



HAL
open science

Nouveaux systèmes copolymères amphiphiles biodégradables pour la délivrance de principes actifs anticancéreux

Victor Delorme

► **To cite this version:**

Victor Delorme. Nouveaux systèmes copolymères amphiphiles biodégradables pour la délivrance de principes actifs anticancéreux. Autre. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONTTS140 . tel-02964698

HAL Id: tel-02964698

<https://theses.hal.science/tel-02964698>

Submitted on 12 Oct 2020

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 POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En ingénierie biomoléculaire

École doctorale Sciences Chimiques Balard

IBMM-UMR 5247

Nouveaux systèmes copolymères amphiphiles biodégradables pour la délivrance de principes actifs anticancéreux

Présentée par Victor DELORME
Le 13 décembre 2019

Sous la direction de Jean COUDANE
et Hélène VAN DEN BERGHE

Devant le jury composé de

Christine JEROME, Professeure, Université de Liège

Bernard MARTEL, Professeur, Université de Lille

Anne AUBERT, Maître de conférences, Université de Montpellier

Jean-Luc SIX, Professeur, Université de Lorraine

Hélène VAN DEN BERGHE, Maître de Conférences, Université de Montpellier

Jean COUDANE, Professeur Emérite, Université de Montpellier

Rapporteure

Rapporteur / Président
du jury

Examinatrice

Examineur

co-directrice

co-directeur



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

*« N'a de conviction, que celui
qui n'a rien approfondi »*

Emil Cioran

Remerciements

De nombreuses personnes m'ont aidé pendant ces trois années de thèse, et je tiens à leur consacrer les lignes suivantes pour les remercier.

Je tiens à remercier mes encadrants Hélène Van Den Berghe et Jean Coudane qui m'ont accompagné depuis mon stage de fin de master. Leur soutien et leur patience m'ont grandement aidé à achever mon doctorat.

Je remercie également le professeur Bernard Martel et la professeure Christine Jérôme d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse en tant que rapporteurs, et je remercie également le professeur Jean-Luc Six et Mme Anne Aubert d'avoir accepté d'être examinateurs de mes travaux.

Je remercie Ghislain David, Claire Negrell, Clément Coquery et Ibrahima Faye pour leur aide sur les réactions de dépolymérisation du chitosane.

Parmi l'équipe Glyco et Nanovecteur de l'IBMM, je remercie le professeur Alain Morère qui nous a fourni l'agent de ciblage à base de mannose. Merci également à Mme Magali Gary-Bobo qui a effectué les études biologiques sur les nanosystèmes préparés au cours de ma thèse.

Je remercie Aurélien Lebrun qui a pris en charge mes analyses RMN DOSY, ainsi que Mme Sylvie Begu pour mes analyses fluorimétriques. Je remercie également Mme Causse pour mes analyses ICP-MS.

J'exprime ma plus grande gratitude envers l'équipe Biopolymères Artificiels. J'ai passé trois années formidables avec l'ensemble de ses membres.

Je tiens à remercier les stagiaires qui ont travaillé avec moi : François, Laurianne et Hana, ainsi que l'ensemble des stagiaires que j'ai rencontré au cours de ma thèse (petite pensée pour Camille et ses punch-lines mémorables).

Merci aux doctorants que j'ai côtoyés au cours de ma thèse :

- Nicolas, qui a été un vrai « bro » jusqu'à la fin.
- Ayman, qui a fait preuve de beaucoup de patience pour supporter mon humour plus que douteux (désolé « machine de guerre »).

- Louis, qui a été l'exemple du thésard parfait à mes yeux (j'espère que tu n'as pas trop été traumatisé toi aussi par mon humour caustique...).
- Floriane, je ne risque pas d'oublier les pauses « tisanes à mamie ».
- Prescillia, avec qui j'ai apprécié discuter de tout et n'importe quoi (aussi de chimie de temps en temps quand même...).
- Et Hadda, ma légendaire binôme de paillasse.

J'ai beaucoup apprécié votre soutien pendant ces trois années.

Je remercie également les postdoctorants qui m'ont tous très bien conseillé: Samantha, Carlos, Sytze et Eva. Je tiens à remercier particulièrement Teddy pour son soutien humoristique (sombre histoire...) et Coline (rien à faire Coline, tu seras toujours ma « postdoc favorite » à mes yeux).

Je tiens à remercier le personnel technique de l'équipe : Vincent Darcos qui a toujours su répondre à mes questions d'ordres techniques, Stéphane qui a été un grand frère pour moi, Audrey avec son humour qui m'aura rendu chèvre et Sylvie dont les compétences techniques n'ont d'égal que sa gentillesse. Je remercie Carine qui m'a toujours apporté une aide précieuse pour les tâches administratives au cours de ma thèse.

Ma gratitude va également à Xavier Garric pour ses encouragements et son sens de l'écoute, je remercie également Benjamin Nottelet pour sa bonne humeur et ses conseils avisés.

Je tiens à remercier mes amis Pierre et Anthony qui m'ont également soutenu à la perfection. On aura vraiment testé toutes les conditions expérimentales possibles, mais rien à faire : les problèmes ne sont pas solubles dans la bière... En tout cas vous avez été parfait les gars.

Je remercie particulièrement Tatiana. Je me souviendrai de toi pour ta gentillesse, ton sens de l'écoute et le soutien sans faille que tu m'as apporté pour la fin de mon doctorat.

Je remercie également ma famille pour tout le soutien qu'ils m'ont apporté, mes parents, mes grands-parents qui m'ont aidé dans les moments de doutes.

Je tiens particulièrement à remercier Thibaut. Sans toi, beaucoup de choses auraient été très différentes et c'est en grande partie grâce à toi que je suis allé au bout de mes études doctorales aujourd'hui.

Il est compliqué de pouvoir mentionner absolument tout le monde, par conséquent je tiens à remercier les personnes qui m'ont aidé et que j'ai pu oublier de citer précédemment.

Table des matières

Remerciements	2
Table des matières	5
Abréviations	10
2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenone	10
Listes des figures	13
Liste des tableaux	18
Introduction générale.....	20
Chapitre 1	26
Etude bibliographique	26
1. Les systèmes d'incorporation de principes actifs pour les traitements anticancéreux	27
1.1. Modes d'action des composés anticancéreux	27
1.2. Propriétés pharmacocinétiques des principes actifs anticancéreux	28
2. Les systèmes de délivrance de principe actif	30
2.1. La taille des systèmes de délivrance	31
2.2. Les différents nano-systèmes de délivrance	32
2.3. Les générations de système de délivrance	35
2.3.1. La première génération : L'incorporation de principe actif	35
2.3.2. La seconde génération : Le développement de systèmes « furtifs »	36
2.3.3. La troisième génération : système de délivrance à ciblage actif	38
3. Les systèmes de délivrance à base de polymères	39
3.1. Les polyesters aliphatiques pour la libération de principes actifs	40
3.2. Les copolymères amphiphiles « furtifs »	41
3.2.1. Synthèse de copolymères à blocs polyester-PEG	41
3.2.2. Synthèse de polyester modifié pour la préparation de copolymères greffés	44

3.2.3.	La voie anionique	47
3.3.	Copolymères polyester-b-PEG fonctionnalisés et système à ciblage actif.....	52
4.	Les copolymères amphiphiles à base de polyester et de polysaccharide	54
4.1.	Copolymères à blocs.....	57
4.1.1.	Structures à base de dextrane	57
4.1.1.1.	Les copolymères amphiphiles DEX-b-PLA.....	58
4.1.1.2.	Les copolymères amphiphiles DEX-b-PCL.....	58
4.1.2.	Structure à base de chitosane : limitation.....	62
4.2.	Copolymères greffés	62
4.2.1.	Structures à base de dextrane	62
4.2.1.1.	Copolymère greffé amphiphile DEX-g-PLA	63
4.2.1.2.	Les copolymères amphiphiles DEX-g-PCL.....	64
4.2.2.	Structure à base de chitosane	66
4.2.2.1.	Les copolymères amphiphiles CHT-g-PLA	66
4.2.2.2.	Les copolymères amphiphiles CHT-g-PCL	70
4.2.2.3.	Synthèse de copolymère greffé à structure « inverse » PCL-g-CHT.....	74
5.	Conclusion.....	76
Chapitre 2		79
Copolymères greffés à structure « inverse » PCL-g-DEX.....		79
1	Fonctionnalisation de PCL par la voie anionique	81
2	Synthèse de dextrane azoturé	84
3	Copolymère PCL-g-DEX.....	86
3.1	Synthèse du copolymère PCL-g-DEX par chimie « clic » CuAAC.....	86
3.2	Caractérisations des copolymères PCL-g-DEX	87
3.3	Marquage fluorescent de copolymère PCL-g-DEX	92
4	Formation de nano-objets à base de copolymère PCL-g-DEX	93
4.1	Formation de nano-objets par nanopréciipitation	94

4.2	Caractérisations des nano-objets	95
5	Encapsulation dans les micelles PCL-g-DEX	96
5.1	Encapsulation de doxorubicine dans les micelles par nanopréciipitation	97
5.2	Propriétés physico-chimiques des micelles chargées en doxorubicine	97
5.3	Cinétique de libération <i>in vitro</i> de la doxorubicine	98
6	Propriétés biologiques des micelles de PCL-g-DEX	100
6.1	Cytotoxicité des micelles PCL-g-DEX vides et chargées en DOX.....	100
6.2	Internalisation cellulaire des micelles PCL-g-DEX	102
7	Conclusion.....	104
	Chapitre 3	107
	Synthèses et caractérisations de copolymères PCL-g-Chitosane	107
1	Synthèse d'oligomères de chitosane hydrosolubles	109
2	Greffage d'un agent de ciblage, le mannose squarate, sur les oligomères de chitosane	112
3	Fonctionnalisations d'oligo-chitosane.....	114
3.1	Azoturation du chitosane	114
3.1.1	Les méthodes d'azoturation du chitosane	114
3.1.2	Synthèse du 3-azidopropanal	115
3.1.3	Synthèse de chitosanes N-azotés par amination réductrice en milieu aqueux	116
3.1.4	Synthèse de chitosanes N-azotés par amination réductrice en milieu hydroalcoolique.....	120
3.2	Thiolation du chitosane	123
3.2.1	Les méthodes de thiolation de chitosane décrites dans la littérature.....	123
3.2.2	Synthèse du 3-oxopropylthioacétate	124
3.2.3	Synthèse de chitosanes N-thioacétylés par amination réductrice en milieu hydroalcoolique.....	126
4	Synthèses des copolymères PCL-g-CHT par réactions de chimie « Clic »	131
4.1	Synthèses des copolymères PCL-g-CHT par CuAAC	131

4.1.1	Premières synthèses : risques de réticulation	131
4.1.2	Étude de l'influence du nombre d'équivalents $N_3/C\equiv CH$ sur les propriétés des copolymères	137
4.1.3	Élimination du cuivre résiduel des copolymères PCL-g-CHT.....	140
4.2	Synthèses de copolymères PCL-g-CHT par couplage thiol-yne	140
4.2.1	Hydrolyse basique des thioesters	141
4.2.2	Couplage thiol-yne	142
5	Préparation et analyse de nano-objets à base de PCL-g-CHT.....	146
6	Conclusion.....	147
	Conclusion générale	149
	Chapitre 4	171
	Partie expérimentale	171
1	Instrumentation.....	172
1.1	Spectrométrie infrarouge	172
1.2	Spectrométrie ultraviolet - visible	172
1.3	Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire.....	172
1.4	Spectrométrie de fluorescence	172
1.5	Chromatographie d'exclusion stérique	172
1.6	Diffusion dynamique de la lumière	173
2	Synthèses	173
2.1	Fonctionnalisation de PCL par voie anionique.....	173
2.2	Propargylation	173
2.3	Propargylation et naphthoylation.....	174
2.4	Synthèse de PCL-g-DEX.....	175
2.4.1	Bromation du dextrane	175
2.4.2	Azoturation du dextrane bromé.....	176
2.4.3	Couplage de dextrane azoturé sur la PCLyne par CuAAC	176

2.5	Synthèse de PCL-g-CHT	177
2.5.1	Dépolymérisation du chitosane commercial	177
2.5.2	Mannosylation d'oligo-chitosane	178
2.5.3	Synthèse de PCL-g-CHT par CuAAC	179
2.5.4	Synthèse de PCL-g-CHT par thiol-yne	181
3	Études physico-chimiques	184
3.1	Protocole de nanoprécipitation	184
3.2	Protocole de dissolution directe	184
3.3	Préparation des échantillons de DLS	184
3.4	Détermination des valeurs de taux de charge et d'efficacité d'encapsulation des micelles PCL-g-DEX chargées en DOX.	184
3.5	Etude de la cinétique de libération de doxorubicine des micelles PCL-g-DEX.....	185
3.6	Préparation des échantillons pour l'analyse de fluorescence	186
4	Etudes biologiques	187
4.1	Etudes de cytotoxicité.....	187
4.2	Etudes d'internalisation cellulaire et cytométrie en flux	187

Abréviations

3-OPT	3-oxopropylthioacétate
AcOH	Acide acétique
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AHC	Acide hydroxycaproïque
ARN	Acide Ribonucléique
AUC	"Area Under Curve" ou aire sous courbe
BHL	Balance Hydrophile / Lipophile (rapport nombre de motifs hydrophobes sur nombre de motifs hydrophile d'un copolymère)
BSA	"Bovine serum albumine" Albumine de sérum bovin
CAC	Concentration d'agrégation critique
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
CDI	Carbodiimide
CHT	Chitosane
COSY	« Correlation Spectroscopy » (analyse RMN 2D)
CuAAC	Cycloaddition 1;3 dipolaire catalysé au cuivre
CuBr	Bromure de cuivre
Đ	Indice de polydispersité (Mn/Mw, GPC)
D ₂ O	Eau deutérée
DDA	Degré de désacétylation (chitosane)
DEX	Dextrane
DL	"Drug loading" Taux de charge
DLS	"Diffusion Light Scattering" ou diffusion dynamique de la lumière
DMF	N,N-Diméthylformamide
DMPA	2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenone
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMSO-d ₆	Diméthylsulfoxyde deutéré
DOSY	« Diffusion Ordered Spectroscopy » (analyse RMN 2D)
DOX	Doxorubicine
DP _n	Degré de polymérisation
DPPE	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethylamine
DS	Degré de substitution
DTPA	Acide diéthylène triaminopentaacétique
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EE	"Encapsulation efficiency" Efficacité d'encapsulation
Effet EPR (EPR effect)	"Enhanced Permeation and Retention Effect"
EG	Ethylène Glycol

EMIMAc	Acétate de 1-Ethyl-3-methylimidazolium
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
Glu	Glucose
GPC	"Gel Permeation Chromatography" ou chromatographie d'exclusion stérique
GPC _{aq}	GPC avec une phase mobile aqueuse
IC50 / DL50	Dose Létale 50
ICP-MS	"Inductive coupled plasma - Mass spectrometry" Spectrométrie d'émission atomique avec torche à plasma, couplée à la spectrométrie de masse
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IR-TF	Infrarouge à transformée de Fourier (analyse spectrométrique)
LA	"Lactic acid" ou acide lactique
LDA	"Lithium Diisopropylamidure" Diisopropylamidure de lithium
MeOH	Methanol
Mn	Masse molaire en nombre (GPC)
Mw	Masse molaire en poids (GPC)
MWCO	"Molecular Weight Cut-Off" Seuil de coupure de masse molaire (pour une membrane de dialyse)
NaBH ₃ CN	Cyanoborohydrure de sodium
Naph	Naphthoyl
NHS	N-hydroxy-succinimide
N-O	Nano-objets
P4VP	Poly(4-vinylpyridine)
PBS	"Phosphate Buffer Saline" ou tampon phosphate
PCL	Poly(ϵ -caprolactone)
PCL _{yne}	PCL propargylée le long de sa chaîne
PEG	Poly(éthylène glycol)
PHEA	Poly(hydroxyéthyl L-asparagine)
PHEG	Poly(hydroxyéthyl L-glutamine)
PLA	Poly(acide lactique)
PLGA	Poly(acide lactique-co-glycolique)
PLL	Poly(L-Lysine)
PMDETA	N,N,N',N',N" pentamethyldiethylenetriamine
PMeOx	Poly(2-méthyl-oxazoline)
RI	"refractive index" Indice de réfraction (module de détection d'analyse GPC)
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROP	"Ring Opening Polymerization" Polymérisation par ouverture de cycle
SAc	Fonction thioacétate
SRE	Système réticulo-endothélial
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphate
THF	Tetrahydrofurane
tr	Temps de rétention (analyse GPC)

UV

X-b-Y

X-g-Y

Ultraviolet

Copolymère à bloc

Copolymère greffé (X: Squelette; Y: Chaîne latérale)

Listes des figures

Figure 1 Les différents types de thérapies anticancéreuses.....	21
Figure 2 Structures de copolymères greffés, nano transporteurs et libération d'agents anticancéreux.....	23
Figure 3 : Exemples d'actions des agents anticancéreux.....	28
Figure 4 Illustration de l'effet de l'incorporation d'un principe actif sur sa concentration plasmique au cours du temps	31
Figure 5 Représentation de la dégradation de microparticules de PLGA ou PLA.....	32
Figure 6 Les différents systèmes de libération de principes actifs reportés a. micelle polymère ¹⁵ , b. nanoparticule polymère ¹¹ , c. Hydrogel, d. liposome ¹⁷ , e. nanoparticule métallique (Fe ₃ O ₄) mésoporeuse ¹² , f. nanoparticule de silice mésoporeuse ¹³	34
Figure 7 Illustration de l'opsonisation et de la phagocytose de nano-transporteurs.....	36
Figure 8 Apport de la furtivité face à l'opsonisation d'un nano-transporteur.....	37
Figure 9. Effet EPR a. Les transporteurs atteignent les tumeurs via les défauts de vascularisation des tumeurs. b. Selon sa taille, les nano-objets s'accumulent dans les tissus tumoraux, contrairement aux anticancéreux de faible masse molaire (adapté de Biswas et al. ²⁸).....	38
Figure 10. Ciblage actif de tissus tumoraux via les récepteurs surexprimés a) par les cellules tumorales, b) par les cellules endothéliales des vascularisations tumorales (adapté de Biswas et al. ²⁸).....	39
Figure 11 Les trois structures de copolymères à blocs à base de polyester et de PEG et les morphologies des micelles issues de ces copolymères	42
Figure 12 Structures copolymère bloc et copolymère greffé à base de PEG et de polyester...	44
Figure 13 Amination de PCL iodée, adapté de El Habnoui et al. ⁵³	46
Figure 14 Synthèse de PCL-g-PEG (Coumes et al. ⁵⁴)	46
Figure 15 Les deux voies de fonctionnalisation chimique de polyester	47
Figure 16 Principe de la voie anionique (Ponsart et al. ⁵⁵).....	47
Figure 17 Synthèse de PCL-g-PEG (adapté de Ponsart et al. ⁵⁹)	49
Figure 18 Synthèse de copolymère PCL-g-poly(L-lysine) ⁶⁰	50
Figure 19 Synthèses de PCL-g-PQDMAEMA, PCL-g-PQ4VP et PCL-g-(P4VP ; PEG) ^{56,57} 50	
Figure 20 Synthèse de PCL-g-PEG par thiol-yne (Al Samad et al. ^{63,64}).....	51
Figure 21 Synthèse d'un copolymère bloc PCL-b-PEG-folate (Yang et al. ⁶⁶)	53
Figure 22 Synthèse d'un copolymère bloc DOX-PLA-b-PEG-folate (Hami et al. ⁶⁷).....	54

Figure 23 Les différentes structures copolymères polyester - polysaccharide et leurs voies de synthèse	56
Figure 24 Structure chimique du chitosane (à gauche) et du dextrane (à droite).....	57
Figure 25 Préparation de structure dextrane-b-polyester	57
Figure 26 Synthèse de Dextrane-b-PLA par CuAAC (a) Synthèse de PLA azoturé, (b) Synthèse de Dextrane propargylé, (c) Couplage par CuAAC (Zhao et al. ⁷⁵).....	58
Figure 27 Synthèse d'un copolymère Dextrane-b-PCL par double amination réductrice (Li et al. ⁸⁰).....	59
Figure 28 Synthèse de Dextrane-b-PCL, adapté de Sun et al. ³¹	60
Figure 29 Synthèse d'un copolymère Dextrane-b-PCL. (a) Synthèse de PCL par ROP, (b) Amination réductrice à l'extrémité du dextrane (c) Couplage des homopolymères par réaction d'aza-Michaël (Zhang et al. ⁸²)	61
Figure 30 Synthèse de Dextrane-b-PCL par CuAAC (de Zhang et al. ⁸¹)	61
Figure 31 Synthèse de copolymères amphiphiles greffés Dextrane-g-polyester par les méthodes de « grafting from » et « grafting to »	63
Figure 32 Synthèse de Dextrane-g-PLA par CuAAC (Laville et al. ⁸⁴).....	63
Figure 33 Synthèse de DEX(alkylglycéryl)-g-PLA (de Toman et al. ⁸⁵).....	64
Figure 34 Synthèse de Dextrane-g-PCL par couplage CDI (Gref et al. ⁸⁶).....	65
Figure 35 Synthèse de DEX-g-PCL par méthode « grafting from » (ROP) (Burt et al. ⁸⁸).....	66
Figure 36 Synthèse de CHT-g-PLLA par ROP (Feng et Dong ⁹⁰).....	67
Figure 37 Synthèse de Chitosane-g-PLA dans de l'AmimCl (Ge et al. ⁹¹).....	67
Figure 38 Synthèse de Chitosane-g-PLA par couplage NHS (Li et al. ⁹² , Di Martino et al. ⁹³)	68
Figure 39 Synthèse de CHT-g-PCL dans de l'acide méthanesulfonique (Duan et al. ⁹⁶).....	70
Figure 40 Synthèse de Chitosane-g-PCL par ROP dans de l'EMIMAc (Wang et al. ⁹⁸)	71
Figure 41 Synthèse de Chitosane (Triméthyl)-g-PCL (Zhang et al. ⁹⁹)	71
Figure 42 Synthèse de CHT-PCL par couplage avec du NHS.....	72
Figure 43 Synthèse de CHT-g-PCL par couplage amine-isocyanate (de Zhang et Cao ¹⁰¹).....	72
Figure 44 Synthèse de CHT-g-PCL (Yu et al. ¹⁰²) par « grafting to »	73
Figure 45 Synthèse de Chitosane-g-(PCL,PEG) par CuAAC (Yuan et al. ¹⁰³).....	73
Figure 46 Synthèse de copolymère PCL-g-Chitosane, (Guerry et al. ³²).....	75
Figure 47 Action catalytique de l'aniline au cours de l'amination réductrice du chitosane (à gauche) Propargylation en extrémité de chaîne du chitosane (à droite) (Guerry et al. ⁸³)	75
Figure 48 Equilibre aldéhyde – hémi-acétal en extrémité de chaînes du dextrane	80

Figure 49 Synthèse d'un copolymère PCL-g-Dextrane, formation de nano-transporteurs chargés en agents anticancéreux et internalisation cellulaire de ces nano-systèmes	81
Figure 50 Réaction d'autocondensation intramoléculaire provoquant le clivage d'une chaîne polyester au cours d'une activation anionique (Ponsart et al. ¹¹⁰).....	82
Figure 51 Synthèse de PCL propargylée par voie anionique	82
Figure 52 RMN- ¹ H de la PCL propargylée PCL _{yne} 0,0817000 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	83
Figure 53 Fonctionnalisation du dextrane en extrémités de chaînes.....	84
Figure 54 Synthèse du copolymère PCL-g-dextrane par chimie clic CuAAC	86
Figure 55 Analyses IR-TF de DEX-N ₃ ⁶⁰⁰⁰ , PCL _{yne} 0,0817000et du copolymère PCL-g-DEX2,04100.....	87
Figure 56 Analyse RMN- ¹ H (DMSOd ₆ , 300 MHz) du copolymère PCL-g-DEX2,04100	88
Figure 57 Analyses GPC (DMF) de DEX-N ₃ ⁶⁰⁰⁰ , PCL _{yne} 0,0817000et du copolymère PCL-g-DEX2,04100.....	90
Figure 58 RMN DOSY (DMSOd ₆) du copolymère PCL-g-DEX2,04100.....	91
Figure 59 Superposition des RMN DOSY (DMSOd ₆) du DEX-N ₃ ⁶⁰⁰⁰ , de la PCL _{yne} 0,0817000 et du copolymère PCL-g-DEX2,04100	91
Figure 60 Synthèse d'un copolymère fluorescent PCL-g-DEX(FITC)	92
Figure 61 Analyse par GPC aqueuse avec double détection RI et UV (λ=450 nm) du copolymère PCL-g-DEX(FITC)	93
Figure 62 Principe de la nanoprécipitation de copolymère amphiphile.....	94
Figure 63 Détermination de la CAC des nano-objets N-O(PCL-g-DEX6,84000) par spectrométrie de fluorescence	95
Figure 64 Analyse DLS de nano-objets N-O(PCL-g-DEX2,04100)	96
Figure 65 Structure chimique de la doxorubicine forme chlorhydrate (DOX).....	97
Figure 66 Cinétique de libération de la DOX chargée dans les micelles et de DOX libre en milieu physiologique (pH 7,4, 37°C)	99
Figure 67 Cinétique de libération de la DOX chargée dans les micelles en fonction du pH (37°C)	99
Figure 68 Tests de cytotoxicité sur la DOX libre, sur des micelles vides N-O(PCL-g-DEX2,04100) et sur des micelles chargées en DOX N-O(PCL-g-DEX2,04100)-DOX _{0,3} (DL = 5,1%) avec (A) des cellules HCT-116 de cancer du côlon (B) des cellules saines fibroblastes (CCD-45SK).....	101

Figure 69 Internalisation cellulaire de micelles fluorescentes (micelles-FITC) par (A) des cellules de cancer du côlon (HCT-116) (B) des cellules saines fibroblastes (CCD-45SK)...	103
Figure 70 Quantification de l'internalisation de micelles-FITC par des cellules cancéreuses colorectales (HCT-116) et des cellules saines fibroblastes (CCD-45SK) par cytométrie en flux	104
Figure 71 Voies de synthèse de copolymères PCL-g-CHT et formation de nano-objets	109
Figure 72 Dépolymérisation du chitosane par la méthode aux micro-ondes	110
Figure 73 Caractérisations d'un lot d'oligo-chitosane CHT0,852800 (a) RMN ¹ H (D ₂ O, 300MHz) (b) GPC (tampon acétate pH 4,5)	111
Figure 74 Mannosylation du copolymère PCL-g-CHT.....	112
Figure 75 Mannosylation d'oligo-chitosanes.....	113
Figure 76 Analyses d'oligo-chitosanes mannosylés (a) RMN ¹ H (D ₂ O, 300MHz) (b) GPC	113
Figure 77 Synthèse du 3-azidopropanal	115
Figure 78 Caractérisations du 3-azidopropanal (a) IR-TF (b) RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300MHz) (c) RMN COSY (CDCl ₃ , 300MHz).....	116
Figure 79 Structure des chitosanes N-azoturés synthétisés par amination réductrice.....	117
Figure 80 Synthèse de chitosane azoturé par amination réductrice en milieu aqueux.....	117
Figure 81 Caractérisations des chitosanes N-azoturés synthétisés en milieu aqueux	118
Figure 82 Synthèse de chitosanes azoturés en milieu hydroalcoolique	120
Figure 83 Caractérisations des différents lots de chitosane N-azoturés purifiés par double précipitation (a) RMN ¹ H (D ₂ O, 300MHz) (b) GPC _{aq}	122
Figure 84 Différentes voies de thiolation de chitosane reportées dans la littérature.....	123
Figure 85 Synthèse du 3-oxopropylthioacétate	124
Figure 86 Caractérisations du 3-OPT (a) IR-TF (b) RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) (c) RMN COSY (CDCl ₃ , 300 MHz).....	126
Figure 87 Synthèse du chitosane N-thioacétylé	127
Figure 88 Structure du chitosane N-thioacétylé.....	127
Figure 89 Analyses de chitosanes N-thioacétylés obtenus avec 0,5 et 1 équivalent de 3-OPT (a) IR-TF (b) GPC _{aq} (c) RMN ¹ H (D ₂ O; 300MHz) (d) RMN COSY de CHT-SAc0,341000(D ₂ O, 300MHz)	128
Figure 90 Analyses de chitosane thioacétylés obtenus avec 0,1 et 0,25 équivalent de 3-OPT (a) IR-TF (b) RMN ¹ H (D ₂ O; 300MHz) (c) GPC _{aq}	130
Figure 91 Synthèse de PCL-g-CHT par CuAAC	131

Figure 92 IR-TF des copolymères PCL-g-CHT insolubles, comparaison avec les CHT-N ₃ correspondants.....	132
Figure 93 Réticulations lors du couplage par CuAAC.....	132
Figure 94 Structures théoriques obtenues par CuAAC entre une PCL _{yne} et un CHT-N ₃ (a) réaction avec un excès d'azoture (b) réaction avec un excès d'alcyne	133
Figure 95 RMN-1H d'un copolymère PCL-g-CHT (DMSOd ₆ , 300MHz)	134
Figure 96 Caractérisations des copolymères PCL-g-CHT préparés à partir de CHT-N ₃ avec différents DS(N ₃) (a) RMN ¹ H (DMSOd ₆ , 300MHz)(b) IR-TF (c) GPC _{aq}	135
Figure 97 Caractérisations des copolymères PCL-g-CHT préparés à partir de différents équivalents N ₃ /C≡CH (a) RMN ¹ H (DMSOd ₆ , 300MHz)(b) infrarouge (c) GPC _{aq}	139
Figure 98 Hydrolyse basique du chitosane thioacétylé.....	141
Figure 99 Superposition en RMN ¹ H du chitosane N-thioacétylé avant et après 6h de déprotection (D ₂ O, 300MHz).....	142
Figure 100 Déprotection des thioesters et couplage thiol-yne « one pot » entre le chitosane thiolé et la PCL _{yne} (Naph).....	142
Figure 101 Aspect du milieu réactionnel suite au couplage thiol-yne après centrifugation ..	143
Figure 102 Analyse du premier lot de copolymères PCL-g-CHT synthétisé par thiol-yne ...	144
Figure 103 Caractérisations des lots de PCL-g-CHT synthétisés par thiol-yne et dialysés ...	146
Figure 104 Analyses DLS des nano-objets à base de copolymère PCL-g-CHT.....	147
Figure 105 Calibration UV de DOX.HCl dans un mélange DMSO/H ₂ O (4/1, v/v)	185
Figure 106 Calibration UV de DOX.HCl dans du PBS (pH7,4).....	186
Figure 107 Calibration UV de DOX.HCl dans du PBS (pH5,8).....	186

Liste des tableaux

Tableau 1 Propriétés pharmacocinétiques de 4 anticancéreux (Source : Drugbank.ca)	29
Tableau 2 Structures du PLA et de la PCL	40
Tableau 3 Etude in vivo de nanoparticules à base de PLA et PEG, adapté de Shan et al. ⁴⁶	43
Tableau 4 Les structures Polyester - PEG	44
Tableau 5 Exemples de fonctionnalisation de lactones pour la synthèse de polyesters modifiés	45
Tableau 6 Exemples de fonctionnalisation de PCL	48
Tableau 7 Exemples de formation de copolymères par réaction sur une PCL anionique.....	49
Tableau 8 Les synthèses de copolymère PCL-g-PEG par voie anionique et chimie « clic » ..	51
Tableau 9 Incorporation d'anticancéreux dans des micelles de copolymère PCL-g-PEG ⁶⁴	52
Tableau 10 polyester-PEG avec ligands de reconnaissance de récepteurs biologiques.....	52
Tableau 11 Nano-transporteurs à base de DEX-b-PCL et leurs méthodes de synthèse.....	59
Tableau 12 Systèmes de libération à base de copolymère DEX-g-PCL	64
Tableau 13 Les différents paramètres de synthèse d'un copolymère de CHT-g-PLA par ROP	68
Tableau 14 Les nano-vecteurs à base de CHT-g-PLA	69
Tableau 15 Les systèmes de délivrance d'anticancéreux à base de CHT-g-PCL	74
Tableau 16 Propriétés de PCL-g-CHT et des micelles préparées à partir de ce dernier (Guerry et al. ³²)	76
Tableau 17 Caractéristiques des lots de PCL _{yne}	83
Tableau 18 GPC dans le tampon acétate pH 4,5 des lots de dextrane azoturé.....	85
Tableau 19 Caractéristiques des différents copolymères PCL-g-Dextrane.....	89
Tableau 20 Masse molaire (Mn) et dispersité (Đ) (GPC DMF) des copolymères PCL-g-DEX et de leurs homopolymères DEX-N3 et PCL _{yne} correspondants	90
Tableau 21 Analyses DLS des différents lots de nano-objets	96
Tableau 22 Caractéristiques physico-chimiques des micelles chargées en doxorubicine	98
Tableau 23 Les différents lots d'oligo-chitosanes synthétisés	111
Tableau 24 Degrés de substitution en azoture (DS(N ₃)) et masses molaires des oligo-chitosanes azoturés synthétisés en milieu aqueux	119
Tableau 25 Degrés de substitution en azoture (DS(N ₃)) et masses molaires des oligo-chitosanes azoturés synthétisés en milieu hydroalcoolique.	121

Tableau 26 Synthèses de chitosanes N-azoturés par amination réductrice purifiés par double précipitation au méthanol	122
Tableau 27 Différents chitosanes N-thiolés reportées dans la littérature	125
Tableau 28 Propriétés des chitosanes N-thioacétylés obtenus avec 0,5 et 1 équivalent de 3-OPT	128
Tableau 29 Propriétés des chitosanes N-thioacétylés obtenus avec 0,1 et 0,25 équivalent de 3-OPT	129
Tableau 30 Paramètres des réactions de CuAAC donnant des composés insolubles	131
Tableau 31 Propriétés des copolymères en fonction du DS(N ₃) des chitosanes N-azoturés .	134
Tableau 32 Comparaison des BHL théoriques et des BHL mesurées par RMN à partir de mélanges de PCL _{yne} et de chitosane-N ₃	136
Tableau 33 BHL réelles des lots de copolymères PCL-g-CHT	136
Tableau 34 Propriétés des copolymères en fonction du nombre d'équivalents N ₃ /C≡CH	138
Tableau 35 Essais d'élimination du cuivre lors de la purification des copolymères	140
Tableau 36 Propriétés des lots de PCL-g-CHT préparés par thiol-yne, après dialyse	145

Introduction générale

Il y a deux milliards d'années, l'évolution a produit des systèmes biologiques constitués de plusieurs cellules¹. Ces ensembles cellulaires se sont développés, formant par la suite les organismes pluricellulaires, dont les humains font partie. La pérennité de ces organismes est assurée par la cohésion entre les cellules les composant. Mais il arrive qu'une ou plusieurs de ces cellules dégèrent et adoptent un comportement anarchique, notamment en se multipliant de manière incontrôlée et formant ainsi un amas de cellules dites cancéreuses ou tumorales. Cet amas cellulaire est appelé cancer.

Les pathologies cancéreuses sont donc très anciennes, mais l'accroissement de l'espérance de vie des humains depuis le XX^{ème} siècle a augmenté le nombre de malades car le vieillissement d'un organisme a tendance à favoriser l'apparition de cellules cancéreuses. Le cancer représente donc un enjeu majeur pour la médecine actuelle car cette maladie est la première cause de mortalité en France : en 2018, il y a eu 157 400 décès dus à cette pathologie, ce qui explique la nécessité de développer de nouveaux traitements anticancéreux.

De nombreuses thérapies ont été développées depuis plusieurs années, chacune d'entre elles visant à éliminer les cellules cancéreuses de l'organisme. La chirurgie ablative du tissu cancéreux est une des méthodes les plus utilisées. Cependant, cette méthode a ses limites : toutes les cellules cancéreuses ne sont pas retirées de l'organisme suite à l'ablation de la tumeur. De plus, dans certains cas le patient ne peut pas être opéré. Par conséquent, des thérapies anticancéreuses alternatives à la chirurgie ont été développées (Figure 1). Ces thérapies sont :

- La chimiothérapie, qui vise à administrer un composé toxique qui, une fois rentré dans une cellule tumorale, va entraîner la mort de cette dernière².
- L'immunothérapie, dont le but est de stimuler le système immunitaire afin de rendre ce dernier capable de reconnaître les cellules tumorales et de procéder à leur élimination³.
- L'hormonothérapie, qui consiste à inhiber la croissance de cellules tumorales sensibles aux stimuli hormonaux⁴. En traitant ces cellules avec des molécules inhibitrices des récepteurs hormonaux, la croissance tumorale peut être stoppée.
- La radiothérapie, qui vise à irradier les cellules tumorales avec des rayons ionisants⁵. Ces rayons vont provoquer des dommages sur l'ADN du noyau cellulaire, entraînant à terme la mort de la cellule tumorale.

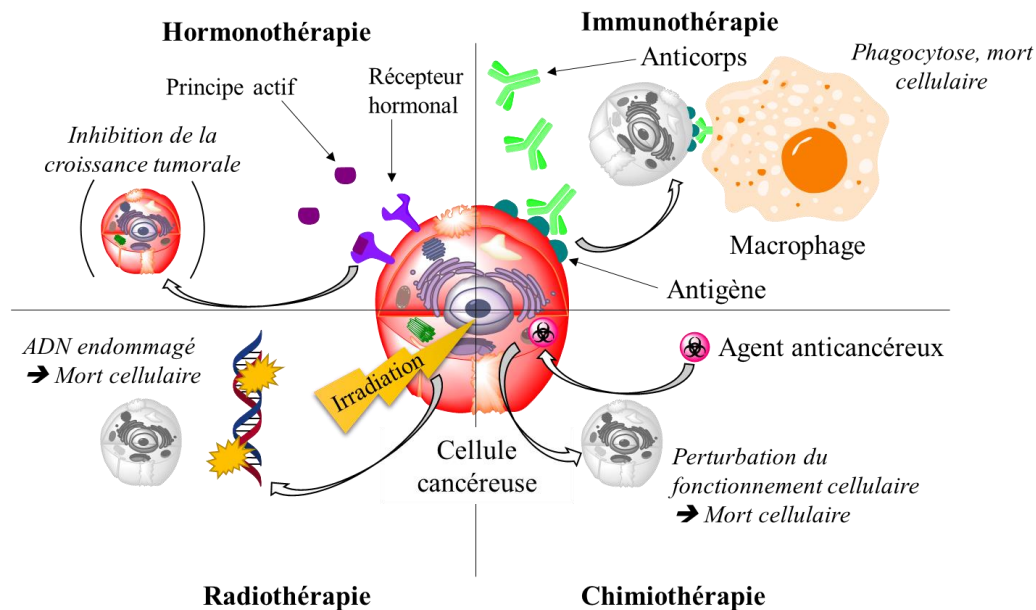


Figure 1 Les différents types de thérapies anticancéreuses

Tous ces traitements ont connu de nombreuses évolutions au cours des dernières décennies. Cette thèse se focalisera sur la chimiothérapie qui est la méthode la plus employée aujourd'hui. L'avantage de la chimiothérapie est que les agents anticancéreux sont capables d'éliminer un large panel de cellules cancéreuses, contrairement à l'hormonothérapie et à l'immunothérapie qui sont spécifiques de certaines tumeurs. Cependant une limitation majeure de la chimiothérapie vient de l'absence de spécificité des agents anticancéreux. Ceux-ci sont aussi très toxiques pour les cellules saines et entraînent des effets secondaires indésirables chez le patient. De plus, les composés anticancéreux peuvent être rapidement métabolisés après injection dans la circulation sanguine, ce qui entraîne une faible biodisponibilité (proportion de composé non métabolisé dans la circulation sanguine).

Actuellement, les enjeux majeurs des recherches en chimiothérapie sont i) d'augmenter la biodisponibilité des principes actifs, ii) d'empêcher leur élimination de l'organisme avant qu'ils n'agissent sur les cellules tumorales et iii) d'accroître la sélectivité de ces composés envers leurs cibles, les cellules cancéreuses.

Un moyen d'obtenir ces critères est d'incorporer un agent anticancéreux dans une matrice nanométrique injectable par voie intraveineuse qui puisse par la suite délivrer le principe actif

dans les tissus tumoraux. Ces nano-transporteurs sont appelés systèmes de délivrance de principes actifs.

Depuis les années 2000, les recherches sur les systèmes de délivrance visent à développer des nano-transporteurs capables de différencier les cellules cancéreuses des cellules saines afin d'augmenter la sélectivité de l'agent anticancéreux vis-à-vis des cellules cancéreuses⁶. Un grand nombre de systèmes de délivrance ont été développés dans ce but, notamment en incorporant des motifs de reconnaissance spécifiques aux récepteurs biologiques surexprimés par les cellules tumorales. Les nano-transporteurs possédant des propriétés de ciblage actif grâce aux motifs de reconnaissance spécifiques sont qualifiés de nano-vecteurs.

Cette thèse porte sur des systèmes de vectorisation à base de polymères. En effet, les polymères permettent de générer un grand nombre de systèmes en fonction de leur nature et de l'architecture de leur architecture. De nombreux polymères sont biocompatibles (c'est-à-dire qu'ils ne provoquent pas d'effet néfaste dans l'organisme) et ont été exploités pour préparer des systèmes de délivrance. On peut citer en particulier :

- Les polyesters aliphatiques, composés **hydrophobes** qui peuvent former des matrices très efficaces pour encapsuler et libérer une molécule hydrophobe comme le sont la plupart des agents anticancéreux. Ces polymères sont par ailleurs biodégradables : les fonctions esters de ces polymères seront hydrolysées pour générer des composés de plus petite taille et inertes pour les organismes ou l'environnement.

- Les polysaccharides sont un autre exemple de composés utilisés pour former des nano-transporteurs car ces systèmes sont dits « furtifs » : ils ne sont pas détectés par les systèmes de défense de l'organisme. Par ailleurs, la nature **hydrophile** de ces composés va permettre de faciliter la solubilisation des nano-transporteurs dans les milieux aqueux comme les fluides biologiques. De plus les fonctions chimiques présentes le long des chaînes des polysaccharides permettent de coupler par un lien covalent des molécules apportant de nouvelles propriétés aux systèmes de délivrance à base de ces polymères.

Les copolymères étudiés dans ces travaux sont des copolymères amphiphiles de polyester et de polysaccharide. Parmi les structures copolymères amphiphiles existantes, deux sont majoritairement décrites pour le transport de principes actifs : les copolymères à blocs et les copolymères greffés. Les propriétés de solubilité (hydrophilie/lipophilie) des copolymères à blocs peuvent être modulées seulement grâce à la longueur des chaînes de polymères,

contrairement aux copolymères greffés dont les propriétés de solubilité peuvent être modulées non seulement par la longueur des chaînes de polymères mais aussi par le taux de greffage des chaînes latérales sur le squelette de la structure. Dans le cas des copolymères greffés polyester-polysaccharide on trouve essentiellement des composés avec un squelette hydrophile (polysaccharide) et des chaînes latérales hydrophobes (polyester) (structure « classique »). L'originalité des travaux de recherche présentés ici vient de la structure des copolymères synthétisés : structure dite « inverse » avec un squelette polyester et des chaînes latérales de polysaccharide. Ces structures sont actuellement peu décrites et pourraient servir à la formation de nano-transporteurs possédant des propriétés physico-chimiques et biologiques originales pour la délivrance d'agents anticancéreux (Figure 2). Les fonctions chimiques des chaînes de polysaccharide permettent de coupler des molécules fonctionnelles comme un fluorophore ou un agent de vectorisation sur le copolymère.

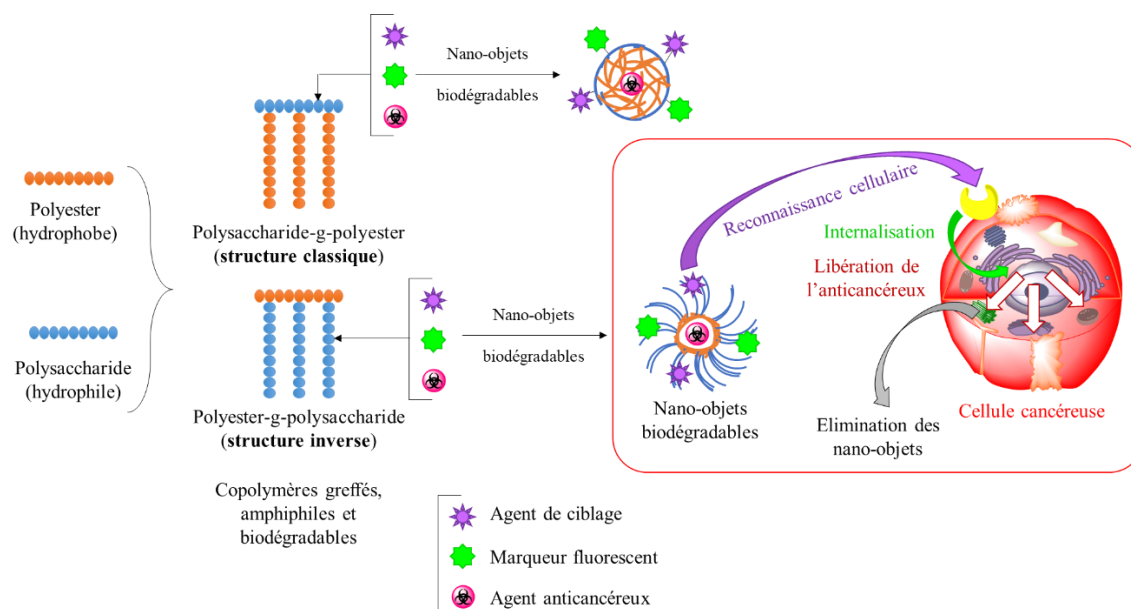


Figure 2 Structures de copolymères greffés, nano transporteurs et libération d'agents anticancéreux

Au cours de cette thèse, nous étudierons la poly (ϵ -caprolactone) comme polyester et deux polysaccharides, le dextrane et le chitosane pour des raisons qui seront précisées ultérieurement.

Cette thèse comporte trois chapitres :

- Le premier chapitre est une étude bibliographique portant sur les propriétés des composés anticancéreux les plus utilisés, leurs limitations et ce qu'apportent les systèmes de transports de principes actifs à base de copolymères amphiphiles, notamment ceux à base de polyesters et de polysaccharides.

- Le second chapitre porte sur la synthèse d'un copolymère greffé poly(ϵ -caprolactone)-*g*-Dextrane (PCL-*g*-DEX), sur la formation de nano-objets chargés en agent anticancéreux et sur les propriétés physico-chimiques et biologiques de ces nano-systèmes pour le transport et la délivrance intracellulaire de l'agent anti-cancéreux.

- Le troisième chapitre traite de la synthèse d'une autre structure copolymère greffé, le poly(ϵ -caprolactone)-*g*-Chitosane (PCL-*g*-CHT), et sur la formation de nano-objets à partir de ce copolymère.

Chapitre 1
Etude bibliographique

1. Les systèmes d'incorporation de principes actifs pour les traitements anticancéreux

1.1. Modes d'action des composés anticancéreux

Le cancer est une pathologie provoquée par les mutations de certaines cellules de l'organisme. Les causes de ces modifications peuvent être d'origine génétique et/ou environnementale. Les cancers sont distingués en fonction du type d'organe où se trouvent les cellules cancéreuses: cancer colorectal, cancer du sein, cancer du poumon... Cependant certains comportements sont communs à l'ensemble des cellules cancéreuses :

-L'insensibilité aux signaux biologiques régulant la multiplication cellulaire, couplée à une prolifération incontrôlée.

-La capacité à être indétectable par le système immunitaire.

-L'absence d'apoptose (phénomène de mort cellulaire naturelle).

Quand elles sont suffisamment développées, les cellules cancéreuses sont capables de provoquer l'angiogenèse, c'est-à-dire la vascularisation des tissus tumoraux. Par conséquent, dans le cadre d'une pathologie cancéreuse, le but d'un traitement par chimiothérapie est de stopper la prolifération des cellules cancéreuses et d'éliminer la totalité de ces dernières de l'organisme. Il existe une grande variété de principes actifs anticancéreux qui vont agir de différentes manières. Quelques exemples sont décrits ci-dessous (Figure 3)

-Les agents anti métabolites (exemple : le 5-fluoro-uracile) dont le but est de perturber le métabolisme des cellules tumorales.

-Les agents alkylants (exemple : le Cis platine), agissant sur l'ADN en y introduisant des groupements alkyle qui empêchent la lecture de l'information génétique de la cellule et bloquent ainsi sa croissance.

-Les agents intercalants (exemple : doxorubicine), ont pour but de s'intercaler entre les deux brins de la double hélice d'ADN rendant l'information génétique contenue dans l'ADN « intercalé » illisible par les ARN polymérase.

-D'autres principes actifs agissent directement sur la mitose des cellules anticancéreuses, perturbant ainsi leur prolifération (exemple : Le paclitaxel qui perturbe le fuseau mitotique, empêchant ainsi la mitose de la cellule cancéreuse).

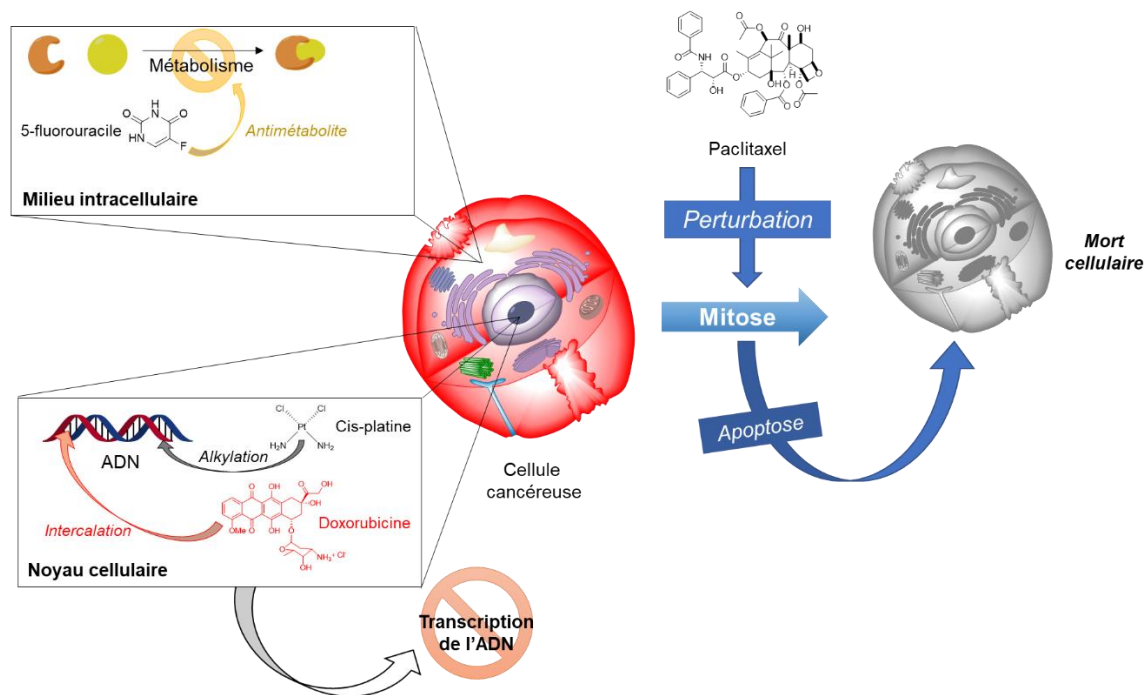


Figure 3 : Exemples d'actions des agents anticancéreux

Il existe donc un grand nombre de principes actifs ayant des actions diverses et qui peuvent être utilisés pour détruire les cellules cancéreuses. Cependant ces cellules sont très similaires aux cellules saines de l'organisme. De ce fait, il est difficile d'obtenir une bonne sélectivité sur les cellules tumorales, les anticancéreux détruisent également les cellules saines. Cela se traduit par les effets secondaires indésirables des chimiothérapies anticancéreuses, comme les risques de cardiomyopathie avec la doxorubicine.

Par conséquent le but actuel de la recherche sur le cancer est de développer des thérapies qui vont être les plus sélectives possibles vis-à-vis des cellules cancéreuses.

1.2. Propriétés pharmacocinétiques des principes actifs anticancéreux

Les propriétés pharmacocinétiques des principes actifs vont dépendre de leurs caractéristiques physico-chimiques. Ces dernières vont influencer le devenir des composé dans l'organisme. Il existe une très grande diversité de composés anticancéreux, dont les propriétés pharmacocinétiques sont présentées dans le Tableau 1 qui illustre aussi les propriétés et les limitations actuelles des anticancéreux.

- Le volume de distribution correspond au rapport entre la quantité totale d'un principe actif contenu dans un organisme sur la concentration plasmatique de ce composé. Cette valeur

donne une indication sur les propriétés de distribution du composé dans l'organisme. Un volume bas indique que le principe actif aura tendance à rester dans la circulation sanguine et sera faiblement absorbé dans les tissus. A l'inverse un volume plus élevé traduit une grande absorption du principe actif dans les tissus, cela peut également signifier que le composé est davantage métabolisé.

- Le temps de demi-vie, dans le cadre médical, est une valeur indiquant le temps après l'injection d'un principe actif pour que la concentration de ce composé dans le plasma sanguin soit divisée par deux.

- La clairance est le volume de plasma théorique nécessaire pour éliminer un principe actif dans un tissu biologique par unité de temps. Cette valeur de clairance indique donc la capacité d'un tissu biologique à éliminer un composé d'un volume de fluide biologique au cours du temps : plus la clairance est élevée, plus le principe actif sera éliminé rapidement.

- La dose létale médiane est la quantité de principe actif pour laquelle 50% d'une population donnée (cellule ou organisme) meurt. Plus cette dose est faible, plus le composé est toxique.

	V distribution L/m ²	Temps de demi-vie	Clairance mL/min/m ²	Dose létale médiane (DL ₅₀) µg/kg	Part liée aux protéines	Voie d'élimination
Doxorubicine	809 - 1214	20-46h	324-809	21 800	74-76% (protéines plasmiques)	Majoritairement hépatique, et rénale
Paclitaxel	227-688	52,7h	7 000-23 800	32 530	89-98% (protéines plasmiques)	Hépatique
Cis platine	11-12	20-30 min	15 000-16 000	Non indiqué	90% (Albumine, transferrine, γ globuline)	Majoritairement rénale, et hépatique
5-fluoro-uracile	Non indiqué	10-20 min	Non indiqué	230 000	8-12%	Majoritairement hépatique, et rénale

Tableau 1 Propriétés pharmacocinétiques de 4 anticancéreux (Source : Drugbank.ca)

Il est à noter que les valeurs présentées dans ce tableau portent sur des composés anticancéreux administrés par voie parentérale. Cependant, il existe d'autres méthodes d'administration

comme la voie orale. En fonction de la voie d'administration employée, les paramètres pharmacocinétiques changeront.

Le montre que les principes actifs anticancéreux utilisés actuellement ont des propriétés pharmacologiques différentes.

- La doxorubicine et le paclitaxel ont de hauts volumes de distribution à l'inverse du cis platine qui, par conséquent, restera plus longtemps dans la circulation sanguine.

- Le temps de demi-vie des anticancéreux va de quelques minutes (cis platine et 5-fluorouracile) à plusieurs heures (doxorubicine et paclitaxel). Ces valeurs montrent que certains anticancéreux sont très rapidement éliminés de l'organisme. Par conséquent, une faible part de ces composés atteindra les tissus cancéreux, la majorité étant rapidement éliminée de l'organisme.

- La clairance montre que les anticancéreux seront éliminés plus ou moins rapidement de l'organisme, que ce soit par voie métabolique ou rénale. Le fait que certaines protéines se lient à ces composés montre que l'organisme est capable de traiter ces composés dès qu'ils se trouvent dans la circulation sanguine.

- La toxicité des anticancéreux (cf. DL_{50}) empêche d'injecter de grandes quantités de principe actif qui permettraient d'augmenter la part de composé qui agira effectivement sur les cellules cancéreuses.

2. Les systèmes de délivrance de principe actif

Il est nécessaire de développer un moyen de pallier les inconvénients des chimiothérapies anticancéreuses. Il consiste à utiliser un agent anticancéreux incorporé dans un système de transport et de délivrance de principe actif. Le but des systèmes de délivrance est de permettre la solubilisation du composé anticancéreux dans la circulation sanguine afin d'assurer l'acheminement de cet agent jusqu'à la zone tumorale, ainsi que sa libération une fois les cellules cancéreuses atteintes. De ce fait, les systèmes de délivrance d'agents anticancéreux modifient le devenir de ces composés une fois dans l'organisme :

- D'une part, ils protègent les tissus sains vis-à-vis de la toxicité du principe actif incorporé.

- D'autre part, ils empêchent la métabolisation prématurée du principe actif par les systèmes de défense de l'organisme.

- Enfin, en délivrant le principe actif uniquement sur la zone ciblée de l'organisme, l'action du composé est augmentée et ses effets secondaires sont limités.

2.1. La taille des systèmes de délivrance

La taille des systèmes de délivrance est un paramètre important. En effet, selon cette taille, le mode de fonctionnement des systèmes de délivrance sera différent.

Les systèmes de délivrance massifs (implants) ou de l'ordre du micromètre (microparticules injectables par voie intramusculaire ou sous cutanée) constituent une matrice qui va libérer les principes actifs par diffusion. Les avantages de ces systèmes sont la protection du principe actif tant qu'il est contenu dans la matrice et une délivrance prolongée de ce principe actif en fonction de la vitesse de diffusion. Ceci évite d'avoir une concentration plasmatique en principe actif trop élevée (au risque d'atteindre des doses toxiques) juste après l'injection comme une métabolisation trop rapide du composé au bout d'un certain temps. Cela est illustré dans la Figure 4 ci-dessous.

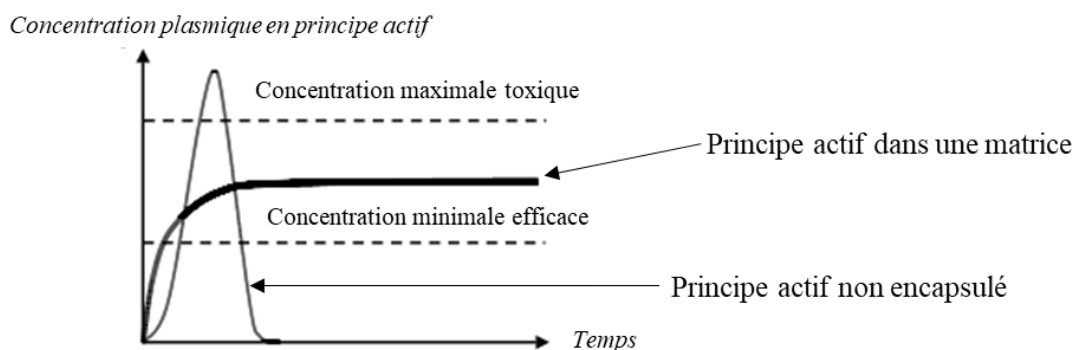


Figure 4 Illustration de l'effet de l'incorporation d'un principe actif sur sa concentration plasmatique au cours du temps

Un exemple de système à base de microparticules de PLGA et de PLA assurant la libération d'acétate de leuprorelina a été étudié par Okada⁷. Dans cette étude, des microparticules de PLA et de PLGA ont été testées en tant que système de délivrance sur un temps prolongé (3 mois maximum). Les polyesters PLA et PLGA constituent des matériaux biocompatibles et biodégradables de choix pour constituer des systèmes de délivrance. L'optimisation de la préparation des systèmes montre que ces derniers peuvent assurer une libération constante de leuprorelina sur 3 mois, ce qui n'est pas possible dans le cas d'injection du principe actif non-

encapsulé. Les produits de dégradation ultime des microparticules de PLA et PLGA sont l'acide lactique et l'acide glycolique, qui sont des composés non-toxiques (Figure 5),

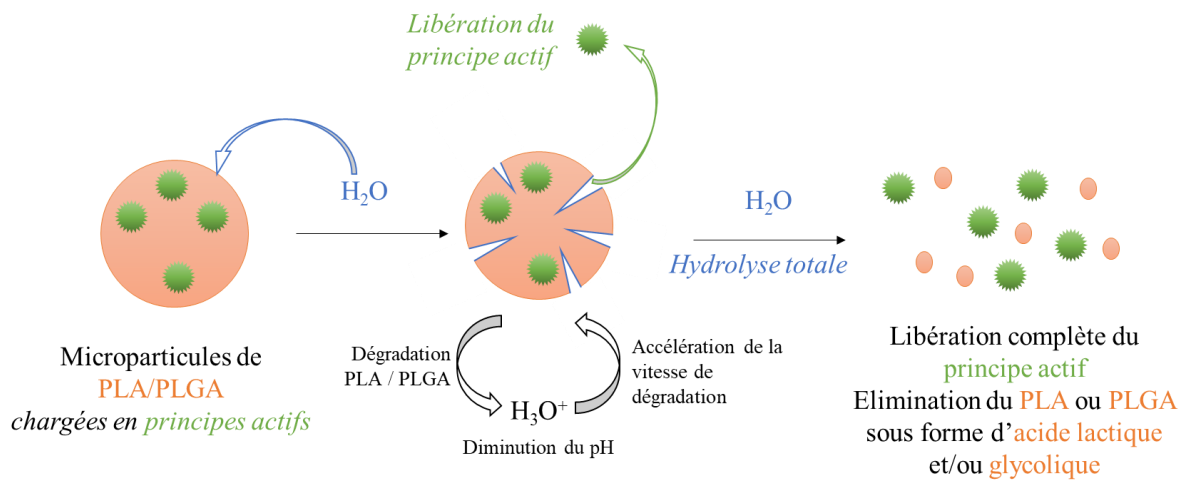


Figure 5 Représentation de la dégradation de microparticules de PLGA ou PLA

Cependant, la dégradation des microparticules de PLA et PLGA augmente l'acidité dans les tissus proches de ces systèmes. Cela peut poser problème pour la stabilité des principes actifs, notamment quand ces derniers sont des peptides qui peuvent être dégradés par l'acidité du milieu.

Les systèmes de délivrance nanométriques ont été développés pour répondre au besoin de systèmes injectables par voie intraveineuse qui utilisent la circulation sanguine afin de rejoindre le site d'action du principe actif. De nombreux systèmes nanométriques de délivrance ont été étudiés et sont détaillés dans le paragraphe suivant.

2.2. Les différents nano-systèmes de délivrance

Plusieurs systèmes transporteurs d'anticancéreux ont été commercialisés, notamment le Doxil® (doxorubicine) et l'Abraxane® (paclitaxel). Les études suivantes présentent les apports de ces systèmes par rapport à l'usage d'anticancéreux non-encapsulés.

Luo et al.⁸ ont montré que la formulation de doxorubicine dans des liposomes (Doxil® et Myocet®) permet de diminuer la cardiotoxicité de ce principe actif. Cette étude montre également que la distribution de la doxorubicine dans les tissus varie selon le type de liposome utilisé. Par conséquent, il peut être judicieux de développer des systèmes de transport dont les propriétés permettront de cibler différents types de cancer.

Sofias et al.⁹ ont comparé deux formulations commerciales du paclitaxel : le Taxol® et l'Abraxane®. Ces deux formulations (à base notamment d'huile de ricin polyoxyéthylée, et d'éthanol anhydre) permettent de solubiliser le paclitaxel afin de permettre l'accumulation d'une plus grande quantité de principe actif dans les tissus tumoraux. Cependant, cette étude précise que le Cremophor EL® (une huile de ricin PEGylée) contenu dans le Taxol® peut provoquer des réactions d'hyper sensibilité chez le patient. Ce défaut du Taxol® soulève la question de l'usage des produits utilisés pour préparer les systèmes de délivrance et la nécessité de développer des systèmes avec des excipients non-toxiques.

Les limitations de ces deux formulations montrent qu'il reste nécessaire de développer de nouveaux systèmes palliant aux défauts des systèmes de délivrance d'anticancéreux commercialisés. Aussi, depuis quelques années de nombreux systèmes de délivrance d'anticancéreux ont été reportés dans la littérature. Beaucoup de composés différents ont été utilisés pour constituer la matrice des systèmes de délivrance (tensio-actif, polymère, silice, métal, ...). La matrice idéale d'un système de délivrance doit contenir le principe actif pour le libérer ensuite uniquement dans les zones tumorales. Cette matrice devra être hydrosoluble afin de permettre la circulation du système dans l'organisme. Par ailleurs, la matrice devra être biocompatible, c'est-à-dire ne provoquer aucune réaction néfaste de l'organisme. Elle devra également être biodégradable, c'est-à-dire se dégrader en formant des produits de dégradation non toxiques qui seront ensuite éliminés de l'organisme.

Selon la nature de ces composés, différents systèmes ont été préparés (Figure 6) :

-des nanoparticules à base de polymères, de silice ou de métaux¹⁰ dont le principe actif incorporé va diffuser à travers la matrice.

*Des nanoparticules de polymères¹¹ : En effet, les copolymères amphiphiles peuvent également former des nanoparticules de polymère ou des micelles en fonctions de certains paramètres. (Figure 6b)

*Des nanoparticules métalliques. En général ces nanoparticules sont recouvertes d'une couche de composé rendant biocompatible le système (exemple : nanoparticules de Fe₃O₄ recouvertes de chitosane¹²). (Figure 6e : couche de protection en bleu, partie métallique du système en rouge)

*Des nanoparticules de silice mésoporeuse. De manière similaire aux nanoparticules métalliques, elles sont recouvertes d'une couche de composé améliorant les propriétés de ces systèmes en terme de libération de principe actif¹³. (Figure 6f : couche de protection en bleu, partie silice du système en gris)

- des micelles¹⁴ qui sont des systèmes amphiphiles dynamiques qui pourront se modifier en fonction de leur environnement, modifiant ainsi le mode de libération du principe actif. Les micelles à base de polymères¹⁵ sont constituées d'une structure copolymère amphiphile. Sur la Figure 6a la partie hydrophile est en bleu et la partie hydrophobe en orange)

- des liposomes¹⁶ qui contiennent un volume de solution aqueuse. Les liposomes¹⁷ sont des structures généralement sphériques constituées d'une bicouche contenant un volume de phase aqueuse. (Figure 6d, partie aqueuse en bleu, partie hydrophobe en orange).

