



HAL
open science

Conception et évaluation de nanoparticules auto-assemblées à base de copolymères à blocs bioactifs et thermosensibles pour des applications anticancéreuses

Manon Levêque

► To cite this version:

Manon Levêque. Conception et évaluation de nanoparticules auto-assemblées à base de copolymères à blocs bioactifs et thermosensibles pour des applications anticancéreuses. Polymères. Université de Bordeaux, 2022. Français. NNT : 2022BORD0040 . tel-03875828

HAL Id: tel-03875828

<https://theses.hal.science/tel-03875828>

Submitted on 28 Nov 2022

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 PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
SPÉCIALITÉ POLYMÈRES

Par Manon LEVÊQUE

**Conception et évaluation de nanoparticules auto-assemblées
à base de copolymères à blocs bioactifs et thermosensibles
pour des applications anticancéreuses**

Sous la direction de : Prof. Sébastien LECOMMANDOUX
Co-directrice : Dr. Élisabeth GARANGER

Soutenue le 11 Février 2022

Membres du jury :

Mme RAVAINÉ, Valérie	Professeure, Bordeaux INP	Présidente
M. NOTTELET, Benjamin	Professeur, Université de Montpellier	Rapporteur
M. TSAPIS, Nicolas	Directeur de Recherche, CNRS, Institut Galien, Paris	Rapporteur
Mme HURBIN, Amandine	Chargée de recherche, INSERM, IAB, Grenoble	Examinatrice
M. LECOMMANDOUX, Sébastien	Professeur, Bordeaux INP	Directeur de thèse
Mme GARANGER, Élisabeth	Chargée de recherche, CNRS, LCPO, Bordeaux	Directrice de thèse

A mes grands-parents,

A ma famille,

*“Le plus sûr soutien est celui que l’on trouve chez ses proches.”
Confusius*

*“Ce n'est pas tant l'intervention de nos amis qui nous aide
mais le fait de savoir que nous pourrons toujours compter sur eux.”
Epicure*

*“The optimist sees the glass half full.
The pessimist sees the glass half empty.
The chemist sees the glass completely full,
half in liquid state and half gaseous,
both of which are probably poisonous.”
Weike Wang, Chemistry*

REMERCIEMENTS

« La thèse, c'est devenir un expert mondial d'une question que l'on est le seul à se poser. »
Si le travail de thèse se concentre effectivement sur un projet spécifique, mené en autonomie, il n'est pour autant pas réalisé seul. L'aide, les conseils et le soutien de nombreuses personnes font partie intégrante du doctorat, au même titre que les expérimentations. Je souhaite donc remercier ici toutes les personnes qui ont rendu cette thèse possible.

Avant toute chose, je souhaiterais remercier les membres de mon jury : Prof. Benjamin Nottelet, Dr. Nicolas Tsapis, Prof. Valérie Ravaine et Dr. Amandine Hurbin. Merci d'avoir accepté d'évaluer mon travail et de vous être déplacés malgré les conditions sanitaires incertaines. Recevoir un manuscrit de 300 pages juste avant les fêtes de fin d'année n'était certes pas un excellent cadeau de Noël... Je suis ravie que vous ne m'en ayez pas tenu rigueur. Je vous remercie également pour la qualité de la discussion que nous avons pu avoir lors de cette soutenance, vos remarques et conseils vont nous permettre d'améliorer encore ce projet pour le porter plus loin. Je vous remercie enfin pour votre bienveillance, qui a su me mettre à l'aise et faire de cet évènement stressant un moment agréable.

Je souhaiterais remercier le Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques pour m'avoir permis de faire cette thèse en son sein, ainsi que l'Université de Bordeaux et le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI) pour son financement à travers l'attribution d'une bourse doctorale au mérite.

Je voudrais remercier mes deux directeurs, Prof. Sébastien Lecommandoux et Dr. Elisabeth Garanger pour m'avoir encadrée et guidée durant ces 3 ans et demi.

Merci Sébastien pour la confiance et le temps que tu m'as accordés, ainsi que pour ton expertise et tes conseils, tant sur le plan scientifique que sur ma poursuite de carrière. Ils m'ont permis de grandir professionnellement, de gagner en autonomie, et me seront très utiles pour la suite, j'en suis certaine. En tant que directeur du LCPO, merci d'avoir assuré la gestion de la crise sanitaire de telle façon que le travail de tous a pu se poursuivre au laboratoire dans les meilleures conditions possibles. Le maintien de l'activité et du lien social a été fondamental dans cette période de troubles et tu nous les as garanti dans la plus grande sécurité.

Merci Elisabeth d'avoir été présente au quotidien, et d'avoir supporté sans (trop) te plaindre que je vienne régulièrement te déranger pour "juste une petite question". Merci du temps que tu m'as consacré, tant pour m'expliquer les obscures arcanes de la science que pour me soutenir dans les moments difficiles. Ton accessibilité, professionnelle et personnelle, permet de prendre confiance en ses capacités et de faire ses premiers pas de chercheur, tout en sachant que l'aide n'est pas loin en cas de besoin. Ta bonne humeur, ton dynamisme et ton investissement au laboratoire font de toi un membre précieux de cette équipe. Je suis fière d'être ta première thésarde "officielle", et je suis certaine que ceux qui suivront seront heureux de t'avoir pour directrice.

Je voudrais également remercier toutes les personnes qui ont collaboré à ce projet, lui permettant d'aller bien plus loin que mes seules compétences n'auraient permis. Merci donc à Mme Laetitia Vanwonderghem Falcon et au Dr. Amandine Hurbin de l'IAB à Grenoble pour toutes les expériences *in vitro* sur cellules, à Mme Laetitia Minder et au Dr. Carmelo Di Primo de l'IECB à Bordeaux pour les analyses par SPR, et aux Dr. Avijit Kumar Das et Prof. Nathan McClenaghan de l'ISM à Bordeaux pour la synthèse de la sonde de PDT et pour les expériences préliminaires d'oxydation par irradiation. Merci à tous du temps que vous m'avez accordé et de toutes les connaissances que vous m'avez enseignées. La découverte de ces nouvelles techniques m'a enchantée et permis de faire le lien avec les applications biologiques, qui étaient pour moi essentielles.

Au-delà du projet en lui-même, je souhaiterais remercier les membres du LCPO qui m'ont entourée durant ces années de thèse.

Merci à Mme Dominique Richard, M. Claude Le Pierres, Mme Corinne Gonçalves de Carvalho et Mme Séverine Saint-Drenant pour avoir effectué les démarches administratives et m'avoir prêté main forte pour l'envoi d'échantillons à Grenoble. Merci également à toutes les personnes m'ayant apporté une aide technique. En particulier, merci à Anne-Laure de m'avoir formée à l'utilisation de la RMN Prodigy et d'avoir été disponible malgré un emploi du temps plus que chargé, à Amélie et Sylvain pour votre aide en SEC, à Cédric pour la formation à la TGA, à Emmanuel pour les analyses sur le confocal, et à Paul pour les longues heures passées sur l'ALV. Merci encore à Sylvain et à ceux qui font tourner ce laboratoire et qui nous permettent de travailler dans de bonnes conditions : tous les AP, Frédérique Ham-Pichavant, Joan Vignolle, Nina, Loïc, etc.

Merci également à M. Espagnet pour tout le temps passé sur la réparation de ce cher lyophilisateur et pour sa réactivité lors des pannes.

Merci à tous les membres du LCPO, permanents et non-permanents, qui m'ont apporté leur aide, qu'elle ait été technique ou morale. Je remercie particulièrement tous ceux avec qui j'ai pu partager des moments agréables au LCPO ou en dehors, et qui remplissent cette période de bons souvenirs : Hanaé, Valentin, Quentin, Anderson, Peter, Chloé, Margaux, Péroline, Victor, Manon, Nicolas, Pauline, Fiona, David, Elodie, Imane, Thaïssa, Samir, Solène, Guillaume (x2), Dijwar, Charles, Simon, Assia, Corentin, et tous les autres.

Une thèse ne serait pas une thèse sans une équipe pour nous soutenir et nous faire rire au quotidien. Un grand merci à toute l'équipe 3 "Poly4Life". Merci à tous ses membres permanents, pour votre aide et ce que vous m'avez enseigné. En l'occurrence, merci à Olivier pour l'aide sur l'irradiation laser (et pour le lien avec l'ESPCI), et à Christophe pour tout ce qui concerne la diffusion de la lumière (et pour les pots de compotes, parfaits pour les dialyses). Merci également à Colin, Angela, et Jeff pour votre implication dans la vie du laboratoire et pour les discussions très instructives que l'on a pu partager. Un merci particulier pour Bertrand, Guillaume, et toute la "team ELP". Merci de m'avoir appris la production recombinante, de m'avoir fourni tout le matériel et l'aide nécessaire, et d'avoir pris la relève. Merci Bertrand pour ta gentillesse, ta bienveillance, et pour les discussions passionnantes sur la science ou l'actualité.

Un immense merci à tous mes compagnons de labo pour avoir partagé ces 3 années et demi de hauts, de bas, de succès, d'échecs, et de pannes du lyoph : Ye, Sophie, Coralie, Marie (x2), Michèle, Guillaume, Louis, Vusala, Vangelis, Esra, Hang, Monica, Julien, Chloé, Martin, Tim, Léa, Flavia, Pedro, Florian, Anouk, Megi, Tingting, Pierre, Nadia, Diana, Pablo, Marie, Matthieu, Romane, Vaiana, Mostafa, Clémence, Fanny, Sifan, Leslie, Ségolène, Elise, Hannah, Eloïse, Dong Shu... Merci aux anciens de m'avoir si bien intégrée dans ce qui tenait plus de la famille que de l'équipe. Merci pour vos conseils et votre soutien. Merci à tous pour les super moments que l'on a passé ensemble, pour les gâteaux du vendredi, et aussi pour avoir supporté la playlist musicale du N2-19.

Merci en particulier à Ye pour m'avoir tout appris sur ce projet, pour m'avoir fait confiance pour prendre la relève, et pour avoir synthétisé des composés qui ont duré toute ma thèse. Merci Coralie, Marie, Tim et Martin pour votre aide et vos conseils avisés. Merci Megi pour cette gentillesse et cette douceur absolues qui te caractérisent et qui sont capables d'apaiser les pires moments de déprime. Merci Anouk pour ton dynamisme, ton enthousiasme, tes créations culinaires, et surtout pour ton sens aigu du collectif qui mérite des éloges. Merci Diana, Pedro et Pablo, pour votre bonne humeur contagieuse, pour votre soutien, et pour les sorties découvertes. Merci Nadia, Michelle, Marie, Leslie et Tingting pour s'être serré les coudes dans l'adversité face aux ELPs.

Une pensée chaleureuse également pour les étudiants étrangers invités et pour les stagiaires qui sont passés dans cette équipe, en particulier pour celles que j'ai eu le plaisir d'encadrer : Clara, Chloé, Laura, et Louise. Merci les filles pour votre travail, votre investissement, et votre aide sur la production des ELPs, le début de la SPAAC, et la détermination des CMC/CMT par fluo, entre autre.

Enfin, je voudrais remercier ce groupe qui a porté plusieurs noms au cours du temps : la Geek Team, le Check de Pattounes, les Board Gamers etc... Merci notamment à Christopher pour les rocks endiablés et les soirées karaoké. Merci Martin et Quentin pour m'avoir fait rire aux larmes. Merci aussi à Sylvain, Cédric, Florian B., Jamie, et Greg. Merci à Boris, pour son soutien dans les coups durs et ses anecdotes invraisemblables mais toujours désopilantes. Merci également aux membres de ce bureau du NO qui m'a servi de refuge toutes ces années, dont Clémence, Laurine, et les petites nouvelles Maëva et Lou. Merci pour votre accueil, votre compassion, et tous les bons moments passés ensemble.

Merci enfin à ceux qui ont constitué ma garde rapprochée, mes soutiens de tous les instants : Flo, Anne, Jerem, et Jessie. Merci pour ces heures interminables de fous rires, de jeux, de puzzles, de balades, de plaids, de cocktails et de tisanes, de conversations plus absurdes les unes que les autres, et de piques avant même d'avoir dit bonjour. Merci d'avoir été là, de m'avoir accompagnée dans mes moments de joie, de m'avoir suivie dans mes délires, et de m'avoir soutenue dans les moments les plus sombres, quand je n'arrivais plus à m'en sortir seule. Cette thèse c'est en partie à vous que je la dois, sans vous je n'en serais pas là aujourd'hui. Bientôt nous serons tous dispersés à travers la France, mais je sais que je n'oublierai jamais tous ces moments partagés. Cette fin de thèse n'est pas un adieu, parce que je sais qu'on se retrouvera, où qu'on aille, et que nos retrouvailles seront aussi joyeuses (et incohérentes) que si l'on s'était quittés la veille. Alors à bientôt pour de nouvelles aventures !

Bien qu'il ait occupé une part importante de ma vie, le LCPO n'est cependant pas tout. Je voudrais donc remercier tous les autres amis qui m'ont soutenue : parfois sur place comme les "Jules-de-chez-Smith-en-face" du Nsysa : Alice, Arianna et Gerry, mais le plus souvent à distance : mes amis de l'ESPCI, de CPI, et d'enfance. Merci d'être toujours là malgré le temps qui passe et la distance qui s'installe. Merci Sandrine et Juju pour votre soutien infailible et pour me tirer la tête hors du labo régulièrement. Merci les Julien(s), Caro et Valou, vous revoir m'a fait immensément plaisir. Merci Lucile de me supporter depuis la maternelle et d'être toujours là malgré tout, en toutes circonstances (même quand il s'agit de passer des heures dans un amphi à m'écouter raconter du charabia incompréhensible).

Enfin, je voudrais dédier cette thèse à mes grands-parents, dont la fierté à l'idée que je devienne docteure m'a permis de tenir et d'achever cette thèse. Je la dédie à ma famille, sans qui je ne serais pas là, sans qui je ne serai pas moi. Je la dédie à mes parents et à ma sœur Miléna pour m'avoir soutenue contre vents et marées, malgré la distance, malgré la difficulté, malgré le deuil, et m'avoir fait comprendre que la thèse n'était pas ma vie, que d'autres voies étaient possibles et que vous seriez toujours là quels que soient mes choix. Merci pour tout, et plus encore.

D'après Louis Chedid, « on ne dit jamais assez aux gens qu'on aime qu'on les aime ». Je profite donc de ces quelques lignes pour le faire.

Merci du fond du cœur,
Avec tout mon amour et toute mon affection,
Manon

TABLE DES MATIÈRES

Liste des abréviations	5
Notations	7
Introduction générale	8
Chapitre I : Revue Bibliographique	11
I.A. Les "Elastin-like Polypeptides" (ELPs) : des polymères bioinspirés au service de la nanomédecine.....	14
I.A.1. Les ELPs : des polymères bioinspirés	14
I.A.1.1. Élastine & tropoélastine.....	14
I.A.1.2. Définition et production des ELPs.....	16
I.A.1.3. Biocompatibilité & devenir dans l'organisme.....	19
I.A.2. Les ELPs : des polymères thermosensibles à LCST.....	21
I.A.2.1. Thermosensibilité : définition et mécanisme.....	21
I.A.2.2. Modulation de la température de transition (T_{cp})	24
<i>I.A.2.2.1. Paramètres macromoléculaires</i>	<i>24</i>
<i>I.A.2.2.2. Paramètres environnementaux.....</i>	<i>26</i>
<i>I.A.2.2.3. Post-modifications des ELPs</i>	<i>28</i>
I.A.3. Utilisation des ELPs dans la nanomédecine pour la lutte contre le cancer	32
I.A.3.1. Nanovectorisation d'actifs et effet EPR	32
I.A.3.2. Les ELPs au service de la nanomédecine anticancéreuse	33
<i>I.A.3.2.1. Bioconjugués ELP-Principe Actif.....</i>	<i>34</i>
<i>I.A.3.2.2. Diblocs d'ELP</i>	<i>35</i>
<i>I.A.3.2.3. Copolymères hybrides à base d'ELPs.....</i>	<i>37</i>
<i>I.A.3.2.4. L'hyperthermie locale pour l'amélioration des traitements.....</i>	<i>40</i>
I.B. Le hyaluronane et le récepteur CD44 : pour un ciblage actif des tumeurs.....	45
I.B.1. Le hyaluronane : une molécule naturelle primordiale	45
I.B.1.1. Origine et généralités.....	45
<i>I.B.1.1.1. Structure.....</i>	<i>45</i>
<i>I.B.1.1.2. Un peu d'Histoire.....</i>	<i>46</i>
<i>I.B.1.1.3. Production et élimination</i>	<i>46</i>
I.B.1.2. De multiples fonctions biologiques.....	47
I.B.1.3. Les hyaladherines.....	48
I.B.1.4. Principal récepteur du hyaluronane : le CD44	51
<i>I.B.1.4.1. Structure biologique</i>	<i>51</i>
<i>I.B.1.4.2. Isoformes.....</i>	<i>52</i>
<i>I.B.1.4.3. Fonctions biologiques.....</i>	<i>53</i>
I.B.2. L'interaction HA-CD44 et le cancer	54

I.B.2.1. Mécanismes d'interaction entre HA et CD44.....	54
<i>I.B.2.1.1. Interaction HA-CD44.....</i>	<i>54</i>
<i>I.B.2.1.2. Multivalence.....</i>	<i>54</i>
<i>I.B.2.1.3. Affinité versus Avidité.....</i>	<i>57</i>
I.B.2.2. HA et CD44 promeuvent le cancer.....	59
<i>I.B.2.2.1. Influence du HA.....</i>	<i>59</i>
<i>I.B.2.2.2. Influence du CD44.....</i>	<i>60</i>
<i>I.B.2.2.3. Cellules souches cancéreuses (CSCs).....</i>	<i>61</i>
I.B.2.3. Le ciblage actif du CD44 par le HA comme appui aux thérapies anticancéreuses.....	63
<i>I.B.2.3.1. Utilité du HA dans la conception d'un système de vectorisation.....</i>	<i>63</i>
<i>I.B.2.3.2. Prodrogues & bioconjugués.....</i>	<i>64</i>
<i>I.B.2.3.3. Le HA dans les systèmes de vectorisation.....</i>	<i>66</i>
<i>I.B.2.3.4. Les nanovecteurs HA-polypeptides.....</i>	<i>70</i>
Conclusion.....	73
Références.....	74
Chapitre II : Élaboration d'une librairie de bioconjugués HA-<i>b</i>-ELP : synthèse et caractérisation.....	99
Introduction.....	101
II.A. Bioproduction et caractérisation des segments ELPs.....	103
II.A.1. Production recombinante des ELP60, ELPn80, et ELPn100.....	103
II.A.2. Caractérisation chimique des ELPn60, ELPn80, et ELPn100.....	105
II.A.3. Caractérisation de la thermosensibilité des ELPs.....	108
II.B. Synthèse de bioconjugués HA-<i>b</i>-ELP par chimie click.....	111
II.B.1. Fonctionnalisation des blocs HA et ELP.....	111
II.B.1.1. Fonctionnalisation de l'extrémité réductrice du HA.....	111
II.B.1.2. Fonctionnalisation de l'extrémité N-terminale de l'ELP.....	113
<i>II.B.1.2.1. Fonctionnalisation par une fonction alcyne aliphatique.....</i>	<i>113</i>
<i>II.B.1.2.2. Fonctionnalisation par une fonction cyclooctyne (DBCO).....</i>	<i>114</i>
II.B.2. Couplage par cycloaddition : comparaison de la CuAAC et de la SPAAC.....	116
II.B.2.1. Synthèse originelle : Cycloaddition Alcyne-Azoture catalysée au Cuivre (CuAAC)....	116
II.B.2.2. Synthèse par chimie "click" sans cuivre : utilisation de la tension de cycle pour favoriser la réaction (SPAAC).....	120
II.B.2.3. Comparaison des deux voies de synthèse CuAAC et SPAAC.....	122
II.B.3. Élaboration d'une librairie de bioconjugués.....	122
Conclusion.....	124
Partie expérimentale.....	125
Annexes.....	132
Références.....	140

Chapitre III : Du copolymère thermosensible à la nanoparticule : étude de l'auto-assemblage de bioconjugués HA-<i>b</i>-ELP.....	143
Introduction	145
III.A. Un auto-assemblage réversible contrôlé	148
III.A.1. Température Critique de Micellisation (CMT).....	148
III.A.1.1. Détermination par diffusion dynamique de la lumière (DLS)	148
III.A.1.2. Détermination par spectroscopie de fluorescence.....	154
III.A.2. Concentration Critique de Micellisation (CMC).....	159
III.A.3. Réversibilité.....	162
III.B. Caractérisation physico-chimique des nanoparticules	163
III.B.1. Mesure du diamètre hydrodynamique	163
III.B.2. Stabilité dans le temps.....	168
III.B.3. Potentiel Zêta	170
III.B.4. Microscopie Électronique en Transmission (TEM)	171
Conclusion.....	172
Partie expérimentale.....	174
Annexes	176
Références	189
Chapitre IV : Évaluation biologique des nanoparticules de bioconjugués HA-<i>b</i>-ELP	191
Introduction	193
IV.A. Adaptation du système à une évaluation biologique.....	195
IV.A.1. Amélioration de la stabilité par réticulation du cœur ELP.....	195
<i>IV.A.1.1. Fonctionnalisation chimiosélective des méthionines de l'ELP.....</i>	<i>195</i>
<i>IV.A.1.2. Réticulation des nanoparticules auto-assemblées.....</i>	<i>198</i>
IV.A.1.2.1. Synthèse et thermosensibilité	198
IV.A.1.2.2. Caractérisation physicochimique des nanoparticules réticulées	201
IV.A.2. Conjugaison de sondes de fluorescence	205
<i>IV.A.2.1. Stratégie de synthèse.....</i>	<i>205</i>
<i>IV.A.2.2. Caractérisation chimique</i>	<i>208</i>
<i>IV.A.2.3. Synthèse des bioconjugués HA-ELP-fluorophore.....</i>	<i>212</i>
IV.B. Étude à l'échelle du récepteur par SPR.....	215
IV.B.1. Principe	215
IV.B.2. Résultats.....	218
<i>IV.B.2.1. Nanoparticules non réticulées sur puce CM5 (NH₂)</i>	<i>219</i>
<i>IV.B.2.2. Nanoparticules réticulées sur puce CM5 (NH₂)</i>	<i>221</i>
<i>IV.B.2.3. Nanoparticules réticulées sur puce NTA (Ni²⁺)</i>	<i>225</i>

