



HAL
open science

Nanoparticules polymères ciblant le récepteur CXCR3 : élaboration et évaluation sur modèles de tumeur

Laura Rodrigues

► **To cite this version:**

Laura Rodrigues. Nanoparticules polymères ciblant le récepteur CXCR3 : élaboration et évaluation sur modèles de tumeur. Polymères. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0104 . tel-02422394

HAL Id: tel-02422394

<https://theses.hal.science/tel-02422394>

Submitted on 22 Dec 2019

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

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

THÈSE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

PAR

LAURA RODRIGUES

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : POLYMERES

**NANOPARTICULES POLYMERES CIBLANT LE
RECEPTEUR CXCR3 : ELABORATION ET EVALUATION
SUR MODELES DE TUMEUR**

Soutenue le 10 Juillet 2018

Membres du jury :

M. LECOMMANDOUX Sébastien
M. BIKFALVI Andreas
Mme HURBIN Amandine
M. COUDANE Jean
Mme DE VIGUERIE Nancy
M. BARTHELEMY Philippe
Mme GARANGER Elisabeth
Mme BILLOTTE Clotilde

Professeur, Institut Polytechnique de Bordeaux
Professeur, Université de Bordeaux
Chargée de recherche, Université de Grenoble
Professeur, Université de Montpellier
Professeur, Université de Toulouse
Professeur, Université de Bordeaux
Chargée de recherche, CNRS, Université de Bordeaux
Maître de conférences, Université de Bordeaux

Directeur de thèse
Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Président
Membre invité
Membre invité

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé en co-direction entre le Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques (LCPO) à Pessac et le Laboratoire de l'Angiogenèse et du Micro-environnement des Cancers (LAMC) à Talence, et a été financé par la Ligue nationale contre le Cancer qui m'a attribué une allocation doctorale pour une durée de 3 ans.

J'aimerais tout d'abord remercier La Ligue pour son soutien financier qui m'a permis de travailler sur ce projet qui me tenait personnellement à cœur.

Ensuite, je souhaite remercier le Prof. Henri Cramail, directeur du LCPO à mon arrivée, et le Prof. Sébastien Lecommandoux, qui a pris sa succession depuis 2016, ainsi que le Prof. Andreas Bikfalvi, directeur du LAMC de m'avoir permis d'intégrer leur laboratoire et d'y réaliser ma thèse.

Les deux directeurs actuels des laboratoires étant également mes deux directeurs de thèse, je tiens également à les remercier en tant que tels. Je vous remercie tout d'abord de m'avoir acceptée en stage de Master 2 en 2014 sur ce sujet et de m'avoir fait confiance pour demander une bourse doctorale à la Ligue Nationale contre le Cancer à mon nom, que j'ai obtenue fin 2014.

Sébastien, je te remercie pour ton implication et ta présence dans ce projet qui m'a tenu à cœur dès le départ, de tous les conseils que tu m'as donnés, et de m'avoir remotivé quand les résultats positifs n'étaient pas de la partie. Je te remercie également pour ta bonne humeur et ta sympathie qui sont essentielles pour évoluer dans une bonne atmosphère de travail.

Andreas, je vous remercie d'avoir mis le laboratoire à ma disposition et d'avoir impliqué de nombreuses personnes dans le projet afin que je puisse travailler dans de bonnes conditions. En effet, les différentes discussions que j'ai pu avoir et les différents conseils que j'ai eu m'ont permis d'avancer et d'apprendre énormément sur des domaines que je ne maîtrisais pas. Ma présence dans votre équipe a été extrêmement enrichissante, encore merci.

Je remercie également Elisabeth Garanger, pour son implication dans le projet depuis le stage et son soutien, surtout les deux premières années. En effet, les débuts de thèse à

l'IECB ont été compliqués avec une chimie capricieuse et tu as toujours gardé le sourire et ta bonne humeur. Tes encouragements et ton optimisme ont été essentiels pour me remotiver dans ces périodes qui n'étaient pas évidentes. Je tiens également à te remercier pour ton implication au sein de l'équipe, à tes différentes organisations et pour tes moments inattendus où tu décidais qu'il fallait faire du rangement ou du nettoyage dans les 5 minutes qui suivaient ! 😊 En bref, merci pour ta bonne humeur et garde ce côté fofou qui fait du bien au moral !

Je voudrai également remercier Clotilde Billottet, pour m'avoir aidée et expliquée de nombreuses notions et techniques inconnues pour moi en biologie, malgré son emploi du temps chargé. Un énorme merci à Nadège Pujol pour son encadrement lors de mes deux derniers mois de thèse où je courrais partout pour finir dans les temps. Merci de m'avoir guidée sur les dernières expériences et d'avoir passé des heures au microscope confocal avec moi.

Je tiens à remercier grandement Kevin Boyé, doctorant au LAMC durant les deux premières années de ma thèse, pour son aide précieuse. Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ta disponibilité ! Merci d'avoir pris de ton temps (beaucoup ^^) pour me montrer et m'expliquer la culture cellulaire et les différentes techniques d'analyses jusque-là inconnues pour moi, d'avoir été présent lorsque j'avais des problèmes ou des questions et de ton implication dans ce projet. En résumé, tu m'as tout appris avec patience et pédagogie, encore merci parce que sans toi je n'aurai pas pu acquérir autant de connaissances en biologie !

Je remercie également les permanents de mes deux équipes du LCPO et du LAMC pour les discussions scientifiques ou personnelles que j'ai pu avoir avec eux, leur aide, leurs nombreux conseils, leur disponibilité et leur gentillesse : Bertrand, Jeff, Christophe, Olivier et Céline. Un grand merci également à tous les doctorants, post-doc et stagiaires que j'ai pu côtoyer durant ces quelques années !

Un grand merci au personnel administratif, Corinne, Claude, Dominique, Catherine, Fred et Karine pour les nombreuses tâches qu'ils effectuent au quotidien pour que le labo tourne correctement ce qui nous permet de nous concentrer seulement sur le côté

scientifique. Ce sont également des personnes sympathiques toujours disponibles et volontaires pour nous aider à n'importe quel moment, donc merci pour ces qualités humaines qui encore une fois permet un quotidien agréable.

Merci aux experts, Anne-Laure, Estelle, Loïc, Gégé, Cédric, Manu, Amélie, Nico, Eric pour leur aide essentielle chacun dans leur domaine, leurs explications et leur disponibilité !
Merci pour votre implication dans mon projet et grâce à votre aide et à vos interprétations des résultats, j'ai pu avancer dans mon projet !

Je remercie mes deux stagiaires, Coralie et Sarah qui ont travaillé sur mon projet de thèse et ont obtenu de supers résultats ! Un merci plus particulier à Coralie, pour ton implication lors du stage et de la quantité de résultats que tu as obtenus, ce qui a redonné un élan positif à ma thèse ! Merci pour ton aide et les différentes explications que tu as pu m'apporter.

Merci à l'ensemble des membres du LCPO et du LAMC avec qui j'ai passé de très bons moments, j'ai rencontré des personnes formidables et qui sont pour certains passés de collègues à amis ; Doudou, Boris, Martin et Benji alias « La Gitanie », Chris (nouveau membre de la gitanie), Cédric, Coralie, Guillaume, Jérémy, Martin, Michèle, Pauline, Sophie, vous m'avez fait passer des moments formidables dans des moments de ma vie où j'en avais le plus besoin. Vous m'avez fait rire, sourire et me sentir bien dans un quotidien pas toujours très rose, vous n'imaginez pas à quel point votre présence et votre amitié a été essentielle à mon bien être !

Gaëlle, je te remercie pour ton aide, tes explications, ton implication et ton soutien !
Merci d'avoir pris le temps de relire ma thèse, d'avoir skypé avec moi pendant des heures pour me préparer aux questions et d'avoir assisté à ma soutenance de thèse tout ça à 6000 km et avec 6 heures de décalage horaire ! Tu es une personne sur qui on peut compter et j'espère pouvoir te le rendre un jour !

Ma Roro, notre amitié est présente depuis le début, à l'époque de l'IECB et de l'équipe Garanger ! Je suis contente d'avoir partagé tous ces moments avec toi, nos pauses carrés de chocolat, nos fous rires, nos délires, nos galères, mais aussi notre road trip aux Etats-Unis avec Johanne. Je sais que notre amitié dépassera les frontières du LCPO, c'est d'ailleurs déjà le cas ! Merci pour tout !

Ma Jojo, une de mes plus belles rencontres de stage ! Une chance que nos deux équipes aient partagées des bureaux et des labos ! On a toutes les deux obtenues une bourse de la Ligue, et au final on a vécu les mêmes joies et les mêmes galères, toi-même tu sais ! On a pu compter l'une sur l'autre et même encore aujourd'hui ! Toi et moi on est les vraies, pas besoin de trio ! Merci pour tout !

Margot, mon autre plus belle rencontre ! Tu es une personne formidable qui fait passer le bien-être de ses proches avant le sien. Toi seule sait toutes les galères personnelles et professionnelles que j'ai eu ces dernières années et tu as été là pour moi à chaque fois, au point de poser des jours pour me soutenir ! Tu as même dormi avec moi la veille de ma soutenance de thèse pour m'épauler et contenir mon stress !! Des personnes comme toi on n'en compte pas énormément dans une vie, mille merci ne suffiraient pas !

Guigui, amitié qui dure depuis plus de 8 ans, meilleurs amis bien avant le LCPO ! Ton soutien et ta loyauté sont présents depuis le début ! Tu sais déjà tout, je ne peux que te remercier une énième fois pour ta présence et tout ce que tu m'apportes au quotidien !

Je remercie enfin ma famille, mes parents et ma soeur pour le soutien qu'ils m'apportent depuis toujours. On parle très souvent de soutien moral mais on parle peu du soutien financier. Pendant près de 7 ans, mes parents m'ont permis de faire des études sans avoir à travailler pour payer mon loyer ! Sans vous, je n'aurais probablement jamais été docteur aujourd'hui. Un énorme merci pour tout ! Je vous aime !

Aymeric, merci pour ta compréhension et ta patience.

Je terminerai par une énorme pensée pour mon grand-père, parti trop tôt à cause de cette fichue maladie. J'espère qu'un jour, toutes ces recherches aboutiront à un bon traitement. J'espère que de là où tu es, tu veilles sur moi et que tu es fier de moi. *Amo-te..*

Carpe Diem

Laura

Table des matières

| | |
|--------------------------------------------------|----------|
| Introduction générale | 1 |
| Liste des abréviations | 4 |
| Chapitre 1 : Etude bibliographique | 6 |
| Introduction..... | 7 |
| 1. Le Cancer | 7 |
| 1.1 Définition | 7 |
| 1.2 Les traitements..... | 9 |
| 1.3 Les chiffres | 10 |
| 1.4 Le cancer du système nerveux central | 12 |
| 1.4.1 Les gliomes | 12 |
| 1.4.2 Les glioblastomes | 14 |
| 1.4.3 L'implication des chimiokines..... | 16 |
| 2. CXCR3 et cancer..... | 17 |
| 2.1 Les chimiokines..... | 17 |
| 2.1.1 Les chimiokines CXC | 20 |
| 2.1.2 Chimiokines et Cancer | 21 |
| 2.2 Les récepteurs aux chimiokines..... | 23 |
| 2.2.1 Voies de transduction / signalisation..... | 28 |
| 2.2.2 Désensibilisation | 30 |
| 2.3 CXCR3 : une cible intéressante | 31 |
| 2.3.1 Physiologie du CXCR3..... | 31 |
| 2.3.2 Ligands naturels du CXCR3 | 34 |
| 2.3.2.1 CXCL9, CXCL10 et CXCL11 | 34 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.2.2 CXCL4/CXCL4L1 | 35 |
| 2.3.3 Implication du CXCR3 dans les cancers | 37 |
| 2.3.4 Ligands antagonistes de CXCR3 | 41 |
| 2.3.5 La molécule SCH546738 | 44 |
| 2.3.5.1 Spécificité du SCH546738 | 44 |
| 2.3.5.2 Action du SCH546738 | 45 |
| 3. Les nanoparticules pour la santé | 47 |
| 3.1 La nanomédecine | 47 |
| 3.2 Les nanoparticules | 47 |
| 3.2.1 Définition, applications, propriétés | 47 |
| 3.2.2 Les différents types de nanoparticules | 49 |
| 3.2.2.1 Les micelles | 49 |
| 3.2.2.2 Les liposomes | 50 |
| 3.2.2.3 Nanoparticules lipidiques | 50 |
| 3.2.2.4 Nanoparticules inorganiques | 51 |
| 3.2.2.5 Nanoparticules polymères | 51 |
| 3.2.3 Les trois générations de nanoparticules | 53 |
| 3.2.4 Les nanoparticules multifonctionnelles | 54 |
| 3.3 Stratégie de ciblage | 56 |
| 3.3.1 Ciblage passif : effet EPR | 56 |
| 3.3.2 Ciblage actif : introduction de ligands spécifiques | 58 |
| 3.4 Internalisation cellulaire des nanoparticules | 61 |
| 3.5 Toxicité des nanovecteurs | 63 |
| 3.6 Nanoparticules pour le ciblage actif | 65 |
| 3.6.1 Nanoparticules multivalentes | 66 |
| 3.6.2 Nanoparticules à base de copolymères à blocs PTMC- <i>b</i> -PEG | 68 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Conclusion..... | 70 |
| Références..... | 71 |
| | |
| Chapitre 2 : Synthèse des copolymères à blocs PTMC-<i>b</i>-PEG et PTMC-<i>b</i>-PEG-SCH546738..... | 82 |
| Introduction..... | 83 |
| 1. Synthèse et caractérisation des copolymères à blocs PTMC- <i>b</i> -PEG..... | 85 |
| 1.1 Polymérisation par ouverture de cycle du TMC amorcé par un PEG..... | 85 |
| 1.2 Caractérisations chimiques des différents copolymères à blocs PTMC- <i>b</i> -PEG... .. | 86 |
| 2. Synthèse du copolymère à blocs PTMC- <i>b</i> -PEG-SCH546738 fonctionnalisé en bout de chaîne par le ligand SCH546738..... | 91 |
| 2.1 Synthèse des blocs hydrophobes PTMC..... | 92 |
| 2.1.1 Polymérisation par ouverture de cycle du TMC amorcé par amorcé par le 3-méthyl-1-butanol..... | 92 |
| 2.1.2 Fonctionnalisation du bout de chaîne du PTMC en acide carboxylique..... | 93 |
| 2.1.3 Synthèse du PTMC fluorescent..... | 94 |
| 2.2 Synthèse du bloc hydrophile PEG-SCH546738..... | 95 |
| 2.2.1 Modification chimique du SCH546738..... | 95 |
| 2.2.1.1 Structure et caractérisation du SCH546738..... | 95 |
| 2.2.1.2 Les différentes tentatives de modification du SCH546738..... | 98 |
| 2.2.1.3 Fonctionnalisation du SCH546738 avec une fonction alcyne..... | 103 |
| 2.2.2 Couplage du bloc PEG et du SCH546738-alcyne par « chimie click »..... | 108 |
| 2.3 Couplage des blocs PTMC et PEG-SCH546738..... | 109 |
| Conclusion..... | 117 |
| Matériels..... | 119 |
| Instrumentation..... | 119 |
| Protocoles expérimentaux..... | 120 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Figures supplémentaires | 126 |
| Références..... | 135 |
| Chapitre 3 : Auto-assemblages des copolymères à blocs PTMC-b-PEG et PTMC-b-PEG-SCH546738..... | 136 |
| Introduction..... | 137 |
| 1. Techniques de préparation des échantillons..... | 138 |
| 1.1 Dissolution directe | 138 |
| 1.2 Déplacement de solvant ou « Nanoprécipitation »..... | 138 |
| 1.2.1 Nanoprécipitation manuelle | 139 |
| 1.2.2 Nanoprécipitation contrôlée grâce à un système de microfluidique (Dolomite®)..... | 139 |
| 2. Techniques de caractérisation..... | 142 |
| 2.1 Diffusion dynamique de la lumière (DLS 90°)..... | 142 |
| 2.2 Diffusion statique et dynamique de la lumière multi-angles (MALS) | 143 |
| 2.3 Spectroscopie de corrélation de durée de vie de fluorescence (FLCS)..... | 144 |
| 2.4 Diffusion de neutrons aux petits angles (SANS) | 145 |
| 2.5 Microscopie électronique à transmission (TEM)..... | 150 |
| 2.6 Cryo-microscopie électronique à transmission (Cryo-TEM)..... | 150 |
| 3. Auto-assemblage des copolymères à blocs PTMC _n -b-PEG ₄₅ | 151 |
| 3.1 Etude de la série de copolymères à blocs PTMC _n -b-PEG ₄₅ | 152 |
| 3.1.1 Par dissolution directe | 153 |
| 3.1.2 Par nanoprécipitation manuelle..... | 154 |
| 3.1.3 Par nanoprécipitation contrôlée par un système de microfluidique | 166 |
| 3.2 Etude sur le PTMC ₉₆ -b-PEG ₄₅ | 169 |
| 3.2.1 Mise en place d'un protocole de nanoprécipitation contrôlée | 169 |
| 3.2.2 Etude des objets obtenus par différents protocoles..... | 173 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4. Co auto-assemblage des PTMC ₉₆ -b-PEG et PTMC ₈₈ -b-PEG-SCH546738 par nanoprecipitation contrôlée | 181 |
| Conclusion..... | 189 |
| Références..... | 191 |

Chapitre 4 : Etude in vitro des différents systèmes sur des modèles cellulaires surexprimant le récepteur CXCR3-A.....192

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Introduction..... | 193 |
| 1. Principe des techniques utilisées | 194 |
| 1.1 western-blot | 194 |
| 1.2 Cytométrie en flux | 195 |
| 1.3 Chambre de Boyden..... | 196 |
| 1.4 Microscopie confocale à balayage laser | 197 |
| 2. Activité biologique du SCH546738 et de ses formes chimiquement modifiées..... | 199 |
| 2.1 Validation de l'activité biologique du SCH546738 | 199 |
| 2.1.1 Western blot..... | 199 |
| 2.1.2 Cytométrie en Flux..... | 201 |
| 2.1.3 Chambre de Boyden | 202 |
| 2.2 Tests d'activité des différentes formes modifiées de l'antagoniste SCH546738 | 204 |
| 2.2.1 Activité de la forme acétylée du SCH546738 (SCH-Ac)..... | 204 |
| 2.2.2 Activité de la forme PEGylée du SCH546738 (PEG-SCH) | 207 |
| 3. Etudes de l'activité des nanoparticules de PTMC b PEG SCH546738 | 210 |
| 3.1 Internalisation des nanoparticules dans les HEK 3A..... | 211 |
| 3.2 Activité biologique des nanoparticules..... | 216 |
| Conclusion | 219 |
| Matériel | 221 |

| | |
|-------------------------------|-----|
| Protocoles expérimentaux..... | 221 |
| Références..... | 225 |
| Conclusion générale | 226 |

Introduction générale

Les nanotechnologies représentent aujourd'hui un domaine scientifique et technique en plein essor dans de nombreux et divers domaines. Ainsi, l'utilisation de ces nanotechnologies, et notamment de nanoparticules, dans le cadre plus spécifique de la médecine (ce que l'on appelle nanomédecine) connaît de grands progrès depuis plus d'une décennie et devrait permettre d'améliorer la détection précoce et le traitement de nombreuses pathologies (cancers, maladies auto-immunes ou infectieuses par exemple).

Les nanoparticules à base de copolymères à blocs amphiphiles présentent un intérêt particulier considérable. En effet, le caractère amphiphile de ces copolymères leur confère d'excellentes capacités d'auto-organisation en solution pouvant être contrôlées par l'architecture et les caractéristiques du copolymère mais également par le procédé d'auto-assemblage. Ainsi, de nombreuses structures (micelles sphériques, vésicules, micelles allongées, etc) et taille d'objets (de quelques dizaines à plusieurs centaines de nanomètres) en solution peuvent être élaborées fournissant chacune des propriétés intéressantes selon l'utilisation souhaitée. Les polymersomes, vésicules formées de copolymères à blocs amphiphiles, présentent de nombreuses propriétés avantageuses dans le domaine de la santé, mais aussi du soin et du bien-être. En effet, leur structure est plus stable et robuste que d'autres morphologies comme les liposomes et ont l'avantage de pouvoir encapsuler des principes actifs hydrophiles en leur cœur et/ou hydrophobes dans la membrane hydrophobe avec des bons taux d'encapsulation, tout en préservant une excellente stabilité colloïdale. Leur modularité permet également de pouvoir fonctionnaliser leur surface avec des molécules bioactives (ligands, anticorps, etc).

En vue d'une application biomédicale, les polymères biodégradables et biocompatibles sont privilégiés. Les plus populaires d'entre eux sont les polyesters, les polycarbonates et les polypeptides, parce qu'ils sont dégradables de façon hydrolytique ou enzymatique par les organismes vivants. Dans la catégorie des polymères hydrophile, le poly(oxyde d'éthylène) POE, souvent confondu avec le poly(éthylène glycol) (PEG) s'est imposé grâce à son absence d'interactions avec les protéines de l'environnement biologique, en

faisant de lui un polymère « furtif » limitant ainsi la reconnaissance et l'élimination des nanoparticules.

Fonctionnaliser les polymersomes avec des agents de reconnaissance, pour apporter des propriétés de ciblage actif, est couramment utilisé, notamment dans le domaine du cancer, où l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention), encore controversé, ne permet souvent pas une accumulation tumorale suffisante. Ainsi, le ligand en surface permet une bien meilleure spécificité des cellules tumorales où la reconnaissance de la cible, surexprimée sur ces cellules, peut aller à l'échelle du nanomolaire. Dans ce contexte, le récepteur CXCR3, surexprimé sur les cellules cancéreuses dans le cas du cancer du rein, du pancréas ou encore dans le cas des glioblastomes, est connu pour jouer un rôle primordial dans la progression de ces cancers. Des ligands synthétiques, comme le SCH546738, ont été étudiés et ont prouvé leur grande affinité, de l'ordre du nanomolaire pour ce récepteur.

Ainsi, l'idée de combiner l'utilisation de nanoparticules dans le but de cibler le récepteur CXCR3 a initié ce projet de thèse. En effet, la stratégie a été de fonctionnaliser la surface de nanoparticules à base de poly(triméthylène carbonate)-*b*-poly(éthylène glycol) PTMC-*b*-PEG avec un rapport optimal de SCH546738 afin de cibler le récepteur CXCR3-A (isoforme de CXCR3 ayant une activité pro-tumorale) surexprimé sur les cellules tumorales et ainsi bloquer les voies de signalisation qui impliquent la migration des cellules cancéreuses.

Ce projet multidisciplinaire de 3 ans qui touche aux domaines de la chimie des polymères, de la bio-conjugaison, l'auto-assemblage et la physico-chimie, jusqu'à la biologie, a été financé par La Ligue Nationale Contre le Cancer.

La première partie de ce projet a consisté à synthétiser une série de copolymères à blocs **PTMC-*b*-PEG** ainsi que son analogue, fonctionnalisé en bout de chaîne hydrophile avec le ligand synthétique SCH546738, **PTMC-*b*-PEG-SCH546738**. Les nombreuses tentatives de **modification chimique du ligand** afin de l'introduire sur le segment PEG sont exposées ainsi que les différentes purifications et caractérisations afin d'obtenir les deux types de copolymères purs. La deuxième partie expose **l'auto-assemblage de différents rapports** de l'un par rapport à l'autre en solution. Les **morphologies obtenues** en fonction des fractions hydrophiles du copolymère PTMC-*b*-PEG ont d'abord

été étudiées ainsi que les **différents procédés d'auto-assemblage** afin d'obtenir le type et la taille de nanoparticule souhaités. Enfin, la dernière partie expose les **premiers tests biologiques** sur cellules cancéreuses (HEK293 et U87) sur-exprimant le récepteur CXCR3-A. L'inhibition des voies de signalisation **MAPK/ERK**, la diminution du **calcium intracellulaire** et la **migration cellulaire** ont été étudiés en présence des différentes nanoparticules obtenues.

Liste des abréviations

| | |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| AC | Acétate de cellulose |
| CAC | Concentration d'agrégation critique |
| CCM | Chromatographie sur couche mince |
| CDCl ₃ | Chloroforme deutéré |
| CMC | Concentration micellaire critique |
| Cryo-TEM | Cryo-microscopie électronique à transmission |
| D | Coefficient de diffusion |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phénylindole |
| DBU | 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène |
| D _h | Diamètre hydrodynamique |
| δ | Epaisseur de membrane |
| D ₂ O | Eau lourde (oxyde de deutérium) |
| DIEA | Diisopropyléthylamine |
| DLS | Diffusion dynamique de la lumière |
| DMAP | Diméthylaminopyridine |
| DMEM | Milieu minimum essentiel de Eagle – Milieu de culture cellulaire |
| DMSO | Diméthylsulfoxyde |
| DP | Degré de polymérisation |
| DSC | Calorimétrie différentielle à balayage |
| EDC | 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide |
| EPR | Perméabilité et rétention tissulaire |
| <i>f</i> | Fraction hydrophile massique |
| FCS | Fractal Core-Shell |
| FLCS | Spectroscopie de corrélation de durée de vie de fluorescence |
| Γ | Fréquence de relaxation |
| GMBS | N-γ-maleimidobutyryl-oxysuccinimide |
| HBTU | 2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate |
| HOBT | Hydroxybenzotriazole |
| HPLC | Chromatographie en phase liquide à haute performance |
| KOH | Hydroxyde de potassium |
| MALS | Diffusion statique et dynamique de la lumière multi-angles |
| N _{agg} | Nombre d'agrégation |
| NEt ₃ | Triéthylamine |
| PDI | Indice de polydispersité |
| PEG | Poly(éthylène glycol) |
| Φ | Fraction volumique |
| POE | Poly(oxyde d'éthylène) |
| PTFE | Polytétrafluoroéthylène |
| PTMC | Poly(triméthylène carbonate) |
| PVDF | Polyfluorure de vinylidène |
| PWR | Résonance plasmonique couplée aux ondes guidées |
| R _g | Rayon de giration |
| R _h | Rayon hydrodynamique |
| ROP | Polymérisation par ouverture de cycle |
| ρ | Densité de longueur de diffusion |

| | |
|----------|-----------------------------------------|
| SANS | Diffusion de neutrons aux petits angles |
| σ | Distribution en taille |
| SDS | Dodécylsulfate de sodium |
| SEC | Chromatographie d'exclusion stérique |
| SLS | Diffusion statique de la lumière |
| T_f | Température de fusion |
| T_g | Température de transition vitreuse |
| TEM | Microscopie électronique à transmission |
| THF | Tétrahydrofurane |
| TMC | Triméthylène carbonate |
| WB | Western blot |

Chapitre 1

Etude bibliographique

Introduction

Cette étude bibliographique a pour objectif de fournir les informations nécessaires à la bonne lecture de ce manuscrit. Elle propose un état de l'art non exhaustif des différents domaines abordés lors de ce projet. Dans un premier temps, la notion de Cancer sera introduite car c'est sur cette thématique que s'est monté le projet, financé par la Ligue contre le Cancer. Notre cible d'intérêt, le récepteur CXCR3, sera décrit afin de bien comprendre son implication dans de nombreuses pathologies et notamment la progression tumorale et donc l'importance de le cibler. Enfin, les différents avantages des copolymères à blocs amphiphiles et leur utilisation dans le domaine du ciblage actif seront abordés.

1. Le Cancer

1.1 Définition

Définition du Petit Larousse : « Tumeur maligne formée par la prolifération désordonnée des cellules d'un tissu ou d'un organe ».

Le cancer est en effet une maladie caractérisée par la prolifération incontrôlée de cellules dans un organe ou un tissu, liée à un échappement aux mécanismes de régulation qui assure le développement harmonieux de notre organisme. Cette multiplication incontrôlée résulte de la modification de la structure d'un gène, généralement le gène qui contrôle la mitose, que l'on appelle « mutation ». Cette modification peut être favorisée par des éléments extérieurs à l'organisme comme par exemple le tabac (cancer du poumon ou de la gorge), la consommation d'alcool (cancer du foie, de l'estomac ou du pancréas), l'alimentation, de l'environnement extérieur comme la pollution, ou alors dépendre de facteurs génétiques.

Cette altération constitue la base même de tous les cancers. Le développement d'un cancer se fait selon trois étapes essentielles indépendantes : l'initiation, la promotion et la progression tumorale.

Lors de l'initiation, la cellule va acquérir une anomalie génétique définitive. Une cellule « initiée » n'a pas acquis d'autonomie de croissance mais transmet à sa descendance la mutation génétique irréversible. Lors de la promotion tumorale, les cellules n'arrêtent plus de se multiplier et restent en vie dans un organe où habituellement les cellules meurent ou se renouvellent. Elles échappent à une mort cellulaire programmée appelée apoptose. Ces cellules vont alors se regrouper entre elles et former un amas de cellules que l'on appelle tumeur lorsque le regroupement atteint environ 100 000 cellules. La dernière étape, appelée progression tumorale, résulte d'une ou plusieurs mutations supplémentaires qui va convertir cette tumeur bénigne formée en tumeur maligne.

Les cellules cancéreuses vont alors se développer et détruire les cellules normales avoisinantes mettant en danger le fonctionnement de l'organe et son environnement et devient alors un danger pour la survie de l'être vivant.

Une cellule cancéreuse peut également se détacher de la tumeur, migrer dans une autre partie du corps et s'installer sur un autre organe pour créer une nouvelle tumeur. Cette tumeur nouvellement formée est appelée métastase.

La cellule cancéreuse met en place les dix mécanismes décrits sur la Figure 1, essentiels pour sa croissance maligne.

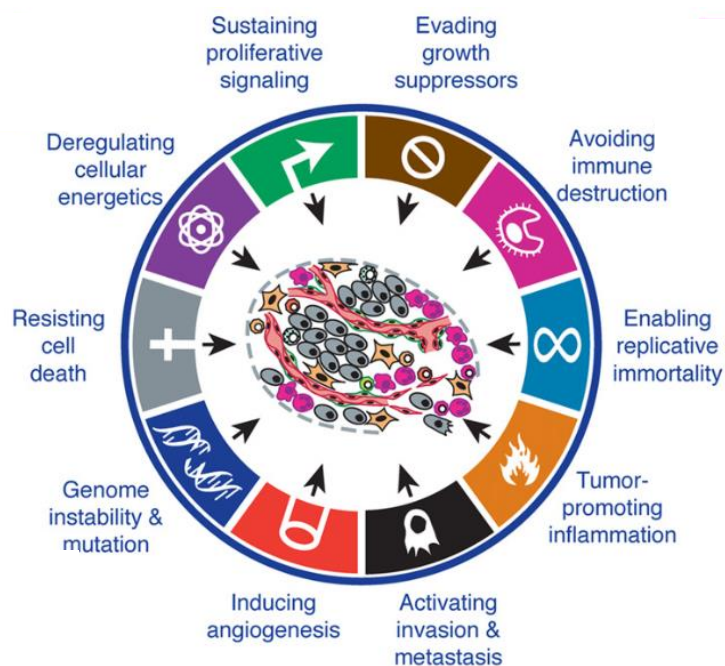


Figure 1 : Altérations responsables du caractère malin des cellules cancéreuses¹

La cancérogenèse s'accompagne de la mise en place de processus biologiques tels que l'angiogenèse, l'échappement tumoral et la diffusion de cellules malignes expliquant que la genèse d'un cancer est un processus complexe souvent long.

En effet, le passage d'une cellule cancéreuse à une tumeur prend en moyenne plusieurs années, et seules les tumeurs peuvent être détectées par les techniques d'imagerie. Lorsqu'un cancer est avéré, cela fait donc plusieurs années que les cellules cancéreuses se développent dans le corps. En effet, la plupart des cancers mortels sont ceux qui sont diagnostiqués trop tard. Un des challenges de nos jours est de trouver des moyens de détection beaucoup plus précoces.²

1.2 Les traitements

Lorsqu'un cancer est détecté suffisamment tôt grâce aux nombreux moyens de détection que l'on possède de nos jours (mammographie, IRM, radiographie, analyses sanguines etc.), il existe plusieurs types de traitements dont les trois principaux sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Dans la plupart des cas, les trois sont complémentaires.

La chirurgie, est une intervention qui consiste à retirer localement la tumeur. Elle est envisagée dans un but curatif car elle comprend un curage ganglionnaire c'est pourquoi cette technique n'est possible que dans les cas où la tumeur est accessible chirurgicalement mais aussi lorsqu'elle se trouve sur organe non vital (comme le cas du pancréas par exemple ou l'ablation est impossible). De plus, avec cette technique, il n'y a pas d'action sur les éventuelles métastases. Il est donc nécessaire d'effectuer un traitement complémentaire afin de détruire les cellules cancéreuses résiduelles et prévenir les récives.

La radiothérapie, est une technique basée sur l'utilisation des rayons X. Ils vont détruire le capital génétique de la cellule ce qui va empêcher la reproduction. Elle peut être utilisée avant toute chirurgie pour diminuer la zone à opérer, après la chirurgie pour éviter toute récive mais peut aussi être utilisée en remplacement de la chirurgie lorsque cette dernière est impossible.

Cependant, la radiothérapie est à l'origine de toxicités spécifiques avec de nombreux effets secondaires dus à l'irradiation (dysphagie, pneumonie radique, etc) qui implique

une incompatibilité de cette technique avec des patients ayant une santé trop faible qui ne pourraient supporter ces irradiations.

La chimiothérapie, est basée sur l'utilisation de médicaments anti-cancéreux. Comme la radiothérapie, elle peut être utilisée en complément de la chirurgie et peut même être utilisée en association avec la radiothérapie. Cependant, dans les cas où les cancers ne peuvent être retirés chirurgicalement ou traités par radiothérapie, la chimiothérapie peut être utilisée seule. Plusieurs médicaments à visée anticancéreuse sont injectés par perfusion ou par voie orale durant une période allant de plusieurs mois à plusieurs années.

Elle aussi présente de nombreux effets secondaires, dû à la non spécificité des agents chimio-thérapeutiques qui vont toucher les cellules cancéreuses comme les cellules saines. Pour une cellule cancéreuse touchée plus de 100 000 cellules saines sont détruites. En effet, les patients traités peuvent souffrir de nausées, de chute de cheveux ou de grandes irritations de la peau lorsque par exemple les cellules du cuir chevelu ou de la peau sont détruites par les principes actifs.

Il est donc nécessaire de trouver un traitement qui n'agirait que sur les cellules cancéreuses et épargnerait les cellules saines.

1.3 Les chiffres

Sur les 56,4 millions de décès survenus dans le monde en 2015 (chiffres donnés par l'OMS), plus de la moitié (54%) est due à 10 principales causes dont la première est due aux cardiopathies ischémiques et aux accidents vasculaires cérébraux, responsables de 15 millions de décès au total.

Le cancer figure parmi les principales causes de morbidité mais aussi de mortalité dans le monde. En effet, le cancer constitue la deuxième cause de décès dans le monde avec 8,8 millions de morts en 2015, ce qui fait environ 1 décès sur 6 qui est dû au cancer.

Les différents types de cancer sont les suivants :

- cancer du poumon (1,69 million de décès);
- cancer du foie (788 000 décès);
- cancer colorectal (774 000 décès);
- cancer de l'estomac (754 000 décès);
- cancer du sein (571 000 décès).

Si l'on regarde les chiffres au niveau national, on s'aperçoit que les types de cancer les plus meurtriers ne sont pas classés dans le même ordre (Figure 2).

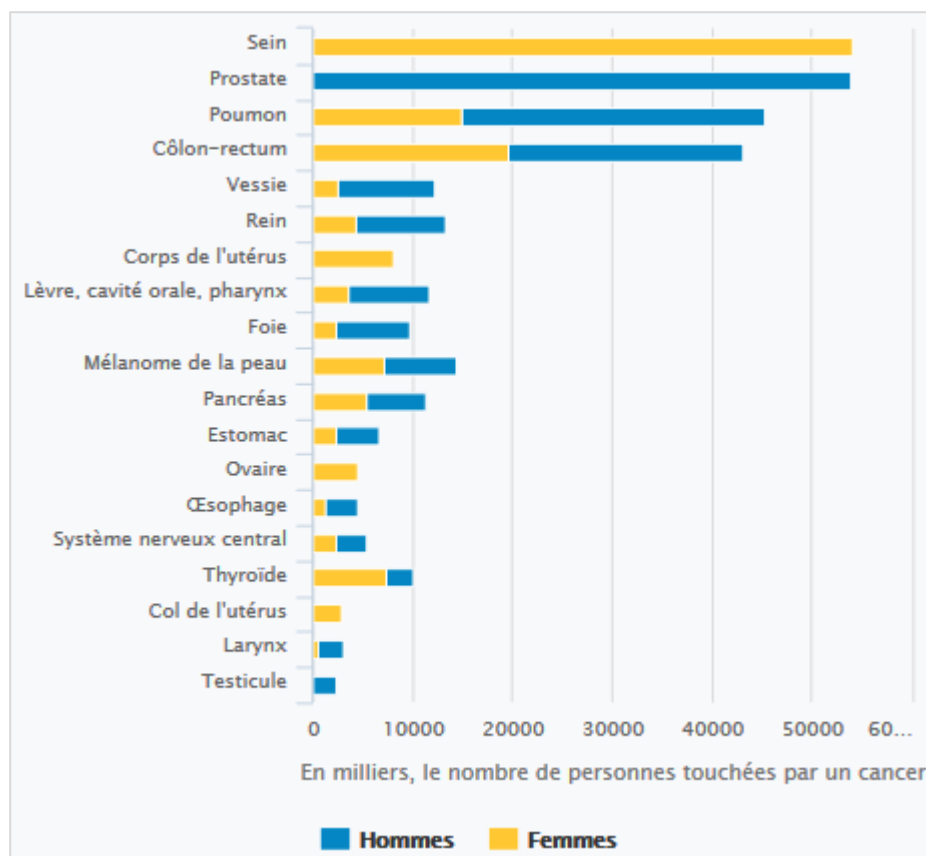


Figure 2: Les cancers les plus répandus en France en 2015 chez les hommes et les femmes (source Institut National du Cancer)

Le cancer le plus courant chez l'homme est le cancer de la prostate et celui chez la femme est le cancer du sein. Ce sont les plus courants mais pas forcément les plus meurtriers, grâce aux progrès concernant la détection de nos jours. Bien que le cancer le plus meurtrier chez la femme reste le cancer du sein (11 913 décès) suivi du cancer du poumon (9 565 décès) et du cancer colorectal (8 496 décès), le cancer le plus meurtrier

chez l'homme est le cancer du poumon (20 990 décès) suivi du cancer colorectal (9 337 décès) et du cancer de la prostate (8 713 décès). (Chiffres donnés par UNICANCER)

De manière générale, le cancer est diagnostiqué beaucoup trop tard. En effet, plus le cancer est détecté tard plus les chances de survie sont minimales. Comme évoqué plus haut, seules les tumeurs de milliers de cellules peuvent être détectées. Avec l'utilisation des nanotechnologies comme diagnostic, des tumeurs 1 000 à 1 000 000 de fois plus petites que celles détectables de nos jours par IRM ou par scanner pourraient être observables et donc détecter le cancer à un stade beaucoup plus précoce avec des chances de survie beaucoup plus importantes. De même, en terme de traitement, l'apport des nanotechnologies permettraient de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses et toucher beaucoup moins de cellules saines, ce qui permettrait d'une part de diminuer de manière significative les effets secondaires ainsi que de permettre un traitement moins contraignant pour le patient et d'autre part bénéficier d'un traitement beaucoup plus efficace qui permettrait de réduire également les métastases.

1.4 Le cancer du système nerveux central

1.4.1 Les gliomes

Les cancers du système nerveux central (SNC) regroupent les cancers se développant dans le cerveau et dans la moelle épinière. Certaines de ces tumeurs, comme les gliomes ou les lymphomes, sont des cancers primitifs, c'est à dire qu'ils se développent spontanément, tandis que d'autres comme les métastases cérébrales, surviennent secondairement chez des patients qui présentent déjà un cancer situé dans un autre organe (sein, poumon, rein, etc).

Les gliomes, ou tumeurs gliales, sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes avec 5 à 8 cas par an pour 100 000 habitants en France et représentent plus de deux tiers des tumeurs primitives du SNC. Les gliomes se développent à partir des cellules contenues dans le tissu de soutien du cerveau, la glie, appelées cellules gliales et dont font partie les astrocytes qui contribuent à la nutrition du SNC.

Des grades établis par l'OMS ont permis de classifier ces tumeurs en fonction de leur malignité et de leurs caractéristiques. Le grade d'une tumeur dépend du degré d'anormalité des cellules cancéreuses et du taux de croissance et d'expansion de la tumeur (Table 1).

| Anaplasie Terme désignant le phénomène au cours duquel certaines cellules, entrant dans la composition des tissus, perdent leurs caractères propres et changent anormalement de structure | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| grade I <i>Tumeurs bénignes</i> | Tumeurs à croissance lente et circonscrites (limites bien définies). |
| grade II <i>Tumeurs bénignes</i> | Tumeurs à croissance lente, mais, contrairement aux tumeurs de grade I, leurs limites sont imprécises. |
| grade III <i>Tumeurs malignes</i> | Tumeurs anaplasiques Un ou plusieurs foyers «anaplasiques» se sont développés au sein d'une tumeur pré-existante de bas grade (I ou II). Leur croissance est plus rapide que celle des tumeurs de bas grade. |
| grade IV <i>Tumeurs malignes</i> | Les tumeurs de grade IV présentent une anaplasie très prononcée. Leur croissance est plus rapide que celle des tumeurs de bas grade. |

Table 1: Classification des gliomes selon 4 grades.³

Parmi les tumeurs astrocytaires, on distingue principalement :

- **Les astrocytomes pilocytiques (GRADE I)** : Elles touchent surtout les enfants et les adolescents. C'est une transformation maligne extrêmement rare.
- **Les astrocytomes diffus (GRADE II)** : Elles touchent surtout les jeunes adultes et ont une forte propension à la transformation maligne.
- **Les astrocytomes anaplasiques (GRADE III)** : Elles touchent surtout les personnes de 50 ans et ont une forte propension à la transformation maligne en glioblastomes.
- **Les Glioblastomes (astrocytomes de GRADE IV)** : Ces tumeurs malignes sont les plus fréquentes chez l'adulte, principalement entre 45 et 70 ans.

1.4.2 Les glioblastomes

Bien que les glioblastomes soient les gliomes les plus agressifs (Grade IV), ce sont également les tumeurs cérébrales les plus fréquentes (55% des gliomes). Ils surviennent à tous âges mais dans 70% des cas se situent entre 45 et 70 ans avec une moyenne à 58 ans. Le pronostic de ces tumeurs est mauvais, surtout en l'absence d'exérèse chirurgicale satisfaisante ou chez les patients âgés. La survie moyenne constatée aujourd'hui est de 15 mois. Le rapport de la CBTRUS entre 2008 et 2012⁴ montre que le taux de survie descend au-dessous des 10% à 3 ans et atteint à peine plus de 2% au bout de 10 ans (Tableau 1).

| Grade | Type histologique | Nombre de cas | Taux de survie (en %) | | | | | |
|-------|---------------------------|---------------|-----------------------|-------|-------|-------|-------|--------|
| | | | 1 an | 2 ans | 3 ans | 4 ans | 5 ans | 10 ans |
| I | Astrocytomes pilocytiques | 3 849 | 97,9 | 96,6 | 95,5 | 94,7 | 94,2 | 92,1 |
| II | Astrocytomes diffus | 6 635 | 72,2 | 61,5 | 55,4 | 51,2 | 47,9 | 37,6 |
| III | Astrocytomes anaplasiques | 4 101 | 62,1 | 44 | 35,7 | 31,2 | 27,9 | 19,8 |
| IV | Glioblastomes | 33 204 | 37,2 | 15,2 | 8,8 | 6,3 | 5,1 | 2,6 |

Tableau 1: Taux de survie des patients en fonction du grade des gliomes – adapté du rapport de la CBTRUS.

Effectivement, lorsque l'on regarde les chiffres, on observe que plus on monte en grade et plus le taux de survie baisse. On peut aussi facilement conclure que les glioblastomes sont de loin les tumeurs les plus fréquentes (entre 5 et 8 fois plus courantes selon le grade) et que le taux de survie au fil des années est en forte décroissance jusqu'à devenir quasi nul.

Cette faible survie vient des traitements utilisés de nos jours qui ne permettent pas de guérir d'un glioblastome. En effet, comme tout cancer il est possible de traiter les glioblastomes par chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie. L'utilisation d'agents chimio-thérapeutiques est cependant limitée dû à la présence de la barrière hémato-encéphalique protégeant le parenchyme cérébral des substances présentes dans

le sang. Bien que le traitement chirurgical reste le moyen le plus efficace, une résection complète de la tumeur reste cependant impossible due à l'infiltration des cellules cancéreuses dans tout le tissu cérébral.⁵

Depuis 2005, le traitement des glioblastomes est relativement standardisé et appelé protocole de Stupp.⁶ Il consiste à associer radiothérapie sur lit chirurgical avec une chimiothérapie adjuvante systémique par le témozolomide oral (Temodal®). La radiothérapie doit être débutée dans un délai maximum de 5 semaines après le geste chirurgical.

Les résultats ci-dessous (Table 2) montrent effectivement que l'ajout de témozolomide à la radiothérapie classique montre une meilleure efficacité avec un meilleur taux de survie. En effet, au bout de 24 mois de traitement associant radiothérapie et témozolomide, le taux de survie est de 26,5% comparé à 10,4% avec une radiothérapie seule. Le gain médian est de 2,5 mois. Le nombre de personnes dont la maladie ne progresse pas grâce au traitement augmente également de manière significative en présence de témozolomide.

| Variable | Radiotherapy (N=286) | Radiotherapy plus Temozolomide (N=287) |
|---------------------------------------|-------------------------|----------------------------------------------|
| | <i>value (95% CI)</i> | |
| Median overall survival (mo) | 12.1 (11.2–13.0) | 14.6 (13.2–16.8) |
| Overall survival (%) | | |
| At 6 months | 84.2 (80.0–88.5) | 86.3 (82.3–90.3) |
| At 12 months | 50.6 (44.7–56.4) | 61.1 (55.4–66.7) |
| At 18 months | 20.9 (16.2–26.6) | 39.4 (33.8–45.1) |
| At 24 months | 10.4 (6.8–14.1) | 26.5 (21.2–31.7) |
| Median progression-free survival (mo) | 5.0 (4.2–5.5) | 6.9 (5.8–8.2) |
| Progression-free survival (%) | | |
| At 6 months | 36.4 (30.8–41.9) | 53.9 (48.1–59.6) |
| At 12 months | 9.1 (5.8–12.4) | 26.9 (21.8–32.1) |
| At 18 months | 3.9 (1.6–6.1) | 18.4 (13.9–22.9) |
| At 24 months | 1.5 (0.1–3.0) | 10.7 (7.0–14.3) |

Table 2 : Taux de survie d'un groupe de patients traités par radiothérapie avec ou sans témozolomide⁶

Le témozolomide fait partie d'une série de dérivés de l'imidazotétrazine et a été développé dans les années 1980 lors de la campagne de recherche sur le Cancer au Royaume-Uni. Il agit comme agent alkylant de l'ADN et a une excellente pénétration dans tous les types de tissu du corps ce qui lui confère la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique. Une fois administré, il est spontanément converti en 5-(3-méthyl)1-triazén-1-yl-imidazole-4-carboxamide (MTIC), un puissant métabolite anti tumoral qui va venir méthyler les atomes N7 et O6 des guanines et O3 de l'adénine de l'ADN. Cette méthylation va entraîner un mauvais appariement du double brin de l'ADN et donc une cassure qui va provoquer la mort cellulaire.⁷

1.4.3 L'implication des chimiokines

Du fait du faible taux de survie des patients atteints de gliomes et plus particulièrement de glioblastomes, de nombreux groupes de recherche tentent de comprendre les mécanismes d'adaptation des glioblastomes et essayer de trouver un autre moyen de bloquer la progression tumorale ou l'infiltration des cellules cancéreuses dans le tissu sain.

Il a été montré que de petites protéines chimiotactiques, appelées chimiokines et leurs récepteurs étaient impliquées dans de nombreuses maladies dont les tumeurs. Effectivement, les astrocytes sont sources de chimiokines. Dans le cas des tumeurs au cerveau, Sehgal *et al.* ont décrit pour la première fois l'augmentation de l'expression d'un de ces récepteurs (CXCR4) dans les tissus tumoraux du cerveau comparé au tissu cérébral sain⁸ et est également responsable d'un très mauvais pronostic chez les patients. Effectivement, des tests *in vitro* sur cellules tumorales de glioblastomes, U87, en présence de l'antagoniste AMD3100 montrent que la présence de la chimiokine correspondante (CXCL12) induisait une croissance tumorale et inhibait l'apoptose à travers des voies de signalisation (ERK1/2 et AKT).⁹

Plus récemment, des études ont montrés que l'immunoexpression de la chimiokine CXCL10 et son récepteur CXCR3 augmentait progressivement à mesure que l'astrocytome de bas grade progressait dans son grade supérieur, suggérant le rôle important de la liaison CXCL10/CXCR3 dans la prolifération des astrocytes et le

recrutement de plus de cellules tumorales, favorisant ainsi l'angiogenèse dans la tumeur.¹⁰

Cette dernière partie nous montre la grande implication des chimiokines dans l'évolution du cancer cérébral mais également dans tous types de cancer et également de nombreuses autres maladies.

2. CXCR3 et cancer

2.1 Les chimiokines

Les cytokines sont des protéines de signalisation cellulaire sécrétées par les cellules du système immunitaire suite à une stimulation. Elles se fixent sur des récepteurs spécifiques et régulent de nombreuses fonctions biologiques dans la cellule comme la prolifération, la migration, la survie ou encore la mort cellulaire.

Les cytokines chimiotactiques, ou chimiokines, sont de petites protéines (8-14 kDa) connues pour leur rôle dans le recrutement de leucocytes depuis le flux circulant jusqu'à leur site d'action, notamment au niveau des sites infectieux et inflammatoires.¹¹ Elles possèdent une structure tridimensionnelle commune qui consiste en une région amino-terminale flexible structurellement désordonnée qui précède la première cystéine. Ce domaine est suivi d'une région en boucle appelée boucle N (N loop) suivie d'un feuillet composé de trois brins β antiparallèles. La partie carboxy-terminale est organisée en hélice α derrière la dernière cystéine.¹² La structure tridimensionnelle est stabilisée à la fois par les deux ponts disulfures mais également par des liaisons hydrophobes entre des résidus de l'hélice α carboxy-terminale et des résidus du feuillet β .

Les chimiokines sont classées selon leurs structures, en fonction du nombre de résidus cystéine et de l'espace entre chaque motif au niveau du NH_2 terminal. Il existe quatre groupes de chimiokines : les chimiokines C (ou XC), CC, CXC et CX3C (Figure 3).

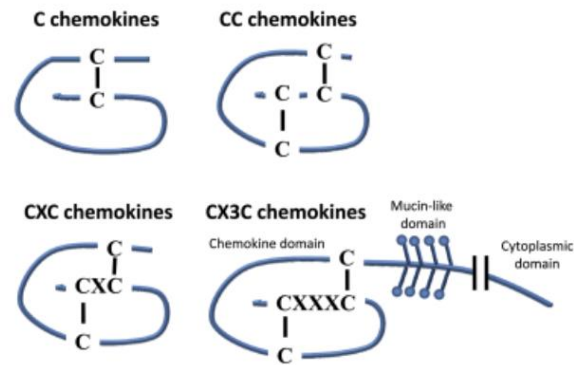


Figure 3: Les 4 sous familles de chimiokines¹³

X représente le nombre d'acide aminé entre chaque Cystéine (C)

La première chimiokine à avoir été découverte est l'interleukine-8 (CXCL8) dans les années 1985 et à ce jour, on distingue environ 50 chimiokines différentes, toutes répertoriées selon cette nomenclature, ce qui fait des chimiokines la plus grande famille de cytokines. Cependant, les familles CC et CXC représentent la grande majorité des chimiokines découvertes de nos jours.

Les chimiokines ont tout d'abord été décrites pour leur fonction de recrutement des leucocytes au niveau des sites inflammatoires ou infectieux de l'organisme.

L'inflammation constitue l'un des plus importants mécanismes de défense de l'organisme. Elle représente la réponse locale des tissus à toute forme d'agression. La réaction inflammatoire met en jeu des interactions complexes entre cellules inflammatoires (lymphocytes, neutrophiles et monocytes/macrophages) et cellules vasculaires (cellules endothéliales). Ces interactions sont possibles grâce à la présence d'un gradient de chimiokines formé au niveau de l'inflammation, qui va permettre l'attraction des leucocytes circulant dans le sang. En se fixant sur leurs récepteurs présents à la surface cellulaire, elles vont induire le roulement des cellules sur l'endothélium vers le site de l'inflammation. L'adhésion partielle des leucocytes sur l'endothélium vasculaire va se faire grâce à l'action principale de protéines d'adhésion présentes à la surface des cellules endothéliales activées et reconnaissant les résidus

glucidiques présents sur les leucocytes, appelées sélectines. L'adhérence ferme et stable des cellules à l'endothélium est contrôlée par les intégrines qui se lient à leur récepteur ICAM « Intracellular adhesion molecule » présents sur la paroi vasculaire. Les cellules immunitaires vont alors réorganiser leur cytosquelette pour passer à travers la couche de cellules endothéliales, guidées par un gradient de concentration de chimiokines : c'est la migration transendothéliale ou diapédèse.¹⁴ Une fois parvenus dans l'espace sous-endothélial, les leucocytes poursuivent leur migration à travers le tissu et sont dirigés vers la zone inflammatoire ou infectieuse grâce au gradient de chimiokines interstitiel (Schéma 1).

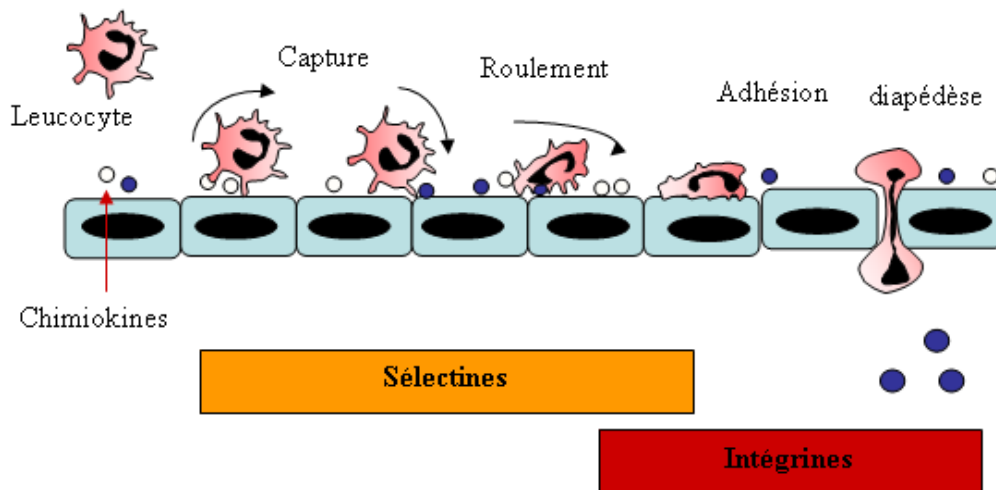


Schéma 1 : Étapes de la migration des leucocytes vers le site inflammatoire grâce à la présence de chimiokine¹⁵

Étape 1. Attraction des leucocytes au niveau de l'endothélium grâce à l'action des chimiokines. - *Étape 2.* Roulement des leucocytes. - *Étape 3.* Adhésion partielle des leucocytes grâce aux selectines puis adhésion ferme et stable grâce aux intégrines. - *Étape 4.* Diapédèse des cellules immunitaires

En plus de ce rôle chimiotactique, elles sont également impliquées dans le développement neuronal, la transmission synaptique, la modulation de l'adhésion cellulaire, l'activation et la différenciation des cellules T, l'apoptose, l'angiogenèse et le développement tumoral.^{16,17,18}

2.1.1 Les chimiokines CXC

Le sous-groupe CXC est également connu pour jouer un rôle primordial dans l'angiogenèse de manière physiologique et pathologique.¹⁹

En effet, les chimiokines CXC sont catégorisées en fonction de la présence ou absence d'une séquence de trois acides aminés (Glutamate, Leucine, Arginine) dans la partie N-terminale, que l'on appelle motif « ELR ». Ce motif est très important car les chimiokines CXC contenant ce motif (ELR+) vont promouvoir l'angiogenèse (activité pro_angiogénique), alors que les chimiokines CXC où le motif ELR est absent (ELR-) vont plutôt être inhibiteurs de l'angiogenèse (activité angiostatique) (Tableau 2).²⁰ Finalement, la balance d'expression des chimiokines ELR+ / ELR- joue un rôle important dans le développement tumoral.²¹

| Systemic name | Human ligand | Receptor | Promotes angiogenesis | Promotes metastasis |
|----------------------------|---------------|-------------|-----------------------|---------------------|
| <i>ELR+ CXC chemokines</i> | | | | |
| CXCL1 | Gro- α | CXCR2 | + | + |
| CXCL2 | Gro- β | CXCR2 | + | + |
| CXCL3 | Gro- γ | CXCR2 | + | + |
| CXCL5 | ENA-78 | CXCR2 | + | + |
| CXCL6 | GCP-2 | CXCR1/CXCR2 | + | + |
| CXCL7 | NAP-2 | CXCR2 | + | ? |
| CXCL8 | IL-8 | CXCR1/CXCR2 | + | + |
| <i>ELR- CXC chemokines</i> | | | | |
| CXCL4 | PF-4 | CXCR3 | - | ? |
| CXCL4L1 | PF-4var | ? | - | - |
| CXCL9 | Mig | CXCR3 | - | ? |
| CXCL10 | IP-10 | CXCR3 | - | - |
| CXCL11 | I-TAC | CXCR3/CXCR7 | - | ? |
| CXCL12 | SDF-1 | CXCR4/CXCR7 | ? | + |
| CXCL14 | BRAK | ? | - | ? |

Tableau 2: Ligands et récepteurs de la famille des chimiokines CXC impliqués dans l'angiogenèse et les métastases²⁰

Les chimiokines CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 et CXCL8 font parties de la famille des chimiokines angiogéniques et possèdent toutes le motif ELR. Ces chimiokines interagissent seules mais peuvent également interagir avec d'autres facteurs angiogéniques présents dans le microenvironnement afin de promouvoir l'angiogenèse. Par exemple, l'activation des cellules endothéliales par le VEGF (Vascular

Endothelial cells Growth Factor) peut entraîner une augmentation de la régulation de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 ce qui va accentuer l'expression de CXCL8 (Interleukine-8) et donc lui donner une fonction autocrine et paracrine afin de maintenir ce phénotype angiogénique.²¹

A l'opposé, les chimiokines CXCL4, CXCL4L1, CXCL9, CXCL10, CXCL11 et CXCL14 sont angiostatiques. CXCL4 a été la première chimiokine connue pour inhiber la néovascularisation.²² CXCL14, quant à lui, inhibe la chimiotaxie des cellules endothéliales microvasculaire *in vitro* et la néovascularisation *in vivo* induites par CXCL8, bFGF et VEGF.²³

En plus d'intervenir dans le système immunitaire via le recrutement des leucocytes ainsi que leurs rôles dans l'angiogenèse, les chimiokines jouent d'autres rôles essentiels dans divers processus physiologiques et pathologiques comme par exemple, dans la pathogénèse d'ulcère gastro-duodéal induite par *H. pylori* ²⁴ ou dans des processus pathologiques tels que les infections du VIH ²⁵, ou encore des maladies pulmonaires comme l'asthme et les maladies chroniques.²⁶

Les chimiokines CXC sont la seule famille de cytokine qui présente, en fonction du rapport structure/fonction et liaison/activation de leur récepteur, à la fois une activité angiogénique et angiostatique dans la régulation de l'angiogenèse.

De nos jours, les recherches se focalisent de plus en plus sur le rôle des chimiokines dans les cancers, que ce soit des chimiokines ayant un rôle pro-tumoral ou anti-tumoral.²⁷

2.1.2 Chimiokines et Cancer

L'angiogenèse est un phénomène essentiel pour la croissance des tumeurs. En effet, c'est un processus de formation de vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux existants. Il s'agit d'un processus physiologique primordial dans le développement, mais qui peut être détourné par les tumeurs pour devenir pathologique. Inhiber cette formation de vaisseaux sanguins tumoraux est depuis longtemps un grand axe de recherche dans la progression tumorale.^{28,29} Dans le micro-environnement tumoral, l'angiogenèse est déterminée par un déséquilibre entre la sur abondance de facteurs angiogéniques par

rapport à la sous-expression des facteurs angiostatiques. En effet, alors que beaucoup de recherches étaient faites sur la contribution de la famille des VEGF dans l'angiogenèse des tumeurs,³⁰ il a finalement été découvert que l'angiogenèse médiée par les chimiokines CXC, jouait un rôle critique dans les maladies malignes affectant les organes comme la peau, le pancréas, l'ovaire, le côlon, l'estomac, le poumon, la prostate, le cerveau, ou les reins. Par exemple, concernant les ligands pro-angiogéniques, les ligands CXCL1, CXCL2 et CXCL3 ont été identifiés comme étant hautement exprimés dans les mélanomes humains et que leurs diminutions réduisaient significativement l'angiogenèse et la croissance tumorale.³¹

De même, une étude sur Capan-1, une ligné cellulaire pancréatique humaine, a montré que CXCL1 et CXCL8 étaient également impliqués dans les cancers pancréatiques. En effet, ces ligands sont fortement exprimés par les Capan-1 et la croissance de ces cellules est inhibée lors de la présence d'anticorps anti-CXCL1 ou anti-CXCL8.³²

La progression du carcinome ovarien dépend également d'une angiogenèse efficace. Dans une étude menée par Yoneda *et al.*, il a été montré que la formation d'ascites était directement liée à l'expression de VEGF/VPF mais que la survie du patient était inversement associée à l'expression de CXCL8.³³

En effet, le micro-environnement tumoral est riche en chimiokines, qui régulent le recrutement leucocytaire sur le site tumoral (chimiotaxie), l'angiogenèse tumorale, ainsi que la prolifération ou survie cellulaire, qui sont nécessaires au développement tumoral. La recherche se positionne sur l'importance de comprendre le rôle des chimiokines et de trouver un moyen d'inhiber leur action.

Comme expliqué dans la partie « 2.1.1.1 Chimiokine CXC », les tumeurs sont infiltrées par des cellules inflammatoires et les cellules tumorales, tout comme les leucocytes associés à la tumeur, contribuent à la production locale de chimiokines à l'intérieur de la tumeur. Ainsi, les chimiokines déterminent le flux de leucocytes dans la tumeur par diapédèse et peuvent stimuler ou inhiber le développement tumoral en attirant les cellules avec des activités pro ou anti-tumorale (Figure 4).

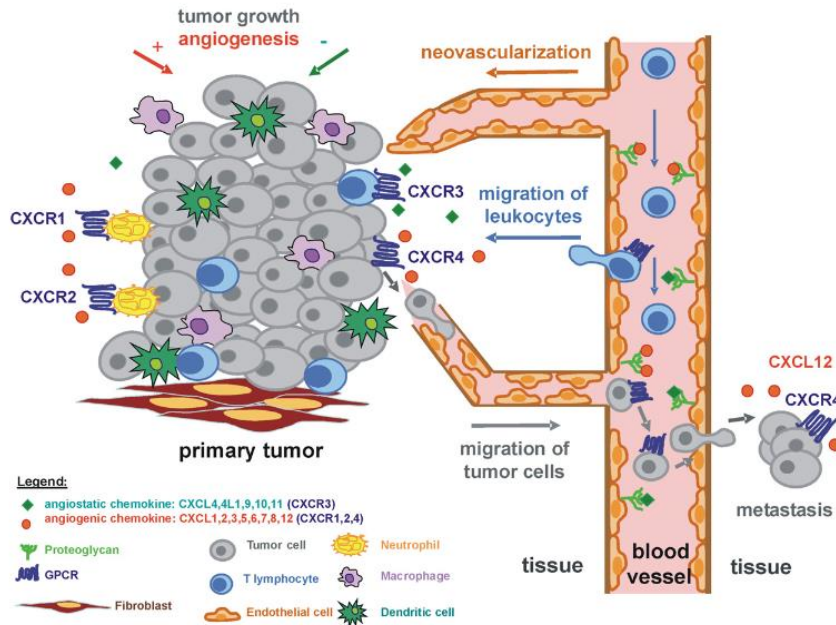


Figure 4: Rôle des chimiokines et de leurs récepteurs dans le micro environnement tumoral¹⁹

Ainsi toutes les chimiokines CXC ELR+ et ELR- vont attirer des cellules pro-tumorales comme les neutrophiles et cellules anti-tumorales comme les cellules NK et T respectivement surexprimant leurs récepteurs.

La production de chimiokines par les cellules tumorales, ou leucocytes affecte finalement le processus d'angiogenèse par leurs propriétés angiostatiques ou angiogéniques. En effet, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins est importante dans la tumorigenèse pour gagner en oxygène et nutriments et stimuler le processus de métastases.

2.2 Les récepteurs aux chimiokines

Les chimiokines peuvent agir et exercer leurs différents rôles grâce à leurs interactions avec les récepteurs localisés sur les cellules cibles. Les récepteurs cellulaires de chimiokines sont tous des récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs), porteurs de 7 hélices transmembranaires. Ils présentent une extrémité amino-terminale et trois

boucles extracellulaires, puis trois boucles et une extrémité carboxy-terminale intracellulaire (Figure 5).

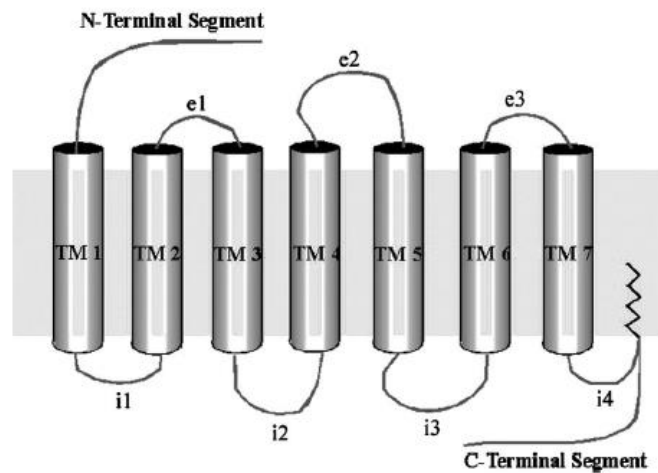


Figure 5: Structure schématique générale des récepteurs couplés aux protéines G ³⁴

Les GPCRs présentent une extrémité amino-terminale qui est exposée à l'extérieur de la cellule, les sept segments transmembranaires (TM1 à TM7) qui sont reliés entre eux par trois boucles extracellulaires (e1, e2, e3) et trois boucles intracellulaires (i1, i2, i3) dont la taille peut varier et une extrémité carboxy-terminale intracellulaire

Le domaine N-terminal extracellulaire est important pour la liaison des ligands surtout au niveau des boucles e1, e2 et e3, bien qu'e3 soit essentiel pour une activation efficace du récepteur. En effet, tous les récepteurs de chimiokines ont deux cystéines, une dans le domaine N-terminal et la seconde au niveau de la troisième boucle extracellulaire ce qui permet la formation d'un pont disulfure, nécessaire pour la liaison avec le ligand.¹² Les chimiokines se lient au niveau du domaine N-terminal du récepteur ce qui permet l'activation du récepteur.³⁵

De nombreuses études ont montré que les chimiokines avaient deux sites principaux de liaison avec leur récepteur, un dans leur partie amine terminale et le second au niveau de leur boucle N après la seconde cystéine. Ceci émet l'hypothèse d'un modèle à deux étapes dans lequel la liaison et l'activation seraient dissociées. Le récepteur reconnaît tout d'abord le site de liaison des chimiokines situé dans la région de la boucle N (domaine d'amarrage). Ce contact initial facilite la liaison subséquente et le bon positionnement de la région flexible NH₂-terminale (domaine de déclenchement), qui active le récepteur en interagissant vraisemblablement avec de multiples sites

hélicoïdaux du récepteur et induit une modification de la conformation du récepteur. Finalement, il semblerait que la région N-loop soit responsable de la reconnaissance du récepteur et que la partie N terminale déclenche le récepteur.³⁶ En effet, il a été montré dans cette même étude que lorsqu'une partie du domaine N-terminal était tronqué, le CXCL10 par exemple, agoniste du CXCR3, inhibait la chimiotaxie et devenait finalement un puissant antagoniste.

Le domaine C-terminal intracellulaire interagit avec les protéines G et permet la transduction du signal à travers la reconnaissance de la chimiokine et la phosphorylation des résidus thréonine et serine.³⁷ Les GPCRs transforment des stimuli extracellulaires pour donner un signal intracellulaire via l'interaction de leurs domaines intracellulaires avec les protéines G. Ces récepteurs lient différents types de ligands comme les protéines, les petites molécules, les acides aminés, les nucléotides ou encore les chimiokines. Il a été répertorié plus de 800 GPCRs dans le génome humain dans les années 2000.³⁸ La plupart des récepteurs de chimiokines reconnaissent plus d'un ligand et plusieurs chimiokines peuvent se lier à différents récepteurs. C'est pourquoi, les chimiokines et leurs récepteurs forment un système complexe de signalisation élaboré ainsi que de liaisons multiples, ce qui permet une certaine robustesse du système puisqu'une même fonction peut être prise en charge par plusieurs ligands simultanément.³⁹

A ce jour, 20 récepteurs de chimiokines sont répertoriés : un récepteur de la famille des chimiokines XC (XCR1), un récepteur CX3C (CX3CR1), onze récepteurs CC (CCR1-11), et sept récepteurs CXC (CXCR1-7), eux-mêmes liés à une cinquantaine de chimiokines comme récapitulé sur la Figure 6 :

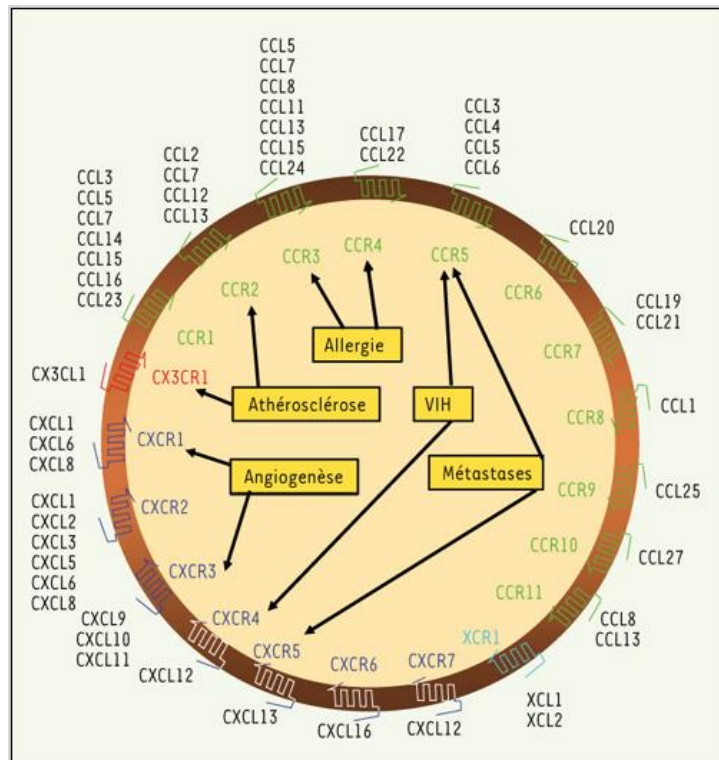


Figure 6 : Les quatre familles de chimiokines, leurs récepteurs et leurs implications dans diverses pathologies⁴⁰

Les C symbolisent les Cystéines, les L désignent un Ligand et les R un Récepteur.

Tous les ligands angiogéniques (CXCL1-3 et CXCL5-8) vont se fixer sur les récepteurs CXCR1 et CXCR2 chez l'homme et seulement sur CXCR2 chez la souris car il n'existe pas d'équivalent de CXCR1.⁴¹ Bien que seules CXCL1, CXCL6 et CXCL8 se lient à CXCR1, toutes les chimiokines CXC ELR+ vont favoriser l'angiogenèse et le récepteur CXCR2 reste le récepteur angiogénique le plus important dans ce rôle car bien que CXCR1 et CXCR2 soient présents dans les cellules endothéliales, seule l'expression de CXCR2 est nécessaire pour le chimiotactisme de ces cellules.⁴²

Cependant certains ligands ELR- ne vont se fixer qu'à un seul récepteur angiostatique comme par exemple les ligands CXCL9, CXCL10 et CXCL11 qui ne se fixent que sur le récepteur angiostatique CXCR3. Ces chimiokines CXC, sont endogènes au CXCR3 et donc agoniste de ce dernier mais CXCL9, CXCL10 et CXCL11 peuvent également jouer le rôle d'antagoniste en se liant à un récepteur d'une autre famille comme CCR3 dont les ligands naturels sont CCL5, 7, 8, 11, 13, 15, et 24. En effet, CXCR3 est surexprimé au niveau des cellules T Th1 alors que CCR3 est exprimé au niveau des Th2 et il a été montré que la

présence de ces trois ligands pouvait déplacer les ligands naturels du CCR3 et donc également jouer un rôle au niveau des Th2 en tant qu'antagonistes.⁴³

Les GPCRs sont impliqués dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques et sont donc l'une des principales cibles pour les chercheurs et les compagnies pharmaceutiques. En fait, approximativement 50% des principes actifs prescrits aujourd'hui ciblent les GPCRs.⁴⁴ Par exemple, CXCR4 est le récepteur le plus largement exprimé dans plusieurs types de cancers et est associé aux métastases et aux mauvais pronostics. En effet, différentes études ont montré l'importance de la liaison entre CXCR4 et son ligand CXCL12 dans le cas du cancer du sein, où il a été montré que la neutralisation de CXCR4 inhibe les métastases *in vivo* mais également que l'interaction CCL21/CCR7 était elle aussi impliquée dans la migration et invasion de cellules cancéreuses⁴⁵, dans le cas de la migration de métastases des cellules cancéreuses de la prostate à la moelle osseuse⁴⁶ ou des cellules cancéreuses du colon jusqu'au foie⁴⁷. Elle joue également un rôle dans le cas du VIH, bien que le récepteur CCR5 soit également impliqué, où de nouvelles stratégies de ciblage de CXCR4 avec de petites molécules comme AMD3100 par exemple sont en cours et montrent pour le moment des résultats encourageants *in vitro*.⁴⁸ D'autres récepteurs sont également impliqués dans les cancers comme par exemple le CCR7 et ses ligands CCL19 et CCL21 qui sont surexprimés dans le cas des cancers du poumon⁴⁹ ou de l'estomac⁵⁰. CXCR1 et CXCR2, sont impliqués dans de nombreux cancers en fonction de la liaison avec leurs différents ligands. Par exemple CXCL8 est présent dans 38% des cas de glioblastomes⁵¹ dans les cancers de la prostate⁵², le cancer du poumon où la présence de CXCL6 ou CXCL5 est également prouvée⁵³ ou encore le cancer du rein où les ligands CXCL1, CXCL3 et CXCL5 sont également impliqués⁵⁴. On peut également citer le récepteur CXCR3 et ses ligands CXCL9, CXCL10 et CXCL11 qui jouent un rôle très important dans les cancers hématologiques comme la leucémie ou cancers dits « solides » comme le cancer de la prostate, du cerveau ou du rein.^{55,56,57}

De manière plus générale, les récepteurs de chimiokines sont impliqués dans de nombreuses infections et de nombreux cancers dus à leur interaction avec leurs différentes chimiokines. En effet, lorsque les chimiokines se lient à leurs récepteurs, le signal induit va activer la polymérisation de l'actine et va induire un changement de

forme de la cellule ainsi que le chimiotactisme, ce qui va provoquer toutes sortes de pathologies.⁵⁸

Les chimiokines CXC ne se lient pas seulement aux récepteurs CXCR mais peuvent également interagir avec des glycosaminoglycanes (GAGs). Il s'agit de longs polysaccharides non ramifiés présents dans de nombreux types de tissus qui permettent de fixer les chimiokines sur la surface des cellules endothéliales. Ainsi, ils vont créer un gradient chimiotactique qui va diriger les leucocytes et les cellules tumorales à travers la couche endothéliale vers le site inflammatoire.⁵⁹ Par exemple, les chimiokines CXCL4 et CXCL8, ligands de CXCR3 et CXCR1/2 respectivement, peuvent également se lier aux GAGs avec des affinités de l'ordre du nanomolaire pour créer un gradient de chimiokines ou alors entrer en compétition avec des facteurs de croissance comme FGF et VEGF et déplacer leurs liaisons avec les GAGs.^{60,61}

2.2.1 Voies de transduction / signalisation

Les protéines G sont des protéines hétérotrimériques G liées à la membrane et sont activées par les récepteurs couplés aux protéines G. Elles sont constituées de trois sous-unités : α , β , et γ . Avant activation du récepteur, ces trois sous-unités sont liées entre elles et la protéine G_α fixe une molécule de GDP (Guanosine DiPhosphate). Quand un ligand agoniste vient activer le récepteur couplé aux protéines G, la protéine G va libérer sa liaison GDP de la sous unité G_α et va venir fixer le GTP (Guanosine TriPhosphate), ce qui va entraîner la dissociation de G_α et du dimère $G_{\beta\gamma}$ ainsi que l'activation de la protéine G.⁶² Cet échange de GDP en GTP est utilisé comme un « interrupteur moléculaire » car en effet l'activation de la protéine G va entraîner la destruction du complexe α - β - γ en dissociant G_α du dimère $G_{\beta\gamma}$ et donc permettre le transfert d'informations par G_α ou $G_{\beta\gamma}$ maintenant libres à l'intérieur de la cellule via une cascade de réaction, que l'on appelle transduction du signal. La durée de ce signal est déterminée par l'état d'hydrolyse de GTP de la sous-unité G_α et de la réassociation de G_α -GDP avec $G_{\beta\gamma}$.

L'activation des GPCRs via leurs protéines G est schématisée sur la Figure 7 ci-dessous :

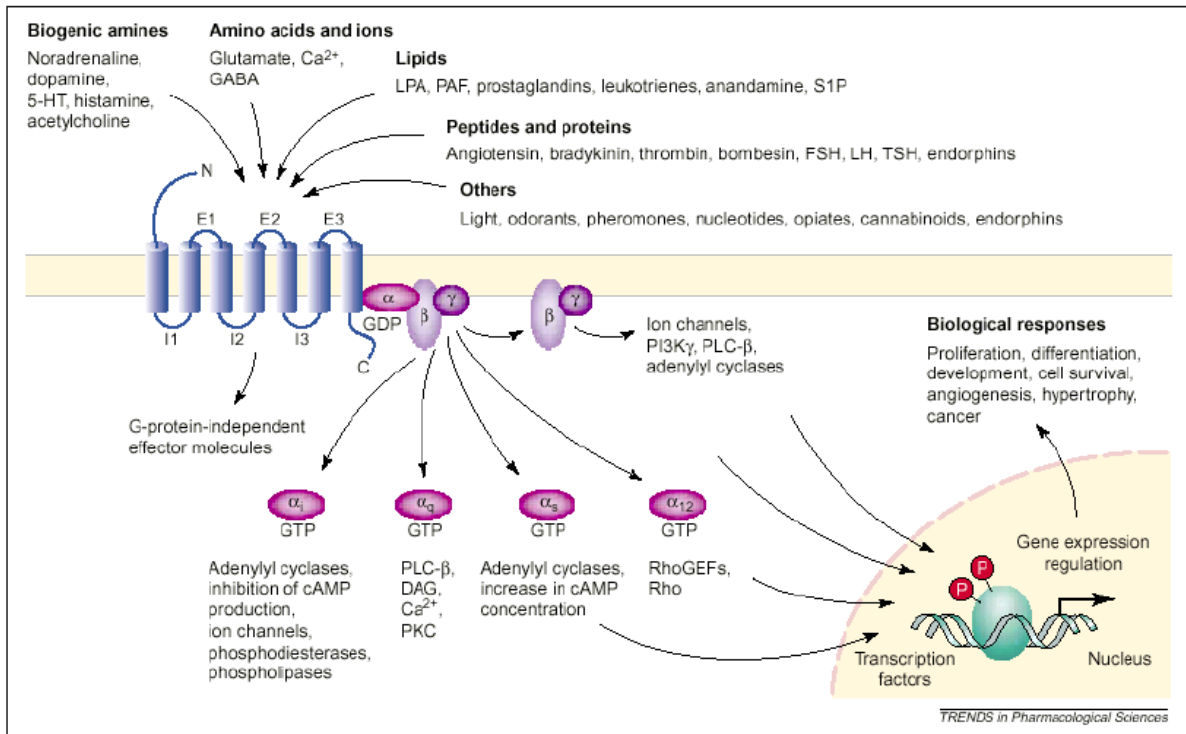


Figure 7: Activation des récepteurs couplés aux protéines G ⁶³

Lors de la fixation d'un agoniste sur son récepteur, la protéine G va libérer la GDP et va venir lier la GTP ce qui va entraîner la dissociation de G_α et du dimère G_{βγ} et induire une cascade de nombreuses signalisations.

La sous-unité G_α est divisée en 3 familles : G_{αq}, G_{αs} et G_{αi}. Les membres de la famille G_{αq} peuvent réguler la phospholipase C et différents types de kinase, comme la kinase C ou la tyrosine kinase. Les membres de la famille G_{αs} régulent positivement tous les isoformes de l'adénylate cyclase et certains ions Ca²⁺ alors que les membres de la famille G_{αi} régulent les ions K⁺ mais répriment tous les isoformes de l'adénylate cyclase ce qui implique une baisse de l'AMPc mais également active les kinases comme les ERK (1 et 2) ou MAP. Plus récemment, une quatrième sous unité de G_α a été identifiée : le G_{α12/13}. Sa fonction principale est la régulation des échanges Na⁺/H⁺. Le dimère G_{βγ}, formé des sous unités β et γ libres, a également beaucoup d'effecteurs qu'il partage avec les sous-unités G_α comme la régulation positive ou négative des différents isoformes de l'adénylate cyclase, la phospholipase C ou encore la libération de plusieurs ions comme K⁺, Ca²⁺ ou Na⁺.⁶⁴ Finalement, le complexe G_{βγ} est aussi efficace que la sous-unité G_α en terme de transmission de signal du récepteur activé jusqu'à l'intérieur de la cellule et est d'une certaine manière le transducteur principal du signal puisqu'il combine tous les effecteurs des différentes familles de G_α à lui tout seul.