- des hydrogels¹⁸ qui peuvent servir de système de délivrance de principe actif, mais également de système d'ingénierie tissulaire. Ces structures peuvent être de deux types : soit des hydrogels chimiques qui se forment grâce à des liaisons covalentes soit des hydrogels physiques qui se forment grâce à des liaisons secondaires (liaisons hydrogène ou liaisons hydrophobes) (Figure 6c)

Ces différentes structures sont schématisées dans la Figure 6.

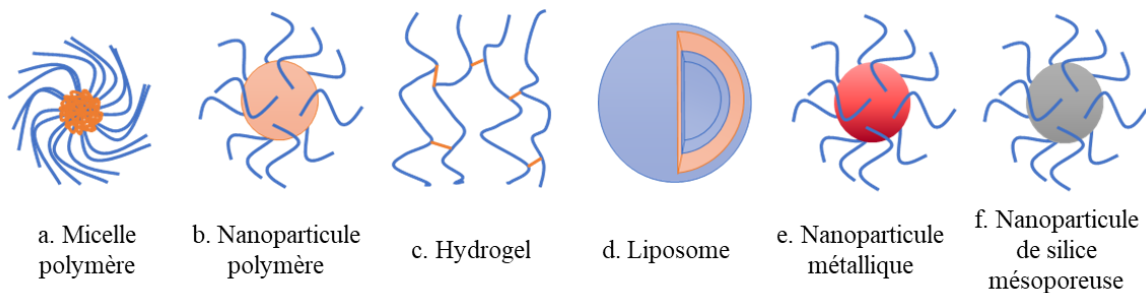


Figure 6 Les différents systèmes de libération de principes actifs reportés a. micelle polymère¹⁵, b. nanoparticule polymère¹¹, c. Hydrogel, d. liposome¹⁷, e. nanoparticule métallique (Fe_3O_4) mésoporeuse¹², f. nanoparticule de silice mésoporeuse¹³

Il existe également des structures à base de nanocapsules lipidiques qui sont capables d'encapsuler divers agents anticancéreux dans leur partie hydrophobe¹⁹.

Dans le cadre de cette thèse, on s'intéressera uniquement aux systèmes de délivrance à base de polymères. En effet certains polymères présentent plusieurs avantages en tant que nano transporteurs :

- Biodégradabilité : les systèmes basés sur ces composés ne provoqueront pas de réaction néfaste de l'organisme et seront dégradés par hydrolyse (exemple : PLA et PLGA décrits précédemment, PCL).
- Furtivité : Ils ne seront pas détectés par les systèmes de défense de l'organisme.
- Facilité d'obtention de structures différentes, comme des copolymères greffés ou à blocs, ce qui permet de moduler les propriétés des systèmes de délivrance basés sur ces polymères.
- A partir des polymères on peut préparer tous les types de nano systèmes, des nanoparticules ou des micelles en fonction de la structure du polymère utilisé et des paramètres de préparation.

Différentes générations de nano-transporteurs sont reportées. Dans le paragraphe suivant les propriétés des différentes générations sont expliquées afin de montrer *in fine* l'intérêt des structures copolymères amphiphiles fonctionnalisées pour la formation de système de délivrance adéquats.

2.3. Les générations de système de délivrance.

Les nano-objets ont connu un certain nombre d'évolutions au cours du temps. Ces évolutions successives permettent de classer les différents systèmes de délivrance en trois générations.

2.3.1. La première génération : L'incorporation de principe actif

Les premiers systèmes décrits ont pour fonction de transporter les principes actifs dans le sang en les encapsulant, afin d'augmenter la biodistribution du principe actif hydrophobe à l'intérieur de l'organisme. Le problème de ces systèmes de délivrance est leur élimination rapide du sang par les systèmes de défense de l'organisme avant que le principe actif n'agisse. Des opsonines vont très rapidement recouvrir le nano-transporteur pour faciliter son élimination par le système réticulo-endothélial (SRE). Par conséquent il a fallu développer de nouveaux systèmes de délivrance capables d'éviter le SRE et donc de séjourner plus longtemps dans l'organisme (Figure 7).

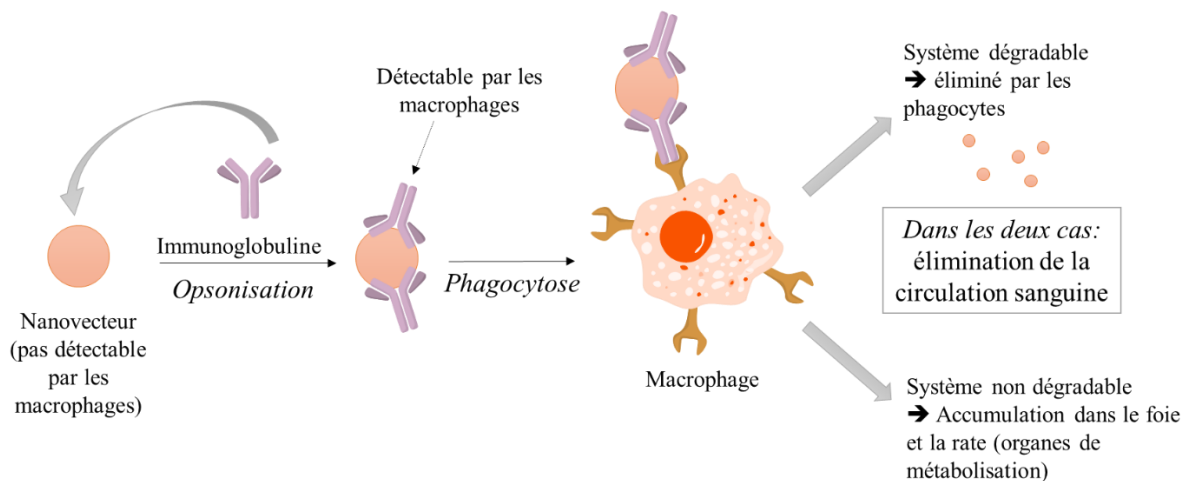


Figure 7 Illustration de l'opsonisation et de la phagocytose de nano-transporteurs

2.3.2. La seconde génération : Le développement de systèmes « furtifs »

Pour éviter ces problèmes d'opsonisation, des transporteurs dits de seconde génération ont été développés qui possèdent des propriétés de furtivité, c'est-à-dire la capacité à ne pas être détectés rapidement par l'organisme. Ces transporteurs possèdent donc une plus grande demi-vie dans la circulation sanguine, augmentant ainsi les chances d'atteindre les tissus tumoraux.

Pour obtenir ces propriétés de furtivité, le transporteur est entouré d'un composé non-délectable par les opsonines qui protège ainsi le cœur du système contenant le principe actif. Ces composés sont très généralement des polyéthers hydrosolubles, le plus couramment utilisé étant le poly(éthylène glycol) (PEG). C'est un polyéther biocompatible mais non biodégradable qui sera éliminé par filtration rénale. Les masses molaires de PEG permettant son élimination sans effets secondaires sont de 400 g/mol à 20 000 g/mol selon Knop et al.²⁰ En dessous de 400 g/mol, les oligomères de PEG sont oxydés par des enzymes déshydrogénases en métabolites toxiques, tandis que des chaînes de masses molaires supérieures à 20 000 g/mol ne seront pas aisément éliminées par les reins.

D'autres polymères alternatifs au PEG ont été étudiés :

- D'autres polyéthers comme le poly(propylène glycol) et le poly(tétraméthylène glycol) ont été décrits pour constituer des systèmes similaires aux systèmes polyester-PEG mais ils sont moins utilisés que ce dernier car le PEG est disponible dans le commerce avec un large catalogue de masse molaire et un faible coût²¹.

- Les poly(2-oxazoline) sont, comme le PEG, des polymères non-biodégradables. Un copolymère poly(L-lysine)-g-poly(2-méthyl-2-oxazoline) a été synthétisé par Konradi et al.²²

qui ont montré que la poly(2-méthyl-oxazoline) (PMeOx) est aussi efficace que le PEG pour empêcher l'adsorption des opsonines sur les nano-transporteurs. La PMeOx est donc un candidat potentiel pour remplacer le PEG qui peut se révéler instable chimiquement sur le long terme en milieu *in vivo*.

- Les poly(aminoacides) comme le poly(hydroxyéthyl L-glutamine) (PHEG) et le poly(hydroxy-éthyl L-asparagine) (PHEA) ont été utilisés avec des chaînes lipidiques par Romberg et al.²³ pour former des liposomes amphiphiles biodégradables par des protéases. Ces poly(aminoacides) apportent la furtivité aux systèmes transporteurs de principes actifs, tout en pouvant être dégradés par voie enzymatique, contrairement au PEG, ce qui facilite l'élimination des liposomes de l'organisme.

- Les polysaccharides tels que le dextrane et le chitosane sont capables d'augmenter la durée de vie de systèmes de délivrance d'anticancéreux²⁴, de plus ces composés sont biocompatibles et biodégradables²⁵

Les différents exemples décrits ci-dessus montrent que de nombreux systèmes furtifs vis-à-vis des opsonines du SRE ont été développés, les principales structures polymères assurant cette furtivité sont reportées dans la Figure 8 ci-dessous.

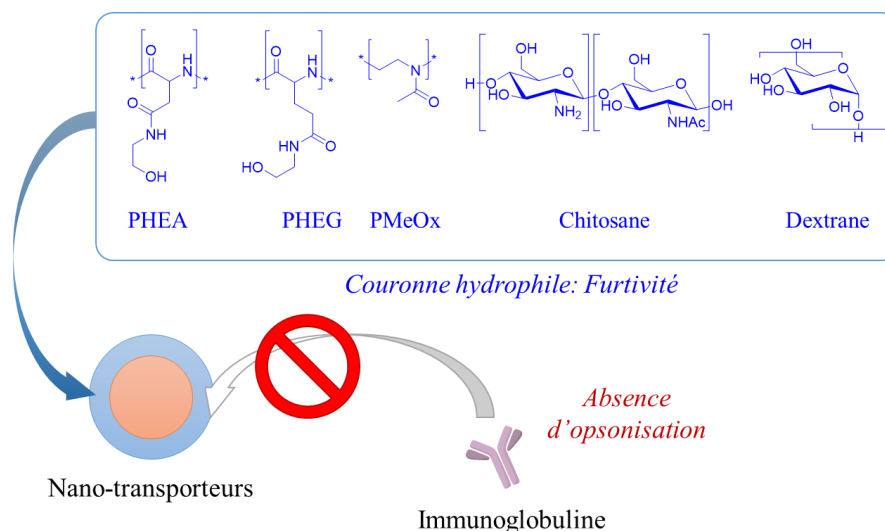


Figure 8 Apport de la furtivité face à l'opsonisation d'un nano-transporteur

Les deux premières générations de systèmes de délivrance d'anticancéreux fonctionnent via un ciblage dit passif dû à l'effet « EPR (Enhanced Permeation Retention) » (Figure 9). Cet

effet se base sur le phénomène de vascularisation des tumeurs au cours de leur croissance : les vaisseaux sanguins formés dans les tumeurs sont moins structurés et possèdent des pores de plus grand diamètre. Hashizume et al.²⁶ indiquent que l'intervalle entre des cellules vasculaires issues de cancer du sein chez la souris est usuellement de 100nm et peut aller jusqu'à 0,3 à 4,7 µm. Par conséquent, en utilisant des systèmes avec un diamètre approprié (10 – 100nm) les nano-objets traversent la paroi des vaisseaux et s'accumulent à l'intérieur des tissus cancéreux pour y délivrer le principe actif incorporé²⁷.

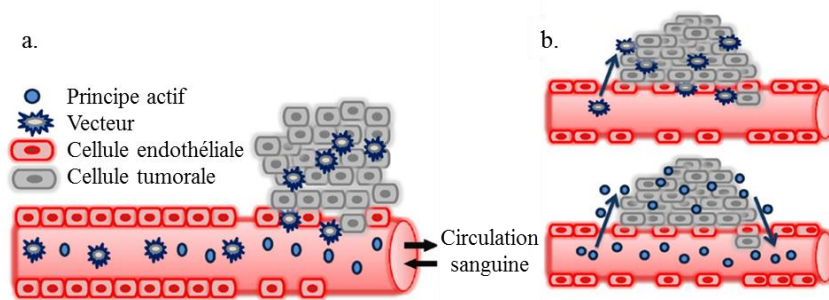


Figure 9. Effet EPR a. Les transporteurs atteignent les tumeurs via les défauts de vascularisation des tumeurs. b. Selon sa taille, les nano-objets s'accumulent dans les tissus tumoraux, contrairement aux anticancéreux de faible masse molaire (adapté de Biswas et al.²⁸)

En plus de l'effet EPR, d'autres moyens existent afin de faciliter la délivrance de principe actif exclusivement dans la zone tumorale, il s'agit des systèmes dits stimuli-dépendants :

- D'une part les systèmes dépendants d'un stimulus interne : les systèmes pH sensibles²⁹, thermosensibles³⁰ ou les systèmes libérant un anticancéreux au contact de réductase^{31,32}.
- D'autre part les systèmes libérant le principe actif en réaction à un stimulus externe : les nanoparticules magnétiques qui, au contact d'un champ magnétique appliqué sur les tissus tumoraux visés, vont libérer l'anticancéreux¹².

Cependant les systèmes basés sur l'effet EPR et sur les systèmes stimuli-dépendants fonctionnent via un ciblage passif des cellules tumorales. C'est pourquoi une troisième génération de systèmes de délivrance est en cours de développement.

2.3.3. La troisième génération : système de délivrance à ciblage actif

Contrairement aux deux générations précédentes ces systèmes sont capables de différencier une cellule tumorale d'une cellule saine grâce à des ligands qui interagissent avec les récepteurs

biologiques surexprimés par les cellules cancéreuses. Ils possèdent des propriétés de ciblage « actif » de cellules tumorales et sont qualifiés de **vecteurs** de principe actif. Pour cibler les cellules tumorales, des motifs de reconnaissance moléculaire sont couplés à la surface du vecteur. Une fois le vecteur injecté, ces ligands sont en contact avec le milieu extracellulaire^{33,34} et interagiront avec les récepteurs biologiques des cellules cancéreuses une fois que le système de vectorisation atteindra les tissus tumoraux (Figure 10).

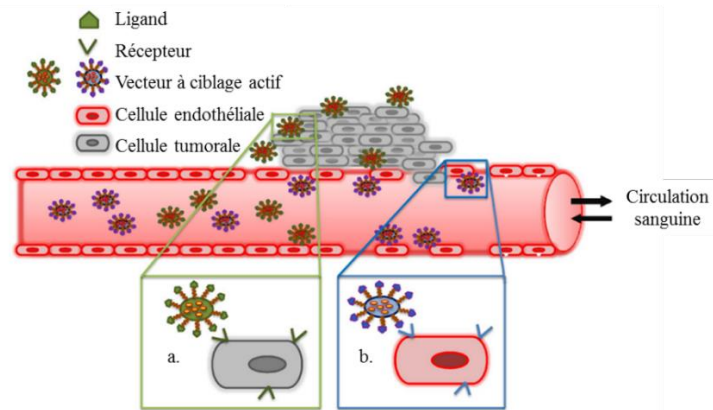


Figure 10. Ciblage actif de tissus tumoraux via les récepteurs surexprimés a) par les cellules tumorales, b) par les cellules endothéliales des vascularisations tumorales (adapté de Biswas et al.²⁸)

Par ailleurs, il existe également des nanovecteurs appelés immunovecteurs. Ces vecteurs ont des propriétés de reconnaissance cellulaire basées sur les interactions anticorps / antigènes. [Référence]

Après cette présentation des différentes générations de systèmes de délivrance, l'étude bibliographique portera plus particulièrement sur les systèmes de délivrance à base de polymères.

3. Les systèmes de délivrance à base de polymères

Dans le cadre de cette thèse, ce sont des nano-transporteurs de seconde et troisième génération constitués de polymères qui ont été synthétisés et caractérisés. Le choix des polymères s'explique par leurs nombreuses propriétés :

- L'usage de polymères biocompatibles et biodégradables permet d'obtenir des systèmes de délivrance qui, après la libération du principe actif, seront éliminés de l'organisme sans toxicité^{25,35,36}.

- Les polymères hydrophobes pourront incorporer des composés hydrophobes comme la plupart des principes actifs anticancéreux.

- Les polymères hydrophiles permettront la solubilisation du système de délivrance *in vivo* et formeront une couronne de protection sur les systèmes de délivrance vis-à-vis des mécanismes de défense de l'organisme (furtivité).

- Des systèmes de délivrance amphiphiles sont préparés en combinant un polymère hydrophile et un autre hydrophobe dans une structure copolymère. Selon la nature des composés utilisés, il est possible de moduler les propriétés physico-chimiques et biologiques de ces systèmes en fonction des propriétés du copolymère le constituant. Des copolymères amphiphiles plus hydrophobes ont tendance à former des nanoparticules, alors que des copolymères amphiphiles plus hydrophiles forment des systèmes micellaires caractérisés par des concentrations micellaires critiques (c'est-à-dire la concentration minimale pour laquelle un composé forme des micelles) plus basses que celles des micelles des tensioactifs classiques. Cela signifie que les micelles polymères ont une meilleure stabilité dans l'organisme par rapport aux micelles de tensioactifs classiques. Ces micelles ont les propriétés des systèmes micellaires classiques en terme de libération de principe actif : ce sont des systèmes dynamiques sensibles au milieu extérieur qui ne fonctionnent pas uniquement par diffusion du principe actif.

3.1. Les polyesters aliphatiques pour la libération de principes actifs

Les polyesters aliphatiques ont été largement décrits pour l'incorporation des composés anticancéreux. Ces polyesters sont hydrophobes et vont donc incorporer aisément des molécules hydrophobes. Dans le cadre de cette bibliographie, l'accent sera mis sur les copolymères à base de PCL et de PLA, deux polyesters très souvent décrits du fait de leur propriétés de biocompatibilité et surtout de biodégradabilité qui constituent un avantage majeur pour préparer des systèmes de délivrance de principe actif dont la matrice est non-toxique^{37,38}.

Polyester	Acronyme	Structure	Monomère
Poly(acide lactique)	PLA		
Poly (ε-caprolactone)	PCL		

Tableau 2 Structures du PLA et de la PCL

La préparation de ces polyesters se fait en général par polymérisation par ouverture de cycle qui permet d'obtenir des polymères de haute masse molaire³⁹ (Tableau 2).

Le PLA est le polyester le plus largement utilisé pour encapsuler des principes actifs. Sa biodégradabilité a été largement étudiée. Il s'hydrolyse *in fine* en acide lactique pris en charge par l'organisme dans le cycle de l'acide tricarboxylique (cycle de Krebs). Le PLA est éliminé de l'organisme sous forme d'eau et de CO₂. Un point important est que la vitesse d'hydrolyse du PLA est aisément modifiée en fonction de différents paramètres⁴⁰ : La stéréochimie des motifs acide lactique, la capacité de l'eau à diffuser ou non à travers la matrice de PLA (hydrolyse à cœur ou en surface) et le pH .

La PCL est un polyester plus hydrophobe que le PLA. Sa vitesse d'hydrolyse est donc plus faible que celle du PLA. La PCL n'ayant pas de carbone asymétrique, il n'est pas possible de moduler sa stéréochimie et donc son taux de cristallinité et par voie de conséquence sa vitesse d'hydrolyse. Dans le cadre de cette thèse c'est ce polyester qui a été sélectionné pour préparer de nouveau système de délivrance d'anticancéreux car une méthode modification chimique appelée « voie anionique » a été développée au laboratoire sur ce polyester. Cette méthode sera détaillée plus loin.

Les nano systèmes de délivrance à base de polyesters aliphatiques sont rapidement reconnus par les immunoglobulines du plasma et éliminés par le système réticuloendothélial ce qui empêche le principe actif incorporé d'atteindre les zones tumorales ciblées. Les travaux de Krause *et al.*⁴¹ ont démontré que les nanoparticules de PLA, après injection intraveineuse, ont tendance à s'accumuler dans le foie, principal organe de métabolisation. En effet, 2h après une injection intraveineuse des nanoparticules de PLA, 42% de la dose injectée se retrouve dans le foie.

3.2. Les copolymères amphiphiles « furtifs »

3.2.1. Synthèse de copolymères à blocs polyester-PEG

Les nano-transporteurs polyester étant trop rapidement éliminés de l'organisme, des structures à base de copolymères amphiphiles ont été synthétisées et étudiées. Les copolymères amphiphiles à base de polyester ont été largement décrits^{11,42-44} pour former des systèmes furtifs de délivrance d'agent anticancéreux dans l'organisme. Comme indiqué précédemment, le polymère hydrophile le plus décrit pour apporter le caractère furtif est le PEG. D'autres

polyéthers ont été reportés comme le Poly(propylène glycol)⁴⁵, mais le PEG reste le polyéther majoritairement utilisé car il est disponible commercialement avec un grand panel de masses molaires disponibles tout en étant peu coûteux. Dans ce paragraphe les structures décrites sont uniquement à base de PEG. Une fois couplé avec un polymère hydrophobe comme le PLA ou la PCL, le PEG va permettre leur solubilisation en milieu aqueux sous forme de micelles. Le PEG constitue la couronne hydrophile de ces systèmes qui sera en contact avec le milieu biologique, formant ainsi une protection autour du cœur hydrophobe.

Plusieurs types de copolymères à base de PEG et de polyester ont été décrites et utilisées, les copolymères à blocs (diblocs ou triblocs), et les copolymères greffés. Les copolymères à blocs sont généralement synthétisés par la méthode dite de « grafting from » : Les chaînes de polyester sont formées par polymérisation par ouverture de cycle du monomère à partir des fonctions alcool réactives aux extrémités des chaînes de PEG. Les nano-objets formés à partir de ces copolymères peuvent avoir différentes structures (Figure 11).

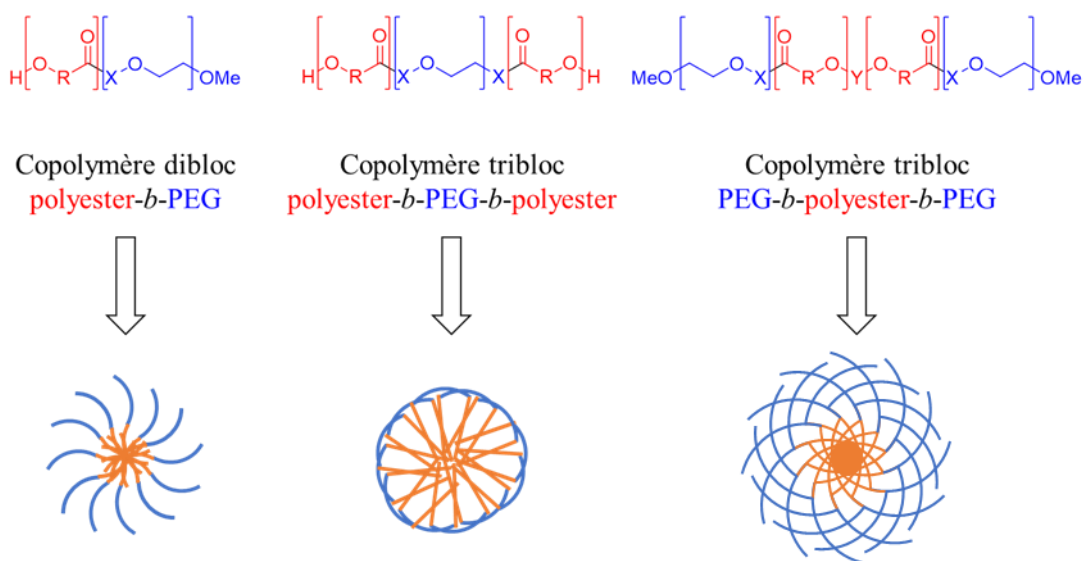


Figure 11 Les trois structures de copolymères à blocs à base de polyester et de PEG et les morphologies des micelles issues de ces copolymères

Shan *et al.*⁴⁶ ont couplé des chaînes de PEG sur les deux extrémités d'une chaîne de PLA (copolymère mPEG-b-PLA-b-mPEG) pour préparer des nanoparticules par une méthode d'évaporation de solvant. Les nanoparticules obtenues ont été injectées à des souris pour déterminer leur durée de vie dans le flux sanguin (Tableau 3).

	Nanoparticules	Nanoparticules		
	PLA	mPEG-b-PLA-b-mPEG		
%PEGylation	0%	5%	15%	30%
Taille [nm]	187.7	193.0	189.9	171.5
Taux de charge en hémoglobine [%]	24.79	23.05	33.17	16.77
AUC(0-36h) plasma [%dose*h]	306.266	1221.96	1331.49	1733.29
Clairance [h⁻¹]	0.1280	0.0161	0.0073	0.0051
Temps de demi-vie dans le sang	1	1	1	6

Tableau 3 Etude *in vivo* de nanoparticules à base de PLA et PEG, adapté de Shan et al.⁴⁶

Le pourcentage de PEGylation correspond au pourcentage d'unités éthylène glycol par rapport à la totalité des unités monomères dans le copolymère. L'AUC (Area Under Curve) correspond à l'aire sous la courbe du pourcentage de la quantité de nanoparticules injectées encore dans le plasma multiplié par le temps. Plus ce pourcentage est élevé et meilleure est la biodisponibilité des nano objets. On constate que les AUC des nanoparticules à base de copolymères sont plus élevées que celles de l'homopolymère. Par ailleurs, plus le pourcentage de PEGylation est élevé, plus l'AUC sera grande. La PEGylation permet donc d'accroître la durée de vie des nanoparticules dans le plasma.

Les structures les plus couramment décrites sont des copolymères diblocs et triblocs. En fonction de la longueur des chaînes de PEG et de polyester la balance hydrophile/lipophile (BHL) sera modulée, impactant les propriétés des systèmes de délivrance d'anticancéreux. Un grand nombre de structures polyester-PEG constituant des transporteurs de principes actifs ont été décrites. Quelques exemples de ces structures et leur utilisation en tant que système d'incorporation de biomolécules sont reportés dans le Tableau 4. Il y est mis en évidence que les nano-transporteurs basés sur un copolymère polyester-PEG sont capables d'incorporer tant des principes actifs plutôt hydrophobes de quelques centaines de daltons. Cependant ces systèmes de délivrance ont une limitation majeure : l'absence de fonction chimique réactive sur les chaînes et donc le manque de site de fonctionnalisation sur le nano transporteur.

Référence	Structure	Nano-objets	Principe actif	Taux de charge [%]	Applications
Yameen et al. ⁴⁷	PCL- <i>b</i> -PEG	Micelle	Doxorubicine	0,76-1,24	Anticancéreux
Sawdon et Peng ⁴⁸	PCL- <i>b</i> -PEG	Micelle	Acyclovir	3,2-8,7	Anticancéreux
Ge et al. ⁴⁹	PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL	Micelle	Nimodipine	3,03-4,96	Prévention spasmes artériels cérébraux
Zhang et al. ⁵⁰	PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL	Micelle	Paclitaxel	28,98	Anticancéreux
Zhang et al. ¹¹	PCL- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PCL	Nanoparticule	Doxorubicine	0,6-8,72	Anticancéreux

Tableau 4 Les structures Polyester - PEG

3.2.2. Synthèse de polyester modifié pour la préparation de copolymères greffés

Les copolymères présentés précédemment sont des copolymères à blocs et ce sont de très loin les plus courants. Cependant, quelques structures de copolymères greffés à base de PEG et de polyester ont été reportées (Figure 12). Rappelons qu'il n'est pas possible avec un polyester non modifié de générer des structures copolymères greffées, des modifications chimiques du polyester sont nécessaires.

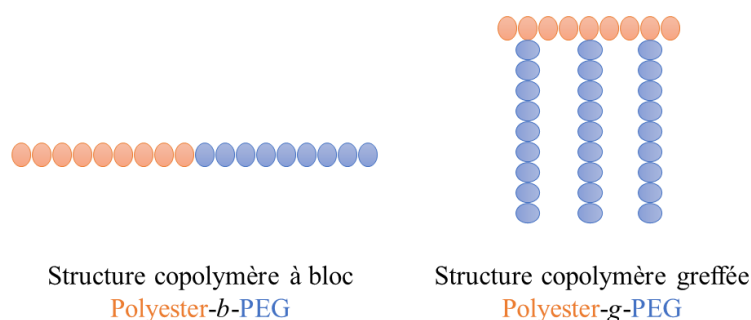


Figure 12 Structures copolymère bloc et copolymère greffé à base de PEG et de polyester

Dans le cadre de cette étude, deux voies de fonctionnalisation visant à préparer des polyesters fonctionnalisés sont présentées : les modifications chimiques avant ou après polymérisation.

La méthode de modification chimique avant polymérisation consiste à préparer une lactone fonctionnelle puis de la polymériser. Le Tableau 5 présente quelques exemples de fonctionnalisation de la lactone et la structure du polyester obtenu.

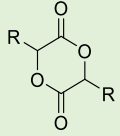
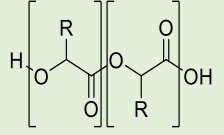
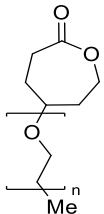
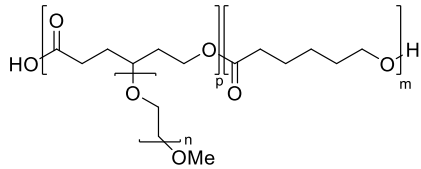
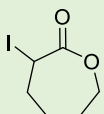
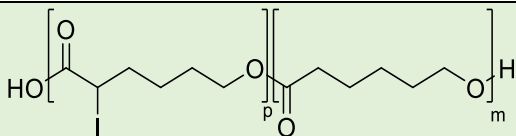
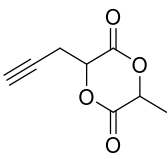
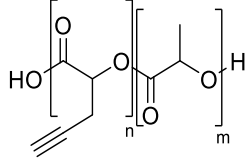
Référence	Monomère	Polyester fonctionnalisé
Trimaille et al. ⁵¹	 R = -CH ₃ ou autre groupement alkyle	 Copolymère de PLA
Rieger et al. ⁵²		 Copolymère PCL-g-PEG
El Habouni et al. ²⁷		 Copolymère PCL iodé
Coumes et al. ²⁷		 Copolymère PCL propargylée

Tableau 5 Exemples de fonctionnalisation de lactones pour la synthèse de polyesters modifiés

Trimaille et al.⁵¹ ont montré que le remplacement du méthyle du D,L lactide par un autre groupe alkyle permet de synthétiser par ROP des polyesters dérivés du PLA. Ces polymères constituent potentiellement un moyen de moduler les propriétés des systèmes basés sur ces composés mais ils ne possèdent pas de fonction réactive sur la chaîne.

L'étude de Rieger et al.⁵² consiste à synthétiser une lactone substituée par un PEG et à la polymériser par ROP, ce qui permet d'obtenir directement une structure « inverse » avec un squelette polyester greffé de chaînes latérales de PEG. Ce type de synthèse, est appelé stratégie de « Grafting through ».

La fonctionnalisation du monomère peut également servir à introduire dans un premier temps une fonction réactive qui permettra par la suite de greffer des chaînes latérales de PEG.

Dans ce cadre, El Habouni et al.⁵³ ont iodé la caprolactone pour générer après ROP une PCL iodée. Cette PCL iodée a été aminée par la suite (Figure 13).

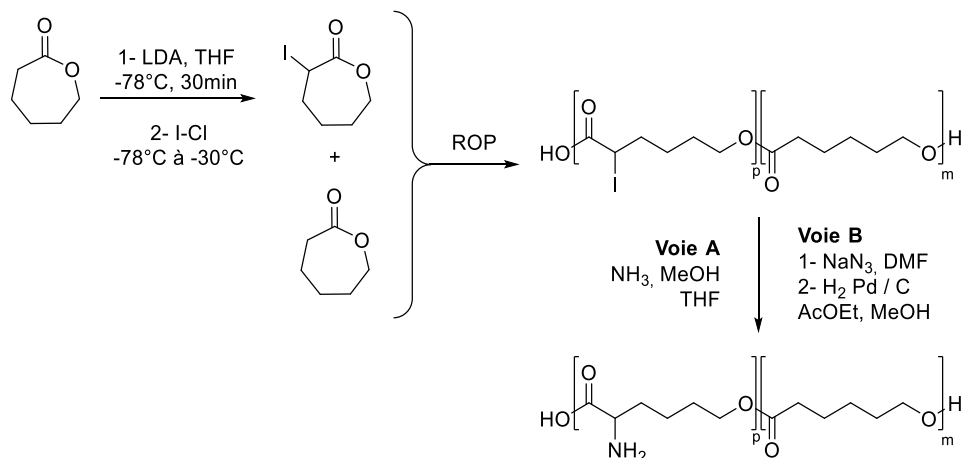


Figure 13 Amination de PCL iodée, adapté de El Habnoui et al.⁵³

Coumes et al.⁵⁴ ont synthétisé une PCL propargylée. Les fonctions propargyle ont permis le couplage par chimie « Clic » de chaînes de PEG azoturés, afin de générer des structures copolymères inverses (Figure 14). Ces copolymères forment des micelles d'environ 200nm dont la concentration d'agrégation critique (CAC), c'est-à-dire la concentration à partir de laquelle les micelles vont formées des agrégats, est plus faible lorsque le copolymère est plus hydrophobe (un ratio (EG)/(LA) = 1,6 donne une CAC de 17 mg/L alors qu'un ratio de 3,5 donne une CAC de 41 mg/L).

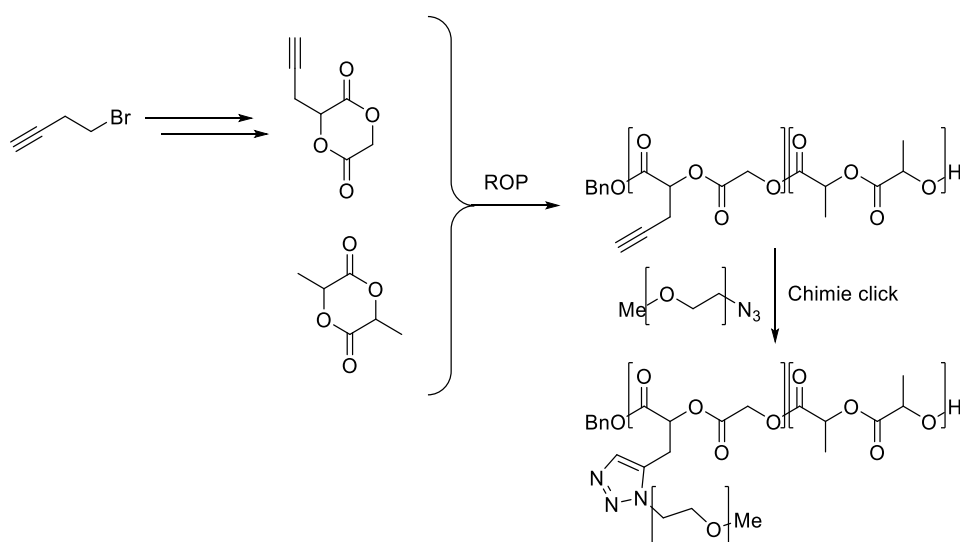


Figure 14 Synthèse de PCL-g-PEG (Coumes et al. ⁵⁴)

A travers ces exemples, il est mis en évidence que la fonctionnalisation de lactone permet de générer diverses structures copolymères « inverses » polyester-g-PEG. Cependant cette méthode nécessite les synthèses de lactones fonctionnelles et leur polymérisation. Or la préparation de lactones fonctionnelles est longue, et les rendements sont moyens. En outre, les polymérisations de ces monomères sont moins aisées que celles des monomères non fonctionnels. Afin d'éviter ces problèmes, une voie de fonctionnalisation en une seule étape, directement à partir du polyester a été mise en place au laboratoire sur la PCL par Ponsart et al.⁵⁵.

3.2.3. La voie anionique

Cette méthode de modification post polymérisation permet d'introduire des fonctions chimiques le long d'un polyester via la formation d'un carbanion et a été nommée par conséquent « voie anionique ». Elle présente l'avantage de ne pas nécessiter de synthèse de monomères fonctionnalisés ni de copolymérisation du polyester fonctionnel (Figure 15).

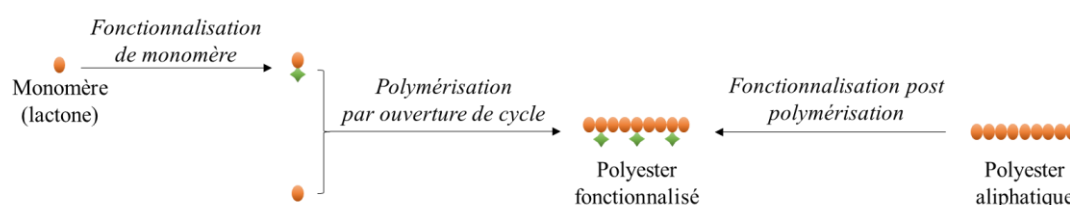


Figure 15 Les deux voies de fonctionnalisation chimique de polyester

Dans les paragraphes suivants, plusieurs fonctionnalisations de PCL sont décrites. Toutes ces synthèses n'ont pas pour but d'obtenir un copolymère greffé PCL-g-PEG, mais de montrer la diversité des composés qui peuvent être couplés le long d'une chaîne de PCL par cette réaction. Dans un premier temps il y a déprotonation du méthylène de la PCL en alpha du carbonyle des fonctions esters. Le carbanion formé réagit ensuite sur un centre électrophile et assure la fonctionnalisation du polyester (Figure 16).

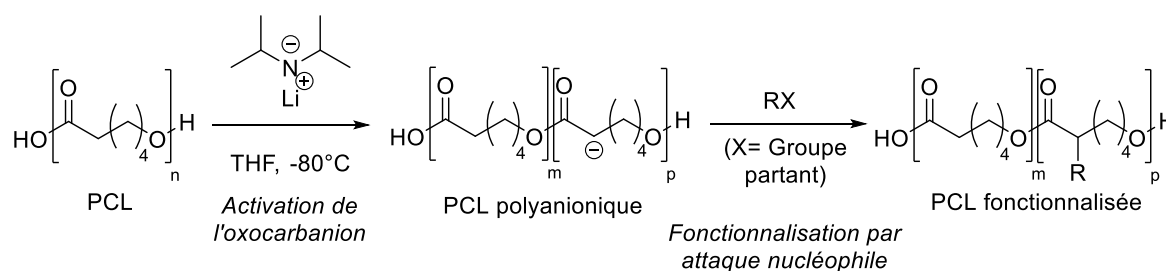


Figure 16 Principe de la voie anionique (Ponsart et al.⁵⁵)

Des molécules électrophiles comme le benzaldéhyde, le chlorure de naphtoyl ou l'iodométhane ont été utilisées pour fonctionnaliser la PCL⁵⁵. La limitation de ces réactions est qu'elles ne permettent pas un contrôle précis du degré de substitution qui reste toujours modéré (<20%) et provoquent des coupures de chaîne de la PCL (\overline{M}_n passe de 53 700 Da à 20 000 Da environ). Par la suite, cette méthode de modification chimique a été largement développée par l'équipe Biopolymères Artificiels de l'IBMM à Montpellier et d'autres réactions de modification de la chaîne de PCL ont été décrites : Une méthylation (Ponsart et al.⁵⁶) ; une carboxylation (Gimenez et al.^{56,57}) ; une formation d'isocyanate (Blanquer et al.⁵⁷) qui permet d'introduire ensuite de nouveaux groupements le long de la PCL (le 1-Naphthylmethanol et le 1-naphthylmethylamine) ; une iodation (Nottelet et al.⁵⁸) qui rend la PCL visible par radiographie; un greffage d'acide diéthylène triaminopentaacétique (DTPA) complexant des ions Gadolinium Gd³⁺ utilisés comme agents de contraste en IRM .

Les exemples du Tableau 6 montrent le potentiel de la voie anionique pour générer une grande diversité de dérivés de PCL fonctionnalisés. Selon ces fonctionnalités, il est possible par la suite de greffer différents composés, notamment des polymères pour générer des structures greffées comme le montrent les études suivantes dans le Tableau 7:

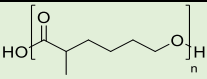
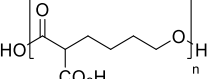
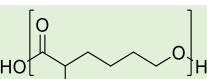
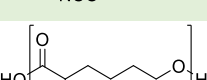
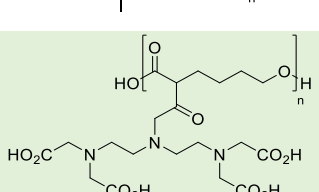
Référence	Motif de PCL modifiée	Application
Ponsart et al. ⁵⁶		Modulation des propriétés physico-chimique du polyester
Gimenez et al. ⁵⁷		Vitesse d'hydrolyse, réactivité chimique
Blanquer et al. ⁵⁸		réactivité chimique
Nottelet et al. ²⁷		Imagerie médicale : radiographie
El habouni et al. ⁵³		Imagerie médicale : IRM

Tableau 6 Exemples de fonctionnalisation de PCL

Référence	Homopolymère greffé	Copolymère obtenu	Nano-objets formés
Ponsart et al. ⁵⁹	PEG	PCL-g-PEG	Nanoparticules (150nm)
Nottelet et al. ⁶⁰	Poly(L-Lysine)	PCL-g-PLL	Agrégat de micelles (60-160nm)
Nottelet et al. ⁶¹	PDMAEMA	PCL-g-PDMAEMA	Micelles 65-125nm (PCL-g-PDMAEMA)
	P4VP	PCL-g-P4VP	
	P4VP + PEG	PCL-g-(P4VP, PEG)	

Tableau 7 Exemples de formation de copolymères par réaction sur une PCL anionique

Ponsart et al.⁵⁹ ont synthétisé un copolymère amphiphile PCL-g-PEG par réaction entre des PEG fonctionnalisés par un brome en extrémité de chaîne et des PCL anioniques (Figure 17). Les copolymères obtenus possèdent une BHL (motifs éthylèneglycol/motifs hydroxycaproïque) de 0,06 à 0,67 en fonction des conditions opératoires lors du greffage. Selon la valeur de ce rapport, le copolymère aura des propriétés différentes en termes de solubilité. Par nanoprecipitation, il est possible de former des nano-objets de 150nm dans l'eau.

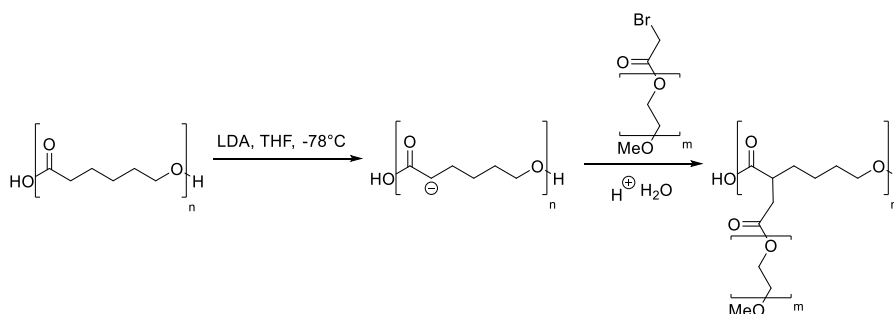


Figure 17 Synthèse de PCL-g-PEG (adapté de Ponsart et al.⁵⁹)

D'autres polymères ont été greffés sur une PCL anionique, comme le montrent deux études de Nottelet et al.^{60,61} La première décrit le greffage de chaînes de poly-(L-lysine) (PLL) par « grafting onto ». Le copolymère PCL-g-PLL forme en solution dans du PBS (pH7,4 ; 0,05mg/cm³) des structures micellaires de tailles comprises entre 60 et 160nm. Ce copolymère a été aussi synthétisé en polymérisant une L-lysine (« grafting from ») (Figure 18). Le copolymère obtenu possède des propriétés différentes de celui synthétisé par « grafting onto » : les nano-objets formés dans l'eau ont un diamètre compris entre 400 et 500nm.

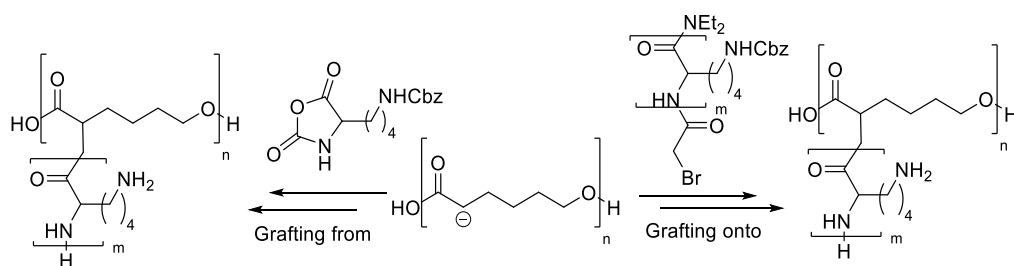


Figure 18 Synthèse de copolymère PCL-g-poly(L-lysine)⁶⁰

Une autre étude de Nottelet et al.⁵⁷ porte sur la synthèse de copolymères PCL-g-PMAEMA et PCL-g-P4VP qui sont hydrosolubles après quaternisation des fonctions amine par méthylation. PCL-g-P4VP a été rendue hydrosoluble par greffage de chaînes de PEG sur la PCL par la méthode « anionique » pour générer des systèmes hydrosolubles PCL-g-(P4VP, PEG) (Figure 19). En milieu aqueux, PCL-g-QMAEMA forme des nano-objets entre 65 à 125nm de diamètre tandis que PCL-g-PQ4VP forme des nano-objets de 75nm et PCL-g-(P4VP, PEG) des nano-objets de 270nm.

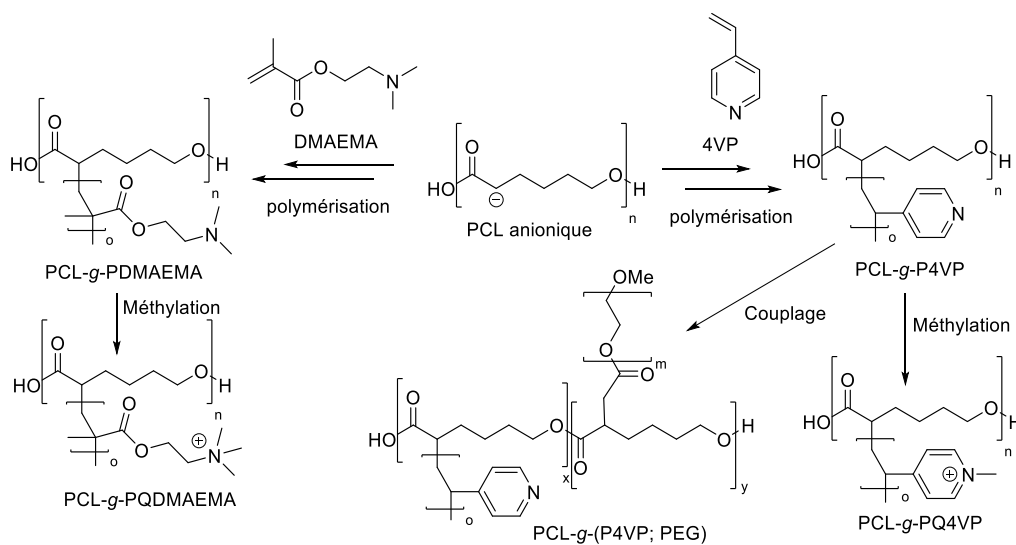


Figure 19 Synthèses de PCL-g-PQDMAEMA, PCL-g-PQ4VP et PCL-g-(P4VP ; PEG)^{56,57}

Avec le développement des réactions de chimie « Clic », la PCL a été fonctionnalisée avec des fonctions propargyle qui permettent de coupler divers composés par réaction CuAAC ou par thiol-yne (Tableau 8)

Référence	Composé greffé sur la PCL	Structure synthétisée	Réaction de couplage	Application
Porsio et al. ⁶²	Dérivé azoturé d'acide diéthylène triaminopentaacétique,	PCL-g-DTPA	CuAAC	Imagerie médicale : IRM
Al Samad et al. ⁶³	PEG-SH	PCL-g-PEG	Thiol-yne	Délivrance de principe actif
Al Samad et al. ⁶⁴	PEG-SH	PCL-g-PEG	Thiol-yne	Délivrance de principe actif

Tableau 8 Les synthèses de copolymère PCL-g-PEG par voie anionique et chimie « clic »

Porsio et al.⁶² ont greffé sur une PCL propargylée un dérivé azoturé de DTPA, ce qui permet d'obtenir une PCL capable de complexer du gadolinium III, exploitable en IRM, par une voie alternative à celle de Blanquer et al.²⁷ La PCL substituée ainsi obtenue forme des nano-objets de 120 à 170nm de diamètre, dont la cytocompatibilité a été mise en évidence par des tests sur des fibroblastes L929.

Al Samad et al.^{63,64} ont synthétisé un copolymère PCL-g-PEG par réaction thiol-yne entre une PCL propargylée et un PEG fonctionnalisé par une fonction thiol en extrémité de chaîne (Figure 20).

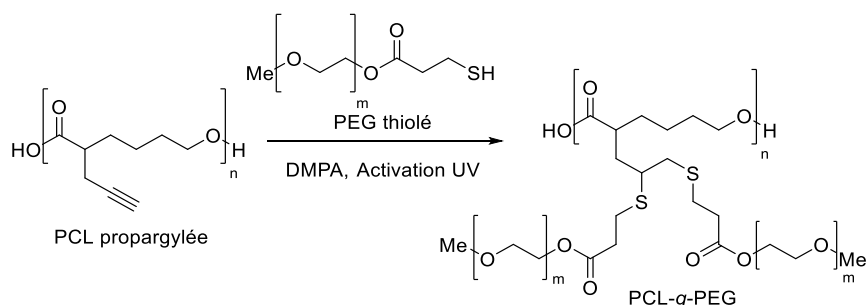


Figure 20 Synthèse de PCL-g-PEG par thiol-yne (Al Samad et al.^{63,64})

Cette méthode de synthèse permet de moduler le ratio entre les unités éthylène glycol et les unités hydroxycaproïque et donc la BHL. En modulant ce ratio, il est possible de moduler les propriétés des nano-objets formés :

- Pour un ratio EG/CL = 0,1 on forme des nano-sphères de 55nm de diamètre alors qu'avec un ratio de 1,15 on obtient des structures micellaires de 40nm dont la CAC est 1mg/L. Les auteurs ont comparé la CAC de ce système avec celle d'un copolymère à blocs (EG/CL=1,2) qui est de 1,3mg/L (Attwood et al.⁶⁵). Sachant que plus la CAC est faible plus

les micelles seront stables *in vivo*, les copolymères greffés PCL-*g*-PEG présentent cet avantage par rapport aux copolymères à blocs. 2 composés anticancéreux, le paclitaxel et l'ABT-199 ont été incorporés dans PCL-*g*-PEG⁶⁰ (Tableau 9). Il est montré que le taux de charge et l'efficacité d'incorporation de ces composés hydrophobes dépendent de la BHL du copolymère.

Copolymère	Rapport EG/CL	Paclitaxel		ABT-199	
		Taux de charge	Efficacité d'incorporation	Taux de charge	Efficacité d'incorporation
PCL- <i>g</i> -PEG0,7k	1.2	ND	2,9%	1,3%	6,8%
PCL- <i>g</i> -PEG2k	3.2	ND	1,6%	0,1%	3,2%

Tableau 9 Incorporation d'anticancéreux dans des micelles de copolymère PCL-*g*-PEG⁶⁴

Pour conclure, la PCL propargylée par la voie anionique permet de synthétiser des copolymères amphiphiles PCL-*g*-PEG. Les micelles formées avec PCL-*g*-PEG présentent des CAC en milieu aqueux inférieures à celles obtenues avec des copolymères à blocs PCL-*b*-PEG.

3.3. Copolymères polyester-*b*-PEG fonctionnalisés et système à ciblage actif

Les systèmes présentés précédemment sont des systèmes de libération de seconde génération, les systèmes de troisième génération sont abordés ici. Seuls les systèmes de délivrance à base de copolymère à blocs polyester-*b*-PEG sont présentés. En effet, bien que la chaîne de PEG ne soit pas fonctionnalisée, les extrémités de chaîne peuvent réagir, notamment avec des dérivés d'acide folique, un ligand utilisé pour cibler des récepteurs aux glycoprotéines P surexprimés par plusieurs types de cellules tumorales. Les deux études présentées dans le Tableau 10 portent sur des copolymères dont les extrémités PEG ont été fonctionnalisées par des fonctions amine (Figure 21 et Figure 22).

Référence	Copolymère	Ligand fonctionnalisé	Cellules ciblées	Principe actif
Yang et al. ⁶⁶	PCL- <i>b</i> -PEG	Acide folique	Cellules cancéreuses épithéliales (lignée KB _{v200})	Vincristine
Hami et al. ⁶⁷	PLA- <i>b</i> -PEG	Acide folique	Cellule cancéreuse ovarienne SKOV3	Doxorubicine

Tableau 10 polyester-PEG avec ligands de reconnaissance de récepteurs biologiques

Les travaux de Yang et al.⁶⁶ montrent que les systèmes décorés avec des folates en extrémité de chaîne ont une plus faible IC50 (0,01 μ M) que les systèmes sans folate (0,02 μ M).

Le même constat a été établi par Hami et al.⁶⁷ qui ont montré la possibilité de former des nano-vecteurs micellaires à partir d'un copolymère DOX-PLA-b-PEG-folate. La doxorubicine a été liée de façon covalente au copolymère par un lien hydrazone hydrolysable afin d'être libérée au fur à mesure de l'hydrolyse du lien hydrazone. Les micelles préparées à partir de ce copolymère présentent une IC50 plus faible (4,65 µg/ml) que celles sans folate (13,51 µg/ml).

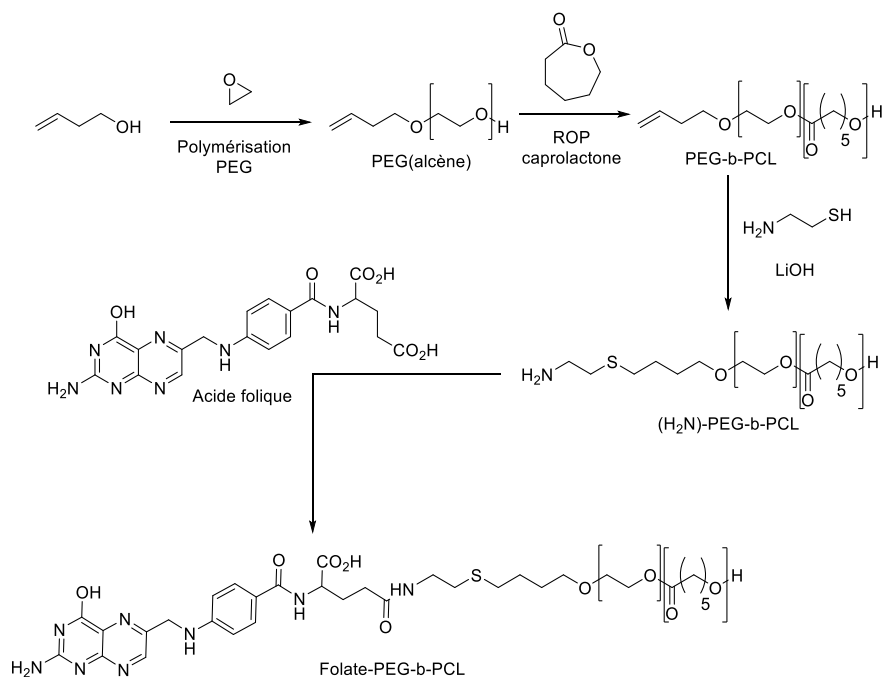


Figure 21 Synthèse d'un copolymère bloc PCL-b-PEG-folate (Yang et al.⁶⁶)

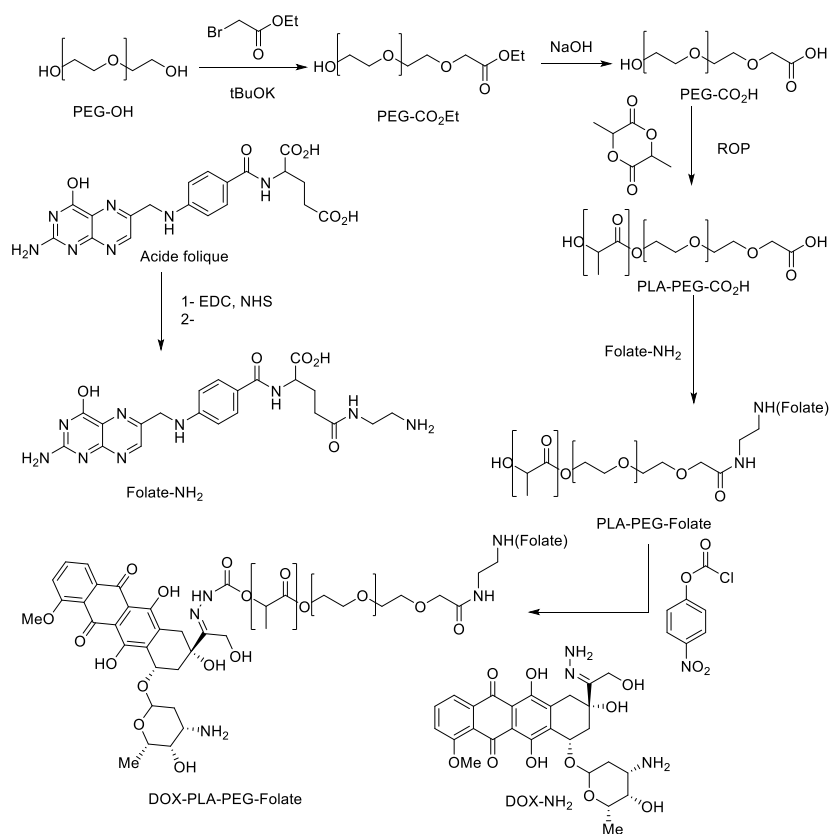


Figure 22 Synthèse d'un copolymère bloc DOX-PLA-b-PEG-folate (Hami et al.⁶⁷)

Dans les deux cas cités ci-dessus, une seule molécule de folate peut être couplée sur chaque chaîne de copolymère. Si le couplage d'une seule molécule de ciblage suffit à augmenter l'efficacité des systèmes de délivrance par rapport aux systèmes de seconde génération, alors on peut se demander si le couplage de plusieurs molécules de ciblage sur une même chaîne de polymère hydrophile d'un copolymère amphiphile pourrait accroître davantage les propriétés de ciblage des nano-vecteurs. Pour cela il est nécessaire de remplacer le PEG par un autre polymère hydrophile **fonctionnalisé** pour constituer la couronne hydrophile de ces systèmes de délivrance.

4. Les copolymères amphiphiles à base de polyester et de polysaccharide

Pour pallier le manque de fonction réactive le long des chaînes de PEG, d'autres polymères hydrophiles ont été utilisés parmi lesquels les polysaccharides. Ces derniers présentent plusieurs propriétés intéressantes pour constituer des systèmes de délivrance de principe actif : ils sont biosourcés, biocompatibles, biodégradables par voie enzymatique et les fonctionnalités chimiques présentes le long de leurs chaînes permettent une grande diversité de modifications

chimiques conduisant à moduler les attributs des systèmes de libération⁶⁸. Par exemple il est possible de greffer des fluorophores sur un polysaccharide afin de suivre l'internalisation cellulaire des nano-objets formés à partir de ce dernier.^{69,70} Il est possible aussi de greffer des ligands le long des chaînes, ce qui permet d'avoir davantage de motifs de reconnaissance sur la couronne hydrophile des nano-vecteurs.

Deux structures principales polyester-polysaccharide sont décrites : des copolymères à blocs et des copolymères greffés avec des chaînes latérales de polyester le long d'un squelette polysaccharide (structure greffée « classique »). Les structures à blocs sont obtenues en couplant deux homopolymères fonctionnalisés à leurs extrémités. Dans le cas des structures greffées « classiques », deux types de greffage sont décrits. D'une part la stratégie « grafting from » qui consiste à polymériser une lactone par ROP sur les fonctions le long du squelette polysaccharide et d'autre part la stratégie « grafting to » qui consiste à greffer des chaînes de polyester le long d'un polysaccharide.

L'originalité de ce projet de thèse consiste à synthétiser de nouveaux copolymères greffés à structure « inverse » avec des chaînes latérales de polysaccharides greffées sur un squelette de PCL. La synthèse de ces structures inverses nécessite la fonctionnalisation préalable du polyester (Figure 23). Dans le cadre de cette thèse, le polyester fonctionnalisé utilisé sera une PCL propargylée par voie anionique. Une autre voie de synthèse a été reportée par Guerry et al.³² avec le PCL-g-CHT (CHT= chitosane). Cette synthèse ainsi que ses différences avec celles présentées dans cette thèse seront abordées à la fin de cette bibliographie. L'ensemble des voies est illustré dans la Figure 23.

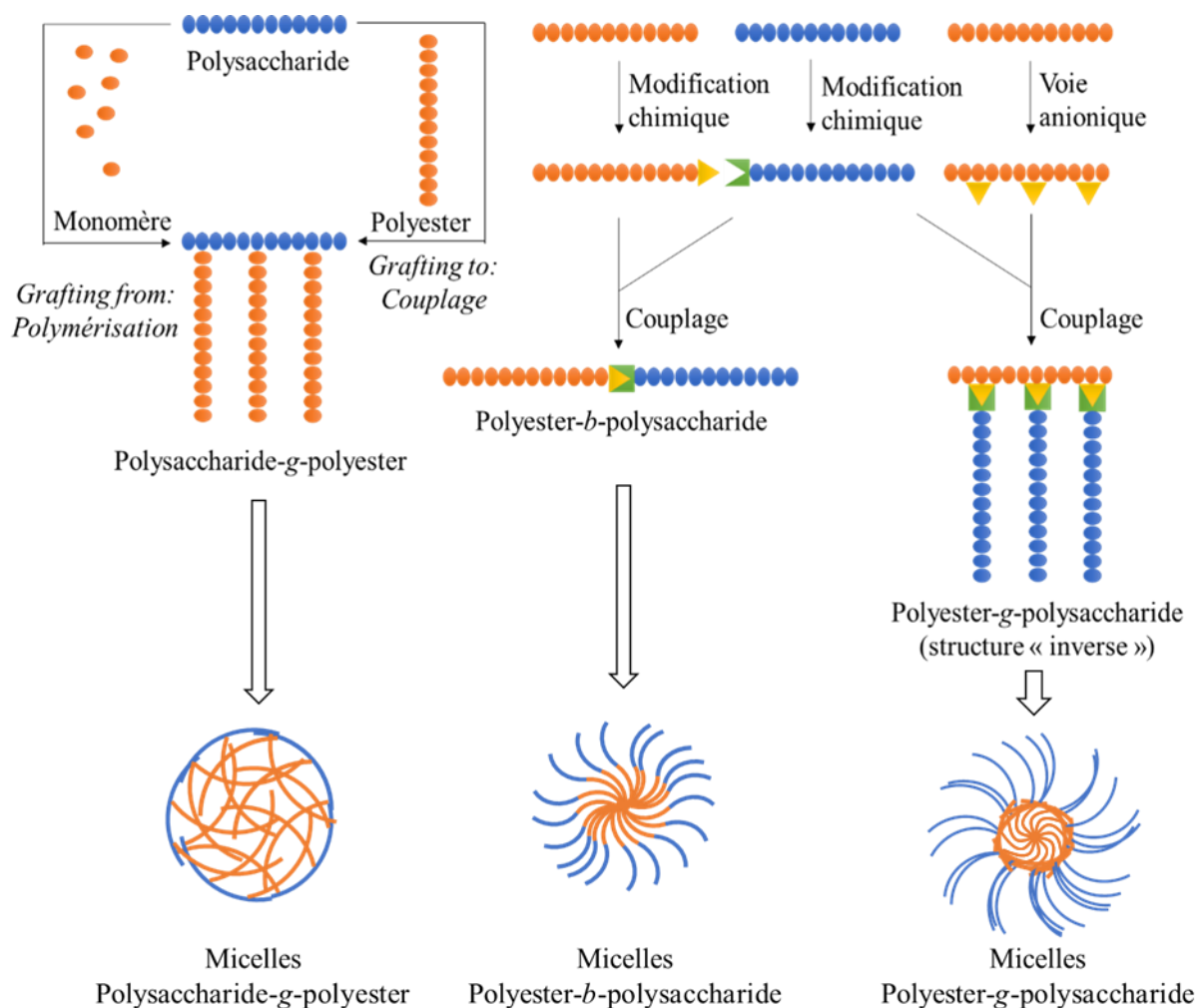


Figure 23 Les différentes structures copolymères polyester - polysaccharide et leurs voies de synthèse

Les copolymères polyester-polysaccharide présentés par la suite porteront sur deux polysaccharides : le dextrane et le chitosane (Figure 24). D'autres structures ont été reportées, par exemple des copolymères à base d'acide hyaluronique^{71,72}, de cellulose⁷³ ou de pullulane⁷⁴. Cependant, le dextrane et le chitosane possèdent des caractéristiques intéressantes pour la synthèse de nouvelles structures copolymères amphiphiles :

Le dextrane est adapté pour servir de polymère « modèle » : il possède uniquement des motifs glucose, donc des fonctions alcool le long de sa chaîne. Ces motifs sont reliés par des liaisons glycoside 1-6 (avec quelques ramifications par des liaisons glycoside 1-3).

Le chitosane est un copolymère comportant des motifs glucosamine et N-acétylglucosamine branchés en 1-3. Il possède donc des fonctions alcool et amine le long de ses chaînes. Les fonctions amine constituent l'avantage majeur du chitosane par rapport aux autres

polysaccharides, leur présence permettant d'effectuer une plus grande diversité de réactions chimiques de fonctionnalisation.

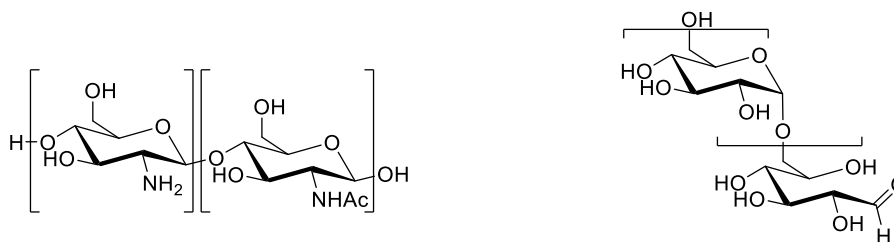


Figure 24 Structure chimique du chitosane (à gauche) et du dextrane (à droite)

4.1. Copolymères à blocs

Pour les structures à blocs il est nécessaire dans un premier temps de modifier chimiquement l'extrémité anomère du polysaccharide pour introduire une fonction réactive sur ce dernier, avant de le coupler au polyester.