IV.C. Étude à l'échelle de la cellule : expériences <i>in vitro</i>	228
IV.C.1. Travail préliminaire	228
IV.C.2. Étude d'affinité et de spécificité	229
IV.C.2.1. Nanoparticules non réticulées.....	229
IV.C.2.1. Nanoparticules réticulées.....	230
IV.C.3. Étude cytotoxicologique	234
Conclusion.....	235
Partie expérimentale.....	237
Annexes	244
Références	268
Chapitre V : De la nanoparticule au nanovecteur anticancéreux : utilisation de bioconjugués HA-<i>b</i>-ELP pour des applications de thérapie photodynamique	269
Introduction	271
VI.A. Synthèse d'un bioconjugué HA-ELPn80 cytotoxique.....	273
VI.A.1. Conjugaison de l'ELPn80 avec un photosensibilisateur.....	273
VI.A.2. Synthèse de bioconjugués HA-ELPn80-PS.....	274
VI.B. Génération de ROS sous irradiation	277
Conclusion.....	282
Partie expérimentale.....	283
Annexes	286
Références	287
Conclusion générale et Perspectives.....	288

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AcOH	Acide acétique
AFM	Microscopie à force atomique
APDC	Ammonium pyrrolidine dithiocarbamate
ATRP	Polymérisation radicalaire par transfert d'atomes
Bodipy	Borondipyrrrométhène
CD44	Cluster de différenciation 44
CMC / CMT	Concentration / Température micellaire critique
CSC	Cellule souche cancéreuse
CuAAC	Cycloaddition alcyne-azoture catalysée au cuivre
DDS	Nanovecteur de principes actifs (drug delivery system)
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamine
DLS / SLS	Diffusion dynamique / statique de la lumière
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOX	Doxorubicine
DPH	Diphenhydramine
DTX	Docetaxel
ECM	Matrice extracellulaire
EDC	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EGFR	Récepteur épithélial de facteurs de croissance
ELP	Polypeptide d'élastine (elastin-like polypeptide)
EMT	Transition épithéliomésenchymateuse
EPBz	Epoxypropyl benzène
EPR	Enhanced permeability and retention
EtOH	Ethanol
fluo	Fluorophore
GEM	Gemcitabine
GSH	Glutathion
HA / oHA	Hyaluronane / Hyaluronane de bas poids moléculaire (oligohyaluronan)
HBTU	N,N,N',N'-Tetraméthyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate
HFIP	Hexafluoroisopropanol
ITC	Inverse transition cycling

LCST / UCST	Température critique minimale / maximale de solubilité
MALDI	Ionisation par désorption laser assistée par matrice
MeOH	Méthanol
Na Asc	Ascorbate de sodium
NHS	N-hydroxysuccinimide
NSCLC	Cancer du poumon non-à-petites-cellules
PBLG	Poly(benzyl-L-glutamate)
PBS	Tampon phosphate salin
PDT	Thérapie Photodynamique
PEG	Poly(éthylène glycol)
PMDETA	N,N,N',N'',N''-Pentamethyldiethylenetriamine
PNIPAM	Poly(N-isopropylacrylamide)
PS	Photosensibilisateur, générateur de ROS
PSM	Poste de sécurité microbiologique
PTMC	Poly(triméthylène carbonate)
PTX	Paclitaxel
RAFT	Polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible (Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer)
RDL	Ligation récursive directionnelle
rhod	Rhodamine
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROP	Polymérisation par ouverture de cycle
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SDS-PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique
SPAAC	Cycloaddition alcyne-azoture favorisé par tension de cycle
SPR	Résonance de plasmon de surface
Tamb	Température ambiante
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamine
TBTA	Tris((1-benzyl-4-triazolyl)methyl)amine
T _{cp} / T _t	Température de point de trouble / Température de transition
TEM	Microscopie électronique par transmission
TGA	Analyse thermogravimétrique
THF	Tétrahydrofurane
TRIS HCl / TRISs	Hydrochlorure de tris(hydroxyméthyl)aminométhane / Tampon TRIS salin (TRIS HCl + NaCl)

NOTATIONS

Pour plus de lisibilité, certaines notations sont adoptées au cours de ce manuscrit.

- Les ELPs de séquence $[(VPGVG)(VPGMG)(VPGVG)_2]_x$ sont notés **ELPnY**, avec $Y = x/4$. Ils peuvent aussi être noté **ELP[M₁V₃-n]**. n correspond au nombre de répétitions du pentapeptide.
- Le hyaluronane de masse molaire $M_w = x$ kDa est noté **HA_{xk}**.
- La notion de copolymère à blocs est sous-entendue pour les bioconjugués : HA-*b*-ELP → **HA-ELP**
- La masse molaire du HA et le nombre de répétition de l'ELP composant un bioconjugué sont précisées sous la forme **HA_m-ELPnY**.
- En l'absence de précision de m et Y, il s'agit de la série de bioconjugués comportant les 3 tailles.
Ex : **HA-ELPn80** → série des bioconjugués HA_{4.6k}-ELPn80, HA_{24k}-ELPn80, et HA_{42k}-ELPn80
HA_{4.6k}-ELP → série des bioconjugués HA_{4.6k}-ELPn60, HA_{4.6k}-ELPn80, et HA_{4.6k}-ELPn100
 (aussi notée **HA_{4.6k}-ELPn60, n80, n100**)
HA-ELP → ensemble de la librairie (HA_m-ELPnY, avec m = 4.6k, 24k, 42k et Y = 60, 80, 100)
HA_m-ELPn → un bioconjugué de la librairie
- Les bioconjugués synthétisés par CuAAC sont notés **HA-ELP (Cu)**, ceux synthétisés par SPAAC sont notés **HA-ELP (SP)**.
 Remarque : ces notations ne sont adoptées que lorsqu'une confusion ou une comparaison entre eux peut exister.
 À partir de la fin du **chapitre II**, la notation **HA-ELP** se réfère aux bioconjugués synthétisés par SPAAC.
- Les notations de tampon **PBS** et **TRISs** se réfèrent aux tampons salins préparés dans cette étude, dont la formulation est détaillée en **page 125**.
- La notation **HA-ELP-fluo** correspond à un bioconjugué fonctionnalisé avec un fluorophore non précisé
- Un co-assemblage de bioconjugué avec un pourcentage massique de ce même bioconjugué fonctionnalisé avec un fluorophore est noté **HA_m-ELPn (% fluorophore)**.

CODE COULEUR

Code couleur & symbole		HA		
		4.6 kDa	24 kDa	42 kDa
ELP	n60	□	□	□
	n80	○	○	○
	n100	◇	◇	◇

Fluorophores :

Fluorescéine : : **jaune/vert**

Rhodamine : **rose fuchsia**

DY700 : **bleu turquoise**

DY410 : **jaune pâle**

Divers :

PEG : **vert**

Froid : **bleu** Chaud : **rouge**

Cellules H322 : **bleu**

Cellules A549 : **rouge**

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le cancer est l'une des maladies les plus meurtrières de notre époque : près d'un français sur trois y sera confronté au cours de sa vie. Le développement de traitements efficaces est donc un enjeu de santé publique majeur. Trop souvent, la chimiothérapie est assortie d'effets secondaires lourds, rendant les périodes de traitement très éprouvantes pour les malades. Ceux-ci sont principalement dus au manque de sélectivité des agents de chimiothérapie pour les cellules et tissus malins, qui nécessitent *de facto* leur administration à des doses sous-optimales et la répétition des traitements.

Afin de palier à ce défaut majeur, de nombreux travaux de recherche ont été consacrés au développement de systèmes de vectorisation des actifs anticancéreux. Ceux-ci doivent permettre simultanément : *i*) d'augmenter la solubilité des actifs chimiothérapeutiques souvent hydrophobes ou de protéger ceux sensibles à la dégradation, *ii*) d'augmenter leur temps de séjour dans la circulation sanguine et d'éviter leur élimination rapide par l'organisme, *iii*) d'augmenter leur accumulation dans la tumeur, et *iv*) idéalement de contrôler leur libération localement et temporellement.

Ces nanovecteurs peuvent être de nature, de morphologie, et de complexité variables. Cependant, si les liposomes ont montré leur efficacité et ont été approuvés par la FDA pour le traitement de certains types de cancer, les autres formulations peinent à franchir la porte des hôpitaux. En cause, une trop grande disparité de comportement entre les études pré-cliniques, *in vitro* et *in vivo* sur des modèles cellulaires ou animaux, et celui constaté lors des essais cliniques chez l'humain, et une complexité de synthèse rendant difficile le changement d'échelle nécessaire à une production industrielle.

Récemment, A. K. Pearce et R. K. O'Reilly ont identifié cinq défis majeurs à relever pour faciliter la transition entre les laboratoires et le domaine clinique (*Bioconjugate Chem.* **2019**, 30, 9, 2300-2311). Selon elles, un nanomédicament doit :

- Ne pas reposer uniquement sur l'effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) pour son accumulation dans les tumeurs, car celui-ci, mis en évidence dans des modèles murins, est controversé chez l'humain.
- Être validé *in vivo* dans des modèles animaux plus proches de l'humain.
- Comporter une formulation simple, applicable à des cas variés, et reproductible.
- Exploiter la multifonctionnalité permise notamment par les polymères, tout en permettant un passage à l'échelle industrielle aisé : une synthèse simple, sans étape de purification complexe et réduisant le nombre de composés afin d'obtenir une reproductibilité de lots et une pertinence clinique les plus élevées possible.
- Ne pas présenter de toxicité à long terme. Une étude du devenir des nanomédicaments après administration *in vivo* complète devrait être systématiquement menée, afin d'étudier non seulement leur action, mais aussi leur élimination par l'organisme.

Ce projet de thèse au sein de l'équipe "Auto-assemblages Polymères et Sciences du Vivant" du Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques (UMR 5629) vise à développer un système s'approchant de ces recommandations. Une librairie de bioconjugués bioinspirés à base de hyaluronane (HA) et de polypeptides d'élastine ("*elastin-like polypeptide*", ELP) a ainsi été synthétisée.

Le hyaluronane est un polysaccharide naturel extrêmement hydrophile et capable de reconnaître le récepteur CD44, surexprimé dans certains cancers. Les ELPs, quant à eux, sont des polypeptides recombinants dont la séquence peptidique répétée est inspirée de l'élastine, une protéine naturelle des tissus conjonctifs. Ils présentent une caractéristique majeure : des propriétés de thermo-sensibilité de type LCST, induisant leur agrégation à haute température en milieu aqueux. La combinaison de ces deux macromolécules au sein d'un copolymère à blocs permet la génération d'un composé dont l'amphiphilie est dépendante de la température. Solubles à froid, ces bioconjugués s'auto-assemblent en nanoparticules sphériques de type cœur-couronne au-delà d'une température critique (CMT). Sous cette forme, le hyaluronane devrait faire preuve d'une affinité pour le récepteur CD44 fortement accrue du fait de sa présentation multivalente en surface.

La possibilité de moduler la force des interactions HA/CD44 par une variation d'état supramoléculaire contrôlée par la température permettrait une amélioration de la sélectivité du ciblage des cellules cancéreuses par notre système. L'encapsulation ou le couplage avec un principe actif transformerait alors ces nanoparticules en nanovecteurs, capables de s'accumuler efficacement dans les tumeurs du fait de la conjugaison de l'effet EPR, du ciblage actif des récepteurs CD44, et de l'action locale de la température. On obtiendrait alors un nanovecteur biocompatible, biodégradable et multifonctionnel, tout en conservant une simplicité de synthèse et de formulation.

La faisabilité de la synthèse d'un tel bioconjugué et son auto-assemblage induit par la température ont d'ores et déjà été prouvés lors des précédents travaux de thèse menés par le Dr. Ye Xiao dans l'équipe. Ce projet vise ici à son optimisation et à son adaptation à des applications biologiques et anticancéreuses.

Ce manuscrit présente les travaux réalisés sur ce sujet durant mes trois années de thèse.

- Le **Chapitre I** comporte deux revues de bibliographie portant respectivement sur les ELPs et le HA, et leurs applications en nanomédecine anticancéreuse.
- Le **Chapitre II** porte sur la synthèse d'une librairie de bioconjugués HA-*b*-ELP par cycloaddition alcyne-azoture catalysée au cuivre (CuAAC) ou favorisée par tension de cycle (SPAAC), dans des conditions compatibles avec des explorations biologiques, et permettant un éventuel changement d'échelle.
- Le **Chapitre III** est consacré à l'étude des conditions d'auto-assemblage de ces bioconjugués et à la caractérisation physico-chimique des nanoparticules formées.
- Le **Chapitre IV** s'intéresse enfin à l'adaptation de ce système à des études biologiques et détaille les interactions des nanoparticules avec le CD44, depuis l'échelle du récepteur jusqu'à celle de la cellule. L'étude de la multivalence, du ciblage et de la cytotoxicité ont fait l'objet d'une attention particulière.
- Enfin, un **chapitre d'ouverture (Chapitre V)** présente l'addition d'un principe actif au système à travers le couplage d'une sonde de thérapie photodynamique sur le meilleur candidat HA-*b*-ELP. Sous irradiation, celle-ci est susceptible de générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) capables de provoquer la mort cellulaire.

CHAPITRE I :
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

**LES POLYPEPTIDES D'ÉLASTINE ET
LE HYALURONANE AU SERVICE DE LA
NANOVECTORISATION ANTICANCÉREUSE**

TABLE DES MATIÈRES

Chapitre I : Revue Bibliographique	11
I.A. Les "Elastin-like Polypeptides" (ELPs) : des polymères bioinspirés au service de la nanomédecine	14
I.A.1. Les ELPs : des polymères bioinspirés	14
I.A.1.1. Élastine & tropoélastine.....	14
I.A.1.2. Définition et production des ELPs.....	16
I.A.1.3. Biocompatibilité & devenir dans l'organisme.....	19
I.A.2. Les ELPs : des polymères thermosensibles à LCST.....	21
I.A.2.1. Thermosensibilité : définition et mécanisme	21
I.A.2.2. Modulation de la température de transition (T_{cp})	24
<i>I.A.2.2.1. Paramètres macromoléculaires</i>	<i>24</i>
<i>I.A.2.2.2. Paramètres environnementaux.....</i>	<i>26</i>
<i>I.A.2.2.3. Post-modifications des ELPs.....</i>	<i>28</i>
I.A.3. Utilisation des ELPs dans la nanomédecine pour la lutte contre le cancer	32
I.A.3.1. Nanovectorisation d'actifs et effet EPR	32
I.A.3.2. Les ELPs au service de la nanomédecine anticancéreuse	33
<i>I.A.3.2.1. Bioconjugués ELP-Principe Actif.....</i>	<i>34</i>
<i>I.A.3.2.2. Diblocs d'ELP</i>	<i>35</i>
<i>I.A.3.2.3. Copolymères hybrides à base d'ELPs.....</i>	<i>37</i>
<i>I.A.3.2.4. L'hyperthermie locale pour l'amélioration des traitements.....</i>	<i>40</i>

I.B. Le hyaluronane et le récepteur CD44 : pour un ciblage actif des tumeurs.....	45
I.B.1. Le hyaluronane : une molécule naturelle primordiale	45
I.B.1.1. Origine et généralités.....	45
<i>I.B.1.1.1. Structure.....</i>	<i>45</i>
<i>I.B.1.1.2. Un peu d'Histoire.....</i>	<i>46</i>
<i>I.B.1.1.3. Production et élimination</i>	<i>46</i>
I.B.1.2. De multiples fonctions biologiques.....	47
I.B.1.3. Les hyaladherines.....	48
I.B.1.4. Principal récepteur du hyaluronane : le CD44	51
<i>I.B.1.4.1. Structure biologique</i>	<i>51</i>
<i>I.B.1.4.2. Isoformes.....</i>	<i>52</i>
<i>I.B.1.4.3. Fonctions biologiques.....</i>	<i>53</i>
I.B.2. L'interaction HA-CD44 et le cancer	54
I.B.2.1. Mécanismes d'interaction entre HA et CD44.....	54
<i>I.B.2.1.1. Interaction HA-CD44.....</i>	<i>54</i>
<i>I.B.2.1.2. Multivalence.....</i>	<i>54</i>
<i>I.B.2.1.3. Affinité versus Avidité.....</i>	<i>57</i>
I.B.2.2. HA et CD44 promeuvent le cancer	59
<i>I.B.2.2.1. Influence du HA</i>	<i>59</i>
<i>I.B.2.2.2. Influence du CD44</i>	<i>60</i>
<i>I.B.2.2.3. Cellules souches cancéreuses (CSCs)</i>	<i>61</i>
I.B.2.3. Le ciblage actif du CD44 par le HA comme appui aux thérapies anticancéreuses.....	63
<i>I.B.2.3.1. Utilité du HA dans la conception d'un système de vectorisation</i>	<i>63</i>
<i>I.B.2.3.2. Prodrogues & bioconjugués</i>	<i>64</i>
<i>I.B.2.3.3. Le HA dans les systèmes de vectorisation</i>	<i>66</i>
<i>I.B.2.3.4. Les nanovecteurs HA-polypeptides</i>	<i>70</i>
Conclusion.....	73
Références	74

I.A. Les "Elastin-like Polypeptides" (ELPs) : des polymères bioinspirés au service de la nanomédecine

Les récentes avancées de la nanomédecine ont permis de définir des paramètres-clés à prendre en compte pour obtenir un vecteur efficace. Parmi eux, la réponse d'un composé à un stimulus peut être avantageuse pour la délivrance contrôlée de principes actifs ou de matériel génétique. Elles ont aussi souligné la nécessité de disposer de composés biocompatibles et biodégradables afin d'assurer la bonne tolérance du système par l'organisme.

Les ELPs sont des polymères biocompatibles inspirés de l'élastine qui possèdent une propriété de thermosensibilité. Ils semblent donc tout à fait pertinents pour des applications biomédicales. Dans cette partie, leur origine biologique et les travaux pionniers de leur découverte sont d'abord exposés. Les paramètres contrôlant leur thermosensibilité sont ensuite détaillés. Enfin, des exemples de leur utilisation en nanomédecine anticancéreuse sont présentés.

I.A.1. Les ELPs : des polymères bioinspirés

I.A.1.1. Élastine & tropoélastine

L'élastine est une protéine naturelle, présente dans la matrice extracellulaire (ECM) des vertébrés. Principal composant des fibres élastiques, elle se trouve majoritairement dans les tissus qui nécessitent de grandes propriétés d'élasticité et de résilience du fait des cycles contrainte-étirement / relaxation qu'ils subissent : ligaments, tendons, cordes vocales, peau, artères, poumons, cartilages, etc.^{1,2} Cette protéine est considérée comme étant la plus durable de l'ECM : elle possède un temps de demi-vie dans l'organisme de 40 à 70 ans (selon le tissu), c'est-à-dire qu'elle ne subit pas de renouvellement régulier mais au contraire se dégrade avec l'âge.^{3,4} L'élastogénèse a principalement lieu au stade fœtal et durant la petite enfance.¹⁻³ Elle n'est observée chez l'adulte qu'en cas de blessure.⁵ L'élastine est ensuite conservée toute la vie. Elle résiste à la protéolyse, exceptée celle due aux élastases, seules enzymes capables de la dégrader.⁶ Si l'élastinolyse est un phénomène normal du vieillissement⁷⁻⁹, sa dérégulation peut mener à des maladies des poumons^{10,11} (emphysème), des artères¹²⁻¹⁵ (athérosclérose), ou encore de la peau^{16,17} (*cutis laxa*).

Outre sa grande stabilité biologique, l'élastine est également l'une des protéines les plus chimiquement inerte : elle est insoluble dans la plupart des solvants, y compris à haute température. Le seul moyen de la solubiliser consiste à briser les liens peptidiques. Or, elle est également résistante à l'hydrolyse acide comme basique.¹⁸ En effet, le protocole développé par SM. Partridge en 1955 ne permet qu'une hydrolyse partielle et une solubilisation qu'au terme de 6 extractions à l'acide oxalique (0.25 M) à 100°C.¹⁹

Bien que tout ceci rende difficile son extraction et son étude, cette protéine fait l'objet de recherches depuis plus d'un siècle. Le premier article la mentionnant date de 1925, mais évoque une connaissance encore antérieure.²⁰ L'intérêt de la communauté scientifique à son égard s'est ensuite intensifié à partir des années 1960.

Ces recherches concernent également son précurseur soluble, la tropoélastine. Cette protéine de 60-70 kDa est à la base de l'élastogénèse. Elle est composée de trois domaines principaux : deux domaines hydrophobes riches en proline et en glycine, et un domaine hydrophile riche en lysine. La tropoélastine consiste en une alternance de ces trois domaines, deux régions hydrophobes étant toujours séparées par une région hydrophile.^{5,21} Dans les régions riches en proline, se trouvent des séquences très répétitives de type VGVAPG, VPGVG etc.^{21,22} (**Figure I-1**). Ce sont elles qui confèrent à la tropoélastine ses propriétés particulières. À titre d'exemple, si la présence de la proline participe à un ordre local du fait de la formation de certaines structures secondaires (*e.g.* coudes β), ces domaines hydrophobes sont intrinsèquement désordonnés et flexibles⁵.

Mais la principale spécificité de la tropoélastine est sa propriété de thermosensibilité : elle possède en effet une température de transition inverse (T_t ou T_{cp}), qui est de 37°C dans les conditions physiologiques (150 mM NaCl, pH 7-8). En dessous de cette température, la tropoélastine est soluble dans l'eau. Au-dessus, en revanche, elle s'auto-assemble en structure fibrillaire. Ce phénomène de coacervation est d'origine thermodynamique : il est endothermique avec une participation importante de l'entropie.²³ Il est à l'origine du phénomène de l'élastogénèse.

