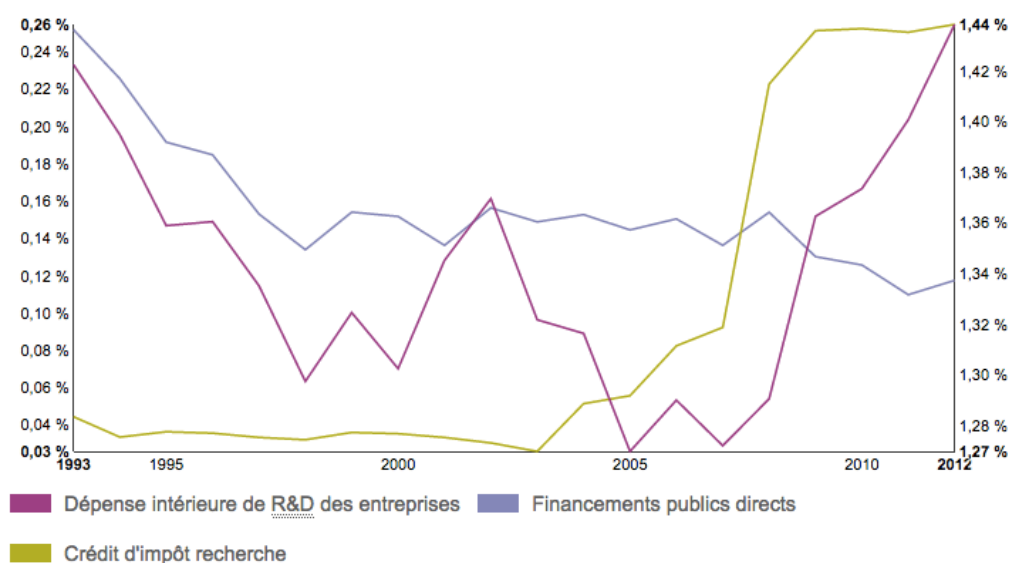


Figure 4. 1: Evolution des financements publics directs et indirects de la R & D des entreprises en % du PIB⁶

4.2. Contexte socio-économique

4.2.1. La thérapie antisens : le besoin de vecteurs sophistiqués

Les acides nucléiques comme les ADN plasmides, les ADN ou ARN antisens ou plus récemment les siRNA (petits brins interférents), ont suscité un vif intérêt parmi les chercheurs pour leur potentiel thérapeutique. De nombreuses études cliniques sont actuellement en cours,⁷ pour le traitement de diverses pathologies, comme les troubles génétiques, les cancers, ou les infections virales.⁸

La thérapie antisens notamment, a été considérée au début des années 2000 comme l'une des approches thérapeutiques les plus intéressantes pour l'avenir, présentant un potentiel presque sans limite.⁹ Cette période, durant laquelle l'intérêt des chercheurs pour l'interférence par ARN a été exponentielle, a notamment été incitée par l'autorisation de mise sur le marché du premier médicament de thérapie antisens en 1998-1999 : le Fomiversen (Vitravene).¹⁰ Ce médicament antiviral est un simple brin d'ADN modifié (afin d'améliorer sa stabilité) composé de 21 nucléotides, administré par injection intraoculaire. Il est indiqué pour le traitement de la rétinite à cytomegalovirus. Il s'en est ensuivi des événements marquants comme l'acquisition par Merck de « siRNA Therapeutics » pour 1,1 milliard de dollars en 2006, mais aussi par le prix Nobel de médecine décerné la même année à Andrew Z. Fire et Craig C. Mello. Ces deux chercheurs américains ont été récompensés pour leur travaux pionniers sur l'interférence par ARN.

L'approche de la thérapie antisens est intéressante pour de nombreuses raisons, comme la spécificité : le gène visé est ciblé de par sa séquence nucléotidique. La thérapie antisens est de plus versatile puisqu'il est aussi bien possible d'augmenter ou de décroître l'expression d'un gène. En effet, bien que le principe de la thérapie antisens consiste à inhiber la traduction d'un ARNm, il est aussi possible d'activer l'expression d'un gène en bloquant par exemple la biosynthèse d'un répresseur naturel.¹¹ Enfin, la production d'oligonucléotides modifiés est aujourd'hui aisée, et les effets secondaires de la thérapie antisens sont limités.

Malheureusement, la frénésie initiale autour de cette nouvelle approche thérapeutique n'a pas abouti aux attentes espérées. En effet la transfection de matériel génétique dans les cellules, s'est révélé être une tâche plus ardue que le laisse présager les résultats très prometteurs obtenus avec le Fomiversen. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, le caractère polyanionique, hydrophile et instable physiologiquement des oligonucléotides nécessite le développement de vecteurs sophistiqués pour permettre leur transfection. Si l'approche de la thérapie antisens n'était alors certainement pas suffisamment comprise, le domaine semble avoir considérablement muri et les paramètres conduisant à des systèmes solides et prometteurs semblent être mieux maîtrisés.⁹ Aujourd'hui, 150 études cliniques de thérapie antisens sont en cours.¹²

4.2.2. Résultats cliniques et étude de la concurrence

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, il existe plusieurs stratégies de thérapie antisens. Les plus avancées sont les suivantes : l'utilisation des oligonucléotides antisens (ASO), et des siRNA.

En ce qui concerne les oligonucléotides antisens, c'est Ionis Pharmaceuticals qui est aujourd'hui l'entreprise pharmaceutique la plus performante dans le domaine. En effet, trois oligonucléotides antisens développés par Ionis Pharmaceuticals ont été mis sur la marché (en plus du Fomiversen dont les droits d'exploitation exclusifs ont expirés) : Mipomersen (Kynamro[®] - 2013), Nusinersen (Spinraza[®] - 2016), Alicaforfen (2017), et quatre projets supplémentaires sont actuellement en phase clinique III. Serepta Therapeutics commercialise actuellement un oligonucléotide antisens dirigé contre la myopathie de Duchenne : Eteplirsén (Exondis 51TM - 2016) et travaille sur deux autres projets actuellement en phase clinique III.

Le processus d'interférence par ARN déclenché par les siRNA est plus efficace que pour les ASO. Pourtant le développement de siRNA en tant que médicament a été plus lent que pour les oligonucléotides antisens classiques. En effet la transfection intracellulaire des ARN double brins est plus difficile.¹³ Les bases nucléotidiques étant au cœur de l'hélice d'un ARN double brin, les siRNA n'exposent que des fonctions phosphates, ce qui les rend particulièrement inadaptés pour la traversée de la barrière cellulaire.¹⁴

Plusieurs méthodes ont alors été mises au point pour développer des médicaments à base de siRNA.¹⁵ Initialement, l'utilisation des vecteurs viraux semblait être une solution très prometteuse. Les virus, de part leur longue évolution, sont particulièrement adaptés pour transférer du matériel génétique dans les cellules. Malheureusement, comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, leur utilisation souffre de nombreux inconvénients.

Ainsi les recherches pour la mise au point de thérapie à base de siRNA se sont concentrées sur les vecteurs synthétiques. De très nombreuses études sont en cours sur le développement de tels vecteurs (nanoparticules, LNP (liposomes), polyplexes, conjugués, siRNA modifiés chimiquement). Alnylam Pharmaceuticals est aujourd'hui la société pharmaceutique la plus avancée dans le domaine. Leur stratégie se concentre essentiellement sur des conjugués siRNA-GalNAc. Les GalNAc (N-Acetylgalactosamine) sont des aminosucres permettant l'internalisation cellulaire. Le premier conjugué développé par Alnylam Pharmaceuticals (Revusiran) n'a malheureusement pas abouti et le projet s'est arrêté en mai 2016 après une phase clinique III non concluante. Quatre autres candidats d'Alnylam Pharmaceuticals sont actuellement en phase III laissant présager que des thérapies à base de siRNA seront bientôt mises sur le marché. Deux autres entreprises pharmaceutiques ont porté des projets jusqu'en phase clinique II ou III : Quark Pharmaceuticals et Arbutus Biopharma. Enfin Dicerna Pharmaceuticals et Arrowhead Pharmaceuticals travaillent sur la mise au point de nombreux candidats prometteurs actuellement en phase préclinique.

Tableau 4. 1 : Candidats de médicament à base de siRNA actuellement en phase clinique II ou III

SOCIÉTÉ	MÉDICAMENT	FORMULATION OU CONJUGAISON	MALADIE CIBLÉE	PHASE CLINIQUE
Alnylam Pharmaceuticals	Revusiran (ALN-TTRsc)	Conjugué GalNAc	Amylose de la transthyréline	Arrêtée en phase III (05/16)
Alnylam Pharmaceuticals	Patisiran	LNP	Amylose de la transthyréline	Phase III
Alnylam Pharmaceuticals	Inclisiran	Conjugué GalNAc	Hypercholestérolémie	Phase III
Alnylam Pharmaceuticals	Fitusiran	Conjugué GalNAc	Hémophilie et maladies rares du sang	Phase III
Alnylam Pharmaceuticals	Givosiran	Conjugué GalNAc	Porphyrie hépatique	Phase III
Quark Pharmaceuticals	QPI-1002	siRNA modifiés nus (Injection intraveineuse)	Rejets de greffes du rein & autres dysfonctionnement rénal	Phase III & Phase II
Quark Pharmaceuticals	PF-655	siRNA modifiés nus (Injection intraveineuse)	Œdème maculaire diabétique & DMLA (Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age)	Phase II & Phase II
Arbutus Biopharma	ARB-1467	LNP	Hépatite B chronique	Phase II

Ainsi, nous devrions voir apparaître dans les prochaines années les premiers médicaments à base de siRNA. Cette nouvelle approche thérapeutique est très prometteuse notamment du fait qu'elle puisse être théoriquement appliquée à des pathologies très diverses : maladies génétiques, cardiovasculaires, rénales, infections virales, cancers, etc. Cette thérapie offre la possibilité de traiter des maladies jusque là restée incurable. Néanmoins, de part les nombreuses maladies potentiellement traitables et donc les différents modes d'administration, formulation etc. que cela implique, il y a aujourd'hui une réelle nécessité de développer plusieurs méthodes de transfection de siRNA, et d'élaborer des vecteurs variés et sophistiqués.

4.2.3. Placement du projet

Dans ce contexte, nous nous sommes attachés au développement d'un nouveau système innovant qui pourrait compléter les différentes stratégies pour l'élaboration d'agent de transfection de siRNA. Bien que notre système soit encore aujourd'hui très loin d'une application *in vivo*, il présente l'avantage d'aborder le problème de la transfection selon une nouvelle approche. L'élaboration de virus artificiels, présentant les mêmes caractéristiques dynamiques structurelles, mais ne déclenchant pas de toxicité inacceptable, est certainement une solution très prometteuse. Nous avons ainsi montré que nous pouvions former des espèces définies, organisées de manière coopérative et hiérarchique entre les siRNA et les oligomères de cyclodextrines, rappelant en tout point la structure, la taille et la fonction d'un virus de type tubulaire comme le TMV (virus de la mosaïque du tabac).

4.3. Démarche actuelle de valorisation

Afin de comprendre dans quel contexte s'inscrit ce projet en cours de valorisation, nous allons tout d'abord établir un sociogramme des différents acteurs du transfert de technologie en France. De très nombreuses institutions, sociétés et autres cabinets de conseil interagissent entre eux afin de permettre à un projet naissant de devenir suffisamment mature pour être introduit dans le secteur industriel. Certains de ces acteurs ont des rôles qui parfois se recoupent et il est parfois compliqué de comprendre celui de chacun. Il est pourtant essentiel de bien savoir la place de ces acteurs pour se tourner vers les bonnes personnes lorsqu'il s'agit de valoriser son propre projet de recherche.

4.3.1. Sociogramme du transfert de technologie et de l'innovation en France

4.3.1.1. Cellules de valorisation internes aux universités

Les propos rapportés ici font suite à un entretien avec Elena Billi-Rizza, responsable du bureau entreprises et transfert de technologie au sein de la DGRIT (Direction générale de la recherche et du transfert de technologie) de l'UPMC.

Les cellules de valorisation internes aux universités s'occupent logiquement des laboratoires qui sont accueillis au sein de celles-ci. Néanmoins, ces laboratoires ne sont pas toujours affiliés aux universités. En effet, il existe un grand nombre de tutelles et de nombreux laboratoires affiliés à d'autres institutions (Inserm, CNRS, etc.). Nous allons voir ici comment intervient la DGRIT dans le processus de valorisation d'un projet provenant d'un laboratoire de l'UPMC.

La première étape se fait *via* la rédaction auprès de la DGRIT d'une déclaration d'invention. Ensuite, la viabilité du projet sera analysée et une étude de brevetabilité sera réalisée. Les antécédents en matière de propriété intellectuelle seront alors éventuellement repérés par un ingénieur brevet de la DGRIT. Enfin, le transfert de technologie sera réalisé par une société extérieure à l'UPMC. Pour les laboratoires affiliés à l'Inserm, il s'agira d'Inserm transfert ; pour les laboratoires affiliés au CNRS, il s'agira du FIST (France Innovation Scientifique et Transfert) et enfin, pour ceux affiliés à l'UPMC, le transfert sera réalisé par la SATT Lutech. Bien entendu, il arrive que certains projets soient développés par plusieurs laboratoires, avec différentes affiliations. C'est pourquoi il est essentiel qu'une bonne communication ait lieu entre les différents acteurs pour une bonne répartition des tâches. La DGRIT rencontre, par exemple, des responsables de la SATT Lutech de manière hebdomadaire, pour avoir un regard sur l'avancement du transfert des projets en cours et pour transmettre les nouvelles déclarations d'invention.

Avant la création des SATT, la DGRIT était l'unique responsable du transfert des projets soumis par les laboratoires qui étaient affiliés à l'UPMC. Désormais, elle délègue la partie transfert et maturation aux SATT. Ainsi, une réorganisation de la DGRIT a eu lieu, rassemblant plusieurs thématiques (entreprises, transferts et Europe) au sein d'un même bureau. La DGRIT est ainsi l'interlocuteur privilégié des laboratoires pour ce qui est de l'établissement et le suivi de contrat avec les entreprises ou pour la mise en place de projets européens. Enfin, un rassemblement des différentes DGRIT de l'UPMC et de Paris-Sorbonne aura lieu suite à la fusion de Sorbonne université.

4.3.1.2. *Sociétés Accélératrices du Transfert de Technologies (SATT)*

Les SATT ont été créées suite au programme d'investissement d'avenir mis en place en 2010. Quatorze SATT ont été créées en plusieurs vagues à partir de 2012. Le but de ces sociétés est de faire le pont entre la recherche publique au niveau local et le secteur privé. Plus concrètement, cela consiste à transformer une invention, résultats de la recherche publique, en innovation pouvant être utilisée par l'industrie pour créer de nouveaux produits ou services. Les SATT sont réparties dans l'objectif de couvrir l'ensemble du territoire français, même si certaines régions ne sont pas encore couvertes. Le choix a été pris de privilégier un morcellement géographique des SATT plutôt que par domaine de recherche. En effet, après en avoir discuté avec différents interlocuteurs sur les raisons de ce choix, celui-ci s'explique par le besoin d'être en contact direct avec les chercheurs, et donc de pouvoir se déplacer pour établir de bonnes relations avec eux. Ainsi, chaque SATT doit être pluridisciplinaire et ne peut développer une spécialité propre.

Les SATT constituent donc un réseau visant à valoriser la recherche de 160 établissements membres. La création des SATT avait pour but principal de limiter l'éparpillement des activités de valorisation au sein des différents établissements de la recherche publique, et donc de mutualiser les différents opérateurs de valorisation pour simplifier le paysage du transfert de technologie. Nous verrons par la suite, qu'il existe néanmoins toujours aujourd'hui des cellules de valorisation qui se recoupent avec les SATT. Le deuxième objectif de ces sociétés est de détecter les inventions à fort potentiel industriel et d'accompagner les équipes de recherche dans les démarches de protection intellectuelle, jusqu'à la maturation du projet. L'objectif d'un programme de maturation est de palier au « gap » entre le niveau de maturité technologique en sortie du laboratoire de recherche et celui nécessaire pour le transfert vers une entreprise déjà existante ou une start-up.

Les SATT sont des SAS (société par actions simplifiées) qui sont néanmoins détenues à 33% par l'état et 67% par les établissements publics de recherche. Elles sont dotées d'un capital public d'un million d'euros chacune, auquel s'ajoutent les 856 millions d'euros répartis sur 10 ans pour l'ensemble du réseau SATT. Ces fonds proviennent du programme d'investissement d'avenir, piloté par le CGI (Commissariat Général à l'Investissement) sous la direction directe du premier ministre. Ces fonds servent dans un premier temps à financer la protection intellectuelle des projets, essentielle à un éventuel transfert ; ils servent dans un second temps à la maturation des projets qui peuvent bénéficier d'enveloppes plus au moins importantes en fonction des besoins. Il est important de noter que même si les brevets sont financés par les SATT, ils restent la propriété des établissements de la recherche publique (Universités, CNRS etc.). Néanmoins, en cas de vente du brevet, ou d'établissement d'une licence, une partie des revenus perçus sont redistribués à la SATT dans un objectif d'autofinancement.

Les SATT sont indépendantes entre elles et chacune d'elle a son propre mode de fonctionnement. Nous prendrons ici pour exemple celui de la SATT Lutech. Créée en mars 2012, cette société de 35 collaborateurs travaille à valoriser la recherche de 8 de ses 9 actionnaires (UPMC, CNRS, UTC, MNHN, Institut Curie, Université Panthéon-Assas, Université Paris Sorbonne, ENSCI), le dernier actionnaire étant la caisse des dépôts.

La SATT Lutech fonctionne par équipe de 5 personnes pour l'accompagnement d'un projet. L'ingénieur brevet s'occupe de la partie propriété intellectuelle et du suivi du dépôt de brevet. Néanmoins, la rédaction des brevets se fait généralement en externe par des cabinets d'avocats spécialisés. Le juriste, s'occupe de la partie juridique, aussi bien en ce qui concerne la propriété intellectuelle, la contractualisation et l'établissement des licences. Le rôle de l'ingénieur d'affaires est d'analyser la technologie à transférer, appréhender les opportunités de transfert, négocier les licences et en assurer le suivi. Le chargé d'affaires ou « business developer » s'occupe principalement de la promotion commerciale des inventions, de l'évaluation du potentiel et des risques économiques de celles-ci. Enfin, le chef de projet s'occupe de coordonner le travail de l'ensemble des membres et suit à tous les niveaux l'avancement du projet. Il s'occupe aussi en partie du sourcing « détection de l'innovation ». Même si la SATT Lutech fonctionne sur un système d'appel à projets, dans lequel les chercheurs eux-mêmes proposent des projets à valoriser *via* une déclaration d'invention transmise à la DGRIT, le rôle du chef de projet est d'entretenir de bonnes relations avec les chercheurs et de détecter et analyser les innovations prometteuses. Enfin, c'est au chef de projet qu'il revient de monter les programmes de maturation.

4.3.1.3. Inserm transfert

A l'image de certaines universités, qui ont choisi de déléguer la valorisation de leur recherche à une filiale privée, l'Inserm a créé l'Inserm transfert qui est, depuis 2006, l'unique mandataire à cette tâche. Depuis sa création, le nombre de brevets déposés par Inserm transfert a presque quadruplé. Les objectifs d'Inserm transfert sont similaires à ceux d'une SATT, qui est d'une part, le « sourcing » via la rencontre régulière des chercheurs et d'autre part l'accompagnement des projets en finançant la maturation à l'aide du fond d'amorçage Inserm Transfert Initiative allant de 3 000 à 300 000 euros, mais aussi *via* la mise en relation des chercheurs avec les incubateurs. Une grande partie du travail d'Inserm transfert consiste aussi en la négociation et la gestion des accords de licences. Inserm transfert qui compte aujourd'hui environ 90 employés, avec un budget annuel de 11,5 millions d'euros, réussit à s'autofinancer depuis 2011.

4.3.1.4. Valorisation au sein du CNRS

Le CNRS est un acteur incontournable de la recherche et de l'innovation en France. Cet organisme public est aujourd'hui le sixième plus grand déposant de brevets en France avec 373 brevets publiés en 2016.¹⁶ La valorisation de la recherche du CNRS est aujourd'hui un enjeu primordial, avec plus de 2000 contrats établis avec des industriels, 4500 familles de brevets, et plus de 1000 entreprises créées depuis 1999 issues du CNRS. Elle se répartit entre plusieurs acteurs. Le pilotage de la stratégie de valorisation de la recherche issue des laboratoires du CNRS, se fait depuis le siège du CNRS par la direction de l'innovation et des relations avec les entreprises (DIRE). Le siège est aussi responsable des relations avec les entreprises, et de la coordination des différents acteurs (délégations régionales, FIST (France Innovation Scientifique et Transfert), SATT). Au niveau régional, les services du partenariat et de la valorisation sont principalement responsables de la négociation des partenariats de recherche avec les industriels. Deux types de partenariats existent, la création de laboratoires communs et les contrats de collaboration de recherche. Ces services sont aussi responsables de la détection de l'innovation, et de l'élaboration de projets de transfert qu'ils peuvent ensuite transmettre au FIST.

FIST est une société anonyme créée en 1992, filiale privée du CNRS et responsable de la valorisation de la recherche du CNRS. Cette filiale s'est considérablement développée depuis et compte actuellement 49 salariés. La FIST est détenue à 70 % par le CNRS et 30 % par BPI France (Banque Publique d'Investissement). Cette filiale a pour objectif la gestion du portefeuille de brevet du CNRS, l'analyse technico-économique des projets et l'établissement de licences. FIST travaille conjointement avec les SATT, dont le travail est relativement similaire, même si ces dernières possèdent des enveloppes destinées à la maturation qui permettent en plus, d'amener les projets jusqu'à un stade de maturité suffisant.

4.3.1.5. Centres Régionaux d'innovation et de transfert de technologie (CRITT)

Les CRITT ont été créés dans les années 1980. Ils ont pour but de regrouper localement les acteurs du secteur privé et de la recherche publique dans un domaine donné. D'une part, ces structures tentent d'apporter une expertise scientifique et technologique aux PME qui n'ont pas les ressources nécessaires pour avoir un centre de R&D, dans l'objectif de promouvoir leur développement et leur potentiel d'innovation ; d'autre part, elles permettent de favoriser le transfert de technologie développé par la recherche publique vers les PME.

Trois labels existent pour caractériser ces structures :

- P.F.T (Plate-Forme Technologique). Organisation visant à soutenir les entreprises via des établissements d'enseignement
- C.D.T (Cellule de Diffusion Technologique). Structure ayant pour mission la mise en relation des entreprises, centres de compétences, établissement de recherche publique. Ces structures ne possèdent pas de moyens technologiques contrairement au C.R.T.
- C.R.T (Centre de Ressources Technologiques). Structure accompagnant les entreprises dans une dimension technique et technologique dans le but de les insérer dans l'écosystème de l'innovation.

4.3.1.6. Pôles de compétitivité

Inspirés des zones de regroupement de start-up aux Etats-Unis (Californie, Boston), les pôles de compétitivité sont définis par la loi de finance de 2005 comme étant « le regroupement sur un même territoire, d'entreprises, d'établissements d'enseignement supérieur et d'organismes de recherche publique ou privée, qui ont vocation à travailler en synergie pour mettre en œuvre des projets de développement économique pour l'innovation ». L'objectif de ces pôles est de rendre l'économie plus compétitive, de créer des emplois et de faire collaborer la recherche publique et privée. Un pôle de compétitivité prend du sens lorsqu'il fait vivre un tissu industriel dans un domaine particulier. Profitant de subventions publiques et d'un régime fiscal avantageux, les pôles de compétitivité incitent donc au rassemblement de différents acteurs de la recherche d'un domaine défini. Ils permettent de mieux exploiter les relations de proximité afin de tisser des réseaux et former de véritables écosystèmes de croissance visant à rayonner internationalement. Suite au programme d'investissement d'avenir de 2010, les Instituts de Recherche Technologique (IRT) ont été créés au sein des pôles de compétitivités avec un objectif semblable : rassembler la recherche publique et privée, mais en s'axant sur des domaines définis plus pointus et plus prospectifs. Il existe aujourd'hui 71 pôles de compétitivité en France, dont 8 auquel un IRT est rattaché. L'intérêt d'un pôle de compétitivité se retrouve dans l'adhésion de ses membres. Il se doit donc de créer la discussion entre les acteurs et de donner l'envie d'y participer.

4.3.1.7. Instituts Carnot

Le label Carnot a été créé en 2006 et est attribué pour une période de 5 ans à une structure de recherche publique qui mène, d'un côté, une recherche fondamentale visant à garantir l'excellence scientifique de cette structure mais aussi, une politique de valorisation en mettant en place des partenariats avec le secteur privé. Les structures se voyant délivrer le label Carnot, profitent de financements de l'Agence Nationale de la Recherche. Ainsi ce label a pour vocation d'encourager la recherche partenariale entre le secteur public et privé. Les laboratoires labélisés Carnot sont excellents dans leur domaine et leur objectif est d'être acteur dans l'établissement de collaborations avec les industriels. On peut citer parmi ces instituts l'ICM (institut du cerveau et de la moelle épinière), l'institut Curie, ou l'institut Pasteur.

4.3.1.8. Incubateurs

Les incubateurs ont été créés en 1999, parallèlement à la loi sur la recherche et l'innovation, dite loi Allègre, suite à un appel à projets lancé par le ministère chargé de la recherche. Ce sont des lieux accueillants les porteurs de projets innovants, généralement en lien avec la recherche publique ou avec les grandes écoles et les accompagnant dans leurs démarches. Les incubateurs sont situés à proximité d'un site scientifique permettant de favoriser les interactions avec les chercheurs de ce site et de profiter de nombreuses ressources. Les incubateurs sont à but non lucratif, liés à des organismes publics et sont destinés à aider, contrairement aux pépinières d'entreprises, des sociétés très jeunes ou encore en création. On compte aujourd'hui 31 incubateurs en France.

4.3.1.9. Pépinières d'entreprises

Dans la même démarche que les incubateurs, les pépinières d'entreprises sont destinées à faciliter leur création, en leur apportant structures, moyens techniques et technologiques et conseils. Ces lieux permettent aussi de rassembler les start-up, favorisant les interactions et dynamisant l'innovation. Il en existe aujourd'hui environ 230 en France.

4.3.1.10. Sociétés de Recherche Contractuelle

Une SRC est une entreprise qui, sur une base contractuelle, fournit certains services de recherche particulièrement dans le domaine de l'industrie pharmaceutique mais aussi pour la recherche publique. On retrouve ce type d'entreprise notamment pour les études précliniques, cliniques, de pharmacovigilance et la conduite de travaux de recherche.

4.3.1.11. Alliances Thématiques de Recherche

Les alliances thématiques de recherche sont chargées de rassembler les différentes institutions de la recherche publique afin de les coordonner dans un domaine bien défini, en lien avec les priorités actuelles de recherche et développement données par le ministère chargé de la Recherche et l'Agence Nationale de la Recherche (ANR). Il en existe actuellement cinq, créées entre 2009 et 2010 : AVIESAN (Alliance Nationale pour les Sciences de la Vie et de la Santé), ANCRE (Alliance Nationale de Coordination de la Recherche pour l'Energie), ALLISTENE (Alliance de Sciences et Technologies du Numérique), ALLENI (Alliance Nationale de Recherche pour l'Environnement), ATHENA (Alliance Nationale des Sciences Humaines et Sociales). Leur objectif peut s'apparenter à celui des pôles de compétitivité. Il s'agit de réunir

autour d'une table les différents acteurs (publics uniquement cette fois ci) pour les faire discuter et interagir entre eux, et permettre l'établissement par exemple d'appels à projets.

4.3.1.12. Sociétés de conseil

La complexité de l'environnement de l'innovation et de l'entrepreneuriat et plus généralement, de la recherche en France, a entraîné le développement de nombreuses sociétés de conseil. Spécialisées dans leur domaine, elles s'adaptent à l'évolution politique et économique pour proposer des prestations aidant les différents acteurs présentés ci-dessus. On peut distinguer trois types de sociétés de conseil en innovation :

Conseil en financement de l'innovation : ces sociétés ont profité essentiellement des différentes réformes sur le CIR et ont développé une expertise dans le domaine, permettant d'aider tout type d'entreprise à déduire fiscalement ses investissements en R&D. Certaines, aident aussi les start-up et petites entreprises à passer les concours permettant d'obtenir d'autres types de financement. On peut se poser la question de la pertinence d'un CIR tellement complexe que les entreprises préfèrent passer par une société de conseil pour mieux en profiter. Ainsi les fonds investis par l'état dans le CIR servent en partie à payer ces consultants plutôt que la recherche même. De plus, ces sociétés de conseil sont rentables principalement grâce aux contrats passés avec les grandes entreprises qui profitent alors plus du CIR que les PME.

Conseil en propriété intellectuelle : ces sociétés proposent, quant à elles, de conseiller les entreprises sur leur stratégie en propriété intellectuelle, mais aussi dans la rédaction de brevets ou de leurs extensions. Sous traiter un dossier à un tel cabinet présente aussi l'avantage de donner du poids à celui-ci. Par exemple, s'il s'agit de vendre un brevet, le faire analyser par une telle société permettra de rassurer l'investisseur quant à la viabilité et à la solidité de la propriété intellectuelle.

Conseil en management stratégique de l'innovation : ces sociétés plus généralistes aident les entreprises dans la détection d'innovation, mais aussi dans le financement, le développement, et le transfert de technologie. Elles peuvent être amenées à travailler avec tous les acteurs cités ci-dessus. Généralement, leur travail consistera à découper, analyser et répondre à une question posée sur l'innovation.

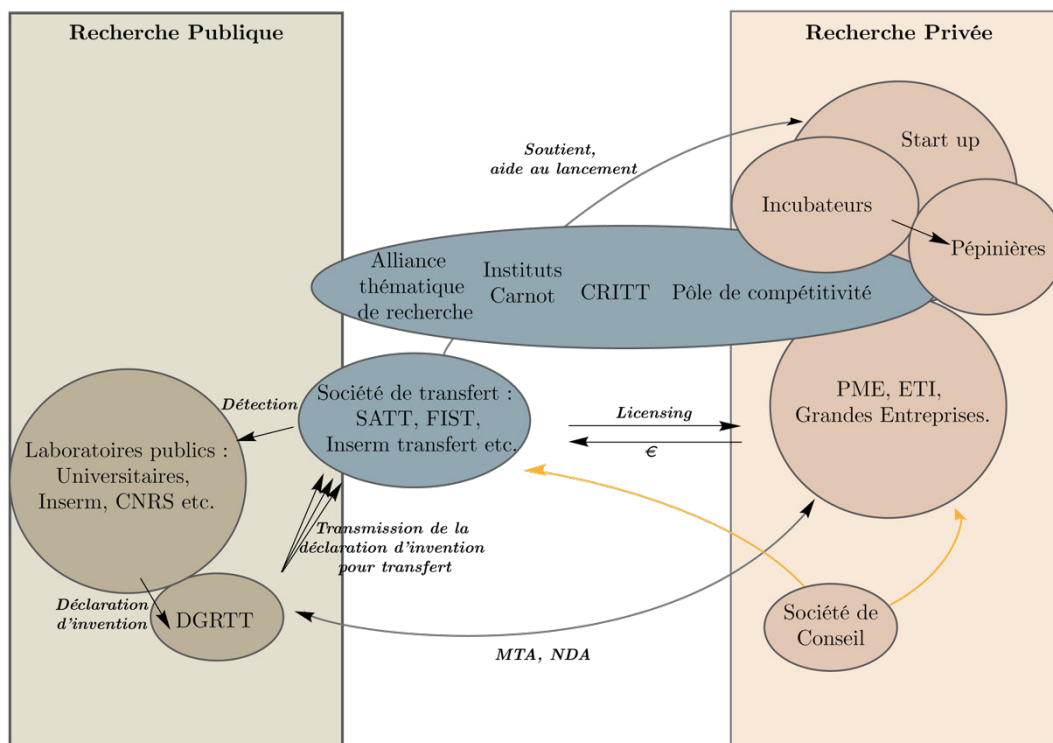


Figure 4. 2 : Représentation simplifiée du sociogramme de la valorisation de la recherche en France. Les MTA (accord de transfert de matériel), et NDA (accord de non divulgation) seront décrits *vide infra*.

4.3.2. Stratégie en propriété intellectuelle : analyse de la demande de brevet.

Durant l'année universitaire 2014/2015, notre équipe de recherche s'est employée à synthétiser les vecteurs de siRNA abordés dans les précédents chapitres, puis à caractériser l'assemblage des polymères supramoléculaires et enfin à expérimenter leur aptitude en transfection. Au début de l'année universitaire 2015, une déclaration d'invention a été rédigée par notre équipe et a été transmise à la DGRITT de l'UPMC en décembre 2015. Le deuxième semestre de l'année universitaire 2015/2016 a été consacré à la rédaction du brevet faisant alors intervenir trois acteurs :

- Notre équipe de recherche a eu pour rôle de communiquer les résultats obtenus aux deux autres parties, afin de compléter la demande d'invention, et de répondre aux différentes questions scientifiques pour permettre une bonne rédaction du brevet. Un véritable travail de relecture a aussi été effectué, afin de corriger les erreurs que notre expertise scientifique permettait de repérer.
- Le cabinet de conseil en propriété intellectuelle Gevers & Ores s'est occupé de la rédaction du brevet. En effet, l'écriture d'un brevet demande une certaine expertise dans le domaine de la propriété intellectuelle et ne pouvait être réalisée par des membres de notre équipe. Tout d'abord, le cabinet s'est occupé de la traduction de la demande d'invention, puis après nous avoir rencontré, a rendu une première version du brevet.
- La SATT Lutech s'est occupé de faire le lien entre le cabinet Gevers & Ores et notre équipe de recherche. Le rôle a notamment été essentiel durant la phase de relecture durant laquelle de nombreux échanges entre le cabinet et notre équipe ont eu lieu. Ce sont aussi eux qui ont défini la stratégie de propriété intellectuelle à mettre en place.

Pour qu'un brevet soit accepté, l'invention qu'il décrit doit respecter trois critères :

- L'invention doit être nouvelle. Ce critère est absolu. Il est indispensable qu'il n'existe absolument aucun document ayant été rendu public décrivant l'invention à protéger. L'invention ne doit pas non plus avoir été divulguée à l'oral publiquement.
- L'invention doit présenter un caractère inventif. Autrement dit, est-ce qu'un homme du métier, par exemple un chercheur ayant une expertise en chimie supramoléculaire, aurait pu logiquement y penser ? Des polymères supramoléculaires à base de cyclodextrines existent déjà, et permettent la transfection de siRNA. Comment était-il alors possible de protéger notre invention ? Le caractère inventif de notre recherche réside dans le pontage des cyclodextrines. Si le problème de l'auto-inclusion était décrit, la solution que nous y apportons est nouvelle et donc inventive. Elle permet de résoudre un problème technique et ouvre de nouvelles opportunités, notamment pour l'établissement de polymères polycationiques présentant une capacité de transfection.
- L'invention doit être suffisamment décrite dans le brevet. Un brevet se décompose en deux parties. Dans la première d'entre elles, un état de l'art mettant en avant la nouveauté et l'inventivité de notre système a été établi. Puis la méthode pour synthétiser et former nos polymères a été décrite.

L'apport du pontage a été mis en valeur et l'aptitude de notre système à transférer des cellules avec des siRNA a aussi été décrite. Dans une deuxième partie appelée « réclamations », l'ensemble des molécules a été protégé, ainsi que la méthode pour les synthétiser, pour former les polymères supramoléculaires et pour transférer des cellules avec notre système.

Concernant ce projet, la demande de brevet a été déposée auprès d'une administration spécialisée couramment désignée sous le terme « Office », en l'occurrence l'Office Européen des Brevets (OEB), le 5 septembre 2016.