4.1.1. Structures à base de dextrane

Le dextrane est un polysaccharide non chargé de source microbienne qui a été largement exploité²⁴ pour générer des systèmes de délivrance de principe actif. Il existe des structures à base de copolymère dextrane-polyester^{75,76}, des systèmes à base de dextrane hydrophobisé par une molécule hydrophobe^{15,77} ou des systèmes basés sur des chaînes de dextrane fonctionnalisées avec un agent de ciblage³³.

Pour obtenir des copolymères à blocs contenant du dextrane, il est nécessaire dans un premier temps de fonctionnaliser l'extrémité aldéhyde du polysaccharide, notamment par amination réductrice. Le polyester également fonctionnalisé en extrémité de chaîne sera ensuite couplé avec le dextrane modifié pour former un copolymère dextrane-b-polyester (Figure 25).

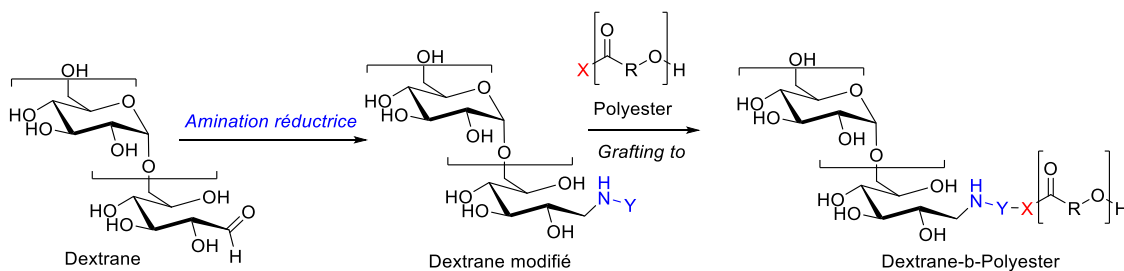


Figure 25 Préparation de structure dextrane-b-polyester

4.1.1.1. Les copolymères amphiphiles DEX-b-PLA

Des structures copolymères Dextrane-b-PLA (DEX-b-PLA) ont été synthétisées par la méthode « grafting to » par Zhao et al.⁷⁸ Dans cette étude le dextrane est fonctionnalisé par un groupement propargyle. Le PLA avec une extrémité hydroxyle est modifié par méthylation avec du chlorure de méthyle, puis substitué par de l'azoture de sodium pour générer le PLA-N₃. Les deux homopolymères sont ensuite couplés par CuAAC (Figure 26). Des micelles de DEX-b-PLA ont été préparées et ont permis d'incorporer de la doxorubicine. Cette étude a notamment montré que des micelles préparées avec des stéréocomplexes de PLLA et PDLLA sont plus stables que celles préparées à partir d'un seul polymère. Ces travaux ont également vérifié que plus le copolymère est hydrophobe (chaîne de PLA plus longue) plus les micelles formées à partir de ce dernier ont une faible CAC en milieu aqueux.

Ces mêmes copolymères ont été utilisés par Piao et al.⁷⁹ pour encapsuler du paclitaxel. Dans le cadre de test de cytotoxicité *in vivo* chez des souris, ces micelles ont montré leur efficacité dans le traitement du cancer du sein (4T1). Ces nano-transporteurs s'accumulent dans les tissus tumoraux grâce à l'effet EPR.

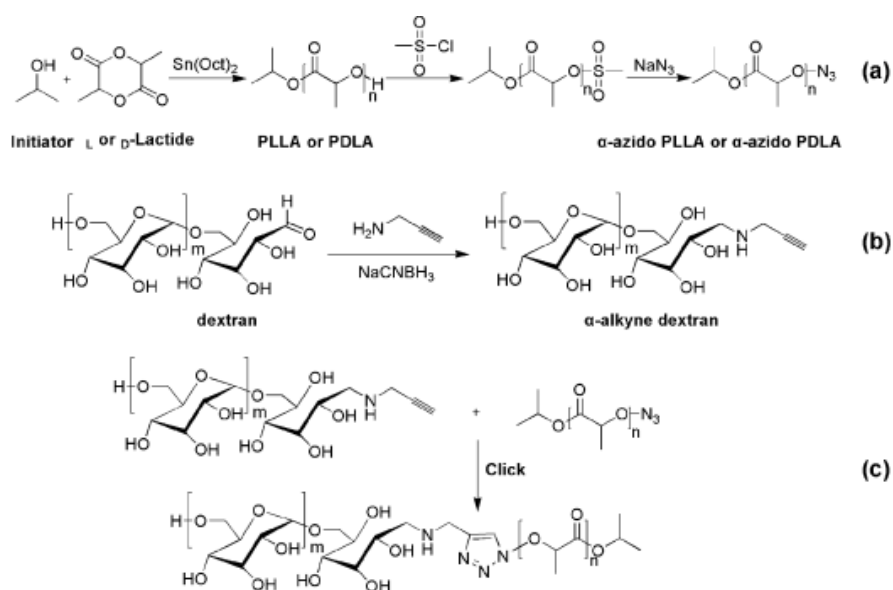


Figure 26 Synthèse de Dextrane-b-PLA par CuAAC (a) Synthèse de PLA azoturé, (b) Synthèse de Dextrane propargylé, (c) Couplage par CuAAC (Zhao et al.75)

4.1.1.2. Les copolymères amphiphiles DEX-b-PCL

Compte tenu de sa plus grande hydrophobie, la PCL est plus utilisée que le PLA pour la préparation de copolymères amphiphiles pour la délivrance de principe actif. Différentes voies de préparation de copolymères DEX-b-PCL sont reportées dans le Tableau 11 .

Référence	Dextrane		PCL		Réaction de couplage	Nano-transporteurs		Principe Actif encapsulé
	Masse	Fonction en extrémité	Masse	Fonction en extrémité		Type	Taille (nm)	
Li et al. ⁸⁰	6kDa	Dextrane-NH ₂	3,3 à 6,3kDa	PCL-maléimide	Aza-Michaël	Nanoparticules	89,2 - 123,3	Doxorubicine
Sun et al. ³¹		Dextrane-SH	3,1kDa	PCL-SH	Formation de pont disulfure	Micelles	60	
Zhang et al. ⁸¹		Dextrane-NH ₂	ND	PCL-CHO	Amination réductrice	Micelles	25 - 3500	Aucun
Zhang et al. ⁸¹	3,5 et 6kDa	Dextrane-propargyle	2 à 6kDa	PCL-N ₃	CuAAC	Micelles et polymersomes	70,9 - 183,2	Doxorubicine

Tableau 11 Nano-transporteurs à base de DEX-b-PCL et leurs méthodes de synthèse

Li et al.⁸⁰ ont utilisé une réaction Aza-Michaël pour obtenir la structure DEX-b-PCL. Le Schéma de la synthèse est présenté sur la Figure 27.

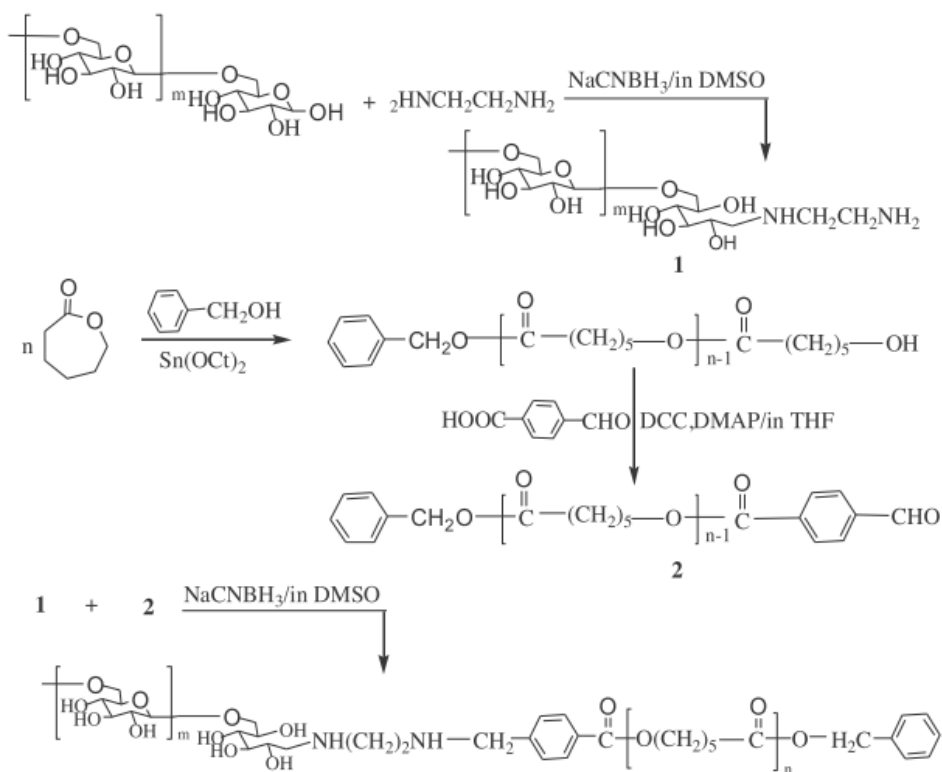


Figure 27 Synthèse d'un copolymère Dextrane-b-PCL par double amination réductrice (Li et al.⁸⁰)

Sun et al.³¹ ont synthétisé un Dextrane-*b*-PCL avec un lien disulfure clivable en présence du réducteur dithiolthréitol (DTT) (Figure 28). Des micelles préparées avec ce copolymère sont sensibles aux agents réducteurs : en présence de DTT (10mM) la taille des micelles augmente de 60 à 200nm, l'indice de polydispersité des micelles augmente également (de 0,15 à 0,6). Des agrégats de plus de 1000nm se forment en présence de DTT. Les auteurs supposent que l'apparition des agrégats est due au clivage des chaînes de copolymère, ce qui provoque la précipitation des chaînes de PCL non liées à une chaîne de dextrane.

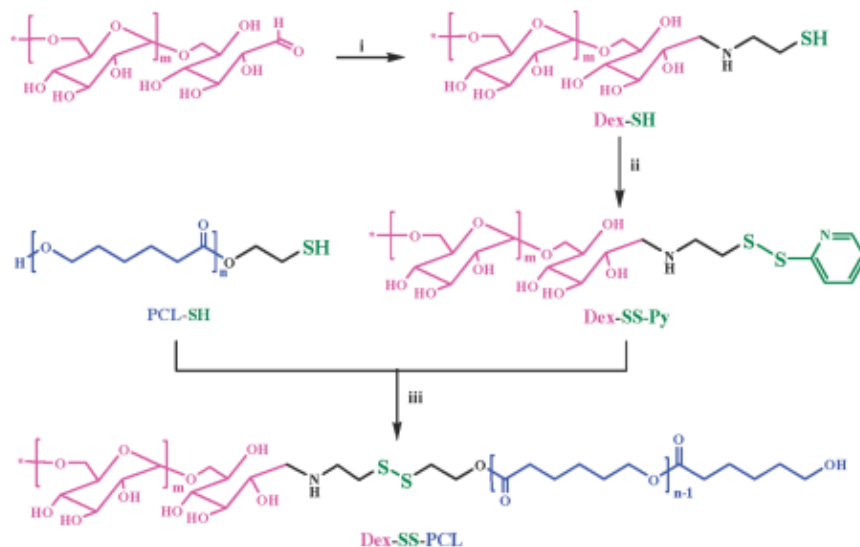


Figure 28 Synthèse de Dextrane-*b*-PCL, adapté de Sun et al.³¹

(i : Cystéamine, NaBH₃CN, DMSO/H₂O (v/v 3/1), 60°C 2 jours puis 40°C 2 jours, traité avec 130 mM DTT dans l'eau pendant 2 jours. ii : Py-SS-Py, pH 2, H₂O, température ambiante, 24h. iii : DMF /LiCl, AcOH, 40°C, 24h)

Ces travaux ont montré qu'un lien disulfure entre le dextrane et la PCL permet d'obtenir un système sensible à la concentration en réducteur dans le milieu. Certaines tumeurs présentant un microenvironnement plus réducteur que celui des tissus sains, le système peut permettre une libération préférentielle de la doxorubicine dans les tissus tumoraux.

Zhang et al.⁸² ont synthétisé un copolymère DEX-*b*-PCL selon le schéma de la Figure 29. Les chaînes des copolymères s'auto-assemblent en milieu aqueux sous forme de micelles pour les plus hydrophiles, ou de polymersomes pour les plus hydrophobes. Ainsi, la BHL impacte la nature des systèmes formés en milieu aqueux. Les auteurs n'ont encapsulé aucun principe actif dans ces nano-objets permettant de déterminer l'impact des différences de structures sur les propriétés de libération de principe actif.

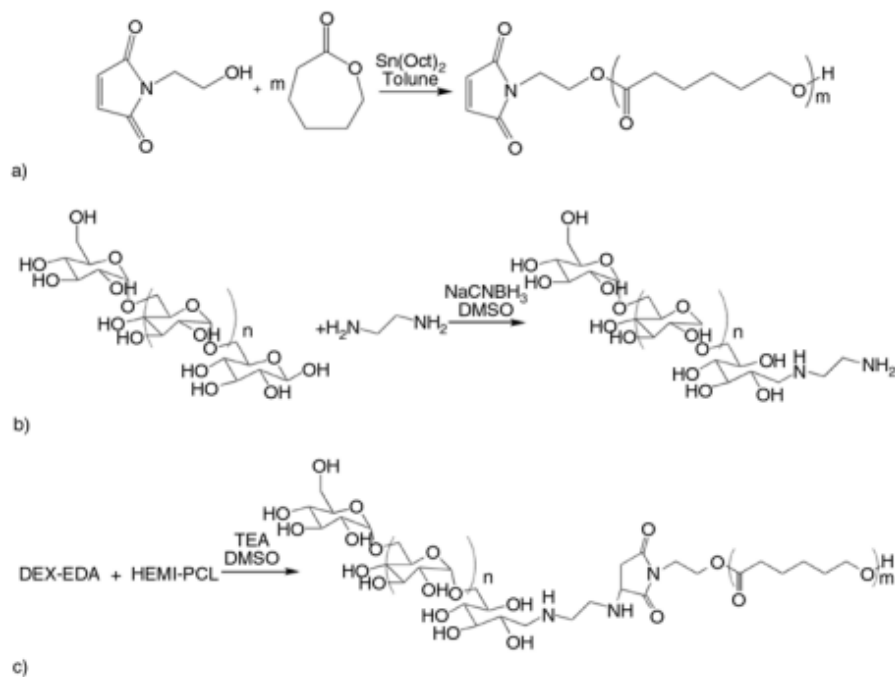


Figure 29 Synthèse d'un copolymère Dextrane-b-PCL. (a) Synthèse de PCL par ROP, (b) Amination réductrice à l'extrémité du dextrane (c) Couplage des homopolymères par réaction d'aza-Michaël (Zhang et al.⁸²)

Enfin, Zhang et al.⁸¹ ont préparé un DEX-b-PCL par réaction de couplage « clic » CuAAC entre une PCL azoturée et un dextrane comportant une liaison triple (Figure 30).

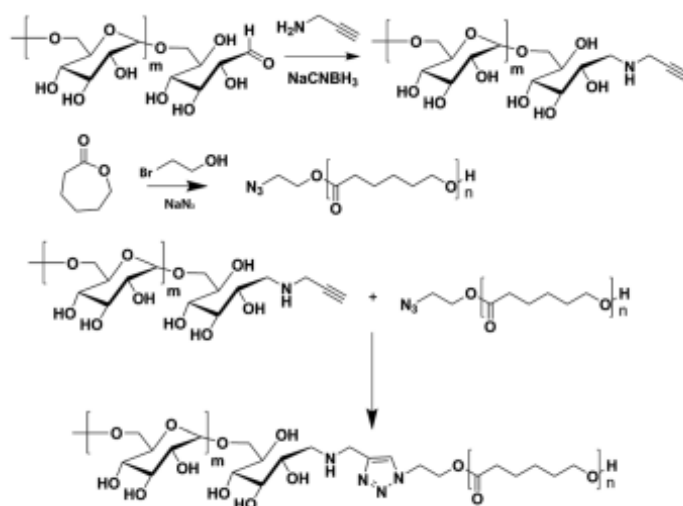


Figure 30 Synthèse de Dextrane-b-PCL par CuAAC (de Zhang et al.⁸¹)

Ces différents exemples mettent l'accent sur l'intérêt de l'amination réductrice pour la fonctionnalisation de l'extrémité de chaîne du dextrane et sur le fait qu'un grand nombre de méthodes de couplage sont disponibles par la suite pour générer des copolymères à blocs amphiphiles Dextrane-b-polyester.

4.1.2. Structure à base de chitosane : limitation

Dans le cas du chitosane les méthodes précédentes ne peuvent pas être appliquées. Compte tenu de la présence des fonctions amine des motifs glucosamine, il est difficile d'effectuer une amination réductrice sur l'extrémité aldéhyde du chitosane car les fonctions amine de la chaîne peuvent former une base de Schiff avec cet aldéhyde. Pour cette raison, les structures à blocs à base de chitosane ne sont pas décrites. On s'intéressera donc aux structures greffées qui ne font pas intervenir les extrémités de chaîne du chitosane. Néanmoins, une méthode de fonctionnalisation du chitosane à son extrémité aldéhyde a été développée par Guerry et al.⁸³ après blocage des fonctions amine de la chaîne. Cette méthode a été utilisée uniquement pour synthétiser des copolymères greffés à structure « inverse » PCL-g-CHT et sera détaillée lors de l'étude des structures « inverses ».

4.2. Copolymères greffés

Comme indiqué précédemment la seconde structure copolymère à base de polyester et de polysaccharide la plus répandue est constituée d'un squelette polysaccharide greffé par des chaînes latérales de polyester. Comme pour les copolymères à blocs, les structures greffées décrites par la suite seront constituées de dextrane et de chitosane.

4.2.1. Structures à base de dextrane

Il est possible de préparer des copolymères greffés à partir d'une chaîne de dextrane par les deux méthodes, le « grafting to » où une chaîne de polyester fonctionnalisée est couplée sur une fonction alcool du dextrane et le « grafting from » où les fonctions alcool du dextrane amorcent une ROP de la lactone monomère (Figure 31).

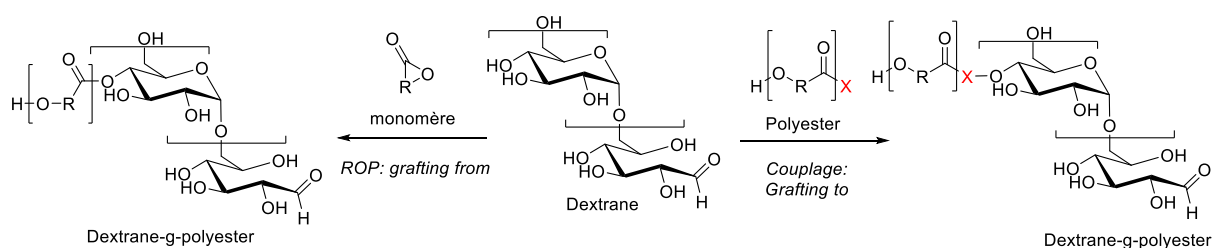


Figure 31 Synthèse de copolymères amphiphiles greffés Dextrane-g-polyester par les méthodes de « grafting from » et « grafting to »

4.2.1.1. Copolymère greffé amphiphile DEX-g-PLA

Une structure copolymère DEX-g-PLA a été obtenue par chimie « clic » CuAAC par Laville et al.⁸⁴ (Figure 32). Les auteurs ont mis en évidence qu'au-delà d'un certain seuil de fonctionnalisation, la présence d'azoture le long des chaînes de dextrane rend ce dernier plus hydrophobe et donc non-hydrosoluble. Il faut donc contrôler le taux de substitution en azoture.

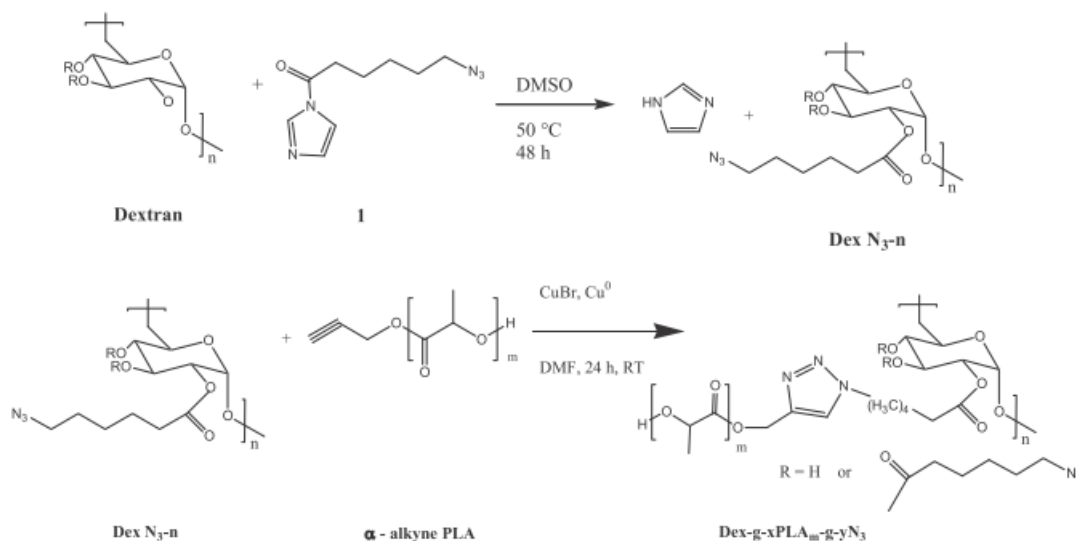


Figure 32 Synthèse de Dextrane-g-PLA par CuAAC (Laville et al.⁸⁴)

Un autre copolymère greffé à base de PLA et de Dextrane a été décrit par Toman et al.⁸⁵ Cette structure est un copolymère DEX(alkylglycéryl)-g-PLA. Dans cette étude les chaînes de dextrane ont été fonctionnalisées avec des époxydes avant le couplage du PLA par « grafting to » (Figure 33). Des nanoparticules incorporant de la doxorubicine avec un taux de charge de 12% ont été préparées et les études de libération de la doxorubicine dans le tampon phosphate (pH=7,4) à 37°C ont montré que ce principe actif est libéré sans effet « burst ». Des tests *in vitro* montrent que ces nanoparticules sont internalisées par des cellules endothéliales du

cerveau. Ces nanoparticules peuvent donc transporter un principe actif jusqu'au cerveau dans le cadre d'une thérapie anticancéreuse contre une tumeur au cerveau. Cependant les tests biologiques effectués ne permettent pas de dire si ces systèmes sont capables de franchir la barrière hématoencéphalique (BHE).

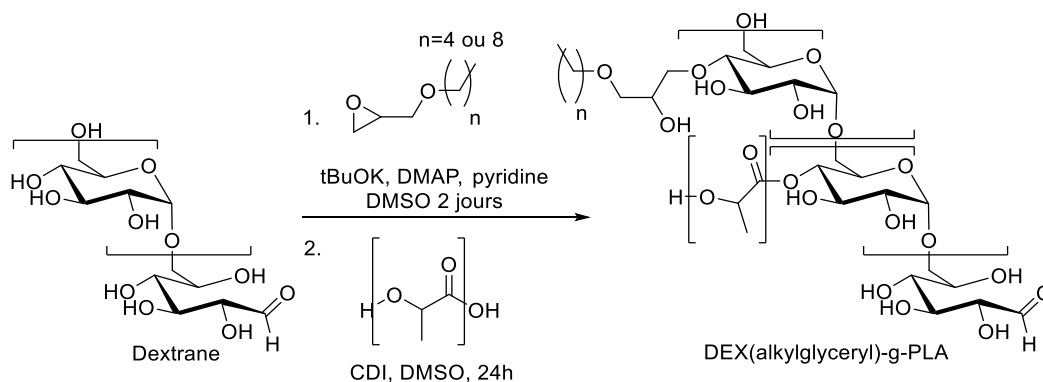


Figure 33 Synthèse de DEX(alkylglycéryl)-g-PLA (de Toman et al. ⁸⁵)

4.2.1.2. Les copolymères amphiphiles DEX-g-PCL

Différentes études sur des structures mettant en jeu le dextrane et la PCL sont répertoriées dans le Tableau 12.

Référence	Dextrane	PCL	Voie de couplage	Nano-transporteur		Principe actif
				Type	Taille [nm]	
Gref et al. ⁸⁶	4,7kDa	2,1kDa	Grafting to CDI	Nanoparticules	45 à 140nm	Aucun
Villemson et al. ⁸⁷	6kDa	2,1kDa	Grafting to CDI	Nanoparticules	200nm	Tamoxifen
Burt et al. ⁸⁸	70kDa et 500kDa	ND	Grafting from ROP	Film	Non déterminé	Paclitaxel

Tableau 12 Systèmes de libération à base de copolymère DEX-g-PCL

Gref et al⁸⁶ ont décrit un couplage consistant à activer l'acide carboxylique en extrémité de chaîne de PCL (Mn=2100 g/mol) avec du carbonyldiimidazole et à faire réagir cette extrémité sur les fonctions hydroxyle du dextrane (Mn=4700 g/mol) (Figure 34). Cette étude détail

l'influence de la balance hydrophile lipophile (BHL) de ces copolymères sur leurs propriétés de solubilité. La BHL est le rapport entre le nombre de motifs hydrophiles sur le nombre de motifs hydrophobes. Cette valeur va de 1 à 7 et selon cette balance, les propriétés de solubilité du copolymère varient. Des nanoparticules ont été préparées avec des diamètres allant de 45 à 140nm. Par la suite d'autres études ont décrit l'incorporation de principes actifs dans ces systèmes.

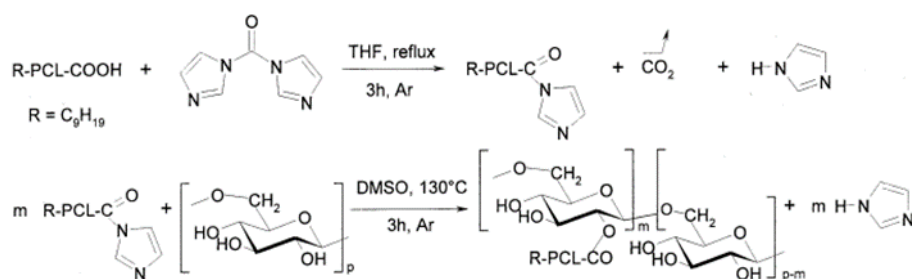


Figure 34 Synthèse de Dextrane-g-PCL par couplage CDI (Gref et al⁸⁶)

Villemson et al.⁸⁷ ont synthétisé un copolymère DEX-g-PCL par « grafting to » via un couplage par carbodiimide. Des nano-transporteurs de 200nm de diamètre contenant du tamoxifène ont été préparés avec des taux de charge en tamoxifène variant de 3,8 à 43%. Là encore, plus le copolymère est hydrophobe, plus le taux de charge est élevé. La libération du tamoxifène dans du tampon PBS à pH=7,4 a montré la présence d'un effet burst : 20% du tamoxifène encapsulé est libéré au cours de la première heure. En présence de dextranase, les nanoparticules s'agrègent au point d'atteindre une taille de l'ordre de 1 µm. Cela s'explique par l'adsorption des enzymes à la surface des nanoparticules et à la perte du dextrane qui rend ces particules hydrophobes. Les chaînes de PCL interagissent alors entre elles et forment les agrégats. En présence de lipase, les chaînes de PCL des nanoparticules sont dégradées, ce qui provoque la destruction des nanoparticules. Cette étude montre que les nanoparticules à base de DEX-g-PCL sont effectivement biodégradables.

Nouvel et al⁸⁹ ont synthétisé un copolymère de DEX-g-PCL par ROP à partir d'un dextrane silylé au préalable. Les ROP des chaînes de PCL ont été amorcées sur les fonctions alcools non-protégées résiduelles. Suite à la déprotection des alcools silylés, la structure DEX-g-PCL a été générée. Selon les conditions de protection et de déprotection, les copolymères DEX-g-PCL auront des propriétés différentes en terme de longueur de chaînes des copolymères.

Burt et al.⁸⁸ ont synthétisé des copolymères DEX-g-PCL également par ROP de caprolactone à partir de chaînes de dextrane de masses molaires 70 000 Da et 500 000 Da, beaucoup plus longues que les précédentes (Figure 35). Des films contenant du paclitaxel ont été préparés et la libération du paclitaxel étudiée. A des taux de charge de 1% il n'y a pas d'effet burst, contrairement aux films chargés à 5% et 10%. L'hypothèse formulée est que la totalité du paclitaxel des films contenant 1% de principe actif interagit avec les chaînes de PCL, ce qui favorise la rétention du composé. Dans les films contenant 5 et 10% de paclitaxel seule une partie du principe actif interagit avec les chaînes de PCL et la libération de l'autre partie sera donc beaucoup plus rapide, expliquant ainsi l'effet burst.

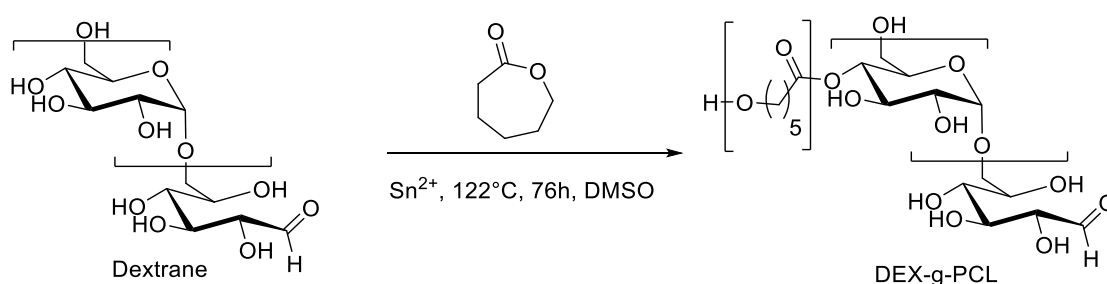


Figure 35 Synthèse de DEX-g-PCL par méthode « grafting from » (ROP) (Burt et al.⁸⁸)

Toutes ces études montrent que les copolymères DEX-g-PCL peuvent former des systèmes de délivrance d'anticancéreux. Selon les tailles des homopolymères et le nombre de chaînes de polyester greffées sur le dextrane, il est possible de moduler les propriétés des systèmes de délivrance. Le caractère biodégradable par voie enzymatique a également été démontré.

4.2.2. Structure à base de chitosane

Dans le cas du chitosane, contrairement aux structures à blocs, il n'y a pas de limitation particulière à la synthèse de copolymère avec un squelette de chitosane et des greffons de polyester car on n'utilise pas de réaction en bout de chaîne du chitosane.

4.2.2.1. Les copolymères amphiphiles CHT-g-PLA

Dans un premier temps cette partie aborde les 2 méthodes de greffage « grafting from » puis « grafting to ».

Feng et Dong⁹⁰ ont décrit une synthèse de CHT-g-PLA par ROP de L-lactide catalysée par du DMAP amorcée par les fonctions alcool du chitosane. Les fonctions amine du chitosane ont été au préalable phthaloylées afin d'améliorer sa solubilité dans le DMSO et le DMF (Figure

36). Les auteurs ont montré qu'il est possible de contrôler la proportion de PLA greffé en fonction du ratio L-lactide/Chitosane phthaloylé et de la durée de la ROP. Dans cette étude, les fonctions amine phthaloylés du chitosane n'ont pas été déprotégées après la ROP. Pour préparer des nano-transporteurs de principes actifs à partir de ce copolymère, il sera nécessaire de déprotéger les fonctions amine phthaloylés afin de générer un copolymère greffé amphiphile.

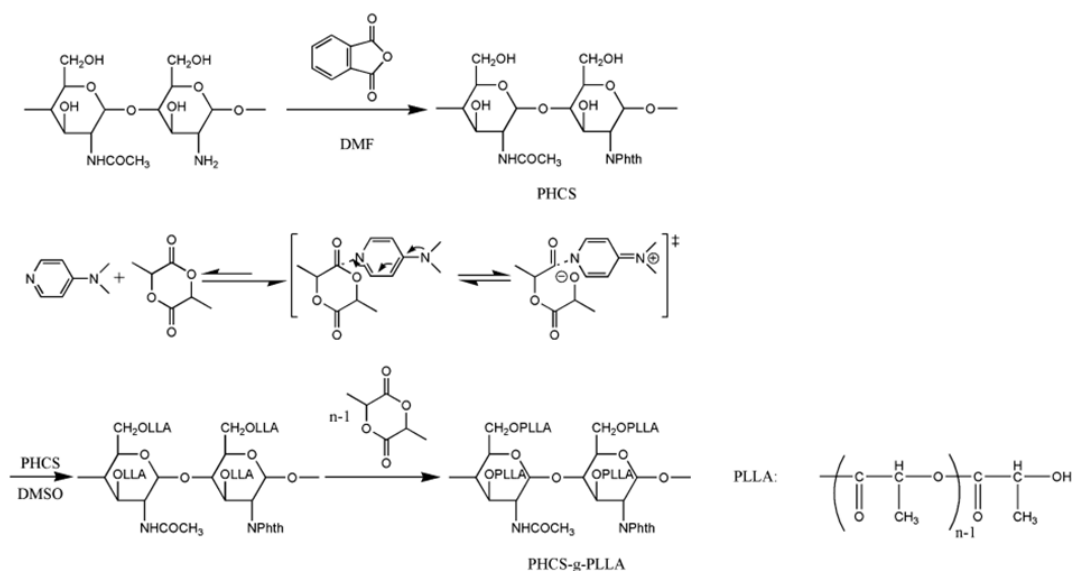


Figure 36 Synthèse de CHT-g-PLLA par ROP (Feng et Dong⁹⁰)

D'une manière similaire, Ge et al.⁹¹ ont synthétisé un CHT-g-PLA (Figure 37) qui forme des micelles de 144 nm en milieu aqueux capables d'incorporer du β -carotène. La concentration micellaire critique des micelles a été estimée à 0,035mg/mL. L'étude a montré que les micelles chargées en β -carotène présentent une meilleure activité antioxydante avec le temps que le β -carotène libre, montrant la capacité de ces nano-transporteurs à protéger un composé chimique incorporé de l'environnement externe (en solution notamment).

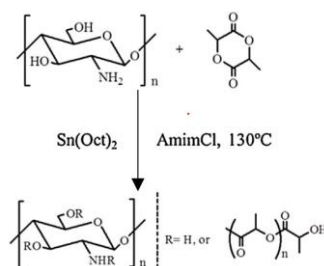


Figure 37 Synthèse de Chitosane-g-PLA dans de l'AmimCl (Ge et al.⁹¹)

Les paramètres des synthèses de CHT-g-PLA par ROP sont répertoriés dans le Tableau 13.

Référence	Chitosane	Fonction de la ROP	Catalyseur	Solvants
Feng et Dong ⁹⁰	Phthaloylé	Alcool	DMAP	DMF
Ge et al. ⁹¹	Natif	Alcool et amine	Sn(oct) ₂	AmimCl

Tableau 13 Les différents paramètres de synthèse d'un copolymère de CHT-g-PLA par ROP

D'autres méthodes de « grafting to » permettent de synthétiser des copolymères CHT-g-PLA, notamment par couplage entre les fonctions amine des motifs glucosamine et les fonctions acide carboxylique en extrémité de chaîne du polyester. L'avantage de ces voies de synthèse est qu'elles ne nécessitent pas de modification chimique du chitosane, il suffit d'activer l'acide carboxylique du polyester. De plus, avec cette méthode la masse molaire des chaînes de polyester greffées est connue, contrairement aux synthèses par grafting from. Dans ce cadre, Li et al.⁹² ont synthétisé, après activation au NHS de l'acide carboxylique du PLA, un CHT-g-PLA (Figure 38) avec un taux de greffage de 2%. Ce copolymère forme des nanoparticules en phase aqueuse de diamètre compris entre 133 et 352nm. Aucun principe actif n'a été encapsulé. Di Martino et al.⁹³ ont synthétisé un copolymère CHT-g-PLA similaire et ont encapsulé une protéine, la sérumalbumine bovine (BSA). Le taux de charge en BSA dans les nanoparticules varie de 20 à 30%. De plus, la libération de la BSA se fait sans effet burst (contrairement à la BSA incorporée dans des particules exclusivement composées de chitosane).

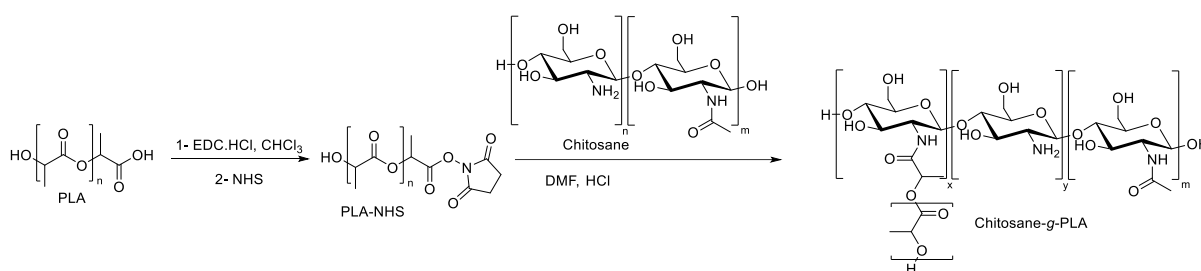


Figure 38 Synthèse de Chitosane-g-PLA par couplage NHS (Li et al.⁹², Di Martino et al.⁹³)

Des nano-vecteurs ont été préparés à partir de CHT-g-PLA en couplant des agents de ciblage de récepteurs biologiques sur les chaînes de chitosane du copolymère. Les caractéristiques des vecteurs préparés dans deux études sont répertoriées dans le Tableau 14.

Référence	Structure	Ligand fonctionnalisé	Récepteur ciblé	Cellule ciblée	Principe actif
Huang et al. ⁹⁴	Chitosane-g-PLA	Acide folique	Récepteur à l'acide folique	Cellules cancéreuses du sein MCF-7 et MCF-10A	Paclitaxel
Nie et al. ⁹⁵	Chitosane-g-PLA/DPPE	Peptide iRGD	Récepteurs intégrine	Cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231	Doxorubicine

Tableau 14 Les nano-vecteurs à base de CHT-g-PLA

L'étude de Huang et al.⁹⁴ a montré que l'ajout de ligands d'acide folique le long des chaînes de chitosane (6% de substitution) de CHT-g-PLA augmente d'un facteur 2 la quantité de paclitaxel internalisée à l'intérieur des cellules cancéreuses MCF-7.

Nie et al.⁹⁵ ont montré qu'un peptide « iRGD » (RGD d'internalisation de séquence CRGDKGPDC) greffé sur CHT-g-PLA fonctionnalisé avec du 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DPPE) permet d'obtenir des nano vecteurs encapsulant de la doxorubicine qui sont internalisés plus rapidement par des cellules surexprimant les récepteurs aux intégrines. Cette étude montre également une diminution de l'IC50 des nanovecteurs lorsqu'ils sont fonctionnalisés avec le peptide iRGD : pour les cellules cancéreuses 4T1, l'IC50 passe de 1,31 à 0,79 tandis que pour les cellules cancéreuses MDA-MB-231, cette IC50 passe de 1,98 à 1,77. Le DPPE est utilisé dans ce système pour donner un caractère pH-dépendant aux nanoparticules, l'acidité supérieure du microenvironnement tumoral accélère la libération de la doxorubicine.

Ces copolymères CHT-g-PLA permettent donc de préparer des nano-transporteurs d'antitumoraux hydrophobes **vectorisables** grâce à des ligands greffés sur les chaînes de chitosane qui ciblent des cellules tumorales surexprimant les récepteurs biologiques ciblés par les ligands (systèmes de libération de 3^{ème} génération).

4.2.2.2. Les copolymères amphiphiles CHT-g-PCL

Dans ce paragraphe sont décrites les synthèses et propriétés de CHT-g-PCL. Là encore on distinguera les méthodes « grafting from » « grafting to ».

Duan et al.⁹⁶ ont synthétisé un CHT-g-PCL par ROP de caprolactone dans de l'acide méthanesulfonique qui joue à la fois le rôle de solvant et de catalyseur de la ROP. La polymérisation est amorcée sur les fonctions alcool du chitosane et non sur les fonctions amine car ces dernières sont sous forme d'ammonium en milieu acide. (Figure 39). Cette méthode permet de conserver les fonctions amine du chitosane après la polymérisation sans réactions de protection-déprotection. Cette méthode a également été exploitée par Gu et al.⁹⁷ qui ont montré la possibilité d'auto assemblage en milieu aqueux de CHT-g-PCL sous forme de micelles. Des systèmes de délivrance de 5-fluorouracile ont été préparés à partir de ces copolymères.

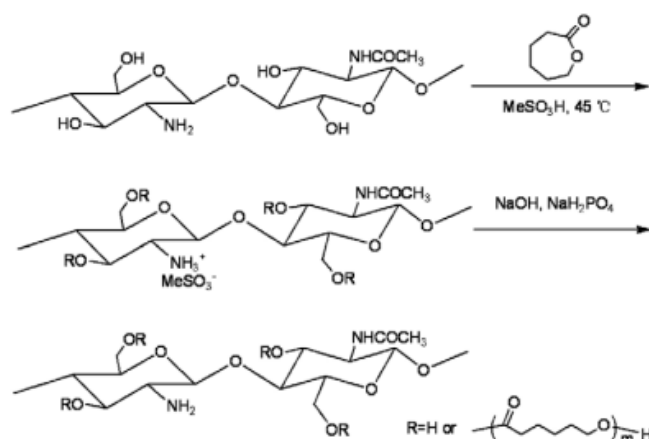


Figure 39 Synthèse de CHT-g-PCL dans de l'acide méthanesulfonique (Duan et al.⁹⁶)

Wang et al.⁹⁸ ont effectué une ROP de caprolactone catalysée à l'octanoate d'étain amorcée par les fonctions alcool et amine du chitosane dans de l'acétate de 1-ethyl-3-methylimidazolium qui solubilise à la fois le chitosane et la caprolactone (Figure 40). L'usage de ce solvant permet de greffer une plus grande quantité de PCL le long du chitosane. Cependant cette réaction ne permet pas de sélectionner les fonctions du chitosane sur lesquelles sont effectuées les ROP.

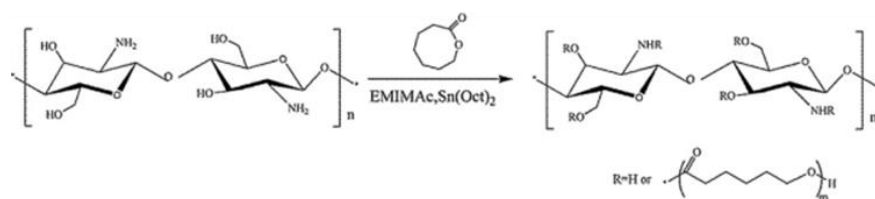


Figure 40 Synthèse de Chitosane-g-PCL par ROP dans de l'EMIMAc (Wang et al.⁹⁸)

Un autre protocole a été développé par Zhang et al.⁹⁹ A l'inverse du précédent, ce protocole permet de greffer une chaîne de PCL exclusivement sur les fonctions alcool du chitosane (Figure 41). Ce protocole a également été employé par Tang et al.¹⁰⁰

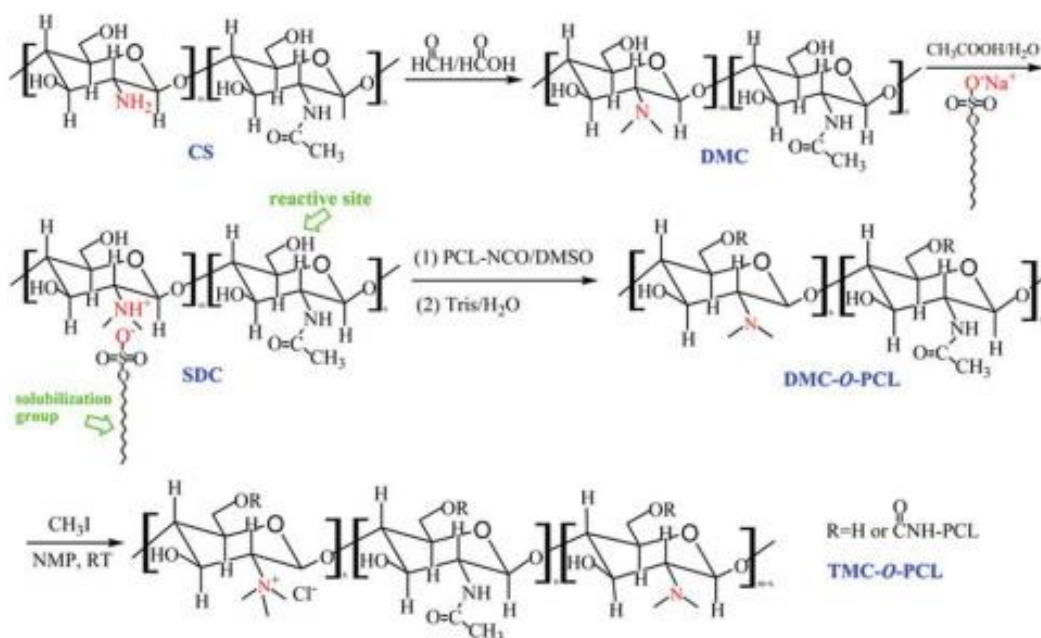


Figure 41 Synthèse de Chitosane (Triméthyl)-g-PCL (Zhang et al.⁹⁹)

Un copolymère CHT-g-PCL a été synthétisé par Sawdon et Peng⁴⁸ de manière similaire avec une PCL activée avec du NHS en extrémité de chaîne. A l'autre extrémité de la PCL une molécule d'acyclovir a été couplée (Figure 42).

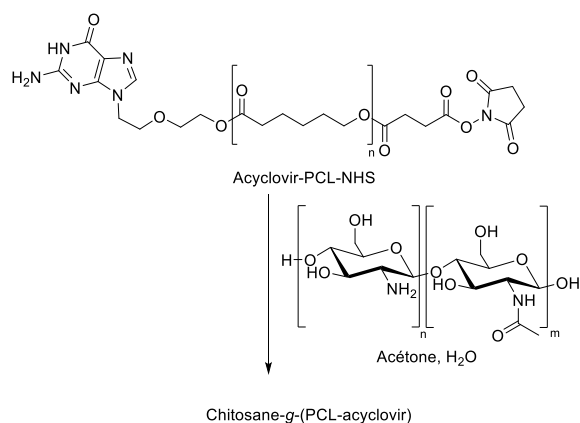


Figure 42 Synthèse de CHT-PCL par couplage avec du NHS

Un système de délivrance à base de copolymère CHT-g-PCL synthétisé par « grafting to » a été reporté par Zhang et Cao⁹⁸ (Figure 43). Les chaînes de chitosane ont été substituées au préalable avec du glycidol afin d'augmenter la solubilité du chitosane dans les solvants organiques. Des micelles chargées en doxorubicine formées à partir de ces copolymères ont un diamètre de 30nm. Lorsque les nano-objets atteignent les microenvironnements tumoraux acides, la protonation des fonctions amine peut moduler la vitesse de libération du principe actif. Il s'agit donc de systèmes « stimuli dépendants ».

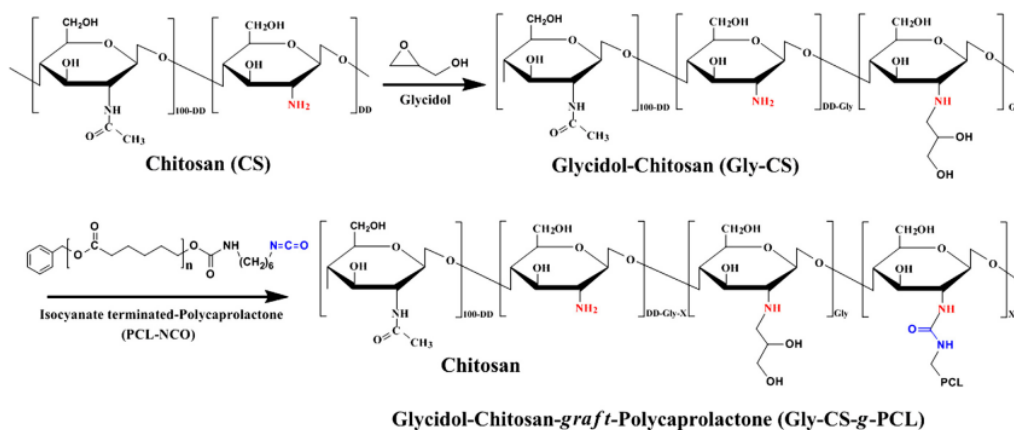


Figure 43 Synthèse de CHT-g-PCL par couplage amine-isocyanate (de Zhang et Cao¹⁰¹)

Une méthode de couplage de PCL exclusivement sur les fonctions amine du chitosane a été développée par Yu et al.¹⁰² en protégeant les fonctions alcool (Figure 44).

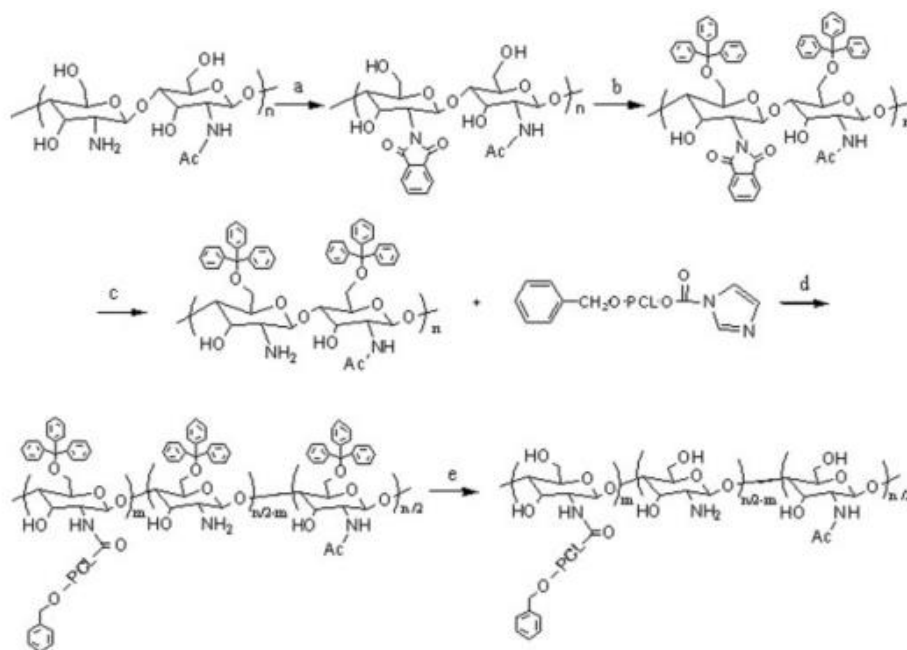


Figure 44 Synthèse de CHT-g-PCL (Yu et al.¹⁰²) par « grafting to »

Enfin Yuan et al.¹⁰³ ont synthétisé un copolymère CHT-g-(PCL, PEG) en utilisant une réaction « clic » CuAAC (Figure 45).

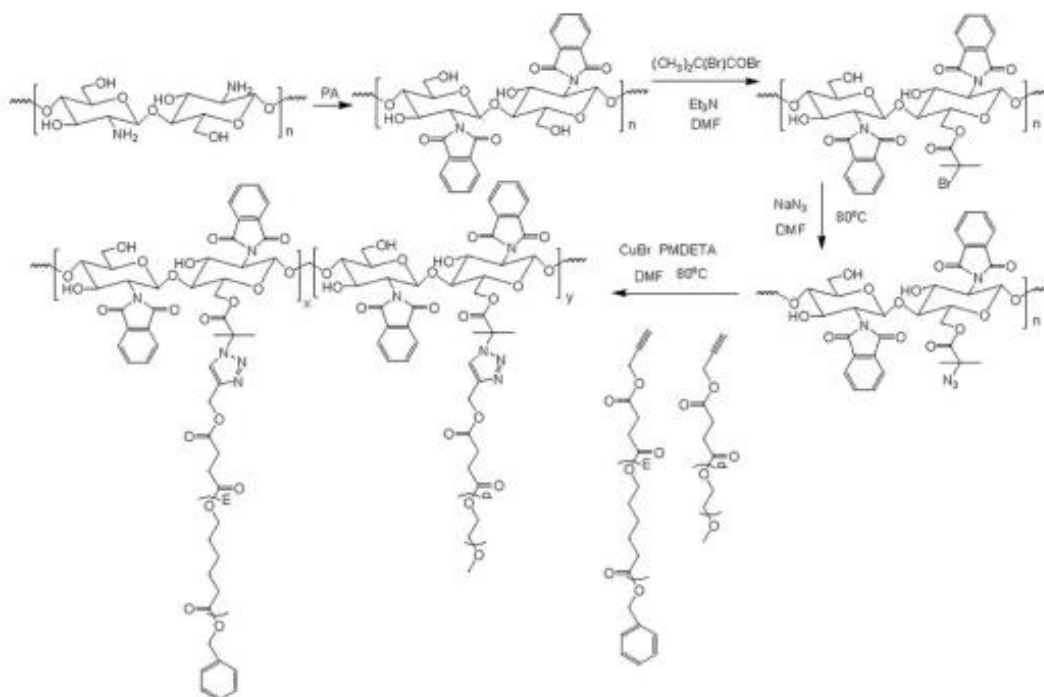


Figure 45 Synthèse de Chitosane-g-(PCL,PEG) par CuAAC (Yuan et al.¹⁰³)

Référence	Chitosane	Polyester		Structure du copolymère	Nano-objets		Principe actif
	Masse molaire	Nom	Masse molaire		Type	Taille [nm]	Nom
Zhang et Cao ¹⁰¹	15kDa	PCL	ND	CHT-g-PCL	Micelle	30	Doxorubicine
Yan et al. ²⁷	100kDa	PCL	ND	CHT-g-PCL	Micelle	110	Doxorubicine
Wang et al. ¹⁰⁴	1,8kDa	PCL	ND	CHT-g-PCL	Micelle	ND	Pyrène (molécule modèle)
Xu et al. ¹⁰⁵	3kDa	PCL	1,2kDa	CHT-g-PCL	Micelle	112	Doxorubicine

Tableau 15 Les systèmes de délivrance d'anticancéreux à base de CHT-g-PCL

Le Tableau 15 répertorie les différents systèmes de délivrance d'anticancéreux à base de CHT-g-PCL. Yan et al.²⁷ et Xu et al.¹⁰⁵ ont mis au point des systèmes copolymères où chitosane et PCL sont reliés par un pont disulfure. Les systèmes obtenus sont sensibles à deux stimuli : le pH et la concentration en réducteur (en l'occurrence de la glutathione) dans le milieu. Ainsi, lorsque les micelles chargées en doxorubicine se retrouvent dans un microenvironnement tumoral plus acide et plus concentré en réducteur, les nano-objets sont détruits (clivage des liens entre le chitosane et la PCL) et la doxorubicine sera rapidement diffusée dans les tissus tumoraux.

4.2.2.3. Synthèse de copolymère greffé à structure « inverse » PCL-g-CHT

Les études décrites dans les paragraphes précédents montrent que les polyesters PCL et PLA forment des copolymères amphiphiles à blocs polyester-*b*-PEG ou polyester-*b*-polysaccharide, ou des copolymères amphiphiles greffés polysaccharide-*g*-polyester. Comme indiqué précédemment il n'est pas possible avec un polyester non modifié sur sa chaîne de générer des structures greffées avec un squelette polyester. Dans la littérature une seule méthode est décrite par modification chimique du monomère avant polymérisation (Guerry et al.³²). Aucune méthode de modification chimique post polymérisation, qui fait l'objet de ce travail, n'est décrite pour la préparation de ces copolymères amphiphiles.

La synthèse de PCL-g-CHT de Guerry et al.³² consiste dans un premier temps à préparer une PCL chlorée par polymérisation d'une caprolactone chlorée en alpha du carbonyle. La PCL chlorée est ensuite azoturée par substitution du chlore. La PCL azoturée a ensuite été greffée

avec des chaînes latérales de chitosane propargylé en extrémité de chaîne (Figure 46) par réaction « clic » CuAAC.

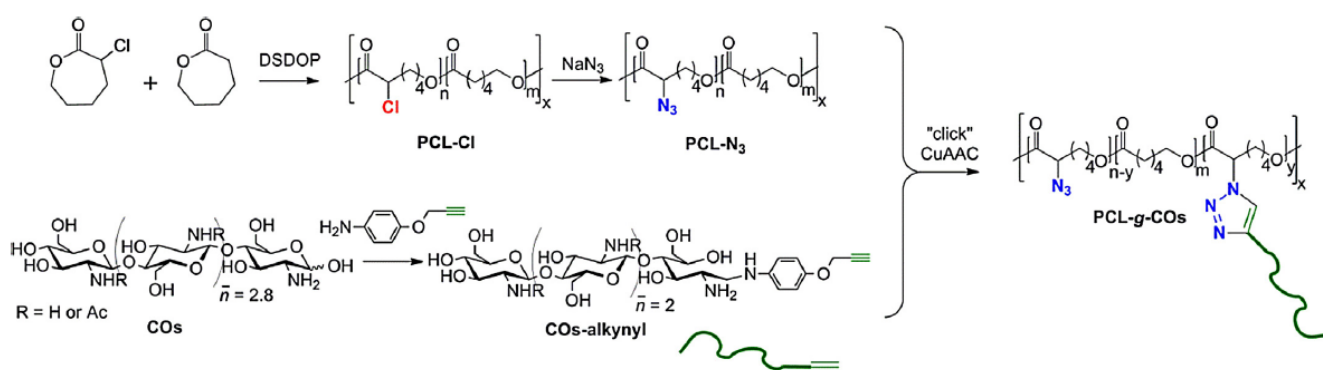


Figure 46 Synthèse de copolymère PCL-g-Chitosane, (Guerry et al.³²)

La propargylation du chitosane a été effectuée par amination réductrice catalysée par de l'aniline. Cette nouvelle méthode d'amination réductrice est décrite sur des oligochitosanes (Dp = 5) (Figure 47), et il n'est pas possible de dire si elle est applicable à des chaînes de chitosane de plus grande taille.

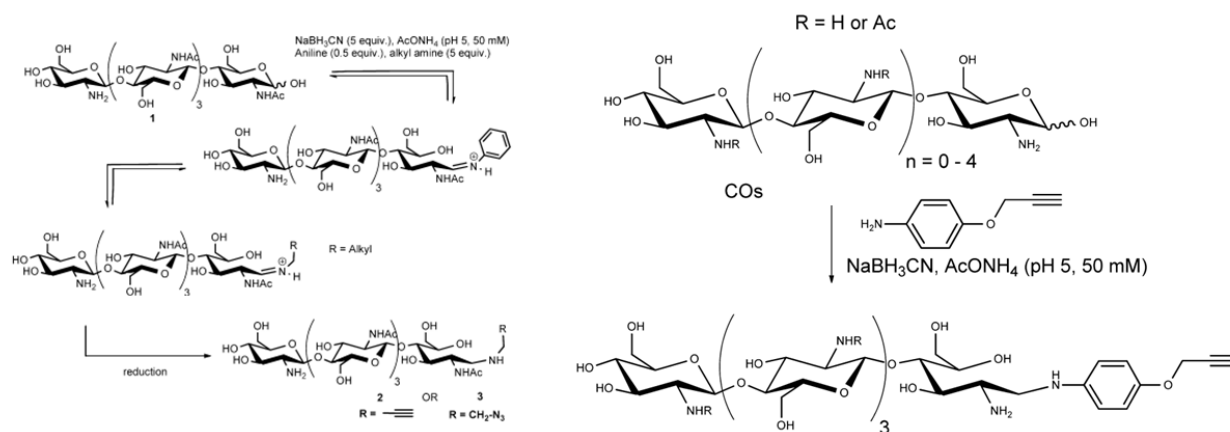


Figure 47 Action catalytique de l'aniline au cours de l'amination réductrice du chitosane (à gauche) Propargylation en extrémité de chaîne du chitosane (à droite) (Guerry et al.⁸³)

Des micelles chargées en doxorubicine ont été formées en milieu aqueux. Les propriétés du copolymère PCL-g-CHT et des micelles sont répertoriées dans le Tableau 16.

Chitosane	Polyester		Structure du copolymère	Nano-objets		Principe actif
	Masse molaire	Nom		Masse molaire	Type	Taille [nm]
2kDa	PCL	5,8 – 11,6kDa	PCL-g- CHT	Micelle	9 -18	Doxorubicine

Tableau 16 Propriétés de PCL-g-CHT et des micelles préparées à partir de ce dernier (Guerry et al.³²)

Certains lots de copolymère ont été couplés de manière covalente par une alkynyl-cystéine. Les liaisons disulfure permettent de former des systèmes micellaires agrégés avec des propriétés sensibles à la concentration en réducteur des microenvironnements tumoraux. Aucun agent de vectorisation n'a été greffé sur ces copolymères amphiphiles, il ne s'agit donc pas de systèmes de libération de 3^{ème} génération.

5. Conclusion

Parmi les divers traitements anti cancer étudiés à l'heure actuelle (chirurgie, radiothérapie, hormonothérapie, immunothérapie...) la chimiothérapie est celle qui offre le plus de potentialités. Dans cette étude, ce sont les chimiothérapies à base de composés anticancéreux qui ont été étudiées. Les traitements actuels présentent de nombreux défauts (toxicité des anticancéreux, hydrophobie, mauvaise biodisponibilité, pas de sélectivité vis-à-vis des tumeurs...). Pour pallier ces défauts, divers systèmes d'incorporation et de délivrance de principes actifs ont été mis au point. Ces systèmes visent à : i) rendre possible le **transport** dans le sang du principe actif hydrophobe, ii) protéger l'anticancéreux vis-à-vis des systèmes de métabolisation de l'organisme qui peuvent éliminer le composé avant qu'il n'ait pu agir sur le tissu tumoral (augmentation de la **biodisponibilité**), iii) protéger les cellules saines de l'organisme de la toxicité du principe actif en le retenant jusqu'à sa libération dans les zones tumorales (**ciblage**).

De nombreux systèmes de délivrance ont été reportés, notamment des nanoparticules, des micelles, des liposomes et des hydrogels. Ces systèmes peuvent être composés de différents matériaux, polymères, métaux, tensio-actifs ou silices mésoporeuses.

Les systèmes à base de polymères peuvent présenter de nombreux avantages (biocompatibilité, biodégradabilité, furtivité, propriétés stimuli-dépendantes pour la

libération de principe actif, ciblage actif...). Les copolymères amphiphiles, et notamment ceux à base de polyesters aliphatiques et de polysaccharides, sont certainement ceux qui présentent le plus d'avantages pour former de tels systèmes.

- Les polyesters aliphatiques constituent le cœur hydrophobe de ces systèmes qui assure l'incorporation de principes actifs hydrophobes. Ils sont biodégradables et biocompatibles. Notre étude portera essentiellement sur la PCL, compte tenu de son hydrophobie et de la facilité avec laquelle il est possible de fonctionnaliser sa chaîne.

- La couronne hydrophile, très souvent composée de PEG, assure la formation de micelles ainsi que la protection des systèmes de délivrance vis-à-vis des défenses de l'organisme. Les polysaccharides, beaucoup moins souvent décrits que le PEG pour ces applications, présentent l'avantage de posséder des fonctions chimiques le long des chaînes, ce qui permet le couplage de diverses molécules et notamment des agents de ciblage pour obtenir des vecteurs de 3^{ème} génération. Les polysaccharides utilisés dans ce travail sont le dextrane et le chitosane.

Les structures des copolymères amphiphiles obtenus (à blocs ou greffés) ont un gros impact sur les propriétés physico-chimiques et biologiques des nano-transporteurs. Les copolymères greffés présentent des propriétés particulièrement intéressantes (plus grande facilité de modification de la BHL, valeurs de CAC plus faibles, structures micellaires différentes). Dans le cas des copolymères amphiphiles greffés PCL-polysaccharide, les structures « classiques » polysaccharide-g-PCL, sont couramment décrites, contrairement aux structures « inverses » PCL-g-polysaccharide qui nécessitent la fonctionnalisation préalable de la chaîne de PCL. Cette fonctionnalisation sera réalisée en utilisant la méthode de substitution « anionique » de la PCL mise au point au laboratoire.

Les deux chapitres suivants seront donc consacrés aux synthèses, études et applications des structures « inverses » PCL-g-dextrane d'une part et PCL-g-chitosane d'autre part.

Chapitre 2

Copolymères greffés à structure « inverse » PCL-g-DEX

Notre objectif est donc de synthétiser un copolymère amphiphile biodégradable greffé polyester-g-polysaccharide avec une structure originale « inverse », c'est-à-dire avec un squelette hydrophobe polyester et des chaînons hydrophiles oligosaccharides. Dans la littérature, seul le groupe de Guerry *et al.* a reporté ce type de structure en décrivant la synthèse d'un copolymère poly(ϵ -caprolactone)-g-chitosane.^{30, 55} Il est donc intéressant d'étudier plus en détail cette architecture copolymère greffée « inverse » qui pourrait servir de plateforme pour diverses applications biomédicales, notamment pour la formation en milieux aqueux de nano-objets avec de nouvelles propriétés physico-chimiques et biologiques. Dans ce chapitre nous décrivons la synthèse de copolymères amphiphiles greffés « inverses » poly(ϵ -caprolactone)-g-dextrane (PCL-g-DEX).

Le poly (acide lactique) (PLA) et la poly(ϵ -caprolactone) (PCL) sont les deux polyesters les plus utilisés dans les domaines pharmaceutique et biomédical. La PCL étant plus hydrophobe, nous avons choisi ce polyester pour la synthèse du copolymère amphiphile. De plus, elle a été largement décrite pour former divers systèmes transporteurs de principes actifs¹⁰⁶ comme des microsphères / nanosphères¹⁰⁷, des hydrogels¹⁸ ou des micelles,¹⁰⁸ notamment sous forme de copolymères à blocs ou greffés « classiques » PCL-polysaccharide.¹⁰⁹

Concernant la partie hydrophile du copolymère, de nombreux polysaccharides ont été utilisés pour former des copolymères amphiphiles, notamment l'acide hyaluronique, le chitosane, le dextrane, les alginates... Notre choix s'est porté sur le dextrane, de par sa structure chimique simple constituée uniquement d'unités glucose qui est donc non chargée et porteuse uniquement de fonctions hydroxyle. Cette structure servira de modèle pour mettre au point et optimiser la synthèse du copolymère. De plus, le dextrane a été largement utilisé pour des applications biologiques de par ses propriétés de cytocompatibilité et de biodégradabilité par voie enzymatique. Par ailleurs, ce polysaccharide possède une extrémité réductrice héli-acétal en équilibre avec une fonction aldéhyde en fonction du pH du milieu (Figure 48).