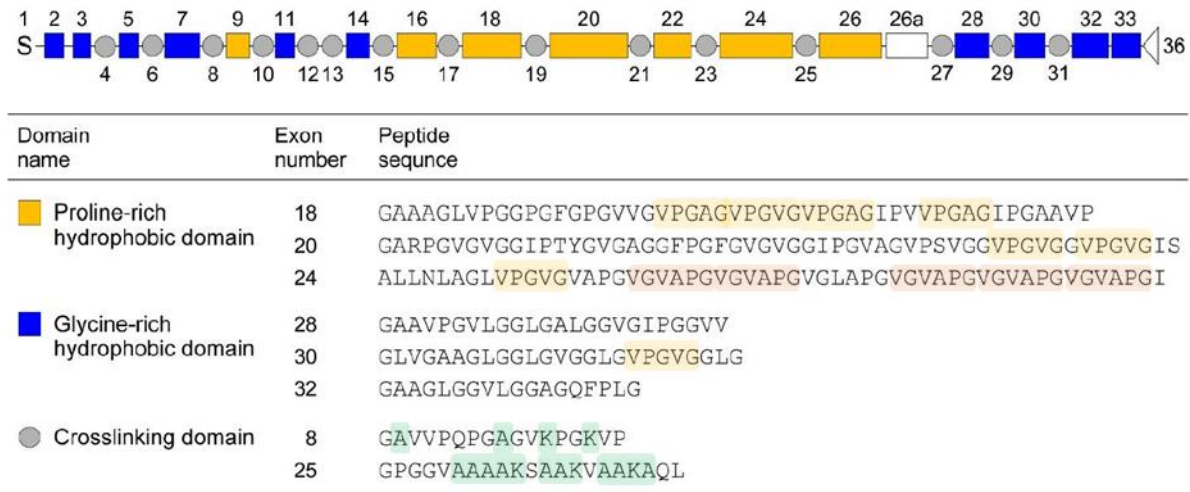


Figure I-1 : Représentation du pré-ARN de la tropoélastine humaine (absence des exons 34 et 35) et exemple de séquences peptidiques caractéristiques de chaque domaine. Le domaine de réticulation (cercle gris) est hydrophile et riche en lysine et alanine (vert). Mise en relief des répétitions de séquences VPGXG (jaune) et VGVAPG (orange). Adapté de l'article de D.H.T. Le et A. Sugawara-Narutaki.²²

L'élastogénèse est le processus à l'origine de la synthèse de l'élastine et des fibres élastiques à partir de l'assemblage de la tropoélastine.^{1,2,24} Son principe chez l'humain est illustré en **Figure I-2**. Tout d'abord la tropoélastine est synthétisée dans l'appareil de Golgi à partir des informations codées par son gène sur le chromosome 7. Là, elle est immédiatement associée à des protéines chaperons ('Elastin Binding Proteins', EBP) qui empêchent son auto-assemblage dans le cytoplasme et sa dégradation.²⁵ Elle passe ensuite à travers la membrane plasmique. Une fois hors de la cellule, elle se dissocie des EBP pour se lier à la fibuline. Les EBP sont alors recyclées²⁵, et la tropoélastine rejoint des microfibrilles composées de fibrilline 1 et 2. Celles-ci servent de support pour l'association, l'alignement et la réticulation des molécules de tropoélastine.²⁶ Les domaines hydrophobes interagissent entre eux, ce qui conduit à l'alignement des domaines hydrophiles. Les lysyl oxydases modifient alors les chaînes latérales des résidus lysine puis les réticulent.²⁷ Il a été prouvé que des polypeptides contenant simplement 3 domaines hydrophobes séparés par 2 domaines hydrophiles étaient capables de s'associer, s'aligner et être réticulés ensemble.²⁸ La coacervation et la réticulation de la tropoélastine produisent ainsi l'élastine et conduisent à la formation des fibres élastiques. Leur élasticité est due à la présence des domaines hydrophobes : lorsque la fibre d'élastine se tend, ils se retrouvent exposés et entrent en contact avec l'eau environnante. La diminution de l'entropie engendrée conduit au retour élastique de l'élastine.^{5,29,30}

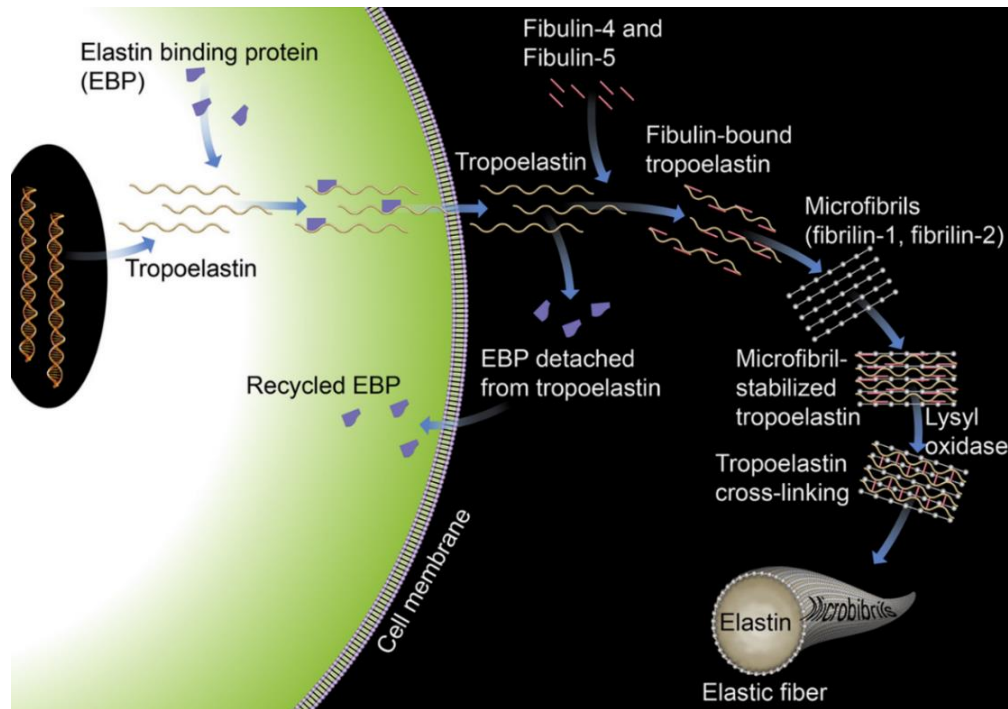


Figure I-2 : Principe de l'élastogénèse. Schéma reproduit de l'article de J. Xu et G-P. Shi.³¹

I.A.1.2. Définition et production des ELPs

Tout comme l'élastine, la tropoélastine est difficile à extraire et à isoler. En effet, elle s'agrège très vite après excrétion par les cellules. Il a fallu attendre le développement de sa production recombinante, notamment chez *Escherichia Coli*, pour avoir accès à des quantités suffisantes à l'approfondissement des recherches.³² Pendant de nombreuses années, le seul moyen d'extraire et d'étudier le comportement de l'élastine était donc de l'hydrolyser en conditions dures afin de produire de l' α -élastine¹⁹. C'est sur cette dernière que D.W. Urry a mené ses recherches dans les années 1970.³³⁻³⁵ En 1974, il découvre que les polypeptides synthétiques de séquence $(VPGVG)_n$ sont capables de former des coacervats en fonction de la température.³⁶ Ils possèdent donc une température de transition inverse, tout comme l' α -élastine et la tropoélastine naturelle. Il les nomme Elastin-Like Polypeptides (ELPs) et se consacre à leur étude. Ses recherches sont aujourd'hui considérées comme les pionnières sur le sujet.³⁷⁻⁴¹

Il propose une définition de séquence pour ces ELPs thermosensibles : $(VPGXG)_n$, dans laquelle n est le nombre de répétitions du pentapeptide et X n'importe quel acide aminé excepté la proline.⁴²⁻⁴⁴ La séquence $(VPGVG)_n$ pour laquelle le résidu hôte X est une valine est la plus courante dans la tropoélastine naturelle et fait office de référence. Depuis, d'autres séquences répétées ont démontré les mêmes propriétés telles que $IPGXG$, $VPAXG$, $LGGVG$ ou encore $IPAXG$.⁴⁵⁻⁵¹ Il a également été montré que le résidu hôte X peut être un acide aminé non naturel.^{52,53}

Ces ELPs ne sont pas les seuls dérivés de l'élastine. D'autres polymères existent, certains présentant une alternance de domaines hydrophobes et hydrophiles dans une structure très proche de la tropoélastine (aussi appelés Immune-Tolerant ELPs, iTEPs),^{28,54} d'autres possédant des chaînes pendantes inspirées de l'élastine.⁵⁵⁻⁵⁹

Les ELPs sont des polypeptides intrinsèquement désordonnés, adoptant une conformation en pelote statistique en dessous de leur température de transition. Au-dessus, une forme plus structurée se met en place, à travers l'augmentation du nombre de structures secondaires du type coude β .⁶⁰ Ces derniers proviennent de l'enchaînement Proline-Glycine qui forme un coude, pouvant ensuite s'arranger en feuillets. En revanche, la formation spirale β initialement proposée par D.W. Urry en 1997, a depuis été remise en question (Figure I-3).⁶⁰⁻⁶² Ces changements de conformation avec la température font partie intégrante du processus de thermosensibilité et seront décrits plus précisément en I.A.2.1.

Les ELPs sont donc des macromolécules de haute masse molaire formées par la répétition de motifs plus courts. Ils peuvent donc être considérés comme des polymères selon la définition de l'IUPAC.⁶³ Du fait de leur structure peptidique désordonnée inspirée de la tropoélastine, ils sont ici assimilés à des polymères bioinspirés.

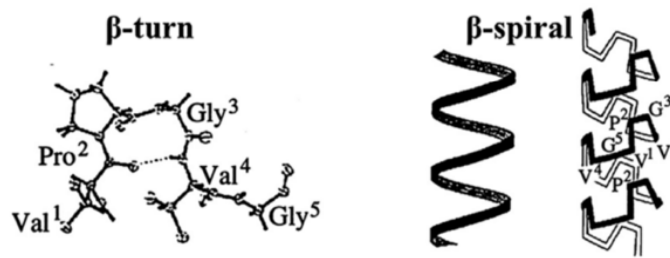


Figure I-3 : Structure secondaire d'un ELP (VPGVG)_n proposée par D.W. Urry et al. L'enchaînement Proline-Glycine produit un coude β, stabilisé par des liaisons hydrogènes intramoléculaires. Ces coudes peuvent ensuite s'arranger en spirale β, exposant les résidus hydrophobes. Reproduit de l'article de revue de Smits et al.⁶⁴

Les ELPs ont d'abord été produits chimiquement, par dégradation de l'élastine, synthèse peptidique en phase solide (SPPS), puis polycondensation. Ces conditions étaient cependant laborieuses et le contrôle de la longueur et de la séquence peptidique assez faible. Ainsi, la SPPS ne permettait de synthétiser de manière fiable que des ELPs courts, tandis que ceux obtenus par polycondensation présentaient une grande polymolécularité.

La synthèse des ELPs se fait à présent majoritairement par expression recombinante chez des microorganismes. Si la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) est la plus utilisée^{41,65}, des productions d'ELPs ont aussi été rapportées chez des levures⁶⁶⁻⁶⁸, des champignons⁶⁹, des plantes⁷⁰⁻⁷³, ou grâce à des systèmes d'expression non cellulaires *in vitro*⁷⁴ ("cell-free expression systems"). Ces dernières présentent cependant des rendements plus faibles que ceux obtenus avec *E. coli* et des cas de modifications post-traductionnelles non désirées ont été notés lors de l'expression chez des plantes. Cette voie par expression d'ADN recombinant possède de nombreux avantages parmi lesquels un contrôle parfait de la séquence peptidique primaire et de la longueur de chaîne.⁴¹ Il s'agit donc d'un atout considérable comparé aux ELPs obtenus par polycondensation et aux autres polymères synthétiques, dont la polydispersité est très souvent élevée.

Le principe de cette production recombinante est illustré en **Figure I-4** et **Figure I-5**. Elle nécessite tout d'abord la formation d'un gène codant pour l'ELP souhaité par ingénierie des protéines. Plusieurs méthodes existent⁷⁵ : pour les ELPs les plus courts (≤ 30 pentapeptides), il est possible d'utiliser une technique de concatémérisation qui permet d'associer bout à bout de courtes séquences, pour donner un gène d'ELP répétitif.

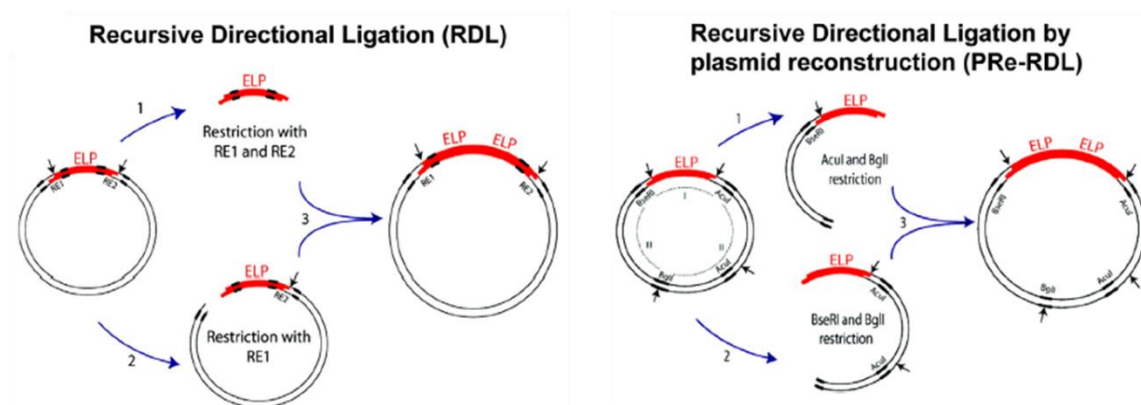


Figure I-4 : Exemples d'utilisation de la ligation récursive directionnelle (RDL) pour la synthèse d'un gène codant pour un ELP long. Gauche : RDL classique, ajout d'un oligonucléotide au gène déjà présent. Droite : RDL par reconstruction de plasmide, combinaison de deux gènes identiques entre eux pour en obtenir un deux fois plus grand. Reproduit de l'article de revue de S. Saha et al.⁷⁵

Pour obtenir des tailles plus élevées tout en maintenant le contrôle sur la taille et la séquence, une autre technique est nécessaire : la ligation récursive directionnelle (RDL, **Figure I-4**). Celle-ci consiste à lier entre eux les courts gènes d'ELPs produits par concatémérisation grâce à des enzymes de restriction de type II.^{76,77}

Cela permet d'augmenter le nombre de répétitions au sein d'un ELP homopolymérique, mais aussi de former des assemblages plus complexes, comme des polymères à blocs constitués d'ELPs de séquences différentes⁷⁸⁻⁸⁰, ou encore des protéines de fusion ELP-protéines^{70,71,81-83}. En revanche, la synthèse d'un ELP très long requiert l'utilisation de la RDL par reconstruction de plasmide. Cette dernière consiste à fusionner deux moitiés de plasmides préexistants et porteurs d'un gène complet d'ELP afin de produire rapidement un gène d'ELP deux fois plus grand (**Figure I-4**).

Une fois le gène formé, il est inséré dans un plasmide accompagné d'un gène de résistance à l'ampicilline. Le plasmide est ensuite transféré dans les bactéries et les clones bactériens l'ayant effectivement intégré sont sélectionnés par ajout d'un antibiotique (*e.g.* ampicilline). Ces clones sont alors cultivés et produisent l'ELP grâce à l'ajout d'un déclencheur dans le milieu de culture (*e.g.* IPTG). L'ELP n'étant pas excrété, une lyse des bactéries est nécessaire pour le récupérer.

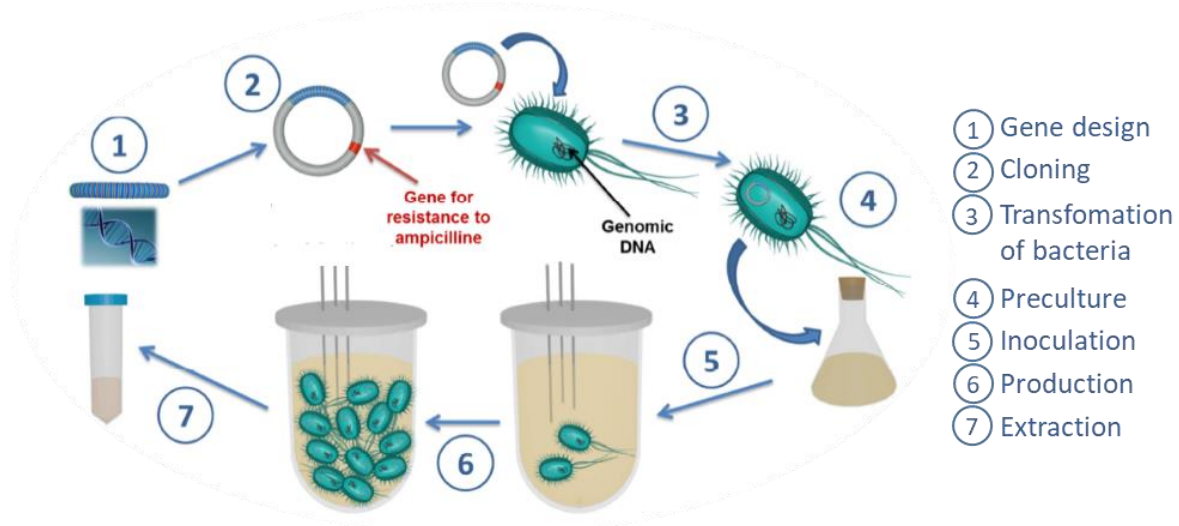


Figure I-5 : Principe de la production recombinante d'ELP chez *E. coli*. Le gène codant l'ELP choisi est produit par ingénierie génétique (1). Il est transféré dans un plasmide contenant le gène de résistance à un antibiotique (ici, l'ampicilline) (2) qui est ensuite introduit chez *E. coli*. Les clones l'ayant intégré sont cultivés (3, 4, 5) et la production de la protéine recombinante déclenchée (6). L'ELP est enfin extrait par lyse bactérienne (7). Schéma reproduit de la thèse de R. Petitdemange.⁸⁴

L'ELP est ensuite purifié par une technique reposant sur sa thermosensibilité nommée ITC (Inverse Transition Cycling). Cette technique a été développée par D.W. Urry en 1996⁸⁵, puis adaptée et nommée par Meyer et Chilkoti en 1999.⁸¹ Elle est illustrée en **Figure I-6**.

Elle consiste en une alternance d'étapes de centrifugation et de resolubilisation, à chaud et à froid, pour séparer les ELPs des autres contaminants bactériens. Un cycle comprend ainsi une première centrifugation à chaud, durant laquelle l'ELP s'agrège et précipite. L'élimination du surnageant entraîne celle de toutes les protéines solubles insensibles à la température. Le culot contenant les ELPs est ensuite resolubilisé à froid. Une deuxième centrifugation, à basse température cette fois, permet de se débarrasser des contaminants insolubles ou dont l'agrégation à chaud est irréversible.

Le surnageant contenant les ELPs subit alors une nouvelle phase de chauffage, pour recommencer un cycle. En règle générale, 3 cycles sont suffisants pour obtenir un ELP pur. Une étape de dialyse peut être utile si la précipitation des ELPs à haute température a été favorisée par l'ajout de sels. Une lyophilisation permet enfin de récupérer les ELPs sous la forme d'un solide blanc cotonneux.⁶⁵

Cette purification par ITC présente l'avantage d'être simple, efficace, et de ne pas nécessiter de solvants organiques. Elle permet en outre une élimination des endotoxines présentes en solution, ce qui est indispensable pour des applications biologiques ultérieures.⁸⁵ Il est intéressant de noter que cette méthode de production et de purification s'applique également dans le cas de protéines de fusion contenant un ELP. L'équipe de A. Chilkoti a ainsi démontré l'utilité d'un tag ELP pour purifier des protéines recombinantes.^{82,86-90} L'ELP conserve sa thermosensibilité même au sein de l'assemblage ce qui permet sa purification par ITC. La protéine d'intérêt est ensuite séparée de l'ELP par coupure enzymatique.

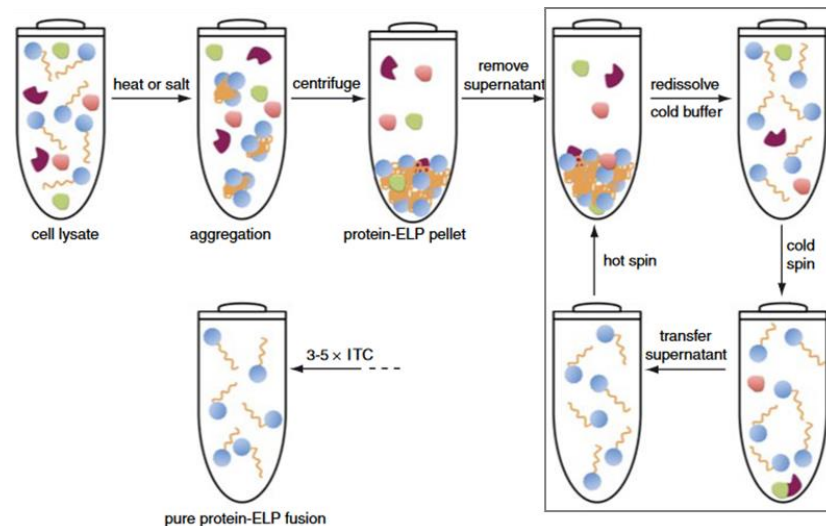


Figure I-6 : Purification d'une protéine de fusion possédant un tag ELP par la technique d'ITC. Schéma reproduit de l'article de W. Hassouneh *et al.*⁸⁶

Cependant, tous les laboratoires ne disposant pas d'équipements de culture bactérienne, des voies de synthèses chimiques ont aussi été développées. Ainsi, le groupe de J. Van Hest a réussi la synthèse d'un polymère à chaînes ELP pendantes par ATRP à partir d'un monomère (VPGVG)-métacrylate⁵⁵. Ce polymère, bien que non linéaire, maintient sa propriété de thermosensibilité.⁵⁶ Un exemple identique, cette fois par polymérisation RAFT, a été étudié par F. Fernandez-Trillo *et al.*⁵⁷

I.A.1.3. Biocompatibilité & devenir dans l'organisme

Tout comme la tropoélastine naturelle dont ils dérivent, les ELPs se révèlent biocompatibles. Une étude a ainsi prouvé qu'ils sont non toxiques, non mutagènes, non antigéniques, non pyrogènes, non hémolytiques, et non allergisants.⁹¹ De même, des microparticules composées d'ELPs de séquence VPAVG ont également semblé être bien tolérées lors d'injections sous-cutanées ou intraoculaires.⁴⁹ Enfin, les séquences GVLPGVG et GAGVPG, très proches de la tropoélastine naturelle, sont considérées comme étant encore moins immunogènes et sont appelées iTEPS (Immune-Tolerant ELPs).⁵⁴

Contrairement à l'élastine, les ELPs sont sensibles à la protéolyse, notamment de la part des élastases et des collagénases. Ces dernières semblent toutefois inefficaces lorsque l'ELP est agrégé ou assemblé dans une nanoparticule ($T > T_{cp}$). Dans ce cas, la dégradation a plutôt lieu dans les lysosomes après internalisation. Elle se produit en 2-24h et génère des produits de dégradation relativement inertes tels que des peptides ou des acides aminés.⁹²

Plusieurs études ont montré que la biodistribution, le temps de circulation dans le sang et l'élimination étaient dépendantes de la masse molaire de l'ELP.^{93,94} Ainsi M. Kuna *et al.*⁹³ ont mené une étude approfondie chez un modèle murin de la biodistribution et de l'élimination de 14 ELPs de séquence $(VPGXG)_n$, avec $X = V:G:A$ selon un ratio 1:4:3 et $n = 63 - 223$ répétitions ($M_w = 13 - 256$ kDa). Ces ELPs présentent des T_{cp} bien supérieures à 37°C afin d'éviter leur coacervation *in vivo*. Des rayons hydrodynamiques (R_H) d'environ 4-7 nm ont été mesurés pour ces objets, ce qui est cohérent avec des polymères en pelote statistique. Les résultats de cette étude sont présentés en **Figure I-7**.