De manière générale, la première action réalisée par l'Office devant lequel la demande de brevet est déposée, consiste à établir une recherche bibliographique permettant d'évaluer la nouveauté et l'activité inventive de l'invention dont la protection est recherchée. En fonction de l'Office devant lequel l'invention est déposée, cette recherche peut être réalisée par exemple par l'USPTO (United States Patent and Trademark Office) ou le JPO (Japan Patent Office) ou l'INPI (Institut National de la Propriété Industrielle). Ce rapport de recherche est établi environ 6 à 9 mois après le dépôt et est accompagné d'un avis préliminaire sur la brevetabilité de l'invention. Selon ce premier avis, le déposant peut retirer sa demande de brevet avant publication ou bien choisir de la maintenir, voire d'étendre la recherche de protection à l'international.

En effet, les brevets ont un effet national, c'est-à-dire un effet uniquement dans le pays de l'Office par lequel ils sont délivrés. Il faut donc déposer une demande de brevet dans chacun des pays dans lesquels une protection est recherchée. A cet égard, différents mécanismes d'extension peuvent être utilisés, seuls ou en combinaison. Tous ces mécanismes reposent sur le droit de priorité, prévu par la Convention de Paris (1883). Selon ce traité, le dépôt d'une demande de brevet donne naissance à un droit de priorité de 12 mois permettant d'étendre la demande de brevet tout en conservant le bénéfice de la date de dépôt de la première demande déposée (dite « date de priorité »). En particulier, l'extension peut être réalisée par :

- des dépôts nationaux directs dans chaque pays où une protection est envisagée,
- des dépôts régionaux, tels le Brevet Européen, assurant une procédure d'examen et de délivrance centralisée pour un groupe d'états (par exemple les pays membres de la Convention sur la délivrance de brevets européens), et/ou
- un dépôt international (demande PCT) désignant, à titre conservatoire, un nombre important de pays et permettant de reporter à une date ultérieure les dépôts nationaux ou régionaux ci-dessus.

Le choix de l'un ou plusieurs de ces mécanismes d'extension peut dépendre par exemple de la zone géographique à couvrir, de l'importance et/ou du stade de développement de l'invention concernée, ou encore de contraintes financières.

Enfin, si de nouveaux résultats expérimentaux sont disponibles, ou si des modes de réalisation particuliers ou des applications nouvelles sont envisagés, il est encore possible de le décrire dans le texte de ces demandes de brevet dites « d'extension ». Il est difficile de fournir des résultats supplémentaires passé le délai de priorité. En tout cas, le fait que ces résultats supplémentaires soient pris en compte par l'Office est à la discrétion du fonctionnaire en charge de l'instruction du dossier.

En ce qui concerne notre demande de brevet, celle-ci a été déposée le 5 septembre 2016, le délai pour bénéficier du droit de priorité expirera donc le 5 septembre 2017. En mars 2018, soit 18 mois après le premier dépôt, la demande de brevet sera publiée et rendue publique. Dans le cas où la demande prioritaire est étendue par une demande PCT, un second rapport de recherche (dit « rapport de recherche internationale » abrégé RRI) est rendu. Lorsque le déposant réside en Europe, c'est l'Office Européen qui établit ce deuxième rapport dans la majorité des cas pour le compte de l'OMPI (Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle). Ce RRI est souvent similaire au premier si le brevet avait été directement déposé auprès de cet office. Ensuite, environ 30 mois après le dépôt de la demande prioritaire (ce qui correspond à 18 mois après le dépôt de la demande PCT), le déposant doit effectuer des procédures de validation devant les Offices devant lesquels il souhaite voir sa demande de brevet être examinée. En pratique, cet événement de procédure est désigné sous le terme « d'entrée en phase nationale/régionale ». Ainsi, la même invention va subir un examen devant chacun des pays dans lequel la demande internationale est entrée en phase nationale/régionale. Autrement dit, dans chacun des pays concernés, une procédure d'examen est ouverte. L'examen s'appuie sur le rapport de recherche et sur l'avis préliminaire quant à la brevetabilité. Il n'est pas rare qu'un examinateur ait une opinion différente de celle qui a été donnée dans l'avis préliminaire quant à la brevetabilité. Ainsi, la procédure d'Examen d'une invention varie d'un pays à l'autre, par exemple en raison de droits des brevets différents selon les pays, et peut aboutir à des décisions différentes. Il est ainsi possible que pour la même invention, un brevet soit obtenu dans un pays, mais pas dans un autre.

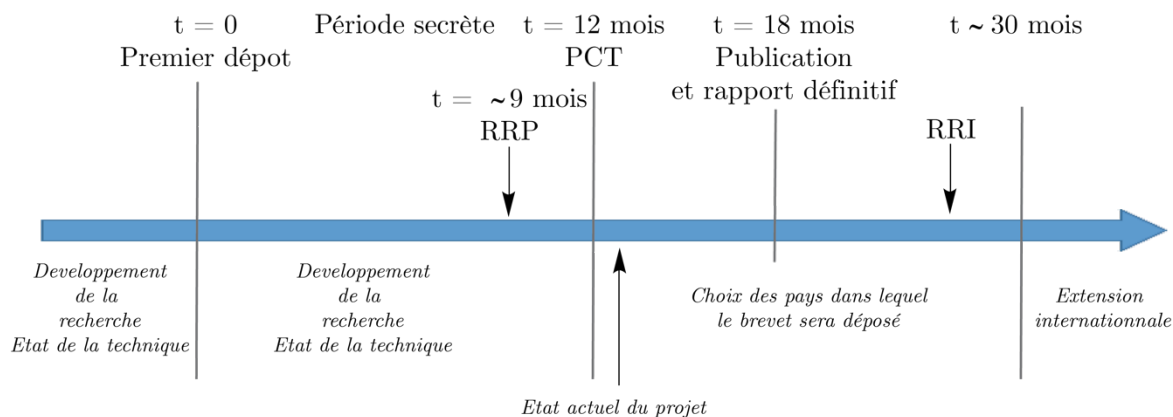


Figure 4. 3 : Les différentes phases de dépôt d'un brevet

4.4. Phases de développement : du laboratoire à l'industrie

4.4.1. Maturation potentielle du projet

Aucun programme de maturation n'est actuellement en cours sur ce projet. Néanmoins, nous allons voir brièvement comment un programme de maturation s'organise au sein d'une SATT.

Un programme de maturation se met en place quand il reste des étapes de validation à effectuer sur un projet avant de pouvoir le transférer vers un industriel ou permettre le lancement d'une start-up. Par exemple : des tests *in vivo*, des formulations précoces, des tests de toxicité, des screening de molécules pour identification d'un « lead ». Pour un projet biomédical, l'idée est d'avancer au maximum la phase préclinique afin de minimiser les risques.

Le dossier de financement comporte une partie étude de marché, très importante, qui permet de positionner le futur produit parmi ceux existants ou en cours de développement (concurrents), de combler un vide thérapeutique ou d'apporter une nouvelle solution. Par exemple, il s'agirait dans notre cas de montrer que notre agent de transfection de siRNA présente bien de réels avantages comparés aux vecteurs viraux et/ou polyplexes et qu'il peut s'inscrire dans ce contexte en tant que nouvelle approche thérapeutique efficace. Ce rapport comporte aussi une partie sur le produit et les résultats associés, le projet de transfert (start-up ou licence à un industriel existant) et les étapes du programme de maturation avec leur planning détaillé et les coûts correspondants. Chaque programme fait l'objet d'une expertise par un professionnel qualifié afin de vérifier la cohérence du projet par rapport aux besoins du marché.

Les enveloppes délivrables par une SATT sont très variables suivant les projets et le travail qu'il reste à effectuer. Les plus petites enveloppes sont de l'ordre de 50 000 € si s'agit juste de maintenir des frais de brevet, mais elles peuvent monter jusqu'à 600 000 € si par exemple une étude préclinique est à effectuer. Cependant l'investissement est sécurisé par des étapes régulière de « go/no go » afin encore une fois de minimiser les risques d'investissement.

Généralement, un programme de maturation commence lorsqu'un brevet a déjà été déposé (afin de sécuriser l'investissement). Cependant des fonds peuvent être débloqués s'il y a un besoin de données complémentaires pour permettre le dépôt d'un brevet. Il est aussi possible de mettre en place des programmes de maturation sur des molécules déjà protégées mais dans le but de démontrer une nouvelle application de celles-ci afin de déposer un brevet d'application.

La maturation d'un projet peut se faire en interne ou en externe (co-maturation). Dans le cas d'une maturation au sein du laboratoire public de recherche, l'enveloppe peut être allouée pour l'embauche d'un post-doc par exemple, ou pour des frais de fonctionnement de laboratoire. Cette enveloppe doit être néanmoins destinée uniquement à la maturation du projet pour laquelle elle a été allouée.

4.4.2. Prospection : comment élaborer une fiche technologique et prendre contact avec des industriels

Lorsqu'un projet est pris en charge par une SATT afin d'être transféré, il s'agit aussi de prendre contact avec les industriels potentiellement intéressés et de vendre la technologie développée. Pour cela, une étude de marché préliminaire est ainsi réalisée par la SATT au moment de la déclaration d'invention afin d'évaluer son potentiel de transfert. Cette analyse consiste surtout à s'assurer qu'il y a bien un besoin sur le marché, ainsi qu'à identifier la concurrence et les différents acteurs impliqués. Une étude de marché plus poussée sera réalisée à la fin de l'étape de prématuration, s'il est question de débloquer des enveloppes supérieures à 75 000 €. Cette étude de marché doit alors être validée par le comité d'investissement de la SATT.

Afin de prendre contact avec des industriels, il existe deux moyens :

- La présence sur des salons ou des événements de « matchmaking » ce qui permet de rencontrer directement les industriels et de leur présenter la technologie.
- L'envoi par mail de la fiche technologique à une liste d'entreprises ciblées.

La fiche technologique en question est basée sur la déclaration d'invention, et la brève étude de marché réalisée à ce moment là. Elle doit être validée par l'ingénieur en propriété intellectuelle de la SATT et l'inventeur. La fiche technologique du projet abordé dans cette thèse est présentée en [Figure 4. 4](#).

Cette fiche est décomposée en plusieurs parties. Tout d'abord, un bref paragraphe résume le contexte socio-économique dans lequel s'inscrit le projet et les défis à relever pour atteindre le marché. L'application potentielle de la technologie et l'état de développement du projet sont ensuite décrits. La fiche technologique met ensuite en avant la manière dont la technologie développée se distingue de celles déjà existantes en présentant ses avantages. Enfin les droits en propriété intellectuelle sont précisés.

On peut constater que ce type de fiche est très succinct. Il est difficile de se rendre compte de quoi est réellement composée cette technologie juste en la lisant. Le but est de maintenir le secret sur l'invention, et aussi d'attirer l'industriel pour permettre par la suite une éventuelle discussion avec lui afin de vendre la technologie, de le pousser à investir pour un éventuel programme de co-maturation, ou mettre en place une collaboration. Ces différentes possibilités nécessiteront alors une contractualisation.

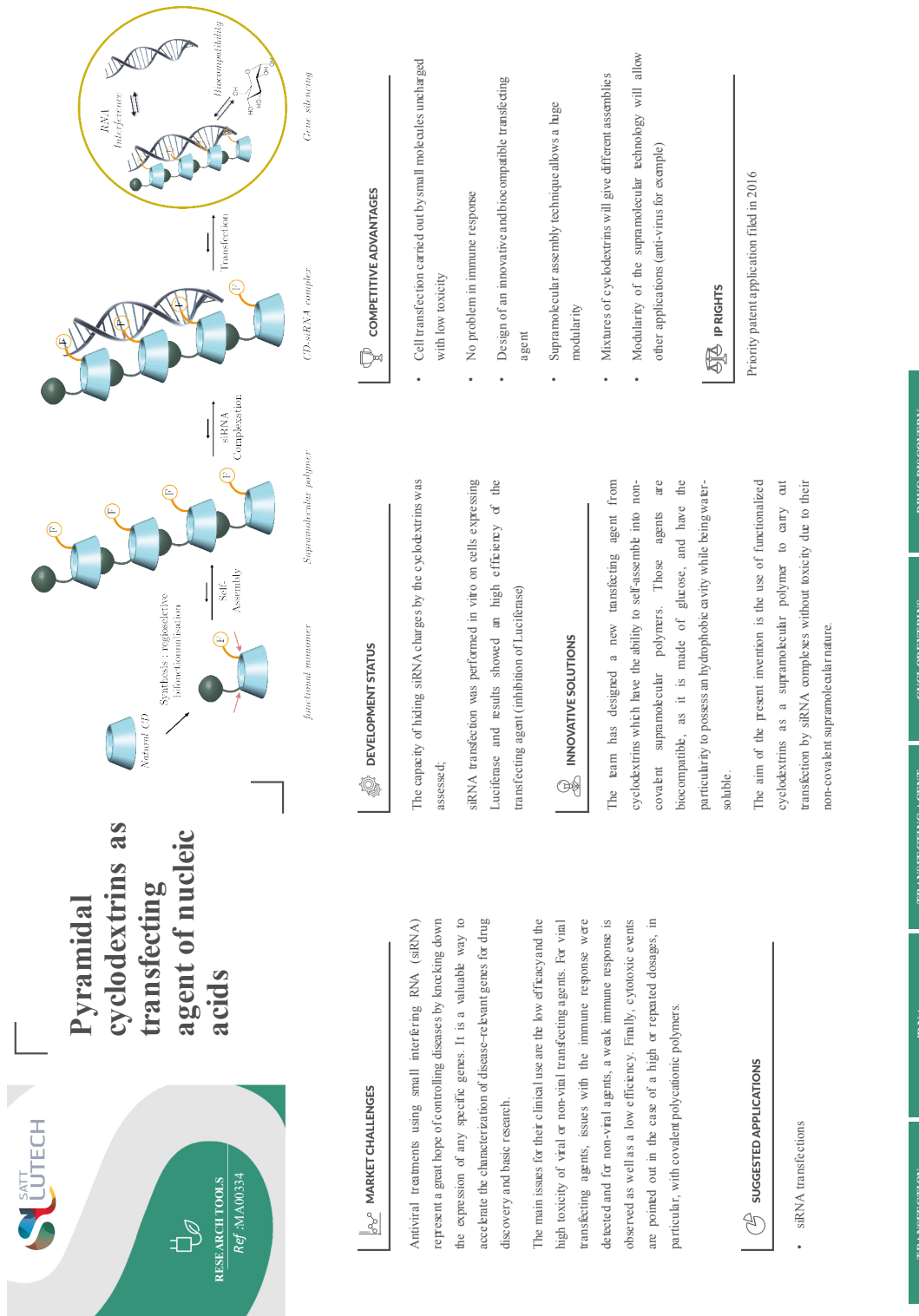


Figure 4. 4 : Fiche technologique du projet réalisée par la SATT Lutec

4.4.3. Définitions des différents contrats

Le contrat est essentiel pour permettre un bon transfert. Le cadre de celui-ci doit être très clair pour optimiser la collaboration. Nous allons voir ci-après les différents types de contrats existants.

4.4.3.1. *Accord de non divulgation (NDA)*

Un accord de non-divulgence (Non-Disclosure Agreement) lie deux entités et engage l'une d'entre elles ou les deux à ne pas communiquer certaines informations qui lui seront transmises. Ce contrat est généralement le premier mis en place afin de permettre d'établir une discussion pouvant aboutir par la suite à l'établissement d'un autre contrat cité ci-dessous.

4.4.3.2. *Accord de transfert de matériel (MTA)*

Un accord de transfert de matériel (Material Transfer Agreement) est un contrat qui permet le transfert à un partenaire de matériel (chimique, biologique, logiciel, etc.) développé par l'un des signataires du contrat. Ce contrat régit l'utilisation de ce matériel et définit les droits et devoirs de chacun de ceux-ci, en particulier concernant la propriété intellectuelle.

4.4.3.3. *Contrat de prestation de service / de recherche*

Contrat liant deux entités non égales : un prestataire (exécutant) et un industriel (donneur d'ordre), pour la réalisation d'une étude, analyse etc. à la demande de ce dernier. Le prestataire est alors choisi pour son savoir faire. Il n'y a en aucun cas un aspect inventif, et le prestataire n'a aucun droit sur les résultats. La prestation est rémunérée et il y a une obligation de résultat.

4.4.3.4. *Collaboration de recherche*

Contrat de recherche entre deux entités dans le but de concevoir, de mettre au point des produits, procédés par un laboratoire en collaboration avec un industriel. Il n'y a pas d'obligation de résultats, mais une obligation de moyens. Il faut que les deux partenaires suivent leurs engagements pour aller au bout du projet quels que soient les résultats. Les frais et la propriété intellectuelle sont à négocier et à partager. Lorsque ce type de contrat implique divers partenaires, on parle alors d'accord de consortium

4.4.3.5. *Contrat de licence*

Le contrat de licence permet de concéder à un tiers le droit d'exploiter une partie définie de ses droits en propriété intellectuelle, pour un territoire, une durée donnée et une finalité définie. Ces droits concédés peuvent être exclusifs ou non. Le tiers concédant ses droits reste propriétaire et détient un droit de regard sur l'utilisation de son invention. Lorsque celui-ci cède complètement son invention de manière définitive, on parle alors de droit de cession.

4.4.4. Rôles des différents acteurs dans l'établissement des contrats

Nous avons vu précédemment que le nombre d'acteurs dans le transfert de technologie est très important. Comprendre lesquels sont responsables d'établir quels contrats restent parfois compliqués. Si chaque acteur a son propre mode de fonctionnement, nous pouvons établir les tendances de répartition observées sans prétendre être exhaustif. On retrouve généralement un découpage local/régional/national.

Au niveau local : les cellules de valorisations sont généralement petites (cellule de valorisation de l'ICM, Curie, Imagine etc.) et s'occupent essentiellement des contrats les plus simples comme les NDA, et les MTA.

Au niveau régional (cellules de valorisation régional du CNRS, d'Inserm transfert), ces cellules sont responsables des contrats simples comme les NDA, et MTA, notamment si aucune cellule locale n'est présente, mais aussi des contrats de collaboration de recherche. Les départements de valorisation des Universités (DGRTT) rentrent aussi dans cette catégorie. Lors des négociations des budgets d'une collaboration de recherche, ils sont à même de discuter des moyens à disposition ou des besoins nécessaires.

Enfin au niveau national (Direction de l'innovation et des relations avec les entreprises pour le CNRS par exemple), les sections sont plus responsables de la coordination des différents acteurs, du suivi des collaborations et de la stratégie. Les sociétés de transfert (SATT, FIST, Inserm transfert), s'occupent essentiellement des contrats de licences et de cession.

4.5. Analyse critique et conclusion

Comme nous avons pu le voir dans ce chapitre, le paysage de la valorisation de la recherche en France est complexe, mais complet. Le nombre d'acteurs pouvant apporter de l'aide, et des conseils pour le transfert est conséquent. Il est donc parfois difficile de savoir à qui s'adresser, mais si le recoupement du rôle de certains acteurs est contreproductif, nous avons la chance en France d'avoir la connaissance, les personnes et les moyens financiers pour permettre à des projets ambitieux de se développer.

L'évolution du paysage de la valorisation de la recherche en France est à mon avis vouée à aller vers la fusion de plusieurs acteurs pour permettre une stratégie plus globale. Cela permettra un meilleur redécoupage local/régional/national, afin de maintenir une proximité du chercheur avec les cellules de valorisation. À l'image de l'Angleterre, le développement d'incubateurs au sein des universités serait aussi très profitable au transfert de technologie. La proximité physique des chercheurs et la mise en place de lieux destinés à l'innovation appliquée sont certainement la clef pour donner l'envie au transfert. Le développement des instituts Carnot de qualité comme l'ICM est certainement aussi un point important pour la valorisation de la recherche de demain.

Nous avons vu avec l'exemple du projet de transfection de siRNA *via* des polymères supramoléculaires de cyclodextrines, que les chercheurs universitaires ont aujourd'hui les clefs pour permettre la valorisation de leurs projets. Les processus établis pour le transfert de technologie sont bien établis. Avec des résultats scientifiques supplémentaires, nous espérons que le transfert du projet se poursuivra permettant d'inscrire cette recherche dans le contexte socio-économique de la thérapie antisens.

4.6. Bibliographie

1. The World Bank. Available at: http://databank.worldbank.org/data/reports.aspx?Code=NY.GDP.MKTP.CD&id=af3ce82b&report_name=Popular_indicators&populartype=series&ispopular=y#.
2. Berger, S. *Reforms in the French Industrial Ecosystem*. (2016).
3. Loi n° 99-587 du 12 juillet 1999 sur l'innovation et la recherche. 1-8 (1999).
4. Langlois-berthelot, M., Cytermann, J.-R., De Malleray, P.-A., Balme, P., Macron, E., Dupont, J.-L., Szymankiewicz, C. & Guillaume, H. Rapport sur la valorisation de la recherche. (2007).
5. Sollogoub, M., Calvez, V., Marcelin, A.-G., Bouteiller, L., Ménand, M., Evenou, P., Gothland, A., Colesnic, D. & Rossignol, J. Capped cyclodextrin hydrophobic moiety conjugate, cyclodextrin supramolecular polymer, and siRNA complex and method of synthesis thereof. PCT/EP2016/070892. (2016).
6. Évolution des financements publics de la R&D des entreprises et de la dépense intérieure de R&D des entreprises (en % du PIB). *MENESR-DGRI-SITTAR MENESR-DGESIP/DGRI-SIES* (2012).
7. Gene therapy clinical trials worldwide. (2017). Available at: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>.
8. Hyeon, T. & Rotello, V. Nanomedicine themed issue and therapy w. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2545–2561 (2012).
9. Aartsma-Rus, A. New Momentum for the Field of Oligonucleotide Therapeutics. *Mol. Ther.* **24**, 193–194 (2016).
10. Catherine, O. Oligonucleotide therapeutics near approval. (2016). Available at: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/47499/title/Oligonucleotide-Therapeutics-Near-Approval/>.
11. Inouye, M. Antisense RNA: its functions and applications in gene regulation--a review. *Gene* **72**, 25–34 (1988).
12. Clinical trials. (2017). Available at: <https://clinicaltrials.gov/>.
13. Wittrup, A. & Lieberman, J. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 543–552 (2015).
14. Watts, J. K. & Corey, D. R. Silencing disease genes in the laboratory and the clinic. 365–379 (2012).
15. Kanasty, R., Dorkin, J. R., Vegas, A. & Anderson, D. Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nat. Mater.* **12**, 967–977 (2013).
16. Ipi. Les palmarès de déposants de brevets. (2016).

Chapitre 5

Conclusion générale et perspectives

5. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

5.1. Conclusion générale

L'utilisation de siRNA est une nouvelle approche thérapeutique très prometteuse. Ils peuvent être théoriquement appliqués à des pathologies très diverses. Néanmoins, la transfection des siRNA à visée thérapeutique est un réel défi. Les obstacles à franchir pour élaborer des agents de transfection sûrs et fiables sont nombreux. Bien que les recherches dans le domaine aient débuté il y a plus de 15 ans, aucun médicament dont le principe actif est un siRNA n'a été mis sur le marché. Même si certaines études s'en approchent, il y existe bien aujourd'hui un réel besoin de développement de divers vecteurs sophistiqués. Les virus, de par leur capacité à transporter du matériel génétique au sein des cellules qu'ils infectent, sont des objets dont nous pouvons nous inspirer pour l'élaboration de virus artificiels comme vecteurs de siRNA. Cette thèse visait donc à construire un système dynamique qui, à l'image des virus, est constitué de briques moléculaires s'emboîtant et interagissant avec des acides nucléiques selon des interactions supramoléculaires.

Pour cela, nous avons travaillé dans un premier temps à l'élaboration de polymères supramoléculaires polycationiques à base de cyclodextrines. La synthèse de monomères de cyclodextrines, pontées et fonctionnalisées par un groupement adamantyle, a donc été réalisée. Ce type de conjugué pallie un problème manifeste dans la littérature concernant les assemblages de β -CD souvent insolubles ou bien auto-inclus. L'ajout éventuel d'une autre fonction cationique, pour améliorer l'interaction avec les siRNA, a aussi été réalisé. Ainsi, la capacité d'auto-assemblage de quatre composés a été étudiée par RMN-1H, RMN-ROESY, ITC, RMN-DOSY, et SANS. Ces études ont confirmé la formation de polymères supramoléculaires pour ces composés. Ces résultats ont, par ailleurs, conduit au dépôt d'une demande de brevet.¹

Ces molécules ont ensuite été utilisées pour la complexation et la transfection *in vitro* de siRNA. Les quatre composés étudiés ont montré une bonne capacité à complexer et à protéger les siRNA. Malheureusement, les deux composés présentant le plus de charges, et sur lesquels nous avons fondé de grands espoirs, se sont finalement révélés inefficaces en transfection. Le composé (10) a cependant montré une bonne efficacité en transfection, sans toxicité notable.

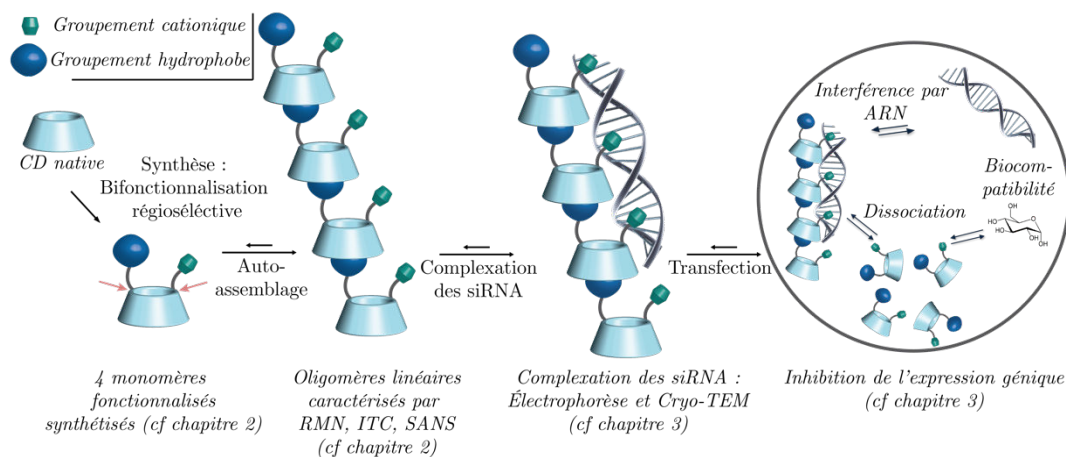


Figure 5. 1 : Résumé du projet et des résultats obtenus

Afin de comprendre comment les assemblages CD-siRNA se forment, des expériences de cryo-microscopie ont ensuite été réalisées. Pour l'instant, nous n'avons pu observer que des formulations constituées de siRNA et du composé (10), choisi pour son habileté à transférer les siRNA. Des fibres d'un diamètre monodisperse (12-13 nm) et d'une longueur allant de quelques centaines de nanomètres à plusieurs micromètres, ont été alors obtenues sur une gamme de ratios N/P définis.

La formation de l'assemblage semble régie par deux phénomènes. En longueur, la croissance des fibres se fait de manière hautement coopérative selon un mécanisme de type décalé. En largeur, les contraintes élastiques et les interactions électrostatiques CD-siRNA se compensent définissant un diamètre régulier. Ainsi des fibres sont formées selon plusieurs niveaux de hiérarchie (assemblage de CD, assemblage CD-siRNA, formation de fibrilles, et formation de fibres).

Dans ce projet, nous avons découvert la création d'assemblages supramoléculaires uniques à base d'acides nucléiques, rappelant la structure, la taille et la fonction d'un virus. Nous pouvons ainsi espérer que ces assemblages, une fois que leur structure aura été parfaitement contrôlée et optimisée, conduiront à la création de vecteurs idéaux de siRNA. Il reste cependant beaucoup de chemin à parcourir avant d'arriver à un agent de transfection optimal. Nous allons voir brièvement les différentes perspectives qui s'ouvrent au terme de cette thèse.

5.2. Perspectives

5.2.1. Microscopie de fluorescence confocale

Après les résultats décevants obtenus en transfection avec le composé (21), nous nous sommes posés la question des raisons expliquant cette incapacité à transfecter. Très récemment, des études de microscopie de fluorescence confocale ont été effectuées avec le composé (21) et des siRNA fluorescents Alexa 488 (Figure 5. 2). Ces expériences ont été réalisées avec Adélie Gothland et Claude-Marie Bachelet à la plateforme de microscopie de l'Institut de la Moelle épinière et du Cerveau (ICM).

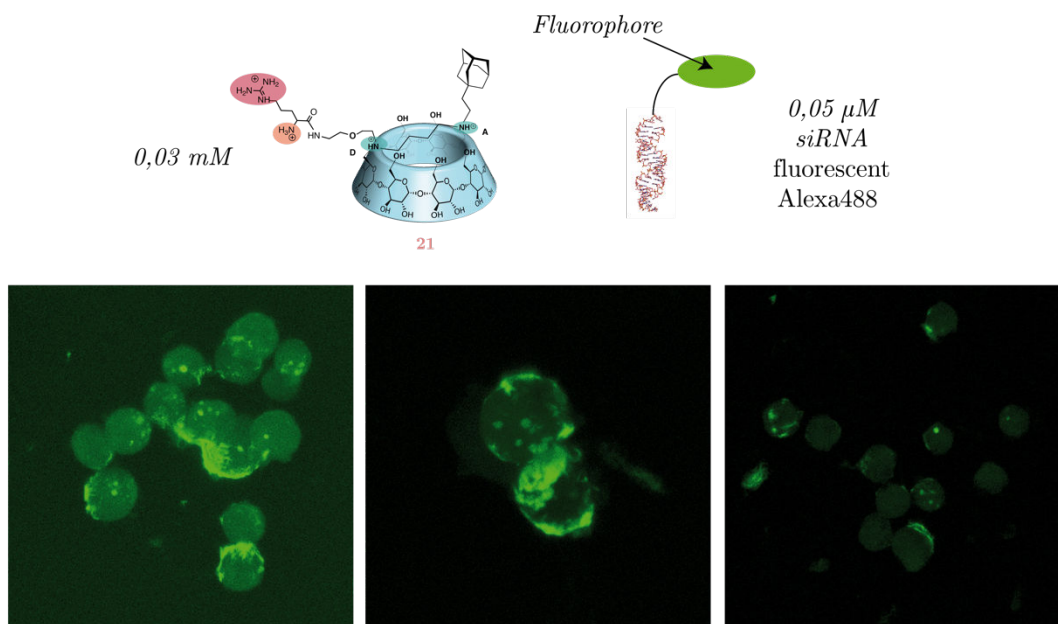


Figure 5. 2 : Images obtenues en microscopie de fluorescence confocale à $t = 24$ h après une transfection de HEK 293 avec une solution de (21) à 0,03 mM et de siRNA Alexa 488 (5 pmole). Conditions : ouverture numérique 1,40. Grossissement : X 63 pour les images de gauche et du centre et X 40 pour l'image de droite.

Sur ces clichés, nous pouvons observer des agrégats de siRNA fluorescents sur les cellules. Une reconstitution en trois dimensions nous a permis d'identifier la localisation des siRNA. La plupart d'entre eux sont agrégés sur la surface membranaire. Néanmoins quelques boules lumineuses ont bien été observées au sein de la cellule. Plusieurs hypothèses peuvent alors être posées :

- L'internalisation cellulaire n'est pas favorisée pour ce type de composé.
- Quelques siRNA sont effectivement internalisés, mais l'échappement endosomal et leur relargage ne sont pas optimisés.
- Des fibres sont formées aussi en milieu biologique et leur longueur est trop grande pour permettre l'internalisation cellulaire. Cela provoque la présence d'agrégats collés sur la membrane cellulaire.

Ces différentes hypothèses posent les bases des différentes améliorations qui peuvent s'appliquer à notre système de manière plus générale.

5.2.2. Fonctionnalisation des cyclodextrines par un ligand

Nous avons anticipé les problèmes d'internalisation de nos composés et avons donc travaillé, durant les derniers mois, à la synthèse de cyclodextrines fonctionnalisées par des CPPs (peptides pénétrants). Les CPP sont de courts peptides (maximum 30 résidus), présentant une capacité à traverser la membrane cellulaire, sans induire de toxicité notable. Les CPP sont généralement cationiques et interagissent de manière électrostatique avec les portéoglycanes de la surface cellulaire, ou plus directement avec le plasma de celle-ci. Ils permettent ainsi de faire pénétrer les molécules ou particules auxquelles ils sont conjugués par endocytose.² Nous avons choisi de fonctionnaliser le mélange (12) à un fragment de la protéine TAT du HIV-1 appelé peptide TAT, correspondant à un domaine basique de la protéine. Avec Kyo Young Goo, étudiante de Master 2 en stage au sein de notre équipe de janvier à juin 2017, nous avons travaillé à la synthèse de ces composés (Figure 5. 3). Après obtention du mélange (22), nous avons finalement effectué une réaction de click pour obtenir le mélange (23). Le composé fonctionnalisé par un CPP a bien été observé en MALDI-TOF. Nous n'avons cependant pas réussi pour l'instant à le purifier.

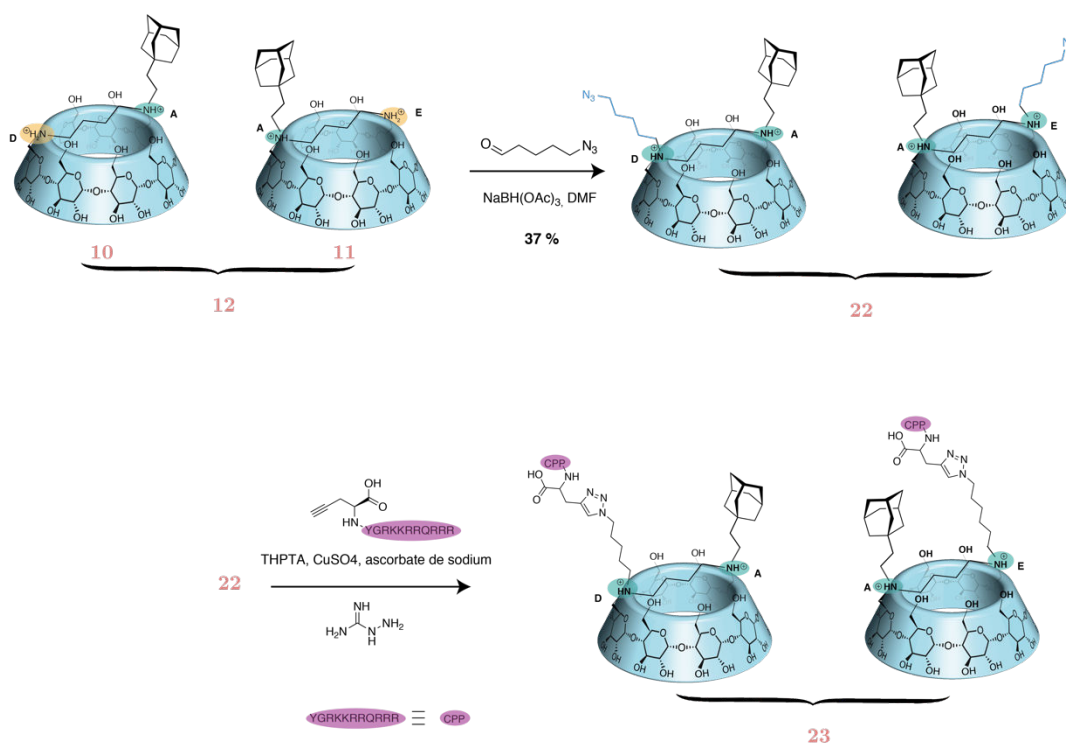


Figure 5. 3 : Synthèse des mélanges (22) et (23)

Afin de poursuivre ce projet, il serait intéressant d'obtenir le mélange (23) et de le formuler avec des siRNA, et d'autres CD fonctionnalisées, comme celles obtenues dans ce projet (composés (10), (11), (19) et (21)), afin d'effectuer des expériences de transfection.

5.2.3. Amélioration du relargage : bras clivable

L'échappement endosomal et le relargage des siRNA sont d'autres problèmes auxquels nous avons réfléchi. Nous supposons que notre système est déjà capable d'induire l'échappement endosomal grâce à la présence d'amines tertiaires sur le pont de nos composés. Il serait néanmoins possible d'augmenter le nombre d'amines ionisables afin d'améliorer l'effet tampon conduisant à la rupture de l'endosome.