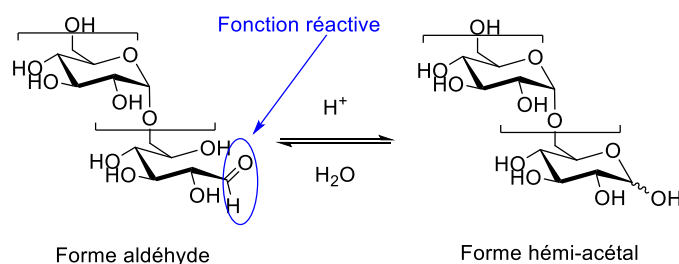


Figure 48 Equilibre aldéhyde – héli-acétal en extrémité de chaînes du dextrane

Cette fonction aldéhyde réactive permet d'effectuer des modifications chimiques en extrémité de chaîne du dextrane.

Le copolymère greffé PCL-g-DEX est synthétisé par une cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée au cuivre (CuAAC) ou cycloaddition de Huisgen. Au préalable, la PCL sera fonctionnalisée le long de ses chaînes par des groupements propargyl et le dextrane modifié en extrémité de chaîne par azotation. Cela permettra donc d'obtenir une structure copolymère greffée de type « peigne ». Des nano-objets seront ensuite préparés en milieu aqueux à partir de ces copolymères et chargés en agent anti-cancéreux. Ces nano-objets assureront le transport et la protection du principe actif jusqu'aux cellules cancéreuses par lesquelles ils seront internalisés pour libérer ensuite l'agent anti-cancéreux à l'intérieur des cellules cancéreuses (Figure 49). Les copolymères seront également marqués avec un fluorophore afin de préparer des nano-objets fluorescents et d'étudier leur internalisation cellulaire.

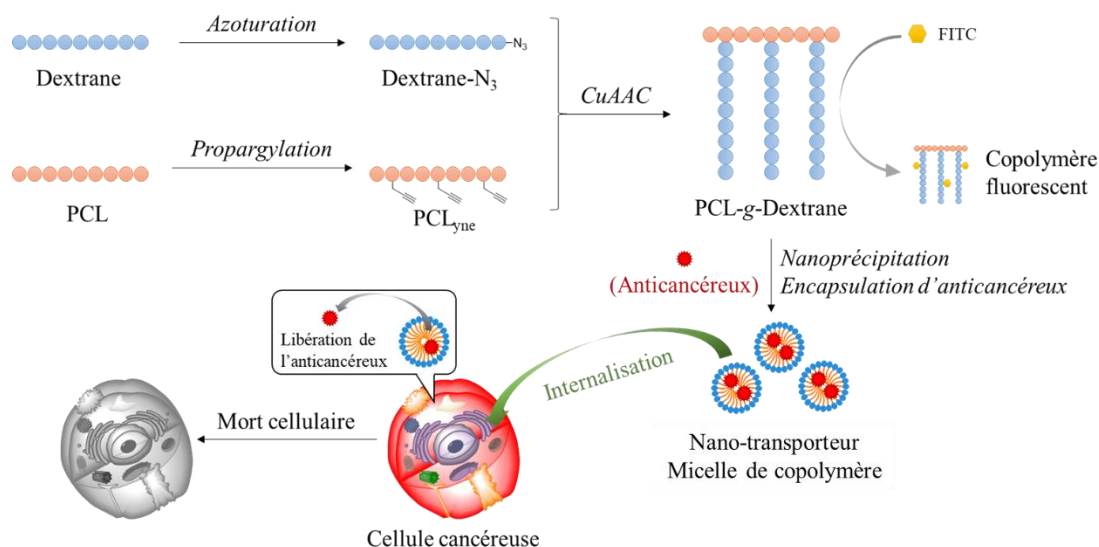


Figure 49 Synthèse d'un copolymère PCL-g-Dextrane, formation de nano-transporteurs chargés en agents anticancéreux et internalisation cellulaire de ces nano-systèmes

1 Fonctionnalisation de PCL par la voie anionique

Pour former des copolymères greffés PCL-g-dextrane de structure « inverse » il est nécessaire de fonctionnaliser les chaînes de PCL. Classiquement, la fonctionnalisation de squelettes PCL se fait par polymérisation par ouverture de cycle (ROP) de monomères cycliques fonctionnels dérivés de caprolactone. Cependant, cette méthode est longue (plusieurs

semaines), elle est limitée aux faibles masses molaires ($M_n < 10\,000$ Da) et les rendements sont souvent faibles du fait de l'étape de fonctionnalisation des monomères.³⁰ Notre groupe a reporté il y a quelques années une méthode générale de modification chimique des chaînes de polyesters le long de la chaîne par voie anionique.⁶ C'est une réaction « one pot » simple et rapide qui consiste dans une première étape à activer le polyester par voie anionique en α du carbonyle des fonctions ester puis à effectuer une substitution sur les macro-carbanions formés. Plusieurs grammes de PCL fonctionnalisée peuvent ainsi être obtenus en une journée à partir d'une PCL commercialement disponible, avec des taux de substitution autour de 10 %, ce qui est suffisant pour obtenir une structure amphiphile par greffage de dextrane. En revanche, ce procédé engendre des coupures de chaînes modérées des polyesters du fait de la présence d'une base forte, le diisopropyl amidure de lithium (LDA). En effet, les carbanions formés peuvent effectuer une autocondensation intramoléculaire sur le carbonyle d'une fonction ester, provoquant ainsi le clivage d'un lien ester entre deux motifs. Ce mécanisme a été reporté par Ponsart *et al.*¹¹⁰ et il est représenté sur la Figure 50. Cependant, ce phénomène est connu et prédictible.

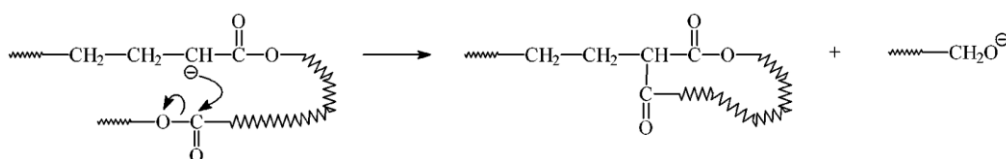


Figure 50 Réaction d'autocondensation intramoléculaire provoquant le clivage d'une chaîne polyester au cours d'une activation anionique (Ponsart *et al.*¹¹⁰)

Dans le but de greffer le dextrane par cycloaddition de Huisgen, la PCL sera donc propargylée par réaction du bromure de propargyle sur les carbanions formés lors de l'activation anionique, comme rapporté par Leroy *et al* et Al Samad *et al* (Figure 51).^{111, 8}

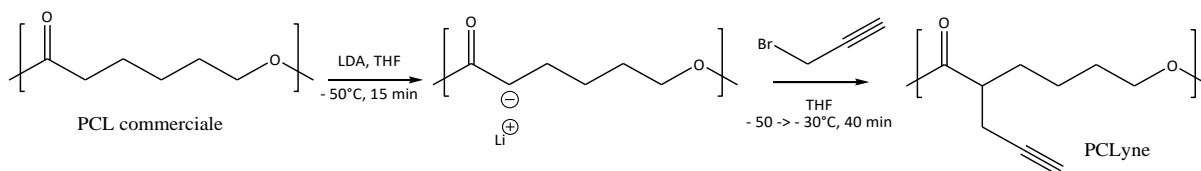


Figure 51 Synthèse de PCL propargylée par voie anionique

La PCL commerciale utilisée a une masse molaire de $45\,400\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (dispersité : $\mathcal{D} = 1,48$) mesurée par GPC dans le THF. Elle sera notée par la suite PCL⁴⁵⁴⁰⁰. Deux lots de PCL propargylées (PCL_{yne}) ont été synthétisés avec des masses molaires et des taux de substitution différents. Ces lots seront notés de la façon suivante :



X = masse molaire moyenne en nombre de la PCL_{yne} déterminée en GPC (THF)

Y = taux de substitution (DS_(-C≡C-H)) déterminé par RMN-¹H (CDCl₃)

Lots de PCL _{yne}	DS(-C≡C-H) ^a	\overline{M}_n ^b (g.mol ⁻¹)	\overline{D} ^b
<i>PCL commerciale</i> (PCL ⁴⁵⁴⁰⁰)	/	45 400	1,5
PCL _{yne} ¹⁷⁰⁰⁰ _{0,08}	8 %	17 000	2,6
PCL _{yne} ²⁷⁰⁰⁰ _{0,10}	10 %	27 000	2,3

^a déterminé par RMN-¹H (CDCl₃) ^b déterminée par GPC (THF)

Tableau 17 Caractéristiques des lots de PCL_{yne}

Le Tableau 17 détaille les caractéristiques des divers lots de PCL_{yne}.

L'analyse par RMN-¹H permet de déterminer le taux de substitution (DS_(-C≡C-H)) de la PCL_{yne} en calculant le rapport entre l'intégration du proton de l'alcyne à 2,0 ppm et l'intégration d'un proton du groupe méthylène de la PCL à 4,1 ppm (Figure 52).

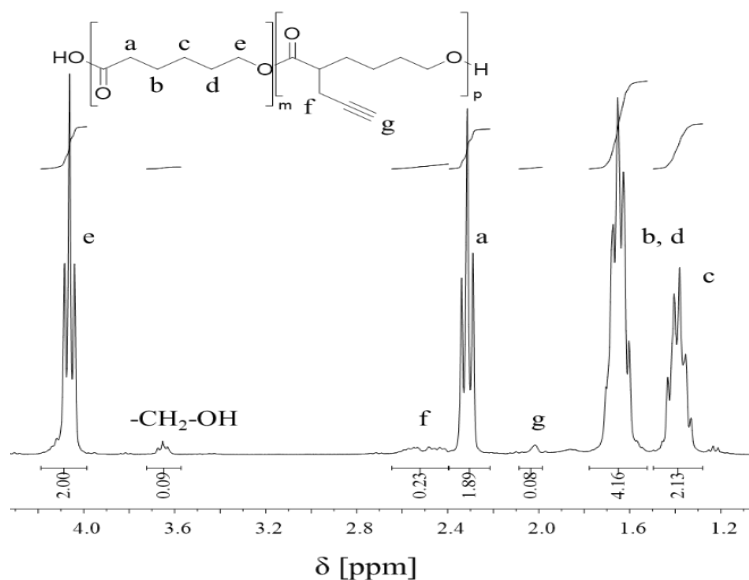


Figure 52 RMN-¹H de la PCL propargylée PCL_{yne}¹⁷⁰⁰⁰_{0,08} (CDCl₃, 300 MHz)

Comme attendu, les valeurs des masses molaires des PCL_{yne} montrent que la voie anionique engendre une diminution des masses molaires due à la présence du LDA.

2 Synthèse de dextrane azoturé

Le dextrane doit être modifié chimiquement afin d'introduire des groupements azoture en extrémité de chaîne et pouvoir ainsi les faire réagir par chimie clic avec les fonctions propargyle des PCL_{yme}. Les extrémités réductrices des chaînes de dextrane étant constituées de fonctions aldéhyde, nous avons choisi la méthode d'amination réductrice pour, dans un premier temps, fonctionnaliser les extrémités de chaînes par un groupement bromopropyle qui sera ensuite transformé en groupement azidopropyle (Figure 53).

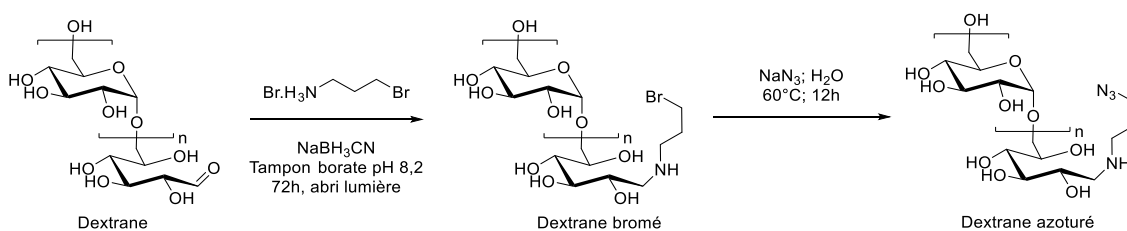


Figure 53 Fonctionnalisation du dextrane en extrémités de chaînes

Deux lots de dextrane commerciaux avec des masses molaires de 2500 et 9800 g.mol⁻¹ (déterminées par GPC dans un tampon acétate à pH 4,5), respectivement DEX²⁵⁰⁰ et DEX⁹⁸⁰⁰, ont été fonctionnalisés afin d'évaluer l'influence des longueurs de chaînes sur les propriétés du copolymère et des nano-objets issus de ces lots de dextrane.

La première étape consiste à faire réagir la bromopropylamine sur l'extrémité aldéhyde de la chaîne de dextrane par amination réductrice.¹¹² C'est une réaction « one pot » qui consiste à former une imine par réaction de l'amine et de l'aldéhyde. Cette fonction imine est ensuite réduite par un agent réducteur pour former une amine secondaire alkylée. L'utilisation du cyanoborohydrure de sodium comme agent réducteur permet d'effectuer ces deux premières étapes « one pot », cet agent réduisant spécifiquement les fonctions aldéhyde et cétone. L'amination réductrice est réalisée à pH 8,2 afin que l'amine soit sous forme non protonée nucléophile R-NH₂. Un temps de réaction de 72h est nécessaire afin que la réaction soit quantitative.¹¹² Le dextrane obtenu est ensuite précipité dans du méthanol puis dialysé contre de l'eau (seuil de coupure : 1000 Da) afin d'éliminer la bromopropylamine et les sels résiduels. La réaction s'effectuant en extrémité de chaîne de dextrane, l'analyse par RMN ¹H du produit purifié ne permet pas de mettre en évidence la formation du dérivé bromé par manque de sensibilité.

La seconde étape consiste à substituer le brome par une fonction azoture par réaction de l'azoture de sodium sur le bromopropyl-dextrane pendant 12 h à 60 °C. Le polymère obtenu est dialysé contre de l'eau distillée pendant 24 h (seuil de coupure 1000 Da). Comme pour le bromopropyl-dextrane, l'analyse RMN ¹H des lots de dextrane azoturé ne permet pas de mettre en évidence la modification chimique.

L'analyse infra-rouge à Transformée de Fourier (IR-TF) n'a pas non plus permis d'observer le pic autour de 2100 cm⁻¹ caractéristique de la fonction azoture. Afin de confirmer que les fonctions azoture sont en trop faible quantité pour être visibles par IR-TF, un mélange des deux réactifs, bromopropyl-dextrane et azoture de sodium, en quantité équimolaire d'azoture et d'extrémités de chaînes dextrane, a été analysé par IR-TF : aucun pic caractéristique des fonctions azoture n'apparaît, ce qui confirme le manque de sensibilité de cette technique.

Une analyse élémentaire a également été effectuée sur le lot provenant du DEX²⁵⁰⁰. La présence d'azote a pu être vérifiée et un taux de substitution de 60 % a pu être calculé.

Enfin, une analyse par GPC dans un tampon acétate pH 4,5 a été réalisée sur les lots de dextrane azoturé. Ces lots ont été notés DEX-N₃^X avec X leur masse molaire (Tableau 18).

Lots de DEX natif	Dispersité du DEX natif ^a	Lots de DEX-N ₃	Masse molaire du DEX-N ₃ (g.mol ⁻¹) ^a	Dispersité du DEX-N ₃ ^a
DEX ²⁵⁰⁰	2,2	DEX-N ₃ ⁶⁰⁰⁰	6000	1,5
DEX ⁹⁸⁰⁰	1,8	DEX-N ₃ ¹⁴⁰⁰⁰	14 000	N.D.

^adéterminé par GPC dans tampon acétate pH 4,5

Tableau 18 GPC dans le tampon acétate pH 4,5 des lots de dextrane azoturé

On observe une légère augmentation des masses molaires suite à l'azotation. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'on couple des groupes propyle hydrophobes qui peuvent engendrer des interactions interchaînes. Par ailleurs, la dispersité diminue au cours de la réaction, ce qui est probablement dû à la purification par précipitation et dialyse qui élimine les chaînes les plus courtes.

D'une manière générale c'est la mise en évidence du greffage de ces lots de dextrane modifiés sur des chaînes de PCL_{yne}, détaillé ultérieurement, qui permettra de confirmer *a posteriori* l'azotation du dextrane.

3 Copolymère PCL-g-DEX

Le copolymère PCL-g-DEX est préparé par cycloaddition de Huisgen à partir des deux homopolymères fonctionnels PCL_{yne} et DEX-N₃. Plusieurs méthodes de chimie « clic » ont été développées ces dernières années car ces réactions possèdent de nombreux avantages : elles sont quantitatives, elles se font dans des conditions douces non destructrices, ce qui évite notamment la dégradation de la PCL, elles sont tolérantes à de nombreux groupements fonctionnels et ce sont des réactions spécifiques, ce qui permet d'éviter la formation de sous-produits de réactions secondaires ainsi que des étapes de protection/déprotection. La chimie « clic » catalysée au cuivre (CuAAC) se trouve être particulièrement efficace pour ce type de réaction de greffage « onto » de polymères.^{13-17, 30, 55}

3.1 Synthèse du copolymère PCL-g-DEX par chimie « clic » CuAAC

Un protocole de CuAAC appliqué à une PCL_{yne} a été décrit par El Habnoui *et al*⁵³ pour le greffage d'un dérivé azoturé de l'acide diéthylènetriaminopentaacétique sur les fonctions propargyle de la PCL_{yne}. Nous l'avons adapté au DEX-N₃ et à la PCL_{yne} en utilisant 1,5 ou 3 équivalents de fonctions azoture par rapport aux fonctions propargyle. Ces 2 rapports différents permettent d'évaluer l'influence de ce ratio sur le taux de greffage et sur la balance hydrophile-hydrophobe du copolymère formé. Le couplage a été effectué dans du DMSO, un solvant commun à la PCL_{yne} et au DEX-N₃. Le catalyseur employé est le bromure de cuivre (I) complexé par un ligand, le (N,N,N',N'',N''-pentamethyldiethylenetriamine) (PMDETA). Pour éviter l'oxydation du cuivre (I) en cuivre (II), des cycles vide-argon ont été effectués au départ et la réaction a été réalisée sous argon (Figure 54).

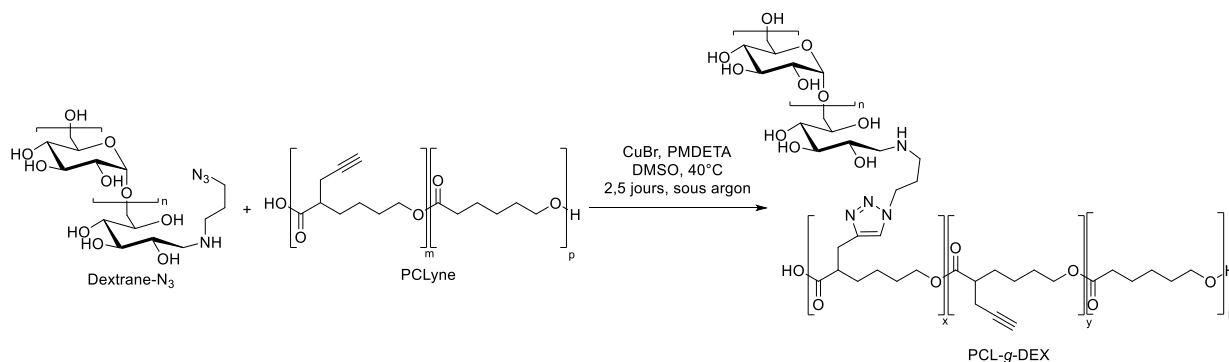
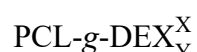


Figure 54 Synthèse du copolymère PCL-g-dextrane par chimie clic CuAAC

Le produit de réaction a ensuite été purifié par dialyse (seuil de coupure 6-8 kDa) contre de l'eau distillée pendant deux semaines, temps nécessaire pour l'élimination du cuivre résiduel et des chaînes d'homopolymères n'ayant pas réagi. L'élimination des sels de cuivre, toxiques pour les cellules en milieu biologique, est ici fondamentale.

3.2 Caractérisations des copolymères PCL-g-DEX

Les lots de copolymères synthétisés sont notés :



Où : X correspond à la masse molaire du copolymère, mesurée par GPC (DMF)

Y correspond à la BHL du copolymère, déterminée par RMN ^1H

Les copolymères synthétisés ont été analysés par IR-TF. Les vibrations caractéristiques du dextrane, par exemple la liaison -C-O- à 1015 cm^{-1} , et celles caractéristiques de la PCL comme le carbonyle de l'ester à 1726 cm^{-1} (Figure 55) sont bien présentes, mais cette analyse ne renseigne pas sur le greffage effectif du DEX- N_3 sur la PCL_{yne}.

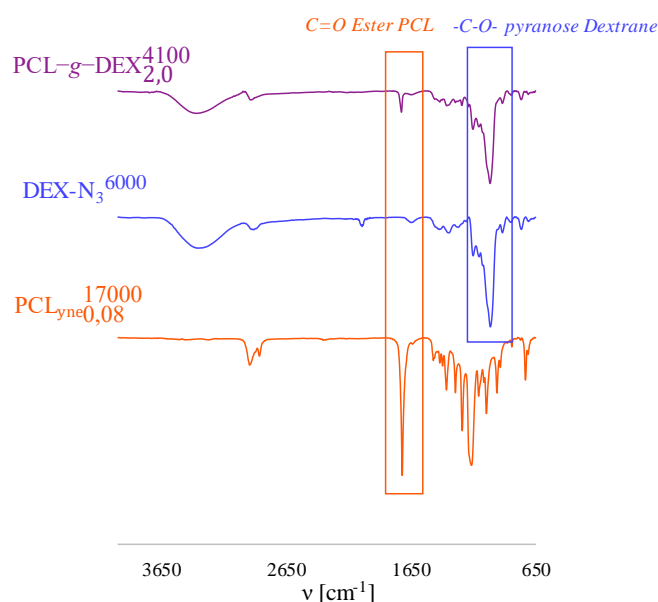


Figure 55 Analyses IR-TF de DEX- N_3^{6000} , PCLyne $^{17000}_{0,08}$ et du copolymère PCL-g-DEX $^{4100}_{2,0}$

Les analyses RMN-¹H dans le DMSO_{d6} des copolymères obtenus montrent aussi la présence du dextrane avec ses pics correspondants à 3,0-3,8 ppm (C-H des unités glucose), 4,4-5,0 ppm (O-H), 4,7 ppm (proton anomérique) et ceux de la PCL à 4,0 ppm (CH₂-O-), 2,7 ppm (CH-CO), 2,3 ppm (-CH₂-CO-), 1,5 (-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-) et 1,3 ppm (-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-) (Figure 56). Le pic du proton des cycles triazoles ne sont pas observables au cours de ses analyses.

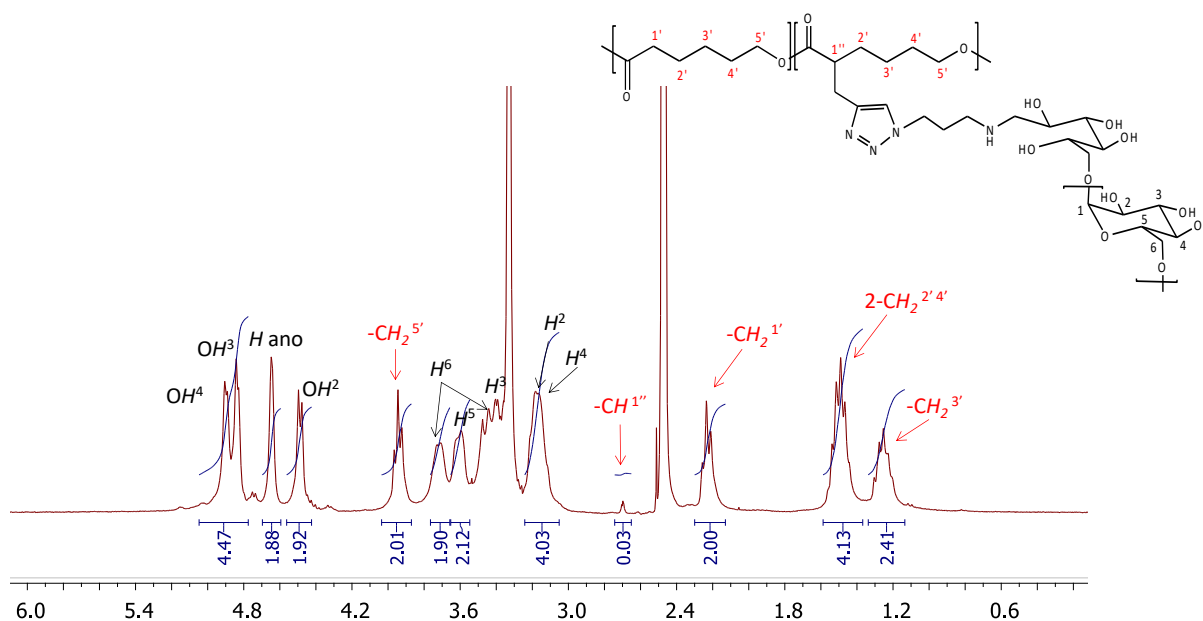


Figure 56 Analyse RMN-¹H (DMSO_{d6}, 300 MHz) du copolymère PCL-g-DEX_{2,0}⁴¹⁰⁰

L'analyse par RMN ¹H permet de déterminer la BHL des copolymères, sous réserve que les chaînes d'homopolymères de DEX-N₃ et de PCL_{yne} résiduelles (non greffées) aient bien été éliminées. La BHL correspond ici au rapport du nombre de motifs glucose (Glu) du dextrane sur le nombre de motifs acide hydroxy-caproïque (AHC) de la PCL. Elle peut donc être calculée par le rapport d'intégrations du proton anomérique du dextrane (H¹) à 4,7 ppm et d'un des protons des groupes méthylène de la PCL (-CH₂-CO-) à 2,3 pm :

$$\text{BHL} = \frac{\text{intégration H}^1 \text{ Glu (4,7 ppm)}}{\text{intégration 1H de (-CH}_2\text{-CO-) du motif AHC (2,3 ppm)}}$$

Les valeurs de BHL des différents lots de copolymères sont données dans le Tableau 19.

Les analyses de RMN ¹H permettent également de déterminer le taux de greffage de la réaction, toujours sous réserve que les homopolymères résiduels aient été éliminés (Tableau

19). Le taux de greffage est calculé par le rapport d'intégration d'un proton de la PCL à 2,7 ppm ((CH-CO) en α du site de greffage, et d'un proton de la PCL à 2,3 ppm (-CH₂-CO-). De plus, l'intégration du proton anomérique et le degré de polymérisation du dextrane (DP_n = 68) confirment ce taux de greffage et démontrent également qu'il n'y a donc pas de chaînes de dextrane libres. Sachant que la PCL est propargylée à 8 % et connaissant le taux de chaînes de dextrane azoturées, on peut déterminer le taux de substitution du copolymère (Tableau 19). Par exemple pour le copolymère PCL-g-DEX_{2,0}⁴¹⁰⁰ (RMN ¹H, Figure 56), avec une PCL_{lyne} propargylée à 8 % et 60% des chaînes de dextrane azoturées (d'après l'analyse élémentaire), le taux de substitution est de 62,5 %.

copolymères	PCL_{lyne}	DEX-N₃	équivalents N₃/CH₂-C≡CH	BHL	Taux de greffage	Taux de substitution
<i>PCL-g-DEX_{2,0}⁴¹⁰⁰</i>	<i>PCL_{lyne}¹⁷⁰⁰⁰_{0,08}</i>	<i>DEX-N₃⁶⁰⁰⁰</i>	1,5	2,0	3 %	62,5 %
<i>PCL-g-DEX_{6,8}⁴⁰⁰⁰</i>			3,0	6,8	10 %*	> 100 %
<i>PCL-g-DEX_{11,5}⁶³⁰⁰</i>		<i>DEX-N₃¹⁴⁰⁰⁰</i>	1,5	11,5	30%*	> 100 %

*Le taux de greffage maximum qu'il est possible d'atteindre est de 8 %

Tableau 19 Caractéristiques des différents copolymères PCL-g-Dextrane

D'après les caractéristiques des copolymères calculées à partir des analyses RMN ¹H, on observe qu'en augmentant le nombre d'équivalents en azoture dans la réaction, on augmente la BHL du copolymère. En revanche, pour les copolymères PCL-g-DEX_{6,8}⁴⁰⁰⁰ PCL-g-DEX_{11,5}⁶³⁰⁰, le taux de greffage et le taux de substitution ne sont pas cohérents. Un excès de dextrane est donc présent dans le produit de réaction montrant un problème de purification lors de la dialyse. Là encore, les analyses de RMN ¹H ne permettent pas de confirmer le greffage effectif des chaînes dextrane sur les chaînes PCL : en effet, le groupement triazole qui se forme lors de la cycloaddition entre la fonction azoture et le groupe propargyle n'est pas détecté en RMN ¹H comme attendu à 8,1 ppm par suite d'un manque de sensibilité de la technique. Pour confirmer le greffage, des analyses par GPC et par RMN DOSY ont été réalisées sur les copolymères.

Les analyses par GPC ont été effectuées dans du DMF (Figure 57).

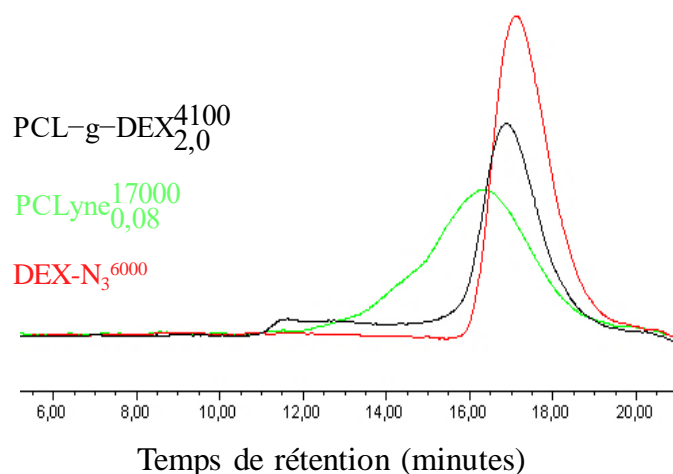


Figure 57 Analyses GPC (DMF) de $DEX-N_3^{6000}$, $PCLyne^{17000}$ et du copolymère $PCL-g-DEX_{2,0}^{4100}$

Les chromatogrammes des copolymères ont une distribution monomodale avec une dispersité étroite. Ceci suggère que l'on a bien un copolymère sans homopolymère résiduel. Les valeurs de masse molaire et de dispersité des différents copolymères sont détaillées dans le Tableau 20.

Lots de copolymère	PCL-g-DEX		DEX-N ₃		PCL _{lyne}	
	\overline{M}_n (g.mol ⁻¹)	Đ	\overline{M}_n (g.mol ⁻¹)	Đ	\overline{M}_n (g.mol ⁻¹)	Đ
$PCL-g-DEX_{2,0}^{4100}$	4100	1,5	2900	1,5	6700	3,7
$PCL-g-DEX_{11,5}^{6300}$	6300	1,4	5700	1,4		
$PCL-g-DEX_{6,8}^{4000}$	4100	1,4	3400	1,2		

Tableau 20 Masse molaire (\overline{M}_n) et dispersité (Đ) (GPC DMF) des copolymères PCL-g-DEX et de leurs homopolymères DEX-N₃ et PCL_{lyne} correspondants

La masse molaire des copolymères est un peu plus élevée que celle des DEX-N₃ correspondants, ce qui suggère également la formation d'un copolymère, bien que cette masse molaire soit plus faible que celle de la PCL_{lyne}, mais ceci est une observation assez classique en GPC lorsque des copolymères amphiphiles sont analysés, du fait du repliement des chaînes.

Le greffage des chaînes dextrane sur les chaînes PCL a finalement été confirmé par des analyses de RMN DOSY. Le spectre DOSY du copolymère $PCL-g-DEX_{2,0}^{4100}$ dans le DMSO-d₆ est présenté Figure 58. On peut observer que les signaux correspondant à la PCL et ceux correspondant au dextrane sont alignés et présentent donc le même coefficient de diffusion (en ordonnées), ce qui prouve le greffage des chaînes dextrane sur les squelettes de PCL.

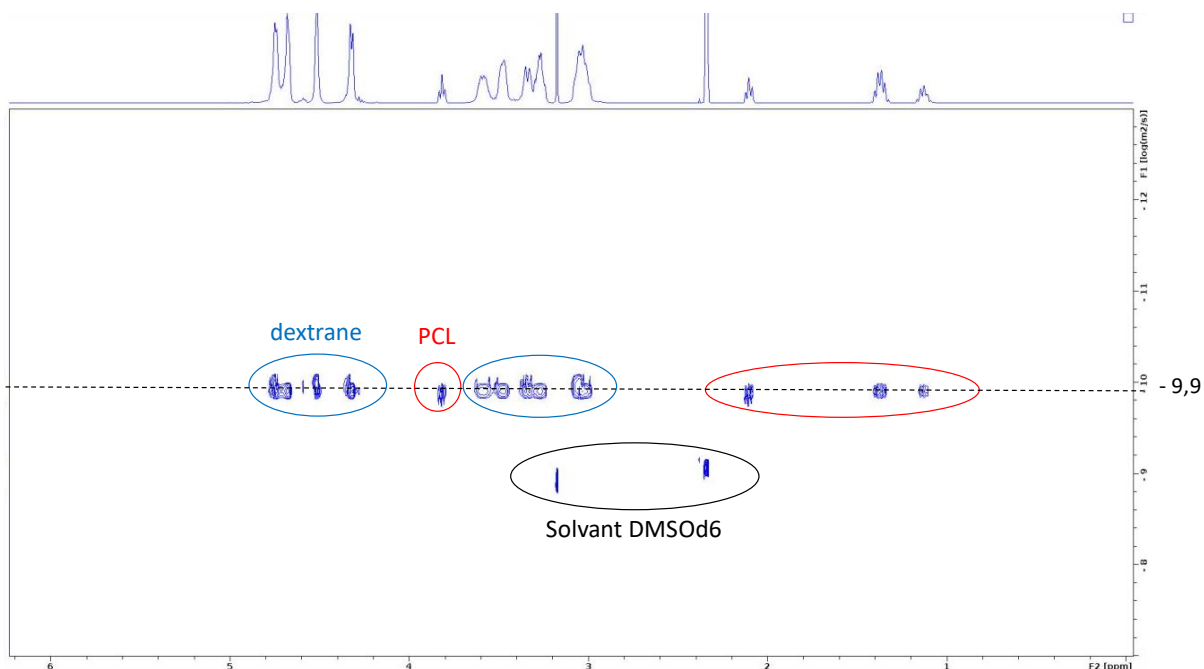


Figure 58 RMN DOSY (DMSOd6) du copolymère $PCL-g-DEX_{2,0}^{A100}$

De plus, aucun signal correspondant aux homopolymères, c'est-à-dire avec un coefficient de diffusion plus bas, n'apparaît, ce qui confirme l'absence de chaînes d'homopolymères résiduels, comme observé en GPC. Pour vérifier ceci, une superposition des spectres RMN DOSY du copolymère et des $DEX-N_3$ et PCL_{lyne} correspondants a été réalisée (Figure 59).

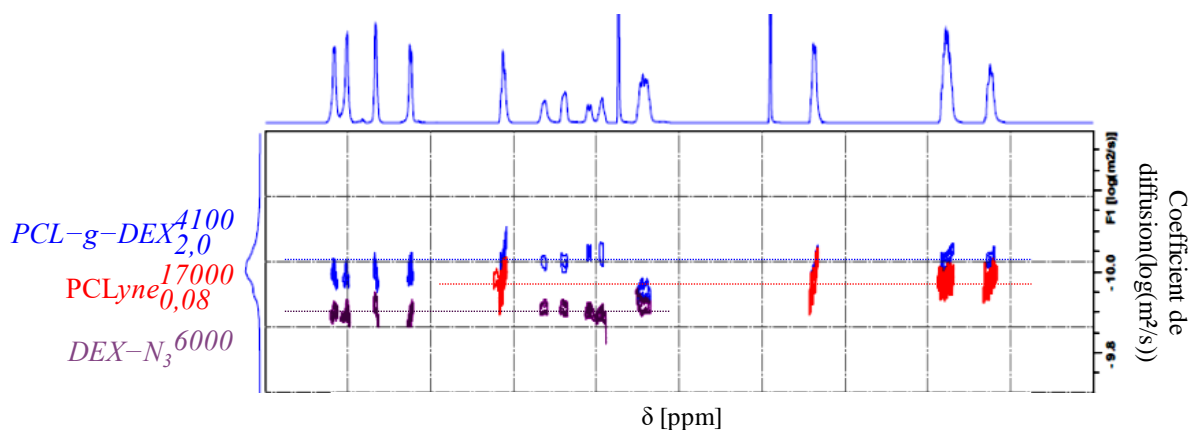


Figure 59 Superposition des RMN DOSY (DMSOd6) du $DEX-N_3^{6000}$, de la PCL_{lyne}^{17000} et du copolymère $PCL-g-DEX_{2,0}^{A100}$

La purification par dialyse a donc été efficace pour éliminer les chaînes de dextrane et/ou de PCL libres.

Une dernière analyse par ICP-MS (spectrophotométrie d'émission atomique avec torche à plasma couplée à la spectrométrie de masse) a été effectuée sur les copolymères afin de vérifier

l'élimination du cuivre résiduel lors de la purification. Cette analyse ICP-MS donne une proportion de cuivre de 6,95 ppm, ce qui est très satisfaisant pour des applications biologiques ($[Cu] < 10$ ppm). La non-toxicité des copolymères sera par ailleurs vérifiée par des études de cytotoxicité sur des nano-objets préparés à partir de ces copolymères. La méthode de purification par dialyse a donc été efficace pour éliminer le cuivre issu de la réaction de chimie « clic ».

3.3 Marquage fluorescent de copolymère PCL-g-DEX

Un copolymère PCL-g-dextrans fluorescent a été synthétisé afin de préparer des nano-objets dont l'internalisation cellulaire sera montrée par microscopie de fluorescence. Pour cela une molécule fluorescente, l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), a été couplée de façon covalente sur les fonctions alcool des chaînes de dextrane du copolymère PCL-g-DEX⁴¹⁰⁰_{2,0}. Rappelons que nous avons choisi de former la partie hydrophile des copolymères avec des polysaccharides plutôt que du poly(éthylène glycol) classiquement utilisé, dans le but de coupler aisément des molécules d'intérêt telles que des fluorophores. L'avantage du couplage covalent du fluorophore est d'éviter sa diffusion dans le milieu lors de l'analyse par imagerie (ce qui induirait un bruit de fond fluorescent gênant pour l'analyse).

Le couplage de FITC sur le copolymère PCL-g-DEX est schématisée sur la Figure 60.

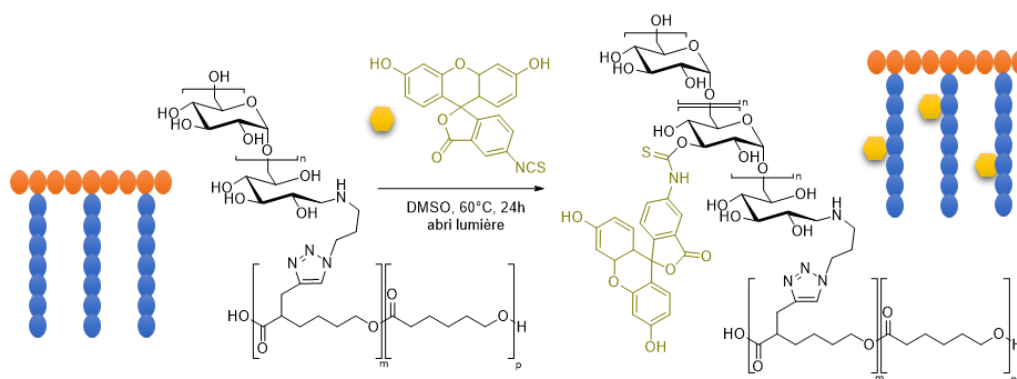


Figure 60 Synthèse d'un copolymère fluorescent PCL-g-DEX(FITC)

Mischra *et al.*¹⁶ rapportent un couplage covalent de FITC sur les fonctions amine d'un polymère. Ce protocole a été adapté afin de faire réagir la molécule sur des fonctions alcool moins réactives. Le marquage a donc été effectué dans du DMSO avec 0,4 équivalent de FITC par rapport aux fonctions alcool du dextrane. Le FITC est mis en défaut car une faible quantité couplée suffit à sa détection. Il sera par ailleurs ainsi plus facile d'éliminer les molécules

résiduelles par dialyse. Le marquage du copolymère a été vérifié par analyse GPC avec une double détection RI et UV à la longueur d'onde d'absorption maximale de FITC ($\lambda = 450 \text{ nm}$) (Figure 61). Le détecteur UV a été utilisé à défaut d'un détecteur fluorimétrique, non disponible au laboratoire au moment de l'étude. Il est à noter que la détection UV est moins sensible et moins sélective que la détection par fluorescence.

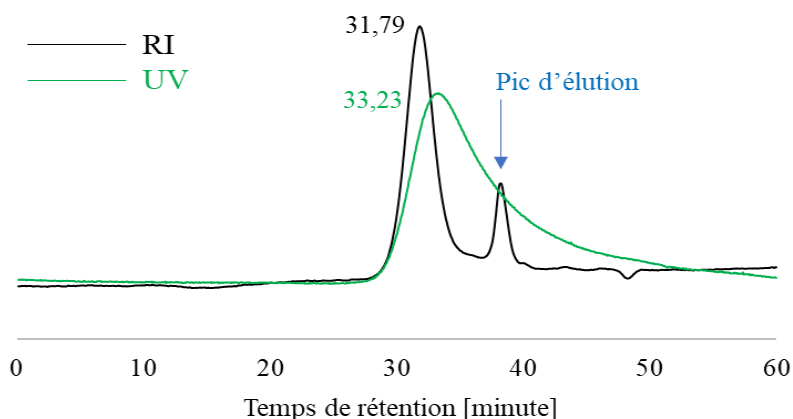


Figure 61 Analyse par GPC aqueuse avec double détection RI et UV ($\lambda=450 \text{ nm}$) du copolymère PCL-g-DEX(FITC)

La détection UV montre un signal propre à FITC à un temps de rétention proche de celui du copolymère ce qui prouve que FITC est bien couplé de manière covalente au copolymère. Le décalage observé entre les deux temps de rétention UV et RI provient de l'écart entre les deux détecteurs montés en série.

La synthèse de copolymères PCL-g-dextrane a donc été réalisée et les copolymères ont été caractérisés.

4 Formation de nano-objets à base de copolymère PCL-g-DEX

De nombreuses méthodes de préparation de nano-objets à partir de copolymères amphiphiles sont décrites dans la littérature :

- La méthode par dissolution directe : cette méthode est utilisable avec des copolymères hydrosolubles qui s'auto-assemblent en nano-objets en milieu aqueux.
- La méthode de nanopréciipitation : le protocole comprend deux étapes : la solubilisation du copolymère dans un solvant organique miscible à l'eau puis cette solution organique est ajoutée à une phase aqueuse (eau ou tampon) sous agitation et débit contrôlés afin de former des nano-objets.

- La méthode par dialyse : le copolymère est dissout dans un solvant organique, puis cette solution est dialysée contre de l'eau. Au fur à mesure que le solvant est remplacé par l'eau, les nano-objets se forment.

La méthode choisie ici pour préparer les nano-objets à base d'un copolymère PCL-*g*-DEX est la nanoprécipitation car c'est la méthode de choix pour incorporer des principes actifs hydrophobes dans des micelles à base de copolymères amphiphiles.⁸⁰

4.1 Formation de nano-objets par nanoprécipitation

Selon les paramètres choisis pour la nanoprécipitation (nature des solvants/non-solvants, concentration en composé, température, débit, agitation du milieu, ...) il est possible de moduler les propriétés des nano-objets obtenus, comme leur taille ou leur morphologie. Le procédé général de nanoprécipitation est schématisé Figure 62.

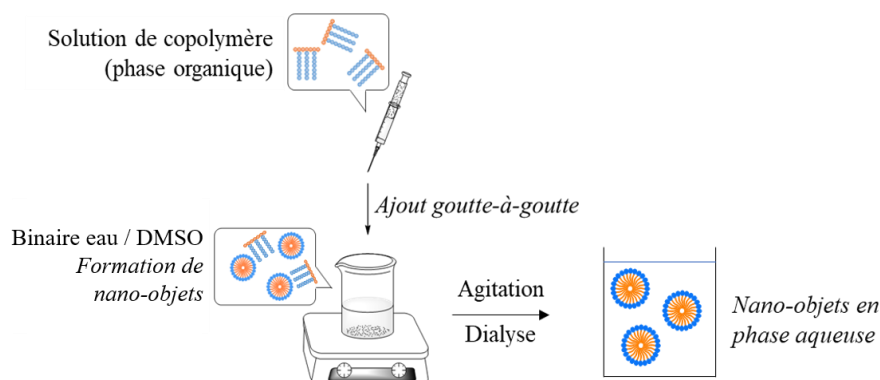
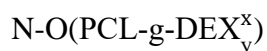


Figure 62 Principe de la nanoprécipitation de copolymère amphiphile

Le copolymère PCL-*g*-Dextrane est solubilisé dans du DMSO à une concentration de 10 mg.mL⁻¹. Cette solution est ajoutée goutte-à-goutte sous agitation contrôlée à un débit de 1 mL.min⁻¹ dans un volume d'eau distillée tel que DMSO/H₂O = 9/1 (v/v) afin d'avoir une concentration finale en nano-objets de 1mg.mL⁻¹. L'ensemble est ensuite dialysé (seuil de coupure 3,5 kDa) contre de l'eau puis lyophilisé. Les nano-objets obtenus sont notés de la façon suivante :



Avec PCL-*g*-DEX_y^x : lot de copolymère à partir duquel les nano-objets ont été préparés.

4.2 Caractérisations des nano-objets

Dans un premier temps nous avons vérifié que les nano-objets préparés étaient des micelles dynamiques et non des nanoparticules solides. Une mesure de la concentration d'agrégation critique (CAC) a donc été réalisée par spectrophotométrie de fluorescence. La CAC correspond à la concentration minimale en copolymère pour laquelle on observe une agrégation de micelles. Cette valeur est importante dans le cas de systèmes destinés à être injectés dans un organisme car elle indique si les agrégats seront stables ou non une fois dilué dans le sang. La spectrométrie de fluorescence permet de mesurer le spectre d'émission d'un fluorophore : le pyrène. Ce composé est étudié en solution aqueuse avec diverse concentrations de copolymère. Selon l'environnement du pyrène (hydrophobe ou hydrophile), le profil de son spectre varie^{116,117}. A faible concentration en copolymère, le pyrène est en solution aqueuse, mais à partir d'une certaine concentration il y a agrégation de micelles et le pyrène hydrophobe est encapsulé dans les agrégats de micelles. La mesure des intensités de fluorescence caractéristiques du milieu aqueux à 375 nm (I_{375}) et du milieu hydrophobe à 394 nm (I_{394}) permet la détermination de la CAC en traçant le rapport I_{375}/I_{394} en fonction de la concentration en copolymère (Figure 63).

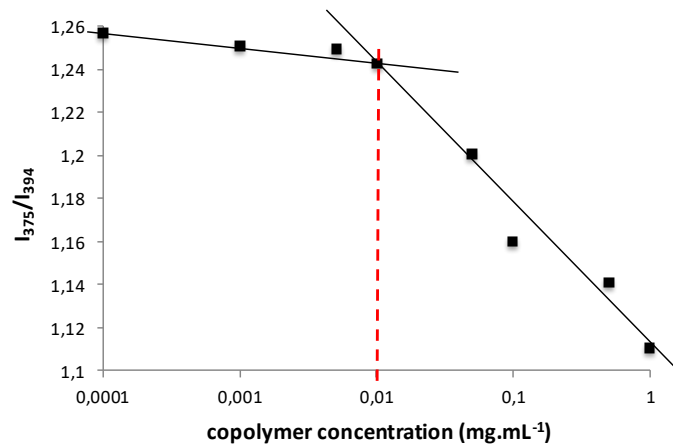


Figure 63 Détermination de la CAC des nano-objets $N-O(PCL-g-DEX_{6,8}^{4000})$ par spectrométrie de fluorescence

L'intersection des deux droites indique une valeur de CAC de $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$. Les nano-objets préparés sont donc des systèmes micellaires polymériques relativement stables en milieu aqueux. La taille et la dispersité des micelles ont été déterminées par diffusion de la lumière (DLS nanosizer) dans du PBS pH 7,4, à une concentration de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$. Les analyses montrent une distribution monomodale en intensité et une dispersité étroite (Figure 64)

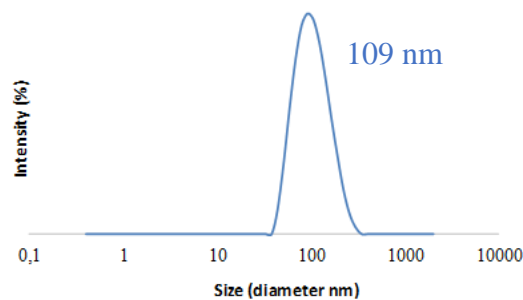


Figure 64 Analyse DLS de nano-objets $N-O(PCL-g-DEX_{2,0}^{4100})$

Le diamètre hydrodynamique moyen D_H et la dispersité des lots de nano-objets préparés sont présentés dans le Tableau 21.

Lots de nano-objets	D_H (nm)	Dispersité
$N-O(PCL-g-DEX_{2,0}^{4100})$	109	0,18
$N-O(PCL-g-DEX_{6,8}^{4000})$	105	0,26
$N-O(PCL-g-DEX_{11,5}^{6300})$	254	0,06

Tableau 21 Analyses DLS des différents lots de nano-objets

Les tailles comprises entre 50 et ~ 250 nm sont adaptées à l'internalisation cellulaire *in vivo* des micelles par effet EPR.¹¹⁸ On peut observer que lorsque les micelles sont issues de dextrane de plus longues chaînes ($N-O(PCL-g-DEX_{11,5}^{6300})$), le diamètre est plus grand et la dispersité plus étroite.

Ces micelles polymères ont ensuite été chargées en agent anticancéreux et les propriétés physico-chimiques et biologiques de ces systèmes ont été étudiées.

5 Encapsulation dans les micelles PCL-g-DEX

La doxorubicine (DOX) est un agent anti-cancéreux couramment utilisé en chimiothérapie dont la structure chimique est reportée Figure 65. Elle présente une solubilité dans l'eau de l'ordre de 10 g.L⁻¹ sous forme de chlorhydrate. C'est un composé de la famille des anthracyclines dont l'activité anticancéreuse est reconnue bien qu'il présente une certaine toxicité pour le cœur et qu'il provoque des cardiomyopathies. Elle possède un logP de 1,27 (coefficient de partage octanol /eau. Cette valeur donne une indication sur les propriétés de solubilité d'un composé). La valeur positive de ce coefficient indique que la doxorubicine est un composé plutôt hydrophobe qui devrait donc plutôt s'encapsuler dans la partie hydrophobe

d'un système de délivrance amphiphile. Il est à noter qu'il existe d'autres principes actifs anticancéreux davantage hydrophobe comme le paclitaxel (logP : 3). De nombreux travaux décrivent l'encapsulation de DOX dans des nano-transporteurs afin de limiter ses effets secondaires.^{31,80,119}

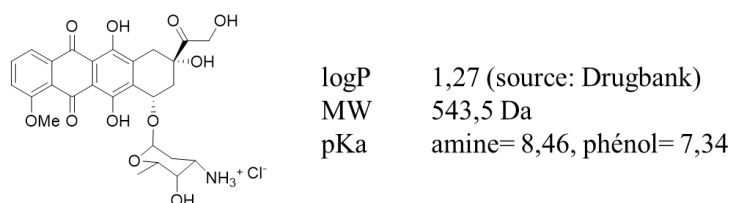


Figure 65 Structure chimique de la doxorubicine forme chlorhydrate (DOX).

5.1 Encapsulation de doxorubicine dans les micelles par nanopréciipitation

Les micelles de PCL-g-DEX chargées en DOX ont été préparées par la méthode de nanopréciipitation précédemment décrite. Deux ratios massiques DOX/copolymère ont été testés afin d'évaluer l'influence de ce ratio sur le taux de charge des micelles. Les micelles chargées en DOX seront nommées N-O(PCL-g-DEX_Y^X)-DOX_Z, avec PCL-g-DEX_Y^X le copolymère et z le ratio massique DOX/copolymère utilisés pour former les micelles.

5.2 Propriétés physico-chimiques des micelles chargées en doxorubicine

Le diamètre hydrodynamique moyen D_H et la dispersité des micelles chargées en DOX ont été déterminés par DLS dans du PBS pH 7,4 à une concentration en micelles de 0,1 mg.mL⁻¹ (Tableau 22). Les micelles vides ont été ajoutées dans ce tableau à titre de comparaison.

Le taux de charge (DL pour « Drug Loading », % en masse) et l'efficacité d'encapsulation (EE, % en masse) de ces micelles ont été déterminés par spectrophotométrie UV-Vis à 490 nm, longueur d'onde d'absorption maximale de la DOX, dans un mélange DMSO/PBS : 4/1 (v/v), le DMSO permettant de détruire totalement les micelles et de s'assurer que l'on quantifie bien la totalité de la DOX encapsulée. La concentration, et donc la masse en DOX, a été déterminée grâce à une calibration UV réalisée à partir de solutions de DOX dans le même milieu. Les valeurs de DL et de EE ont été calculées à partir des relations suivantes :

$$DL(\%) = \frac{\text{Masse de DOX dans les micelles}}{\text{Masse des micelles}} * 100$$

$$EE(\%) = \frac{\text{Masse de DOX dans les micelles}}{\text{Masse initiale de DOX}} * 100$$

Les résultats de ces analyses sont présentés dans le Tableau 22.

Lots de micelles	Ratio massique DOX/copolymère	D_H (nm)	dispersité	DL (%)	EE (%)
N-O(PCL-g-DEX _{2,0} ⁴¹⁰⁰)	/	109	0,18	/	/
N-O(PCL-g-DEX _{2,0} ⁴¹⁰⁰)-DOX _{0,15}	1,5 / 10	144	0,18	2,0	7,5
N-O(PCL-g-DEX _{2,0} ⁴¹⁰⁰)-DOX _{0,3}	3,0 / 10	142	0,16	5,1	15,4

Tableau 22 Caractéristiques physico-chimiques des micelles chargées en doxorubicine

Concernant la taille des micelles, on peut constater que l'encapsulation de la DOX engendre une augmentation du diamètre hydrodynamique, comme attendu. La dispersité reste faible. Le fait de doubler la masse initiale de DOX n'engendre pas de modification de la taille des micelles.

Concernant le taux de charge (DL) des micelles, on peut noter que l'augmentation du ratio DOX/copolymère d'un facteur 2 permet d'améliorer le taux de charge et d'atteindre une valeur de 5,1 % en masse, valeur classique pour ce type de système. En revanche, les valeurs d'efficacité d'encapsulation restent très faibles comparées aux valeurs de la littérature, et ce quel que soit le ratio DOX/copolymère. Ceci est dû à une perte conséquente de micelles lors de la dialyse après nanoprecipitation.

5.3 Cinétique de libération *in vitro* de la doxorubicine

Une étude de cinétique de libération de DOX *in vitro* à partir des micelles chargées N-O(PCL-g-DEX_{2,0}⁴¹⁰⁰)-DOX_{0,15} a été réalisée à 37 °C dans du PBS pH 7,4 afin de mimer le milieu physiologique. Une expérience dans les mêmes conditions a été réalisée avec une même quantité de DOX non encapsulée pour comparaison avec la DOX chargée dans les micelles. La DOX libérée est mesurée à différents temps sur 48 h par spectrophotométrie UV ($\lambda_{max} = 490$ nm) en se référant à une courbe de calibration réalisée à partir d'une gamme étalon de solutions de DOX dans le même milieu. Les courbes de libération sont présentées dans la Figure 66 ci-dessous.

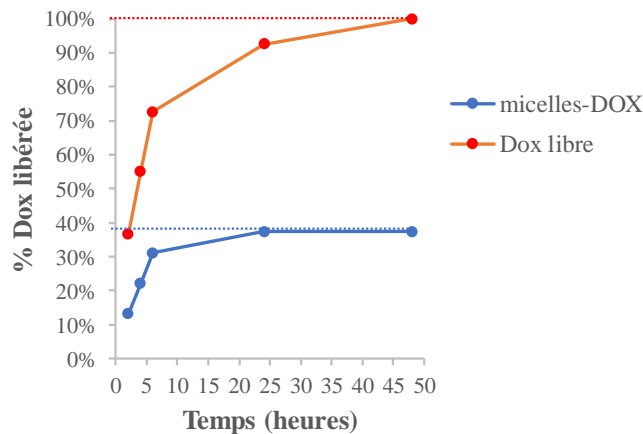


Figure 66 Cinétique de libération de la DOX chargée dans les micelles et de DOX libre en milieu physiologique (pH 7,4, 37°C)

Aucun effet « burst » n'est observé lors de la libération de la DOX à partir des micelles. Contrairement à la DOX libre qui est totalement libérée en 2 jours, la libération de la DOX à partir des micelles est retardée, un plateau à 37 % est atteint après 24 heures. On note un précipité de couleur rouge (caractéristique de la DOX) dans le tube de dialyse après 24 heures de libération. Ce précipité a été isolé et quantifié par UV. La masse de DOX contenue dans le précipité correspond à 52% de la masse totale de DOX contenue dans les micelles. Plus de 90% de la DOX (52% dans le précipité et environ 40% libérée) ont donc été retrouvés.

Une seconde étude de libération de DOX a consisté à se placer dans du PBS à pH 5,8 afin de mimer le milieu intracellulaire dans lequel la DOX doit être libérée (lysosomes : pH 4,5-5,0 ; endosomes : pH 5,0-6,5) (Figure 67).

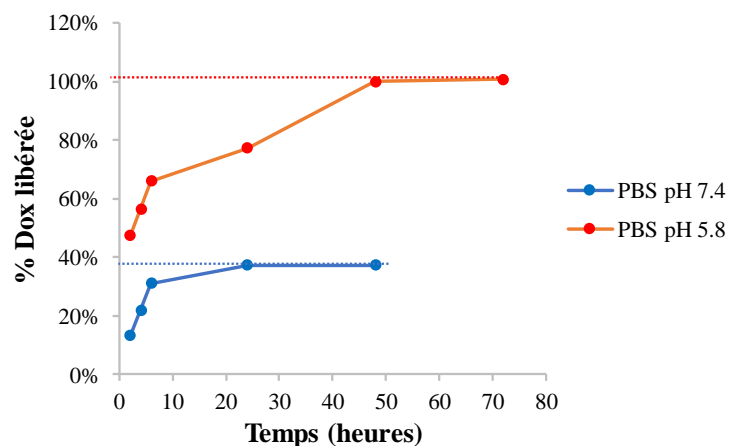


Figure 67 Cinétique de libération de la DOX chargée dans les micelles en fonction du pH (37°C)

Les courbes de libération en fonction du pH montrent que la libération de la DOX encapsulée dans les micelles est totale après 2 jours à pH 5,8 et que la cinétique de cette libération est plus rapide qu'à pH physiologique. Ce point est particulièrement intéressant pour les applications biologiques : dans le pH sanguin la libération est lente et partielle, ce qui permet d'éviter la toxicité de la DOX, alors qu'elle est beaucoup plus rapide une fois internalisée dans les cellules ce qui va faciliter la destruction des cellules tumorales.

La formation d'un précipité à pH 7,4 après 24h de libération peut poser problème car cela remet en question la possibilité d'injecter les micelles par voie intraveineuse. Nous étudierons ultérieurement la cinétique d'internalisation cellulaire de ces micelles afin de vérifier qu'aucun précipité ne se forme.

6 Propriétés biologiques des micelles de PCL-g-DEX

Les propriétés biologiques des micelles de PCL-g-DEX seront étudiées notamment en termes de toxicité vis-à-vis de cellules saines et cancéreuses et d'internalisation intracellulaire dans ces mêmes cellules.

Trois tests biologiques ont été réalisés :

- Des tests de cytotoxicité sur des micelles de PCL-g-DEX vides afin de s'assurer de leur cytocompatibilité et sur des micelles de PCL-g-DEX chargées en DOX afin d'étudier et de comparer leur effet cytotoxique vis-à-vis de cellule saines et cancéreuses.
- Des analyses par microscopie confocale sur des micelles fluorescentes pour visualiser leur internalisation cellulaire

Des tests de cytométrie en flux pour quantifier la part de micelles internalisées dans les cellules cancéreuses et dans les cellules saines.

6.1 Cytotoxicité des micelles PCL-g-DEX vides et chargées en DOX

Pour une application en thérapie anti-cancéreuse, il est important de comparer la cytotoxicité des micelles chargées en agent anti-cancéreux sur des cellules cancéreuses et sur des cellules saines. Les cultures cellulaires ont été incubées 24 h avec des concentrations croissantes de 0, 50, 100 or 150 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ en DOX libre ou en micelles chargées avec la même quantité de DOX. Des micelles vides ont également été étudiées afin de vérifier leur cytocompatibilité. Les lots de micelles issues du copolymère PCL-g-DEX_{2,0}⁴¹⁰⁰ ont été choisies pour cette étude. La Figure

68 montre les résultats obtenus sur des cellules de cancer du côlon (HCT-116) et sur des cellules saines de fibroblastes (CCD-45SK).

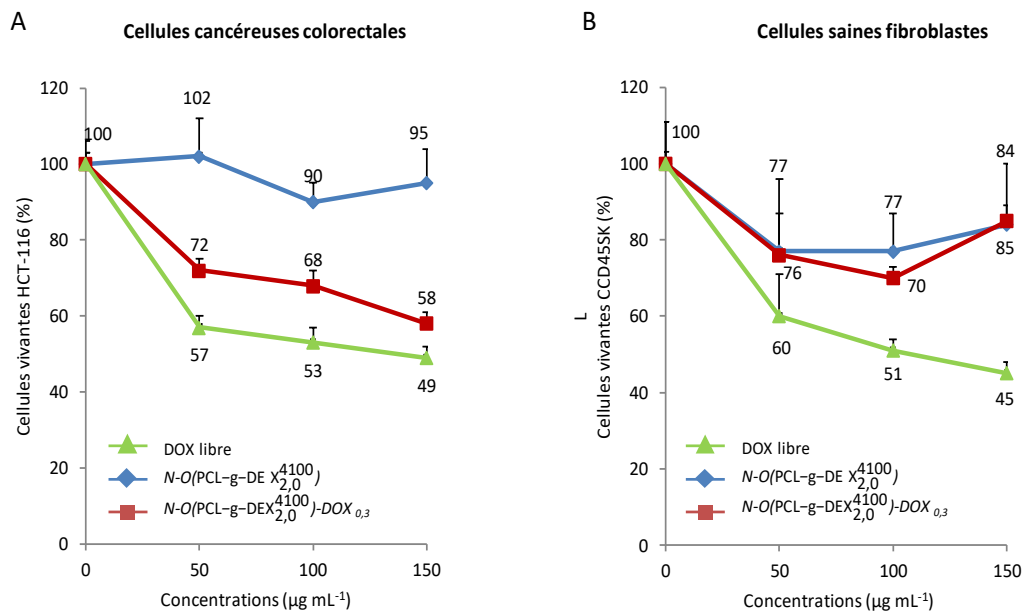


Figure 68 Tests de cytotoxicité sur la DOX libre, sur des micelles vides $N-O(PCL-g-DEX)_{2,0}^{4100}$ et sur des micelles chargées en DOX $N-O(PCL-g-DEX)_{2,0}^{4100}-DOX_{0,3}$ ($DL = 5,1\%$) avec (A) des cellules HCT-116 de cancer du côlon (B) des cellules saines fibroblastes (CCD-45SK)

Les micelles vides de PCL-g-DEX ne présentent pas de toxicité importante dans le milieu de culture ce qui montre leur cytocompatibilité. En revanche, à la concentration la plus élevée ($150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) la DOX induit la mort de 51 % des cellules de cancer du côlon et de 55% des cellules saines. De façon tout à fait intéressante, on peut noter que les micelles chargées en DOX induisent un effet biologique totalement différent selon qu'elles sont incubées avec des cellules saines ou avec des cellules cancéreuses. Avec les cellules tumorales, le profil de survie cellulaire est similaire à celui de la DOX libre alors que dans les cas des cellules saines, la courbe est superposée à celle des micelles vides cytocompatibles.

Ces résultats de cytotoxicité montrent donc que :

- i) Les micelles de PCL-g-DEX n'engendrent pas de toxicité vis-à-vis des cellules saines, elles sont cytocompatibles
- ii) La DOX a un effet cytotoxique aussi bien sur les cellules cancéreuses que sur les cellules saines (**aucun effet de ciblage**)

iii) Les micelles chargées en DOX tuent les cellules cancéreuses aussi efficacement que la DOX libre

iv) Les cellules saines ne sont pas affectées par l'incubation avec des micelles chargées en DOX : il y a **une sélectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses.**

6.2 Internalisation cellulaire des micelles PCL-g-DEX

Pour vérifier l'internalisation des micelles dans les cellules de cancer du côlon (HCT-116) et/ou les cellules saines fibroblastes (CCD-45SK), des micelles fluorescentes ont été préparées par nanopréciipitation du copolymère PCL-g-DEX(FITC). L'internalisation a été étudiée par microscopie confocale. On observe qu'après 24 h d'incubation des cellules en présence des micelles fluorescentes (micelles-FITC) à une concentration de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ces dernières sont efficacement internalisées par les cellules tumorales alors que dans le cas des cellules saines on n'observe quasiment pas d'internalisation et les micelles forment des agrégats à l'extérieur des cellules saines (Figure 69). On observe de nouveau un effet de ciblage : les cellules cancéreuses internalisent les micelles beaucoup mieux que les cellules saines.