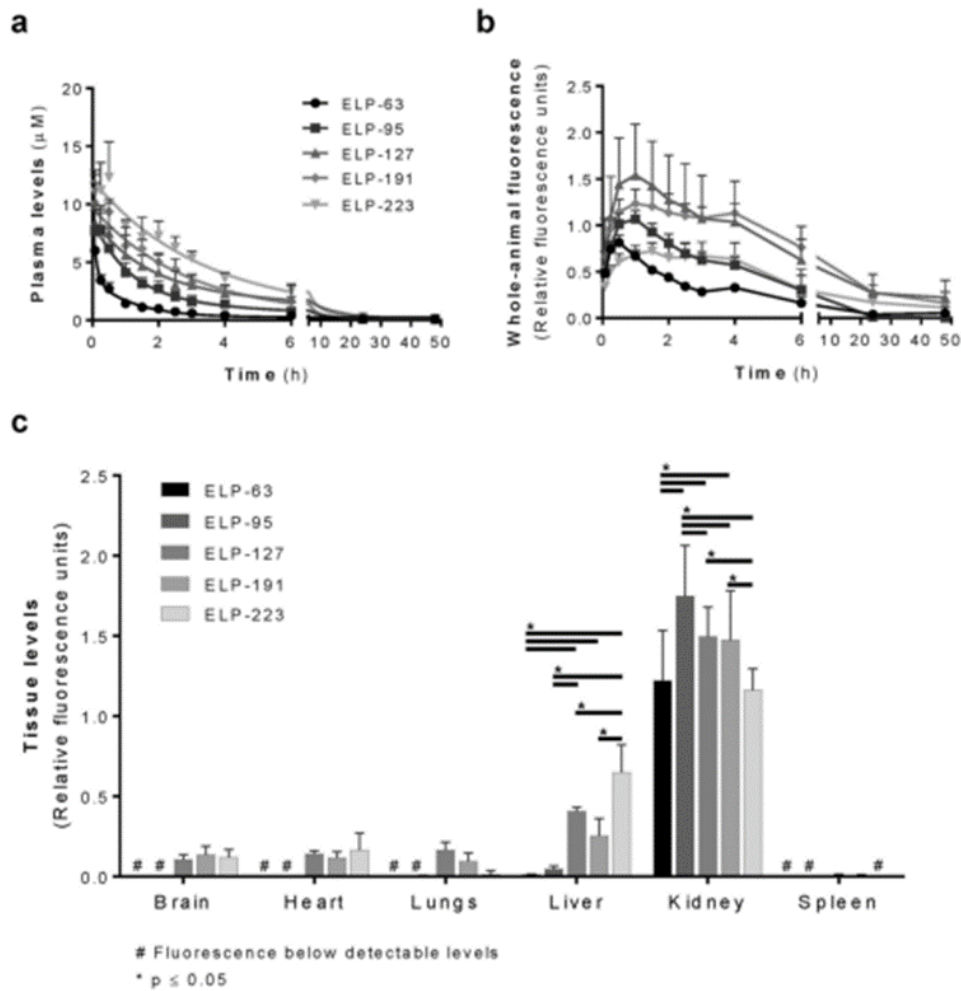


Figure I-7 : Étude de la biodistribution et de la biodégradabilité d'ELPs en fonction de leur masse molaire. La notation ELP-n correspond à un ELP de n répétitions du pentapeptide (VPGXG) avec X = V:G:A selon un ratio 1:4:3. A : Dégradation des ELPs en fonction du temps dans du plasma à 37°C. B : Évolution de la fluorescence globale dans des souris injectées avec des ELPs-rhodamine au cours du temps. C : Biodistribution des ELPs dans différents organes. Reproduit de l'article de M. Kuna et al.⁹³

Des tests de stabilité ont été effectués dans du PBS et du plasma à 4°C et 37°C. Un phénomène de dégradation n'a été observé que dans le plasma à 37°C (a). Il semble légèrement plus rapide pour les ELPs les plus courts. Les ELPs sont cependant stables en l'absence d'activité enzymatique. Par ailleurs des essais *in vivo* menés sur des ELPs couplés à un fluorophore n'ont montré qu'une faible libération de ce dernier (b). Il a également été observé que l'élimination systémique se produisait sur des temps plus courts que ceux nécessaires à la dégradation *in vitro*. L'action enzymatique ne semble donc pas dégrader les ELPs injectés dans la circulation sanguine.

En termes de biodistribution, tous les ELPs testés s'accumulent majoritairement dans les reins et dans une moindre mesure dans le foie. Cela traduit une élimination principalement par voie rénale, en cohérence avec la taille des objets. Les ELPs les plus longs présentent une accumulation plus importante dans le foie et dans quelques autres organes (cerveau, cœur, poumons) que les ELPs plus courts. Leur temps de demi-vie, de circulation et de captation par les tissus sont également plus longs.

Le ELPs répondent à la fois à la définition de polypeptides et de polymères : ils sont donc considérés comme des polymères biospirés. Cela leur confère de nombreux avantages en comparaison avec les polymères synthétiques : ils sont biocompatibles et leur production par voie recombinante permet un contrôle précis de leur structure primaire et de la taille des chaînes. Par ailleurs, contrairement à de nombreux polypeptides, ils sont résistants à l'hydrolyse et stables à basse température. Ils semblent donc très prometteurs pour des recherches à l'interface de la chimie et de la biologie, et pour des applications biomédicales.

I.A.2. Les ELPs : des polymères thermosensibles à LCST

I.A.2.1. Thermosensibilité : définition et mécanisme

Définition

La thermosensibilité d'un polymère se définit par un changement brutal d'état ou de propriétés pour de faibles variations de température. Il s'agit souvent d'une transition de phase. On distingue deux comportements : le type LCST ("Lower Critical Solution Temperature") et le type UCST ("Upper Critical Solution Temperature") (Figure I-8).

Un polymère à LCST entreprend une transition de phase inverse lors de l'augmentation de la température : il est soluble à froid et insoluble à chaud. La température de point de trouble (T_{cp} ou T_t) correspond à la température à laquelle cette solution de polymère se trouble, soit au changement d'état soluble-insoluble. Cette T_{cp} est dépendante de la concentration. La LCST correspond à la T_{cp} la plus basse ($T_{cp} \geq LCST$) et est définie pour une concentration critique. En dessous de la LCST, le polymère est soluble à toute concentration. Dans le cas d'un polymère à UCST, la transition de phase est inversée : le polymère est insoluble à froid et soluble à chaud. Cette fois, l'UCST correspond à la température la plus élevée à laquelle ce changement d'état insoluble-soluble se produit ($T_{cp} \leq UCST$). Au-dessus de l'UCST, le polymère est soluble à toute concentration.⁹⁵

Si la thermosensibilité à LCST et UCST est observable dans certains solvants organiques, elle n'y est que peu étudiée. La thermosensibilité en milieu aqueux est en revanche présente dans de nombreuses recherches en raison des potentielles applications biologiques qui en découlent.⁹⁶⁻⁹⁹

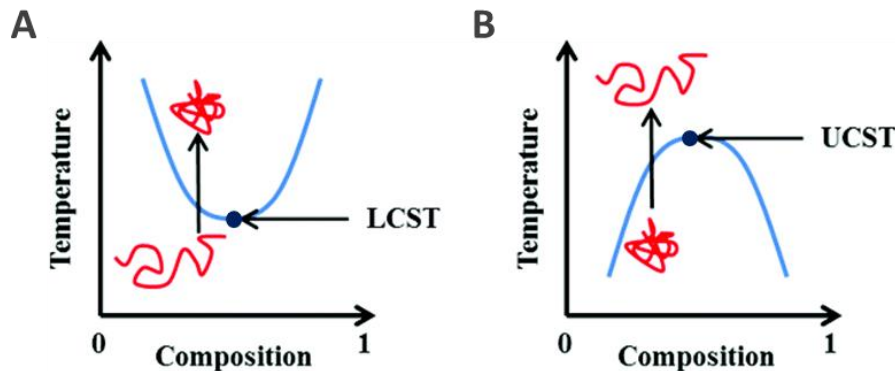


Figure I-8 : Diagrammes de phases de solutions de polymères à LCST (A) ou à UCST (B). La ligne bleu clair correspond à la transition de phase, chacun des points la composant étant une T_{cp} . Le point bleu foncé correspond au point extrême (LCST ou UCST). A : polymère à LCST soluble à froid et insoluble à chaud. B : polymère à UCST insoluble à froid et soluble à chaud. Adapté de l'article de D.J. Phillips et M.I. Gibson.¹⁰⁰

Étonnamment, la communauté scientifique ne fait preuve que d'un intérêt modeste envers les polymères à UCST, bien qu'il soit en augmentation ces dernières années. Pourtant, leur transition de phase semble être plus intuitive que pour les polymères à LCST, avec une solubilisation au chauffage.

Parmi les polymères à UCST les plus courants, le poly(*N*-acryloylglycinamide) (PNAGA) a été très étudié par J. Seuring et S. Argawal.¹⁰¹⁻¹⁰⁴ Le poly(acrylamide-co-acrylonitrile) P(AAm-co-AN)¹⁰⁵⁻¹⁰⁷, ou certains polymères zwitterioniques de sulfobétaïnes¹⁰⁸ peuvent également être cités.

Pour s'adapter au mieux aux besoins d'applications biologiques, des polymères à UCST dégradables et pouvant s'assembler de façon réversibles ont été développés par T. Wolf *et al.*¹⁰⁹ De même, F.G. Quiroz et A. Chilkoti se sont inspirés des ELPs pour élaborer des polypeptides intrinsèquement désordonnés à UCST.¹¹⁰

Les ELPs étant des polymères à LCST¹¹¹, cette partie se concentre sur ce type de thermosensibilité. La transition se faisant d'un état soluble à un état insoluble, la T_{cp} est le plus souvent déterminée par turbidimétrie. En effet, sous l'effet du changement d'état, la solution se trouble et son absorbance augmente. En traçant son évolution en fonction de la température, il est possible de déterminer la T_{cp} de trois manières différentes, illustrées en **Figure I-9** :

- La température pour laquelle l'absorbance atteint 50% de son maximum (T_{cp} 1)
- La température pour laquelle l'absorbance atteint 90% de son maximum (T_{cp} 3)
- La température pour laquelle la dérivée première de l'absorbance est maximale (T_{cp} 2)

Cette dernière est la plus couramment utilisée.

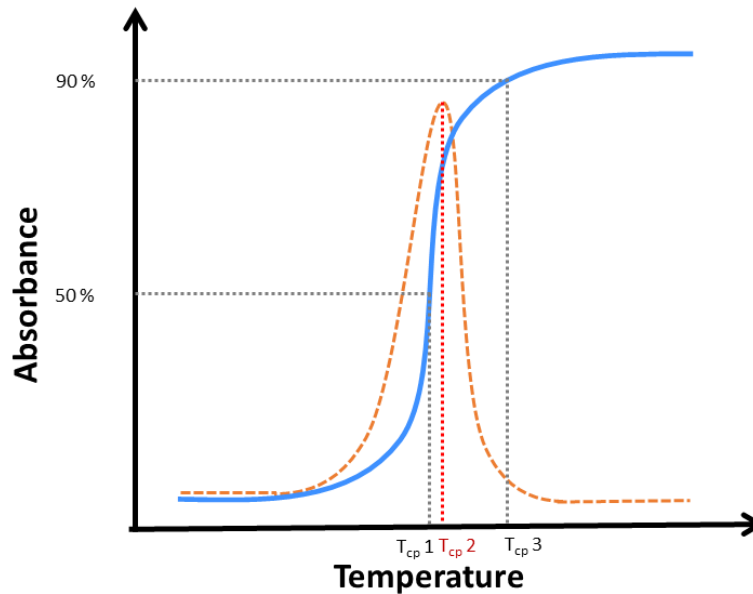


Figure I-9 : Détermination de la T_{cp} par turbidimétrie. L'augmentation de l'absorbance est représentée en fonction de la température (bleu). La T_{cp} peut être définie de 3 façons : la température pour laquelle l'absorbance est à 50% de son maximum (T_{cp} 1), à 90% de son maximum (T_{cp} 3), ou pour laquelle la dérivée première de l'absorbance (pointillés oranges) est maximale (T_{cp} 2).

Mécanisme de transition

La transition de phase d'un polymère à LCST est un phénomène thermodynamique, dépendant de l'énergie libre de Gibbs : $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, avec G l'énergie libre, H l'enthalpie libre, T la température, et S l'entropie. Pour qu'un phénomène se produise spontanément, il faut que $\Delta G < 0$.

Dans le cas d'un polymère à LCST, en dessous de cette température critique, les zones hydrophiles sont en interaction avec des molécules d'eau par liaisons hydrogènes (liaisons H), tandis que les parties hydrophobes sont entourées d'une couche d'hydratation liée et ordonnée. À mesure que la température et l'agitation thermique augmentent, les liaisons H se rompent, ce qui contribue à l'augmentation l'enthalpie ($\Delta H > 0$), tandis que la couche d'hydratation se brise, libérant les molécules d'eau qui y étaient piégées. Ces dernières gagnant des degrés de liberté, cette rupture entraîne une nette diminution de leur entropie ($\Delta S < 0$), plus importante que le gain lié à la structuration de l'ELP. Combinée à l'augmentation de la température, cela suffit à contrebalancer celle de l'enthalpie et à atteindre une énergie libre négative ($|\Delta H| < |T\Delta S|$). La transition d'état a donc lieu spontanément, les parties hydrophobes à présent exposées pouvant alors se rassembler à travers des interactions intra- et intermoléculaires plus favorables. La transition de phase de type LCST est donc principalement menée par la contribution entropique de l'eau.

L'un des polymères à LCST le plus étudié est le poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM). Il s'agit d'un homologue synthétique de la poly(leucine) qui peut être aisément synthétisé par polymérisation radicalaire RAFT ou ATRP.

Sa thermosensibilité a été observée pour la première fois par Scarpa *et al.* en 1967¹¹² (Figure I-10). Sa LCST de 32°C, légèrement inférieure à la température physiologique et peu dépendante de la concentration, en fait un polymère très prometteur pour des applications biologiques, ce qui explique l'engouement à son égard.¹¹³⁻¹¹⁷ Il est possible de la moduler par adjonction de comonomères, leur caractère hydrophile ou hydrophobe ayant respectivement pour effet de l'augmenter et de la diminuer.¹¹⁸ L'influence de la masse molaire ou de paramètres extérieurs tels que le pH et les sels sur la LCST fait toutefois l'objet de conclusions contradictoires.^{99,118-121} Sa T_{cp} paraît cependant stable sur une large gamme de concentrations. Par ailleurs, bien que le PNIPAM semble biocompatible, la neurotoxicité de son monomère NIPA et de ses produits de dégradation par hydrolyse acide a été observée.¹²²⁻¹²⁴

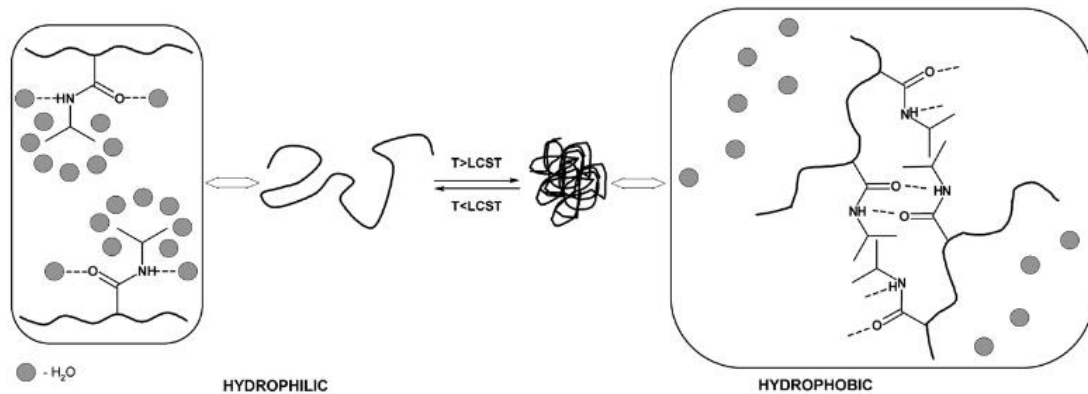


Figure I-10 : Illustration de la transition de phase de type LCST du PNIPAM. À gauche, la température est inférieure à la LCST, le PNIPAM est soluble en raison des liaisons H formées entre les molécules d'eau et les groupements hydrophiles. Les groupements hydrophobes sont isolés les uns des autres par une couche d'hydratation. À droite, la température est supérieure à la LCST, les couches d'hydratation sont rompues et les chaînes pendantes peuvent interagir entre elles par liaisons H ou interactions hydrophobes. Le PNIPAM est alors insoluble. Reproduit de l'article de I. Dimitrov *et al.*¹²⁵

Le mécanisme de transition de phase de la tropoélastine et des ELPs est assez similaire : la libération de l'eau liée aux chaînes pendantes non polaires ou hydrophobes augmente son entropie et permet l'interaction des chaînes entre elles.^{23,60} C'est une transition de phase inverse endothermique, qui est classiquement observée chez les polypeptides et protéines.⁴³

Une étude détaillée de ce mécanisme a été menée par N.K. Li *et al.* dans le groupe d'A. Chilkoti.¹²⁶ À l'aide de simulations, ils ont démontré que l'augmentation de la température était corrélée avec une diminution de l'eau d'hydratation et du nombre de liaisons H polypeptide-H₂O, ainsi qu'avec une augmentation des liaisons intramoléculaires. Concernant la structure secondaire, ils ont confirmé l'augmentation de l'ordre à haute température, avec un nombre accru de coudes β et de feuillets β , qui avaient déjà été observés.^{21,127,128,62,129} La formation de spirales β proposée par D.W. Urry ne fait, quant à elle, pas consensus.^{61,62} À l'échelle des acides aminés, l'augmentation de la température entraîne des changements conformationnels du squelette peptidique, exposant la valine hydrophobe et cachant la proline. Enfin, des études d'énergie les ont amenés à la conclusion qu'un polypeptide seul est plus stable à basse température qu'à haute, et inversement pour un assemblage. Tout ceci explique donc l'agrégation réversible des ELPs avec la température.

I.A.2.2. Modulation de la température de transition (T_{cp})

Les valeurs de LCST et de T_{cp} des ELPs dépendent de plusieurs paramètres physico-chimiques, intrinsèques à l'ELP ou caractéristiques de son environnement. Cela permet d'adapter précisément le système aux applications souhaitées. L'influence de certains d'entre eux est détaillée ci-après.

I.A.2.2.1. Paramètres macromoléculaires

La température de transition T_{cp} est dépendante de la structure primaire de l'ELP, et en particulier de la nature des acides aminés qui la compose et de la longueur de chaîne. La séquence $(VPGXG)_n$ est utilisée comme référence.

Nature du résidu hôte X

L'un des moyens les plus courants pour moduler la T_{cp} est la variation du résidu hôte X. Au début des années 1990, D.W. Urry *et al.* ont ainsi effectué un travail approfondi à ce sujet.⁴³ Ils ont synthétisé 19 ELPs, de masse molaire supérieure à 50 kDa, et de séquence $[f_v(VPGVG), f_x(VPGXG)]_n$, avec $f_v + f_x = 1$, par polycondensation et en faisant varier la nature du résidu X et la fraction molaire de $(VPGXG)$ f_x . L'analyse de la thermosensibilité de ces copolymères leur a permis d'établir une échelle expérimentale d'hydrophobie des résidus et sa corrélation avec la T_{cp} (**Figure I-11**). La séquence pour laquelle X = V (ELP purement $(VPGVG)_n$) a servi de référence. Ainsi, ils ont défini qu'une T_{cp} basse correspond à un acide aminé hydrophobe tandis qu'une T_{cp} élevée traduit la présence de résidus hydrophiles et/ou chargés. Cette règle reste valable y compris avec des acides aminés non naturels.