2.2.2 Désensibilisation

Une fois le récepteur activé par un agoniste et la cascade de réaction lancée, la signalisation en aval est peu à peu atténuée jusqu'à l'arrêt; ceci est dû à la phosphorylation de résidus tyrosines du récepteur dans le domaine C-terminal via une catalyse par des récepteurs kinases couplés à la protéine G (GRK) (Figure 8). Ceci résulte de liaisons de la protéine arrestine (le plus souvent β -arrestine 1 et 2) avec les sites phosphorylés et emmène donc à une désensibilisation suivie d'une internalisation de certains récepteurs grâce à la formation de « puits » recouverts de clathrines. En effet, après la phosphorylation du récepteur par GRK, les protéines β -arrestines, présentes dans le cytosol sont recrutées dans la membrane plasmatique où elles se localisent avec les récepteurs et la liaison entre les deux empêche le couplage du récepteur avec la protéine G, ce qui marque l'arrêt de la signalisation cellulaire et de la même manière va induire l'hydrolyse de GTP en GDP ce qui va permettre à l'hétérotrimère de se reformer. L'association des sous-unités α , β , et γ constitue la forme inactive de la protéine G.

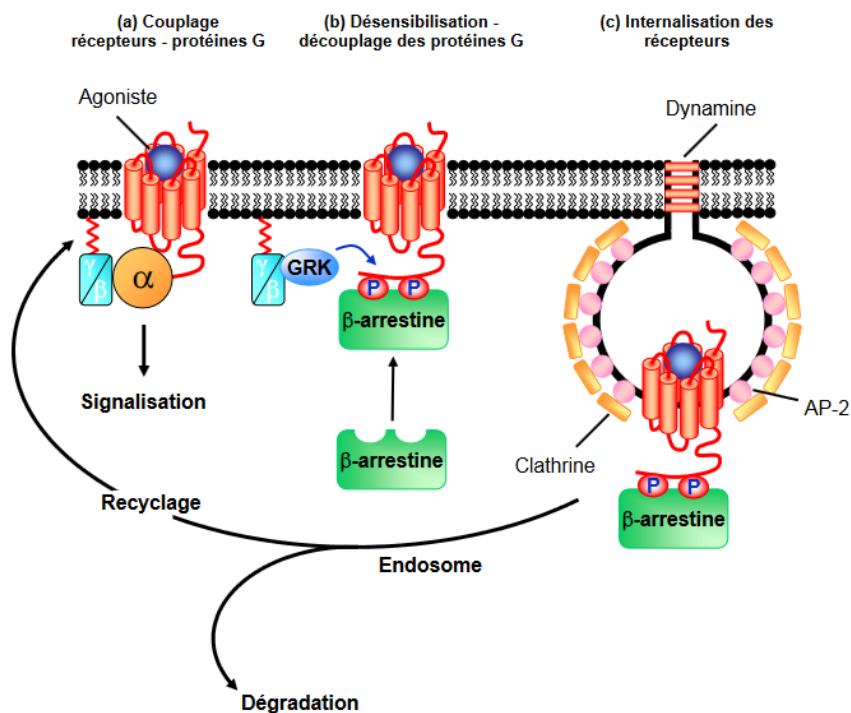


Figure 8 : Désensibilisation des GPCRs ⁶⁵

L'interaction entre les chimiokines et leurs récepteurs est déterminante pour la liaison et la signalisation. En effet, il a été montré que le domaine N-terminal des chimiokines était un domaine de signalisation clé et qu'un retrait ou une modification de ce dernier entraînait des changements et notamment une perte de signalisation tout en conservant de manière générale une haute affinité pour leurs récepteurs. Par exemple, des tests sur des analogues de MCP-1 ont montré que certains conservaient leurs propriétés antagonistes, comme l'analogue « asparagine » et d'autres non, comme l'analogue acétylé, ce qui suggère que la liaison au récepteur peut être dissociée de l'activation de ce dernier.⁶⁶

C'est pourquoi la présence ou non du motif ELR dans le domaine N-terminal des chimiokines CXC est essentiel sur la fonction qu'elles vont exercer.

Chaque récepteur de chimiokines est impliqué dans différentes pathologies. Dans la partie suivante, nous discuterons seulement du récepteur CXCR3.

2.3 CXCR3 : une cible intéressante

2.3.1 Physiologie du CXCR3

Le récepteur CXCR3 est un récepteur GPCR qui fait partie de la famille des récepteurs de chimiokines de type CXC. Physiologiquement parlant, le récepteur CXCR3 est composé d'une partie N-terminale extracellulaire, trois boucles extracellulaires ainsi que trois boucles intracellulaires séparées par sept domaines transmembranaires et un segment C-terminal cytoplasmique. Comme tous les récepteurs CXC, il possède deux cystéines, une située à l'extrémité N-terminale et la seconde au niveau de la troisième boucle extracellulaire ce qui forme un pont disulfure essentiel pour la fixation des ligands et ainsi l'activation du récepteur. La seconde boucle intracellulaire possède le motif DRYLAIV nécessaire pour le couplage des protéines hétérotrimériques (protéine G) liant la GTP.⁶⁷

Il est impliqué dans deux principaux mécanismes biologiques qui sont le chimiotactisme des cellules immunitaires et l'angiogenèse. Ces rôles sont orchestrés par la liaison de CXCR3 avec ses ligands. Il est sélectif des chimiokines ELR négatif et lie spécifiquement

les chimiokines CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL4, et son variant CXCL4L1. Des études sur des analogues de CXCR3 où chaque domaine extracellulaire de CXCR3 a été analysé, ont montré que la sulfatation des résidus tyrosine dans le domaine N-terminal de CXCR3 était essentielle pour la fixation de ses ligands et ainsi son activation⁶⁸. Il est exprimé en grande majorité dans différents types de lymphocytes comme les lymphocytes T auxiliaires (T_{helper} ou Th) où il marque particulièrement Th1,⁶⁹ les cellules tueuses naturelles (NK),⁷⁰ lymphocyte B, cellules dendritiques,⁷¹ fibroblastes, endothéliales et du macrophage.⁷²

Le CXCR3 murin est identique à celui de l'humain à hauteur de 86% et est, pour les deux espèces, localisé sur le chromosome X. Comme tous les récepteurs GPCR, CXCR3 est couplé à la sous unité G_{α} et est internalisé sous l'activation d'un de ses ligands. Ceci entraîne une activation de cascade de signalisation impliquant des kinases comme les MAPK ou AKT qui va affecter plusieurs réponses cellulaires comme l'augmentation du flux calcique, la prolifération ou la migration cellulaire.

Le gène CXCR3 humain subit un épissage alternatif ce qui conduit à trois isoformes : CXCR3-A, CXCR3-B et CXCR3-Alt. Le CXCR3-A est composé de 368 acides aminés encodés par deux exons séparés par un intron et est couplé à la sous unité G_{α_i} ce qui entraîne un signal pro-migratoire et prolifératif et augmente le niveau de calcium intracellulaire (Figure 9). Au contraire, CXCR3-B est plus long, il possède 415 acides aminés dû à sa partie amino-terminale plus grande que le CXCR3-A de 52 acides aminés, et est couplé à la sous unité G_{α_s} ce qui entraîne un signal de réaction opposé à celui de CXCR3-A puisqu'il va inhiber la migration et la prolifération en entraînant l'apoptose⁷³. Ceci explique le fait que les ligands du CXCR3 aient des rôles biologiques bien distincts et que l'activation de CXCR3 entraîne des effets contraires. Effectivement, la présence de ces deux isoformes influe au niveau de la morphologie de la cellule, la viabilité, l'activité proliférative, l'apoptose et la capacité angiogénique. L'activation de CXCR3-A, exprimé chez plusieurs cellules dont les leucocytes, augmente la viabilité cellulaire et la prolifération ainsi que la formation de nouveaux vaisseaux sanguins *in vitro* et donc induit un signal pro-tumoral alors que le CXCR3-B, exclusivement exprimé sur les cellules endothéliales, diminue la croissance et induit la mort des cellules et a donc un effet anti-tumoral (Figure 10). Ces résultats ont notamment été observés lors de

différents tests effectués sur des cellules endothéliales microvasculaires humaines HMEC-1 transfectées par l'isoforme CXCR3-A ou CXCR3-B.⁷³

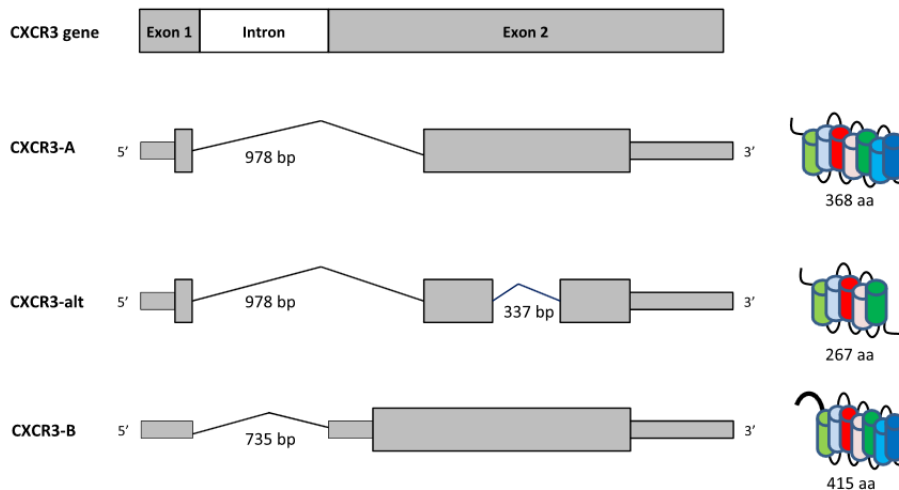


Figure 9 : Représentation schématique des isoformes de CXCR3⁷⁴

Le CXCR3-Alt quant à lui, est beaucoup moins exprimé que les deux autres isoformes de CXCR3 et son rôle est encore très peu connu. Il se situe au niveau des membranes cellulaires et possède une partie amino-terminale tronquée comparée au CXCR3-A, ainsi qu'une absence de domaines transmembranaires caractéristiques des récepteurs GPCRs mais montre cependant une activité chimiotactique via la fixation de CXCL11 mais pas de CXCL9 et CXCL10.⁷⁵

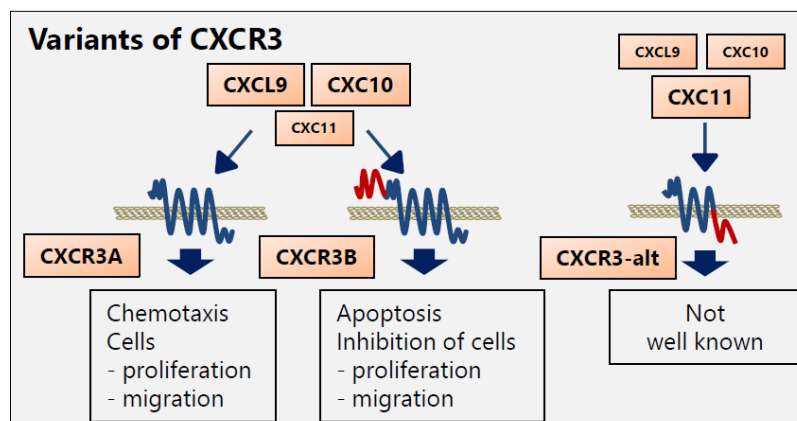


Figure 10 : Axes de CXCL9, CXCL10 et CXCL11 en fonction des différents isoformes de CXCR3 dans le micro-environnement tumoral.⁷⁶

2.3.2 Ligands naturels du CXCR3

CXCR3 se lie à ses ligands endogènes naturels qui sont CXCL9, CXCL10 et CXCL11, CXCL4 et son variant CXCL4L1.

Ces chimiokines appartiennent à la famille des chimiokines CXC ELR négatif. Ce sont des molécules clé pour attirer différents leucocytes comme les monocytes, les cellules tueuses naturelles (NK), et les lymphocytes T au niveau des sites inflammatoires. Cependant, ces différents ligands se lient au CXCR3 avec différentes affinités. En effet, CXCL9, CXCL10 et CXCL11 se lient tous les trois aux CXCR3-A et CXCR3-B avec une plus grande affinité pour le CXCR3-A alors que CXCL4 a davantage d'affinité pour le CXCR3-B.⁷³ Le CXCR3-Alt lui, ne lie que le CXCL11 (Figure 11).

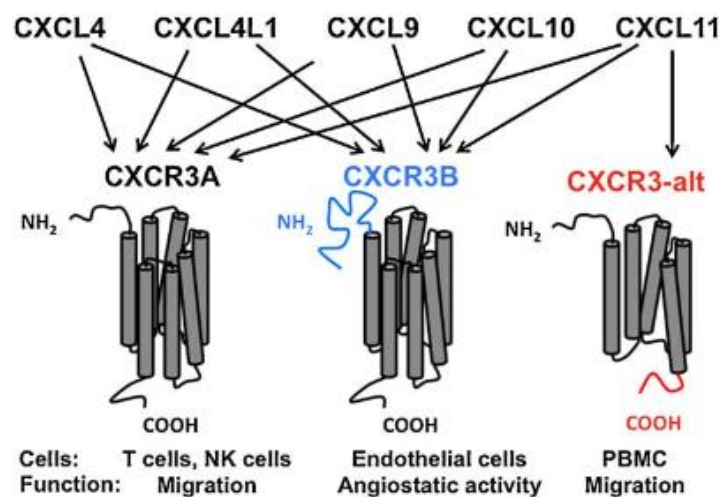


Figure 11 : Les 3 isoformes de CXCR3 et les différentes liaisons avec ses ligands ⁷⁷

2.3.2.1 CXCL9, CXCL10 et CXCL11

Les chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11, également appelés MIG, IP-10 et I-TAC respectivement sont situées sur le chromosome 4 humain et sont sélectives du récepteur CXCR3. En effet, les 16 premiers acides aminés et la première boucle extracellulaire de CXCR3 sont essentiels pour la fixation de CXCL10 et CXCL11 et l'activation du récepteur mais pas pour CXCL9. Cependant, l'arginine en position 216 de

la seconde boucle est nécessaire pour l'activation du CXCR3 lié à ses trois ligands. La troisième boucle, elle, est importante pour la chimiotaxie induite par CXCL9 et CXCL10.⁷⁸

Ces trois chimiokines sont capables de réguler l'inflammation en induisant par exemple l'activation d'intégrine et en médiant la chimiotaxie de plusieurs cellules comme les cellules T activées, les monocytes ou les cellules naturelles tueuses contrairement au CXCL4 qui n'a aucune de ces activités sur les mêmes types de cellules.

Elles sont d'habitude exprimées à des niveaux bas mais leurs niveaux augmentent de manière significative au cours de l'inflammation. Elles sont sécrétées par les monocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules cancéreuses en réponse à l'interféron gamma (IFN γ) et au facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α). Les IFN sont des protéines naturellement produites par les cellules du système immunitaire. Comme ses ligands, l'expression de CXCR3 sur ces cellules est conduite par l'IFN γ .

Elles font toutes les trois parties des chimiokines CXC angiostatiques, dépourvues du motif ELR, qui atténuent de manière générale l'angiogenèse en régulant la migration cellulaire et la différenciation impliquant un effet anti-tumoral. Cependant, de nombreux travaux dans la littérature montrent que CXCL9, CXCL10 et CXCL11 augmentent la prolifération tumorale et les métastases.⁷⁹ Ceci étant dû à la présence des trois isoformes de CXCR3 sur les cellules cancéreuses.

2.3.2.2 CXCL4/CXCL4L1

Le ligand CXCL4, également appelé PF-4 (*Platelet Factor 4*), a été découvert pour la première fois par Deutsch *et al.* en 1955⁸⁰ et décrit comme étant une protéine plaquettaire ayant une activité anti-héparine impliquée dans de nombreux processus biologique comme l'hématopoïèse⁸¹, la coagulation du sang⁸² ou l'angiogenèse⁸³. CXCL4 a d'ailleurs été la première chimiokine connue pour ses caractéristiques angiostatiques et anti-tumorale du à son absence de motif ELR²². Il a été montré que CXCL4 inhibait la migration et la prolifération des cellules endothéliales et jouait un rôle crucial en supprimant la formation de métastases et en inhibant la croissance de tumeurs. En effet, CXCL4 inhibe l'activité mitogénique des facteurs de croissance, de l'endothélium vasculaire (VEGF) et des fibroblastes (bFGF) qui sont spécifiques de la différenciation,

migration et prolifération des cellules endothéliales, soit en interagissant directement avec eux soit en les déplaçant de leur récepteurs.^{60,61}

En 1989, Green *et al.*⁸⁴ identifient une chimiokine hautement similaire à CXCL4 nommée CXCL4L1 ou PF-4var, elle aussi située dans le chromosome 4. Elle est issue d'une duplication récente car on ne retrouve le gène que dans le génome du singe, du chimpanzé et de l'homme. Elle est absente chez la souris. Cette protéine est composée de 70 acides aminés et diffère de seulement 3 acides aminés dans la région C-terminale (Pro⁵⁸ -> Leu, Lys⁶⁶ -> Glu, Leu⁶⁷ -> His), région critique pour l'interaction de CXCL4 avec l'héparine (Figure 12).

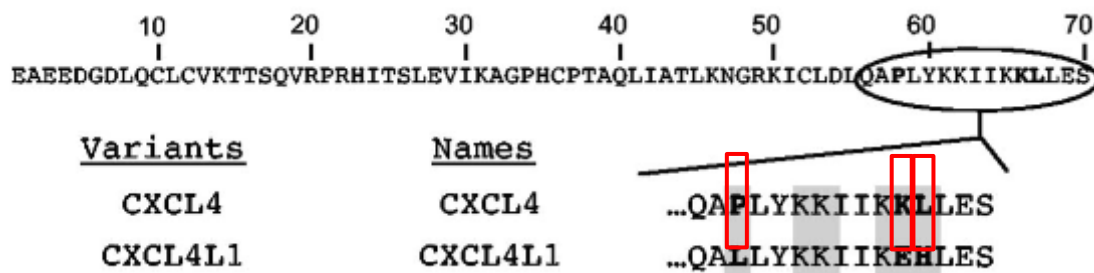


Figure 12 : Différence de séquence entre CXCL4 et CXCL4L1 - adapté de Dubrac *et al.*⁸⁵

La substitution de la Leucine67 chez CXCL4 en Histidine chez CXCL4L1 entraîne donc une diminution de l'affinité de CXCL4L1 pour les glycosaminoglycanes.⁸⁵ Il a parallèlement été montré, notamment sur test CAM ou test de croissance cellulaire sur différentes cellules cancéreuses comme le carcinome pulmonaire de Lewis ou mélanome sur cellules B16-F10, que le CXCL4L1 avait une activité angiostatique bien meilleure que CXCL4 et inhibait davantage l'angiogenèse (50 ng/mL pour CXCL4L1 suffisent pour inhiber la migration des cellules endothéliales contre au minimum 200 ng/mL pour CXCL4).⁸⁶ Finalement, la présence de l'Histidine en position 67 joue un rôle crucial dans le changement des propriétés biologiques et la liaison avec les GAGs.

CXCL4 et CXCL4L1 ont une localisation subcellulaire distincte et sont sécrétées différemment. Contrairement au CXCL4 qui est stocké et libéré massivement lors de l'activation plaquettaire, CXCL4L1 lui est synthétisé en permanence et sécrété de façon constitutive.⁸⁷ CXCL4 a une très grande affinité pour le CXCR3-B et ne lie le CXCR3-A

qu'à plus forte concentration (micromolaire) alors que le CXCL4L1 se lie aux deux isoformes.⁸⁸

2.3.3 Implication du CXCR3 dans les cancers

Le récepteur CXCR3 et ses ligands CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL4 et son variant CXCL4L1 sont impliqués dans de nombreuses maladies telles que la polyarthrite rhumatoïde ⁸⁹, la sclérose en plaque ⁹⁰, ou encore les rejets de greffes⁹¹.

Il a également été montré qu'il était surexprimé dans plusieurs cas de tumeurs et que les mauvais pronostics notamment chez les patients atteints du cancer du côlon, du rein, du sein et de la peau, étaient liés à un niveau très élevé de CXCR3.⁷⁴ Dans le micro-environnement tumoral, CXCR3 et ses ligands sont exprimés sur les cellules cancéreuses mais également au niveau des cellules stromales, des vaisseaux et des leucocytes recrutés lors de l'inflammation. Ceci implique donc de manière directe ou indirecte le CXCR3 dans la progression des cancers en régulant l'excroissance tumorale, la migration, l'invasion, l'immunité ou encore l'angiogenèse.⁹²

Une étude a révélé que CXCR3 était fortement méthylé dans les cellules normales de la prostate (RWPE-1) et cellules cancéreuses (PC-3 et DU145) sans grande différence.⁹³ Cette observation amène donc à la conclusion que l'expression de CXCR3 ne diffère pas entre les cellules saines et les cellules cancéreuses, mais que c'est plutôt le niveau des deux isoformes A et B qui va changer (Figure 13). Lors de la progression tumorale, le niveau de CXCR3-A va augmenter pendant que CXCR3-B va diminuer et CXCR3 va se déplacer de la membrane au cytoplasme jouant un rôle important puisqu'il va limiter la présence de CXCR3-B à la membrane et donc favoriser une activité pro-tumorale avec la grande présence de CXCR3-A.

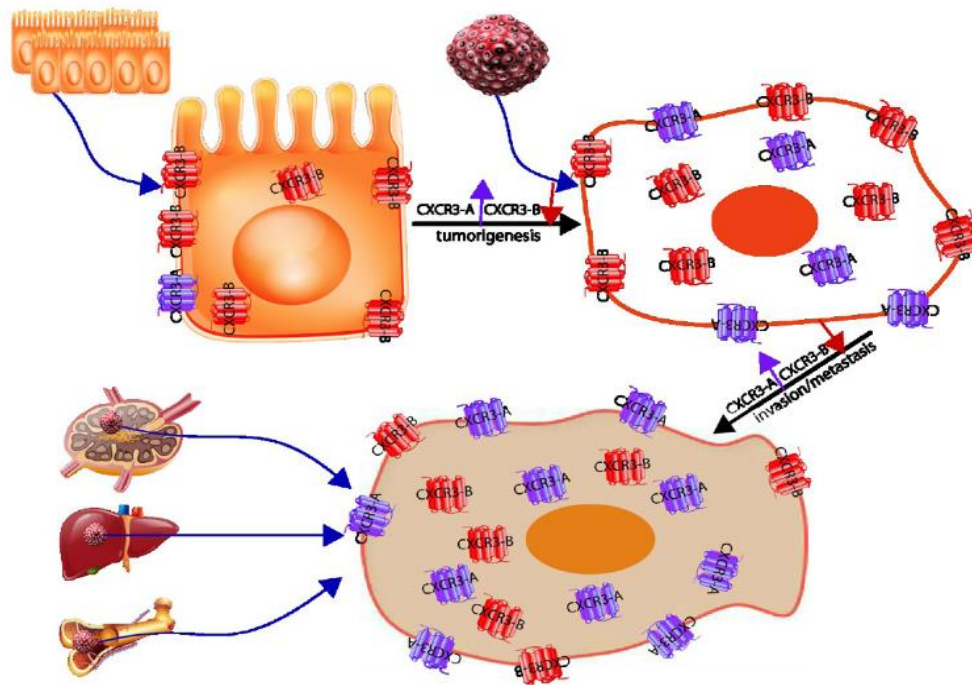


Figure 13: Expression des isoformes de CXCR3 lors de la progression tumorale.⁹²

Dans les cellules saines, l'isoforme prédominant est CXCR3-B. Avec la progression, le ratio CXCR3-A / CXCR3-B va évoluer en faveur du CXCR3-A.

Bien que les ligands de CXCR3 soient très largement décrits pour leurs fonctions angiostatiques dû à l'absence du motif ELR, ils sont de plus en plus étudiés pour l'implication du CXCR3 dans le développement tumoral. En effet, dans plusieurs cas de cancer comme le cancer du sein⁹⁴, du côlon⁹⁵ ou les glioblastomes⁹⁶, il a été montré que l'expression de CXCR3-A était bien plus élevée dans les cellules cancéreuses que dans les cellules saines. Dans le cas par exemple du cancer du rein, des études montrent que CXCR3-A est surexprimé pendant que CXCR3-B est sous-exprimé.⁵⁶ Dans une autre étude, cette même équipe a montré que la surexpression de CXCR3-B inhibait la prolifération et provoquait l'apoptose.⁹⁷

Le même constat a été fait dans le cas du cancer des ovaires, où il a été observé que CXCR3-A était beaucoup plus élevé que dans les ovaires sains, alors que CXCR3-B a le comportement totalement inverse.⁹⁸

La présence des deux principales isoformes de CXCR3, CXCR3-A et CXCR3-B joue un rôle primordial dans l'activité anti-tumorale ou pro-tumorale induite par la liaison avec leurs ligands. En effet, plusieurs études sur lignée cellulaire HMEC-1 ou sur souris présentant des lésions de la moelle épinière ont montré que lorsque CXCL10 se liait au CXCR3-A,

cela impliquait la chimiotaxie et la prolifération cellulaire alors qu'une liaison avec le CXCR3-B induisait une inhibition de la croissance tumorale.^{73 57} Cela suggère donc deux voies différentes de transduction du signal et que CXCR3-B et CXCR3-A ne sont pas couplées aux mêmes types de protéines G.

Il a également été montré que l'expression de CXCL10 était directement liée à l'activation de la protéine Ras (étude réalisée sur cellules cancéreuses du sein, MDA-MB-435 et MCF-7) et que cette activation impliquait également la sous expression de CXCR3-B et va donc par conséquent augmenter la liaison CXCL10/CXCR3-A.⁹⁹ Une autre étude sur MCF-7 et MDA-MB-231, également cellules cancéreuses du sein, a montré l'implication de CXCL9 au même titre que CXCL10 en prouvant qu'ils augmentaient tous les deux le niveau de Cathepsin B, une protéine liée à la progression du cancer du sein. Au contraire, CXCL4, ligand spécifique du CXCR3-B, n'a aucun effet, ce qui prouve l'implication de CXCR3-A dans la régulation de la Cathepsin B et donc la progression tumorale.¹⁰⁰

L'axe CXCL9, -10, -11/CXCR3 régule la migration des cellules immunitaires, la différenciation et l'activation ce qui entraîne la suppression de la tumeur (axe paracrine). Lorsque cet axe est impliqué dans la croissance tumorale et la présence de métastases, on parle d'axe autocrine. En fait, la réactivité immunitaire se produit grâce au recrutement des cellules CTLs, NK, NKT et du macrophage à travers l'axe paracrine, et la polarisation des cellules Th1 par cet axe active également les cellules immunitaires en réponse à IFN- γ . Au contraire, comme pour le signal autocrine, les cellules cancéreuses vont avoir tendance à métastaser dû à la liaison des ligands avec le CXCR3-A. Les chimiokines, dérivées de tumeurs, sont également responsables du recrutement des cellules Th2, et T régulatrices qui vont créer un microenvironnement pro-tumoral.⁷⁶

L'inhibition de l'angiogenèse est la deuxième fonction caractéristique importante de CXCR3. Cet effet angiostatique est médié par l'interaction des chimiokines avec l'isoforme CXCR3-B du CXCR3 des cellules endothéliales et ainsi l'activation de la voie MAPK.

Les isoformes de CXCR3 induisent l'activation de voies distinctes en se liant à des sous unités spécifiques de la protéine G α . En effet, la principale isoforme CXCR3-A est

associée à la sous unité $G\alpha_i$ et $G\alpha_q$ et cette association va entraîner l'activation de voies de signalisation comme MAPK (ERK1/2, p38 et JNK) et PI3K/Akt, et donc induire une augmentation de calcium intracellulaire, ainsi qu'une prolifération cellulaire à la fois dans les cellules physiologiques comme les cellules du système respiratoire et dans les cellules cancéreuses comme pour les gliomes. Finalement, CXCR3-A active des voies pro-tumorales. Au contraire, CXCR3-B inhibe la prolifération et la migration via son association avec $G\alpha_s$ activant ainsi l'adénylate cyclase. Cette activation va permettre par cascade d'activer l'AMPc qui va elle-même stimuler la protéine kinase A (PKA), un puissant angiostatique qui va activer l'apoptose et inhiber l'angiogénèse (Figure 14).⁷⁴

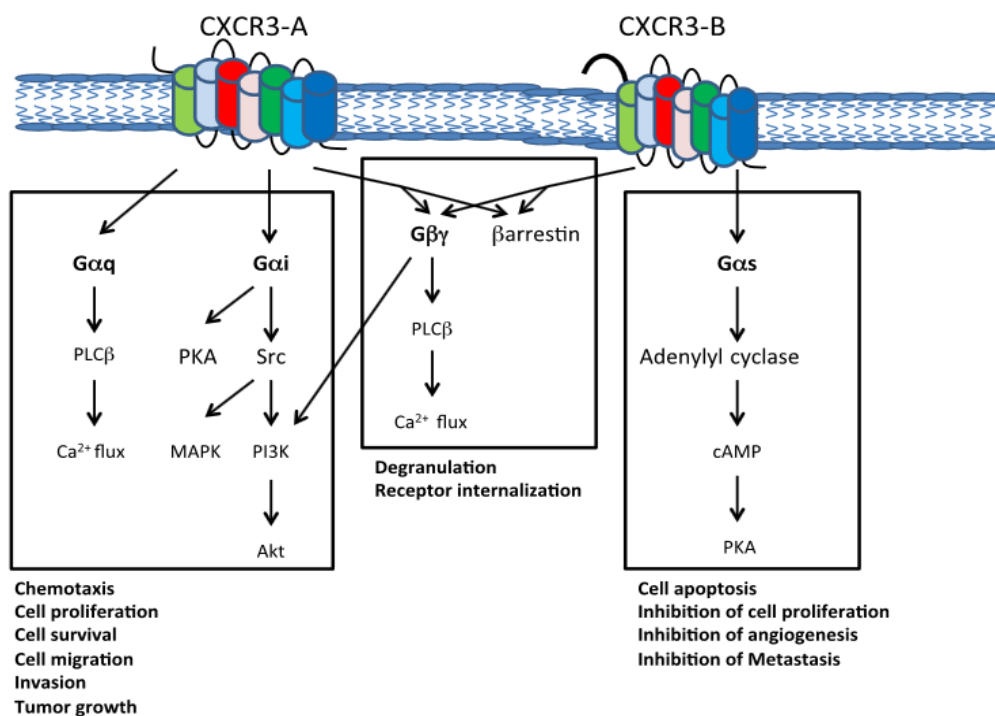


Figure 14 : Représentation schématique des voies de signalisation des différents isoformes de CXCR3.⁷⁴

Le CXCR3-alt est co-exprimé avec le CXCR3-A et induit donc une activation des voies MAPK/Akt mais à un niveau trop faible pour induire une croissance des cellules tumorales.¹⁰¹

Comme CXCR3-A joue un rôle clé dans la progression tumorale ainsi que dans le développement de métastases, un traitement ne ciblant que le CXCR3-A et non le CXCR3-B et CXCR3-Alt dans l'axe CXCL9, -10, -11/CXCR3 serait une excellente stratégie.

2.3.4 Ligands antagonistes de CXCR3

Depuis plusieurs années, de nombreux antagonistes aux récepteurs de chimiokines non peptidiques ont été développés dû à l'implication de ces récepteurs dans les problèmes de santé tels que le rejet de greffe ou encore l'invasion tumorale et certains sont actuellement en phase clinique. Il existe par exemple les molécules AMD3100, AMD3465 ou ALX40-4C pour le récepteur CXCR4 ou encore AZD5069 pour le récepteur CXCR2.^{102,103}

A ce jour, plusieurs types de petites molécules antagonistes au CXCR3 ont été découverts et il a été prouvé que l'antagonisme de CXCR3 avait des bénéfices thérapeutiques dans le traitement de différentes maladies comme l'inflammation et tous types de dommages au niveau des cartilages, les maladies auto-immunes comme le psoriasis ou la sclérose en plaque, le rejet de greffes, ou encore les métastases tumorales. Plusieurs molécules ont déjà été décrites dans la littérature comme ayant une activité en se liant au CXCR3 comme par exemple NBI-74330 qui en bloquant CXCR3 diminue l'athérosclérose¹⁰⁴, TAK-779 qui inhibe le développement de l'encéphalomyélite auto-immune¹⁰⁵ ou encore AMG487 qui est le seul antagoniste à ce jour à avoir atteint la phase clinique chez l'Homme avec une efficacité excellente dans l'inhibition de la migration des cellules immunitaires provoquée par CXCL9, CXCL10 et CXCL11.¹⁰⁶ Il a cependant dû être abandonné en Phase clinique II pour le traitement du psoriasis, par manque d'efficacité.

Ces molécules sont généralement des dérivés de quinazolinones¹⁰⁶, de benzimidazoles¹⁰⁷, d'urées¹⁰⁸ ou encore de benzetimide¹⁰⁹. Ainsi, une librairie de nombreuses molécules ayant une affinité de liaison pour le CXCR3 a été créée, et une étude poussée a montré que les dérivés pipérazinyl-pipéridine, montrait une très bonne affinité de liaison pour le CXCR3 (à l'échelle nanomolaire).

Des tests d'optimisation sur ces molécules ont donc été réalisés, notamment par l'équipe de Stuart B. Rosenblum où leur recherche s'est basée sur des molécules synthétiques ayant le même squelette pipérazinyl-pipéridine, mais en changeant les différents groupements fonctionnels afin de trouver la meilleure relation structure / force de liaison (Figure 15-A).^{110, 111, 112}

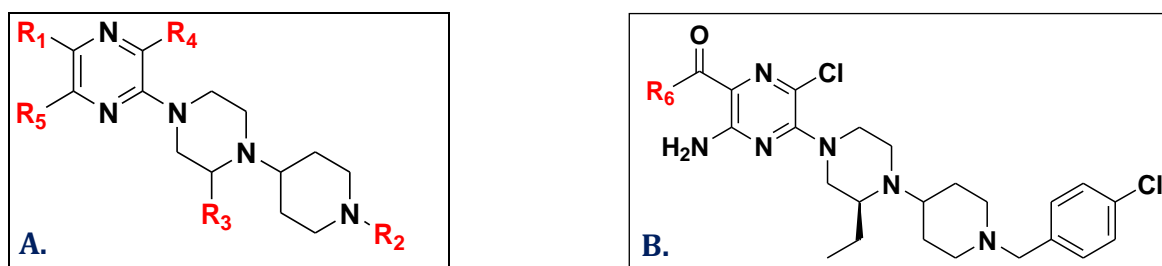


Figure 15 : Différentes structures de molécules antagonistes au CXCR3 dans la famille des pipérazinyl-pipéridine

A. Schéma général des molécules antagonistes ; B. Molécule optimisée avec les groupements les plus réactifs

Afin de déterminer chacun des groupements R, cette équipe a testé de nombreuses combinaisons pour obtenir la meilleure affinité de liaison pour le CXCR3 (hCXCR3, IC₅₀, nM) mais également maintenir un niveau suffisant de canaux potassiques du gène hERG qui est essentiel pour une activité électrique normale du coeur (hERG, %) ainsi qu'un bon profil pharmacocinétique mesuré chez le rat (AUC, μM, h/mL).

Concernant le groupement R₂, ils ont tout d'abord observé que la substitution en para du groupement benzyl augmentait la réactivité comparée au benzyl non substitué. Ainsi, en testant différentes substitutions du benzyl, le substituant 4-Chloro-benzyl semble être plus efficace (70 nM) que d'autres halogénés comme le Brome ou encore des substituants accepteurs ou donneurs d'électrons comme le trifluoro-benzyl ou le methoxy-benzyl. Il existe cependant des groupements avec une affinité de liaison légèrement meilleure que le 4-chloro-benzyl mais en prenant en compte la difficulté et le temps de synthèse pour obtenir ces molécules, le 4-chloro-benzyl semble être le meilleur compromis.

Concernant la partie gauche de la molécule avec le groupement **R₁**, cette même équipe a montré que la présence d'un groupement amide secondaire était importante et que la substitution de ce dernier par des urées ou des amines impliquait une grande perte d'activité (allant de 70 à 560 nM pour les amides secondaire à 3800 nM pour une amine tertiaire ou même une perte totale d'affinité pour l'analogue urée), ce qui démontre que le groupement amide secondaire en position **R₁** est primordial pour avoir une bonne affinité pour le CXCR3. De la même manière, la présence du Chlore sur la partie aminopyridine en **R₄** permet une augmentation d'activité de 100 fois et l'amine en **R₅** donne également de meilleurs résultats.

Concernant le corps piperazinyl-pipéridine, de nombreuses substitutions à différents endroits ont été testées notamment le carbonyl et méthyle (R ou S). Ils ont observé que seule la substitution située en position 2' de la piperazine, nommée ici **R₃**, améliorait l'activité de liaison. Ils se sont alors davantage concentrés sur la nature de la substitution qu'il fallait employer et se sont rendu compte que le groupement éthyle était plus efficace que le groupement méthyle mais également que tous les alkyles plus gros comme l'isobutyle ou le phényle ou encore que des substituants polaires comme des alcools ou des esters. Cependant, seule la conformation S de l'éthyle est efficace.

Finalement, afin de déterminer le rôle du cœur piperazinyl-pipéridine, des tests de structures ont été réalisés en remplaçant la piperazine par une pipéridine, l'inversion de structure entre la piperazine et la pipéridine, ou encore l'ouverture des cycles et les affinités de liaison pour le CXCR3 dans chacun des cas diminuent du nanomolaire au micromolaire, ce qui prouve l'importance de ce type de structure pour cibler le récepteur CXCR3.

Une fois que tous les groupements ont été déterminés, le type d'amide en position **R₆** a été peaufiné (Figure 15-B) et l'utilisation de l'amide secondaire primaire (dérivé pyrazinamide) donne une des molécules antagonistes du CXCR3 la plus efficace (IC₅₀ : 0,8 nM). Cet analogue amide primaire (SCH546738) a été sélectionné pour une preuve de concept *in vivo* sur des modèles de souris CIA et rat EAE.¹¹³

2.3.5 La molécule SCH546738

Le SCH546738, petite molécule organique synthétique (491,2 g/mol), a d'abord été décrit comme étant l'un des nombreux antagonistes du CXCR3¹¹² mais a été par la suite développé et davantage étudié par les laboratoires Merck aux Etats-Unis en 2012 (Figure 16).¹¹³

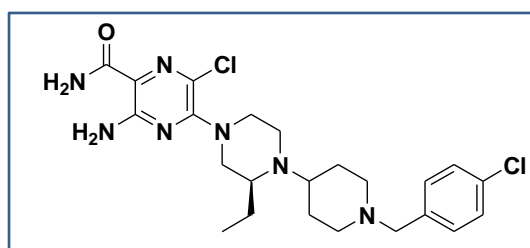


Figure 16 : Structure chimique du SCH546738

2.3.5.1 Spécificité du SCH546738

Il a été montré, grâce à une analyse compétitive de liaison entre l'analogue soufré du SCH546738 marqué au ³⁵S et le SCH546738, que ce dernier avait une affinité de liaison pour le CXCR3 à l'échelle nanomolaire (0.4 nM). Cette constante d'affinité est comparable à celle d'un anticorps.

Il a également été montré que le SCH546738 est un antagoniste non compétitif de CXCL10 et CXCL11 car l'IC₅₀ du SCH546738 est constant (autour de 1-2 nM) et indépendant des différentes concentrations de CXCL10 ou CXCL11 lors des tests de déplacements de ces ligands. Ces résultats laissent entendre que le SCH546738 se lie sur des sites allostériques du CXCR3 et change sa conformation afin d'empêcher la liaison de CXCL10 ou de CXCL11 avec CXCR3. Lors des tests de diminution du chimiotactisme en présence de CXCL9, CXCL10, CXCL11 et un ligand de CCR7 le CCL19, il a été montré que le SCH546738 diminuait significativement le chimiotactisme induit par CXCL9, CXCL10 et CXCL11 de manière non compétitive, mais qu'il n'affectait pas le chimiotactisme induit par CCL19, ce qui prouve la spécificité du SCH546738 pour les ligands CXCL9, CXCL10 et CXCL11 et donc le CXCR3. Il est effectivement essentiel d'avoir un antagoniste non-compétitif qui puisse inhiber la liaison de plusieurs ligands avec un récepteur afin d'empêcher (ou activer) les fonctions de l'un combiné avec l'autre. Cette spécificité du

SCH546738 a été confirmée par des tests d'affinités avec 49 autres GPCRs que le CXCR3. La plupart se sont avérés être négatifs et ou très faiblement actifs ce qui prouve la grande spécificité de ce ligand pour le récepteur CXCR3. Des études complémentaires ont montrés que le SCH546738 avait une affinité de liaison pour le CXCR3-A trois fois supérieure que pour le CXCR3-B et qu'à faible concentration (1 nM), il inhibait plus de 70 % de CXCR3-A contre 25 % de CXCR3-B.¹¹⁴

2.3.5.2 Action du SCH546738

Des tests d'efficacité de SCH546738 sur des souris où le CIA (Collagen-induced Arthritis) a été induite, ont été réalisés et ont montrés une diminution significative du développement de la maladie en présence de SCH546738 comparé au contrôle. De même, les pattes de souris traitées avec le SCH546738 à 40 mpk (au jour 9) ont été analysées et comparées à celles des souris traitées avec un placebo et ces analyses montrent que l'infiltration de leucocytes dans les articulations et les dommages structuraux sur les os et cartilages sont réellement atténués en présence de SCH546738. Ces différents résultats montrent qu'un traitement thérapeutique avec le SCH546738 entrave de manière significative, sur modèle animal, les problèmes d'arthrites comme ici dans le cas de polyarthrite rhumatoïde.

La même équipe a réalisée d'autres tests sur modèle d'allogreffe cardiaque de rat afin de vérifier l'efficacité du SCH546738 sur le maintien de greffes. A ce jour, l'agent immunosuppresseur le plus utilisé pour prévenir le rejet de greffon est la Cyclosporine. Il permet de maintenir la greffe sur 40% des rats après 100 jours, alors que le SCH546738 ne permet pas d'atteindre un maintien au-delà de 20 jours. Il a cependant été montré que l'association de la Cyclosporine avec le SCH546738 augmentait à 100% le maintien de greffe après 100 jours, ce qui permettrait d'utiliser une dose plus faible de Cyclosporine limitant ainsi le risque d'effets secondaires graves.

En comparaison avec d'autres antagonistes de CXCR3, comme par exemple AMG1237845 qui prolonge la survie du greffon mais n'inhibe pas l'accumulation de leucocytes au niveau de la greffe ¹¹⁵, ou bien TLRK-A qui n'est efficace qu'en association

avec la Cyclosporine ¹¹⁶ ou encore NIBR2130 qui ne prolonge pas la durée de vie du greffon ¹¹⁷, le SCH546738 est efficace dans tous ces cas et une thérapie utilisant le SCH546738 serait une excellente stratégie pour le traitement de maladies auto-immunes comme par exemple l'arthrite, la sclérose en plaques ou prévenir le rejet de greffes mais également dans des processus pathologiques tels que le développement tumoral ou encore l'angiogenèse tumorale. En effet, il a récemment été montré que SCH546738 inhibait significativement l'invasion tumorale en bloquant spécifiquement le CXCR3-A sur les cellules U87 de glioblastome et sur modèle CAM à faible concentration (2,2 nM) où la tumeur reste localisée 7 jours après l'implantation en présence de SCH546738 et s'étend en son absence. ⁵⁵

Le SCH546738 a été utilisé comme preuve de concept et a prouvé sa forte affinité de liaison (à l'échelle nanomolaire) pour le CXCR3 mais également son efficacité.

L'équipe de Stuart B. Rosenblum a cependant montré en 2014¹¹⁸, grâce à des tests à base de rubidium, que l'utilisation de cette molécule entraînait une cardiotoxicité due à une diminution du taux de hERG, très importante pour l'activité électrique du cœur, ce qui diminue la vitesse d'élimination du potassium de la cellule et peut aboutir à un arrêt cardiaque. Par ailleurs, sa structure est très proche de celle de SCH900875, qui induit une toxicité hématologique importante (anémie hémolytique et thrombopénie). ¹¹⁹

Le SCH546738, malgré sa très forte affinité de liaison pour le CXCR3-A, ne peut donc pas être utilisé seul comme traitement.

Nous avons vu que CXCR3 jouait un rôle primordial dans la progression des cancers, il apparaît donc intéressant de le cibler. L'efficacité de la molécule SCH546738 comme antagoniste a été démontrée cependant elle présente des effets négatifs notamment sur le cœur. Il faut donc pouvoir transporter cette molécule au niveau du CXCR3 sans pour autant induire de toxicité.

L'utilisation de nanoparticules semble être une excellente stratégie et ont donc été choisies.

3. Les nanoparticules pour la santé

3.1 La nanomédecine

Le terme de nanomédecine est apparu à la fin des années 1990 et désigne, par définition, l'association des nanotechnologies et de la médecine, ou plus particulièrement, l'utilisation des nanotechnologies pour des applications médicales. En effet, comme énoncé plus haut, les inconvénients intrinsèques aux thérapies conventionnelles contre le cancer ont incité le développement et l'application de nanoparticules pour un diagnostic, une visualisation et/ou un traitement du cancer plus efficaces et plus sûrs.¹²⁰ L'idée d'utiliser ces nanoparticules dans le cadre d'un traitement est de modifier la distribution de la molécule active dans l'organisme, d'accumuler cette molécule au niveau des sites d'actions pharmacologiques et de l'éloigner des sites sur lesquels elle pourrait avoir des effets non désirés (effets secondaires). En pénétrant au cœur des tumeurs, le principe actif se montre efficace sur le site ciblé. Ainsi, l'index thérapeutique de la molécule active peut être amélioré.

Ce chapitre ne sera pas exhaustif sur la littérature des nanoparticules mais se focalisera sur les nanoparticules dans le traitement du Cancer.

3.2 Les nanoparticules

3.2.1 Définition, applications, propriétés

Le développement des nanoparticules représente actuellement un domaine scientifique multidisciplinaire en pleine effervescence dans plusieurs domaines tels que la biologie, la physique et la chimie, notamment dans le cadre de la médecine, constitue des plateformes très prometteuses de la recherche.

Selon la définition du *National Nanotechnology Initiative* (initiative de recherche et développement (R&D) du gouvernement américain), les nanoparticules sont des structures dont au moins une dimension se trouve dans le domaine de taille variant entre 1 et 100 nm. Cependant, le préfixe « nano » est aussi couramment utilisé pour désigner les particules de plusieurs centaines de nanomètres.¹²¹ Cette taille peut offrir

une énorme surface spécifique et une bonne stabilité. Elles peuvent ainsi former des dispersions homogènes qui ne sédimentent pas et sont capables d'arriver à leurs cibles cellulaires spécifiquement. De même, elles sont absorbées par les cellules plus facilement que des particules plus grandes, de sorte que ces nanoparticules peuvent être utilisées comme outils de transport efficaces pour la vectorisation ciblée de principes actifs.¹²² En effet, il est possible d'encapsuler des principes actifs à l'intérieur d'une nanoparticule et ainsi de profiter de plusieurs avantages, tels que la pharmacocinétique, la pharmacodynamique et donc la biodisponibilité. Le principe actif encapsulé a ainsi une durée de vie plus importante du fait qu'il n'est pas en contact direct avec les fluides biologiques, et a moins de risque de provoquer des effets secondaires.

Le caractère polyvalent des nanoparticules permet également le développement de la théranostique (diagnostic + thérapie), qui permet de combiner la thérapie et l'imagerie non invasive, afin de valider puis d'optimiser le traitement pour chaque patient.¹²³

Dans l'optique d'une application thérapeutique, les nanoparticules doivent être biocompatibles et non toxiques, c'est-à-dire capable d'intégrer l'environnement biologique sans déclencher de réponse immunitaire. En fait, les effets indésirables liés aux nanoparticules dépendent de plusieurs paramètres comme la taille hydrodynamique, la forme, la quantité, la chimie de surface, la réaction du système immunitaire et leurs temps de résidence dans le système sanguin. C'est pourquoi des études de toxicologie sont nécessaires pour chaque formulation de nanoparticules. Il est généralement accepté que les nanoparticules avec un rayon hydrodynamique compris entre 10 et 100 nm ont des propriétés pharmacocinétiques optimales pour des applications *in vivo*. Les nanoparticules plus petites sont sujets à des extravasations tissulaires et à une clairance rénale tandis que les particules plus grosses sont rapidement captées par les opsonines et éliminées de la circulation sanguine via les macrophages du système réticulo-endothélial.¹²⁴

Ainsi, en raison de leurs petites tailles, les nanostructures présentent des propriétés physicochimiques et biologiques uniques qui en font un matériau favorable pour les applications biomédicales.

3.2.2 Les différents types de nanoparticules

Il existe plusieurs types de nanovecteurs utilisés en nanomédecine qui diffèrent selon leur composition et leur structure (Figure 17) :

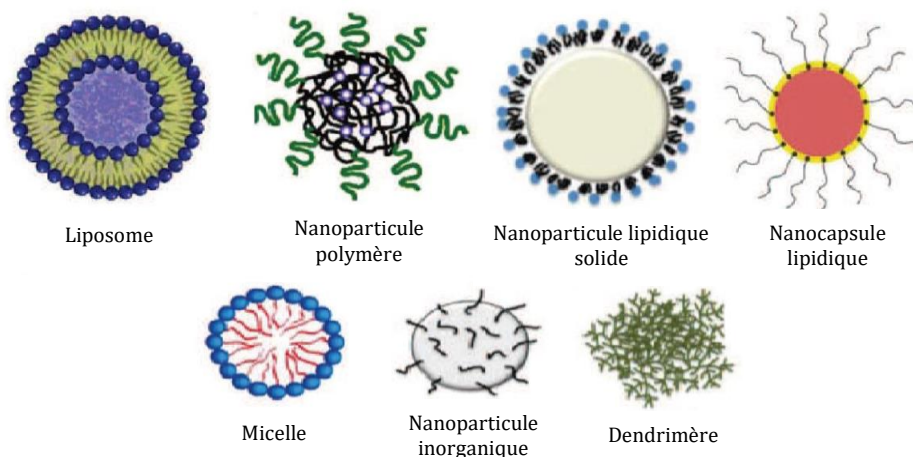


Figure 17 : Les différents types de nanovecteurs utilisés en nanomédecine – adaptée ¹²⁵

Parmi les nanovecteurs les plus courants, on peut citer les liposomes, les micelles, les nanoparticules polymères, lipidiques et inorganiques.

3.2.2.1 Les micelles

Les micelles sont des auto-assemblages de molécules amphiphiles qui forment des structures de type cœur-coquille («core-shell» en anglais) en milieu aqueux. Elles sont composées de têtes polaires hydrophiles dirigées vers l'extérieur et de chaînes hydrophobes dirigées vers l'intérieur. Ce phénomène d'auto-assemblage se fait spontanément au contact de l'eau afin de minimiser le contact des parties hydrophobes avec l'eau lorsque la concentration en surfactants dépasse une valeur seuil appelée concentration micellaire critique (CMC). Ce phénomène est réversible.

Différents types de micelles peuvent être obtenus en fonction de la nature des molécules amphiphiles utilisées. On peut citer les micelles à base de phospholipides ou de surfactants à base de poly(éthylène glycol) (PEG), mais ce sont actuellement les micelles

à base de polymères qui concentrent la plus grande partie de la recherche.^{126,127} Les principaux inconvénients de ces systèmes sont qu'ils ne sont pas adaptés à tous les principes actifs, leur faible taux de chargement dû à un faible espace disponible à l'intérieur de la micelle et la possible dissociation des micelles lors de l'injection chez le patient.

3.2.2.2 Les liposomes

Observés pour la première fois en 1964 par Bangham et al.¹²⁸, les liposomes sont des vésicules artificielles formées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques concentriques composées de molécules amphiphiles qui s'auto-assemblent en milieu aqueux et qui donnent un cœur hydrophile et une bicouche hydrophobe. A la différence des micelles, les liposomes sont capables d'encapsuler des composés hydrophiles et hydrophobes, en leur cœur ou dans la bicouche. Ils sont facilement formés à partir de molécules amphiphiles (le plus souvent des phospholipides) non toxiques, naturels, et biodégradables. Leur taille varie généralement de quelques nanomètres à quelques micromètres.

Ces systèmes sont très intéressants pour des applications de vectorisation de principes actifs. En effet, la première formulation anti-cancéreuse à l'état nanoparticulaire à avoir été approuvée par l'agence de santé américaine (U S Food and Drug Administration) est le Doxil^{®129} en 1995, liposome PEGylé encapsulant la doxorubicine.

Les liposomes présentent cependant, un problème de stabilité chimique dû à la présence de groupements esters, de fuite dû à la fluidité membranaire ainsi qu'un faible taux de chargement en principes actifs lipophiles.¹³⁰

3.2.2.3 Nanoparticules lipidiques

Ces nanoparticules sont constituées d'un cœur lipidique, généralement à base de triglycérides biodégradables et non toxiques, ce qui en fait des systèmes très intéressants pour la vectorisation de principes actifs. Parmi les particules entrant dans

cette catégorie, on peut citer les nanoparticules lipidiques solides (SLN) qui sont les plus étudiées¹³¹, ainsi que les nanocapsules lipidiques (LNC). Les SLN sont constitués d'une matrice de lipides solides plus ou moins cristallisée et sont très stables grâce à la présence d'une couche de surfactants. Elles présentent cependant l'inconvénient de voir leur taille augmenter au cours du temps, une tendance à gélifier de manière imprévisible et une faible capacité d'encapsulation due à la structure cristalline de la matrice lipidique. Les LNC sont constitués d'un cœur lipidique liquide entouré par une coque solide.¹³²

3.2.2.4 Nanoparticules inorganiques

Les nanoparticules inorganiques, formées de composés tels que la silice, l'alumine, les métaux, ou les oxydes métalliques, sont également très étudiées notamment les nanoparticules magnétiques¹³³ et les nano cristaux semi-conducteurs plus connus sous le nom de « Quantum dots »¹³⁴ pour une application en imagerie.

La majorité des particules magnétiques se base sur l'utilisation d'oxydes de fer superparamagnétiques. Elles sont constituées de petites particules de maghémite (Fe_2O_3) ou de magnétite (Fe_3O_4), de quelques nanomètres de diamètre et peuvent être encapsulées dans une matrice de silice, de polymère ou de polysaccharide.

Les Quantum dots, sont des objets plus petits, mesurant entre 2 et 10 nm de diamètre et sont composés d'un cœur cristallin semi-conducteur. Ce cœur est généralement recouvert d'une coque de sulfure de zinc afin de passiver la surface tout en stabilisant les propriétés optiques de ces nanoparticules.

3.2.2.5 Nanoparticules polymères

La plupart des nanoparticules polymères étudiées pour des applications en santé est biodégradable et biocompatible, et est très utilisée pour l'administration de médicaments. Elles présentent un fort potentiel de modification de surface par modification chimique grâce à la grande diversité de monomères, fournissent un excellent contrôle pharmacocinétique et sont appropriés pour l'encapsulation et la

délivrance de médicaments. Elles peuvent être formulées selon différents protocoles afin d'encapsuler plusieurs classes d'agents thérapeutiques. La matrice polymère empêche la dégradation du médicament et assure également la gestion de la libération du médicament. Les propriétés de surface sont également une composante essentielle de leurs caractéristiques de ciblage, puisque ces nanoparticules entrent en contact direct avec les membranes cellulaires, ainsi leurs propriétés peuvent déterminer le mécanisme d'internalisation.¹³⁵

Différentes catégories de nanoparticules à base de polymères peuvent être obtenues en fonction des polymères et de la méthode de préparation utilisés. En effet, les copolymères à blocs amphiphiles peuvent s'auto-assembler en divers types de structures, de tailles très variables allant d'une centaine de nanomètres à plusieurs micromètres dans des solutions aqueuses. On peut par exemple citer les micelles polymères, les dendrimères, ou les polymersomes.

Les dendrimères sont des constructions polymères synthétiques fortement branchées. Leur taille dépasse rarement les 15 nm et sont étudiés comme vecteurs ou marqueurs en imagerie.¹³⁶ Malheureusement leur capacité de chargement en agents est faible.¹³⁷

Les polymersomes ont une structure similaire à celle des liposomes mais sont constitués de polymères. Par opposition aux micelles polymères qui ne possèdent pas de réservoir aqueux, les polymersomes sont des sphères creuses constituées d'un compartiment aqueux au cœur, lui-même entouré par une membrane de type bicouche. Cette membrane sépare et protège le cœur aqueux du milieu extérieur.

L'intérêt des polymersomes dans le domaine des biomatériaux provient de leur grande stabilité, imperméabilité et robustesse qui résulte de la membrane épaisse qui les entoure, généralement plus importante qu'une membrane de phospholipides, dû à la possibilité d'utiliser des polymères de hautes masses molaires. Leurs capacités de stockage est également un point fort des polymersomes, car en effet, des composés hydrophiles et /ou hydrophobes peuvent être encapsulés, grâce à la présence du cœur aqueux et de la membrane hydrophobe.¹³⁸⁻¹³⁹

3.2.3 Les trois générations de nanoparticules

Une partie des recherches menées pour améliorer la biodisponibilité du principe actif, réside dans l'étude de la vectorisation de ces médicaments. Ces vecteurs doivent donc être stables dans l'organisme et capables de véhiculer une substance chimique biologiquement active du site d'administration vers le site actif, suivant un dosage et une cinétique stricte. Pour cela, de nombreuses études de la nature des nanoparticules ont été réalisées au cours des années et sont aujourd'hui classées en trois générations en fonction de leur biodisponibilité (Figure 18).

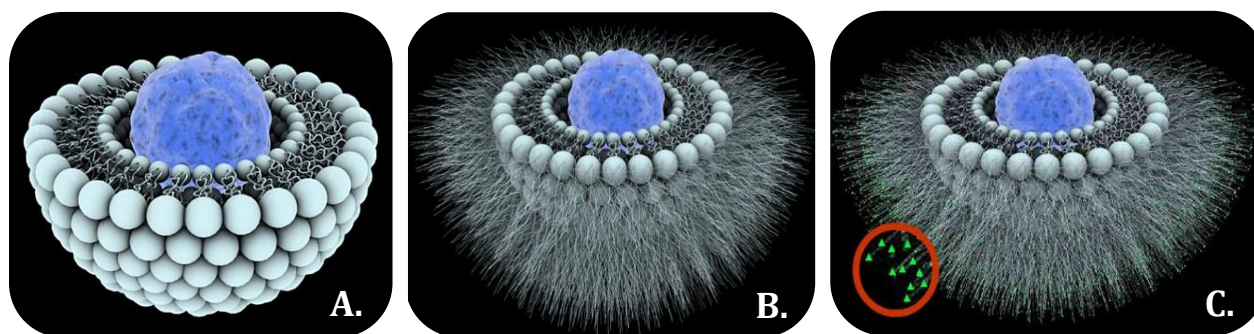


Figure 18 : Les différentes générations de vecteurs

*A. Vecteurs de première génération ; B. Vecteurs de deuxième génération ;
C. Vecteurs de troisième génération*

Les vecteurs de **première génération** (Figure 18-A) correspondent à des colloïdes stables en milieu aqueux encapsulant des agents actifs, l'intérêt principal étant de ralentir leur élimination (notamment par voie rénale) et de prolonger leurs effets. L'exemple prototypique est le liposome, vésicule formée d'une ou de plusieurs bicouches à l'intérieur desquelles est encapsulé le médicament. Un exemple commercialisé à ce jour est le Myocet[®], utilisé dans le cas des cancers du sein. Du fait de leur grande surface spécifique, ils interagissent fortement avec les protéines plasmatiques, en particulier les opsonines, qui se fixent à leur surface et sont ensuite captés par les macrophages du foie qui reconnaissent les opsonines. Les nanovecteurs sont donc détruits et le principe actif est libéré.

Les vecteurs de **deuxième génération** (Figure 18-B), ont été mis en place pour limiter le phénomène d'opsonisation. Ces derniers ont été rendus furtifs par ajout d'un polymère hydrophile à la surface, très souvent le polyéthylène glycol (PEG), ce qui permet au vecteur d'échapper à la reconnaissance par les cellules immunitaires dû à la couche protectrice qui limite leur fixation.^{140,141} Ainsi, les vecteurs de deuxième génération restent plus longtemps dans la circulation sanguine générale et vont pouvoir s'accumuler au niveau du tissu cancéreux où le principe actif va être libéré. On peut par exemple citer l'exemple du Doxil®, utilisé pour le traitement de différentes pathologies comme le cancer des ovaires.

Les vecteurs de **troisième génération** (Figure 18-C), présentent une surface fonctionnalisée par des agents de ciblage en plus du PEG, ce qui permet de limiter la longue persistance des nanoparticules de deuxième génération dans le sang et leur extravasation dans les zones extrêmement vascularisées puisque ce ligand va permettre un ciblage actif. En effet, la présence d'un ligand va permettre une accumulation des nanoparticules dans une zone d'intérêt grâce à une fixation spécifique sur les cellules tumorales surexprimant son récepteur. Une fois fixé, le vecteur peut être internalisé dans la cellule malade et libérer le médicament de manière plus efficace.

L'évolution des générations de vecteurs a permis d'augmenter en efficacité de traitement et notamment l'index thérapeutique dans le cas de délivrance de principes actifs.¹⁴²

3.2.4 Les nanoparticules multifonctionnelles

Le concept des nanoparticules multifonctionnelles décrit par Mauro Ferrari¹⁴³ en 2005 représente la nanoparticule idéale, c'est-à-dire un agent ciblant injectable combinant diagnostic et thérapie. La représentation de cette nanoparticule multifonctionnelle est illustrée sur la Figure 19 ci-dessous.

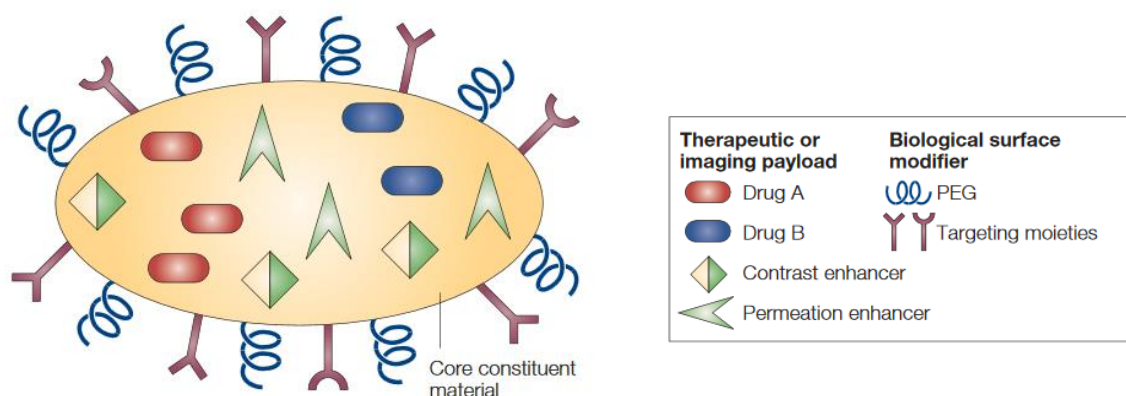


Figure 19 : Nanoparticule multifonctionnelle ¹⁴³

Les nanoparticules multifonctionnelles sont décrites comme étant composées d'un cœur à l'intérieur duquel peuvent être encapsulés différents agents thérapeutiques en vue d'un traitement, des agents de contraste pour un suivi dans l'organisme par imagerie, ou des agents de perméation qui permettent de traverser les barrières biologiques telles que la paroi des vaisseaux sanguins ou la membrane cellulaire.

La couronne est composée d'agents de furtivité pour éviter leur capture par les macrophages et augmenter leur temps de circulation dans l'organisme et la surface des nanoparticules fonctionnalisée par des agents de ciblage de toutes natures pour permettre un ciblage actif.

Il est également possible d'utiliser des agents d'activation, un composé répondant à un stimulus extérieur, comme la température ou le pH, qui induit une libération contrôlée des principes actifs.^{144,145}

Finalement, les nanoparticules constituent un type de plateforme sur laquelle différents agents viennent prendre place, et à partir de laquelle il est possible d'obtenir différentes propriétés en fonction des agents choisis.

3.3 Stratégie de ciblage

Il existe deux approches pour la vectorisation de nanoparticules, souvent appelés dans la littérature « ciblage passif » et « ciblage actif ».

La première approche repose principalement sur l'accumulation de nanoparticules dans les vaisseaux sanguins irréguliers qui alimentent les tumeurs. Ce phénomène appelé « EPR » (Enhanced Permeability and Retention) peut-être amplifié d'une fonctionnalisation des nanoparticules par des groupements dits « furtifs » afin d'augmenter leur temps de circulation dans le sang.

La seconde approche se base sur le fait que les cellules tumorales ou du microenvironnement tumoral surexpriment des récepteurs, comparé aux cellules saines. Ainsi, la fonctionnalisation des nanoparticules par des ligands qui vont cibler spécifiquement ces récepteurs, va permettre de faciliter leur internalisation dans les cellules cancéreuses.

Ces deux approches sont détaillées ci-dessous.

3.3.1 Ciblage passif : effet EPR

Des études histologiques montrent que, dans un tissu sain, l'endothélium vasculaire est dit jointif, c'est-à-dire que les jonctions intercellulaires sont serrées, ce qui empêche les nanovecteurs de pénétrer dans ce tissu. Inversement, au niveau des tissus cancéreux, on observe une réaction inflammatoire, caractérisée par l'arrivée de macrophages et une libération de cytokines, qui vont induire une augmentation de la perméabilité vasculaire (Figure 20).

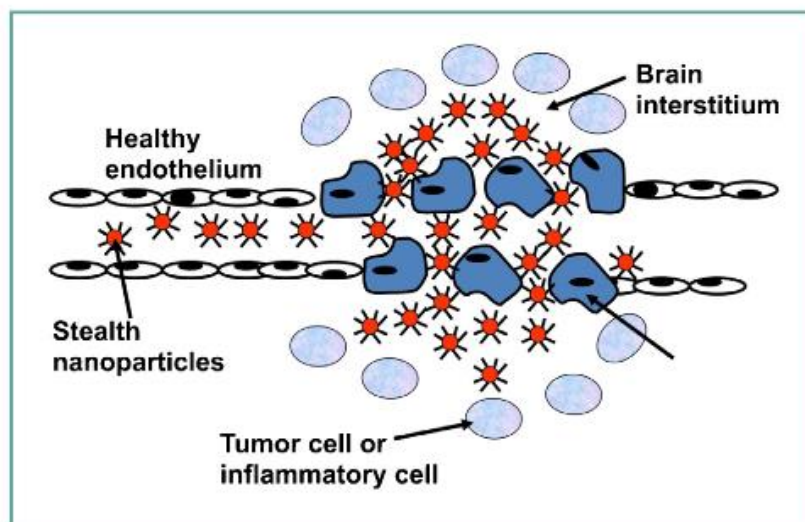


Figure 20 : Effet de perméation et de rétention « Effet EPR »¹⁴⁶

Cette augmentation de perméabilité se produit car la vascularisation de la tumeur n'est pas étanche et va permettre aux nanoparticules de pénétrer dans le tissu cancéreux par diffusion et s'accumuler au niveau des cavités. En effet, le système de drainage lymphatique dans les tumeurs est, contrairement au tissu sain, déficient, ce qui empêche les nanoparticules d'être évacuées et la rétention peut durer plusieurs semaines.¹⁴⁷ Il est possible, en un ou deux jours, d'atteindre des concentrations locales en principe actifs, 10 à 50 fois supérieures à celles obtenues dans les tissus sains.¹⁴⁸

Ce sont ces deux caractéristiques (perméabilité des vaisseaux et rétention des nanoparticules) qui composent l'effet EPR, décrit pour la première fois en 1986 par Maeda *et al.* chez la souris.¹⁴⁸

Cependant, le ciblage passif nécessite l'utilisation de composés stables, non agrégés, furtifs et présentant un temps de circulation suffisamment long pour conduire à l'accumulation du composé dans les tumeurs. C'est pourquoi les vecteurs de deuxième génération sont privilégiés par rapport aux vecteurs de première génération. En effet, des études ont montré que la présence de PEG en surface de liposomes prolongeait leur temps de circulation *in vivo* comparé aux liposomes non PEGylés.¹⁴⁹

Un des premiers exemples de formulation en utilisation clinique est le Doxil®, un liposome PEGylé stable encapsulant la doxorubicine. Une très bonne rétention de la molécule thérapeutique dans la formulation liposomale et un temps de circulation 6 fois plus important que la doxorubicine seule ont été démontrés. Il est utilisé dans le cas du cancer des ovaires et du sein métastatiques où il montre des résultats très efficaces dans la réduction de la taille des tumeurs grâce au mécanisme de rétention et perméabilité accrues.¹²⁹ Des nanoparticules polymères émergent également dans les études cliniques avec des résultats notables comme l'étude de phase II de BIND-014 qui s'intéresse à l'efficacité d'une suspension de micelles de PGA-*b*-PEG pour vectoriser le Docetaxel, un agent antimétabolique, dans le cas du cancer de la prostate et cancer bronchique non à petite cellules.¹⁵⁰

De nos jours, il existe de nombreux systèmes de délivrance de principes actifs non ciblés. On peut par exemple citer les nanoparticules de PTMC-*b*-PEG encapsulant du paclitaxel, testées *in vitro* et *in vivo* sur modèles de gliomes, et qui ont montrées une activité anti-tumorale supérieure comparé au principe actif seul (taxol) *in vitro* et une accumulation plus importante par effet EPR *in vivo*.¹⁵¹ Ou encore, les polymersomes POE-*b*-PCL, chargés de doxorubicine dans le réservoir hydrophile, où Ghoroghchian *et al.*¹⁵² ont réussi à induire son relargage de manière contrôlée grâce à des variations de pH et Levine *et al.*¹⁵³ qui ont démontré le potentiel thérapeutique de ce système *in vivo* sur modèle de souris portant des tumeurs xénotransplantées, où la croissance tumorale est retardée.

Le ciblage passif ne suffit cependant pas à accumuler de manière spécifique les nanoparticules au niveau des tumeurs et de l'environnement tumoral, c'est pourquoi ces limitations ont contribué au développement d'une approche alternative qu'est l'utilisation de nanovecteurs de troisième génération pour du ciblage dit « actif ».

3.3.2 Ciblage actif : introduction de ligands spécifiques

Contrairement au ciblage passif, le ciblage actif requiert la conjugaison d'un ligand spécifique d'un récepteur qui va promouvoir le ciblage des sites spécifiques. Cette

reconnaissance moléculaire peut se faire via la formation d'un complexe ligand-récepteur, par interactions antigène-anticorps ou encore par ciblage en utilisant des aptamères. En effet, les maladies localisées comme les cancers ou toutes sortes d'inflammation ne présentent pas seulement une disjonction au niveau des vaisseaux mais surexpriment aussi plusieurs épitopes ou récepteurs qui peuvent être utilisés comme cible. Ainsi, les ligands qui lient spécifiquement ces épitopes ou récepteurs peuvent être couplés à la surface de nanovecteurs, eux même PEGylés afin de circuler plus longtemps dans le corps. Les ligands peuvent avoir des natures et des structures différentes telles que des saccharides, des oligonucléotides¹⁴², des anticorps¹⁵⁴, des peptides¹⁵⁵, ou des molécules organiques synthétiques¹⁵⁶.

Ce type de ciblage est particulièrement intéressant pour les agents thérapeutiques qui ne sont pas facilement absorbés par les cellules et nécessitent une aide par fusion, endocytose, ou d'autres processus pour accéder à leur site actif. En effet, le ciblage actif permet une amélioration de la distribution des vecteurs au niveau de l'interstitium et ainsi leur pénétration à l'intérieur de la cellule.

Lorsque le récepteur, surexprimé sur les cellules, reconnaît son ligand, le complexe récepteur-ligand va être internalisé par la cellule et se retrouver dans un endosome intracellulaire, ce qui va permettre la libération du principe actif (Figure 21).

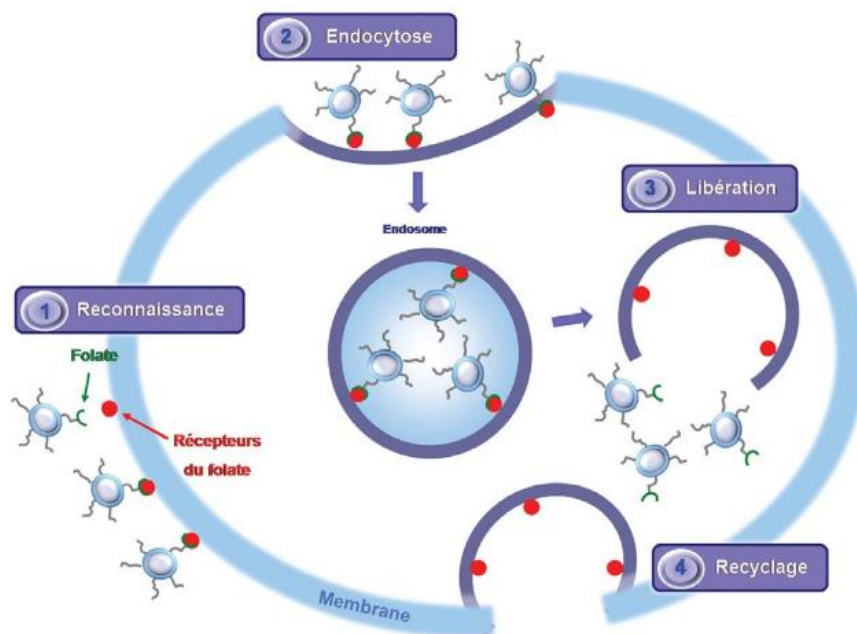


Figure 21 : Pénétration de la nanoparticule dans la cellule tumorale ¹⁵⁷

Cependant, l'utilisation de ligands n'est pas une stratégie de ciblage en soi, elle est en fait complémentaire à l'effet EPR. En effet, l'utilisation de ligands ne permet pas d'amener directement les nanovecteurs aux cellules surexprimant leurs récepteurs. Leur accumulation par effet EPR aux alentours de la tumeur est une première étape nécessaire. La présence de ligand permet ensuite un ciblage induisant alors l'internalisation. Le cas de ciblage de récepteurs surexprimés au niveau des cellules tumorales est illustré dans la Figure 22 ci-dessous.

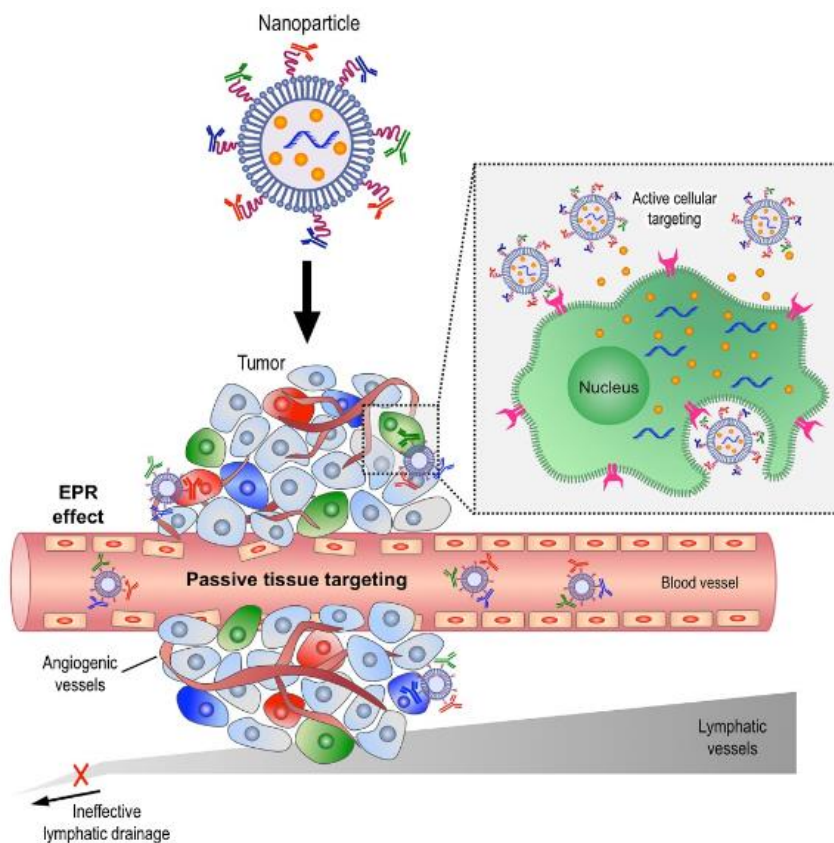


Figure 22 : Représentation d'un ciblage actif¹⁵⁸

La taille nanométrique des nano-vecteurs ainsi que la possibilité de coupler différents ligands à leurs surfaces offrent d'excellentes opportunités pour passer les barrières physiologiques et permettre à l'agent thérapeutique de s'accumuler préférentiellement dans les tissus ciblés. Le fait de pouvoir varier le taux de ligand en surface pour obtenir les meilleures propriétés fait des nanoparticules, un système multivalent. Il est ainsi

possible, grâce à cette multivalence, d'augmenter l'efficacité du ciblage.¹⁵⁹ En effet, une modulation de la réponse physiologique induite au niveau d'un récepteur en fonction de la multivalence du ligand a été observée (intensité et nature de la réponse) et une présentation multivalente de ligands peut induire un phénomène d'endocytose du complexe ligand/récepteur non observé dans le cas du ligand monovalent. Quelques exemples de ces complexes sont résumés dans la partie 3.6.

3.4 Internalisation cellulaire des nanoparticules

L'utilisation dans le corps de vecteurs de petite taille est préférable à ceux dont les tailles vont au-delà du micromètre car ces derniers induisent une réponse phagocytaire au niveau des macrophages et sont éliminés. Ainsi, les petits vecteurs vont avoir un meilleur temps de circulation dans le corps et vont également avoir une bien meilleure internalisation. En effet, une étude menée par Koval *et al.* a montré que moins de 30% des particules entre 200 et 750 nm étaient phagocytés par les macrophages comparé à 80% des particules de 2 à 3 μm .¹⁶⁰ Ainsi, pour éviter ce phénomène d'élimination, la taille des particules ne doit pas excéder 200 nm. De même, Perrault *et al.* ont montré que les nanoparticules d'or PEGylées devaient avoir un diamètre inférieur à 100 nm pour s'éloigner du système vasculaire et rester au niveau de la tumeur.¹⁶¹

Au niveau des cellules cancéreuses, l'internalisation des particules ne se fait que lorsque la taille de ces dernières ne dépasse pas 500 nm. En effet, Rejman *et al.* ont montré que plus la taille des nanoparticules était grande plus l'internalisation diminuait.¹⁶²

Le type d'internalisation cellulaire des nanoparticules influence fortement les réponses biologiques. Plusieurs mécanismes d'endocytose sont engagés afin de faciliter l'internalisation des différents vecteurs (Figure 23).

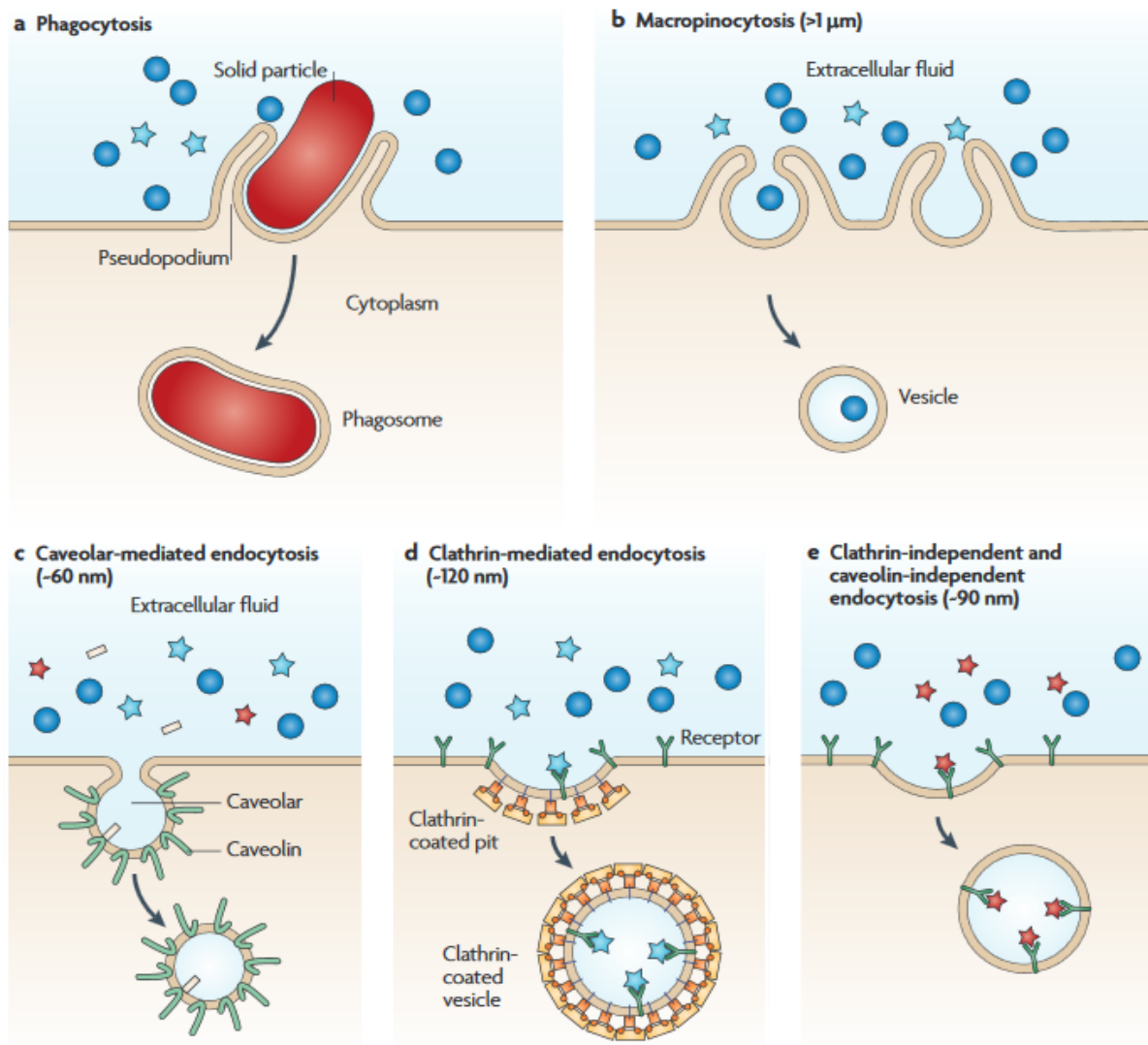


Figure 23 : Modes d'internalisation cellulaire des nanoparticules ¹⁶³

Les nanoparticules sont représentées par des boules bleues (>1 μ m), des étoiles bleues (environ 120 nm), étoiles rouges (environ 90 nm) et des rectangles blancs (environ 60 nm)

a. Phagocytose ; **b.** Macropinocytose ; **c.** Endocytose cavéole-dépendante ; **d.** Endocytose clathrine-dépendante ; **e.** Endocytose cavéole/clathrine dépendante

L'endocytose représente la voie principale d'internalisation des nanoparticules dans la cellule du fait de leur taille qui est supérieure à 10 nm, ce qui va permettre la formation de nouvelles vésicules intracellulaires à partir de la membrane plasmique et induire l'internalisation.¹⁶⁴ C'est un mécanisme cellulaire très dynamique.