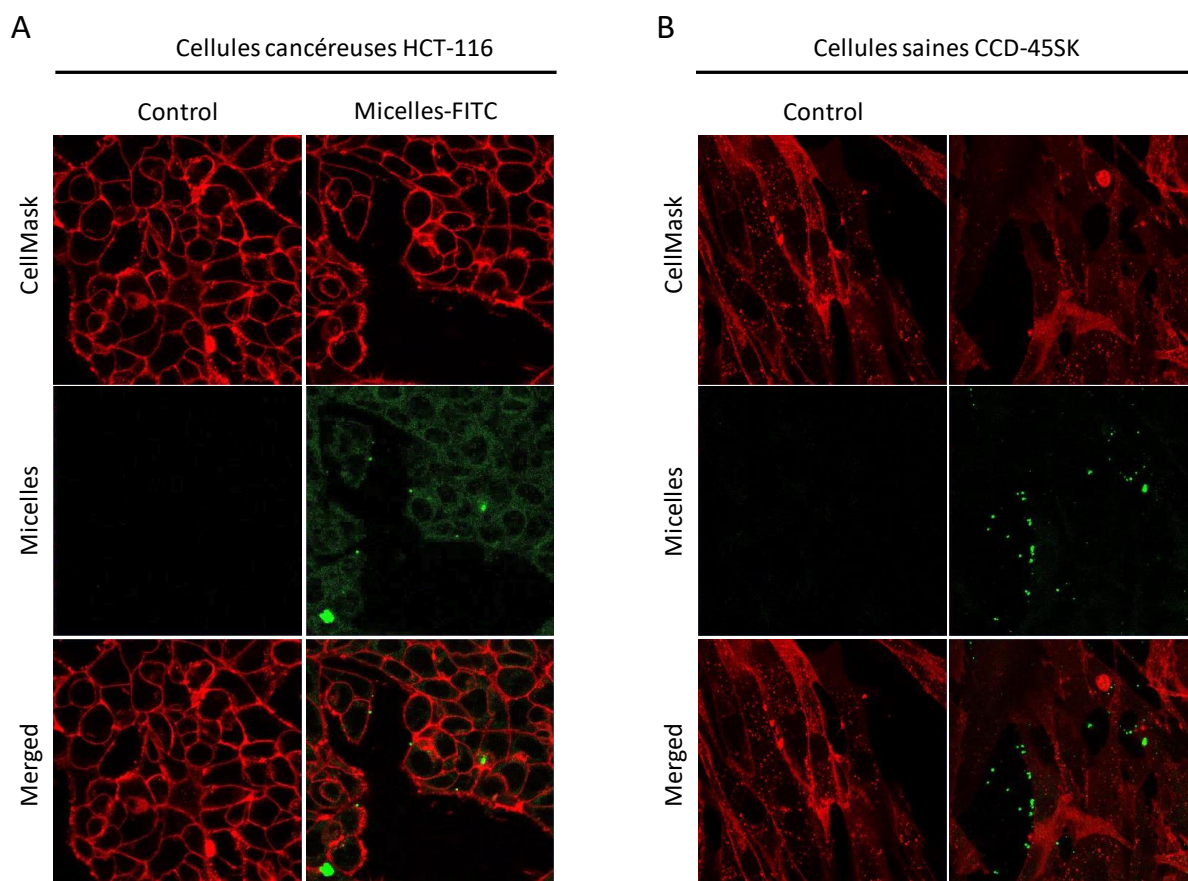


Figure 69 Internalisation cellulaire de micelles fluorescentes (micelles-FITC) par (A) des cellules de cancer du côlon (HCT-116) (B) des cellules saines fibroblastes (CCD-45SK)

La différence d'internalisation entre les cellules cancéreuses et les cellules saines a ensuite été quantifiée par cytométrie en flux (Figure 78). Les micelles-FITC ont été incubées dans un milieu de culture cellulaire à une concentration de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pendant différentes périodes (1h, 3h, 6h et 24h). La cinétique d'internalisation des micelles a ensuite été déterminée pour les cellules tumorales (HCT-116) et pour les cellules saines (CCD-45SK).

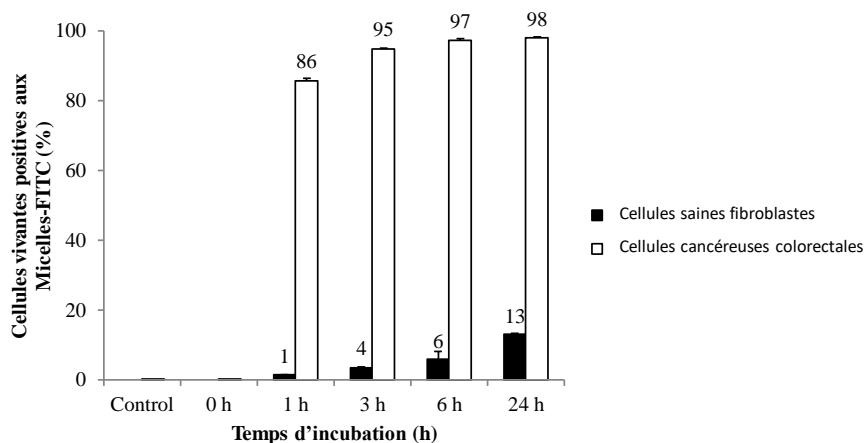


Figure 70 Quantification de l'internalisation de micelles-FITC par des cellules cancéreuses colorectales (HCT-116) et des cellules saines fibroblastes (CCD-45SK) par cytométrie en flux

Ces résultats montrent qu'après 1h d'incubation, un taux d'internalisation élevé (86 %) est atteint avec les cellules cancéreuses HCT-116 contre 1% pour les cellules saines. Après 24 heures les proportions sont respectivement 98% et 13%. Ces résultats démontrent clairement un ciblage des cellules cancéreuses par les micelles. On observe aussi que les micelles sont en quasi-totalité internalisées par les cellules cancéreuses après 3 h d'incubation (95 %). Ainsi, la précipitation des micelles dans du PBS observée lors de l'étude de libération *in vitro* de la DOX ne devrait pas poser de problème.

7 Conclusion

Dans ce chapitre il a été montré la faisabilité de la synthèse d'une nouvelle structure copolymère biodégradable amphiphile greffée « inverse » PCL-*g*-DEX par une réaction de chimie clic (CuAAC). Pour cela, une PCL hydrophobe et des chaînes de dextrane hydrophiles ont été modifiées chimiquement au préalable. La réaction de greffage a permis de synthétiser différents lots de copolymères PCL-*g*-DEX en modulant le taux de greffage et leur masse molaire et par voie de conséquence leur balance hydrophile-hydrophobe. Un copolymère fluorescent a également été synthétisé par couplage covalent d'un marqueur fluorophore, le FITC, dans le but de préparer des nano-objets fluorescents et de pouvoir suivre leur internalisation cellulaire par microscopie de fluorescence. Nous avons utilisé pour ce greffage la fonctionnalité chimique du dextrane, qui n'existe pas sur le PEG classiquement utilisé.

Des micelles polymères stables en milieu aqueux ont été préparées par nanopréciipitation des copolymères PCL-*g*-DEX. La taille nanométrique des micelles est adaptée à une injection par voie intraveineuse et à une internalisation cellulaire *in vivo* du système par effet EPR. Ces micelles ont été chargées en DOX, un agent anti-cancéreux couramment employé en chimiothérapie de par son efficacité anti-cancéreuse et ce, malgré ses effets cytotoxiques dans l'organisme. L'étude des propriétés physico-chimiques a montré que l'on peut charger ces micelles à 5,1% en DOX, un taux de charge suffisant pour observer une activité anti-tumorale des nano-systèmes chargés. De plus, la libération de DOX *in vitro* à partir des micelles chargées montre que le système est parfaitement adapté à l'application visée puisque les micelles libèrent rapidement toute la DOX en milieu acide mimant les endosomes ou les lysosomes alors que la libération est retardée en milieu physiologique.

L'étude des propriétés biologiques de ces nano-systèmes a permis de montrer que les micelles chargées en DOX ne sont pas toxiques envers des cellules saines (CCD-45SK) alors qu'elles le sont envers des cellules tumorales colorectales (HCT-116), montrant ainsi une excellente reconnaissance de la cible. Par ailleurs, la vectorisation de la DOX par les micelles n'affecte pas l'efficacité du principe actif. Enfin, les micelles de PCL-*g*-DEX sont efficacement internalisées par les cellules cancéreuses (avec la presque totalité dès 3 h d'incubation) alors qu'elles ne le sont que très peu par les cellules saines. L'ensemble de ces études biologiques montre de manière indiscutable un ciblage des cellules tumorales par ces systèmes de libération.

Chapitre 3

Synthèses et caractérisations de copolymères PCL-g-Chitosane

Ce chapitre porte sur les synthèses de copolymères greffés amphiphiles à structure « inverse » PCL-g-Chitosane. Le chitosane a été choisi car c'est un polysaccharide très utilisé à des fins médicales¹²⁰⁻¹²⁴, notamment pour préparer des systèmes de délivrance de principes actifs¹²⁵⁻¹²⁸. La principale caractéristique du chitosane par rapport aux autres polysaccharides est la présence de fonctions amine le long de sa chaîne. Ces fonctions amine ont notamment été utilisées pour coupler sur le chitosane des agents fluorescents^{69,70}, des ligands de récepteurs biologiques^{94,129,130} ou des fonctions chimiques modifiant les propriétés du polysaccharide, par exemple des thiols qui augmentent les propriétés mucoadhésives^{131,132} ou des groupements phthaloyl qui augmentent la solubilité du chitosane dans les solvants organiques^{133,134}.

La présence de fonctions amine permet une plus grande diversité de réactions chimiques par rapport au dextrane qui ne possède que des fonctions alcool le long de sa chaîne. Par conséquent, les réactions du chitosane présentées dans ce chapitre sont effectuées sur les fonctions amine **de la chaîne**, contrairement au dextrane où elles n'ont lieu qu'en **extrémité de chaîne**. Les copolymères PCL-g-CHT auront donc *in fine* une structure différente de la structure peigne des copolymères PCL-g-DEX étudiés précédemment.

Les deux méthodes de greffage de chitosane sur la PCL activée utilisées au cours de cette étude sont des réactions de chimie « clic », CuAAC et thiol-yne avec des chaînes de chitosane azoturées ou thiolées (Figure 71).

Le chitosane à longue chaîne n'est pas hydrosoluble à pH neutre. Pour cette raison nous travaillerons sur des oligomères hydrosolubles de masse molaire $<6000 \text{ g.mole}^{-1}$. D'autre part les oligomères sont chimiquement plus réactifs que les chaînes longues. Pour obtenir ces oligomères, un chitosane commercial a été au préalable dépolymérisé. Cette dépolymérisation est présentée au début de ce chapitre.

La fonctionnalisation de chaînes d'oligo-chitosane par un ligand, le mannose squarate qui cible les cellules cancéreuses surexprimant sur leurs bicouches lipidiques des récepteurs au mannose 6-phosphate, est décrite^{145, 146}. Cette fonctionnalisation a pour but de tester la faisabilité du couplage du ligand sur les chaînes de chitosane du copolymère PCL-g-CHT.

Les PCL utilisées pour les synthèses des copolymères PCL-g-CHT sont une PCL_{lyne} similaire à celle utilisée pour préparer les copolymères PCL-g-DEX, et une PCL bifonctionnalisée PCL_{lyne}(Naph).

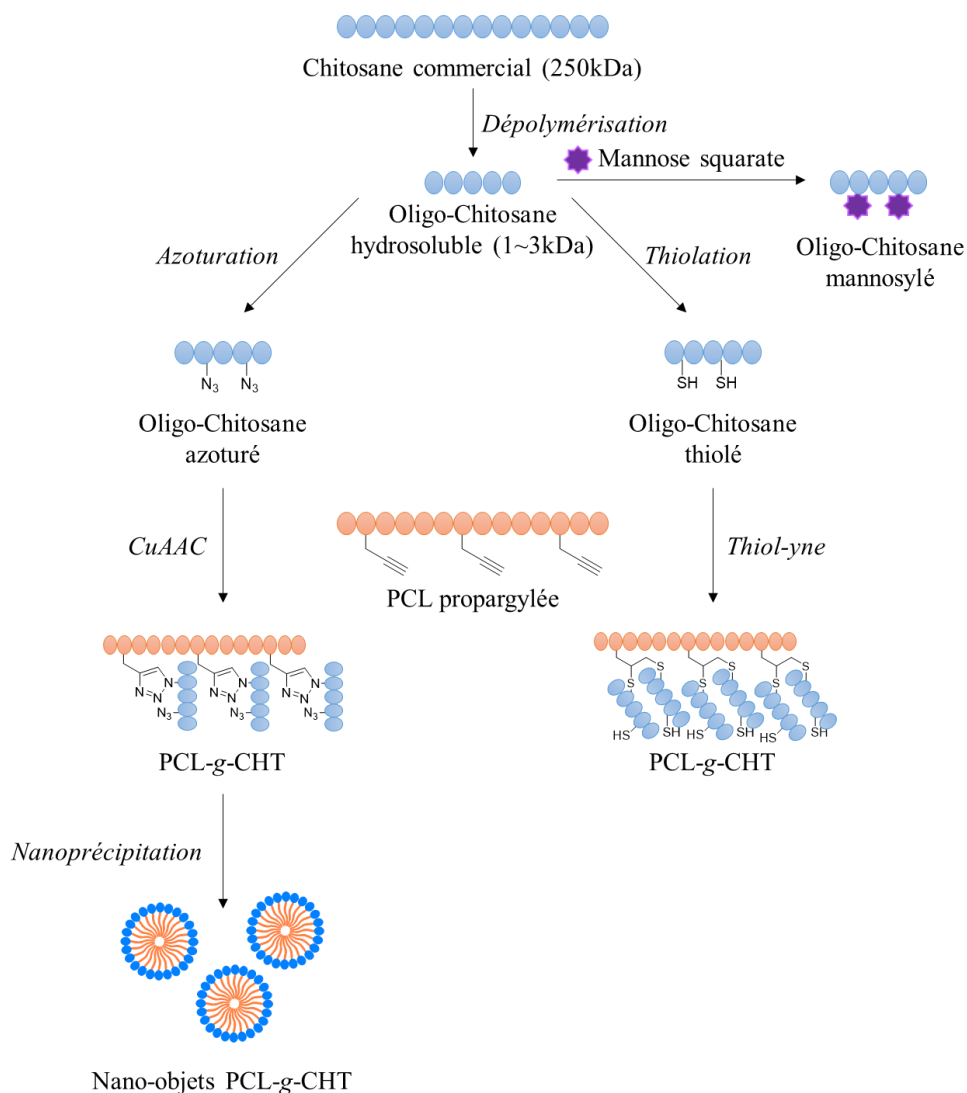


Figure 71 Voies de synthèse de copolymères PCL-g-CHT et formation de nano-objets

1 Synthèse d'oligomères de chitosane hydrosolubles

La solubilité du chitosane est un point crucial pour la possibilité de préparer des copolymères amphiphiles. Le chitosane étant peu soluble en milieux aqueux non acide ($\text{pH} > 6$), diverses méthodes consistant à modifier les propriétés de solubilité du chitosane ont été développées, comme l'usage de complexe ammonium avec un contre ion hydrophobe⁹⁹. Une autre possibilité est la dépolymérisation des chaînes de chitosane, la diminution de masse molaire permettant d'obtenir des oligo-chitosanes hydrosolubles. L'utilisation d'oligo-chitosanes facilite à la fois la fonctionnalisation, le greffage sur la PCL_{yne} et donc la formation de la partie hydrophile de copolymères amphiphiles.

Dans la littérature, de nombreuses méthodes de dépolymérisation du chitosane sont décrites :

- à base de composés métalliques comme $H[AuCl_4]^{135}$ ou des nanoparticules de TiO_2^{136} .
- par oxydation des liens glycoside entre les motifs de répétition du chitosane, avec $NaClO^{137}$, $NaClO_2^{138}$, HNO_2^{139} ou de l'eau oxygénée¹⁴⁰
- par traitement acide avec de l'acide chlorhydrique^{141,142} ou de l'acide acétique¹⁴³
- enzymatiquement en présence de cellulase^{144,145} ou d'amylase¹⁴⁶

Dans le cadre de cette thèse la méthode de dépolymérisation choisie est l'oxydation sous micro-ondes dans une solution acidifiée d'eau oxygénée (Figure 72). Cette méthode, développée par Illy *et al.*¹⁴⁷, permet d'obtenir des oligo-chitosanes hydrosolubles de masse molaire comprise entre 1500 et 3400 $g.mol^{-1}$ à partir d'un chitosane de 250 000 $g.mol^{-1}$ avec un degré de désacétylation (DDA) de 85%. Le degré de désacétylation est le rapport entre le nombre de motifs glucosamine et le nombre total de motifs de la chaîne de chitosane.

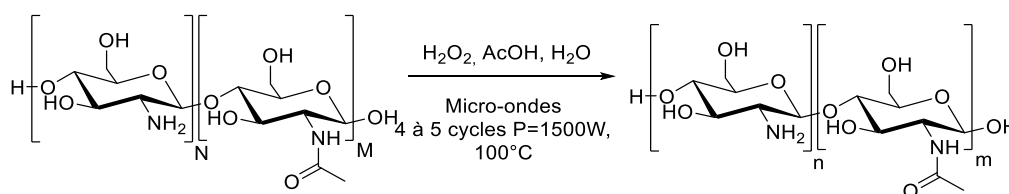
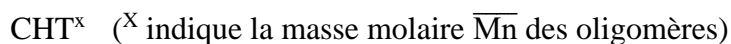


Figure 72 Dépolymérisation du chitosane par la méthode aux micro-ondes

Les différents lots d'oligo-chitosane sont annotés de la façon suivante :



Tous les lots de chitosane ont été préparés à partir de chitosane commercial dans une solution aqueuse d'acide acétique (1% en masse d'acide acétique, 2% en masse de chitosane) sauf dans le cas du dernier lot de chitosane CHT^{1600} où le chitosane est à 4% en masse. Un dixième de volume de H_2O_2 à 30% est ajouté à la solution de chitosane avant d'effectuer les cycles de dépolymérisation. Après les cycles de dépolymérisation, les solutions de chitosane sont précipitées dans l'acétone et centrifugées, sauf dans le cas du lot chitosane CHT^{1600} où les oligomères ont été décantés une nuit à $4^\circ C$.

Les masses molaires des différents lots d'oligo-chitosane ont été mesurées par GPC en milieu aqueux (tampon acétate 0,1M, pH 4,5) (figure 73). Le second pic présent sur la GPC (tr =39 min) correspond à l'élution du solvant. Les DDA de ces lots ont été mesurés par RMN ¹H (D₂O) (Figure 74) d'après la formule suivante :

$$\text{DDA}[\%] = 100 - \left[\frac{1}{3} \frac{\text{intégrale CH}_3 \text{ acétamide (2,05ppm)}}{\text{intégrale H1 (4,59ppm)}} * 100 \right]$$

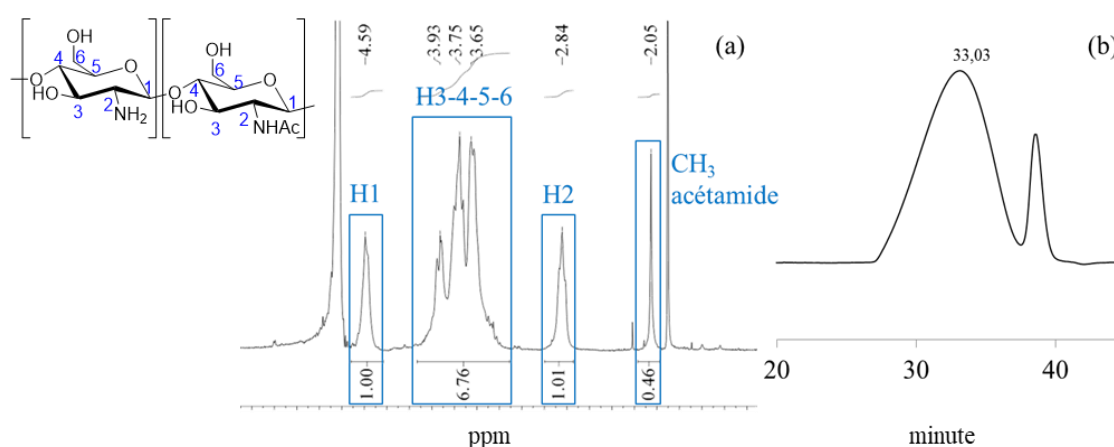


Figure 73 Caractérisations d'un lot d'oligo-chitosane $\text{CHT}_{0,85}^{2800}$ (a) RMN ¹H (D₂O, 300MHz) (b) GPC (tampon acétate pH 4,5)

Le Tableau 23 résume les valeurs des masses molaires, des dispersités (\bar{D}) et les DDA obtenus pour différents lots d'oligo-chitosanes en fonction du nombre de cycles de dépolymérisation.

Lots	Nombre de cycles de dépolymérisation	GPCaq		RMN (D ₂ O)
		Mn	\bar{D}	DDA
CHT²⁹⁰⁰	4	2900	4,68	0,85
CHT¹⁵⁰⁰	4	1500	3,40	0,83
CHT²⁸⁰⁰	4	2800	3,76	0,85
CHT³⁰⁰⁰	5	3000	3,33	0,85
CHT³⁴⁰⁰	5	3400	3,48	0,84
CHT¹⁶⁰⁰	5	1600	3,39	0,83

Tableau 23 Les différents lots d'oligo-chitosanes synthésés

L'augmentation du nombre de cycles de dépolymérisation ne permet pas de diminuer davantage les masses molaires des chitosanes obtenus.

Il n'y a pas de variation significative du DDA au cours des dépolymérisations (DDA du chitosane natif = 0,85). La limitation de cette méthode de dépolymérisation est le manque de reproductibilité des masses molaires obtenues pour des conditions de dépolymérisation analogues. Il ne semble pas y avoir de relation entre les masses molaires des oligomères et les conditions opératoires (concentration en chitosane, nombre de cycles de dépolymérisation, méthode de purification employée). Par conséquent, il ne sera pas possible de répliquer un lot d'oligo-chitosane avec cette méthode de dépolymérisation.

2 Greffage d'un agent de ciblage, le mannose squarate, sur les oligomères de chitosane

Rappelons que l'intérêt du chitosane dans ces systèmes par rapport aux autres polysaccharides est la présence de fonctions amine réactives. Dans le cadre de ce projet, le but *in fine* est de synthétiser des copolymères PCL-g-CHT fonctionnalisés avec des groupements mannose pour conférer aux nano-transporteurs issus de ces copolymères des propriétés de ciblage envers certaines cellules cancéreuses. Pour cela, le ligand envisagé est le mannose squarate (Figure 82).

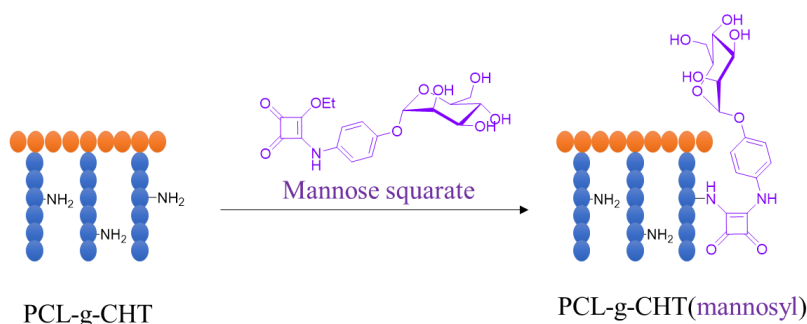


Figure 74 Mannosylation du copolymère PCL-g-CHT

Actuellement, ce composé est utilisé pour fonctionnaliser des systèmes anticancéreux à base de nanoparticules de silice mésoporeuse aminées en surface^{148,149}. Étant donné que ce composé n'a jamais été utilisé précédemment pour mannosyler les motifs glucosamine de la chaîne de chitosane, une réaction test a été mise en place sur les oligo-chitosanes pour vérifier la faisabilité de ce couplage avant de la réaliser sur un copolymère. Le couplage a été effectué en milieu aqueux, avec un équivalent de mannose squarate par motif glucosamine (Figure 75).

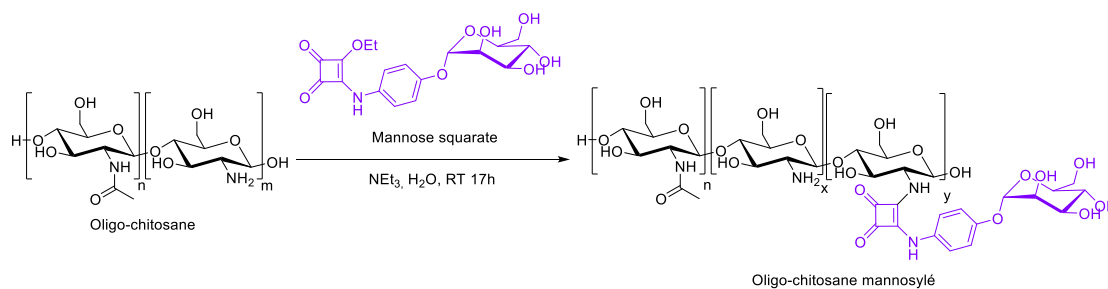


Figure 75 Mannosylation d'oligo-chitosanes

Les oligo-chitosanes mannosylés ont été caractérisés par RMN ¹H (D₂O) et GPC (tampon acétate pH 4.5) (Figure 76).

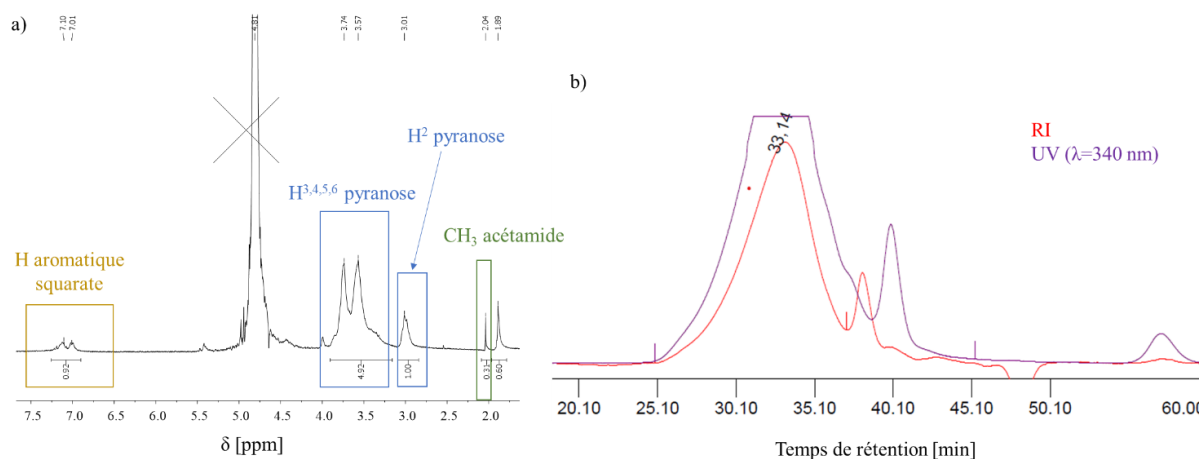


Figure 76 Analyses d'oligo-chitosanes mannosylés (a) RMN ¹H (D₂O, 300MHz) (b) GPC

L'analyse par RMN ¹H a permis d'estimer la proportion de motifs mannosylés selon la relation suivante :

$$\text{Taux de glucosamine mannosylée} = 1/4 \frac{\text{intégrale (H aromatique squarate)}}{\text{intégrale (H2 pyranose)}} * 100$$

Ce taux a été estimé à 23% par RMN. Cependant, il faut prendre en compte l'analyse effectuée en GPC aqueuse (pH4,5) avec une double détection RI et UV à 340 nm, longueur d'onde caractéristique du mannose squarate (Figure 77b). Cette analyse montre la présence d'une faible quantité de mannose squarate non couplé (tr=58 minutes), par conséquent la part de glucosamine mannosylée calculée par RMN ¹H est légèrement surévaluée. Néanmoins, étant donné que le signal UV est intense au point de saturer le signal du chitosane (tr=33min), il y a

bien eu couplage de mannose squarate sur les chaînes de chitosane. Notons que ce taux de substitution de près de 20% est très élevé pour une application en vectorisation (une substitution par chaîne peut être suffisante). Cela est dû au fait que la réaction a été réalisée avec un équivalent de mannose squarate par motif glucosamine, proportion très élevée justifiée par le fait que l'on souhaitait simplement tester la faisabilité de la réaction. Malheureusement cette même réaction n'a pas pu être effectuée sur un copolymère dans le cadre de cette thèse.

3 Fonctionnalisations d'oligo-chitosane

À présent, nous allons aborder les fonctionnalisations d'oligo-chitosanes permettant le couplage par chimie « clic » sur la PCL_{yne}. Contrairement au cas du dextrane, deux voies de fonctionnalisation sont abordées : l'azoturation et la thioacétylation. Les oligo-chitosanes azotés seront par la suite couplés par CuAAC sur la PCL_{yne}, tandis que les chitosanes thioacétylés seront déprotégés en thiols pour être couplés par thiol-yne sur la PCL_{yne}. Les fonctionnalisations sont effectuées par amination réductrice dans les deux cas. Ces deux réactions de chimie « clic » ont été choisies pour leur grande sélectivité, limitant ainsi les réactions secondaires.

3.1 Azoturation du chitosane

3.1.1 Les méthodes d'azoturation du chitosane

Dans la littérature, de nombreuses voies d'azoturation ont été développées sur le chitosane en vue d'effectuer des réactions de type CuAAC (Kritchenkov et Skorik¹⁵⁰, Lakouraj *et al.*¹⁵¹). Kulbokaite *et al.*¹⁵² ont utilisé une méthode de substitution des fonctions amine en fonctions azote pour préparer des copolymères de chitosane greffés avec des chaînes de PEG par CuAAC à partir d'un chitosane contenant 27% de motifs glucosamine azotés. Les auteurs ont aussi montré que cette méthode d'azoturation provoque la dépolymérisation des chaînes de chitosane. Deux autres réactifs ont été testés par Kulbokaite *et al.*¹⁵²: l'azote de triflyle et l'azote d'imidazole-1-sulfonyle qui permettent de substituer 40% et 60 % des motifs glucosamine respectivement. Cependant le chitosane azoté à 60% est insoluble dans l'eau quel que soit le pH. Cette étude montre que pour conserver la solubilité du chitosane en milieu aqueux, le taux d'azoturation des motifs glucosamine doit rester assez faible. De plus, le nombre d'équivalents en réactif ne permet pas de contrôler le nombre de motifs glucosamines azotés.

À notre connaissance, il n'y a pas de méthode d'azoturation du chitosane *via* une amination réductrice sur les fonctions amine bien que de nombreuses études portent sur l'amination réductrice des fonctions amine du chitosane. Ces méthodes permettent en général d'obtenir un chitosane avec des degrés de substitution DS <50% sans provoquer de coupure de chaînes. Mais l'amination réductrice risque de provoquer des réticulations entre les amines du chitosane et les fonctions aldéhyde à l'extrémité des chaînes. Une étude a montré effectivement une augmentation de la masse molaire des chaînes de chitosane après amination réductrice¹⁵³, mais cette augmentation semble plutôt due à l'ajout de groupements le long du chitosane qu'à des réactions interchaînes.

Par conséquent, nous avons développé une nouvelle méthode de fonctionnalisation d'oligo-chitosanes par amination réductrice avec une molécule bifonctionnelle : le 3-azidopropanal.

3.1.2 Synthèse du 3-azidopropanal

Le 3-azidopropanal a été synthétisé par addition 1,4-insaturée d'azoture sur de l'acroléine selon un protocole reporté par Munneke *et al.*¹⁵⁴ Le schéma de la réaction effectuée en milieu aqueux acide est présenté sur la Figure 77.

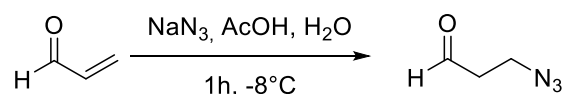


Figure 77 Synthèse du 3-azidopropanal

La caractérisation par IR-TF montre la présence des fonctions azoture (2092 cm^{-1}) et aldéhyde (1718 cm^{-1}) (Figure 78a). L'analyse par RMN ^1H (CDCl_3) permet d'identifier l'aldéhyde (9,78ppm) et les deux méthylènes du 3-azidopropanal (3,60 et 2,73 ppm) (Figure 78b). Les deux méthylènes ont été différenciés par RMN COSY, une analyse qui permet d'étudier les couplages entre les différents protons d'une molécule (Figure 78c). On constate que les protons à 2,73 ppm sont corrélés avec le proton à 9,78 ppm et ceux à 3,60 ppm. Il s'agit donc du méthylène qui se trouve entre la fonction aldéhyde et du second méthylène du 3-azidopropanal. Le méthylène lié à l'azoture correspond donc au signal à 3,60ppm.

Suite à la synthèse du 3-azidopropanal, plusieurs protocoles d'amination réductrice ont été testés pour azoturer les oligo-chitosanes. Le développement de la méthode d'amination réductrice est tout d'abord présenté, puis la méthode d'amination réductrice retenue ainsi que les propriétés des chitosanes N-azoturés obtenus seront détaillés.

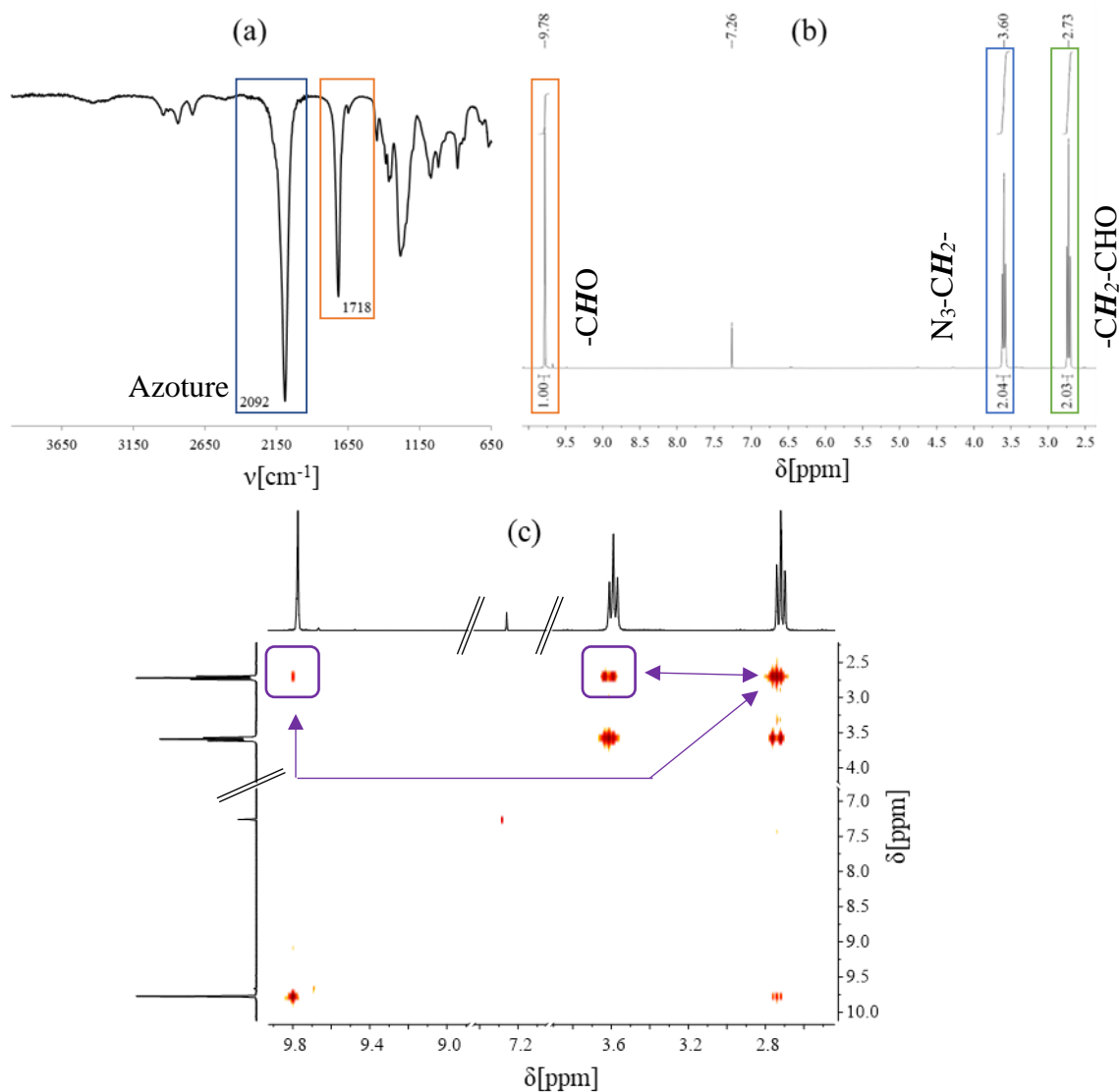


Figure 78 Caractérisations du 3-azidopropanal (a) IR-TF (b) RMN^{-1}H (CDCl_3 , 300MHz) (c) RMN COSY (CDCl_3 , 300MHz)

3.1.3 Synthèse de chitosanes N-azoturés par amination réductrice en milieu aqueux

Les différents lots de chitosane synthétisés ont été notés ainsi :



- Y correspond à la masse molaire $\overline{\text{Mn}}$ du chitosane azoturé. Elle est déterminée par GPCaq (tampon acétate pH 4,5) avec une calibration à base de pullulane.

- x correspond au degré de substitution en azoture, mesuré par ^1H RMN dans D_2O via le rapport d'intégrations entre le signal d'un méthylène (1,80ppm) de l'azido-propyl et le signal des protons H1 des cycles pyranose du chitosane (Figure 79):

$$\text{DS}(\text{N}_3) = \frac{\text{intégrale}(-\text{CH}_2-, 1,8\text{ppm})}{2 * \text{intégrale}(\text{H1 pyranose}) * \text{DDA}} * 100$$

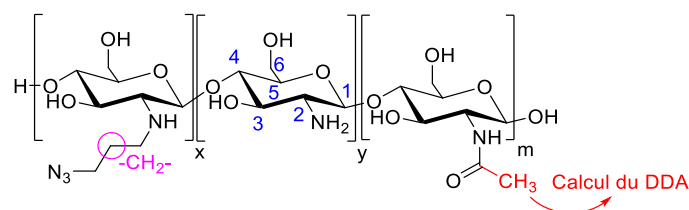


Figure 79 Structure des chitosanes N-azoturés synthétisés par amination réductrice

Le degré de substitution (DS) est calculé par rapport au nombre de fonctions amine présentes sur le chitosane, en tenant compte du DDA dans le calcul du DS.

La première méthode d'amination réductrice testée est effectuée dans de l'eau distillée (Figure 84).

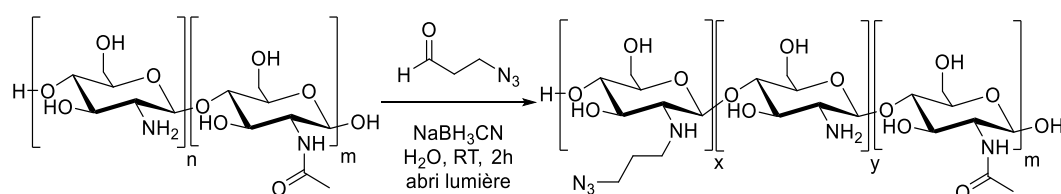


Figure 80 Synthèse de chitosane azoturé par amination réductrice en milieu aqueux

Plusieurs lots de chitosane azoturé ont été synthétisés avec différents équivalents de 3-azidopropanal par rapport au nombre de motifs glucosamine. Le 3-azidopropanal est partiellement soluble dans l'eau : lorsque ce composé (liquide à température ambiante) est ajouté au milieu réactionnel, celui-ci devient orange (partie soluble du réactif) et des gouttelettes en suspension se forment (partie insoluble du réactif). En fin de réaction, le milieu réactionnel est précipité dans du méthanol (la partie insoluble du 3-azidopropanal se solubilise dans MeOH)

et le précipité est centrifugé. Les différents lots d'oligo-chitosanes azoturés ont été analysés par IR-TF, RMN ^1H et GPCaq (Figure 85).

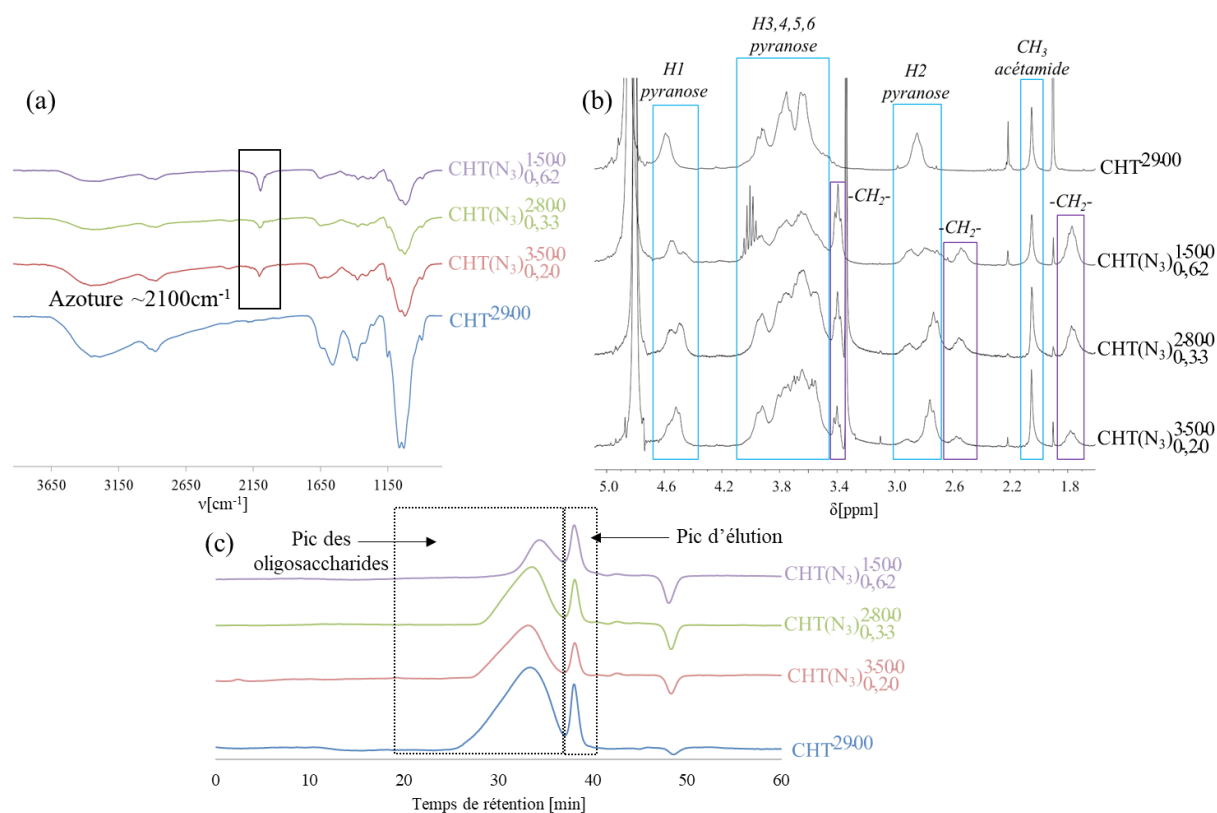


Figure 81 Caractérisations des chitosanes N-azoturés synthétisés en milieu aqueux

(a) IR-TF (b) RMN ^1H D₂O (c) GPCaq

Les spectres IR-TF des différents chitosanes N-azoturés montrent les signaux du chitosane ainsi que le signal caractéristique des fonctions azoture à 2100cm⁻¹ (Figure 85a). Cependant l'infrarouge ne montre pas si les fonctions azoture sont bien liées au chitosane et quel taux d'azoture a été greffé.

Les spectres de RMN ^1H des chitosanes N-azoturés présentent les signaux caractéristiques du chitosane en plus de nouveaux signaux correspondant aux trois méthylènes liant la fonction azoture au chitosane (Figure 85b). Les DS et les masses molaires des différents lots sont indiqués dans le Tableau 26.

Plusieurs modifications de masses molaires ont été constatées :

Lots	Oligo-chitosanes natifs	Nombre d'équivalents 3-azidopropanal ^a	DS(N ₃) ^b	\overline{M}_n [g/mol] (Đ)
CHT-N ₃ ³⁵⁰⁰ _{0,2}	CHT ²⁹⁰⁰ (Đ = 4,7)	0,25	20%	3 500 (3,2)
CHT-N ₃ ²⁸⁰⁰ _{0,33}		0,5	33%	2 800 (3,0)
CHT-N ₃ ¹⁵⁰⁰ _{0,62}		1	62%	1 500 (2,4)

^a par rapport aux motifs glucosamine ^b déterminé par RMN-¹H (D₂O)

Tableau 24 Degrés de substitution en azoture (DS(N₃)) et masses molaires des oligo-chitosanes azoturés synthétisés en milieu aqueux

- Le lot de chitosane N-azoturé synthétisé avec 0,25 équivalent d'aldéhyde a une Mn plus élevée que celle de l'oligo-chitosane.
- Le lot de chitosane N-azoturé synthétisé avec 0,5 équivalent d'aldéhyde a une Mn similaire à celle de l'oligo-chitosane.
- Le lot de chitosane N-azoturé synthétisé avec 1 équivalent d'aldéhyde a une Mn plus basse que celle de l'oligo-chitosane.

Ces variations de masse molaire sont probablement dues au fait que la fonctionnalisation des fonctions amine impacte le rayon hydrodynamique du polymère en solution aqueuse. Lorsque le DS est faible (20%), il y a des interactions secondaires hydrophobes entre les chaînes dues à la présence du propyl-azoture, ce qui a pour effet d'augmenter le rayon hydrodynamique du polymère. L'augmentation du nombre de propyl-azoture rend le chitosane moins hydrosoluble par suite de formation d'interactions intra chaînes, ce qui a pour effet de diminuer le rayon hydrodynamique (DS=33% et 62%).

Le Tableau 24 montre que plus le nombre d'équivalents en 3-azidopropanal augmente, plus le DS(N₃) augmente. Cependant il n'y a pas proportionnalité entre le nombre d'équivalents et le DS(N₃) qui peut s'expliquer par la faible solubilité du 3-azidopropanal dans l'eau distillée. Lors de la réaction, seule la partie soluble du réactif réagit avec le chitosane. Le DS(N₃) étant un paramètre influençant les structures et les propriétés des copolymères synthétisés, il est important d'avoir le meilleur contrôle possible sur le taux d'azoture greffé sur le chitosane. Pour cette raison, nous avons développé une autre méthode d'azoturation par amination réductrice avec un meilleur contrôle du DS(N₃) en changeant le solvant de la réaction pour solubiliser à la fois le chitosane et le 3-azidopropanal et ainsi mieux contrôler le greffage.

3.1.4 Synthèse de chitosanes N-azoturés par amination réductrice en milieu hydroalcoolique

Des tests de solubilité du chitosane et du 3-azidopropanal ont mis en évidence que le mélange de solvants méthanol /eau /acide acétique (4/ 1/ 0,01 : v/ v/ v) est capable de solubiliser les deux composés. Ce mélange de solvant a notamment été utilisé par Sashiwa et al.¹⁵³ pour l'amination réductrice de chitosanes N-substitués à partir d'un chitosane de $\overline{Mn} = 24\text{kDa}$ et un DDA de 80%. (Figure 82).

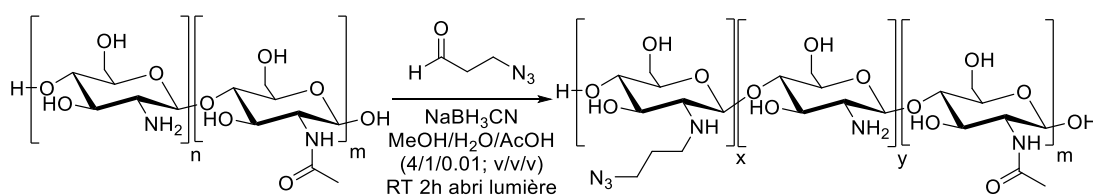


Figure 82 Synthèse de chitosanes azoturés en milieu hydroalcoolique

Les réactions effectuées dans ce mélange ne posent plus de problèmes de solubilité. En fin de réaction le milieu réactionnel a été concentré puis précipité dans un mélange méthanol/ NaOH_{aq} (2M) (300/1 ; v/v), la soude servant à neutraliser l'acide acétique et ainsi faciliter la précipitation du chitosane. Le précipité obtenu est resolubilisé dans de l'eau et dialysé (MWCO =1kDa) dans un premier temps contre un mélange de solvants identique au milieu réactionnel afin d'éliminer le 3-azidopropanal et le cyanoborohydrure de sodium résiduels, puis contre de l'eau distillée afin d'éliminer le méthanol et l'acide acétique. Par la suite, la solution contenue dans le boyau de dialyse est lyophilisée.

Deux lots d'oligo-chitosane ont été utilisés et les nombres d'équivalents testés sont 0,25 et 0,5. Les chitosanes N-azoturés obtenus ont été caractérisés par IR-TF, RMN ¹H et GPC_{aq}. Les propriétés des différents lots sont reportées dans le Tableau 25.

Lots	Oligo-chitosanes	Equivalents de 3-azidopropanal	DS(N ₃)	\overline{M}_n [g/mol] (Đ)
CHT-N _{30,47} ⁴⁸⁰⁰	CHT ²⁸⁰⁰	0,25	0,47	4800 (2,6)
CHT-N _{30,72} ²¹⁰⁰		0,5	0,72	2100 (3,0)
CHT-N _{30,40} ³¹⁰⁰	CHT ²³⁰⁰	0,25	0,40	3100 (3,44)
CHT-N _{30,67} ²³⁰⁰		0,5	0,67	2300 (2,81)

Tableau 25 Degrés de substitution en azoture (DS(N₃)) et masses molaires des oligo-chitosanes azoturés synthétisés en milieu hydroalcoolique.

Les analyses IR-TF sont similaires à celles des chitosanes N-azoturés synthétisés en phase aqueuse : on observe les signaux caractéristiques du chitosane et le signal des fonctions azoture à 2100cm⁻¹.

Les \overline{M}_n mesurées par GPC_{aq} des chitosanes N-azoturés synthétisés avec 0,25 équivalent sont plus élevées que celle du chitosane natif, et l'évolution des masses molaires avec le taux de substitution est similaire à celle des lots de chitosanes N-azoturés synthétisés en phase aqueuse.

Cependant les DS estimés par RMN ¹H sont plus élevés que la valeur maximale théorique, compte tenu du nombre d'équivalent d'azoture ajouté lors de la synthèse. Une hypothèse est que la dialyse élimine préférentiellement les chaînes de chitosane moins substituées augmentant ainsi le DS estimé par RMN du copolymère resté à l'intérieur du boyau de dialyse. Le mode de purification a donc été changé, la dialyse a été supprimée et le milieu réactionnel est précipité deux fois dans du méthanol. Deux précipitations sont effectuées, car une seule purification ne suffit pas à éliminer les sels résiduels (visibles en analyse IR-TF et RMN ¹H).

Les lots synthétisés via ce protocole sont répertoriés dans le Tableau 26. Ces composés ont été analysés par IR-TF, RMN ¹H et GPC_{aq} (Figure 83).

Le Tableau 26 présente les degrés de substitution en azoture DS(N₃) obtenus par RMN ¹H (Figure 83a) ainsi que les masses molaires déterminées en GPC (Figure 83b) pour chaque lot de chitosane azoturé en fonction de la quantité de 3-azodipropanal introduite au départ.

Les analyses IR-TF montrent les signaux caractéristiques du chitosane et le signal des fonctions azoture à 2100cm⁻¹.

Lots	Oligo-chitosane utilisé	Équivalents 3-azidopropanal	DS (N ₃) (RMN D ₂ O)	\overline{M}_n [g/mol] (Đ)
CHT-N _{30,04} ⁴⁷⁰⁰	CHT ³⁴⁰⁰ (Đ = 3,5)	0,05	4%	4700 (3,0)
CHT-N _{30,17} ⁴¹⁰⁰		0,1	17%	4100 (3,9)
CHT-N _{30,29} ³⁸⁰⁰		0,25	29%	3800 (4,6)
CHT-N _{30,57} ²³⁰⁰		0,5	57%	2300 (3,9)
CHT-N _{30,06} ³⁷⁰⁰	CHT ¹⁶⁰⁰ (Đ = 3,4)	0,05	6%	3700 (3,0)
CHT-N _{30,11} ²⁶⁰⁰		0,1	11%	2600 (2,5)
CHT-N _{30,27} ⁴²⁰⁰		0,25	27%	4200 (4,1)

Tableau 26 Synthèses de chitosanes N-azotés par amination réductrice purifiés par double précipitation au méthanol

Les analyses par RMN ¹H montrent que les DS(N₃) des différents lots de chitosane N-azoté sont relativement bien corrélés aux nombres d'équivalents en 3-azidopropanal. Les valeurs de DS(N₃) sont néanmoins légèrement supérieures aux valeurs théoriques maximales, mais ces variations peuvent être expliquées par l'incertitude sur les valeurs d'intégration des signaux de RMN ¹H. Par conséquent, le protocole d'amination réductrice avec un traitement par double précipitation permet de synthétiser des chitosanes N-azotés avec un meilleur contrôle du DS(N₃).

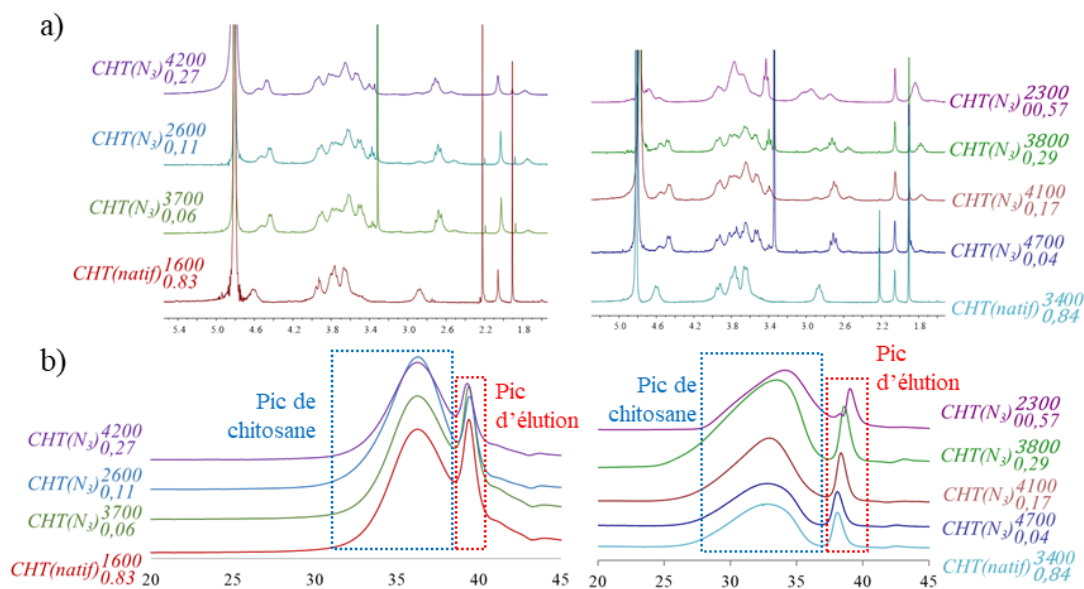


Figure 83 Caractérisations des différents lots de chitosane N-azotés purifiés par double précipitation (a) RMN ¹H (D₂O, 300MHz) (b) GPCaq

3.2 Thiolation du chitosane

L'introduction de fonctions thiol le long d'une chaîne chitosane permet d'effectuer des réactions de thiol-yne avec des composés propargylés. La thiol-yne permet de coupler deux fonctions thiols (et donc deux chaînes de chitosane) par fonction propargyle, contrairement à la CuAAC qui ne permet de coupler qu'une seule fonction azoture (donc une seule chaîne de chitosane). D'autre part la thiol-yne ne nécessite pas de sels de cuivre qui sont des composés toxiques et qui sont beaucoup plus difficiles à éliminer du chitosane que du dextrane.

Dans un premier temps, les méthodes de thiolation de la littérature ainsi que leurs limitations sont exposées et dans un second temps est présenté le développement d'une nouvelle méthode de thiolation du chitosane par amination réductrice.

3.2.1 Les méthodes de thiolation de chitosane décrites dans la littérature.

Les méthodes de thiolation du chitosane consistent en une amidation des fonctions amine du chitosane par une molécule comportant un thiol et un acide carboxylique. Un certain nombre d'acides thiolés ont été utilisés comme l'acide thioglycolique^{131,155} ou la N-acétylcystéine¹⁵⁶. Croce et al.¹⁵⁷ ont ainsi généré une bibliothèque de chitosanes thiolés obtenus à partir de différents acides carboxyliques thiolés (Tableau 27). En plus des acides d'autres réactifs sont reportés pour générer des chitosanes thiolés, comme le 2-iminothiolane¹⁵⁶ ou l'homocystéine-thiolactone¹⁵⁸.

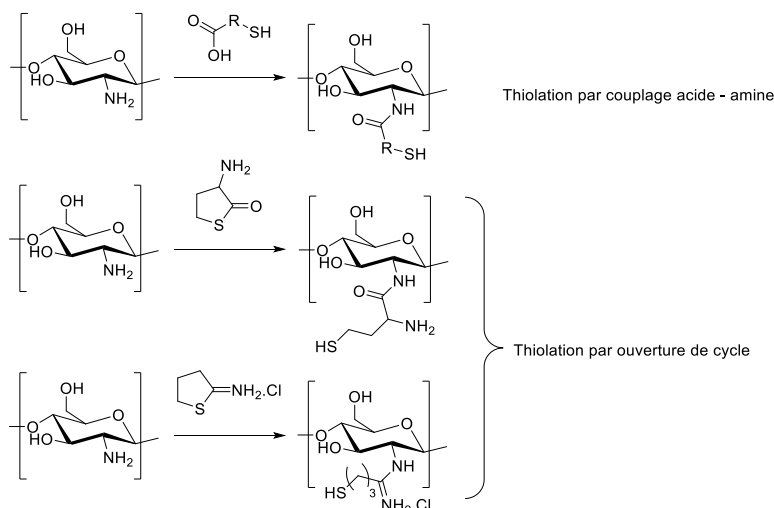


Figure 84 Différentes voies de thiolation de chitosane reportées dans la littérature

- Les différentes réactions de thiolation sont illustrées dans la Figure 84. Dans les études citées dans le Tableau 27, les thiols ont pour but d'améliorer les propriétés mucoadhésives du

chitosane. Cependant les réactions de thiolation reportées présentent certaines limitations pour effectuer des couplages thiol-yne sur les chitosanes ainsi thiolés :

- Il n'est pas possible de contrôler le DS en fonction du nombre d'équivalent en réactif. Par exemple, dans l'étude de Croce et al.¹⁵⁷ un excès de réactif thiolé est utilisé par rapport au nombre de fonctions amine, mais les DS ne dépassent pas 4%.

- Pour effectuer une réaction de thiol-yne, il faut que chaque chaîne de chitosane thiolé ait au moins une fonction thiol. Or, si les oligo-chitosanes hydrosolubles (3000 g/mol au maximum, soit 18 unités) ont un DS de 4% une fois fonctionnalisé (DS maximal atteignable avec ces méthodes), alors il y aura moins d'une unité glucosamine thiolée sur 18.

À cause de ces limitations, ces réactions ne seront pas exploitées pour la thiolation des oligo-chitosanes. Une autre méthode de thiolation est développée qui consiste à fonctionnaliser les oligomères par un procédé d'amination réductrice similaire à celui développé pour synthétiser les chitosanes N-azoturés. Dans un premier temps, le 3-oxopropylthioacétate (3-OPT), une molécule bifonctionnelle aldéhyde-thiol (sous forme protégée en thioacétate), est synthétisée. La protection des thiols en thioester permet d'éviter que les thiols ne réticulent sous forme de ponts disulfure. Cette molécule est ensuite couplée sur les amines d'oligo-chitosanes par amination réductrice.

3.2.2 Synthèse du 3-oxopropylthioacétate

La première étape consiste à préparer le 3-oxopropylthioacétate (3-OPT)¹⁵⁴, par addition 1,4 de l'acide thioacétique sur de l'acroléine (Figure 85).

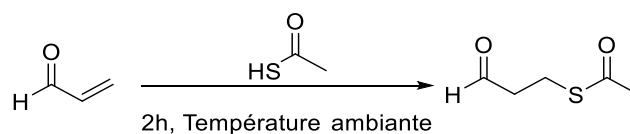


Figure 85 Synthèse du 3-oxopropylthioacétate

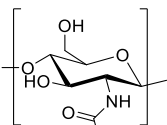
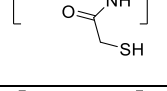
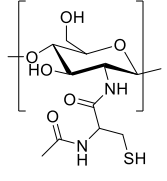
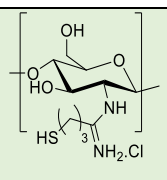
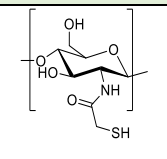
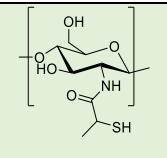
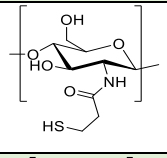
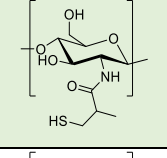
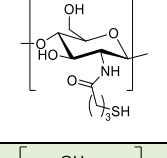
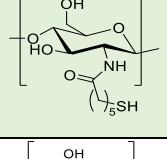
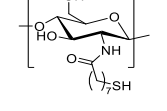
Référence	Chitosane natif		Structure du chitosane thiolé	Quantification des thiols	
	Masse molaire	DDA		Nombre de moles pour 1g de chitosane [$\mu\text{mol/g}$]	DS
Kast et Bernkop-Schnürch ¹³¹	Non indiquée	>85%		5 - 40	0,1 – 0,8%
Geisberger et al. ¹⁵⁵	Non indiquée	>85%		160 – 173	3%
Fernandes et al. ¹⁵⁶	15kDa	87%		158	3%
				172	3%
Croce et al. ¹⁵⁷	92kDa	93%		90,2	2%
				186,7	3%
				144,1	3%
				206,6	4%
				168,3	3%
				253,7	4%
				254,6	4%

Tableau 27 Différents chitosanes N-thiolés reportées dans la littérature

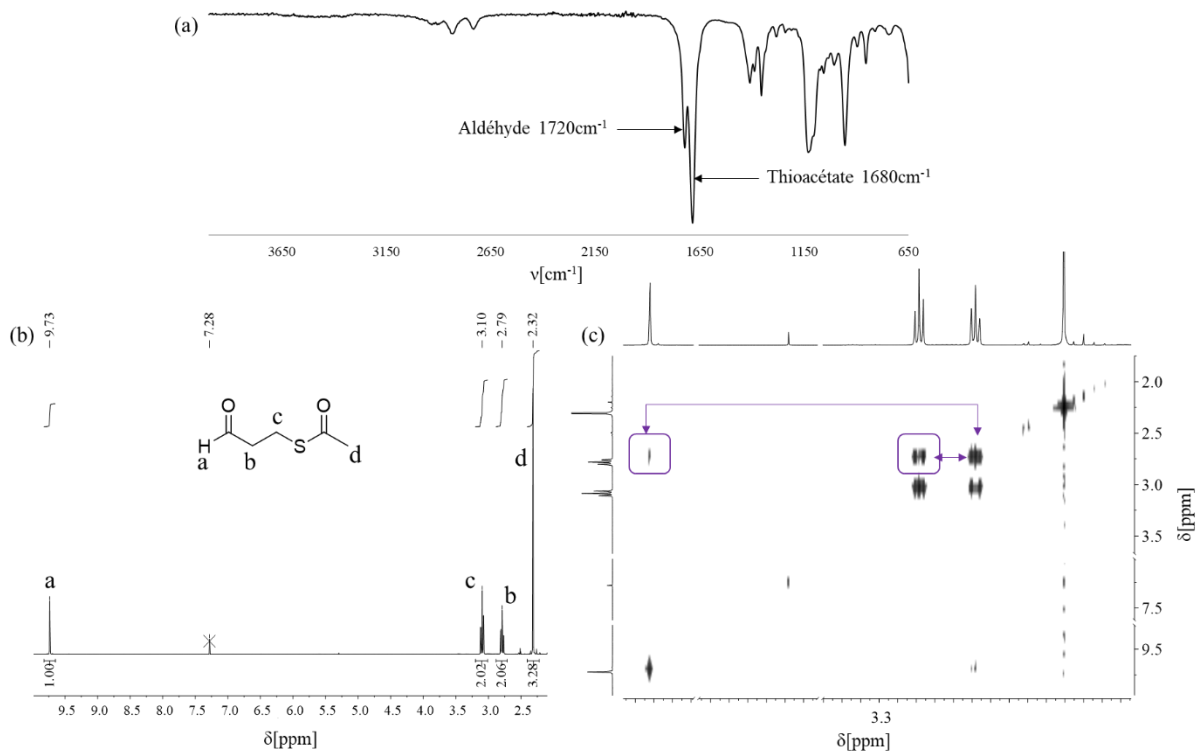


Figure 86 Caractérisations du 3-OPT (a) IR-TF (b) RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) (c) RMN COSY (CDCl_3 , 300 MHz)

Cette molécule a été caractérisée par IR-TF et RMN ^1H et COSY dans CDCl_3

L'analyse par IR-TF montre la présence des deux fonctions thioester (1680cm^{-1}) et aldéhyde (1720cm^{-1}) (Figure 86a).

Le spectre de RMN ^1H (CDCl_3) permet d'identifier l'aldéhyde (9,73ppm), les deux méthylènes du 3-OPT (3,10 et 2,79ppm) et le méthyle du thioacétate (2,32ppm) (Figure 86b). Les deux méthylènes ont été différenciés par RMN COSY (Figure 86c) : le méthylène à 2,79ppm est à côté de la fonction aldéhyde, car il est corrélé avec le signal à 9,73ppm, alors que celui à 3,10ppm est à côté du thioester.