Par ailleurs, J.A. MacKay *et al.* ont également montré que l'incorporation d'un acide aminé acide ou basique permet de plus de rendre la coacervation pH-dépendante : en fonction du pH et du pKa du résidu, il peut se trouver sous forme neutre ou chargée et ainsi provoquer une variation importante de la T_{cp} . La coacervation peut ainsi être déclenchée sans changer de température.¹³⁰

La position relative au sein de la chaîne ELP des pentapeptides contenant certains acides aminés comme résidu hôte semble également pouvoir moduler la T_{cp} .¹³¹

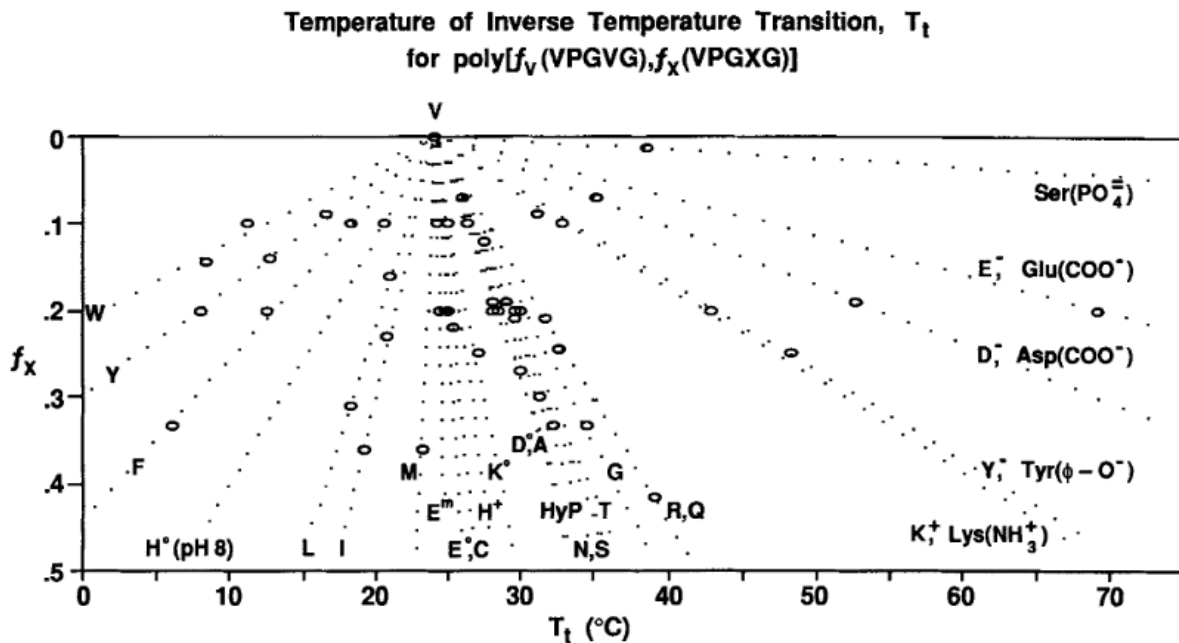


Figure I-11 : Échelle d'hydrophobie établie par D.W. Urry *et al.* en 1992. La température de transition inverse est représentée en fonction de la nature du résidu hôte X et de sa fraction dans l'ELP. Les ^{0, +, -} correspondent à la charge des résidus. E^m indique un ester méthylié sur le résidu Glu, HyP signifie hydroxyproline. La valine sert de référence. Reproduit de leur article.⁴³

Nature des autres résidus

La nature des autres résidus a également de l'importance. Certaines séquences peptidiques ne présentent ainsi pas de thermosensibilité. D'autres possèdent une LCST mais un comportement différent. Ainsi, le remplacement de la valine en position 1 par une isoleucine (VPGVG → IPGVG) diminue la T_{cp} , en cohérence avec l'échelle d'hydrophobie décrite précédemment.^{42,132}

L'introduction d'alanine a également des effets notables. À titre d'exemple, les ELPs de séquence (VPGVA)_n ou (APGVG)_n ne coacervent pas à haute température mais précipitent de façon irréversible.^{133,134} En revanche, si la substitution se fait en 3^e position (VPAVG), la réversibilité existe, mais une hystérèse importante est observée : la température de retour à l'état hydraté est bien plus basse que celle de coacervation lors du chauffage (Figure I-12). Les auteurs de cette étude estiment donc que le changement d'état comporte une plus grande dépendance cinétique que thermodynamique¹³⁵, et que le comportement rhéologique est plus plastique que viscoélastique.^{136,137}

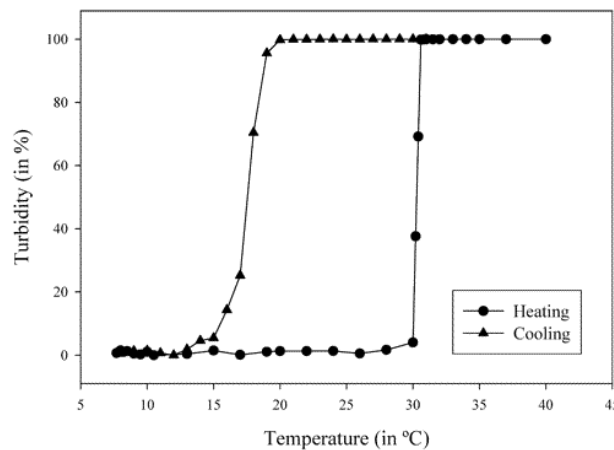


Figure I-12 : Détermination de la température de transition d'un ELP (VPAVG)_n par turbidimétrie. Importante hystérèse entre le chauffage et le refroidissement. Reproduit de l'article de J. Reguera et al¹³⁵.

Longueur de chaîne

La longueur de la chaîne de l'ELP semble également primordiale. En effet, à séquence identique, plusieurs études suggèrent que la T_{cp} est plus basse pour les ELPs les plus longs.^{138,139} En revanche, ce paramètre ne paraît pas avoir d'influence sur la LCST.

En tenant compte de tous ces éléments, J.R. McDaniel, J.C. Radford et A. Chilkoti ont pu déterminer un modèle de prédiction de la T_{cp} pour un ELP (VPGXG)_n avec X = A/V, en fonction de la proportion d'alanine dans la séquence et du nombre n de répétition du pentapeptide.¹³⁹ Ce modèle, illustré en Figure I-13, permet de déterminer à l'avance la séquence primaire exacte à produire de manière recombinante pour une application précise. Ce même travail peut être effectué pour d'autres résidus.

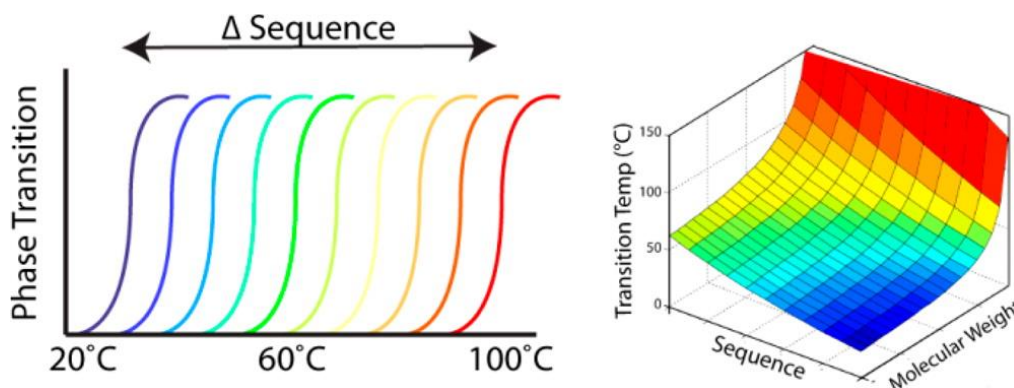


Figure I-13 : Illustration d'un modèle pour déterminer la T_{cp} d'un ELP en fonction de sa séquence ((VPGVG)_x(VPGAG)_{1-x}) avec x variable) et de son poids moléculaire (nombre de répétition des pentapeptides). Reproduit de l'article de J.R. McDaniel, J.C. Radford et A. Chilkoti.¹³⁹

I.A.2.2.2. Paramètres environnementaux

Nature du solvant

La thermosensibilité des ELPs étant basée sur les interactions avec l'eau, elle est généralement absente dans les solvants organiques purs. La solubilité des ELPs dans ces solvants dépend alors de leur nature et non plus de la température. Ils peuvent donc être utilisés dans des étapes d'extraction ou de purification.^{140,141} Il existe cependant peu d'études sur leur comportement dans des mélanges eau-solvant organique.

Un article récent a fait état de recherches menées sur des solutions diluées d'ELPs dans des mélanges eau-alcool.¹⁴² Ce travail s'est concentré sur des mélanges aqueux de méthanol, éthanol, isopropanol, et 1-propanol, pour des pourcentages molaires allant de 0% à 40% d'alcool (**Figure I-14**). L'ELP présente une séquence [(VPGVG)₂-(IPGVG)-(VPGVG)₂]₂₀, précédée de tags de purification, et a été dissout à une concentration de 1 mg/mL.

Les auteurs ont rapporté un comportement de non-cosolvation ("cononsolvency"), avec une diminution de la T_{cp} lors de l'augmentation de la teneur en alcool. Ils exposent donc qu'il existe des mélanges pour lesquels les ELPs sont insolubles y compris à basse température (excepté pour le méthanol). Par ailleurs, aux pourcentages les plus élevés, une inversion de la thermosensibilité a été observée avec l'apparition d'un comportement de type UCST. Au-delà de 40 mol% d'alcool, l'ELP est parfaitement soluble à toutes températures. Ces comportements semblent corrélés à l'hydrophobie des alcools (méthanol < éthanol < isopropanol < 1-propanol) : si le méthanol ne perturbe que peu la thermosensibilité, de plus grandes différences sont observées avec les trois autres. En l'occurrence, la taille du domaine d'insolubilité totale augmente avec l'hydrophobie de l'alcool, tandis que celle du domaine à UCST diminue.

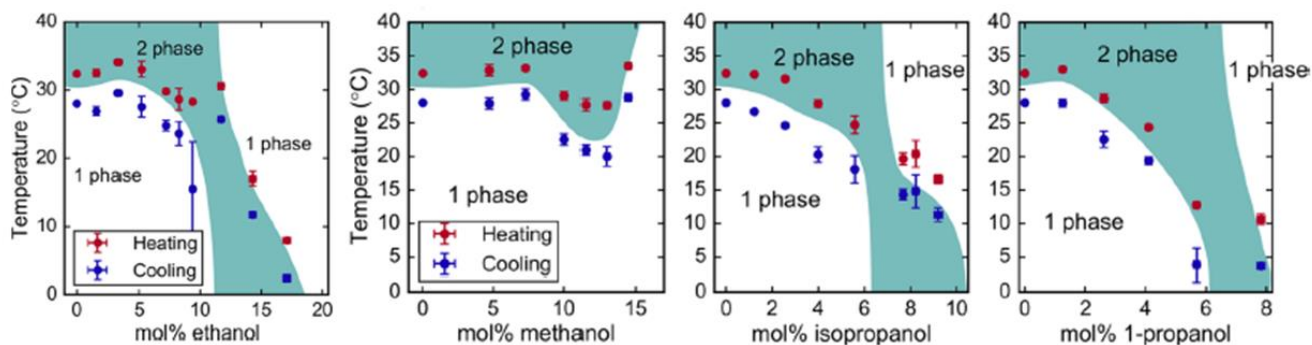


Figure I-14 : Diagrammes de phase de solutions d'ELPs à 1 mg/mL dans des mélanges eau-alcool. Effet de "cononsolvency" avec une diminution de la température de transition inverse lors de l'augmentation du %mol d'alcool. Reproduit de l'article de C.E. Mills, E. Ding et B.D. Olsen.¹⁴²

Ces résultats se rapprochent de ceux décrits dans la littérature pour le PNIPAM.^{143,144} Un autre article a quant à lui montré que l'ajout de 20%vol de DMSO dans un tampon PBS a, au contraire, pour effet d'augmenter la T_{cp} .¹⁴⁵

Cosolutés et sels

La présence d'un cosolvant n'est pas la seule à impacter la thermosensibilité d'un ELP en solution. Les cosolutés et notamment les sels revêtent également une grande importance.¹⁴⁶ P.S. Cremer et son équipe se sont intéressés aux ions de la série de Hofmeister et à leur influence sur la température de transition.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ En particulier, ils ont mené une étude sur l'effet de onze anions de cette série (CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, H_2PO_4^- , F^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , I^- , ClO_4^- , SCN^-) en solution à différentes concentrations.¹⁴⁷ Ils ont constaté que l'augmentation de la concentration en sels entraîne une diminution de la T_{cp} . Les mécanismes inhérents à cette baisse diffèrent selon leur nature kosmotropique (ions fortement hydratés) ou chaotropique (ions faiblement hydratés). De même, cette diminution est linéaire pour les ions kosmotropiques mais non-linéaire pour les ions chaotropiques.

Le caractère hydrophile ou hydrophobe de l'ELP joue également un rôle dans la variation de la T_{cp} avec la concentration saline. Ainsi, il est courant d'ajouter des sels (NaCl) pour forcer les ELPs à précipiter à température ambiante ("salting out"), notamment dans les étapes de purification par ITC.⁸¹

La présence de PEG comme cosoluté a également montré un effet de stabilisation de l'état agrégé et de diminution de la T_{cp} .¹⁴⁵ Par ailleurs, comme mentionné précédemment, le pH peut avoir une grande influence sur la T_{cp} dans le cas de séquences comportant des résidus hôtes chargés.

Concentration

La concentration est l'un des facteurs influençant le plus la T_{cp} : celle-ci diminue lorsque la concentration augmente. Cette dépendance a été mise en équation par D.E. Meyer et A. Chilkoti de façon empirique.¹³⁸ Elle permet de prévoir la T_{cp} d'une solution d'ELP en fonction de sa séquence et de sa concentration :

$$T_{cp} = T_{cp,c} + \frac{k}{L} \times \ln\left(\frac{C_c}{C}\right)$$

avec T_{cp} la température de transition inverse (°C), k une constante positive dépendant de la séquence primaire en acides aminés (°C), L la longueur de la chaîne (en nombre de répétitions du pentapeptide), et C la concentration (μ M). $T_{cp,c}$ et C_c représentent des valeurs critiques de température et de concentration, dépendant elles aussi de la séquence. En particulier, $T_{cp,c}$ est la température de transition pour une chaîne de longueur infinie.

Cette équation peut être notée de façon simplifiée :

$$T_{cp} = a - b \times \ln(C)$$

Avec $a = T_{cp,c} + \frac{k}{L} \times \ln(C_c)$ et $b = \frac{k}{L}$

La représentation schématique de cette équation est donnée en **Figure I-15** : l'évolution de la T_{cp} en fonction du logarithme de la concentration pour un ELP de longueur L est représentée par une droite pointillée. À mesure que L augmente, la T_{cp} et sa dépendance envers la concentration diminuent. De même, ils montrent que la constante k est plus grande pour les séquences comportant des acides aminés hydrophiles. Suivant leur théorie, les ELPs longs et hydrophobes sont donc moins sensibles aux variations de concentration. Par ailleurs, il existe un point de convergence entre toutes les droites, dont les coordonnées sont les valeurs critiques $T_{cp,c}$ (notée $T_{t,c}$) et C_c . Il est intéressant de noter que la $T_{cp,c}$ correspond de fait à la LCST, atteinte pour une concentration précise C_c . Cette LCST est donc bien dépendante de la séquence peptidique mais pas de la longueur de la chaîne.

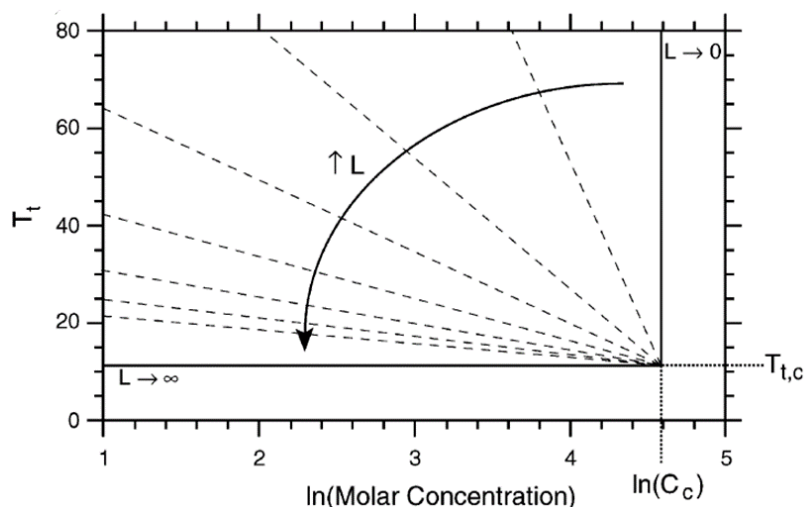


Figure I-15 : Modèle schématique défini par D.E. Meyer et A. Chilkoti pour la détermination de la T_{cp} (T_t) d'un ELP en fonction de sa longueur de chaîne (L) et du logarithme de sa concentration. L'évolution de la T_{cp} en fonction de la concentration pour un ELP est représentée en pointillés. Reproduit de leur article.¹³⁸

Récemment, une étude systématique de machine learning a comparé le comportement d'un ELP (VPGVG)₄₀ seul en solution ou en mélange (85:15) avec des conjugués ELP-PEI₈₀₀ et ELP-PEI_{10k} obtenus par couplage peptidique¹⁵⁰. L'évolution de la T_{cp} et la taille des agrégats formés au-dessus ont été évaluées en fonction de 3 paramètres : la concentration en polymère, la concentration en sels, et le pH. Pour l'ELP seul, les résultats sont conformes à ceux décrits dans la littérature, notamment par Urry *et al.* et Chilkoti *et al.* : la T_{cp} diminue lorsque la concentration en polymère et/ou en sels augmente, et elle augmente légèrement avec le pH (traduisant l'impact du pKa du seul acide carboxylique terminal). En présence de conjugués ELP-PEI, les mêmes conclusions sont données pour l'influence de la concentration en polymère et en sel. En revanche, la présence du PEI fortement chargé annule l'effet du pH.

L'ensemble de ces paramètres confirme l'impact important de l'environnement sur la T_{cp} des ELPs. Il est donc nécessaire d'y être attentif lors de la planification d'applications en milieu biologique.

I.A.2.2.3. Post-modifications des ELPs

Si la séquence peptidique choisie pour une production par voie recombinante (nature du résidu hôte et longueur de chaîne) est primordiale dans la définition de la T_{cp} , il est encore possible de la moduler par fonctionnalisation de la chaîne à postériori. De nombreux sites sont disponibles.

Modifications des extrémités N- et C-terminales et auto-assemblage

Comme tout polypeptide, les ELPs disposent d'extrémités de chaîne portant les fonctions amine primaire (extrémité N-terminale) et acide carboxylique (extrémité C-Terminale). Elles sont donc aisément fonctionnalisables. Ceci permet d'adjoindre à l'ELP de nombreuses molécules pour des applications variées : visualisation grâce à un fluorophore, transport d'actifs ou de matériel génétique, formation de copolymères à blocs ou d'hybride ELP-nanoobjet inorganique etc... Plusieurs méthodes de modification des extrémités existent : il est possible de former des protéines de fusion par ingénierie biologique^{81,83,151-154}, de tirer avantage de modifications post-traductionnelles¹⁵⁵⁻¹⁵⁷, ou encore de passer par une fonctionnalisation chimique¹⁵⁸⁻¹⁶².

La plupart du temps, l'ELP conserve sa propriété de thermosensibilité après couplage. En revanche celle-ci est influencée par la molécule couplée, et en particulier par son caractère hydrophile ou hydrophobe. En effet, suivant la même logique que celle décrite par D.W. Urry *et al.* pour les ELPs non modifiés, l'altération de l'hydrophobie générale du système entraîne également une modification de la T_{cp} . Ainsi, une T_{cp} plus élevée est constatée lors du couplage de l'ELP avec une molécule hydrophile, et inversement pour une molécule hydrophobe.

Ce couplage peut entraîner la formation d'une espèce amphiphile dans une gamme de température, menant à un assemblage supramoléculaire. Par exemple, en 2014, l'équipe de J.A. MacKay a combiné par ingénierie génétique un ELP (VPGAG)₁₉₂ avec un anticorps simple chaîne anti CD20 (scFv) pour former la protéine de fusion scFv-A192.¹⁵² Ils ont d'abord observé que le couplage covalent avec l'anticorps (plus hydrophobe que l'ELP) entraînait une nette diminution de la T_{cp} et de sa dépendance envers la concentration (**Figure I-16 A**). Plus inattendu, à une température physiologique (soit en dessous de la T_{cp}), les espèces solubles présentes dans le milieu n'étaient pas des chaînes libres, mais des nanofilaments (**Figure I-16 B**). En effet, à cette température, l'ELP est hydrophile. Son association avec un anticorps plus hydrophobe peut donc créer un amphiphile capable de s'auto-assembler. Lorsque la température dépasse la T_{cp} , l'ELP devient à son tour hydrophobe et les nanofilaments se transforment en agrégats. Ces nanofilaments se sont révélés plus efficaces que l'anticorps monoclonal actuellement utilisé dans le traitement de lymphomes B (Rituximab).

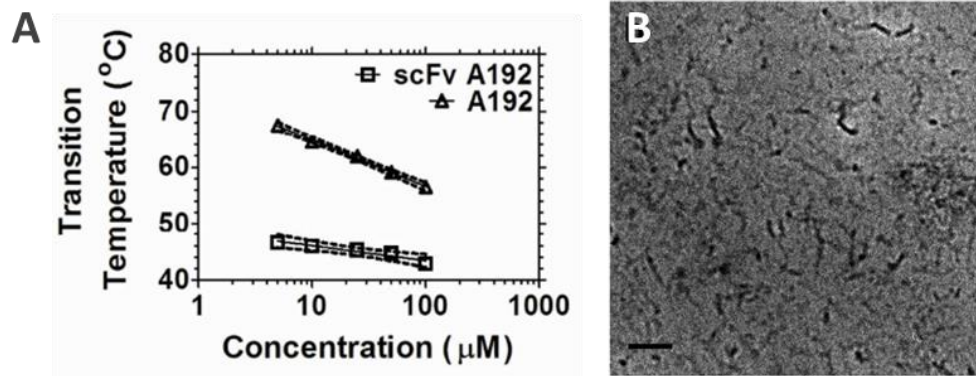


Figure I-16 : A : Évolution de la T_{cp} en fonction de la concentration pour un ELP(VPGAG)₁₉₂ (A192) et la protéine de fusion scFv-ELP(VPGAG)₁₉₂ (scFv A192). B : Image obtenue par cryoTEM des nano-filaments formés par le composé scFv-A192 en solution à $T < T_{cp}$. Échelle = 100 nm. Reproduit de l'article de S.R. Aluri et al¹⁵².

Certaines petites molécules possèdent également une hydrophobie suffisante ($\log D > 1.5$) pour induire un caractère amphiphile et un auto-assemblage.¹⁶³ C'est la découverte faite par A. Chilkoti *et al.* en 2013.¹⁶³ Il est toutefois bon de noter que dans le cas cité, l'extrémité C-terminale de l'ELP est couplée avec un peptide chimérique possédant plusieurs sites de couplage, sur lesquels la petite molécule s'ajoute. Elle est par conséquent présente en plusieurs exemplaires, ce qui augmente son potentiel hydrophobe.