Les deux principales voies d'endocytose utilisées par la cellule sont la phagocytose et la pinocytose, qui comprend l'endocytose clathrine-dépendante, cavéole-dépendante, clathrine/cavéole indépendantes et la macropinocytose.

La *phagocytose* se fait essentiellement dans les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques.¹⁶⁵ L'internalisation des grosses particules est facilitée par la présence des phagosomes, vésicules endocytées supérieures à 250 nm.

La *pinocytose* est présente chez tous les types de cellules et favorise l'internalisation des petites particules. Leur taille va influencer le mode d'internalisation par clathrine ou par cavéoline. Bien que la voie d'endocytose par la clathrine soit assez complexe et implique la signalisation intercellulaire, le recyclage de la membrane et l'absorption des éléments nutritifs, elle reste la voie la plus étudiée.¹⁶⁶

Dans les cellules, le type d'internalisation dépend de la taille des nanoparticules mais également de leur forme ou de leurs charges en surface. De manière cruciale, cela influence le devenir et la localisation intracellulaire de la particule. Ainsi, il est important de comprendre le processus d'internalisation des nanoparticules chargées en principes actifs afin d'élaborer des stratégies fiables et contrôler l'absorption cellulaire des nano-objets dans l'espoir d'améliorer l'effet thérapeutique.¹⁶⁴

3.5 Toxicité des nanovecteurs

Depuis plusieurs années, le développement des nanotechnologies ainsi que le manque d'informations sur les effets négatifs sur la santé et l'environnement ont poussé les recherches sur la toxicologie, notamment des nanoparticules dans le domaine de la santé.¹⁶⁷ La nanotoxicologie est l'étude des interactions entre les nanostructures et les systèmes biologiques afin de comprendre la relation entre les propriétés physico-chimiques des nanomatériaux et les réponses biologiques toxiques.

Plusieurs aspects de l'architecture et de la composition des nanoparticules peuvent influencer leur toxicité. Les facteurs les plus importants sont la taille, la surface de la particule, la nature des composés chimiques et le dosage.

En effet, une réduction en taille de particules équivaut à une augmentation de l'aire de surface par volume, ce qui va augmenter le nombre de molécules qui va pouvoir s'attacher à sa surface et améliorer sa réactivité, mais aussi augmenter ses effets toxiques. Les nanoparticules atteignent la circulation sanguine et se propagent ensuite à travers les tissus. En effet, une étude a montré que 33% des particules de 50 nm, 26% des particules de 100 nm et 10% des particules de 500 nm ont été découverts dans les tissus muqueux et lymphatiques de l'intestin.¹⁶⁷ Les particules inférieures à 100 nm possèdent des propriétés mécaniques, électriques, et chimiques essentielles pour la vectorisation mais auront tendance à avoir plus d'effets toxiques que les plus grosses. En effet, elles vont pouvoir franchir les barrières mécaniques naturelles du corps humain par différentes voies et induire le déclenchement des réactions immunitaires.¹⁶⁸ Il faut également que le vecteur ait une taille appropriée qui ne dépasse pas la taille de pores des vaisseaux (généralement entre 380 et 780 nm) mais en même temps que sa taille ne soit pas trop petite car les petites molécules peuvent se redistribuer dans la circulation sanguine par diffusion et/ou convection et sont éliminés généralement par voie rénale.¹⁶⁹

De même, lorsque la surface d'une particule est modifiée chimiquement pour y greffer un ligand par exemple, les effets biologiques sont altérés et il est donc possible d'introduire de la toxicité. Par exemple, dans le cas de particules de quartz où il a été montré que la modification de surface altérait leur pénétration dans les cellules épithéliales de poumons mais induisait également des dommages au niveau de l'ADN soit une plus grande toxicité.¹⁷⁰ L'hydrophobicité de la surface de la nanoparticule est également importante pour leur absorption au niveau du mucus intestinal. Effectivement, une étude a montré que les nanoparticules avec une surface hydrophobe étaient beaucoup plus éliminées que celles avec une surface hydrophile.¹⁷¹

La composition des nanoparticules est également décisive afin d'éviter des effets toxiques. Elles peuvent par exemple, réagir avec le fer présent dans le corps et ainsi

amplifier la production d'espèces réactives oxygénées (ROS) dans le système cellulaire.¹⁷² Il est aussi nécessaire d'utiliser des composants biocompatibles.

De manière générale, même si la nanoparticule en elle-même respecte les critères de taille, de chimie de surface et des bons composants, qui ne vont pas induire de toxicité apparente, un sur dosage peut être dangereux voire crucial pour le patient.

3.6 Nanoparticules pour le ciblage actif

De nombreux progrès réalisés au cours des vingt dernières années dans les domaines de la biologie moléculaire, cellulaire et de la génomique ont contribué à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le phénomène tumoral. Cela a permis le développement de nouvelles molécules ciblant des anomalies spécifiques des cellules cancéreuses.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'avantage des nanoparticules et du ciblage actif est qu'il est possible de distribuer le principe actif encapsulé au niveau des cellules tumorales dû à la présence d'un agent de ciblage en surface qui va reconnaître spécifiquement son récepteur à la surface de la cellule tumorale. Il est également possible, grâce à cette technique de ciblage, de simplement « bloquer » le récepteur grâce à la liaison avec son ligand qui jouera le rôle d'antagoniste et perturbera ainsi les différentes voies de signalisation.

Comme énoncé préalablement, il existe plusieurs types de nanoparticules en fonction de leur composition (lipides, polymères, etc.) et leur utilisation. Dû aux grands nombres de nanovecteurs différents reportés dans la littérature, cette partie ne présentera que des nanoparticules fonctionnalisées en surface pour du ciblage actif et plus particulièrement celles composées de Poly(triméthylène carbonate)-*b*-Poly(éthylène glycol) PTMC-*b*-PEG qui ont été au cœur de notre étude.

3.6.1 Nanoparticules multivalentes

A l'heure actuelle, plusieurs grandes approches de ciblage actif ont été développées afin de bloquer les différentes voies de signalisation impliquées dans le développement et la progression tumorale. Les cibles peuvent être intracellulaires comme les kinases ou transférases ou extracellulaires comme les récepteurs membranaires ou antigènes à la surface des cellules cancéreuses.

Quelques exemples de nanoparticules multivalentes sont répertoriés dans le Tableau 3 ci-dessous.

| Nanoparticules | Taille (nm) | Cible | Agent de ciblage | % molaire de fonctionnalisation | IC50 (nM) | Réf |
|------------------------------------|-------------|----------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------|-----|
| Nanoparticules Inorganiques | | | | | | |
| Tf-PEG-AuNPs | 80 | Récepteur de Tf : TfRs | Glycoprotéine : Tf | 144 Tf/particules | 0,03 | 173 |
| AuS-U11 | 120 | uPAR | Peptide : U11 | 100 | 1300 | 174 |
| Nanoparticules polymères | | | | | | |
| PEG-p(Asp-Hyd-ADR) | 65 | TβR-1 | Molécule organique : LY364947 | 100 | 59 | 175 |
| FPF-PT | 50 | Récepteur de folate | Acide folique | 10 | 1,5 | 176 |
| PAMAM-PVL-PEG-OCH3/KE108/Cy5 | 55 | SSTR 1-5 | Peptide: KE108 | 15 | 0,6-2,6 | 156 |
| Nanoparticules lipidiques | | | | | | |
| IA-NP- ⁹⁰ Y | 60-65 | α _v β ₃ et Flk-1 | Molécule organique : IA | 10 | 40 | 177 |

Tableau 3 : Tableau représentant quelques exemples de systèmes multivalents

Les nanoparticules utilisées pour du ciblage actif peuvent être de différentes compositions chimiques (organiques ou inorganiques) et présentent en surface des agents de ciblage de différentes natures (peptide, molécule synthétique). Le taux de fonctionnalisation de ces agents diffère également. Cette multivalence est un grand point

fort des nanoparticules et permet d'adapter la fonctionnalisation de surface en fonction de l'utilisation et de l'affinité pour la cible.

Ce tableau n'est pas exhaustif de toutes les nanoparticules étudiées dans des applications de ciblage actif, mais la grande diversité de ces vecteurs (taille, morphologies, composition, multivalence) en font des systèmes prometteurs.

En 2013, on comptait 13 nanoparticules fonctionnalisées au niveau des essais cliniques dont 2 à base de polymères qui ciblent les tumeurs.¹⁷⁸

BIND-014, nanoparticule polymère de 50 nm développée par BIND Biosciences pour le traitement des tumeurs solides, est composée d'un cœur hydrophobe de Poly(D,L-lactide) (PLA) dans lequel le docetaxel est encapsulé et une couronne de PEG. La surface est fonctionnalisée par une petite molécule appelée ACUPA (S,S-2-[3-[5-amino-1-carboxypentyl]-ureido]-pentanedioic acid) qui va cibler spécifiquement l'antigène PSMA exprimés au niveau des cellules tumorales de prostate avec un IC50 d'environ 500 nM. Les études de pharmacocinétique et de biodistribution sur souris montrent que ces nanoparticules ont un temps de demi-vie de 20 heures dans le sang, une faible accumulation dans le foie et une augmentation de la suppression de croissance tumorale.¹⁷⁸

CALAA-01, développé par Calando Pharmaceuticals, est une nanoparticule de polymère également à base de PEG délivrant siRNA et fonctionnalisée en surface par la protéine transferrine qui permet de cibler son récepteur surexprimé sur les cellules cancéreuses.¹⁷⁹ Dans le cas du cancer du cou et de la tête chez la souris, ce système ciblé a permis de réduire significativement la croissance tumorale.

Ces derniers exemples démontrent que les nanoparticules fonctionnalisées par des ligands pour une délivrance contrôlée de médicaments par exemple sont prometteuses puisque des essais cliniques sont en cours pour certains d'entre eux.

3.6.2 Nanoparticules à base de copolymères à blocs PTMC-*b*-PEG

Les polycarbonates aliphatiques, dont le Poly(triméthylène carbonate) (PTMC), sont des matériaux biodégradables et sont très étudiés pour des applications pharmaceutiques dû également à leur faible toxicité et à leur biocompatibilité.¹⁸⁰

Le comportement de dégradation unique du PTMC, tel que la résistance à l'hydrolyse non enzymatique, la génération de produits de dégradation non acides et la dégradation enzymatique avec un mécanisme d'érosion de surface¹⁸¹ ouvre une nouvelle fenêtre pour des applications dans des dispositifs biomédicaux jamais réalisés avec des polyesters aliphatiques. En effet, le PTMC a une dégradation beaucoup plus lente que les polyesters aliphatiques tels que le poly(L-lactide) (PLLA) par exemple qui vont être érodés en masse par hydrolyse.

Le PTMC est connu comme étant un polymère amorphe mais il a été montré qu'à de faibles masses molaires ($MW < 12\ 000\ \text{g/mol}$), il pouvait cristalliser.¹⁸² Cette nature semi-cristalline joue un rôle important dans les propriétés membranaires des vésicules. En effet, il a été démontré que le changement de conformation du PTMC avec la température, modifiait les propriétés de la membrane et impliquait donc une variation réversible de taille de vésicules.¹⁸³

Le PTMC est considéré comme biocompatible, cependant de multiples modifications sont requises pour l'utilisation du PTMC comme biovecteur. Comme le PTMC est un polymère hydrophobe, il va avoir tendance à adsorber les protéines et les cellules de manière non spécifique, c'est pourquoi la conjugaison avec un polymère hydrophile augmente l'hydratation ce qui supprime l'adhérence des protéines et des cellules à l'interface.

Les copolymères à blocs amphiphiles à base de PTMC ainsi formés, sont très largement utilisés dans de nombreuses applications médicales mais ce sont ceux constitués d'une couronne hydrophile de Polyéthylène glycol (PEG) qui sont le plus utilisés pour du ciblage actif. Certains de ces systèmes sont résumés dans le Tableau 4 ci-dessous.

| Nanoparticules | Taille (nm) | Ligand | Ligand en surface (% molaire) | Cible | Principe actif | Tumeur | Réf |
|----------------|-------------|------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------|------------------|-----|
| Polymersome | 80 | Peptide GE11 | 10 | EGFR | Doxorubicine | Cancer du foie | 184 |
| Polymersome | 100-120 | Peptide cNGQ | 20 | Integrine $\alpha_3\beta_1$ | Doxorubicine | Cancer du poumon | 185 |
| Micelle | 75 | Peptide CKGHPG GPQAsp ₈ | 100 | Enzyme CTSK | Doxorubicine | Métastase des os | 186 |
| Micelle | 50 | Peptide RGD | 10 | Integrine $\alpha_3\beta_1$ | Paclitaxel | Tumeurs solides | 187 |

*Tableau 4 : Quelques exemples de nanoparticules PTMC-*b*-PEG fonctionnalisées pour cibler des récepteurs de tumeurs*

Ces systèmes de même composition chimique, diffèrent en morphologie (micelle et polymersome), en taille (entre 50 et 120 nm) et en taux de fonctionnalisation. Ces études ont validé que la présence du ligand en surface permettait une meilleure délivrance de principes actifs contrôlée dans le temps et un taux de survie augmenté.

L'utilisation des nanoparticules de type PTMC-*b*-PEG pour une délivrance contrôlée de médicament grâce à un ciblage actif s'est avérée efficace et valide ces nanoparticules pour de futures applications dans le domaine du biomédical.

Cependant, lorsque l'on parle de ciblage actif et d'affinité ligand-récepteur, la multivalence devient un critère essentiel. En effet, cette dernière, différente dans chaque cas, va être déterminée par plusieurs paramètres. L'affinité du ligand pour son récepteur, la nature ou la taille de la nanoparticule jouent un rôle crucial dans la détermination de ce pourcentage. Effectivement, le bon ratio permettra une bonne disponibilité du ligand pour le récepteur tout en apportant la meilleure activité biologique, c'est pourquoi il est nécessaire de prendre ce paramètre en compte dans la fonctionnalité des nanoparticules.

Conclusion

Au cours de ces trois parties, nous avons vu les chiffres importants de cancers qui augmentent d'années en années dans le monde et notamment les problèmes liés au manque de diagnostic précoce et de traitements efficaces dans certains cas. Effectivement, si nous prenons le cas de la chimiothérapie, il y a une absence de spécificité de l'agent thérapeutique qui implique que la dose fournie n'est pas la dose dont le patient a besoin mais celle que son corps peut tolérer et donc une efficacité minimale.

Nous avons également vu que l'utilisation de nanoparticules apportait de nombreux avantages comme une meilleure pharmacocinétique, pharmacodynamique, biodisponibilité et multivalence lors de ciblage actif ou dans le cas de délivrance contrôlée de médicaments.

Nous avons enfin observé que le récepteur CXCR3-A était fortement impliqué dans la progression tumorale (notamment dans le cas des glioblastomes), que le SCH546738 avait une très bonne affinité de liaison à l'échelle du nanomolaire (2,2 nM) et qu'il pouvait bloquer la migration en déplaçant les agonistes naturels de CXCR3.

C'est pour tout cela que nous avons décidé de travailler sur des nanoparticules de PTMC-*b*-PEG fonctionnalisées par le SCH546738, afin de cibler le récepteur CXCR3-A. Les différentes étapes du projet sont décrites dans les chapitres suivants.

Références

- (1) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646–674.
- (2) Ligue contre le cancer | Association de lutte contre le Cancer <https://www.ligue-cancer.net/> (accessed Jan 9, 2018).
- (3) La Ligue contre le cancer. Les Tumeurs Cérébrales et Du Système Nerveux Central. 2009.
- (4) Ostrom, Q. T.; Gittleman, H.; Fulop, J.; Liu, M.; Blanda, R.; Kromer, C.; Wolinsky, Y.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J. S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-Oncol.* **2015**, *17* (Suppl 4), iv1–iv62.
- (5) Umans, R. A.; Sontheimer, H. Combating Malignant Astrocytes: Strategies Mitigating Tumor Invasion. *Neurosci. Res.* **2018**, *126*, 22–30.
- (6) Stupp, R.; Mason, W. P.; Van Den Bent, M. J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M. J.; Belanger, K.; Brandes, A. A.; Marosi, C.; Bogdahn, U. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352* (10), 987–996.
- (7) Stupp, R.; Gander, M.; Leyvraz, S.; Newlands, E. Current and Future Developments in the Use of Temozolomide for the Treatment of Brain Tumours. *Lancet Oncol.* **2001**, *2* (9), 552–560.
- (8) Sehgal, A.; Keener, C.; Boynton, A. L.; Warrick, J.; Murphy, G. P. CXCR-4, a Chemokine Receptor, Is Overexpressed in and Required for Proliferation of Glioblastoma Tumor Cells. *J. Surg. Oncol.* **1998**, *69* (2), 99–104.
- (9) Rubin, J. B.; Kung, A. L.; Klein, R. S.; Chan, J. A.; Sun, Y.; Schmidt, K.; Kieran, M. W.; Luster, A. D.; Segal, R. A. A Small-Molecule Antagonist of CXCR4 Inhibits Intracranial Growth of Primary Brain Tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (23), 13513–13518.
- (10) Sharma, I.; Siraj, F.; Sharma, K. C.; Singh, A. Immunohistochemical Expression of Chemokine Receptor CXCR3 and Its Ligand CXCL10 in Low-Grade Astrocytomas and Glioblastoma Multiforme: A Tissue Microarray-Based Comparison. *J Can Res Ther* **2016**, *12* (2), 793–797.
- (11) Charo, I. F.; Ransohoff, R. M. The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *354* (6), 610–621.
- (12) Baggiolini, M.; Dewald, B.; Moser, B. Human Chemokines: An Update. *Annu. Rev. Immunol.* **1997**, *15* (1), 675–705.
- (13) Bestebroer, J.; de Haas, C. J. C.; van Strijp, J. A. G. How Microorganisms Avoid Phagocyte Attraction. *FEMS Microbiol. Rev.* **2010**, *34* (3), 395–414.
- (14) *Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux*; John Libbey Eurotext, 2007.
- (15) Mbouiti, N. Facteurs Plasmatiques Libérés Sous l'effet Des Cristaux d'urate Monosodique, Université Laval, 2008.
- (16) Cartier, L.; Hartley, O.; Dubois-Dauphin, M.; Krause, K.-H. Chemokine Receptors in the Central Nervous System: Role in Brain Inflammation and Neurodegenerative Diseases. *Brain Res. Rev.* **2005**, *48* (1), 16–42.
- (17) Biber, K.; Zuurman, M. W.; Dijkstra, I. M.; Boddeke, H. W. Chemokines in the Brain: Neuroimmunology and Beyond. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2002**, *2* (1), 63–68.
- (18) Krieg, C.; Boyman, O. The Role of Chemokines in Cancer Immune Surveillance by the Adaptive Immune System. *Semin. Cancer Biol.* **2009**, *19* (2), 76–83.
- (19) Vandercappellen, J.; Van Damme, J.; Struyf, S. The Role of CXC Chemokines and Their Receptors in Cancer. *Cancer Lett.* **2008**, *267* (2), 226–244.

- (20) Keeley, E. C.; Mehrad, B.; Strieter, R. M. CXC Chemokines in Cancer Angiogenesis and Metastases. In *Advances in Cancer Research*; Elsevier, 2010; Vol. 106, pp 91–111.
- (21) Strieter, R. M.; Burdick, M. D.; Mestas, J.; Gomperts, B.; Keane, M. P.; Belperio, J. A. Cancer CXC Chemokine Networks and Tumour Angiogenesis. *Eur. J. Cancer* **2006**, *42* (6), 768–778.
- (22) Maione, T. E.; Gray, G. S.; Petro, J.; Hunt, A. J.; Donner, A. L.; Bauer, S. I.; Carson, H. F.; Sharpe, R. J. Inhibition of Angiogenesis by Recombinant Human Platelet Factor-4 and Related Peptides. *Science* **1990**, *247* (4938), 77–79.
- (23) Shellenberger, T. D.; Wang, M.; Gujrati, M.; Jayakumar, A.; Strieter, R. M.; Burdick, M. D.; Ioannides, C. G.; Efferson, C. L.; El-Naggar, A. K.; Roberts, D.; et al. BRAK/CXCL14 Is a Potent Inhibitor of Angiogenesis and a Chemotactic Factor for Immature Dendritic Cells. *Cancer Res.* **2004**, *64* (22), 8262–8270.
- (24) Bagheri, V.; Hassanshahi, G.; Mirzaee, V.; Khorramdelazad, H. CXC Chemokine CXCL12 Tissue Expression and Circulating Levels in Peptic Ulcer Patients with Helicobacter Pylori Infection. *Cytokine* **2016**, *85*, 1–4.
- (25) Berger, E. A.; Murphy, P. M.; Farber, J. M. Chemokine Receptors as HIV-1 Coreceptors: Roles in Viral Entry, Tropism, and Disease. *Annu. Rev. Immunol.* **1999**, *17* (1), 657–700.
- (26) Zhang, J.; Noguchi, E.; Migita, O.; Yokouchi, Y.; Nakayama, J.; Shibasaki, M.; Arinami, T. Association of a Haplotype Block Spanning SDAD1 Gene and CXC Chemokine Genes with Allergic Rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2005**, *115* (3), 548–554.
- (27) Rivas-Fuentes, S.; Salgado-Aguayo, A.; Pertuz Belloso, S.; Gorocica Rosete, P.; Alvarado-Vásquez, N.; Aquino-Jarquín, G. Role of Chemokines in Non-Small Cell Lung Cancer: Angiogenesis and Inflammation. *J. Cancer* **2015**, *6* (10), 938–952.
- (28) Folkman, J. Tumor Angiogenesis Factor. *Cancer Res.* **1974**, *34* (8), 2109–2113.
- (29) Folkman, J.; Merler, E.; Abernathy, C.; Williams, G. Isolation of a Tumor Factor Responsible for Angiogenesis. *J. Exp. Med.* **1971**, *133* (2), 275–288.
- (30) Maslianko, R. P.; Shekel, V. F. Tumor Angiogenesis. *Науковий Вісник Львівського Національного Університету Ветеринарної Медицини Та Біотехнологій Імені СЗ Жицького* **2014**, *16* (2–1).
- (31) Owen, J. D.; Strieter, R.; Burdick, M.; Haghnegahdar, H.; Nanney, L.; Shattuck-Brandt, R.; Richmond, A. Enhanced Tumor-Forming Capacity for Immortalized Melanocytes Expressing Melanoma Growth Stimulatory Activity/Growth-Regulated Cytokine β and γ Proteins. *Int. J. Cancer* **1997**, *73* (1), 94–103.
- (32) Takamori, H.; Oades, Z. G.; Hoch, R. C.; Burger, M.; Schraufstatter, I. U. Autocrine Growth Effect of IL-8 and GRO α on a Human Pancreatic Cancer Cell Line, Capan-1. *Pancreas* **2000**, *21* (1), 52–56.
- (33) Yoneda, J.; Kuniyasu, H.; Price, J. E.; Bucana, C. D.; Fidler, I. J.; Crispens, M. A. Expression of Angiogenesis-Related Genes and Progression of Human Ovarian Carcinomas in Nude Mice. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90* (6), 447–454.
- (34) Hollmann, M. W.; Strumper, D.; Herroeder, S.; Durieux, M. E. Receptors, G Proteins, and Their Interactions. *Anesthesiol. J. Am. Soc. Anesthesiol.* **2005**, *103* (5), 1066–1078.
- (35) Allen, S. J.; Crown, S. E.; Handel, T. M. Chemokine:Receptor Structure, Interactions, and Antagonism. *Annu. Rev. Immunol.* **2007**, *25* (1), 787–820.
- (36) Clark-Lewis, I.; Mattioli, I.; Gong, J.-H.; Loetscher, P. Structure-Function Relationship between the Human Chemokine Receptor CXCR3 and Its Ligands. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (1), 289–295.
- (37) Lacotte, S.; Brun, S.; Muller, S.; Dumortier, H. CXCR3, Inflammation, and Autoimmune Diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1173* (1), 310–317.

- (38) Fredriksson, R.; Lagerström, M. C.; Lundin, L.-G.; Schiöth, H. B. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63* (6), 1256–1272.
- (39) Mantovani, A. The Chemokine System: Redundancy for Robust Outputs. *Immunol. Today* **1999**, *20* (6), 254–257.
- (40) Combadière, B.; Combadière, C.; Deterre, P. Les Chimiokines : Un Réseau Sophistiqué de Guidage Cellulaire. *médecine/sciences* **2007**, *23* (2), 173–179.
- (41) Mehrad, B.; Keane, M. P.; Strieter, R. M. Chemokines as Mediators of Angiogenesis. *Thromb. Haemost.* **2007**.
- (42) Addison, C. L.; Daniel, T. O.; Burdick, M. D.; Liu, H.; Ehlert, J. E.; Xue, Y. Y.; Buechi, L.; Walz, A.; Richmond, A.; Strieter, R. M. The CXC Chemokine Receptor 2, CXCR2, Is the Putative Receptor for ELR+ CXC Chemokine-Induced Angiogenic Activity. *J. Immunol.* **2000**, *165* (9), 5269–5277.
- (43) Loetscher, P.; Pellegrino, A.; Gong, J.-H.; Mattioli, I.; Loetscher, M.; Bardi, G.; Baggiolini, M.; Clark-Lewis, I. The Ligands of CXC Chemokine Receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, Are Natural Antagonists for CCR3. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (5), 2986–2991.
- (44) Flower, D. R. Modelling G-Protein-Coupled Receptors for Drug Design. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Rev. Biomembr.* **1999**, *1422* (3), 207–234.
- (45) Müller, A.; Homey, B.; Soto, H.; Ge, N.; Catron, D.; Buchanan, M. E.; McClanahan, T.; Murphy, E.; Yuan, W.; Wagner, S. N.; et al. Involvement of Chemokine Receptors in Breast Cancer Metastasis. *Nature* **2001**, *410* (6824), 50–56.
- (46) Taichman, R. S.; Cooper, C.; Keller, E. T.; Pienta, K. J.; Taichman, N. S.; McCauley, L. K. Use of the Stromal Cell-Derived Factor-1/CXCR4 Pathway in Prostate Cancer Metastasis to Bone. *Cancer Res.* **2002**, *62* (6), 1832–1837.
- (47) Zeelenberg, I. S.; Stalle, L. R.-V.; Roos, E. The Chemokine Receptor CXCR4 Is Required for Outgrowth of Colon Carcinoma Micrometastases. *Cancer Res.* **2003**, *63* (13), 3833–3839.
- (48) Poty, S.; Désogère, P.; Goze, C.; Boschetti, F.; D’huys, T.; Schols, D.; Cawthorne, C.; Archibald, S. J.; Maëcke, H. R.; Denat, F. New AMD3100 Derivatives for CXCR4 Chemokine Receptor Targeted Molecular Imaging Studies: Synthesis, Anti-HIV-1 Evaluation and Binding Affinities. *Dalton Trans* **2015**, *44* (11), 5004–5016.
- (49) Takanami, I. Overexpression of CCR7 mRNA in Nonsmall Cell Lung Cancer: Correlation with Lymph Node Metastasis. *Int. J. Cancer* **2003**, *105* (2), 186–189.
- (50) Mashino, K.; Sadanaga, N.; Yamaguchi, H.; Tanaka, F.; Ohta, M.; Shibuta, K.; Inoue, H.; Mori, M. Expression of Chemokine Receptor CCR7 Is Associated with Lymph Node Metastasis of Gastric Carcinoma. *Cancer Res.* **2002**, *62* (10), 2937–2941.
- (51) Bajetto, A.; Barbieri, F.; Dorcaratto, A.; Barbero, S.; Daga, A.; Porcile, C.; Ravetti, J. L.; Zona, G.; Spaziante, R.; Corte, G.; et al. Expression of CXC Chemokine Receptors 1–5 and Their Ligands in Human Glioma Tissues: Role of CXCR4 and SDF1 in Glioma Cell Proliferation and Migration. *Neurochem. Int.* **2006**, *49* (5), 423–432.
- (52) Murphy. Nonapical and Cytoplasmic Expression of Interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 Correlates with Cell Proliferation and Microvessel Density in Prostate Cancer <http://sci-hub.cc/10.1158/1078-0432.ccr-04-1518> (accessed Aug 18, 2017).
- (53) Zhu, Y. M.; Bagstaff, S. M.; Woll, P. J. Production and Upregulation of Granulocyte Chemotactic Protein-2/CXCL6 by IL-1 β and Hypoxia in Small Cell Lung Cancer. *Br. J. Cancer* **2006**, *94* (12), 1936–1941.
- (54) Mestas, J.; Burdick, M. D.; Reckamp, K.; Pantuck, A.; Figlin, R. A.; Strieter, R. M. The Role of CXCR2/CXCR2 Ligand Biological Axis in Renal Cell Carcinoma. *J. Immunol.* **2005**, *175* (8), 5351–5357.

- (55) Boyé, K.; Pujol, N.; D Alves, I.; Chen, Y.-P.; Daubon, T.; Lee, Y.-Z.; Dedieu, S.; Constantin, M.; Bello, L.; Rossi, M.; et al. The Role of CXCR3/LRP1 Cross-Talk in the Invasion of Primary Brain Tumors. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1).
- (56) Datta, D.; Contreras, A. G.; Grimm, M.; Waaga-Gasser, A. M.; Briscoe, D. M.; Pal, S. Calcineurin Inhibitors Modulate CXCR3 Splice Variant Expression and Mediate Renal Cancer Progression. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2008**, *19* (12), 2437–2446.
- (57) Glaser, J.; Gonzalez, R.; Perreau, V. M.; Cotman, C. W.; Keirstead, H. S. Neutralization of the Chemokine CXCL10 Enhances Tissue Sparing and Angiogenesis Following Spinal Cord Injury. *J. Neurosci. Res.* **2004**, *77* (5), 701–708.
- (58) Kruizinga, R. C.; Bestebroer, J.; Berghuis, P.; de Haas, C. J.; Links, T. P.; de Vries, E. G.; Walenkamp, A. M. Role of Chemokines and Their Receptors in Cancer. *Curr. Pharm. Des.* **2009**, *15* (29), 3396–3416.
- (59) Proudfoot, A. E.; Handel, T. M.; Johnson, Z.; Lau, E. K.; LiWang, P.; Clark-Lewis, I.; Borlat, F.; Wells, T. N.; Kosco-Vilbois, M. H. Glycosaminoglycan Binding and Oligomerization Are Essential for the in Vivo Activity of Certain Chemokines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (4), 1885–1890.
- (60) Watson, J. B.; Getzler, S. B.; Mosher, D. F. Platelet Factor 4 Modulates the Mitogenic Activity of Basic Fibroblast Growth Factor. *J. Clin. Invest.* **1994**, *94* (1), 261.
- (61) Gengrinovitch, S.; Greenberg, S. M.; Cohen, T.; Gitay-Goren, H.; Rockwell, P.; Maione, T. E.; Levi, B.-Z.; Neufeld, G. Platelet Factor-4 Inhibits the Mitogenic Activity of VEGF121 and VEGF165 Using Several Concurrent Mechanisms. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (25), 15059–15065.
- (62) Li. The Molecule Pages database <http://www.nature.com.docelec.u-bordeaux.fr/nature/journal/v420/n6916/pdf/nature01307.pdf> (accessed Aug 3, 2017).
- (63) 1-Introduction : l'organisation cellulaire 2- Principes de transduction du signal 3- Les seconds messagers 4- Principaux récepteurs aux signaux - PDF <http://docplayer.fr/59242456-1-introduction-l-organisation-cellulaire-2-principes-de-transduction-du-signal-3-les-seonds-messagers-4-principaux-recepteurs-aux-signaux.html> (accessed May 22, 2018).
- (64) Knall. G-Protein Regulatory Pathways: Rocketing into the Twenty-first Century <http://moscow.sci-hub.cc/c76e055f700721dd1d3779c7fe96f81d/knall1998.pdf> (accessed Aug 9, 2017).
- (65) Maurel, D. Oligomérisation des récepteurs couplés aux protéines G: deux ou plus? Application des technologies de FRET en temps résolu au cas du récepteur GABAB.
- (66) Gong, J.-H.; Clark-Lewis, I. Antagonists of Monocyte Chemoattractant Protein 1 Identified by Modification of Functionally Critical NH₂-Terminal Residues. *J. Exp. Med.* **1995**, *181* (2), 631–640.
- (67) Karnik, S.; Gogonea, C.; Patil, S.; Saad, Y.; Takezako, T. Activation of G-Protein-Coupled Receptors: A Common Molecular Mechanism. *Trends Endocrinol. Metab.* **2003**, *14* (9), 431–437.
- (68) Colvin, R. A.; Campanella, G. S. V.; Manice, L. A.; Luster, A. D. CXCR3 Requires Tyrosine Sulfation for Ligand Binding and a Second Extracellular Loop Arginine Residue for Ligand-Induced Chemotaxis. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26* (15), 5838–5849.
- (69) Sallusto, F.; Lenig, D.; Mackay, C. R.; Lanzavecchia, A. Flexible Programs of Chemokine Receptor Expression on Human Polarized T Helper 1 and 2 Lymphocytes. *J. Exp. Med.* **1998**, *187* (6), 875–883.
- (70) Loetscher, M.; Gerber, B.; Loetscher, P.; Jones, S. A.; Piali, L.; Clark-Lewis, I.; Baggiolini, M.; Moser, B. Chemokine Receptor Specific for IP10 and Mig: Structure, Function, and Expression in Activated T-Lymphocytes. *J. Exp. Med.* **1996**, *184* (3), 963–969.
- (71) Penna, G.; Sozzani, S.; Adorini, L. Cutting Edge: Selective Usage of Chemokine Receptors by Plasmacytoid Dendritic Cells. *J. Immunol.* **2001**, *167* (4), 1862–1866.

- (72) Janatpour, M. J.; Hudak, S.; Sathe, M.; Sedgwick, J. D.; McEvoy, L. M. Tumor Necrosis Factor-dependent Segmental Control of MIG Expression by High Endothelial Venules in Inflamed Lymph Nodes Regulates Monocyte Recruitment. *J. Exp. Med.* **2001**, *194* (9), 1375–1384.
- (73) Lasagni, L.; Francalanci, M.; Annunziato, F.; Lazzeri, E.; Giannini, S.; Cosmi, L.; Sagrinati, C.; Mazzinghi, B.; Orlando, C.; Maggi, E.; et al. An Alternatively Spliced Variant of CXCR3 Mediates the Inhibition of Endothelial Cell Growth Induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and Acts as Functional Receptor for Platelet Factor 4. *J. Exp. Med.* **2003**, *197* (11), 1537–1549.
- (74) Billottet, C.; Quemener, C.; Bikfalvi, A. CXCR3, a Double-Edged Sword in Tumor Progression and Angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **2013**, *1836* (2), 287–295.
- (75) Ehlert, J. E.; Addison, C. A.; Burdick, M. D.; Kunkel, S. L.; Strieter, R. M. Identification and Partial Characterization of a Variant of Human CXCR3 Generated by Posttranscriptional Exon Skipping. *J. Immunol.* **2004**, *173* (10), 6234–6240.
- (76) Tokunaga, R.; Zhang, W.; Naseem, M.; Puccini, A.; Berger, M. D.; Soni, S.; McSkane, M.; Baba, H.; Lenz, H.-J. CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 Axis for Immune Activation – A Target for Novel Cancer Therapy. *Cancer Treat. Rev.* **2018**, *63*, 40–47.
- (77) Vandercappellen, J.; Van Damme, J.; Struyf, S. The Role of the CXC Chemokines Platelet Factor-4 (CXCL4/PF-4) and Its Variant (CXCL4L1/PF-4var) in Inflammation, Angiogenesis and Cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2011**, *22* (1), 1–18.
- (78) Xanthou, G.; Williams, T. J.; Pease, J. E. Molecular Characterization of the Chemokine Receptor CXCR3: Evidence for the Involvement of Distinct Extracellular Domains in a Multi-Step Model of Ligand Binding and Receptor Activation. *Eur. J. Immunol.* **2003**, *33* (10), 2927–2936.
- (79) Cambien, B.; Karimjee, B. F.; Richard-Fiardo, P.; Bziouech, H.; Barthel, R.; Millet, M. A.; Martini, V.; Birnbaum, D.; Scoazec, J. Y.; Abello, J.; et al. Organ-Specific Inhibition of Metastatic Colon Carcinoma by CXCR3 Antagonism. *Br. J. Cancer* **2009**, *100* (11), 1755.
- (80) Deutsch, E.; Johnson, S. A.; Seegers, W. H. Differentiation of Certain Platelet Factors Related to Blood Coagulation. *Circ. Res.* **1955**, *3* (1), 110–115.
- (81) Dudek, A. Z. Platelet Factor 4 Promotes Adhesion of Hematopoietic Progenitor Cells and Binds IL-8: Novel Mechanisms for Modulation of Hematopoiesis. *Blood* **2003**, *101* (>12), 4687–4694.
- (82) Piepkorn, M. W. Dansyl (5-Dimethylaminonaphthalene-1-Sulphonyl)-Heparin Binds Antithrombin III and Platelet Factor 4 at Separate Sites. *Biochem. J.* **1981**, *196* (2), 649–651.
- (83) Slungaard, A. Platelet Factor 4: A Chemokine Enigma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2005**, *37* (6), 1162–1167.
- (84) Green, C. J.; Charles, R. S.; Edwards, B. F.; Johnson, P. H. Identification and Characterization of PF4var1, a Human Gene Variant of Platelet Factor 4. *Mol. Cell Biol.* **1989**, *9* (4), 1445–1451.
- (85) Dubrac, A.; Quemener, C.; Lacazette, E.; Lopez, F.; Zanibellato, C.; Wu, W.-G.; Bikfalvi, A.; Prats, H. Functional Divergence between 2 Chemokines Is Conferred by Single Amino Acid Change. *Blood* **2010**, *116* (22), 4703–4711.
- (86) Struyf, S.; Burdick, M. D.; Peeters, E.; Van den Broeck, K.; Dillen, C.; Proost, P.; Van Damme, J.; Strieter, R. M. Platelet Factor-4 Variant Chemokine CXCL4L1 Inhibits Melanoma and Lung Carcinoma Growth and Metastasis by Preventing Angiogenesis. *Cancer Res.* **2007**, *67* (12), 5940–5948.
- (87) Lasagni, L.; Grepin, R.; Mazzinghi, B.; Lazzeri, E.; Meini, C.; Sagrinati, C.; Liotta, F.; Frosali, F.; Ronconi, E.; Alain-Courtois, N.; et al. PF-4/CXCL4 and CXCL4L1 Exhibit Distinct Subcellular Localization and a Differentially Regulated Mechanism of Secretion. *Blood* **2007**, *109* (10), 4127–4134.
- (88) Struyf, S.; Salogni, L.; Burdick, M. D.; Vandercappellen, J.; Gouwy, M.; Noppen, S.; Proost, P.; Opendakker, G.; Parmentier, M.; Gerard, C.; et al. Angiostatic and Chemotactic Activities of the

- CXC Chemokine CXCL4L1 (Platelet Factor-4 Variant) Are Mediated by CXCR3. *Blood* **2011**, *117* (2), 480–488.
- (89) Patel, D. D.; Zachariah, J. P.; Whichard, L. P. CXCR3 and CCR5 Ligands in Rheumatoid Arthritis Synovium. *Clin. Immunol.* **2001**, *98* (1), 39–45.
- (90) Szczuciński, A.; Losy, J. Chemokines and Chemokine Receptors in Multiple Sclerosis. Potential Targets for New Therapies. *Acta Neurol. Scand.* **2007**, *115* (3), 137–146.
- (91) Hancock, W. W.; Lu, B.; Gao, W.; Csizmadia, V.; Faia, K.; King, J. A.; Smiley, S. T.; Ling, M.; Gerard, N. P.; Gerard, C. Requirement of the Chemokine Receptor CXCR3 for Acute Allograft Rejection. *J. Exp. Med.* **2000**, *192* (10), 1515–1520.
- (92) Ma, B.; Khazali, A.; Wells, A. CXCR3 in Carcinoma Progression. *Histol. Histopathol.* **2015**, *30* (7), 781–792.
- (93) Kumar, D. S. S. Epigenetic Regulation of Alternative Splicing in Cancer, University of Pittsburgh: Graduate school of public health, 2013.
- (94) Ma, X.; Norsworthy, K.; Kundu, N.; Rodgers, W. H.; Gimotty, P. A.; Goloubeva, O.; Lipsky, M.; Li, Y.; Holt, D.; Fulton, A. CXCR3 Expression Is Associated with Poor Survival in Breast Cancer and Promotes Metastasis in a Murine Model. *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8* (3), 490–498.
- (95) Kawada, K.; Hosogi, H.; Sonoshita, M.; Sakashita, H.; Manabe, T.; Shimahara, Y.; Sakai, Y.; Takabayashi, A.; Oshima, M.; Taketo, M. M. Chemokine Receptor CXCR3 Promotes Colon Cancer Metastasis to Lymph Nodes. *Oncogene* **2007**, *26* (32), 4679.
- (96) Pu, Y.; Li, S.; Zhang, C.; Bao, Z.; Yang, Z.; Sun, L. High Expression of CXCR3 Is an Independent Prognostic Factor in Glioblastoma Patients That Promotes an Invasive Phenotype. *J. Neurooncol.* **2015**, *122* (1), 43–51.
- (97) Datta, D.; Banerjee, P.; Gasser, M.; Waaga-Gasser, A. M.; Pal, S. CXCR3-B Can Mediate Growth-Inhibitory Signals in Human Renal Cancer Cells by Down-Regulating the Expression of Heme Oxygenase-1. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (47), 36842–36848.
- (98) Furuya, M.; Yoneyama, T.; Miyagi, E.; Tanaka, R.; Nagahama, K.; Miyagi, Y.; Nagashima, Y.; Hirahara, F.; Inayama, Y.; Aoki, I. Differential Expression Patterns of CXCR3 Variants and Corresponding CXC Chemokines in Clear Cell Ovarian Cancers and Endometriosis. *Gynecol. Oncol.* **2011**, *122* (3), 648–655.
- (99) Datta, D.; Flaxenburg, J. A.; Laxmanan, S.; Geehan, C.; Grimm, M.; Waaga-Gasser, A. M.; Briscoe, D. M.; Pal, S. Ras-Induced Modulation of CXCL10 and Its Receptor Splice Variant CXCR3-B in MDA-MB-435 and MCF-7 Cells: Relevance for the Development of Human Breast Cancer. *Cancer Res.* **2006**, *66* (19), 9509–9518.
- (100) Bronger, H.; Karge, A.; Dreyer, T.; Zech, D.; Kraeft, S.; Avril, S.; Kiechle, M.; Schmitt, M. Induction of Cathepsin B by the CXCR3 Chemokines CXCL9 and CXCL10 in Human Breast Cancer Cells. *Oncol. Lett.* **2017**.
- (101) Korniejewska, A.; McKnight, A. J.; Johnson, Z.; Watson, M. L.; Ward, S. G. Expression and Agonist Responsiveness of CXCR3 Variants in Human T Lymphocytes. *Immunology* **2011**, *132* (4), 503–515.
- (102) Zhang, W.; Navenot, J.-M.; Haribabu, B.; Tamamura, H.; Hiramatu, K.; Omagari, A.; Pei, G.; Manfredi, J. P.; Fujii, N.; Broach, J. R.; et al. A Point Mutation That Confers Constitutive Activity to CXCR4 Reveals That T140 Is an Inverse Agonist and That AMD3100 and ALX40-4C Are Weak Partial Agonists. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (27), 24515–24521.
- (103) Soyza, A. D.; Pavord, I.; Elborn, J. S.; Smith, D.; Wray, H.; Puu, M.; Larsson, B.; Stockley, R. A Randomised, Placebo-Controlled Study of the CXCR2 Antagonist AZD5069 in Bronchiectasis. *Eur. Respir. J.* **2015**, *46* (4), 1021–1032.
- (104) Wanrooij, E. J. A. van; Jager, S. C. A. de; Es, T. van; Vos, P. de; Birch, H. L.; Owen, D. A.; Watson, R. J.; Biessen, E. A. L.; Chapman, G. A.; Berkel, T. J. C. van; et al. CXCR3 Antagonist NBI-74330

- Attenuates Atherosclerotic Plaque Formation in LDL Receptor-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2008**, *28* (2), 251–257.
- (105) Ni, J.; Zhu, Y.-N.; Zhong, X.-G.; Ding, Y.; Hou, L.-F.; Tong, X.-K.; Tang, W.; Ono, S.; Yang, Y.-F.; Zuo, J.-P. The Chemokine Receptor Antagonist, TAK-779, Decreased Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Reducing Inflammatory Cell Migration into the Central Nervous System, without Affecting T Cell Function. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *158* (8), 2046–2056.
- (106) Johnson, M.; Li, A.-R.; Liu, J.; Fu, Z.; Zhu, L.; Miao, S.; Wang, X.; Xu, Q.; Huang, A.; Marcus, A.; et al. Discovery and Optimization of a Series of Quinazolinone-Derived Antagonists of CXCR3. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (12), 3339–3343.
- (107) Hayes, M. E.; Breinlinger, E. C.; Wallace, G. A.; Grongsaard, P.; Miao, W.; McPherson, M. J.; Stoffel, R. H.; Green, D. W.; Roth, G. P. Lead Identification of 2-Iminobenzimidazole Antagonists of the Chemokine Receptor CXCR3. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (7), 2414–2419.
- (108) Watson, R. J.; Allen, D. R.; Birch, H. L.; Chapman, G. A.; Galvin, F. C.; Jopling, L. A.; Knight, R. L.; Meier, D.; Oliver, K.; Meissner, J. W. G.; et al. Development of CXCR3 Antagonists. Part 3: Tropenyl and Homotropenyl-Piperidine Urea Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (1), 147–151.
- (109) Bongartz, J.-P.; Buntinx, M.; Coesemans, E.; Hermans, B.; Van Lommen, G.; Van Wauwe, J. Synthesis and structure-activity relationship of benzetimide derivatives as human CXCR3 antagonists <http://sci-hub.cc/10.1016/j.bmcl.2008.07.115> (accessed Oct 7, 2017).
- (110) McGuinness, B. F.; Carroll, C. D.; Zawacki, L. G.; Dong, G.; Yang, C.; Hobbs, D. W.; Jacob-Samuel, B.; Hall, J. W.; Jenh, C.-H.; Kozlowski, J. A.; et al. Novel CXCR3 Antagonists with a Piperazinyl-Piperidine Core. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (17), 5205–5208.
- (111) Shao, Y.; Anilkumar, G. N.; Carroll, C. D.; Dong, G.; Hall, J. W.; Hobbs, D. W.; Jiang, Y.; Jenh, C.-H.; Kim, S. H.; Kozlowski, J. A.; et al. II. SAR Studies of Pyridyl-piperazinyl-Piperidine Derivatives as CXCR3 Chemokine Antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (5), 1527–1531.
- (112) Kim, S. H.; Anilkumar, G. N.; Zawacki, L. G.; Zeng, Q.; Yang, D.-Y.; Shao, Y.; Dong, G.; Xu, X.; Yu, W.; Jiang, Y.; et al. III. Identification of Novel CXCR3 Chemokine Receptor Antagonists with a Pyrazinyl-piperazinyl-piperidine Scaffold. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (23), 6982–6986.
- (113) Jenh, C.-H.; Cox, M. A.; Cui, L.; Reich, E.-P.; Sullivan, L.; Chen, S.-C.; Kinsley, D.; Qian, S.; Kim, S. H.; Rosenblum, S.; et al. A Selective and Potent CXCR3 Antagonist SCH 546738 Attenuates the Development of Autoimmune Diseases and Delays Graft Rejection. *BMC Immunol.* **2012**, *13* (1), 1–14.
- (114) Boyé, K.; Billottet, C.; Pujol, N.; Alves, I. D.; Bikfalvi, A. Ligand Activation Induces Different Conformational Changes in CXCR3 Receptor Isoforms as Evidenced by Plasmon Waveguide Resonance (PWR). *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1).
- (115) Rosenblum, J. M.; Zhang, Q.-W.; Siu, G.; Collins, T. L.; Sullivan, T.; Dairaghi, D. J.; Medina, J. C.; Fairchild, R. L. CXCR3 Antagonism Impairs the Development of Donor-Reactive, IFN- γ -Producing Effectors and Prolongs Allograft Survival: *Transplantation* **2009**, *87* (3), 360–369.
- (116) Bowdish, M. E.; Barr, M. L.; Quardt, S. M.; Medina, J.; Collins, T.; Johnson, M.; Tonn, G.; Newland, D.; Dairaghi, D.; Wu, G. D.; et al. Evaluation of an Oral CXCR3 Antagonist in a Rat Model of Acute Cardiac Allograft Rejection. *J. Heart Lung Transplant.* **2003**, *22* (1), S162.
- (117) Christen, S.; Holdener, M.; Beerli, C.; Thoma, G.; Bayer, M.; Pfeilschifter, J. M.; Hintermann, E.; Zerwes, H.-G.; Christen, U. Small Molecule CXCR3 Antagonist NIBR2130 Has Only a Limited Impact on Type 1 Diabetes in a Virus-Induced Mouse Model: CXCR3 Blockade in Autoimmune Diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* **2011**, *165* (3), 318–328.
- (118) Nair, A. G.; Wong, M. K. C.; Shu, Y.; Jiang, Y.; Jenh, C.-H.; Kim, S. H.; Yang, D.-Y.; Zeng, Q.; Shao, Y.; Zawacki, L. G.; et al. IV. Discovery of CXCR3 Antagonists Substituted with Heterocycles as Amide Surrogates: Improved PK, HERG and Metabolic Profiles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (4), 1085–1088.

- (119) Poulet, F. M.; Penraat, K.; Collins, N.; Evans, E.; Thackaberry, E.; Manfra, D.; Engstrom, L.; Geissler, R.; Geraci-Erck, M.; Frugone, C.; et al. Drug-Induced Hemolytic Anemia and Thrombocytopenia Associated with Alterations of Cell Membrane Lipids and Acanthocyte Formation. *Toxicol. Pathol.* **2010**, *38* (6), 907–922.
- (120) Shi, J.; Kantoff, P. W.; Wooster, R.; Farokhzad, O. C. Cancer Nanomedicine: Progress, Challenges and Opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17* (1), 20–37.
- (121) Wilczewska, A. Z.; Niemirowicz, K.; Markiewicz, K. H.; Car, H. Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Pharmacol. Rep.* **2012**, *64* (5), 1020–1037.
- (122) Suri, S. S.; Fenniri, H.; Singh, B. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems. *J. Occup. Med. Toxicol.* **2007**, *2*, 16.
- (123) Lammers, T.; Aime, S.; Hennink, W. E.; Storm, G.; Kiessling, F. Theranostic Nanomedicine. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (10), 1029–1038.
- (124) Cole, A. J.; Yang, V. C.; David, A. E. Cancer Theranostics: The Rise of Targeted Magnetic Nanoparticles. *Trends Biotechnol.* **2011**, *29* (7), 323–332.
- (125) Faraji, A. H.; Wipf, P. Nanoparticles in Cellular Drug Delivery. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17* (8), 2950–2962.
- (126) Liu, S. Q.; Tong, Y. W.; Yang, Y.-Y. Incorporation and in Vitro Release of Doxorubicin in Thermally Sensitive Micelles Made from Poly(N-Isopropylacrylamide-Co-N,N-Dimethylacrylamide)-b-Poly(d,l-Lactide-Co-Glycolide) with Varying Compositions. *Biomaterials* **2005**, *26* (24), 5064–5074.
- (127) Varela-Moreira, A.; Shi, Y.; M. Fens, M. H. A.; Lammers, T.; E. Hennink, W.; M. Schiffelers, R. Clinical Application of Polymeric Micelles for the Treatment of Cancer. *Mater. Chem. Front.* **2017**, *1* (8), 1485–1501.
- (128) Bangham, A. D.; Horne, R. W. Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface-Active Agents as Observed in the Electron Microscope. *J. Mol. Biol.* **1964**, *8* (5), 660IN2–668IN10.
- (129) Barenholz, Y. (Chezy). Doxil® — The First FDA-Approved Nano-Drug: Lessons Learned. *J. Controlled Release* **2012**, *160* (2), 117–134.
- (130) Feng, L.; Mumper, R. J. A Critical Review of Lipid-Based Nanoparticles for Taxane Delivery. *Cancer Lett.* **2013**, *334* (2), 157–175.
- (131) Wong, H. L.; Bendayan, R.; Rauth, A. M.; Li, Y.; Wu, X. Y. Chemotherapy with Anticancer Drugs Encapsulated in Solid Lipid Nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59* (6), 491–504.
- (132) Peltier, S.; Oger, J.-M.; Lagarce, F.; Couet, W.; Benoît, J.-P. Enhanced Oral Paclitaxel Bioavailability After Administration of Paclitaxel-Loaded Lipid Nanocapsules. *Pharm. Res.* **2006**, *23* (6), 1243–1250.
- (133) Cheon, J.; Lee, J.-H. Synergistically Integrated Nanoparticles as Multimodal Probes for Nanobiotechnology. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (12), 1630–1640.
- (134) Tada, H.; Higuchi, H.; Wanatabe, T. M.; Ohuchi, N. In Vivo Real-Time Tracking of Single Quantum Dots Conjugated with Monoclonal Anti-HER2 Antibody in Tumors of Mice. *Cancer Res.* **2007**, *67* (3), 1138–1144.
- (135) Murakami, H.; Kobayashi, M.; Takeuchi, H.; Kawashima, Y. Preparation of Poly(DL-Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles by Modified Spontaneous Emulsification Solvent Diffusion Method. *Int. J. Pharm.* **1999**, *187* (2), 143–152.
- (136) Theoharis, S.; Krueger, U.; Tan, P. H.; Haskard, D. O.; Weber, M.; George, A. J. T. Targeting Gene Delivery to Activated Vascular Endothelium Using Anti E/P-Selectin Antibody Linked to PAMAM Dendrimers. *J. Immunol. Methods* **2009**, *343* (2), 79–90.

- (137) Duncan, R.; Izzo, L. Dendrimer Biocompatibility and Toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57* (15), 2215–2237.
- (138) Danafar, H.; Manjili, H. K.; Najafi, M. Study of Copolymer Composition on Drug Loading Efficiency of Enalapril in Polymersomes and Cytotoxicity of Drug Loaded Nanoparticles. *Drug Res.* **2016**, *66* (09), 495–504.
- (139) Ahmed, F.; Pakunlu, R. I.; Brannan, A.; Bates, F.; Minko, T.; Discher, D. E. Biodegradable Polymersomes Loaded with Both Paclitaxel and Doxorubicin Permeate and Shrink Tumors, Inducing Apoptosis in Proportion to Accumulated Drug. *J. Controlled Release* **2006**, *116* (2), 150–158.
- (140) Moghimi, S. M.; Szebeni, J. Stealth Liposomes and Long Circulating Nanoparticles: Critical Issues in Pharmacokinetics, Opsonization and Protein-Binding Properties. *Prog. Lipid Res.* **2003**, *42* (6), 463–478.
- (141) Pasut, G.; Veronese, F. M. PEG Conjugates in Clinical Development or Use as Anticancer Agents: An Overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61* (13), 1177–1188.
- (142) Farokhzad, O. C.; Cheng, J.; Teply, B. A.; Sherifi, I.; Jon, S.; Kantoff, P. W.; Richie, J. P.; Langer, R. Targeted Nanoparticle-Aptamer Bioconjugates for Cancer Chemotherapy in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103* (16), 6315–6320.
- (143) Ferrari, M. Cancer Nanotechnology: Opportunities and Challenges. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5* (3), 161–171.
- (144) Wang, W.; Ma, X.; Yu, X. PH-Responsive Polymersome Based on PMCP-b-PDPA as a Drug Delivery System to Enhance Cellular Internalization and Intracellular Drug Release. *Chin. J. Polym. Sci.* **2017**, *35* (11), 1352–1362.
- (145) Lutz, J.-F. Polymerization of Oligo(Ethylene Glycol) (Meth)Acrylates: Toward New Generations of Smart Biocompatible Materials. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2008**, *46* (11), 3459–3470.
- (146) Andrieux, K.; Couvreur, P. Nanomedicine as a Promising Approach for the Treatment and Diagnosis of Brain Diseases: The Example of Alzheimer's Disease. *Ann. Pharm. Fr.* **2013**, *71* (4), 225–233.
- (147) Parveen, S.; Misra, R.; Sahoo, S. K. Nanoparticles: A Boon to Drug Delivery, Therapeutics, Diagnostics and Imaging. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2012**, *8* (2), 147–166.
- (148) Matsumura, Y.; Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* **1986**, *46* (12 Part 1), 6387–6392.
- (149) Allen, T. M.; Hansen, C.; Martin, F.; Redemann, C.; Yau-Young, A. Liposomes Containing Synthetic Lipid Derivatives of Poly(Ethylene Glycol) Show Prolonged Circulation Half-Lives in Vivo. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1991**, *1066* (1), 29–36.
- (150) Hrkach, J.; Von Hoff, D.; Ali, M. M.; Andrianova, E.; Auer, J.; Campbell, T.; De Witt, D.; Figa, M.; Figueiredo, M.; Horhota, A.; et al. Preclinical Development and Clinical Translation of a PSMA-Targeted Docetaxel Nanoparticle with a Differentiated Pharmacological Profile. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4* (128), 128ra39-128ra39.
- (151) Jiang, X.; Xin, H.; Sha, X.; Gu, J.; Jiang, Y.; Law, K.; Chen, Y.; Chen, L.; Wang, X.; Fang, X. PEGylated Poly(Trimethylene Carbonate) Nanoparticles Loaded with Paclitaxel for the Treatment of Advanced Glioma: In Vitro and in Vivo Evaluation. *Int. J. Pharm.* **2011**, *420* (2), 385–394.
- (152) Ghoroghchian, P. P.; Li, G.; Levine, D. H.; Davis, K. P.; Bates, F. S.; Hammer, D. A.; Therien, M. J. Bioresorbable Vesicles Formed through Spontaneous Self-Assembly of Amphiphilic Poly(Ethylene Oxide)-Block-Polycaprolactone. *Macromolecules* **2006**, *39* (5), 1673–1675.

- (153) Levine, D. H.; Ghoroghchian, P. P.; Freudenberg, J.; Zhang, G.; Therien, M. J.; Greene, M. I.; Hammer, D. A.; Murali, R. Polymersomes: A New Multi-Functional Tool for Cancer Diagnosis and Therapy. *Methods* **2008**, *46* (1), 25–32.
- (154) Yang, J.; Lim, E.-K.; Lee, H. J.; Park, J.; Lee, S. C.; Lee, K.; Yoon, H.-G.; Suh, J.-S.; Huh, Y.-M.; Haam, S. Fluorescent Magnetic Nanohybrids as Multimodal Imaging Agents for Human Epithelial Cancer Detection. *Biomaterials* **2008**, *29* (16), 2548–2555.
- (155) Cai, W.; Shin, D.-W.; Chen, K.; Gheysens, O.; Cao, Q.; Wang, S. X.; Gambhir, S. S.; Chen, X. Peptide-Labeled Near-Infrared Quantum Dots for Imaging Tumor Vasculature in Living Subjects. *Nano Lett.* **2006**, *6* (4), 669–676.
- (156) Chen, G.; Jaskula-Sztul, R.; Harrison, A.; Dammalapati, A.; Xu, W.; Cheng, Y.; Chen, H.; Gong, S. KE108-Conjugated Unimolecular Micelles Loaded with a Novel HDAC Inhibitor Thailandepsin-A for Targeted Neuroendocrine Cancer Therapy. *Biomaterials* **2016**, *97*, 22–33.
- (157) Couvreur, P. Les nanomédicaments : une approche intelligente pour le traitement des maladies sévères http://www.mediachimie.org/sites/default/files/chimie_105.pdf (accessed Feb 1, 2018).
- (158) Peer, D. Harnessing RNAi Nanomedicine for Precision Therapy. *Mol. Cell. Ther.* **2014**, *2* (1), 5.
- (159) Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Strong, L. E.; Oetjen, K. A.; Kiessling, L. L. Influencing Receptor–Ligand Binding Mechanisms with Multivalent Ligand Architecture. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (50), 14922–14933.
- (160) Koval, M.; Preiter, K.; Adles, C.; Stahl, P. D.; Steinberg, T. H. Size of IgG-Opsonized Particles Determines Macrophage Response during Internalization. *Exp. Cell Res.* **1998**, *242* (1), 265–273.
- (161) Perrault, S. D.; Walkey, C.; Jennings, T.; Fischer, H. C.; Chan, W. C. W. Mediating Tumor Targeting Efficiency of Nanoparticles Through Design. *Nano Lett.* **2009**, *9* (5), 1909–1915.
- (162) Rejman, J.; Oberle, V.; Zuhorn, I. S.; Hoekstra, D. Size-Dependent Internalization of Particles via the Pathways of Clathrin- and Caveolae-Mediated Endocytosis. *Biochem. J.* **2004**, *377* (1), 159–169.
- (163) Petros, R. A.; DeSimone, J. M. Strategies in the Design of Nanoparticles for Therapeutic Applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9* (8), 615–627.
- (164) Yameen, B.; Choi, W. I.; Vilos, C.; Swami, A.; Shi, J.; Farokhzad, O. C. Insight into Nanoparticle Cellular Uptake and Intracellular Targeting. *J. Controlled Release* **2014**, *190*, 485–499.
- (165) Aderem, A.; Underhill, and D. M. Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **1999**, *17* (1), 593–623.
- (166) Kirchhausen, T. Clathrin. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69* (1), 699–727.
- (167) Suh, W. H.; Suslick, K. S.; Stucky, G. D.; Suh, Y.-H. Nanotechnology, Nanotoxicology, and Neuroscience. *Prog. Neurobiol.* **2009**, *87* (3), 133–170.
- (168) Dhawan, A.; Sharma, V. Toxicity Assessment of Nanomaterials: Methods and Challenges. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398* (2), 589–605.
- (169) Hobbs, S. K.; Monsky, W. L.; Yuan, F.; Roberts, W. G.; Griffith, L.; Torchilin, V. P.; Jain, R. K. Regulation of Transport Pathways in Tumor Vessels: Role of Tumor Type and Microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95* (8), 4607–4612.
- (170) Schins, R. P. F.; Duffin, R.; Höhr, D.; Knaapen, A. M.; Shi, T.; Weishaupt, C.; Stone, V.; Donaldson, K.; Borm, P. J. A. Surface Modification of Quartz Inhibits Toxicity, Particle Uptake, and Oxidative DNA Damage in Human Lung Epithelial Cells. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15* (9), 1166–1173.
- (171) Clift, M. J. D.; Rothen-Rutishauser, B.; Brown, D. M.; Duffin, R.; Donaldson, K.; Proudfoot, L.; Guy, K.; Stone, V. The Impact of Different Nanoparticle Surface Chemistry and Size on Uptake and Toxicity in a Murine Macrophage Cell Line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *232* (3), 418–427.

- (172) Ai, J.; Biazar, E.; Jafarpour, M.; Montazeri, M.; Majdi, A.; Aminifard, S.; Zafari, M.; Akbari, H. R.; Rad, H. G. Nanotoxicology and Nanoparticle Safety in Biomedical Designs. *Int. J. Nanomedicine* **2011**, *6*, 1117–1127.
- (173) Choi, C. H. J.; Alabi, C. A.; Webster, P.; Davis, M. E. Mechanism of Active Targeting in Solid Tumors with Transferrin-Containing Gold Nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (3), 1235–1240.
- (174) Li, H.; Wang, P.; Deng, Y.; Zeng, M.; Tang, Y.; Zhu, W.-H.; Cheng, Y. Combination of Active Targeting, Enzyme-Triggered Release and Fluorescent Dye into Gold Nanoclusters for Endomicroscopy-Guided Photothermal/Photodynamic Therapy to Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Biomaterials* **2017**, *139*, 30–38.
- (175) Kano, M. R.; Bae, Y.; Iwata, C.; Morishita, Y.; Yashiro, M.; Oka, M.; Fujii, T.; Komuro, A.; Kiyono, K.; Kaminishi, M. Improvement of Cancer-Targeting Therapy, Using Nanocarriers for Intractable Solid Tumors by Inhibition of TGF- β Signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (9), 3460–3465.
- (176) Zhang, W.; Shi, Y.; Chen, Y.; Ye, J.; Sha, X.; Fang, X. Multifunctional Pluronic P123/F127 Mixed Polymeric Micelles Loaded with Paclitaxel for the Treatment of Multidrug Resistant Tumors. *Biomaterials* **2011**, *32* (11), 2894–2906.
- (177) Li, L.; Wartchow, C. A.; Danthi, S. N.; Shen, Z.; Dechene, N.; Pease, J.; Choi, H. S.; Doede, T.; Chu, P.; Ning, S. A Novel Antiangiogenesis Therapy Using an Integrin Antagonist or Anti-Flk-1 Antibody Coated 90Y-Labeled Nanoparticles. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2004**, *58* (4), 1215–1227.
- (178) van der Meel, R.; Vehmeijer, L. J.; Kok, R. J.; Storm, G.; van Gaal, E. V. Ligand-Targeted Particulate Nanomedicines Undergoing Clinical Evaluation: Current Status. In *Intracellular Delivery III*; Springer, 2016; pp 163–200.
- (179) Davis, M. E. The First Targeted Delivery of SiRNA in Humans via a Self-Assembling, Cyclodextrin Polymer-Based Nanoparticle: From Concept to Clinic. *Mol. Pharm.* **2009**, *6* (3), 659–668.
- (180) Nair, L. S.; Laurencin, C. T. Biodegradable Polymers as Biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32* (8–9), 762–798.
- (181) Zhang, Z.; Kuijer, R.; Bulstra, S. K.; Grijpma, D. W.; Feijen, J. The in Vivo and in Vitro Degradation Behavior of Poly(Trimethylene Carbonate). *Biomaterials* **2006**, *27* (9), 1741–1748.
- (182) Zhu, K. J.; Hendren, R. W.; Jensen, K.; Pitt, C. G. Synthesis, Properties, and Biodegradation of Poly(1,3-Trimethylene Carbonate). *Macromolecules* **1991**, *24* (8), 1736–1740.
- (183) Sanson, C.; Meins, J.-F. L.; Schatz, C.; Soum, A.; Lecommandoux, S. Temperature Responsive Poly(Trimethylene Carbonate)- Block -Poly(1 -Glutamic Acid) Copolymer : Polymersomes Fusion and Fission. *Soft Matter* **2010**, *6* (8), 1722–1730.
- (184) Fang, Y.; Yang, W.; Cheng, L.; Meng, F.; Zhang, J.; Zhong, Z. EGFR-Targeted Multifunctional Polymersomal Doxorubicin Induces Selective and Potent Suppression of Orthotopic Human Liver Cancer in Vivo. *Acta Biomater.* **2017**, *64*, 323–333.
- (185) Zou, Y.; Meng, F.; Deng, C.; Zhong, Z. Robust, Tumor-Homing and Redox-Sensitive Polymersomal Doxorubicin: A Superior Alternative to Doxil and Caelyx? *J. Controlled Release* **2016**, *239*, 149–158.
- (186) Wang, X.; Yang, Y.; Jia, H.; Jia, W.; Miller, S.; Bowman, B.; Feng, J.; Zhan, F. Peptide Decoration of Nanovehicles to Achieve Active Targeting and Pathology-Responsive Cellular Uptake for Bone Metastasis Chemotherapy. *Biomater. Sci.* **2014**, *2* (7), 961–971.
- (187) Jiang, X.; Sha, X.; Xin, H.; Chen, L.; Gao, X.; Wang, X.; Law, K.; Gu, J.; Chen, Y.; Jiang, Y.; et al. Self-Aggregated Pegylated Poly (Trimethylene Carbonate) Nanoparticles Decorated with c(RGDyK) Peptide for Targeted Paclitaxel Delivery to Integrin-Rich Tumors. *Biomaterials* **2011**, *32* (35), 9457–9469.

Chapitre 2 :

***Synthèse des copolymères à
blocs PTMC-*b*-PEG et
PTMC-*b*-PEG-SCH546738***

Introduction

Comme présenté dans le chapitre bibliographique précédent, les copolymères à blocs amphiphiles sont très explorés en nanomédecine grâce, au regard entre autres de leur biocompatibilité et de leurs propriétés d'auto-assemblage dans l'eau.

Dans cette partie, nous décrivons la synthèse de différents copolymères à blocs amphiphiles PTMC-*b*-PEG comportant un segment hydrophile PEG de 2000 g/mol et un bloc hydrophobe PTMC de longueur variable afin d'obtenir des fractions hydrophiles massique différentes.

En parallèle, d'autres copolymères à blocs amphiphiles de même composition ont été fonctionnalisés en bout de chaîne PEG par le ligand SCH546738 (PTMC-*b*-PEG-SCH546738). Cette synthèse implique la modification chimique préalable de ce ligand afin de l'introduire sur le segment PEG, qui sera ensuite couplé au bloc PTMC préalablement synthétisé.

Ces deux copolymères à blocs ont été synthétisés dans le but de les co-auto-assembler par la suite en solution afin de faire varier le ratio de SCH546738 en surface de la nanoparticule.

Le schéma réactionnel général de synthèse est illustré sur le schéma 1.

La polymérisation par ouverture de cycle (ROP) permet un grand contrôle de la polymérisation et reste de loin la plus largement utilisée pour la synthèse de matériaux bien définis. De plus, la ROP du monomère triméthylène carbonate (TMC) étant bien décrite, le copolymère à blocs PTMC-*b*-PEG est donc synthétisé ainsi.¹

Le copolymère à blocs PTMC-*b*-PEG-SCH546738 est obtenu par couplage des blocs PTMC et PEG-SCH546738 pour plusieurs raisons. La molécule SCH546738 étant très coûteuse, il a été nécessaire de contrôler les différentes étapes au préalable comme la synthèse du bloc PTMC par ROP du TMC ou le couplage des deux blocs par un lien amide qui sont bien des étapes de synthèse bien connus. De plus, la molécule étant très peu réactive, un couplage sur une nanoparticule aurait sans doute été difficile.

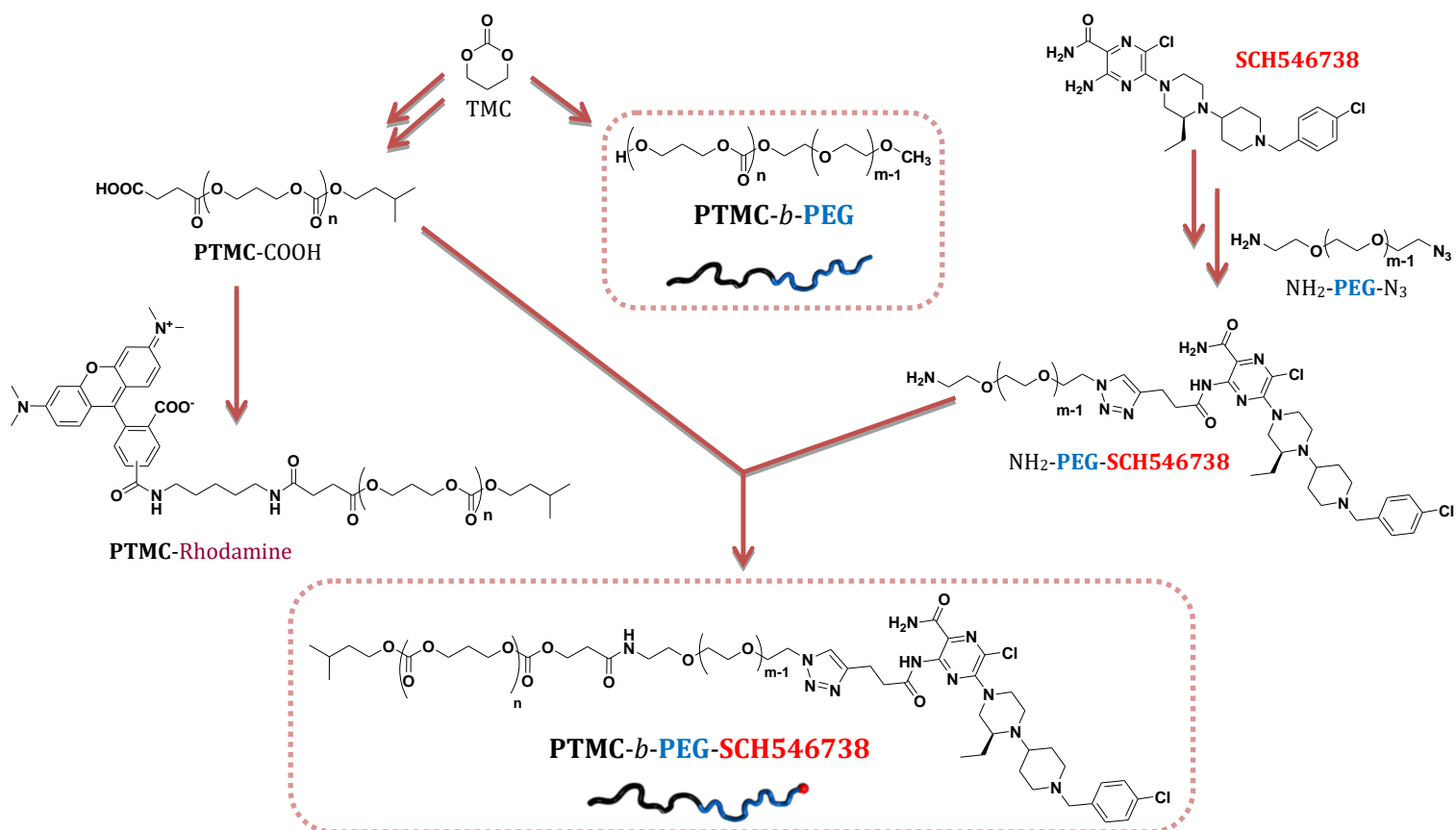


Schéma 1 : Schéma réactionnel général de la synthèse des copolymères à blocs PTMC-*b*-PEG et PTMC-*b*-PEG-SCH546738

*Une voie de synthèse divergente a été utilisée pour PTMC-*b*-PEG et convergente pour PTMC-*b*-PEG-SCH546738*

La ROP du TMC amorcée par un segment PEG avec un bout de chaîne alcool fournit une série de copolymères à blocs PTMC-*b*-PEG. Cette même réaction amorcée par un alcool aliphatique permet d'obtenir les homopolymères PTMC-OH, modifiés par la suite pour introduire un groupement acide carboxylique en bout de chaîne.

La molécule SCH546738 est chimiquement modifiée pour présenter un groupement alcyne permettant son couplage par « chimie click » avec le segment PEG azide également fonctionnalisé en bout de chaîne par une amine primaire. Les blocs PTMC et PEG-SCH546738 sont finalement couplés par un lien amide pour obtenir le PTMC-*b*-PEG-SCH546738

1. Synthèse et caractérisation des copolymères à blocs PTMC-*b*-PEG

1.1 Polymérisation par ouverture de cycle du TMC amorcé par un PEG

Des études réalisées sur l'auto-assemblage de copolymères à blocs amphiphiles prédisent la structure des objets formés en solution en fonction de la fraction hydrophile massique du copolymère.^{2,3} Cependant, ces études n'ayant pas été réalisées sur les copolymères à blocs PTMC-*b*-PEG, une série de ces macromolécules a été synthétisée avec différentes tailles du bloc PTMC, et donc de fraction hydrophile massique, afin d'observer leur comportement en milieu aqueux. Le MeO-PEG₄₅-OH utilisé (MW : 2000 g/mol) est commercial car ils sont largement disponibles et disposent de nombreuses fonctionnalisations de bout de chaîne.

Pour cela, une ROP du monomère TMC amorcée par le MeO-PEG₄₅-OH en présence de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU) a été réalisée (voir figure 1).

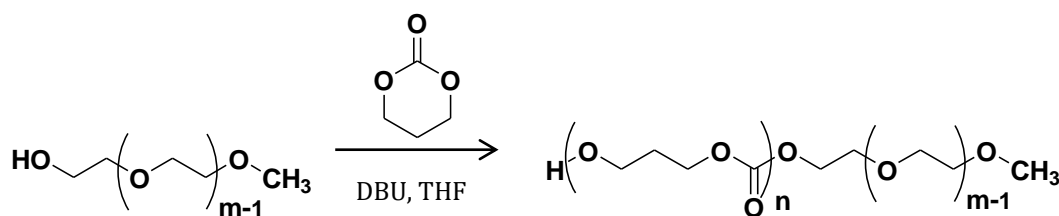


Figure 1 : Schéma réactionnel de la polymérisation en cycle du TMC amorcée par le MeO-PEG_m-OH et catalysée par le DBU

Dans cette réaction, le DBU joue le rôle de base (pK_a=12) en déprotonant le proton acide de l'alcool (pK_a=15) pour permettre l'amorçage de la polymérisation en chaîne. Elle est facile d'utilisation, car il peut être utilisé à température ambiante et ne crée pas de réactions secondaires à des hauts taux de conversion comme par exemple le diéthylzinc.⁴ La réaction se déroule sous atmosphère inerte et à température ambiante. Le solvant de réaction (THF) et les réactifs doivent être anhydres ou distillés et donc préalablement purifiés pour éviter les réactions secondaires avec l'eau.

Certains paramètres tels que le temps de réaction (qui varie entre plusieurs heures et plusieurs semaines) ou la proportion des réactifs, permettent d'avoir un contrôle sur le degré de polymérisation DP du PTMC. Ainsi, plusieurs copolymères à blocs ont été synthétisés dont les conditions de réaction sont rassemblées dans le tableau 1 ci-après.

| | DP visé (n) | n TMC (mmol) | n DBU (mmol) | n PEG (mmol) | Vol THF (mL) | Temps de réaction | % conversion * |
|------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------|-------------------|
| Polymère 1 | 40 | 40 | 0,98 | 0,98 | 8 | 72 H | 83 |
| Polymère 2 | 120 | 40 | 0,33 | 0,33 | 8 | 66 H | 68 |
| Polymère 3 | 190 | 40 | 0,21 | 0,21 | 8 | 9 jours | 76 |
| Polymère 4 | 190 | 40 | 0,42 | 0,21 | 8 | 9 jours | 87 |
| Polymère 5 | 400 | 29 | 0,07 | 0,07 | 6 | 3 semaines | 68 |

Tableau 1 : Conditions de réaction des différents copolymères à blocs PTMC-*b*-PEG synthétisés

DP : Degré de Polymérisation du bloc PTMC ; * Calculé par rapport aux valeurs de DP calculées par RMN ¹H

Les réactions sont contrôlées dans le temps en analysant le brut de réaction par RMN ¹H où l'évolution des pics caractéristiques du bloc PTMC est observée (voir figure S1). La réaction est alors stoppée par ajout d'un excès d'acide acétique lorsque le DP attendu est obtenu.

1.2 Caractérisations chimiques des différents copolymères à blocs PTMC-*b*-PEG

Après purification par précipitation dans le méthanol froid, les cinq copolymères à blocs sont alors caractérisés et leurs différentes caractéristiques sont répertoriées dans le tableau 2.

| Copolymères à blocs | DP du PTMC | | M _n du bloc PTMC (g/mol) | | M _n des PTMC _n - <i>b</i> -PEG ₄₅ (g/mol) ^a | T _g ^b (°C) | T _f ^b (°C) | Fraction hydrophile massique <i>f</i> | Indice de polydispersité ^c |
|------------------------------------------------------|--------------------|------------------|----------------------------------------|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------|
| | RMN ¹ H | SEC ^a | RMN ¹ H | SEC ^a | | | | | |
| 1. PTMC ₃₈ - <i>b</i> -PEG ₄₅ | 33 | 38 | 3400 | 3900 | 5900 | - 40 | 41 | 34% | 1,05 |
| 2. PTMC ₉₆ - <i>b</i> -PEG ₄₅ | 81 | 96 | 8300 | 9800 | 11800 | - 32 | 39 | 17% | 1,05 |
| 3. PTMC ₁₄₄ - <i>b</i> -PEG ₄₅ | 144 | 144 | 14700 | 14700 | 16700 | - 27 | 40 | 12% | 1,06 |
| 4. PTMC ₁₇₀ - <i>b</i> -PEG ₄₅ | 166 | 170 | 17000 | 17400 | 19400 | - 26 | 40 | 10% | 1,11 |
| 5. PTMC ₃₃₂ - <i>b</i> -PEG ₄₅ | 272 | 332 | 27800 | 33900 | 35900 | - 21 | 42 | 6% | 1,17 |

Tableau 2 : Caractéristiques de chacun des copolymères à blocs synthétisés

^a. Déterminés par triple détection par analyses de SEC (THF) ;

^b. Déterminés par analyses DSC ; ^c. Déterminés par analyses de SEC (THF)

Le DP obtenu est facilement calculable par spectroscopie RMN ^1H réalisée dans le chloroforme deutéré (CDCl_3) grâce à l'intégration des pics à 2,04 et 4,23 ppm correspondants aux protons du bloc PTMC. La calibration se fait sur le pic à 3,37 ppm correspondant au groupement méthyle en bout de chaîne du segment PEG (voir figure S1). Les DP des différents copolymères sont également calculés en triple détection par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) dans le THF. Cependant, la valeur des DP calculés par ces deux analyses diffèrent. Ceci peut s'expliquer par l'intégration des pics en RMN ^1H non précise ou d'un pic présent sous le pic de référence qui fausserait la calibration, c'est pourquoi nous utiliserons les DP obtenus par SEC.