3.2.3 Synthèse de chitosanes N-thioacétylés par amination réductrice en milieu hydroalcoolique

Le 3-OPT a été couplé sur les amines d'oligo-chitosanes par amination réductrice *via* un protocole similaire à celui décrit précédemment pour l'azoturation en mélange hydroalcoolique. Dans un premier temps, l'amination réductrice a été effectuée avec le protocole de Sashiwa et al.¹⁵³ évoqué précédemment (Figure 87).

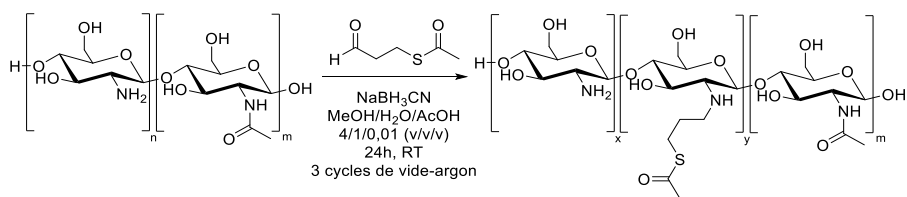


Figure 87 Synthèse du chitosane N-thioacétylé

Le moyen de purification employé est une précipitation dans le méthanol suivie d'une dialyse dans l'eau. Les différents lots de chitosane synthétisés ont été annotés ainsi :



- Y correspond à la masse molaire \overline{Mn} du chitosane thioacétylé, déterminée par GPCaq.
- x correspond au degré de substitution en thioacétate, mesuré par RMN ^1H dans D_2O via le rapport d'intégrations entre le signal des méthyles du thioacétate (2,37ppm) et le signal des méthyles des motifs N-acétylglucosamine du chitosane (Figure 88 et Figure 89c). Le DS(SAc) a été calculé avec ces intégrales, car les signaux utilisés précédemment pour calculer les DS(N_3) sont superposés avec le pic d'eau résiduelle.

$$\text{DS}(\text{SAC}) = \frac{\text{intégrale}(-\text{CH}_3 \text{ thioacétate})}{1 - \frac{\text{intégrale}(-\text{CH}_3 \text{ acétamide})}{3}} \times 100$$

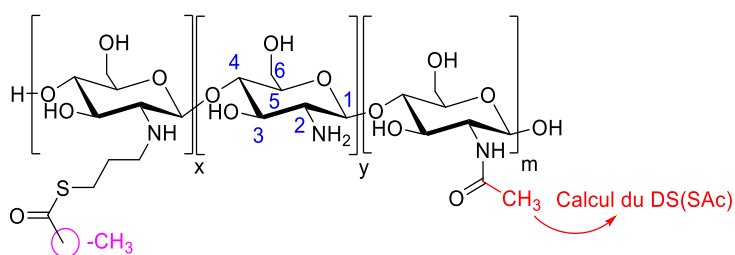


Figure 88 Structure du chitosane N-thioacétylé

Pour effectuer ce calcul il faut que l'amination réductrice ne modifie pas le DDA du chitosane N-thioacétylé. Or les aminations précédentes n'ont pas modifié de manière significative le DDA. Par conséquent pour chaque thioacétylation, le DDA du chitosane N-thioacétylé sera considéré inchangé par rapport à celui des oligomères non modifiés correspondants.

Les premiers lots de chitosane N-thioacétylé présentent des problèmes de solubilité en milieu aqueux. Il est probable qu'au cours de l'amination réductrice, des fonctions thioester s'hydrolysent et les thiols générés peuvent former des ponts disulfures, notamment en présence

d'oxygène ambiant. Pour pallier ce problème des cycles « vide-argon » ont été mis en place afin d'éliminer le dioxygène dissous dans le milieu réactionnel. Les deux premiers lots de chitosane N-thioacétylé ont été synthétisés avec 0,5 et 1 équivalent en 3-OPT par rapport au nombre de motifs glucosamine, afin de mettre en évidence la faisabilité du couplage du 3-OPT. Les chitosanes substitués ont été caractérisés par IR-TF, GPC_{aq} et RMN ¹H (Figure 89). Les propriétés des composés obtenus sont récapitulées dans le Tableau 30.

Lots	Mn du CHT natif (g/mol)	Équivalents en 3-OPT	DS (SAc)	\overline{M}_n
CHT(SAc) _{0,40} ⁶⁰⁰	1500	1	40%	600
CHT(SAc) _{0,34} ¹⁰⁰⁰		0,5	34%	1000

Tableau 28 Propriétés des chitosanes N-thioacétylés obtenus avec 0,5 et 1 équivalent de 3-OPT

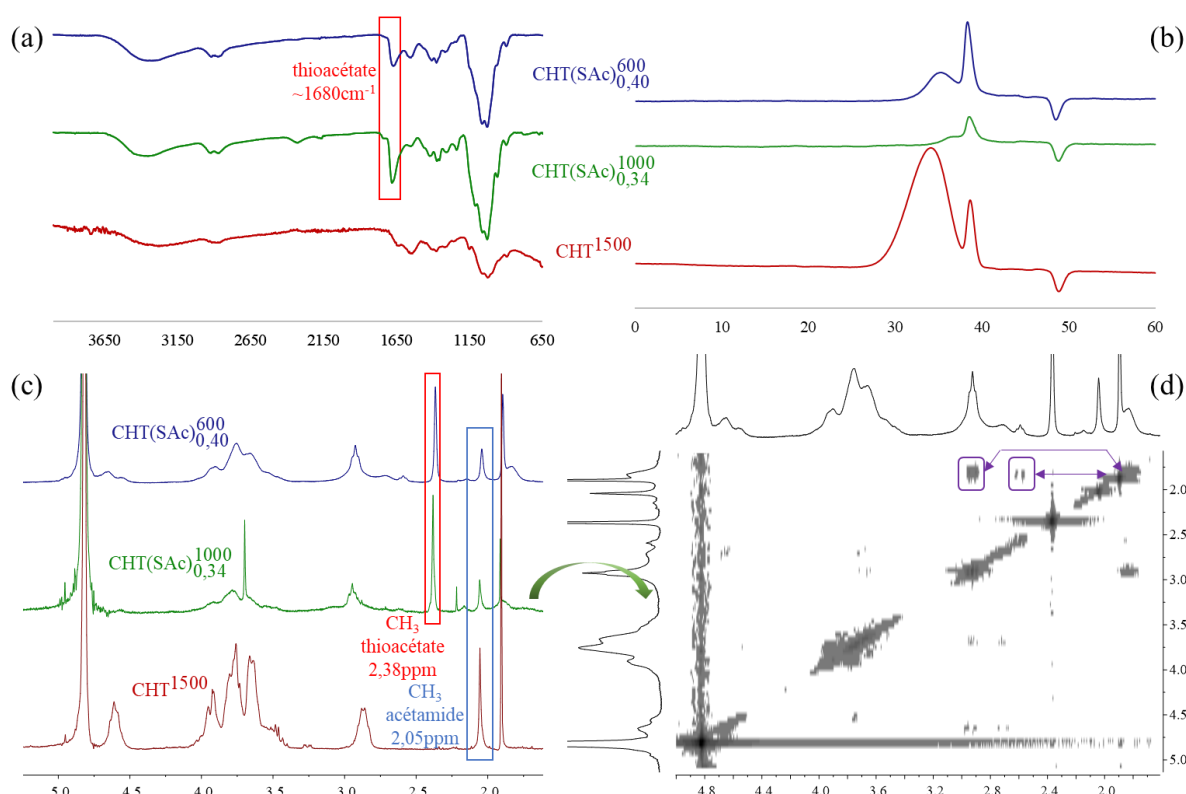


Figure 89 Analyses de chitosanes N-thioacétylés obtenus avec 0,5 et 1 équivalent de 3-OPT (a) IR-TF (b) GPC_{aq} (c) RMN ¹H (D₂O; 300MHz) (d) RMN COSY de CHT-SAc_{0,34}¹⁰⁰⁰ (D₂O, 300MHz)

Les deux lots ont des spectres IR-TF similaires (Figure 89a). En plus des signaux propres au chitosane, un signal à 1680cm⁻¹ apparaît qui correspond aux fonctions thioester formées.

Cependant, l'IR-TF ne permet pas de quantifier le taux de fonctions thioester couplées sur les chaînes de chitosane.

Les analyses par GPC_{aq} (Figure 89b) montrent que les masses molaires des chitosanes thioacétylés dérivés du lot CHT¹⁵⁰⁰ sont plus faibles (600 et 1000 g/mol) que celle du chitosane natif (1500 g/mol). Les conditions d'amination réductrice utilisées (nombre d'équivalents en 3-OPT notamment) provoquent une diminution des masses molaires des chitosanes.

Les spectres de RMN ¹H (Figure 89c) montrent la présence des pics du chitosane, d'un pic à 2,37ppm (méthyle de la fonction thioester) et de trois pics à 2,93, 2,59 et 1,83 ppm qui correspondent aux trois méthylènes reliant la fonction thioester à l'amine du chitosane. Les trois méthylènes ont été mis en évidence par RMN COSY sur le lot CHT(SAc)¹⁰⁰⁰_{0,34} (Figure 89d où les corrélations entre les 3 méthylènes sont indiquées).

Ces réactions montrent qu'il est possible de coupler des fonctions thioester par amination réductrice sur une chaîne de chitosane. Cependant, les DS(SAc) sont inférieurs aux valeurs théoriques : pour CHT(SAc)¹⁰⁰⁰_{0,34} : 34% au lieu de 50% et pour CHT(SAc)⁶⁰⁰_{0,40} 40% au lieu de 100% mais les taux de substitution obtenus sont bien supérieurs à ceux obtenus par les méthodes de la littérature.

Afin d'obtenir un meilleur contrôle des taux de substitution, des réactions avec de plus faibles équivalents d'OPT (0,1 et 0,25) ont été réalisées. Les propriétés de ces chitosanes N-thioacétylés sont reportées dans le Tableau 29.

Lots	\overline{M}_n CHT natif (g/mol)	Équivalents en 3-OPT	DS (SAc)	\overline{M}_n (g/mol)
CHT(SAc) ⁷⁶⁰ _{0,29}	3000	0,25	29%	760
CHT(SAc) ⁸⁶⁰ _{0,11}	3000	0,1	11%	860
CHT(SAc) ⁷⁶⁰ _{0,12}	1600	0,1	12%	760
CHT(SAc) ⁹⁰⁰ _{0,13}	1600	0,1	13%	900

Tableau 29 Propriétés des chitosanes N-thioacétylés obtenus avec 0,1 et 0,25 équivalent de 3-OPT

Les différents lots ont été caractérisés par IR-TF (Figure 90a). Contrairement aux lots préparés avec 0,5 et 1 équivalent en 3-OPT, le pic du thioester n'est pas visible à 1680 cm⁻¹ car il est masqué par le signal de l'acétamide à proximité (1640cm⁻¹). La présence du thioester est confirmée par les analyses RMN ¹H suivantes.

Les spectres de RMN ^1H montrent les signaux caractéristiques du chitosane et du méthyle du thioester à 2,37ppm (Figure 90b), les DS(SAc) présentent ici une bonne corrélation avec le nombre d'équivalents en 3-OPT. Un bon contrôle des DS(SAc) est donc possible jusqu'à 0,25 équivalent.

Les analyses par GPC_{aq} (Figure 90c) indiquent une diminution des masses molaires des chitosanes N-thioacétylés (760 à 900 g/mol) par rapport à celles des oligo-chitosanes natifs (1600 et 3000 g/mol). L'amination réductrice provoque donc invariablement une diminution des masses molaires du chitosane, indépendamment du nombre d'équivalents en 3-OPT. Cette évolution des masses molaires est différente de celle constatée lors des réactions d'azoturation.

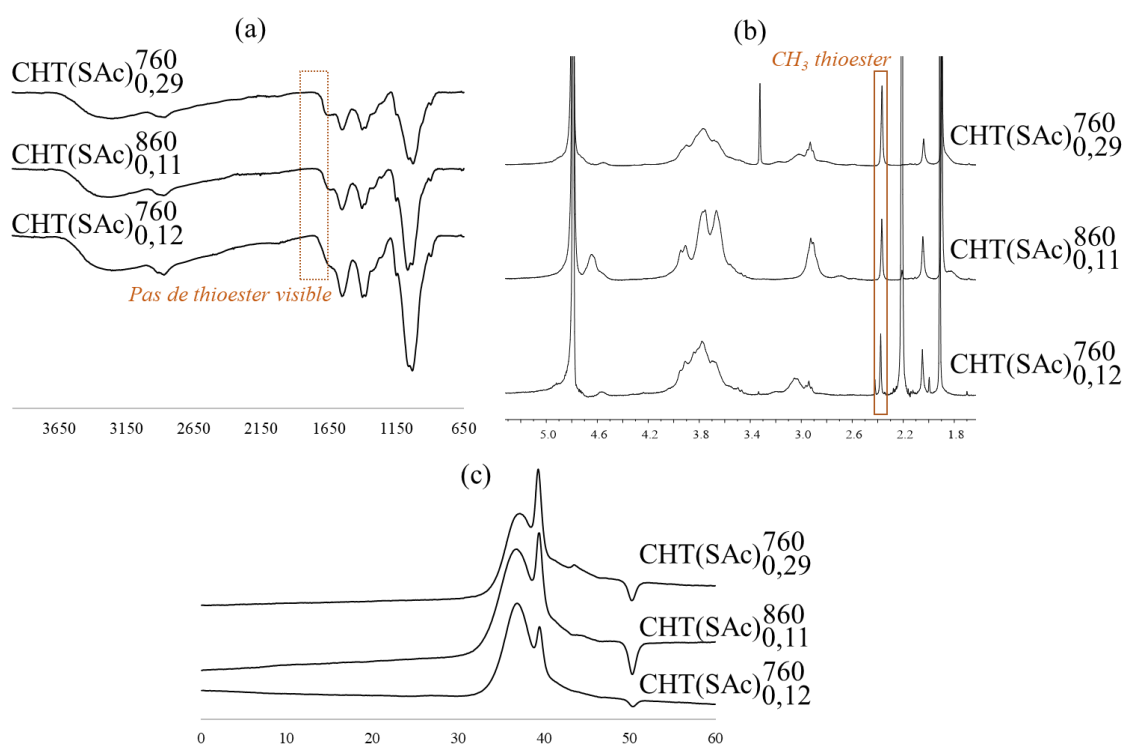


Figure 90 Analyses de chitosane thioacétylés obtenus avec 0,1 et 0,25 équivalent de 3-OPT
(a) IR-TF (b) RMN ^1H (D_2O ; 300MHz) (c) GPC_{aq}

Pour conclure, les synthèses de chitosanes N-thioacétylés par amination réductrice permettent le contrôle du DS(SAc) en fonction du nombre d'équivalents en 3-OPT, à condition de cibler des DS(SAc) inférieurs ou égaux à 25% (soit 0,25 équivalent en aldéhyde). Ces valeurs de DS(SAc) permettent d'obtenir des oligo-chitosanes avec une fonction thioester par chaîne de chitosane dans le cas de lot synthétisé avec 0,25 équivalent en aldéhyde. Dans le cas des lots à 0,1 équivalent, environ une chaîne de chitosane sur deux est fonctionnalisée. Ce résultat est

inférieur à celui souhaité (une fonction par chaîne) mais les chaînes de chitosane non substitué ne posant pas de problème pour la réaction de thiol-yne, ces lots de chitosanes N-thioacétylés ont été utilisés pour préparer des copolymères. Notons qu'il sera nécessaire d'hydrolyser les fonctions thioester en thiols pour réaliser la thiol-yne.

4 Synthèses des copolymères PCL-g-CHT par réactions de chimie « Clic »

4.1 Synthèses des copolymères PCL-g-CHT par CuAAC

Les réactions de CuAAC ont été largement décrites pour la synthèse de copolymères par greffage « onto »^{63,133,152,159,160}. Le protocole utilisé pour coupler le chitosane azoturé à la PCL-yne s'inspire du protocole de El Habnoui *et al.*⁵³ Cette synthèse est effectuée dans le DMSO, le catalyseur utilisé est du cuivre (I) complexé avec un ligand PMDETA (Figure 91). Plusieurs paramètres ont été testés pour optimiser la réaction de greffage : le nombre d'équivalents en azoture, le DS(-C≡CH) de la PCL-yne et le DS(N₃) du chitosane N-azoturé.

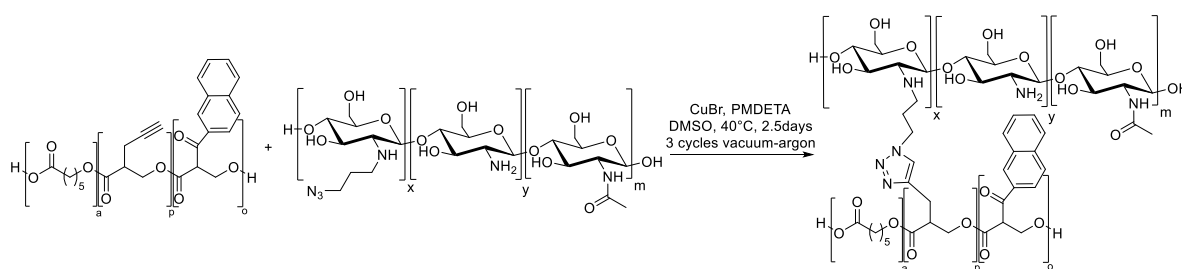


Figure 91 Synthèse de PCL-g-CHT par CuAAC

4.1.1 Premières synthèses : risques de réticulation

Les premières réactions ont été effectuées avec des rapports azoture/propargyle de 1,5 et 1,8. Cet excès a été choisi pour que l'ensemble des fonctions propargyle de la PCL puissent réagir. Les lots sont synthétisés avec les oligo-chitosanes azoturés fonctionnalisés en milieu aqueux. En fin de réaction, la formation d'un précipité est constatée. Les composés ont été ensuite purifiés par dialyse (MWCO 6~8kDa) contre une solution d'acide acétique (pH4) puis contre de l'eau. Les paramètres des deux lots de copolymères sont reportés dans le Tableau 30.

Lot copolymère	Lot PCL-yne	Lot CHT-N ₃	Nombre d'équivalents N ₃ /Propargyl
PCL-g-CHT 1	PCLyne ¹¹⁴⁰⁰ _{0,06}	CHT-N _{30,2} ³⁵⁰⁰	1,8
PCL-g-CHT 2	PCLyne ¹¹⁴⁰⁰ _{0,06}	CHT-N _{30,33} ²⁸⁰⁰	1,5

Tableau 30 Paramètres des réactions de CuAAC donnant des composés insolubles

Ces premiers greffages ont donné des composés insolubles dans l'eau, le DMSO, le DMF et le CHCl_3 . Par conséquent, la seule analyse effectuée est l'IR-TF (Figure 96). Les spectres des deux lots de PCL-g-CHT montrent la présence des signaux du chitosane et de la PCL, mais l'analyse ne permet pas de dire s'il s'agit d'un copolymère et/ou d'un mélange d'homopolymères. On note aussi la présence du pic de l'azoture qui a été mis en excès.

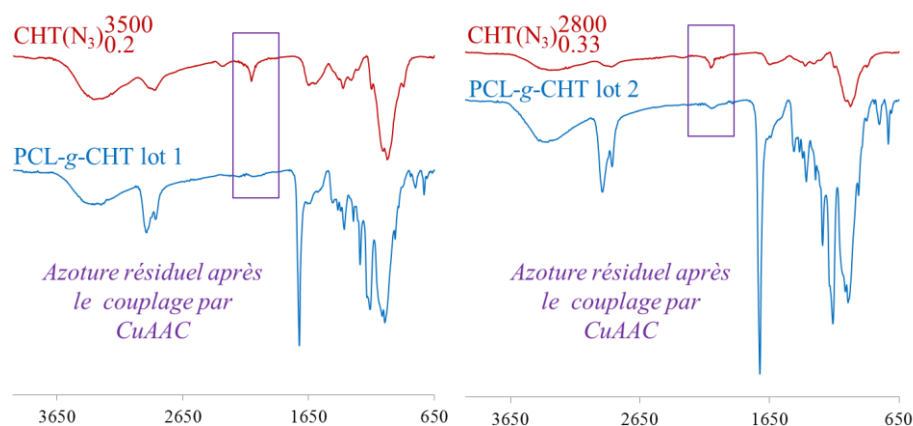


Figure 92 IR-TF des copolymères PCL-g-CHT insolubles, comparaison avec les CHT-N3 correspondants

La formation du précipité peut être expliquée parce qu'avec des rapports azoture/propargyle de 1,5 et 1,8, les chaînes d'homopolymères réticulent entre elles (Figure 93).

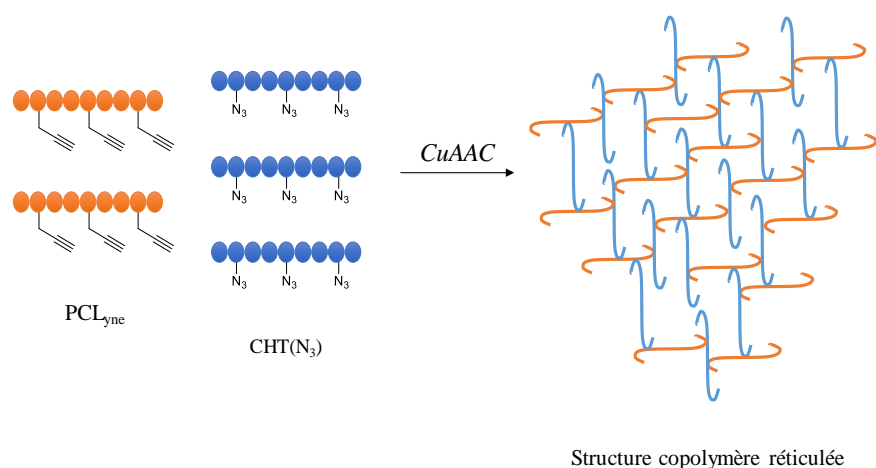


Figure 93 Réticulations lors du couplage par CuAAC

Afin d'éviter ces réticulations, la solution envisagée est d'utiliser un gros excès d'azoture par rapport au propargyle afin d'augmenter la probabilité que chaque fonction propargyle réagisse avec un azoture venant d'une chaîne de chitosane azoturé différente et ainsi favoriser la formation de copolymères greffés « inverses » PCL-g-CHT plutôt que de structures réticulées (Figure 94a).

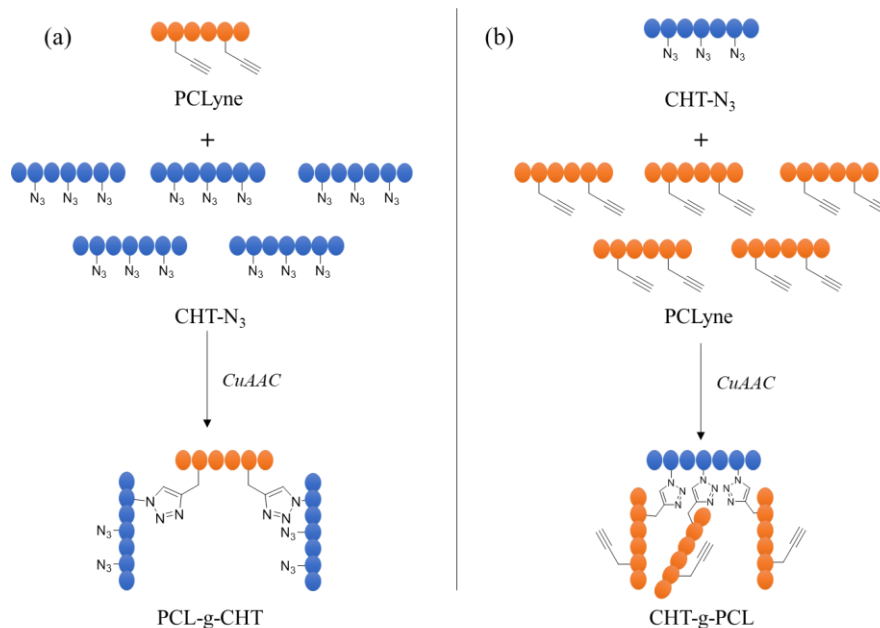
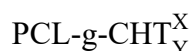


Figure 94 Structures théoriques obtenues par CuAAC entre une PCL_{lyne} et un CHT-N₃ (a) réaction avec un excès d'azoture (b) réaction avec un excès d'alcyn

Dans le cas où un excès de propargyle est utilisé par rapport aux fonctions azoture (Figure 94b), les structures formées se rapprochent de structures copolymères greffées « classiques » CHT-g-PCL (Figure 108b). Dit autrement, en fonction du rapport azoture/propargyle on peut théoriquement obtenir des structures « inverses », « classiques » ou des réticulations. Les copolymères suivants ont été préparés avec un grand excès d'azoture par rapport au propargyle. Ces copolymères sont annotés de la façon suivante :



Avec : X : masse molaire du copolymère (en g/mol) mesurée par GPC_{aq}.

γ : balance hydrophile/lipophile (BHL) du copolymère : rapport des unités glucosamine sur les unités hydroxycaproïque. Cette BHL est calculée à partir de l'analyse RMN ¹H dans le DMSO_{d6} du copolymère selon la relation suivante :

$$\text{BHL} = \frac{1}{3 * (1 - \text{DDA})} * \frac{\text{intégrale} (-\text{CH}_3 \text{ acétamide } 1,82\text{ppm})}{\text{intégrale} (-\text{CH}_2 - \text{PCL } 2,27\text{ppm})}$$

Un exemple de RMN ^1H dans le DMSO-d_6 d'un copolymère PCL-g-CHT est illustré dans la Figure 95 ci-dessous. Comme dans le cas des copolymères de PCL-g-DEX, il n'y a pas de signal correspondant aux protons des cycles triazole qui soit observable.

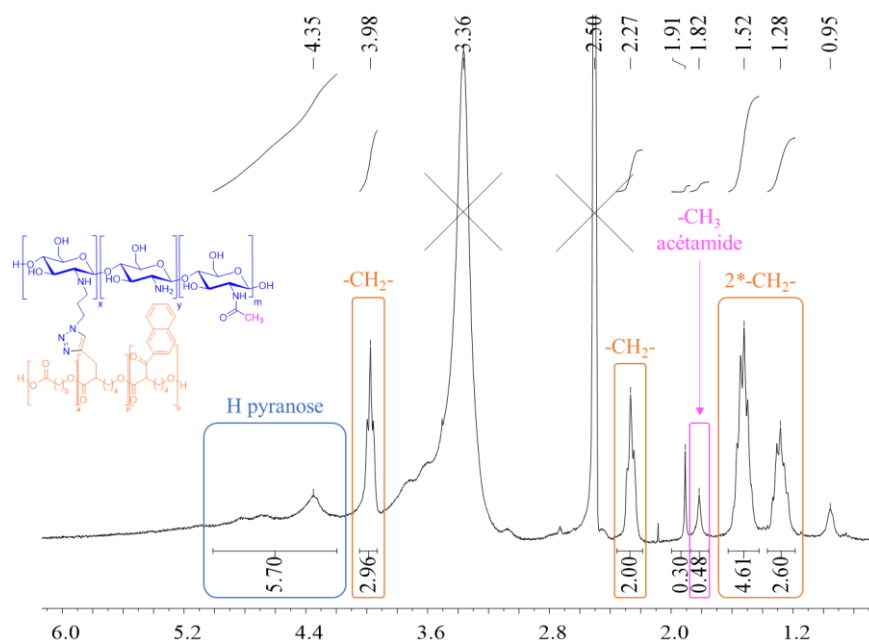


Figure 95 RMN-1H d'un copolymère PCL-g-CHT (DMSO-d_6 , 300MHz)

Les produits obtenus sont solubles dans le DMSO. L'influence de deux paramètres sur les propriétés des copolymères, les valeurs de $\text{DS}(\text{N}_3)$ des chitosanes N-azoturés et le rapport molaire azoture/propargyle est étudiée.

Les copolymères PCL-g-CHT synthétisés à partir de chitosanes N-azoturés avec différents $\text{DS}(\text{N}_3)$ (5%, 13% et 28%) sont reportés dans le Tableau 31. Ces lots ont été synthétisés avec la même PCL_{lyne} et avec des chitosanes de $\overline{\text{Mn}}$ relativement proches.

Lots de copolymère	PCL_{lyne}	Équivalents $\text{N}_3/\text{C}\equiv\text{CH}$	Lot de CHT- N_3	BHL	BHL maximale théorique ^a	Mn (g/mol)
<i>PCL-g-CHT</i> ³⁹⁰⁰ _{1,40}	<i>PCL</i> _{lyne} ¹⁸⁹⁰⁰ _{0,08}	10	<i>CHT-N</i> _{30,28} ³⁵⁰⁰	1,40	1,48	3900
<i>PCL-g-CHT</i> ⁵⁹⁰⁰ _{2,02}			<i>CHT-N</i> _{30,13} ²³⁰⁰	2,02	1,04	5900
<i>PCL-g-CHT</i> ¹¹⁰⁰ _{2,67}			<i>CHT-N</i> _{30,05} ³⁸⁰⁰	2,67	1,78	1100

^a Calcul détaillé ci-dessous

Tableau 31 Propriétés des copolymères en fonction du $\text{DS}(\text{N}_3)$ des chitosanes N-azoturés

La BHL maximale théorique a été calculée en considérant que pour chaque fonction propargyle il y a une chaîne de chitosane couplée et une seule.

$$\text{BHL maximale théorique} = \frac{n(\text{alcyne/chaîne PCL-yne}) * \text{Dp}(\text{CHT-N}_3)}{\text{Dp}(\text{PCL-yne})}$$

Les valeurs de BHL mesurées par RMN (Figure 96a) sont supérieures ou égales aux valeurs théoriques calculées. Cela signifie qu'il reste du chitosane non-greffé en fin de réaction, qui n'a pas été éliminé par la dialyse. Par conséquent, les BHL déterminées par RMN sont estimées par excès.

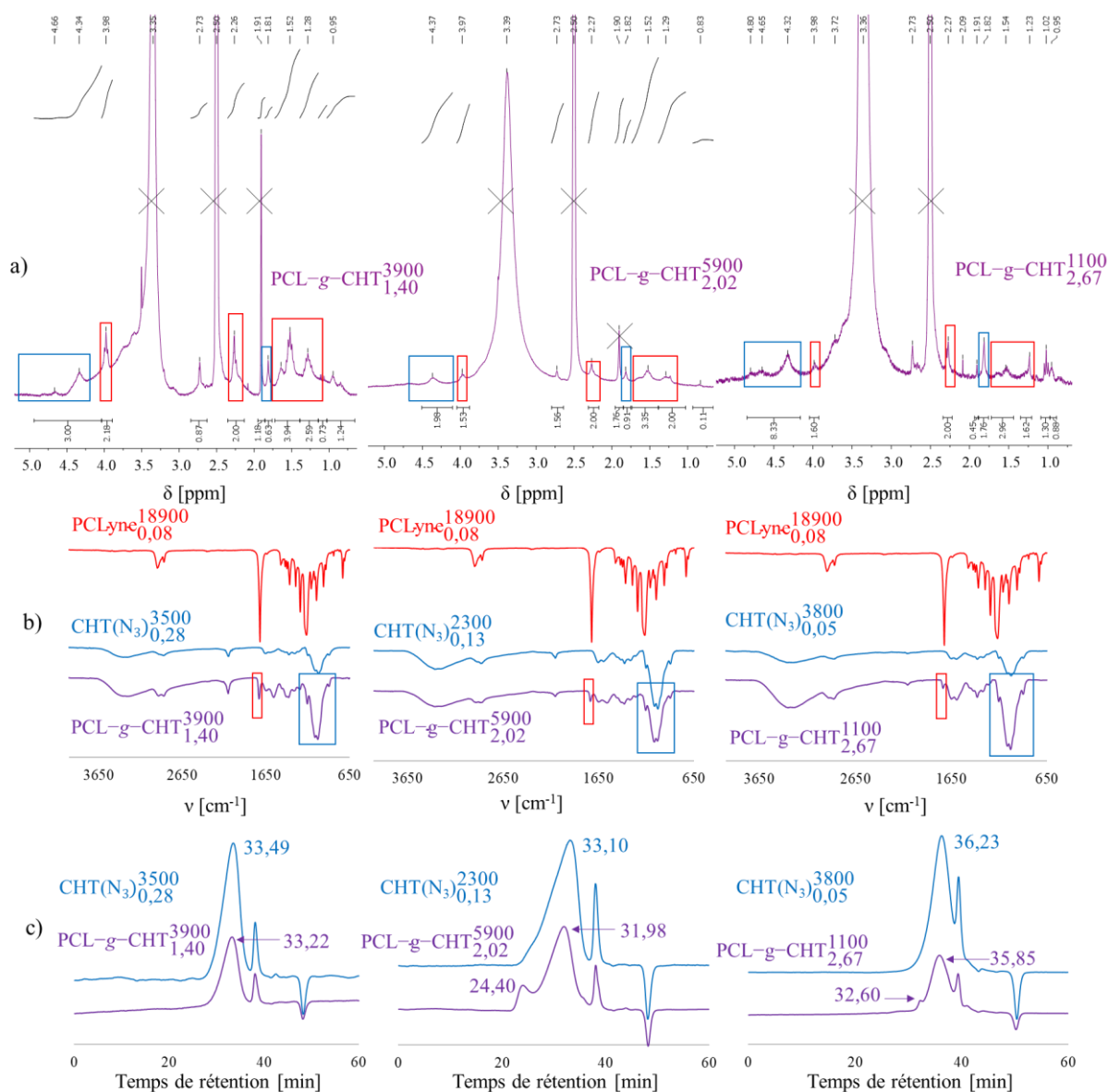


Figure 96 Caractérisations des copolymères PCL-g-CHT préparés à partir de CHT-N₃ avec différents DS(N₃) (a) RMN ¹H (DMSO_{d6}, 300MHz)(b) IR-TR (c) GPC_{aq}

Plus les DS(N₃) augmentent, plus les BHL diminuent ce qui peut paraître étonnant. Mais pour avoir un rapport azoture/propargyle = 10 il faut mettre en réaction un nombre de chaînes

de chitosane qui dépend de $DS(N_3)$: Plus $DS(N_3)$ est élevé, plus le nombre de chaînes de chitosane est faible. Pour cette raison, il peut être intéressant d'utiliser des chitosanes très substitués (29%) afin d'éviter la présence d'une quantité trop élevée de chitosane par rapport à la quantité de PCL. Mais le risque est alors qu'une même chaîne de chitosane réagisse sur plusieurs fonctions propargyle d'une même chaîne de PCL.

D'autre part, il est connu qu'en RMN les parties hydrophiles et hydrophobes d'un copolymère amphiphile ne sont pas détectées de la même manière selon le solvant utilisé : un solvant hydrophobe privilégiera la partie hydrophobe. Afin de vérifier la réponse des signaux de RMN, des mélanges en quantités connues de PCL_{yne} et de chitosane- N_3 ont été analysés par RMN (Tableau 32).

Mélanges	$\frac{1 \text{ motif glucosamine}}{3 \text{ motifs caprolactone}}$	$\frac{1 \text{ motif glucosamine}}{1 \text{ motif caprolactone}}$	$\frac{3 \text{ motifs glucosamine}}{1 \text{ motif caprolactone}}$
BHL théorique	0,33	1	3
BHL mesurée via RMN 1H dans le DMSOd6	0,15	0,44	1,04

Tableau 32 Comparaison des BHL théoriques et des BHL mesurées par RMN à partir de mélanges de PCL_{yne} et de chitosane- N_3

Les valeurs des « BHL » des mélanges mesurées dans le DMSO sont plus faibles que les valeurs réelles, d'un facteur F_{RMN} compris entre 2.2 et 2.9. Il faut donc tenir compte de ce facteur dans les calculs de BHL : $BHL \text{ réelle} = F_{RMN} * BHL_{(RMN \text{ DMSO})}$

En utilisant la valeur moyenne 2,3 pour F_{RMN} , les valeurs des BHL des produits du Tableau 33 sont modifiées:

Lots de copolymères	BHL (RMN DMSOd6)	BHL réelle
PCL-g-CHT$_{1,4}^{3900}$	1,40	3,18
PCL-g-CHT$_{2,0}^{5900}$	2,02	4,59
PCL-g-CHT$_{3,8}^{1100}$	2,67	6,06

Tableau 33 BHL réelles des lots de copolymères PCL-g-CHT

Les composés contiennent donc majoritairement du chitosane par suite de l'excès de fonctions azoture. Cependant la RMN ne permet pas de savoir si le chitosane est effectivement greffé à la PCL. Contrairement aux copolymères PCL-g-DEX étudiés précédemment, les solutions de copolymères dans le DMSOd6 sont trop visqueuses pour permettre d'effectuer une analyse DOSY. Ce phénomène n'est pas constaté sur des mélanges d'homopolymères

chitosane-N₃ et PCL_{yne}. Cela indique que la viscosité des solutions ne vient pas des homopolymères (en cas d'absence de couplage) et qu'elle est due à la présence de copolymère, dont la proportion ne peut être quantifiable par RMN DOSY dans le DMSO.

Les analyses IR-TF (Figure 96b) montrent la présence des signaux de chitosane et de PCL dans chaque lot de composé. La présence d'azoture résiduel est visible à 2100cm⁻¹ (azotures en excès). Cependant les composés synthétisés sont hydrosolubles, aucun précipité ne se forme dans l'eau bien que toutes les analyses montrent la présence de chaînes de PCL. Ces observations vont dans le sens de la formation d'un copolymère amphiphile, car s'il reste de la PCL non greffée, elle précipite dans l'eau.

Les analyses par GPC_{aq} (Figure 96c) des chitosanes azoturés et des copolymères n'ont pas pu être faites avec les mêmes calibrations à base de pullulanes (mis à part le lot PCL-g-CHT_{1,4}³⁹⁰⁰). Pour cette raison, seuls les temps de rétention seront comparés, mais dans certains cas la présence de pics non identifiés (tr = 24,60 min ou tr = 32,60 min) ne permet pas de tirer des conclusions claires. Dans le DMF les copolymères ne sont pas solubles et n'ont donc pas pu être analysés comme les copolymères de PCL-g-DEX étudiés dans le chapitre 2. Rappelons que ces copolymères sont synthétisés avec un excès de chitosane (insoluble dans le DMF) par rapport à la PCL, il n'est donc pas surprenant que les composés obtenus ne soient pas totalement solubles dans le DMF.

Pour conclure, les copolymères PCL-g-CHT synthétisés à partir de chitosane avec différents DS(N₃) sont hydrosolubles bien que contenant de la PCL. Leur comportement (rayon hydrodynamique notamment) est voisin de celui du chitosane, ce qui explique la difficulté à séparer le chitosane résiduel du copolymère par dialyse.

4.1.2 Étude de l'influence du nombre d'équivalents N₃/-C≡CH sur les propriétés des copolymères

Le Tableau 34 reporte les BHL et les masses molaires des copolymères PCL-g-CHT synthétisés à partir de différents rapports N₃/-C≡CH à partir de la même PCL-yne et avec des chitosanes de \overline{Mn} relativement proches.

Lots de copolymère	PCL-yne	Équivalent $N_3/C\equiv CH$	Lot de CHT-N3	BHL (RMN)	BHL réelle	BHL maximale théorique	Mn (g/mol)
$PCL-g-CHT_{2,25}^{4300}$	PCL-yne(Naph) $_{0,10}^{27000}$	5	CHT-N $_{30,05}^{3700}$	2,25	5,11	1,08	4300
$PCL-g-CHT_{1,44}^{3900}$		0,5		1,44	3,27	1,08	3900
$PCL-g-CHT_{ND}^{ND}$		0,05	CHT-N $_{30,05}^{3800}$	ND	ND	0,11	ND

Tableau 34 Propriétés des copolymères en fonction du nombre d'équivalents $N_3/C\equiv CH$

Dans le cas du lot $PCL-g-CHT_{2,25}^{4300}$, une dialyse de contrôle a été effectuée sur des oligochitosanes azoturés dans les mêmes conditions que le milieu réactionnel en fin de couplage. La proportion de chitosane résiduel a été estimée à 8%. La dialyse permet donc d'éliminer la majorité du chitosane non-greffé. Cependant ce résultat ne peut pas être généralisé à l'ensemble des réactions, car différents paramètres diffèrent au cours de la CuAAC, comme la quantité et le lot de chitosane N-azoturé utilisé.

L'analyse par RMN 1H des copolymères (Figure 97a) permet de déterminer leur BHL. Celle-ci diminue quand le nombre d'équivalents $N_3/C\equiv CH$ diminue. Dans le cas du lot $PCL-g-CHT_{ND}^{ND}$, la BHL n'a pas été déterminée, car les signaux caractéristiques du chitosane sont absents du spectre de RMN (les signaux de la PCL sont les seuls visibles).

Les analyses IR-TF (Figure 97b) indiquent la présence de PCL et de chitosane dans les lots préparés avec un rapport $N_3/C\equiv CH = 5$ et 0,5. L'absence de fonction azoture résiduelle est à noter dans le cas du lot préparé avec 0,5 équivalent en azoture. Un lot préparé avec 0,05 équivalent en azoture ne présente que des signaux de PCL, il contient trop peu de chitosane pour que ce dernier soit détectable.

Les analyses de GPC_{aq} (Figure 97c) montrent que les masses molaires des copolymères $PCL-g-CHT_{2,25}^{4300}$ et $PCL-g-CHT_{1,44}^{3900}$ ne sont pas supérieures à celle du chitosane N-azoturé utilisés pour les synthétiser. Le lot $PCL-g-CHT_{ND}^{ND}$ est non hydrosoluble et n'a donc pas été analysé par GPC_{aq}.

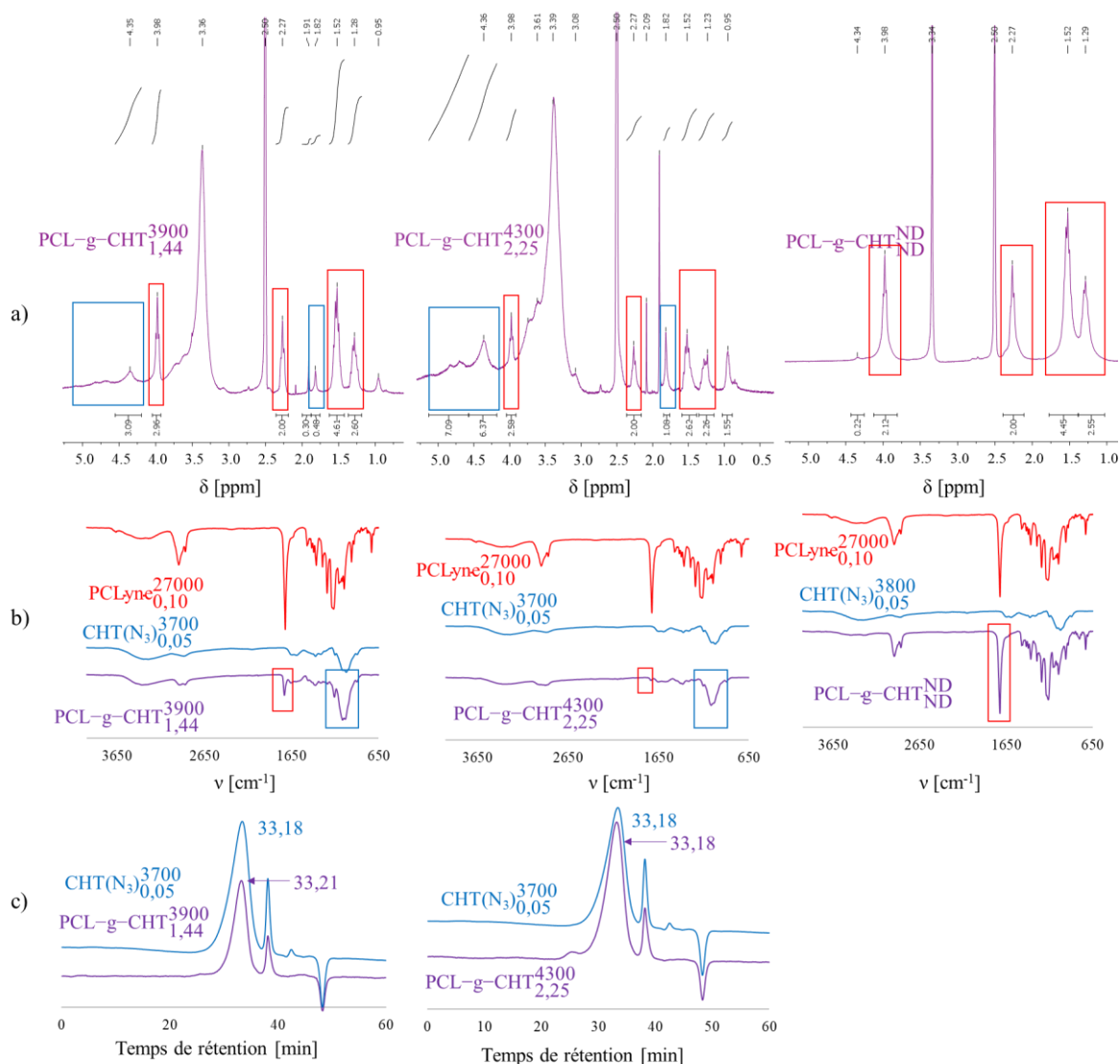


Figure 97 Caractérisations des copolymères PCL-g-CHT préparés à partir de différents équivalents $N_3/C\equiv CH$ (a) RMN 1H (DMSO d_6 , 300MHz)(b) infrarouge (c) GPC $_{aq}$

Pour conclure, Il est difficile de caractériser de manière non ambiguë les copolymères. Cependant certaines caractéristiques peuvent être estimées. On note que plus le rapport $N_3/C\equiv CH$ augmente, plus la BHL du copolymère augmente. Lorsque $N_3/C\equiv CH < 1$, il n'y a pas d'azoture résiduel sur le copolymère et pour $N_3/C\equiv CH = 0,05$ le copolymère obtenu est non hydrosoluble et il n'est pas possible d'estimer sa BHL.

Comme dans le cas des copolymères à base de dextrane, pour des applications biomédicales la présence de sels toxiques de cuivre est à éviter. Mais, contrairement au dextrane, le chitosane est un très bon chélatant des ions cuivre^{161,162} et il n'est pas possible d'éliminer le cuivre par

dialyse des copolymères contre de l'eau distillée comme dans le cas des copolymères PCL-g-DEX.

4.1.3 Élimination du cuivre résiduel des copolymères PCL-g-CHT

Plusieurs méthodes d'élimination du cuivre ont été testées :

- La première méthode consiste à traiter une solution aqueuse de copolymère par une résine Dowex MSC-1 marathon possédant des fonctions acide sulfonique qui complexent les ions cuivreux¹⁶³. Mais le traitement d'un copolymère avec cette résine acide peut le dégrader.

- La seconde méthode consiste à laver une suspension de copolymère dans un volume d'EDTA (0,1M, pH 8), chélatant du cuivre qui a été décrit pour éliminer le cuivre résiduel dans une réaction de CuAAC impliquant du chitosane.^{159,164-166}

Dans les deux cas, il reste du cuivre résiduel dans les copolymères comme le montrent les analyses ICP-MS reportées dans le Tableau 35:

Méthode de purification	Lot de copolymères	Concentration en cuivre ^a (ppm)	
Dowex MSC-1	PCL-g-CHT _{1,4} ³⁹⁰⁰	Avant traitement	1251
		Après traitement	146
EDTA	PCL-g-CHT _{1,9} ⁶¹⁰⁰	Avant traitement	613
		Après traitement	152

^a déterminée par ICP-MS

Tableau 35 Essais d'élimination du cuivre lors de la purification des copolymères

Ces différents protocoles de purification ont permis de diminuer la quantité de cuivre résiduel, sans l'éliminer totalement. Des tests de cytotoxicité seront nécessaires pour vérifier si les quantités de cuivre résiduel sont rédhibitoires pour des études biologiques sur les nano-objets. En revanche, la présence de cuivre résiduel n'influence pas les propriétés physico-chimiques des nano-objets qui seront caractérisés par des analyses de DLS présentées plus loin.

4.2 Synthèses de copolymères PCL-g-CHT par couplage thiol-yne

Comme indiqué précédemment l'intérêt de la voie thiol-yne est de greffer deux chaînes de chitosane par fonction alcyne, contre une seule avec la CuAAC. Nous avons montré qu'il est très difficile d'enlever le cuivre résiduel des copolymères, et le couplage thiol-yne ne nécessite pas de catalyseur au cuivre.

La réaction de thiol-yne nécessite l'hydrolyse des fonctions thioester du chitosane en thiols. Dans un premier temps la mise au point d'une méthode de déprotection en solution dans le DMSO est discutée. Le DMSO est utilisé pour la déprotection et pour la réaction thiol-yne en « one-pot » afin d'éviter autant que possible la réticulation des chaînes de chitosane thiolé par formation de ponts disulfure. Dans un second temps, les synthèses de copolymères PCL-g-CHT par thiol-yne sont détaillées.

4.2.1 Hydrolyse basique des thioesters

Cette déprotection a été effectuée sur $\text{CHT}(\text{SAc})_{0,12}^{763}$ dans un mélange DMSO/ H_2O (5/1 ; v/v) par hydrolyse en présence de soude (12 équivalents par rapport aux thioesters), en présence de TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine) (1mL de solution à 0,5M, pH 7,0) un agent réducteur permettant d'éviter la formation des ponts disulfure (Figure 98).

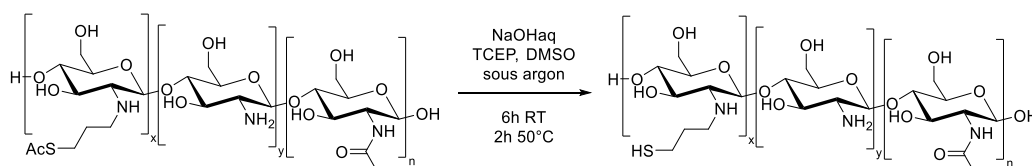


Figure 98 Hydrolyse basique du chitosane thioacétylé

L'hydrolyse des thioesters a été suivie par RMN ¹H dans le DMSO jusqu'à la disparition du pic du méthyle du thioester à 2,38ppm (Figure 99) qui survient au bout de 6h où la déprotection est donc supposée totale. Par conséquent, le couplage thiol-yne sera lancé en « one pot » après 6h de déprotection.

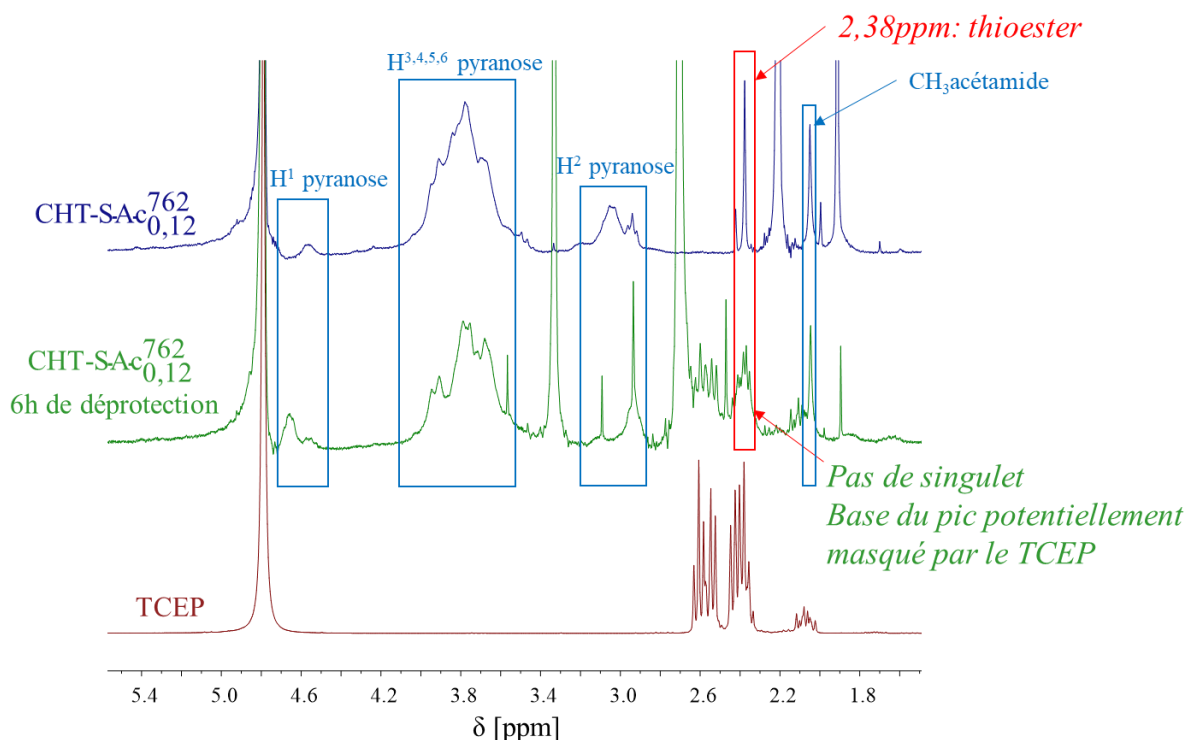


Figure 99 Superposition en RMN ^1H du chitosane N-thioacétylé avant et après 6h de déprotection (D_2O , 300MHz)

4.2.2 Couplage thiol-yne

La méthode de thiol-yne utilisée pour coupler les chitosanes N-thiolés (déprotégés) sur des chaînes de PCL_{yne} est basée sur le protocole de Al Samad et al.⁶³ Suite à la déprotection des thioesters du chitosane, la PCL_{yne} et un photo-amorceur (DMPA :2,2-diméthoxy-2-phenylacétophenone) sont ajoutés au milieu réactionnel (Figure 100). Lors de l'ajout de la PCL_{yne} , une partie de cette dernière forme un précipité par suite de la présence d'eau dans le milieu réactionnel. Puis la solution est irradiée sous UV pendant deux heures à 100 mW/cm^2 .

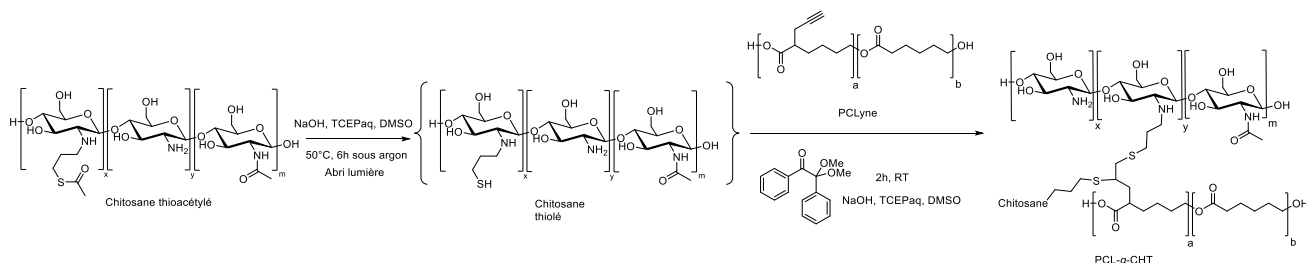


Figure 100 Déprotection des thioesters et couplage thiol-yne « one pot » entre le chitosane thiolé et la PCL_{yne} (Naph)

Un premier test a été effectué avec $\text{CHT}(\text{SAc})_{0,11}^{860}$ et $\text{PCL}_{\text{yne}}(\text{Naph})_{0,10}^{27000}$ avec 0,5 équivalent de thiol par fonction propargyle en supposant que la totalité des thioesters est déprotégée sous forme de thiol lors de la première étape. En fin de réaction le milieu réactionnel est centrifugé et deux solides ont été obtenus : un précipité jaune présentant à la fois des chaînes de PCL et de chitosane, et un solide noir en suspension composé uniquement de PCL. Ces deux solides ont été séchés et le filtrat évaporé. Les trois « phases » sont illustrées dans la Figure 101.

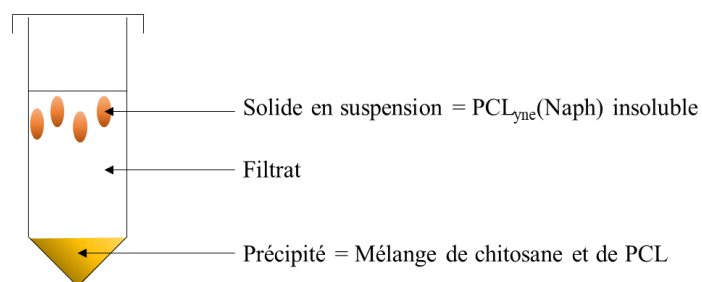


Figure 101 Aspect du milieu réactionnel suite au couplage thiol-yne après centrifugation

Les 3 parties du composé ont été analysées par IR-TF, RMN ^1H (DMSO-d_6) et GPC(DMF).

Les analyses du filtrat sec ne montrent pas de présence de chaînes de PCL et de chitosane. Seuls les signaux du DMPA et du TCEP sont visibles en infrarouge et RMN ^1H (DMSO-d_6). Par conséquent cette partie du composé a été écartée (analyses non représentées).

Les analyses IR-TF du précipité jaune et du solide noir montrent la présence des chaînes polymères. En se référant aux hauteurs des pics on constate qu'il y a plus de PCL que de chitosane dans le cas du solide noir, alors que c'est l'inverse dans le précipité jaune (Figure 102a). Notons que lorsque les échantillons sont solubilisés dans du DMSO-d_6 , une partie des deux composés (précipité jaune et solide noir) est restée insoluble. Les analyses de RMN ne portent donc que sur la partie soluble. Dans le précipité noir, seuls les signaux de la PCL sont visibles, tandis que les signaux des deux homopolymères sont présents dans le précipité jaune. Cependant, il n'a pas pu être possible de déterminer la BHL du précipité jaune (tout du moins de la partie soluble) à partir de la RMN, car le signal du CH_3 acétamide est masqué par les pics de TCEP résiduel vers 2,0 ppm (Figure 102b).

Ce précipité a été analysé par GPC(DMF) et comparé avec la PCL_{yne} utilisée pour effectuer la réaction de thiol-yne (Figure 102c). Il n'est que partiellement soluble dans le DMF et donc seule la partie soluble est analysée. Le copolymère a un temps de rétention plus faible ($t_r = 14$

min) que celui de la PCL_{yne} ($tr = 16,5$ minutes) ce qui montre la formation du copolymère $PCL-g-CHT$.

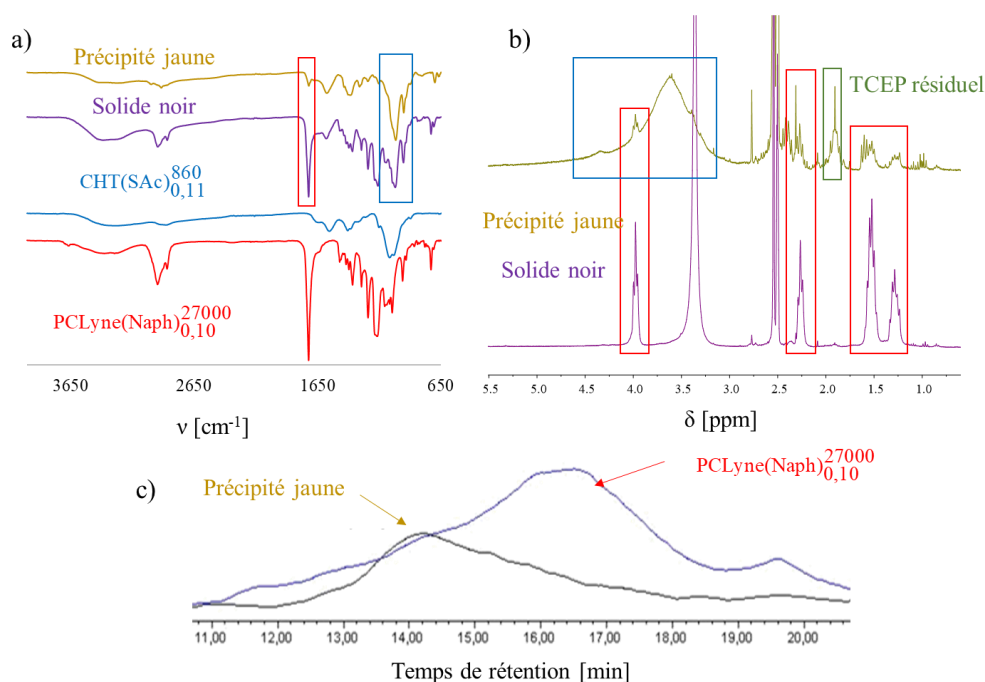


Figure 102 Analyse du premier lot de copolymères $PCL-g-CHT$ synthétisé par thiol-yne
(a) infra rouge (b) RMN ($DMSO-d_6$, 300MHz) (c) GPC (DMF)

Cette première réaction thiol-yne a donc fonctionné, il y a formation de copolymère, mais le protocole de purification du copolymère est à améliorer. De nouveaux lots de composés ont été synthétisés et purifiés par dialyse (MWCO 1kDa) contre de l'eau afin d'éliminer notamment le TCEP. Deux lots ont été synthétisés à partir de $PCL_{\text{yne}}(\text{Naph})_{0,10}^{27000}$ et de $CHT(\text{SAc})_{0,13}^{900}$ avec 0,5 équivalent en dérivé soufré (thioacétate et thiol) par rapport aux alcynes, en suivant le même protocole. Seule la proportion des solvants a été changée ($DMSO/H_2O = 10/1$ au lieu de $5/1$; v/v) afin d'être dans des conditions plus favorables à la solubilisation de la PCL_{yne} . Malgré cela une partie de la PCL_{yne} précipite quand même. La totalité du milieu réactionnel (filtrat et les deux précipités) a été dialysée contre de l'eau. Dès que les composés sont en milieu aqueux, une partie a précipité dans le tube de dialyse. Le contenu du tube de dialyse est centrifugé, le filtrat lyophilisé et le précipité séché. Les propriétés des produits obtenus sont reportées dans le Tableau 36:

Lots	BHL (RMN DMSO _{d6})	Temps de rétention [min] (GPC _{aq})
Lot 1 (partie hydrosoluble)	1,44	35,38
Lot 1 (partie non hydrosoluble)	ND (seule la PCL est visible en RMN)	ND (insoluble en phase aqueuse)
Lot 2 (partie hydrosoluble)	0,60	34,38
Lot 2 (partie non hydrosoluble)	ND (que de la PCL de visible en RMN)	ND (insoluble en phase aqueuse)

Tableau 36 Propriétés des lots de PCL-g-CHT préparés par thiol-yne, après dialyse

L'analyse IR-TF des composés (Figure 103a) montre que les produits hydrosolubles contiennent de la PCL, ce qui montre la formation de copolymère. Les produits non hydrosolubles ne contiennent que de la PCL, probablement de la PCL_{yne} n'ayant pas réagi.

Les analyses de RMN ¹H dans le DMSO_{d6} (cf. Figure 103b) montrent la présence de TCEP résiduel à 1,9 ppm, malgré le traitement par dialyse. Cependant le signal des méthyles des fonctions acétamide est visible, ce qui permet d'estimer la BHL des copolymères.

Les analyses par GPC_{aq} et GPC(DMF) non représentés ne donnent pas des résultats clairs. On ne constate pas d'augmentation de masse molaire par rapport à la PCL_{yne} et les temps de rétention GPC_{aq} sont voisins de celui du chitosane N-thioacétylé utilisé pour les synthétiser (Figure 103c).

Ces analyses vont dans le sens de la formation d'un copolymère PCL-g-CHT, notamment parce que la partie hydrosoluble de ces lots contiennent de la PCL. Cependant, les GPC ne permettent pas de statuer définitivement sur la formation effective de copolymère.

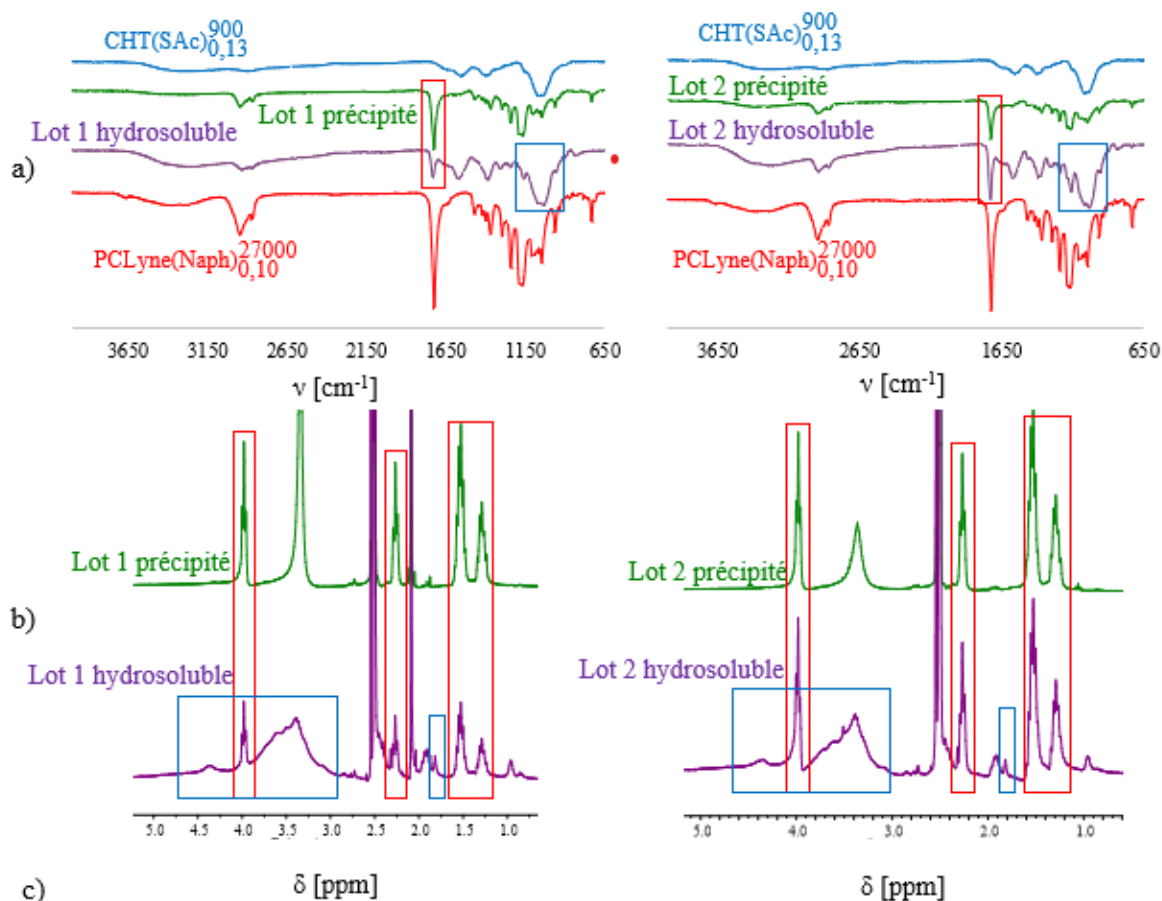


Figure 103 Caractérisations des lots de PCL-g-CHT synthétisés par thiol-yne et dialysés

(a) infrarouge (b) RMN ($DMSO_d_6$, 300MHz)

5 Préparation et analyse de nano-objets à base de PCL-g-CHT

Malgré les difficultés de caractérisation et d'analyse des copolymères PCL-g-CHT, des nano-objets ont été préparés par deux méthodes, la nanoprécipitation (comme dans le cas des copolymères PCL-g-DEX) et la dissolution directe.