Un second problème est le relargage des siRNA dans le cytoplasme. Nous pensons que, parce que notre système est dynamique, le recrutement des siRNA est possible pour former le complexe d'extinction induit par l'ARN (RISC). Il est cependant envisageable d'améliorer le relargage des siRNA en introduisant des motifs clivables entre l'adamantyle et la CD. Nous nous sommes intéressés dernièrement à la synthèse de composés présentant un motif pont disulfure asymétrique (Figure 5. 4). Il s'est avéré que la synthèse de ces composés est relativement laborieuse. Toutefois, il serait intéressant de synthétiser des conjugués CD-adamantyle reliés par d'autres liens clivables comme les oximes ou les hydrazones.³ Ce type de motifs sont plus faciles à introduire, l'équipe de Ulrich a notamment travaillé à l'élaboration de vecteurs de siRNA présentant des motifs hydrazones.⁴

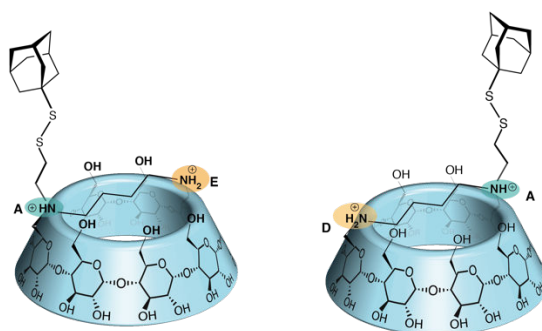


Figure 5. 4 : Conjugués CD-pontée-Adamantyle présentant un motif pont disulfure

5.2.4. Contrôle de la longueur des fibres

Bien que la taille des fibres que nous avons réussi à former est impressionnante et témoigne de la forte coopérativité de l'assemblage, nous pensons qu'elle est inadaptée à une internalisation cellulaire aisée. Il serait intéressant de réussir à contrôler aussi bien le diamètre que la longueur des fibres. Dans cet objectif, le mélange de siRNA avec des cyclodextrines s'auto-assemblant - comme les composés (10), (11), (19) et (21) - et des cyclodextrines ne s'auto-assemblant pas - comme les composés (9) et (14) - pourrait être effectué. En effet, ces composés ne s'auto-assemblant pas, peuvent jouer le rôle de bouchon et devraient ainsi, en étant introduits en faibles proportions, réduire la longueur des fibres (Figure 5. 5).

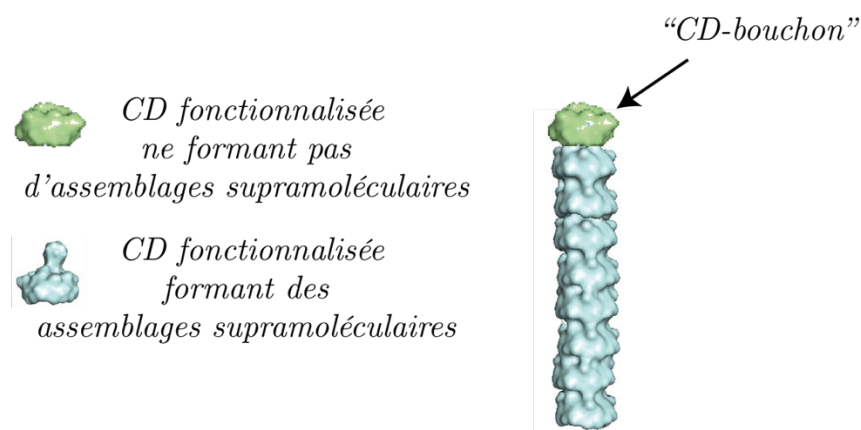


Figure 5. 5 : Mélange de CD s'auto-assemblant et de CD ne s'auto-assemblant pas afin de limiter la taille des oligomères de CD et donc la taille des fibres formées en présence de siRNA.

5.2.5. Cristallisation des fibres

La réalisation de différentes expériences de cryo-microscopie, nous a permis de poser un certain nombre d'hypothèses pour expliquer la formation des fibres. Pour confirmer, ou bien infirmer ces hypothèses, nous souhaiterions cristalliser nos fibres afin de les observer par diffraction des rayons X. La cristallisation d'objets biologiques est cependant relativement difficile. Par conséquent nous envisageons de collaborer avec l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule de Paris Saclay, qui possède l'expertise et le matériel pour expérimenter un très grand nombre de conditions de cristallisation.

5.2.6. Expériences complémentaires de cryo-microscopie

Pour le moment, nous avons réalisé des expériences de cryo-microscopie uniquement sur le composé (10) et (14). Il serait intéressant d'observer des assemblages CD-siRNA avec les autres composés s'auto-assemblant : (11), (19), et (21).

Par ailleurs, nous avons vu qu'il était possible de former des fibres aussi bien avec des acides nucléiques de type ARN que de type ADN. Il est ainsi envisageable de former des édifices supramoléculaires avec des polyanions, autres que les acides nucléiques. Gaëlle Pembouong, doctorante de l'IPCM au sein de l'équipe de chimie des polymères, a récemment observé des fibres en mélangeant le composé (10) avec un polyanion de type polyimide. Contrairement aux fibres observées avec les siRNA, celles-ci présentent une forme moins rigide (Figure 5. 6).

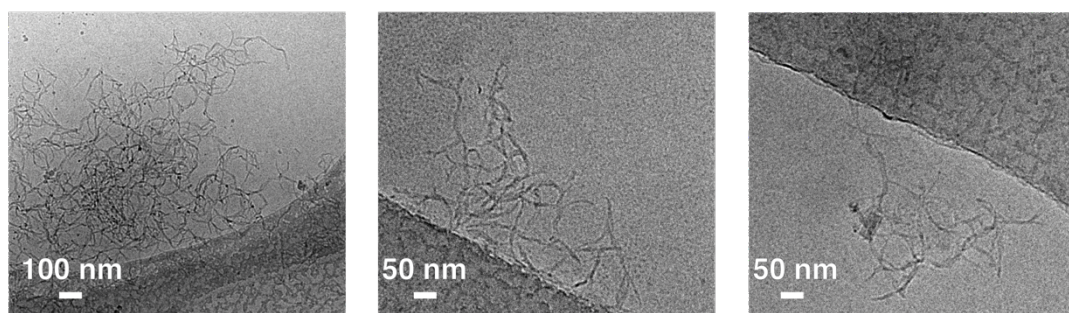


Figure 5. 6 : Micrographes de Cryo-TEM d'une solution de complexe ($[10] = 5 \text{ mM}$, Polyimide = $0,02 \text{ mM}$). Observation de structures de type fibrillaires d'une longueur de plusieurs centaines de nanomètres.

Les monomères de cyclodextrines mis au point dans ce projet semblent ainsi pouvoir s'assembler de manière hiérarchique avec divers polyanions. Le contrôle de la forme de ces assemblages devrait mener à l'élaboration de vecteurs d'acides nucléiques performants, mais aussi à des architectures diverses aux applications multiples.

5.3. Bibliographie

1. Sollogoub, M., Calvez, V., Marcelin, A.-G., Bouteiller, L., Ménand, M., Evenou, P., Gothland, A., Colesnic, D. & Rossignol, J. Capped cyclodextrin hydrophobic moiety conjugate, cyclodextrin supramolecular polymer, and siRNA complex and method of synthesis thereof. PCT/EP2016/070892. (2016).
2. Bechara, C. & Sagan, S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett.* **587**, 1693–1702 (2013).
3. Patil, R., Portilla-Arias, J., Ding, H., Konda, B., Rekechenetskiy, A., Inoue, S., Black, K. L., Holler, E. & Ljubimova, J. Y. Cellular delivery of doxorubicin via pH-controlled hydrazone linkage using multifunctional nano vehicle based on poly(β -L-malic acid). *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 11681–11693 (2012).
4. Bartolami, E., Bessin, Y., Bettache, N., Gary-Bobo, M., Garcia, M., Dumy, P. & Ulrich, S. Multivalent DNA recognition by self-assembled clusters: deciphering structural effects by fragments screening and evaluation as siRNA vectors. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 9427–9438 (2015).

Chapitre 6

Experimental part

6. EXPERIMENTAL PART

6.1. General information

The reactants were purchased from commercial sources and used without further purification. Tetrahydrofuran (THF) was freshly distilled over sodium/benzophenone. DMF was dried over molecular sieves.

NMR spectra were recorded on a Bruker Avance I - 400 MHz or a Bruker Avance III - 600 MHz using CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$, and D_2O as solvents. All the spectra were calibrated with solvent signals : CHCl_3 , H_2O , DMSO , and MeOH for carbon spectra in D_2O .

Assignments of the signals were done using COrrrelation SpectroscopY (COSY), Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY (NOESY), Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy (HSQC), Heteronuclear Multiple Bound Correlation (HMBC), TOtal Correlation SpectroscopY (TOCSY), Transverse Rotating-frame Overhauser Enhancement Spectroscopy (T-ROESY). If total attribution is described, all sugar units are sort from the unit with the less deshielded H_1 (α) to the more deshielded one (η). All units were then rename as described in the chapter 2, from unit A to unit G in the counterclockwise (first rim).

Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY) NMR diffusion measurements were carried out by using the Longitudinal Eddy current BiPolar Gradient Pulse (LEDBPGP) sequence. Sixteen spectra were acquired with gradient pulse (Δ) of 4 ms ranging in strength from 0.28 to 5.26 g/mm for BBFO 5 mm NMR probe. A diffusion delay (Δ) from 50 to 100 ms was used and the diffusion coefficients (D) were calculated with topspin 3.0.

High Resolution Mass Spectrometry (HRMS) was performed on a Bruker microTOF spectrometer using Agilent ESI-L Low Concentration Tuning-Mix, Sodium formiate or Lithium formiate as reference.

Optical rotations were measured on a Perkin-Elmer 341 digital polarimeter with a path length of 1 dm.

Isothermal Titration Calorimetry (ITC) measurements were carried out at 20°C with a VP-ITC₂₀₀ instrument from Malvern Instruments. The results were analysed using “Origin for ITC” software supplied with VP-ITC Microcalorimeter.

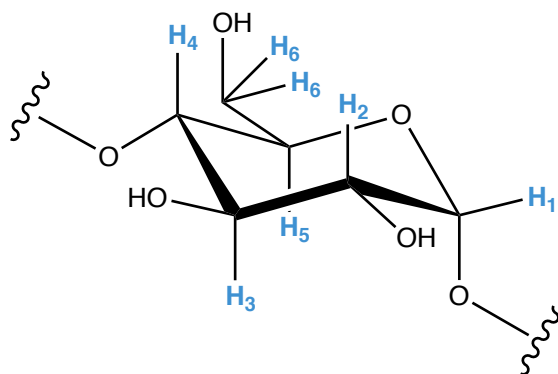
Cryo-TEM measurements were performed using a JEOL JEM2100F equipped with a GATAN Ultrascan 4000 camera. The sample was fast frozen using liquid ethan. The acquisition was performed with a low electron beam intensity ($10 \text{ e}^- \text{Å}^{-2} \text{s}^{-1}$). Measurements of the length and the diameter of bundles were carried out on Image J.

Small Angle Neutron Scattering (SANS) measurements were done at the LLB of Grenoble on the D11 instrument. Data were recorded for the empty cell signal and the solute and solvent incoherent background. A light water standard was used to normalize the scattered intensities to cm^{-1} units.

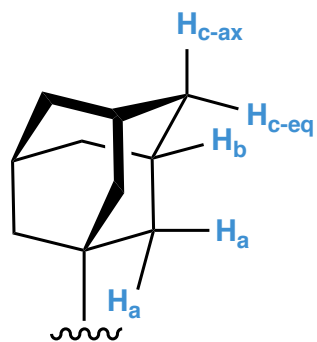
For fluorescence imaging, cells were trypsinized and seed in an 8-well coverglass. A confocal microscope SP2 leica was used (laser: 488 nm, filter :500-583 nm). siRNA Alexa 488 was purchased from Qiagen.

6.2. Nomenclature

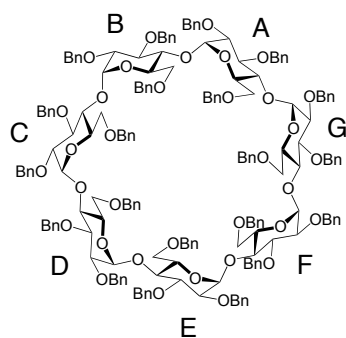
Cyclodextrin carbohydrate unit:



Adamantyl moiety:



6.3. Synthesis

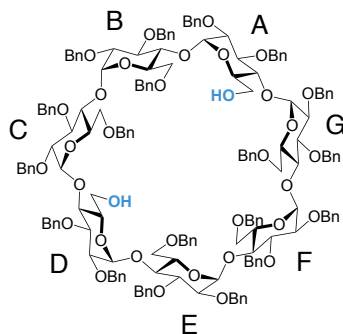
2^{A-G}, 3^{A-G}, 6^{A-G}-per-*O*-benzyl- β -cyclodextrin (**1**)

Protocol: β -cyclodextrin was freeze-dried before use. Sodium hydride (21.4 g, 535 mmol, w/w 60 % in oil) was added portionwise to a stirred solution of β -cyclodextrin (10.4 g, 9.16 mmol) in DMSO (200 ml) at room temperature (r.t.) under N_2 . Benzyl chloride (52 ml, 448 mmol) was then added carefully with vigorous mechanic stirring. Reaction was stirred overnight. The mixture was carefully quenched with MeOH (40 ml) and diluted in water (200 ml). The solution was extracted with Et_2O (3x200 ml). The combined organics layers were washed with brine (2x200 ml), dried under $MgSO_4$ and concentrated. The resulting crude product was purified with a silica gel chromatographic column and eluted with Cyclohexane/ $EtOAc$ (95:5 then 3:1) to afford the perbenzylated- β -cyclodextrin (**1**; 26.6 g, 96 %).

The structure of the product was confirmed by comparison with the literature.¹

6. EXPERIMENTAL PART

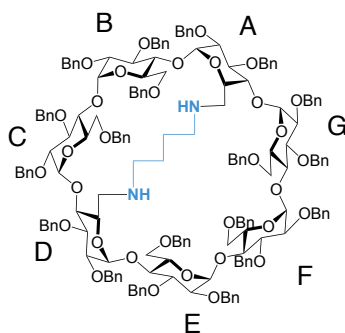
2^{A-G},3^{A-G},6^{B-C;E-G}-nonadeca-*O*-benzyl- β -cyclodextrin (**2**)



Protocol: The perbenzylated- β -cyclodextrin (**1**) (15.2 g, 5.02 mmol) was solubilized in Toluene (35 ml). Diisobutylaluminum hydride (1.5 M in toluene, 66 ml, 93 mmol) was added at r.t. The mixture was heated at 60°C under N₂ flux during 1h30. The mixture was then poured carefully into an ice/water erlenmeyer (500 ml). EtOAc (500 ml) and HCl (300 ml) were then added. Solution was stirred overnight. The solution was extracted with 3 x 300 ml of EtOAc, washed with brine (300 ml), dried with MgSO₄ and concentrated. The resulting crude product was purified with a silica gel column and eluted with Cyclohexane/EtOAc (9:1 then 3:1) to afford the diol- β -cyclodextrine (**2**; 10.4 g, 74 %).

The structure of the product was confirmed by comparison with the literature².

6^A,6^D-Dideoxy-6^A,6^D-diamino-*N,N'*-butyl-
2^{A-G},3^{A-G},6^{B-C}:E-G-nonadeca-*O*-benzyl- β -cyclodextrin (**3**)



Protocol: Oxalyl dichloride (3 ml, 35.5 mmol) was dissolved in DCM (30 ml) under Argon at -78°C . DMSO (5 ml, 70.4 mmol) was diluted in DCM (30 ml) and added over 30 min to the first solution and stirred for 30 minutes. An additional solution of the diol- β -cyclodextrin (**2**) (10.5 g, 3.69 mmol) dissolved in DCM (40 ml) was added slowly to the first solution. Reaction was stirred for 1h30. Triethylamine (5.9 ml, 42.8 mmol) was added and the solution was stirred overnight and warmed slowly to r.t. Solution was quenched with water (300 ml). The mixture was diluted in DCM (200 ml), and layers were separated. Aqueous layer was extracted with DCM (3 x 200 ml). The combined organics layers were washed with water (2 x 300 ml), dried under MgSO_4 , filtered and concentrated. The resulting crude product was filtered with a silica gel column and eluted with Cyclohexane/EtOAc (4:1) to afford the dialdehyde- β -cyclodextrin (9.2 g, 88 %).

The dialdehyde- β -cyclodextrin (9.2 g, 3.24 mmol) was solubilized in DCM (100 ml). Butane-1,4-diamine (0.4 ml, 3.99 mmol) and Sodium triacetoxyborohydride (3.5 g, 16.51 mmol) were then added at r.t. The solution was stirred during 1h30. EtOAc (200 ml) and NaHCO_3 (200 ml) were added. Layers were separated, aqueous layer was extracted with EtOAc (2 x 200 ml). Organic layers were combined and washed with a NaHCO_3 solution (200 ml) and brine (200 ml), dried with MgSO_4 and concentrated. The resulting crude product was purified with a silica gel column (700 ml) and eluted with Cyclohexane/EtOAc (4:1 then 6:4 with Et_3N) to afford the bridged- β -cyclodextrin (**3**; 7.76 g, 83 %).

RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , 300K): δ = 7.33-6.85 (m, 95 H, H-Ar), 5.77 (d, $^3J_{\text{H1-H2}}$ = 4.1 Hz, 1 H, H-1), 5.45 (d, 2J = 10.6 Hz, 1 H, CHH-Ph), 5.32 (d, $^3J_{\text{H1-H2}}$ = 3.8 Hz, 1 H, H-1), 5.29 (d, 2J = 10.6 Hz, 1 H, CHH-Ph), 5.22 (d, 2J = 10.6 Hz, 1 H, CHH-Ph), 5.20 (d, $^3J_{\text{H1-H2}}$ = 3.8 Hz, 1 H, H-1), 5.15 (d, 2J = 10.6 Hz, 1 H, CHH-Ph), 5.08 (d, 2J = 10.6 Hz, 1 H, CHH-Ph), 4.96 (d, $^3J_{\text{H1-H2}}$ = 3.5 Hz, 1 H, H-1), 4.89 (d, $^3J_{\text{H1-H2}}$ = 3.5 Hz, 1 H, H-1), 4.84-4.69 (m, 11 H, 2 x H-1, 9 x CHH-Ph), 4.60-4.27 (m, 24 H, CHH-Ph), 4.20 (dd, $^2J_{\text{H6-H6'}}$ = 10.8 Hz, $^3J_{\text{H6-H5}}$ = 2.7 Hz, 1 H, H-6), 4.13-2.79 (m, 23H, 7 x H-3, 5 x H-4, 7 x H-5, 4 x H-6), 3.71 (br. 1H, H-6), 3.63-3.40 (m, 10 H, 5 x H-2, 1 x H-4, 4 x H-6), 3.31 (dd, $^3J_{\text{H1-H2}}$ = 3.3 Hz, $^3J_{\text{H3-H2}}$ = 9.6 Hz, 1 H, H-2), 3.29-3.26 (m, 2 H, H-2, H-4), 3.04 (br. 1H, H-6), 2.80 (dd, $^2J_{\text{H6-H6'}}$ = 11.5 Hz, $^3J_{\text{H6-H5}}$ = 2.46 Hz, 1H, H-6), 2.65 (dd, $^2J_{\text{H6-H6'}}$ = 12.0 Hz, $^3J_{\text{H6-H5}}$ = 7.8 Hz, 1 H, H-6), 2.50 (dd, $^2J_{\text{H6-H6'}}$ = 13.3 Hz, $^3J_{\text{H6-H5}}$ = 9.50 Hz, 1 H, H-6), 2.40 (br. m, 2 H, CH_2 -NH), 2.32 (br. m, 2 H, CH_2 -NH), 1.48 (br. m, 1 H, CHH- CH_2 -NH), 1.33 (br. m, 1 H, CHH- CH_2 -NH), 1.25 (br. m, 1 H, CHH- CH_2 -NH), 1.04 (br. m, 1 H, CHH- CH_2 -NH).

RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3 , 300K): δ = 139.68-137.62 (19 x C-quat-Ar), 128.49-126.36 (95 C, CH-Ar), 99.75 (C-1), 99.55 (C-1), 99.30 (C-1), 98.93 (C-1), 98.42 (C-1), 98.16 (C-1), 97.91 (C-1), 81.92-80.51 (12 C, 7 x C-3, 5 x C-4), 80.20 (C-2), 79.81 (C-2), 79.10-78.04 (5 x C-2), 77.29 (C-4), 76.57-76.16 (4 x CH_2 -Ph, C-4), 75.23-74.82 (2 x CH_2 -Ph), 73.74-72.43 (13 x CH_2 -Ph), 72.05-71.45 (5 x C-5), 69.87-69.63 (2 x C-5), 69.23-68.54 (5 x C-6), 52.69 (C-6), 52.39 (C-6), 48.96 (1C, CH_2 -NH), 48.67 (CH_2 -NH), 29.85 (CH_2 - CH_2 -NH), 27.05 (CH_2 - CH_2 -NH).

ESI-HRMS (m/z) calculated for $\text{C}_{179}\text{H}_{193}\text{N}_2\text{O}_{33}$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$) 2898.3480, found: 2898.3592 (err: -3.9 ppm)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 80.9$ (c = 0.45, DCM)

6. EXPERIMENTAL PART

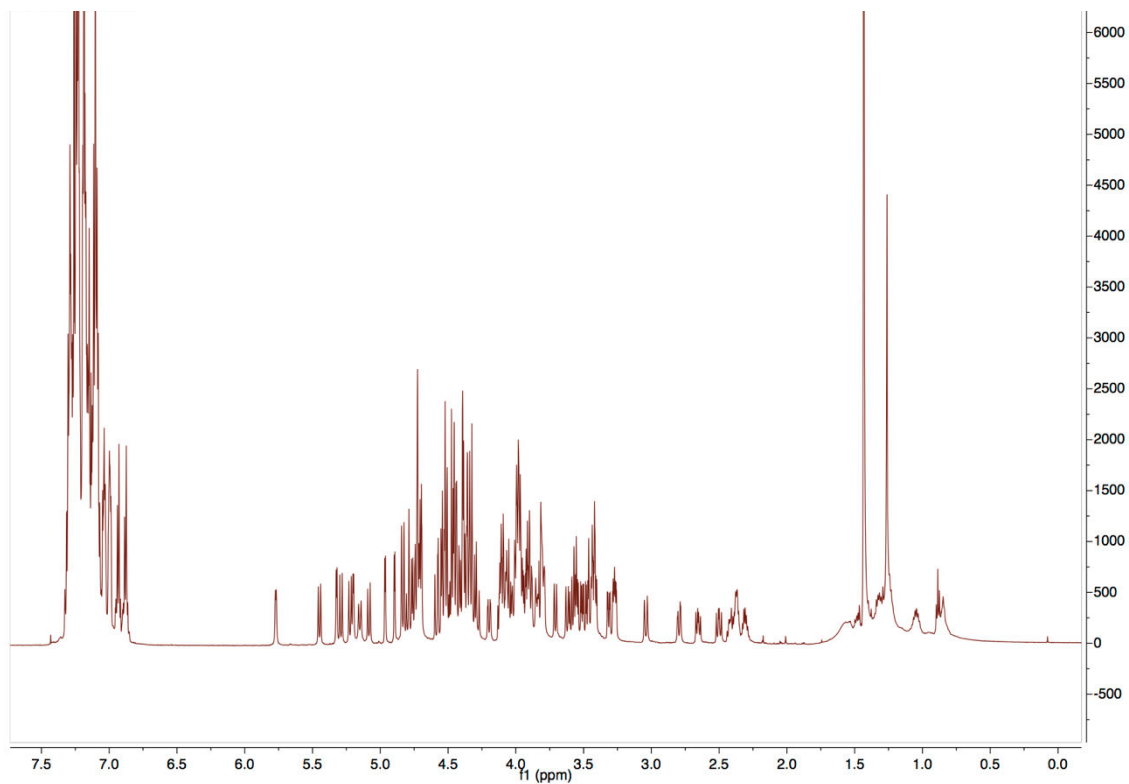


Figure 6. 1: RMN ^1H (600MHz, CDCl_3 , 300 K) of compound (3)

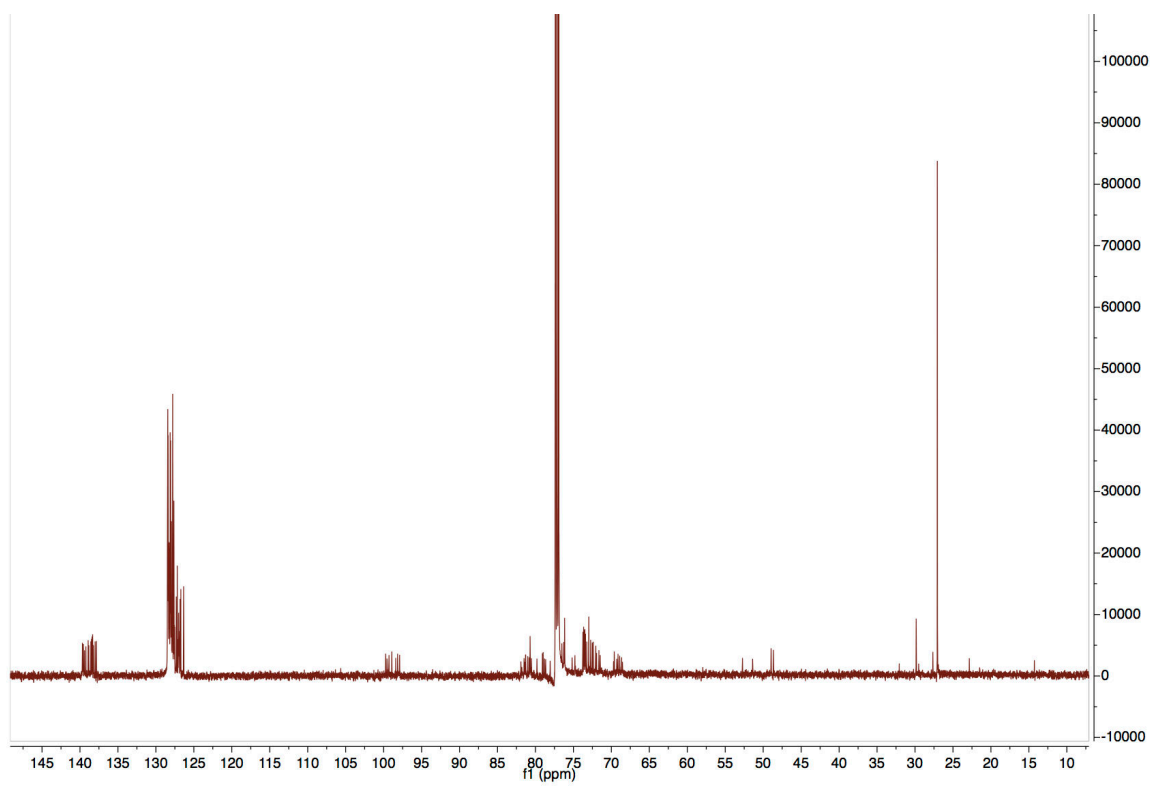


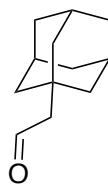
Figure 6. 2: RMN ^{13}C (150MHz, CDCl_3 , 300 K) of compound (3)

RMN (600 Mhz, CDCl₃, 300K)

	Attribution	Signal (ppm)	Correlation (ppm)	Attribution	
<i>Cycle α/G</i>	H-1 α	5.77	3.58	γH ₁	
	C-1 α	97.88			
	H-2 α	3.55			
		C-2 α	78.05		
		H-3 α	4.10		
		C-3 α	81.00		
		H-4 α	4.00	3.99	εH ₁
		C-4 α	81.49		
		H-5 α	3.81		
		C-5 α	71.95		
		H-6 α	3.70		
			3.57		
<i>Cycle β/C</i>	C-6 α	69.13			
	H-1 β	5.32	4.06	γH ₁	
	C-1 β	98.40			
	H-2 β	3.47			
		C-2 β	79.07		
		H-3 β	3.99		
		C-3 β	81.64		
		H-4 β	3.91	3.92	δH ₁
		C-4 β	80.83		
		H-5 β	3.80		
		C-5 β	71.64		
		H-6 β	3.56		
		3.90			
<i>Cycle γ/D</i>	C-6 β	69.28			
	H-1 γ	5.20	3.27	γH ₁	
	C-1 γ	99.29			
	H-2 γ	3.51			
		C-2 γ	78.96		
		H-3 γ	4.11		
		C-3 γ	81.31		
		H-4 γ	4.06	4.06	δH ₁
		C-4 γ	77.28		
		H-5 γ	3.99		
		C-5 γ	71.46		
		H-6 γ	3.63		
		4.09			
<i>Cycle δ/B</i>	C-6 γ	68.85			
	H-1 δ	4.96	3.92	δH ₁	
	C-1 δ	99.56			
	H-2 δ	3.44			
		C-2 δ	78.63		
		H-3 δ	3.96		
		C-3 δ	80.52 on 80.70		
		H-4 δ	3.92	3.91	εH ₁
		C-4 δ	81.27		
		H-5 δ	3.85		
		C-5 δ	72.03 on 72.08		
		H-6 δ	4.21		
		3.46			
<i>Cycle ε/F</i>	C-6 δ	68.65			
	H-1 ε	4.89	3.99	εH ₁	
	C-1 ε	99.70			
	H-2 ε	3.41			
		C-2 ε	78.79		
		H-3 ε	3.98		
		C-3 ε	81.70 on 81.77		
		H-4 ε	3.81	3.81	γH ₁
		C-4 ε	81.39		
		H-5 ε	3.83		
		C-5 ε	72.05 on 72.08		
		H-6 ε	4.02		
		3.42			
<i>Cycle φ/A</i>	C-6 ε	68.54			
	H-1 φ	4.73	3.91	εH ₁	
	C-1 φ	98.13			
	H-2 φ	3.31			
		C-2 φ	80.23		
		H-3 φ	3.98		
		C-3 φ	81.70 on 81.77		
		H-4 φ	3.58	3.58	γH ₁
		C-4 φ	76.11		
		H-5 φ	4.07		
		C-5 φ	69.59		
		H-6 φ	2.79		
		2.66			
<i>Cycle ηE</i>	C-6 φ	51.36			
	H-1 η	4.69	3.81	εH ₁	
	C-1 η	98.92			
	H-2 η	3.27			
		C-2 η	79.80		
		H-3 η	3.96		
		C-3 η	80.52 on 80.70		
		H-4 η	3.27	3.27	γH ₁
		C-4 η	81.91		
		H-5 η	3.91		
		C-5 η	69.72		
		H-6 η	3.04		
		2.50			
	C-6 η	52.70			

6. EXPERIMENTAL PART

2-adamantan-2-acetaldehyde (**4**)



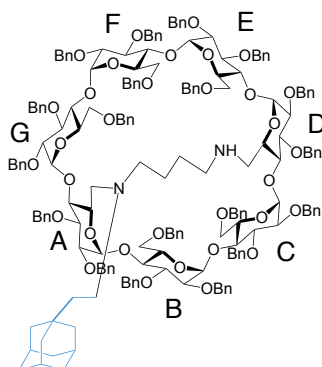
Protocol: To a flask containing 2-(adamantan-1-yl)ethanol (5.60mmol, 1.01g) in DCM (30ml) was added TEMPO (0.57mmol, 0.088g) then iodobenzene diacetate (6.21mmol, 2.00g). The reaction was stirred for 2 hours and then diluted with DCM (50 ml). Saturated aqueous solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (100ml) was added and extracted with DCM (2 x 50 ml). The combined organic layers were washed with saturated aqueous NaHCO_3 (50 ml), brine (50 ml), dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash silica gel chromatography and eluted with ether/pentane (5:95) to provide the the title compound (**4**; 0.803g, 80%).

The structure of the product was confirmed by comparison with the literature³.

Procedure to obtain (5), (6), mixture (7) and (8)

Protocol: To a solution of bridged- β -cyclodextrin (3) (7.76 g, 2.68 mmol) in DCM (1200 ml) and Sodium triacetoxyborohydride (2.9 g, 13.68 mmol) was added slowly 2-adamantan-2-acetaldehyde (4; 0.5 g, 2.80 mmol) at 0°C for 1h. Then the reaction was stirred overnight at r.t. Water (200 ml) was added, and layers were separated. The aqueous layer was extracted with DCM (2x100 ml). Organic layers were combined, washed with saturated NaHCO₃ solution (100 ml), brine (100 ml) and dried with MgSO₄ and concentrated. The resulting crude product was purified with a silica combi flash column (200g) and eluted with Cyclohexane/EtOAc (gradient from 95:5 to 1:1 with Et₃N) to afford a mixture of (5) and (6) (ratio 65/35) called (7; 43 %), the difunctionalized compound (8; 13 %), and the starting materials (3; 21%). (5) and (6) can be separated during the purification to obtained separately (5; 29%) and (6; 14%).

6^A,6^D-Dideoxy-6^A,6^D-diamino-*N,N'*-butyl-*N*-(ethyladamantyl)-*N'*-amine-
2^{A-G},3^{A-G},6^{B-C}:E-G-nonadeca-*O*-benzyl- β -cyclodextrin (**5**)



RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃, 300K): δ = 7.30-6.80 (m, 95 H, H-Ar), 5.73 (d, ³*J*_{H1-H2} = 3.9 Hz, 1 H, H-1), 5.48 (d, ²*J* = 11.0 Hz, 1 H, CHH-Ph), 5.33 (d, ³*J*_{H1-H2} = 3.9 Hz, 1 H, H-1), 5.26 (d, ³*J*_{H1-H2} = 3.9 Hz, 1 H, H-1), 5.22-5.15 (m, 3 H, CHH-Ph), 4.96 (d, ³*J*_{H1-H2} = 3.30 Hz, 1 H, H-1), 4.92 (d, ³*J*_{H1-H2} = 3.30 Hz, 1 H, H-1), 4.89 (d, ³*J*_{H1-H2} = 2.90 Hz, 1 H, H-1), 4.83-4.81 (m, 2 H, CHH-Ph), 4.77-4.65 (m, 8 H, H-1, 7 x CHH-Ph), 4.61-4.57 (m, 2 H, CHH-Ph), 4.54-4.25 (m, 23 H, H-6, 22 x CHH-Ph), 4.20-4.14 (m, 6 H, CHH-Ph, 2 x H-3, 3 x H-6), 4.06-3.95 (m, 9 H, 5 x H-3, 2 x H-4, 2 x H-5), 3.89-3.78 (m, 9 H, 3 x H-4, 5 x H-5, H-6), 3.71-3.66 (m, 2 H, H-6), 3.62-3.52 (m, 6 H, 2 x H-2, H-4, 3 x H-6), 3.46-3.40 (m, 2 H, 2 x H-2), 3.32-3.26 (m, 3 H, 2 x H-2, H-4), 2.86 (br. 1 H, H-6), 2.62 (br. 1 H, H-6), 2.56-2.39 (m, 5 H, 2 x H-6, 2 x CHH-NH, Ad-CH₂-CHH-NH), 2.23-2.07 (m, 3 H, 2 x CHH-NH, Ad-CH₂-CHH-NH), 1.98 (s, 3 H, H_b-Ad), 1.79-1.64 (m, 6 H, H_c-Ad), 1.47-1.23 (m 12 H, 6 x H_a-Ad, 4 x CHH-CH₂-NH, 2 x Ad-CHH-CH₂-NH).

RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃, 300K): δ = 139.84-138.09 (19 x C-quat-Ar), 128.46-126.29 (95 C, CH-Ar), 100.30 (C-1), 99.73 (C-1), 99.47 (2 x C-1), 99.44 (C-1), 99.42 (C-1), 99.28 (C-1), 81.90-80.30 (C-2, 7 x C-3, 5 x C-4), 79.88-79.37 (3 x C-2), 78.72-77.39 (3 x C-2, 2 x C-4), 76.40 -75.48 (4 x CH₂-Ph), 74.15-72.43 (14 x CH₂-Ph), 72.20-71.90 (4 x C-5), 71.75 (CH₂-Ph), 71.27 (C-5), 70.37 (C-5), 70.03 (C-5), 69.60-68.89 (5 x C-6), 59.45 (C-6), 53.35 (CH₂-CH₂-NH), 51.85 (C-6), 49.93 (CH₂-CH₂-NH), 48.05 (Ad-CH₂-CH₂-NH), 42.73 (3C, C_a-Ad), 39.35 (CH₂-Ad), 37.22 (3C, C_c-Ad), 31.83 (C-quat-Ad), 28.90 (3C, C_b-Ad), 26.88 (CH₂-CH₂-NH), 25.05 (CH₂-CH₂-NH).

ESI-HRMS (m/z) calculated for C₁₉₁H₂₁₁N₂O₃₃ ([M + H]⁺) 3060.4889, found: 3060.5000 (err: -3.6 ppm)

[α]_D²⁰ = + 41.4 (c = 0.75, DCM)

6. EXPERIMENTAL PART

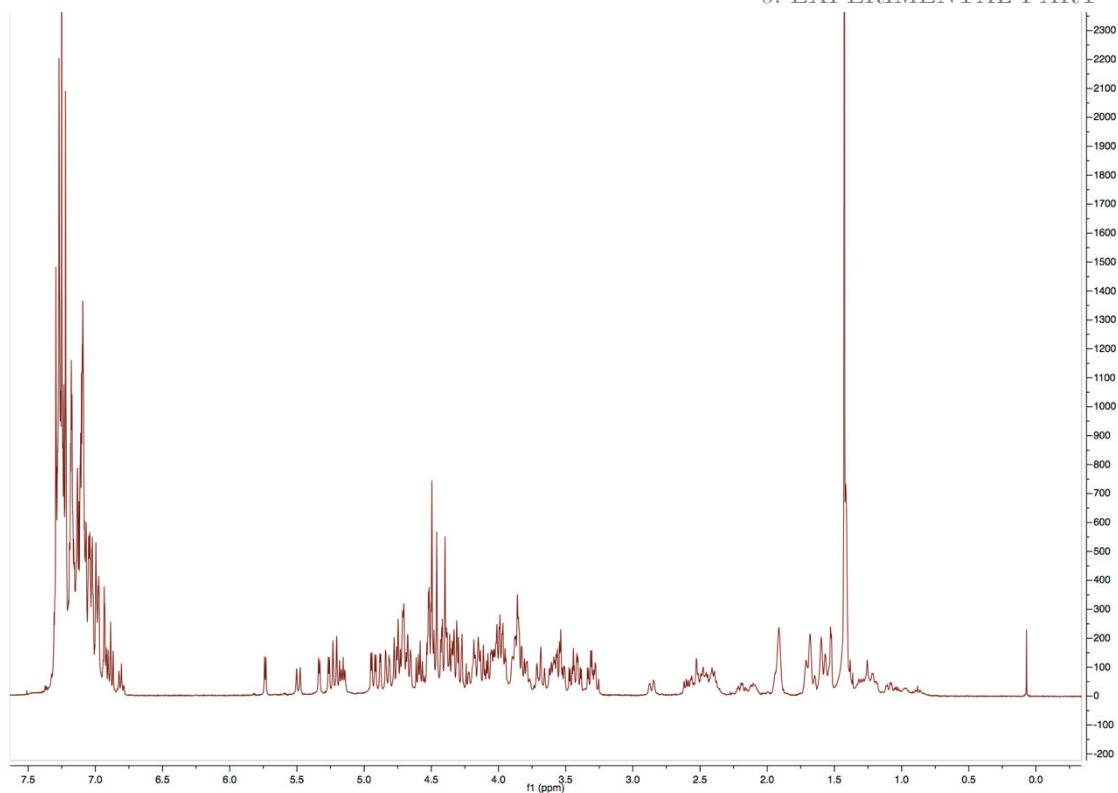


Figure 6. 3: RMN ^1H (600MHz, CDCl_3 , 300 K) of compound (5)

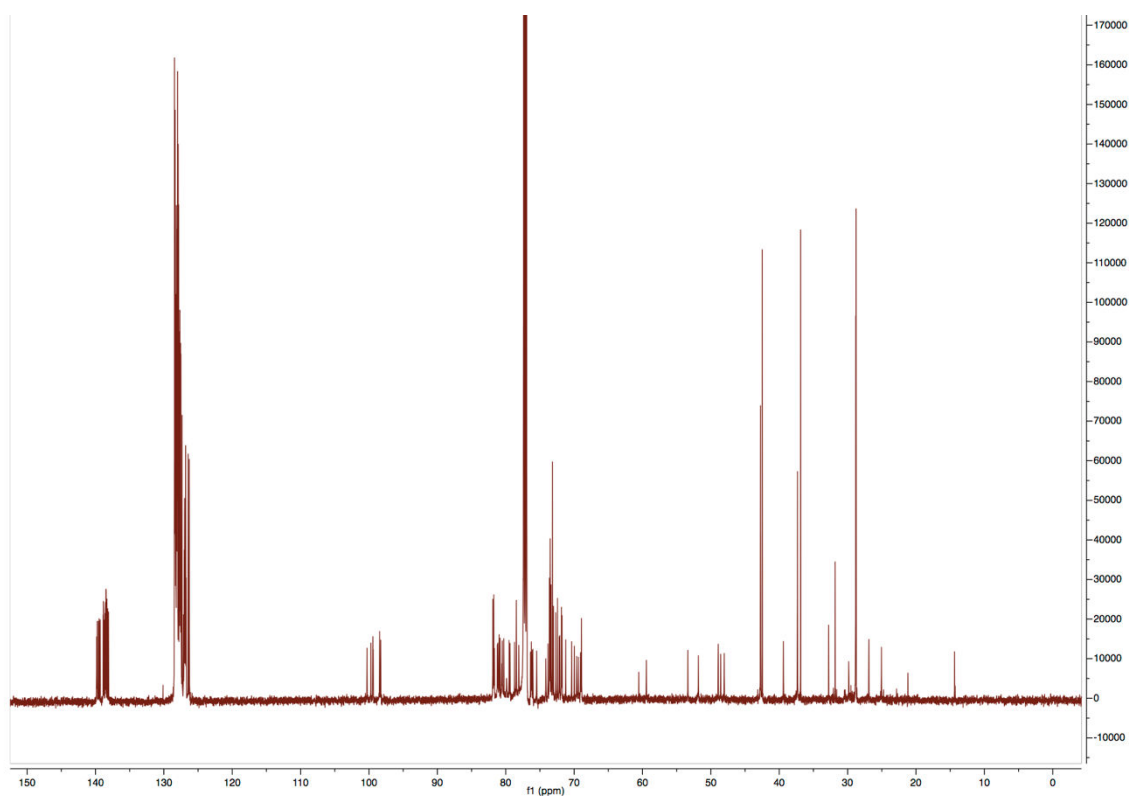


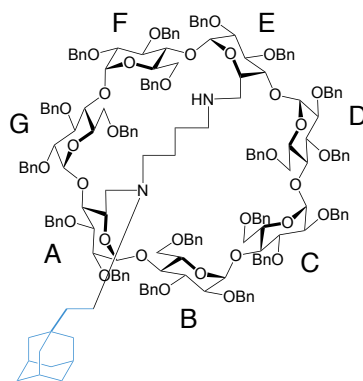
Figure 6. 4: RMN ^{13}C (150MHz, CDCl_3 , 300 K) of compound (5)

6. EXPERIMENTAL PART

RMN (600 Mhz, CDCl₃, 300K)

	<i>Attribution</i>	<i>Signal (ppm)</i>	<i>Correlation (ppm)</i>	<i>Attribution</i>
<i>Cycle α/G</i>	H-1 α	5.73	3.56	¹ H ₁
	C-1 α	98.28		
	H-2 α	3.55		
	C-2 α	77.08		
	H-3 α	4.11		
	C-3 α	81.01		
	H-4 α	4.01	4.92	¹ H ₁
	C-4 α	81.16		
	H-5 α	3.89		
	C-5 α	71.85 ou 72.09 ou 72.18		
	H-6 α	4.17		
	<i>Cycle β/D</i>	C-6 α	3.71	
C-6 α		69.07		
H-1 β		5.33	3.28	² H ₁
C-1 β		99.44		
H-2 β		3.53		
C-2 β		78.72		
H-3 β		4.13		
C-3 β		81.67		
H-4 β		4.07	5.26	¹ H ₁
C-4 β		78.46		
H-5 β		4.05		
C-5 β		71.23		
H-6 β	3.67			
<i>Cycle γ/C</i>	C-6 β	4.17		
	C-6 β	68.93		
	H-1 γ	5.26	4.07	² H ₁
	C-1 γ	98.43		
	H-2 γ	3.46		
	C-2 γ	79.38		
	H-3 γ	3.97		
	C-3 γ	80.29 ou 80.58 ou 80.83		
	H-4 γ	3.84	4.95	² H ₁
	C-4 γ	81.24 ou 81.75 ou 81.89		
	H-5 γ	3.79		
	C-5 γ	71.87		
H-6 γ	3.88			
<i>Cycle δ/B</i>	C-6 γ	3.60		
	C-6 γ	69.38		
	H-1 δ	4.95	3.84	¹ H ₁
	C-1 δ	100.29		
	H-2 δ	3.40		
	C-2 δ	78.46		
	H-3 δ	3.97		
	C-3 δ	80.29 ou 80.58 ou 80.83		
	H-4 δ	3.85	4.71	¹ H ₁
	C-4 δ	81.24 ou 81.75 ou 81.89		
	H-5 δ	3.87		
	C-5 δ	71.85 ou 72.09 ou 72.18		
H-6 δ	3.53			
<i>Cycle ε/F</i>	C-6 δ	4.10		
	C-6 δ	68.93		
	H-1 ε	4.92	4.01	² H ₁
	C-1 ε	99.38		
	H-2 ε	3.43		
	C-2 ε	79.52		
	H-3 ε	3.97		
	C-3 ε	80.29 ou 80.58 ou 80.83		
	H-4 ε	3.83	4.88	² H ₁
	C-4 ε	81.24 ou 81.75 ou 81.89		
	H-5 ε	3.89		
	C-5 ε	71.85 ou 72.09 ou 72.18		
H-6 ε	3.61			
<i>Cycle φ/E</i>	C-6 ε	4.37		
	C-6 ε	69.62		
	H-1 φ	4.88	3.83	¹ H ₁
	C-1 φ	99.72		
	H-2 φ	3.30		
	C-2 φ	79.89		
	H-3 φ	4.02		
	C-3 φ	80.97		
	H-4 φ	3.28	5.33	² H ₁
	C-4 φ	81.91		
	H-5 φ	3.80		
	C-5 φ	70.36		
H-6 φ	2.55			
<i>Cycle η/A</i>	C-6 φ	2.46		
	C-6 φ	59.44		
	H-1 η	4.71	3.85	² H ₁
	C-1 η	98.45		
	H-2 η	3.32		
	C-2 η	80.51		
	H-3 η	3.99		
	C-3 η	81.75		
	H-4 η	3.56	5.73	² H ₁
	C-4 η	77.47		
	H-5 η	4.04		
	C-5 η	69.99		
H-6 η	3.00			
C-6 η	2.87			
	C-6 η	51.85		

6^A,6^E-Dideoxy-6^A,6^E-diamino-*N,N'*-butyl-*N*-(ethyladamantyl)-*N'*-amine-
2^{A-G},3^{A-G},6^{B-D}; F-G-nonadeca-*O*-benzyl- β -cyclodextrin (**6**)



RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃, 300K): δ = 7.30-6.88 (m, 95 H, H-Ar), 5.60 (d, ³*J*_{H1-H2} = 3.8 Hz, 1 H, H-1), 5.56 (d, ³*J*_{H1-H2} = 3.8 Hz, 1 H, H-1), 5.32-5.26 (m, 2 H, CHH-Ph), 5.19 (d, ²*J* = 11.5 Hz, 1 H, CHH-Ph), 5.12-5.10 (m, 2 H, CHH-Ph), 5.02 (m, 2 H, H-1), 4.99 (d, ³*J*_{H1-H2} = 3.6 Hz, 1 H, H-1), 4.95 (d, ³*J*_{H1-H2} = 3.6 Hz, 1 H, H-1), 4.83-4.68 (m, 9 H, 8 x CHH-Ph, H-1), 4.52-4.28 (m, 25 H, H-6, 24 x CHH-Ph), 4.25-4.13 (m, 4 H, CHH-Ph, 3 x H-6), 4.09-3.85 (m, 18 H, 7 x H-3, 4 x H-4, 7 x H-5), 3.79-3.03 (m, 6 H, H-4, 5 x H-6), 3.58-3.54 (m, 2 H, H-2), 3.49 (d, ²*J* = 9.7 Hz, 1 H, H-6), 3.45 (dd, ³*J*_{H1-H2} = 3.3 Hz, ³*J*_{H3-H2} = 9.2 Hz, 1 H, H-2), 3.43-3.39 (m, 6 H, 4 x H-2, 2 x H-4), 3.37 (dd, ³*J*_{H1-H2} = 3.3 Hz, ³*J*_{H3-H2} = 9.81 Hz, 1 H, H-2), 3.29 (dd, ³*J*_{H1-H2} = 3.3 Hz, ³*J*_{H3-H2} = 9.8 Hz, 1 H, H-2), 2.91 (d, ²*J* = 12.91 Hz, 1 H, H-6), 2.66-2.29 (m, 9 H, 3 x H-6, 6 x CHH-NH), 1.91 (s, 3 H, H_b-Ad), 1.70-1.57 (m, 6 H_c-Ad), 1.47-1.20 (m, 12 H, 6 x H_a-Ad, 4 x CHH-CH₂-NH, 2 x Ad-CHH-CH₂-NH).

RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃, 300K): δ = 139.96-137.96 (19 x C-quat-Ar), 128.53-126.27 (95 C, CH-Ar), 100.45 (C-1), 99.57 (C-1), 99.51 (C-1), 98.84 (C-1), 98.62 (2 x C-1), 97.87 (C-1), 81.93-77.84 (7 x C-2, 7 x C-3, 7 x C-4), 76.31-75.70 (4 x CH₂-Ph), 74.00-72.49 (13 x CH₂-Ph), 72.49 (C-5), 72.46 (CH₂-Ph), 72.16 (C-5), 71.99 (CH₂-Ph), 71.90 (C-5), 71.76 (2 x C-5), 71.06 (C-5), 69.83 (C-6), 69.44 (C-6), 69.14 (2 x C-6), 69.00 (C-6), 68.79 (C-5), 58.09 (C-6), 54.64 (CH₂-CH₂-NH), 51.95 (C-6), 50.22 (Ad-CH₂-CH₂-NH), 48.39 (CH₂-CH₂-NH), 42.79 (3 x Ca-Ada), 38.81 (CH₂-Ad), 37.40 (3 x Cc-Ad), 31.70 (C-quat-Ad), 28.88 (3 x Cb-Ad, CH₂-CH₂-NH), 25.36 (CH₂-CH₂-NH).

ESI-HRMS (m/z) calculated for C₁₉₁H₂₁₁N₂O₃₃ ([M + H]⁺) 3060.4889, found: 3060.4772 (err: 3.8 ppm)

[α]²⁰_D = + 24.4 (c = 0.95, CHCl₃)

6. EXPERIMENTAL PART

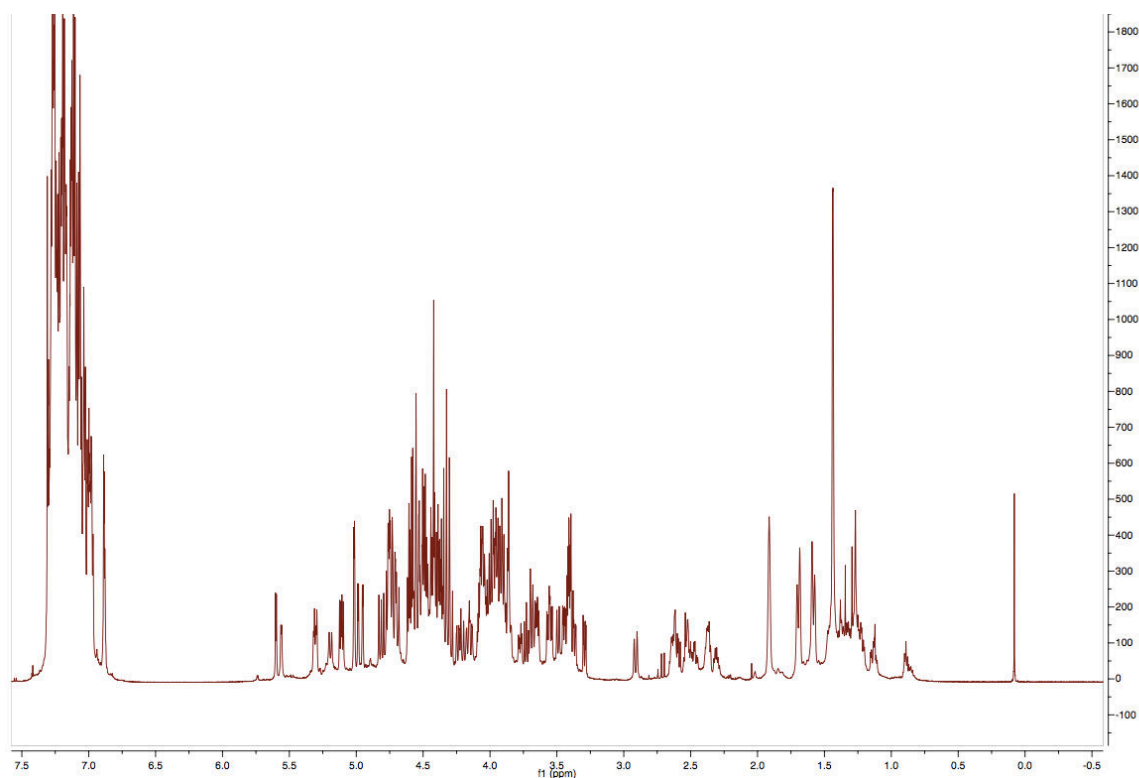


Figure 6. 5: RMN ^1H (600MHz, CDCl_3 , 300 K) of compound (6)

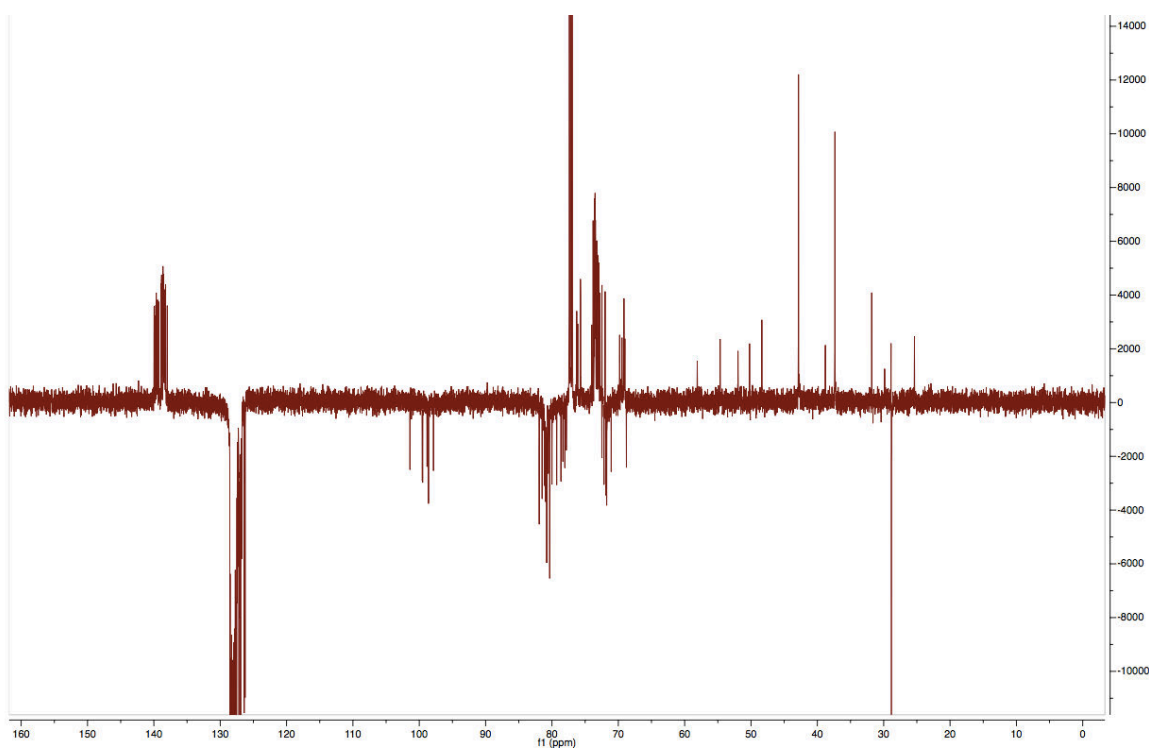


Figure 6. 6: RMN ^{13}C -Jmod (150MHz, CDCl_3 , 300 K) of compound (6)

RMN (600 Mhz, CDCl₃, 300K)

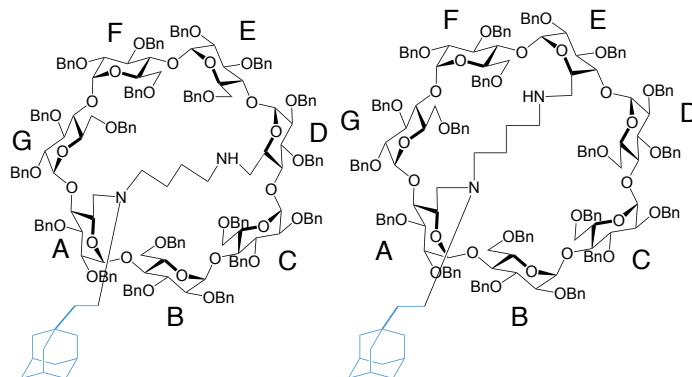
	Attribution	Signal (ppm)	Correlation (ppm)	Attribution
<i>Cycle α/D</i>	H-1 α	5.60	3.41	⁵ H ₁
	C-1 α	98.60		
	H-2 α	3.55		
	C-2 α			
	H-3 α	4.07		
	C-3 α			
	H-4 α	4.01	4.98	⁵ H ₁
	C-4 α			
	H-5 α	3.94		
	C-5 α			
	H-6 α	4.24		
	C-6 α	69.15		
<i>Cycle β/G</i>	H-1 β	5.56	3.39	⁹ H ₁
	C-1 β	99.55		
	H-2 β	3.57		
	C-2 β			
	H-3 β	4.08		
	C-3 β			
	H-4 β	4.06	5.02	⁶ H ₁
	C-4 β			
	H-5 β	3.91		
	C-5 β			
	H-6 β	3.68		
	C-6 β	69.02		
<i>Cycle γ/B</i>	H-1 γ	5.02	3.73	⁵ H ₁
	C-1 γ	101.40		
	H-2 γ	3.41		
	C-2 γ			
	H-3 γ	3.96		
	C-3 γ			
	H-4 γ	3.86	4.95	⁹ H ₁
	C-4 γ			
	H-5 γ	3.86		
	C-5 γ			
	H-6 γ	4.51		
	C-6 γ	69.44		
<i>Cycle δ/F</i>	H-1 δ	5.02	4.06	⁶ H ₁
	C-1 δ	98.83		
	H-2 δ	3.45		
	C-2 δ			
	H-3 δ	3.93		
	C-3 δ			
	H-4 δ	3.90	4.75	⁵ H ₁
	C-4 δ			
	H-5 δ	3.85		
	C-5 δ			
	H-6 δ	3.49		
	C-6 δ	68.93		
<i>Cycle ε/C</i>	H-1 ε	4.98	4.00	⁹ H ₁
	C-1 ε	99.60		
	H-2 ε	3.41		
	C-2 ε			
	H-3 ε	4.06		
	C-3 ε			
	H-4 ε	3.73	5.02	⁷ H ₁
	C-4 ε			
	H-5 ε	3.91		
	C-5 ε			
	H-6 ε	3.77		
	C-6 ε	69.81		
<i>Cycle φ/A</i>	H-1 φ	4.95	3.86	⁷ H ₁
	C-1 φ	99.50		
	H-2 φ	3.37		
	C-2 φ			
	H-3 φ	4.06		
	C-3 φ			
	H-4 φ	3.39	5.56	⁶ H ₁
	C-4 φ			
	H-5 φ	3.96		
	C-5 φ			
	H-6 φ	2.53		
	C-6 φ	58.09		
<i>Cycle η/E</i>	H-1 η	4.75	3.90	⁶ H ₁
	C-1 η	97.86		
	H-2 η	3.29		
	C-2 η			
	H-3 η	3.96		
	C-3 η			
	H-4 η	3.41	5.60	⁸ H ₁
	C-4 η			
	H-5 η	3.98		
	C-5 η			
	H-6 η	2.91		
	C-6 η	51.95		

6. EXPERIMENTAL PART

Mixture of

6^A,6^D-Dideoxy-6^A,6^D-diamino-*N,N'*-butyl-*N*-(ethyladamantyl)-*N'*-amine-
2^{A-G},3^{A-G},6^{B-C};E-G-nonadeca-*O*-benzyl- β -cyclodextrin (65%) and
6^A,6^E-Dideoxy-6^A,6^E-diamino-*N,N'*-butyl-*N*-(ethyladamantyl)-*N'*-amine-
2^{A-G},3^{A-G},6^{B-D};F-G-nonadeca-*O*-benzyl- β -cyclodextrin (35%)

(7)



RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃, 300K): δ = 7.30-6.80 (m, 95 H, H-Ar), 5.73 (d, ³*J*_{H1-H2} = 4.2 Hz, 1 H, H-1), 5.59 (d, ³*J*_{H1-H2} = 4.2 Hz, 1 H, H-1), 5.56 (d, ³*J*_{H1-H2} = 3.6 Hz, 1 H, H-1), 5.48 (d, ²*J* = 10.2 Hz, 1 H, CHH-Ph), 5.36-5.28 (m, 3 H, 1 x H-1, 2 x CHH-Ph), 5.26 (d, ³*J*_{H1-H2} = 3.6 Hz, 1 H, H-1), 5.22-5.15 (m, 4 H, CHH-Ph), 5.11-5.10 (m, 2 H, CHH-Ph), 5.02 (m, 2 H, H-1), 4.97 (d, ³*J*_{H1-H2} = 3.6 Hz, 1 H, H-1), 4.95-4.93 (m, 2 H, H-1), 4.92 (d, ³*J*_{H1-H2} = 3.0 Hz, 1 H, H-1), 4.88 (d, ³*J*_{H1-H2} = 2.4 Hz, 1 H, H-1), 4.83-3.26 (m, 142 H, 67 x CHH-Ph, 2 x H-1, 13 x H-2, 14 x H-3, 14 x H-4, 14 x H-5, 20 x H-6), 2.90 (m, 1 H, H-6), 2.86 (m, 1 H, H-6), 2.66-2.26 (m, 15 H, 6 x H-6, 8 x CHH-NH, Ad-CH₂-CHH-NH), 2.22-2.08 (m, 3 H, 2 x CHH-NH, Ad-CH₂-CHH-NH), 2.04 (s, 3 H, H_b-Ad), 1.91 (s, 3 H, H_b-Ad), 1.70-1.57 (m, 12 H, H_c-Ad), 1.46-1.19 (m, 24 H, 12 x H_a-Ad, 8 x CHH-CH₂-NH, 4 x Ad-CHH-CH₂-NH).

RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃, 300K): δ = 139.94-137.91 (38 x C-quat-Ar), 128.52-126.21 (190 x CH-Ar), 101.30-97.95 (14 x C-1), 81.93-77.40 (42 C, 14 x C-2, 14 x C-3, 14 x C-4), 76.40-72.10 (38 x CH₂-Ph), 72.23-70.08 (14 x C-5), 69.66-51.81 (14 x C-6), 54.64-53.35 (2 x CH₂-CH₂-NH), 50.25-49.13 (2 x Ad-CH₂-CH₂-NH), 48.95-47.94 (2 x CH₂-CH₂-NH), 42.79-42.73 (6 x C_a-Ad), 39.36-38.79 (2 x CH₂-Ad), 37.21-37.11 (6 x C_c-Ad), 31.83-31.70 (2 x C-quat-Ad), 28.80 (6 x C_b-Ad), 25.05-24.81 (4 x CH₂-CH₂-NH)

ESI-HRMS (m/z) calculated for C₁₉₁H₂₁₁N₂O₃₃ (M + H⁺) 3060.4889, found 3060.4985 (err: -3.2 ppm)

[α]_D²⁰ = +44.6 (c = 0.45, DCM)

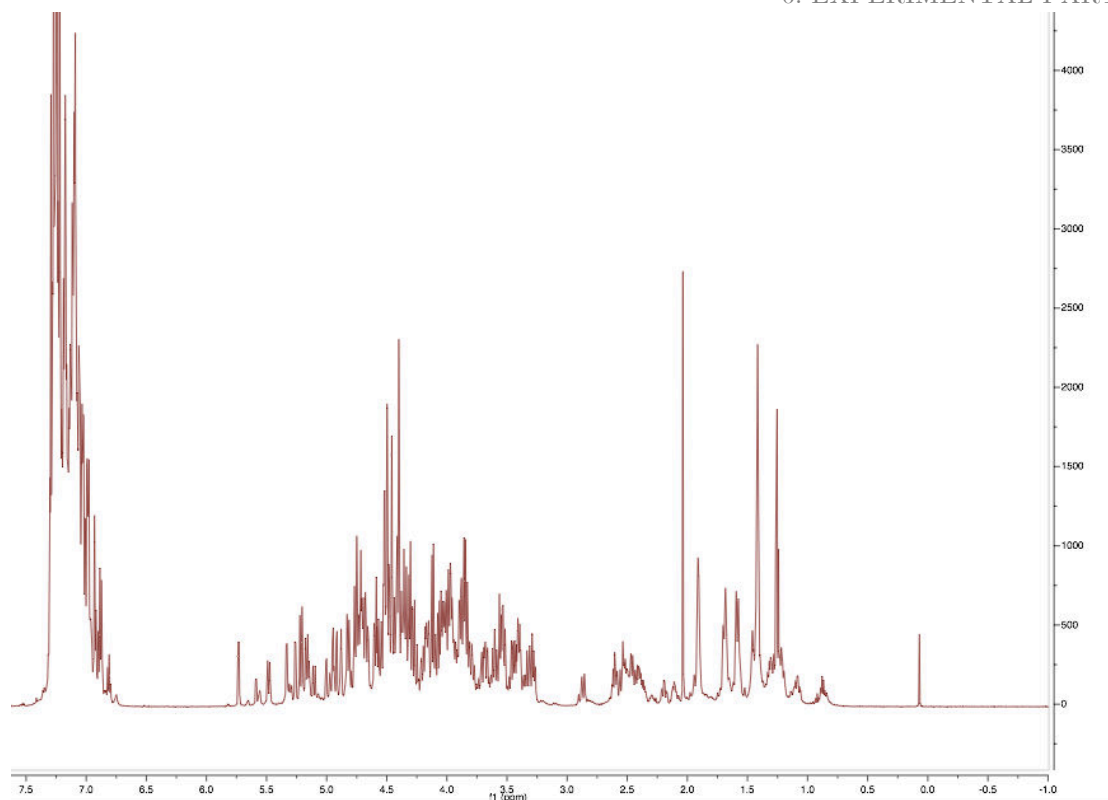


Figure 6. 7: RMN ^1H (600Mhz, CDCl_3 , 300 K) of mixture (7)

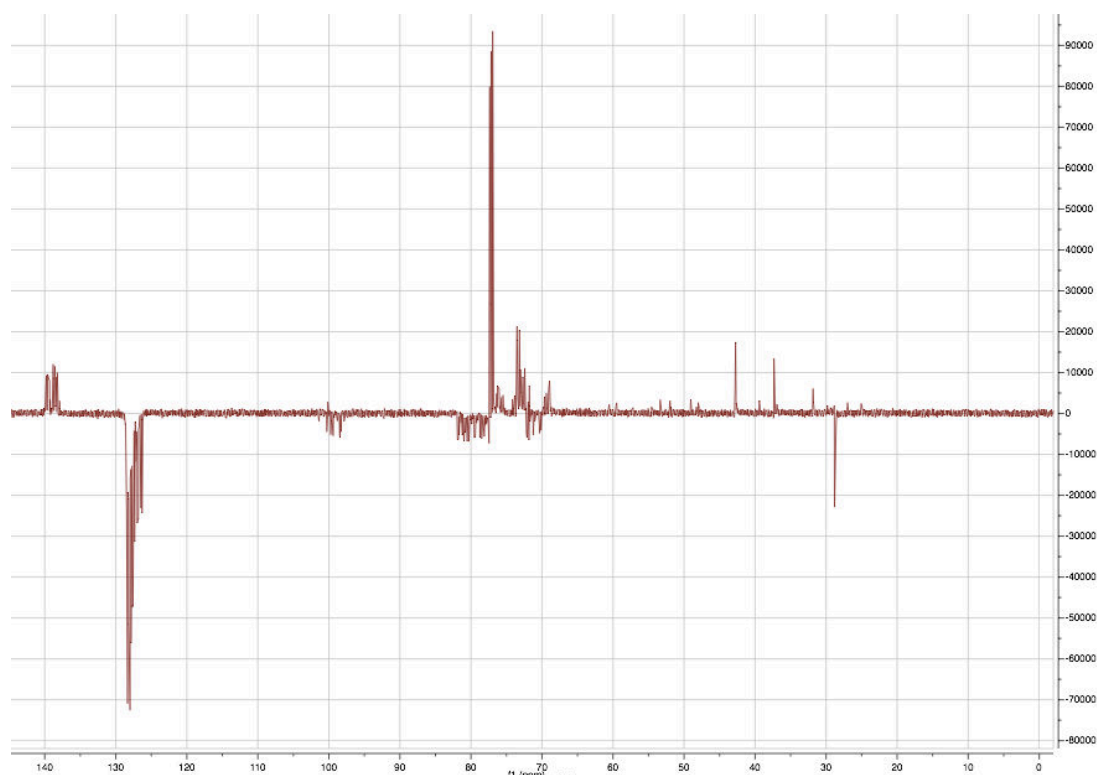
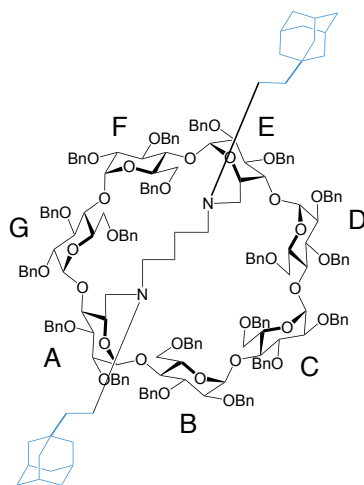


Figure 6. 8: RMN ^{13}C -Jmod (150Mhz, CDCl_3 , 300 K) of mixture (7)

6. EXPERIMENTAL PART

6^A,6^E-Dideoxy-6^A,6^E-diamino-*N,N'*-butyl-*N*-(ethyladamantyl)-*N'*-(ethyladamantyl)-
2^{A-G},3^{A-G},6^{B-D}; F-G-nonadeca-*O*-benzyl- β -cyclodextrin (**8**)



RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃, 300K): 7.30-6.75 (m, 95 H, H-Ar), 5.67 (d, ³J_{H1-H2} = 4,0 Hz, 1 H, H-1), 5.60 (d, ³J_{H1-H2} = 4,1 Hz, 1 H, H-1), 5.47 (d, ²J = 10.1 Hz, 1 H, CHH-Ph), 5.36 (d, ²J = 11.0 Hz, 1 H, CHH-Ph), 5.28-5.23 (m, 2 H, CHH-Ph), 5.12 (d, ²J = 11.0 Hz, 1 H, CHH-Ph), 4.98 (d, ³J_{H1-H2} = 3.4 Hz, 1 H, H-1), 4.96 (d, ³J_{H1-H2} = 3.2 Hz, 1 H, H-1), 4.94 (m, 2 H, H-1), 4.89 (d, ³J_{H1-H2} = 3.2 Hz, 1 H, H-1), 4.86-4.69 (m, 7 H, CHH-Ph), 4.50-4.24 (m, 29 H, 25 x CHH-Ph, 4 x H-6), 4.18-4.15 (m, 2 H, 1 x CHH-Ph, 1 x H-5), 4.13-4.10 (m, 2 H, 1 x H-3, 1 x H-4), 4.07-3.93 (m, 10 H, 2 x H-4, 6 x H-3, 2 x H-5), 3.90-3.80 (6H, 1 x H-4, 4 x H-5, 1 x H-6), 3.74 (t, ³J = 9.7 Hz, 1 H, H-4), 3.70-3.53 (m, 7 H, 2 x H-2, 5 x H-6), 3.46-3.29 (m, 7 H, 5 x H-2, 2 x H-4), 2.70-2.46 (m, 9 H, 4 x H-6, 5 x CHH-NH), 2.38 (br. 1H, CHH-NH), 2.26-2.15 (m 2 H, CHH-NH), 1.91 (m, 6 H, H_b-Ad), 1.70-1.39 (m, 28 H, 12 H_c-Ad, 12 x H_a-Ad, 4 x CHH-CH₂-NH), 1.29-1.11 (m, 4 H, Ad-CHH-CH₂-NH).

RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃, 300K): δ = 140.06-138.20 (19 x C-quat-Ar), 128.53-126.18 (95 C, CH-Ar), 101.66 (C-1), 99.89 (C-1), 99.06 (3 x C-1), 98.56 (C-1), 98.47 (C-1), 82.45 (C-4), 82.42 (C-4), 81.38-78.63 (17 C, 5 x C-2, 7 x C-3, 5 x C-4), 78.12 (2 x C-2), 76.37-75.82 (5 x CH₂-Ph), 73.86-72.64 (12 x CH₂-Ph), 72.40 (C-5), 72.09 (C-5), 72.00 (C-5), 71.95 (CH₂-Ph), 71.82 (CH₂-Ph), 71.49 (C-5), 71.27 (C-5), 70.98 (C-5), 70.49 (C-5), 69.85 (C-6), 69.58 (C-6), 69.34 (C-6), 68.94 (C-6), 68.85 (C-6), 59.13 (2 x C-6), 54.71 (CH₂-CH₂-NH), 54.10 (CH₂-CH₂-NH), 50.03 (Ad-CH₂-CH₂-NH), 48.50 (Ad-CH₂-CH₂-NH), 42.97 (3 x Ca-Ada), 42.81 (3 x Ca-Ada), 40.59 (CH₂-Ad), 38.82 (CH₂-Ad), 37.35 (6 x Cc-Ada), 31.78 (2 x C-quat-Ada), 28.76 (6 x Cb-Ada), 25.57 (CH₂-CH₂-NH), 24.98 (CH₂-CH₂-NH).

ESI-HRMS (m/z) calculated for C₂₀₃H₂₂₉N₂O₃₃ ([M + H]⁺) 3222.6297, found 3222.6430 (err: -0.3 ppm)

[α]_D²⁰ = + 39.8 (c = 0.70, DCM)

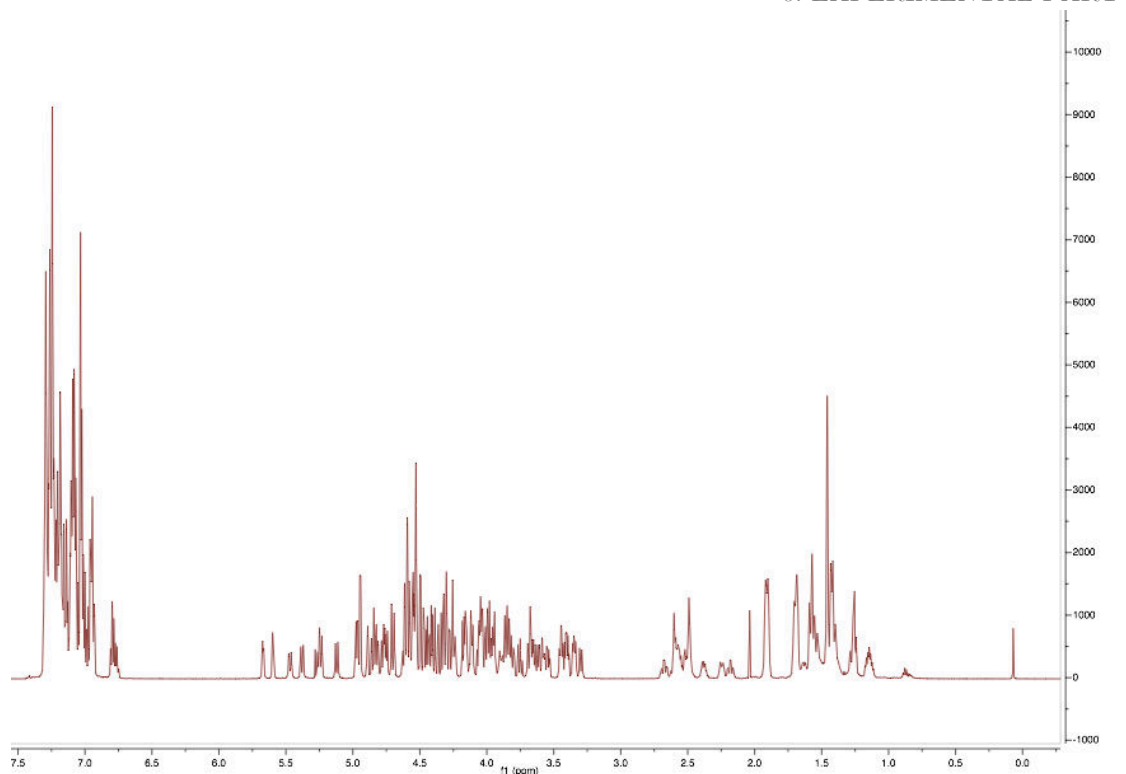


Figure 6. 9: RMN ^1H (600MHz, CDCl_3 , 300 K) of compound (8)

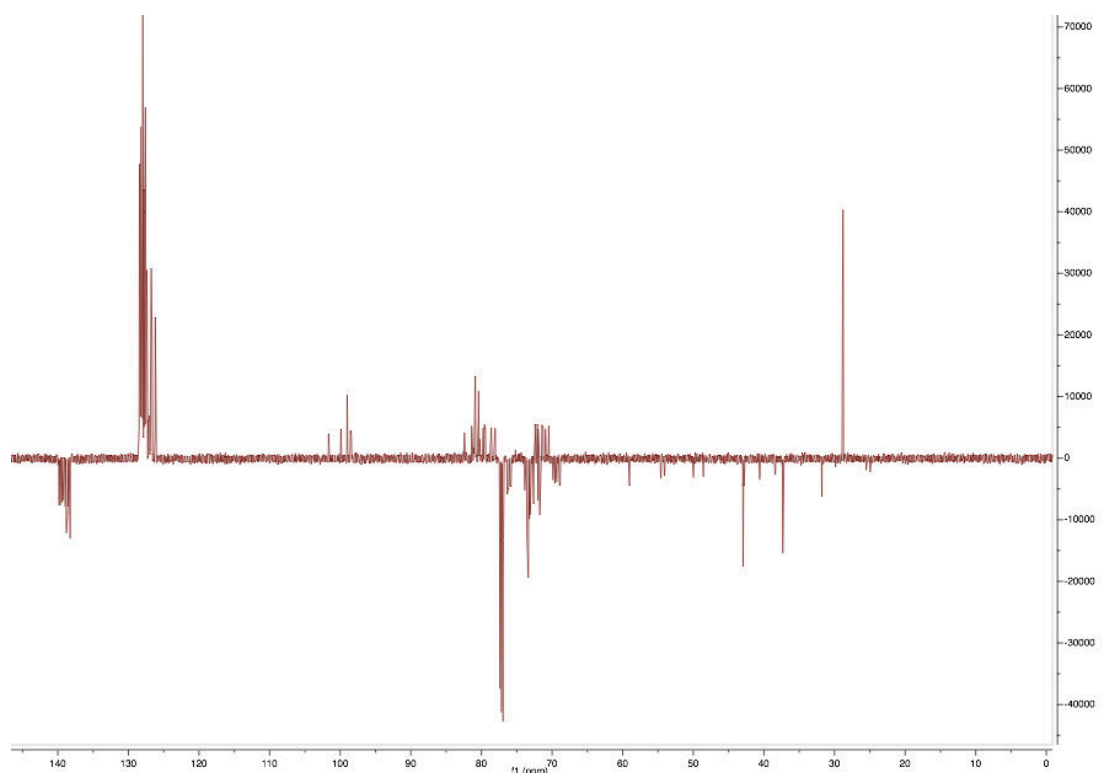
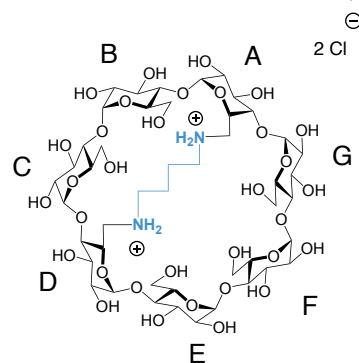


Figure 6. 10: RMN ^{13}C -Jmod (150MHz, CDCl_3 , 300 K) of compound (8)

6^A,6^D-Dideoxy-6^A,6^D-diamino-*N,N'*-butyl-*N,N'*-ammonio-
 β -cyclodextrin chlorohydrate (**9**)



Protocol: the bridged- β -cyclodextrin (**3**) (201 mg, 0.066 mmol) was dissolved in THF/H₂O (36/12ml) under argon atmosphere in a 250 ml round bottom flask. 2,2,2-trifluoroacetic acid (40 μ l, 0.520 mmol) and Pd/C (206 mg, 1.880 mmol) were added. The reaction mixture was stirred under H₂ atmosphere for 48 h. Then the mixture was purged under nitrogen, filtered through a μ -filter (0,2 μ m – polyester). The organic solvents were evaporated under vacuum and the residue was lyophilized. The crude product was purified by a reverse phase chromatography to afford a white amorphous powder.

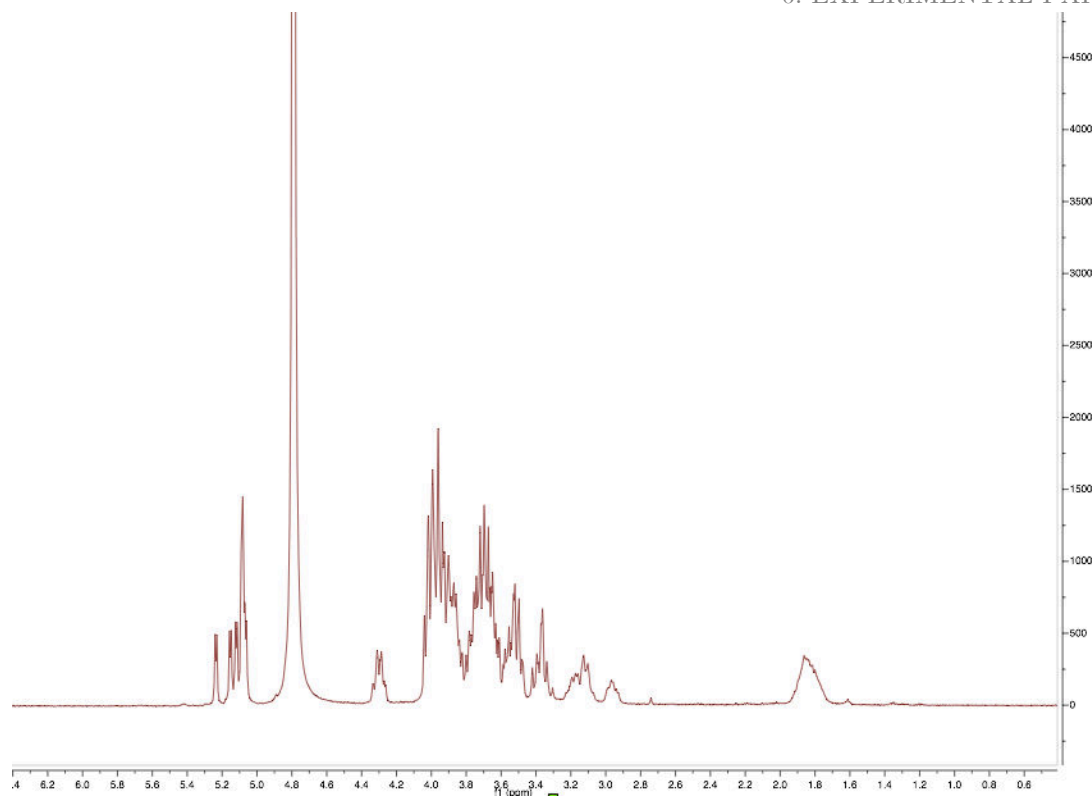
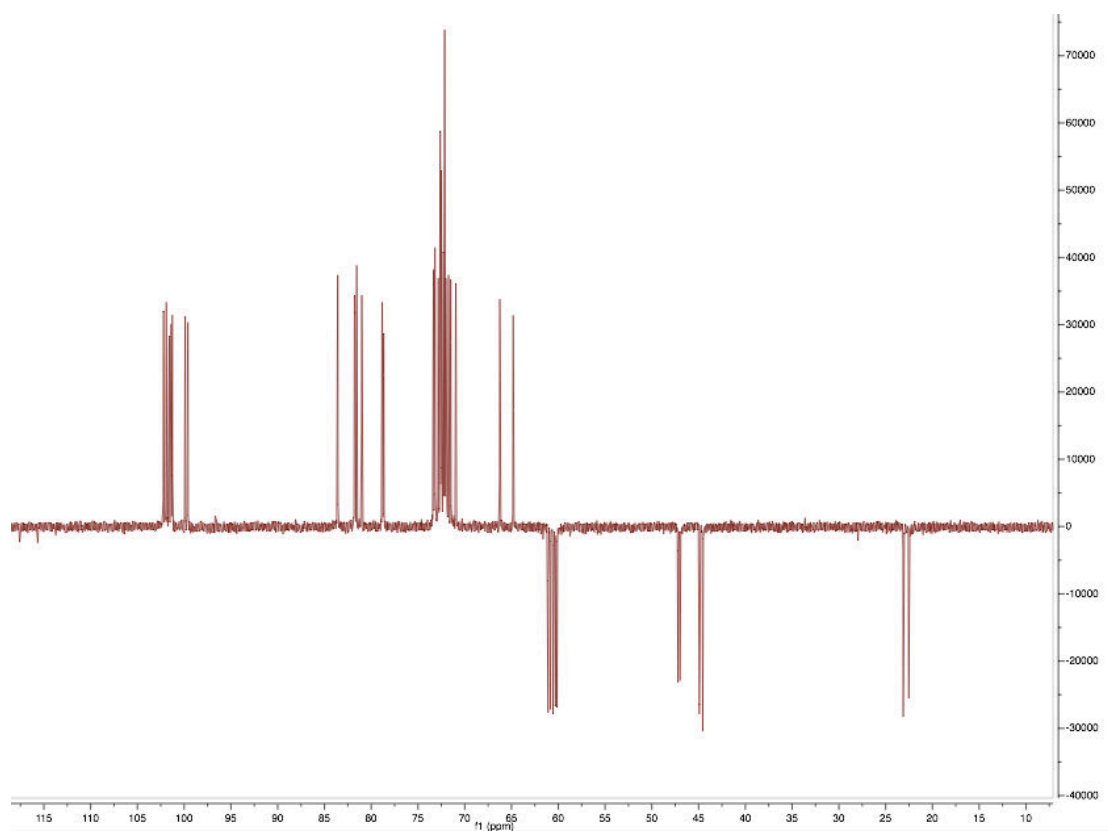
The powder was solubilized in a minimum volume of water, and eluted with water through an ion exchange column (Amberlite Cl⁻ resin). The product was lyophilized to afford the corresponding deprotected bridged- β -cyclodextrin as a white amorphous powder (**9**; 33 mg, 34 %).

RMN ¹H (600 MHz, D₂O, 300K): δ = 5.24 (d, ³*J*_{H1-H2} = 3.7 Hz, 1 H, H-1), 5.15 (d, ³*J*_{H1-H2} = 3.7 Hz, 1H, H-1), 5.12 (d, ³*J*_{H1-H2} = 3.7 Hz, 1H, H-1), 5.09-5.06 (m, 4 H, H-1), 4.33-4.28 (m, 2 H, H-5), 4.04-3.82 (m, 19 H, 7 x H-3, 5 x H-5, 7 x H-6), 3.80-3.61 (m, 11 H, 7 x H-2, 2 x H-6, 3 x H-4), 3.59-3.47 (m, 5 H, 4 x H-4, 1 x H-6), 3.42-3.31 (m, 4 H, H-6), 3.23-3.08 (m, 3 H, C_{HH}-NH), 2.96 (br. 1 H, C_{HH}-NH), 1.91-1.74 (m, 4 H, C_{HH}-CH₂-NH).

RMN ¹³C (150 MHz, D₂O, 300K): δ = 102.21 (C-1), 101.91 (C-1), 101.59 (C-1), 101.39 (C-1), 101.27 (C-1), 99.89 (C-1), 99.60 (C-1), 83.58 (C-4), 81.78 (C-4), 81.72 (C-4), 81.55 (C-4), 81.01 (C-4), 78.83 (C-4), 78.67 (C-4), 73.34, 73.22, 73.18, 72.83 (2C), 72.68, 72.62, 72.52, 72.50, 72.47, 72.28, 72.15(2C), 72.13, 72.02, 71.95, 71.74, 71.50, 70.96 (19 C, 7 x C-2, 7 x C-3, 5 x C-5), 66.25 (C-5), 64.83 (C-5), 61.09 (C-6), 60.85 (C-6), 60.56 (C-6), 60.30 (C-6), 60.14 (C-6), 47.20 (C-6), 46.99 (C-6), 44.92 (CH₂-NH), 44.56 (CH₂-NH), 23.12 (CH₂-CH₂-NH), 22.53 (CH₂-CH₂-NH).

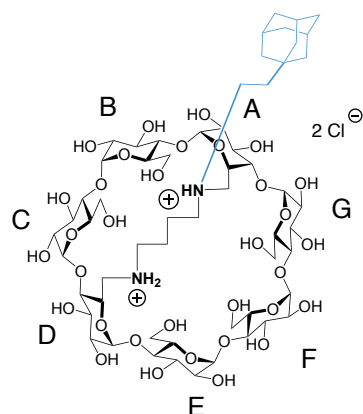
ESI-HRMS (m/z) calculated for C₄₆H₇₉N₂O₃₃ ([M + H]⁺) 1187.4560, found: 1187.4598 (err: -3.2 ppm)

[α]_D²⁰ = 110,0 (c = 1.00, H₂O)

Figure 6. 11: RMN ^1H (600MHz, D_2O , 300 K) of compound (9)Figure 6. 12: RMN ^{13}C -Jmod (150MHz, D_2O , 300 K) of compound (9)

6. EXPERIMENTAL PART

6^A,6^D-Dideoxy-6^A,6^D-diamino-*N,N'*-butyl-*N*-(ethyladamantyl)-*N'*-ammonio- β -cyclodextrin chlorohydrate (**10**)



Protocol: the bridged-mono-adamantyl- β -cyclodextrin (**5**) (101 mg, 0.033 mmol) was dissolved in THF/H₂O (18/6ml) under argon atmosphere in a 100 ml round bottom flask. TFA (20 μ l, 0.260 mmol) and Pd/C (100 mg, 0.940 mmol) were added and the reaction mixture was stirred under H₂ atmosphere for 48 h. Then the mixture was purged under nitrogen, filtered through a μ -filter (0,2 μ m – polyester). The organic solvents were evaporated under vacuum and the residue was lyophilized. The crude product was purified by a reverse phase chromatography to afford a white amorphous powder.

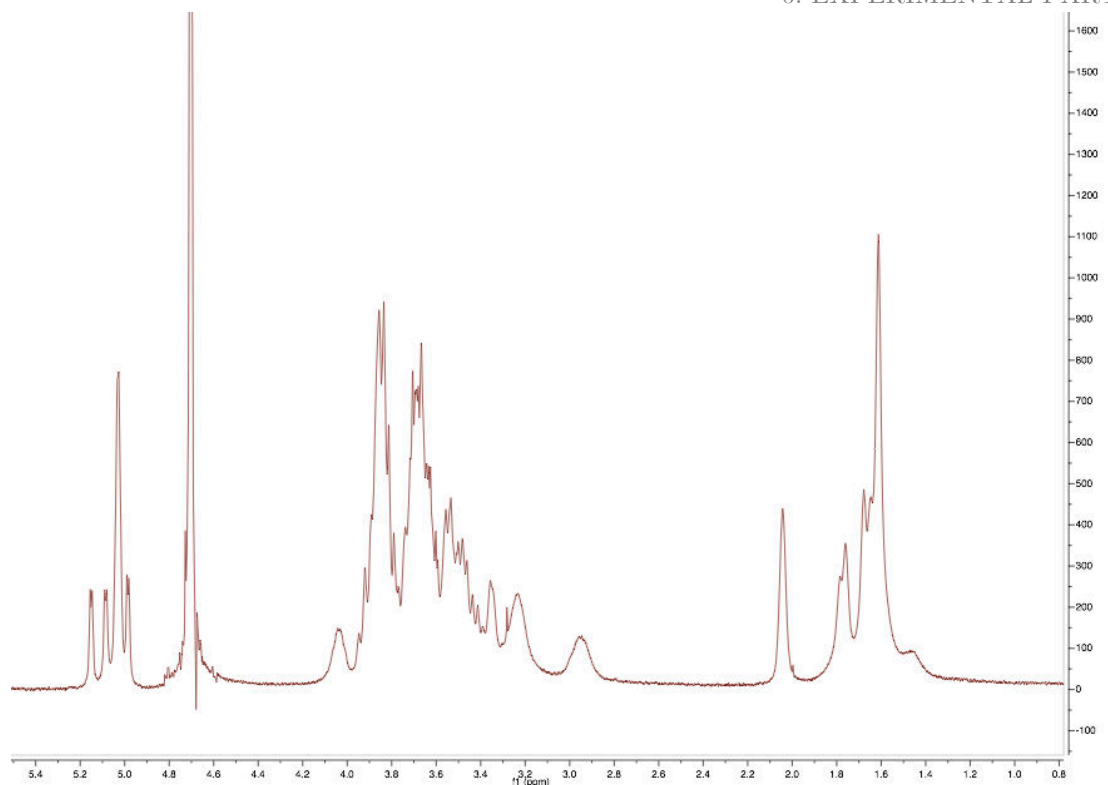
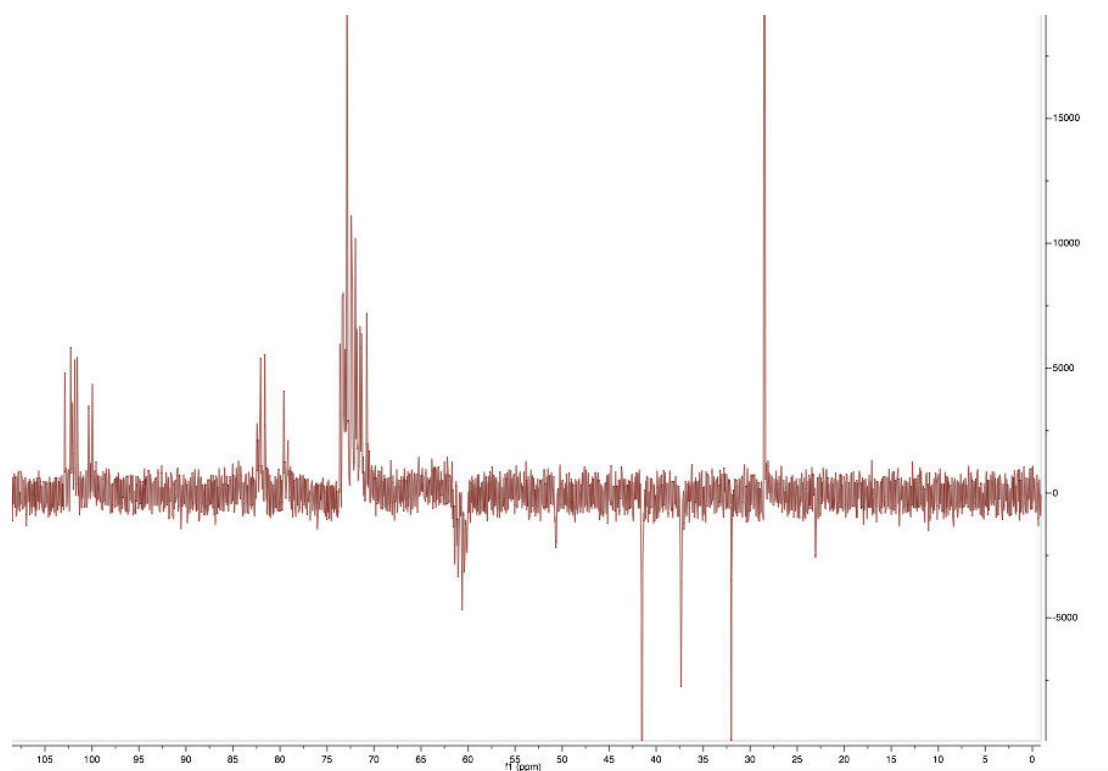
The powder was solubilized in a minimum volume of water, and eluted with water through an ion exchange column (Amberlite Cl⁻ resin). The product was then lyophilized to afford the deprotected bridged-mono-Adamantyl- β -cyclodextrin as a white amorphous powder (**10**; 21 mg, 46 %).

RMN ¹H (600 MHz, D₂O, 300K): δ = 5.19 (d, ³J_{H1-H2} = 3.5 Hz, 1 H, H-1), 5.13 (d, ³J_{H1-H2} = 3.5 Hz, 1 H, H-1), 5.08-5.05 (m, 4 H, H-1), 5.02 (d, ³J_{H1-H2} = 3.6 Hz, 1 H, H-1), 4.06 (br. 2 H, H-5), 3.99-3.79 (m, 17 H, 7 x H-3, 1 x H-5, 9 H-6), 3.77-3.62 (m, 12 H, 7 x H-2, 2 x H-6, 3 x H-4 or H-5), 3.61-3.46 (m, 7 H, 2 x H-4, 5 x H-4 or H-5), 3.41-2.95 (m 10 H, 4 x H-6, 6 x CH₂-NH), 2.09 (s, 3 H, H_b-Ad), 1.83 (br, 3 H, H_c-Ad), 1.73-1.51 (m, 15 H, 6 x H_a-Ad, 3 x H_c-Ad, 2 x CH₂-CH₂-Ada, 4 x CH₂-CH₂-NH).

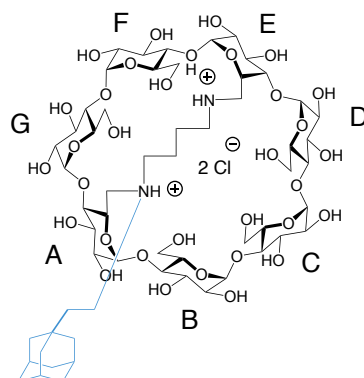
RMN ¹³C (150 MHz, D₂O, 300K): δ = 102.87 (C-1), 102.12 (2 x C-1), 101.86 (C-1), 101.53 (C-1), 100.49 (C-1), 99.97 (C-1), 84.84, 83.15, 81.90, 81.48, 79.68, 79.19, 79.12 (7 C, C-4), 73.72-70.78 (19 C, 7 x C-2, 7 x C-3, 5 x C-5), 66.24 (C-5), 65.57 (C-5), 60.37-59.82 (5 x C-6), 41.63 (3C, Ca-Ad), 37.34 (3C, Cc-Ada), 31.91 (C-quat-Ad), 28.44 (3C, Cb-Ad).

ESI-HRMS (m/z) calculated for C₅₈H₉₇N₂O₃₃ ([M + H]⁺) 1349.5968, found: 1349.5964 (err: 0.9 ppm)

[α]_D²⁰ = 85.1 (c = 0.35, H₂O)

Figure 6. 13: RMN ^1H (400MHz, D_2O , 300 K) of compound (10)Figure 6. 14: RMN ^{13}C -Jmod (100MHz, D_2O , 300 K) of compound (10)

6. EXPERIMENTAL PART

 $6^A,6^E$ -Dideoxy- $6^A,6^E$ -diamino-*N,N'*-butyl-*N*-(ethyladamantyl)-*N'*-ammonio- β -cyclodextrin chlorohydrate (**11**)


Protocol: the bridged-mono-adamantyl- β -cyclodextrin (**6**) (321 mg, 0.105 mmol) was dissolved in THF/H₂O (54/18 ml) under argon atmosphere in a 250 ml round bottom flask. TFA (95 μ l, 0.766 mmol) and Pd/C (415 mg, 4.194 mmol) were added and the reaction mixture was stirred under H₂ atmosphere for 48 h. Then the mixture was purged under nitrogen, filtered through a μ -filter (0,2 μ m – polyester). The organic solvents were evaporated under vacuum and the residue was lyophilized. The crude product was purified by a reverse phase chromatography to afford a white amorphous powder.

The powder was solubilized in the minimum volume of water, and eluted with water through an ion exchange column (Amberlite Cl⁻ resin). The product was then lyophilized to afford the deprotected bridged-mono-Adamantyl- β -cyclodextrin as a white amorphous powder (**11**; 64 mg, 43 %).

RMN ¹H (600 MHz, D₂O, 300K): δ = 5.23-5.10 (m, 7 H, H-1), 4.20-2.84 (m, 48 H, 7 x H-2, 7 x H-3, 7 x H-4, 7 x H-5, 14 H-6, 6 x C_{HH}-NH), 2.16 (s, 3 H, Hb-Ad), 1.91-1.51 (m, 18 H, 6 x Hc-Ad, 6 x Ha-Ad, 2 x C_{HH}-CH₂-Ad, 4 x C_{HH}-CH₂-NH).

RMN ¹³C (150 MHz, D₂O, 300K): δ = 102.45-99.51 (7 x C-1), 83.61-79.11 (7 x C-4), 73.92-70.64 (7 x C-2, 7 x C-3, 7 x C-5), 61.50-59.75 (5 x C-6), 41.60 (3C, Ca-Ad), 37.28 (3C, Cc-Ad), 31.74 (C-quat-Ad), 28.31 (3C, Cb-Ad).

ESI-HRMS (m/z) calculated for calculated for C₅₈H₉₇N₂O₃₃ ([M + H]⁺) 1349.6005, found: 1349.5968 (err: -3.7 ppm)
[α]_D²⁰ = 68.1 (c = 0.63, H₂O)

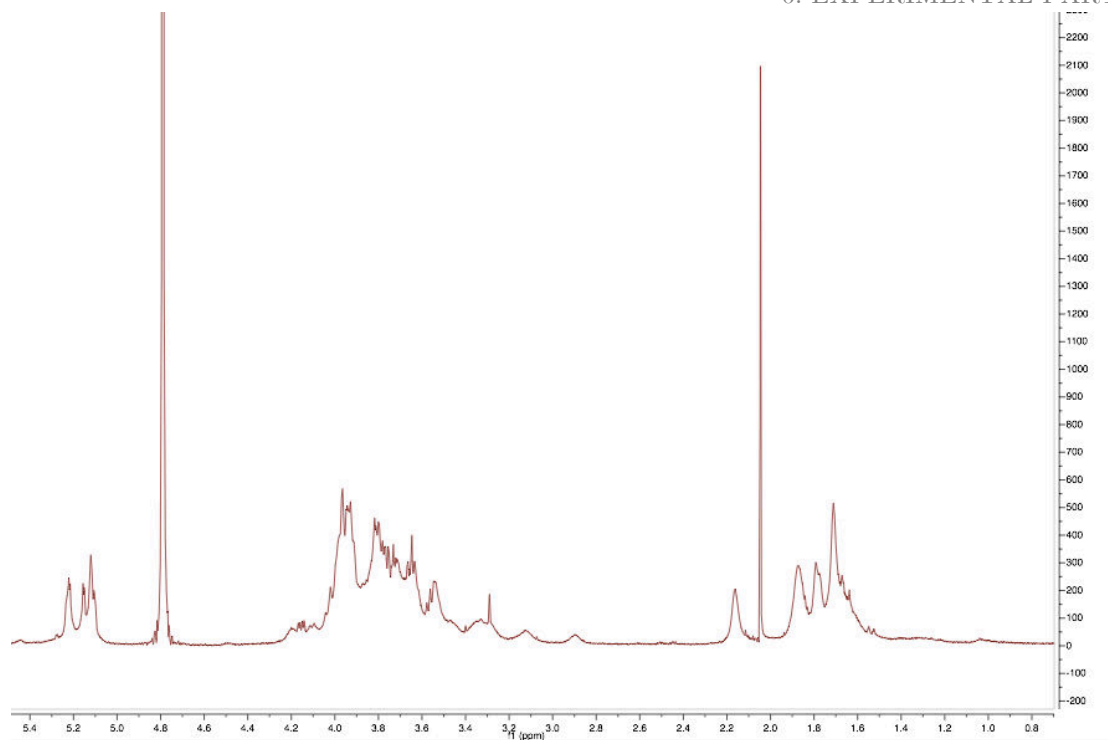


Figure 6. 15: RMN ^1H (600MHz, D_2O , 300 K) of compound (11)

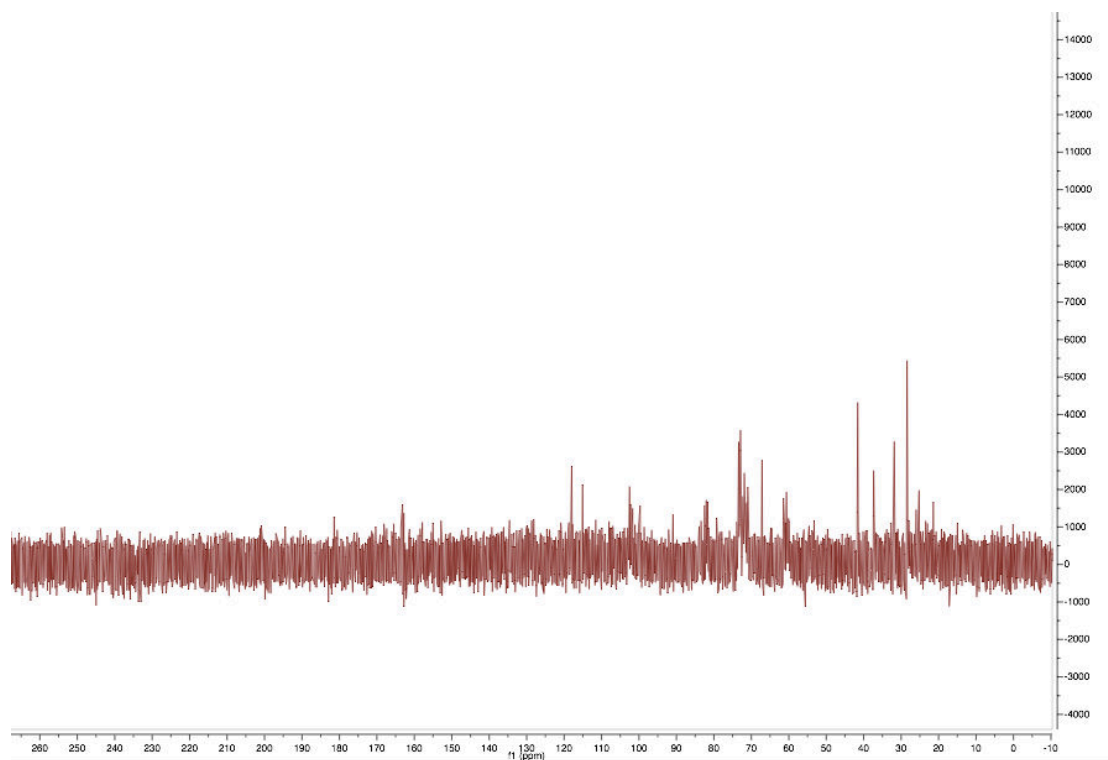
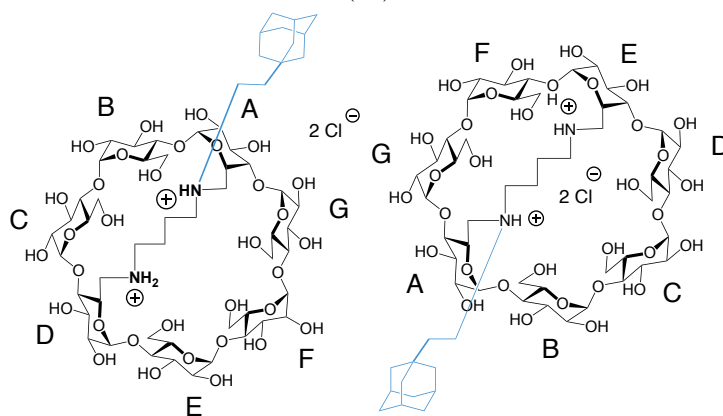


Figure 6. 16: RMN ^{13}C (100MHz, D_2O , 300 K) of compound (11)

6. EXPERIMENTAL PART

Mixture of
 $6^A,6^E$ -Dideoxy- $6^A,6^E$ -diamino-*N, N'*-butyl-*N*-(ethyladamantyl)-*N'*-ammonio- β -cyclodextrin chlorohydrate (65%) and
 $6^A,6^E$ -Dideoxy- $6^A,6^E$ -diamino-*N, N'*-butyl-*N*-(ethyladamantyl)-*N'*-ammonio- β -cyclodextrin chlorohydrate (35%)
 (12)



Protocol: The mixture (7) (0.065mmol, 0.200g) was dissolved in distilled THF (36ml)/H₂O (12ml) under argon atmosphere. TFA (0.523mmol, 0.060g) and Pd/C (1.960mmol, 0.209g) were added and the reaction mixture was stirred under H₂ atmosphere for 48 h. Then the mixture was purged under nitrogen, filtered through a μ -filter (0,2 μ m – polyester). The organic solvents were evaporated under vacuum and the residue was lyophilized. The crude product was purified by a reverse phase chromatography to afford a white amorphous powder.