Un série de cinq copolymères à blocs $\text{PTMC}_n\text{-}b\text{-PEG}_{45}$ avec $n=38, 96, 144, 170$ et 332 et donc des fractions hydrophiles massiques allant de 34 à 6% est obtenue.

Les analyses par SEC dans le THF révèlent une distribution en taille étroite des copolymères (PDI allant de 1,05 à 1,17) (voir figure 2).

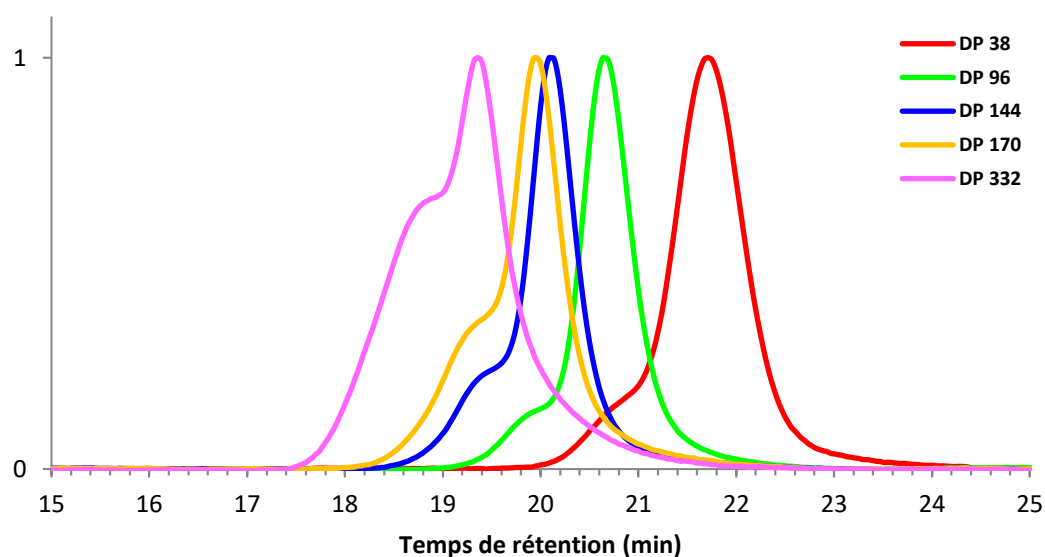


Figure 2 : Chromatogrammes d'exclusion stérique dans le THF des différents $\text{PTMC}_n\text{-}b\text{-PEG}$
Détection en RI (Refractive Index)

Plus la masse molaire du copolymère est élevée plus son temps de rétention va être petit. Nous observons cependant un épaulement qui s'accroît avec la taille du copolymère, ce qui explique l'augmentation de la dispersité. Cet épaulement, aux temps de rétention plus courts, correspond au PTMC_{2n} obtenu lors d'une réaction secondaire

pendant la ROP ⁴ et qui viendrait dans notre cas de la durée de la réaction trop longue qui peut atteindre plusieurs semaines.

De plus en plus de groupes utilisent aujourd'hui un cocatalyseur comme la 1-[3,5-Bis(trifluorométhyl)phényl]-3-cyclohexylthiourée (TU) qui permet de réduire incontestablement le temps de réaction.⁵ Il a également été montré qu'en diminuant le pourcentage de conversion ou en réduisant le rapport Monomère/Amorçeur, on réduisait de manière significative, voire même empêchait totalement la présence de cet épaulement.⁶

Cet épaulement correspondant au PTMC_{2n} semble cependant être inerte et non gênant pour la suite du projet puisqu'il ne présente pas de fonction réactive.

L'analyse thermogravimétrique (TGA) donne un profil de dégradation du polymère en fonction de la température et également de la pureté de ce dernier (voir figure 3).

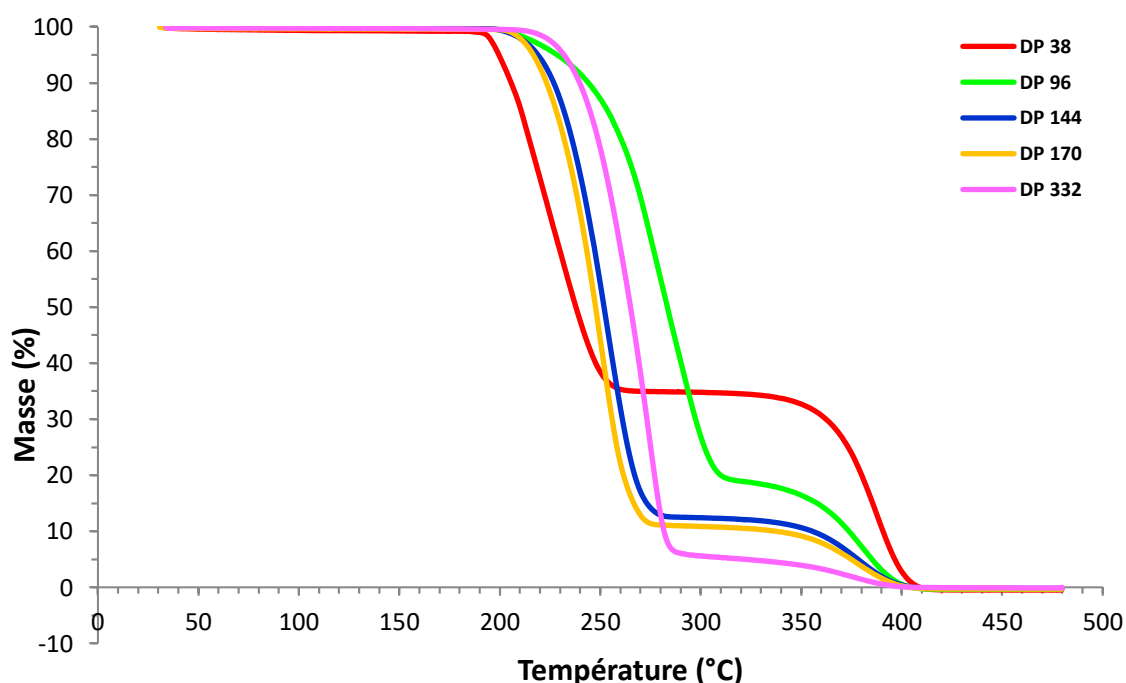
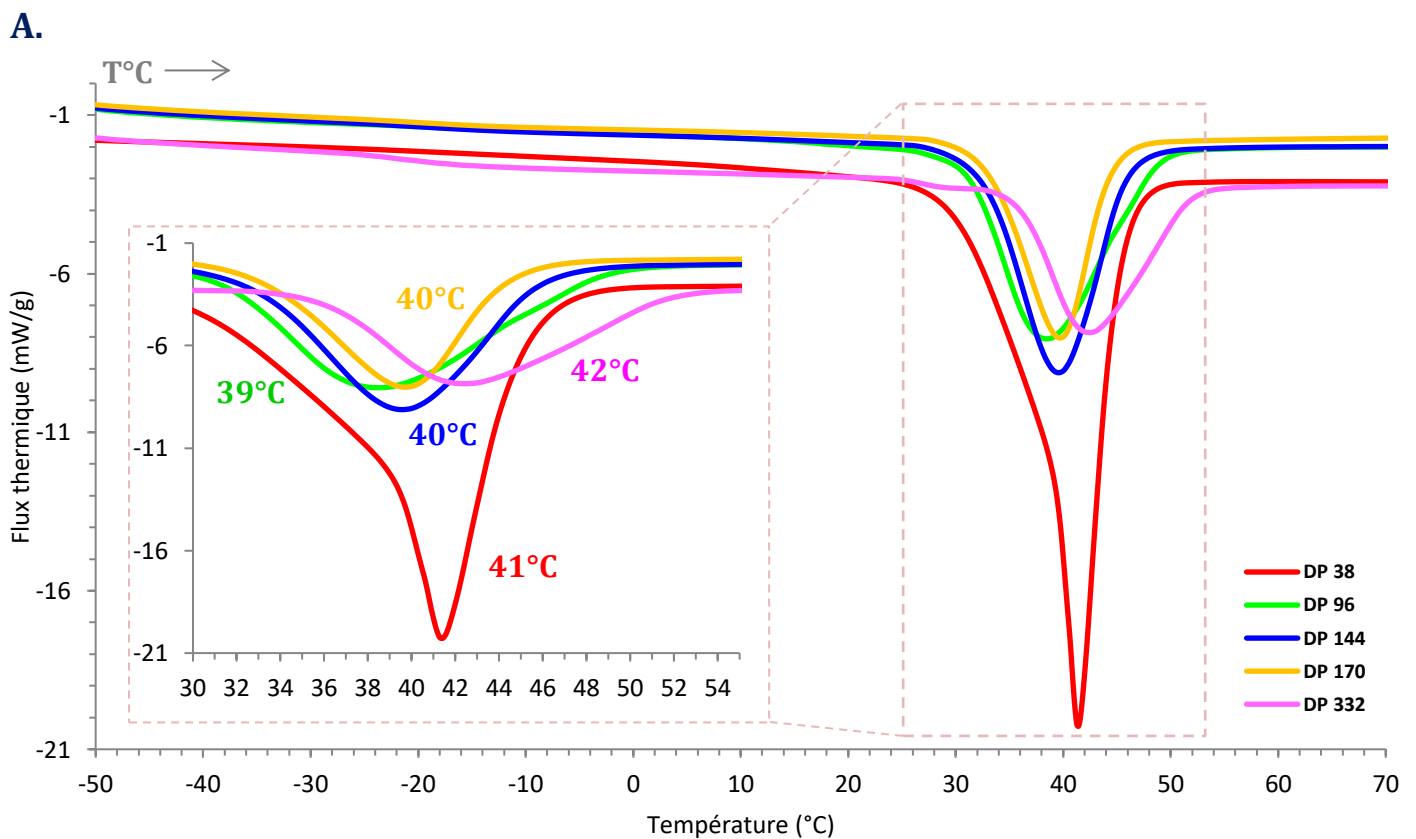


Figure 3 : Thermogrammes (TGA) des différents copolymères PTMC-b-PEG en fonction du DP du bloc PTMC

Le premier bloc à se dégrader est le PTMC aux alentours de 200 °C, puis le PEG aux alentours de 320 °C. Plus le bloc PTMC est grand, plus sa température de dégradation augmente. Le pourcentage massique de dégradation de chacun des blocs confirme également la proportion d'un bloc par rapport à l'autre. Le fait que la courbe atteigne la valeur zéro en masse signifie qu'il n'y a pas de résidus en fin de chauffage et que le produit est pur.

Les copolymères à blocs ont également été analysés par calorimétrie différentielle à balayage (DSC), qui va déterminer les différentes transitions de phases correspondant au polymère (enthalpie de fusion, de cristallisation et température de transition vitreuse). Lors de l'analyse, les polymères subissent un premier cycle de chauffage (figure 4-A), un cycle de refroidissement (figure 4-B) puis un second cycle de chauffage (figure 4-C). Le premier cycle de chauffe est nécessaire pour éliminer toute trace d'humidité ou de solvants résiduels.



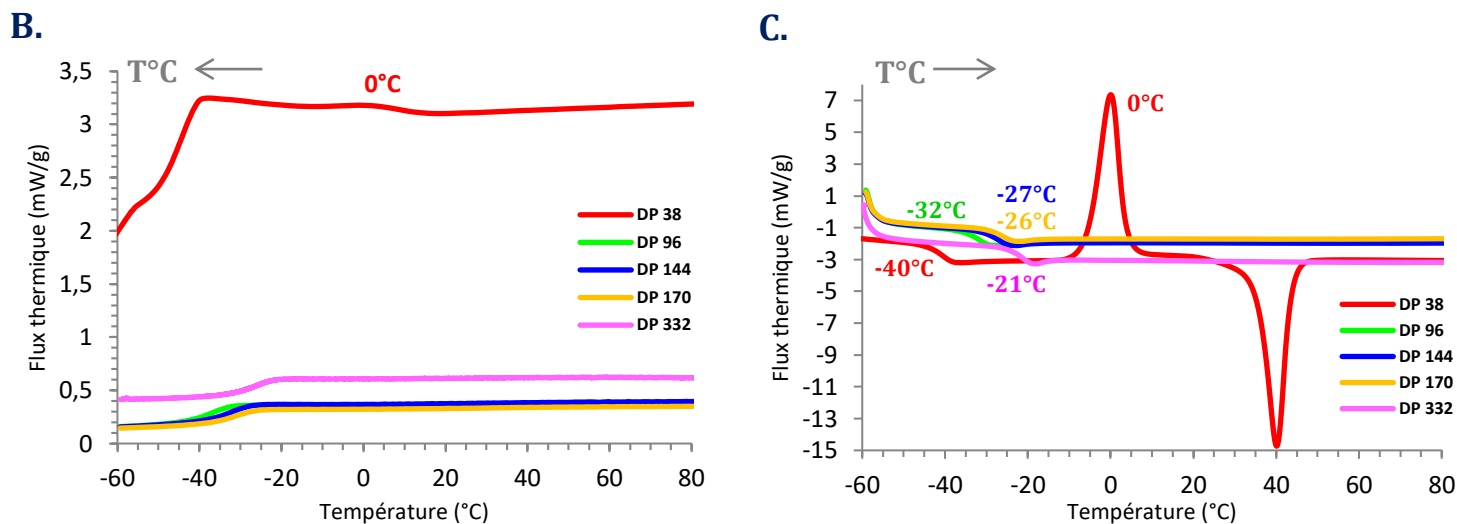


Figure 4 : Thermogrammes (DSC) des différents copolymères à blocs PTMC-*b*-PEG

A. Thermogramme du premier cycle de chauffage (10°C/min) ; *B.* Thermogramme du cycle de refroidissement (10°C/min) ; *C.* Thermogramme du second cycle de chauffage (10°C/min)

Les cinq copolymères présentent des températures de transition vitreuse T_g (figure 4-C) entre -40°C et -21°C (la T_g augmente lorsque le DP du bloc PTMC augmente), ainsi qu'un pic endothermique aux alentours de 40°C (figure 4-A) correspondant à la fusion du copolymère ce qui traduit un caractère semi-cristallin du PTMC-*b*-PEG. On voit cependant que la recristallisation est très longue puisqu'il n'y a pas de pic exothermique correspondant à la recristallisation du copolymère lors du cycle de refroidissement (figure 4-B), et donc absence de pic endothermique au second passage, excepté dans le cas du DP le plus petit (DP 38).

Le cas du DP 38 est différent des autres car la proportion de PTMC dans le copolymère n'est pas suffisante pour perturber la recristallisation du copolymère. En effet, lors du cycle de refroidissement le copolymère commence à se recristalliser aux alentours de 0°C (figure 4-B) et continue lors du deuxième cycle de chauffe (figure 4-C). La même expérience a été réalisée en fixant la vitesse de refroidissement à 2°C/min et on observe la quasi-totalité de la recristallisation lors du cycle de refroidissement.

Des tests de cinétique de recristallisation à 21°C ont alors été réalisés par analyses DSC pour les DP 96, 144, 170 et 332 afin d'estimer le temps nécessaire pour le début de la recristallisation (figure S2 et tableau 3).

| <i>DP des PTMC_n-b-PEG₄₅</i> | <i>DP 38</i> | <i>DP 96</i> | <i>DP 144</i> | <i>DP 170</i> | <i>DP 332</i> |
|---------------------------------------------------|-------------------|-----------------|----------------|----------------|-------------------|
| <i>Début de recristallisation</i> | <i>20 minutes</i> | <i>2 heures</i> | <i>4 jours</i> | <i>4 jours</i> | <i>2 semaines</i> |

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des temps nécessaire à un début de recristallisation des PTMC_n-b-PEG₄₅ estimé par analyses DSC

Plus la proportion de PTMC dans le copolymère est grande plus la recristallisation est longue. C'est un processus très lent car effectivement, le temps de début de recristallisation du PTMC-*b*-PEG varie entre quelques minutes et plusieurs semaines. Il serait intéressant d'observer le comportement de ces copolymères auto-assemblés en micro DSC (DSC sur échantillons liquide).

Une série de cinq copolymères à blocs PTMC-*b*-PEG de fraction hydrophile massique *f* allant de 34 à 6% a été synthétisée et bien caractérisée.

2. Synthèse du copolymère à blocs PTMC-*b*-PEG-SCH546738 fonctionnalisé en bout de chaîne par le ligand SCH546738

La synthèse du copolymère à bloc PTMC-*b*-PEG-SCH546738 se fait via une approche différente de celle du copolymère à bloc PTMC-*b*-PEG non fonctionnalisé. En effet, il est obtenu par une synthèse convergente contrairement au copolymère non fonctionnalisé obtenu par synthèse divergente.

Pour cela, la stratégie a été de synthétiser d'une part le bloc PTMC avec un bout de chaîne acide carboxylique et d'autre part le bloc hydrophile PEG-SCH546738 impliquant la modification chimique préalable du SCH546738.

2.1 Synthèse des blocs hydrophobes PTMC

La synthèse du bloc PTMC a été réalisée en deux étapes : la ROP du TMC amorcée par un alcool primaire puis l'estérification du $\text{PTMC}_n\text{-OH}$ produit pour obtenir un bout de chaîne acide carboxylique qui servira au couplage avec le segment PEG fonctionnalisé par une amine primaire.

2.1.1 Polymérisation par ouverture de cycle du TMC amorcé par le 3-méthyl-1-butanol

La ROP du TMC se déroule dans les mêmes conditions que dans la partie précédente mais cette fois ci amorcée par un alcool primaire aliphatique, le 3-méthyl-1-butanol (voir figure 5).

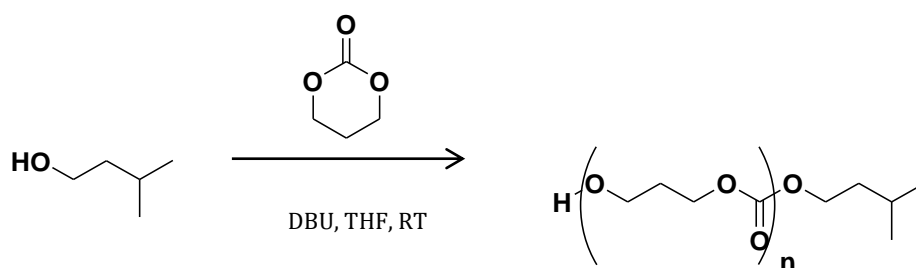


Figure 5 : ROP du TMC amorcé par le 3-méthyl-1-butanol

De même que pour le $\text{PTMC-}b\text{-PEG}$, les conditions de réactions ont été modulées pour obtenir finalement un $\text{PTMC}_{36}\text{-OH}$ ainsi qu'un $\text{PTMC}_{88}\text{-OH}$ dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau 4 ci-dessous.

| Homopolymère | Temps de réaction | % de conversion | DP du $\text{PTMC}_n\text{-OH}$ | | M_n du $\text{PTMC}_n\text{-OH}$ (g/mol) | | T_g (°C) ^b | T_f (°C) ^b | Indice de polydispersité ^c |
|---------------------------------|-------------------|-----------------|---------------------------------|------------------|--------------------------------------------|------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| | | | RMN ¹ H | SEC ^a | RMN ¹ H | SEC ^a | | | |
| 1. $\text{PTMC}_{36}\text{-OH}$ | 30 heures | 78% | 31 | 36 | 3200 | 3700 | - 23 | 46 | 1,12 |
| 2. $\text{PTMC}_{88}\text{-OH}$ | 91 heures | 78% | 78 | 88 | 8000 | 9000 | - 20 | 43 | 1,13 |

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des caractéristiques des différents $\text{PTMC}_n\text{-OH}$

a. Déterminés par triple détection (THF) ; b. Déterminés par analyses DSC ; c. Déterminés par analyses de SEC (THF)

Ces deux homopolymères ont été caractérisés par RMN ^1H , SEC dans le THF, DSC et TGA comme dans la partie précédente. Le DP calculé par RMN ^1H est cette fois-ci obtenu grâce à la calibration faite sur les deux groupements méthyle du 3-méthyl-1-butanol à 0,91 ppm (voir figure S3). Le DP conservé sera également celui obtenu par SEC.

2.1.2 Fonctionnalisation du bout de chaîne du PTMC en acide carboxylique

Afin de pouvoir coupler le bloc PTMC avec le bloc hydrophile PEG, fonctionnalisé en bout de chaîne par une amine ($\text{NH}_2\text{-PEG}_{45}\text{-N}_3$ commercial), il est nécessaire d'introduire une fonction acide carboxylique en bout de chaîne du segment PTMC préalablement synthétisé. Pour cela, une estérification du $\text{PTMC}_n\text{-OH}$ par un anhydride et activé par la diméthylaminopyridine (DMAP) est réalisée (voir figure 6).

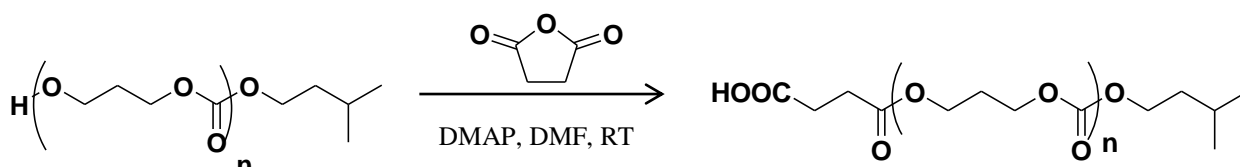


Figure 6 : Post modification du $\text{PTMC}_n\text{-OH}$ en $\text{PTMC}_n\text{-COOH}$

Un large excès d'anhydride succinique (20équivalents/PTMC) est utilisé afin d'assurer une conversion quantitative. La RMN ^1H montre l'apparition d'un nouveau pic à 2,65 ppm correspondant aux protons $-\text{CH}_2$ en α et β de l'acide carboxylique et la disparition des pics correspondant au bout de chaîne hydroxyle du $\text{PTMC}_n\text{-OH}$ (voir figure 7).

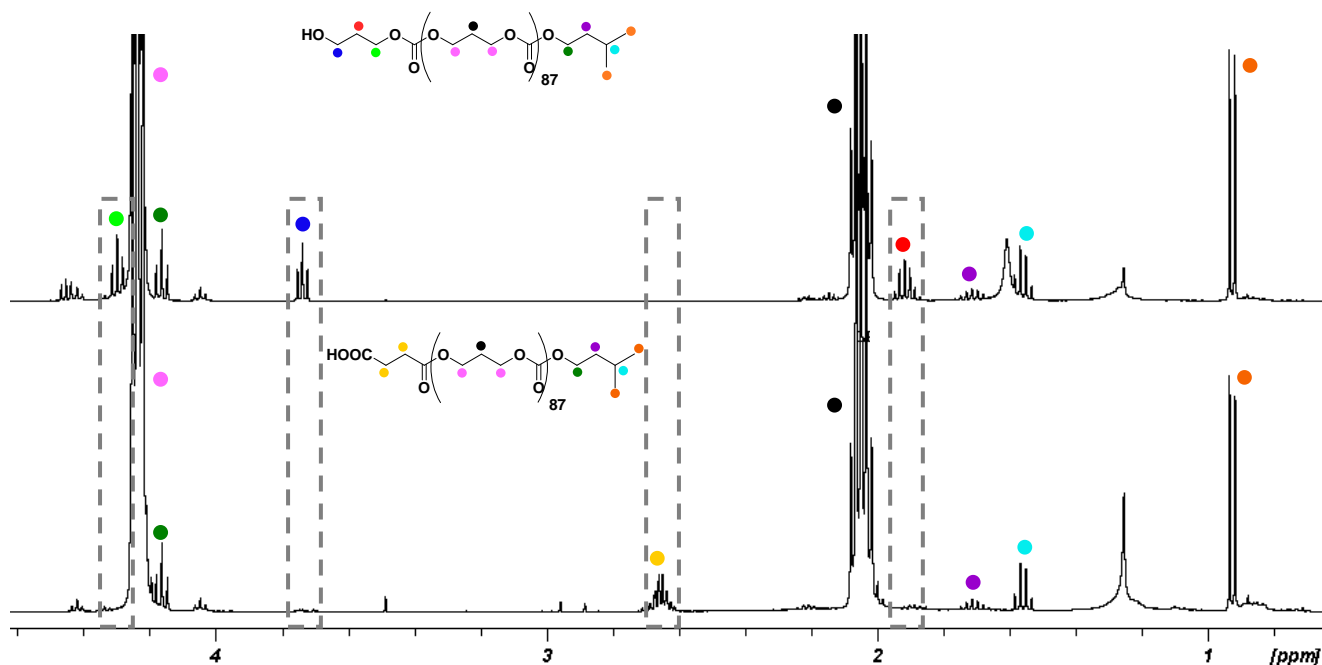


Figure 7 : Spectres RMN ^1H des $\text{PTMC}_{88}\text{-OH}$ (en haut) et $\text{PTMC}_{88}\text{-COOH}$ (en bas)

L'intégration du pic à 2,65 ppm est à 4, ce qui prouve la totale modification de bout de chaîne du segment PTMC.

2.1.3 Synthèse du PTMC fluorescent

Le but de ce projet est de tester nos systèmes sur cellules surexprimant le récepteur CXCR3. Il a donc été nécessaire de coupler nos systèmes avec une molécule fluorescente afin de pouvoir les détecter par fluorescence. Les cellules HEK293 au LAMC sont transfectées avec l'eGFP, elles sont donc visibles en vert ($\lambda_{\text{ex/em}} = 488/510$ nm). Un chromophore émettant dans une autre couleur que le vert a été nécessaire. La rhodamine cadaverine ($\lambda_{\text{ex/em}} = 544/571$ nm) semblait être un bon choix dans notre cas car les objets sont visibles en rouge et elle présente une amine libre pouvant être couplée à l'acide carboxylique en bout de chaîne du PTMC.

Son couplage avec le $\text{PTMC}_n\text{-COOH}$ est détaillé sur la figure 8 ci-dessous.

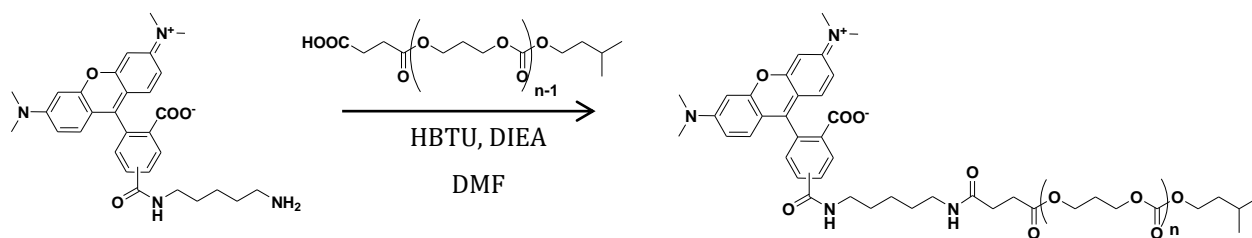


Figure 8 : Schéma réactionnel du couplage entre le PTMC_n-COOH et la rhodamine cadavérine

Cette réaction n'est réalisée que sur le PTMC₈₈-COOH car nous souhaitons avoir un DP proche de celui du PTMC₉₆-b-PEG₄₅ qui sera essentiellement utilisé au chapitre suivant.

La purification par dialyse dans l'eau est terminée une fois que l'eau n'est plus colorée car la Rhodamine cadaverine, de couleur violette, est soluble dans l'eau et diffuse à travers les pores de la membrane (membrane 3,5 kDa). Le produit pur est alors analysé par spectroscopie RMN ¹H où le décalage du pic correspondant aux protons en α du -COOH sur le PTMC est observé lorsque l'amide est formé.

2.2 Synthèse du bloc hydrophile PEG-SCH546738

2.2.1 Modification chimique du SCH546738

2.2.1.1 Structure et caractérisation du SCH546738

Le ligand SCH546738 est une molécule organique de faible masse molaire (491,2 g/mol) synthétisée à façon et fournit par ChemExpress (Chine). Il fait partie de la famille des pipérazinyl-pipéridine, dont l'affinité de liaison pour le récepteur CXCR3 a été démontrée.^{7,8} Sa structure chimique est représentée sur la figure 9 ci-dessous.

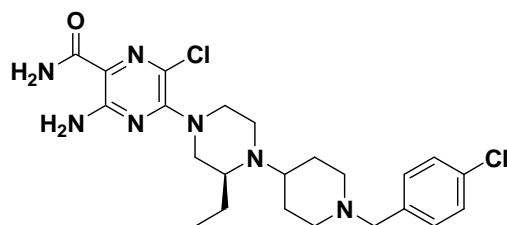


Figure 9 : Formule chimique du SCH546738

Selon la stratégie de synthèse choisie, cette molécule est introduite sur un segment PEG, il est donc nécessaire de la modifier chimiquement. Dans un premier temps, nous avons caractérisé la molécule, tout d'abord par spectrométrie de masse pour vérifier la masse molaire du composé fourni, puis par RMN (^1H , ^{13}C , COSY et HSQC) pour une confirmation de sa structure chimique. La RMN ^1H montre une molécule assez peu soluble dans les solvants deutérés testés (CDCl_3 et DMSO-d_6) au vu des signaux larges et mal définis (voir figure 10).

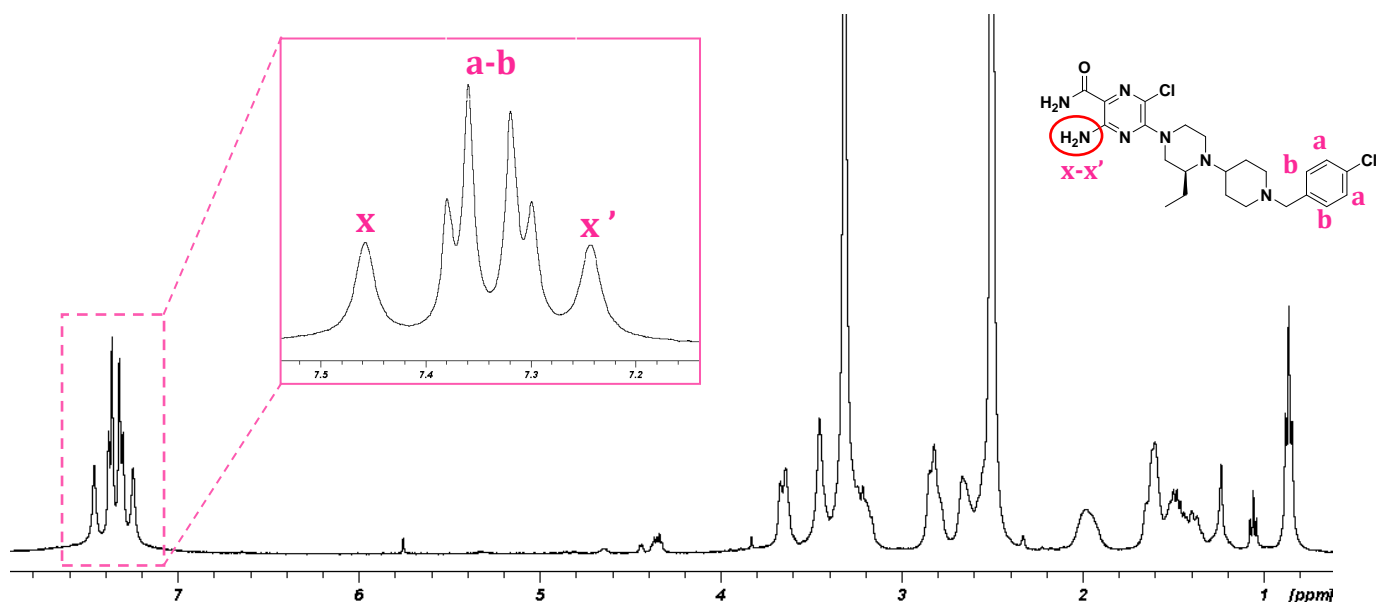


Figure 10 : Spectre RMN ^1H du SCH546738 dans le DMSO-d_6

Les spectres RMN ^1H ont été réalisés dans le CDCl_3 afin d'attribuer tous les signaux compris entre 0 et 4 ppm (voir figure S4) puis dans le DMSO deutéré pour visualiser les pics à 7,4 ppm (cachés par le pic de solvant dans CDCl_3) correspondants aux 4 protons

aromatiques (a et b) et aux 2 protons de l'amine aromatique (x et x'). Ces données sont importantes pour analyser et confirmer les futures modifications faites sur le SCH546738.

La solubilité de la molécule SCH546738 dans différents solvants a également été testée afin de déterminer le meilleur solvant de réaction. Le « Derived Count Rate », nombre de photons détectés par seconde et valeur dépendant de la concentration et de la taille des particules présentes dans le milieu, est obtenu par diffusion dynamique de la lumière (DLS) et permet de conclure sur la solubilité du SCH546738 (voir tableau 5).

| Concentration SCH546738/solvant | DMF | DMSO | THF | DCM | H ₂ O |
|---------------------------------|-------------|-------------|---------|-------------|------------------|
| 1 g/L | Soluble | Soluble | Soluble | Soluble | Non soluble |
| 5 g/L | Non soluble | Non soluble | Soluble | Non soluble | Non soluble |
| 10 g/L | Non soluble | Non soluble | Soluble | Non soluble | Non soluble |

Tableau 5 : Solubilité du SCH546738 dans différents solvants

Les observations sont faites grâce au « Derived Count Rate » calculés par la DLS (angle 90°C)

Le ligand SCH546738 est soluble à faible concentration dans les solvants organiques excepté pour le THF, où il est soluble aux trois concentrations testées. Ces tests confirment la lipophilie du SCH546738 car il est totalement insoluble dans l'eau à ces concentrations.

L'absorbance du SCH546738 a été observée par spectrophotométrie UV-Visible avec un maximum d'absorbance à 229 nm (voir figure S5). Les futures analyses, comme la SEC et l'HPLC, se feront avec une détection à 229 nm.

Les différents types de caractérisation réalisés ont permis de s'appropriier les différents types d'analyses pour les prochaines étapes de synthèse.

2.2.1.2 Les différentes tentatives de modification du SCH546738

Une fois la molécule SCH546738 bien caractérisée, la deuxième partie a été sa modification chimique. Etant donné que le but de ce projet est de tester nos systèmes sur le blocage du récepteur CXCR3, il est nécessaire de s'assurer que l'activité biologique de SCH546738 ne soit pas altérée lors de sa modification chimique. Une collaboration entre Merck et Ligand Pharmaceuticals aux Etats-Unis a permis une étude de l'activité biologique des différents dérivés de pipérazinyl-pipéridine, dont fait partie le SCH546738, et ont démontré que la modification de l'amine aromatique permettait toujours une activité de liaison à des concentrations de l'ordre du nanomolaire, ce qui a confirmé la faisabilité d'une accroche à cet endroit de la molécule (voir figure 11).⁹

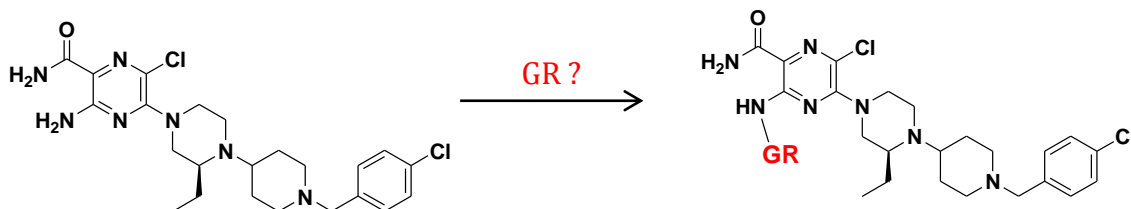


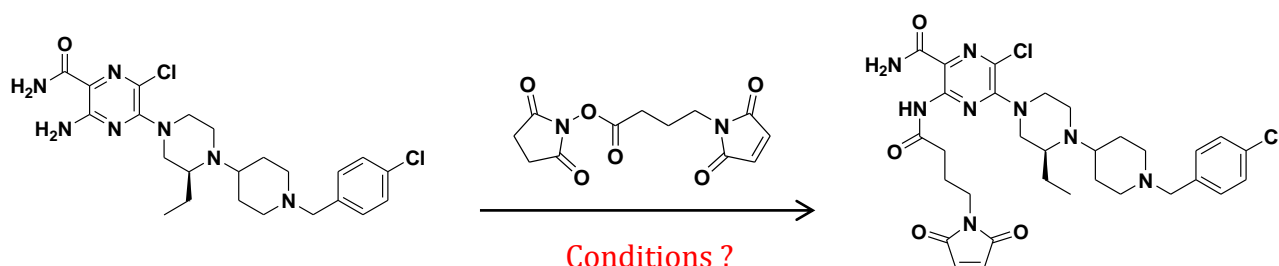
Figure 11 : Représentation schématique de la modification chimique du SCH546738

GR : Groupement Réactif

La stratégie a été d'utiliser un agent de couplage qui lierait le SCH546738 au niveau de l'amine aromatique, et le segment PEG. L'avantage avec le PEG commercial est qu'il est disponible avec de nombreuses fonctions en bout de chaînes différentes, ce qui permet une grande diversité d'agents. Cet agent de couplage doit donc présenter deux fonctions réactives à ses deux extrémités.

Le N- γ -maleimidobutyryl-oxysuccinimide (GMBS) a d'abord été testé car il présente une fonction ester activé qui peut réagir avec l'amine aromatique du SCH546738 pour créer un lien amide, et une fonction maléimide pouvant réagir avec un thiol en bout de chaîne du segment PEG. Cependant, un couplage sur ce type d'amine (fausse amine primaire dû à la forte délocalisation des électrons) n'est pas très courant dû au pKa du noyau aminopyrazine qui est aux alentours de 26.

Le GMBS est très souvent couplé dans des tampons comme l'HEPES,¹⁰ or le SCH546738 n'y est pas soluble, c'est pourquoi, plusieurs conditions de formation d'amide en milieu organique ont été testées sur le GMBS en changeant le solvant, la base, ou encore la température et sont résumées dans le tableau 6 suivant.



| Test | GMBS | NEt ₃ (pKa=11) | KOH _{aq} (pKa=15) | NaH (pKa=35) | LDA (pKa=40) | DMAP | T° | Solvant | Couplage ? |
|------|--------|------------------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|--------|------|---------|------------|
| 1. | 1,2 éq | - | - | - | - | - | 60°C | DMSO | ☒ |
| 2. | 2 éq | 2 éq | - | - | - | - | 60°C | DMSO | ☒ |
| 3. | 2 éq | 2 éq | - | - | - | - | TA | DMSO | ☒ |
| 4. | 5 éq | 20 éq | - | - | - | - | TA | DMSO | ☒ |
| 5. | 2 éq | - | 1,5 éq | - | - | - | TA | DMSO | ☒ |
| 6. | 1,3 éq | - | - | - | 1,1 éq | - | TA | DMSO | ☒ |
| 7. | 2 éq | - | - | 2 éq | - | - | TA | THF | ☒ |
| 8. | 2 éq | - | - | - | - | 0,2 éq | TA | THF | ☒ |

Tableau 6 : Conditions réactionnelles pour la modification chimique du SCH546738 avec le GMBS

TA : Température Ambiante ; Réactions réalisées sous atmosphère inerte ; Nombre d'équivalents par rapport au SCH546738 ;
Concentration de SCH546738 : 10mg/mL

Afin de visualiser un éventuel couplage entre le GMBS et le SCH546738, les pics aux alentours de 7,4 ppm sur le spectre RMN ¹H du SCH546738 dans le DMSO qui intègrent pour 6 protons (voir spectre Figure 10) sont suivis ainsi qu'une possible modification de temps de rétention du pic du SCH546738 sur les chromatogrammes HPLC.

Pour la première réaction, en absence de base, le spectre RMN ¹H et chromatogramme HPLC montrent la présence du GMBS et du SCH546738 dans le milieu mais sans couplage apparent. L'ajout de triéthylamine (NEt₃) ou d'hydroxyde de potassium aqueux

(KOH_{aq}) ne permet pas le couplage, toutefois on observe la disparition des pics correspondants au GMBS que ce soit sur les analyses HPLC ou RMN ¹H. Le GMBS semble se dégrader en présence de base. La réaction a été également réalisée en boîte à gants en présence de NEt₃ distillé ou de Diisopropylamidure de lithium (LDA) qui est une base forte (pKa = 40), cependant le constat est le même.

Afin d'éliminer la possibilité de l'instabilité de l'agent de couplage GMBS, d'autres réactifs commerciaux possédant une fonction réactive ont alors été utilisés¹¹ : le PEG₄₅-NHS afin d'accrocher directement le PEG sans utiliser d'agent de couplage ; un chlorure d'acyle, le chlorure de Nitro-4-benzoylé ; un acide aminé, le Fmoc-β-Ala-OH et enfin un anhydride, l'anhydride acétique (voir tableau 7).





| Test | Réactifs | KOH _{aq} (pKa=15) | LDA (pKa=40) | DIEA/HBTU (pKa=10,6) | T (°C) | Couplage ? |
|------|----------------------------------|-------------------------------|-----------------|-------------------------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 9. | PEG ₄₅ -NHS 1,1 éq | - | 1,1 éq | - | TA |  |
| 10. | Chlorure de 4-pentynoyle 4 éq | 1,2 éq | - | - | TA |  |
| 11. | Fmoc-β-Ala-OH 2 éq | - | - | 4 éq | TA |  |
| 12. | Anhydride acétique 4 éq | 1,2 éq | - | - | TA |  |

Tableau 7 : Modification du SCH546738 en présence de différents réactifs

TA : Température Ambiante ; Réactions réalisées sous atmosphère inerte ; Nombre d'équivalents par rapport au SCH546738

La réaction entre le SCH546738 et le PEG-NHS réalisée en présence de LDA a été menée sous atmosphère inerte. Le spectre RMN ¹H du milieu réactionnel dénote un massif à 7,4 ppm qui intègre pour 5 protons au lieu de 6 dans le cas du SCH546738. Le chromatogramme d'HPLC ne montre toutefois pas l'apparition d'un nouveau produit de réaction. La réaction avec le chlorure d'acyle en présence de KOH_{aq} ou l'acide aminé en présence de la base Diisopropyléthylamine (DIEA) et du réactif de couplage (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU), tous les deux utilisés dans la formation d'amide, ne conduit pas non plus au couplage.¹²

Le SCH546738 a également été placé en solution avec l'acide 4-pentynoïque dans le DMF en présence du 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC), qui fait partie de la famille des carbodiimides souvent utilisée pour la création de fonction amide,¹³ de l'Hydroxybenzotriazole (HOBt) qui permet d'augmenter l'efficacité de la réaction et du 4-diméthylaminopyridine (DMAP) pour catalyser la réaction.¹⁴ Ces conditions ne permettent cependant pas le couplage des deux molécules.

Toutefois, la réaction entre le SCH546738 et l'anhydride acétique en présence de KOH_{aq} (réaction 12) montre un massif à 7,4 ppm intégrant pour 5 protons sur le spectre RMN ^1H et le chromatogramme en HPLC montre l'apparition d'un nouveau produit à un temps de rétention plus élevé qui n'appartient ni au SCH546738 ni à l'anhydride acétique (voir figure 12).

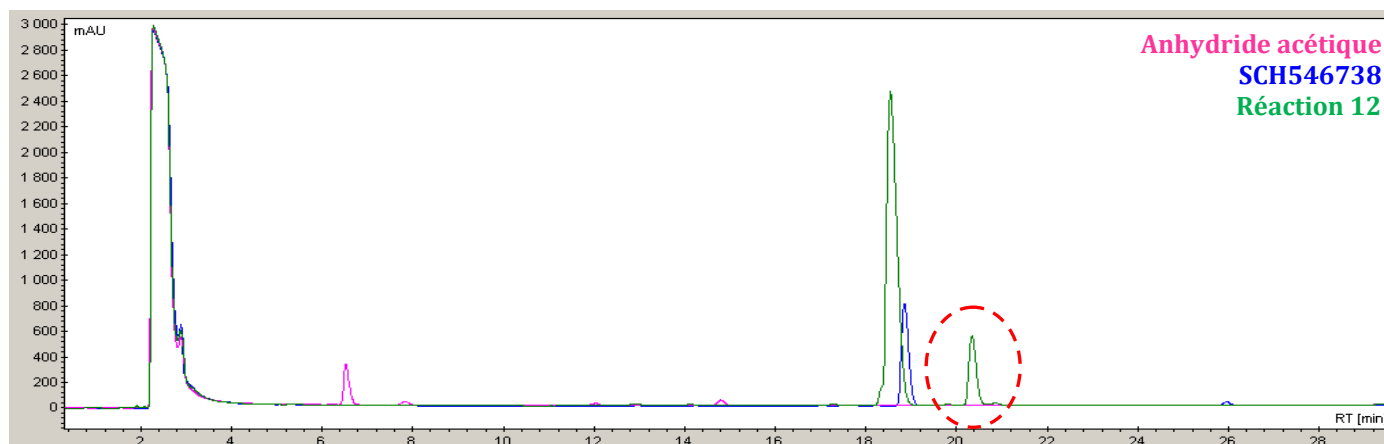


Figure 12 : Superposition des chromatogrammes HPLC de l'anhydride acétique, du SCH546738 et de la réaction entre les deux molécules (réaction 12)

Gradient 10-50% CH_3CN – 1mL/min – 30 minutes d'enregistrement – 229 nm

L'acétylation a été confirmée par une analyse LC/MS (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry), qui permet d'allier chromatographie liquide et spectrométrie de masse, afin d'obtenir une corrélation entre le spectre de masse et le temps de rétention (voir figure 13). Les temps de rétention sont différents car la colonne utilisée en LC/MS est différente.

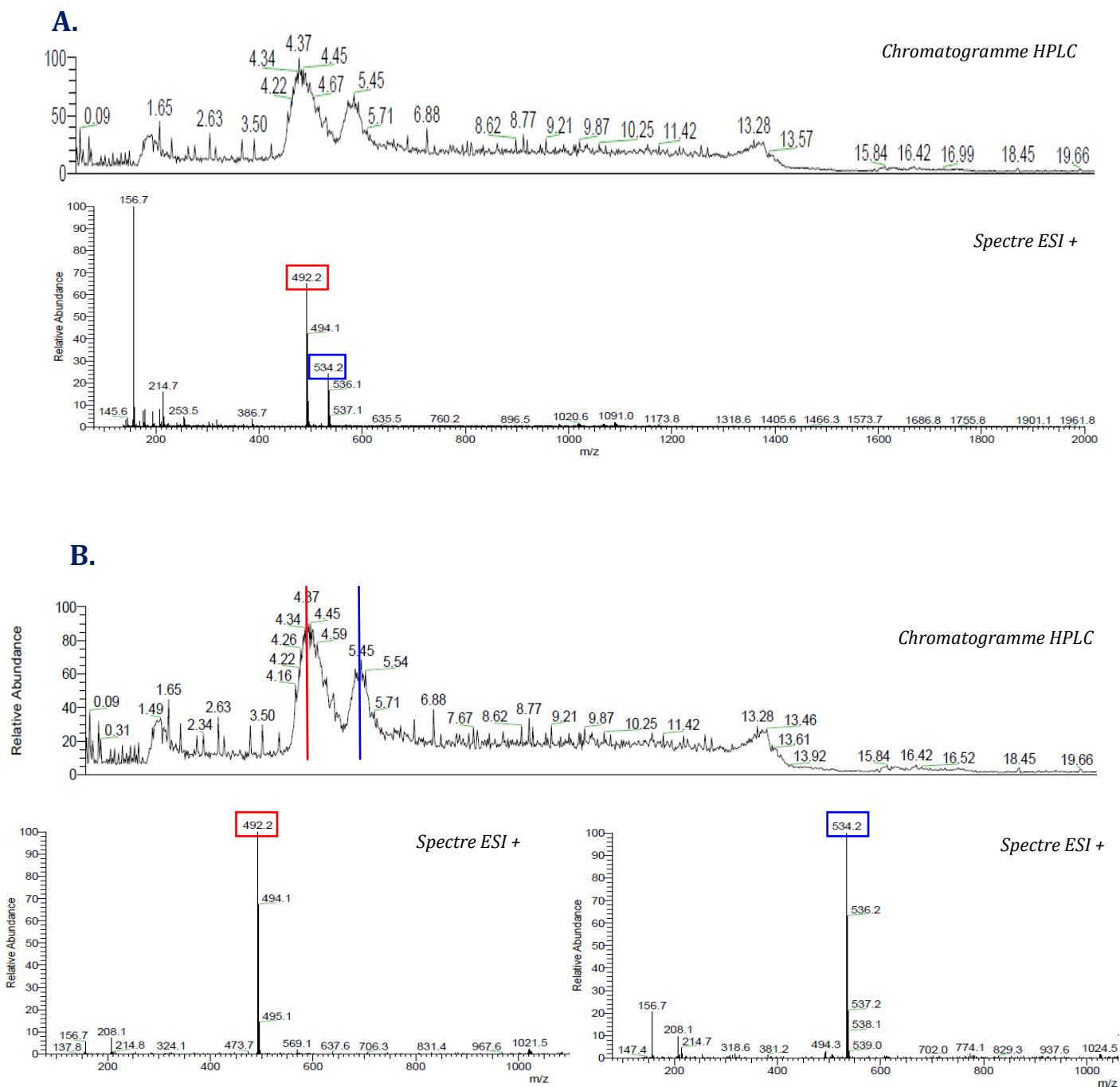


Figure 13 : Analyse LC/MS du brut de la réaction 12

A. LC/MS complet du brut de réaction ; **B.** LC/MS selon chacun des deux pics

Cette analyse de LC/MS permet de définir que le premier produit au temps de rétention de 4,4 min possède un $m/z = 492,2$ g/mol (pic mono chargé $[M+H]^+$) et correspond donc au réactif non modifié SCH546738 (MW = 491,2 g/mol). Le second au temps de

réretention de 5,5 min possède un $m/z = 534,2$ g/mol qui correspond bien à la forme acétylée du SCH546738 (SCH546738-Ac) ce qui confirme sa présence.

Le mélange réactionnel, produit en grande quantité, a été purifié par HPLC préparative (gradient 10-50% CH_3CN), afin d'isoler le SCH546738-Ac pour tester son activité biologique au Laboratoire de l'Angiogenèse et du Microenvironnement des Cancers (LAMC). Il est important de s'assurer que l'acétylation n'ait pas altérée son affinité de liaison pour le récepteur CXCR3 (voir résultats au chapitre 4).

Parmi toutes les tentatives de modification du SCH546738 testées, la seule réaction qui a conduit à son acétylation est celle en présence d'un anhydride, bien qu'une conversion de 10-15% soit très faible. L'anhydride acétique utilisée dans cette réaction test ne présentant pas de fonctions réactives pour coupler le segment PEG, nous avons donc choisi d'utiliser cette même stratégie en employant un anhydride possédant une fonction réactive.

2.2.1.3 Fonctionnalisation du SCH546738 avec une fonction alcyne

Le choix s'est porté sur un anhydride comportant une fonction alcyne, permettant le couplage à un segment PEG comportant un bout de chaîne azide par cycloaddition. L'anhydride alcyne n'étant pas commercial, il a donc été préalablement synthétisé selon la réaction illustrée en figure 14.

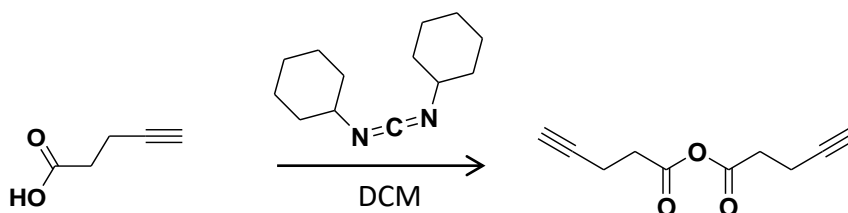


Figure 14 : Schéma réactionnel de la synthèse de l'anhydride alcyne

La synthèse est assez minutieuse car l'anhydride est très sensible à l'air, c'est pourquoi il est synthétisé et purifié (élimination de la dicyclohexyl-urée DCU formée) sous atmosphère inerte. Il est directement ajouté à la solution SCH546738 / KOH_{aq} dans le DMSO anhydre (voir figure 15).

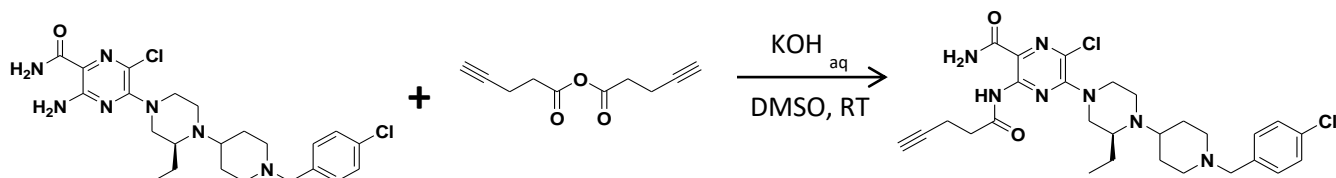


Figure 15 : Fonctionnalisation du SCH546738 par un groupement alcyne

Cette synthèse est également réalisée sous atmosphère inerte afin d'éviter que l'anhydride se dégrade avant de pouvoir réagir. Bien que l'anhydride s'hydrolyse en présence d'eau, le KOH aqueux est toutefois nécessaire au couplage car son analogue KOH dans le DMSO anhydre n'est pas aussi efficace. L'anhydride alcyne est obtenu au bout de 7 heures et le couplage entre ce dernier et le SCH546738 est lancé en suivant. Le couplage est contrôlé par HPLC après environ 16 heures de réaction. Les différents tests avec des temps de réactions plus importants ne montrent pas de changements quant au rendement de la réaction (voir figure 16).

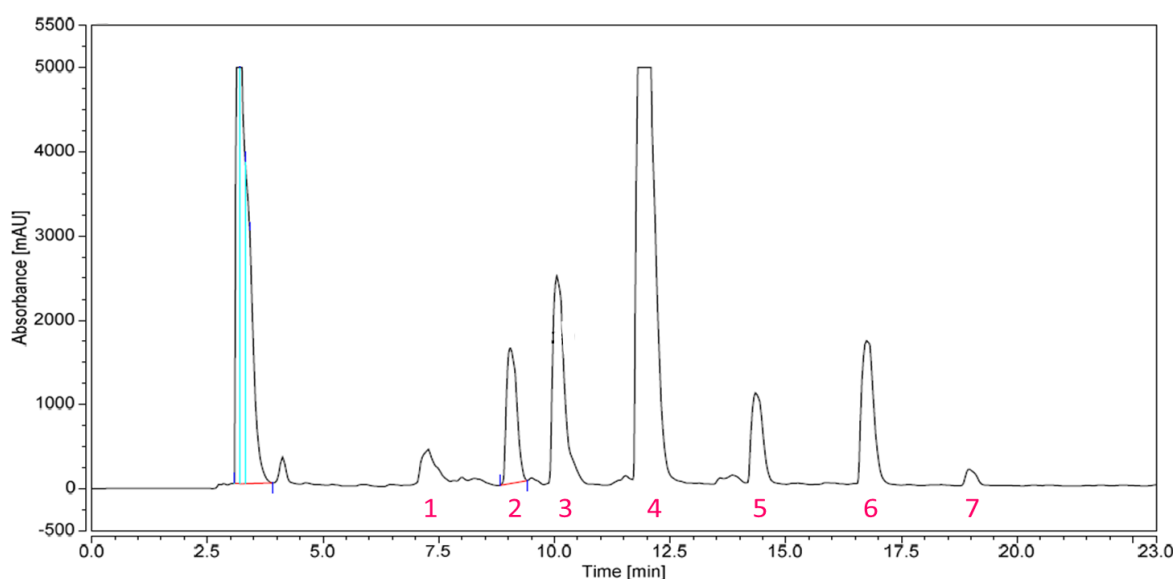


Figure 16 : Chromatogramme HPLC du brut de réaction du SCH546738-alcyne

HPLC préparative – Gradient 20-50% CH₃CN – 1 mL/min – 20 minutes de RUN – 229 nm

Le brut de réaction a été purifié par HPLC préparative où les composés des différentes fractions ont été récupérés séparément et analysés par spectrométrie de masse. La fraction 4 correspond au SCH546738 n'ayant pas réagi, cependant les fractions 5 et 6 ont toutes les deux une masse $[M+H]^+ = 572,2$ g/mol correspondant au SCH546738-alcyne attendu. L'hypothèse serait un couplage sur l'amine aromatique et sur l'amide aromatique, en sachant que ces deux types de modification conduiraient à des composés de même masse molaire. Les produits isolés par HPLC préparative ont l'avantage d'être purs mais une grande quantité de produit est perdue pendant les purifications, dû au manque de solubilité du SCH546738 dans l'eau et dans l'acétonitrile. Le rendement de la réaction étant faible, il a seulement été possible de récupérer une quantité suffisante pour analyser davantage la fraction 6 contrairement à la fraction 5.

La fraction 6 a été analysée par spectroscopie RMN 1D (RMN ^1H) et 2D (COSY, HMBC ^1H - ^{13}C et HSQC ^1H - ^{13}C et ^1H - ^{15}N). Ces analyses ont permis de déterminer l'attribution principale de la molécule (voir figure S6) mais la seule analyse qui a permis de conclure que le couplage était sur l'amine aromatique est l'HMBC ^1H - ^{15}N , qui s'intéresse aux couplages en J^2 ou J^3 entre les protons et les azotes (voir figure 17).

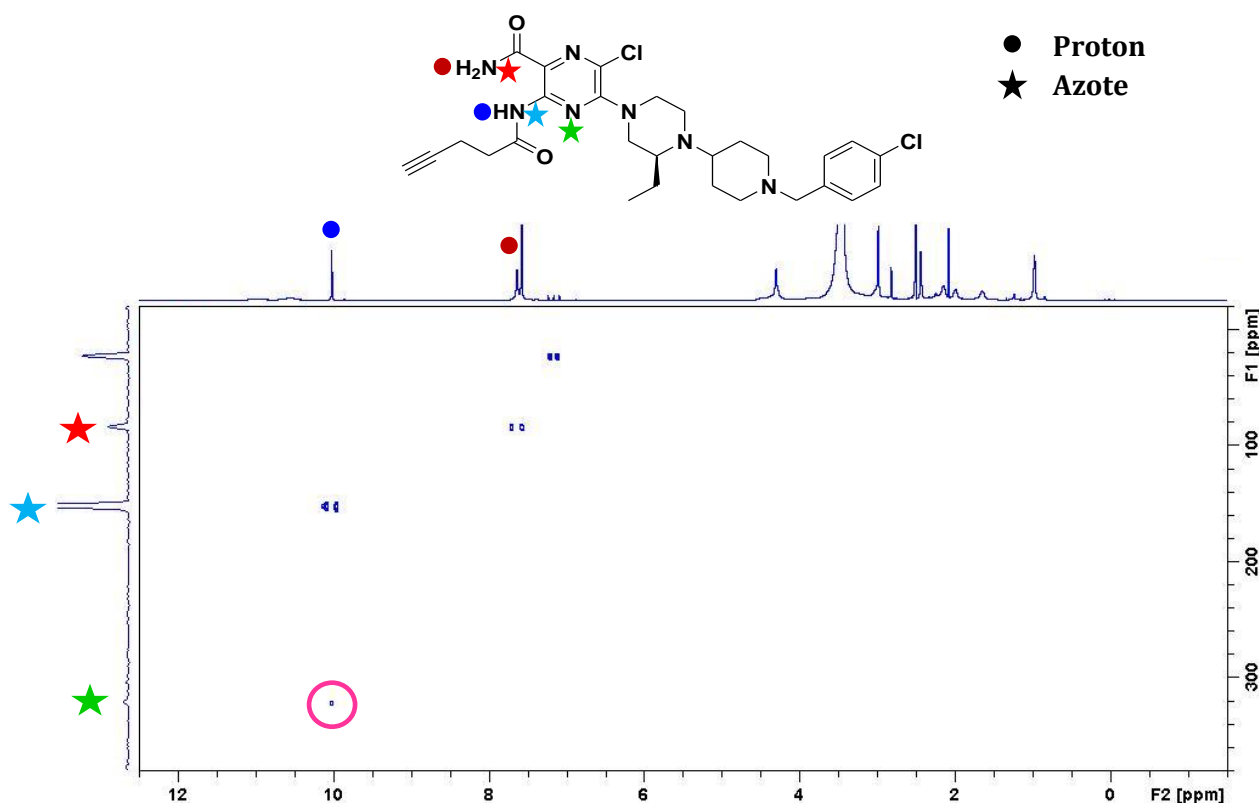


Figure 17 : Spectre HMBC ^1H - ^{15}N du SCH546738-alcyne (fraction 6) purifié par HPLC préparative

Le spectre HMBC ^1H - ^{15}N révèle le couplage entre l'azote à 320 ppm (symbolisé par une étoile verte) et le proton à 10 ppm qui se situe sur l'azote de l'ancienne amine aromatique (symbolisé par un rond bleu). Ceci confirme le couplage de l'anhydride alcyne au niveau de l'amine aromatique du SCH546738 et non de l'amide aromatique. La fraction 5 serait peut-être le résultat du couplage de l'anhydride sur l'amide aromatique du SCH546738 mais sans analyses complémentaires, il est impossible de le confirmer.

Comme observé précédemment, le SCH546738-alcyne est obtenu avec un faible rendement (10-15%). De nombreuses modifications des conditions de réaction ont été testées afin d'augmenter le taux de conversion et le rendement comme la température, la nature du solvant, la concentration en SCH546738 et la base (voir tableau 8).

| Changements des conditions | | Couplage | Rendement augmenté ? * |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------|----------|------------------------|
| Température | <i>TA</i> | Oui | |
| | 40 °C | Oui | Non |
| | 60°C | Oui | Non |
| Solvant (anhydre) | <i>DMSO</i> | Oui | |
| | <i>THF</i> | Non | / |
| | <i>DCM</i> | Non | / |
| | <i>DMF</i> | Non | / |
| Concentration en SCH546738 (dans le DMSO) | 10 mg/mL | Oui | |
| | 1 mg/mL | Non | / |
| Base | <i>KOH_{aq} (80 mg/mL eau)</i> | Oui | |
| | <i>KOH_{aq} (40 mg/mL eau)</i> | Oui | Non |
| | <i>KOH_{aq} (500 mg/mL eau)</i> | Oui | Non |
| | <i>KOH_{DMSO} (80 mg/mL DMSO)</i> | Oui | Non |
| | <i>NEt₃</i> | Non | / |
| | <i>NEt₃ + DMAP</i> | Non | / |
| | <i>NaH</i> | Non | / |

Tableau 8 : Modification des conditions de réaction pour obtenir le SCH546738-alcyne

Les valeurs en rouge sont les conditions utilisées au départ (figure 15) ;

* Le rendement est comparé au rendement obtenu avec les valeurs en rouge.

Le changement de température ne joue pas sur la réaction alors que le changement de solvant ou de concentration en SCH546738 ne conduit plus au couplage.

Le fait d'utiliser le KOH dissous dans le DMSO à la place de l'eau, diminue considérablement le rendement de la réaction, ce qui n'est pas cohérent dû à la dégradation d'un anhydride dans l'eau. De même, plus la concentration de KOH dans l'eau est importante plus le taux de conversion augmente, bien que le rendement à 500 mg/mL soit sensiblement le même qu'à 80 mg/mL.

L'utilisation du micro-onde en présence de NEt_3 dans DMF ne permet pas de coupler l'anhydride alcyne au SCH546738.

Finalement, les seules conditions réactionnelles qui permettent d'obtenir le meilleur rendement est le SCH546738 à une concentration de 10 mg/mL dans le DMSO anhydre en présence de KOH_{aq} à 80 mg/mL dans l'eau à température ambiante et sous atmosphère inerte.

Cette réaction a été réalisée dans les mêmes conditions mais avec une molécule commerciale, présentant également une amine aromatique, le 3,5-diméthoxyaniline, à la place du SCH546738. Elle présente un rendement quasi-total ce qui prouve le manque de réactivité qui vient du SCH546738 dans ce projet et nous conforte dans l'idée qu'il est difficile de pouvoir améliorer ce rendement.

L'étape suivante a consisté en la purification du SCH546738-alcyne. L'HPLC préparative permet de récupérer des fractions pures mais trop de produit est perdu. Une chromatographie préparative sur plaque de verre a alors été utilisée. La grande majorité du DMSO a tout d'abord été éliminé par ajout d'eau suivi d'une lyophilisation. Plusieurs tests d'élution sur chromatographie sur couche mince (CCM) ont été réalisés et la séparation du SCH546738 et du SCH546738-alcyne est la meilleure en présence du mélange acétone:toluène (50:50) et NEt_3 . Sous lampe UV, il est possible de récupérer la silice de la plaque en verre et d'isoler la fraction désirée. Après traitement au THF, le produit pur est récupéré mais encore une fois cette technique n'est pas adaptée car il n'est possible de déposer qu'une équivalence de 5 mg de produit sur la plaque de chromatographie préparative et de ne purifier qu'une faible quantité. De plus, une

tentative de recyclage du SCH546738 non réagi puis son engagement dans une nouvelle réaction, ne conduit plus à sa fonctionnalisation par l'anhydride.

Il a donc été décidé de continuer les étapes de synthèse sans purification préalable. Le SCH546738 non fonctionnalisé est « inerte » et ne réagira pas dans le couplage du SCH546738-alcyne et du PEG-azide. Cependant, l'anhydride alcyne qui a été mis en large excès redevient sous forme acide et pourrait venir se coupler avec le PEG-azide et créer deux populations différentes de PEG fonctionnalisé. Il est donc nécessaire de s'en affranchir et pour cela une CRYO-distillation sous vide statique du brut de réaction en présence d'eau a été réalisée. Lorsque la première CRYO-distillation est terminée, un large excès d'eau est rajouté dans le brut de réaction et une nouvelle distillation est lancée jusqu'à ce que l'eau récupérée ne contienne plus d'acide 4-pentynoïque (contrôlé par pH et par CCM). En effet, cet acide au faible poids moléculaire a une faible température d'ébullition et permet d'être éliminé par cette méthode.

Finalement, malgré les nombreuses tentatives de fonctionnalisation du SCH546738 et de modifications des conditions de réactions pour augmenter le taux de conversion, le SCH546738-alcyne n'est obtenu qu'en présence d'anhydride alcyne (voir schéma réactionnel figure 15).

2.2.2 Couplage du bloc PEG et du SCH546738-alcyne par « chimie click »

Le couplage du segment PEG à extrémités azide et amine ($\text{NH}_2\text{-PEG}_{45}\text{-N}_3$) et du SCH546738-alcyne précédemment synthétisé est réalisé par cycloaddition de Huisgen, appelé également « chimie click » en présence de sulfate de cuivre (Cu^{II}) et d'ascorbate de sodium (voir figure 18).¹⁵

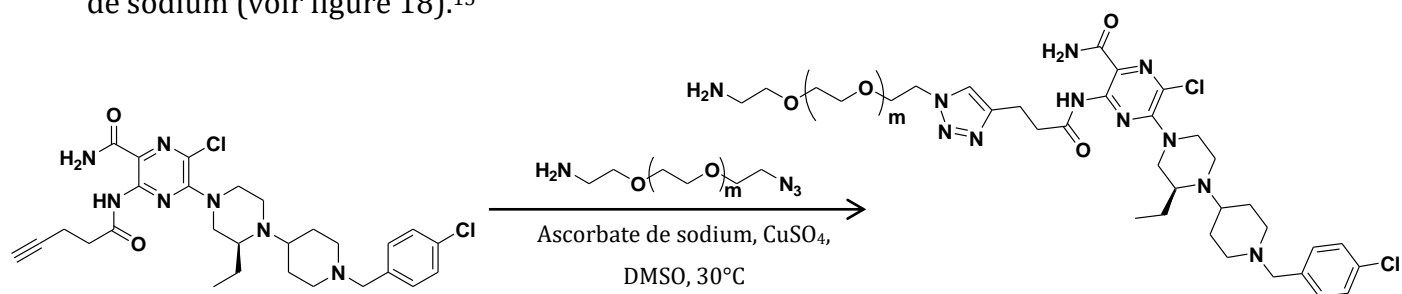


Figure 18 : Schéma réactionnel de la synthèse du PEG-SCH546738

Une première tentative de réaction a été de placer le PEG en excès, cependant cela a compliqué la purification. Effectivement, par analyse CCM dans différents éluants, il semblerait que le PEG-SCH546738 et le bloc PEG en excès migrent à la même vitesse ce qui empêche une purification par colonne de silice. De même, les deux masses molaires étant trop proches, une purification par dialyse a été impossible.

Le SCH546738-alcyne est alors utilisé en excès (basé sur le rendement estimé par HPLC). Ainsi, une purification par dialyse contre de l'eau (membrane 1 kDa) en présence d'EDTA peut être réalisée permettant de complexer le cuivre et de l'éliminer ainsi que le DMSO. Une ultrafiltration dans l'eau (membrane 1 kDa) est cependant utilisée en remplacement pour un gain de temps et d'efficacité.

Le composé obtenu après lyophilisation est analysé par spectroscopie infrarouge où la disparition du pic à 2100 cm^{-1} correspondant à l'azide du segment PEG est observée (voir figure S7). De même, par RMN ^1H dans le DMSO- d_6 , l'apparition du pic à 7,7 ppm correspondant au proton du triazole formé est constatée (voir figure S8).

Les analyses de SEC dans le THF montre cependant la présence du SCH546738 et du SCH546738-alcyne en excès qui n'ont pas été éliminés par ultrafiltration dans l'eau dû à leur manque de solubilité (voir figure S9).

Une purification par SEC préparative dans le THF permet d'obtenir un PEG-SCH546738 pur, cependant énormément de produit est perdu par cette technique. Le couplage de ce dernier avec le segment PTMC est alors réalisé sans purification préalable.

2.3 Couplage des blocs PTMC et PEG-SCH546738

Le copolymère à bloc fonctionnalisé PTMC-*b*-PEG-SCH546738 est obtenu par le couplage amide entre le bloc hydrophobe PTMC, fonctionnalisé avec un acide carboxylique, et le bloc hydrophile PEG-SCH546738, fonctionnalisé avec une amine comme présenté sur la figure 19 ci-dessous.

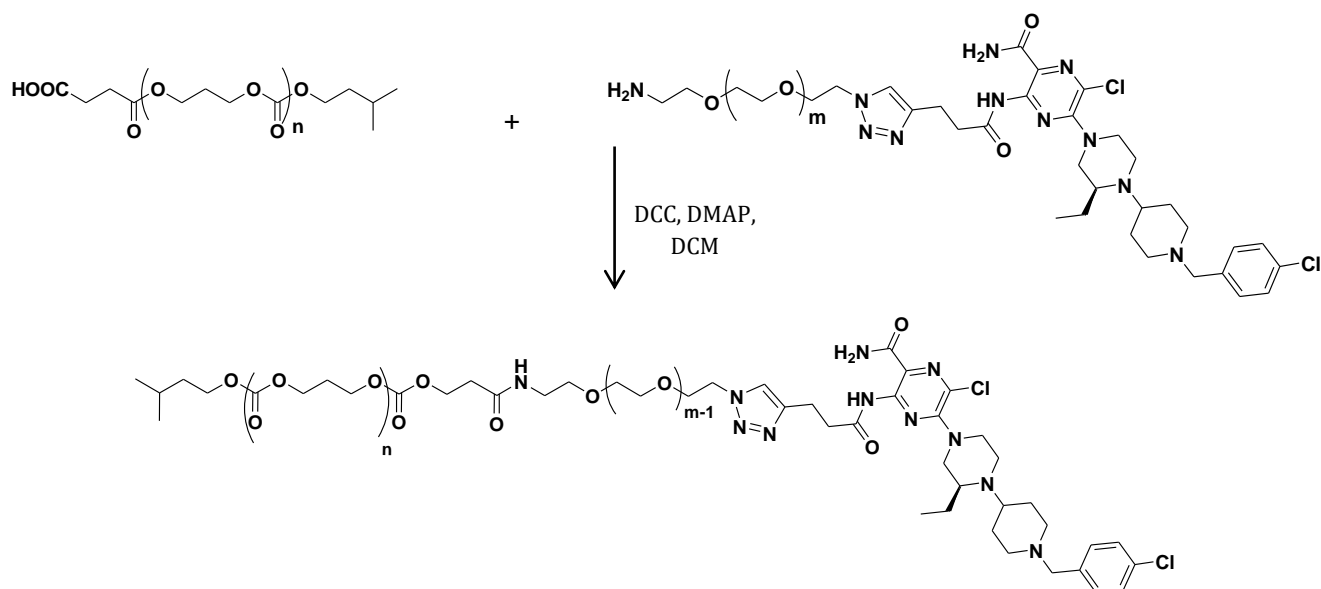


Figure 19 : Schéma réactionnel de la synthèse du PTMC-*b*-PEG-SCH546738

L'avancement de la réaction est suivie par CCM dans différents éluants (DCM/MeOH 95/5 et 88/12 ; Toluène/Acétone 50/50) mais il est cependant impossible de dissocier le PEG-SCH546738 (mis en excès) et le PTMC-*b*-PEG-SCH546738 formé.

Le produit a toutefois été analysé par RMN ^1H après 24 heures de réaction, où le décalage du pic correspondant aux protons en α de la fonction carboxylique est observé, ce qui prouve la formation de l'amide et donc du copolymère attendu. La comparaison des spectres RMN ^1H du PTMC₈₈-COOH et du PTMC₈₈-*b*-PEG-SCH546738 est illustrée sur la figure 20 ci-dessous.

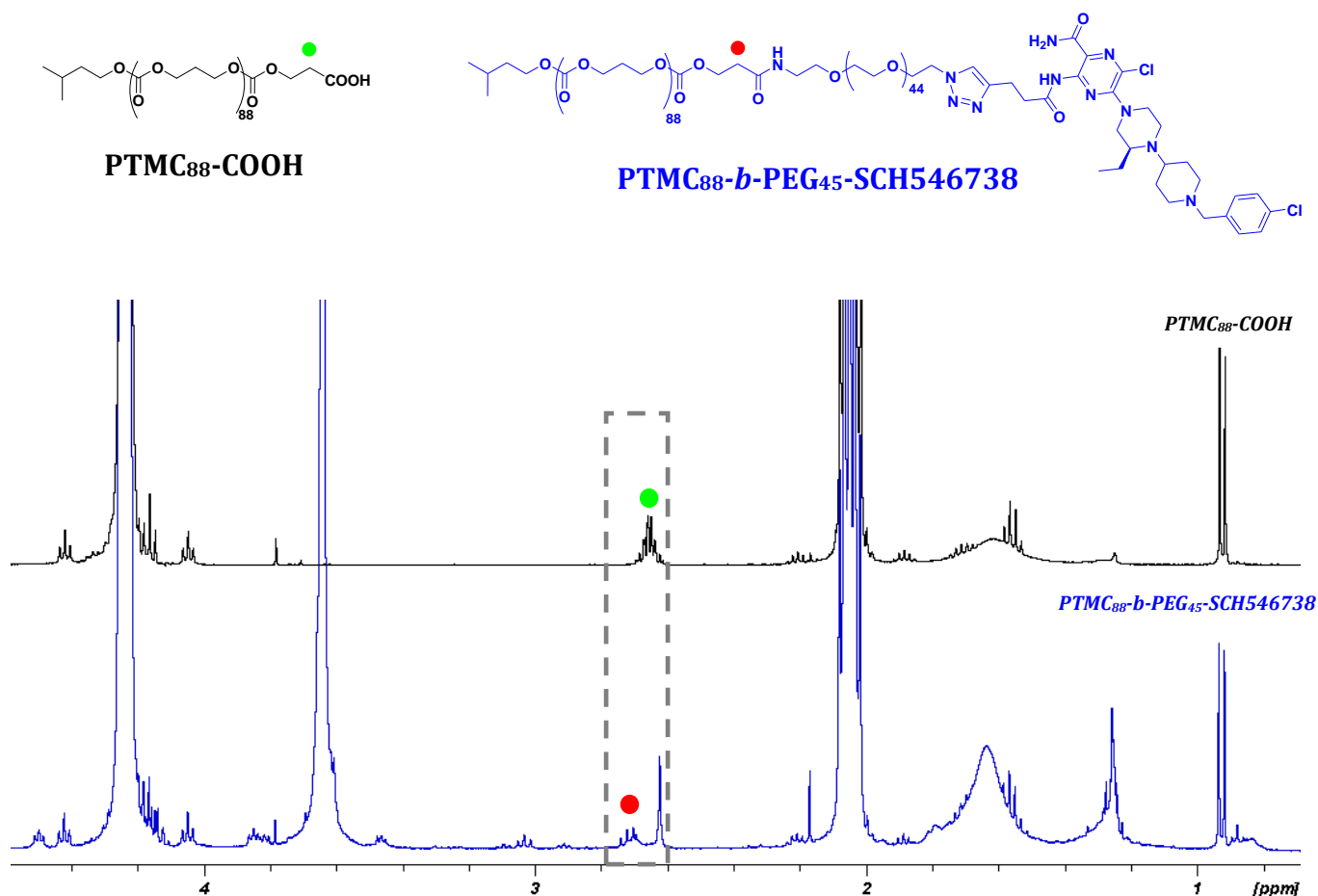


Figure 20 : Spectres RMN ^1H du $\text{PTMC}_{88}\text{-COOH}$ et du $\text{PTMC}_{88}\text{-}b\text{-PEG}_{45}\text{-SCH546738}$ dans le CDCl_3

Le produit purifié par HPLC préparative est également analysé par RMN DOSY (voir figure 21 et tableau 9).

La RMN DOSY est une expérience de RMN à deux dimensions où l'une des dimensions correspond aux déplacements chimiques RMN (δ en ppm - axe horizontal) et l'autre aux coefficients de diffusion D (m^2/s - axe vertical).

En règle générale, l'acquisition d'une expérience DOSY consiste à collecter une série de spectre 1D PFG-SE (Pulse Field Gradient Spin Echo / expérience d'écho de spin à gradients de champs pulsés) en faisant varier systématiquement l'amplitude des impulsions de gradient et en gardant le délai de diffusion (Δ) constant. L'intensité des signaux recueillis pour chaque espèce diffusante de l'échantillon, est atténuée selon une décroissance exponentielle en $(-q^2 \Delta D)$, où q est directement proportionnel à l'intensité des gradients utilisés qui est la même pour tous les composants de l'échantillon.

Ainsi, l'atténuation des signaux ne dépend que du coefficient de diffusion D de chacune des espèces. Le D peut donc être estimé par l'analyse de la décroissance exponentielle du signal car les signaux de petites molécules (D élevé) diminuent plus rapidement que ceux des grosses molécules (D faibles). En effet, le coefficient de diffusion D dépend de la masse molaire des molécules et d'autres propriétés hydrodynamiques (taille, forme, charge) ainsi que de son environnement (température, état d'agrégation).

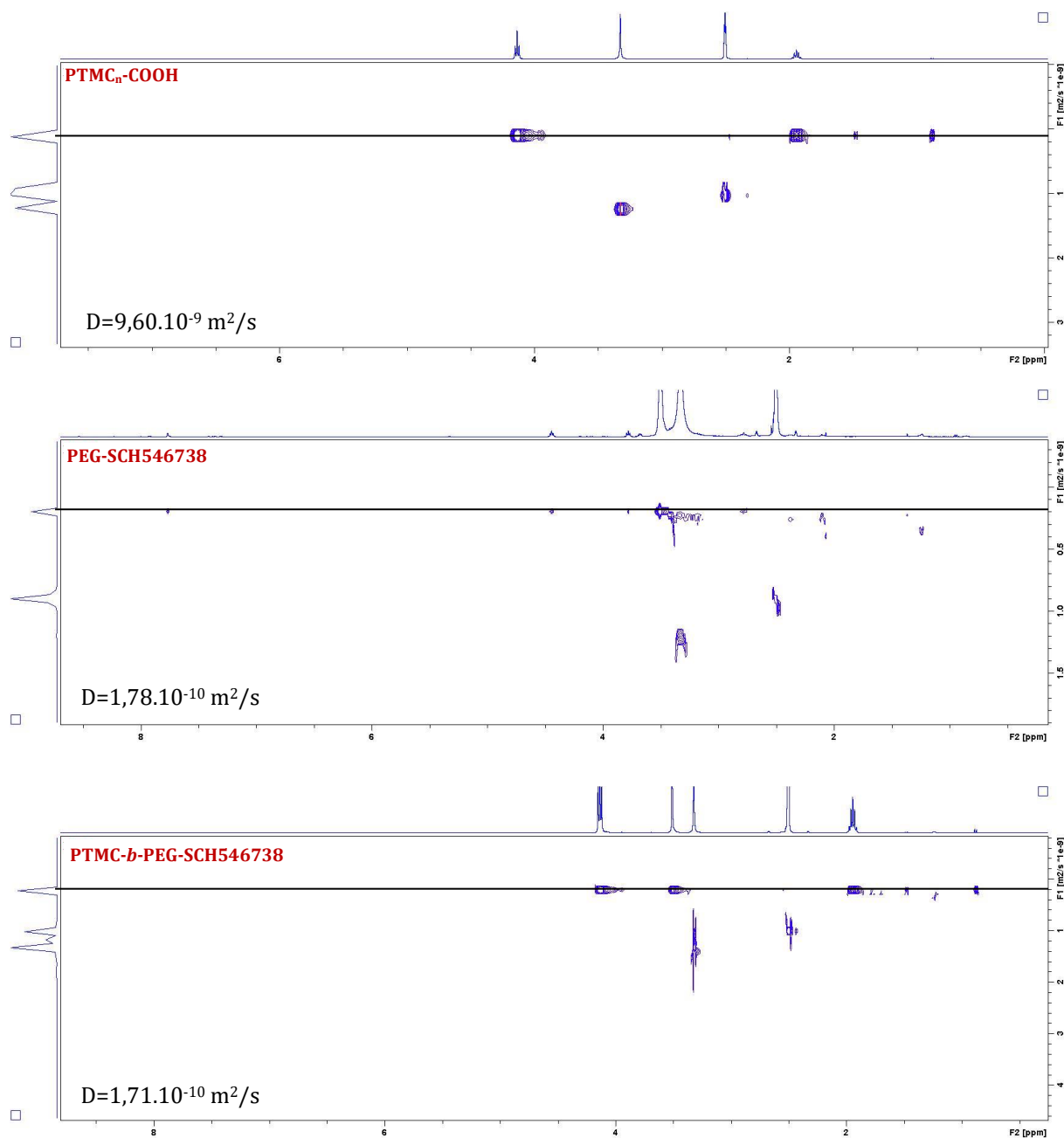


Figure 21 : Spectres RMN DOSY des différentes molécules impliquées dans la synthèse du PTMC-*b*-PEG-SCH546738

| | PTMC-COOH | PEG-SCH546738 | PTMC- <i>b</i> -PEG-SCH546738 |
|------------------------------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------------|
| Coefficient de diffusion D (m ² /s) | 9,60.10 ⁻⁹ | 1,78.10 ⁻¹⁰ | 1,71.10 ⁻¹⁰ |

Tableau 9 : Coefficients de diffusion des différentes espèces déterminés par RMN DOSY

Dans cette analyse, le coefficient de diffusion D du PTMC-*b*-PEG-SCH546738 est plus faible que celui du PTMC_n-COOH, ce qui est cohérent étant donné que sa masse molaire est plus importante. Cependant, le D est sensiblement le même dans le cas du PTMC-*b*-PEG-SCH546738 et du PEG-SCH546738 alors que les masses molaires sont très différentes.