Dans la nanoprécipitation le copolymère est solubilisé dans du DMSO, puis un volume d'eau distillée est ajouté (DMSO/H₂O ; 1/9 ; v/v) à un débit constant de 1mL/min. Des nano-objets sont formés et dialysés contre de l'eau pour éliminer le DMSO, puis lyophilisés.

La dissolution directe consiste à mettre en solution aqueuse un copolymère qui s'auto-assemble en nano-objets. Pour cela il est nécessaire que le produit soit hydrosoluble, ce qui est le cas de PCL-g-CHT³⁹⁰⁰_{1,44} qui est mis en solution dans de l'eau distillée puis agité avec un

Ultraturax (11 000 rpm) afin de créer une émulsion qui sera ensuite lyophilisée. Les nano-objets préparés ont été analysés par DLS en milieu aqueux (tampon PBS, pH 7,4). (Figure 104).

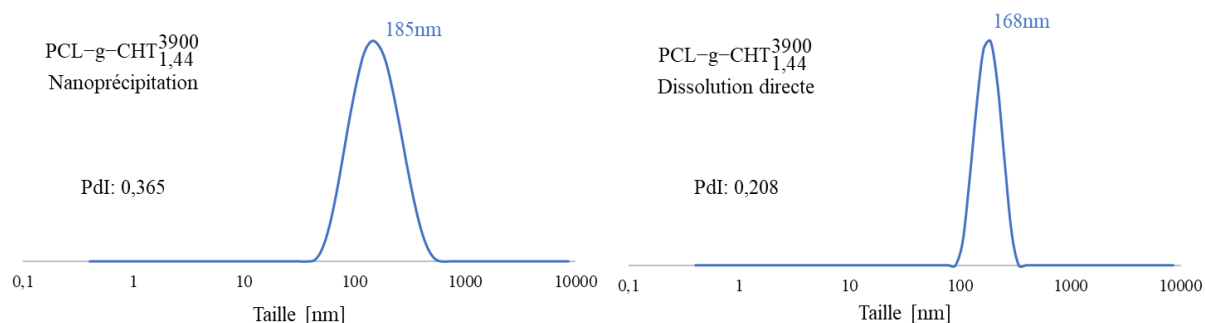


Figure 104 Analyses DLS des nano-objets à base de copolymère PCL-g-CHT

Cette étude montre que les deux méthodes permettent de former des nano-objets dans le PBS. On obtient des systèmes monodisperses de diamètre 185 nm par nanoprécipitation et de 168 nm par dissolution directe.

6 Conclusion

Dans ce chapitre, des copolymères PCL-g-CHT ont été synthétisés afin de préparer des nano-objets d'intérêt pour des applications en libération de principe actif. D'un point de vue chimique, la différence avec le dextrane provient des fonctions amine dans la chaîne du chitosane qui vont permettre la réalisation de nouvelles réactions. Les fonctions amine des oligo-chitosanes ont notamment permis le greffage d'un agent de ciblage, le mannose squarate.

Ces oligo-chitosanes ont été fonctionnalisés par amination réductrice afin d'obtenir des chitosanes N-azotés ou N-thioacétylés pour effectuer des réactions « clic » CuAAC et thiol-yne. Dans les deux cas des réactions de chimie « clic » sur la PCL-yne ont permis d'obtenir des copolymères PCL-g-CHT. Les réactions d'amination réductrice permettent en outre de contrôler le degré de substitution le long des chaînes de chitosane en fonction des proportions des réactifs. Ces chitosanes N-azotés ont été couplés par CuAAC. Les propriétés des copolymères et notamment la BHL sont dépendantes du taux d'azotation du chitosane utilisé pendant le couplage et du rapport $N_3/C\equiv CH$. D'une manière générale il est difficile de séparer le chitosane résiduel du copolymère PCL-g-CHT, ce qui rend difficile la détermination de la BHL. De plus, le chitosane étant un bon chélatant du cuivre, il est difficile d'éliminer la totalité du cuivre résiduel. Pour éviter ce problème des PCL-g-CHT ont été préparés par couplage de

chitosanes N-thiolés sur la PCL-yne (réaction thiol-yne) en l'absence de cuivre. Des nanoobjets ont été préparés par dissolution directe et par nanoprécipitation.

Faute de temps, l'optimisation des réactions de synthèse, les purifications et les études physico-chimiques et biologiques des nanoobjets n'ont pu être menées à bien dans le cadre de cette thèse et devraient pouvoir être menées ultérieurement.

Conclusion générale

Le cancer représente à l'heure actuelle un enjeu majeur pour la médecine car il est la première cause de mortalité en France. De nombreuses thérapies ont été développées depuis plusieurs années et la plus universelle est la chimiothérapie qui vise à la délivrance d'une substance toxique sur les cellules cancéreuses afin de les tuer.

Les principaux agents anticancéreux sont des composés hydrophobes dont l'administration dans le flux sanguin est très difficile à cause de leur faible solubilité et de leur grande toxicité pour les cellules saines quand ces composés ne sont pas encapsulés. Afin de contourner ces problèmes la recherche actuelle s'oriente vers l'élaboration de transporteurs des agents anticancéreux dans l'organisme. La plupart d'entre eux sont à base de polyesters aliphatiques hydrophobes et biodégradables tels que la PCL, sous forme de nano-objets incorporant le principe actif. L'avantage des nano-objets est qu'ils répondent au critère de ciblage passif grâce à l'effet EPR qui leur permet d'aller préférentiellement dans les zones tumorales. Si les problèmes d'absence de solubilité des agents anticancéreux et leur toxicité sont en partie résolus avec ces transporteurs, il convient de résoudre les problèmes suivants :

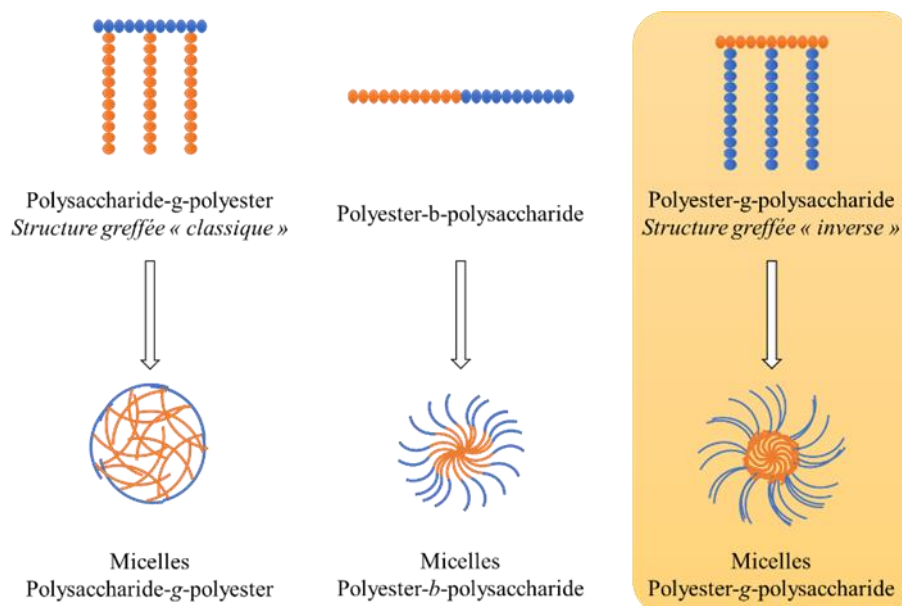
L'absorption des nanoparticules par les opsonines du sang qui diminue leur biodisponibilité. Pour éviter ce phénomène il convient d'entourer ces nano-objets d'une couronne hydrophile, classiquement à base de PEG.

Afin d'obtenir un ciblage « actif » on peut greffer sur le copolymère un agent de ciblage des cellules cancéreuses. Pour cela les copolymères PCL-PEG ne conviennent pas à cause de l'absence de fonctions réactives le long des chaînes de PCL et de PEG. C'est la raison pour laquelle il est intéressant de remplacer le PEG par des oligosaccharides qui sont structurellement fonctionnalisés et qui permettent aussi l'évitement de l'opsonisation.

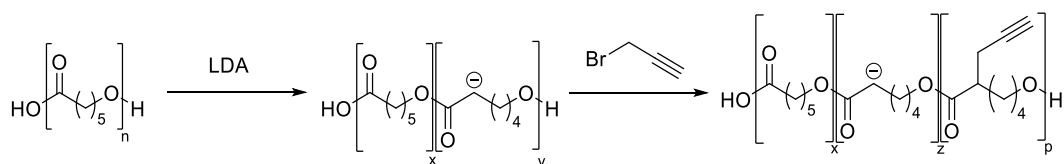
Pour obtenir des copolymères amphiphiles PCL-polysaccharide on peut préparer des structures « à blocs » ou « greffées ». Il a été montré que les structures greffées sont plus efficaces que les structures « à blocs » pour la stabilisation des nano-objets et l'efficacité de la répulsion des protéines. D'autre part elles permettent un contrôle plus aisé de la balance hydrophile/hydrophobe par le taux de greffage.

Compte tenu de la fonctionnalité des chaînes de polysaccharide, les copolymères greffés à base de PCL et de polysaccharide ont tous une chaîne principale hydrophile polysaccharide sur laquelle sont greffés des chaînons hydrophobes de PCL, c'est la structure dite « classique ».

L'objet de ce travail consiste à synthétiser de nouveaux copolymères amphiphiles greffés PCL-g-polysaccharide à structure « inverse » où la chaîne principale est la PCL avec des greffons polysaccharides. La PCL a été choisie car elle est biocompatible, biodégradable et très hydrophobe. La méthode mise au point dans ce travail vise à obtenir une plateforme de synthèse de n'importe quel copolymère PCL-polysaccharide à structure « inverse ». Pour cette raison deux polysaccharides ont été testés : le dextrane et le chitosane. La première application de ces nouvelles structures consiste à former des micelles macromoléculaires chargées en doxorubicine pour des applications en chimie anticancéreuse. Dans ce travail plusieurs micelles ont été préparées et caractérisées et les premiers essais d'activité anticancéreuse ont été réalisés.



-La base de cette plateforme est la synthèse d'une PCL fonctionnalisée, ici la PCL propargylée. Le groupement propargyle a été choisi afin de réaliser des réactions de chimie « clic », connues pour leur réactivité et leur spécificité. La substitution du propargyle a été réalisée en utilisant la méthode « anionique » décrite dans notre laboratoire il y a quelques années. En optimisant les conditions opératoires, nous obtenons par cette méthode plusieurs grammes de PCL propargylée en une demi-journée, avec des taux de substitution de 3 à 15% et des masses molaires de 16 000 à 45 000g/mol.



Nous avons aussi préparé une nouvelle PCL « bifonctionnalisée » en réalisant en « one pot » la substitution de bromure de propargyle et de chlorure de naphtoyle. La naphtoylation de la PCL permet d'obtenir un polymère qui absorbe en UV ($\lambda=310\text{nm}$) et qui est fluorescent ($\lambda_{\text{exc}}=298\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=365\text{nm}$), ce qui permet de détecter sélectivement le chaînon hydrophobe du copolymère.

- La fonctionnalisation de la partie hydrophobe du copolymère étant maîtrisée, nous avons choisi le dextrane comme polysaccharide car il possède une structure « simple » : il ne comporte que des motifs glucose et donc uniquement des fonctions alcool. Afin de synthétiser le copolymère par réaction d'un dextrane activé sur la PCL propargylée nous avons mis au point une nouvelle méthode d'activation de l'extrémité de chaîne du dextrane en deux étapes : une bromation par amination réductrice avec le 3-bromopropylamine et le cyanoborohydrure de sodium, suivie d'une substitution du brome par l'azoture de sodium. Nous obtenons un azido-dextrane qui réagit ensuite par chimie « clic » sur la PCL propargylée pour obtenir la nouvelle structure « inverse » PCL-g-DEX. Le composé obtenu a ensuite été caractérisé par diverses analyses : IR-TF, GPC et RMN ^1H . Le greffage effectif du dextrane a été montré par RMN-DOSY.

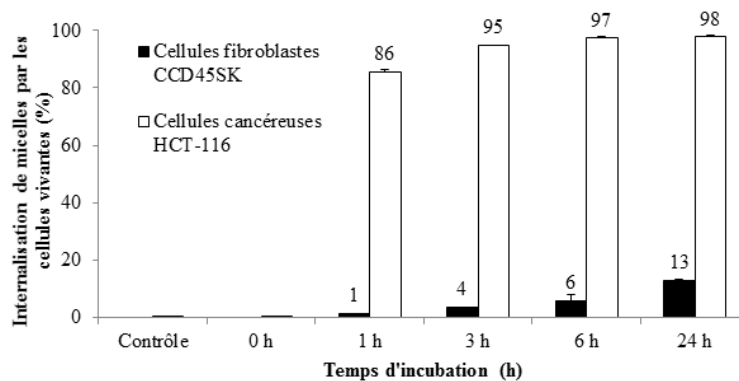
-Un des intérêts de cette structure est qu'il est possible de faire varier sa balance hydrophile/hydrophobe (BHL) en faisant varier le taux de greffage du dextrane sur la PCL. La BHL est très importante pour la préparation de nano objets, elle détermine l'obtention de nanoparticules solides ou de micelles. Notre choix s'est porté sur les micelles qui permettent une libération plus rapide du principe actif après leur internalisation dans les cellules. Ces micelles ont été préparées par nanoprecipitation, et nous avons pu vérifier leur formation effective par l'existence d'une CAC en milieu aqueux

De la doxorubicine a été incorporée dans ces micelles à des taux variant de 3% à 5,1%. Ces taux sont relativement faibles, mais nous n'avons pas cherché à les optimiser, car des taux très faibles suffisent à tuer les cellules cancéreuses après internalisation, comme le montrent les études biologiques.

-Les études de libération *in vitro* de la doxorubicine à partir des micelles chargées apportent des résultats très intéressants : en 24h la libération n'est que partielle (<40%) à pH=7,4 mais beaucoup plus rapide et totale à pH=5,8. Ce point est très important car il signifie que probablement la doxorubicine ne se libèrera que peu dans le flux sanguin, et présentera donc une faible toxicité. La libération sera beaucoup plus rapide dans le milieu acide des endosomes et lysosomes après internalisation.

-Les études de cytotoxicité ont été réalisées sur des cellules saines et des cellules cancéreuses afin de comparer les résultats sur ces deux types de cellules. Tout d'abord l'absence de toxicité des micelles non chargées a été vérifiée sur des cellules saines (85% de survie) et cancéreuses (95% de survie) après 24h d'incubation. Ensuite la toxicité de la DOX libre sur les cellules saines (45% de survie) et cancéreuses (49% de survie) a été vérifiée. On note que la DOX libre est aussi toxique pour les cellules saines que cancéreuses, elle ne présente aucun phénomène de ciblage des cellules cancéreuses. Enfin les micelles chargées en DOX se sont avérées toxiques pour les cellules cancéreuses (58% de survie) et beaucoup moins pour les cellules saines (85% de survie), preuve d'une sélectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses. Ces résultats démontrent les propriétés de sélectivité des micelles de PCL-g-DEX chargées en doxorubicine à l'encontre des cellules tumorales.

-Afin que le système soit efficace en thérapie anticancéreuse, il faut que les micelles soient internalisées dans les cellules tumorales. Cette internalisation a été étudiée par fluorescence. L'intérêt de la présence des fonctions alcool sur le dextrane est ici mise en valeur : nous avons greffé un agent fluorescent (la FITC) sur ces fonctions alcool pour rendre le copolymère fluorescent et ainsi permettre l'étude de l'internalisation. Une propriété remarquable a été mise en évidence : après 24h d'incubation les micelles sont internalisées préférentiellement par les cellules cancéreuses : 95% des cellules cancéreuses ont internalisé les micelles contre seulement 14% des cellules saines. Après seulement 1h d'incubation les pourcentages sont respectivement de 86% et 1%. Ces résultats montrent là aussi un ciblage des cellules cancéreuses par les micelles de PCL-g-DEX, et sont en parfait accord avec les études de cytotoxicité.



Les résultats obtenus avec le PCL-g-DEX sont donc très prometteurs quant à l'utilisation de nos micelles à structure « inverse » pour la chimiothérapie anticancéreuse. La synthèse et la caractérisation du copolymère sont maîtrisées et les premières études biologiques concernant l'internalisation et la toxicité sont très encourageantes, notamment en ce qui concerne la toxicité préférentielle pour les cellules cancéreuses.

Dans une deuxième partie, et compte tenu des résultats intéressants obtenus avec les copolymères PCL-g-DEX, nous avons souhaité étendre notre mode de synthèse à un autre polysaccharide afin de valider cette plateforme de synthèse. Le chitosane a été choisi parce qu'il est déjà utilisé dans le domaine biomédical, et aussi pour la présence de fonctions amine le long de ses chaînes. Ces fonctions confèrent au chitosane des propriétés particulières et d'un point de vue chimique, les fonctions amine offrent la possibilité de réaliser de nouvelles réactions chimiques.

-Contrairement au dextrane, il est difficile de trouver dans le commerce des oligomères de chitosane. Les faibles masses molaires sont nécessaires à deux titres : 1) les oligomères de chitosane sont beaucoup plus solubles que les chitosanes de masse molaire élevée en milieu aqueux non acide et ii) ils sont chimiquement plus réactifs. Nous avons donc dû synthétiser des oligo-chitosanes par une méthode d'oxydation sous microondes pour obtenir des masses molaires inférieures à 3 500g/mol. Cette réaction n'affecte pas le degré de désacétylation qui reste proche de 85%.

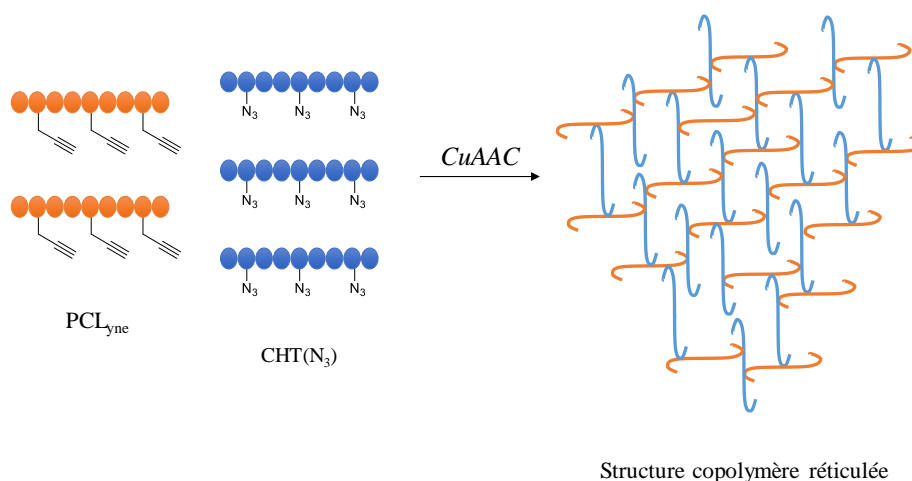
-La réactivité des fonctions amine des oligo-chitosanes a été exploitée pour greffer un agent de vectorisation active, le mannose squarate avec un taux de greffage très élevé (environ 20%) pour une application de ciblage, mais qui permet de valider l'efficacité de la réaction.

-Contrairement au cas du dextrane, activé en extrémité de chaîne sur le carbone anomérique, les fonctions amine du chitosane ont aussi été utilisées pour développer et optimiser une

nouvelle méthode d'azoturation par amination réductrice avec une molécule bifonctionnelle : le 3-azidopropanal. En jouant sur divers paramètres de la réaction (mélanges de solvant, proportion des réactifs, mode de purification) nous avons pu obtenir un bon contrôle du taux de substitution en azoture qui peut atteindre 50%.

-Les copolymères PCL-g-CHT ont ensuite été préparés par réaction « clic » entre la PCL propargylée et les oligo-chitosanes azoturés. Par suite de la présence probable de plusieurs fonctions azoture le long des chaînes, en fonction de la valeur du taux de substitution d'azoture, de nouveaux problèmes sont apparus :

a- S'il y a plusieurs fonctions réactives sur la PCL propargylée comme sur le chitosane azoturé, il est possible que les chaînes réticulent entre elles. Avec un rapport azoture/propargyle de l'ordre de 1,5 à 1,8 on constate l'apparition d'un précipité insoluble dû à la formation d'un copolymère tridimensionnel. En diminuant le rapport azoture/propargyle on va obtenir une structure copolymère classique (Polysaccharide-g-polyester) plutôt qu'une structure « inverse ». Afin d'obtenir une structure inverse sans réticulation il convient donc de travailler avec un rapport azoture/propargyle très élevé (environ 10)



b- Une grande difficulté de séparation du copolymère et des homopolymères qui n'existe pas avec le dextrane, ce qui rend la détermination de la BHL délicate.

c- Contrairement au dextrane, le chitosane est un excellent complexant du cuivre. Celui-ci est donc très difficile à éliminer du copolymère, ce qui pose problème pour des applications en santé. Les purifications par passage sur résine Dowex ou par complexation avec de l'EDTA ont donné des résultats décevants. D'autres méthodes de purification de PCL-g-CHT sont donc à envisager. Par exemple, on peut envisager d'effectuer une extraction du cuivre (I) avec une

solution de thiourée. En effet, il a été reporté que la thiourée est capable de complexer le Cu(I) en solutions aqueuses et acides¹⁶⁷.

En conclusion, les fonctions amine permettent indiscutablement d'ouvrir l'éventail des réactions et d'accroître le nombre de structures copolymères envisageables, mais elles peuvent entraîner l'apparition de nouveaux problèmes. Néanmoins, des nano-objets ($\cong 150\text{nm}$) ont été préparés à partir de lots de PCL-g-CHT synthétisés par catalyse au cuivre. Ces nano-objets ont été préparés par nanoprecipitation ou dissolution directe.

-Le problème lié à l'élimination du cuivre nous a conduit à essayer une réaction de greffage de chitosane sur la PCL propargylée par une réaction « clic » thiol-yne, qui ne nécessite pas la présence de cuivre. Pour cela, une nouvelle synthèse de chitosane thiolé a été réalisée. Dans un premier temps le 3-oxopropylthioacétate (3-OPT) a été synthétisé puis couplé sur le chitosane par amination réductrice pour obtenir un chitosane thioacétylé. Les taux de substitution obtenus (de 11 à 29%) sont nettement supérieurs à ceux décrits dans la littérature.

-La réaction de thiol-yne nécessite en premier lieu l'hydrolyse du thioester en thiol. Cette réaction a posé de nombreux problèmes dus à la formation de ponts disulfure entre les chaînes, ce qui a entraîné des réticulations et la précipitation du produit. Nous avons alors préparé le copolymère PCL-g-CHT en « one pot » : hydrolyse du thioester en présence d'un réducteur, le TCEP afin d'éviter la formation de ponts disulfure, suivie de la réaction de thiol-yne en présence d'un photoamorceur. Le copolymère a été mis en évidence, notamment par GPC, mais n'a pu être parfaitement caractérisé et purifié.

La partie consacrée aux copolymères PCL-g-CHT est bien entendue moins aboutie que celle concernant PCL-g-Dex, mais elle permet de répondre à certaines questions : i-La méthode de synthèse de copolymère développée dans ce travail est applicable aux deux polysaccharides et pourrait être adaptée à d'autres polysaccharides. ii-Les fonctions amine du chitosane ont été mises à profit pour coupler un agent de vectorisation, le mannose squarate, et pour accrocher les oligo-chitosanes sans activation de l'extrémité de chaîne.

Les principales perspectives à court terme de ce travail concernent en premier lieu la finalisation des études avec le chitosane : optimiser la réaction de thiol-yne, développer une méthode de purification des copolymères, effectuer des études de libération de la DOX à partir des micelles, comme des études biologiques *in vitro* afin de comparer les comportements de PCL-g-DEX et PCL-g-CHT.

Les études d'internalisation et de toxicité des micelles à base de PCL-g-DEX chargées en DOX donnant d'excellents résultats *in vitro*, des tests *in vivo* chez la souris sont souhaitables afin d'étudier l'évolution de tumeurs cancéreuses après injection des micelles chargées en DOX. Enfin l'étude peut être étendue à d'autres agents anticancéreux (pirarubicine, cis-platine, paclitaxel...). Un changement de méthode préparation des micelles est également envisageable, en effet, seule la nanoprecipitation a été utilisée afin de préparer ces systèmes pour le moment.

A plus long terme, il serait envisageable de changer la synthèse des copolymère de PCL-g-CHT afin d'obtenir des structure greffée en peigne qui ressemblerait davantage au structure PCL-g-CHT. Pour cela il sera nécessaire de développer une nouvelle méthode de fonctionnalisation en extrémité de chaîne de chitosane. Or, il existe une méthode de dépolymérisation récente par l'acide nitreux¹⁶⁸ qui permet d'obtenir des oligomères de chitosane avec une fonction aldéhyde en extrémité de chaîne qui n'est pas sous forme d'équilibre aldéhyde – hémiacétal. Il est envisageable de modifier chimiquement cette extrémité pour introduire des fonctions réactives (azoture ou thiol) qui permettront d'effectuer par la suite des couplage par chimie clic entre le chitosane modifié et une PCL propargylée. Ainsi les copolymères PCL-g-CHT en peigne permettront une comparaison plus pertinente avec les copolymères de PCL-g-DEX en terme de formation de système de délivrance d'agent anticancéreux.

Bibliographie

- (1) Albani, A. E.; Bengtson, S.; Canfield, D. E.; Bekker, A.; Macchiarelli, R.; Mazurier, A.; Hammarlund, E. U.; Boulvais, P.; Dupuy, J.-J.; Fontaine, C.; Fürsich, F. T.; Gauthier-Lafaye, F.; Janvier, P.; Javaux, E.; Ossa, F. O.; Pierson-Wickmann, A.-C.; Riboulleau, A.; Sardini, P.; Vachard, D.; Whitehouse, M.; Meunier, A. Large Colonial Organisms with Coordinated Growth in Oxygenated Environments 2.1 Gyr Ago. *Nature* **2010**, *466* (7302), 100–104. <https://doi.org/10.1038/nature09166>.
- (2) Liu, Z.; Delavan, B.; Roberts, R.; Tong, W. Lessons Learned from Two Decades of Anticancer Drugs. *Trends in Pharmacological Sciences* **2017**, *38* (10), 852–872. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.06.005>.
- (3) Weiner, L. M.; Murray, J. C.; Shuptrine, C. W. Antibody-Based Immunotherapy of Cancer. *Cell* **2012**, *148* (6), 1081–1084. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.034>.
- (4) Sainsbury, R. The Development of Endocrine Therapy for Women with Breast Cancer. *Cancer Treatment Reviews* **2013**, *39* (5), 507–517. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.07.006>.
- (5) Baskar, R.; Lee, K. A.; Yeo, R.; Yeoh, K.-W. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *Int. J. Med. Sci.* **2012**, *9* (3), 193–199. <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>.
- (6) Lu, Y.; Low, P. S. Folate-Mediated Delivery of Macromolecular Anticancer Therapeutic Agents. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *19*.
- (7) Okada, H. One- and Three-Month Release Injectable Microspheres of the LH-RH Superagonist Leuporelin Acetate. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, *28* (1), 43–70. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(97\)00050-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00050-1).
- (8) Luo, R.; Li, Y.; He, M.; Zhang, H.; Yuan, H.; Johnson, M.; Palmisano, M.; Zhou, S.; Sun, D. Distinct Biodistribution of Doxorubicin and the Altered Dispositions Mediated by Different Liposomal Formulations. *International Journal of Pharmaceutics* **2017**, *519* (1–2), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.002>.
- (9) Sofias, A. M.; Dunne, M.; Storm, G.; Allen, C. The Battle of “Nano” Paclitaxel. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2017**, *122*, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.02.003>.
- (10) Aftab, S.; Shah, A.; Nadhman, A.; Kurbanoglu, S.; Aysıl Ozkan, S.; Dionysiou, D. D.; Shukla, S. S.; Aminabhavi, T. M. Nanomedicine: An Effective Tool in Cancer Therapy. *International Journal of Pharmaceutics* **2018**, *540* (1–2), 132–149. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.02.007>.
- (11) Zhang, L.; Chen, Z.; Wang, H.; Wu, S.; Zhao, K.; Sun, H.; Kong, D.; Wang, C.; Leng, X.; Zhu, D. Preparation and Evaluation of PCL–PEG–PCL Polymeric Nanoparticles for Doxorubicin Delivery against Breast Cancer. *RSC Adv.* **2016**, *6* (60), 54727–54737. <https://doi.org/10.1039/C6RA04687H>.
- (12) Zou, Y.; Liu, P.; Liu, C.-H.; Zhi, X.-T. Doxorubicin-Loaded Mesoporous Magnetic Nanoparticles to Induce Apoptosis in Breast Cancer Cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2015**, *69*, 355–360. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.12.012>.
- (13) Tian, Z.; Yu, X.; Ruan, Z.; Zhu, M.; Zhu, Y.; Hanagata, N. Magnetic Mesoporous Silica Nanoparticles Coated with Thermo-Responsive Copolymer for Potential Chemo- and Magnetic Hyperthermia Therapy. *Microporous and Mesoporous Materials* **2018**, *256*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.07.053>.
- (14) Ahmad, Z.; Shah, A.; Siddiq, M.; Kraatz, H.-B. Polymeric Micelles as Drug Delivery Vehicles. *RSC Adv.* **2014**, *4* (33), 17028–17038. <https://doi.org/10.1039/C3RA47370H>.

- (15) Yu, J.; Zhou, Y.; Chen, W.; Ren, J.; Zhang, L.; Lu, L.; Luo, G.; Huang, H. Preparation, Characterization and Evaluation of α -Tocopherol Succinate-Modified Dextran Micelles as Potential Drug Carriers. *Materials* **2015**, *8* (10), 6685–6696. <https://doi.org/10.3390/ma8105332>.
- (16) Zylberberg, C.; Matosevic, S. Pharmaceutical Liposomal Drug Delivery: A Review of New Delivery Systems and a Look at the Regulatory Landscape. *Drug Delivery* **2016**, *23* (9), 3319–3329. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1177136>.
- (17) Cao, D.; Zhang, X.; Akabar, Md.; Luo, Y.; Wu, H.; Ke, X.; Ci, T. Liposomal Doxorubicin Loaded PLGA-PEG-PLGA Based Thermogel for Sustained Local Drug Delivery for the Treatment of Breast Cancer. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **2019**, *47* (1), 181–191. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1548470>.
- (18) Deng, H.; Dong, A.; Song, J.; Chen, X. Injectable Thermosensitive Hydrogel Systems Based on Functional PEG/PCL Block Polymer for Local Drug Delivery. *Journal of Controlled Release* **2019**, *297*, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.01.026>.
- (19) Tsakiris, N.; Papavasileiou, M.; Bozzato, E.; Lopes, A.; Vigneron, A. M.; Pr at, V. Combinational Drug-Loaded Lipid Nanocapsules for the Treatment of Cancer. *International Journal of Pharmaceutics* **2019**, *569*, 118588. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118588>.
- (20) Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U. S. Poly(Ethylene Glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49* (36), 6288–6308. <https://doi.org/10.1002/anie.200902672>.
- (21) Kolate, A.; Baradia, D.; Patil, S.; Vhora, I.; Kore, G.; Misra, A. PEG — A Versatile Conjugating Ligand for Drugs and Drug Delivery Systems. *Journal of Controlled Release* **2014**, *192*, 67–81. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.046>.
- (22) Konradi, R.; Pidhatika, B.; M hlebach, A.; Textor, M. Poly-2-Methyl-2-Oxazoline: A Peptide-like Polymer for Protein-Repellent Surfaces. *Langmuir* **2008**, *24* (3), 613–616. <https://doi.org/10.1021/la702917z>.
- (23) Romberg, B.; Metselaar, J.; Baranyi, L.; Snel, C.; Bungler, R.; Hennink, W.; Szebeni, J.; Storm, G. Poly(Amino Acid)s: Promising Enzymatically Degradable Stealth Coatings for Liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *331* (2), 186–189. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.11.018>.
- (24) Huang, G.; Huang, H. Application of Dextran as Nanoscale Drug Carriers. *Nanomedicine* **2018**, *13* (24), 3149–3158. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0331>.
- (25) Kean, T.; Thanou, M. Biodegradation, Biodistribution and Toxicity of Chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, *62* (1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.09.004>.
- (26) Hashizume, H.; Baluk, P.; Morikawa, S.; McLean, J. W.; Thurston, G.; Roberge, S.; Jain, R. K.; McDonald, D. M. Openings between Defective Endothelial Cells Explain Tumor Vessel Leakiness. *The American Journal of Pathology* **2000**, *156* (4), 1363–1380. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65006-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65006-7).
- (27) Sashiwa, H.; Thompson, J. M.; Das, S. K.; Shigemasa, Y.; Tripathy, S.; Roy, R. Chemical Modification of Chitosan: Preparation and Lectin Binding Properties of α -Galactosyl-Chitosan Conjugates. Potential Inhibitors in Acute Rejection Following Xenotransplantation. *Biomacromolecules* **2000**, *1* (3), 303–305. <https://doi.org/10.1021/bm005536r>.
- (28) Biswas, S.; Kumari, P.; Lakhani, P. M.; Ghosh, B. Recent Advances in Polymeric Micelles for Anti-Cancer Drug Delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2016**, *83*, 184–202. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.12.031>.

- (29) Gao, Z. G.; Lee, D. H.; Kim, D. I.; Bae, Y. H. Doxorubicin Loaded PH-Sensitive Micelle Targeting Acidic Extracellular PH of Human Ovarian A2780 Tumor in Mice. *Journal of Drug Targeting* **2005**, *13* (7), 391–397. <https://doi.org/10.1080/10611860500376741>.
- (30) Zhang, L.; Guo, R.; Yang, M.; Jiang, X.; Liu, B. Thermo and PH Dual-Responsive Nanoparticles for Anti-Cancer Drug Delivery. *Advanced Materials* **2007**, *19* (19), 2988–2992. <https://doi.org/10.1002/adma.200601817>.
- (31) Sun, H.; Guo, B.; Li, X.; Cheng, R.; Meng, F.; Liu, H.; Zhong, Z. Shell-Sheddable Micelles Based on Dextran-SS-Poly(ϵ -Caprolactone) Diblock Copolymer for Efficient Intracellular Release of Doxorubicin. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (4), 848–854. <https://doi.org/10.1021/bm1001069>.
- (32) Guerry, A.; Cottaz, S.; Fleury, E.; Bernard, J.; Halila, S. Redox-Stimuli Responsive Micelles from DOX-Encapsulating Polycaprolactone-g-Chitosan Oligosaccharide. *Carbohydrate Polymers* **2014**, *112*, 746–752. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.052>.
- (33) Tang, Y.; Li, Y.; Xu, R.; Li, S.; Hu, H.; Xiao, C.; Wu, H.; Zhu, L.; Ming, J.; Chu, Z.; Xu, H.; Yang, X.; Li, Z. Self-Assembly of Folic Acid Dextran Conjugates for Cancer Chemotherapy. *Nanoscale* **2018**, *10* (36), 17265–17274. <https://doi.org/10.1039/C8NR04657C>.
- (34) Vaillant, O.; Cheikh, K. E.; Warther, D.; Brevet, D.; Maynadier, M.; Bouffard, E.; Salgues, F.; Jeanjean, A.; Puche, P.; Mazerolles, C.; Maillard, P.; Mongin, O.; Blanchard-Desce, M.; Raehm, L.; Rébillard, X.; Durand, J.-O.; Gary-Bobo, M.; Morère, A.; Garcia, M. Mannose-6-Phosphate Receptor: A Target for Theranostics of Prostate Cancer. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54* (20), 5952–5956. <https://doi.org/10.1002/anie.201500286>.
- (35) Vert, M. Aliphatic Polyesters: Great Degradable Polymers That Cannot Do Everything †. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (2), 538–546. <https://doi.org/10.1021/bm0494702>.
- (36) Rinaudo, M. Main Properties and Current Applications of Some Polysaccharides as Biomaterials. *Polymer International* **2008**, *57* (3), 397–430. <https://doi.org/10.1002/pi.2378>.
- (37) Tyler, B.; Gullotti, D.; Mangraviti, A.; Utsuki, T.; Brem, H. Polylactic Acid (PLA) Controlled Delivery Carriers for Biomedical Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2016**, *107*, 163–175. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.018>.
- (38) Woodruff, M. A.; Hutmacher, D. W. The Return of a Forgotten Polymer—Polycaprolactone in the 21st Century. *Progress in Polymer Science* **2010**, *35* (10), 1217–1256. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002>.
- (39) Jérôme, C.; Lecomte, P. Recent Advances in the Synthesis of Aliphatic Polyesters by Ring-Opening Polymerization. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60* (9), 1056–1076. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.02.008>.
- (40) Elsayy, M. A.; Kim, K.-H.; Park, J.-W.; Deep, A. Hydrolytic Degradation of Polylactic Acid (PLA) and Its Composites. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2017**, *79*, 1346–1352. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.143>.
- (41) Krause, H.-J.; Schwarz, A.; Rohdewald, P. Polylactic Acid Nanoparticles, a Colloidal Drug Delivery System for Lipophilic Drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **1985**, *27* (2–3), 145–155. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(85\)90064-X](https://doi.org/10.1016/0378-5173(85)90064-X).
- (42) Phan, Q. T.; Le, M. H.; Le, T. T. H.; Tran, T. H. H.; Xuan, P. N.; Ha, P. T. Characteristics and Cytotoxicity of Folate-Modified Curcumin-Loaded PLA-PEG Micellar Nano Systems with Various PLA:PEG Ratios. *International Journal of Pharmaceutics* **2016**, *507* (1–2), 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.05.003>.

- (43) Feng, R.; Song, Z.; Zhai, G. Preparation and in Vivo Pharmacokinetics of Curcumin-Loaded PCL-PEG-PCL Triblock Copolymeric Nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine* **2012**, 4089. <https://doi.org/10.2147/IJN.S33607>.
- (44) Grossen, P.; Witzigmann, D.; Sieber, S.; Huwyler, J. PEG-PCL-Based Nanomedicines: A Biodegradable Drug Delivery System and Its Application. *Journal of Controlled Release* **2017**, 260, 46–60. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.05.028>.
- (45) Rajan, M.; Praphakar, R. A.; Govindaraj, D.; Arulselvan, P.; Kumar, S. S. Cytotoxicity Assessment of Palbociclib-Loaded Chitosan-Polypropylene Glycol Nano Vehicles for Cancer Chemotherapy. *Materials Today Chemistry* **2017**, 6, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2017.08.002>.
- (46) Shan, X.; Liu, C.; Yuan, Y.; Xu, F.; Tao, X.; Sheng, Y.; Zhou, H. In Vitro Macrophage Uptake and in Vivo Biodistribution of Long-Circulation Nanoparticles with Poly(Ethylene-Glycol)-Modified PLA (BAB Type) Triblock Copolymer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2009**, 72 (2), 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.04.017>.
- (47) Yameen, B.; Vilos, C.; Choi, W. I.; Whyte, A.; Huang, J.; Pollit, L.; Farokhzad, O. C. Drug Delivery Nanocarriers from a Fully Degradable PEG-Conjugated Polyester with a Reduction-Responsive Backbone. *Chem. Eur. J.* **2015**, 21 (32), 11325–11329. <https://doi.org/10.1002/chem.201502233>.
- (48) Sawdon, A. J.; Peng, C.-A. Polymeric Micelles for Acyclovir Drug Delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, 122, 738–745. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.08.011>.
- (49) Ge, H.; Hu, Y.; Jiang, X.; Cheng, D.; Yuan, Y.; Bi, H.; Yang, C. Preparation, Characterization, and Drug Release Behaviors of Drug Nimodipine-loaded Poly(E-caprolactone)-poly(Ethylene Oxide)-poly(E-caprolactone) Amphiphilic Triblock Copolymer Micelles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2002**, 91 (6), 1463–1473. <https://doi.org/10.1002/jps.10143>.
- (50) Zhang, L.; He, Y.; Ma, G.; Song, C.; Sun, H. Paclitaxel-Loaded Polymeric Micelles Based on Poly(ϵ -Caprolactone)-Poly(Ethylene Glycol)-Poly(ϵ -Caprolactone) Triblock Copolymers: In Vitro and in Vivo Evaluation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2012**, 8 (6), 925–934. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.11.005>.
- (51) Trimaille, T.; Möller, M.; Gurny, R. Synthesis and Ring-Opening Polymerization of New Monoalkyl-Substituted Lactides: ROP of New Monoalkyl-Substituted Lactides. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2004**, 42 (17), 4379–4391. <https://doi.org/10.1002/pola.20251>.
- (52) Rieger, J. Synthesis, Characterization and Biomedical Interest of Amphiphilic Biocompatible and Bioeliminable (Glyco)Copolymers of Various Architectures, Univeristé de Liège; Univeristé Joseph Fourier, Liège (Belgique) & Grenoble (France), 2006.
- (53) El Habnoui, S.; Nottelet, B.; Darcos, V.; Porsio, B.; Lemaire, L.; Franconi, F.; Garric, X.; Coudane, J. MRI-Visible Poly(ϵ -Caprolactone) with Controlled Contrast Agent Ratios for Enhanced Visualization in Temporary Imaging Applications. *Biomacromolecules* **2013**, 14 (10), 3626–3634. <https://doi.org/10.1021/bm400978a>.
- (54) Coumes, F.; Darcos, V.; Domurado, D.; Li, S.; Coudane, J. Synthesis and Ring-Opening Polymerisation of a New Alkyne-Functionalised Glycolide towards Biocompatible Amphiphilic Graft Copolymers. *Polym. Chem.* **2013**, 4 (13), 3705. <https://doi.org/10.1039/c3py00375b>.
- (55) Ponsart, S.; Coudane, J.; Vert, M. A Novel Route To Poly(ϵ -Caprolactone)-Based Copolymers via Anionic Derivatization. *Biomacromolecules* **2000**, 1 (2), 275–281. <https://doi.org/10.1021/bm005521t>.

- (56) Ponsart, S.; Coudane, J. ϵ -Caprolactone Copolymers Obtained by Chemical. 7.
- (57) Gimenez, S.; Ponsart, S.; Coudane, J.; Vert, M. Synthesis, Properties and in Vitro Degradation of Carboxyl-Bearing PCL. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **2001**, *16* (1), 32–46. <https://doi.org/10.1106/MF92-TCJC-KC2X-J0FB>.
- (58) Blanquer, S.; Garric, X.; Coudane, J. PCL-Isocyanate: A New, Degradable Macromolecular Synthron for the Synthesis of Polymeric Bioconjugates. *Macromol. Chem. Phys.* **2009**, *210* (20), 1691–1696. <https://doi.org/10.1002/macp.200900301>.
- (59) Ponsart, S.; Coudane, J.; McGrath, J.; Vert, M. Study of the Grafting of Bromoacetylated α -Hydroxy- ω -Methoxypoly(Ethyleneglycol) onto Anionically Activated Poly(ϵ -Caprolactone). *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **2002**, *17* (6), 417–432. <https://doi.org/10.1177/088391102030911>.
- (60) Nottelet, B.; El Ghzaoui, A.; Coudane, J.; Vert, M. Novel Amphiphilic Poly(ϵ -Caprolactone)-*g*-Poly(L-Lysine) Degradable Copolymers. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (8), 2594–2601. <https://doi.org/10.1021/bm700449c>.
- (61) Nottelet, B.; Vert, M.; Coudane, J. Novel Amphiphilic Degradable Poly(ϵ -Caprolactone)-Graft-Poly(4-Vinyl Pyridine), Poly(ϵ -Caprolactone)-Graft-Poly(Dimethylaminoethyl Methacrylate) and Water-Soluble Derivatives. *Macromolecular Rapid Communications* **2008**, *29* (9), 743–750. <https://doi.org/10.1002/marc.200800037>.
- (62) Porsio, B.; Lemaire, L.; El Habnoui, S.; Darcos, V.; Franconi, F.; Garric, X.; Coudane, J.; Nottelet, B. MRI-Visible Nanoparticles from Hydrophobic Gadolinium Poly(ϵ -Caprolactone) Conjugates. *Polymer* **2015**, *56*, 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2014.11.031>.
- (63) Al Samad, A.; Bakkour, Y.; Fanny, C.; El Omar, F.; Coudane, J.; Nottelet, B. From Nanospheres to Micelles: Simple Control of PCL-*g*-PEG Copolymers' Amphiphilicity through Thiol–Yne Photografting. *Polym. Chem.* **2015**, *6* (28), 5093–5102. <https://doi.org/10.1039/C5PY00391A>.
- (64) Al Samad, A.; Bethry, A.; Koziolová, E.; Netopilík, M.; Etrych, T.; Bakkour, Y.; Coudane, J.; El Omar, F.; Nottelet, B. PCL–PEG Graft Copolymers with Tunable Amphiphilicity as Efficient Drug Delivery Systems. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4* (37), 6228–6239. <https://doi.org/10.1039/C6TB01841F>.
- (65) Attwood, D.; Booth, C.; Yeates, S.; Chaibundit, C.; Ricardo, N. Block Copolymers for Drug Solubilisation: Relative Hydrophobicities of Polyether and Polyester Micelle-Core-Forming Blocks. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *345* (1–2), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.07.039>.
- (66) Yang, X.; Deng, W.; Fu, L.; Blanco, E.; Gao, J.; Quan, D.; Shuai, X. Folate-Functionalized Polymeric Micelles for Tumor Targeted Delivery of a Potent Multidrug-Resistance Modulator FG020326. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2008**, *86A* (1), 48–60. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31537>.
- (67) Hami, Z.; Amini, M.; Ghazi-Khansari, M.; Rezayat, S.; Gilani, K. Doxorubicin-Conjugated PLA-PEG-Folate Based Polymeric Micelle for Tumor-Targeted Delivery: Synthesis and in Vitro Evaluation. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* **2014**, *22* (1), 30. <https://doi.org/10.1186/2008-2231-22-30>.
- (68) Khan, T.; Date, A.; Chawda, H.; Patel, K. Polysaccharides as Potential Anticancer Agents—A Review of Their Progress. *Carbohydrate Polymers* **2019**, *210*, 412–428. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.064>.
- (69) Domínguez-Rodríguez, P.; Franconetti, A.; Gómez-Guillén, M.; Jatunov, S.; Cabrera-Escribano, F. New Coumarin-Chitosan Based Fluorescent Polymers. In *Proceedings of The 17th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*; MDPI: Sciforum.net, 2013; p d002. <https://doi.org/10.3390/ecsoc-17-d002>.

- (70) Jatunov, S.; Franconetti, A.; Prado-Gotor, R.; Heras, A.; Mengíbar, M.; Cabrera-Escribano, F. Fluorescent Imino and Secondary Amino Chitosans as Potential Sensing Biomaterials. *Carbohydrate Polymers* **2015**, *123*, 288–296. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.061>.
- (71) Bhatnagar, P.; Pant, A. B.; Shukla, Y.; Panda, A.; Gupta, K. C. Hyaluronic Acid Grafted PLGA Copolymer Nanoparticles Enhance the Targeted Delivery of Bromelain in Ehrlich's Ascites Carcinoma. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2016**, *105*, 176–192. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.06.002>.
- (72) Chen, S.-C.; Yang, M.-H.; Chung, T.-W.; Jhuang, T.-S.; Yang, J.-D.; Chen, K.-C.; Chen, W.-J.; Huang, Y.-F.; Jong, S.-B.; Tsai, W.-C.; Lin, P.-C.; Tyan, Y.-C. Preparation and Characterization of Hyaluronic Acid-Polycaprolactone Copolymer Micelles for the Drug Delivery of Radioactive Iodine-131 Labeled Lipiodol. *BioMed Research International* **2017**, *2017*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/4051763>.
- (73) Deng, W. J.; Zhuang, X. P.; Guan, K. T.; Cheng, B. W. Structure and Thermal Properties of Cellulose Diacetate-Graft-Poly(Lactic Acid) Copolymer. *AMR* **2011**, *221*, 85–89. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.221.85>.
- (74) Lee, S. J.; Shim, Y.-H.; Oh, J.-S.; Jeong, Y.-I.; Park, I.-K.; Lee, H. C. Folic-Acid-Conjugated Pullulan/Poly(DL-Lactide-Co-Glycolide) Graft Copolymer Nanoparticles for Folate-Receptor-Mediated Drug Delivery. *Nanoscale Res Lett* **2015**, *10* (1), 43. <https://doi.org/10.1186/s11671-014-0706-1>.
- (75) Choi, K.-C.; Bang, J.-Y.; Kim, C.; Kim, P.-I.; Lee, S.-R.; Chung, W.-T.; Park, W.-D.; Park, J.-S.; Lee, Y. S.; Song, C.-E.; Lee, H.-Y. Antitumor Effect of Adriamycin-Encapsulated Nanoparticles of Poly(DL-Lactide-Co-Glycolide)-Grafted Dextran. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, *98* (6), 2104–2112. <https://doi.org/10.1002/jps.21588>.
- (76) Chebil, A.; Funfschilling, D.; Six, J.-L.; Nouvel, C.; Durand, A.; Léonard, M. Process Conditions for Preparing Well-Defined Nano- and Microparticles as Delivery Systems of Alkyl Gallates. *Particuology* **2019**, *44*, 105–116. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2018.07.003>.
- (77) Yao, X.; Chen, L.; Chen, X.; He, C.; Zheng, H.; Chen, X. Intercellular PH-Responsive Histidine Modified Dextran-g-Cholesterol Micelle for Anticancer Drug Delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, *121*, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.032>.
- (78) Zhao, Z.; Zhang, Z.; Chen, L.; Cao, Y.; He, C.; Chen, X. Biodegradable Stereocomplex Micelles Based on Dextran-Block-Polylactide as Efficient Drug Deliveries. *Langmuir* **2013**, *29* (42), 13072–13080. <https://doi.org/10.1021/la402890k>.
- (79) Piao, L.; Li, Y.; Zhang, H.; Jiang, J. Stereocomplex Micelle Loaded with Paclitaxel for Enhanced Therapy of Breast Cancer in an Orthotopic Mouse Model. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2019**, *30* (3), 233–246. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1565612>.
- (80) Li, B.; Wang, Q.; Wang, X.; Wang, C.; Jiang, X. Preparation, Drug Release and Cellular Uptake of Doxorubicin-Loaded Dextran-b-Poly(ϵ -Caprolactone) Nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* **2013**, *93* (2), 430–437. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.12.051>.
- (81) Zhang, Z.; Chen, X.; Gao, X.; Yao, X.; Chen, L.; He, C.; Chen, X. Targeted Dextran-b-Poly(ϵ -Caprolactone) Micelles for Cancer Treatments. *RSC Adv.* **2015**, *5* (24), 18593–18600. <https://doi.org/10.1039/C4RA15696J>.
- (82) Zhang, Y. L.; Dou, X. W.; Jin, T. Synthesis and Self-Assembly Behavior of Amphiphilic Diblock Copolymer Dextran-Block-Poly(ϵ -Caprolactone) (DEX-b-PCL) in Aqueous Media. *Express Polymer Letters* **2010**, *4* (10), 599–610. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2010.75>.

- (83) Guerry, A.; Bernard, J.; Samain, E.; Fleury, E.; Cottaz, S.; Halila, S. Aniline-Catalyzed Reductive Amination as a Powerful Method for the Preparation of Reducing End-“Clickable” Chitoooligosaccharides. *Bioconjugate Chemistry* **2013**, *24* (4), 544–549. <https://doi.org/10.1021/bc3003716>.
- (84) Laville, M.; Babin, J.; Londono, I.; Legros, M.; Nouvel, C.; Durand, A.; Vanderesse, R.; Leonard, M.; Six, J.-L. Polysaccharide-Covered Nanoparticles with Improved Shell Stability Using Click-Chemistry Strategies. *Carbohydrate Polymers* **2013**, *93* (2), 537–546. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.050>.
- (85) Toman, P.; Lien, C.-F.; Ahmad, Z.; Dietrich, S.; Smith, J. R.; An, Q.; Molnár, É.; Pilkington, G. J.; Górecki, D. C.; Tsibouklis, J.; Barbu, E. Nanoparticles of Alkylglyceryl-Dextran- Graft -Poly(Lactic Acid) for Drug Delivery to the Brain: Preparation and in Vitro Investigation. *Acta Biomaterialia* **2015**, *23*, 250–262. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.05.009>.
- (86) Gref, R.; Rodrigues, J.; Couvreur, P. Polysaccharides Grafted with Polyesters: Novel Amphiphilic Copolymers for Biomedical Applications. *Macromolecules* **2002**, *35* (27), 9861–9867. <https://doi.org/10.1021/ma021132a>.
- (87) Villemson, A.; Couvreur, P.; Gillet, B.; Larionova, N.; Gref, R. Dextran-Poly- ϵ -Caprolactone Micro- and Nanoparticles: Preparation, Characterization and Tamoxifen Solubilization. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2006**, *16* (4), 307–313. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(06\)50055-3](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(06)50055-3).
- (88) Shi, R.; Burt, H. M. Amphiphilic Dextran-Graft-Poly(ϵ -Caprolactone) Films for the Controlled Release of Paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, *271* (1), 167–179. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.11.005>.
- (89) Nouvel, C.; Ydens, I.; Degée, P.; Dubois, P.; Dellacherie, E.; Six, J.-L. Partial or Total Silylation of Dextran with Hexamethyldisilazane. *Polymer* **2002**, *43* (6), 1735–1743. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(01\)00778-9](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(01)00778-9).
- (90) Feng, H.; Dong, C.-M. Synthesis and Characterization of Phthaloyl-Chitosan-g-Poly(L-Lactide) Using an Organic Catalyst. *Carbohydrate Polymers* **2007**, *70* (3), 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.04.004>.
- (91) Ge, W.; Li, D.; Chen, M.; Wang, X.; Liu, S.; Sun, R. Characterization and Antioxidant Activity of β -Carotene Loaded Chitosan-Graft-Poly(Lactide) Nanomicelles. *Carbohydrate Polymers* **2015**, *117*, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.056>.
- (92) Li, J.; Kong, M.; Cheng, X. J.; Dang, Q. F.; Zhou, X.; Wei, Y. N.; Chen, X. G. Preparation of Biocompatible Chitosan Grafted Poly(Lactic Acid) Nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules* **2012**, *51* (3), 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.05.011>.
- (93) Di Martino, A.; Kucharczyk, P.; Zednik, J.; Sedlarik, V. Chitosan Grafted Low Molecular Weight Polylactic Acid for Protein Encapsulation and Burst Effect Reduction. *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, *496* (2), 912–921. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.017>.
- (94) Huang, S.; Wan, Y.; Wang, Z.; Wu, J. Folate-Conjugated Chitosan–Polylactide Nanoparticles for Enhanced Intracellular Uptake of Anticancer Drug. *Journal of Nanoparticle Research* **2013**, *15* (12). <https://doi.org/10.1007/s11051-013-2096-1>.
- (95) Nie, X.; Zhang, J.; Xu, Q.; Liu, X.; Li, Y.; Wu, Y.; Chen, C. Targeting Peptide IRGD-Conjugated Amphiphilic Chitosan-Co-PLA/DPPE Drug Delivery System for Enhanced Tumor Therapy. *Journal of Materials Chemistry B* **2014**, *2* (21), 3232. <https://doi.org/10.1039/c3tb21744b>.
- (96) Duan, K.; Chen, H.; Huang, J.; Yu, J.; Liu, S.; Wang, D.; Li, Y. One-Step Synthesis of Amino-Reserved Chitosan-Graft-Polycaprolactone as a Promising Substance of

- Biomaterial. *Carbohydrate Polymers* **2010**, *80* (2), 498–503. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.013>.
- (97) Gu, C.; Le, V.; Lang, M.; Liu, J. Preparation of Polysaccharide Derivates Chitosan-Graft-Poly(ϵ -Caprolactone) Amphiphilic Copolymer Micelles for 5-Fluorouracil Drug Delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, *116*, 745–750. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.01.026>.
- (98) Wang, Z.; Zheng, L.; Li, C.; Zhang, D.; Xiao, Y.; Guan, G.; Zhu, W. A Novel and Simple Procedure to Synthesize Chitosan-Graft-Polycaprolactone in an Ionic Liquid. *Carbohydrate Polymers* **2013**, *94* (1), 505–510. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.090>.
- (99) Zhang, H.; Cai, G.; Tang, G.; Wang, L.; Jiang, H. Synthesis, Self-Assembly, and Cytotoxicity of Well-Defined Trimethylated Chitosan-O-Poly(ϵ -Caprolactone): Effect of Chitosan Molecular Weight. *J. Biomed. Mater. Res.* **2011**, *98B* (2), 290–299. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31851>.
- (100) Tang, S.; Huang, Z.; Zhang, H.; Wang, Y.; Hu, Q.; Jiang, H. Design and Formulation of Trimethylated Chitosan-Graft-Poly(ϵ -Caprolactone) Nanoparticles Used for Gene Delivery. *Carbohydrate Polymers* **2014**, *101*, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.053>.
- (101) Zhang, P.; Cao, M. Preparation of a Novel Organo-Soluble Chitosan Grafted Polycaprolactone Copolymer for Drug Delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* **2014**, *65*, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.01.009>.
- (102) Yu, H.; Wang, W.; Chen, X.; Deng, C.; Jing, X. Synthesis and Characterization of the Biodegradable Polycaprolactone-Graft-Chitosan Amphiphilic Copolymers. *Biopolymers* **2006**, *83* (3), 233–242. <https://doi.org/10.1002/bip.20551>.
- (103) Yuan, W.; Zhao, Z.; Gu, S.; Ren, J. Synthesis, Characterization, and Properties of Amphiphilic Chitosan Copolymers with Mixed Side Chains by Click Chemistry. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2010**, *48* (15), 3476–3486. <https://doi.org/10.1002/pola.24136>.
- (104) Wang, C.; Li, G.; Tao, S.; Guo, R.; Yan, Z. Crystalline and Micellar Properties of Amphiphilic Biodegradable Chitooligosaccharide-Graft-Poly(ϵ -Caprolactone) Copolymers. *Carbohydrate Polymers* **2006**, *64* (3), 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.12.017>.
- (105) Xu, Y.; Wang, L.; Li, Y.-K.; Wang, C.-Q. Reduction and PH Dual-Responsive Nanoparticles Based Chitooligosaccharide-Based Graft Copolymer for Doxorubicin Delivery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2016**, *497*, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.01.049>.
- (106) Dash, T. K.; Konkimalla, V. B. Poly- ϵ -Caprolactone Based Formulations for Drug Delivery and Tissue Engineering: A Review. *Journal of Controlled Release* **2012**, *158* (1), 15–33. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.064>.
- (107) Sinha, V. R.; Bansal, K.; Kaushik, R.; Kumria, R.; Trehan, A. Poly- ϵ -Caprolactone Microspheres and Nanospheres: An Overview. *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, *278* (1), 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.01.044>.
- (108) Brandt, J. V.; Piazza, R. D.; dos Santos, C. C.; Vega-Chacón, J.; Amantéa, B. E.; Pinto, G. C.; Magnani, M.; Piva, H. L.; Tedesco, A. C.; Primo, F. L.; Jafelicci, M.; Marques, R. F. C. Synthesis and Colloidal Characterization of Folic Acid-Modified PEG-b-PCL Micelles for Methotrexate Delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2019**, *177*, 228–234. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.02.008>.
- (109) Wu, D.-Q.; Lu, B.; Chang, C.; Chen, C.-S.; Wang, T.; Zhang, Y.-Y.; Cheng, S.-X.; Jiang, X.-J.; Zhang, X.-Z.; Zhuo, R.-X. Galactosylated Fluorescent Labeled Micelles as a Liver Targeting Drug Carrier. *Biomaterials* **2009**, *30* (7), 1363–1371. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.11.027>.

- (110) Ponsart, S.; Coudane, J.; Vert, M. A Novel Route To Poly(ϵ -Caprolactone)-Based Copolymers via Anionic Derivatization. *Biomacromolecules* **2000**, *1* (2), 275–281. <https://doi.org/10.1021/bm005521t>.
- (111) Leroy, A.; Al Samad, A.; Garric, X.; Hunger, S.; Noël, D.; Coudane, J.; Nottelet, B. Biodegradable Networks for Soft Tissue Engineering by Thiol–Yne Photo Cross-Linking of Multifunctional Polyesters. *RSC Adv.* **2014**, *4* (60), 32017–32023. <https://doi.org/10.1039/C4RA03665D>.
- (112) Verma, M. S.; Gu, F. X. Microwave-Enhanced Reductive Amination via Schiff’s Base Formation for Block Copolymer Synthesis. *Carbohydrate Polymers* **2012**, *87* (4), 2740–2744. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.025>.
- (113) Leophairatana, P.; De Silva, C. C.; Koberstein, J. T. How Good Is CuAAC “Click” Chemistry for Polymer Coupling Reactions? *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2017**. <https://doi.org/10.1002/pola.28872>.
- (114) Lowe, A. B. Thiol–Yne ‘Click’/Coupling Chemistry and Recent Applications in Polymer and Materials Synthesis and Modification. *Polymer* **2014**, *55* (22), 5517–5549. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2014.08.015>.
- (115) Pressly, E. D.; Amir, R. J.; Hawker, C. J. Rapid Synthesis of Block and Cyclic Copolymers via Click Chemistry in the Presence of Copper Nanoparticles. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2011**, *49* (3), 814–819. <https://doi.org/10.1002/pola.24504>.
- (116) Lochmuller, C. H.; Wenzel, T. J. Spectroscopic Studies of Pyrene at Silica Interfaces. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94* (10), 4230–4235. <https://doi.org/10.1021/j100373a065>.
- (117) Kalyanasundaram, K.; Thomas, J. K. Environmental Effects on Vibronic Band Intensities in Pyrene Monomer Fluorescence and Their Application in Studies of Micellar Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99* (7), 2039–2044. <https://doi.org/10.1021/ja00449a004>.
- (118) Golombek, S. K.; May, J.-N.; Theek, B.; Appold, L.; Drude, N.; Kiessling, F.; Lammers, T. Tumor Targeting via EPR: Strategies to Enhance Patient Responses. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2018**, *130*, 17–38. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.007>.
- (119) Saldías, C.; Velásquez, L.; Quezada, C.; Leiva, A. Physicochemical Assessment of Dextran-g-Poly (ϵ -Caprolactone) Micellar Nanoaggregates as Drug Nanocarriers. *Carbohydrate Polymers* **2015**, *117*, 458–467. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.035>.
- (120) Amidi, M.; Hennink, W. E. Chitosan-Based Formulations of Drugs, Imaging Agents and Biotherapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, *62* (1), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.12.006>.
- (121) Elgadir, M. A.; Uddin, Md. S.; Ferdosh, S.; Adam, A.; Chowdhury, A. J. K.; Sarker, Md. Z. I. Impact of Chitosan Composites and Chitosan Nanoparticle Composites on Various Drug Delivery Systems: A Review. *Journal of Food and Drug Analysis* **2015**, *23* (4), 619–629. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.10.008>.
- (122) Kumar, M. N. V. R.; Muzzarelli, R. A. A.; Muzzarelli, C.; Sashiwa, H.; Domb, A. J. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chemical Reviews* **2004**, *104* (12), 6017–6084. <https://doi.org/10.1021/cr030441b>.
- (123) Luque-Alcaraz, A. G.; Lizardi-Mendoza, J.; Goycoolea, F. M.; Higuera-Ciapara, I.; Argüelles-Monal, W. Preparation of Chitosan Nanoparticles by Nanoprecipitation and Their Ability as a Drug Nanocarrier. *RSC Adv.* **2016**, *6* (64), 59250–59256. <https://doi.org/10.1039/C6RA06563E>.
- (124) Prabakaran, M. Chitosan-Based Nanoparticles for Tumor-Targeted Drug Delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* **2015**, *72*, 1313–1322. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.052>.