The powder was solubilized in the minimum volume of water, and eluted with water through an ion exchange column (Amberlite Cl⁻ resin). The product was then lyophilized to afford the corresponding deprotected bridged-mono-Adamantyl- β -cyclodextrin as a white amorphous powder (12; 43.5 mg, 43 %).

RMN ¹H (600 MHz, D₂O, 300K): δ = 5.13-5.00 (m, 14 H, H-1), 4.05-3.47 (m, 76 H 14 x H-2, 14 x H-3, 14 x H-4, 14 x H-5, 20 x H-6), 3.35-2.91 (m, 20 H, 8 x H-6, 12 x *CHH*-NH), 2.06 (br, 6 H, H_b-Ad), 1.78-1.47 (m, 36 H, 12 x H_a-Ad, 12 x H_c-Ad, 4 x *CHH*-CH₂-Ad, 8 x *CHH*-CH₂-NH).

ESI-HRMS (m/z) calculated for C₅₈H₉₇N₂O₃₃ ([M + H]⁺) 1349.5968, found: 1349.5996 (err: -2.1 ppm)

[α]_D²⁰ = -1.9 (c = 0.105, H₂O)

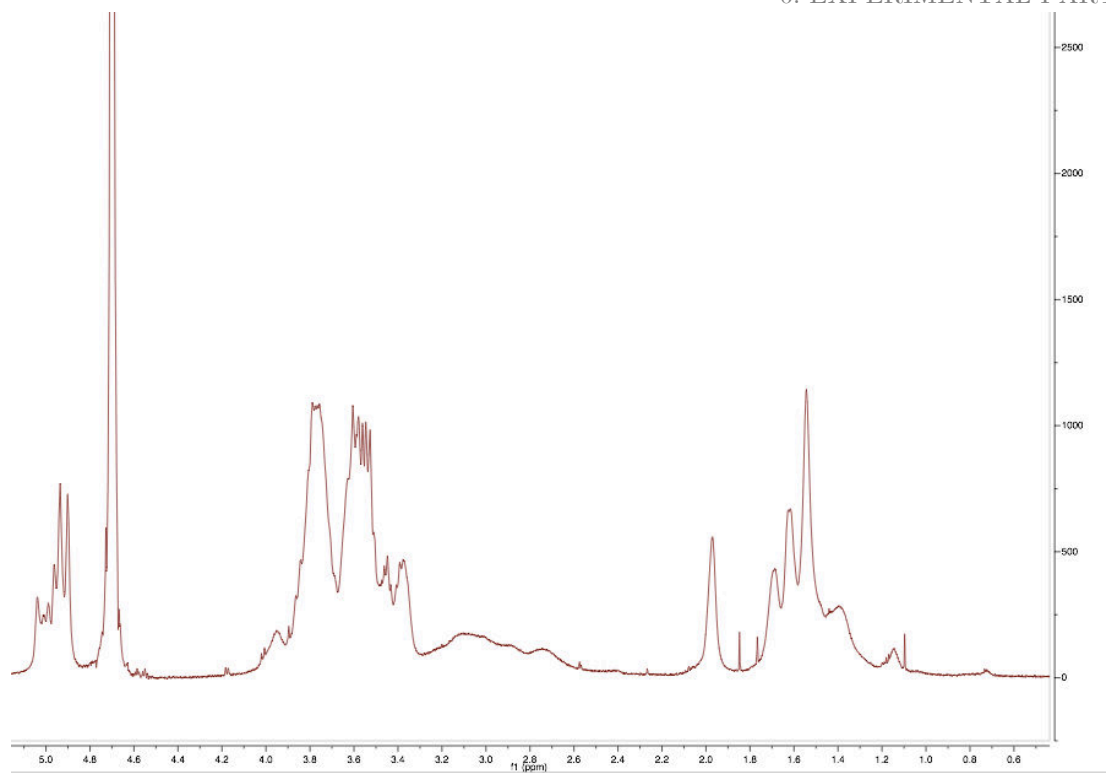
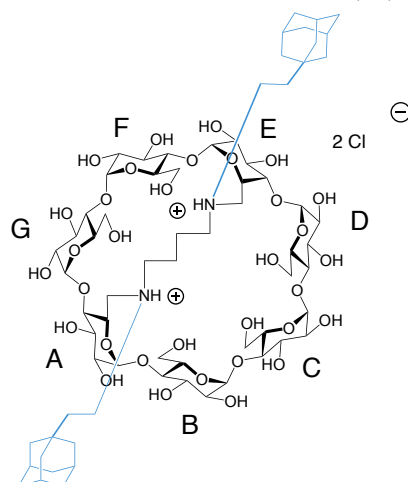


Figure 6. 17: RMN ^1H (600MHz, D_2O , 300 K) of compound of mixture (12)

6. EXPERIMENTAL PART

6^A,6^E-Dideoxy-6^A,6^E-diamino-*N,N'*-butyl-*N*-(ethyladamantyl)-*N'*-(ethyladamantyl)- β -cyclodextrin-chlorohydrate (**13**)



Protocol: the bridged- β -cyclodextrin-bis-adamantyl (**8**) (325 mg, 0.101 mmol) was dissolved in THF/H₂O (54/18ml) under argon atmosphere in a 250 ml round bottom flask. TFA (57 μ l, 0.744 mmol) and Pd/C (297 mg, 2.791 mmol) were added and the reaction mixture was stirred under H₂ atmosphere for 48 h. Then the mixture was purged under nitrogen, filtered through a μ -filter (0,2 μ m – polyester). The organic solvents were evaporated under vacuum and the residue was lyophilized. The crude product was purified by reverse phase chromatography to afford a white amorphous powder.

The powder was solubilized in the minimum volume of water, and eluted with water through an ion exchange column (Amberlite CF resin). The product was lyophilized to afford the deprotected bridged- β -cyclodextrin-bis-adamantyl as a white amorphous powder (113 mg, 78 %)

RMN ¹H (600 MHz, D₂O, 300K): δ = 5.29 (br. 1 H, H-1), 5.26 (br. 1 H, H-1), 5.24 (br. 1 H, H-1), 5.21 (br. 1 H, H-1), 5.18 (m, 2 H, H-1), 5.16 (br. 1 H, H-1), 4.13-3.55 (m, 42 H, 7 H-2, 7 H-3, 7 H-4, 7 H-5, 14 H-6), 3.52-3.13 (m, 8 H, CH₂-CHH-N), 2.14 (s, 6 H, Hb-Ad), 1.99-1.37 (m, 32 H, 12 x Ha-Ad, 12 x Hc-Ad, 4 x CHH-CH₂-Ad, 4 x CHH-CH₂-NH).

RMN ¹³C (150 MHz, D₂O, 300K): δ = 102.70 (C-1), 102.29 (C-1), 102.10 (C-1), 101.90 (C-1), 101.50 (C-1), 100.60 (C-1), 99.66 (C-1), 84.45, 82.36, 82.25, 81.54, 81.47, 79.37, 79.16 (7 x C-4), 73.70-70.70 (21C, 7 x C-2, 7 x C-3, 7 x C-5), 61.44-60.10 (5 x C-6), 41.60 (6 x Ca-Ad), 36.68 (6 x Cc-Ad), 33.50 (2 x C-quat-Ad), 28.31 (6 x Cb-Ad).

ESI-HRMS (m/z) calculated for calculated for C₇₀H₁₁₅N₂O₃₃ ([M + H]⁺) 1511.7377, found: 1511.7427 (err: -5.0 ppm)

$[\alpha]_D^{20}$ = -184.1 (c = 0.40, H₂O)

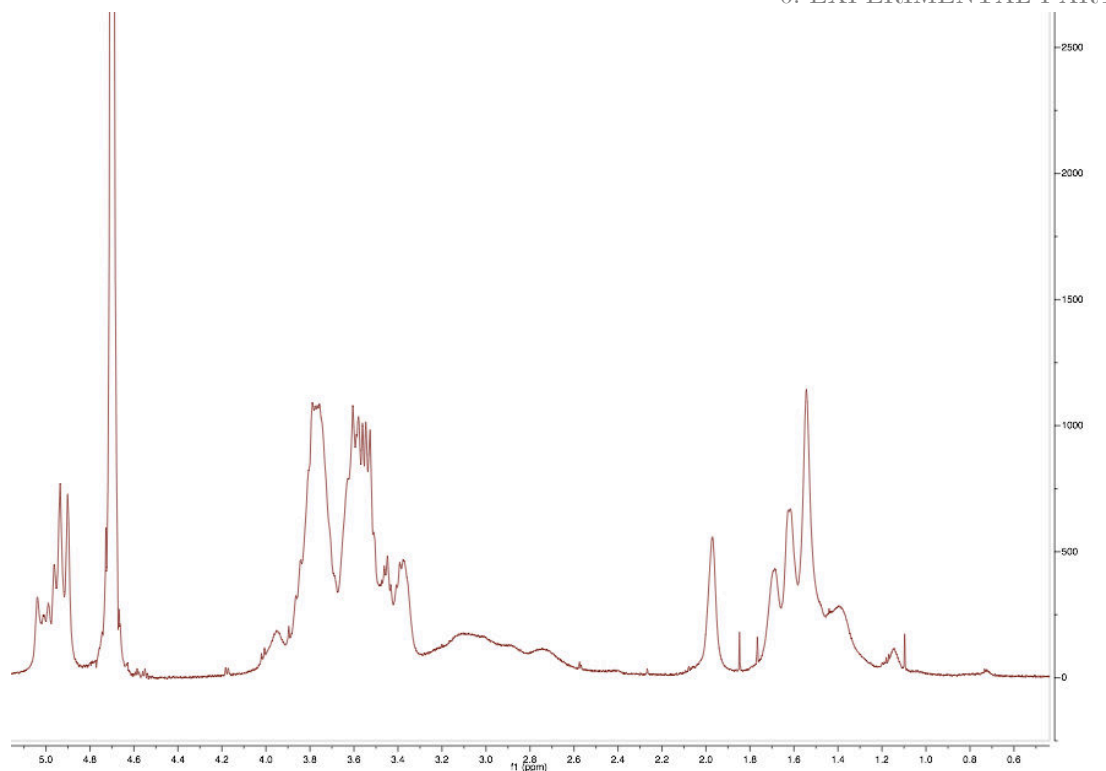


Figure 6. 18: RMN ^1H (600MHz, D_2O , 300 K) of compound of compound (13)

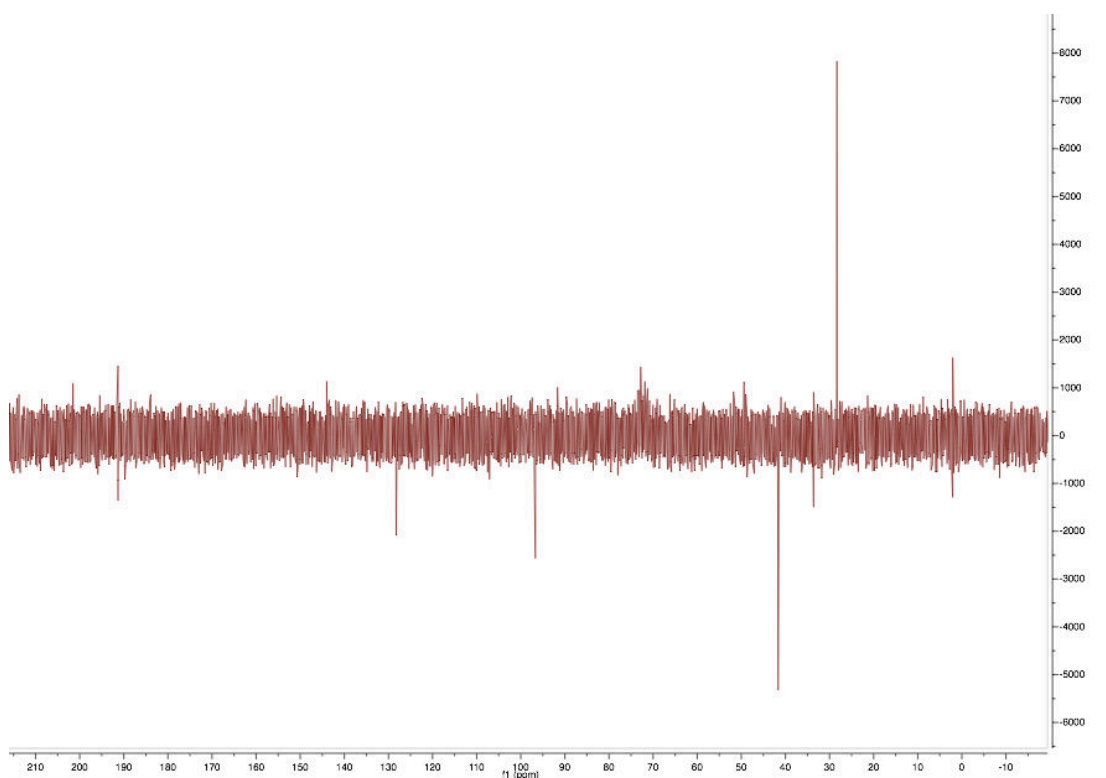
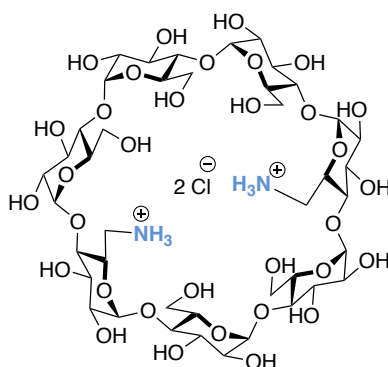


Figure 6. 19: RMN ^{13}C -Jmod (150MHz, D_2O , 300 K) of compound (13)

6. EXPERIMENTAL PART

6^A,6^Ddiamino- β -cyclodextrin (**14**)

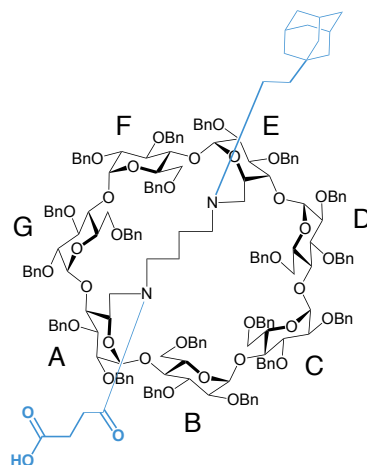


Protocol: The diazido- β -cyclodextrin (150 mg, 0.052 mmol) was dissolved in THF/H₂O (18/6 ml) under argon atmosphere in a 100 ml round bottom flask. 2,2,2-trifluoroacetic acid (31 μ l, 0.41 mmol) and Pd/C (137 mg, 1.294 mmol) were added and the reaction mixture was stirred under H₂ atmosphere for 48 h. Then the mixture was purged under nitrogen, filtered through a μ -filter (0,2 μ m – polyester). The organic solvent was evaporated under vacuum and the residue was lyophilized. The crude product was purified by reverse phase chromatography to afford a white amorphous powder.

The powder was solubilized in the minimum volume of water, and eluted with water through an ion exchange column (Amberlite CF resin). The product was lyophilized to afford the deprotected product as a white amorphous powder (**14**; 43 mg, 61 %).

The structure of the product was confirmed by comparison with the literature.⁴

6^A,6^D-Dideoxy-6^A,6^D-diamino-*N,N'*-butyl-*N*-(ethyladamantyl)-*N'*-4-oxobutanoic acid-2^{A-G},3^{A-G},6^{B-C}; E-G-nonadeca-*O*-benzyl- β -cyclodextrin (**15**)



Protocol: the bridged-mono-adamantyl- β -cyclodextrin (**6**) (400 mg, 0.131 mmol) was dissolved in DMF (5ml) under argon atmosphere. Dihydrofuran-2,5-dione (40 mg, 0.40 mmol) and DIPEA (112 μ l, 660 mmol) were added. Solution was heated at 180°C under microwaves during 1 h

Et₂O and water were added, layers were separated. The aqueous layer was extracted with Et₂O (2x100 ml). Organic layers were combined, washed with NaHSO₄ (1M, 100 ml), brine (100 ml) dried with MgSO₄ and concentrated. The resulting crude product was purified with a silica combi flash column and eluted with Cyclohexane/EtOAc (9:1) and Acetic acid (1%) to afford the oxobutanoic-bridged-mono-adamantyl- β -cyclodextrin (**15**; 131 mg, 32 %). Two conformers are observed. The chemical shifts of the major one are reported, ratio conformers cis/trans (7:3)

RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃, 300K): δ = 7.41-6.81 (m, 95 H, *H*-Ar), 6.02 (d, ³*J*_{H1-H2} = 3.8 Hz, 1 H, H-1), 5.81 (d, ³*J*_{H1-H2} = 3.0 Hz, 1 H, H-1), 5.55 (d, ²*J* = 11.9 Hz, 1 H, *CHH*-Ph), 5.35 (d, ²*J* = 11.9 Hz, 1 H, *CHH*-Ph), 5.31-5.29 (m, 2 H, *CHH*-Ph), 5.21 (d, ³*J* = 11.9 Hz, 1 H, *CHH*-Ph), 5.07-5.04 (m, 2 H, 1 x H-3, 1 x H-1), 4.99 (d, ²*J* = 11.9 Hz, 1 H, *CHH*-Ph), 4.94-4.92 (m, 2 H, 1 x *CHH*-Ph, 1 x H-1), 4.89-4.87 (m, 2 H, 1 x *CHH*-Ph, 1 x H-1), 4.82-4.57 (m, 12 H, 1 x H-4 or H-5, 2 x H-1, 9 x *CHH*-Ph), 4.54-4.15 (m, 26 H, 1 x H-3, 1 x H-4 or H-5, 2 x H-6, 21 x *CHH*-Ph), 4.09-3.89 (m, 9 H, 4 x H-3, 4 x H-4 or H-5, 1 x H-6), 3.89-3.76 (m, 9 H, 1 x H-3, 3 x H-6, 5 x H-4 or H-5), 3.75-3.64 (m, 2 H, 1 x H-2, 1 x H-6), 3.63-3.53 (m, 2 H, 1 x H-4 or H-5, 1 x H-6), 3.50-3.44 (m, 6 H, 3 x H-2, 1 x H-4, 2 x H-6), 3.38-3.30 (m, 3 H, H-2), 3.11 (t, ³*J*_{H4-H3} = ³*J*_{H4-H5} = 9.6 Hz, 1 H, H-4), 3.08-3.03 (br. 3 H, 2 x H-6, 1 x *CHH*-NH or *CHH*-C=O), 2.92-2.84 (br. 2 H, *CHH*-NH or *CHH*-C=O), 2.75 (br. 1 H, H-6), 2.68-2.56 (br. 3 H, *CHH*-NH or *CHH*-C=O), 2.52-2.40 (br. 2 H, *CHH*-NH or *CHH*-C=O), 2.34-2.32 (br. 1 H, *CHH*-NH or *CHH*-C=O), 2.16-2.12 (m, 1 H, H-6), 2.01-1.96 (br. 1 H, *CHH*-NH or *CHH*-C=O), 1.89 (s, 3 H, Hb-Ad), 1.68-1.57 (m, 8 H, 6 x Hc-Ad, 2 x *CHH*-CH₂-NH), 1.47-1.42 (m, 8 H, 6 x Ha-Ad, 2 x *CHH*-CH₂-NH), 1.28 (br. 2 H, 2 x *CHH*-CH₂-NH).

RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃, 300K): δ = 173.44 (C-quat-carbonyl), 170.36 (C-quat-carbonyl), 139.97-137.47 (19 x C-quat-Ar), 128.68-126.17 (95 C, *CH*-Ar), 101.44 (C-1), 101.17 (C-1), 99.83 (C-1), 97.57 (C-1), 97.24 (C-1), 96.6 (C-1), 95.53 (C-1), 85.83 (C5), 83.01(C-4 or C-5), 82.57(C-4 or C-5), 81.85 (C-3), 81.20 (C-2), 81.16 (C-3), 80.97 (2C, 1 x C-3, 1 x C-4 or C-5), 80.63 (2 x C-3), 80.31(C-3), 80.21 (C-4 or C-5), 79.85 (C-2), 79.81 (C-4 or C-5), 79.66 (C-3), 79.37 (C-2), 79.30 (C-2), 79.17 (C-4 or C-5), 78.76 (C-2), 78.72 (C-2), 77.98 (C-2), 76.79-75.35 (5 C, CH₂-Ph), 74.65 (C-4 or C-5), 74.45 (CH₂-Ph), 74.38 (C-4 or C-5), 73.88-73.34 (5 C, CH₂-Ph), 73.21 (C-4 or C-5), 73.13 (2 x CH₂-Ph), 73.09 (C-4 or C-5), 73.05-72.18 (6 C, C-4 or C-5, 5 x CH₂-Ph), 71.50 (C-4 or C-5), 70.47 (CH₂-Ph), 70.40 (C-4 or C-5), 70.20 (C-4 or C-5), 69.67-68.87 (5 x H-6), 57.88 (C-6), 53.36 (CH₂-NH or CH₂-C=O), 48.72 (CH₂-NH or CH₂-C=O), 46.62 (C-6), 43.43 (CH₂-NH or CH₂-c=O), 42.46 (5 C, 3 x Ca-Ad, 2 x CH₂-NH or CH₂-C=O), 37.36 (3 x Cc-Ad), 33.62 (CH₂-NH or CH₂-C=O), 31.65 (C-quat-Ad), 28.90 (3 x Cb-Ad), 28.87 (CH₂-NH or CH₂-C=O).

ESI-HRMS (m/z) calculated for C₁₉₅H₂₁₅N₂O₃₆ (M + H⁺) 3160.5049, found: 3160.5155 (err: -3.4 ppm)

6. EXPERIMENTAL PART

$[\alpha]_D^{20} = +12.6$ (c = 1.50, DCM)

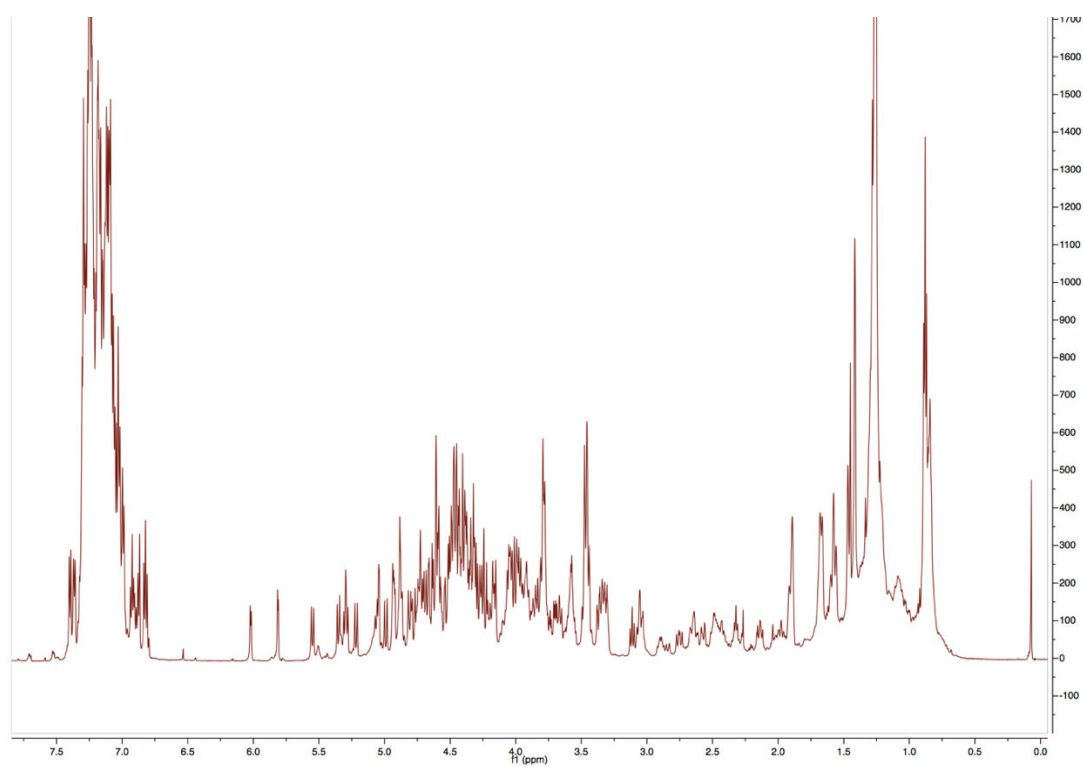


Figure 6. 20: RMN ^1H (600MHz, CDCl_3 , 300 K) of compound (15)

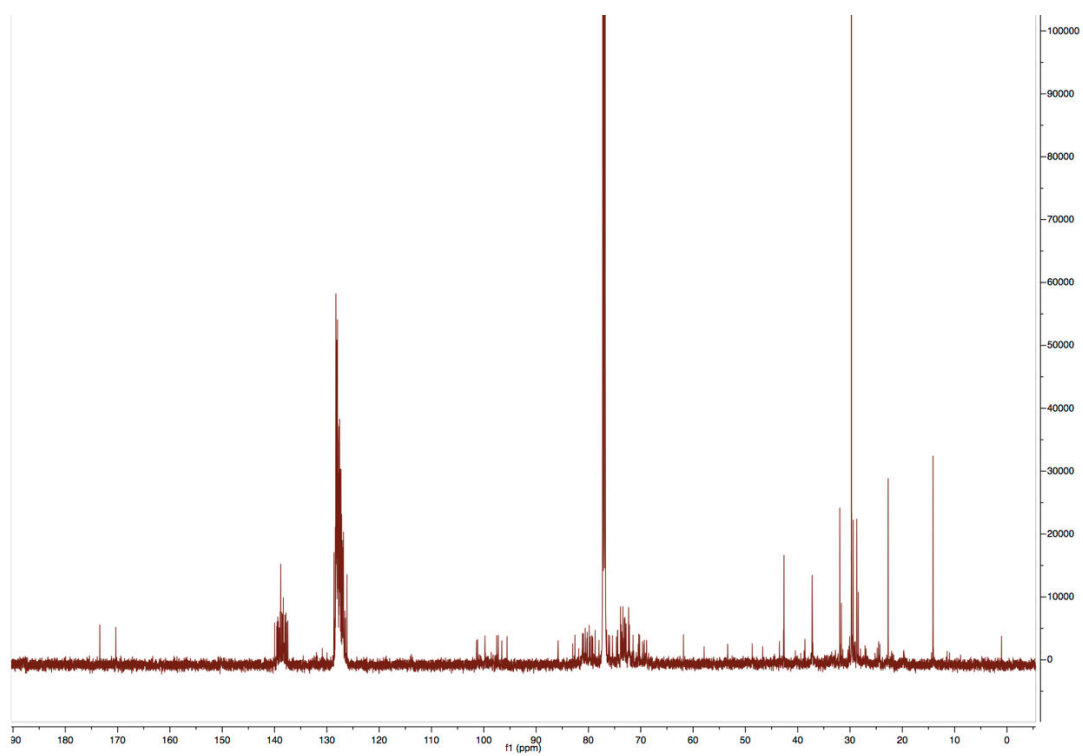
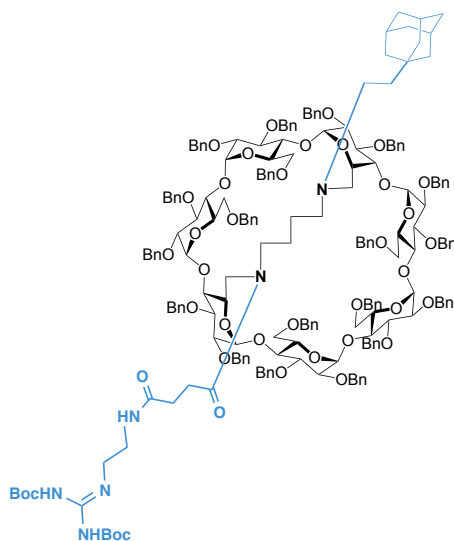


Figure 6. 21: RMN ^{13}C (150MHz, CDCl_3 , 300 K) of compound (15)

6^A,6^D-Dideoxy-6^A,6^D-diamino-*N,N*-butyl-*N*-(ethyladamantyl)-*N*'-succinamide-(2-ethyl)-
1,3-di-Boc-guanidine
2^{A-G},3^{A-G},6^{B-C}; E-G-nonadeca-*O*-benzyl- β -cyclodextrin (**16**)



Protocol: the oxobutanoic-bridged-mono-adamantyl- β -cyclodextrin (**15**) (69 mg, 0.022 mmol) was dissolved in DMF (5ml) under argon atmosphere. DIPEA (19 μ l, 0.109 mmol), and HATU (6 mg, 0.024 mmol) were added. Solution was stirred for 15 minutes and 2-(2-aminoethyl)-1,3-di-Boc-guanidine (10 mg, 0.033 mmol) was added and the solution was stirred overnight.

Et₂O (50 ml) and water (100 ml) were added, layers were separated. The aqueous layer was extracted with Et₂O (2x100 ml). Organic layers were combined, washed with saturated NaHCO₃ (100 ml) solution, brine (100 ml) and dried with MgSO₄ and concentrated. The resulting crude product was purified with a silica gel column chromatography and eluted with Cyclohexane/EtOAc (1:1) to afford the expected product. (**16**; 54 mg; 71 %).

RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆, 360K): δ = 7.42-7.11 (m, 95 H, *H*-Ar), 5.42 (br. 1 H, H-1), 5.37 (br. 1 H, H-1), 5.32 (br. 1 H, H-1), 5.15 (br. 2 H, H-1), 5.09-5.07 (br. 3 H, 2 x H-1, 1 x *CHH*-Ph), 5.00-4.97 (m, 1 H, *CHH*-Ph), 4.87-4.43 (m, 35 H, 34 x *CHH*-Ph, 1 x H-6), 4.36 (*CHH*-Ph), 4.32 (*CHH*-Ph), 4.21-4.13 (m, 3 H, 2 x H-5, 1 x H-6), 4.10-4.02 (m, 7 H, 4 x H-3, 2 x H-4 or H-5, 1 x H-6), 4.00-3.83 (m, 14 H, 2 x H-3, 8 x H-4 or H-5, 4 x H-6), 3.81-3.74 (br. 2 H, 1 x H-2, 1 x H-3), 3.71-3.61 (m, 6 H, 1 x H-2, 2 x H-4 or H-5, 3 x H-6), 3.56-3.43 (m, 5 H, H-2), 3.21-2.92, 2.69-2.32 (4 x *CHHC*=O, 2 x *CHH*-Guanidine, 2 x *CHH*-NHC=O, 4 x H-6, 6 x *CHH*-NH), 1.95 (s, 3 H, Hb-Ada), 1.75-1.64 (m, 6 H, Hc-Ada), 1.50 (s, 6 H, Ha-Ada), 1.33-1.19 (m, 22 H, 18 x (CH₃)₃C=O, 4 x *CHH*-CH₂-NH).

RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃, 360K): δ = 139.12-137.52 (19 x C-quat-Ar), 126.44-125.92 (95 C, CH-Ar), 98.67 (C-1), 97.95 (C-1), 97.79 (C-1), 97.23 (C-1), 97.05 (C-1), 96.79 (C-1), 96.74 (C-1), 85.83 (C-5), 83.01 (C-4 or C-5), 80.02-76.99 (21 C, 7 x C-2, 7 x C-3, 7 x C-4 or C-5), 74.43-70.83 (23 C, 19 x CH₂-Ph, 4 x C-4 or C-5), 69.48-67.93 (6C, 1 x C-4 or C-5, 5 x C-6), 56.47-59.17 (5C, 2 x C-6, 3 x CH₂-NH), 41.53 (3C, Ca-Ad), 40.37-37.66 (4C, 2 x CH₂-C=O, 1 x CH₂-NHC=O, 1x CH₂-Guanidine), 36.04 (3C, Cc-Ad), 30.80 (6 C, (CH₃)₃C=O), 27.54 (3C, Cb-Ad), 29.89-28.20 (3C, *CHH*-CH₂-NH).