Afin de s'assurer que le couplage ait bien eu lieu, 0,1 équivalents de PEG-SCH546738 a été rajouté dans le tube RMN contenant le PTMC-*b*-PEG-SCH546738 et un spectre RMN DOSY a été réalisé (voir figure 22).

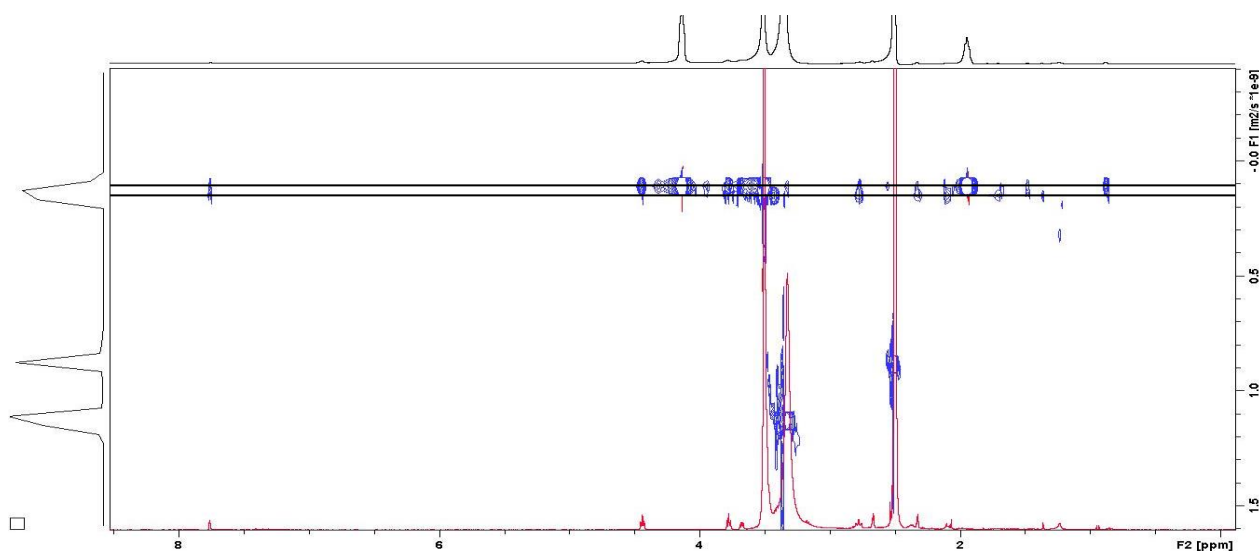
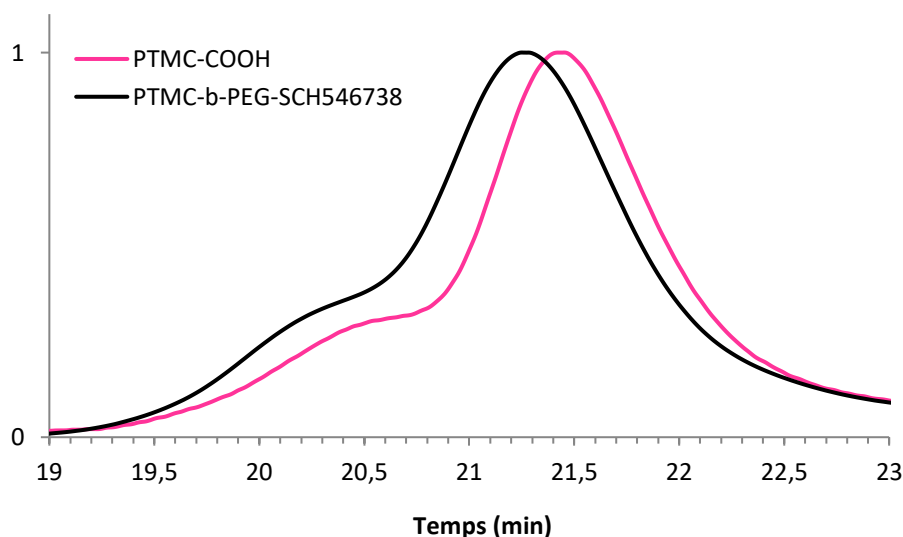


Figure 22 : Spectre RMN DOSY du PTMC-*b*-PEG-SCH546738 + 0,1 équiv de PEG-SCH546738

*Le spectre RMN ¹H du PEG-SCH546738 est dessiné en rouge et celui du PTMC-*b*-PEG-SCH546738 est en noir.*

Bien que les coefficients de diffusion des deux molécules soient très proches, l'apparition d'une nouvelle « ligne » et donc d'un nouveau coefficient de diffusion signifie qu'il y a bien présence de deux molécules différentes dans le milieu et prouve donc que le PTMC-*b*-PEG-SCH546738 est bien obtenu malgré son coefficient de diffusion proche de celui du PEG-SCH546738.

Ce constat est vérifié par analyse en SEC THF où un décalage du temps de rétention vers des valeurs plus basses (molécule plus grande) est observé entre le PTMC₈₈-COOH et le PTMC₈₈-*b*-PEG₄₅-SCH546738 (voir figure 23).



*Figure 23 : Chromatogrammes de SEC dans le THF (RI) du PTMC₈₈-COOH et du PTMC₈₈-*b*-PEG₄₅-SCH546738*

L'obtention du PTMC-*b*-PEG-SCH546738 est confirmée par analyses RMN ¹H, RMN DOSY ainsi que SEC THF, cependant la purification est plus compliquée car la purification par SEC préparative ne peut pas être utilisée à terme. Comme énoncé précédemment, il est impossible d'injecter un volume ou une concentration trop élevés sur la colonne donc c'est une purification très longue et de plus, beaucoup de produit est perdu. Il est donc nécessaire de trouver une purification plus adaptée.

Dans le milieu réactionnel final, sont présents, le SCH546738 de la première réaction avec l'anhydride alcyne qui n'avait pas réagi à environ 85%, le SCH546738-alcyne mis en excès dans la réaction avec le bloc PEG, puis le PEG-SCH546738 mis en excès dans cette dernière réaction avec le PTMC₈₈-COOH.

L'idée était de placer le PEG-SCH546738 en excès dans cette réaction afin de pouvoir l'éliminer par **dialyse** dans l'**eau**, car le PTMC-*b*-PEG-SCH546738 s'auto-assemblerait et l'utilisation d'une membrane de grande taille aurait pu être possible. Cependant, malgré l'utilisation de membrane de 50 et 100 kDa et des changements d'eau de dialyse

réguliers sur une semaine, les analyses par SEC THF montrent toujours la présence du PEG-SCH546738. L'**ultrafiltration** dans les mêmes conditions a également été réalisée mais le constat est le même.

Le PEG (MW= 2000 g/mol) est soluble dans l'eau alors que le SCH546738 (MW= 491,2 g/mol) ne l'est pas. Il est possible que la présence du SCH546738 dans le couplage des deux molécules diminue sensiblement la solubilité du PEG dans l'eau et formerait des agrégats. Ceci expliquerait pourquoi le PEG-SCH546738 ne peut être éliminé en présence d'eau.

Pour confirmer cette hypothèse, une analyse par spectrophotométrie UV-Visible de plusieurs concentrations de PEG-SCH546738 dans l'eau en présence de pyrène¹⁶ a été réalisée afin de visualiser s'il y a présence d'une Concentration d'agrégation Critique (CAC) (voir figure 24).

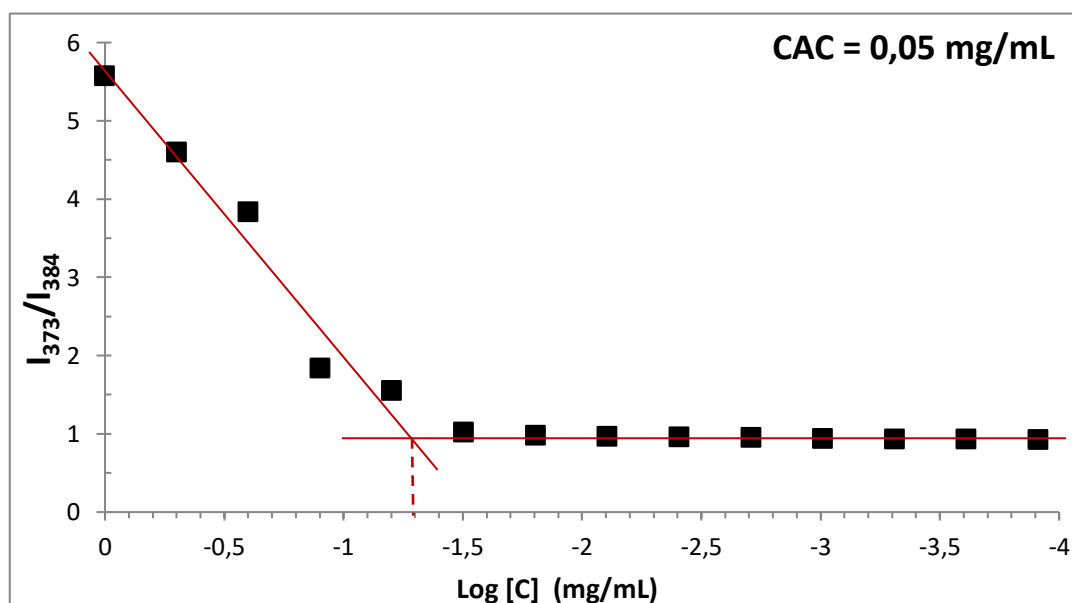


Figure 24 : Détermination de la CAC du PEG-SCH546738

Concentration SCH546738/eau entre 1 mg/mL et 10^{-6} mg/mL ; $\lambda_{ex} = 337$ nm ; I_{373}/I_{384} = Rapport des intensités à 373 nm et 384 nm.

L'analyse par spectrophotométrie UV-Visible démontre effectivement la présence d'une CAC à 0,05 mg/mL. L'élimination du PEG-SCH546738 par dialyse dans l'eau au-dessus de cette concentration est irréalisable. Cependant, en se plaçant à des concentrations

plus basses (aux alentours de 0,02 mg/mL), la présence du PEG-SCH546738 est toujours visible par SEC THF.

Une **extraction DCM/H₂O (HCl)** semblait être une bonne purification car le copolymère PTMC-*b*-PEG-SCH546738 et le PEG-SCH546738 sont solubles dans le DCM mais en rajoutant de l'eau acidifiée, l'amine en bout de chaîne du PEG-SCH546738 se protone et le rend soluble dans l'eau. Malheureusement, les deux molécules se retrouvent dans les deux phases.

Etant donné qu'il est difficile d'éliminer le PEG-SCH546738 en excès, la même réaction a été réalisée mais en ajoutant cette fois ci le PTMC₈₈-COOH en excès pour s'affranchir du PEG-SCH546738. Malheureusement, malgré des tentatives d'amélioration, la réaction n'est pas totale car l'analyse par SEC THF montre encore la présence du PEG-SCH546738. La totale fonctionnalisation du bout de chaîne du PEG commercial avec une amine est fortement mise en doute ; une réaction témoin entre ce PEG et un chlorure d'acyle, facilement identifiable en RMN ¹H comme le chlorure de benzoyle, pourrait le déterminer.

Finalement, la stratégie a été de ne pas purifier le milieu dans l'eau à cause de la CAC du PEG-SCH546738 en milieu aqueux, mais en présence d'un co-solvant. Le THF permet en effet de solubiliser les deux polymères à n'importe quelle concentration.

L'**ultrafiltration** dans le **THF** a nécessité des joints en téflon et une membrane en cellulose régénérée (ici 5 kDa), malheureusement au bout de quelques minutes les pores de la membrane se bouchent à cause du THF, ce qui l'empêche de s'écouler.

Une **dialyse** dans un bain de **THF** a alors été réalisée (membrane de cellulose régénérée - 3,5 kDa). Bien que la purification soit longue, après une vingtaine de changement du bain de THF (THF recyclé), le PEG-SCH546738 ainsi que les différents SCH546738 et SCH546738-alcyne ont pu être éliminés comme observé sur les chromatogrammes de SEC en THF (figure 25).

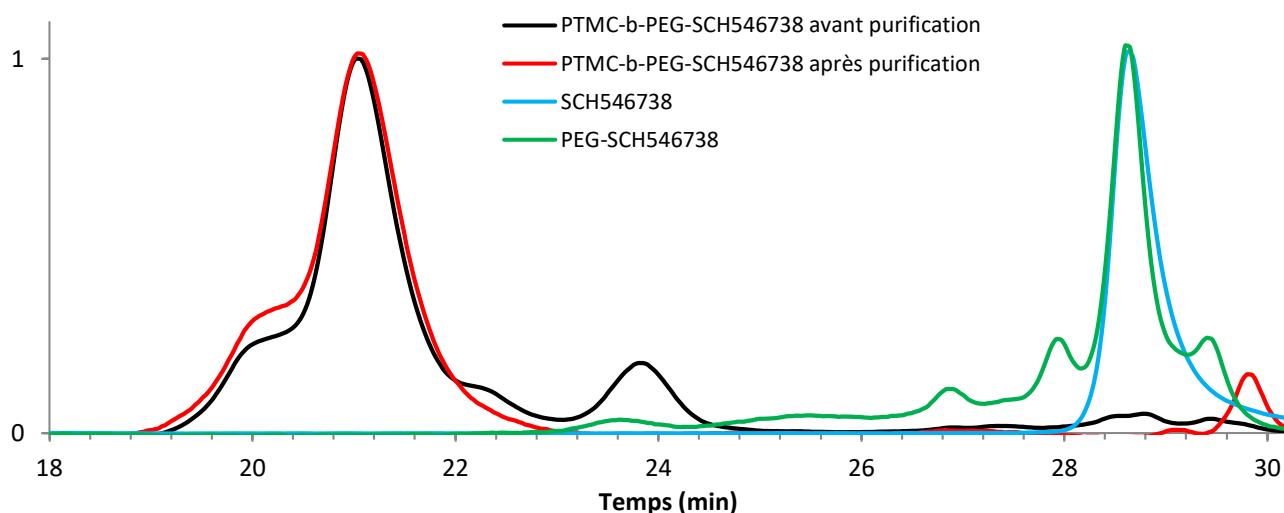


Figure 25 : Superposition des différents chromatogrammes de SEC (RI) dans le THF des PTMC-b-PEG-SCH546738 avant et après purification

Le pic à 30 minutes vient d'une contamination du THF utilisé pour la SEC

Les pics à 24 et 29 minutes, correspondant au PEG-SCH546738 et au SCH546738 seul présents dans le brut de réaction du PTMC-*b*-PEG-SCH546738, ont disparu dans le spectre du copolymère purifié par dialyse dans le THF.

Le PTMC-*b*-PEG-SCH546738 maintenant pur et surtout affranchi de toutes autres molécules contenant le SCH546738, qui pourrait fausser les futurs auto-assemblages et les résultats d'affinité de liaison pour le CXCR3, va pouvoir être placé en présence du PTMC-*b*-PEG non fonctionnalisé à différents pourcentages pour obtenir des taux de SCH546738 différents en surface.

Conclusion

Le PTMC-*b*-PEG a été obtenu par ROP du monomère TMC amorcé par un PEG de masse molaire 2000 g/mol. Le DP du segment PTMC a été modulé afin d'obtenir des fractions hydrophiles massiques différentes, allant de 34% à 6%. Effectivement, il est intéressant

d'étudier l'auto assemblage de ces copolymères à blocs en fonction de leur fraction hydrophile massique.

Le PTMC-*b*-PEG-SCH546738, a été produit par synthèse convergente avec 3 étapes principales ; l'obtention du segment hydrophobe PTMC d'un côté, du segment hydrophile PEG-SCH546738 de l'autre et enfin le couplage de ces deux segments.

Le PTMC_n-COOH est obtenu par ROP du TMC amorcé par l'isopentanol, suivi d'une estérification en présence d'anhydride succinique.

La modification chimique du SCH546738 a été une étape compliquée dû à son manque de réactivité. Le lien amide obtenu par couplage avec l'anhydride alcyne est la seule combinaison qui permet cette modification, et malgré des tentatives d'amélioration, le rendement reste très faible. De même, la purification laborieuse n'est finalement pas effectuée à ce stade.

Le couplage avec le segment PEG a été réalisé par chimie « click » en présence de cuivre et les différentes analyses, notamment l'IR, démontre que la réaction est totale, bien que le SCH546738-alcyne placé en excès soit toujours présent. De même que l'étape précédente, la purification n'est pas effectuée.

Le PTMC-*b*-PEG-SCH546738 est finalement obtenu par liaison amide entre les deux bouts de chaîne des deux homopolymères. L'utilisation de la dialyse dans le THF a permis de purifier le copolymère et de s'affranchir des autres molécules présentes depuis le début des étapes.

Malgré la difficulté de la synthèse et la perte considérable de produits, le PTMC-*b*-PEG-SCH546738 pur peut être associé au PTMC-*b*-PEG non fonctionnalisé afin d'obtenir des objets par auto-assemblage dans l'eau et étudier toute la physico chimie associée.

Matériels

Les solvants utilisés (THF, DMSO, DMF, Methanol, DCM) ont été commandés chez Sigma-Aldrich et le THF est séché par l'appareil de purification de solvants du laboratoire. La DIEA, le CuSO₄ et l'acide 4-pentynoïque viennent également de chez Sigma-Aldrich. Le Triméthylène carbonate (1,3-dioxane-2-one; TMC) a été commandé chez TCI Europe. Le MeO-PEG-OH (poly(éthylène glycol)méthyl éther; Mn=2000 g/mol) et le HBTU ont été commandés chez Iris Biotech GmbH. Le N₃-PEG-NH₂ (Mn=2000 g/mol) a été commandé chez JenKemUSA. Le TAMRA cadaverine et la DMAP ont été commandés chez Fisher. Le SCH546738 a été fourni par ChemExpress China et la DCC provient de chez Alfa Aesar.

Les membranes de dialyse 1 kDa et 3,5 kDa humides sont en cellulose régénérée et proviennent de chez Spectrum Labs.

Instrumentation

Les analyses de **spectrométrie de masse** ESI-HRMS (High resolution electrospray ionization mass spectrometry) et de LC-MS (Liquid Chromatographie – Mass Spectrometry) ont été réalisées sur un Thermo Exactive avec un analyseur de masse à piège à ions du Laboratoire de Spectrométrie de Masse de l'Institut Européen de Chimie et de Biologie (IECB).

Les analyses de **SEC** dans le THF sont réalisées sur un système Ultimate 3000 de ThermoScientific équipé d'un détecteur à barrettes de diodes (DAD). Le système inclut aussi un détecteur de diffusion de la lumière multi-angles (MALS) et d'un détecteur d'indice de réfraction différentiel dRI de chez Wyatt Technology. Les polymères sont séparés sur trois colonnes (G2000, G3000 and G4000 TOSOH HXL - 300 x 7.8 mm) à 40°C (limites d'exclusion de 1000 Da à 400 000 Da) avec un débit de 1 mL/min. Le Polystyrène est utilisé comme standard.

Les analyses **RMN** sont effectuées sur un spectromètre RMN Bruker Avance I opérant à 400 MHz et utilisant le TMS comme standard. Les spectres RMN ¹H sont

obtenus avec un DI de 5s et 64 scans et les spectres DOSY avec le programme d'impulsion "ledbpgp2s" du logiciel topsin de chez Bruker.

Les analyses **DSC** sont réalisées sur un appareil TA Instruments RCS sous flux continu d'azote et d'hélium (25 mL/min), utilisant environ 7 mg d'échantillon dans des capsules en aluminium scellée. Les thermogrammes des trois cycles successifs sont obtenus avec les gradients suivants : i) -60 à 80°C à 10°C/min ; ii) 80 à -60°C à 10°C/min ; iii) -60 à 80°C à 10°C/min.

Les analyses **TGA** sont effectuées sur un appareil TA Instruments Q500. La nacelle en aluminium utilisée contient environ 8 mg d'échantillon. Le cycle de chauffe est réalisé à 10 °C/min jusqu'à 500 °C sous flux d'azote.

Les spectres **HPLC** sont obtenus à partir d'un appareil Varian composé d'un détecteur UV et d'un échantillonneur automatique Prostar. L'analyse est réalisée sur une colonne C18 100-5 (250x4,6 mm) avec un débit de 1 mL/min sur 30 minutes, à 229 nm avec un gradient de 20-60% CH₃CN. Les éluants utilisés sont l'eau distillée et l'acétonitrile (HPLC grade) avec 0,1% de TFA.

Protocoles expérimentaux

Recristallisation du TMC :

Dans un schlenk contenant le TMC est ajouté l'acétate d'éthyle préalablement distillé (environ 3 mL pour 5 g de TMC). Le schlenk sous azote, est plongé dans un bain à 70°C jusqu'à totale solubilisation du TMC dans l'acétate d'éthyle. Le schlenk est retiré du bain en laissant revenir la solution à température ambiante. Une fois le TMC totalement recristallisé, l'acétate d'éthyle est retiré à l'aide d'une seringue et les impuretés solubles sont éliminées avec. L'étape de solubilisation / recristallisation est répétée 3 fois puis le TMC est séché sous vide et placé dans la boîte à gant pour une future polymérisation.

Polymérisation par ouverture de cycle ('ROP' de l'anglais *Ring Opening Polymerisation*) du TMC par l'isopentanol (PTMC_n-OH):

La procédure décrite ci-dessous a été utilisée pour un DP ciblé de 40 mais est adapté pour le DP de 100.

Sous atmosphère inerte (argon < 0.5 ppm O₂ < 5 ppm H₂O), l'isopentanol distillé (145 µL, 1.35 mmol) est ajouté dans 2,5 mL de THF. Séparément, le TMC recristallisé (5g, 49 mmol) est dissout dans 7,5 mL de THF. Les deux solutions sont alors mélangées puis la DBU distillée (201 µL, 1.35 mmol) est ajoutée. La réaction est agitée à température ambiante jusqu'à obtenir une conversion de 90% (déterminée par RMN ¹H). Le milieu réactionnel est alors quenché avec un excès d'acide acétique. Le polymère est ensuite précipité dans du méthanol froid (10 fois le volume), centrifugé (4°C, 3500 rpm) en éliminant le surnageant. Cette étape est reproduite 3 fois puis le polymère est séché sous vide toute une nuit.

Le produit obtenu a été caractérisé par RMN ¹H et SEC dans le THF, TGA et DSC.

RMN ¹H (400MHz, CDCl₃, δ ppm): 4,29 (t: 2H, HO-CH₂-CH₂-CH₂-O-); 4,23 (t: 4nH, -CO-O-CH₂-CH₂-CH₂-O-); 4,15 (t: 2H, -O-CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂); 3,73 (t: 2H, HO-CH₂-CH₂-CH₂-O-); 2,04 (quint: 2nH, -CO-O-CH₂-CH₂-CH₂-O-); 1,91 (quint: 2H, HO-CH₂-CH₂-CH₂-O-); 1,69 (m: 1H, -O-CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂); 1,56 (quad- 2H, -O-CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂); 0,91 (d: 6H, -O-CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂).

Fonctionnalisation du PTMC_n-OH par un acide carboxylique (PTMC_n-COOH) :

La procédure décrite ci-dessous a été utilisée pour un PTMC-OH de DP 33 mais est adapté pour le DP obtenu de 88.

Le PTMC₃₃-OH, préalablement synthétisé, (250 mg, 0.07 mmol) est dissout dans 1,5 mL de DMF. Séparément, l'anhydride succinique (140 mg, 1,4 mmol) et la DMAP (17,1 mg, 0,14 mmol) sont dissouts dans 1,5 mL de DMF. Les deux solutions sont alors mélangées et agitées pendant une nuit à température ambiante. Le polymère est ensuite précipité

dans du méthanol froid (10 fois le volume), centrifugé (4°C, 3500 rpm) en éliminant le surnageant. Cette étape est reproduite 3 fois puis le polymère est séché sous vide toute une nuit.

Le produit obtenu est caractérisé par RMN ¹H, SEC dans le THF, TGA et DSC.

RMN ¹H (400MHz, CDCl₃, δ ppm): 4,23 (t: 4nH, -CO-O-CH₂-CH₂-CH₂-O-); 4,15 (t: 2H, -O-CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂); 2,65 (m: 4H, HOOC-CH₂-CH₂-O-); 2,04 (quint: 2nH, -CO-O-CH₂-CH₂-CH₂-O-); 1,69 (m: 1H, -O-CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂); 1,56 (quad: 2H, -O-CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂); 0,91 (d: 6H, -O-CH₂-CH₂-CH-(CH₃)₂).

Synthèse du PTMC-COOH fonctionnalisé par la Rhodamine (PTMC_n-Rhodamine) :

Le PTMC₇₄-COOH préalablement synthétisé (37 mg, 4,86 μmol) est dissout dans 350 μL de DMF. Le HBTU (O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate, 5,5 mg, 14,6 μmol) dissout dans 60 μL de DMF est ajouté à la solution de PTMC.

La DIEA (N, N-diisopropyléthylamine, 2,5 μL, 14,6 μmol) dans 50 μL de DMF est ajouté à la solution de TAMRA cadaverine (5 mg, 9,72 μmol) dans 100 μL de DMSO.

Les deux solutions sont alors mélangées et agitées pendant une nuit à température ambiante.

A la fin de la réaction, 1 mL d'eau Milli-Q est rajouté puis le tout est dialysé contre de l'eau dans un bécher de 5 L (membrane 10 kDa) à l'abri de la lumière. L'eau de dialyse est changée jusqu'à disparition visuellement de la coloration violette de l'eau puis le produit est lyophilisé et conservé à l'abri de la lumière.

Le produit obtenu est analysé par RMN ¹H (shift du proton à 2,62 ppm).

Synthèse de l'anhydride alcyne :

Toutes les étapes sont réalisées en évitant que le produit soit au contact de l'air.

Dans un schlenk, sont placés la DCC (Dicyclohexylcarbodiimide, 400 mg, 1,94 mmol) et l'acide 4-pentynoïque (380 mg, 3,88 mmol) puis 15 mL de DCM anhydre sont ajoutés. Au bout de 5 heures de réaction, la solution est filtrée, le filtrat est récupéré puis évaporé en laissant une goutte de solvant au fond du ballon. Le ballon est alors placé à -20°C pendant 1 heure. La solution est à nouveau filtrée puis évaporée pour finalement obtenir une huile. L'anhydride est directement utilisé dans une réaction avec le SCH546738.

Modification du SCH546738 avec l'anhydride alcyne (SCH546738-Alcyne) :

Le SCH546738 (20 mg, 40,7 µmol), est séché dans un schlenk puis 2 mL de DMSO anhydre sont ajoutés. Le schlenk est chauffé jusqu'à solubilisation du SCH546738. Le KOH aqueux (80 mg/mL, 32 µL, 44,8 µmol) est ajouté à température ambiante. Au bout d'une trentaine de minutes, l'anhydride alcyne fraîchement synthétisé est ajouté en large excès. La réaction est agitée pendant 24 heures.

Le DMSO et l'excès d'acide 4-pentynoïque (venant de la synthèse de l'anhydride alcyne) sont éliminés par cryodistillation en rajoutant de l'eau à chaque fois (3-4 fois).

Le produit est analysé par spectrométrie de masse (pic à 572,2 m/z) et par HPLC analytique (Gradient 20-60% eau/acétonitrile – pic à 25 min).

Rendement : 10 – 15 % (déterminé par HPLC)

Couplage du N₃-PEG₄₅-NH₂ et du SCH546738-Alcyne (PEG-SCH546738) :

La réaction se déroule sous atmosphère inerte.

Le SCH546738-Alcyne (20 mg, 35 µmol) et le N₃-PEG₄₅-NH₂ commercial (64 mg, 31,8 µmol) sont dissous dans 2 mL de DMSO anhydre. L'ascorbate de sodium (13 mg, 63,6 µmol) est ajouté et finalement le CuSO₄ (sulfate de cuivre (II), 5 mg, 31,8 µmol). La réaction est agitée à 30°C pendant 16 heures.

Le produit est purifié par ultrafiltration dans l'eau (20 fois en volume d'eau sur 3 passages) sur une membrane 1 KDa puis lyophilisé.

Le produit obtenu est analysé par RMN ^1H (apparition du proton du triazole à 7,6 ppm) et Infrarouge (disparition du pic à 2100 cm^{-1}).

Couplage du PTMC_n-COOH et du PEG-SCH546738 (PTMC-*b*-PEG-SCH546738) :

La réaction se déroule sous atmosphère inerte.

Le PTMC₈₈-COOH (115 mg, 13,45 μmol) est dissout dans 2 mL de DCM anhydre en présence de DCC (5,5 mg, 26,9 μmol). La DMAP (4-Diméthylaminopyridine, 0,3 mg, 2,7 μmol) est ensuite ajouté et enfin le PEG-SCH546738 (37 mg, 14,8 μmol) est ajouté. La réaction est agitée à température ambiante pendant 5 jours.

Le DCM est alors évaporé et la solution est dialysée contre du THF avec une membrane (3,5 KDa) jusqu'à totale disparition du PEG-SCH546738 libre (contrôlé par SEC THF).

Polymérisation par ouverture de cycle (ROP) du TMC amorcé par MeO-PEG₄₅-OH (PTMC-*b*-PEG):

Cette réaction est réalisée de la même manière que pour la ROP du TMC par l'isopentanol mais en amorçant ici avec le MeO-PEG₄₅-OH commercial.

La procédure décrite ci-dessous a été utilisée pour un DP ciblé de 40 mais est adapté pour les DP's supérieurs de 120, 190 et 400.

Le MeO-PEG₄₅-OH est préalablement séché sous vide en présence de dioxane. Sous atmosphère inerte (argon $< 0.5\text{ ppm O}_2 < 5\text{ ppm H}_2\text{O}$), le MeO-PEG₄₅-OH (2.2 g, 1.08 mmol) est ajouté dans 2 mL de THF. Séparément, le TMC (4g, 39 mmol) est dissout dans 6 mL de THF. Les deux solutions sont alors mélangées puis la DBU distillée (161 μL , 1.08 mmol) est ajoutée. La réaction est agitée à température ambiante jusqu'à obtenir une conversion de 90% (déterminée par RMN ^1H). Le milieu réactionnel est alors quenché

avec un excès d'acide acétique. Le polymère est ensuite précipité dans du méthanol froid (10 fois le volume), centrifugé (4°C, 3500 rpm) en éliminant le surnageant. Cette étape est reproduite 3 fois puis le polymère est séché sous vide toute une nuit.

Le produit obtenu a été caractérisé par RMN ¹H, SEC dans le THF, TGA et DSC.

Le degré de polymérisation, le PDI et le rendement massique obtenus sont respectivement de 33, 1,05 et 51% (3.16 g).

Notation : PTMC₃₃-*b*-PEG₄₅

RMN ¹H (400MHz, CDCl₃, δ ppm): 4,29 (t: 2H, HO-CH₂-CH₂-CH₂-O-); 4,23 (t: 4nH, -CO-O-CH₂-CH₂-CH₂-O-); 3,73 (t: 2H, HO-CH₂-CH₂-CH₂-O-); 3,63 (s, 4*45H, -O-CH₂-CH₂-O-); 3,37 (s, 3H, -O-CH₂-CH₂-O-CH₃); 2,04 (quint: 2nH, -CO-O-CH₂-CH₂-CH₂-O-); 1,91 (quint: 2H, HO-CH₂-CH₂-CH₂-O-).

Figures supplémentaires

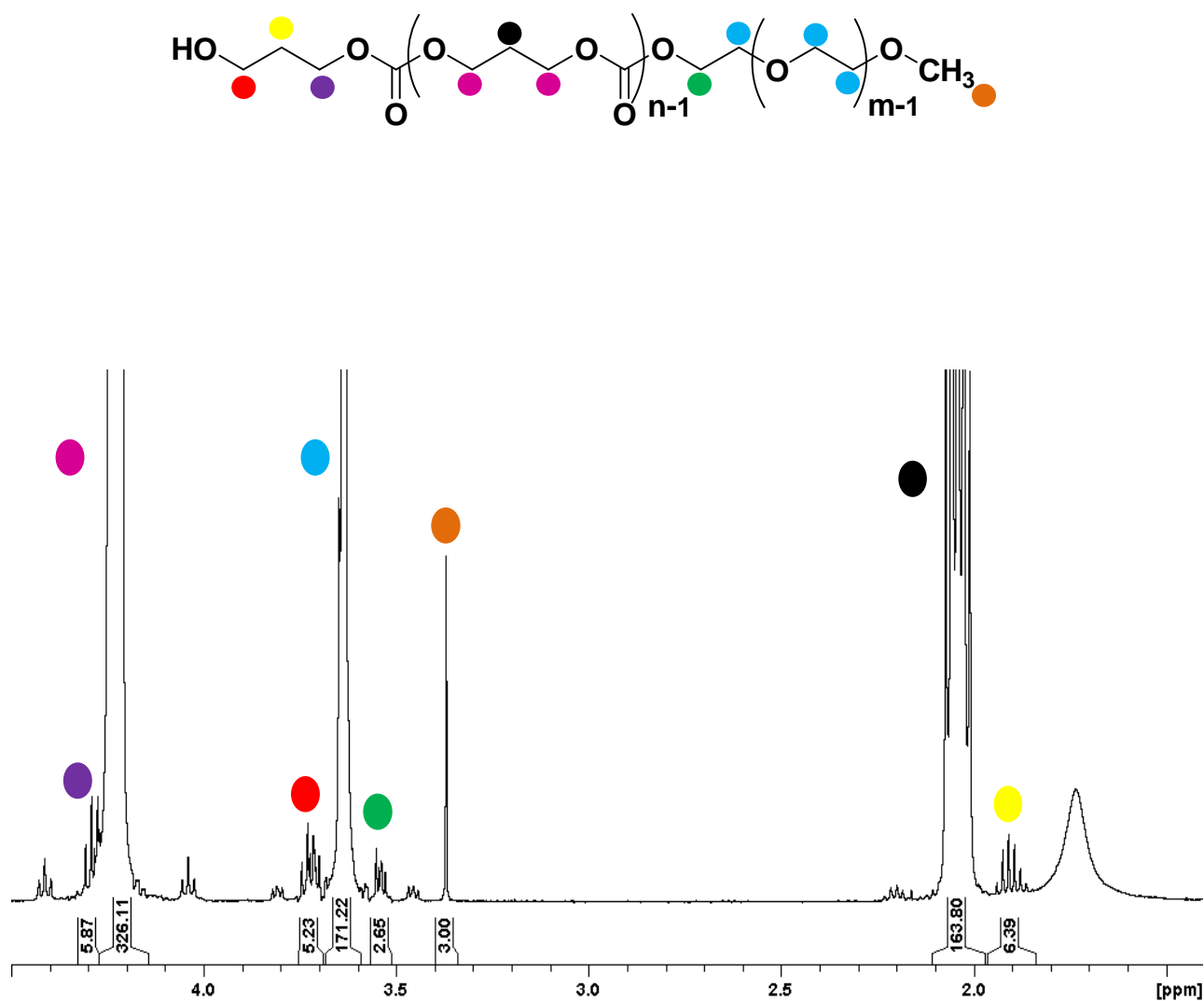


Figure S1 : RMN ^1H du PTMC-b-PEG (DP96)

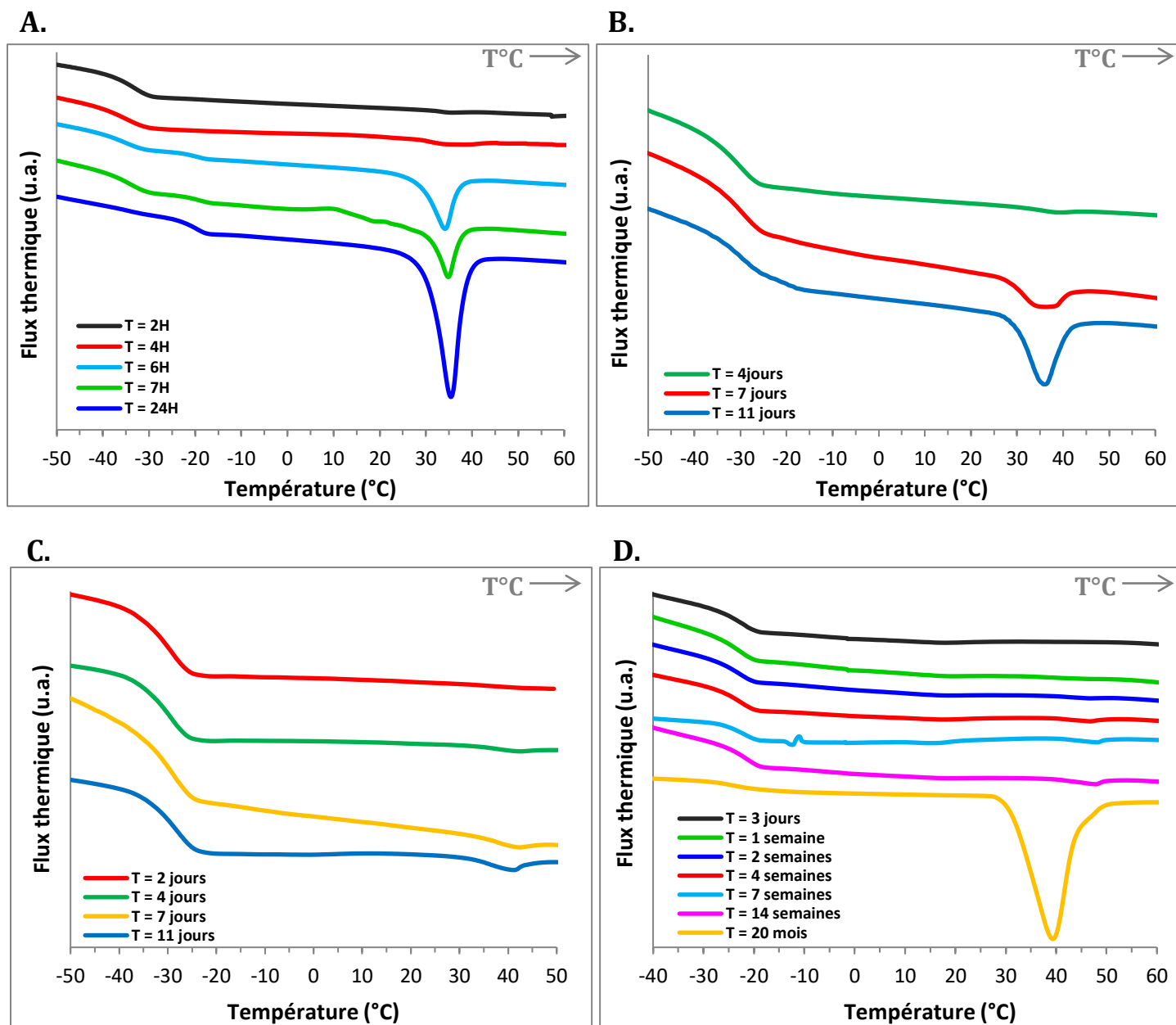


Figure S2 : Tests de cinétique de recristallisation des PTMC-b-PEG par analyse DSC

A. DSC du PTMC₉₆-b-PEG₄₅; B. DSC du PTMC₁₄₄-b-PEG₄₅

C. DSC du PTMC₁₇₀-b-PEG₄₅; D. DSC du PTMC₃₃₂-b-PEG₄₅

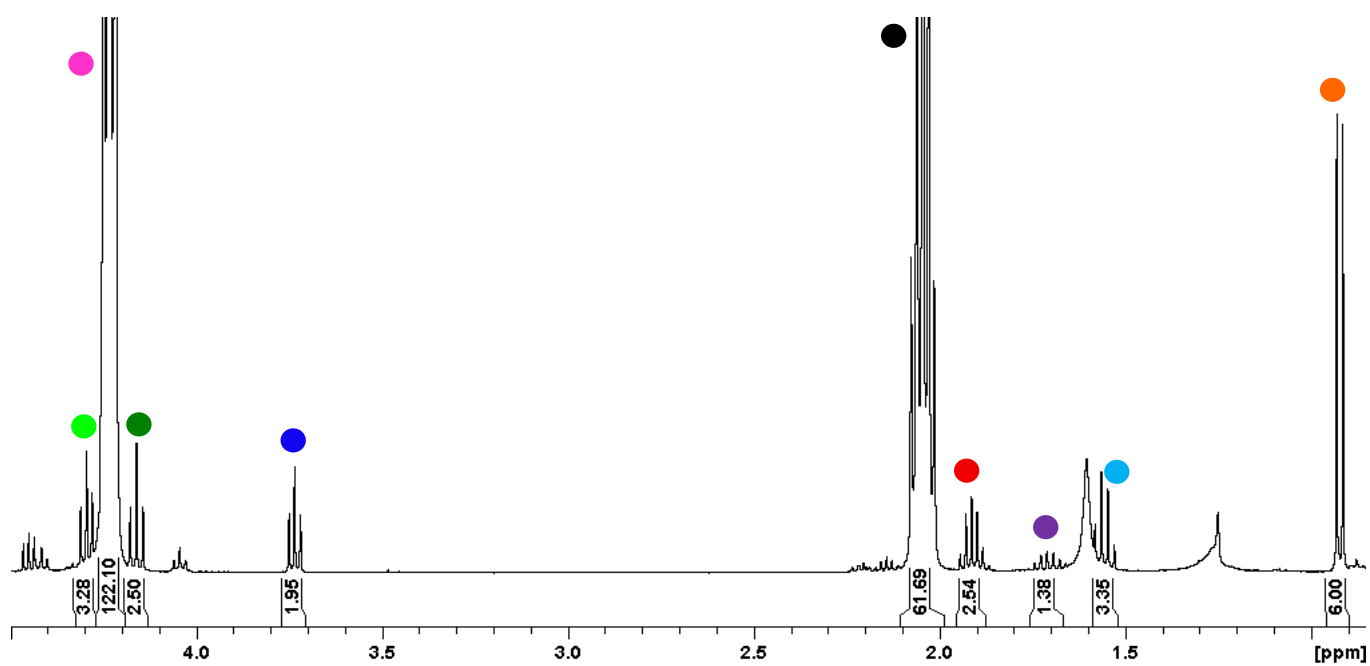
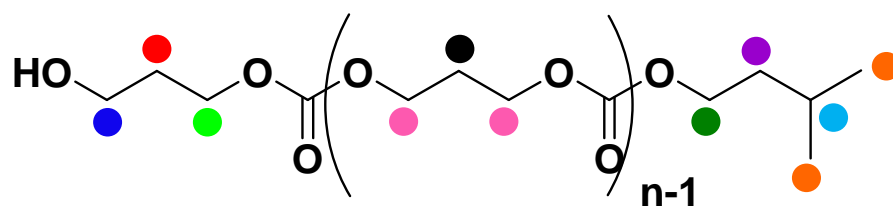


Figure S3 : RMN ^1H du $\text{PTMC}_n\text{-OH}$ (DP RMN ^1H 31) dans le CDCl_3

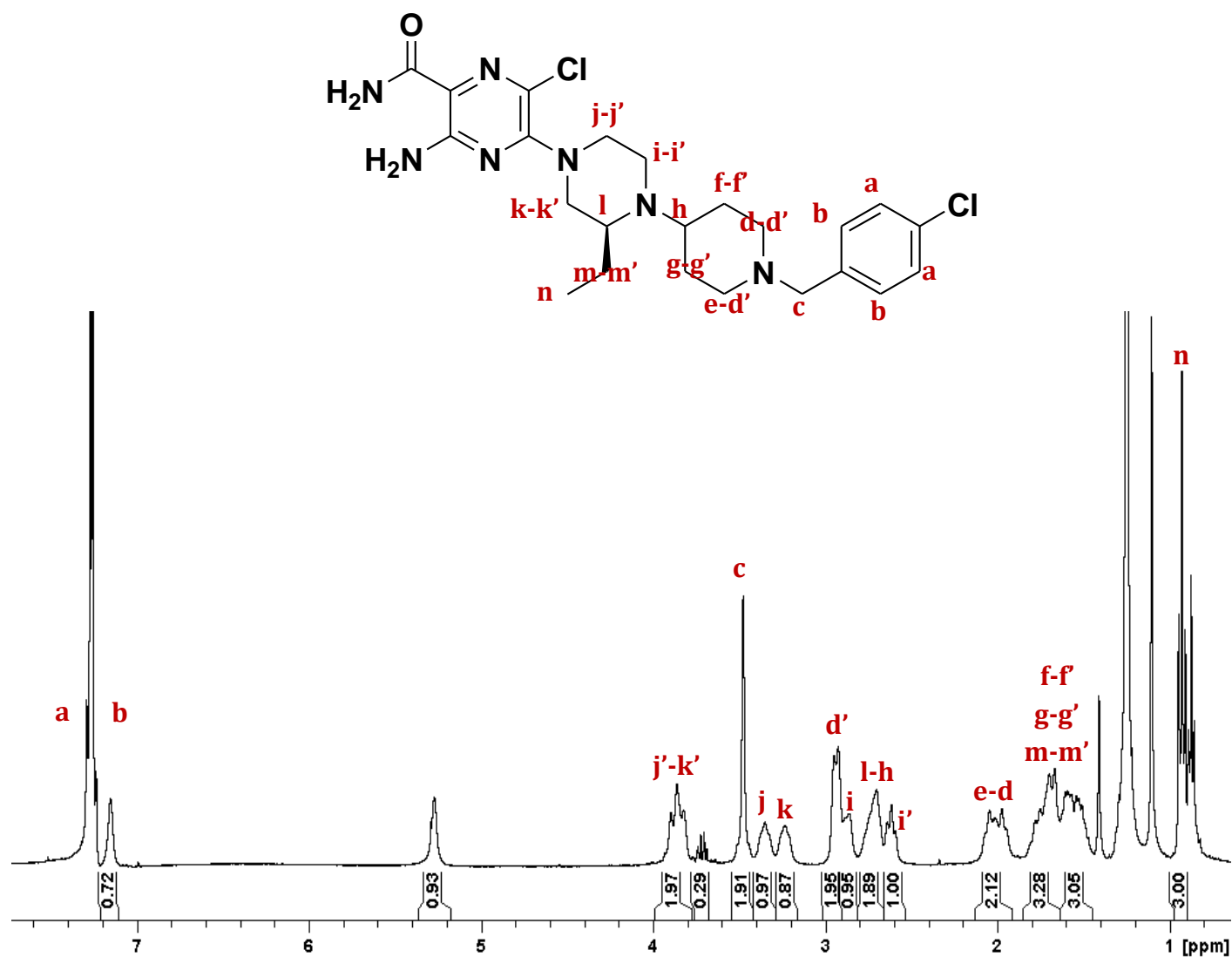


Figure S4 : RMN ^1H du SCH546738 dans le CDCl_3

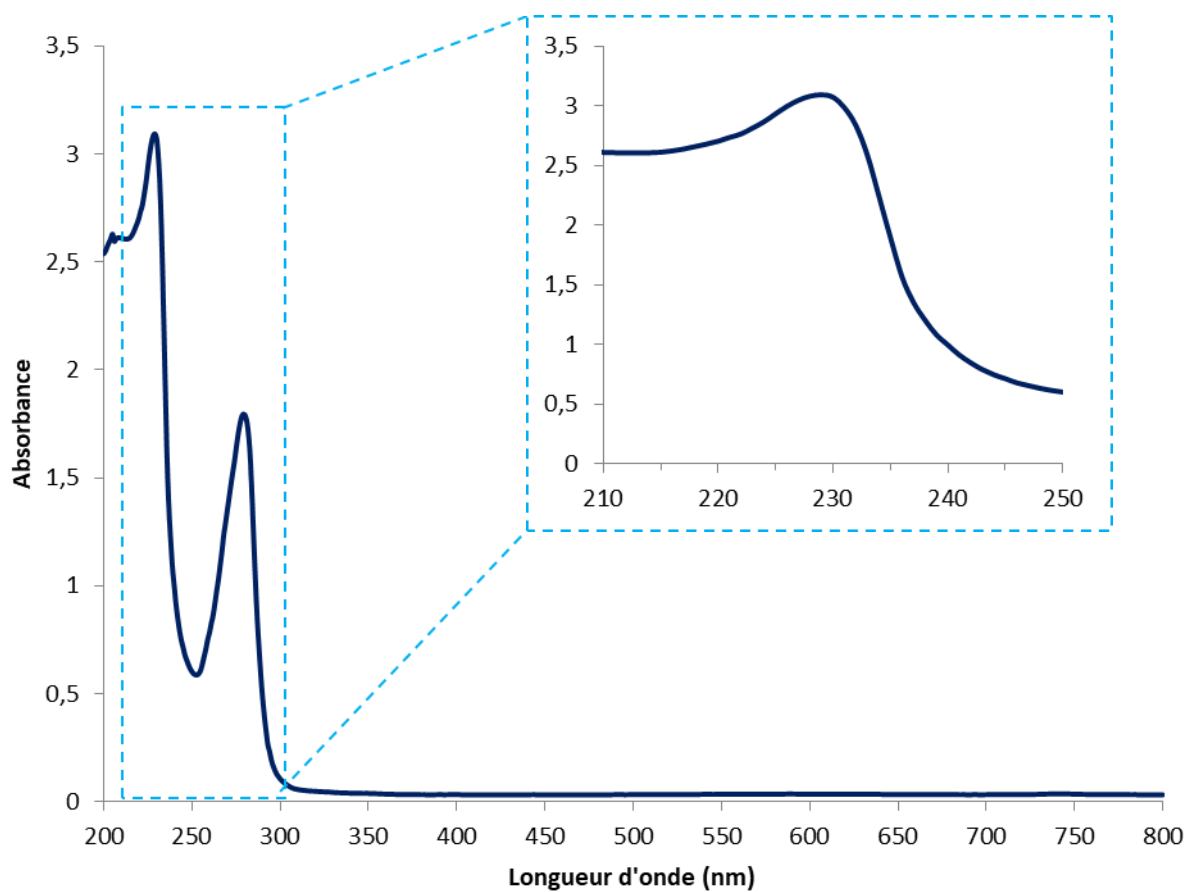


Figure S5 : Spectre d'absorbance du SCH546738

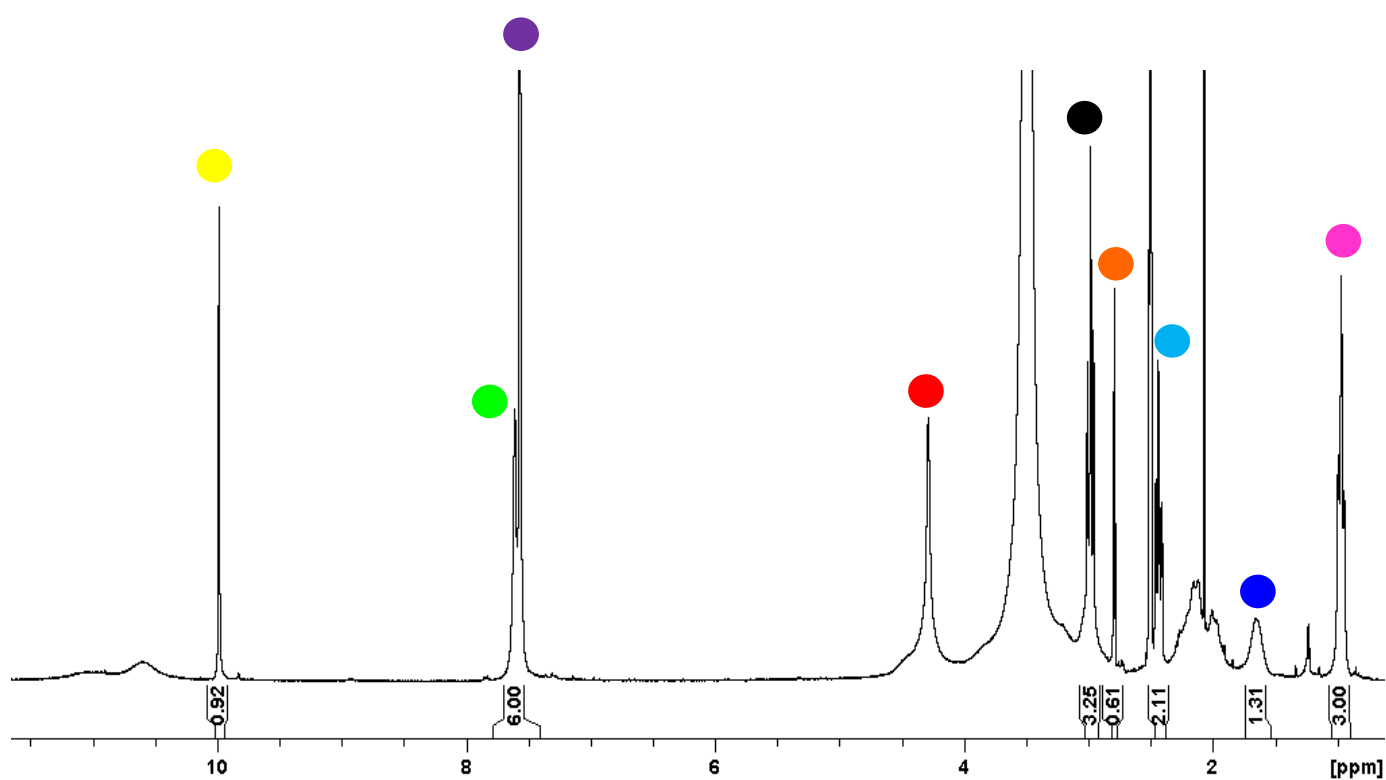
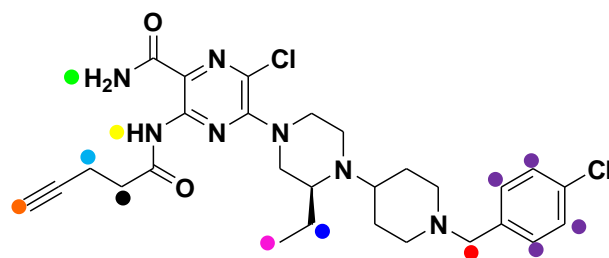


Figure S6 : RMN ¹H du SCH546738-alcyne dans le DMSO-d₆

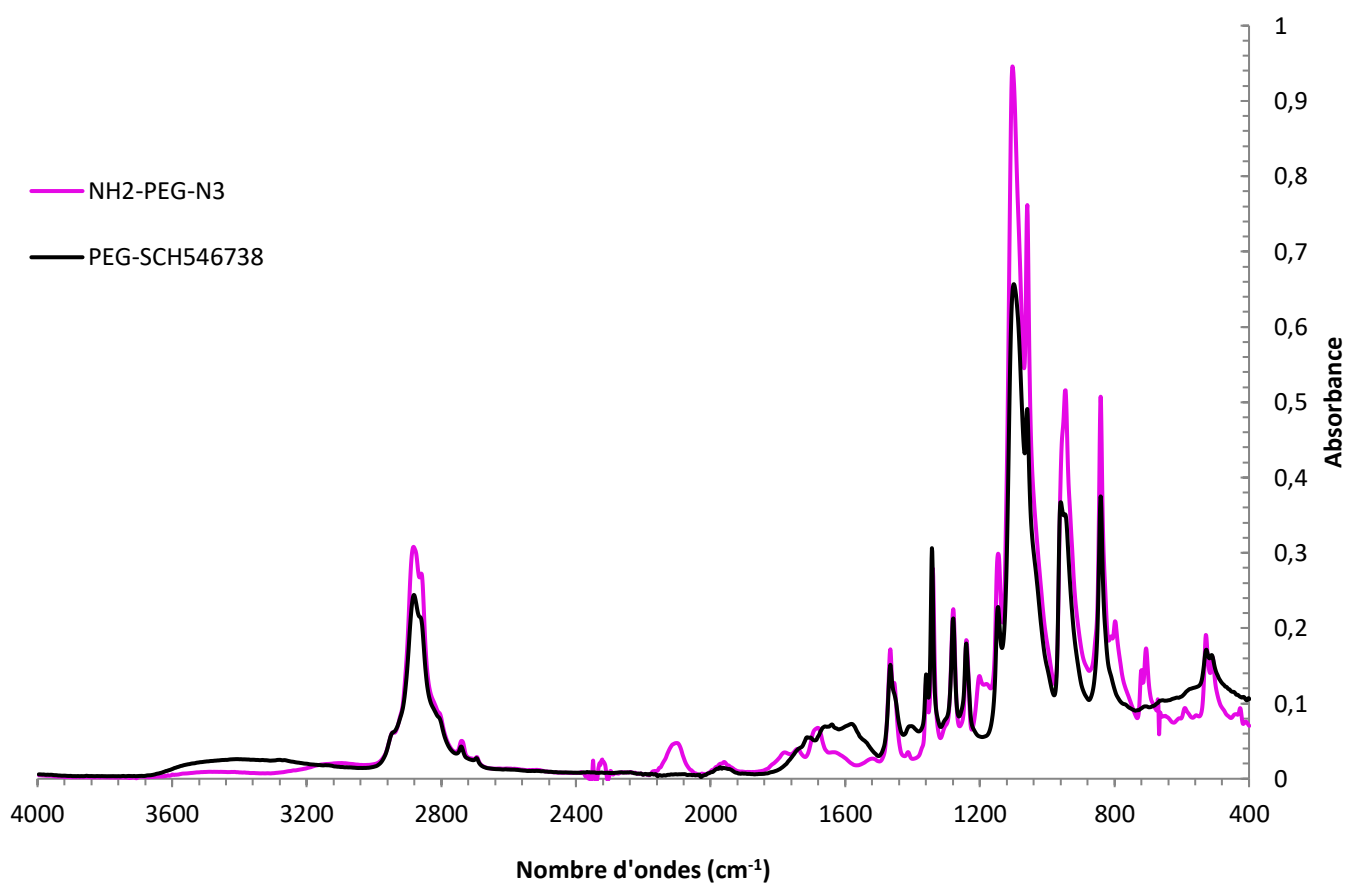


Figure S7 : Spectre Infrarouge du NH₂-PEG-N₃ et du PEG-SCH546738

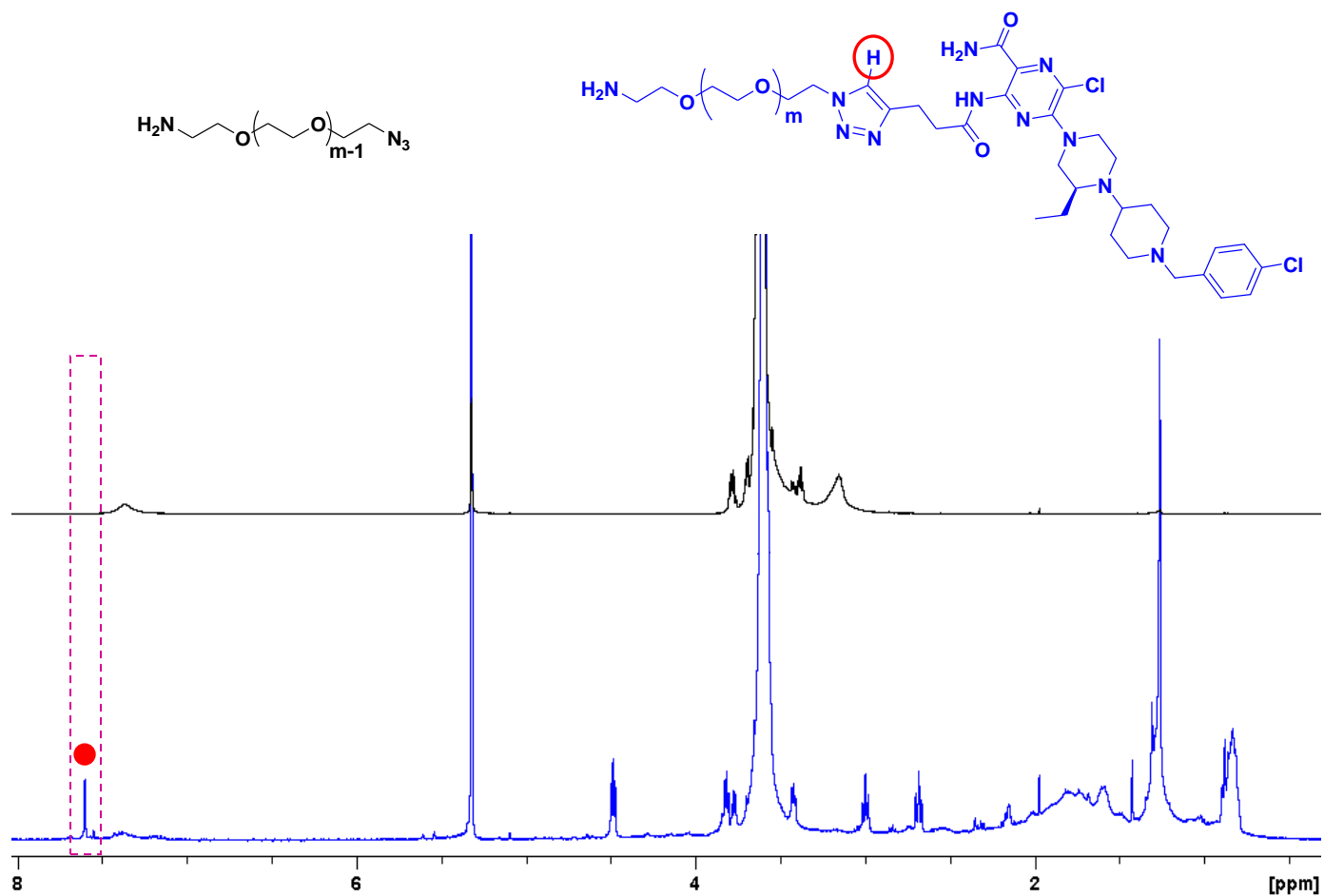


Figure S8 : Spectres RMN ^1H des $\text{NH}_2\text{-PEG-N}_3$ (en haut) et PEG-SCH546738 (en bas) dans CD_2Cl_2

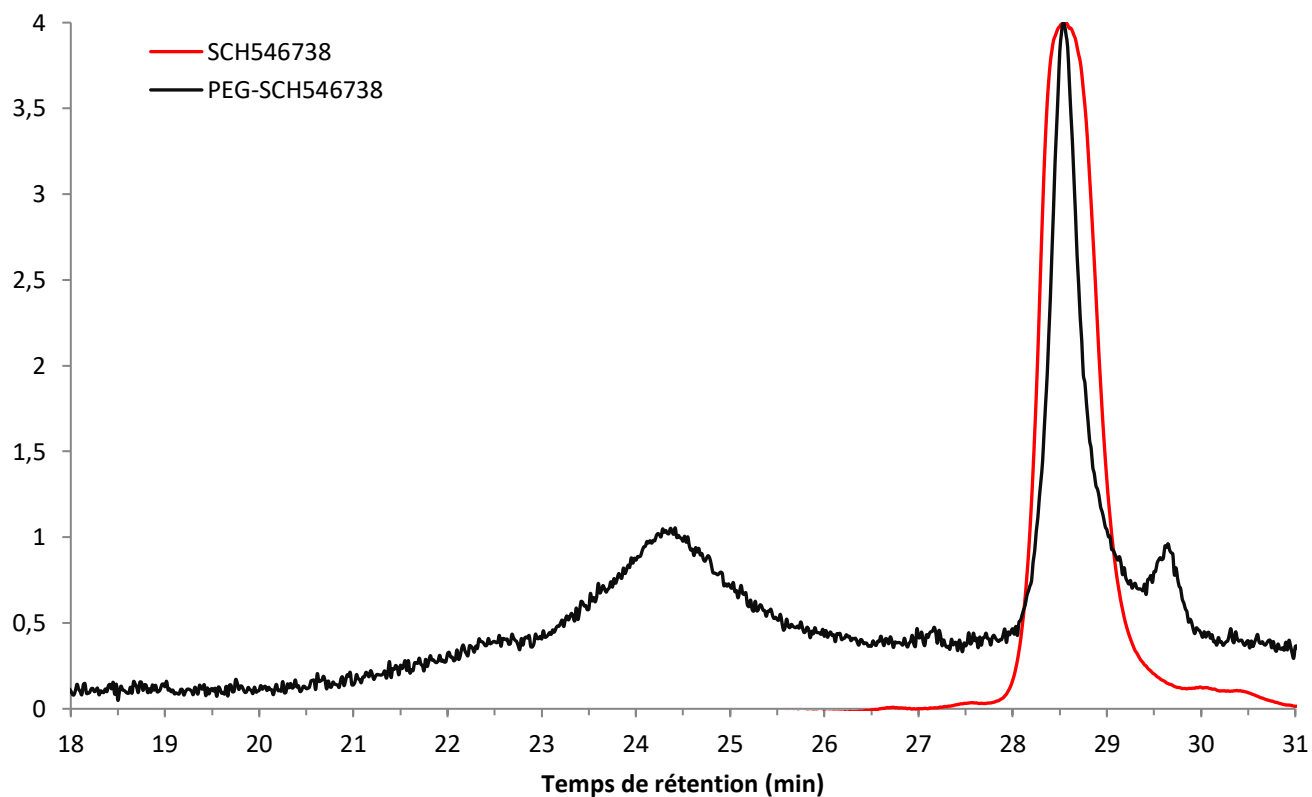


Figure S9 : Chromatogramme SEC des PEG-SCH546738 et SCH546738 dans le THF (UV - 229 nm)

Références

- (1) Nederberg, F.; Lohmeijer, B. G. G.; Leibfarth, F.; Pratt, R. C.; Choi, J.; Dove, A. P.; Waymouth, R. M.; Hedrick, J. L. Organocatalytic Ring Opening Polymerization of Trimethylene Carbonate. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (1), 153–160.
- (2) Dionzou, M.; Morère, A.; Roux, C.; Lonetti, B.; Marty, J.-D.; Mingotaud, C.; Joseph, P.; Goudounèche, D.; Payré, B.; Léonetti, M.; et al. Comparison of Methods for the Fabrication and the Characterization of Polymer Self-Assemblies: What Are the Important Parameters? *Soft Matter* **2016**, *12* (7), 2166–2176.
- (3) Discher, D. E.; Ahmed, F. Polymersomes. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2006**, *8* (1), 323–341.
- (4) Drappier, C. Auto-Assemblages Biofonctionnels à Base de Conjugués Polymère-b-Peptide, Université Sciences et Technologies-Bordeaux I, 2013.
- (5) Chan, J. M. W.; Zhang, X.; Brennan, M. K.; Sardon, H.; Engler, A. C.; Fox, C. H.; Frank, C. W.; Waymouth, R. M.; Hedrick, J. L. Organocatalytic Ring-Opening Polymerization of Trimethylene Carbonate To Yield a Biodegradable Polycarbonate. *J. Chem. Educ.* **2015**, *92* (4), 708–713.
- (6) Delcroix, D.; Martín-Vaca, B.; Bourissou, D.; Navarro, C. Ring-Opening Polymerization of Trimethylene Carbonate Catalyzed by Methanesulfonic Acid: Activated Monomer versus Active Chain End Mechanisms. *Macromolecules* **2010**, *43* (21), 8828–8835.
- (7) Kim, S. H.; Anilkumar, G. N.; Zawacki, L. G.; Zeng, Q.; Yang, D.-Y.; Shao, Y.; Dong, G.; Xu, X.; Yu, W.; Jiang, Y.; et al. III. Identification of Novel CXCR3 Chemokine Receptor Antagonists with a Pyrazinyl-piperazinyl-piperidine Scaffold. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (23), 6982–6986.
- (8) Jenh, C.-H.; Cox, M. A.; Cui, L.; Reich, E.-P.; Sullivan, L.; Chen, S.-C.; Kinsley, D.; Qian, S.; Kim, S. H.; Rosenblum, S.; et al. A Selective and Potent CXCR3 Antagonist SCH 546738 Attenuates the Development of Autoimmune Diseases and Delays Graft Rejection. *BMC Immunol.* **2012**, *13* (1), 1–14.
- (9) Shao, Y.; Anilkumar, G. N.; Carroll, C. D.; Dong, G.; Hall, J. W.; Hobbs, D. W.; Jiang, Y.; Jenh, C.-H.; Kim, S. H.; Kozlowski, J. A.; et al. II. SAR Studies of Pyridyl-piperazinyl-Piperidine Derivatives as CXCR3 Chemokine Antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (5), 1527–1531.
- (10) Ding, Y.-H.; Fan, S.-B.; Li, S.; Feng, B.-Y.; Gao, N.; Ye, K.; He, S.-M.; Dong, M.-Q. Increasing the Depth of Mass-Spectrometry-Based Structural Analysis of Protein Complexes through the Use of Multiple Cross-Linkers. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (8), 4461–4469.
- (11) A. G. N. Montalbetti, C.; Falque, V. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827–10852.
- (12) Amine to Amide (Coupling) - HBTU http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Amine_to_Amide_Coupling/Amine_to_Amide_Coupling_HBTU.html
- (13) Han, S.-Y.; Kim, Y.-A. Recent Development of Peptide Coupling Reagents in Organic Synthesis. *Tetrahedron* **2004**, *60*.
- (14) Boger, D. L.; Miyazaki, S.; Kim, S. H.; Wu, J. H.; Castle, S. L.; Loiseleur, O.; Jin, Q. Total Synthesis of the Vancomycin Aglycon. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (43), 10004–10011.
- (15) Nierengarten, J.-F.; Iehl, J.; Oerthel, V.; Holler, M.; Illescas, B. M.; Muñoz, A.; Martín, N.; Rojo, J.; Sánchez-Navarro, M.; Cecioni, S.; et al. Fullerene Sugar Balls. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (22), 3860–3862.
- (16) Alkayal, N.; Zapsas, G.; Bilalis, P.; Hadjichristidis, N. Self-Assembly Behavior of Well-Defined Polymethylene-Block-Poly(Ethylene Glycol) Copolymers in Aqueous Solution. *Polymer* **2016**, *107*, 415–421.

Chapitre 3 :

***Auto-assemblages des
copolymères à blocs***

PTMC-*b*-PEG et

PTMC-*b*-PEG-SCH546738

Introduction

L'intérêt des copolymères à blocs amphiphiles est qu'ils sont capables de former spontanément dans un solvant sélectif, des structures complexes aux morphologies variées et contrôlées. Les systèmes amphiphiles auto-assemblés en solvant aqueux sont particulièrement pertinents pour leurs applications dans le domaine de la nanomédecine. La morphologie vésiculaire de taille nanométrique est très intéressante notamment comme utilisation en tant que nanovecteurs de principes actifs ou de ciblage. Les vésicules polymères, appelés polymersomes, sont formées d'une bicouche de copolymères à blocs amphiphiles ayant une membrane hydrophobe et enfermant un compartiment hydrophile. Les atouts de ces objets résident principalement dans leur robustesse, leur capacité d'encapsulation de principes actifs hydrophiles et/ou hydrophobes, leur versatilité et leur propriété de furtivité dans le corps.¹

Une série de copolymères à blocs PTMC-*b*-PEG a été synthétisée en modifiant leurs paramètres moléculaires afin d'obtenir des tailles de bloc hydrophobe différentes et donc de fraction hydrophile massique f . Ces valeurs, qui varient de 34 à 6%, sembleraient ne pas donner de morphologie vésiculaire, excepté pour un seul, selon la règle de Discher et Eisenberg² (les vésicules selon ce modèle devant être obtenues pour des $f = 35 \pm 10\%$). Comme cette loi n'est qu'empirique et qu'elle est basée sur des copolymères de type PBD-*b*-PEG et que d'autres systèmes donnent des tendances différentes, il est intéressant d'observer le comportement de notre série en solution.

Par ailleurs, il existe de nombreuses méthodes de mise en solution permettant de diriger et moduler les propriétés d'auto-assemblage et de couvrir une large gamme de taille et de morphologie de nano-objets selon l'utilisation souhaitée. Dans cette partie, nous nous intéresserons à la méthode de dissolution directe, et de nanopréciipitation manuelle ou contrôlée par un système de microfluidique.

L'objectif de cette étude est de corréler la fraction hydrophile f et la morphologie des auto-assemblages obtenus selon une même technique. En parallèle, différentes méthodes d'auto-assemblage seront effectuées sur un même copolymère afin d'observer l'influence du protocole sur la morphologie et taille obtenues.

Fort de tous ces résultats, nous pourrons réaliser les co-auto-assemblages des PTMC₉₆-*b*-PEG₄₅ et PTMC₉₆-*b*-PEG₄₅-SCH546738 dans les meilleures conditions afin d'obtenir des nanoparticules fonctionnelles mixtes de façon contrôlée et reproductible.

1. Techniques de préparation des échantillons

1.1 Dissolution directe

La dissolution directe est une des techniques d'auto-assemblage de copolymères amphiphiles les plus simples. En effet, elle consiste à solubiliser sous agitation le copolymère directement dans une solution aqueuse, avec une concentration supérieure à sa concentration micellaire critique (CMC).

La cinétique de l'auto-assemblage peut être très longue pour atteindre un équilibre thermodynamique des objets, influencée par les critères de taille du copolymère amphiphile et de sa fraction hydrophile, ses propriétés thermiques ou encore de la concentration du polymère dans l'eau.

1.2 Déplacement de solvant ou « Nanoprécipitation »

A la différence de la dissolution directe, le copolymère est complètement solubilisé dans un solvant organique (co-solvant des deux blocs) miscible à l'eau. Cette solution peut être ajoutée dans l'eau (ou un tampon) ou inversement. La taille et la morphologie des objets obtenus peuvent différer selon plusieurs paramètres comme le sens et la vitesse d'ajout, la température, la concentration ou encore la nature du solvant.^{1,3,4} Dans tous les cas, lorsque les deux phases sont en contact, le solvant organique va diffuser vers la phase aqueuse, diminuant petit à petit la solubilité du copolymère. Les blocs hydrophobes commencent alors à s'agréger déclenchant ainsi l'auto-assemblage.⁵ Lorsque le volume en eau est suffisant, tous les copolymères sont assemblés et les morphologies sont figées cinétiquement (en particulier si le bloc hydrophobe possède une haute T_g ou un caractère semi-cristallin). Le solvant organique est ensuite éliminé

par évaporation ou par dialyse. Ce procédé permet d'obtenir une bonne reproductibilité et un bon contrôle des tailles et morphologie des objets.

1.2.1 Nanoprécipitation manuelle

Concernant la méthode de nanoprécipitation manuelle que nous avons utilisé, les copolymères à blocs amphiphiles sont solubilisés dans le DMSO avec une concentration en polymère de 10 g/L. Afin d'être précis, le copolymère ainsi que le DMSO sont pesés ($d_{\text{DMSO}} = 1,1$) et placés dans un pilulier fermé contenant un barreau aimanté. La solution est agitée à température ambiante pendant une nuit à 25°C puis filtrée sur filtres Polytétrafluoroéthylène (PTFE) 0,22 μm .

Dans un pilulier, est placé un volume V_{DMSO} de la solution de copolymère à blocs dans le DMSO et sous agitation contrôlée (400 tr/min). Un volume V_{eau} d'eau ultrapure (dépendant du pourcentage d'eau final souhaité) préalablement filtrée sur filtre d'acétate de cellulose (AC) à 0,22 μm , est ajouté d'un seul coup à l'aide d'une micro pipette. Le sens d'ajout peut être inversé, où V_{DMSO} est ajouté sur V_{eau} .

Dans tous les cas, la suspension obtenue est ensuite dialysée contre de l'eau (membrane 3,5 kDa) pendant 24 heures (3 changements d'eau) pour éliminer le DMSO.

1.2.2 Nanoprécipitation contrôlée grâce à un système de microfluidique (Dolomite®)

Les expériences de nanoprécipitation contrôlée ont été réalisées à l'aide d'un appareil de microfluidique de marque Dolomite® équipé d'une puce de micromélangeur comportant deux circuits de 12 étapes de mélanges chacun comme illustré sur la figure 1 suivante.

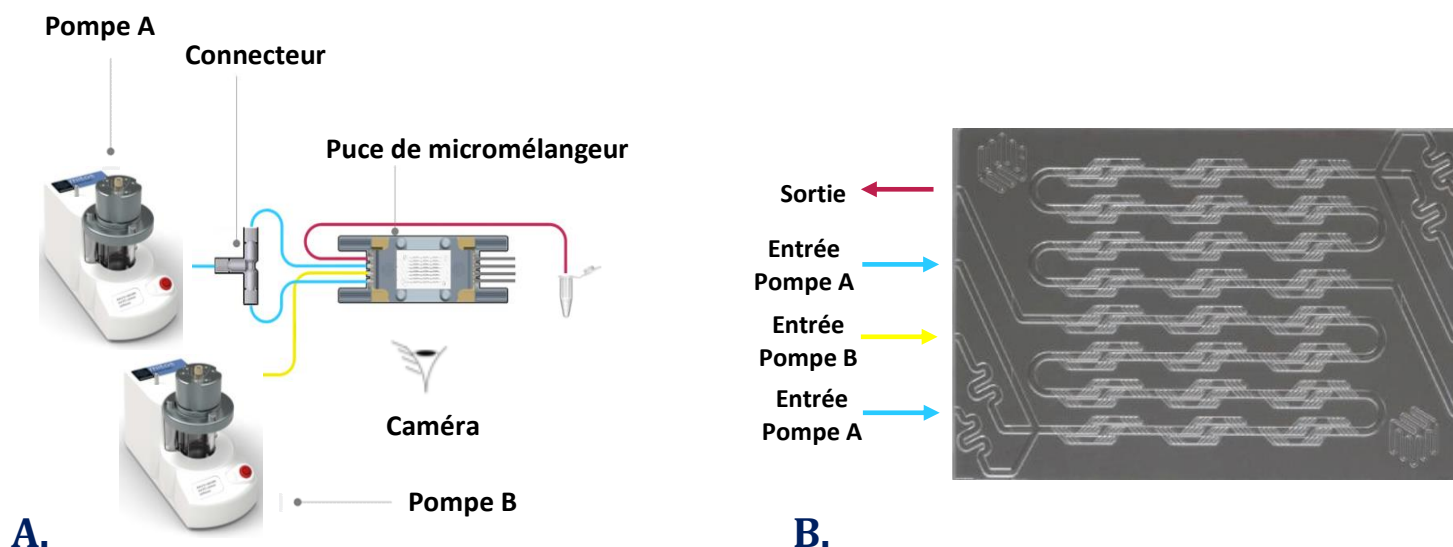


Figure 1 : Représentation du système de microfluidique Dolomite®

A. Schéma général du système ; B. Zoom sur la puce de micromélangeur (puce en verre, 22,5mm x 15mm x 2mm)

D'après www.dolomite-microfluidics.com

Le schéma est représenté ici avec deux pompes et un connecteur pour la pompe A, car il a été utilisé ainsi dans notre cas, mais il est possible d'utiliser 3 pompes pour un mélange de trois solvants ou pour encapsuler un principe actif par exemple. Ces pompes à régulation de pression sont équipées de débitmètres permettant d'obtenir des flux sans-à-coups et donc des débits stables allant de 30 à 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les tubulures en PTFE qui relient les pompes à la puce ont un diamètre interne de 0,5 mm et une longueur fixée. En effet, le diamètre et la longueur de ces tubes peuvent jouer un rôle dans la taille des objets obtenus. C'est pourquoi, ces paramètres-là sont fixés et ne sont jamais modifiés. La pièce de travail est réglée à une température fixée de 22 °C afin de travailler avec une viscosité de DMSO équivalente pour chaque test.

La pompe A est utilisé pour la solution de copolymères solubilisés dans le DMSO et la pompe B pour l'eau. Le mélange se fait donc avec une entrée d'eau et deux entrées de DMSO. Ces solutions sont préalablement filtrées sur filtres AC pour l'eau et PTFE pour le DMSO à 0,45 μm .

La puce peut être observée par une caméra connectée à l'ordinateur, ce qui nous permet de visualiser le mélange des solutions puisque les deux solvants possèdent une différence d'indice de réfraction (1,33 pour l'eau et 1,48 pour le DMSO à 25°C) (voir figure 2), ce qui permet de vérifier que l'étape de mélange se fait sans encombre. Effectivement, il est possible qu'une des tubulures se bouche mais également qu'une pompe fuit ou bien qu'il y ait des bulles ou des poussières dans la puce. Contrôler ces différents paramètres est essentiel pour la monodispersité et la bonne reproductibilité des auto-assemblages. C'est pourquoi, l'étanchéité du système a été améliorée en plaçant des rubans PTFE au niveau des connections. Le risque de poussières a été diminué en ajoutant des filtres (PTFE ou AC 0,45 μm) en sortie de pompes et le risque de bouchon dans les tubulures est évité en les nettoyant minutieusement au DMSO puis à l'éthanol et en les séchant sous flux d'azote après chaque utilisation.