- (125) Katuwavila, N. P.; Perera, A. D. L. C.; Samarakoon, S. R.; Soysa, P.; Karunaratne, V.; Amaratunga, G. A. J.; Karunaratne, D. N. Chitosan-Alginate Nanoparticle System Efficiently Delivers Doxorubicin to MCF-7 Cells. *Journal of Nanomaterials* **2016**, *2016*, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/3178904>.
- (126) Tan, M. L.; Choong, P. F. M.; Dass, C. R. Review: Doxorubicin Delivery Systems Based on Chitosan for Cancer Therapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2009**, *61* (2), 131–142. <https://doi.org/10.1211/jpp/61.02.0001>.
- (127) Emami, J.; Rezazadeh, M.; Rostami, M.; Hassanzadeh, F.; Sadeghi, H.; Mostafavi, A.; Minaiyan, M.; Lavasanifar, A. Co-Delivery of Paclitaxel and α -Tocopherol Succinate by Novel Chitosan-Based Polymeric Micelles for Improving Micellar Stability and Efficacious Combination Therapy. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2015**, *41* (7), 1137–1147. <https://doi.org/10.3109/03639045.2014.935390>.
- (128) Gupta, U.; Sharma, S.; Khan, I.; Gothwal, A.; Sharma, A. K.; Singh, Y.; Chourasia, M. K.; Kumar, V. Enhanced Apoptotic and Anticancer Potential of Paclitaxel Loaded Biodegradable Nanoparticles Based on Chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules* **2017**, *98*, 810–819. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.030>.
- (129) Shilakari Asthana, G.; Asthana, A.; Kohli, D. V.; Vyas, S. P. Mannosylated Chitosan Nanoparticles for Delivery of Antisense Oligonucleotides for Macrophage Targeting. *BioMed Research International* **2014**, *2014*, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2014/526391>.
- (130) Yao, W.; Jiao, Y.; Luo, J.; Du, M.; Zong, L. Practical Synthesis and Characterization of Mannose-Modified Chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules* **2012**, *50* (3), 821–825. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.11.019>.
- (131) Kast, C. E.; Bernkop-Schnürch, A. Thiolated Polymers — Thiomers: Development and in Vitro Evaluation of Chitosan–Thioglycolic Acid Conjugates. *Biomaterials* **2001**, *22* (17), 2345–2352. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00421-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00421-X).
- (132) Mahmood, A.; Lanthaler, M.; Laffleur, F.; Huck, C. W.; Bernkop-Schnürch, A. Thiolated Chitosan Micelles: Highly Mucoadhesive Drug Carriers. *Carbohydrate Polymers* **2017**, *167*, 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.019>.
- (133) Tirino, P.; Laurino, R.; Maglio, G.; Malinconico, M.; d’Ayala, G. G.; Laurienzo, P. Synthesis of Chitosan–PEO Hydrogels via Mesylation and Regioselective Cu(I)-Catalyzed Cycloaddition. *Carbohydrate Polymers* **2014**, *112*, 736–745. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.026>.
- (134) Zampano, G.; Bertoldo, M.; Ciardelli, F. Defined Chitosan-Based Networks by C-6-Azide–Alkyne “Click” Reaction. *Reactive and Functional Polymers* **2010**, *70* (5), 272–281. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2010.01.004>.
- (135) Pestov, A.; Nazirov, A.; Modin, E.; Mironenko, A.; Bratskaya, S. Mechanism of Au(III) Reduction by Chitosan: Comprehensive Study with ^{13}C and ^1H NMR Analysis of Chitosan Degradation Products. *Carbohydrate Polymers* **2015**, *117*, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.030>.
- (136) Taghizadeh, M. T.; Abdollahi, R. Sonolytic, Sonocatalytic and Sonophotocatalytic Degradation of Chitosan in the Presence of TiO_2 Nanoparticles. *Ultrasonics Sonochemistry* **2011**, *18* (1), 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.04.004>.
- (137) Xue Zheng; Wei Jiang; Liyan Xing; Junwen Pu. Synthesis and Characterization of Low Molecular Weight Chitosan. *BioResources* **2015**, *10* (2), 2338–2349.
- (138) Murinov, K. Yu.; Kuramshina, A. R.; Khisamutdinov, R. A.; Murinov, Yu. I.; Kabal’nova, N. N. IR Study on Chitosan Oxidation with Sodium Chlorite. *Russian Journal of General Chemistry* **2010**, *80* (1), 23–26. <https://doi.org/10.1134/S1070363210010044>.
- (139) Allan, G. G.; Peyron, M. Molecular Weight Manipulation of Chitosan I: Kinetics of Depolymerization by Nitrous Acid. *Carbohydrate Research* **1995**, *277* (2), 257–272. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(95\)00207-A](https://doi.org/10.1016/0008-6215(95)00207-A).

- (140) Tian, F.; Liu, Y.; Hu, K.; Zhao, B. The Depolymerization Mechanism of Chitosan by Hydrogen Peroxide. *Journal of Materials Science* **2003**, *38* (23), 4709–4712.
- (141) Vårum, K. M.; Ottøy, M. H.; Smidsrød, O. Acid Hydrolysis of Chitosans. *Carbohydrate Polymers* **2001**, *46* (1), 89–98. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00288-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00288-5).
- (142) Kazami, N.; Sakaguchi, M.; Mizutani, D.; Masuda, T.; Wakita, S.; Oyama, F.; Kawakita, M.; Sugahara, Y. A Simple Procedure for Preparing Chitin Oligomers through Acetone Precipitation after Hydrolysis in Concentrated Hydrochloric Acid. *Carbohydrate Polymers* **2015**, *132*, 304–310. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.082>.
- (143) Savitri, E.; Juliastuti, S. R.; Handaratri, A.; Sumarno; Roesyadi, A. Degradation of Chitosan by Sonication in Very-Low-Concentration Acetic Acid. *Polymer Degradation and Stability* **2014**, *110*, 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.09.010>.
- (144) Xia, W.; Liu, P.; Liu, J. Advance in Chitosan Hydrolysis by Non-Specific Cellulases. *Bioresource Technology* **2008**, *99* (15), 6751–6762. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.011>.
- (145) Li, J.; Du, Y.; Liang, H. Low Molecular Weight Water-Soluble Chitosans: Preparation with the Aid of Cellulase, Characterization, and Solubility. *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, *102* (2), 1098–1105. <https://doi.org/10.1002/app.24306>.
- (146) Rokhati, N.; Widjajanti, P.; Pramudono, B.; Susanto, H.; Rokhati, N.; Widjajanti, P.; Pramudono, B.; Susanto, H. Performance Comparison of α - and β -Amylases on Chitosan Hydrolysis, Performance Comparison of α - and β -Amylases on Chitosan Hydrolysis. *International Scholarly Research Notices, International Scholarly Research Notices* **2013**, *2013*, *2013*, e186159. <https://doi.org/10.1155/2013/186159>, [10.1155/2013/186159](https://doi.org/10.1155/2013/186159).
- (147) Illy, N.; Robitzer, M.; Auvergne, R.; Caillol, S.; David, G.; Boutevin, B. Synthesis of Water-Soluble Allyl-Functionalized Oligochitosan and Its Modification by Thiol-Ene Addition in Water. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2014**, *52* (1), 39–48. <https://doi.org/10.1002/pola.26967>.
- (148) Gary-Bobo, M.; Mir, Y.; Rouxel, C.; Brevet, D.; Hocine, O.; Maynadier, M.; Gallud, A.; Da Silva, A.; Mongin, O.; Blanchard-Desce, M.; Richeter, S.; Loock, B.; Maillard, P.; Morère, A.; Garcia, M.; Raehm, L.; Durand, J.-O. Multifunctionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for the in Vitro Treatment of Retinoblastoma: Drug Delivery, One and Two-Photon Photodynamic Therapy. *International Journal of Pharmaceutics* **2012**, *432* (1–2), 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.04.056>.
- (149) Gary-Bobo, M.; Mir, Y.; Rouxel, C.; Brevet, D.; Basile, I.; Maynadier, M.; Vaillant, O.; Mongin, O.; Blanchard-Desce, M.; Morère, A.; Garcia, M.; Durand, J.-O.; Raehm, L. Mannose-Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Efficient Two-Photon Photodynamic Therapy of Solid Tumors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (48), 11425–11429. <https://doi.org/10.1002/anie.201104765>.
- (150) Kritchenkov, A. S.; Egorov, A. R.; Skorik, Yu. A. Azide Pre-Click Modification of Chitosan: N-(2-Azidoethyl)Chitosan. *Russian Chemical Bulletin* **2018**, *67* (10), 1915–1919. <https://doi.org/10.1007/s11172-018-2307-0>.
- (151) Lakouraj, M. M.; Hasanzadeh, F.; Zare, E. N. Nanogel and Super-Paramagnetic Nanocomposite of Thiocalix[4]Arene Functionalized Chitosan: Synthesis, Characterization and Heavy Metal Sorption. *Iran Polym J* **2014**, *23* (12), 933–945. <https://doi.org/10.1007/s13726-014-0287-y>.
- (152) Kulbokaite, R.; Ciuta, G.; Netopilik, M.; Makuska, R. N-PEGylation of Chitosan via “Click Chemistry” Reactions. *Reactive and Functional Polymers* **2009**, *69* (10), 771–778. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2009.06.010>.

- (153) Sashiwa, H.; Thompson, J. M.; Das, S. K.; Shigemasa, Y.; Tripathy, S.; Roy, R. Chemical Modification of Chitosan: Preparation and Lectin Binding Properties of α -Galactosyl-Chitosan Conjugates. Potential Inhibitors in Acute Rejection Following Xenotransplantation. *Biomacromolecules* **2000**, *1* (3), 303–305. <https://doi.org/10.1021/bm005536r>.
- (154) Munneke, S.; Prevost, J. R. C.; Painter, G. F.; Stocker, B. L.; Timmer, M. S. M. The Rapid and Facile Synthesis of Oxyamine Linkers for the Preparation of Hydrolytically Stable Glycoconjugates. *Organic Letters* **2015**, *17* (3), 624–627. <https://doi.org/10.1021/ol503634j>.
- (155) Geisberger, G.; Gyenge, E. B.; Hinger, D.; Käch, A.; Maake, C.; Patzke, G. R. Chitosan-Thioglycolic Acid as a Versatile Antimicrobial Agent. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (4), 1010–1017. <https://doi.org/10.1021/bm3018593>.
- (156) Fernandes, M. M.; Francesko, A.; Torrent-Burgués, J.; Tzanov, T. Effect of Thiol-Functionalisation on Chitosan Antibacterial Activity: Interaction with a Bacterial Membrane Model. *Reactive and Functional Polymers* **2013**, *73* (10), 1384–1390. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2013.01.004>.
- (157) Croce, M.; Conti, S.; Maake, C.; Patzke, G. R. Synthesis and Screening of N-Acyl Thiolated Chitosans for Antibacterial Applications. *Carbohydrate Polymers* **2016**, *151*, 1184–1192. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.014>.
- (158) Chivangkul, T.; Pengprecha, S.; Padungros, P.; Siraleartmukul, K.; Prasongsuk, S.; Muangsin, N. Enhanced Water-Solubility and Mucoadhesion of N,N,N-Trimethyl-N-Gluconate-N-Homocysteine Thiolactone Chitosan. *Carbohydrate Polymers* **2014**, *108*, 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.078>.
- (159) Oliveira, J. R.; Martins, M. C. L.; Mafra, L.; Gomes, P. Synthesis of an O-Alkynyl-Chitosan and Its Chemoselective Conjugation with a PEG-like Amino-Azide through Click Chemistry. *Carbohydrate Polymers* **2012**, *87* (1), 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.043>.
- (160) Novoa-Carballal, R.; Müller, A. H. E. Synthesis of Polysaccharide-b-PEG Block Copolymers by Oxime Click. *Chemical Communications* **2012**, *48* (31), 3781. <https://doi.org/10.1039/c2cc30726j>.
- (161) Elmezayyen, A. S.; Reicha, F. M. Preparation of Chitosan Copper Complexes: Molecular Dynamic Studies of Chitosan and Chitosan Copper Complexes. *Open Journal of Applied Sciences* **2015**, *05* (08), 415–427. <https://doi.org/10.4236/ojapps.2015.58041>.
- (162) Jurado-López, B.; Vieira, R. S.; Rabelo, R. B.; Beppu, M. M.; Casado, J.; Rodríguez-Castellón, E. Formation of Complexes between Functionalized Chitosan Membranes and Copper: A Study by Angle Resolved XPS. *Materials Chemistry and Physics* **2017**, *185*, 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2016.10.018>.
- (163) Matyjaszewski, K.; Pintauer, T.; Gaynor, S. Removal of Copper-Based Catalyst in Atom Transfer Radical Polymerization Using Ion Exchange Resins. *Macromolecules* **2000**, *33* (4), 1476–1478. <https://doi.org/10.1021/ma9911445>.
- (164) Sahariah, P.; Sørensen, K. K.; Hjálmsdóttir, M. Á.; Sigurjónsson, Ó. E.; Jensen, K. J.; Mátsson, M.; Thygesen, M. B. Antimicrobial Peptide Shows Enhanced Activity and Reduced Toxicity upon Grafting to Chitosan Polymers. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (58), 11611–11614. <https://doi.org/10.1039/C5CC04010H>.
- (165) Sarwar, A.; Katas, H.; Samsudin, S. N.; Zin, N. M. Regioselective Sequential Modification of Chitosan via Azide-Alkyne Click Reaction: Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity of Chitosan Derivatives and Nanoparticles. *PLOS ONE* **2015**, *10* (4), e0123084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123084>.
- (166) Barbosa, M.; Vale, N.; Costa, F. M. T. A.; Martins, M. C. L.; Gomes, P. Tethering Antimicrobial Peptides onto Chitosan: Optimization of Azide-Alkyne “Click” Reaction

- Conditions. *Carbohydrate Polymers* **2017**, *165*, 384–393.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.050>.
- (167) Mironov, I. V.; Tselodub, L. D. Complexation of Copper(I) by Thiourea in Acidic Aqueous Solution. *J Solution Chem* **1996**, *25* (3), 315–325.
<https://doi.org/10.1007/BF00972529>.
- (168) Moussa, A.; Crépet, A.; Ladavière, C.; Trombotto, S. Reducing-End “Clickable” Functionalizations of Chitosan Oligomers for the Synthesis of Chitosan-Based Diblock Copolymers. *Carbohydrate Polymers* **2019**, *219*, 387–394.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.078>.

Chapitre 4

Partie expérimentale

1 Instrumentation

1.1 Spectrométrie infrarouge

Les spectres infrarouges (IR) ont été enregistrés sur un spectromètre Perkin-Elmer 100 IR-TF.

1.2 Spectrométrie ultraviolet - visible

Les spectres UV-visibles (UV-Vis) ont été effectués avec un spectromètre Perkin-Elmer Lambda 35 à double faisceau, avec des cuves en quartz de trajet optique d'1 cm.

1.3 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire

Les analyses de résonance magnétique nucléaire RMN ^1H et RMN COSY ont été effectuées sur un spectromètre Bruker (AMX300) opérant à 300 MHz. Le chloroforme (CDCl_3), le diméthylsulfoxyde (DMSO-d_6) et l'eau (D_2O) ont été utilisés comme solvant. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport à l'étalon interne tétraméthylsilane (TMS).

Les analyses de Diffusion par RMN (DOSY) ont été effectuées sur un spectromètre Bruker Avance III 600 MHz équipé avec une cryosonde à l'azote liquide Prodigy TCI équipée de gradient Z Bruker multinucléaire. Les spectres DOSY ont été récupérés depuis le logiciel topspin de Bruker avec le programme ledbpgp2s. La longueur de pulsation du gradient O était de 5 ms pour s'assurer de l'atténuation totale du signal.

1.4 Spectrométrie de fluorescence

Les expériences de fluorimétrie ont été réalisées sur un fluorimètre RF 5302 Shimadzu (Japon) équipé d'une source de lumière de Xénon (UXL-150S, Ushio, Japon). Les spectres ont été enregistrés en émission de 350 à 450 nm, pour une longueur d'onde d'excitation de 340 nm, et avec des fentes d'émission et d'excitation de 5 nm et 3 nm respectivement.

1.5 Chromatographie d'exclusion stérique

Les analyses de Chromatographie d'Exclusion Stérique (GPC) ont été effectuées sur trois systèmes avec différentes phases mobiles :

- Les GPC en phase aqueuse ont été effectuées avec deux colonnes : une TSK gel PW5000 et une PW3000. La phase mobile est un tampon acétate (0,15 M AcOH, 0,1 M AcONa;

pH4,5) dont le débit est fixé à 1mL/min. Les composés analysés ont été solubilisés dans ce tampon (10mg/mL) et filtrés sur un filtre 0,45 µm Millipore RC avant d'être injectés dans la boucle d'injection de l'appareillage. Les masses molaires des polysaccharides ont été déterminées à partir d'étalons de pullulan (342g/mol à 211 000g/mol).

- Les GPC en phase mobile THF ont été effectuées avec un appareillage Shimadzu composé de deux colonnes en série PLgel 5 µm MIXED-C (300*7,8mm) thermostatées à 30°C, couplées à un détecteur RI Shimadzu 20-A et un détecteur UV SPD-20A (thermostaté à 40°C). Les composés analysés sont dissouts dans du THF (5mg/mL) et filtrés sur un filtre Millipore PTFE 0,45 µm. Les masses molaires ont été déterminées à partir d'une calibration polystyrène (580g/mol à 2 470 000g/mol)

- Les GPC en phase mobile DMF (avec 0,1% de LiBr en poids/volume) ont été effectuées sur un appareillage Waters composé de deux colonnes PLgel 5µm Mixed-D (300mm) couplées à un détecteur RI. Le débit a été fixé à 1mL/min. La calibration utilisée est une calibration PEG (400g/mol à 276 300 g/mol).

1.6 Diffusion dynamique de la lumière

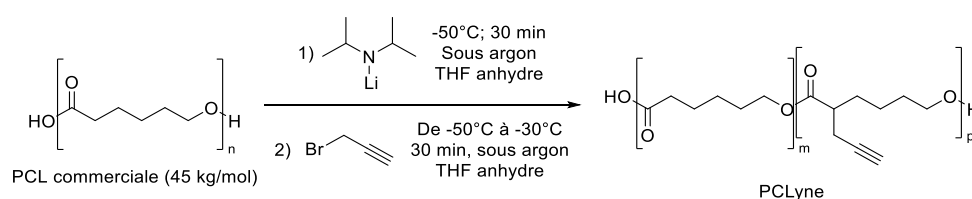
Les expériences de diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont été réalisées avec un appareil Malvern Instrument Nano ZS muni d'un laser He-Ne ($\lambda = 632,8$ nm). La fonction de corrélation a été analysée par la « general purpose method (NNLS) » afin d'obtenir la distribution de coefficients de diffusion des solutions (D). Le rayon hydrodynamique équivalent apparent (RH) a été déterminé par la méthode des cumulants. Les valeurs moyennes des rayons ont été obtenues par 3 tests successifs. Les déviations standards ont été évaluées à partir de la distribution des rayons hydrodynamiques.

Les échantillons d'analyses ont été solubilisés dans du tampon PBS (pH7,4) à 0,1mg/mL. Ces solutions ont été filtrées sur un filtre RC45 avant d'être analysées.

2 Synthèses

2.1 Fonctionnalisation de PCL par voie anionique

2.2 Propargylation



6g de PCL (53mmol; motifs caprolactone : 1 équivalent) sont dissouts dans 400mL de THF anhydre dans un réacteur à quatre cols sous agitation mécanique à -50°C sous argon. 17,52 mL d'une solution de LDA (26,5mmol ; 0,5 équivalent) sont injectés au milieu réactionnel *via* une seringue à travers un septum, puis le milieu réactionnel est agité pendant 30 minutes à -50°C. Par la suite 3,78mL de bromure de propargyle (26,5mmol ; 0,5 équivalent) sont ajoutés au milieu réactionnel et la solution est ensuite réchauffée jusqu'à -30°C. Après 30 minutes d'agitation, la réaction est stoppée par l'addition de 100mL d'une solution de NH₄.Cl, et le pH est ajusté à 7 par l'ajout d'HCl_{aq} (1M). Le polymère est extrait avec 3*150mL de CH₂Cl₂. Les trois phases de CH₂Cl₂ sont réunies, séchées sur MgSO₄ et filtrées. La solution de PCLyne est ensuite concentrée à l'évaporateur rotatif et précipité dans du Méthanol glacial. Puis le polymère est séché pendant 24h sous vide.

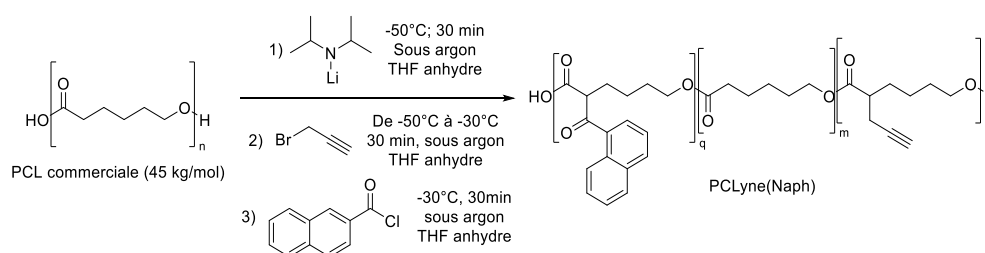
Rendement massique : 78%

IR-TF ν [cm⁻¹] : 2944 - 2865 (-CH₂-); 1721 (C=O ester); 1471 ; 1418; 1396; 1365; 1293 (-C-C- & -C-O-); 1239 (-C-O-C-); 1166 (-C-C=O); 1107; 1065; 1045; 961; 933; 840; 731.

RMN ¹H (CDCl₃; 300MHz) δ [ppm] : 3,98(2H ; -CH₂-O-) ; 3,4 (2H ; -CH₂-OH) ; 2,4-2,6 (1H ; -CO-CH-CH₂-C \equiv CH et 2H ; -CH₂-C \equiv CH) ; 2,3 (2H ; -CO-CH₂-); 2,0 (1H ; -C \equiv CH) ; 1,6 (4H ; -CO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-); 1,4 (2H ; -CO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-).

GPC THF: \overline{M}_n 18 900 g/mol; \overline{D} 2,55

2.3 Propargylation et naphthoylation



6g de PCL (53mmol de motifs caprolactone) sont dissouts dans 400mL de THF anhydre dans un réacteur à quatre cols sous agitation mécanique à -50°C sous argon. 17,52 mL d'une solution de LDA (26,5mmol ; 0,5 équivalent) sont injectés au milieu réactionnel *via* une seringue à travers un septum, puis le milieu réactionnel est agité pendant 30 minutes à -50°C. Par la suite, du 3,78mL de bromure de propargyle (26,5mmol ; 0,5 équivalent) sont ajoutés au milieu réactionnel et la solution est ensuite réchauffée jusqu'à -30°C. Puis le 2-chloronaphtoyl

est ajouté au milieu réactionnel. Après 30 minutes d'agitation, la réaction est stoppée par l'addition de 100mL d'une solution de NH_4Cl , et le pH est ajusté à 7 par l'ajout d' HCl_{aq} (1M). Le polymère est extrait avec 3*150mL de CH_2Cl_2 . Les trois phases de CH_2Cl_2 sont réunies, séchées sur MgSO_4 et filtrées. La solution de PCLyne est ensuite concentrée à l'évaporateur rotatif et précipité dans du Méthanol glacial. Puis le polymère est séché pendant 24h sous vide.

Rendement massique : 76%

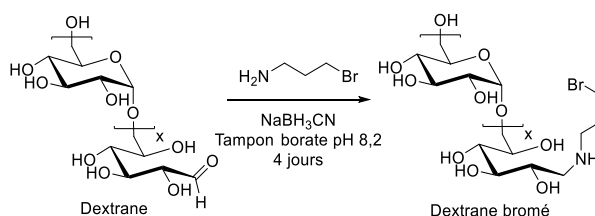
IR-TF ν [cm^{-1}] : 2944 - 2865 ($-\text{CH}_2-$); 1721 ($\text{C}=\text{O}$ ester); 1471 ; 1418; 1396; 1365; 1293 ($-\text{C}-\text{C}-$ & $-\text{C}-\text{O}-$); 1239 ($-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$); 1166 ($-\text{C}-\text{C}=\text{O}$); 1107; 1065; 1045; 961; 933; 840; 731

RMN ^1H (CDCl_3 ; 300MHz) δ [ppm] : 8,57-7,54 (7H; H-naphtoyle); 4,03 (2H ; $-\text{CH}_2-\text{O}-$) ; 3,61 (2H ; $-\text{CH}_2-\text{OH}$) ; 2,50-2,43 (1H ; $-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$ et 2H ; $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$) ; 2,28 (2H ; $-\text{CO}-\text{CH}_2-$); 1,98 (1H ; $-\text{C}\equiv\text{CH}$) ; 1,62 (4H ; $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$); 1,35 (2H ; $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$).

GPC THF: \overline{M}_n 27 000 g/mol; \overline{D} 2,27

2.4 Synthèse de PCL-g-DEX

2.4.1 Bromation du dextrane



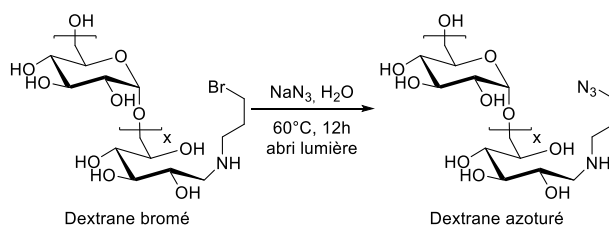
Dans un premier temps un tampon borate a été préparé : 4g de NaOH (0,1mol) et 24g de H_3BO_3 (0,38mol) ont été solubilisés dans 500mL d'eau distillée. 3g (0,5 mmol) de dextrane sont solubilisés dans 10mL de tampon borate. Puis 2,64g de bromure de 3-bromopropylammonium (12 mmol ; 25 équivalents) et 0,54g de cyanoborohydrure de sodium (8mmol ; 16 équivalents) sont ajoutées à la solution de dextrane. Le milieu réactionnel est agité pendant 4 jours à l'abri de la lumière. Par la suite, la solution est précipitée dans 300mL de Méthanol glacial. Le précipité est centrifugé et resolubilisé dans 20mL d'eau distillée pour être ensuite dialysé (MWCO 1kDa) contre 1L d'eau distillée. Le milieu externe est changé 3 fois. Puis le contenu du boudin est lyophilisé.

Rendement : ~50%

IR-TF ν [cm^{-1}] : 3348; 2913 ; 2036 ; 1657 ; 1424 ; 1340 ; 1143 ; 1012 ; 917 ; 767

RMN ^1H (D_2O ; 300MHz) δ [ppm] : 4,84 (1H ; H^1 pyranose) ; 3,76 – 3,86 (2H ; H^6 : 5 pyranose) ; 3,60 – 3,55 (2H ; H^3 : 4 pyranose) 3,34 - 3,45 (2H ; H^2 : 4 pyranose)

2.4.2 Azoturation du dextrane bromé



0,65g de dextrane bromé (0,11mmol) sont solubilisés dans 28mL d'eau. Puis 0,07g d'azoture de sodium sont ajoutés à cette solution. Le milieu est agité pendant une nuit à 60°C , à l'abri de la lumière. Puis le milieu réactionnel est dialysé (MWCO 1kDa) contre 1L d'eau distillée. Le milieu externe est régulièrement changé pendant une journée, puis le contenu de la membrane de dialyse est lyophilisé.

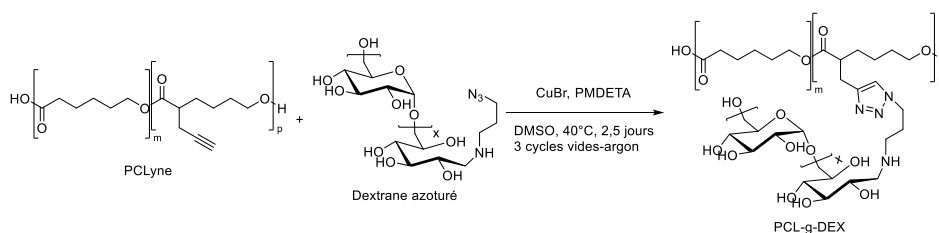
Rendement : ~60%

IR-TF ν [cm^{-1}] : 3348 ; 2934 ; 2036 ; 1642 ; 1442 ; 1345 ; 1150 ; 1014 ; 916 ; 767

RMN ^1H (D_2O ; 300MHz) δ [ppm] : 4,84 (1H ; H^1 pyranose) ; 3,76 – 3,86 (2H ; H^6 : 5 pyranose) ; 3,60 – 3,55 (2H ; H^3 : 4 pyranose) 3,34 - 3,45 (2H ; H^2 : 4 pyranose)

GPCaq: \overline{M}_n 6 000 g/mol; \overline{D} 1,50

2.4.3 Couplage de dextrane azoturé sur la PCLyne par CuAAC



50mg de PCL_{lyne} (fonction propargyle : 0,035mmol ; 1 équivalent) sont solubilisés sous agitation dans 3mL de DMSO pendant deux heures. En parallèle, le dextrane azoturé (300mg ; 0,05mmol ; 1,5 équivalent en fonctions azoture) est solubilisé dans 3mL de DMSO. Les deux solutions de polymères sont réunies dans un schlenk, le CuBr est ajouté au mélange (9,4mg ; 0,07mmol ; 2 équivalents) et le volume de la solution est complété à 15mL avec du DMSO. Le

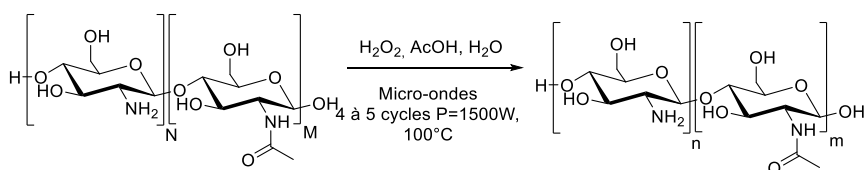
milieu réactionnel est dégazé avec 3 cycles vide – argon. Puis le PMDETA (14 μ L ; 0,07mmol ; 2 équivalents) est ajouté via une seringue Hamilton à travers un bouchon à jupe. Le milieu réactionnel est agité à 40°C pendant 2 jours et demi sous argon et à l’abri de la lumière. En fin de réaction le milieu est dialysé (MWCO 6~8kDa), dans un premier temps contre 500mL de gradient de DMSO/H₂O (3/1 puis 1/1 puis 1/3 v/v), et dans un second temps contre 1L d’eau distillée. Le milieu externe est changé 3 fois par jour pendant 2 semaines. Puis le contenu de la membrane de dialyse est lyophilisé.

IR-TF ν [cm⁻¹] : 3371 ; 2931 ; 1728 (C=O ester); 1643; 1458; 1418; 1362; 1241; 1153; 1102; 1014; 917; 849; 764

RMN ¹H (DMSO-d₆; 300MHz) δ [ppm] : 4,94 (1H ; OH⁴pyranose) ; 4,88 (1H ; OH³pyranose) ; 4,68 (1H ; H¹pyranose) 4,53 (1H ; OH²pyranose) 3,98 (2H ; -CH₂⁽⁵⁾- PCL) ; 3,74 (1H ; H⁶pyranose) 3,62 (1H ; H⁵pyranose) ; 3,42 (1H ; H^{3 ; 6'}pyranose) 3,20 (1H ; H^{2 ; 4}pyranose) 2,27 (2H ; -CH₂⁽¹⁾- PCL) ; 1,52 (4H ; 2*-CH₂^(2&4)- PCL) ; 1,29 (2H ; -CH₂⁽³⁾- PCL)

2.5 Synthèse de PCL-g-CHT

2.5.1 Dépolymérisation du chitosane commercial



12g de chitosane (250 000Da) sont solubilisés dans une solution aqueuse d’acide acétique (582mL d’eau distillée + 6g d’acide acétique) sous agitation mécanique (200RPM) pendant une nuit. 60g de solution d’eau oxygénée à 30% (Perdrogen®) sont ajoutés à la solution de chitosane. Puis la solution est irradiée au microonde (P=1500W ; température de rampe : 100°C en 3 minutes). La solution est ensuite refroidie par agitation dans un bain de glace. L’irradiation et le refroidissement sont appliqués 4 à 5 fois selon le lot de chitosane (4 à 5 cycles de dépolymérisation). Par la suite, la solution de chitosane est précipitée dans 3L d’acétone. Le précipité obtenu est ensuite centrifugé et séché sous vide pendant une nuit. Puis le polymère est solubilisé dans 200mL d’eau distillée, la solution est centrifugée, les oligo-chitosanes hydrosolubles sont lyophilisés et le précipité est séché sous vide.

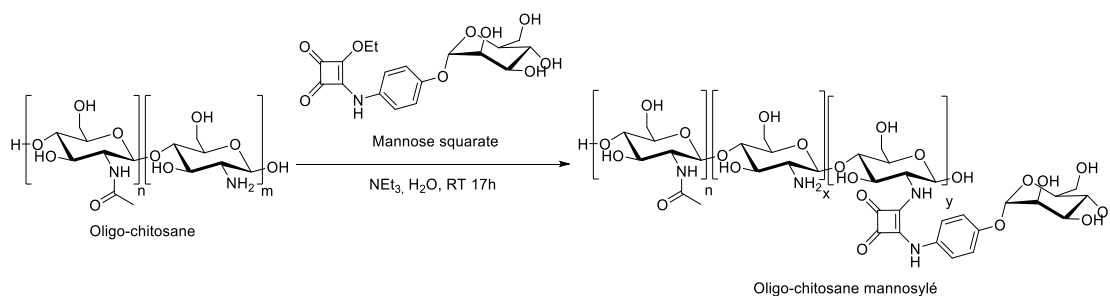
Rendement massique : 25 à 65% selon les lots

IR-TF ν [cm^{-1}] : 3284 (-O-H, -N-H) ; 2866 (-CH₂-, -CH-) ; 1641 (C=O acetamide) ; 1557 ; 1405 ; 1377 ; 1319 ; 1261 ; 1151 ; 1062 ; 1029 (-C-O-) ; 895

RMN ¹H (D₂O; 300MHz) δ [ppm] : 4,62 (1H ; H¹pyranose) ; 3,91 – 3,66 (5H ; H^{3,4,5,6}pyranose) ; 2,90 (1H ; H²pyranose) ; 2,05 (3H ; CH₃acétamide).

GPC_{aq}: \overline{M}_n 1500 à 3500 g/mol; \overline{D} 3,1 à 4,6

2.5.2 Mannosylation d'oligo-chitosane



50mg d'oligo-chitosane sont solubilisés dans 10mL d'eau distillée à 50°C pendant 1h. Une solution de 100mg de mannose squarate dans 15mL d'eau distillée est ajoutée goutte à goutte à la solution d'oligo-chitosane. Puis 35 μ L de triéthylamine sont ajoutées au milieu réactionnel. La solution est laissée sous agitation à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant une nuit. Le milieu réactionnel est précipité dans 300mL d'acétone glaciale et le chitosane précipité est centrifugé. Le polymère est ensuite solubilisé dans 10mL d'eau et la solution est dialysée (MWCO 1kDa) contre 500mL d'eau. Le milieu externe est changé 4 fois sur un jour. Le contenu de la dialyse est ensuite lyophilisé.

Rendement massique : 64%

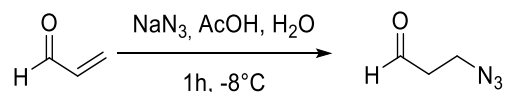
IR-TF ν [cm^{-1}] : 3344 ; 2881 ; 2202 ; 1795 ; 1653 ; 1586 ; 1542 ; 1448 ; 1378 ; 1319 ; 1231 ; 1148 ; 1065 ; 1031 ; 895

RMN ¹H (D₂O; 300MHz) δ [ppm] : 7,28 – 7,18 (4H, H aromatique) ; 3,91 – 3,73 (5H ; H^{3,4,5,6}pyranose) ; 3,17 (1H ; H²pyranose) ; 2,05 (CH₃acétamide)

GPC_{aq}: \overline{M}_n 2900 g/mol; \overline{D} 4,0

2.5.3 Synthèse de PCL-g-CHT par CuAAC

1.1.1. Synthèse du 3-azidopropanal



L'azoture de sodium (17,77mmol, 1,65 équivalents) est dissout dans 6,2mL d'une solution d'acide acétique (1,7mL AcOH + 4,5mL H₂O). Cette solution est ajoutée goutte à goutte à 800μL d'acroléine (10,77mmol, 1 équivalent) refroidie à -6°C. Le milieu réactionnel est agité à -6°C pendant une heure. Le produit est ensuite extrait avec 2*15mL de CH₂Cl₂. Les deux volumes de CH₂Cl₂ sont réunis et lavés avec 15mL d'une solution aqueuse saturée en Na₂CO₃ puis avec 15mL d'eau distillée. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée sur coton et évaporée sous vide à l'évaporateur rotatif. Le 3-azidopropanal est obtenu sous la forme d'un liquide jaune.

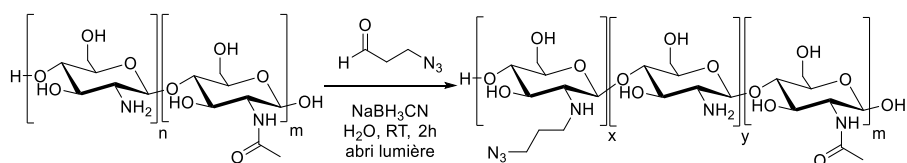
Rendement : 73%

IR-TF ν [cm⁻¹] : 2091(-N₃), 1718 (-CHO).

RMN ¹H (CDCl₃; 300MHz) δ [ppm] : 9.78(t, -CHO), 3.60(t, -CH₂-N₃), 2.73(dt, -CH₂-CHO).

2.5.3.1 Azoturation d'oligo-chitosane par amination réductrice

- Azoturation dans l'eau distillée



400mg d'oligo-chitosane (2,04 mmol d'amine) sont solubilisés dans 130mL d'eau distillée (60°C pendant 45 minutes). Le 3-azidopropanal (nombre d'équivalents variable) est mis en suspension dans 10mL d'eau et est ajouté goutte à goutte à la solution de chitosane. Le cyanoborohydrure de sodium (3 équivalents par rapport au 3-azidopropanal) est solubilisé dans 10mL d'eau et est ajouté goutte à goutte au milieu réactionnel. La solution est agitée 2h à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le milieu réactionnel est concentré à l'évaporateur rotatif et est précipité dans 250mL de Méthanol glacial. Le précipité formé est centrifugé et séché sous vide.

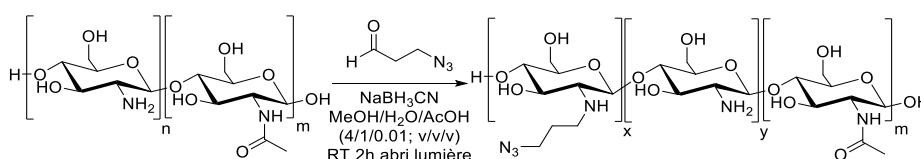
Rendement massique : 30 à 70% selon les lots

IR-TF ν [cm^{-1}] : 3284 ; 2870 ; 2103 ($-\text{N}_3$) ; 1651 ; 1372 ; 1307 ; 1148 ; 1054 ; 1024 ; 892

RMN ^1H (D_2O ; 300MHz) δ [ppm] : 4,55-4,47 (1H; H^1 pyranose) ; 3,92 – 3,40 (6H; $\text{H}^{3,4,5,6}$ pyranose) ; 3,34 (2H; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}_3$) ; 2,88 – 2,54 (2H & 1H; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}_3$ & H^2 pyranose) ; 2,05 (3H; CH_3 acétamide) ; 1,77 (2H; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}_3$)

GPC_{aq}: $\overline{\text{Mn}}$ 1400 à 3500 g/mol; $\overline{\text{D}}$ 2,4 à 3,2

- Azoturation en milieu hydroalcoolique



2g d'oligo-chitosane (10,01 mmol d'amine) sont solubilisés dans 202mL d'une solution aqueuse d'acide acétique (200mL H_2O + 2mL AcOH). 750mL de Méthanol sont ajoutés au milieu réactionnel. Le 3-azidopropanal (nombres d'équivalents variables) est solubilisé dans 2mL de Méthanol et ajouté goutte à goutte à la solution de chitosane. Le cyanoborohydrure de sodium (3 équivalents par rapport au 3-azidopropanal) est également solubilisé dans 2mL de Méthanol et ajouté au milieu réactionnel goutte à goutte. Le volume du milieu est complété à 1L avec du Méthanol et l'ensemble est agité 2h à l'abri de la lumière, puis concentré à l'évaporateur rotatif jusqu'à un volume de 10mL environ. La solution est précipitée dans un mélange de Méthanol et NaOH_{aq} glacial (600mL Méthanol + 2mL de NaOH_{aq} (2M)). Le précipité est centrifugé, resolubilisé dans 10mL de solution aqueuse d'acide acétique (10mL H_2O + 0,1mL AcOH) et de nouveau précipité dans un 602mL de mélange Méthanol + NaOH_{aq} (2M) (600+2mL). Le précipité est centrifugé et séché sous vide.

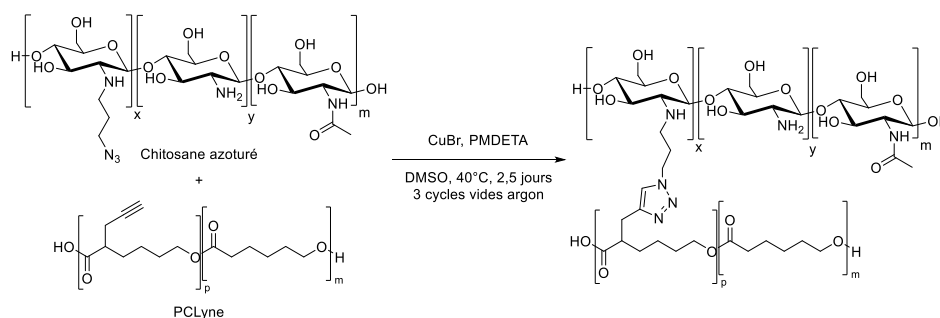
Rendement : 50 à 60% selon les lots.

IR-TF ν [cm^{-1}] : 3283 ; 2867 ; 2098 ($-\text{N}_3$) ; 1628 ; 1546 ; 1401 ; 1312 ; 1261 ; 1150 ; 1059 ; 1021 ; 892

RMN ^1H (D_2O ; 300MHz) δ [ppm] : 4,55-4,47 (1H; H^1 pyranose) ; 3,92 – 3,40 (6H; $\text{H}^{3,4,5,6}$ pyranose) ; 3,34 (2H; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}_3$) ; 2,88 – 2,54 (2H & 1H; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}_3$ & H^2 pyranose) ; 2,05 (3H; CH_3 acétamide) ; 1,77 (2H; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}_3$)

GPC_{aq}: $\overline{\text{Mn}}$ 2100 à 4800 g/mol; $\overline{\text{D}}$ 2,5 à 4,6

2.5.3.2 Couplage de chitosane azoturé sur une PCLyne par CuAAC



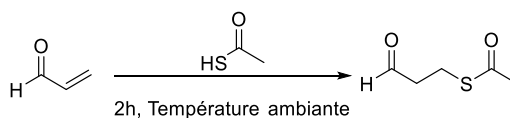
20mg de PCLyne (0,01mmol ; fonction propargyle : 1 équivalent) est solubilisée dans 3mL de DMSO pendant deux heures. En parallèle, le chitosane azoturé (nombre d'équivalents variable) est solubilisé dans 10mL de DMSO. Les deux solutions de polymères sont réunies dans un schlenk, CuBr est ajouté au mélange (2,5mg ; 0,02mmol ; 2 équivalents) et le volume de la solution est complété avec du DMSO. Le milieu réactionnel est dégazé avec 3 cycles vide – argon. Puis le PMDETA (4 μ L ; 0,02mmol ; 2 équivalents) est ajouté via une seringue Hamilton à travers un bouchon à jupe. Le milieu réactionnel est agité à 40°C pendant 2 jours et demi sous argon et à l'abri de la lumière. En fin de réaction le milieu est dialysé (MWCO 6~8kDa), dans un premier temps contre 500mL de gradient de DMSO/H₂O (3/1 puis 1/1 puis 1/3 v/v), dans un second temps contre 500mL de solution aqueuse d'acide acétique (497mL H₂O + 3mL d'AcOH), le milieu externe est changé 3 fois puis les dialyses sont effectuées dans 1L d'eau distillée (3 changements par jour pendant 4 jours). Puis le contenu de la membrane de dialyse est mis à lyophiliser.

IR-TF ν [cm⁻¹] : 3369 ; 2929 ; 2865 ; 2099 (-N₃ résiduel) ; 1730 (C=O ester) ; 1655 (C=O acétamide) ; 1456 ; 1416 ; 1376 ; 1302 ; 1238 ; 1156 ; 1062 ; 1030 ; 896

RMN ¹H (DMSO-d₆; 300MHz) δ [ppm] : 4,82 – 4,35 (Hpyranose); 3,98 (-CH₂⁽⁵⁾⁻); 2,27 (-CH₂⁽¹⁾⁻); 1,82 (CH₃acétamide); 1,52 (2*-CH₂^{(2;4)-}); 1,28 (-CH₂⁽³⁾⁻)

2.5.4 Synthèse de PCL-g-CHT par thiol-yne

2.5.4.1 Synthèse du 3-oxopropylthioacétate



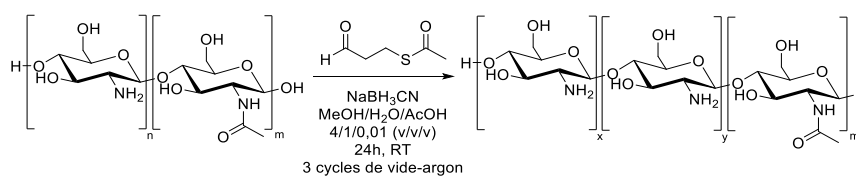
De l'acroléine (7,06mmol) est ajoutée goutte à goutte à 650 μ L d'acide thioacétique (8,90mmol, 1,26 équivalents) sous agitation. Le milieu réactionnel est agité pendant 2h puis ce mélange est solubilisé dans 15mL de CH₂Cl₂ et lavé avec 15mL de Na₂CO₃. La phase aqueuse est ensuite extraite avec 2*15mL de CH₂Cl₂. Les phases organiques sont réunies, lavées avec 15mL de solution aqueuse saturée en NaCl, séchées sur MgSO₄ et filtrées sur coton avant d'être évaporées à l'évaporateur rotatif. Le 3-oxopropylthioacétate est obtenu sous la forme d'un liquide jaune orangé.

Rendement 71%

IR-TF ν [cm⁻¹]: 1721 (-CHO), 1683 (-SCOMe)

RMN ¹H (CDCl₃; 300MHz); δ [ppm] : 9.68 (t, -CHO), 7.26 (s, CHCl₃), 3.04 (t, -CH₂-SCO-), 2.74 (t, -CH₂-CHO), 2.26 (s, -SCO-CH₃)

2.5.4.2 Thioacétylation d'oligo-chitosane par amination réductrice



500mg d'oligo-chitosane (2,50 mmol d'amine) sont solubilisés dans 50,5mL de solution aqueuse d'acide acétique (50mL H₂O + 0,5mL AcOH) et 150mL de Méthanol sont ajoutés au milieu réactionnel. Le 3-OPT (nombre d'équivalents variable) est solubilisé dans 2mL de Méthanol et ajouté goutte à goutte à la solution de chitosane. Le cyanoborohydrure de sodium (3 équivalents par rapport au 3-OPT) est également solubilisé dans 2mL de Méthanol et ajouté au milieu réactionnel goutte à goutte. Le volume du milieu est complété à 250,5mL avec du Méthanol. Ce milieu est dégazé avec 3 cycles de vides – argon. La réaction est laissée sous agitation pendant 24h sous argon, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le milieu réactionnel est concentré à l'évaporateur rotatif et est précipité dans un mélange de Méthanol et NaOH_{aq} glacial (600mL Méthanol + 2mL de NaOH_{aq} (2M)). Puis le précipité est solubilisé dans 20,2mL de solution aqueuse d'acide acétique (20mL H₂O + 0,2mL AcOH). Cette solution est dialysée (MWCO 1kDa) contre 500mL de mélange Méthanol / H₂O / AcOH (4/1/0,01 v/v/v). Le milieu externe est changé 3 fois puis la dialyse est effectuée contre 1L d'eau distillée (nombre de changements : 6). Le contenu de la dialyse est lyophilisé.

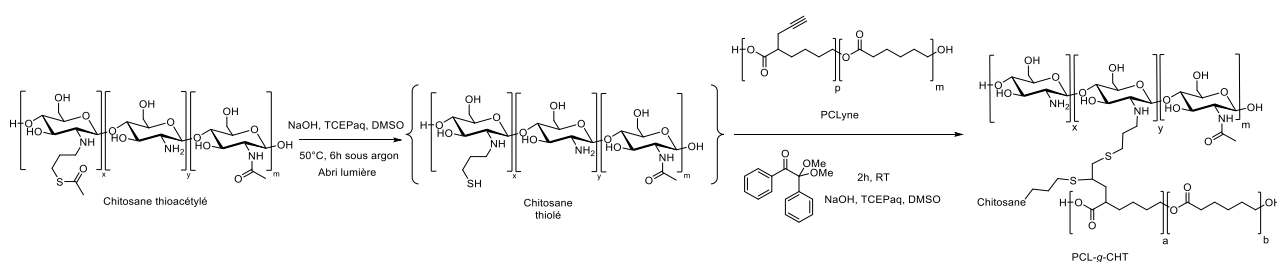
Rendement massique : ~65%

IR-TF ν [cm^{-1}] : 3350 ; 2871 ; 1680 (C=O thioester) ; 1550 ; 1418 ; 1372 ; 1307 ; 1238 ; 1110 ; 1059 ; 1026 ; 958. 898

RMN ^1H (D_2O ; 300MHz) δ [ppm]: 4,56 (1H; H^1 pyranose) ; 3,91 – 3,67 (6H; $\text{H}^{3,4,5,6}$ pyranose) ; 3,48 (2H; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SCOCH}_3$); 3,17 – 2,80 (2H & 1H; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SCOCH}_3$ & H^2 pyranose); 2,37 (3H; $-\text{SCOCH}_3$) ; 2,04 (3H; CH_3 acétamide); 1,85 (2H; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}_3$)

GPCaq : $\overline{\text{Mn}}$ 600 à 900 g/mol; $\overline{\text{D}}$ 1,9 à 2,6

2.5.4.3 Hydrolyse du thioacétate et couplage de chitosane thiolé sur une PCLyne par thiol-yne



- Déprotection des thioesters

200mg de chitosane thioacétylé (thioester : 0,1mmol, 1 équivalent) sont solubilisés dans 6 mL de DMSO (50°C sous argon). Puis 1mL de solution de TCEP (0,5M) et NaOH_{aq} (7,2M, 12 équivalents) sont ajoutés à la solution de chitosane. Le milieu réactionnel est agité 6h à 50°C sous argon.

- Réaction thiol-yne

252mg de PCLyne (0,2mmol, 2 équivalents par rapport aux thioester) sont solubilisés dans 3mL de DMSO puis ajoutés goutte à goutte à la solution de chitosane (formation d'un précipité). Le DMPA (13mg ; 1 équivalent) est solubilisé dans 1mL de DMSO et est ajouté goutte à goutte au milieu réactionnel. Le mélange est irradié sous UV pendant 2h. Par la suite, 2 traitements ont été appliqués pour purifier le copolymère selon le lot de produit :

- Le milieu réactionnel est centrifugé, le filtrat est évaporé, les solides (précipité et solide en suspension) sont séchés à la pompe à palettes.
- Le milieu réactionnel est dialysé (MWCO 1kDa) contre 1L d'eau distillée à l'abri de la lumière. Par la suite, le contenu de la membrane de dialyse est centrifugé, le filtrat est lyophilisé et le précipité séché à la pompe à palettes.

IR-TF ν [cm^{-1}] : 3277 ; 2948 ; 1728 (C=O ester); 1631; 1566; 1394; 1317; 1234; 1159; 1061; 1031; 955; 834

RMN ^1H (DMSO-d_6 ; 300MHz) δ [ppm] : 4,35 – 3,40 (H pyranose); 3,98 ($-\text{CH}_2^{(5)-}$); 2,27 ($-\text{CH}_2^{(1)-}$); 1,82 (CH_3 acétamide); 1,52 ($2^*-\text{CH}_2^{(2;4)-}$); 1,28 ($-\text{CH}_2^{(3)-}$)

3 Études physico-chimiques

3.1 Protocole de nanoprécipitation

20mg de copolymère sont solubilisés dans 2mL de DMSO (agitation 2h à 55°C, à l'abri de la lumière). La solution de copolymère est ensuite ajoutée goutte à goutte *via* un pousse seringue (Q=1mL/min) dans 18mL d'eau distillée agitée à 300RPM. Puis la solution est agitée à 300RPM pendant 2h à température ambiante et à l'abri de la lumière. Cette solution est ensuite dialysée (MWCO 3500Da) contre 1L d'eau distillée pendant un jour et demi (nombre de changements : 10), puis le contenu de la dialyse est filtré sur un filtre 0,45 μm Millipore RC et lyophilisé.

3.2 Protocole de dissolution directe

20mg de copolymère sont solubilisés dans 20mL d'eau distillée. La solution est agitée sous Ultraturax (11 000RPM) pendant 30 minutes puis sous agitation magnétique (700RPM) pendant 1h. La solution est passée aux ultrasons pendant 15 minutes avant d'être filtrée (filtre 0,45 μm Millipore RC) et lyophilisée.

3.3 Préparation des échantillons de DLS

2mg de micelles sont solubilisés dans 20mL de PBS. La solution est agitée à température ambiante pendant 1h à l'abri de la lumière. Puis la solution est filtrée sur un filtre 0,45 μm Millipore RC avant d'être analysée par DLS. Pour les analyses avec du tween 80, 20mg de tween sont ajoutés aux 20mL de solution de micelles. La solution est agitée au vortex puis mise à décanté pendant deux minutes.

3.4 Détermination des valeurs de taux de charge et d'efficacité d'encapsulation des micelles PCL-g-DEX chargées en DOX.

Les valeurs de taux de charge (DL « drug loading ») et d'efficacité d'encapsulation (EE) sont définies par les équations suivantes :

$$\text{DL}(\%) = \frac{\text{Masse de DOX dans les micelles}}{\text{Masse de micelles}} * 100$$

$$EE(\%) = \frac{\text{Masse de DOX dans les micelles}}{\text{Masse initiale de DOX}} * 100$$

Ces valeurs ont été mesurées par spectrophotométrie UV ($\lambda = 480 \text{ nm}$) dans un mélange DMSO/H₂O (4/1 : v/v), le DMSO permettant de détruire les micelles et de s'assurer que l'on quantifie bien la totalité de la DOX encapsulée. La concentration, et donc la masse en DOX été déterminée grâce à une calibration UV ($\lambda_{\text{max}}=480\text{nm}$) (Figure 105) réalisés à partir de solutions de DOX.HCl solubilisée dans le même mélange DMSO/H₂O (4/1 : v/v) .

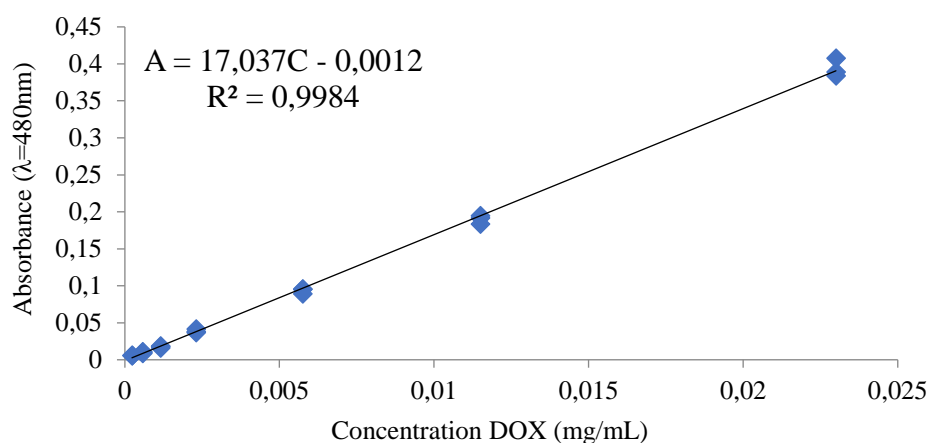


Figure 105 Calibration UV de DOX.HCl dans un mélange DMSO/H₂O (4/1, v/v)

3.5 Étude de la cinétique de libération de doxorubicine des micelles PCL-g-DEX

2mg de micelles chargées en doxorubicine sont solubilisés dans 2mL de tampon PBS (tampon commercial à pH7,4 ou tampon préparé à pH 5,8). La solution est agitée pendant 1h à l'abri de la lumière) puis dialysée (MWCO 3,5kDa) contre 20mL de tampon PBS analogue à celui contenu dans la membrane de dialyse. La solution de dialyse est placée à 37°C, agitée à 180RPM et à l'abri de la lumière. Le milieu externe de la dialyse est régulièrement analysé au spectromètre UV ($\lambda_{\text{max}}=490\text{nm}$) et remplacé par 20mL de tampon PBS analogue pour rester à volume constant. La concentration en DOX dans le milieu externe de chaque étude est déterminée via une calibration de DOX.HCl dans le même tampon que celui de l'étude (Figure 106 et Figure 107). Les analyses UV et les changements de milieu sont effectués au bout de 2h, 4h, 6h, 24h, 48h et 72h après le début de la libération.

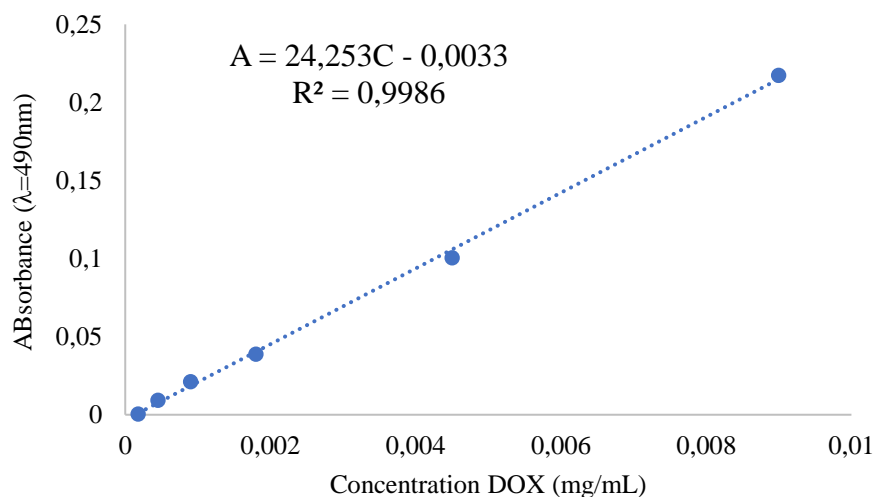


Figure 106 Calibration UV de DOX.HCl dans du PBS (pH7,4)

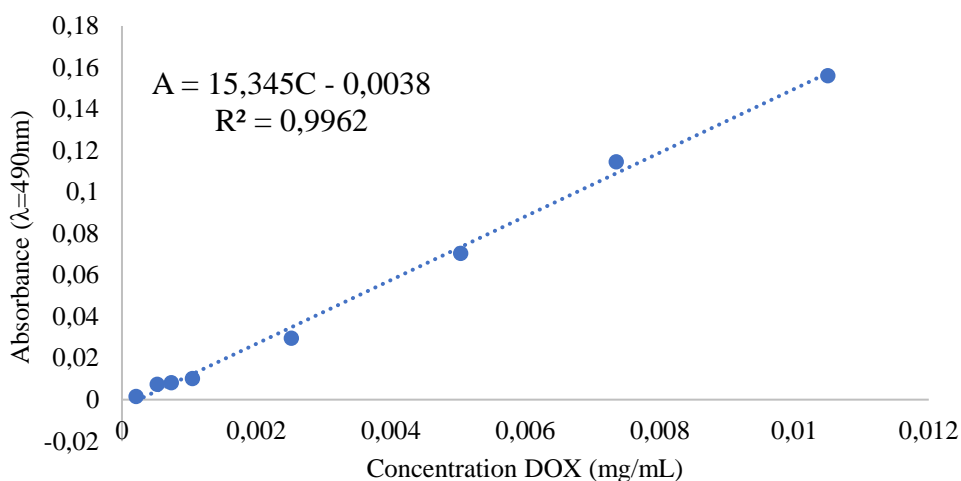


Figure 107 Calibration UV de DOX.HCl dans du PBS (pH5,8)

3.6 Préparation des échantillons pour l'analyse de fluorescence

Les CAC des micelles ont été déterminées par l'analyse du pyrène : une sonde fluorescente hydrophobe incorporée dans les agrégats micellaires. Dans un premier temps plusieurs volumes de solution de pyrène dans l'acétone ($6\mu\text{M}$; 1mL) ont été évaporés pour préparer 9 piluliers contenant 6nmol de pyrène. En parallèle, une solution aqueuse de micelles a été préparée par un protocole de nanopréciipitation similaire à celui décrit précédemment, cependant les micelles ne sont pas lyophilisées en fin de dialyse. 9 solutions de micelles dans l'eau distillée de concentrations connues ont été préparées par dilution (concentration de 10^{-4}g/L à 1g/L). Chaque solution est mélangée avec 6 nmol de pyrène et agitée pendant 3h. Par la suite les solutions sont filtrées sur un filtre $0,45\mu\text{m}$ Millipore RC et sont placées dans un bain à ultrason pendant 15 minutes. Puis les échantillons sont analysés au spectromètre de fluorescence.

4 Etudes biologiques

4.1 Etudes de cytotoxicité

Les études de cytotoxicité MTT ont permis de mesurer la mort cellulaire. La veille de la transfection, 2000 cellules sontensemencées dans une plaque 96 puits avec 200 μ L de milieu de culture cellulaire. 24h après l'ensemencement, les composés (DOX, N-O(PCL-g-DEX) vides ou chargés en DOX) sont ajoutés au milieu de culture avec des concentration allant de 0 à 150 μ g/mL. Les milieux de culture sont incubés pendant 24h. Après cette période d'incubation, les cellules sont traitées pendant 4h avec 0,5mg/mL de MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Promega). La solution du milieu de culture est ensuite éliminée et les cristaux de formazan précipités sont dissouts dans un mélange EtOH/DMSO (1 :1). L'absorbance de la solution est mesurée à $\lambda=540$ nm.

4.2 Etudes d'internalisation cellulaire et cytométrie en flux

L'internalisation des micelles fluorescentes N-O(PCL-g-DEX(FITC)) dans les cellules cancéreuses HCT-116 et les fibroblastes CCD-45SK a été observée par microscopie confocale. La veille de l'expérience, les cellules sontensemencées dans une boîte de Pétri en verre (World Precision Instrument, Stevenage, UK) avec une densité de 10⁶ cellules/cm². Les cellules fixées ont ensuite été lavées et incubées dans 1mL de milieu de culture cellulaire contenant les N-O(PCL-g-DEX(FITC)) à une concentration de 50 μ g/mL pendant 20h. 15 minutes avant la fin de la période d'incubation, les cellules ont été déposées sur une membrane plasmique teintée CellMaskTM (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) avec une concentration finale de 5 μ g/mL. Avant l'observation, les cellules ont été lavées doucement avec un milieu Moy's 5a. Les cellules ont ensuite été visualisées avec microscope confocale LSM 780 LIVE (Carl Zeiss, Le Pecq, France) 488nm avec un grossissement 63x/1,4 OIL DIC Plan-Apo.

L'internalisation des micelles N-O(PCL-g-DEX(FITC)) a été quantifiée par cytométrie en flux. Les cellules ont été traitées ou non avec 50 μ g/mL de micelles N-O(PCL-g-DEX(FITC)) pendant 1, 3, 6 et 24h. Après le traitement, les cellules traitées et les cellules témoins ont été lavées avec du tampons PBS froid, récoltées et centrifugées (1300RPM, 5 minutes). Les cellules ont ensuite été remise en solution dans un tampon PBS enrichit en CaCl²⁺, MgCl²⁺ et teinté avec de l'iodure de propidium (1 μ g/mL) (Sigma-Aldrich Chimie, Lyon, France), un indicateur de mort cellulaire. La quantification du nombre de cellules vivantes contenant des micelles par cytométrie en flux a été effectuée avec un cytomètre FACS CytoFlex Flow (Beckman Coulter, France) avec au minimum 5000 cellules vivantes collectées.

Nouveaux systèmes copolymères amphiphiles biodégradables pour la délivrance de principes actifs anticancéreux

Ce travail présente la synthèse de copolymères amphiphiles biocompatibles et biodégradables pour la formation de systèmes de libération d'agents anticancéreux. Ces copolymères sont composés d'une chaîne de poly-(ϵ -caprolactone) (PCL), un polyester hydrophobe biocompatible et biodégradable, sur laquelle sont greffés des chaînes hydrophiles d'oligomères de dextrane ou de chitosane. Ces nouvelles structures copolymères sont dites « inverses », les structures « classiques » étant constituées d'une chaîne polysaccharide avec des greffons PCL. La chaîne de PCL a été propargylée *via* une méthode anionique développée par notre équipe, tandis que les oligosaccharides ont été azoturés en extrémité de chaîne sur le dextrane, mais le long de sa chaîne sur le chitosane grâce à la présence de ses fonctions amines. Les copolymères ont été obtenus par couplage « clic » CuAAC entre PCL propargylée et oligosaccharides azoturés. Dans le cas du chitosane, les amines de la chaîne permettent i) le couplage de mannose squarate, un agent de ciblage de cellules cancéreuses et ii) une fonctionnalisation sous forme de thiol qui permet un couplage par réaction thiol-yne sur la PCL propargylée. Ces copolymères donnent des nano-objets en milieu aqueux qui, dans le cas du PCL-g-dextrane, sont sous forme de micelles qui encapsulent de la doxorubicine dont la libération est pH dépendante. Des études biologiques ont montré que ces micelles chargées sont toxiques essentiellement pour les cellules cancéreuses et qu'elles sont préférentiellement internalisées par les cellules cancéreuses. Ces résultats démontrent une grande sélectivité d'action vis-à-vis des cellules tumorales.

Mots-clés : Copolymères greffés amphiphiles, poly ϵ -caprolactone, dextrane, chitosane, micelles biodégradables, libération de doxorubicine, thérapie anti-cancer.

New amphiphilic biodegradable copolymer systems for anticancer agents delivery

This work presents the synthesis of biocompatible and biodegradable amphiphilic copolymers for the formation of anticancer drug delivery systems. These copolymers consist of a poly-(ϵ -caprolactone) (PCL) chain, a biocompatible and biodegradable hydrophobic polyester, on which hydrophilic oligomers of dextrane or chitosane are grafted. These new copolymer structures are called “reverse” structures, the “classic” ones being made of a polysaccharide chain with PCL grafts. The PCL chain was propargylated via an anionic method developed by our team, while azide functions were grafted on oligosaccharides at a chain end of dextrane, but along the chain in chitosan, thanks to its amine functions. Copolymers were obtained by CuAAC click coupling between the activated PCL and oligosaccharides. In the case of chitosan, the amines of the chain allowed the coupling of mannose squarate, a cancer cell targeting agent, as well as a functionalization in the form of thiols which allow coupling by thiol-yne reaction on propargylated PCL. These copolymers form nano-objects in aqueous media which, in the case of the PCL-g-dextrane structure, are forming micelles that encapsulate doxorubicin, which is further released in a pH-dependent way. Biological studies have shown that these charged micelles are toxic to cancer cells and not to healthy cells and are preferentially internalized by cancer cells. These results demonstrate a high degree of selectivity of action against tumor cells.

Key words: amphiphilic graft copolymers, Poly(ϵ -caprolactone), dextran, chitosan, biodegradable micelles, doxorubicin delivery, anti-cancer therapy.