Les exemples couplages avec une macromolécule hydrophile sont plus rares. Toutefois, Y. Xiao a récemment synthétisé des bioconjugué ELP-polysaccharides, solubles à froid et s'auto-assemblant sous forme de nanoparticules à chaud, dans le cadre de ses travaux de thèse au sein de notre équipe au LCPO.¹⁶²

Fonctionnalisation du résidu hôte

La fonctionnalisation le long de la chaîne par l'intermédiaire du résidu hôte est également courante. En particulier, parmi tous les acides aminés naturels, la cystéine, la lysine et la tyrosine sont les plus souvent modifiés.^{164,165} Par exemple, l'équipe de J.C.M. Van Hest a non seulement transformé l'amine N-terminale d'un ELP en azoture, mais il a appliqué le même protocole aux amines des lysines, permettant ainsi une addition multiple de PEG.¹⁵⁹ Pour cela, un passage d'un pH 8,5 à 10 a été nécessaire pour rendre possible la sélectivité de la réaction envers tous les groupements amines de la chaîne. Les lysines représentent un site de fonctionnalisation de choix pour la conjugaison avec un actif¹⁶⁶ ou pour une réticulation¹⁶⁷⁻¹⁶⁹

La tyrosine est aussi régulièrement modifiée. Récemment B.M Seifried, J. Cao et B.D. Olsen¹⁶⁵ ont produit des ELPs [(VPGYG)₃(VPGSG)]_{24/48}. Des fonctions sulfonate, éther de PEO, ou alcyne ont ensuite été introduite par couplage diazonium sur les tyrosines. La présence des alcynes a enfin permis une conjugaison avec du PEO ou des sucres, mimant ainsi une glycosylation (Figure I-17).

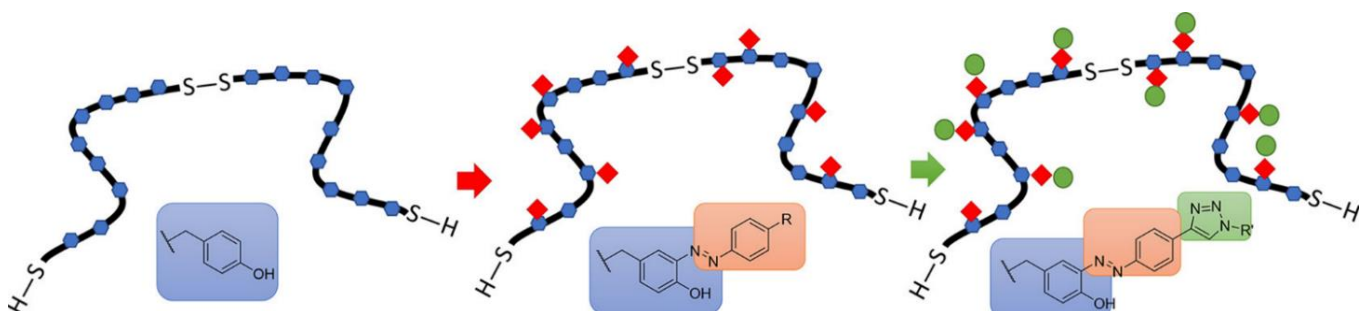


Figure I-17 : Formation d'ELP de très haute masse molaire par couplage de cystéines et modification chimique des tyrosines. Fonctionnalisation par cycloaddition catalysée au cuivre (CuAAC). Reproduit de l'article de B.M Seifried, J. Cao et B.D. Olsen.¹⁶⁵

Si la fonctionnalisation des résidus lysine et cystéine est aisée, leur présence peut néanmoins se révéler problématique lors de la production recombinante des ELPs. En effet, la lysine fortement hydrophile et chargée peut mener à une T_{cp} très élevée, rendant la purification par ITC compliquée, tandis que les groupements thiol des cystéines peuvent mener à une oligomérisation des chaînes par formation de ponts disulfure.

C'est pourquoi, depuis quelques années, notre équipe au LCPO s'est penchée sur la fonctionnalisation chimiosélective des résidus méthionine des ELPs. En effet, J.R. Kramer et T.J. Deming ont prouvé qu'à pH acide, le groupement thioéther de la méthionine devient plus réactif que tous les autres groupements amine ou thiol, ce qui permet sa modification chimique sans impacter les autres résidus ou les extrémités N- et C-terminales. Cela ouvre la voie à de grandes possibilités de fonctionnalisation.

Plusieurs modifications ont donc été appliquées à des ELPs de séquence $[(VPGVG)(VPGMG)(VPGVG)_2]_n$. D'une part, des thio-alkylations ont été effectuées avec des halogénures d'alkyle, des époxydes, ou encore des dérivés d'oxaziridines (**Figure I-18**).^{162,170-172} Dans les deux premiers cas, le thioéther a été remplacé par un sulfonium chargé positivement. Ceci pouvant avoir un impact sur la T_{cp} , une étape de déméthylation a ensuite été menée afin de revenir à une espèce neutre. Ces thio-alkylations sont susceptibles d'introduire aisément diverses fonctions le long de la chaîne. En particulier, l'introduction de groupements alcynes ou azoture peut permettre une fonctionnalisation extrêmement variée par cycloaddition CuAAC.¹⁷³ Ceci pourrait être un avantage certain pour le développement de systèmes de délivrance de principes actifs, en augmentant considérablement le nombre de sites de couplage et donc le taux de chargement.

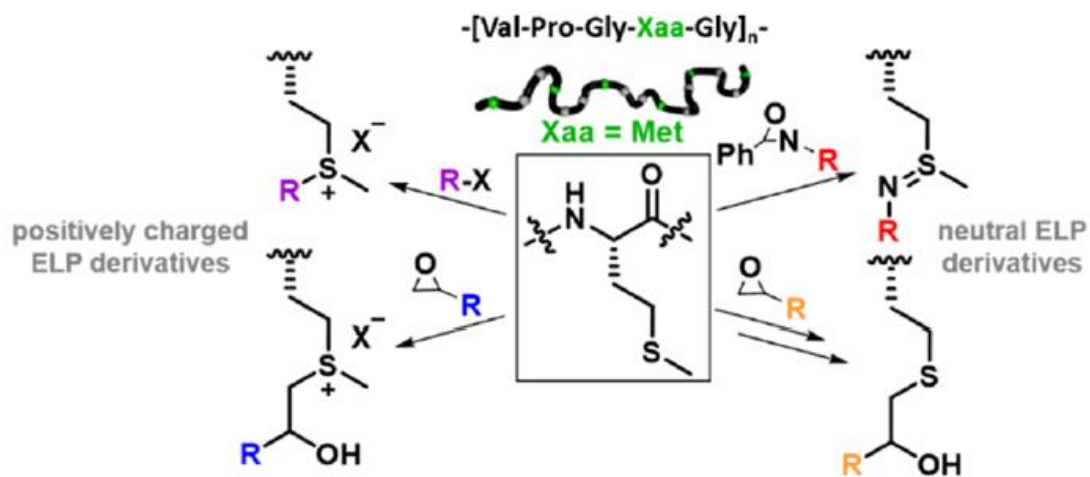


Figure I-18 : Exemples de modifications chimiosélectives de la méthionine pour un ELP de séquence $(VPGVG)_n$ avec $X = V/M$ (3:1). Des dérivés chargés (sulfonium) sont obtenus par thioalkylation avec un halogénure d'alkyle ou un époxyde. Des dérivés neutres sont obtenus par thioalkylation avec un dérivé d'oxaziridine ou par déméthylation d'un dérivé chargé. Reproduit de l'article de M. Rosselin et al.¹⁷¹

D'autre part, l'ELP a été placé dans un environnement fortement oxydant, changeant les fonctions thioéther en sulfoxide, puis en sulfone.^{174,175} Une analyse de la T_{cp} par turbidimétrie a permis de constater une grande influence de l'état d'oxydation des méthionines sur la transition (**Figure I-19**). Ainsi, la présence de fonctions sulfoxide ou sulfone entraîne une forte augmentation de la T_{cp} . Bien qu'étant moins oxydée que la sulfone, le sulfoxide mène à une T_{cp} bien plus élevée. En effet, l'existence d'interactions sulfone-sulfone et sulfone-protéine diminue la solubilité de l'ELP et donc sa T_{cp} .

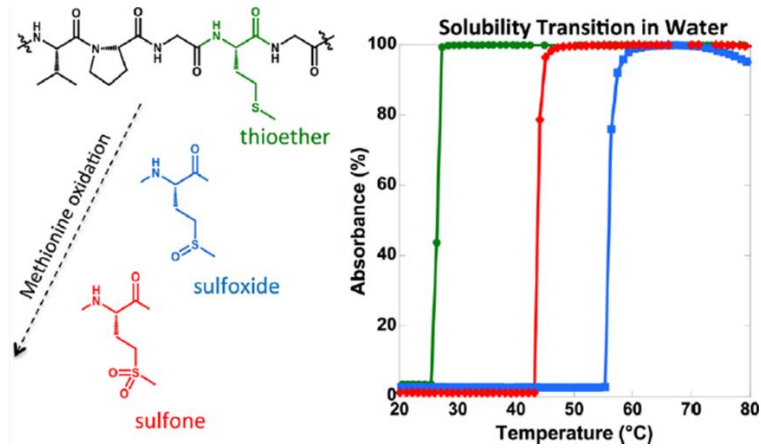


Figure I-19 : Influence de l'état d'oxydation de la méthionine d'un ELP de séquence (VPGXG) avec X = V/M (3:1) sur la T_{cp} . Droite : évolution de l'état d'oxydation du résidu méthionine dans un milieu oxydant. Gauche : Détermination de la T_{cp} des ELPs comportant des méthionines non oxydées (vert), oxydées en sulfoxyde (bleu) ou en sulfone (rouge) par turbidimétrie. Reproduit de l'article de R. Petitdemange.¹⁷⁴

La thermosensibilité des ELPs est donc modulable par des moyens très variés. Au-delà du choix des séquences peptidiques répétées, la fonctionnalisation chimique post-production permet de moduler la T_{cp} sur une large gamme de températures. Cette stratégie permet d'accéder à des ELPs de T_{cp} variées tout en limitant le recours à l'ingénierie génétique pouvant être contraignante. Une fois le système défini, elle peut encore être ajustée par des paramètres comme la concentration ou la présence de sels ou de solvants organiques.

Par ailleurs, cette propriété est maintenue même au sein de conjugués plus complexes, pouvant donner lieu à des assemblages supramoléculaires, dépendant eux-mêmes de la température. Parfois, une très simple modification chimique peut entraîner une grande variation de la T_{cp} , permettant d'envisager des études structure-propriétés ou des applications plus concrètes telles que de la libération contrôlée de principes actifs. Finalement, quelle que soit l'application souhaitée, il semble qu'il existe un ELP capable de proposer une température de transition compatible.

I.A.3. Utilisation des ELPs dans la nanomédecine pour la lutte contre le cancer

Outre leur biocompatibilité, les ELPs représentent des systèmes extrêmement versatiles, de par leur facilité de modification et la grande possibilité de modulation de leur température de transition. Ils sont donc très pertinents pour des applications biologiques.^{90,64,176,177} La formation d'hydrogels pour la culture cellulaire^{158,178,179}, la cicatrisation^{180,181} ou dans le cadre de l'ingénierie tissulaire¹⁸²⁻¹⁸⁵ est une de leurs utilisations les plus courantes. La délivrance contrôlée de principes actifs ou de matériel génétique en est une autre.¹⁸⁶⁻¹⁸⁹ Cette partie rappelle donc brièvement les avantages de la nanovectorisation, avant de présenter quelques exemples de l'utilisation des ELPs dans des systèmes anticancéreux.

I.A.3.1. Nanovectorisation d'actifs et effet EPR

Dans la lutte contre le cancer, l'injection de principes actifs libres directement dans la circulation sanguine a montré ses limites¹⁹⁰ : problème d'insolubilité, de biodisponibilité, de biodistribution, ou encore de forts effets secondaires dus à l'absence de ciblage des cellules tumorales. Dès 1955, l'idée d'utiliser des lipides ou des polymères pour améliorer les traitements a été mise en pratique dans de nombreux laboratoires.¹⁹¹⁻¹⁹⁷ L'objectif était le développement d'une "magic bullet" semblable à celle rêvée par Paul Ehrlich, qui ne ciblerait que les cellules cancéreuses, sans atteindre les cellules saines. Dans l'espoir d'atteindre un jour ce médicament idéal, une très grande variété de systèmes a été développée. Dans un premier temps, un simple couplage principe actif – PEG a d'ores et déjà prouvé son efficacité dans l'amélioration de la solubilité et de l'allongement du temps de circulation dans le sang¹⁹⁸. Par la suite, des assemblages plus complexes permettant une meilleure vectorisation ont été élaborés.

Le design rationnel de nanovecteurs ("drug delivery systems", DDS) est au cœur de nombreuses recherches depuis des années.¹⁹⁹⁻²⁰² Ils peuvent être lipidiques, polymériques, inorganiques, ou encore des composés "hybrides" entre toutes ces catégories. Ces nanovecteurs ont pour but de protéger le principe actif et de limiter les effets secondaires dus à l'action hors-cible. Ils peuvent également avoir une activité intrinsèque, qu'elle soit physique, chimique, ou biologique.^{203,204} Leur taille nanométrique et leur grand ratio surface/volume leur confère des propriétés spécifiques, mais peut également les exposer à des limitations particulières, telles que la reconnaissance précoce par le système immunitaire et l'élimination tout aussi rapide par le foie. Le contrôle de la morphologie des nanovecteurs est d'une grande importance puisque la taille, la forme, ou encore la nature de la surface sont décisives pour leur devenir et leur efficacité dans l'organisme.²⁰⁵ Si actuellement la plupart des nanovecteurs approuvés par la FDA sont des liposomes, des systèmes de plus en plus variés sont testés en phase clinique, en majorité des micelles polymériques.^{206,207}

La conception de tels nanovecteurs est au cœur de nombreuses études dans le domaine de la lutte contre le cancer. L'un des principes premiers de cette vectorisation est alors l'accumulation passive dans la tumeur par effet EPR (Enhanced Permeability and Retention).^{208,209} Cet effet a été pour la première fois décrit en 1907 par E. Goldmann.²¹⁰ Il explique que la croissance rapide de la tumeur entraîne une angiogenèse anarchique. Les vaisseaux sanguins nouvellement formés présentent donc des défauts, et notamment des pores entre les cellules épithéliales. Leur présence permet la pénétration d'objets de 10-200 nm de diamètre dans les tissus tumoraux. Le drainage lymphatique y étant défaillant, les objets peuvent s'y accumuler (**Figure I-20**). Un temps de circulation dans le sang prolongé est donc primordial puisqu'il offre une plus grande opportunité d'atteindre la tumeur et d'y pénétrer par effet EPR. Cependant, si cet effet a été bien observé chez la souris, sa présence chez l'Homme est plus controversée.²¹¹ En effet, les systèmes reposant uniquement sur lui pour une accumulation dans les tumeurs ont pour l'instant donné des résultats décevants en phase clinique. Le couplage avec un ligand capable de cibler spécifiquement un récepteur tumoral est donc de plus en plus souvent requis pour augmenter la spécificité et amplifier l'accumulation par voie active.

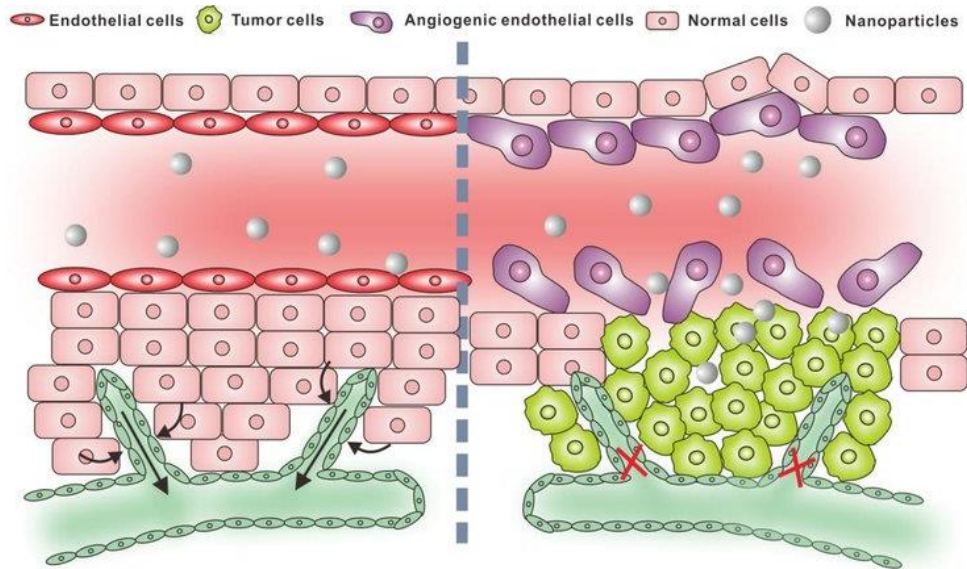


Figure I-20 : Illustration de l'effet EPR. A gauche : tissu et vaisseau sanguin sains. Les cellules sont liées entre elles par des jonctions adhérentes et forment une barrière empêchant le passage des nanoparticules. Le drainage lymphatique élimine efficacement les rejets des cellules hors du tissu. A droite : le tissu tumoral et les cellules endothéliales cancéreuses présentent une architecture déficiente qui permet aux nanoparticules de pénétrer dans la tumeur. Le drainage lymphatique défectueux les empêche ensuite d'en ressortir : elles s'y accumulent. Reproduit de l'article de revue de X. Xie et al.²¹²

I.A.3.2. Les ELPs au service de la nanomédecine anticancéreuse

Les ELPs sont au cœur de plusieurs stratégies de vectorisation d'actifs anticancéreux. En effet, ils sont biocompatibles, thermosensibles et leur voie de production recombinante permet un contrôle de leur séquence et de leur masse molaire inégalé en comparaison avec les polymères synthétiques. De plus, leur thermosensibilité permet une grande diversité de délivrances (**Figure I-21**).

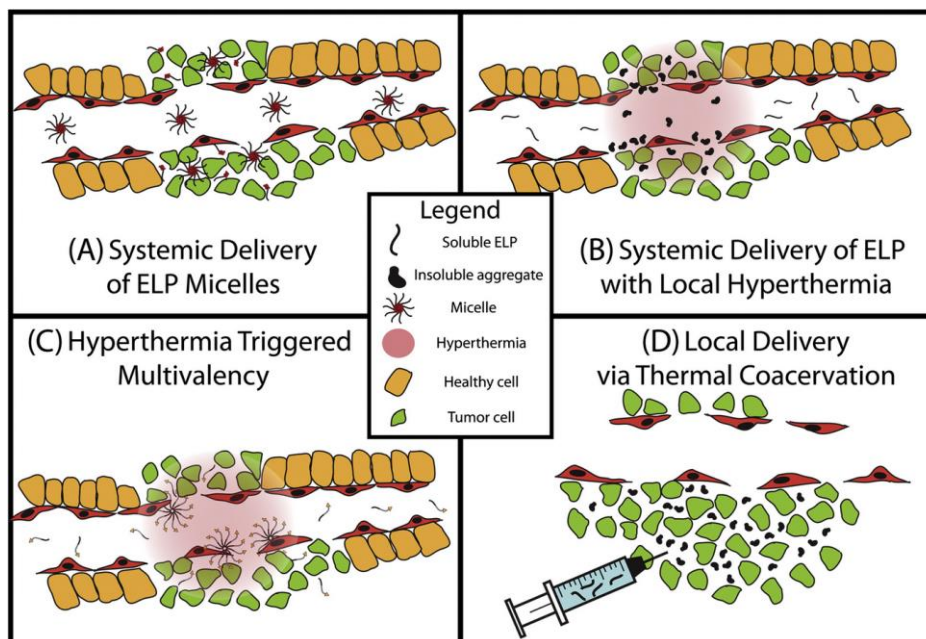


Figure I-21 : Exemples de systèmes de vectorisation à base d'ELP, avec une $T_{cp} < 37^{\circ}\text{C}$ (A) ou $T_{cp} > 37^{\circ}\text{C}$ (B, C, D). A : Administration de nanoparticules pouvant pénétrer dans la tumeur par effet EPR et/ou ciblage actif. B, C : Administration d'unimères d'ELP pouvant s'agréger (B) ou micelliser (C) au niveau de la tumeur par hyperthermie locale. D : Administration intra-tumorale d'unimères d'ELP pouvant former des agrégats ou un dépôt solide in situ. Reproduit de l'article de J.R. McDaniel, J.R Callahan et A. Chilkoti.²¹³

Ainsi, en choisissant judicieusement la T_{cp} de l'ELP, il est possible d'injecter des nanoparticules déjà formées ($T_{cp} < 37^{\circ}\text{C}$), ou au contraire de les former *in situ* par hyperthermie locale ($T_{cp} > 37^{\circ}\text{C}$).

Cette propriété facilite également la formation de dépôts sous-cutanés en permettant l'injection d'une solution peu visqueuse d'ELPs solubles ne formant un gel qu'à l'entrée dans l'organisme ($T_{cp} < 37^{\circ}\text{C}$). Cette technique a notamment été utilisée par l'équipe d'A. Chilkoti pour l'amélioration de la curiethérapie en allongeant le temps de rétention du radionuclide ^{131}I et en le protégeant de la dégradation par les déhalogénases.^{214–216}

Les propriétés des ELPs permettent donc leur utilisation dans des DDS variés. Quelques exemples sont détaillés ci-après.

I.A.3.2.1. Bioconjugués ELP-Principe Actif

Comme évoqué plus haut, les ELPs peuvent être directement conjugués à des principes actifs afin d'en améliorer entre autre la biodisponibilité, la solubilité, ou encore le temps de circulation.

Par exemple au début des années 2000, Dreher *et al.* ont formé des conjugués ELP-doxorubicine (DOX).^{166,217} Pour cela, ils ont inséré une lysine en extrémité de séquence, qu'ils ont ensuite fonctionnalisée pour exposer une fonction maléimide. Le couplage avec une DOX portant un groupement hydrazone a ainsi pu être effectué. L'avantage de ce lien réside dans sa sensibilité au pH acide. Ainsi, les auteurs espèrent sa rupture dans le microenvironnement tumoral ou après internalisation dans les lysosomes, libérant ainsi la DOX.

Plus tard, ce système a été amélioré en dotant l'ELP d'une extrémité riche en cystéines permettant l'addition de plusieurs DOX.²¹⁸ La présence de cette petite molécule hydrophobe en multiples exemplaires semble suffire pour induire un auto-assemblage micellaire (**Figure I-22**). Il est ensuite détruit en conditions acides par la rupture des liaisons DOX-ELP.

Les tests biologiques effectués chez des souris ont montré une bonne pharmacocinétique et accumulation des nanoparticules dans la tumeur, menant à sa régression complète. La même stratégie a été appliquée plus tard pour la combinaison d'un ELP-cystéine avec du Paclitaxel (PTX) ou de la niclosamide.^{219,220} Les résultats avec le PTX démontraient une meilleure efficacité que l'Abraxane, la formulation actuellement utilisée dans le traitement de certains cancers.