ESI-HRMS (m/z) calculated for C₂₀₈H₂₃₉N₆O₃₉ ([M + H]⁺) 3444.6897, found: 3444.6919 (err: -0.6 ppm)

[α]_D²⁰ = + 11.1 (c = 0.40, DCM)

6. EXPERIMENTAL PART

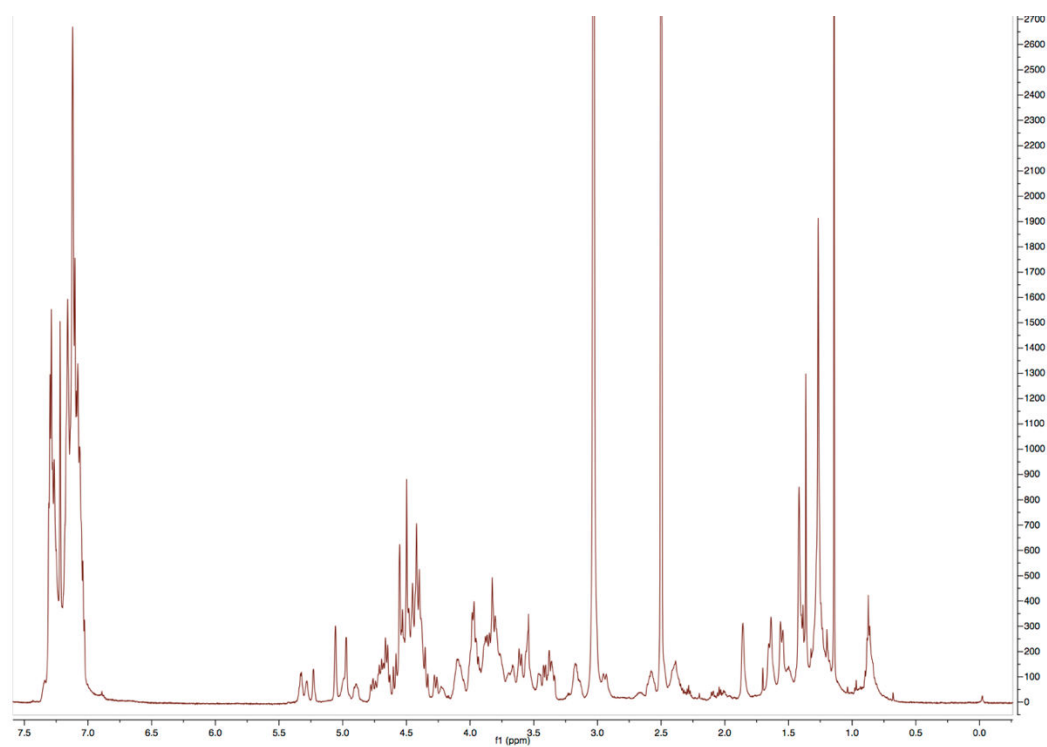


Figure 6. 22: RMN ^1H (600MHz, DMSO- d_6 , 360 K) of compound (16)

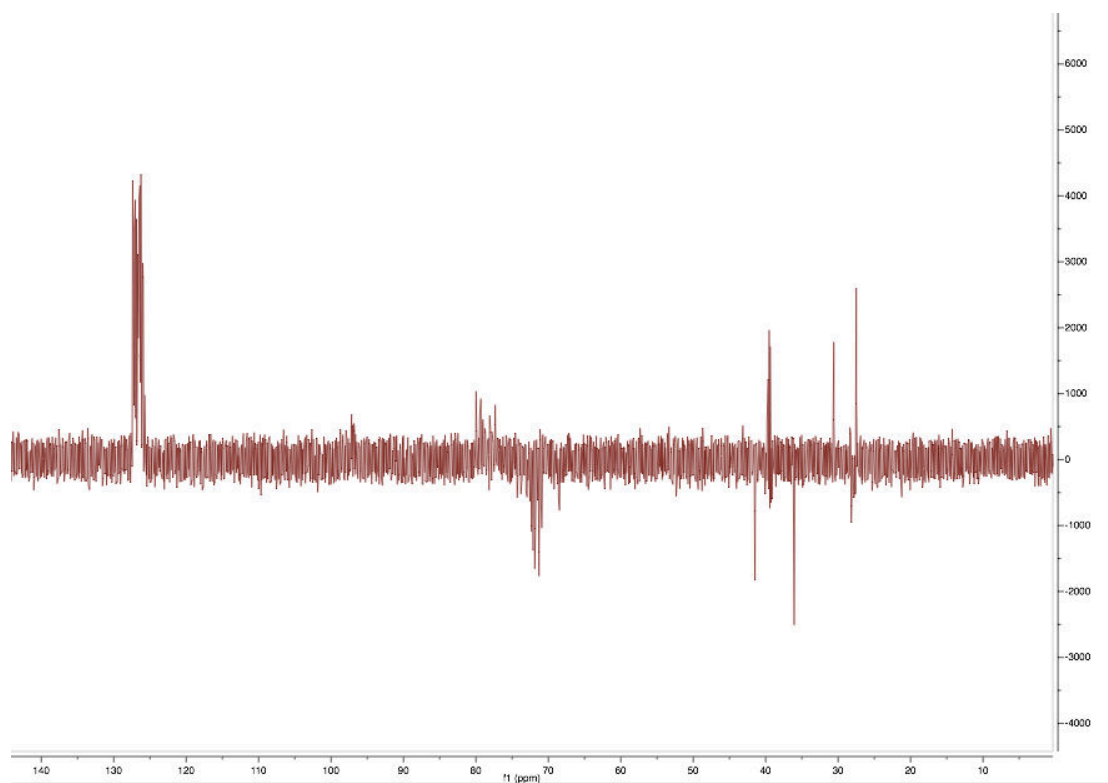
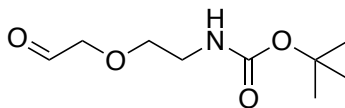


Figure 6. 23: RMN ^{13}C (150MHz, DMSO- d_6 , 360 K) of compound (16)

Carbamic acid, [2-(2-oxoethoxy)ethyl]-, 1,1-dimethylethyl ether (**17**)



Protocol: To a solution of 2-(2-Aminoethoxy)ethanol (3g, 28.571 mmol) in DCM (100ml) and Et₃N (4ml) was added di-tert-butyl dicarbonate (5.2g, 31.4 mmol) at room temperature. The solution was stirred overnight. The reaction was quenched with saturated NH₄Cl (100 ml) at 0 °C and extracted with diethyl ether (2 x 100 ml), washed with a saturated NaHCO₃ solution (100 ml), brine (100 ml), dried over MgSO₄ and concentrated. The resulting crude product was purified with a silica gel column and eluted with Cyclohexane/EtOAc (8:2), to afford the expected protected amine.

Then the intermediate obtained was dissolved in DCM (100 ml). Tempo and iodobenzene diacetate were added, and the solution was stirred for 2 hours. Saturated solution of Na₂S₂O₃ (100 ml) was added and the aqueous layer was extracted with DCM (100 ml). The combined organic layers were washed with a saturated solution of NaHCO₃ (100 ml), brine (100 ml), dried with MgSO₄, and concentrated under vacuum. The resulting crude product was purified with a silica gel column and eluted with petroleum ether/EtOAc (9:1 then 6:4), to afford the Carbamic acid, [2-(2-oxoethoxy)ethyl]-, 1,1-dimethylethyl ether (**17**; 1.8 g, 31 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, 300K): 3.94-3.90 (m, 2 H, O-*CHH*-CH₂-NH, CHO-*CHH*-O), 3.63-3.49 (m, 4 H, 1 x O-*CHH*-CH₂-NH, 2 x O-CH₂-*CHH*-NH, 1 x CHO-*CHH*-O), 3.35 (br. 1 H, NH), 1.48 (s, 9 H, H-Boc).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, 300K): δ = 81.17 (C-quat-Boc), 70.60 (2 C, O-CH₂-CH₂-NH, O-CH₂-CH₂-NH), 66.56 (CHO-CH₂-O), 28.45 (3C, (CH₃)₃).

ESI-HRMS (m/z) calculated for C₉H₁₆NO₄Na ([M + Na]⁺) 226.1050, found: 226.1040 (err: 4.4 ppm)

[α]_D²⁰ = + 1.5 (c = 0.266, DCM)

6. EXPERIMENTAL PART

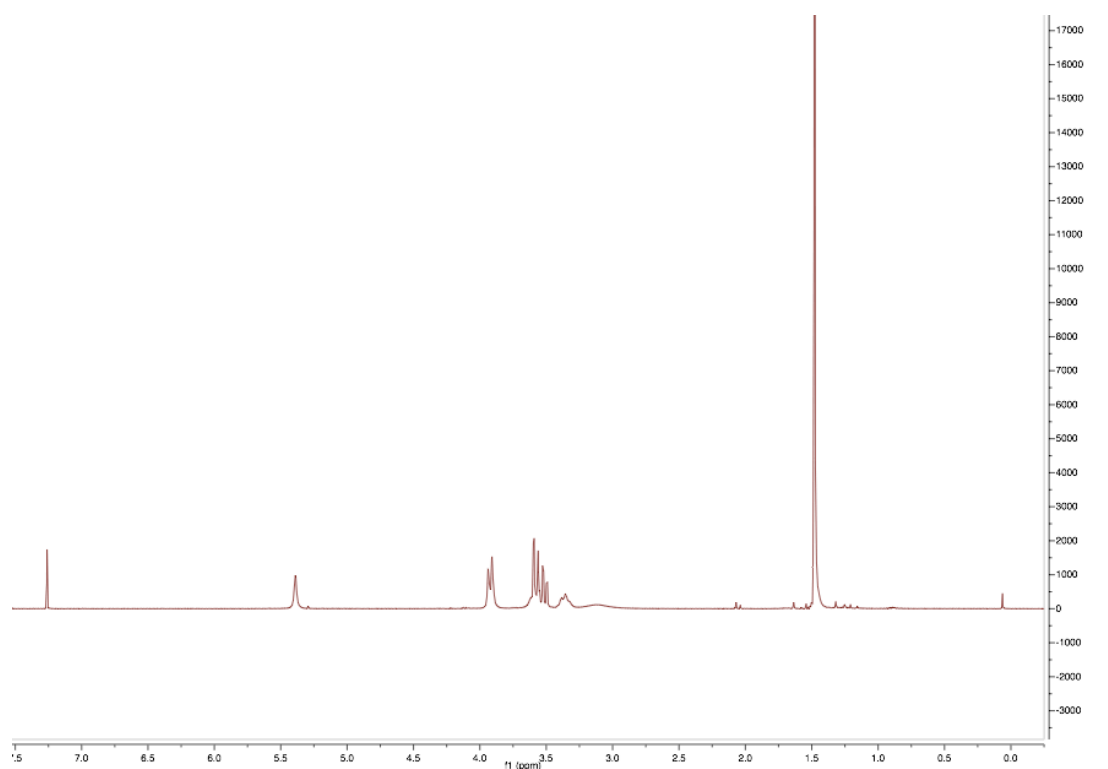


Figure 6. 24: RMN ^1H (400MHz, CDCl_3 , 300 K) of compound (17)

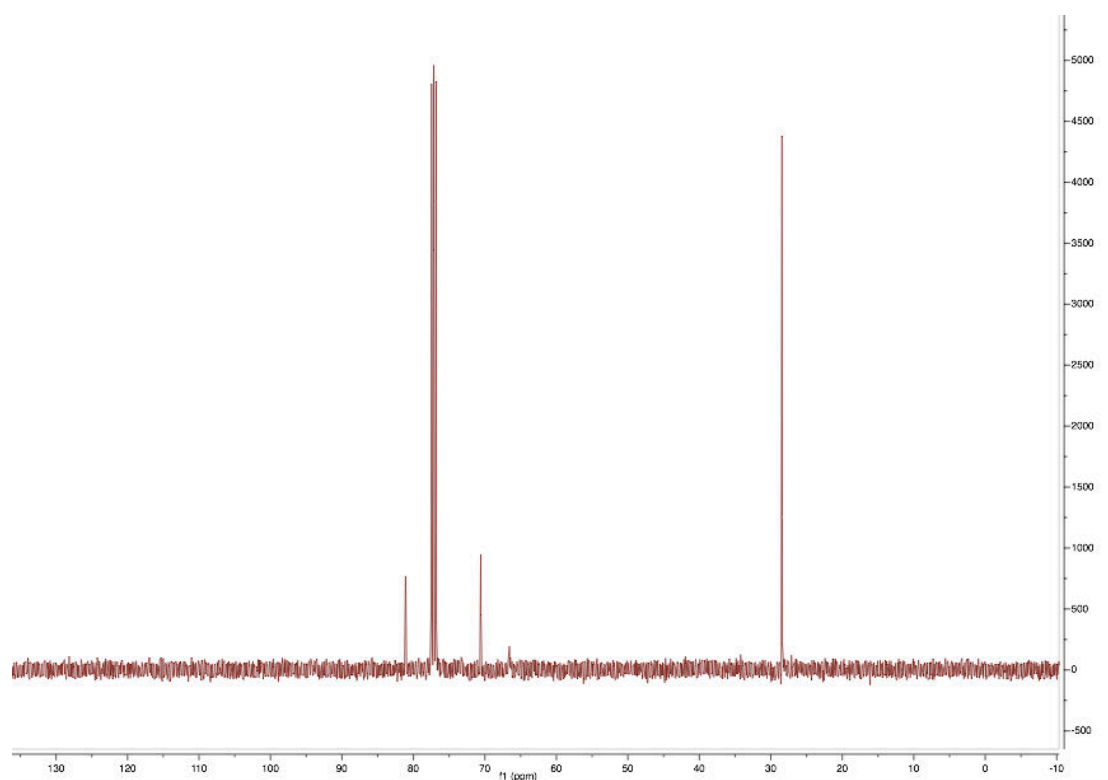
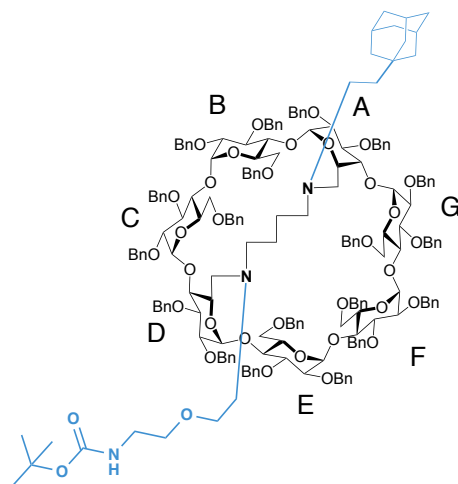


Figure 6. 25: RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3 , 300 K) of compound (17)

6^A,6^D-Dideoxy-6^A,6^D-diamino-*N,N'*-butyl-*N*-(ethyladamantyl)-*N'*-*tert*-butyl(2-(2-(amino)ethoxy)ethyl)carbamate
 2^{A-G},3^{A-G},6^{B-C};E-G-nonadeca-*O*-benzyl- β -cyclodextrin (**18**)



Protocol: the bridged-mono-adamantyl- β -cyclodextrin (**5**; 1,038 g, 0.365 mmol) was dissolved in DCM (50ml) under argon atmosphere. Carbamic acid, [2-(2-oxoethoxy)ethyl]-, 1,1-dimethylethyl ester (**17**; 379 mg, 0.731 mmol) and sodium triacetoxyborohydride (398 mg, 1.827 mmol) were added. Solution was stirred overnight.

DCM (50 ml) and water (100 ml) were added, layers were separated. The Aqueous layer was extracted with DCM (3 x 50 ml). Organic layers were combined, washed with a saturated NaHCO₃ solution (50 ml), brine, (50 ml) dried under MgSO₄ and concentrated. The resulting crude product was purified with a silica gel column and eluted with Cyclohexane/EtOAc (9:1) to afford the expected product. (**18**; 685 mg, 65 %).

RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃, 300K): δ = 7.30-6.83 (m, 95 H, *H*-Ar), 5.64 (br. 1 H, H-1), 5.56 (d, ²*J*_{H1-H2} = 4.1 Hz, 1H, H-1), 5.41 (d, ³*J* = 10.8 Hz, 1 H, *CHH*-Ph), 5.32 (d, ³*J* = 10.8 Hz, 1 H, *CHH*-Ph), 5.23-5.21 (m, 2 H, *CHH*-Ph), 5.12 (d, ³*J* = 10.8 Hz, 1 H, *CHH*-Ph), 5.01 (d, ²*J*_{H1-H2} = 3.3 Hz, 1 H, H-1), 4.99 (d, ²*J*_{H1-H2} = 3.3 Hz, 1 H, H-1), 4.97 (d, ²*J*_{H1-H2} = 3.01 Hz, 1 H, H-1), 4.92 (br. 1 H, H-1), 4.87 (br. 1 H, H-1), 4.83-4.69 (m, 12 H, *CHH*-Ph), 4.60-4.16 (m, 25 H, 21 x *CHH*-Ph, 4 x H-6), 4.09-3.80 (m, 21 H, 7 x H-3, 6 x H-4, 7 x H-5, 1 x H-6), 3.69-3.52 (m, 6 H, 2 x H-2, 4 x H-6), 3.46-3.32 (m, 9 H, 5 x H-2, 1 x H-4, 1 x H-6, 2 x N-CH₂-*CHH*-O), 3.28 (br. 2 H, O-*CHH*-CH₂-NHBoc), 3.20 (br. 2 H, O-CH₂-*CHH*-NHBoc), 2.79-2.63 (m, 3 H, 1 x N-*CHH*-CH₂-O, 2 x H-6), 2.57-2.47 (m, 6 H, 2 x H-6, 1 x N-*CHH*-CH₂-O, 2 x CH₂-CH₂-*CHH*-N, 1 x Ad-CH₂-*CHH*-N), 2.37 (br. 1 H, CH₂-CH₂-*CHH*-N), 2.26-2.31 (m, 2 H, 1 x CH₂-CH₂-*CHH*-N, 1 x Ad-CH₂-*CHH*-N), 1.91 (s, 3 H, Hb-Ada), 1.71 (m, 3 H, Hc-Ada), 1.58-1.53 (m, 4 H, 3 x Hc-Ada, 1 x CH₂-*CHH*-CH₂-N), 1.45-1.41 (m, 18 H, 6 x Ha-Ada, 3 x CH₂-*CHH*-CH₂-N, 9 x C(CH₃)₃), 1.27 (br. 1 H, 1 x Ad-*CHH*-CH₂-N), 1.12 (br. 1 H, Ad-*CHH*-CH₂-N).

RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃, 300K): δ = 155.98 (C-quat-carbamate), 139.93-138.31 (19 x C-quat-Ar), 128.45-126.18 (95 C, *CH*-Ar), 101.18 (C-1), 88.53 (C-1), 99.05-98.57 (5 x C-1), 82.04 (C-4), 91.94 (C-4), 81.30-80.21 (12 C, 7 x C-3, 1 x C-2, 4 x C-4), 79.81 (C-4), 79.68 (C-2) 79.45 (2 x C-2), 78.62 (C-2), 78.12 (C-2), 77.87 (C-2), 76.30-75.61 (5 x CH₂-Ph), 73.75-72.61 (11 x CH₂-Ph), 72.50 (C-5), 72.01 -71.36 (8C, 3 x CH₂-Ph, 5 x C-5), 70.27 (C-5), 70.15 (O-CH₂-CH₂-NHBoc), 69.95 (N-CH₂-CH₂-O), 69.61 (C-6), 69.37 (C-6), 69.32 (C-6), 68.97 (C-6), 68.92 (C-6), 59.11 (C-6), 58.87 (C-6), 56.41 (CH₂-CH₂-CH₂-N), 55.86 (N-CH₂-CH₂-O), 53.96 (CH₂-CH₂-CH₂-N), 48.85 (Ad-CH₂-CH₂-N), 42.93 (3 x Cb-Ad), 40.70 (O-CH₂-CH₂-NHBoc), 40.22 (Ad-CH₂-CH₂-N), 37.31 (3 x Cc-Ad) 31.85 (C-quat-Ada), 29.91 (CH₂-CH₂-CH₂-N), 28.67 (3 x Ca-Ad), 28.44 (3 x CH₃-Boc), 25.10 (CH₂-CH₂-CH₂-N).

ESI-HRMS (m/z) calculated for C₂₀₀H₂₂₈N₃O₃₆ ([M + H]⁺) 3247.6097, found: 3247.5979 (err: 3.6 ppm)

[α]_D²⁰ = 9.6 (c = 0.67, CHCl₃)

6. EXPERIMENTAL PART

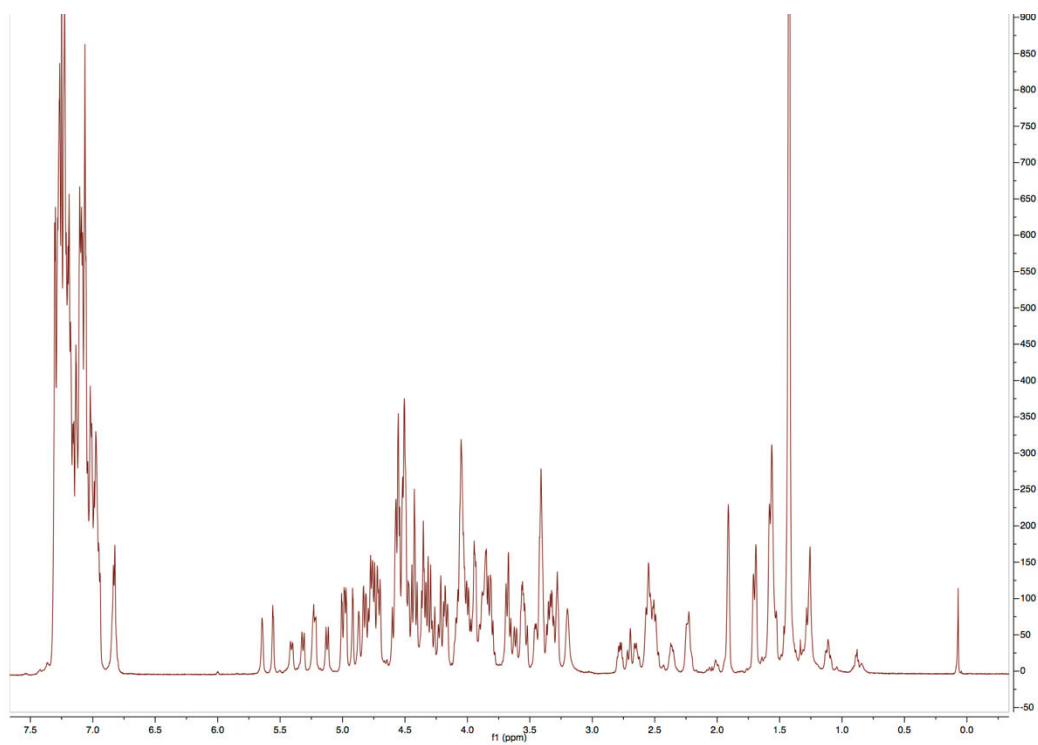


Figure 6. 26: RMN ^1H (600MHz, CDCl_3 , 300 K) of compound (18)

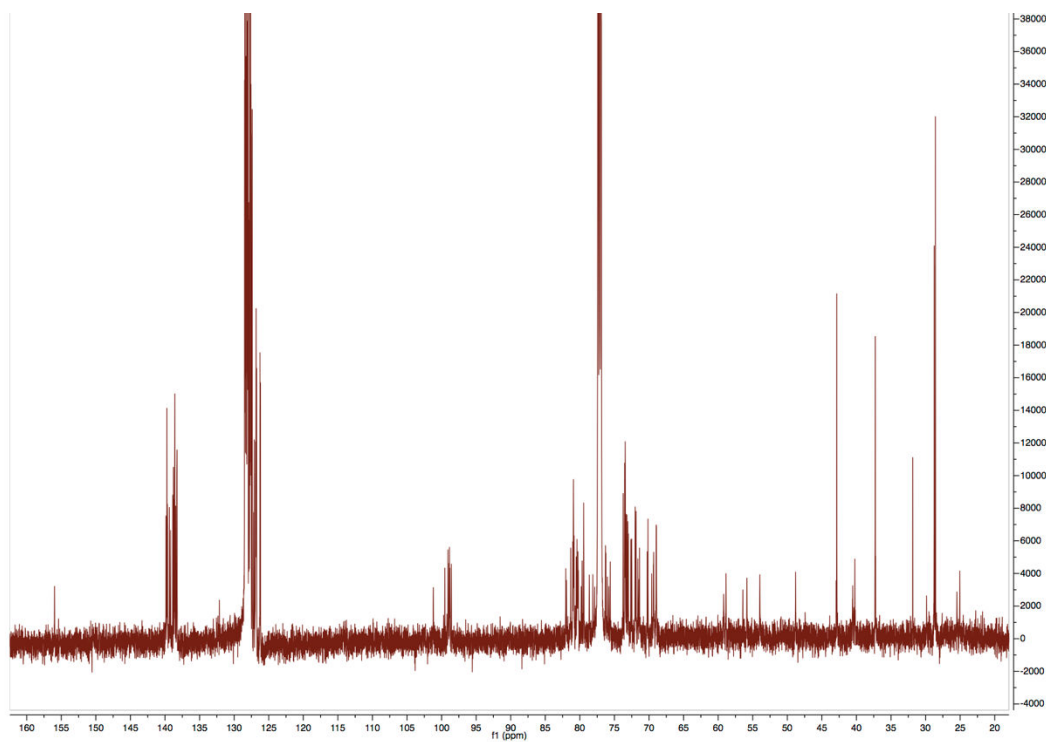
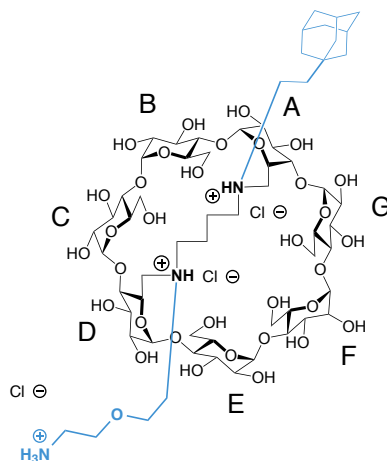


Figure 6. 27: RMN ^{13}C (150MHz, CDCl_3 , 300 K) of compound (18)

6^A,6^D-Dideoxy-6^A,6^D-diamino-*N,N'*-butyl-*N*-(ethyladamantyl)-*N'*-tertbutyl(2-(2-(amino)ethoxy)ethyl)carbamate- β -cyclodextrin-chlorohydrate (**19**)



Protocol: the β -cyclodextrin (**18**) (294 mg, 0.096 mmol) was dissolved in DCM (45 ml), TFA (5 ml) was added and the solution was stirred during 2 hours. Solution was diluted with DCM (50 ml) and NaHCO₃ (100 ml). Layers were separated, the aqueous layer was extracted with DCM (2 x 50 ml), the organics layers were combined and washed with NaHCO₃ (50 ml) and brine (50 ml) and then concentrated.

The resulting product was dissolved in THF/H₂O (18/6ml) under argon atmosphere in a 100 ml round bottom flask. TFA (58 μ l, 0.77 mmol) and Pd/C (256 mg, 2.40 mmol) were added and the reaction mixture was stirred under H₂ atmosphere for 48 h. Then the mixture was purged under nitrogen, filtered through a μ -filter (0,2 μ m – polyester). The organic solvents were evaporated under vacuum and the residue was lyophilized. The crude product was purified by a reverse phase chromatography to afford a white amorphous powder (**19**; 36 mg, 24 %).

RMN ¹H (600 MHz, D₂O, 300K): δ = 5.29-5.16 (m, 7 H, 7 H-1), 4.21 (br. 1 H, 1 H-5), 4.13-3.58 (m, 47 H, 7 x H-2, 7 x H-3, 7 x H-4, 6 x H-5, 14 x H-6, 6 x CHH-NH), 3.43-3.27 (br. 8 H, 4 x O-CH₂-CHH-N, 4 x O-CH_H-CH₂-N), 2.25 (s, 3 H, 3 x Hb-Ada), 1.97-1.70 (m, 18 H, 6 x Hc-Ada, 6 x Ha-Ada, 2 x CHH-CH₂-Ada, 4 x CH₂-CHH-CH₂-NH).

RMN ¹³C (150 MHz, D₂O, 300K): δ = 102.88 (C-1), 102.54 (C-1), 102.25 (C-1), 101.87 (C-1), 101.61 (C-1), 100.79 (C-1), 99.92 (C-1), 83.79-79.51 (7C, C-4), 73.56-70.86 (20C, 7 x C-2, 7 x C-3, 6 x C-5), 66.70 (O-CH₂-CH₂-N), 64.86 (O-CH₂-CH₂-N), 61-53-60.45 (5 x C-6, Ad-CH₂-CH₂-N, 2 x CH₂-CH₂-CH₂-N), 53.70 (2C, C-6), 41.57 (6C, Ca-Ada), 39.10 (2C, O-CH₂-CH₂-N), 37.33 (6C, Cc-Ada), 32.06 (C-quat-Ada), 28.44 (3C, Cb-Ada).

HRMS (ESI): (m/z) calculated for C₆₂H₁₀₆N₃O₃₄ ([M + H]⁺) 1436.6652, found: 1436.6711 (err: -4.1 ppm)

[α]_D²⁰ = 76.5 (c = 1.00, H₂O)

6. EXPERIMENTAL PART

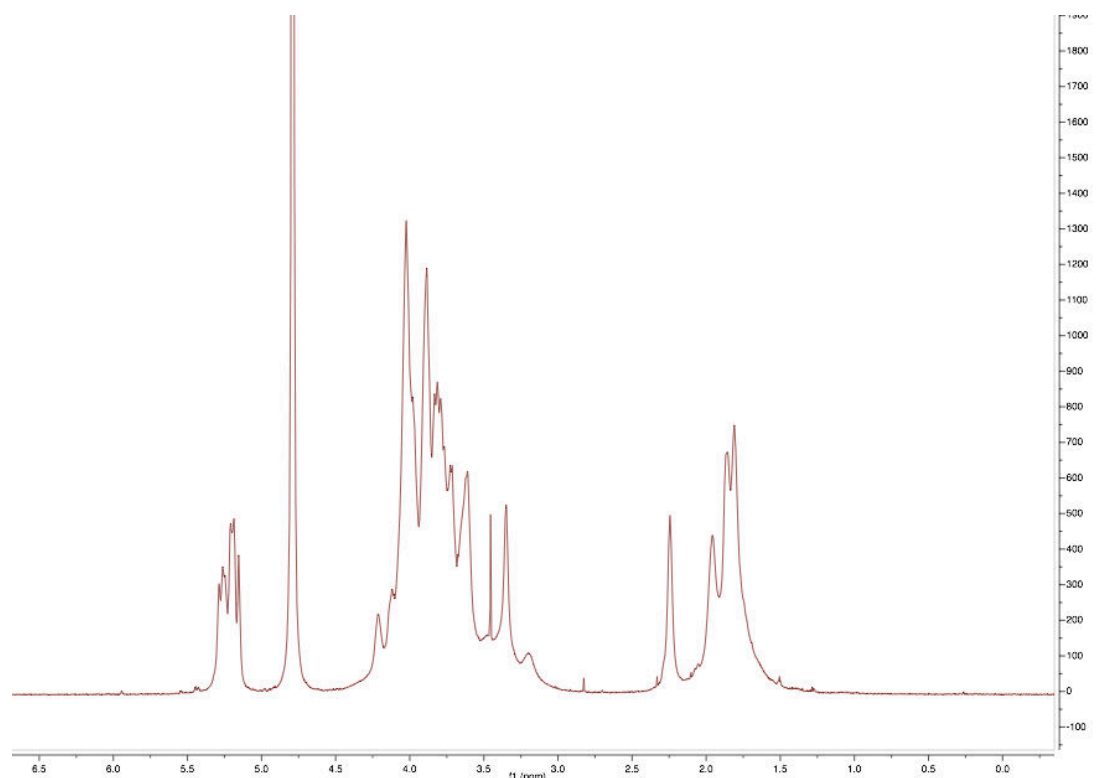


Figure 6. 28: RMN ¹H (600MHz, D₂O, 300 K) of compound (19)

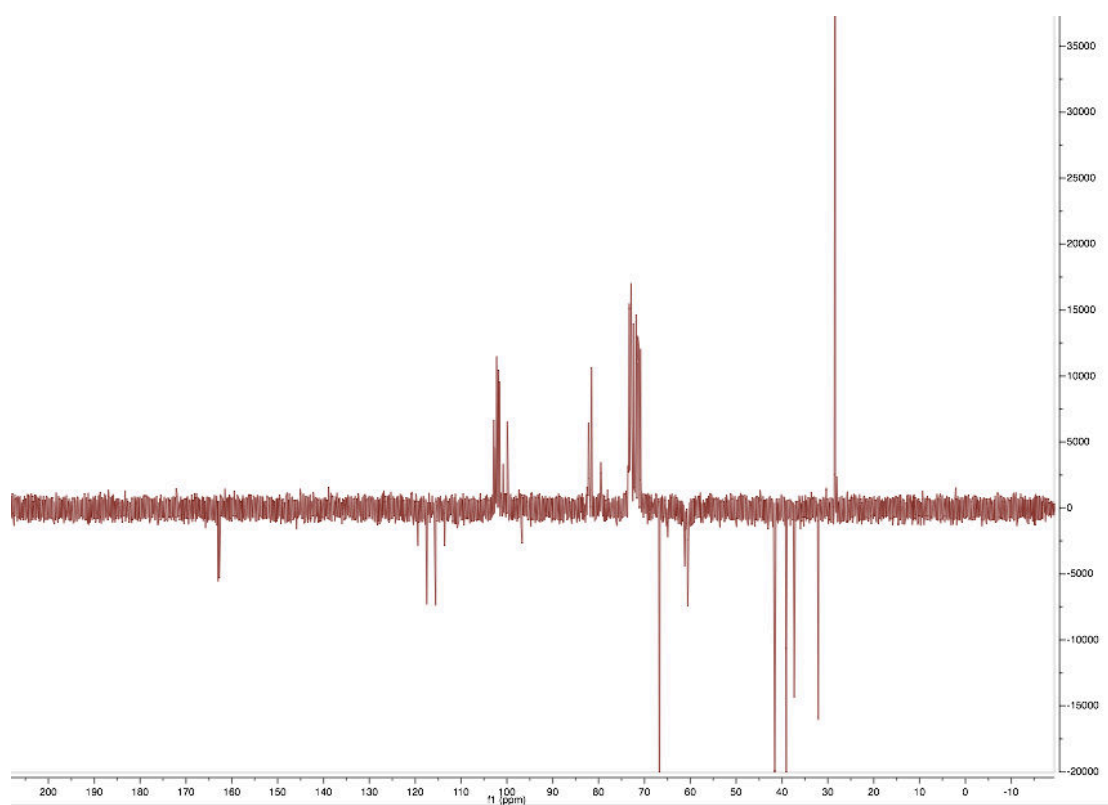
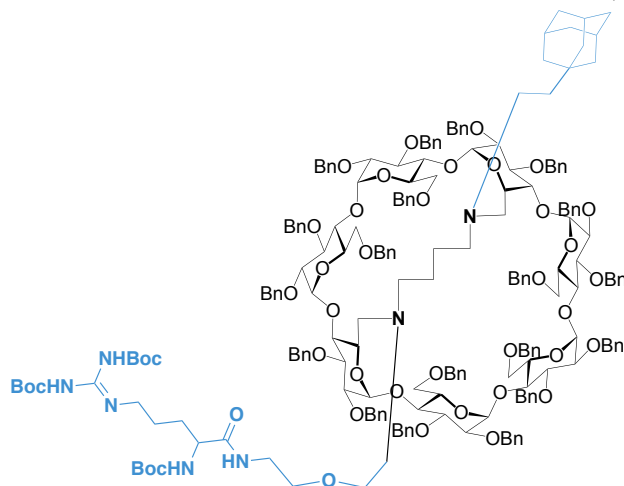


Figure 6. 29: RMN ¹³C-Jmod (150MHz, D₂O, 300 K) of compound (19)

6^A,6^D-Dideoxy-6^A,6^D-diamino-*N,N'*-butyl-*N*-(ethyladamantyl)-*N'*-2-ethoxyethyl(1-tri-*tert*-butyl-Arginine)

2^{A-G},3^{A-G},6^{B-C};E-G-nonadeca-*O*-benzyl- β -cyclodextrin (**20**)



Protocol: the bridged-mono-adamantyl-mono-boc-amine- β -cyclodextrin (**19**) (0.650 g, 0.200 mmol) was dissolved in DCM (40ml). TFA (5 ml) was added and the solution was stirred overnight. DCM (50 ml) and a saturated solution of NaHCO₃ (100 ml) were added, layers were separated. The Aqueous layer was extracted with DCM (2 x 50 ml). Organic layers were combined, washed with a saturated NaHCO₃ (50 ml) solution, brine (50 ml), dried under MgSO₄ and concentrated. The resulting crude product was purified with a silica gel column and eluted with Cyclohexane/EtOAc (2:1) to afford the corresponding deprotected product.