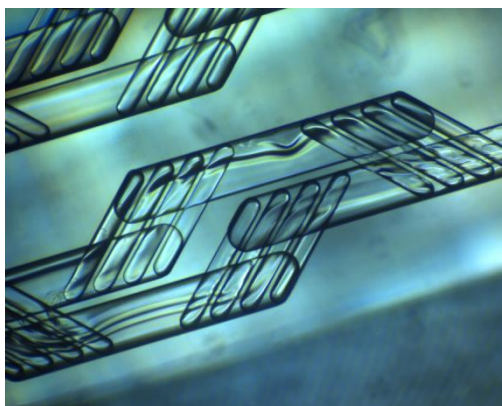


Figure 2 : Image du mélange entre l'eau et le DMSO dans la puce

Une fois les conditions optimisées, le débit de chaque pompe est rentré dans le logiciel et un délai de 5 minutes est respecté avant de prélever l'échantillon en sortie de puce. En effet, ce temps de 5 minutes, déterminé par un suivi des échantillons par diffusion dynamique de la lumière à 90° (DLS 90°), assure une stabilité du débit et de la taille de l'échantillon. Une fois récupérés, les échantillons sont rapidement analysés par DLS (90°) puis dialysés directement contre de l'eau (membrane 3,5 kDa) pendant 24 heures (3 changements de bain).

2. Techniques de caractérisation

2.1 Diffusion dynamique de la lumière (DLS 90°)

La diffusion dynamique de la lumière (« Dynamic Light Scattering » en anglais) est une technique non invasive qui permet de mesurer la taille et la distribution en taille des molécules et particules en solution dans la région submicronique. Le mouvement brownien des particules en suspension engendre une fluctuation de l'intensité de la lumière diffusée. L'analyse de ces fluctuations dans le temps permet d'obtenir des informations sur la vitesse de déplacement des objets. En effet, plus les particules sont petites plus elles se déplacent vite.

L'évolution temporelle de l'intensité est représentée par une fonction d'autocorrélation qui est analysée en utilisant la méthode des cumulants, permettant ainsi de déterminer un coefficient de diffusion D . Cette méthode permet ensuite de remonter à la taille des objets grâce à la loi de Stokes-Einstein :

$$R_h = \frac{kT}{6\pi \eta_0 D}$$

R_h : Rayon hydrodynamique des objets en solution ; k : constante de Boltzmann ;

T : température de l'échantillon ; η_0 : viscosité du solvant ; D : coefficient de diffusion

Le coefficient de diffusion D dépend de la fréquence de relaxation Γ et du vecteur d'onde q et est déterminé comme étant le coefficient directeur de la droite $\Gamma = f(q^2)$. Ici, l'angle θ est constant à 90°.

En pratique, les mesures sont réalisées sur les échantillons placés dans une cuve en quartz à l'aide d'un Malvern Zetasizer Nano ZS muni d'un laser He-Ne d'une longueur d'onde de 633 nm à 25°C et à un angle de 90°. Les mesures sont effectuées trois fois sur un même échantillon pour s'assurer de la bonne reproductibilité des résultats.

2.2 Diffusion statique et dynamique de la lumière multi-angles (MALS)

Lors des expériences de diffusion statique et dynamique de la lumière (MALS), l'intensité diffusée $I(q)$ est mesurée à différents angles (entre 30° et 150°) et par conséquent différents vecteurs d'onde q .

Dans le domaine de Guinier ($qR_g \ll 1$), la pente de la droite $\ln(I(q))$ en fonction de q^2 , permet de remonter à la valeur du rayon de gyration R_g grâce à la « loi de Guinier » suivante :

$$\ln(I(q)) = \ln(I(0)) - q^2 R_g^2 / 3$$

Les valeurs de R_h peuvent être aussi déterminées de la même façon que précédemment, mais à différents angles, permettant ainsi d'obtenir une valeur plus précise et indépendante d'un certain nombre d'approximations.

Finalement, le rapport R_g/R_h donne une estimation sur la morphologie des objets vésiculaire (autour de 1) ou micellaire (vers 0,775) obtenus. ⁶

En pratique, ces mesures ont été réalisées avec un goniomètre ALV-5000 équipé d'un laser He-Ne de 35 mW polarisé de longueur d'onde 633 nm et d'un corrélateur ALV-5000/EPP Multiple Tau Digital avec un temps d'échantillonnage initial de 125 ns.

Pour chaque expérience, 1 mL de la solution d'échantillon est introduit dans une cellule en verre cylindrique de 10 mm de diamètre, puis immergée dans un bain de toluène à 25°C . Les mesures ont été effectuées trois fois pour chaque angle de diffusion θ (entre 30° et 150° par pas de 5°) sur un temps de trois fois 5 secondes par angle. Les données sont analysées sur le logiciel d'acquisition ALV-5000E.

2.3 Spectroscopie de corrélation de durée de vie de fluorescence (FLCS)

Cette technique, réalisée à l'Institut de Chimie Macromoléculaire à Prague par l'équipe de Jiří Pánek, est utilisée pour étudier la présence et la stabilité des polymersomes fluorescents dans le milieu de culture cellulaire DMEM. Comme le DMEM est intrinsèquement fluorescent, le signal fluorescent détecté comprend des contributions à la fois des particules de polymères marquées et des molécules autofluorescentes présentes dans le DMEM. Dans les mesures réalisées, le FLCS est exploité pour faire la distinction entre les particules fluorescentes et les espèces fluorescentes du DMEM, c'est-à-dire la soustraction du fond de fluorescence parasite du signal utile.

La spectroscopie de corrélation de durée de vie de fluorescence (FLCS) est une variante de la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS), qui utilise des différences de taux de décroissance de l'intensité de fluorescence pour s'affranchir des données de FCS, comme les artefacts, ou séparer les enregistrements de données d'un mélange de plusieurs fluorophores afin d'obtenir des fonctions d'autocorrélation distinctes.⁷

Dans les deux cas, la fonction d'autocorrélation temporelle est la principale donnée obtenue par la mesure. Elle est mathématiquement notée $G(t)$ où t représente le temps de corrélation. La décroissance de la courbe peut être liée aux propriétés dynamiques des objets étudiés, le plus souvent à leur coefficient de diffusion D .

Dans le cas le plus simple d'un composant diffusant, la forme de la fonction d'autocorrélation peut être décrite par l'équation suivante :

$$G(t) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{t}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{t}{\kappa^2 \tau_D}\right)^{-\frac{1}{2}}$$

N : Nombre moyen d'espèces fluorescentes dans le volume focal ; $\kappa = w_z/w_{xy}$ où w_{xy} et w_z sont la largeur du volume confocal dans le plan x - y (perpendiculaire à l'axe optique) et le long de l'axe z ; τ_D : Temps de diffusion défini par l'équation $\tau_D = w_{xy}^2/4D$.

Le coefficient de diffusion D est proportionnel au rayon hydrodynamique R_h de l'objet en solution et peut être calculé grâce à la relation de Stokes-Einstein donné par l'équation suivante :

$$D_0 = \frac{kT}{f} = \frac{kT}{6\pi \eta_0 R_h}$$

k : Constante de Boltzmann ; *T* : Température ; *f* : Coefficient de friction ; η : viscosité du solvant

En pratique, les échantillons sont placés dans une cuvette (avec une concentration de 5 nM en fluorophore, ici la Rhodamine) et sont excités par un laser Solea supercontinuum émettant une lumière à 545 nm à travers un miroir dichroïque à 543 nm. Le signal de fluorescence passe à travers un filtre d'émission et est détectée par un photomultiplicateur hybride opérant en mode comptage de photons. Les mesures sont réalisées à 23 ± 1 °C. Les courbes obtenues par le logiciel permettent de récupérer les valeurs des coefficients de diffusion D correspondants et donc des rayons hydrodynamiques R_h correspondants.

2.4 Diffusion de neutrons aux petits angles (SANS)

Les expériences de diffusion de neutrons aux petits angles (SANS), réalisées au Laboratoire Léon Brillouin (LLB) sur le site du CEA de Saclay par Coralie Lebleu (LCPO) en collaboration avec Dr. Annie Brûlet (LLB), consistent à envoyer un faisceau monochromatique de neutrons possédant une certaine longueur d'onde λ sur un échantillon en solution. Les neutrons sont préalablement produits dans un réacteur par fission nucléaire de l'uranium 235. Ce faisceau est collimaté à l'aide de diaphragmes avant d'atteindre l'échantillon. Un détecteur permet ensuite d'analyser la variation du nombre de neutrons diffusés (proportionnelle à l'intensité $I(q)$ du signal) en fonction de leur angle de diffusion (voir figure 3).

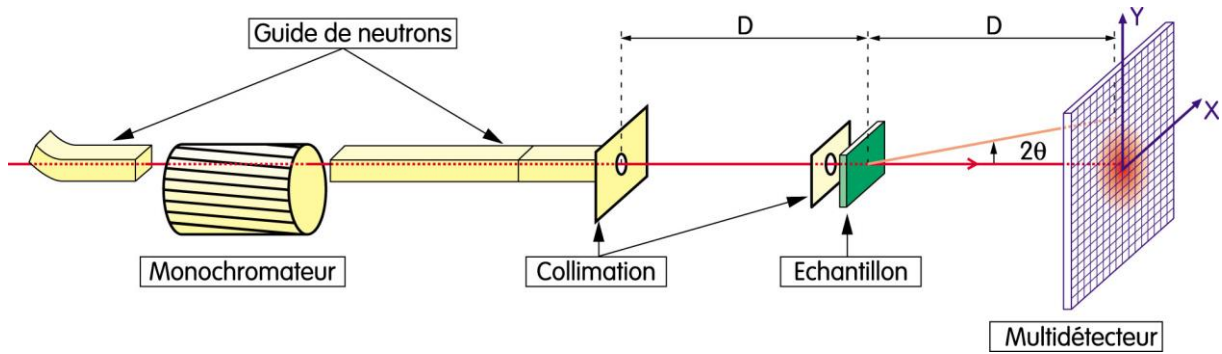


Figure 3 : Spectromètre de diffusion de neutrons aux petits angles

Image tirée de "Small Angle Neutron Scattering - Neutron Reflectometry" de Fabrice Cousin

Différentes configurations des spectromètres ont été utilisées (selon la longueur d'onde λ et la distance échantillon-détecteur D choisies) afin de couvrir une gamme de vecteurs de diffusion q la plus large possible tout en ayant un recouvrement suffisant entre les gammes. Les angles θ balayés ne sont pas plus grands que 5° (d'où l'appellation de diffusion aux « petits angles »).

L'intensité brute collectée au niveau du multidétecteur est corrigée afin de ne recueillir que l'intensité diffusée par les particules de l'échantillon $I(q)$ et ainsi s'affranchir des intensités provenant de la cellule vide ou encore du solvant.

L'intensité diffusée $I(q)$ dépend du nombre de particules N de volume $V_{part.}$ placées dans un volume total V et peut être exprimée en fonction du module du vecteur d'onde q , selon l'équation suivante :

$$I(q) = \Phi \Delta\rho^2 V_{part.} P(q) \cdot S(q)$$

Fraction volumique $\Phi = \frac{NV_{part.}}{V}$; $P(q)$: Facteur de forme des particules traduisant la taille et la géométrie des particules ; $S(q)$: Facteur de structure représentant les interactions particule-particule ; $(\Delta\rho)^2$: Contraste, soit la différence entre la densité de longueur de diffusion entre le solvant et la particule

Dans le cas de solutions diluées où les interactions particules-particules sont faibles, le facteur $S(q)$ peut être négligé.

Afin de pouvoir réaliser ces analyses, les échantillons doivent être en suspension dans l'eau lourde (D_2O) afin d'avoir un meilleur contraste entre l'échantillon et le solvant et donc un meilleur signal. En effet, les valeurs de densité de longueur de diffusion ρ pour le poly(triméthylène carbonate), le poly(éthylène glycol), l'eau et l'eau lourde sont les suivantes : $\rho_{PTMC} = 1,40.10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$, $\rho_{PEG} = 5,69.10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$, $\rho_{H_2O} = -0,56.10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ et $\rho_{D_2O} = 6,35.10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$. Etant donné que les chaînes de PEG sont considérées comme étant totalement hydratées dans l'eau, le contraste prend seulement en compte le PTMC. Effectivement, le contraste $\Delta\rho$ est optimal dans l'eau lourde ($\Delta\rho_{PTMC,D_2O} = 4,95.10^{-6} \text{ \AA}^{-2} > \Delta\rho_{PTMC,H_2O} = -1,96.10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$).

La courbe de l'intensité $I(q)$ en fonction de q [$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$] obtenue, nous donne des éléments essentiels pour la détermination de la morphologie des objets. Ces courbes sont ensuite ajustées à des modèles dont le facteur de forme $P(q)$ dépend de la morphologie des objets. L'ajustement a été fait à l'aide du logiciel SasView en utilisant plusieurs modèles : sphère, vésicule et fractale de cœur coquille.⁸

Le modèle de sphère provient du modèle de Guinier et se base sur l'expression du facteur de forme sous l'équation suivante :

$$P(q, R) = \left[V_p \frac{\sin(qR) - qR \cos(qR)}{(qR)^3} \right]^2$$

R et V_p sont respectivement le rayon et le volume de la particule sphérique

Ce modèle permet de décrire une morphologie de micelle ayant un cœur de PTMC de rayon R ($\rho_{\text{sphère}} = \rho_{PTMC}$) et possédant des chaînes de PEG en surface qui sont totalement hydratées dans le solvant ($\rho_{\text{solvant}} = \rho_{D_2O}$). Une polydispersité sur le rayon R a été prise en compte sous la forme d'une déviation standard σ d'une distribution log-normale.

Le modèle de vésicule est décrit par un modèle de sphère creuse polydisperse où l'on considère que les objets diffusants sont des coquilles de PTMC ($\rho_{coquille} = \rho_{PTMC}$) d'épaisseur $\delta = R_e - R_c$ (différence entre le rayon externe R_e et le rayon de cœur R_c) en solution dans l'eau lourde ($\rho_{solvant} = \rho_{D_2O} = \rho_{cœur}$) comme illustré sur la figure 4.

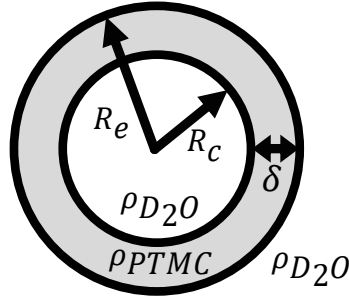


Figure 4 : Schéma du modèle de vésicule de rayon de cœur R_c et de rayon externe R_e donnant une épaisseur δ de membrane de PTMC.

Ainsi, le facteur de forme peut être défini grâce à une pondération par les volumes respectifs des sphères externe V_{R_e} et de cœur V_{R_c} selon l'équation suivante :

$$P(q, R_e, R_c) = \frac{9}{(V_{R_e} - V_{R_c})^2} \left[V_{R_e} \frac{\sin(qR_e) - q\cos(qR_e)}{(qR_e)^3} - V_{R_c} \frac{\sin(qR_c) - q\cos(qR_c)}{(qR_c)^3} \right]^2$$

Des polydispersités géométriques (distributions en taille σ) ont été intégrées sur la valeur du rayon du cœur R_c et sur l'épaisseur de la membrane δ , ce qui donne une intensité diffusée sous la forme :

$$I(q) = \Phi(\Delta\rho)^2 \frac{\iint_{R_c, \delta} (V_{R_e} - V_{R_c})^2 P(q, R_e, R_c) F(R_c, \sigma_{R_c}) dR_c F(\delta, \sigma_\delta) d\delta}{\iint_{R_c, \delta} (V_{R_e} - V_{R_c}) F(R_c, \sigma_{R_c}) dR_c F(\delta, \sigma_\delta) d\delta}$$

en choisissant une distribution log-normale pour R_c selon la relation suivante :

$$F(R_c, R_{c\text{moy}}, \sigma_{R_c}) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_{R_c} R_c} \exp \left[-\frac{(\ln R_c - R_{c\text{moy}})^2}{2\sigma_{R_c}^2} \right]$$

et une distribution gaussienne pour δ :

$$F(\delta, \delta_{moy}, \sigma_\delta) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_\delta} \exp\left[-\frac{(\ln\delta - \delta_{moy})^2}{2\sigma_\delta^2}\right]$$

Le modèle de fractale de cœur-coquille (Fractal core-shell - FCS) est décrit comme un modèle de fractale ayant comme composante de base des sphères cœur-coquille. Ce modèle permet de décrire des agrégats sphériques de vésicules. Différents paramètres sont à prendre en compte pour exprimer le facteur de forme et le facteur de structure d'un tel modèle, selon les équations suivantes :

$$P(q) = \frac{\phi}{V_e} \left[3V_c(\rho_c - \rho_s) \frac{\sin(qR_c) - qR_c \cos(qR_c)}{(qR_c)^3} + 3V_e(\rho_s - \rho_{D_2O}) \frac{\sin(qR_e) - qR_e \cos(qR_e)}{(qR_e)^3} \right]^2$$

(V_c, V_e) et (R_c, R_e) sont le volume et le rayon du cœur (solvant) ou externe et $(\rho_c = \rho_{D_2O}, \text{ et } \rho_s)$ sont les densités de longueur de diffusion du cœur (solvant D_2O) et de la couronne (PTMC)

et

$$S(q) = 1 + \left[\frac{D_f \Gamma(D_f - 1)}{(1 + 1/(q\xi)^2)^{(D_f-1)/2}} \frac{\sin((D_f - 1) \tan^{-1}(q\xi) q)}{(qR_e)^{D_f}} \right]^2$$

D_f : Dimension de la fractale ; ξ : Longueur de corrélation dans la fractale

Une polydispersité de géométrie log-normale a été appliquée au rayon de la sphère entière σ_{R_e} tandis qu'une polydispersité de géométrie gaussienne a été choisie pour l'épaisseur de la coquille de PTMC ($\delta = R_e - R_c$).

En pratique, les échantillons ont été analysés en suspension dans l'eau lourde (D_2O) à une concentration d'environ 1 g/L en particules dans des cellules en quartz (Thuet®) de 5 mm de trajet optique. Pour obtenir 1,5 mL d'échantillon dans D_2O , deux cycles de lavage par D_2O (2 fois 8 mL) puis reconcentration par ultrafiltration (membrane de seuil de coupure 1kDa et de 25 μm de diamètre, Ultracel® Millipore), ont été menés sur 1,5 mL de chaque échantillon dans H_2O .

2.5 Microscopie électronique à transmission (TEM)

Cette technique permet de visualiser les nanoparticules à l'état sec sur une grille de microscopie en cuivre recouverte d'un film de carbone, grâce à un microscope et de déterminer leur taille à sec et leur morphologie si le contraste est suffisamment important. Pour cela, une goutte de la suspension est déposée sur la grille. Après une minute, elle est séchée à l'aide de papier filtre puis une goutte de colorant est déposée puis séchée elle aussi au bout d'une minute et observée au microscope.

Les images de ces grilles ont été prises par Coralie Lebleau (LCPO) sur un microscope Hitachi H7650 du Bordeaux Imaging Center (BIC) fonctionnant sous haute tension à 80 kV et équipé d'une caméra GATAN Orius de 11 Mégapixels. Les différentes grilles utilisées proviennent de AgarScientific® pour les grilles de cuivres recouvertes d'un film de carbone et formvar et utilisées du côté formvar et de PacificGrid-Tech® pour les grilles de cuivre ayant un film de carbone très fin (5 nm). L'Uranyless® provient du fournisseur DeltaMicroscopies®, les solutions d'acétate d'uranyle étaient disponibles au BIC.

2.6 Cryo-microscopie électronique à transmission (Cryo-TEM)

La Cryo-TEM permet l'observation directe de la morphologie et de la taille des nanoparticules dans l'eau vitrifiée. Pour cela, une goutte de la suspension relativement concentrée est déposée sur une membrane en carbone. L'excès d'eau est absorbé sur papier filtre et la membrane subit très rapidement une trempe dans un mélange éthane/propane liquide à -170°C, ce qui permet la formation d'un film très mince de glace amorphe à la surface des puits de la grille où s'est déposée la suspension de nanoparticules. Ces grilles sont alors transférées dans le microscope et observées à basse température.

Les expériences de cryo-TEM ont été réalisées par Jean-Michel Guigner du l'IMPMC (Jussieu, Paris) sur un microscope 3200FSC Jeol fonctionnant à 300 kV en champ clair et en utilisant une caméra Ultrascan Gatan 4000 CCD pour acquérir les images.

3. Auto-assemblage des copolymères à blocs PTMC_n-*b*-PEG₄₅

Les copolymères à blocs amphiphiles sont composés d'au moins deux segments de nature chimique différente. En solution, l'incompatibilité des deux blocs se traduit en termes de différence de solubilité, et en choisissant un solvant dans lequel seulement un des deux blocs est soluble, ces copolymères à blocs vont s'auto-assembler au-delà d'une certaine concentration (concentration micellaire critique CMC). Ces objets en solution, peuvent être obtenus par différentes méthodes comme par exemple la dissolution directe, la nanoprecipitation ou encore la réhydratation de film.⁹ Il est donc possible d'obtenir des morphologies et tailles différentes variant d'une dizaine de nanomètres à quelques centaines de nanomètres, ce qui en fait au sens strict des nanoparticules. Les plus couramment obtenues sont les micelles sphériques, les micelles cylindriques et les vésicules, cependant des morphologies plus complexes ne sont pas exclues.

Des études menées par Discher et Eisenberg¹ sur des systèmes poly(éthylène glycol)-*b*-polybutadiène (PEG-*b*-PBD), mettent particulièrement au jour le fait que la géométrie du copolymère est directement liée à la fraction massique hydrophile f des copolymères à blocs (voir figure 5).

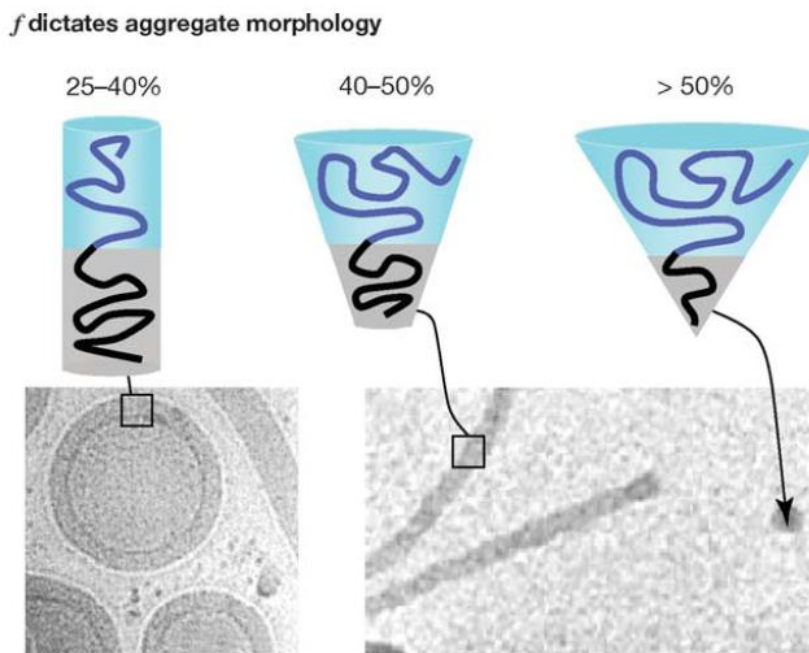


Figure 5 : Représentation schématique de l'auto-assemblage des copolymères à blocs amphiphiles en solution et exemple de morphologies obtenues ²

Cependant, d'autres études menées notamment sur les copolymères à blocs poly(oxide d'éthylène-*b*- ϵ -caprolactone) PEO-*b*-PCL, poly(oxide d'éthylène-*b*-D,L-lactide) PEO-*b*-PDLLA, poly(oxide d'éthylène-*b*-styrène) PEO-*b*-PS, poly(oxide d'éthylène-*b*-butadiène) PEO-*b*-PBD ou poly(oxide d'éthylène-*b*-méthyl méthacrylate) PEO-*b*-PMMA, ont montré qu'une fraction hydrophile massique f inférieure à 20 % permettait d'obtenir des polymersomes après auto-assemblage (allant même jusqu'à 13 % pour les segments hydrophobes les plus polaires).¹⁰ Cette étude montre également l'influence du protocole utilisé sur la taille et la morphologie d'un même copolymère.

L'auto-assemblage de la série de copolymères à blocs PTMC-*b*-PEG synthétisés précédemment, a donc été réalisé afin d'étudier leur comportement en solution aqueuse et ainsi observer l'influence de la fraction hydrophile massique f sur la morphologie des objets et également l'influence de la méthode de préparation sur la nature des objets pour un des copolymères.

3.1 Etude de la série de copolymères à blocs PTMC_n-*b*-PEG₄₅

Des nanoparticules issues de l'auto-assemblage des différents PTMC_n-*b*-PEG₄₅ synthétisés précédemment (avec $n = 38, 96, 144, 170$ et 332 correspondant respectivement à des $f = 34, 17, 12, 10$ et 6%) ont été préparées afin d'observer l'influence de la fraction hydrophile massique f sur la nature des objets.

Pour cela, différentes techniques ont été testées ; la dissolution directe et la nanoprécipitation. En effet, de nombreux auto-assemblages sont réalisés à partir de ces techniques et des objets de différentes tailles et morphologies peuvent être obtenus.

Notre stratégie a donc été de déterminer la technique d'auto-assemblage la plus adaptée pour comparer nos systèmes.

3.1.1 Par dissolution directe

La dissolution directe a tout d'abord été testée sur deux des copolymères $PTMC_n-b-PEG_{45}$ ($n=96$ et 144) où 3 mL d'eau osmosée a été rajoutée à 3 mg de copolymère et agitée à température contrôlée. La taille des objets ainsi que l'indice de polydispersité (PDI) ont été suivi par DLS (90°) au cours du temps (figure 6).

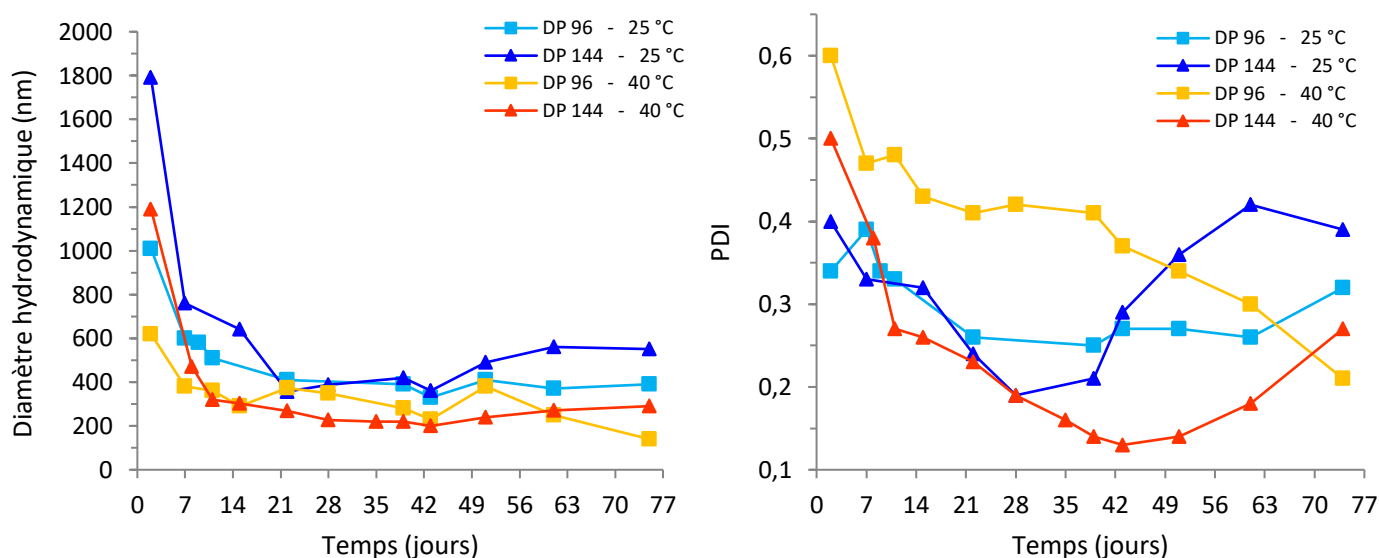


Figure 6 : Suivi cinétique des tailles et du PDI des objets obtenus en dissolution directe des $PTMC-b-PEG$

DP 96 : $PTMC_{96}-b-PEG_{45}$ (Carrés bleus : $25^\circ C$ et jaunes : $40^\circ C$) ;
DP 144 : $PTMC_{144}-b-PEG_{45}$ (Triangles bleus : $25^\circ C$ et oranges : $40^\circ C$)

Les objets obtenus au bout de 77 jours n'ont toujours pas atteint un état d'équilibre car le diamètre hydrodynamique ne s'est pas stabilisé et sont assez polydisperses quelle que soit la température. Il semblerait que le fait de chauffer à une température avoisinant la température de fusion du copolymère ($40^\circ C$) diminue la polydispersité des nanoparticules mais les PDI restent cependant élevés (entre 0,2 ($40^\circ C$) et 0,4 ($25^\circ C$)).

La dissolution directe dans ces conditions n'est donc pas une méthode adaptée pour obtenir des objets de tailles bien définies avec cette nature de copolymères à blocs.

3.1.2 Par nanopréciipitation manuelle

Avant de réaliser les expériences de nanopréciipitation manuelle, des tests d'ajout successifs d'eau dans une solution de copolymère à bloc dans le DMSO ont été réalisés afin de visualiser à quel ratio d'H₂O/DMSO il faut se placer pour obtenir des objets. Ces expériences ont été effectuées sur les copolymères PTMC-*b*-PEG avec des DP de 38, 96 et 170. Les mélanges ont été observés en DLS (90°) afin de mesurer l'influence du pourcentage d'eau sur l'intensité diffusée par les particules, traduite sur le logiciel de Malvern® par le « Derived Count Rate » (DCR), c'est-à-dire le nombre de photons détectés par seconde, valeur dépendant de la concentration et de la taille des particules (voir figure 7).

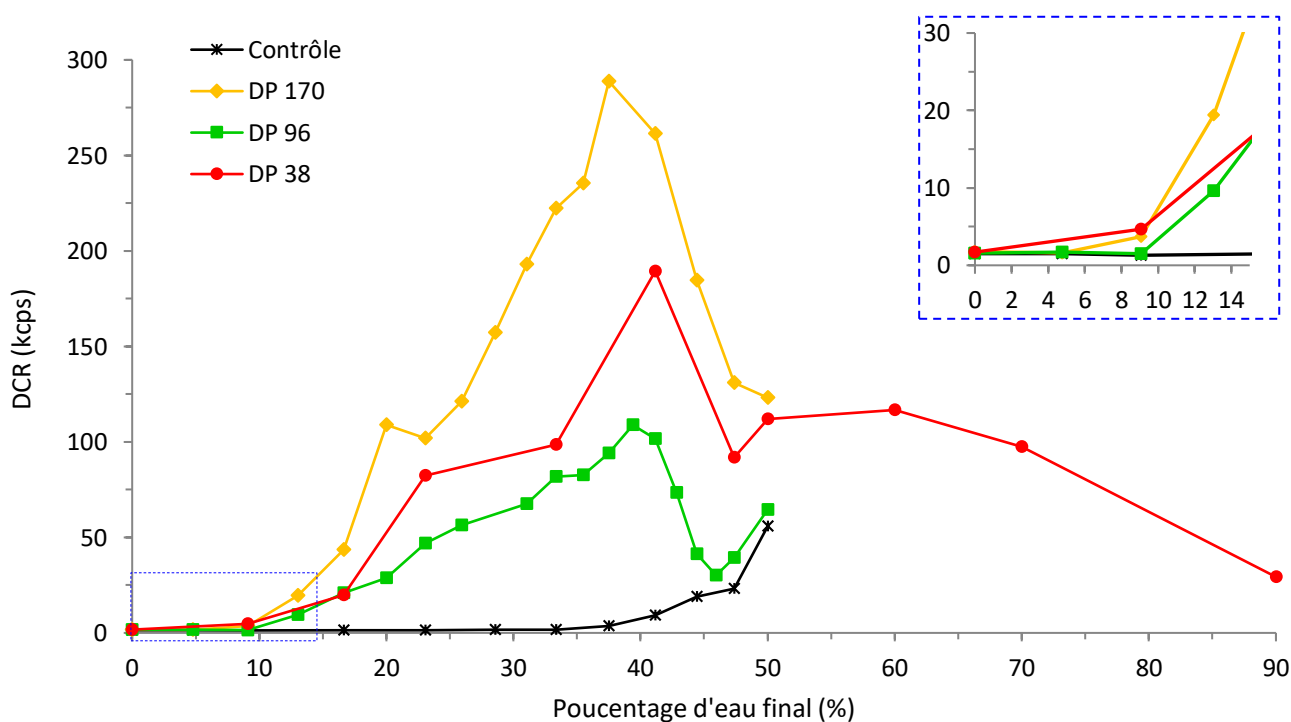


Figure 7 : DCR en fonction du pourcentage d'eau final

DP 170 : PTMC₁₇₀-*b*-PEG₄₅ ; **DP 96** : PTMC₉₆-*b*-PEG₄₅ ; **DP 38** : PTMC₃₈-*b*-PEG₄₅ ; **Contrôle** : Ajout d'eau dans du DMSO

L'apparition des premiers objets est observée aux alentours de 5% d'eau dans le volume final pour les DP 38 et 170 et vers 9% pour le DP 96. La valeur du DCR augmente avec l'ajout d'eau, ce qui signifie que des objets continuent à se former ou à évoluer jusqu'à

atteindre un maximum vers 40%. A partir de cette valeur, le DCR diminue car ce n'est plus la formation d'objet que l'on observe mais une dilution de ces objets par ajout d'eau.

Cette expérience montre l'importance du pourcentage final d'eau car s'il est trop faible, les objets ne seront sans doute pas stables et pas tous formés. Il faut donc se placer au-dessus de 40% en eau final pour des expériences de nanopréciipitation.

Pour les premières expériences d'auto-assemblage par nanopréciipitation manuelle, le pourcentage final en eau a été fixé à 90%. Pour cela, les différents copolymères à blocs sont solubilisés dans le DMSO à 10 g/L puis 300 μ L de la solution sont placés dans un pilulier sous agitation (400 tr/min). Un volume de 2,7 mL d'eau osmosée est alors ajouté rapidement pour provoquer l'auto-assemblage. Après dialyse contre de l'eau, les suspensions (appelées NP) sont analysées par DLS (90°) (voir figure 8).

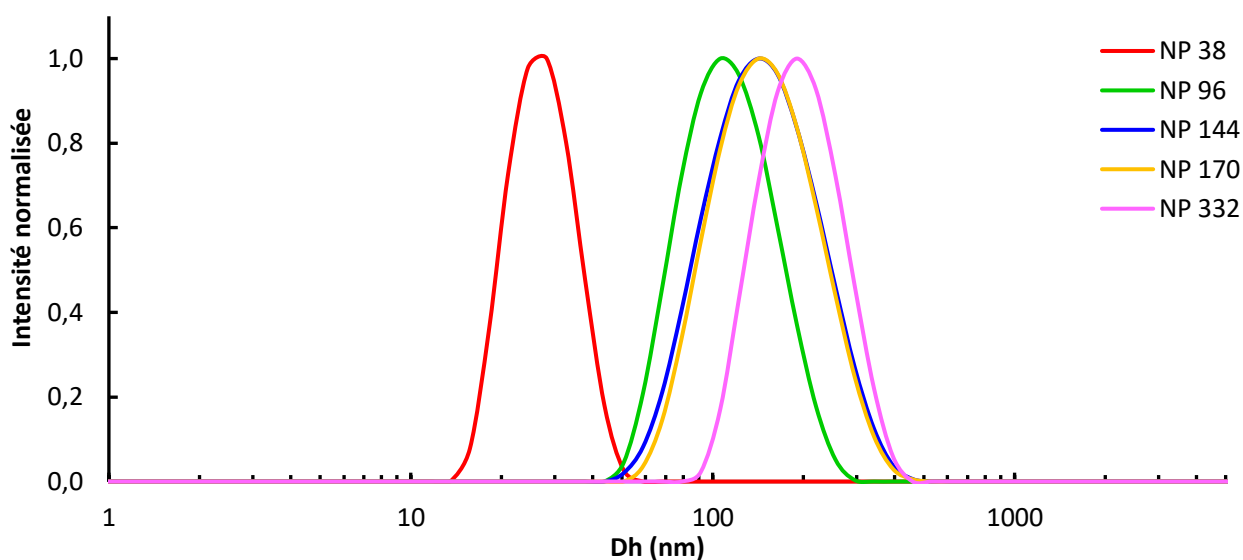


Figure 8 : Intensité diffusée normalisée en fonction du diamètre hydrodynamique (D_h) des objets formés par nanopréciipitation manuelle

NP 38 : PTMC₃₈-b-PEG₄₅ ; **NP 96** : PTMC₉₆-b-PEG₄₅ ; **NP 144** : PTMC₁₄₄-b-PEG₄₅ ; **NP 170** : PTMC₁₇₀-b-PEG₄₅ ;
NP 332 : PTMC₃₃₂-b-PEG₄₅

La taille des objets obtenus dans ces conditions, varie de 12 nm de rayon pour NP 38 à 100 nm pour NP 332 et semble augmenter avec le DP du PTMC (voir tableau 1). Ces nano-objets sont relativement monodisperses puisque le PDI se situe entre 0,05 et 0,15.

La méthode de nanopréciipitation manuelle apparait donc comme étant une meilleure alternative de production de nano-objets monodisperses comparé à la dissolution directe.

Des mesures de diffusion statique et dynamique de la lumière multi-angles (MALS) ont été réalisées sur ces échantillons afin de déterminer les rayons hydrodynamiques (R_h) et de giration (R_g) des objets en solutions. Ces valeurs sont obtenues grâce aux tracés de $\ln(I(q)) = f(q^2)$ en SLS et $\Gamma = f(q^2)$ en DLS qui sont illustrés sur la figure 9 ci-dessous.

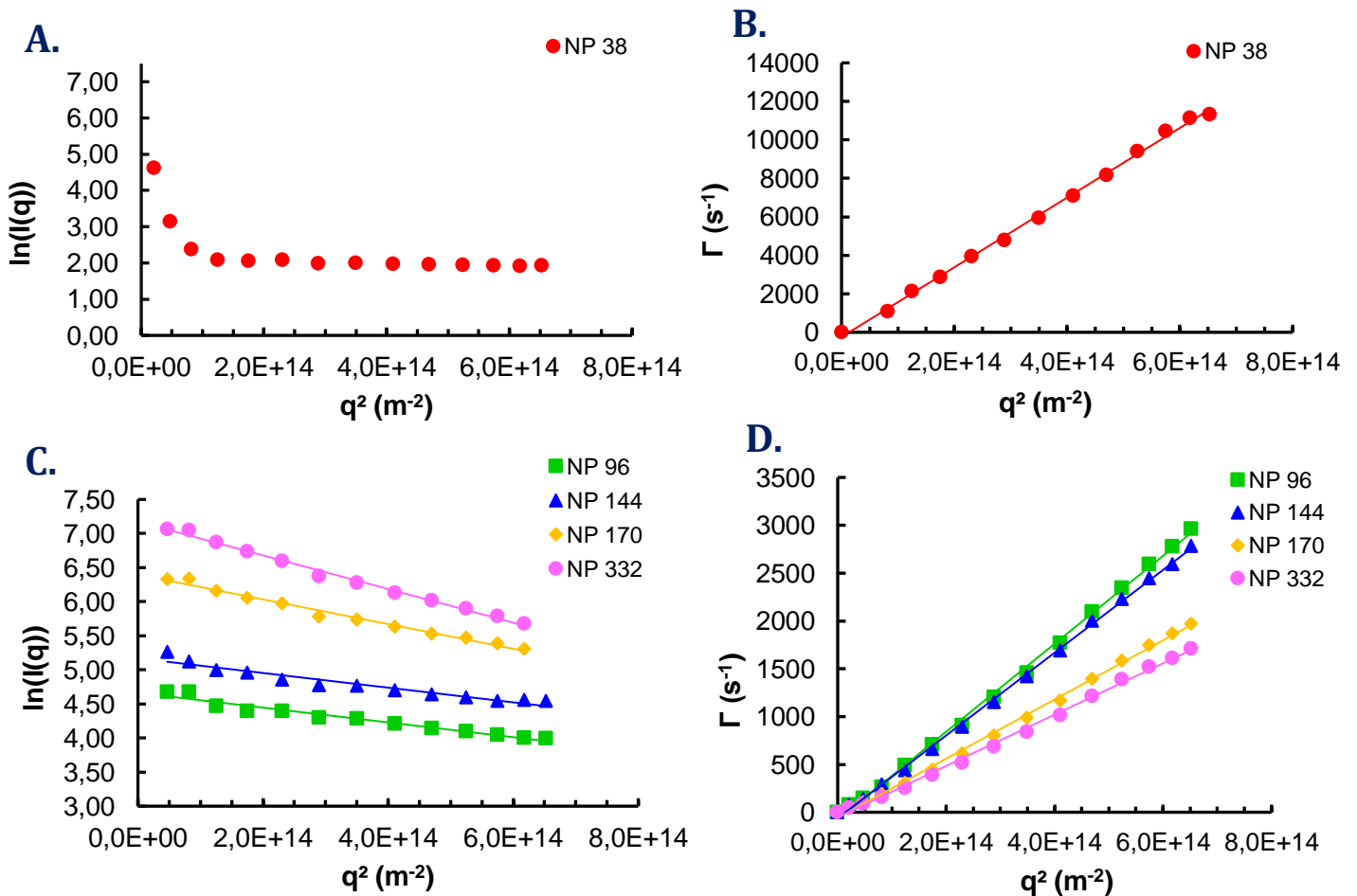


Figure 9 : Tracés des différentes données obtenues en MALS des différentes NP

A, C : Tracé de $\ln(I(q)) = f(q^2)$; B, D : Tracé de $\Gamma = f(q^2)$

NP 38 : PTMC₃₈-b-PEG₄₅ ; NP 96 : PTMC₉₆-b-PEG₄₅ ; NP 144 : PTMC₁₄₄-b-PEG₄₅ ; NP 170 : PTMC₁₇₀-b-PEG₄₅ ;

NP 332 : PTMC₃₃₂-b-PEG₄₅

Le rapport R_g/R_h déduit grâce aux expériences de MALS est proche de 1 dans le cas des NP 96, 144, 170 et 332, ce qui laisse penser à une structure vésiculaire. Le R_g du NP 38 est à priori trop faible pour être mesuré de façon fiable dans cette expérience. On peut cependant déduire que ce copolymère ne forme pas de vésicules au vu de son rayon très petit qui impliquerait une courbure de la membrane bien trop importante.

Les expériences ont été reproduites 2 à 3 fois et les valeurs ont été répertoriées dans le tableau 1 suivant :

| DP (PTMC) NP | DLS 90° | | MALS | | |
|-----------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|
| | R_h (nm) | PDI | R_g (nm) | R_h (nm) | R_g/R_h |
| 38 | 12 | 0,1 | / | 13 | / |
| | 12 | 0,05 | | 15 | |
| 96 | 58 | 0,13 | 50 | 49 | 1,02 |
| | 60 | 0,12 | 57 | 53 | 1,08 |
| 144 | 55 | 0,14 | 49 | 46 | 1,07 |
| | 63 | 0,14 | 58 | 57 | 1,02 |
| 170 | 80 | 0,15 | 56 | 58 | 0,97 |
| | 55 | 0,12 | 48 | 51 | 0,94 |
| 332 | 92 | 0,13 | 74 | 78 | 0,95 |
| | 92 | 0,13 | 81 | 84 | 0,96 |
| 332 | 57 | 0,12 | 49 | 51 | 0,96 |
| | 100 | 0,09 | 86 | 90 | 0,96 |
| 332 | 100 | 0,13 | 92 | 92 | 1,00 |
| | 95 | 0,07 | 79 | 87 | 0,91 |

Tableau 1 : Données DLS (90°) et MALS des différents objets obtenus par nanopréciipitation manuelle

Les valeurs en bleu correspondent à celles des échantillons dont les courbes DLS 90° et MALS sont représentées en figure 8 et 9

NP 38 : PTMC₃₈-b-PEG₄₅ ; **NP 96** : PTMC₉₆-b-PEG₄₅ ; **NP 144** : PTMC₁₄₄-b-PEG₄₅ ; **NP 170** : PTMC₁₇₀-b-PEG₄₅ ;

NP 332 : PTMC₃₃₂-b-PEG₄₅

Ces expériences de nanopréciipitation manuelles ont été réalisées sans contrôle de température. Or au laboratoire, cette dernière peut varier de 18 à 30 degrés, ce qui joue forcément sur la viscosité du DMSO, et donc sur l'auto-assemblage et la reproductibilité des résultats, comme observé dans le tableau. Cependant, le ratio R_g/R_h semble toujours proche de 1, révélant à priori la conservation d'une morphologie de type vésiculaire.

Ces échantillons ont alors été reproduits dans des conditions contrôlées (pièce climatisée à 22°C et bain marie contenant les échantillons à 25°C) et également analysés par DLS (90°) et MALS (voir tableau 2). Les rapports R_g/R_h restent proches de 1 mais sont quand même faibles, ce qui laisse penser qu'il y aurait majoritairement des vésicules mais également présence d'autres morphologies.

Dans le but d'obtenir plus d'informations sur la morphologie de ces objets, nous avons réalisé des expériences de diffusion de neutrons aux petits angles (SANS).

Comme expliqué précédemment, pour pouvoir observer des dimensions spécifiques au PTMC au sein des particules, le contraste entre le PTMC et le solvant doit être le meilleur possible. Pour cela, les échantillons dans H₂O ont subi des lavages au D₂O puis concentrés par ultrafiltration. Un contrôle des différents échantillons a été effectué par DLS (90°) afin de s'assurer que l'ultrafiltration et le changement de solvant n'aient pas altéré la taille et la dispersité des échantillons.

Les échantillons, à environ 1 g/L dans le D₂O, ont alors été analysés par SANS. Les courbes de l'intensité diffusée en fonction du vecteur d'onde q [$I(q) = f(q)$] ont été obtenues pour chaque copolymères à blocs et sont tracées sur la figure 10.

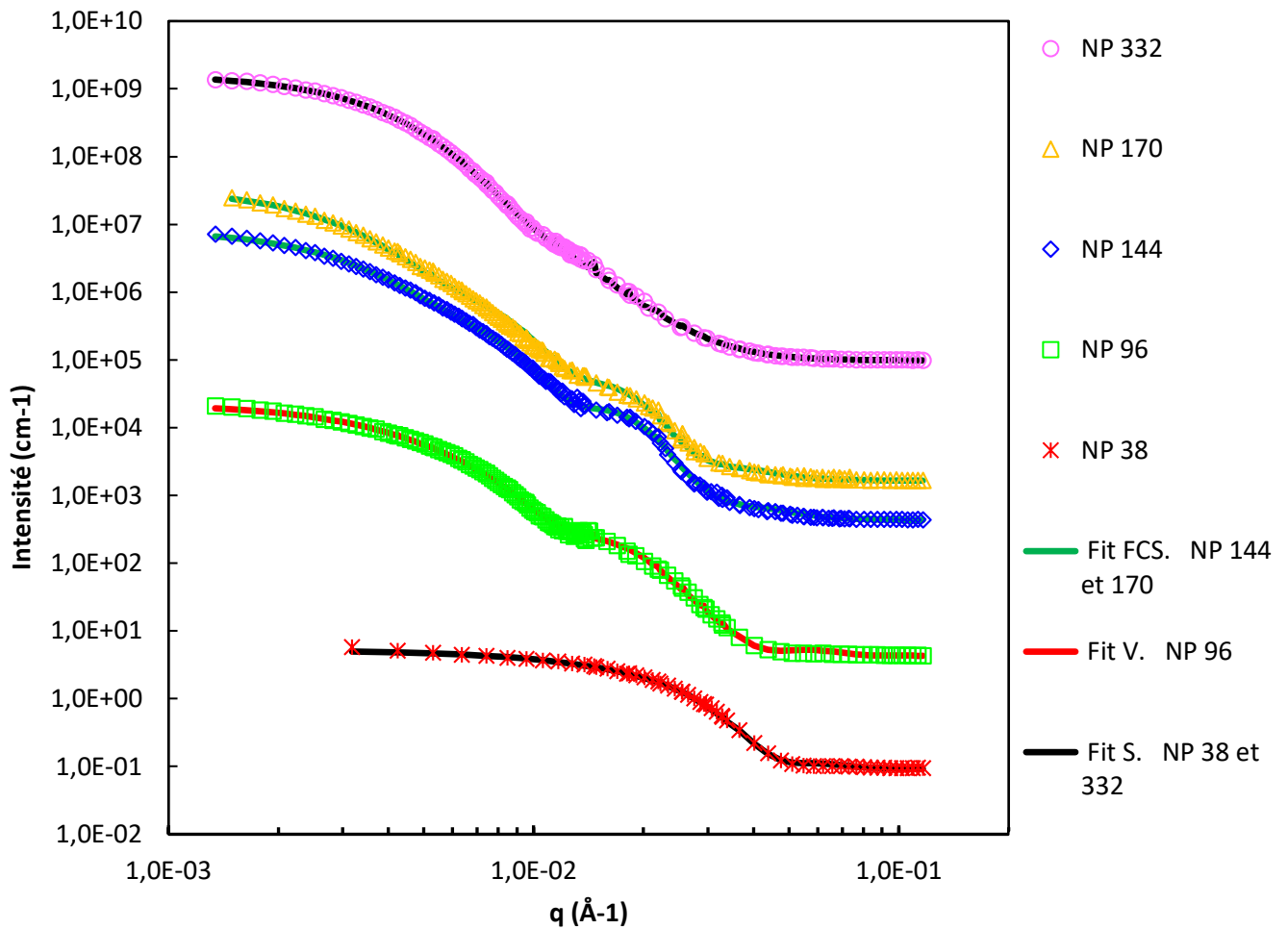


Figure 10 : Intensité diffusée en fonction de q en SANS des échantillons dans le D_2O préparés par nanoprécipitation manuelle

FCS. : Fractal Core Shell ; V. : Vésicule ; S. : Sphère

Intensités multipliées par un facteur pour une meilleure visualisation

NP 38 : PTMC₃₈-b-PEG₄₅ ; NP 96 : PTMC₉₆-b-PEG₄₅ ; NP 144 : PTMC₁₄₄-b-PEG₄₅ ; NP 170 : PTMC₁₇₀-b-PEG₄₅ ;

NP 332 : PTMC₃₃₂-b-PEG₄₅

L'allure des courbes est relativement proche dans le cas des NP 96, 144 et 170 par rapport à celle des courbes des NP 38 et 332.

En effet, dans les trois premiers cas, une diminution de l'intensité diffusée en q^{-4} jusqu'à une oscillation d'asymptote au niveau des valeurs intermédiaires de q en q^{-2} , caractéristique d'une interface lamellaire, est observée. Une nouvelle diminution en q^{-4}

apparaît avant d'atteindre un plateau aux grandes valeurs de q , ce qui semblerait indiquer la présence d'une interface de polymères en solution.

En ce qui concerne l'allure de la courbe du NP 38, une décroissance de l'intensité diffusée en q^{-4} avant d'atteindre le plateau de Guinier aux petites valeurs de q indique la présence de sphère avec des tailles finies.

L'allure de la courbe du NP 332 semble être un intermédiaire des deux cas précédents puisque son oscillation en q^{-2} n'est pas aussi marquée que dans le cas des NP 96, 144 et 170 et se rapproche de l'allure de la courbe du NP 38.

Il est possible d'utiliser des modèles théoriques correspondant à des morphologies données pour traiter les données expérimentales. Ces courbes expérimentales peuvent être ajustées à des courbes théoriques obtenues pour des modèles d'une certaine géométrie, classiquement un modèle de sphère pour des micelles ou encore des modèles de vésicule ou de cœur-coquille. Il est important de choisir le bon modèle pour obtenir des données précises et cohérentes. En se basant sur la forme des courbes, il semble évident que les nanoparticules NP 38 correspondent à des micelles. Les autres courbes pourraient être ajustées avec un modèle de vésicule mais une vision globale de la morphologie des objets est nécessaire avant toute conclusion.

Pour cela, ces mêmes échantillons ont été envoyés à l'Institut de minéralogie, de physique des matériaux et de cosmochimie (IMPMC) à Paris, où la visualisation des échantillons par cryo-TEM a pu être réalisée. Une image de chacun des échantillons est illustrée sur la figure 11.

Trois grandes familles de morphologie sont observées ; des vésicules dans le cas de la NP 96 (figure 11-B), des sphères dans le cas des NP 38 et 332 (figure 11-A et E), et une sorte d'agrégation d'objets sphériques que l'on pourrait nommer « agrégats vésiculaires » pour les NP 144 et 170 (figure 11-C et D).

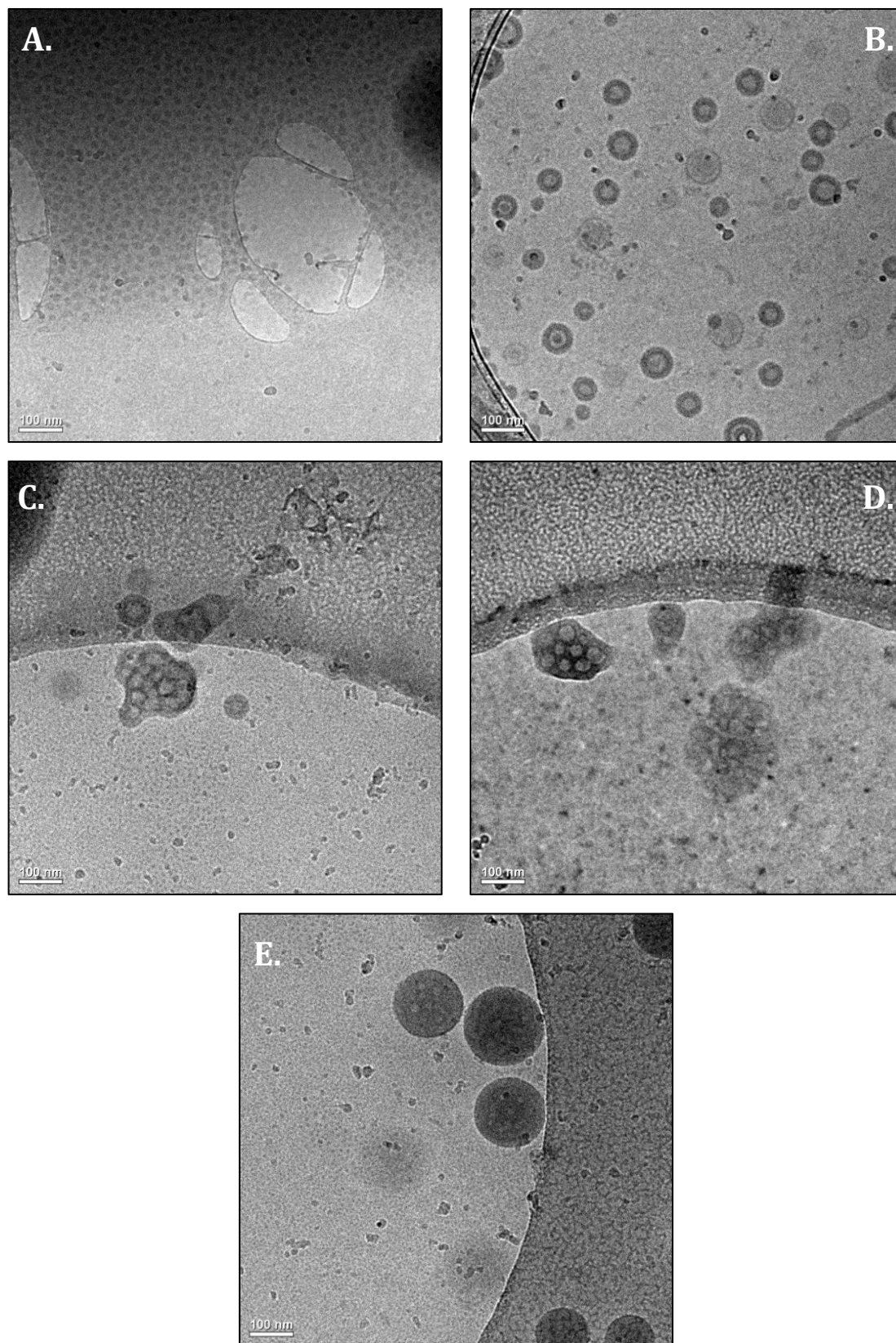


Figure 11 : Images de Cryo-TEM des échantillons obtenus par nanopréciipitation manuelle

A. PTMC₃₈-b-PEG₄₅ (NP 38) ; B. PTMC₉₆-b-PEG₄₅(NP 96) ; C. PTMC₁₄₄-b-PEG₄₅ (NP 144) ;

D. PTMC₁₇₀-b-PEG₄₅ (NP 170) ; E. PTMC₃₃₂-b-PEG₄₅ (NP 332) - Echelle : 100 nm

La figure 11-A (NP 38) montre clairement la présence de micelles d'une vingtaine de nanomètres de diamètre et au contraire, le DP 96 (figure 11-B) s'auto-assemble sous forme de vésicule d'environ 75 nm de diamètre. On observe cependant, quelques cylindres et micelles dans le milieu.

Il semblerait toutefois, que dans la figure 11-C et D, les NP 144 et 170 soient en partie des vésicules mélangées à des « agrégats vésiculaires » pour lesquels on peut clairement observer une membrane foncée et des creux plus clairs.

La figure 11-E (NP 332), montre majoritairement de grandes sphères pleines foncées où l'on pourrait presque distinguer de petits creux plus clair, qui pourraient indiquer une morphologie extrême d'agrégats vésiculaires qui ont été observés pour NP 144 et 170. Cependant, le microscope utilisé pour faire ces images n'a pas une résolution suffisante pour visualiser plus clairement ces potentiels creux. Il nous est donc impossible de conclure sur la morphologie interne mais la morphologie globale est distinctement celle d'une sphère.

Les morphologies observées sur les images de cryo-TEM ont donc été considérées pour l'ajustement des courbes de SANS au modèle géométrique le plus pertinent pour chaque échantillon. Ainsi, un modèle de sphère a été utilisé pour les NP 38 et 332, un modèle de vésicule pour la NP 96 et un modèle de fractal core shell (multi-vésicules) pour les NP 144 et 170 (figure 10).

Certains paramètres des modèles ont tout d'abord été fixés : le bruit de fond, les valeurs de densité de longueur de diffusion du solvant ($6,36 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$) et du PTMC ($1,70 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$) ainsi que la concentration exacte des échantillons sous forme de fraction volumique.

Ensuite, les incertitudes sur les valeurs de $I(q)$ et de q dues au spectromètre ont été prises en compte, une distribution en taille σ de géométrie log-normale a été choisie pour les rayons et une distribution gaussienne pour les épaisseurs de PTMC. Enfin, les ajustements des valeurs de rayons et d'épaisseurs ont été réalisés et s'adaptent très bien aux courbes expérimentales (cf traits plein figure 10).

Il a cependant été nécessaire de rajouter un facteur de structure $S(q)$ appelé « StickyHardSphere » en plus du facteur de forme $P(q)$ pour le NP 96, qui dénote la présence d'agrégation, afin que la courbe aux petites valeurs de q soit vraiment ajustée. Les différentes valeurs obtenues sont répertoriées dans le tableau 2.

| DP (PTMC) NP | DLS 90° ^a | | MALS ^a | | | Cryo-TEM ^b | | | | | SANS ^b | | | | | |
|------------------------|------------------------|------|------------------------|------------------------|--------------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|-------------------|----------------------------------------------|------------------------|----------------|------------------------|----------------|
| | R _h (nm) | PDI | R _g (nm) | R _h (nm) | R _g /R _h | m ^c | R ^{d*} (nm) | SD _R | δ [*] (nm) | SD _δ | m ^e | φ ^f (10 ⁻⁴ g/mL) | R ^g (nm) | σ _R | δ ^h (nm) | σ _δ |
| 38 | 15 | 0,09 | / | 14 | / | S | 7,8 | 1,2 | / | / | S | 5,6 | 8,8 | 0,13 | / | / |
| 96 | 55 | 0,13 | 53 | 51 | 1,04 | V | 37,3 | 15,0 | 14,6 | 1,6 | V | 8,8 | 15,5 | 0,35 | 14,6 | 0,10 |
| 144 | 85 | 0,14 | 69 | 72 | 0,96 | AV | 67,5 | 24,7 | 17,5 | 2,9 | FCS | 10,1 | 11,5 | 0,35 | 18,1 | 0,18 |
| 170 | 90 | 0,14 | 71 | 81 | 0,88 | AV | 72,1 | 29,0 | 19,2 | 3,9 | FCS | 6,4 | 9,5 | 0,42 | 20,2 | 0,20 |
| 332 | 70 | 0,06 | 55 | 68 | 0,81 | S _{+AV} | 47,1 | 13,3 | / | / | S | 9,5 | 39,4 | 0,28 | / | / |

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des caractéristiques des nano-objets préparés par nanoprécipitation manuelle

a : Valeurs des échantillons dans H₂O ; **b** : Valeurs des échantillons dans D₂O ; **c** : Morphologie obtenue en cryo-TEM (S : Sphère, V : Vésicule, AV : Agrégats vésiculaires) ; **d** : Rayon R mesuré sur les images de cryo-TEM : rayon du cœur des sphères (S), rayon externe des vésicules (V) et des agrégats vésiculaires (AV) ; **e** : Modèle choisi pour l'ajustement des courbes en SANS (S : Sphère, V : Vésicule, FCS : Fractal Core Shell) ; **f** : Fraction Volumique φ : volume de la partie hydrophobe (PTMC) des polymères en solution dans l'échantillon ; **g** : Rayon R estimé par ajustement des courbes : Rayon du cœur des sphères (S), rayon interne des vésicules (V), rayon externe des fractal core shell (FCS) ; **h** : Epaisseur de la membrane hydrophobe ; * Valeurs obtenues par Image J sur une moyenne d'au moins 85 objets

La comparaison des résultats, notamment pour les valeurs de rayon, montre qu'il y a un gros écart entre le rayon R trouvé en SANS qui est beaucoup plus petit que le R_h en DLS puisqu'il y a un facteur pouvant aller jusqu'à 8.

Cette différence peut s'expliquer par le fait que le rayon hydrodynamique R_h comprend toute la structure de l'objet (les chaînes de PEG en surface des nanoparticules et la sphère de solvation par les molécules d'eau) alors qu'en SANS, le rayon R ne prend en compte que les chaînes compactées du PTMC pour les sphères et le rayon calculé pour les vésicules n'est que le rayon interne donc ne prend en compte ni la membrane de PTMC, ni la couronne extérieure de PEG ou encore la sphère de solvation.

De même, les valeurs fournies par DLS sont celles obtenues en intensité, donc peuvent être surestimées en présence de structures plus grandes, ce qui est toujours le cas dans des échantillons de nanoparticules même monodisperses.

Les épaisseurs de la membrane hydrophobe δ déterminées grâce aux ajustements des courbes de SANS pour le modèle de vésicule et de fractale de multi-vésicules, varient entre 14,6 et 20,2 nm, ce qui reste cohérent avec des épaisseurs de bicouches de polymersomes pour cette gamme de masse molaire de copolymère.² Il apparaît également que l'épaisseur de la membrane hydrophobe augmente avec le DP du PTMC. Pour mettre en évidence cette tendance, l'évolution de δ en fonction de la masse molaire du PTMC a été tracée sur la figure 12.

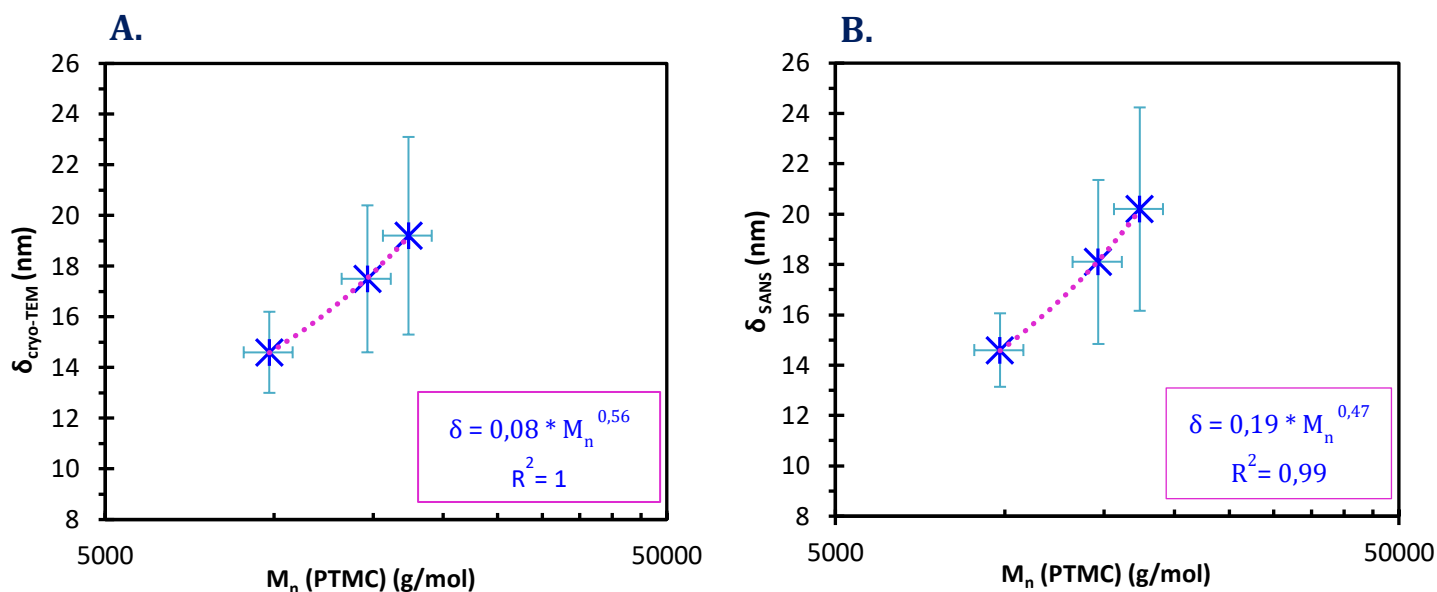


Figure 12 : Evolution de l'épaisseur δ de la membrane des nanoparticules en fonction de la masse molaire du PTMC dans les copolymères PTMC_n-b-PEG₄₅

A. Valeurs de δ obtenues par cryo-TEM ; B. Valeurs de δ obtenues par ajustement des courbes $I(q)$ de SANS

Nous pouvons clairement observer une dépendance en loi de puissance de l'épaisseur de la membrane (calculée par SANS ou par cryo-TEM) avec la masse molaire du PTMC bien que davantage de points seraient nécessaires pour déterminer l'exposant caractéristique avec une plus grande précision.

Cette tendance a déjà été observée dans la littérature. On peut notamment citer un article de Bermudez *et al.*¹¹ où il est rappelé que cette tendance est liée au fait que le rayon de giration R_g d'un polymère est également proportionnel à sa masse molaire à une certaine puissance. La valeur de cet exposant étant notamment 0,5 lorsque les chaînes de polymères ne sont pas perturbées au sein de la membrane, c'est-à-dire dans un solvant où $R_g \propto \bar{M}_n^{0,5}$.

Dans notre cas, nous obtenons une équation mettant en jeu la masse molaire à la puissance 0,56 ou 0,47 selon l'analyse prise en compte (respectivement cryo-TEM et SANS). Cette valeur étant proche de 0,5, nous pouvons supposer que les chaînes de PTMC ne sont à priori pas perturbées au sein de la membrane des structures vésiculaires obtenues.

Grâce à cette loi de puissance, il est donc possible de prédire quelle masse molaire de PTMC est nécessaire pour moduler à façon l'épaisseur de la membrane hydrophobe des vésicules. La morphologie de vésicules ayant énormément d'avantages, elle peut être a priori conservée si la fraction hydrophile massique f visée pour la synthèse reste aux alentours de 17 %, c'est-à-dire adapter la masse molaire du PEG amorceur de la polymérisation du TMC. Effectivement, l'épaisseur de la membrane hydrophobe des polymersomes est liée à toutes les propriétés membranaires et savoir moduler ce paramètre est très important. C'est le cas de la tension à la rupture α_c , le module de flexion k_c , la perméabilité p , ou encore le coefficient de diffusion D des chaînes dans la membrane. Le seul paramètre ne dépendant pas de δ est le module d'expansion de surface K_a , qui dépend principalement de la composition chimique à l'interface de la membrane, c'est-à-dire de la tension interfaciale γ , et non de paramètres physiques.¹²

En conclusion de cette étude sur les nanoparticules obtenues par nanoprécipitation manuelle, nous pouvons confirmer que le DP du PTMC dans les copolymères à blocs PTMC_n-*b*-PEG₄₅ et donc la fraction hydrophile massique *f* jouent un rôle essentiel sur la nature des objets obtenus. Il s'avère également que le PTMC₉₆-*b*-PEG₄₅ est le copolymère qui forme préférentiellement des vésicules par nanoprécipitation manuelle.

Cependant, cette méthode manque de reproductibilité et permet seulement d'obtenir des objets de dispersité moyenne (entre 0,1 et 0,2).

3.1.3 Par nanoprécipitation contrôlée par un système de microfluidique

L'auto assemblage de la série de copolymères à blocs PTMC-*b*-PEG de DP = 38, 96, 144, 170 et 332 a été rapidement testée par nanoprécipitation contrôlée par un système de microfluidique disposant d'un micromélangeur.

Après une étude où les débits et leurs rapports ont été modulés, les nano-objets formés à partir d'une seule condition de débit et de pourcentage en eau final ont été étudiés en détails. En effet, ses conditions se sont avérées optimales pour la formation d'objets d'environ 100 nm:

- Débit de la pompe A contenant la solution de copolymère à bloc dans le DMSO (1 g/L) : **150 µL/min**
- Débit de la pompe B contenant l'eau osmosée : **100 µL/min**
- Pourcentage en eau final : **40 %**

Effectivement, si l'on se place à 90% d'eau final comme pour la nanoprécipitation manuelle, les objets n'ont pas le temps de se former et précipitent directement dans la puce.

Ces nanoparticules (notées **NP x-D**) ont été analysés par DLS 90° et MALS et les résultats sont répertoriés dans le tableau 3. Pour plus d'informations sur leur morphologie, ils ont également été analysés par cryo-TEM (voir figure 13).

| DP (PTMC) NP | DLS 90° | | | MALS | | |
|--------------------|----------------------|----------------------|------|----------------------|----------------------|--------------------------------|
| | D _h nm | R _h nm | PDI | R _g nm | R _h nm | R _g /R _h |
| 38-D | 22 + agg* | 11 | 0,7 | / | 15 | / |
| 96-D | 95 | 48 | 0,06 | 49 | 46 | 1,06 |
| 144-D | 102 | 51 | 0,12 | 51 | 48 | 1,07 |
| 170-D | 97 | 49 | 0,13 | 59 | 47 | 1,26 |
| 332-D | 92 | 46 | 0,14 | 48 | 47 | 1,03 |

Tableau 3 : Données DLS (90°) et MALS des différents objets obtenus par nanopréciipitation contrôlée par un système de microfluidique

* Agg : agrégats aux alentours de 600 nm et à plus de 1 μ m

Cette technique de nanopréciipitation contrôlée par un système de microfluidique donne des tailles très proches (sauf pour le NP 38-D), indépendamment du copolymère utilisé, comparées à la nanopréciipitation manuelle où la taille semblait augmenter avec le DP du PTMC. Ceci n'est pas étonnant car la taille des particules est souvent contrôlée par la technique de préparation d'échantillons choisie.¹³ Le rapport R_g/R_h est proche de 1 (sauf pour NP 170-D), ce qui laisse présager des morphologies vésiculaires. Les indices de polydispersité ne semblent pas significativement meilleurs qu'avec la nanopréciipitation manuelle excepté pour NP 96-D mais ces expériences n'ont été réalisées qu'une seule fois il est donc difficile de conclure sur la technique car il faudrait optimiser les conditions utilisées pour ce système.

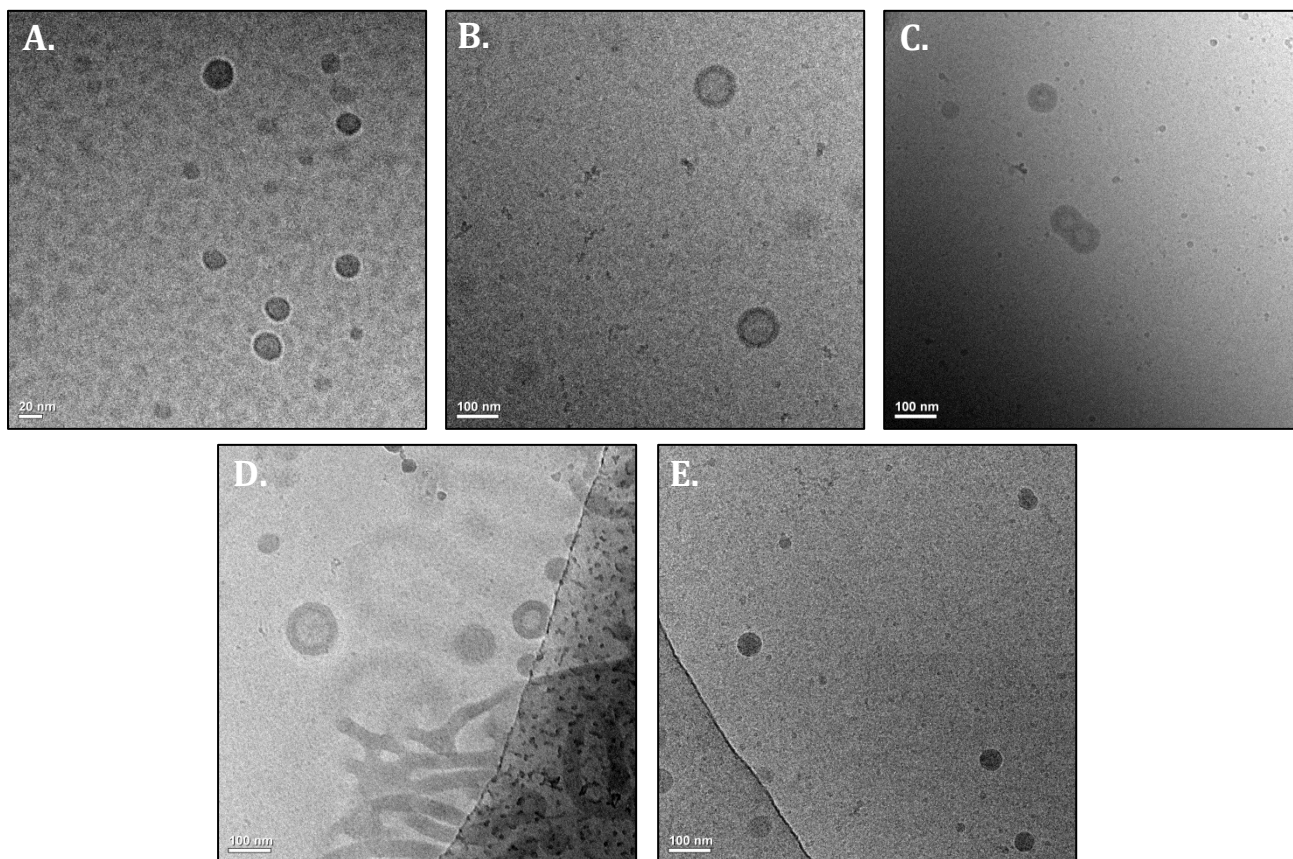


Figure 13 : Images de cryo-TEM des échantillons préparés par nanoprecipitation contrôlée

A. NP 38-D ; B. NP 96-D ; C. NP 144-D ; D. NP 170-D ; E. NP 332-D ; (A. Echelle 20 nm ; B.C.D.E. Echelle 100 nm)

La nanoprecipitation contrôlée donne sensiblement le même type de morphologie que pour la nanoprecipitation manuelle : des sphères pour le NP 38-D et 332-D, des vésicules pour le NP 96-D et un mélange de vésicules, agrégats vésiculaires et cylindres pour les NP 144-D et 170-D.

L'étude de la série de copolymères par nanoprecipitation contrôlée n'a pas été poussée davantage car nous souhaitons travailler avec des polymersomes et seul le PTMC_n-b-PEG₄₅ avec un DP 96 donne une large majorité de vésicules. C'est pourquoi, des études plus poussées seront réalisées sur ce copolymère à blocs afin cette fois-ci de moduler la taille des polymersomes selon les conditions de préparation choisies.

3.2 Etude sur le PTMC₉₆-*b*-PEG₄₅

Cette étude a été réalisée en parallèle de la série de copolymère à bloc.

Comme observé précédemment, le PTMC₉₆-*b*-PEG₄₅ (DP 96) donne, après auto-assemblage dans l'eau, des vésicules d'environ 110 nm en nanopréciipitation manuelle et semblerait également donner des vésicules d'environ 95 nm par nanopréciipitation contrôlée. L'intérêt de cette partie est de visualiser tout d'abord si le protocole d'auto-assemblage sur ce copolymère ne joue effectivement pas sur la morphologie des objets mais plutôt sur leur taille et enfin pouvoir moduler la taille des vésicules sans pour autant changer leur épaisseur de membrane.

3.2.1 Mise en place d'un protocole de nanopréciipitation contrôlée

Il a fallu tout d'abord mettre en place un protocole de nanopréciipitation contrôlée à l'aide d'un micromélangeur dans le but d'obtenir des tailles équivalentes à la taille des objets formés par nanopréciipitation manuelle ($D_h = 110$ nm).

Pour cela, différents montages et paramètres ont été variés et un criblage en DLS (90°) de la taille de tous les échantillons formés a été réalisé (analyse en sortie du micromélangeur, c'est-à-dire sur les mélanges eau/copolymère dans le DMSO, non dialysés). Il est important de préciser cette information car la dialyse, non contrôlée dans notre cas, est une étape très importante dans l'auto-assemblage des objets. En effet, elle peut influencer la morphologie et la taille des objets, c'est pourquoi les échantillons sont toujours analysés avant et après dialyse (lorsque les échantillons sont dialysés) pour comparaison.

Grâce aux débitmètres situés en sortie des deux pompes, il est possible de varier le débit mais également le pourcentage volumique de l'eau par rapport au DMSO dans la suspension finale. Des tests ont été réalisés sur le PTMC₉₆-*b*-PEG₄₅ (DP 96) à 1 mg/mL dans le DMSO.

Le tableau 4 ci-dessous, répertorie les deux tests réalisés. Le premier consistait à fixer le pourcentage d'eau final à 75 % et ainsi faire varier le débit total de l'eau et du DMSO. Le

second a été de fixer le débit de l'eau à 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ et de changer le débit du DMSO, pour pouvoir moduler le pourcentage de l'eau final dans la suspension.

| Echantillon | Débit en eau | Débit en DMSO/copolymère (1 mg/mL) | % d'eau dans la solution finale | Taille des objets * (D_h) | PDI * |
|-------------|--------------------------|------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------|
| | $\mu\text{L}/\text{min}$ | $\mu\text{L}/\text{min}$ | | nm | |
| 1 | 90 | 30 | 75% | 74 | 0,10 |
| 2 | 150 | 50 | 75% | 67 | 0,10 |
| 3 | 300 | 100 | 75% | 63 | 0,12 |
| 4 | 600 | 200 | 75% | 48 | 0,12 |
| 5 | 900 | 300 | 75% | 44 | 0,12 |
| 6 | 30 | 70 | 30% | 97 | 0,03 |
| 7 | 30 | 45 | 40% | 91 | 0,01 |
| 8 | 30 | 30 | 50% | 77 | 0,05 |

Tableau 4 : Données DLS (90°) des échantillons préparés par nanopréciipitation contrôlée

* Valeurs obtenues par DLS (90°) sans dialyse

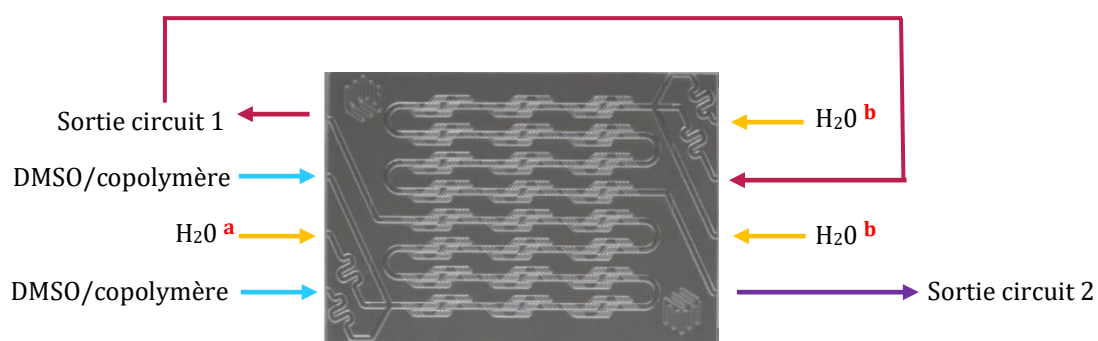
Condition 1 en rouge ; Condition 2 en bleu

Ces variables influencent énormément les paramètres des objets obtenus. En effet, lorsque le pourcentage d'eau final en sortie de puce est fixé (en rouge dans le tableau), on observe que plus le débit est grand plus les objets sont petits. De même, lorsque le débit en eau est fixé (en bleu dans le tableau) et que le débit en DMSO/copolymère diminue et donc le pourcentage d'eau final augmente, les objets sont plus petits.

Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait qu'une grande vitesse de mélange aurait tendance à figer les objets plus rapidement et de plus petites tailles que si la vitesse était plus lente et où les objets pourraient avoir le temps de subir une phase de croissance en taille après une supposée phase de nucléation. La modulation de ces deux paramètres a l'avantage de pouvoir fournir une large gamme de taille d'objets monodisperses (PDI autour de 0,1).

Cependant, même en utilisant le débit le plus bas disponible sur nos débitmètres (30 $\mu\text{L}/\text{min}$) et en restant à des pourcentages d'eau finaux suffisants, il est impossible d'obtenir des objets de plus de 100 nm de diamètre.

Afin d'augmenter la taille des nanoparticules, l'idée a été de ralentir le mélange de l'eau avec la solution de DMSO/copolymère. Pour cela, une nouvelle étude a été menée en réalisant un montage utilisant les deux circuits de 12 chambres de mélange de la puce (voir figure 14). Dans le premier circuit, deux flux de DMSO/copolymère à 1 g/L ont été mélangés à un flux d'eau dans des proportions en volume d'eau de 30% ou 50% comme précédemment. Le mélange a ensuite été réintégré dans le deuxième circuit où deux flux d'eau s'ajoutent au mélange de façon à atteindre un pourcentage en eau final de 75 % comme dans l'expérience précédente et les débits ont également été variés et ceci grâce à l'utilisation de la troisième pompe.



| Echantillon | Débit en eau ^a | Débit en DMSO/copolymère (1 mg/mL) | % eau en sortie de circuit 1 | Débit en eau ^b | % d'eau dans la solution finale | Taille des objets (D _h) | PDI |
|-------------|---------------------------|------------------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|------|
| | μL/min | μL/min | | μL/min | | nm | |
| 10 | 30 | 70 | 30 | 180 | 75% | 90 | 0,09 |
| 11 | 50 | 117 | 30 | 300 | 75% | 85 | 0,09 |
| 12 | 100 | 233 | 30 | 600 | 75% | 81 | 0,05 |
| 13 | 200 | 280 | 30 | 720 | 75% | 80 | 0,07 |
| 14 | 30 | 30 | 50 | 60 | 75% | 82 | 0,06 |
| 15 | 50 | 50 | 50 | 100 | 75% | 78 | 0,10 |
| 16 | 100 | 100 | 50 | 200 | 75% | 76 | 0,09 |
| 17 | 200 | 200 | 50 | 400 | 75% | 71 | 0,12 |
| 18 | 300 | 300 | 50 | 600 | 75% | 64 | 0,08 |

Figure 14 : Schéma du montage et données DLS (90°) des objets obtenus en nanoprécipitation contrôlée du PTMC₉₆-b-PEG₄₅ sans étape de dialyse

Le constat précédent est le même ; plus le pourcentage d'eau en sortie de circuit 1 est petit plus l'objet final est gros (on peut comparer les échantillons 13 et 18 où le débit de DMSO/copolymère est sensiblement le même et où le pourcentage d'eau est respectivement de 30 ou 50%). De même, pour un même pourcentage final en eau intermédiaire (dans le cas de l'échantillon 10 et 13), plus le débit total augmente, plus la taille des objets diminue. Les objets sont monodisperses quelles que soient les conditions, cependant une taille à 110 nm comme en nanoprécipitation manuelle n'a toujours pas été atteinte. Ces résultats montrent tout de même une influence de la concentration en copolymères (la concentration finale restant fixe) car en effet plus le pourcentage d'eau en sortie du circuit 1 est faible, plus les D_h sont importants.

Ainsi, toujours dans la perspective d'augmenter la taille des objets, une expérience avec un mélange DMSO/copolymère à 5 g/L (contrairement aux 1 g/L utilisés jusqu'à présent) a été réalisée sur un seul circuit. Effectivement, dans les mêmes conditions, la concentration à 5 g/L donne des objets plus gros qu'à 1 g/L (par exemple : Débit en eau et Débit en DMSO/copolymère: 30 $\mu\text{L}/\text{min}$; D_h (1 g/L): 77 nm et D_h (5 g/L) : 134 nm) pouvant atteindre un D_h de 170 nm. Toutefois, au bout de plusieurs minutes après lancement des pompes, le copolymère précipite dans la puce au contact de l'eau et perturbe la reproductibilité de découpe des fluides et donc l'auto-assemblage. Il est donc impossible de travailler à cette concentration.

Toutes ces expériences de nanoprécipitation contrôlée à l'aide d'un micromélangeur nous ont donc montré que la concentration en polymère, le pourcentage en eau dans la suspension de nano-objets et le débit total utilisé sont des paramètres influant chacun d'une certaine manière sur la taille finale des objets. En modulant ces paramètres, il a notamment été montré que des nano-objets monodisperses de diamètre hydrodynamique entre 44 nm (tableau 4) et 170 nm (obtenu avec une solution de DMSO/copolymères à 5 g/L) peuvent être formés à partir de l'auto-assemblage d'un même copolymère, le PTMC₉₆-*b*-PEG₄₅.

3.2.2 Etude des objets obtenus par différents protocoles

Il existe de nombreux paramètres influant sur la nature de l'objet lors d'une nanoprécipitation manuelle comme la température, le sens et la vitesse d'ajout ou encore le pourcentage d'eau ajouté.

Pour visualiser le changement qu'impliquent ces paramètres, trois méthodes de préparation d'échantillons ont été réalisées sur le copolymère PTMC₉₆-*b*-PEG₄₅:

✚ L'ajout rapide d'eau sur une solution de DMSO/copolymère (10 g/L) pour obtenir une suspension à un pourcentage d'eau final de 70 % et une concentration finale en copolymère à 3 g/L.

Echantillon appelé **NP 96-70%**.

✚ L'ajout de la solution DMSO/copolymère sur l'eau (90% en volume). Mêmes conditions que pour NP 96 (échantillon répertorié dans le tableau 2) mais avec le sens d'ajout inversé.

Echantillon appelé **NP 96-I**.

✚ Préparation en nanoprécipitation contrôlée avec les conditions suivantes : volume final en eau de 30% et débits faibles (Débit en eau : 100 μ L/min et débit en DMSO/copolymère (1 g/L) : 233 μ L/min) ; $D_h = 110$ nm et PDI = 0,04.

Echantillon appelé **NP 96-D**.

Ces trois échantillons ont été analysés par DLS (90°) et MALS après dialyse et comparés au **NP 96** préparé précédemment par nanoprécipitation manuelle (90% de volume d'eau ajouté) (voir tableau 2). Les valeurs comparatives de ces 4 échantillons sont répertoriées dans le tableau 5.

Le rayon hydrodynamique R_h des NP 96-70% et NP 96-D sont similaires à NP 96 aux alentours de 50 nm alors que celui du NP 96-I n'est que de 30 nm. Ce sont des nanoparticules monodisperses bien que le NP 96-D ait un PDI beaucoup plus faible que les nanoparticules obtenues par nanoprécipitation manuelle. De plus, la valeur de R_g/R_h de NP 96-D est proche de 1 comme dans le cas de NP 96 ce qui laisse penser qu'il aurait

également une morphologie vésiculaire. La valeur de 1,2 pour le R_g/R_h de NP 96-I semble cependant trop élevée pour correspondre à une morphologie de vésicule.

Afin d'en apprendre davantage sur la nature de ces quatre échantillons, des expériences de SANS et de cryo-TEM ont été réalisées.

La figure 15 représente l'intensité diffusée $I(q)$ en fonction du vecteur d'onde q pour les nanoparticules NP 96, NP 96-70%, NP 96-I et NP 96-D analysés en SANS.

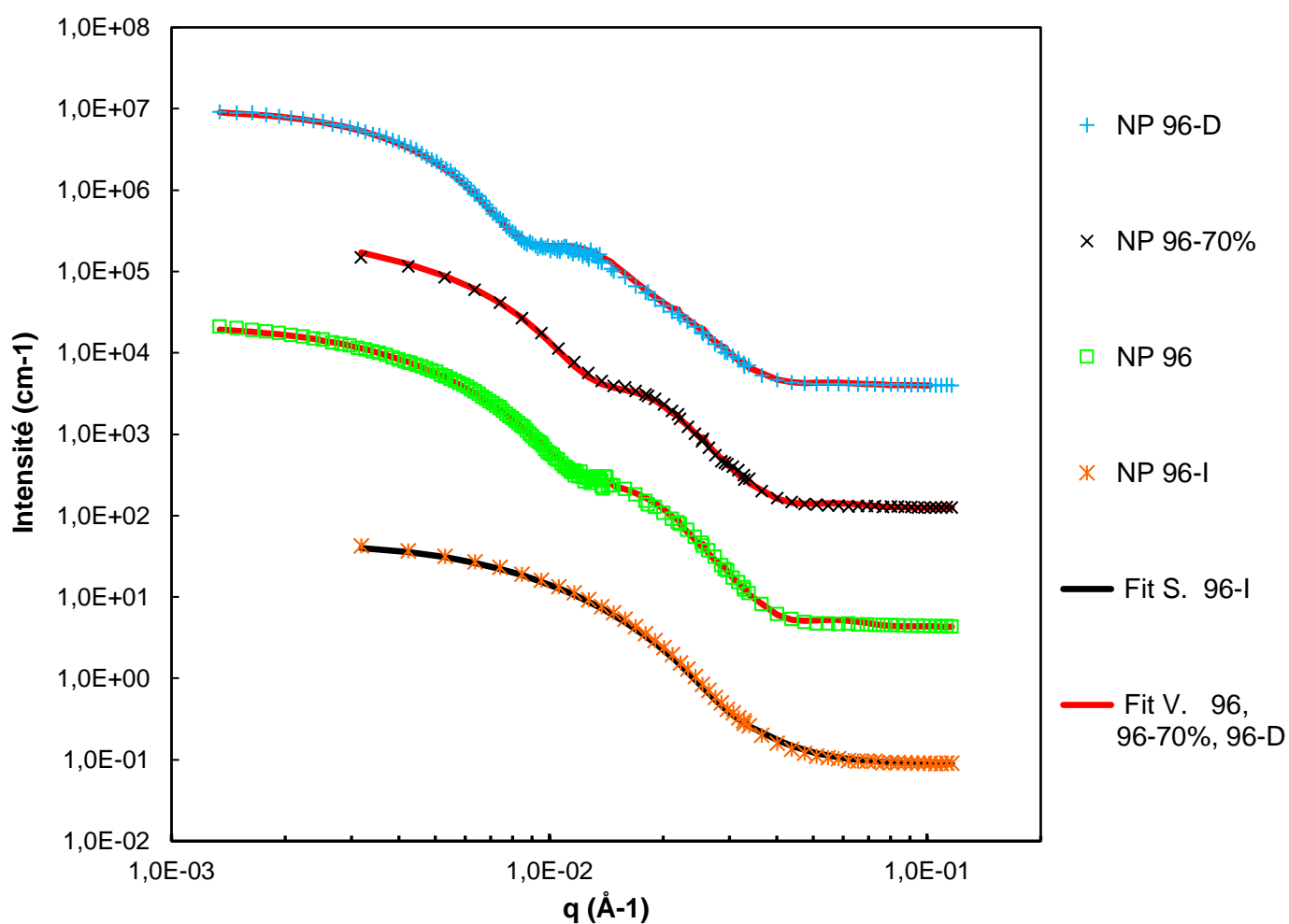


Figure 15 : Intensité diffusée en fonction du vecteur d'onde en SANS pour les nanoparticules obtenues par nanopréciipitation manuelle ou contrôlée dans le D_2O

*S. : Sphère ; V. : Vésicule
Intensités multipliées par une puissance de 10 pour une meilleure visualisation*

L'allure de la courbe de NP 96-I est différente des trois autres courbes. En effet, l'intensité diffusée évolue en q^{-4} sur la partie décroissante de la courbe, ce qui est caractéristique d'une sphère et atteint le plateau de Guinier aux petites valeurs de q indiquant une taille finie des objets. La courbe des trois autres échantillons est sensiblement la même ce qui laisse supposer une morphologie vésiculaire (présence d'une oscillation en q^{-2}).

Comme précédemment, afin d'ajuster les courbes à des modèles théoriques, il est nécessaire d'observer ces objets en microscopie pour obtenir de meilleurs résultats sur les suspensions obtenues. Bien que la cryo-TEM donne d'excellentes images, des tests de visualisation par microscopie électronique à transmission « classique » (TEM) ont été réalisés car c'est une analyse que nous pouvons faire en libre-service sur Bordeaux donc plus disponible.

Il est important de noter que la TEM permet une visualisation d'objets à l'état sec sur une grille si le contraste entre cette dernière et l'échantillon est suffisamment important. Il faut pour cela que les molécules qui composent l'échantillon aient une haute densité électronique et que le film de la grille soit fin. Pour les échantillons issus de l'auto-assemblage des copolymères PTMC-*b*-PEG, le contraste est très faible car les chaînes amphiphiles ne possèdent pas d'éléments ayant une forte densité électronique (atomes lourds, cycles aromatiques ou doubles liaisons).

Ainsi, plusieurs tests d'optimisation de préparation des grilles ont été réalisés sur un échantillon préparé en nanoprécipitation manuelle sans contrôle de température, sur le NP 96 et sur le NP 96-D (figure 16).

Des grilles présentant un film fin de 5 nm de carbone dans certains endroits de la grille ont été sélectionnées car elles permettent une visualisation sans ajout de colorant alors que sur des grilles de carbone plus épaisses, il est impossible de visualiser les objets.

Deux colorants ont cependant été testés pour un meilleur contraste : l'acétate d'uranyle qui est couramment utilisé pour des colorations négatives et l'Uranyles, un colorant sur le marché depuis quelques années et qui est composé d'un mélange de lanthanides, non radioactif car sans acétate d'uranyle donc plus facilement manipulable.

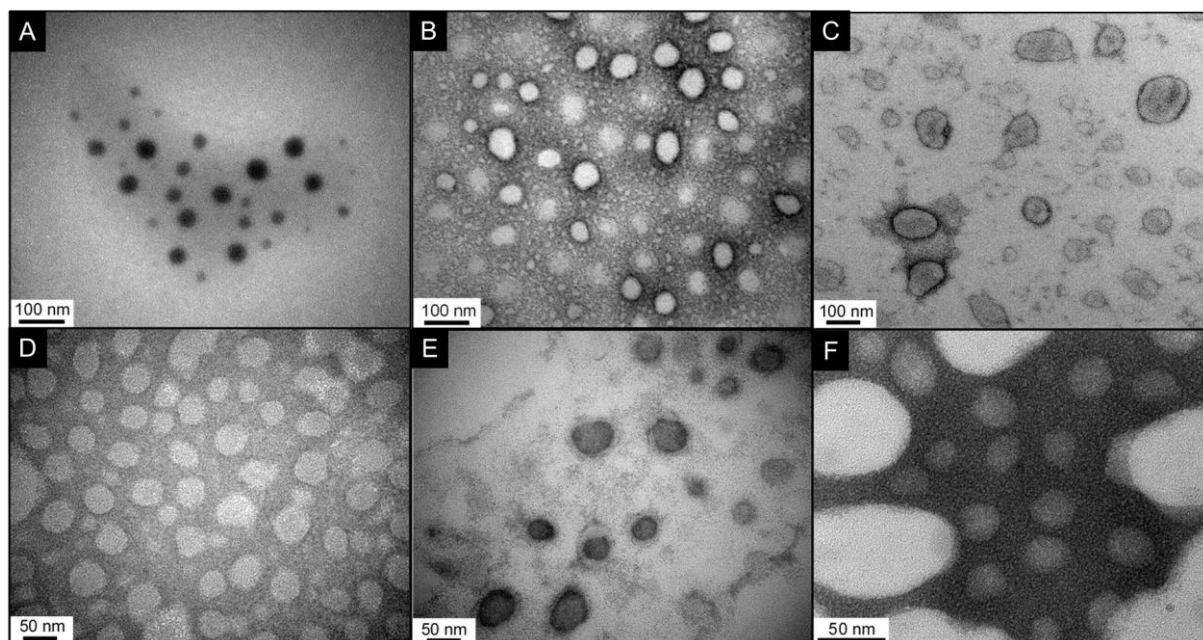


Figure 16 : Images obtenues en TEM d'échantillons obtenus par auto-assemblage du $PTMC_{96}\text{-}b\text{-}PEG_{45}$

A,B,C,D. Echantillon préparé en nanoprecipitation manuelle sans contrôle de température ; **E.** NP 96 ; **F.** NP 96-D
Coloration de la grille : **A.** Sans coloration ; **B.** Acétate d'uranyle (3 * 1 min) ; **C,F.** Uranyless (3 * 1 min) ;
D. Uranyless (1min30) ; **E.** Uranyless (1min30 puis lavage à l'eau)

Les différents temps de dépôt de colorant, n'ont pas permis d'obtenir des contrastes suffisants pour affirmer la morphologie des échantillons même s'il semblerait que la coloration permette de distinguer l'interface (figure 16-B ou C).

Nous savons cependant, grâce aux différentes analyses précédentes, que le NP 96 et le NP 96-D formaient des vésicules. Il est donc facile de conclure sur le fait que le TEM ne permet qu'une visualisation de la forme globale et de la taille de l'échantillon. Afin de connaître la morphologie exacte de l'échantillon et pouvoir visualiser la membrane hydrophobe, la cryo-TEM reste essentielle.

L'ajustement des courbes SANS à des modèles de sphère pour le NP 96-I et vésicules pour les trois autres a donc été réalisé grâce aux images de cryo-TEM illustrées en figure 17.

L'ajustement des courbes expérimentales est très bon dans tous les cas. La nanopréciipitation inverse (NP 96-I) donne des sphères présentant un cœur de PTMC de 11,3 nm, dans laquelle les chaînes de PTMC sont plus compactées que dans la membrane des vésicules formées en nanopréciipitation usuelle (NP 96) de taille globale de 60 nm et d'épaisseur de membrane de 14 nm.

Pour les nanoparticules préparées par le système microfluidique (NP 96-D), on peut observer une oscillation caractéristique de la membrane bien mieux marquée que pour NP 96-70% (NP 96 à 3 g/L) et encore plus que pour NP 96. Dans le cas du NP 96-D, il n'a pas été nécessaire de prendre en compte le facteur de structure $S(q)$ (contrairement au NP 96) car l'ajustement de la courbe au modèle de vésicule était déjà très bonne. Ce constat révèle la grande monodispersité en épaisseur et en rayon de l'échantillon préparé en nanopréciipitation contrôlée comparé à celui préparé en nanopréciipitation manuelle.

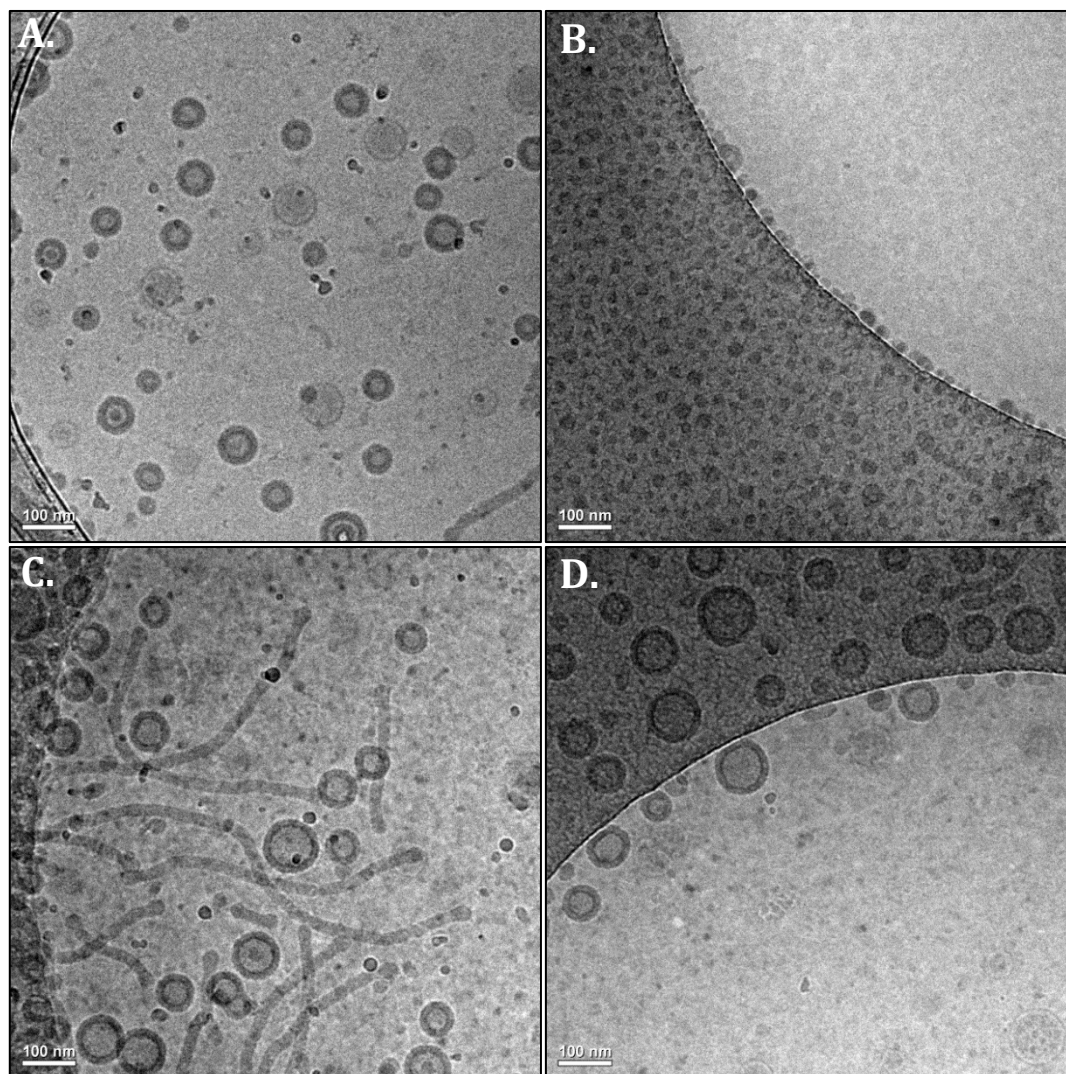


Figure 17 : Images de cryo-TEM des échantillons préparés en nanopréciptation manuelle et contrôlée

A. NP 96 ; B. NP 96-I ; C. NP 96-70% ; D. NP 96-D ; Echelle 100 nm

Les images de cryo-TEM confirment le fait que le NP 96-I est différent des trois autres car il forme des micelles contrairement aux autres qui forment des vésicules. Cependant, le NP 96-70% présente un mélange de morphologies avec majoritairement des vésicules mais aussi des cylindres et des micelles comparé au NP 96 qui présente beaucoup moins de morphologies autres que des vésicules. Quant à l'échantillon NP 96-D, il ne présente quasiment que des vésicules, de taille bien définie grâce à la méthode de préparation par microfluidique, ce qui explique que son PDI soit meilleur que pour le NP 96.

Grâce à toutes les analyses réalisées sur les quatre échantillons, de nombreuses informations ont pu être obtenues et sont répertoriées dans le tableau 5 suivant.

| NP | DLS 90° ^a | | MALS ^a | | | Cryo-TEM ^b | | | | | SANS ^b | | | | | |
|--------|------------------------|------|------------------------|------------------------|--------------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|-------------------|----------------------------------------------|------------------------|----------------|------------------------|----------------|
| | R _h (nm) | PDI | R _g (nm) | R _h (nm) | R _g /R _h | m ^c | R ^{d*} (nm) | SD _R | δ [*] (nm) | SD _δ | m ^e | φ ^f (10 ⁻⁴ g/mL) | R ^g (nm) | σ _R | δ ^h (nm) | σ _δ |
| 96 | 55 | 0,13 | 53 | 51 | 1,04 | V | 37,3 | 15 | 14,6 | 1,6 | V | 8,8 | 15,5 | 0,35 | 14,6 | 0,10 |
| 96-70% | 50 | 0,13 | / | / | / | V+C | 38,8 | 13,9 | 13,9 | 1,5 | V | 8,0 | 13,8 | 0,36 | 14,4 | 0,10 |
| 96-I | 30 | 0,17 | 34 | 28 | 1,21 | S | 11,3 | / | / | / | S | 7,2 | 11,3 | 0,31 | / | / |
| 96-D | 55 | 0,04 | 49 | 51 | 0,96 | V | 40,6 | 14,7 | 14,7 | 1,6 | V | 3,4 | 25 | 0,26 | 14,2 | 0,13 |

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des caractéristiques des objets obtenus par nanopréciipitation manuelle et contrôlée

a : Valeurs des échantillons dans H₂O ; **b** : Valeurs des échantillons dans D₂O ; **c** : Morphologie obtenue en cryo-TEM (S : Sphère, V : Vésicule, C: Cylindre) ; **d** : Rayon R mesuré sur les images de cryo-TEM : rayon du cœur des sphères (S), rayon externe des vésicules (V) ; **e** : Modèle choisi pour l'ajustement des courbes en SANS (S : Sphère, V : Vésicule) ; **f** : Fraction Volumique φ : volume de la partie hydrophobe (PTMC) des polymères en solution dans l'échantillon ; **g** : Rayon R estimé par ajustement des courbes : Rayon du cœur des sphères (S), rayon interne des vésicules (V) ; **h** : Epaisseur de la membrane hydrophobe ; * Valeurs obtenues par Image J sur une moyenne d'au moins 80 objets

Les valeurs de rayon obtenues en SANS pour le NP 96-I sont cohérentes avec celles trouvées en MALS. Le rayon interne des vésicules du NP 96-70% est sensiblement identique à celui du NP 96 autour de 15 nm. Cette valeur est beaucoup plus grande pour NP 96-D que pour NP 96 et NP 96-70%, toutefois ce constat est également observé sur les images de cryo-TEM.

Les valeurs d'épaisseur de membrane sont identiques à $14,4 \pm 0,4$ nm dans les trois cas, et égales à celles déterminées précédemment pour le NP 96 (tableau 2) ce qui prouve que cette valeur ne varie pas selon le procédé de fabrication et est effectivement caractéristique du copolymère PTMC_{96-b}-PEG₄₅. La distribution gaussienne sur

l'épaisseur des membranes des vésicules σ_8 indique une plus grande monodispersité en épaisseur pour les NP 96 et NP 96-70% que pour le NP 96-D.

Les valeurs de rayon R_h obtenues par DLS 90° pour les NP 96 et NP 96-D sont identiques (55 nm) et forment tous les deux des vésicules dans l'eau. Le tracé des courbes de DLS 90° dans les deux cas (figure 18) montre clairement que pour une même taille de nanoparticules et une même morphologie, le procédé utilisé joue sur la dispersité en taille puisque la courbe de NP 96-D est beaucoup plus étroite que celle de NP 96.

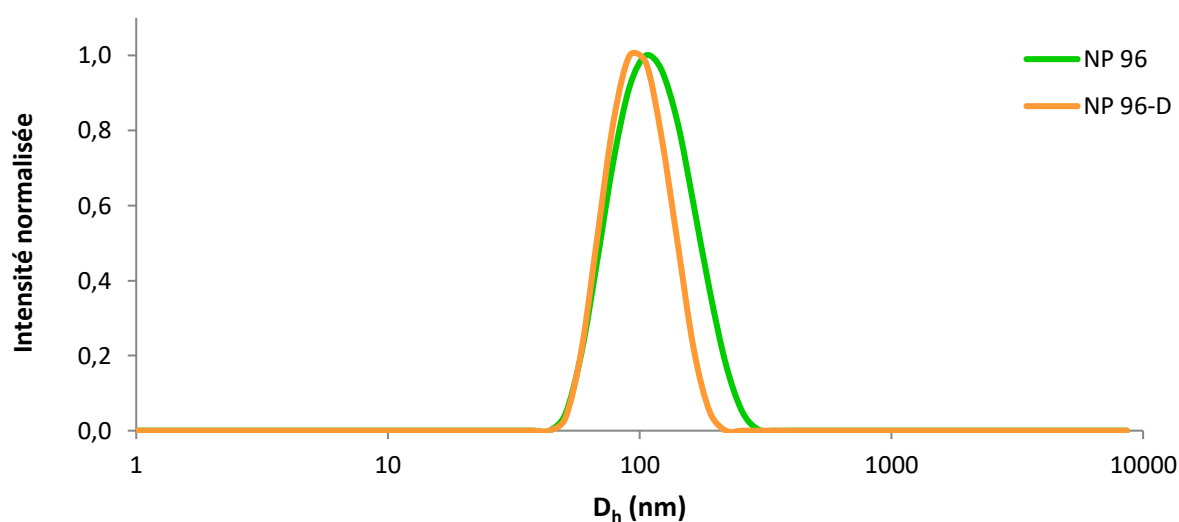


Figure 18 : Comparaison des tracés de D_h par DLS 90° pour NP 96 et NP 96-D

Ces résultats confirment donc qu'en nanoprécipitation contrôlée à l'aide d'un système de microfluidique, les objets obtenus peuvent avoir la même taille et la même morphologie qu'en nanoprécipitation manuelle mais sont bien mieux définis et beaucoup plus monodisperses (PDI inférieurs à 0,1), tout en assurant une parfaite reproductibilité du procédé d'un batch à l'autre.

4. Co auto-assemblage des PTMC₉₆-*b*-PEG et PTMC₈₈-*b*-PEG-SCH546738 par nanopréciipitation contrôlée

Comme énoncé dans les chapitres précédents, il s'avère que le SCH546738 est un très bon ligand pour cibler le récepteur CXCR3 avec une constante d'affinité de l'ordre du nanomolaire.¹⁴ L'intérêt de placer ce ligand à la surface de polymersomes permettrait de profiter des avantages de chacun. En effet, le polymersome, de par sa robustesse et sa furtivité, améliorerait la solubilité, la pharmacocinétique et pharmacodynamique du ligand, et en parallèle, de par son pouvoir attracteur, le ligand pourrait « diriger » le polymersome vers le CXCR3 pour simplement bloquer son action et/ou délivrer un principe actif encapsulé. Ainsi, le taux de SCH546738 en surface des polymersomes est important pour obtenir la meilleure efficacité biologique pour s'assurer d'un minimum de ligand pour avoir une action biologique et à l'inverse éviter un éventuel encombrement. Pour cela, la stratégie est de co auto-assembler des copolymères à blocs PTMC-*b*-PEG non fonctionnalisés avec des PTMC-*b*-PEG-SCH546738 fonctionnalisés pour obtenir des nanoparticules mixtes avec différents ratios de SCH546738. Basé sur la littérature, nous avons décidé de fonctionnaliser les nanoparticules avec 0% (contrôle), 5%, 10% et 20% molaire de SCH546738.

Grâce aux nombreuses données obtenues dans la partie précédente, le PTMC₉₆-*b*-PEG₄₅ semble être le meilleur copolymère pour donner des vésicules après auto-assemblage dans l'eau que ce soit par nanopréciipitation manuelle ou contrôlée. Cependant, le système de microfluidique permet d'obtenir des objets beaucoup plus définis et monodisperses. C'est pourquoi, ce sera la seule technique d'auto-assemblage utilisée dans cette partie.

La nanopréciipitation contrôlée par un système de microfluidique reste une technique assez minutieuse puisqu'il ne faut pas qu'il y ait de bulles ou de poussières dans la puce pour ne pas perturber l'auto-assemblage. C'est pourquoi, un filtre 0,45 µm a été placé en sortie du réseau d'azote juste avant son entrée dans le système. Les conditions d'expériences ont donc été modifiées entre les nombreux tests réalisés précédemment et ceux-ci.

Bien que nécessaire, ce filtre a cependant perturbé la pression d'arrivée d'azote et donc également les débitmètres. Les valeurs de débits utilisées pour le NP 96-D ne sont donc plus valables. Il a donc été nécessaire de tester de nouvelles conditions de débits afin d'obtenir à nouveau des objets d'une centaine de nanomètres (voir tableau 6).

| Echantillon | Débit en eau | Débit en DMSO/copolymère (1 mg/mL) | % d'eau dans la solution finale | Taille des objets (D _h) | PDI |
|-------------|--------------|------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|------|
| | μL/min | μL/min | | nm | |
| 19 | 100 | 233 | 30% | 88 | 0,05 |
| 20 | 65 | 150 | 30% | 116 | 0,14 |
| 21 | 100 | 150 | 40% | 95 | 0,06 |
| 22 | 150 | 150 | 50% | 80 | 0,07 |
| 23 | 350 | 350 | 50% | 67 | 0,14 |
| 24 | 200 | 200 | 50% | 74 | 0,08 |
| 25 | 150 | 150 | 50% | 80 | 0,07 |
| 26 | 50 | 50 | 50% | 86 | 0,12 |

Tableau 6 : Données DLS des échantillons de PTMC₉₆-b-PEG₄₅ auto-assemblés par nanoprecipitation contrôlée

En vert : conditions utilisées pour NP 96-D; En bleu : débit DMSO/copolymère fixé; En rouge : pourcentage d'eau final fixé

En fixant le débit du DMSO/copolymère et en augmentant le pourcentage final d'eau, on obtient des tailles d'objets qui diminuent, et de même si le pourcentage final en eau est fixé et que le débit total augmente, la taille des objets diminue. La présence du filtre ne perturbe donc pas la tendance observée jusqu'à présent. Cependant, les débits fixés pour le NP 96-D donne maintenant des objets à 88 nm (contrairement à 110 nm précédemment).

L'échantillon 21 présente des objets qui se rapprochent le plus de 100 nm de diamètre (95 nm) avec une très bonne dispersité en taille (PDI 0,06). Cet échantillon a donc été analysé plus en détail en MALS (voir tableau 7) où le R_g/R_h est proche de 1 ce qui nous

conforte dans l'idée que l'on est en présence de vésicules mais relativement bas ce qui laisse penser que d'autres morphologies seraient également présentes.

Les différents co-auto-assemblages ont également été réalisés dans ces mêmes conditions (débit en eau : 100 $\mu\text{L}/\text{min}$; débit en DMSO/copolymère : 150 $\mu\text{L}/\text{min}$; pourcentage en eau dans le volume final : 40%).

Pour cela, les deux solutions de PTMC₈₈-*b*-PEG-SCH546738 et PTMC₉₆-*b*-PEG dans le DMSO à 1 g/L ont été préparées puis agitées pendant une nuit à 25°C. Après filtration sur filtre PTFE 0,45 μm , le mélange à 5, 10 ou 20% molaire de PTMC-*b*-PEG-SCH546738 dans le PTMC-*b*-PEG est directement effectué dans le pilulier DMSO/copolymère. Il n'y a pas l'intervention d'une troisième pompe. Les nanoparticules obtenues sont notées **NP x%** (x = 5, 10 ou 20). La nanoparticule contrôle (0% en SCH546738) sera notée **NPc**.

De la même manière, afin de visualiser les nanoparticules en imagerie, 3% molaire de PTMC-Rhodamine ont été intégrés à de nouveaux mélanges. Les nanoparticules obtenues sont notées **NP x% Rho** ou **NPc Rho**, et les résultats obtenus après dialyse sont répertoriés dans le tableau 7.

| NP | DLS 90° | | | MALS | | | | | | |
|----------------|----------------|----------------|------|----------------|----------------|--------------------------------|----------------|--------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------|
| | D _h | R _h | PDI | R _g | R _h | R _g /R _h | M _w | R _g | A ₂ | N _{agg} [‡] |
| | nm | nm | | nm | nm | | nm | 10 ⁸ g/mol | 10 ⁻⁹ mol dm ³ /g ² | |
| c * | 78 | 39 | 0,06 | 33 | 40 | 0,83 | 0,817 | 36 | 0,631 | 6900 |
| 5% | 85 | 43 | 0,05 | 41 | 44 | 0,93 | 1,291 | 45 | 0,370 | 11000 |
| 10% * | 60 | 30 | 0,07 | 30 | 31 | 0,97 | 0,502 | 31 | 1,150 | 4300 |
| 20% * | 72 | 36 | 0,14 | 39 | 34 | 1,15 | 0,724 | 44 | 0,555 | 6300 |
| c Rho | 85 | 43 | 0,08 | | | | | | | |
| 5% Rho | 90 | 45 | 0,10 | | | | | | | |
| 10% Rho | 100 | 50 | 0,13 | | | | | | | |
| 20% Rho | 102 | 51 | 0,16 | | | | | | | |

Tableau 7 : Données DLS (90°) et MALS des nanoparticules obtenues par nanoprécipitation contrôlée

* Echantillons filtrés sur 1 μm après dialyse ; [‡] N_{agg} : Nombre d'agrégation

Les échantillons NPc, 10% et 20% ont été obtenus une semaine de grand froid où la température de la pièce de travail n'était pas régulée. Le mélange a donc été perturbé et l'auto-assemblage dans certains cas et la dialyse dans l'eau dans d'autres, ont créées des agrégats à l'échelle du micromètre. Le problème majoritaire de ce système de microfluidique est que les suspensions obtenues après dialyse sont très peu concentrées (0,2 g/L), c'est pourquoi il faut générer suffisamment de volume en sortie de puce pour pouvoir concentrer la solution par ultrafiltration et augmenter la concentration en objets. Ces étapes pour chaque mélange sont très longues, et par manque de temps il a été impossible de refaire de nouvelles suspensions. Ces trois échantillons ont alors été filtrés (1 μm) et les valeurs dans le tableau sont celles après filtration.

Les valeurs de R_g/R_h sont relativement proches de 1, ce qui laisse supposer une morphologie vésiculaire qui a pu être observée par cryo-TEM (voir figure 19).

La représentation schématique de ces quatre nanoparticules (NPc, NP5%, NP10% et NP20%) est illustrée sur le schéma 1 ci-dessous.

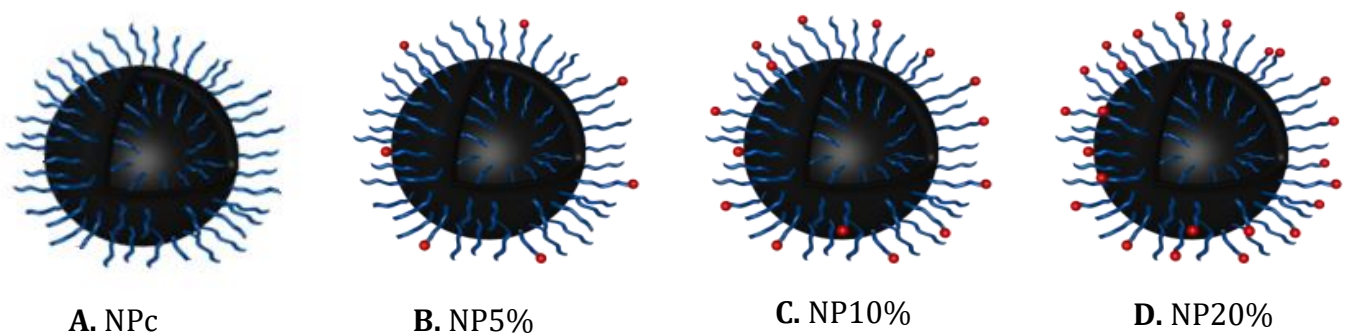


Schéma 1 : Représentation schématique des différentes nanoparticules

A. Nanoparticule avec 0% de SCH546738 (contrôle) ; B. Nanoparticule avec 5%mol de SCH546738 ;

C. Nanoparticule avec 10%mol de SCH546738 ; D. Nanoparticule avec 20%mol de SCH546738

Le segment PTMC est symbolisé en noir, le segment PEG en bleu et le SCH546738 en rouge

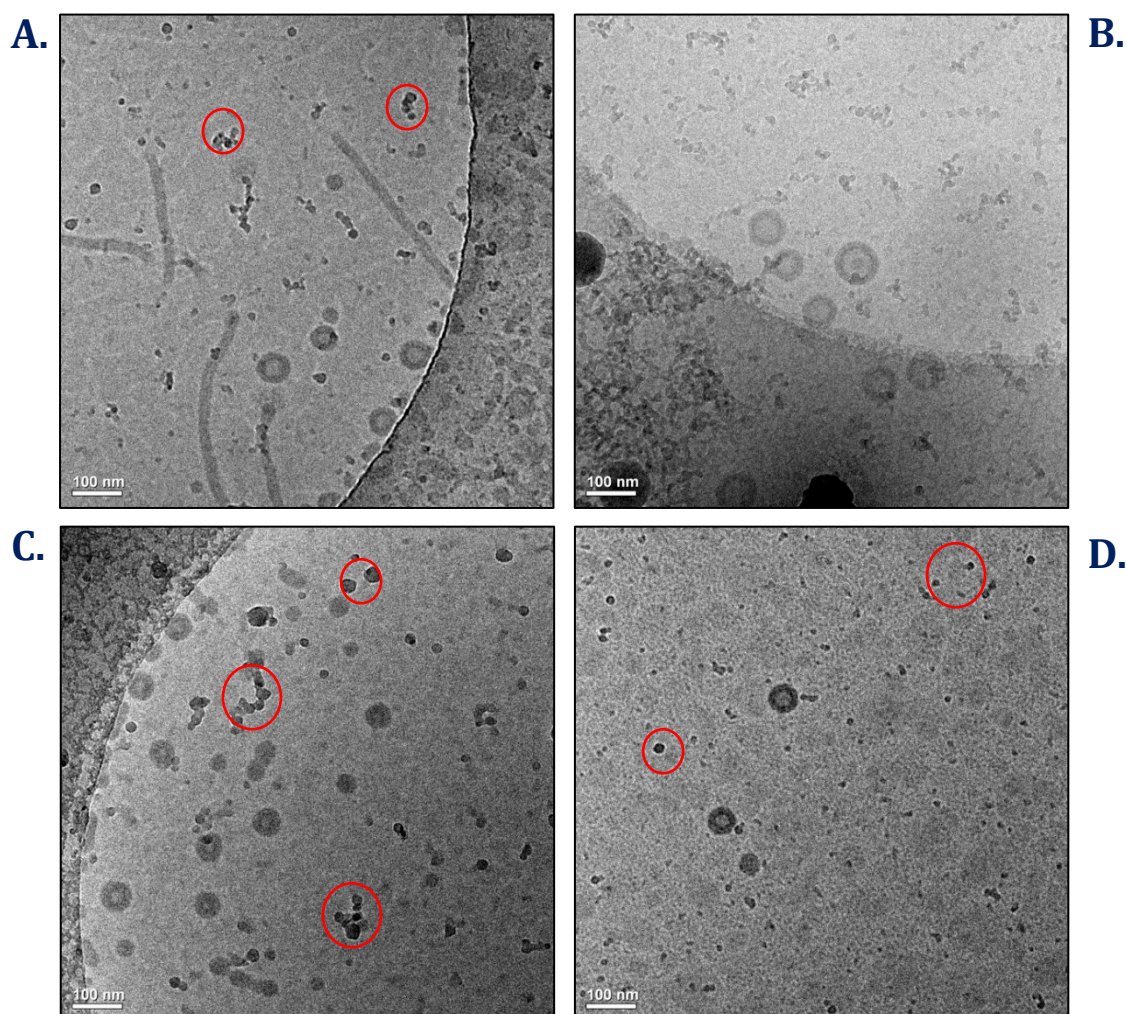


Figure 19 : Images de cryo-TEM des nanoparticules à 0, 5, 10 ou 20 % en SCH546738

A. NPc ; B. NP 5% ; C. NP 10 % ; D. NP 20%

Les tâches, dont quelques exemples sont entourés, proviennent de la mauvaise qualité de la glace lors de la trempe des échantillons pour l'analyse.

Les images de cryo-TEM ne sont pas très nettes dû à la présence d'une glace de mauvaise qualité qui est visible sur tous les clichés. Encore une fois, même après concentration des échantillons au maximum à l'ultrafiltration (tailles et PDI contrôlés par DLS 90°), la concentration en objet reste très faible et il est difficile de pouvoir imager une quantité suffisante d'objets pour pouvoir réaliser des moyennes de tailles.

Toutefois, la présence de ligands à différents taux, ne perturbe pas l'auto-assemblage sous forme de vésicules, bien qu'il y ait présence d'autres types de morphologies comme

des cylindres ou micelles. Cette dispersion de morphologie provient peut-être du processus d'auto-assemblage dans de mauvaises conditions ou de l'ultrafiltration bien que le contrôle de la taille et du PDI restent inchangés en DLS 90°. Il aurait été intéressant de pouvoir créer de nouvelles suspensions dans de meilleures conditions et analyser à nouveau ces échantillons.

Les nombres d'agrégation N_{agg} ont également été calculés lors d'une expérience de diffusion élastique de la lumière où l'intensité diffusée à différents angles θ et à différentes concentrations est calculée. Pour l'exploitation des résultats, le diagramme de Berry a été utilisé et permet de visualiser les valeurs de $\sqrt{\frac{Kc}{R(q)}}$ en fonction de ses deux variables C et q .

Cette méthode valable en régime dilué et dans le cas où les particules sont caractérisées par une taille inférieure à 200 nm, permet à travers une double extrapolation (à $C=0$ et $q=0$) d'obtenir la masse molaire moyenne en masse M_w , le rayon de giration R_g du polymère et le second coefficient Viriel A_2 (caractérisant la qualité des interactions polymère/solvant). Les extrapolations à ($\theta = 0$) et ($q=0$) donnent (A_2 et M_w) et (R_g^2 et M_w) respectivement.

La connaissance de l'accroissement de l'indice de réfraction avec la concentration (dn/dc) de la solution est importante, car il intervient dans le calcul de la constante de diffusion. Ce paramètre est déterminé par SEC dans l'eau à l'aide d'un réfractomètre différentiel muni d'une source laser opérant à 658 nm (dn/dc NPc = $0,1117 \pm 5,4$ % mL/g).

La faible concentration d'échantillons a de nouveau posé problème pour la détermination du dn/dc des NP 5%, 10%, et 20%. Etant donné que le dn/dc est basé sur la densité et le volume spécifique des molécules en solution, il n'est pas faux de supposer que ce dernier soit sensiblement identique en présence de SCH546738 au vu de son faible poids moléculaire et de son faible pourcentage molaire au sein des polymersomes. C'est pourquoi, la détermination des quatre N_{agg} a été réalisée avec un $dn/dc = 0,1117$ mL/g.

Ces valeurs de N_{agg} , typiques de celles trouvées pour une morphologie vésiculaire, confirme l'auto-assemblage de ces quatre échantillons sous forme de vésicule.^{15,16}

Dans la suite du projet, ces nanoparticules seront placées en milieu biologique à 2,2 nM en SCH546738 afin d'évaluer leur activité biologique. Il est donc nécessaire de s'assurer qu'à cette concentration-là, les copolymères soient toujours sous forme assemblés. C'est pourquoi des tests de détermination de concentration d'agrégation critique CAC ont été effectués en présence de pyrène.¹⁷ Les courbes du ratio de l'intensité à 373 nm et 384 nm en fonction de la concentration des quatre échantillons dans l'eau sont représentées sur la figure 20.

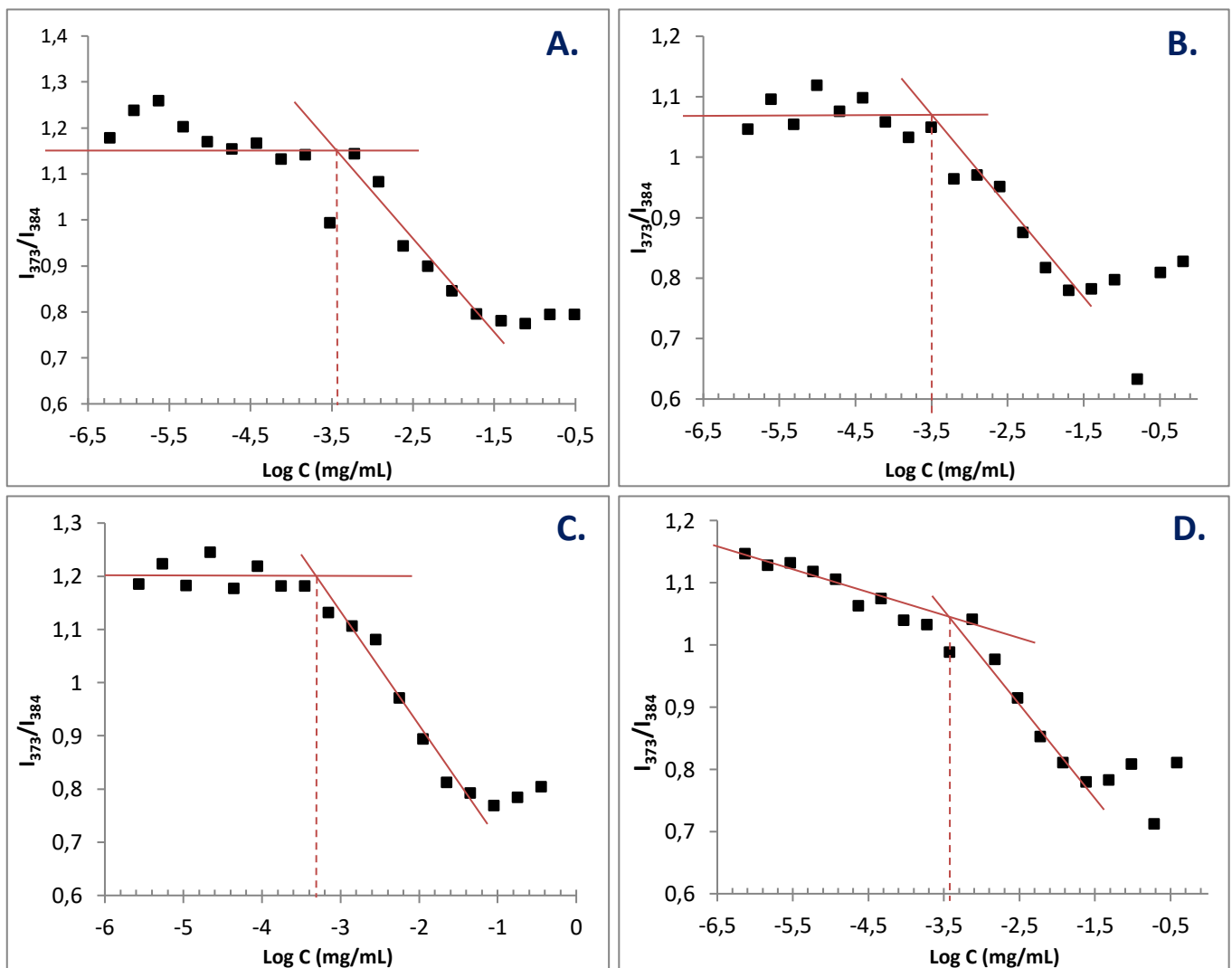


Figure 20 : Détermination de la CAC des nanoparticules

Concentration NP entre 1 mg/mL et 10^{-6} mg/mL ; $\lambda_{ex} = 337$ nm ; I_{373}/I_{384} = Rapport des intensités à 373 nm et 384 nm.

A. NPc ; B. NP 5% ; C. NP 10% ; D. NP 20%

La CAC des différentes nanoparticules est sensiblement la même ($3-4 \cdot 10^{-4}$ mg/mL). Cela signifie qu'en-dessous d'une concentration molaire de l'ordre de 30 nM, les macromolécules de PTMC₉₆-*b*-PEG et PTMC₈₈-*b*-PEG-SCH546738 ne sont plus sous forme de nanoparticules. Or, nous travaillons à des concentrations molaires en copolymères allant de 11 à 42 nM en milieu biologique selon le pourcentage de SCH546738, qui sont de l'ordre de la CAC.

Pour être certain de la présence de nanoparticules à cette concentration, les échantillons marqués par la Rhodamine ont été analysés par Spectroscopie de corrélation de durée de vie de fluorescence (FLCS). L'avantage de cette technique est la possibilité d'analyser des échantillons très peu concentrés (de l'ordre du nanomolaire). Grâce à la présence de Rhodamine dans les nanoparticules à hauteur de 3% molaire (notées NP x% Rho ; avec x le nombre de pourcentage molaire en SCH546738), une fonction d'auto-corrélation a pu être obtenue ainsi que les valeurs de R_h de chaque échantillon à 2,2 nM en SCH546738 dans l'eau et dans le DMEM (milieu biologique). Les valeurs sont répertoriées dans le tableau 8.

| Echantillon | DLS (90°) | | FLCS | |
|-----------------|-----------|----|-------|------|
| | Eau | | Eau | DMEM |
| | R_h | | R_h | |
| | nm | | nm | |
| NPc Rho | 42 | 45 | 85 | |
| NP 5% Rho | 45 | 51 | 80 | |
| NP 10% Rho | 51 | 38 | 25 | |
| NP 20% Rho | 51 | 41 | 25 | |
| Rhodamine seule | / | 1 | 0,8 | |
| DMEM | / | / | 1 | |

Tableau 8 : Données de Rayon hydrodynamique pour les différentes nanoparticules marquées par la Rhodamine par DLS (90°) et FLCS

Les valeurs de R_h des échantillons dans l'eau sont sensiblement les mêmes en DLS (90°) et en FLCS. Cependant, dans le DMEM, la taille est plus grande dans les deux premiers cas et plus petite dans les deux derniers. Le milieu biologique étant chargé en sels, il est possible que la taille du cœur soit augmentée ou que ces sels soient adsorbés à la surface des polymersomes, ce qui donnerait un rayon global plus grand.¹⁵ De plus, cette analyse est très sensible à la présence de poussières ou de molécules présentes dans le milieu (comme les molécules auto fluorescentes du DMEM), ce qui perturbe le signal émis et donc ne permet pas d'obtenir des valeurs de taille précises, contrairement aux échantillons dans l'eau, bien que les échantillons soient filtrés avant analyse. Ces analyses ont été effectuées sur des échantillons dans l'eau préparés depuis 4 mois. Il est possible que la nature des polymersomes ait changé bien qu'en DLS 90° ni la taille ni les PDI n'aient bougés 6 mois après. Il faudrait pousser ces analyses avec de nouveaux échantillons.

Toutefois, le fait d'observer des R_h de tailles cohérentes dans l'eau, confirme la présence d'objets dans un milieu à 2,2 nM en SCH546738. Les tests biologiques avec ces quatre types de nanoparticules peuvent donc être réalisés sans soucis de concentration.

Conclusion

La série de copolymères à blocs PTMC-*b*-PEG avec différentes fractions hydrophiles massique f a pu être étudiée par auto-assemblage afin d'observer leur comportement dans l'eau. Ces différents auto-assemblages ont pu être caractérisés par DLS (90°), MALS, TEM, cryo-TEM et SANS.

Il a été montré que pour une même nature de copolymères à bloc, il est possible d'obtenir des morphologies différentes comme des micelles (lorsque $f = 34\%$) ou des vésicules (lorsque $f < 17\%$) par nanoprecipitation manuelle ou contrôlée. L'épaisseur de membrane des vésicules, variant de 14,6 à 20,2 nm (vérifié par SANS et cryo-TEM) évolue de manière linéaire avec la masse molaire du bloc hydrophobe PTMC. Ce résultat

est très intéressant pour de nombreuses applications puisqu'il est possible grâce à cette relation, de faire varier les propriétés membranaires des polymersomes.

Les études plus poussées sur le PTMC₉₆-*b*-PEG₄₅ ont permis d'observer que pour un même polymère, il était possible d'obtenir des tailles et des morphologies différentes. Un changement du sens d'ajout de solvant permet par exemple de passer d'une structure vésiculaire à micellaire. L'auto-assemblage par nanopréciipitation contrôlée permet cependant d'obtenir la même taille et morphologie que par nanopréciipitation manuelle mais avec des objets beaucoup mieux définis, une meilleure dispersité en taille (PDI < 0,1) et surtout une excellente reproductibilité des échantillons.

Cette technique d'auto-assemblage par nanopréciipitation contrôlée a été utilisée pour réaliser les co auto-assemblages des PTMC₉₆-*b*-PEG₄₅ et PTMC₈₈-*b*-PEG₄₅-SCH546738 avec ou sans PTMC-Rhodamine en faisant varier le pourcentage de l'un par rapport à l'autre. Les quatre nanoparticules obtenues (0%, 5%, 10% et 20% en SCH546738) ont été largement caractérisées par DLS (90°), MALS, cryo-TEM et FLCS. Ces co-auto-assemblages permettent de garder la structure vésiculaire des objets mais beaucoup moins définis que pour NP 96-D et de tailles variables. Il reste encore du travail d'optimisation sur l'auto-assemblage de ces mélanges par nanopréciipitation contrôlée mais la technique de FLCS a tout de même confirmé la présence d'objets dans des solutions à 2,2 nM, ce qui permet de tester leur activités biologiques *in vitro*.

Références

- (1) Discher, D. E.; Eisenberg, A. Polymer Vesicles. *Science* **2002**, *297* (5583), 967–973.
- (2) Discher, D. E.; Ahmed, F. Polymersomes. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2006**, *8* (1), 323–341.
- (3) Li, Z.; Yuan, D.; Fan, X.; Tan, B. H.; He, C. Poly(Ethylene Glycol) Conjugated Poly(Lactide)-Based Polyelectrolytes: Synthesis and Formation of Stable Self-Assemblies Induced by Stereocomplexation. *Langmuir* **2015**, *31* (8), 2321–2333.
- (4) Shen, H.; Eisenberg, A. Morphological Phase Diagram for a Ternary System of Block Copolymer PS₃₁₀-*b*-PAA₅₂/Dioxane/H₂O. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (44), 9473–9487.
- (5) Schubert, S.; Delaney, Jr, J. T.; Schubert, U. S. Nanoprecipitation and Nanoformulation of Polymers: From History to Powerful Possibilities beyond Poly(Lactic Acid). *Soft Matter* **2011**, *7*, 1581–1588.
- (6) Burchard, W. Static and Dynamic Light Scattering from Branched Polymers and Biopolymers. In *Light Scattering from Polymers*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1983; Vol. 48, pp 1–124.
- (7) Pánek, J.; Loukotová, L.; Hrubý, M.; Štěpánek, P. Distribution of Diffusion Times Determined by Fluorescence (Lifetime) Correlation Spectroscopy. *Macromolecules* **2018**, *51* (8), 2796–2804.
- (8) Guinier,+Fournet,+Small+Angle+Scattering+of+X-Rays+(1955).Pdf.
- (9) Letchford, K.; Burt, H. A Review of the Formation and Classification of Amphiphilic Block Copolymer Nanoparticulate Structures: Micelles, Nanospheres, Nanocapsules and Polymersomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *65* (3), 259–269.
- (10) Dionzou, M.; Morère, A.; Roux, C.; Lonetti, B.; Marty, J.-D.; Mingotaud, C.; Joseph, P.; Goudounèche, D.; Payré, B.; Léonetti, M.; et al. Comparison of Methods for the Fabrication and the Characterization of Polymer Self-Assemblies: What Are the Important Parameters? *Soft Matter* **2016**, *12* (7), 2166–2176.
- (11) Bermudez, H.; Brannan, A. K.; Hammer, D. A.; Bates, F. S.; Discher, D. E. Molecular Weight Dependence of Polymersome Membrane Structure, Elasticity, and Stability. *Macromolecules* **2002**, *35* (21), 8203–8208.
- (12) Le Meins, J.-F.; Sandre, O.; Lecommandoux, S. Recent Trends in the Tuning of Polymersomes' Membrane Properties. *Eur. Phys. J. E* **2011**, *34* (2).
- (13) Sanson, C.; Schatz, C.; Le Meins, J.-F.; Brûlet, A.; Soum, A.; Lecommandoux, S. Biocompatible and Biodegradable Poly(Trimethylene Carbonate)-*b*-Poly(L-Glutamic Acid) Polymersomes: Size Control and Stability. *Langmuir* **2010**, *26* (4), 2751–2760.
- (14) Boyé, K.; Billottet, C.; Pujol, N.; Alves, I. D.; Bikfalvi, A. Ligand Activation Induces Different Conformational Changes in CXCR3 Receptor Isoforms as Evidenced by Plasmon Waveguide Resonance (PWR). *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1).
- (15) Papagiannopoulos, A. Bovine Serum Albumin Interactions with Cationic Surfactant Vesicles Decorated by a Low-Molar-Mass Polysaccharide. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2018**, *537*, 495–501.
- (16) Nakai, K.; Ishihara, K.; Kappl, M.; Fujii, S.; Nakamura, Y.; Yusa, S. Polyion Complex Vesicles with Solvated Phosphobetaine Shells Formed from Oppositely Charged Diblock Copolymers. *Polymers* **2017**, *9* (2), 49.
- (17) Alkayal, N.; Zapsas, G.; Bilalis, P.; Hadjichristidis, N. Self-Assembly Behavior of Well-Defined Polymethylene-Block-Poly(Ethylene Glycol) Copolymers in Aqueous Solution. *Polymer* **2016**, *107*, 415–421.

Chapitre 4 :

***Etude in vitro des différents
systèmes sur des modèles
cellulaires surexprimant le
récepteur CXCR3-A***

Introduction

Comme évoqué précédemment, de nombreux cancers sont liés à la surexpression du récepteur membranaire CXCR3.¹ C'est pourquoi des approches destinées à empêcher l'activation de ce récepteur ont été développées depuis plusieurs années. Il a été montré que la fixation d'un ligand agoniste sur ce récepteur se traduisait par une augmentation du flux calcique Ca^{2+} entrant, l'activation des voies de signalisation impliquant des kinases telles que MAPK/ERK et PI3K/AKT.² L'ensemble de ces processus conduit à la migration cellulaire. Les conséquences de l'activation du récepteur CXCR3 ont été étudiées en utilisant des techniques immunochimiques (western blot), la cytométrie en Flux, des chambres de Boyden ou encore par microscopie confocale. La comparaison des résultats obtenus entre une molécule agoniste (PS372424) et un ligand antagoniste (SCH546738) est nécessaire à l'interprétation des résultats.

Ces différents tests ont été réalisés sur la lignée cellulaire **HEK293**, qui provient initialement de cellules de rein embryonnaire humain, modifiée génétiquement pour surexprimer le récepteur CXCR3-A (HEK-CXCR3-A) ou pour surexprimer le même vecteur vide (cellules contrôle HEK-CTRL). Ces vecteurs (pEGFPN2 vide ou pEGFPN2+CXCR3-A) contiennent le gène de la protéine fluorescente « enhanced Green Fluorescent Protein » (eGFP). Nous avons également choisi de travailler avec une lignée de glioblastome humain, la lignée cellulaire **U87** transfectée par des vecteurs ne contenant pas l'eGFP (vecteur pCDNA3.1 vide ou pCDNA3.1+CXCR3-A). Elle a été choisie car elle exprime un niveau bas de CXCR3 comparées à d'autres lignées cellulaires de gliomes comme T98G ou U118.³

Dans une première partie, l'effet antagoniste du ligand SCH546738 sur ces lignées cellulaires a été validé puis par la suite, l'effet des formes modifiées de SCH546737 (SCH546738 acétylé et PEG-SCH546738) et les différentes nanoparticules fonctionnalisées a été évalué.

1. Principe des techniques utilisées

1.1 Western-blot

Cette technique a été mise au point par W. Neal Burnette en 1981.⁴ Le principe est basé sur la spécificité de l'interaction anticorps-antigène qui permet d'identifier une protéine d'intérêt au sein d'un mélange complexe de protéines.

Le western blot (WB) se déroule en plusieurs étapes : la préparation des échantillons, l'électrophorèse sur gel en conditions dénaturantes, le transfert sur membrane, et enfin la détection de la bande correspondant à la protéine d'intérêt grâce à des anticorps spécifiques.

Les cellules sont placées en culture dans les conditions souhaitées. Après traitement par les molécules à tester (dans notre cas agoniste ou antagoniste du récepteur CXCR3), les protéines sont extraites des cultures cellulaires, puis séparées par électrophorèse dans un gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Le détergent SDS (Dodécylsulfate de sodium) permet de rompre les liaisons non covalentes permettant la formation des structures secondaires des protéines, et donne la même charge négative par unité de masse à chaque protéine (~1.4 g SDS/ g de protéine). Ainsi, pendant l'électrophorèse, les protéines vont se séparer les unes des autres en fonction de leur masse moléculaire, les petites migrant plus rapidement que les grandes. Une fois que les protéines sont séparées, elles sont transférées sur une membrane (généralement en polyfluorure de vinylidène PVDF ou nitrocellulose) par électrotransfert. Pour minimiser les interactions entre les sites libres de la membrane et les anticorps, il est nécessaire de saturer la membrane par une solution riche en protéine, généralement du sérum albumine de bœuf. Enfin, l'étape de détection, consiste à incuber la membrane avec une solution contenant des anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine d'intérêt, que l'on appelle des anticorps primaires. Après lavage, la membrane est alors incubée avec un anticorps secondaire reconnaissant la partie constante de l'anticorps primaire. Cet anticorps secondaire est généralement couplé à un marqueur (fluorophore ou enzyme) pour la détection (voir figure 1).

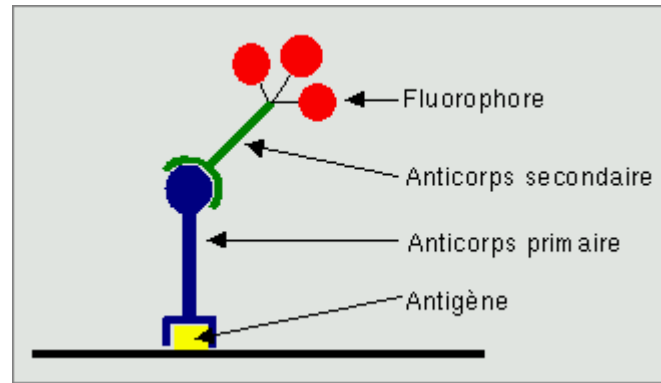


Figure 1 : Principe du western Blot ⁵

1.2 Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique permettant de faire défiler des particules ou des cellules fluorescentes en suspension dans un liquide à grande vitesse dans le faisceau d'un laser, en les comptant et en les triant grâce à la lumière réémise par fluorescence.

Cette technique est divisée en trois parties : fluïdique, optique, numérique.

Lors de l'analyse, le liquide contenant la suspension est prélevé et les cellules sont transportées jusqu'au centre de la buse de mesure puis alignées les unes derrière les autres grâce à un système de centrage hydrodynamique de l'échantillon, afin d'être excitées une par une avec le faisceau lumineux. Ce laser permet une illumination des colorants à une longueur d'onde proche de leur maximum d'absorption. Les différents signaux optiques émis sont focalisés, séparés puis amenés vers des systèmes de détection. Ils sont pour cela, sélectionnés par différents circuits optiques, composés d'une alternance de miroirs et de filtres (voir figure 2).

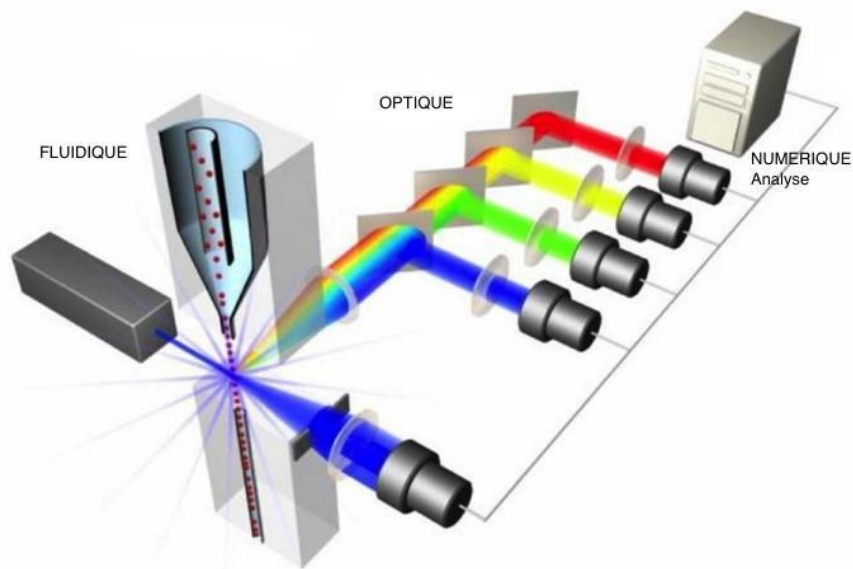


Figure 2 : Représentation schématique d'un cytomètre en flux ⁶

Après avoir traversé cette succession de miroirs et de filtres, la lumière est recueillie et transformée en signal électrique par un photomultiplicateur ou photodiode. Ces signaux sont ensuite traités et les résultats des mesures peuvent alors être représentés sous la forme d'histogrammes ou de nuages de points.

Dans notre cas, le cytomètre en flux utilisé est l'Accuri C6 de chez BD.

1.3 Chambre de Boyden

La chambre de Boyden est une des techniques qui permet d'étudier la chimiotaxie, processus par lequel les cellules migrent le long d'un gradient de facteur de croissance.

Cette technique relativement simple, consiste à suspendre un puits plus petit (insert) au-dessus du puits principal d'une plaque de culture cellulaire. Au fond de cet insert, se trouve une membrane perméable qui peut laisser passer les cellules. Les cellules en solution, préalablement traitées avec les conditions souhaitées, sont placées au-dessus de la membrane, alors qu'au fond du puits principal se trouve un chimio attractant (molécule agoniste par exemple) (voir schéma 1).

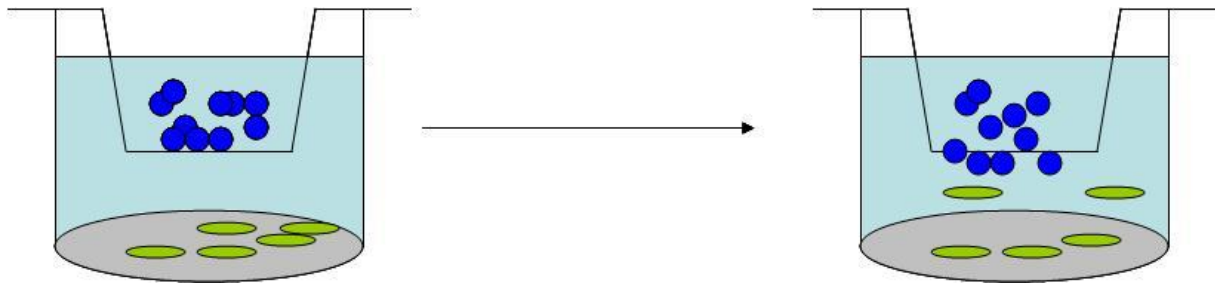


Schéma 1 : Principe de la chambre de boyden ⁷

Les cellules sont symbolisées en bleu et la molécule chimio attractante en vert

Après un temps défini, la migration des cellules à travers les pores de la membrane est observée par microscopie. Le nombre de cellules qui a traversé la membrane est compté et comparé avec un contrôle (sans chimio attractant).

1.4 Microscopie confocale à balayage laser

Un microscope confocal est un microscope à balayage ; il scanne l'échantillon avec un faisceau localisé et construit ainsi une image point par point. Ce qui le rend confocal provient d'un sténopé (*pinhole* en anglais) qui est placé devant le détecteur, dans un plan focal conjugué au plan focal de l'objectif. Ainsi, seuls les photons provenant du plan focal passent le sténopé et participent à la formation de l'image qui sera beaucoup plus nette car la lumière des plans adjacents sera arrêtée. Une succession de coupes de différents plans confocaux peuvent donner des informations nettes et précises dans les trois dimensions de l'objet.

La source de lumière utilisée est un laser qui va permettre d'obtenir une gamme de longueurs d'onde. Le laser va traverser une paire de miroirs oscillants et venir illuminer point par point l'échantillon.

La fluorescence émise par l'échantillon passe à travers les systèmes de miroir vers un séparateur de faisceau qui rejette toutes les longueurs d'onde d'excitation réfléchies, puis à travers le sténopé pour générer la tranche optique souhaitée.

Le détecteur utilisé est un tube photomultiplicateur (ou PMT) qui enregistre simplement la luminosité de la fluorescence à chaque point de trame et l'affiche en une image 2D (XY) (voir schéma 2).

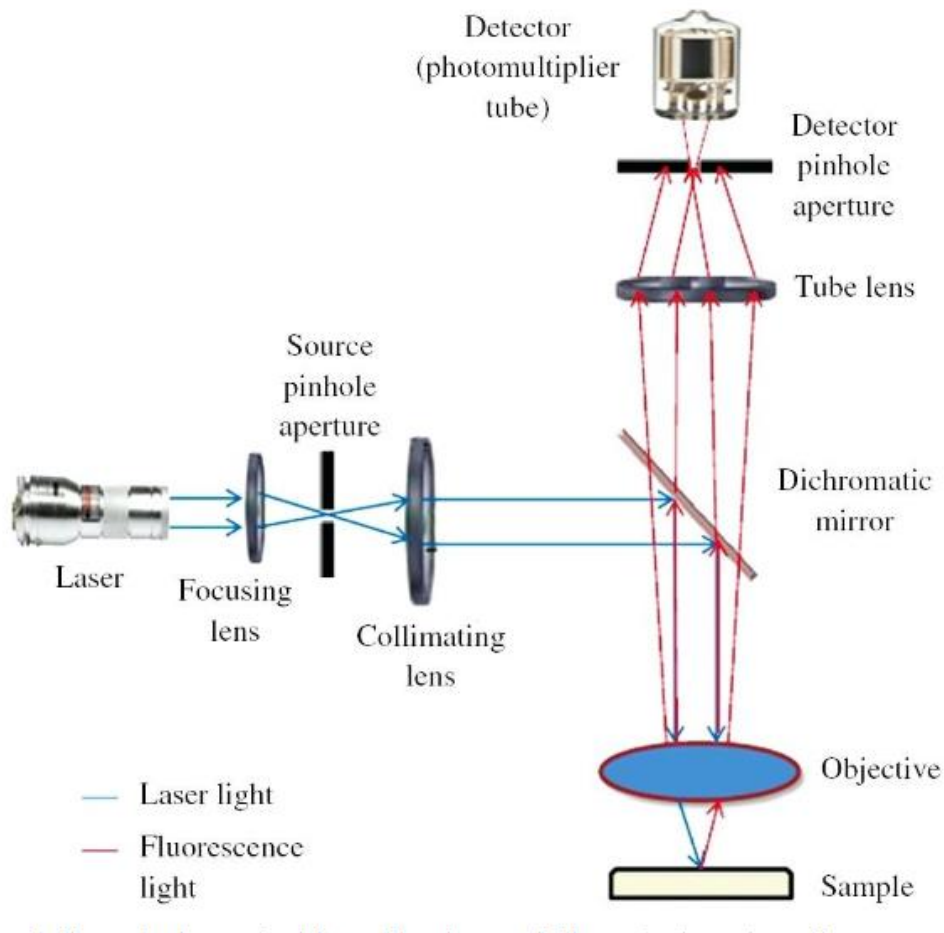


Schéma 2 : Représentation d'un microscope confocal ⁸

Le microscope confocal utilisé est un microscope inversé de marque Leica TCS SP5 équipé d'un objectif à immersion en huile HCX PL APO 63x, NA 1.4 en mode fluorescence. Les noyaux ont été observés en utilisant une diode UV dont la longueur d'onde d'excitation est de 405 nm et la lumière de fluorescence émise a été collectée sur une fenêtre spectrale comprise entre 406 et 466 nm, les cellules HEK293 ont été excitées avec un laser argon à 488 nm et observée sur la fenêtre spectrale entre 499 et 564 nm et enfin les nanoparticules avec une longueur d'onde d'excitation à 451 nm et observées entre 588 et 666 nm. Grâce à une sur platine, une superposition de 26 plans (en z) a permis d'obtenir une image moyenne par condition.

2. Activité biologique du SCH546738 et de ses formes chimiquement modifiées

2.1 Validation de l'activité biologique du SCH546738

Cette partie a été menée en étroite collaboration avec Kevin Boyé, doctorant au LAMC. Une partie de ces résultats a été publiée dans un de ses articles.³

Il a d'ailleurs montré par la technique de PWR (Plasmon-Waveguide Resonance) et de flux calcique que le SCH546738 avait une très bonne affinité de liaison pour le CXCR3 (2,2 nM), et qu'il avait une meilleure affinité pour l'isoforme CXCR3-A (IC₅₀= 0,67 nM) que pour l'isoforme CXCR3-B (IC₅₀ = 1,68 nM).

L'activité biologique de la molécule commerciale a donc été testée par les techniques de WB et de cytométrie en flux. La migration cellulaire a été également étudiée par l'utilisation des chambres de Boyden.

2.1.1 western blot

La phosphorylation de la voie MAPK/ERK a été étudiée sur les deux lignées cellulaires HEK293 (surexprimant ou pas le récepteur CXCR3-A) par la technique de WB en présence d'agoniste du CXCR3 (PS372424) et/ou de l'antagoniste SCH546738. Dans ces deux cas, la concentration de la molécule à tester était de 2,2 nM, et le temps d'incubation était d'une heure. L'agoniste est ajouté 5 minutes avant la lyse des cellules à une concentration constante de 160 nM.

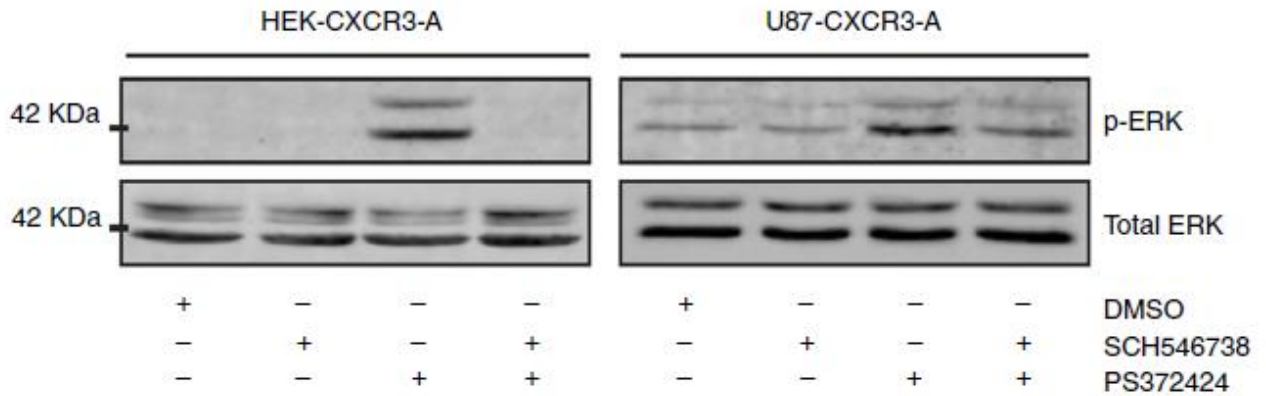


Figure 3 : Activation de la voie MAPK/ERK après stimulation de CXCR3 ³

p-ERK correspond à la forme phosphorylée des MAPK/ERK

Les deux bandes observées correspondent aux deux isoformes de la protéine ERK respectivement de poids moléculaires de 43 kDa (379 acides aminés) et 41 kDa (360 acides aminés) chez l'humain. Quand ces protéines deviennent phosphorylées, elles acquièrent un poids moléculaire de 44 kDa et 42 kDa respectivement pour ERK-1 et pour ERK-2.

L'immunodétection a été réalisée avec deux anticorps primaires différents, l'un spécifique de la forme phosphorylée de ERK (p-ERK : phospho- p42 et -p44) et l'autre révélant toutes les formes de ERK (ERK total : p42 et p44). Cela a permis de vérifier que la même quantité de protéines a été déposée dans tous les puits du gel, et donc de pouvoir quantifier les formes p-ERK.

Les traitements par le DMSO (diluant des molécules à tester), et par le SCH546738 servent de contrôle pour prouver qu'ils n'induisent pas de cascade de phosphorylation.

Lors de ce test, nous observons que les cellules HEK-293 possèdent un niveau basal de p-ERK plus faible que celui des U87. En revanche, dans les deux cas, une augmentation de cette phosphorylation en présence de l'agoniste PS372424 qui induit une activation de la voie de signalisation MAPK/ERK est observée. Lorsque les cellules sont pré-incubées pendant 1 heure avec l'antagoniste SCH546738, puis que l'agoniste est ajouté, l'augmentation de la phosphorylation de ERK n'est pas observée et reste à son niveau basal. Ceci montre que le SCH546738 a une très bonne affinité de liaison au

CXCR3-A, puisqu'une concentration de 2,2 nM est suffisante pour empêcher l'agoniste de se fixer, et donc d'activer cette voie de signalisation.

2.1.2 Cytométrie en Flux

L'intensité du calcium intracellulaire a été analysé par cytométrie de flux. En effet, un des premiers évènements de l'activation d'un GPCR est l'augmentation du calcium.

Pour cela, les deux lignées HEK-CXCR3-A et U87-CXCR3-A ont été traitées avec 2,2 nM de SCH546738 ou un même volume de DMSO (cellules contrôles) pendant 1 heure et 160 nM d'agoniste ou un volume équivalent de DMSO (condition contrôle). Deux minutes après le début de l'enregistrement, l'agoniste PS372424 ou le DMSO ont été ajoutés et les valeurs prélevées sont celles obtenues 20 secondes après cet ajout (voir figure 4).

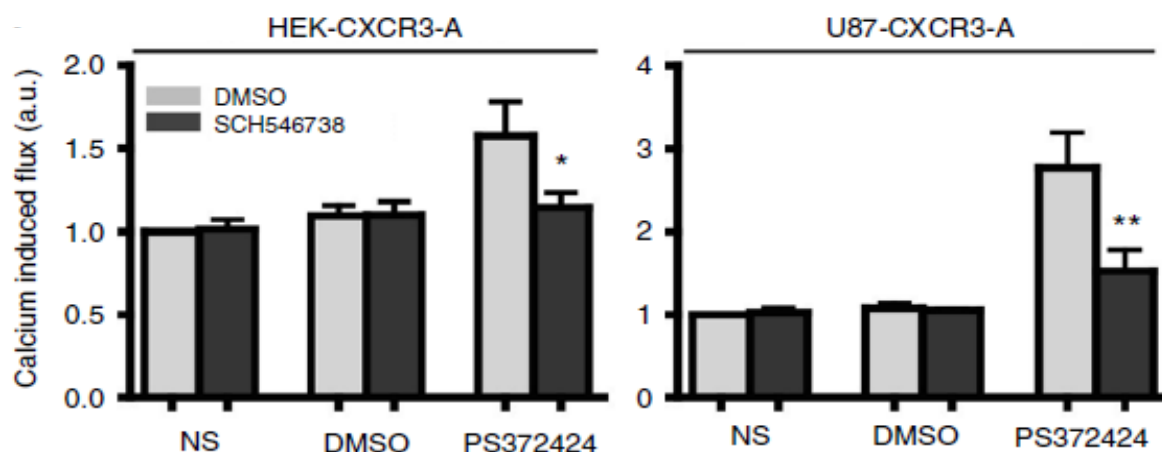


Figure 4 : Flux calcique relatif sur cellules HEK-CXCR3-A et U87-CXCR3-A après stimulation par l'agoniste (20secondes) ³

Les bandes noires représentent les cellules traitées pendant 1heure avec 2,2 nM de SCH546738 et les bandes grises représentent les cellules en présence de DMSO (correspondant au solvant du SCH546738) pendant 1 heure.