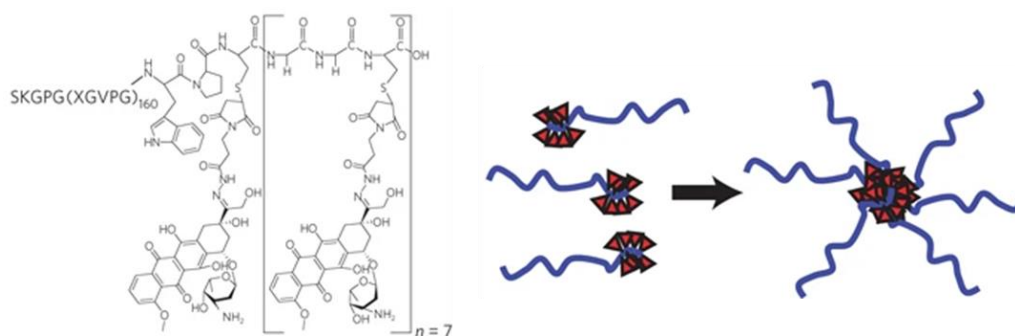


Figure I-22 : Couplage d'un ELP présentant une extrémité riche en cystéine avec de la doxorubicine (DOX) par chimie maléimide-hydrazone. La présence de la DOX hydrophobe entraîne l'auto-assemblage des conjugués en nanoparticules micellaires. Reproduit de l'article de Mackay *et al.*²¹⁸

De la même façon, Zhao *et al.* ont conjugué un ELP immunotolérant (iELP) de séquence (GAGVPG)₇₀(G₈C)₈ avec plusieurs exemplaires de Salinomycine (Sali).^{221,222} Ce principe actif est très efficace contre les cellules souches cancéreuses (CSCs, cf. **I.B.2.2.3**), mais également très toxique pour les cellules saines. Une délivrance contrôlée et ciblée est donc nécessaire. Le couplage de cette molécule hydrophobe avec les cystéines a été réalisé au moyen d'un lien hydrazone pH-sensible. L'espèce amphiphile ainsi formée s'auto-assemble en micelles pouvant encapsuler du PTX. Après internalisation, le pH acide des lysosomes est supposé permettre la libération du Sali, désassemblant la nanoparticule. Le Sali et le PTX pourraient alors agir en synergie pour détruire la tumeur et les CSCs.

Des tests *in vivo* ont été menés sur des souris porteuses de tumeurs du sein métastatiques. Le système a démontré son efficacité en diminuant la croissance tumorale et augmentant la survie comparé au Sali seul. Par ailleurs, la présence de Paclitaxel améliore encore ces bons résultats, en augmentant le taux de survie en l'absence de métastases.

I.A.3.2.2. Diblocs d'ELP

Parfois, un greffage covalent des principes actifs n'est pas possible ou pas souhaité. Il convient alors d'utiliser un nanovecteur pour une encapsulation physique. Pour cela, les copolymères à blocs d'ELP semblent prometteurs.

En 2000, l'équipe de V.P. Conticello a conçu pour la première fois un dibloc d'ELP capable de s'assembler réversiblement en structure micellaire en fonction de la température.⁷⁸ La juxtaposition des gènes codant pour deux séquences d'ELP distinctes a permis de former aisément un tel composé. La séquence peptidique du premier bloc [VPGEG-(IPGAG)₄]₁₄ contient des acides glutamiques (Glu, E) qui lui confèrent un caractère hydrophile. A l'inverse, le deuxième bloc possède une séquence [VPGFG-(IPGVG)₄]₁₆, que les résidus phénylalanine (Phe, F) rendent hydrophobe. La T_{cp} dépendant fortement de l'hydrophobie générale de la séquence, les deux blocs présentent des T_{cp} différentes, qui définissent son état en solution dans un milieu aqueux. À froid, lorsque $T < T_{cp(F)} < T_{cp(E)}$, le composé est totalement soluble. Lorsque la température augmente et dépasse la T_{cp} du bloc hydrophobe ($T_{cp(F)} < T < T_{cp(E)}$), celui-ci s'agrège tandis que le bloc hydrophile garde sa solubilité : l'ensemble acquiert un caractère amphiphile et s'assemble en nano-particules micellaires. Cette température est appelée "température critique de micellisation" (CMT). Si la température dépasse la T_{cp} du bloc le plus hydrophile ($T_{cp(F)} < T_{cp(E)} < T$), il devient également hydrophobe et les micelles laissent place à des agrégats. On parle alors de "température d'agrégation" (T_{ag}). En sélectionnant judicieusement les séquences des deux blocs et leur T_{cp} , il est possible de moduler la plage de températures sur laquelle cette structure micellaire est maintenue.

Depuis, la formation de tels diblocs d'ELPs et leur auto-assemblage ont été plus amplement étudiés.^{79,80,175,223} Ils ont notamment été cités pour des applications biomédicale et/ou d'encapsulation.²²⁴⁻²²⁷ Quelques exemples illustrent leurs promesses dans la lutte contre le cancer.

Ainsi, en 2013, Shi *et al.* ont développé un système ingénieux se basant sur deux diblocs amphiphiles d'ELP de séquences : [G(VPGIG)₄₈(VPGSG)₄₈Y] et [G(VPGFG)₂₄(VPGSG)₂₄Y].²²⁸ La température de micellisation est de 27°C pour le premier (I48S48) et inférieure à 4°C pour le second (F24S24). Une température d'agrégation de 85°C a été reportée pour I48S48. Dans un premier temps, les auteurs ont confirmé la possibilité d'une encapsulation physique de petites molécules en utilisant le Rose Bengale. Par la suite, ils ont conçu une protéine de fusion dans laquelle le gène codant pour le récepteur FKBP a été inséré à l'extrémité de celui du bloc hydrophile de l'ELP (**Figure I-23**). Ce récepteur est capable de se lier avec une forte affinité à la Rapamycine (Rapa), une molécule antiproliférative et anticancéreuse.

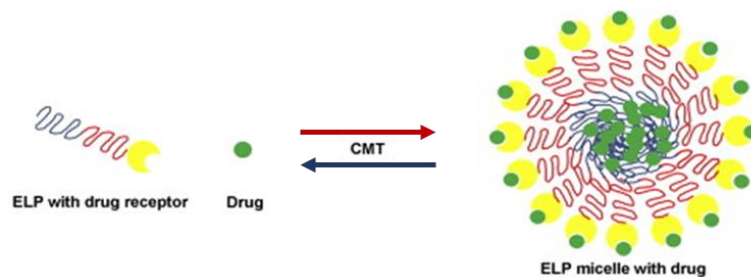


Figure I-23 : Principe de fonctionnement du système développé par Shi *et al.* pour une double encapsulation de molécules anticancéreuses. Utilisation d'un dibloc d'ELP (rouge : bloc hydrophile, bleu bloc hydrophobe fonctionnalisé par le récepteur (jaune) d'un principe actif (vert). Au-dessus de la CMT, formation de nanoparticules encapsulant l'actif à la fois dans le cœur hydrophobe, et sur la couronne par interaction ligand-récepteur. Adapté de l'article de Shi *et al.*²²⁸

La Rapa étant insoluble dans l'eau, une technique par évaporation de solvant a été mise en place pour son encapsulation. De par la conception du système, celle-ci peut être double : en effet, la Rapa peut être emprisonnée de manière physique dans le cœur hydrophobe des nanoparticules d'ELP, mais également piégée en surface par son affinité pour le récepteur FKBP. L'utilisation de ce système permettrait donc non seulement d'améliorer sa solubilité dans le sang, mais également de contrôler sa libération. En effet la Rapa contenue dans le cœur de la micelle présente un temps de demi-vie assez court ($\approx 2h$), mais les 30% piégés en surface par le FKBP restent de façon prolongée ($t_{1/2} \approx 58h$). Testé *in vivo*, ces micelles semblent plus efficaces et moins toxiques que la Rapa seule. Ce système est donc prometteur, bien que certains points demeurent encore inexpliqués, tels que le mécanisme de libération de la Rapa du FKBP, ou encore l'influence de la libération en deux temps sur l'efficacité du traitement.

Un autre exemple très complet a été récemment conçu par S.A. Costa *et al.*, du groupe d'A. Chilkoti.²²⁹ Il s'agit d'un système composé d'une base formée par un dibloc d'ELPs de séquence [(VPGVG)₈₀(VPGSG)₈₀] (Figure I-24). L'extrémité de son bloc hydrophile a été fonctionnalisée avec le nanocorps EgA1. Celui-ci est capable de se lier avec le récepteur épithélial de facteurs de croissance (EGFR), surexprimé dans de multiples cancers (*e.g.* sein, ovaire, poumon, cerveau, carcinomes). A l'opposé, l'extrémité C-terminale du bloc hydrophobe comprend un acide aminé non naturel pAcF. Celui-ci présente une cétone fonctionnalisable de façon bio-orthogonale, permettant de ne pas altérer les résidus cystéine ou lysine. Sur cet acide aminé, une molécule de DOX a été greffée, au moyen d'un lien oxime pH-sensible.

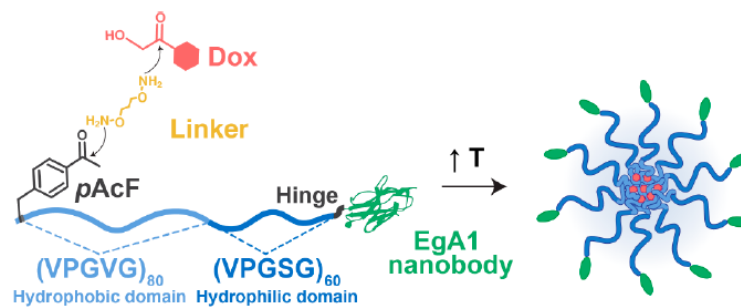


Figure I-24 : Nanovecteur à base de dibloc d'ELP amphiphile, permettant une présentation du nanocorps EgA1 en surface et un couplage covalent pH-sensible avec la Doxorubicine. Reproduit de l'article de S.A. Costa *et al.*²²⁹

Les auteurs expliquent le fonctionnement de ce système comme suit : lorsqu'il est placé en solution dans un milieu aqueux, l'augmentation de la température entraîne la micellisation, du fait de l'agrégation du bloc hydrophobe. La DOX se place dans le cœur de cette micelle, tandis que le nanocorps est déployé sur la surface. Il assure alors le ciblage actif de la tumeur, par interaction multivalente avec son récepteur. Une fois celle-ci atteinte, la nanoparticule est internalisée et se retrouve dans les lysosomes. Là, le pH acide brise le lien oxime et libère la DOX, qui peut alors accomplir son action anticancéreuse.

Une étude *in vitro* a été menée sur deux lignées cellulaires cancéreuses : l'une sur-exprimant le récepteur EGFR et très sensible à la DOX (A431), et l'autre ayant une expression moyenne d'EGFR et n'étant que peu sensible (SKOV3). Elle conclue à un IC₅₀ significativement réduit pour les nanoparticules présentant le nanocorps EgA1 à leur surface. Cela témoigne de l'efficacité de la multivalence dans le ciblage actif. Par ailleurs, les témoins sans DOX ne semblent pas cytotoxiques.

Les auteurs déclarent ainsi avoir mis au point un système non toxique et biodégradable, sensible à la température et au pH, permettant un ciblage actif des cellules cancéreuses EGFR⁺, et dont la libération de la DOX est contrôlée. La présence d'un acide aminé non naturel implique un couplage des molécules actives sur l'ELP permettant la conservation de l'intégrité du ligand ciblant, y compris si celui-ci contient des résidus lysine ou cystéine. En revanche, elle peut également complexifier la production recombinante et en diminuer le rendement. Des tests *in vivo* sont en cours afin de confirmer ces résultats néanmoins prometteurs.

I.A.3.2.3. Copolymères hybrides à base d'ELPs

Les nanovecteurs composés de diblocs d'ELPs présentent donc de nombreux avantages. Cependant, l'association avec d'autres espèces telles que des peptides²³⁰⁻²³⁴, des lipides^{232,235-239}, des polymères synthétiques^{159,160,188,240}, ou encore des nanoparticules inorganiques^{234,241-245}, peut permettre d'accéder à des propriétés spécifiques ou des structures supramoléculaires plus variées. Certains exemples sont listés en **Figure I-25** :

Synthetic motif	ELP sequence	Method of appendment	Self-assembling behavior	References
Palmitoyl chain	(VPGXG) ₃ ; X = A/I/V	Synthetic: Fmoc-chemistry	Nanofiber	[159]
Myristoyl chain	(VPGXG) ₄₀₋₁₂₀ ; X = A:V 9:1	Recombinant: PTM	Spherical micelle	[160]
Peptide amphiphile	(VPGVG) ₄₀	Recombinant: PTM	Dynamic: worm-like to nanofiber	[161]
Peptide amphiphile	[(VPGVG VPGEGVPGVG VPGVG) ₁₀ -(VGIPG) ₆₀] ₂ - [(VPGIG) ₁₀ -AVTGRGDSPASS(VPGIG) ₁₀] ₂	Physical mixing	Dynamic: membrane to 3D tube	[162]
Cholesterol	[G(V8/A2)GVP] ₁₀ GKG]	Recombinant: PTM	Ellipsoid micelle	[161]
DSPE-PEG	(VPGVG) ₂₀ (VPGVG) ₁₂₈	Synthetic: NHS-chemistry	Liposomes	[163,164]
Stearyl	(VPGVG) _{2,6}	Synthetic: coupling chemistry	Liposomes	[165-167]
p-azidophenyl alanine	(VPGVG) ₂₀ & (VPGVG) ₂₀ -(VPGSG) ₈₀	Recombinant: UAA technology	Nano to microscale gel particle	[168]
PEG	(VPGXG) ₄₀₋₁₃₀ ; X = V:L:G 5:2:3	Synthetic: SPAAC	Spherical micelle	[169]
PAA	(VPGVG) ₂	Synthetic: Cu-catalyzed click reaction	Spherical aggregate	[170]
PBLG	[(VPGVG)(VPGMG)(VPGVG) ₂] ₁₀	Synthetic: ROP	Spherical micelle, worm-like, vesicle	[171]
Silica	(VPGVG) ₆₀ -(VPGXG) ₆₀ ; X = A:G 1:1	Synthetic: Silification	Clustered sphere to discrete particle	[172]

Self-assembly behavior depends on extrinsic parameters like temperature, concentration, solvent, self-assembling technique, etc. These parameters have been described in the text but not in this table.

Figure I-25 : Exemples de copolymères hybrides d'ELP associés à des lipides, des peptides, des polymères synthétiques, ou encore de la silice. Explicitation de leur méthode de synthèse et de l'objet obtenu après auto-assemblage. Reproduit de l'article de revue de Saha et al.⁷⁵ (Les références indiquées en dernières colonne sont celles de l'article).

L'association hybride la plus courante est celle d'un ELP avec des peptides courts et bioactifs. Elle permet souvent d'améliorer le ciblage, l'internalisation dans les cellules ou encore d'apporter une action anticancéreuse.²³⁰⁻²³⁴ Elle est généralement aisée car générée dès le départ par une fusion des gènes codant pour l'ELP et pour le peptide. De plus, la petite taille du peptide n'induit pas de grandes perturbations dans les propriétés physico-chimiques de l'ELP, ce qui permet de conserver un contrôle de la thermosensibilité. Il est intéressant de noter que les exemples de DDS formés par des diblocs d'ELPs détaillés plus haut étaient fusionnés avec un peptide : le FKBP permettait le piégeage de la Rapa en surface du DDS de Shi et al.²²⁸ tandis que le nanocorps EgA1 assurait le ciblage des tumeurs dans celui de Costa et al.²²⁹ Ces peptides fonctionnalisent également souvent la surface des nanoparticules hybrides d'ELPs. Actuellement, les DDS à base d'ELP présentant des peptides à leur surface semblent les plus prometteurs pour les applications biomédicales.

Parfois, l'association avec des peptides plus longs peut être intéressante pour obtenir des structures ou des comportements plus complexes. Par exemple, en 2017, l'équipe d'A. Chilkoti a synthétisé des copolymères à blocs à partir de peptides inspirés de l'élastine (ELP) et de la résiline (RLP)¹⁵³. De façon analogue aux ELPs, les RLP possèdent une propriété de thermosensibilité, mais de type UCST. Le couplage de ces deux peptides au sein d'un même dibloc lui confère donc une réponse à la température très particulière : ainsi, le copolymère RLP₄₀-ELP_{S,80} se présente sous forme micellaire en dessous de la T_t du bloc RLP (T < 35°C). En effet, ce dernier est alors hydrophobe et se place au cœur de la micelle, tandis que le bloc ELP est hydrophile et se déploie en couronne. Lorsque la température dépasse les 35°C, les blocs ELP et RLP sont tous deux hydrophiles, le composé est donc soluble. À 58°C, la T_{cp} de l'ELP est atteinte et il devient hydrophobe. La structure micellaire est cette fois inversée, avec un cœur d'ELP hydrophobe et une couronne de RLP hydrophile. Cette inversion peut être utilisée pour la présentation en surface de différents ligands en fonction de la température. Par ailleurs, la séquence et la taille relative de chaque bloc sont directement liées à la morphologie adoptée par l'assemblage (sphérique ou cylindrique) et aux températures de transition.

De la même façon, il est possible d'associer les ELPs avec des lipides. Plusieurs systèmes ELP-lipides ou ELP-liposomes ont ainsi été décrits.^{232,235-239} Un de ces systèmes lipide-ELP à avoir démontré une efficacité anticancéreuse a été développé en 2017 par K.M. Luginbuhl *et al.* (**Figure I-26**).¹⁵⁴ La synthèse de ce composé repose sur une modification post-traductionnelle : la N-myristoyltransferase (NMT) est coexprimée chez *E. coli* avec un ELP porteur d'une courte séquence de reconnaissance. Après sa synthèse, la NMT reconnaît la séquence et ajoute un acide myristique ($C_{14}H_{28}O_2$) à l'extrémité N-terminale de l'ELP, la réaction entre les deux formant un lien amide. La forte hydrophobie de la chaîne C_{14} confère un caractère amphiphile à l'ensemble qui s'autoassemble en micelles ou en nanobâtonnets. La température à laquelle cet assemblage a lieu peut être modulée par la séquence et la taille de l'ELP.

Ces objets ont été utilisés pour encapsuler du PTX ou de la DOX par diffusion dans un milieu aqueux : ceux-ci migrent en effet spontanément vers le cœur hydrophobe formé par les chaînes lipidiques. Les auteurs affirment que cette méthode permet un taux d'encapsulation supérieur à celui obtenu par un dibloc d'ELP, confirmant l'intérêt de l'utilisation du lipide.

Des études *in vitro* et *in vivo* ont cependant donné des résultats mitigés : en effet, l' IC_{50} des principes actifs encapsulés est bien plus élevé que celui de l'actif libre (x4 pour la DOX, x20 pour le PTX). Ce système est donc moins efficace. En revanche, l'encapsulation améliore le temps de demi-vie dans le sang et la biodistribution. Les auteurs restent néanmoins confiants, car la synthèse recombinante permet d'ajouter de façon simple un ligand à l'extrémité de l'ELP, qui rendrait possible un ciblage actif des cellules cancéreuses et pouvant ainsi améliorer l'efficacité de leur système. Il est intéressant de noter que cette technique a été utilisée par la suite pour former des bioconjugués ELP-Cholestérol, appliqués au traitement du diabète de type II.¹⁵⁶

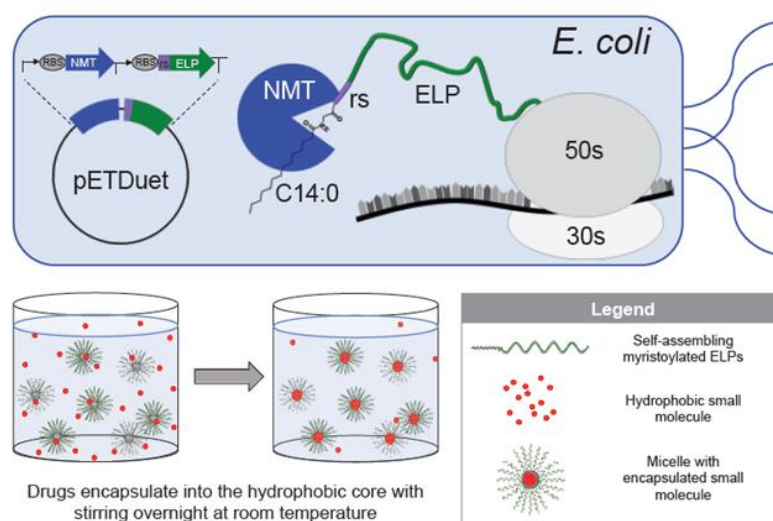


Figure I-26: Élaboration du nanovecteur ELP-myristolé (M-ELP) par K.M. Luginbuhl *et al.* Haut : principe de la myristoylation de l'ELP. Bas : Encapsulation d'un principe actif hydrophobe (rouge) par diffusion dans le cœur lipidique des micelles de M-ELP. Schéma reproduit de leur article.¹⁵⁴

Une autre possibilité est l'intégration d'hybrides ELP-lipides dans la membrane de liposomes. Ils ont alors deux fonctions majeures : ils sont souvent porteurs de peptides permettant le ciblage et/ou l'internalisation et permettent une déstabilisation de la membrane avec la température. En effet, des études faites sur des bicouches lipidiques contenant des ELPs ont montré que leur changement de conformation à haute température était capable de perturber les membranes désordonnées.^{246,247}

C'est le choix fait par M.S. Kim *et al.* en 2014 (**Figure I-27**).²³⁹ Ils proposent un système de liposome, composé de phospholipides (DSPC ou DPPC), encapsulant de la DOX. Afin de cibler les cellules cancéreuses, sa surface a été fonctionnalisée par un PEG supportant un peptide cyclique porteur de la séquence RGD (c-RGD). Celui-ci est capable de reconnaître les intégrines $\alpha\beta_3$, surexprimées notamment lors de l'angiogenèse tumorale.