In a second flask tri-*tert*-butyl-Arginine was dissolved in DMF (20 ml). DIPEA (1.04 ml, 6.00 mmol) was added. Solution was stirred and HATU (141.6 mg, 0.60 mmol) was then added. 15 minutes later the previous deprotected product obtained was added and the second flask and the solution was stirred during 2 hours. ET₂O (50 ml), water (100 ml) and a solution of NaHSO₄ (50 ml) were added, layers were separated. The aqueous layer was extracted with ET₂O (3 x 50 ml). Organic layers were combined, washed with brine (100 ml), dried under MgSO₄ and concentrated. The resulting crude product was purified with a silica gel column chromatography and eluted with Cyclohexane/EtOAc (8.5:1.5) to afford a white foam (**20**; 372 mg, 52 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, 300K): δ = 7.31-6.80 (m, 95 H, *H*-Ar), 5.63 (d, ²*J*_{H1-H2} = 4.5 Hz, 1 H, H-1), 5.54 (d, ²*J*_{H1-H2} = 4.5 Hz, 1 H, H-1), 5.40 (d, ³*J* = 10.9 Hz, 1 H, *CHH*-Ph), 5.28 (d, ³*J* = 10.9 Hz, 1 H, *CHH*-Ph), 5.21 (d, ³*J* = 10.9 Hz, 2 H, *CHH*-Ph), 5.13 (d, ³*J* = 10.9 Hz, 1 H, *CHH*-Ph), 5.02 (d, ²*J*_{H1-H2} = 3.21 Hz, 1 H, H-1), 4.99 (m, 2 H, H-1), 4.92 (d, ²*J*_{H1-H2} = 3.2 Hz, 1 H, H-1), 4.89 (d, ²*J*_{H1-H2} = 2.8 Hz, 1 H, H-1), 4.83-4.69 (m, 15H, *CHH*-Ph), 4.61-4.15 (m, 24.5H, 18 x *CHH*-Ph, 5 x H-6, 1 x *CHNHBoc*, 0.5 x *CHH*-Guanidine), 4.09-3.81 (m, 22.5H, 7 x H-3, 7 x H-4, 7 x H-5, H-6, 0.5 x *CHH*-Guanidine), 3.76-3.22 (m, 18 H, *CHH*-Guanidine, 7 x H-2, 4 x H-6, 2 x N-CH₂-*CHH*-O, 2 x O-*CHH*-CH₂-NHArg, 2 x O-CH₂-*CHH*-NHBoc), 2.83-2.19 (m, 12 H, 4 x H-6, 2 x N-CH₂-CH₂-O, 4 x CH₂-CH₂-*CHH*-N, 2 x Ad-CH₂-*CHH*-N), 1.96-1.89 (m, 4 H, *CHH*-CH₂-Guanidine, 3 x Hb-Ad), 1.73-1.39 (m, 45H, 2 x , 6 x Hc-Ad, 2 x CH₂-*CHH*-CH₂-N, 6 x Ha-Ad, *CHH*-CH₂-Guanidine, 2 x *CHH*-CH₂-CH₂-Guanidine, 27 x H-Boc), 1.34-1.08 (m, 4 H, 2 x Ad-*CHH*-CH₂-N, 2 x 2 x CH₂-*CHH*-CH₂-N).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, 300K): δ = 172.4 (C-quat-carbamate), 163.47 (C-quat-carbamate), 161.01 (C-quat-carbamate), 155.09 (C-quat-carbamate), 139.89-138.31 (19 x C-quat-Ar), 128.64-126.15 (95 C, *CH*-Ar), 100.98 (C-1), 99.47 (C-1), 99.08 (2 x C-1), 98.75 (2 x C-1), 98.56 (C-1), 84.15 (C-quat-Guanidine), 82.12-77.95 (21C, 7 x C-3, 7 x C-4, 7 x C-2), 77.48-75.54 (5 x CH₂-Ph), 73.86-72.67 (12 x CH₂-Ph), 72.54 (C-5), 72.10 (C-5), 72.06 (CH₂-Ph), 71.95 (C-5), 71.89 (CH₂-Ph), 71.69 (C-5), 71.46 (2 x C-5), 70.17 (C-5), 69.80-68.69 (7C, 1 x O-CH₂-CH₂-NHC=O, 1 x N-CH₂-CH₂-O, 5 x C-6), 59.20 (C-6), 58.68 (C-6), 56.85 (CH₂-CH₂-CH₂-N), 56.23 (N-CH₂-CH₂-O), 54.18 (0.5 x CH-NHBoc), 53.98 (CH₂-CH₂-CH₂-N), 52.76 (0.5 x CH-NHBoc), 48.86 (Ad-CH₂-CH₂-N), 45.45 (0.5 x CH-Guanidine), 44.17 (0.5 x CH-Guanidine), 42.86 (3C, Ca-Ad), 40.18 (Ad-CH₂-CH₂-N), 39.60 (O-CH₂-CH₂-NH-

6. EXPERIMENTAL PART

Arg), 37.30 (3C, Cc-Ad), 31.92 (C-quat-Ad), 29.93 (CH₂-CH₂-CH₂-N), 29.02-27.78 (12,5C, 3 x Cb-Ad, 9 x CH₃-Boc, 0.5 x CH₂-CH₂-Guanidine), 26.96-24.81 (CH₂-CH₂-CH₂-N, 0.5 x CH₂-CH₂-Guanidine, 0.5 x CH₂-CH₂-CH₂-Guanidine), 20.27 (CH₂-CH₂-CH₂-Guanidine).

ESI-HRMS (m/z) calculated for C₂₁₆H₂₅₆N₇O₄₁ ([M + H]⁺) 3603.8157, found: 3605.8122 (err: 3.3 ppm)

[α]_D²⁰ = + 17.5 (c = 0.30, DCM)

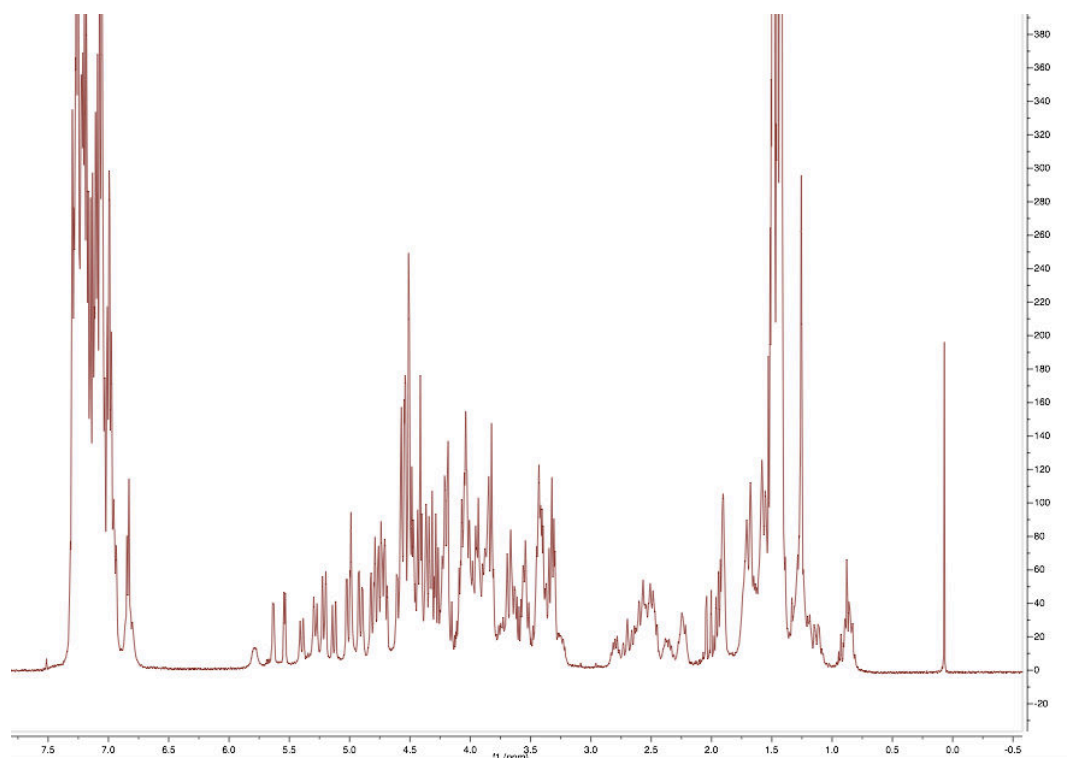


Figure 6. 30: RMN ¹H (400MHz, CDCl₃, 300 K) of compound (20)

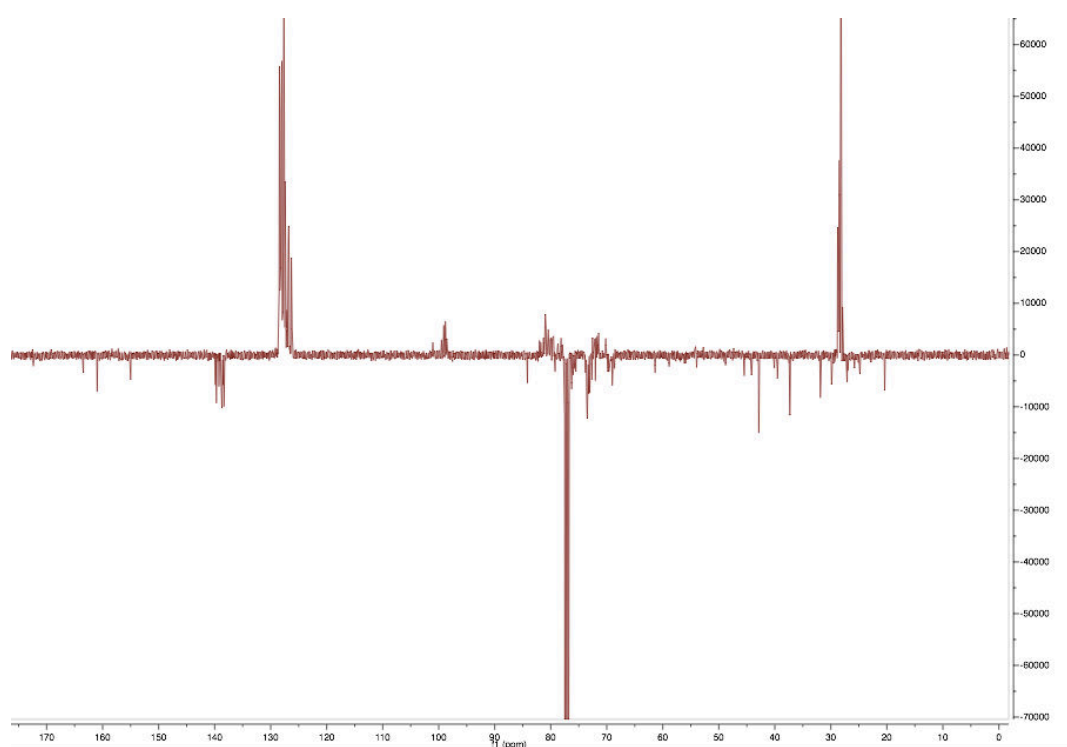
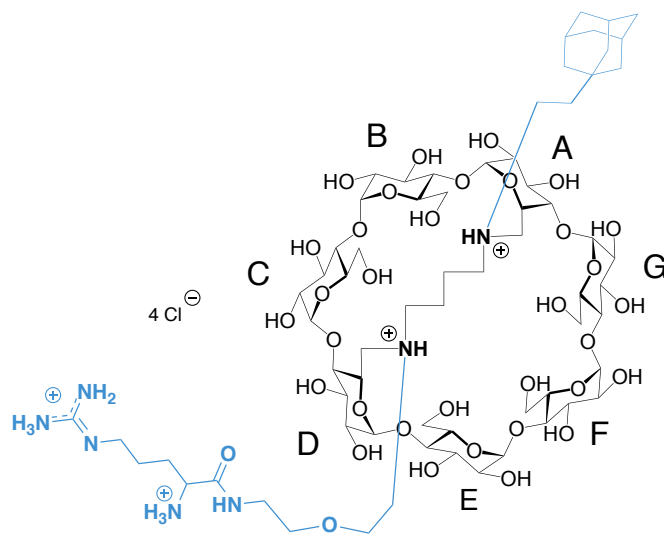


Figure 6. 31: RMN ¹³C-Jmod (100MHz, CDCl₃, 300 K) of compound (20)

6^A,6^D-Dideoxy-6^A,6^D-diamino-*N,N'*-butyl-*N*-(ethyladamantyl)-*N'*-2-ethoxyethyl(1-tri-*tert*-butyl-Arginine)- β -cyclodextrin chlorohydrate (**21**)



Protocol: the bridged-mono-adamantyl-mono-Arginine- β -cyclodextrin-per-Bn (**20**) (372 mg, 0.112 mmol) was dissolved in DCM (45 ml), TFA (5 ml) was added and the solution was stirred during 2 hours. Solution was diluted with DCM (50 ml) and NaHCO₃ (100 ml). Layers were separated. The Aqueous layer was extracted with DCM (3 x 50 ml). Organics layers were combined and washed with NaHCO₃ (50 ml) and brine (50 ml) and then concentrated.

The resulting product was dissolved in THF/H₂O (54/18 ml) under argon atmosphere in a 250 ml round bottom flask. TFA (137 μ l, 1.801 mmol) and Pd/C (359 mg, 3.377 mmol) were added and the reaction mixture was stirred under H₂ atmosphere for 48 h. Then the mixture was purged under nitrogen, filtered through a μ -filter (0,2 μ m – polyester). The organic solvents were evaporated under vacuum and the residue was lyophilized. The crude product was purified by a reverse phase chromatography to afford a white amorphous powder.

The powder was solubilized in a minimum volume of water, and eluted with water through an ion exchange column (Amberlite Cl⁻ resin). The product was then lyophilized to afford the corresponding deprotected compound as a white amorphous powder (77 mg, 40 %).

RMN ¹H (600 MHz, D₂O, 300K): δ = 5.24 (br. 1 H, H-1), 5.20 (m, 2H, H-1), 5.16 (br. 1 H, H-1), 5.13 (m, 2 H, H-1), 4.10 (br. 1 H, H-1), 4.07-3.50 (m, 49 H, 7 x H-2, 7 x H-3, 7 x H-4, 7 x H-5, 14 x H-6, 4 x O-CHH-CH₂-N, 2 x CHH-Guanidine, CH-Arginine), 3.62-3.14 (m, 10 H, 4 x O-CH₂-CHH-N, 2 x N-CHH-CH₂-Ad, 4 x CH₂-CH₂-CHH-N), 2.16 (s, 3 H, Hb-Ada), 2.01-1.56 (m, 22 H, 6 x Hc-Ada, 6 x Ha-Ada, 2 x CHH-CH₂-Ada, 4 x CHH-CH₂-NH, 2 x CHH-CH₂-Guanidine, 2 x CHH-CH₂-CH₂-Guanidine).

RMN ¹³C (150 MHz, D₂O, 300K): δ = 169.58 (C-quat-guanidine), 156.86 (C-quat-carbamate), 102.97-99.94 (7 x C-1), 84.07-79.49 (7 x C-4), 73.22-70.80 (7 x C-2, 7 x C-3, 7 x C-5), 69.10 (CH₂Guandine), 64.80 (2 x O-CH₂-CH₂-N), 61.64-60.49 (7 x C-6), 52.97 (CH-Arg), 41.57 (3C, Ca-Ada), 40.38-38.92 (5C, 4 x CH₂-NH, 1 x CH₂NC=O), 37.13 (3C, Cc-Ada), 32.02 (C-quat-Ada), 28.41 (3C, Cb-Ada), 28.07 (2C, 1 x CH₂-CH₂-Guanidine, 1 x CH₂-CH₂-CH₂-Guanidine), 23.70 (CH₂-CH₂-NH).

ESI-HRMS (m/z) calculated for C₆₈H₁₁₈N₇O₃₅ ([M + H]⁺) 1592.7692, found: 1592.7663 (err: -2.9 ppm)

[α]_D²⁰ = + 89.1 (c = 0.35, H₂O)

6. EXPERIMENTAL PART

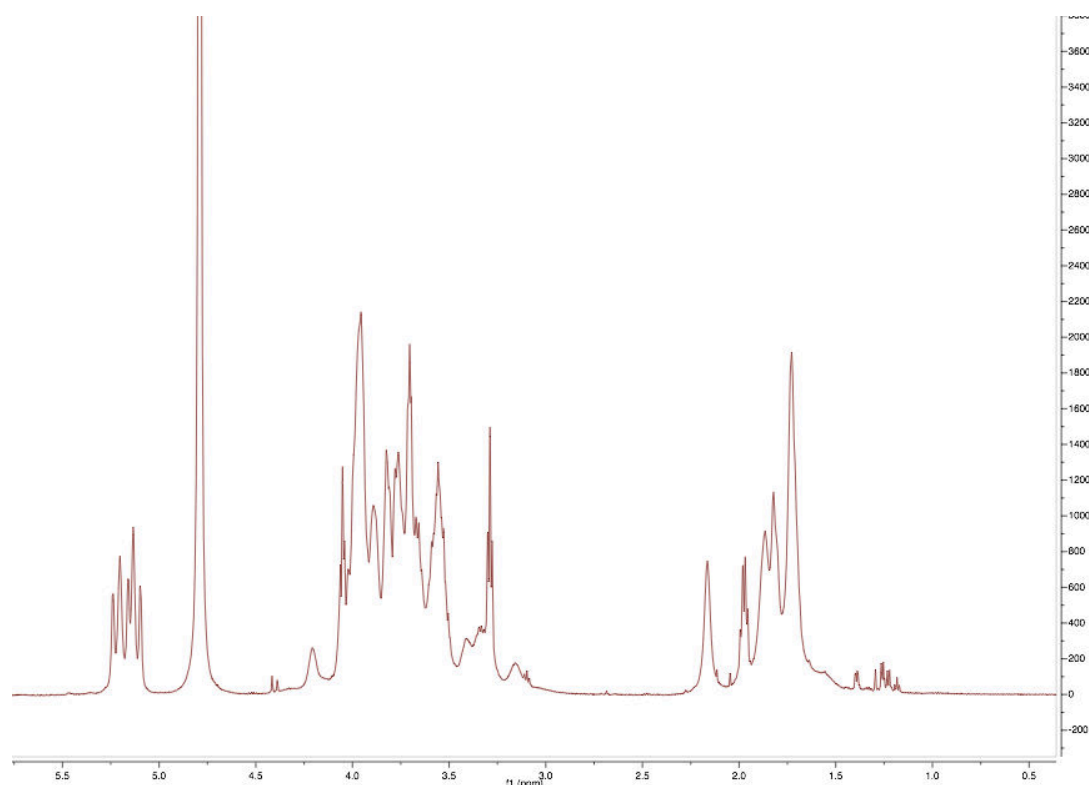


Figure 6. 32: RMN ^1H (600MHz, D_2O , 300 K) of compound (21)

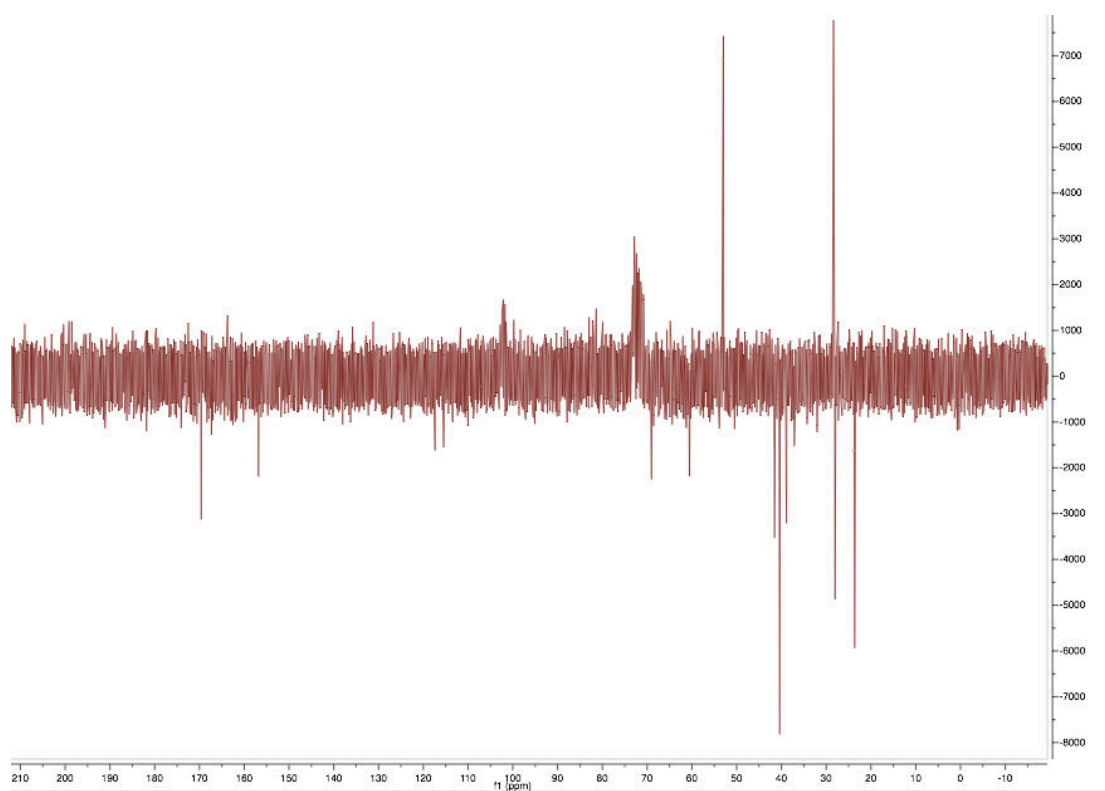
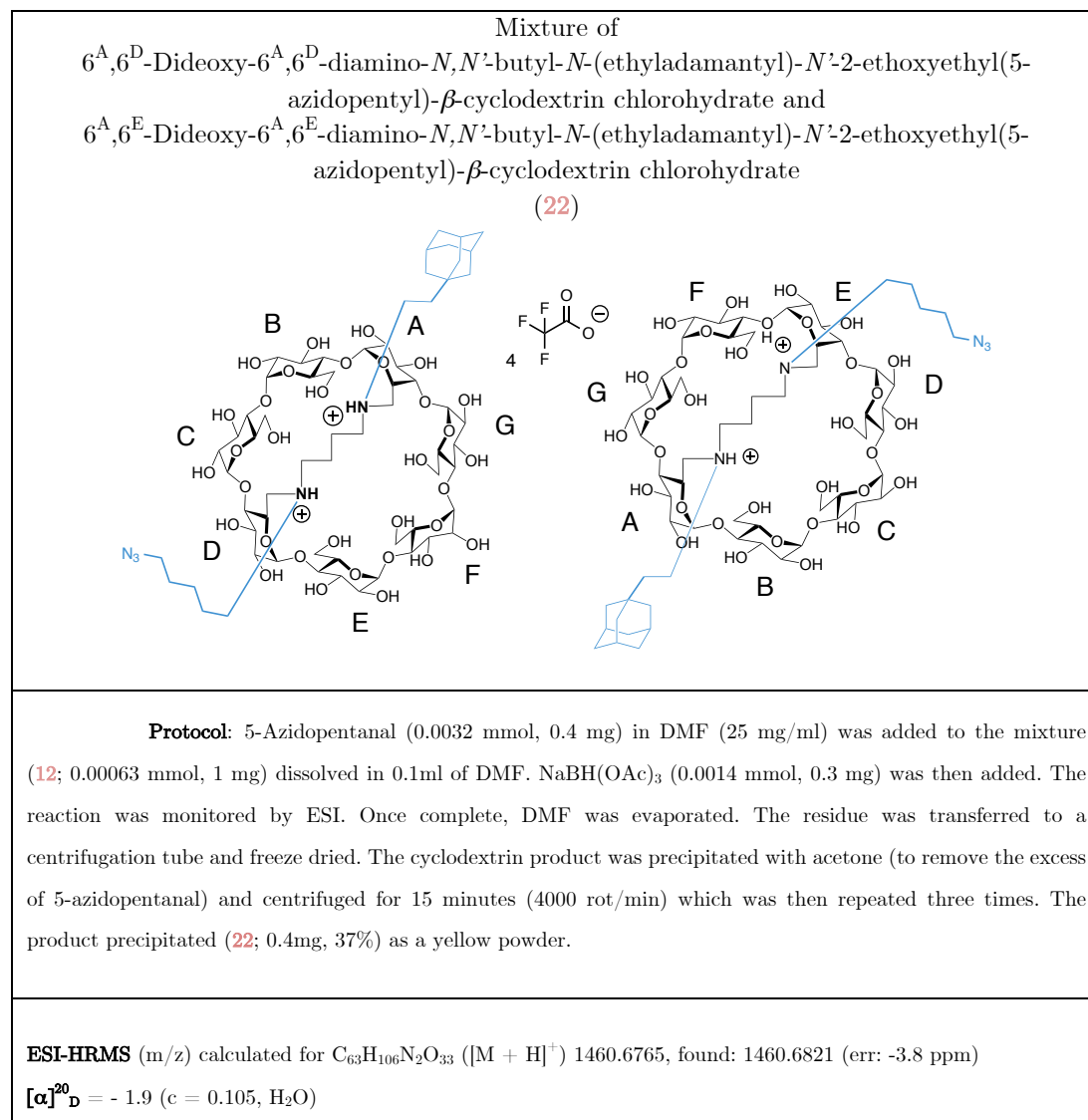


Figure 6. 33: RMN ^{13}C -Jmod (100MHz, CDCl_3 , 300 K) of compound (21)



6.4. Biological experiments

Materials:

Luciferase GL3 siRNA

Custom synthesized pGL3 siRNA targeting the firefly luciferase (encoded by the pGL3-Basic Vector of Promega) was purchased from Sigma-Aldrich. The sequence is:

5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3' (sense strand)

5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT-3' (antisense strand)

Opti-MEM

Opti-MEM is a variation of Eagle's minimal essential medium (EMEM) usually used to bring the nutrients needed for the cell proliferation. Opti-MEM is buffered with HEPES and sodium bicarbonate, supplemented with hypoxanthine, thymidine, sodium pyruvate, and glutamine.

DMEM (Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium)

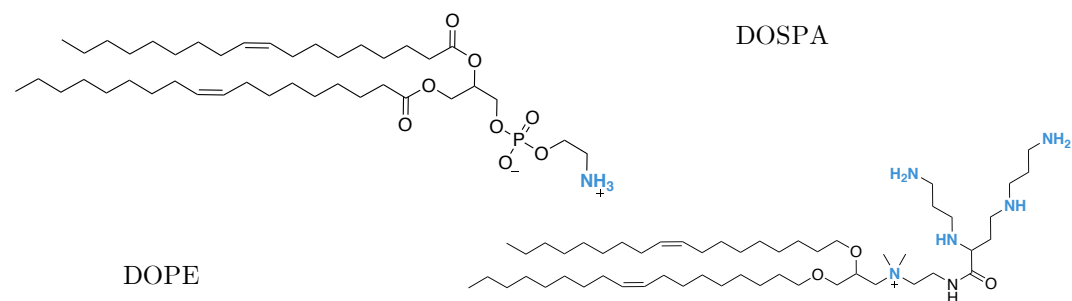
DMEM is a variation of Eagle's minimal essential medium (EMEM) usually used to bring the nutrients needed for the cell proliferation. DMEM has approximately four times more vitamins and amino acids than the classical EMEM.

FBS (Fetal Bovine Serum)

FBS serum is from a blood drawn from a bovine serum. It is classical serum used in culture cell. It is usually added to a cell medium (5-10 %) to increase the amount of proteins, hormones and minerals. To be transfected, the cell's medium need to be poor in FBS.

Lipofectamine[®] 2000

Lipofectamine 2000 is a mixture (3:1) of the polycationic lipids DOSPA and DOPE. It is a cationic lipid-based transfection agent used as positive reference for the transfection of siRNA.



Preparation of siRNA-Cyclodextrin complexes

Protocol: For assays in vitro, the quantities of compound used were calculated according to the desired siRNA amount of 5 pmol and 10 pmol, and the number of protonable nitrogen atoms in the selected β -CD derivative to achieve the desired N/P ratio and concentration. β -CD derivative was treated in a DMEM medium (Dulbecco's modified Eagle's medium) with FBS (Fetal bovine serum) 10%, without antibiotics (50 μ L). The siRNA were treated in an Opti-MEM medium (poor in a fetal veal serum, 50 μ L). Each solution of siRNA and β -CD derivative was mixed gently combined within 5 minutes after their preparation, and then incubated for 20 minutes at ambient temperature.

Preparation of siRNA- Lipofectamine[®] 2000 complexes

Protocol: The lipofectamine[®] 2000 complexes were used as positive reference of transfection of siRNA. For assays in vitro, the quantities of compound used were calculated according to the desired siRNA amount of 5 pmol and 10 pmol, and the lipofectamine[®] 2000 (Invitrogen, 1mg/ml) volume of 0.25 and 0.50 μ L per well. Lipofectamine[®] 2000 was treated in a DMEM medium with FBS 10%, without antibiotics (50 μ L). siRNA were treated in a Opti-MEM medium FBS (50 μ L). Each solution of siRNA and lipofectamine[®] 2000 was mixed gently combined within 5 minutes after their preparation, and then incubated for 20 minutes at ambient temperature.

HEK293 cell line culture

Protocol: HEK293 are rounded cells purchased from the Molecular Genetic Institute of Montpellier (UMR 5535 CNRS), which are human embryonic kidney 293 cells (HEK293) which express constitutively the firefly luciferase GL3. This cell line was maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, 1% penicillin and streptomycin plus 200 μ g/mL hygromycin B in a humidified 37°C incubator, 5% of CO₂. Cells were seeded in 96-well plates at 1.10^3 cell/wells in a final volume of 200 μ L of growth medium such that they will be 30-50% of confluence the day after. 200 μ L of medium were then withdrawn and replaced by the preparation for transfection. The medium was then withdrawn and replaced by the solution of transfection.

KnockDown test of the luciferase GL3 gene

Protocol: Transfection of cell line HEK293 with the siRNA directed against the firefly luciferase GL3 with β -CD derivative or Lipofectamine[®] 2000 (used as a positive reference of transfection) has been carried out. The efficacy of transfection on the cells has been evaluated by a method of luminescence. The day of the transfection, the 200 μ L/well of medium are withdrawn and replaced by the preparation of siRNA-cyclodextrin complexes (100 μ L/wells) or the preparation of siRNA-lipofectamine complexes (100 μ L/wells). Cells were then incubated at 37°C during 24 hours. The cell plaque was equilibrated at room temperature during 30 min, and 100 μ L of the kit One-Glo luciferase assay (Promega) were added. Cells were incubated at room temperature during 10 minutes until the analysis by luminescence of the KD of the gene of the luciferase.

Cell viability

Protocol: Possible toxicity of the transfection preparation was assessed using the kit CellTiter Glo 2.0 (Promega), and evaluated by a method of luminescence. The day of the transfection, the 200 μ L/well of medium are withdrawn and replaced by the preparation of siRNA-cyclodextrin complexes (100 μ L/wells) or the preparation of siRNA-lipofectamine complexes (100 μ L/wells). Cells were then incubated at 37°C during 24 hours. The cell plaque was equilibrated at room temperature during 30 min, 50 μ L of the medium was withdrawn, and 100 μ L of the kit CellTiter Glo 2.0 (Promega) were added. Cells were incubated at room temperature during 10 minutes until the analysis by luminescence of the KD of the gene of the luciferase.

Agarose-gel electrophoresis

Protocol: Each siRNA/ β -CD derivative complex was submitted to electrophoresis for 40 min under 100 V through a 0.8 % agarose gel in Tris/borate/EDTA (TBE) buffer and was stained by spreading with Ethidium bromide (EtBr). A solution of 17 μ L of siRNA-compound (0,5 μ g/well) and β -CD derivative in water, and 3 μ L bromophenol blue was deposited in the wells. The amount of β -CD derivative was chosen to achieve the desired N/P ratio and concentration.

siRNA protection against RNAses

Protocol: siRNA and β -CD derivative were incubated for 30 min with with the desired N/P ratios and concentration., corresponding to concentration which provided full retention of siRNA in the previous ESMA assays. Then, RNase (0.25% w/v) was added and incubated for 30 min at 37°C. RNase was then inactivated by cooling the samples at 4°C for 15 min. To release siRNA from complex, heparin (1 mg/ml) was added for 20 min period at 4°C Samples with 3 μ L bromophenol blue was deposited in the wells and submitted to electrophoresis for 40 min under 100 V through a 0.8 % agarose gel in Tris/borate/EDTA (TBE) buffer and was stained by spreading with Ethidium bromide (EtBr).

N/P ratio determination

N/P ratio corresponds to the amount of protonated amine of the cationic species divided by the amount of phosphate residues coming from the nucleic acids.⁵ This ratio enables to compare the efficiency of a cationic compound to be complexed with nucleic acids.

$$\text{Thus, } \frac{N}{P} = \frac{\text{number of moles of all cationic compounds} \cdot \text{number of charges by molecule}}{\text{number of moles of siRNA} \cdot \text{number of base pairs} \times 2}$$

In the present case, the cationic compound is the β -CD derivative, the number of charges by molecule is the number of charges by CD-derivative and the number of base pairs is the number of base pairs of the siRNA.

6.5. Bibliography

1. Lecourt, T., Hérault, A., Pearce, A. J., Sollogoub, M. & Sinaÿ, P. Triisobutylaluminium and diisobutylaluminium hydride as molecular scalpels: The regioselective stripping of perbenzylated sugars and cyclodextrins. *Chem. An Asian J.* **10**, 2960–2971 (2004).
2. Xiao, S., Yang, M., Sinaÿ, P., Blériot, Y., Sollogoub, M. & Zhang, Y. Diisobutylaluminium hydride (DIBAL-H) promoted secondary rim regioselective demethylations of permethylated β -cyclodextrin: A mechanistic proposal. *European J. Org. Chem.* 1510–1516 (2010).
3. Beeson, T. D. & MacMillan, D. W. C. Enantioselective organocatalytic alpha-fluorination of aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 8826–8828 (2005).
4. Duarte, L., Nag, S., Castro, M., Zaborova, E., Ménand, M., Sollogoub, M., Bennevault, V., Feller, J. F. & Guégan, P. Chemical Sensors Based on New Polyamides Biobased on (Z) Octadec-9-Enedioic Acid and β -Cyclodextrin. *Macromol. Chem. Phys.* **217**, 1620–1628 (2016).
5. Metwally, A. A., Pourzand, C. & Blagbrough, I. S. Efficient gene silencing by self-assembled complexes of siRNA and symmetrical fatty acid amides of spermine. *Pharmaceutics* **3**, 125–140 (2011).

Abstract

siRNA based therapeutics are very promising. A key challenge for their development is the design of sophisticated, safe and effective delivery methods. To address all the biological obstacles for the conception of such therapeutics, we focused on the construction of a virus-like dynamic system, built with molecular bricks, able to self assemble and to interact with nucleic acid through supramolecular interactions. Bridged cyclodextrin based supramolecular polymers were developed to form host-guest interactions. To do so, cyclodextrins were conjugated with cationic and hydrophobic moiety in a spatially controlled way. These conjugates solved problems well known in the literature about the self-inclusion and the solubility in water of such molecules. The ability to self-assemble of 4 compounds were studied by RMN-1H, RMN-ROESY, ITC, RMN-DOSY and SANS. All these compounds showed a good capability to complex and protect siRNA. Moreover, one of these compounds is able to transfect siRNA *in vitro* without any toxicity, and therefore, to induce gene silencing. Assembly of CD and siRNA were finally observed by cryo-microscopy, which showed long fibres organised in a hierarchical and cooperative manner. This unique system is therefore strongly reminiscent of the structure, size and function of a virus.

Keywords: Cyclodextrin, siRNA, supramolecular polymer, transfection, host-guest, hierarchical, cooperativity, artificial virus.

Résumé

L'utilisation de siRNA est une nouvelle approche thérapeutique très prometteuse. Néanmoins leur transfection à visée thérapeutique est un réel défi. Les obstacles à franchir pour élaborer des agents de transfection sûrs et fiables sont nombreux. Afin de les contourner nous sommes attachés à la construction d'un système dynamique qui, à l'image des virus, est constitué de briques moléculaires, s'emboîtant et interagissant avec des acides nucléiques selon des interactions supramoléculaires. Ainsi, nous avons élaboré des polymères supramoléculaires polycationiques à base de monomères de cyclodextrines pontées, fonctionnalisées par un groupement adamantyle. Ce type de conjugué pallie un problème manifeste dans la littérature concernant les assemblages de β -CD souvent insolubles ou bien auto-inclus. L'ajout éventuel d'une autre fonction cationique pour améliorer l'interaction avec les siRNA a aussi été réalisé. Ainsi, la capacité à s'auto-assembler de quatre composés a été étudiée par RMN-1H, RMN-ROESY, ITC, RMN-DOSY, et SANS. Par ailleurs, ces composés ont montré une certaine capacité à complexer et à protéger les siRNA. L'un de ces composés a de plus montré une bonne aptitude à transférer des siRNA *in vitro*, sans induire de toxicité. Les assemblages CD-siRNA ont finalement été observés par cryo-TEM et ont montré la formation de fibres, organisées de manière hiérarchique et hautement coopérative. Nous avons ainsi créé des assemblages supramoléculaires uniques à base d'acides nucléiques, rappelant la structure, la taille et la fonction d'un virus.

Mots-clefs : Cyclodextrines, siRNA, polymère supramoléculaire, transfection, hôte-invité, hiérarchie, coopérativité, virus artificiel.