NS : Non stimulé – Signal observé sans stimulation au DMSO ou à l'agoniste

DMSO : Stimulation au DMSO au bout de 2 minutes d'enregistrement

PS372424 : Stimulation à l'agoniste au bout de 2 minutes d'enregistrement

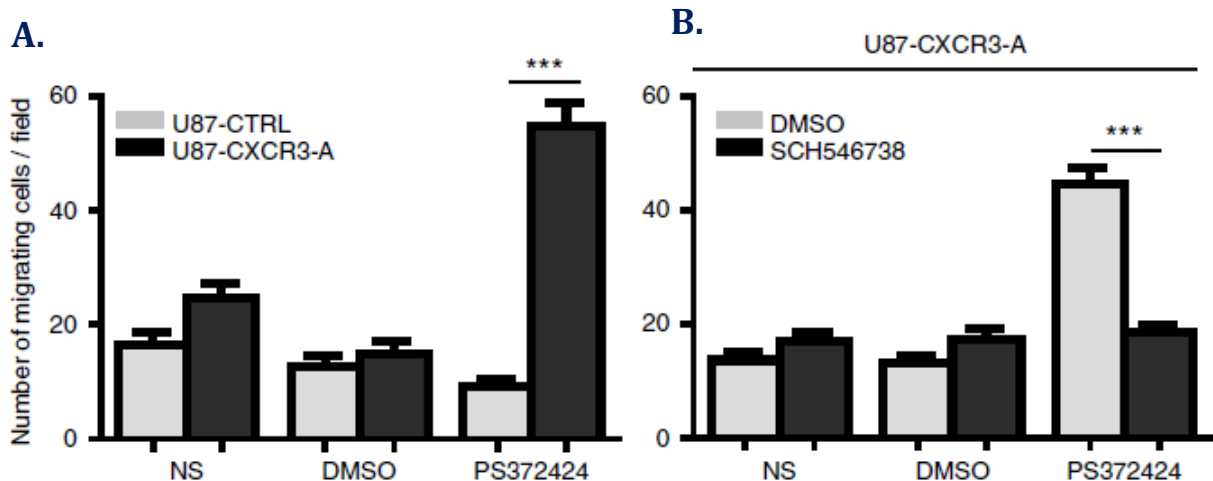
Les cellules non stimulées possèdent un niveau basal de calcium intracellulaire, et cette valeur a été arbitrairement ramenée à 1 par rapport aux cellules contrôles traitées 1 heure avec le DMSO. Des calculs ont préalablement été réalisés afin de déduire la fluorescence due à l'eGFP qui est exprimée dans les cellules HEK 293.

Lors de l'ajout de DMSO, il ne se passe rien, ce qui prouve une nouvelle fois que le DMSO n'a pas d'effet sur le système étudié.

Lors de la stimulation par l'agoniste, on observe une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. En revanche, lorsque ces mêmes cellules ont été pré-incubées avec l'antagoniste SCH546738, cette augmentation n'est pas observée et la concentration en calcium reste à un niveau quasi basal, ce qui signifie que le SCH546738 est capable de bloquer l'effet de l'agoniste.

2.1.3 Chambre de Boyden

La migration des cellules a été réalisée sur les cellules U87 sur-exprimant le récepteur CXCR3-A (voir figure 5).



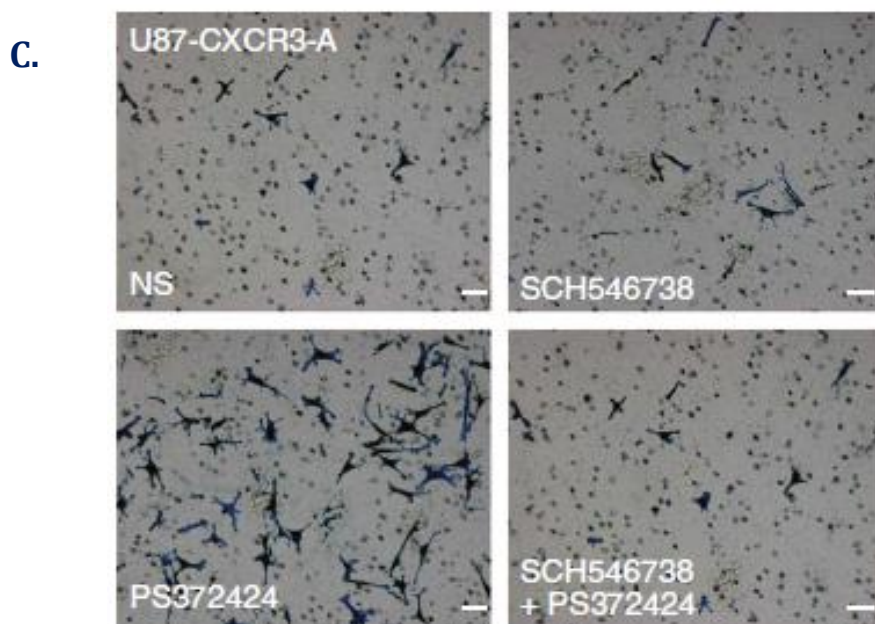


Figure 5 : Migration cellulaire des U87-CXCR3-A en présence de l'agoniste PS372424 et/ou de SCH546738 ³

A. Comparaison entre les U87 surexprimant le CXCR3-A (U87-CXCR3-A) ou non (U87-CTRL)

B. Migration cellulaire des U87-CXCR3-A en présence ou non de SCH546738

C. Images au microscope optique des cellules migrées

On observe sur le graphique 5-A qu'en présence de l'agoniste, les U87-CXCR3-A migrent cinq fois plus que les U87-CTRL. Toutefois, cette augmentation de migration cellulaire ne se produit pas lorsque ces mêmes cellules U87-CXCR3-A ont été pré-incubées avec l'antagoniste SCH546738 (graphique 5-B).

La figure 5-C montre les images des cellules qui ont migré à travers l'insert. En présence de DMSO (NS) ou de SCH546738 seul, peu de cellules se retrouvent dans la chambre basse. En présence de l'agoniste, une nette augmentation de la quantité de cellules est observée, alors qu'une pré-incubation avec le SCH546748 inhibe la migration.

Ainsi, ces trois techniques complémentaires, ont permis de valider que la molécule SCH546738 était un bon antagoniste du récepteur membranaire CXCR3-A. Cet antagoniste est en effet capable, à faible concentration (2,2 nM), d'empêcher la fixation d'un agoniste au récepteur CXCR3.

Ces résultats ont été confirmés *in vivo* sur le modèle de la membrane chorio-allantoïde de l'embryon de poulet (CAM - chicken chorioallantoic membrane) dans le cadre de la thèse de Kevin Boyé, ou il a montré que l'antagoniste SCH546738 permettait de stopper l'invasion tumorale, et empêchait la dissémination des tumeurs.⁹

2.2 Tests d'activité des différentes formes modifiées de l'antagoniste SCH546738

Comme exposé dans le chapitre 2, plusieurs modifications chimiques ont été réalisées sur la molécule SCH546738 afin de pouvoir la greffer sur une nanoparticule de PTMC-*b*-PEG. La version acétylée du SCH546738 (SCH-Ac), ainsi que la version PEGylée (PEG-SCH), ont été testées sur culture cellulaire. Pour des raisons pratiques, ces tests ont été uniquement réalisés sur les cellules HEK-CXCR3-A.

2.2.1 Activité de la forme acétylée du SCH546738 (SCH-Ac)

L'activité de la forme SCH546738 acétylé (SCH-Ac) (figure 6) a été testée afin de s'assurer que la modification chimique n'avait pas modifié la capacité de l'antagoniste à se fixer au récepteur CXCR3.



Figure 6 : Structures chimiques du SCH546738 (en rouge) et de la forme acétylée du SCH546738 SCH-Ac (en vert)

Pour cela, l'activation des voies de phosphorylation des MAPK/ERK a été étudiée par la technique de WB sur les cellules HEK-293.

La première interrogation a été de savoir quel temps d'incubation était nécessaire pour avoir une bonne activité. En effet, une modification chimique, même minime, peut changer les différents paramètres de fixation du ligand sur son récepteur.

Une cinétique de temps allant de 5 à 60 minutes d'incubation a été testée en fixant la concentration de l'antagoniste à 2,2 nM (voir figure 7).

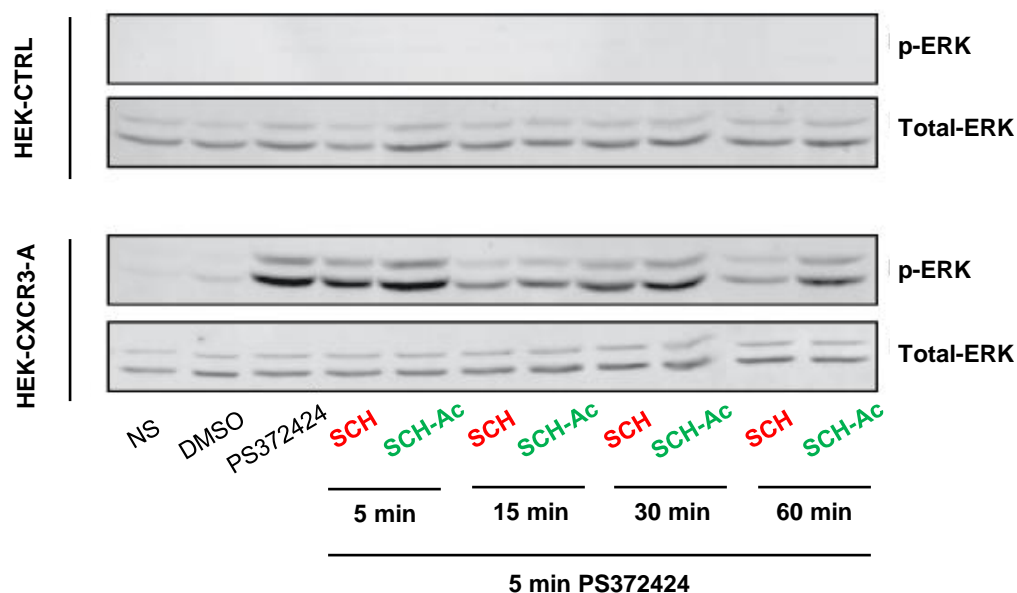


Figure 7 : Tests de différents temps d'incubation des SCH546738 (SCH) et SCH546738 acétylé (SCH-Ac) par WB

HEK-CTRL : Cellules HEK-293 n'exprimant pas le CXCR3-A ; HEK-CXCR3-A : Cellules HEK-293 surexprimant le CXCR3-A ;

NS : Cellules non traitées ; p-ERK : forme phosphorylée de ERK

Les différents tests montrent qu'après 5 minutes d'incubation avec le SCH-Ac, les niveaux de la protéine ERK phosphorylés sont comparables à ceux des cellules stimulées par l'agoniste seul. Une diminution de la quantité de forme phosphorylée n'est obtenue qu'à partir de 15 minutes d'incubation avec SCH-Ac. Pour des raisons pratiques, les expériences suivantes ont été réalisées avec une pré-incubation du SCH-Ac de 60 minutes, comme précédemment utilisé pour l'antagoniste non-modifié SCH546738.

La deuxième interrogation a été sur la concentration de SCH-Ac à utiliser. Ainsi, différentes concentrations allant de 2,2 nM à 10 nM ont été testées (voir figure 8).

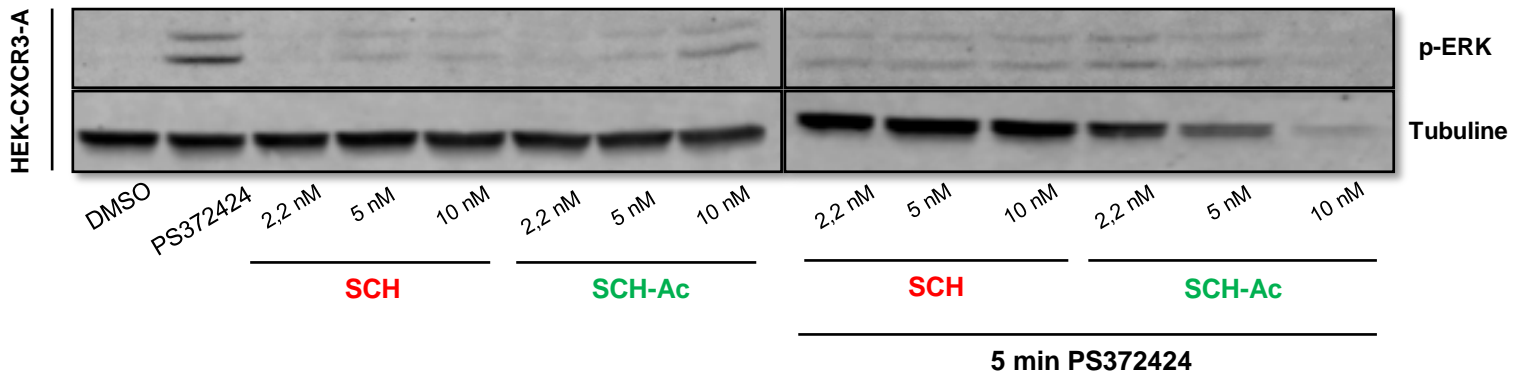


Figure 8 : Tests de différentes concentrations des SCH546738 (SCH) et SCH546738 acétylé (SCH-Ac) par WB

Les deux premiers puits, correspondant au DMSO ou à l'agoniste PS372424 incubés pendant 5 minutes, servent de contrôle.

On observe que quelle que soit la concentration de SCH-Ac utilisée, la phosphorylation de la protéine ERK est inhibée. Pour la suite, nous avons choisi la concentration la plus basse (2,2 nM) afin d'éviter d'éventuels effets cytotoxiques.

La capacité de des deux molécules à bloquer la phosphorylation des MAPK/ERK est représentée sur le graphe ci-dessous (Figure 9).

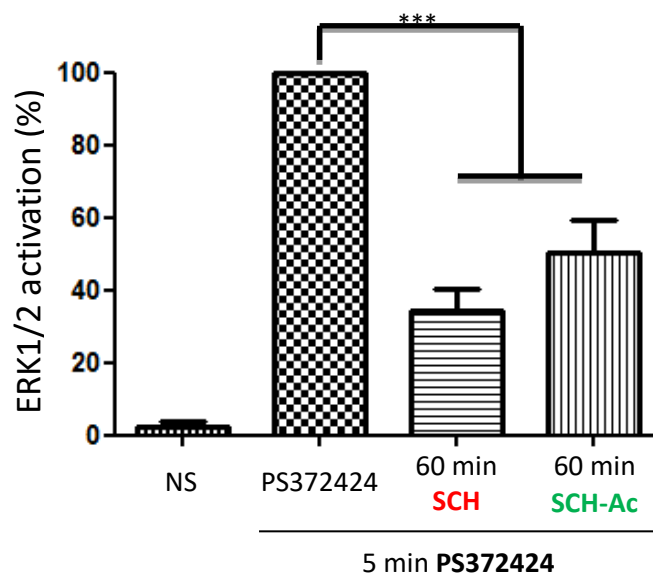


Figure 9 : Inhibition des MAPK/ERK en présence de SCH546738 (SCH) ou de SCH546738 acétylé (SCH-Ac)

Quantification réalisée sur 3 expériences indépendantes

La quantité de ERK phosphorylée, suite à la stimulation de la voie par l'agoniste PS372424, a été rapportée à 100%. Lorsque les cellules sont pré-incubées pendant 60 minutes avec le SCH546738 ou le SCH-Ac, puis mises en présence de l'agoniste, l'activation de la voie MAPK/ERK phosphorylée est respectivement inhibée de 60% et 50% en présence des antagonistes SCH546738 et SCH-Ac.

Ainsi, la modification chimique du SCH546738 à cet endroit du squelette ne diminue que très légèrement son activité biologique, ce qui suggère que le SCH-Ac est toujours capable de se fixer au récepteur CXCR3.

2.2.2 Activité de la forme PEGylée du SCH546738 (PEG-SCH)

Compte-tenu des résultats précédents avec le SCH-Ac, le SCH546738 a été modifié afin d'y greffer un segment de PEG (PEG-SCH) qui constituera la partie hydrophile de la nanoparticule (voir figure 10).

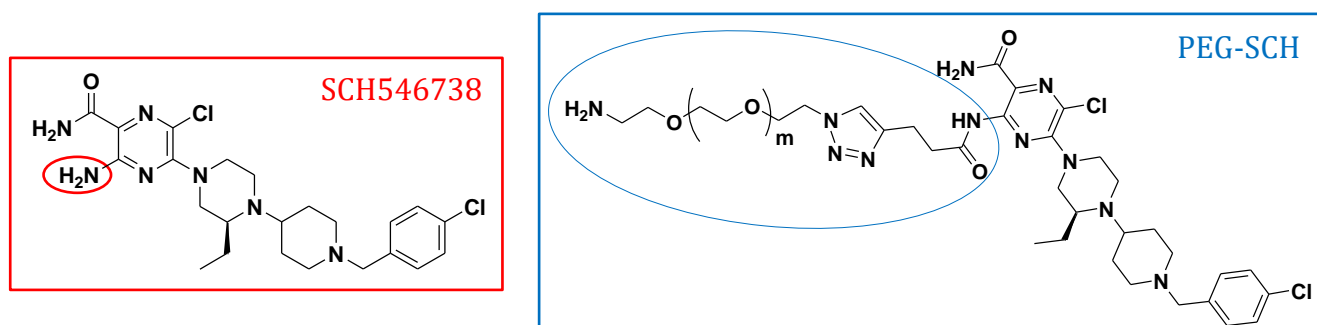


Figure 10 : Structure chimique du SCH546738 (en rouge) et du PEG-SCH (en bleu)

L'activité biologique du PEG-SCH a été également évaluée car cette modification chimique introduit un groupement bien plus encombrant qu'un acétal. Cela pourrait modifier l'efficacité de cette forme de l'antagoniste, et donc demander un ajustement des paramètres tels que le temps d'incubation et la concentration.

Un premier test par WB a donc été réalisé, en pré-incubant le PEG-SCH à des concentrations comprises entre 2,2 nM et 5 nM, pendant 1 heure, avant d'ajouter l'agoniste et d'incuber 5 minutes supplémentaires (figure 11).

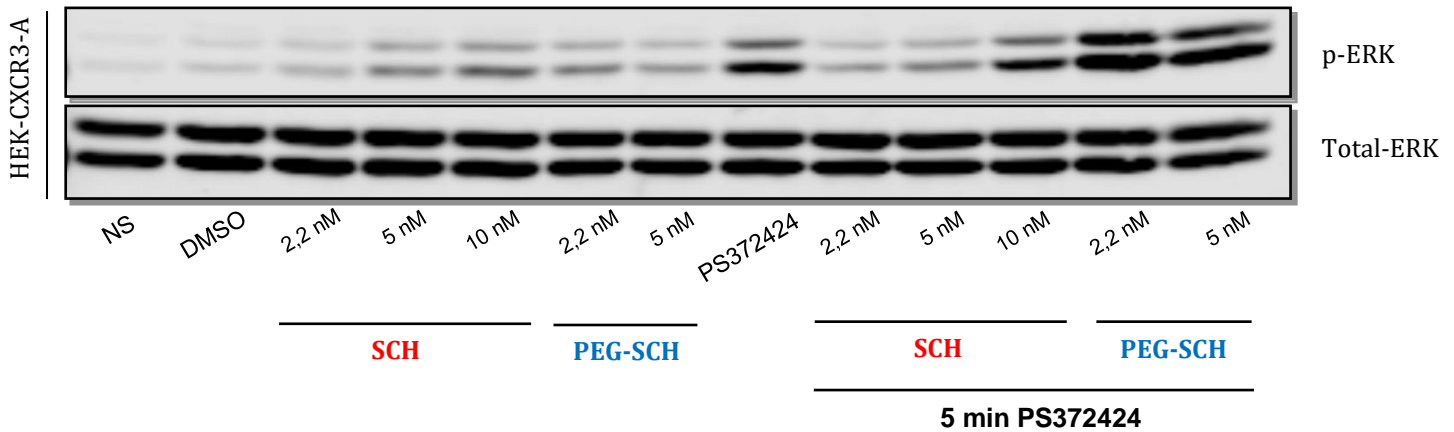


Figure 11 : Phosphorylation des MAPK/ ERK en présence de SCH546738 (SCH) ou de PEG-SCH

NS : Cellules n'ayant pas été traitées

On observe tout d'abord que le PEG-SCH seul, tout comme le SCH546738, n'induit pas ou peu de phosphorylation de la protéine ERK. Lorsque l'on stimule par l'agoniste, l'inhibition de cette phosphorylation par SCH à 2,2 nM est confirmée, alors qu'elle semble moins efficace pour de plus grandes concentrations. En revanche, on n'observe pas d'inhibition de la phosphorylation de la protéine ERK quelle que soit la concentration en PEG-SCH utilisée. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la présence du PEG augmenterait la solubilité de la molécule PEG-SCH, et que par conséquent la liaison au récepteur membranaire CXCR3 demanderait plus de temps.

Pour tester cette hypothèse, cette expérience a été refaite en augmentant les temps de pré-incubation avec la molécule PEG-SCH (6H, 24H et 48H), tout en maintenant sa concentration à 2,2 nM (voir figure 12).

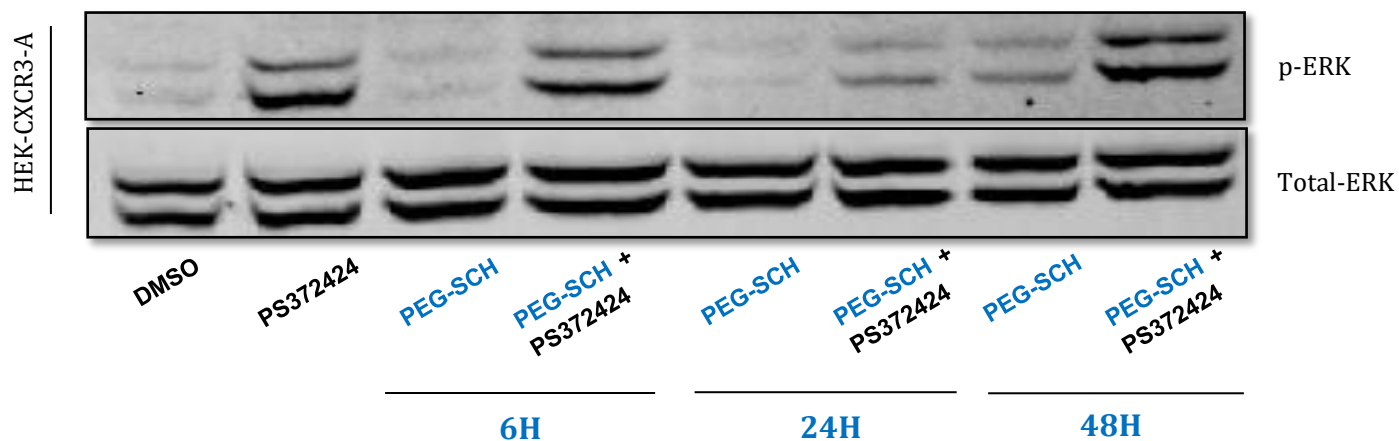


Figure 12 : Phosphorylation des MAPK/ERK en présence de PEG-SCH à différents temps d'incubation

Les temps de pré-incubations de 6, 24 et 48 heures correspondent au PEG-SCH.

Le PS372424 est ajouté pendant 5 minutes dans tous les cas.

Les résultats obtenus montrent que les temps de préincubation de 6 heures ou 48 heures ne permettent pas d'empêcher la stimulation par l'agoniste. En revanche, si les cellules sont incubées 24 heures avec la molécule PEG-SCH, la stimulation par l'agoniste PS372424 (piste PEG-SCH + PS372424 24H) est beaucoup moins efficace qu'en absence de l'antagoniste (piste PS372424).

Ces résultats semblent donc indiquer que l'ajout d'une molécule de PEG sur le SCH546738 diminue l'activité biologique du conjugué. Comme dit précédemment, cela pourrait être dû à une augmentation de la solubilité de la molécule, qui diffuserait donc mieux dans le milieu de culture et se concentrerait moins vite au niveau des membranes cellulaires. Une autre hypothèse serait que l'encombrement stérique apporté par la molécule de PEG générerait l'interaction de l'antagoniste SCH546738 avec le récepteur CXCR3-A, et donc que l'affinité soit significativement diminuée. Toutefois, il est important de noter que même si la forme PEG-SCH a une activité diminuée, elle est capable dans certaines conditions (24 H de pré-incubation) d'empêcher l'action de l'agoniste PS372424.

D'autres WB ont été réalisés dans les mêmes conditions pour confirmer ces résultats, mais les résultats obtenus n'étaient pas exploitables, notamment car les signaux détectés étaient trop faibles. La raison pourrait être soit une dégradation des anticorps primaires ou secondaires utilisées pour la détection des isoformes de la protéine ERK, soit une mauvaise conservation des molécules d'agonistes utilisées pour ces expériences.

De nombreux tests de cytométrie en flux ont également été réalisés en parallèle mais n'ont pas permis de tirer de conclusions. De plus, ces tests ont été réalisés de nombreux mois après les tests par WB, ce qui a émis des doutes sur l'activité encore existante du PEG-SCH ou sur le fait qu'il était peut-être dégradé à ce moment là.

C'est pourquoi, nous avons fait le choix de ne pas continuer à analyser cette molécule mais de tester plutôt les nanoparticules de PTMC-*b*-PEG-SCH.

3. Etudes de l'activité des nanoparticules de PTMC-*b*-PEG-SCH546738

Des nanoparticules contenant différents pourcentage de SCH546738 ont été formées afin de déterminer quel était le taux optimal d'antagoniste pour bloquer la migration cellulaire. Pour cela, des nanoparticules contenant 5% molaire (NP5%), 10% molaire (NP10%) ou 20% molaire (NP20%) de SCH546738 ont été conçues. Des nanoparticules contrôles, ne comportant pas de SCH546738 (NPc), ont également été élaborées (voir figure 13).

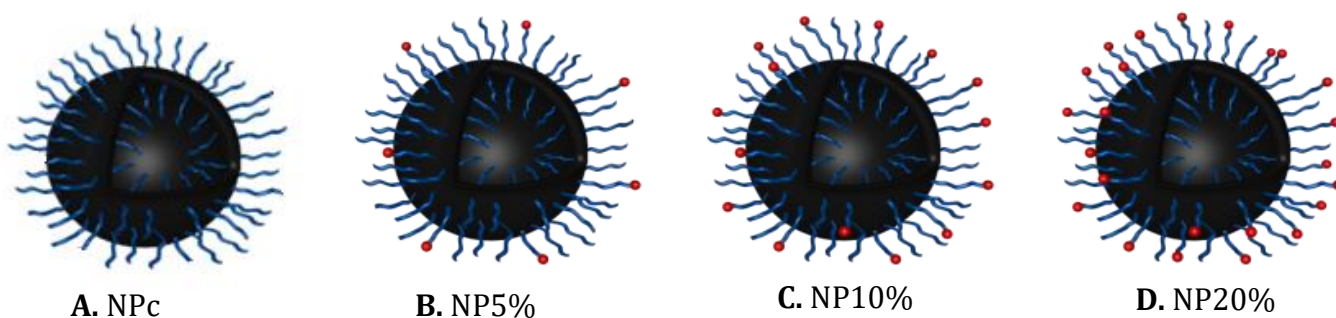


Figure 13 : Représentation schématique des différentes nanoparticules

A. Nanoparticule avec 0% de SCH546738 (contrôle) ; B. Nanoparticule avec 5%mol de SCH546738 ; C. Nanoparticule avec 10%mol de SCH546738 ; D. Nanoparticule avec 20%mol de SCH546738

3.1 Internalisation des nanoparticules dans les HEK 3A

De même que précédemment, il était nécessaire de déterminer le temps d'incubation essentiel aux nanoparticules pour se lier au récepteur et pour pénétrer dans les cellules. Pour cela, les cellules HEK-CXCR3-A surexprimant le récepteur CXCR3-A ont été utilisées.

Les nanoparticules ont été incubées avec les cellules pendant 30 minutes, 1 heure, 2 heures, 6 heures, 12 heures et 24 heures. Chaque solution de nanoparticules utilisée a été déterminée de manière à ce que la concentration en antagoniste reste constante à 2,2 nM. Après incubation sur des lames LABTEK 8 puits, les cellules ont été traitées avec le 4',6-diamidino-2-phénylindole DAPI (afin de visualiser les noyaux en bleu en imagerie), puis elles ont été fixées au paraformaldéhyde pour visualisation au microscope confocal. Les cellules HEK-CXCR3-A et HEK-CTRL transfectées avec un vecteur eGFP, émettent une fluorescence verte (émission 488 nm). Les nanoparticules ont été formulées en présence de Rhodamine (3% molaire) permettant de les visualiser en rouge (544 nm) au microscope confocal.

Un exemple des images de l'internalisation des NP10% en fonction du temps est montrée sur la figure 14 ci-dessous.

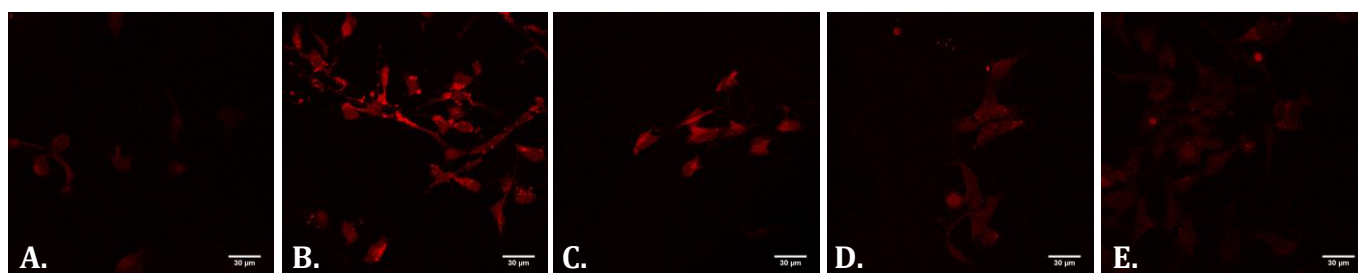


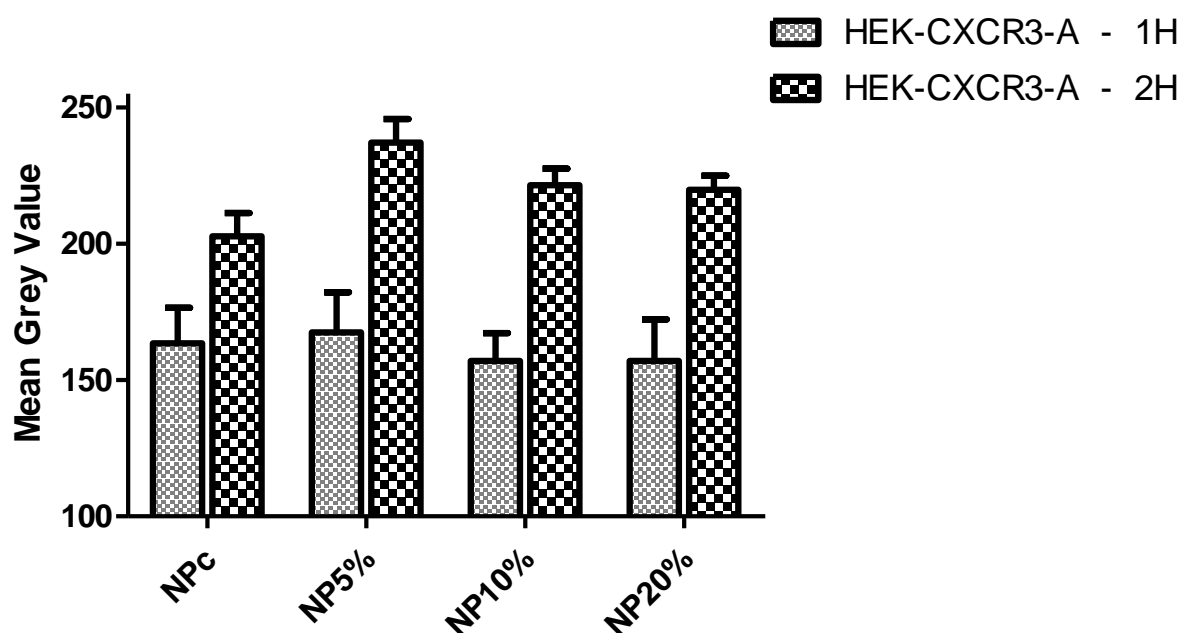
Figure 14 : Internalisation de NP10% dans les HEK-CXCR3-A à différents temps

Image de microscope confocal aux temps 1 heure (A.), 2 heures (B.), 6 heures (C.), 12 heures (D.), et 24 heures (E.) – Echelle 30 µm

Les images de microscopie confocale révèlent qu'au bout d'1 heure, il y a peu de nanoparticules internalisées dans les cellules. Après 2 heures d'incubation, la quantité de nanoparticules intracellulaires augmente nettement, puis diminue graduellement

pour des temps d'incubation plus longs. Les mêmes résultats ont été obtenus quel que soit le pourcentage de ligand SCH546738 qui était en surface des nanoparticules. Cette diminution pourrait s'expliquer par la dégradation intracellulaire des nanoparticules car des études sur d'autres nanoparticules PEGylées montrent des durées de demi-vie d'élimination variant de quelques heures (6,5 H dans le cas du PLGA-*b*-PEG¹⁰ ou 30 H pour de petites nanoparticules d'or¹¹). Ce temps d'élimination dépend toutefois de la nature de la nanoparticule, de sa taille mais aussi de son taux de ligand en surface.

Les temps d'incubation 1 heure et 2 heures ont donc été choisis afin de quantifier l'internalisation des nanoparticules cellules par cellules. (voir figure 15).



| | « Mean Grey Value » | | | |
|------------------|---------------------|------|-------|-------|
| | NPC | NP5% | NP10% | NP20% |
| HEK-CXCR3-A - 1H | 163 | 168 | 157 | 157 |
| HEK-CXCR3-A - 2H | 203 | 237 | 221 | 220 |

Figure 15 : Quantification et comparaison de l'internalisation des nanoparticules dans les cellules HEK-CXCR3-A au bout de 1 heure et de 2 heures.

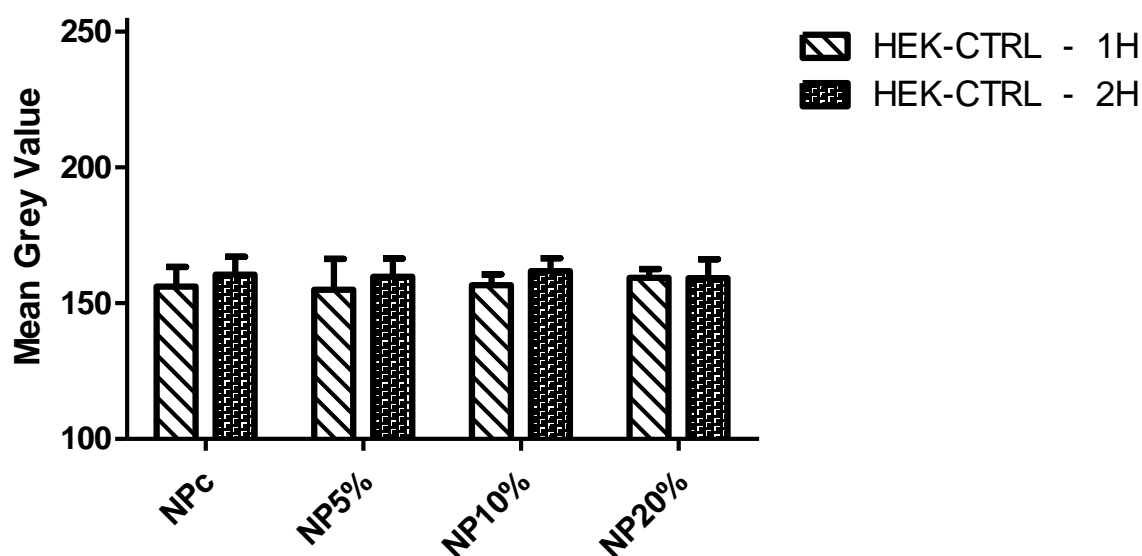
Quantification faite sur ImageJ sur une moyenne de 16 cellules par conditions, valeurs des « Mean Grey Value » comprises entre 1 et 255.

Cette quantification a été réalisée grâce au logiciel ImageJ où le « Mean Grey Value » de chaque cellule a été calculé. Le « Mean Grey Value » correspond à l'intensité des pixels divisé par le nombre de pixels (pixels correspondant à l'intensité de fluorescence rouge) et varie entre 1 (valeur d'intensité la plus basse) et 255 (valeur d'intensité la plus haute). Les images de microscopie confocale ont toutes été prises avec les mêmes paramètres pour permettre la comparaison entre toutes les conditions testées. Ainsi, le « Mean Grey Value » nous donne une information sur la quantité de nanoparticules dans chaque cellule.

Les résultats de cette quantification confirment les résultats visuels. Nous observons, qu'après 1 heure d'incubation, il y a peu d'internalisation des nanoparticules, et ce quelle que soit le type de nanoparticules testées (avec ou sans ligand). Ceci suggère que le peu de nanoparticules internalisées l'ait été par un mécanisme d'endocytose passif, sans qu'il y ait eu liaison avec le récepteur. Les résultats obtenus après deux heures d'incubation montrent toutefois une internalisation plus importante pour toutes les nanoparticules, mais que cette augmentation est plus importante pour les nanoparticules fonctionnalisées que pour les nanoparticules contrôles.

Ces résultats suggèrent que même si la présence de l'antagoniste SCH546738 en surface des nanoparticules n'est pas indispensable à leur internalisation, sa présence permet d'en augmenter l'efficacité. Toutefois, il reste à démontrer que cette amélioration de l'efficacité d'internalisation est bien due à l'interaction entre l'antagoniste et son récepteur de surface.

Afin de valider cette hypothèse, les mêmes expériences et conditions ont été réalisées sur les cellules HEK-CTRL ne sur-exprimant pas le récepteur CXCR3. La quantification cellules par cellules sur les HEK-CTRL est montrée dans la figure 16.



| « Mean Grey Value » | | | | |
|---------------------|-----|------|-------|-------|
| | NPc | NP5% | NP10% | NP20% |
| HEK-CTRL - 1H | 156 | 155 | 157 | 159 |
| HEK-CTRL - 2H | 161 | 160 | 162 | 159 |

Figure 16 : Quantification et comparaison de l'internalisation des nanoparticules dans les cellules HEK-CTRL au bout de 1 heure et de 2 heures.

Quantification faite sur ImageJ sur une moyenne de 11 cellules par conditions, valeurs de « Mean Grey Value » comprises entre 1 et 255.

Ces résultats montrent que l'internalisation des nanoparticules est semblable dans les cellules HEK-CTRL, que ce soit au bout d'une heure ou de deux heures d'incubation. Ce constat est différent de celui précédemment fait pour les cellules HEK-CXCR3-A.

En effet, après une heure d'incubation, on n'observe pas de différence dans les quantités de nanoparticules, quelle que soit leur composition, entre les cellules HEK-CXCR3-A et HEK-CTRL (« mean gray value » de l'ordre de 155-165 dans tous les cas).

En revanche, après deux heures d'incubation, l'internalisation des nanoparticules a augmenté dans les cellules exprimant le récepteur, alors qu'elle reste stable dans les

cellules témoins (HEK-CTRL). Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle il y a interaction entre les nanoparticules et le récepteur. Toutefois, ce résultat est à nuancer puisqu'on observe une augmentation de l'internalisation des NPc (sans SCH546738 à leur surface) après 2 heures d'incubation avec les cellules HEK-CXCR3-A alors qu'aucune augmentation n'est mesurée avec les cellules HEK-CTRL. Quoiqu'il en soit, les meilleurs résultats ont été obtenus avec les nanoparticules présentant l'antagoniste SCH546738 incubées avec les cellules HEK sur-exprimant le récepteur CXCR3-A. Ce constat est également validé par les images de microscopie confocale (voir figure 18).

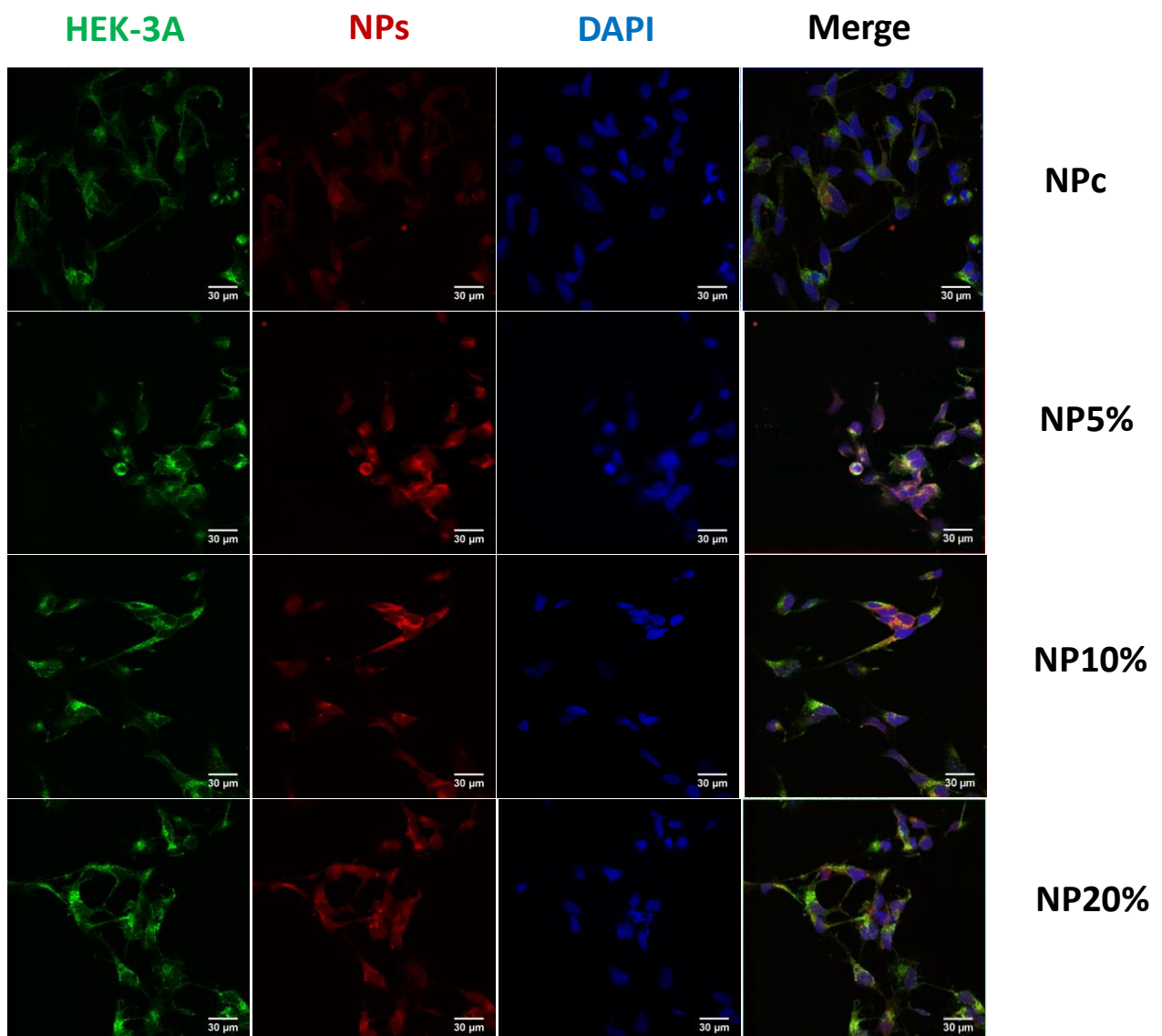


Figure 17 : Internalisation des nanoparticules au bout de 2 heures d'incubation

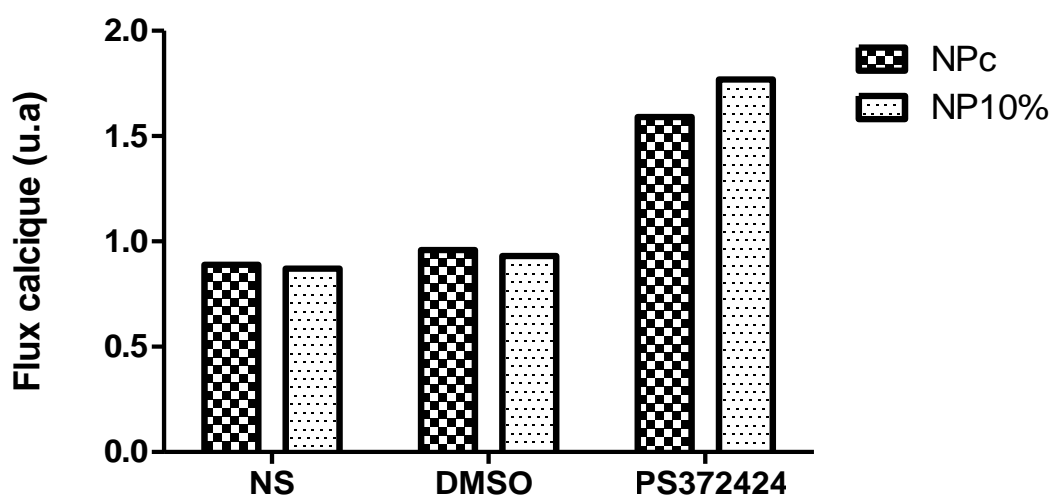
Exemple d'une image de microscopie confocale par conditions (superposition de 26 plans en Z, échelle 30µm)

Pour la suite des expériences et afin de tester l'activité biologique de ces différentes nanoparticules, des temps d'incubation de 1 heure et/ou de 2 heures ont été choisis.

3.2 Activité biologique des nanoparticules

Ces nanoparticules ont été testées afin de savoir si elles étaient capables d'inhiber la voie de signalisation passant par la phosphorylation de la protéine ERK, d'empêcher l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, et d'inhiber la migration cellulaire.

La cytométrie en flux ayant été faite en parallèle des tests d'internalisation, la quantification n'était pas encore réalisée à ce moment là et seule la NP10% sans Rhodamine (NP10%) a été testée sur les HEK-CXCR3-A (voir figure 19).



| | NPc | NP10% |
|----------|------|-------|
| NS | 0,89 | 0,87 |
| DMSO | 0,96 | 0,93 |
| PS372424 | 1,59 | 1,77 |

Figure 18 : Flux calcique induit par NPc ou par NP10% (unité arbitraire)

NS : « Non stimulée » signifie que les cellules n'ont été mises en présence que du kit de flux calcique.

DMSO : Cellules stimulées au DMSO après 2 minutes de Run

PS372424 : Cellules stimulées à l'agoniste après 2 minutes de Run

Il était important de ne pas tester les nanoparticules contenant la rhodamine car cette molécule fluoresce dans le même canal que celui utilisé pour mesurer l'intensité du calcium. Les valeurs obtenues dans le tableau correspondent au rapport de l'intensité émise par les cellules après stimulation par l'agoniste sur celles avant stimulation.

Par manque de temps, cette manipulation n'a été réalisée qu'une seule fois, nous ne pouvons donc tirer qu'une tendance de ces résultats mais il semblerait que les NP10% n'induisent pas de diminution du flux calcique, les résultats obtenus étant identiques à ceux des nanoparticules contrôles (NPc). Il serait nécessaire de confirmer ce résultat par d'autres expériences.

L'inhibition de la phosphorylation de ERK a également été testée par la technique de WB en utilisant les NP5%, NP10% et NP20%. Malheureusement, l'agoniste qui sert de contrôle positif, n'a pas suffisamment induit de phosphorylation de la protéine ERK, ce qui ne nous a pas permis de conclure.

La NP10% avait cependant été testée par WB auparavant, pour des temps d'incubation de 1 heure et 2 heures avec une concentration en antagoniste SCH546738 de 2,2 nM. Les effets des NP10% formulées avec la Rhodamine (NP10% Rho) et ceux des NP10% sans Rhodamine (NP10%) sur les HEK-CXCR3-A ont été analysés. Les deux gels correspondants sont illustrés sur la figure 20 ci-dessous.

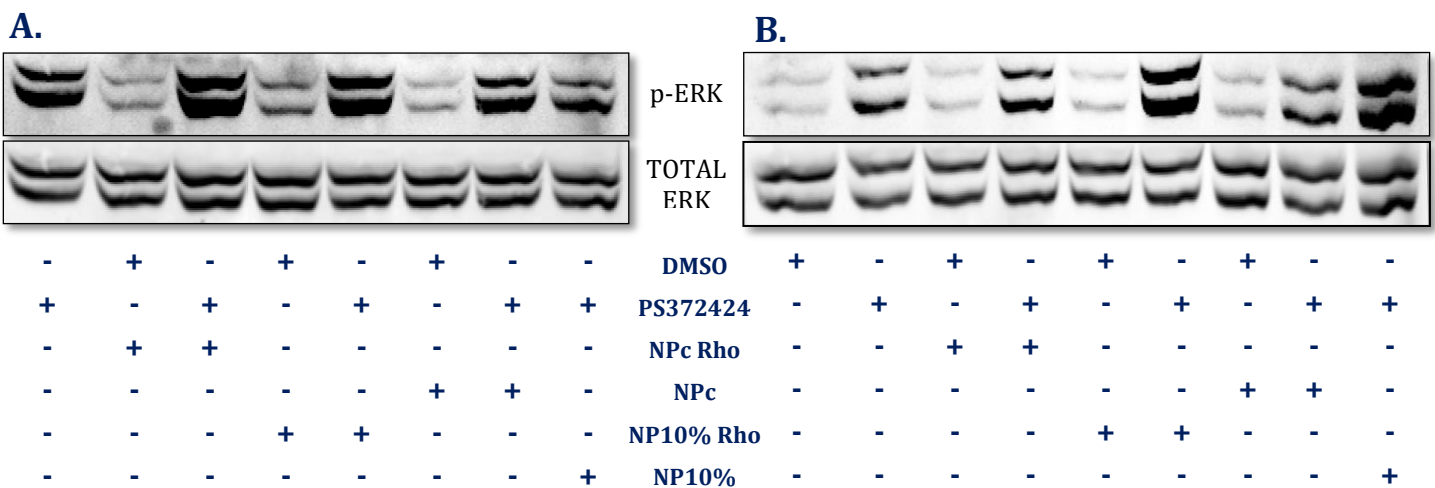


Figure 19 : WB de NP10% sur HEK-CXCR3-A aux temps 1 heure et 2 heures

NPc Rho et NP10% Rho contiennent la Rhodamine ; NPc et NP10% ne la contiennent pas ; incubation de **A.** 1H et **B.** 2H

Les résultats montrent qu'il n'y a pas de diminution de la phosphorylation des MAPK/ERK en présence des deux types de nanoparticules. De façon étonnante, ces gels sembleraient également montrer que la phosphorylation des MAPK/ERK soit plus importante quand les cellules ont été pré-incubées avec les NP10%, puis stimulées par l'agoniste, que quand les cellules ont été stimulées par l'agoniste seul, comme si les NP10% avaient eu un effet synergique avec l'agoniste. Mais seule une hypothèse peut être émise.

Comme les NP5% semble montrer une affinité légèrement meilleure pour le CXCR3-A lors des tests d'internalisation, seules ces nanoparticules ont été testées par la technique de la chambre de Boyden.

Cette expérience a été réalisée avec les cellules U87 surexprimant le récepteur CXCR3-A (U87-CXCR3-A).

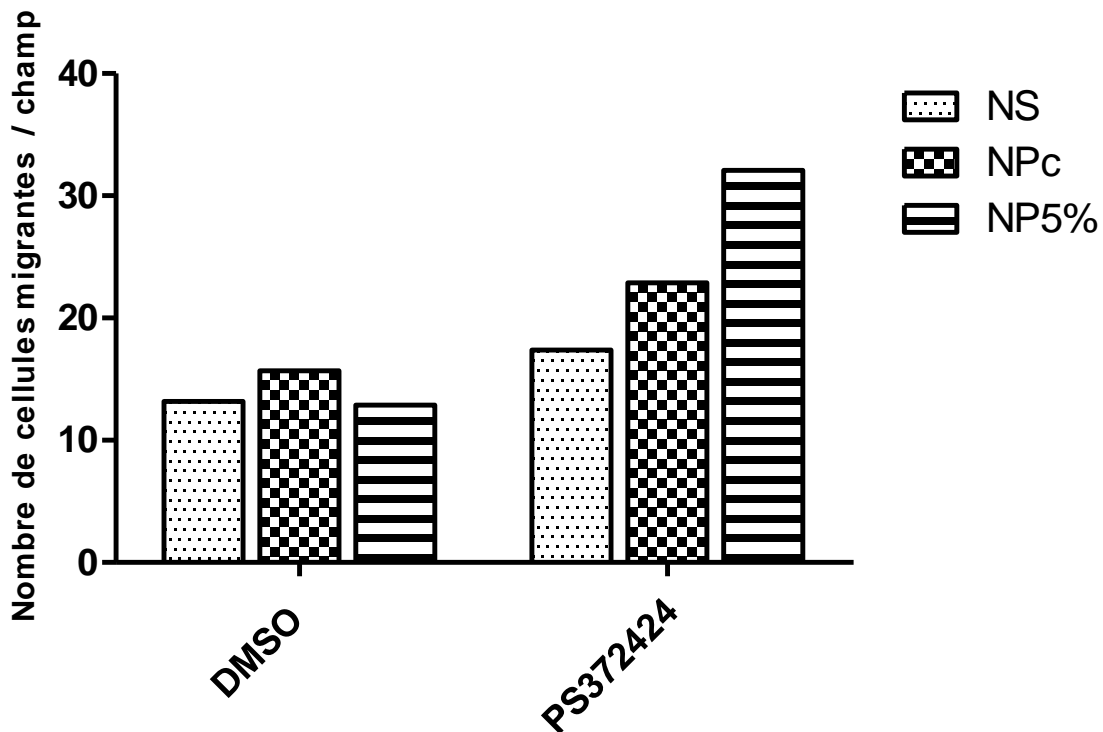


Figure 20 : Nombre de cellules migrantes en présence de NPc et NP5% après induction de l'agoniste sur cellules U87-CXCR3-A

Moyenne réalisée sur cinq champs différents des trois puits

Cet unique test montre que la migration des cellules à travers la chambre après traitement par l'agoniste PS372424 n'est pas inhibée par la pré-incubation avec les nanoparticules portant l'antagoniste SCH546738, mais au contraire semble être augmentée.

Par des contraintes de temps, ces expériences n'ont pu être reproduites pour en évaluer la reproductibilité. Néanmoins, ces résultats très préliminaires suggèrent que les différentes nanoparticules n'ont pas d'effet inhibiteur.

Ces résultats négatifs pourraient s'expliquer par le fait que les nanoparticules aient été synthétisées deux mois avant de faire les derniers tests biologiques. Il est donc possible qu'elles aient perdues leur activité avec le temps, ou qu'elles se soient dégradées.

Conclusion

Le SCH546738 est connu pour cibler le récepteur CXCR3, avec une meilleure affinité de liaison pour le CXCR3-A, et ainsi bloquer les voies MAPK/ERK, induire une diminution du flux calcique et réduire la migration cellulaire. Il a effectivement été prouvé au laboratoire grâce à différentes techniques que le SCH546738 possède une activité antagoniste efficace à une concentration de 2,2 nM.

Les différentes formes chimiquement modifiées de la molécule SCH546738 (SCH-Ac et PEG-SCH) ont également montré une efficacité de blocage de la voie de signalisation passant par le récepteur CXCR3-A, à des concentrations identiques à celles de SCH546738. Toutefois, les temps d'incubation nécessaires pour observer un effet étaient plus longs dans le cas du PEG-SCH.

Les différents tests effectués sur les cellules HEK-CXCR3-A et U87-CXCR3-A avec les différentes nanoparticules ont été moins concluants. En effet, nous avons montré que les nanoparticules étaient internalisées de manière spécifique au bout de 2 heures d'incubation. Ce résultat suggère que la présence du ligand et du récepteur CXCR3 à la surface des cellules permet une meilleure internalisation et que dans le cas des

HEK-CTRL, l'internalisation est plutôt passive. Cependant, les tests d'activité ne montrent aucuns effets des nanoparticules sur la migration cellulaire. Il semblerait au contraire qu'elle soit activée par ces dernières mais sans expériences complémentaires, nous ne pouvons que le supposer.

Finalement, les nanoparticules fonctionnalisées s'internalisent dans les cellules qui surexpriment le récepteur CXCR3-A mais ne permettent pas de bloquer la voie de signalisation MAPK/ERK. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse qu'elles ne se lient pas au récepteur dû à la non disponibilité du SCH546738 en surface car même la quantité de NPc internalisée augmente avec le temps. En effet, le SCH546738 étant un antagoniste lipophile, nous avons supposé que sa fonctionnalisation sur les nanoparticules permettrait d'augmenter sa solubilité. Il semblerait au contraire que lorsque le SCH546738 est à la surface des nanoparticules, il ne soit pas vraiment exposé, sûrement dû au fait qu'il se rétracte afin de minimiser son interaction avec le milieu aqueux. Ceci l'empêcherait de se lier correctement au récepteur CXCR3. Il est possible également que les nanoparticules fonctionnalisées se lient au récepteur mais pas sur le domaine du récepteur impliqué dans la transduction du signal. Une hypothèse alternative est que la liaison est suffisante pour induire l'internalisation des nanoparticules, mais pas assez pour bloquer les voies de signalisation en aval du CXCR3.

Ceci pourrait être prouvé par des expériences de PWR (Plasmon Wavelength Resonance), qui permettent d'étudier en temps réel les interactions récepteurs/ligands, et les changements de conformation de ces récepteurs. En effet, l'interaction récepteur/ligand induit un changement de conformation du récepteur, ce qui permettrait de valider l'interaction des nanoparticules avec le récepteur CXCR3-A, et donc de déterminer le type de nanoparticule ayant la meilleure constante d'affinité.

Matériel

Les cellules HEK-293 et U87 ont été achetées chez American Type Culture Collection. Les anticorps primaires ont été commandés chez Cell Signaling. Les anticorps secondaires et le tampon de blocage (Odyssey® Blocking Buffer (PBS)) ont été commandé chez Li-Cor® Odyssey. L'agoniste de CXCR3 utilisé (PS372424) a été commandé chez Calbiochem. La Glycine, l'EDTA, l'acrylamide et le TRIS base ont été commandés chez EUROMEDEX. L'Ethanol 96% Vol vient de chez VWR. La Trypsin-EDTA ainsi que le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) viennent de chez Gibco®. La Zeocin (100mg/mL) vient de chez Invitrogen et le G418 Disulfate Biochemica vient de chez PanReac AppliChem. Le kit de Flux calcique (Calcium Assay Kit – N°640176) a été acheté chez BD Biosciences. Le Glycerol, l'Accutase, le Triton X-100, le NaCl, le 2-mercaptoethanol, le TWEEN 20 ont été commandés chez SIGMA-ALDRICH. Le SDS, le PBS et le TEMED ont été fournis par Biosolve. Les inhibiteurs de protéases (cOmplete Tablets, Mini) et de phosphatases (phosSTOP) ont été commandés chez Roche. Le Paraformaldéhyde (Solution 4% PBS) vient de chez ChemCruz. Le Bradford a été commandé chez BIO BASIC CANADA INC. Le marqueur de masse moléculaire pour les électrophorèses (PageRuler – #26616) vient de chez ThermoScientific. Les membranes PVDF (Immobilon®-P, 0,45 µm) viennent de chez Merck, et celles en nitrocellulose (BioTrace™NT) viennent de chez PALL.

Protocoles expérimentaux

Les HEK-293 expriment la protéine fluorescente eGFP pour permettre leur visualisation en microscopie.

Culture cellulaire

Les différentes lignées cellulaires (HEK-293 et U87) sont placées en culture dans du milieu complet (DMEM 4,5 g/L supplémenté par 10% de sérum de veau foetal (FBS),

5% d'antibiotiques (pénicilline et Streptomycine) et 5% de L-glutamine). Les cellules se développent à 37°C, 5% de CO₂ en présence d'antibiotique comme la Zéocine (2µL/mL de milieu) pour les HEK ou la gentamicine G418 Disulfate Biochemica (1µL/mL de milieu) pour les U87. Les cultures cellulaires sont divisées entre 70 et 90% de confluence, en utilisant la trypsine pour les décoller des boîtes de culture.

Analyses par Cytométrie en Flux :

L'analyse de cytométrie en flux a été réalisée sur un appareil BD Accuri C6. Les cellules sontensemencées dans des boîtes de culture de 60 mm avec une densité de 250 000 cellules/puits, et incubées la nuit dans un milieu de culture complet. Le milieu est alors changé pour du milieu zéro (DMEM 4,5 g/L, 5% pénicilline, 5% streptomycine, 5% L-glutamine) et les différentes molécules et les différents contrôles sont ajoutés selon le temps choisi. Les cellules sont alors lavées au PBS, décollées par action de l'acutase puis comptées grâce à l'appareil Countess II afin de préparer un tube par condition avec 200 000 cellules dans 100 µL de milieu complet. 100 µL d'une solution de flux calcique (contenant 1mL de la solution du kit de flux calcique et 0,1% de sonde calcique) sont ajoutés et les tubes placés à 37°C pendant 20 minutes.

La concentration de calcium est ensuite enregistrée pendant 5 minutes sur l'appareil de cytométrie en flux. La stimulation à l'agoniste de CXCR3 (1,6 µM) a été réalisée après 2 minutes d'enregistrement et l'évolution du calcium intracellulaire est observée. La concentration en calcium après stimulation a été normalisée par la concentration en calcium avant la stimulation. Les cellules sans tampon coloré servent de contrôle négatif pour quantifier le niveau basal de l'intensité propre aux cellules.

Analyses par western blot :

Les cellules sontensemencées dans des boîtes de culture de 6 puits à une densité de 250 000 cellules/puits, puis incubées la nuit dans un milieu de culture complet. Le milieu est changé pour du milieu zéro et les cellules sont pré-traitées en présence des antagonistes à tester à la concentration de 2,2 nM. Après différents temps d'incubation, l'agoniste est ajouté pendant 5 minutes à une concentration de 160 nM. Les cellules sont alors lavées deux fois par du PBS, et 50 µL de tampon de lyse (Triton/NP40 : 10mM Tris-

HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,5% NP-40, 1% TritonX-100, 1mM EDTA, inhibiteurs de protéase et phosphatase) sont ajoutés. La concentration protéique est mesurée par un dosage de Bradford. Ensuite, 50 µg de protéines sont suspendues dans un tampon de Laemmli (62,5 mM Tris pH 6,8, 10% glycerol, 2,5% SDS, 2,5% β-mercapto-ethanol) et placés à 100°C pendant 5 minutes. Les différents échantillons et le marqueur de taille sont déposés dans les puits d'un gel d'électrophorèse à 10% d'acrylamide, contenant du SDS. Après migration dans un présence de tampon de migration (25 mM TRIS base, 250 mM Glycine, 200 mL éthanol, 800 mL eau distillée). Les gels sont transférés sur une membrane de PVDF ou nitrocellulose par électrotransfert à 100 Volts pendant 1h30, en présence de tampon de transfert (25 mM TRIS base, 250 mM Glycine, 0,1% SDS à 20%, 1L eau distillée). La membrane est ensuite saturée avec du tampon de blocage pendant 1 heure, puis incubée avec la solution contenant l'anticorps primaire d'intérêt (Tampon de blocage, Tween (1000^{ième}), anticorps primaire Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Mouse - 1000^{ième}) pour pERK ou p44-42 MAPK (ERK1/2) (Rabbit - 250^{ième}) pour TOTAL ERK) toute la nuit à 4°C. Après rinçages au TBS Tween, la solution contenant l'anticorps secondaire (tampon de blocage, Tween (1000^{ième}), SDS (1000^{ième}), anticorps secondaire (Donkey anti Mouse ou Goat anti Rabbit - 5000^{ième})) couplé à un fluorophore (680 ou 800 nm) est ajouté pendant 1 heure à température ambiante. Après 2 rinçages au TBS Tween et 2 rinçages au TBS, les membranes sont révélées grâce à l'appareil Odyssey (LI-COR).

Analyse par microscopie confocale :

Les cellules sontensemencées dans des chambres de culture 8 puits posées sur une lame de microscopie en verre (LAB-TEK) à une densité de 30 000 cellules/puits. Après le temps souhaité, les puits sont lavés au PBS puis 200 µL de paraformaldéhyde sont ajoutés pendant 10 minutes. Les puits sont à nouveau lavés au PBS, puis la solution de DAPI (dilution au 2000^{ième} dans du PBS) est ajoutée pendant 10 minutes. Après lavages, les puits sont détachés et une lamelle est collée pour l'observation au microscope.

Analyse par chambre de Boyden :

Les cellules sontensemencées dans des boîtes de culture de 60 mm avec une densité de 200 000 cellules/boîtes et incubées 48 heures dans un milieu de culture complet. Le milieu est alors changé pour 2 mL de milieu zéro. Les différentes molécules sont alors ajoutées pour un temps et une concentration déterminés. Les cellules sont ensuite décollées à l'aide de trypsine, et des solutions à 50000 cells/mL sont préparées et mélangées à nouveau aux molécules à tester.

Sur une plaque 24 puits adaptées, les puits sont remplis de 750 μ L de milieu zéro ainsi que 160 nM d'agoniste ou de DMSO pour les contrôles. Les inserts sont ensuite placés au-dessus, et 500 μ L des solutions (cellules + antagonistes) sont ajoutés.

Le test de migration cellulaire dure 6 heures à 37°C.

Les cellules sont alors comptées au microscope en faisant une moyenne sur 3 champs.

Références

- (1) Vandercappellen, J.; Van Damme, J.; Struyf, S. The Role of CXC Chemokines and Their Receptors in Cancer. *Cancer Lett.* **2008**, *267* (2), 226–244.
- (2) Billottet, C.; Quemener, C.; Bikfalvi, A. CXCR3, a Double-Edged Sword in Tumor Progression and Angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **2013**, *1836* (2), 287–295.
- (3) Boyé, K.; Pujol, N.; D Alves, I.; Chen, Y.-P.; Daubon, T.; Lee, Y.-Z.; Dedieu, S.; Constantin, M.; Bello, L.; Rossi, M.; et al. The Role of CXCR3/LRP1 Cross-Talk in the Invasion of Primary Brain Tumors. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1).
- (4) Burnette, W. N. “Western Blotting”: Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A. *Anal. Biochem.* **1981**, *112* (2), 195–203.
- (5) Techniques/Marquages et dosages : l’immunomarquage <http://webiologie.free.fr/techniques/marquage/anticorps.html> (accessed Feb 23, 2018).
- (6) Cours de cytométrie <http://cytobase.montp.inserm.fr/Cours/Cours.html> (accessed Feb 23, 2018).
- (7) Chang, A. Technique: Chemotaxis Revisited – the Boyden Chamber Assay. *makingbones*, 2013.
- (8) Confocal Laser Scanning Microscopy Microscope System Confocal Laser Scanning Microscopy I An Overview Of Principle And Practice In Biomedical Research – Donnascdiscountdeals.Info.
- (9) Boyé, K. Implication de CXCR3 dans la progression tumorale : une nouvelle cible thérapeutique. phdthesis, Université de Bordeaux, 2016.
- (10) Hu, C.-M. J.; Zhang, L.; Aryal, S.; Cheung, C.; Fang, R. H.; Zhang, L. Erythrocyte Membrane-Camouflaged Polymeric Nanoparticles as a Biomimetic Delivery Platform. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108* (27), 10980–10985.
- (11) Cho, W.-S.; Cho, M.; Jeong, J.; Choi, M.; Cho, H.-Y.; Han, B. S.; Kim, S. H.; Kim, H. O.; Lim, Y. T.; Chung, B. H.; et al. Acute Toxicity and Pharmacokinetics of 13 Nm-Sized PEG-Coated Gold Nanoparticles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2009**, *236* (1), 16–24.

Conclusion générale

L'objectif principal de ce travail de thèse était l'élaboration de nanoparticules composées de copolymères à blocs PTMC-*b*-PEG fonctionnalisées en surface par le ligand SCH546738, afin de cibler le récepteur CXCR3 et bloquer son implication dans la progression tumorale. En effet, l'intérêt était de pouvoir combiner les avantages des nanoparticules polymères avec le pouvoir bloquant du SCH546738. Ce ligand est hydrophobe, ainsi la stratégie de l'intégrer sur une nanoparticule devrait permettre d'augmenter sa solubilité, sa durée de vie dans la circulation sanguine et plasmatique et donc potentiellement augmenter son efficacité. Aussi, l'effet de multivalence apporté par les nanoparticules, devrait permettre d'adapter le pourcentage idéal de ligand en surface pour avoir le taux d'efficacité maximum avec une utilisation de ligand bien mieux optimisée.

Dans cette optique, nous avons abordé trois grands domaines que sont la chimie de synthèse de polymères et leur fonctionnalisation, l'étude de l'auto-assemblage et de la physico-chimie colloïdale des nanoparticules formées, et enfin les tests en biologie de nos systèmes sur cellules surexprimant le récepteur CXCR3.

La synthèse des copolymères à blocs PTMC-*b*-PEG et de son analogue fonctionnalisé PTMC-*b*-PEG-SCH546738 a été réalisée dans la première partie de cette thèse. Ces deux types de copolymères ont été obtenus par deux stratégies différentes ; synthèse convergente et divergente. Le PTMC-*b*-PEG a été obtenu par polymérisation par ouverture de cycle du triméthylène carbonate cyclique à partir d'un PEG fonctionnalisé en bout de chaîne par un alcool, qui permet un contrôle sur la taille du bloc hydrophobe. Ainsi, une série de cinq copolymères de fraction hydrophile massique f différente (f compris entre 34 et 6 %) a pu être produite. La synthèse du PTMC-*b*-PEG-SCH546738, reposant sur la conjugaison des blocs PTMC et PEG-SCH546738 par un couplage amide, a été beaucoup plus périlleuse. La première étape qui consistait à modifier chimiquement le SCH546738 afin d'introduire un agent de couplage a été difficile dû à son manque de réactivité, bien que des changements de base, de solvants, ou encore de réactifs aient été réalisés. La réaction avec un anhydride a cependant permis un couplage de faible rendement. Les multiples étapes de purification ont également été

minutieuses. La lipophilie du SCH546738 a posé beaucoup de problème même lorsqu'il était couplé au segment hydrophile PEG, rendant le PEG-SCH546738 beaucoup moins soluble dans l'eau. Toute purification dans l'eau a donc été exclue. Certaines de ces étapes ont même été abandonnées, au vue de leur complexité et de l'inactivité des espèces en solution pour les étapes de synthèse suivantes. Malgré un gros travail d'optimisation de synthèse et de purification, des grandes quantités de produits ont été perdues (très grand pourcentage de SCH546738 non réagi) mais le PTMC-*b*-PEG-SCH546738 a finalement pu être obtenu et purifié.

La deuxième partie de cette thèse a consisté en l'étude physico chimique de la série de PTMC-*b*-PEG, accessible en grande quantité contrairement au PTMC-*b*-PEG-SCH546738 assez précieux. L'étude de l'auto-assemblage des PTMC-*b*-PEG par dissolution directe n'a pas donné de résultats satisfaisants car après plus de 70 jours d'agitation des polymères dans l'eau, aucune taille stable d'objets monodisperses n'a pu être obtenue. L'étude par nanoprecipitation manuelle a cependant permis d'obtenir des nano-objets stables et de morphologie contrôlée. Ainsi, l'auto-assemblage du copolymère de fraction hydrophile massique de 34% forme des micelles en solution dans l'eau et les copolymères intermédiaires ($f = 17, 12$ et 10 %) forment des vésicules, cependant mieux définies dans le cas de $f = 17\%$, car les deux autres semblent présenter des sortes d'agrégats de vésicules que l'on peut assimiler à des fractales de cœur coquille. Enfin, le copolymère ayant le bloc hydrophobe le plus grand ($f = 6$ %) produit des sphères aux alentours de la centaine de nanomètres. Cette série a minutieusement été analysée par différentes techniques comme la diffusion dynamique de la lumière à 90° (DLS 90°), diffusion statique et dynamique de la lumière multi-angles (MALS), diffusion des neutrons aux petits angles (SANS) et enfin visualisée par TEM et cryo-TEM. De nombreuses caractéristiques des objets obtenus ont pu être déterminées, comme la morphologie exacte, leur taille caractéristique et sa distribution, ou l'épaisseur de membrane dans le cas des polymersomes. Une loi de puissance liant l'épaisseur de membrane à la masse molaire du bloc hydrophobe dans le cas des vésicules a d'ailleurs pu être mise en place, démontrant ainsi la possibilité de moduler les propriétés membranaires tout en gardant la morphologie de vésicule dans le cas des PTMC-*b*-PEG. Cette étude a montré que pour une même méthode d'auto-assemblage, la fraction hydrophile massique jouait un rôle primordial dans la nature des objets obtenus en solution.

Une autre technique utilisée sur cette même série, la nanoprécipitation contrôlée par un système de microfluidique, n'influence pas la morphologie des objets obtenus mais permet d'acquérir des objets bien mieux définis en taille ($PDI < 0,1$). Des tests plus poussés sur un même polymère ($f = 17 \%$), a permis de montrer que le protocole utilisé influençait la taille et la morphologie des objets. En effet, le sens d'ajout des solvants en nanoprécipitation manuelle, permet de passer d'une structure vésiculaire à une structure micellaire par exemple.

Les études précédentes ont déterminé que le PTMC₉₆-*b*-PEG₄₅ était le seul copolymère de la série qui fournissait des vésicules de tailles bien définies aux alentours de 100 nm de diamètre. La technique d'auto-assemblage contrôlée par un système de microfluidique, étant une technique reproductible et permettant d'obtenir des objets de taille monodisperse, a été utilisée pour réaliser le co-auto-assemblage des PTMC₉₆-*b*-PEG₄₅ et PTMC₈₈-*b*-PEG₄₅-SCH546738. Le PTMC₈₈-*b*-PEG₄₅-SCH546738 a été ajouté à la solution de PTMC₉₆-*b*-PEG₄₅ dans le DMSO à hauteur de 5, 10 et 20 % molaire. Dans tous les cas, des polymersomes monodisperses de tailles comprises entre 60 et 85 nm de diamètre sont obtenus.

Cette technique très minutieuse nécessite de s'affranchir de toutes poussières et problèmes comme des fuites ou des bulles dans la puce pour obtenir des objets monodisperses et reproductibles. La température est également un paramètre crucial car elle joue sur la viscosité du DMSO, ainsi que sur ses propriétés de solubilité et de mélange. Certaines des nanoparticules élaborées ont été réalisées par période de grand froid où la température de la pièce n'a pas pu être contrôlée, ce qui a impliqué la présence d'agrégats dans les solutions et donc la filtration de ces dernières pour s'en affranchir. Avec davantage de temps, il serait intéressant de créer de nouvelles solutions de nanoparticules en milieu contrôlé et profiter du grand avantage de ce système de microfluidique.

Ces quatre nanoparticules (0, 5, 10 et 20 % en SCH546738) ont ensuite été étudiées *in vitro* en présence de cellules (HEK 293 et U87) surexprimant le récepteur CXCR3-A. Des tests d'internalisation de ces nanoparticules ont tout d'abord été réalisés. Une internalisation dépendante de la présence de ligand a été observée au bout de deux heures. Cependant, les tests d'activité biologique mesurés par les méthodes de flux

calcique, phosphorylation de la voie MAPK/ERK et migration cellulaire, n'ont pas été concluants car il semblerait qu'aucune de ces nanoparticules ne bloque ni la voie MAPK/ERK ni la migration cellulaire. Par manque de temps, ces différents tests n'ont pu être réalisés suffisamment de fois pour être statistiquement concluants. Cependant les différents tests dénotent une même tendance de manque d'activité inhibitrice des nanoparticules fonctionnalisées avec la molécule SCH546738. Les raisons de ces résultats discordants entre l'internalisation et l'activité sur la signalisation cellulaire ne sont pas clairement connues et nous pouvons seulement formuler des hypothèses.

La présence du ligand antagoniste influe sur l'internalisation des nanoparticules fonctionnalisées comparé à la nanoparticule contrôle. Il semble que ces nanoparticules reconnaissent le récepteur mais étant donné que l'activation du récepteur n'est pas impactée, une liaison à un autre domaine de CXCR3 qui ne joue pas sur son activation est supposée. Cependant, aucune de nos expériences ne prouvant cette hypothèse, il est également possible qu'aucune liaison ne soit présente entre les nanoparticules fonctionnalisées et CXCR3. Ceci peut être expliqué par le manque de solubilité du SCH546738 qui n'est visiblement pas augmenté lorsqu'il est fonctionnalisé sur la nanoparticule, impliquant probablement son repliement dans les chaînes de PEG et réduisant ainsi sa disponibilité. Cette éventuelle liaison avec le récepteur serait suffisante pour induire son internalisation mais pas assez pour bloquer son activité pro-tumorale. Par ailleurs, le SCH546738, ayant été synthétisé deux ans avant la réalisation de ces études biologiques, il est possible que son activité ait diminué avec le temps. De même, les nanoparticules, synthétisées 3 mois avant les derniers tests biologiques, ont pu être dégradées en solution dans l'eau et ainsi diminuées en concentration et en efficacité. Pour s'affranchir de ces doutes, il faudrait pouvoir tester un SCH546738 et des nanoparticules fraîchement synthétisées.

Finalement, une autre stratégie, un peu plus éloignée de ce projet, serait d'utiliser la même nature de copolymères à blocs PTMC-*b*-PEG, mais de les fonctionnaliser avec un ligand hydrophile. Ainsi, cela permettrait de s'affranchir des propriétés lipophiles du SCH546738 comme les effets secondaires (cardiotoxicité dû à son implication dans l'inhibition de hERG), des problèmes de solubilité, de synthèse et de purification des copolymères, de disponibilité du ligand en surface de la nanoparticule pour une meilleure liaison avec le CXCR3 et donc un blocage plus efficace.

Résumé

La thèse présentée porte sur l'élaboration de nanoparticules polymères fonctionnalisées par le ligand SCH546738 afin de cibler le récepteur CXCR3 surexprimé sur les cellules cancéreuses. La synthèse des copolymères à blocs Poly(triméthylène carbonate)-*b*-Poly(éthylène glycol) (PTMC-*b*-PEG) et PTMC-*b*-PEG-SCH546738, puis leurs auto-assemblages dans l'eau avec des pourcentages différents de l'un par rapport à l'autre et enfin l'activité biologique de ces nanoparticules *in vitro* ont été réalisés.

Une série de PTMC-*b*-PEG de fraction hydrophile massique f différentes (entre 34 et 6%) ont été obtenus par polymérisation par ouverture de cycle (ROP) du monomère triméthylène carbonate (TMC) amorcée par un PEG (MW= 2000 g/mol). Les études d'auto-assemblage ont montré que la fraction hydrophile était liée à la morphologie des objets obtenus (micelles et vésicules) et que la taille et la morphologie pouvaient être modulées en fonction du protocole utilisé.

Des PTMC-*b*-PEG-SCH546738 ont été obtenus par couplage convergent entre le PEG-SCH546738 et le bloc PTMC. Le co auto-assemblage entre les copolymères fonctionnalisés et non fonctionnalisés a été réalisé par nanopréciipitation contrôlée par un système de microfluidique qui permet d'obtenir des polymersomes monodisperses de tailles contrôlées. Le pourcentage molaire de SCH546738 en surface des polymersomes a été fixé à 5, 10 et 20 % et à l'aide d'une nanoparticule contrôle ces échantillons ont pu être testés *in vitro* sur cellules HEK 293 et U87 surexprimant le CXCR3-A. L'influence du ligand et son pourcentage sur l'internalisation des nanoparticules à différents temps et sur le blocage des voies de signalisation des cellules cancéreuses ont été observés.

Summary

This thesis deals with the elaboration of polymeric nanoparticles functionalized by the ligand SCH546738 to target the CXCR3 receptor overexpressed in human healthy or tumoral cells. Poly(trimethylene carbonate-*b*-Poly(ethylene glycol) (PTMC-*b*-PEG) blocks copolymers and PTMC-*b*-PEG-SCH546738 synthesis, then their self-assembly with different ratios in water, and finally biological activity *in vitro* of these different nanoparticles were studied.

A serie of PTMC-*b*-PEG with different hydrophilic mass fractions f (between 34 and 6%) were obtained by ring opening polymerization (ROP) of trimethylene carbonate (TMC) initiated by a block PEG (MW: 2000 g/mol). Self-assembly studies showed that the hydrophilic mass fraction was related to the morphology of the nano objects (micelles and vesicles) and that size and morphology of nano objects can be changed by the self-assembly protocol.

PTMC-*b*-PEG-SCH546738 were obtained by the convergent coupling between PEG-SCH546738 and PTMC block. The co self-assembly of functionalized and not functionalized copolymers was done by nanoprecipitation controlled by a microfluidic system that allows monodisperse polymersomes with controlled size to be produced. The molar percentage of SCH546738 at the surface of polymersomes was fixed at 5, 10 and 20 %, and with the control nanoparticle, these samples were tested *in vitro* on HEK 293 and U87 cells overexpressing the CXCR3-A. The influence of the ligand and its percentage on nanoparticles internalization and signaling pathways blocking on cells were analyzed.