Ce segment ciblant PEG-cRGD a été inséré dans la membrane du liposome grâce à un bloc lipidique DSPE. La libération de la DOX, quant à elle, est contrôlée par un ELP très court de séquence (VPGVG)₃, ancré dans la bicouche par couplage avec un acide stéarique. L'objectif des auteurs avec ce système serait que lors de son administration dans l'organisme, le PEG empêche l'activation du complément et assure la furtivité du liposome. Celui-ci ciblerait la tumeur, aussi bien par effet EPR (passif) que par reconnaissance des intégrines par le peptide c-RGD (actif). Cette reconnaissance permettrait l'internalisation dans les endosomes et lysosomes. L'application d'une hyperthermie locale (42°C) rendrait alors l'ELP hydrophobe. L'agrégation de celui-ci déstabiliserait la bicouche et permettrait la libération de la DOX dans le cytoplasme.

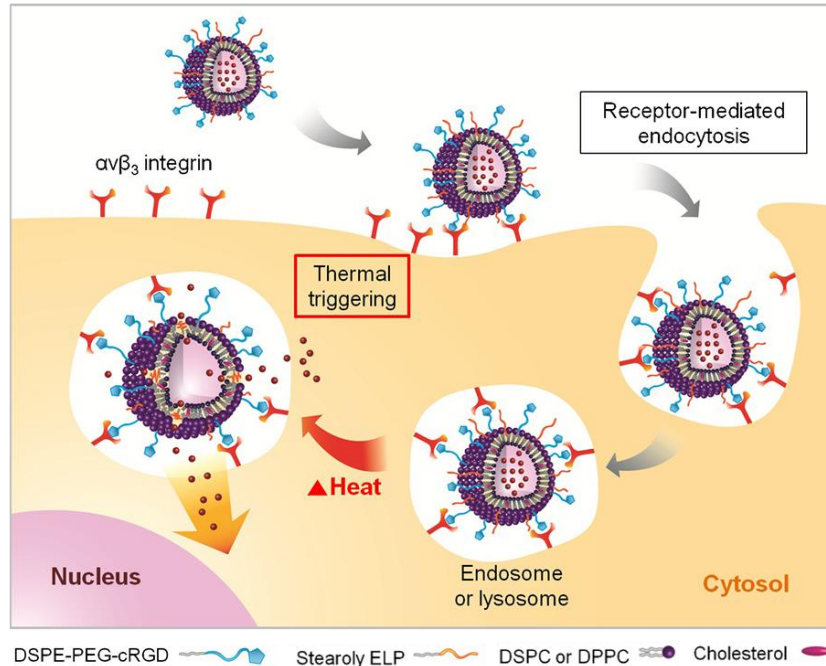


Figure I-27 : Principe de fonctionnement du DDS liposomal développé par M.S. Kim *et al.* Le liposome est constitué de phospholipides DSPC ou DPPC et fonctionnalisé par des chaînes PEG-cRGD (bleu) et ELP (orange). Après reconnaissance du peptide cRGD par les intégrines $\alpha v \beta_3$, le liposome est internalisé. L'application locale d'une hyperthermie permet la déstabilisation de la membrane par la transition de phase inverse de l'ELP et la délivrance de la DOX dans le cytoplasme. Adapté de leur article.²³⁹

Ce liposome s'est révélé très stable dans des conditions physiologiques. Par ailleurs des études *in vitro* ont prouvé l'efficacité du ciblage actif en comparant l'effet des liposomes avec ou sans peptide c-RGD sur des cellules sur-exprimant ou dépourvues d'intégrines $\alpha v \beta_3$. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* avec une accumulation 5 fois plus importante pour les liposomes présentant le peptide c-RGD à leur surface. Concernant la libération de la DOX, la combinaison du ciblage c-RGD et de l'hyperthermie semble avoir conféré à l'ensemble une cytotoxicité plus importante que ces deux éléments pris séparément. Par la suite, cette équipe a développé une technique de libération par ultrasons permettant d'augmenter l'accumulation locale de ces liposomes en complément ou en remplacement du traitement thermique.²⁴⁸⁻²⁵⁰

Le couplage d'un ELP avec un polymère synthétique est plus rare. Cela apporte pourtant une grande versatilité, du fait des propriétés extrêmement variées de ces derniers.

L'association avec le PEG par J.C.M. Van Hest et son équipe a déjà été évoquée (cf. **I.A.2.2.3**). Une autre technique consiste à synthétiser des copolymères à blocs par polymérisation par ouverture de cycle (ROP). Elle a notamment été utilisée au LCPO par G. Le Fer *et al.* pour former des hybrides ELP-PBLG¹⁶⁰, ou par T.H.H. Chen *et al.* pour un dibloc ELP-poly(L-acide aspartique)¹⁸⁸. L'obtention d'hydrogels à partir de triblocs PTMC-ELP_A-ELP_B a également été rapportée.²⁴⁰ Malheureusement, si le mécanisme d'assemblage et les caractérisations physico-chimiques de tels conjugués sont très étudiés, peu d'études présentent leurs applications biologiques.^{188,251}

Enfin les ELPs peuvent être utilisés pour la fonctionnalisation de surface de nanoparticules inorganiques, en particulier pour des applications de thérapie photothermique.^{234,241–245} Un tel système a été élaboré par M. Sun *et al.* (**Figure I-28**).²⁴⁴ Un ELP de séquence (VPGVG)₆₀ comportant une cystéine à l'extrémité N-terminale a été greffé sur la surface de nanoparticules d'or (AuNP) par liaison covalente thiol-or. Sa T_{cp} de 23°C permet un contrôle de l'état en solution des ELP-AuNP par la température. En-dessous, les ELPs hydrophiles se déploient en couronne et empêchent le rapprochement des nanoparticules par gêne stérique, tandis qu'au-dessus l'agrégation des ELPs entraîne celle des AuNP. Les auteurs décrivent alors le mécanisme d'action de leur système, après une administration intra-tumorale de nanoparticules stables d'environ 12 nm de diamètre. La température corporelle, supérieure à la T_{cp} , entraîne l'agrégation des AuNP en collier ou en filaments. La proximité des nanoparticules permet alors une réponse photothermique conséquente lors d'une irradiation dans le proche infrarouge (NIR), qui conduit à la destruction des cellules cancéreuses.

Des comparaisons *in vitro* et *in vivo* ont ainsi été menées entre des ELP-AuNP et des PEG-AuNP, avec et sans irradiation laser. Les groupes combinant les ELP-AuNP et la NIR ont montré une annihilation complète des tumeurs, sans rechute ni mortalité précoce, contrairement à tous les autres groupes. Outre ces très bons résultats en thérapie photothermique, ce système peut également servir pour de l'imagerie : par rayon X (CT-Scan ou tomodensitométrie), photothermie (PT), ou photoacoustique (PA). Il propose donc une action complète de théranostique tout en conservant une bonne biocompatibilité. Cependant, la nécessité d'une injection intra-tumorale limite pour l'heure ses applications.

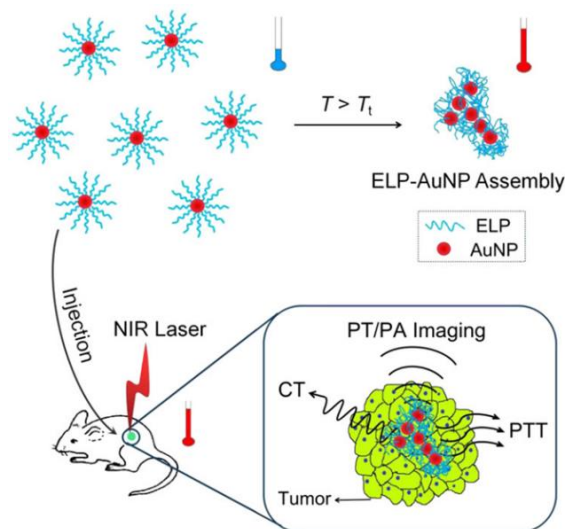


Figure I-28 : Contrôle de l'agrégation de nanoparticules d'or (AuNP) grâce à la fonctionnalisation de leur surface par des ELPs (T_{cp} inférieure à la température corporelle). Après injection dans la tumeur, l'agrégation des AuNP permet leur utilisation efficace dans des applications variées de tomodensitométrie (CT), d'imagerie et de thérapie photothermiques (PT & PTT) et photoacoustiques (PA). Reproduit de l'article de M. Sun *et al.*²⁴⁴

I.A.3.2.4. L'hyperthermie locale pour l'amélioration des traitements

De nombreux exemples développés précédemment nécessitent une variation de la température pour induire un effet (e.g. libération d'actifs, changement de conformation, thérapie photothermique). L'hyperthermie locale a donc un rôle propre dans l'efficacité de ces traitements en devenir.

A. Chilkoti *et al.* ont ainsi prouvé qu'un ciblage actif des tumeurs était possible, non pas par l'intermédiaire d'une reconnaissance ligand-récepteur, mais simplement par application d'une hyperthermie localisée.^{252–255} En 2006, ils ont produit par voie recombinante deux ELPs marqués au ¹⁴C de séquence (VPGXG) avec X = V, A, G en ratio 5:2:3 pour l'ELP₁ et 1:8:7 pour l'ELP₂. Les T_{cp} sont égales à 40°C et 56°C pour les ELP₁ et ELP₂ respectivement. La T_{cp} de l'ELP₂ étant bien supérieure à la température corporelle, il sert de témoin "non-thermosensible" dans la gamme de températures étudiée.

Une biodistribution de ces deux ELPs a été effectuée sur un modèle murin avec et sans application d'une hyperthermie (42°C) au niveau de la tumeur. Conformément aux prédictions, celle-ci n'a pas eu d'influence sur la biodistribution de l'ELP₂, qui ne présente qu'une accumulation faible dans la tumeur. Le même résultat a été observé pour l'ELP₁ sans hyperthermie. En revanche l'augmentation de la température au niveau de la tumeur y a entraîné une accumulation significativement plus élevée de l'ELP₁. Ainsi, le ciblage d'un DDS composé d'ELP peut être amélioré par l'application d'une hyperthermie locale.

Cette propriété d'assemblage et de désassemblage *in situ* en fonction de la température présente de nombreux avantages. Ainsi, une cryothermie locale peut permettre un désassemblage de nanoparticules d'ELP par resolubilisation, et une libération de la molécule cargo qu'elles contiennent. À l'inverse, une hyperthermie peut mener à l'auto-assemblage local de nano-objets. Cette capacité d'auto-assemblage *in situ* a notamment été utilisée pour contrôler la présentation multivalente de ligands et les effets qui en découlent.

Cet effet de multivalence est fondamental dans de nombreux processus biologiques. En 1998, Whitesides *et al.* ont défini les bases du principe de multivalence et illustré son implication en biologie, notamment dans l'association des virus avec les cellules, dans la communication entre elles, ou encore dans la réplication et traduction de l'ADN.²⁵⁶ La multivalence, par la combinaison de plusieurs interactions ligand-récepteur faibles, donne lieu à une interaction très forte. Elle permet aussi de graduer une réponse biologique, en évitant un fonctionnement binaire de type "0 ou 1". Ainsi, une unique interaction entre un ligand et un récepteur n'est souvent pas suffisante pour déclencher une cascade signalétique. En revanche, une importante concentration locale en ligands rend possible une interaction multivalente forte entre eux et un ou plusieurs récepteurs, pouvant déclencher ces cascades biologiques.²⁵⁶ Une bonne compréhension du phénomène de multivalence permettrait donc une amélioration des traitements, à travers celle de l'interaction entre un nanovecteur et sa cible.²⁵⁷ En particulier, le contrôle de la présentation monovalente ou multivalente d'un ligand pourrait augmenter nettement la sélectivité des traitements envers les cellules malades, et par conséquent limiter fortement les effets secondaires.

L'utilisation de la thermosensibilité des ELPs comme moyen de contrôle de la multivalence est de plus en plus étudiée.^{94,224,258,259} En effet, un dibloc d'ELP dont la CMT est légèrement supérieure à la température corporelle se trouve en théorie à l'état d'unimère dans la circulation sanguine. S'il porte un ligand, il n'est alors capable que d'interaction monovalente avec un éventuel récepteur, ce qui n'est pas suffisant pour mener à son internalisation. En revanche, lorsqu'il atteint une zone échauffée localement, son auto-assemblage avec d'autres diblocs permet la présentation de plusieurs ligands en surface de l'objet. Ceci entraîne une forte augmentation de leur concentration locale et rend possible des interactions multivalentes et une internalisation. (**Figure I-29**).²²⁴ Ce type de systèmes permet donc de cibler sélectivement des cellules tumorales surexprimant des récepteurs pourtant également présents sur des cellules saines grâce à une hyperthermie locale.

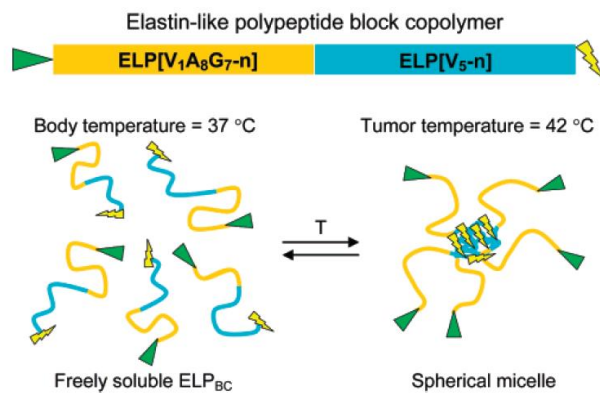


Figure I-29 : Exemple d'utilisation d'un dibloc d'ELP pour la présentation monovalente ou multivalente d'un ligand en fonction de la température. Le dibloc est composé de deux blocs hydrophile (jaune) et hydrophobe (bleu) couplé à un ligand (vert) et un principe actif (éclair jaune). La variation de température permet de passer d'unimères à une micelle sphérique présentant plusieurs copies du ligand en surface. Reproduit de l'article de M.R. Dreher.²²⁴

Récemment l'équipe d'A. Chilkoti a mené une étude approfondie sur l'effet de la multivalence en fonction de la densité locale de ligands et de récepteurs (**Figure I-30**).²⁵⁹ Pour cela, ils ont synthétisé des diblocs d'ELPs de séquence [(VPGXG)₄₀(VPGSG)₄₀] avec X = W/V (1:4), dont l'extrémité N-terminale est fusionnée avec un peptide EC1 à travers un lien K₈D₄. Les diblocs avec et sans ligands sont respectivement notés ELP_{BC}-K₈D₄-EC1 et ELP_{BC}-K₈D₄. Des micelles présentant le peptide EC1 à leur surface sont ensuite formées par coassemblage entre les ELP_{BC}-K₈D₄-EC1 et ELP_{BC}-K₈D₄, la densité de ligand étant contrôlée par le ratio entre ces deux composés. Cinq densités de ligands ont ainsi été obtenues. Le peptide EC1 est le ligand du récepteur membranaire ErbB2 qui est surexprimé dans 30% des cancers du sein et est associé à un phénotype agressif. Dans cette étude, l'expression de ce récepteur ERbB2 par des cellules de cancer du sein (SK-BR3 et MCF-7) a été précisément modulée pour atteindre 11 densités de récepteur différentes. Une comparaison systématique de chacune des combinaisons possibles entre ces micelles et ces cellules a ensuite été effectuée par spectroscopie de résonance de plasmon de surface (SPR) et par cytométrie en flux.

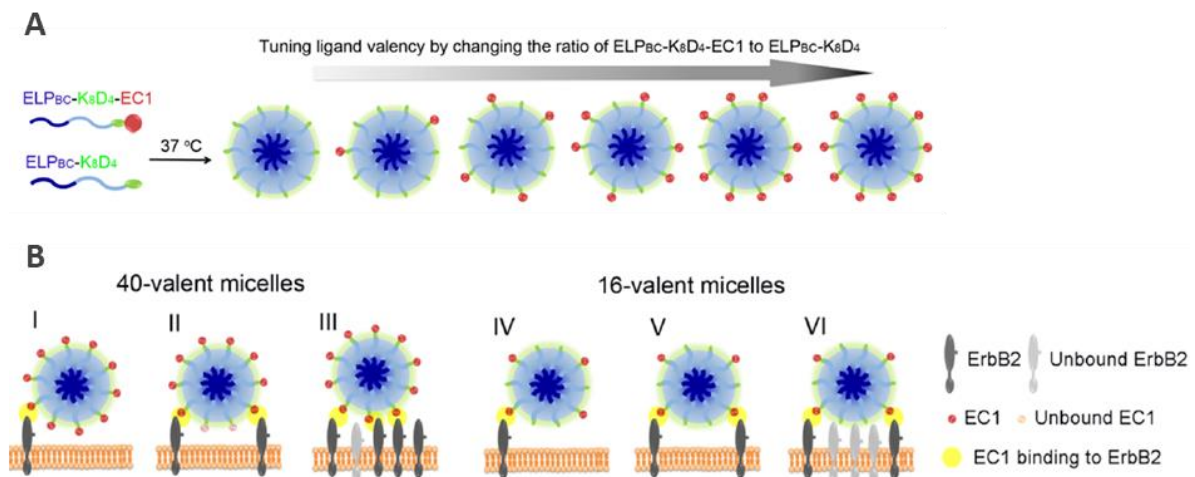


Figure I-30 : Étude de la multivalence en fonction du nombre de ligands EC1 présentés à la surface de micelles d'ELP et du nombre de récepteurs ErbB2 exprimés à la surface de cellules cancéreuses génétiquement modifiées. A : synthèse de nanoparticules par auto-assemblage de diblocs d'ELPs porteurs du ligand EC1 ou non. La concentration en ligand est contrôlée par la proportion d'ELP-EC1 dans la micelle. B : Comparaison de 6 situations comprenant 2 densités de ligands et 3 densités de récepteurs. I et IV : interaction monovalente, nombreux ligands non liés. II : Interaction faiblement multivalente, nombreux ligands non liés. III : Interaction fortement multivalente, quelques ligands et récepteurs non liés. V : interaction multivalente équilibrée, peu de ligands non liés. VI : Interaction faiblement multivalente, nombreux récepteurs non liés. Adapté de l'article de Wang et al.²⁵⁹

Plusieurs cas de figures ressortent de leur étude : si la densité de ligands est très supérieure à celle des récepteurs, alors l'interaction est faible et de nombreux ligands sont inutiles (situations I et II). Inversement, une trop faible densité de ligands pour un grand nombre de récepteurs conduit à une interaction plus faible que ce qu'il serait possible d'obtenir (situation VI). Un équilibre entre la quantité de ligands et de récepteurs disponibles mène au contraire à une interaction multivalente forte et efficace (situations III et V).

L'étude de l'avidité normalisée par ligand a permis aux auteurs de définir une gamme de densité de ligands et de récepteurs idéale : ils concluent qu'un ratio de densité récepteur/ligand de 0,7-4,5 et un minimum d'environ 1.6 interaction ligand-récepteur sont nécessaires pour induire l'internalisation des micelles par endocytose. Ils catégorisent ensuite les patients souffrant de cancer en fonction du niveau d'expression du récepteur ErbB2 par leur tumeur : les bas-ErbB2, les haut-ErbB2 et les ErbB2 intermédiaires. À partir de toutes ces données, ils sont capables de prédire la réponse de chacun de ces groupes à un nanovecteur en fonction de la densité de ligands EC1 présent en surface. Ceci permet de rationaliser les traitements en fournissant à chacun le nanovecteur le plus adapté à son cas et le plus efficace.

L'étude, la compréhension et le maintien de cette multivalence sont donc primordiaux pour l'efficacité du ciblage et de l'internalisation.

Or, la concentration possède une forte influence sur la T_{cp} des ELPs. Il est probable que les résultats modestes obtenus par certains systèmes *in vivo* proviennent d'un désassemblage non contrôlé *in situ*, engendrant une perte de la multivalence. En effet, si la T_{cp} est bien inférieure à la température corporelle pour une solution d'ELP avant administration, le passage dans le sang entraîne une dilution importante et très rapide. La T_{cp} augmentant avec la dilution, elle peut devenir supérieure à 37°C et mener au désassemblage du DDS.

Pour éviter ce problème, une réticulation du cœur de la nanoparticule peut se révéler nécessaire. Très récemment, P. Weber *et al.* ont illustré ce principe en synthétisant des copolymères à blocs hybrides RLP-ELP fusionnés avec des ligands anticancéreux (Figure I-31).²⁶⁰

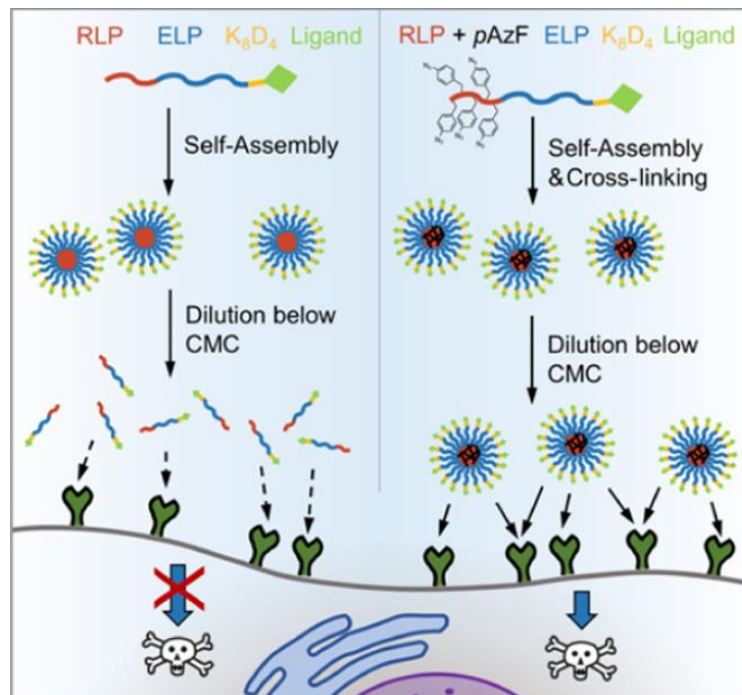


Figure I-31 : Illustration de l'utilité de la réticulation pour le maintien de l'assemblage micellaire, de la multivalence et de l'efficacité d'un DDS RLP-ELP-ligand. Gauche : perte de la multivalence du fait du désassemblage *in situ* des micelles sous l'effet de la dilution. Droite : Maintien de la multivalence et de l'activité anticancéreuse grâce à la réticulation du cœur des micelles. Reproduit de l'article de P. Weber *et al.*²⁶⁰

Le bloc RLP a été modifié par ingénierie génétique pour incorporer dans sa séquence plusieurs exemplaires de l'acide aminé non naturel *para*-azidophénylalanine (*pAzF*). Les micelles ont été formées par auto-assemblage et exposées aux UV. Les résidus *pAzF* ont alors formé des liaisons covalentes intra- et intermoléculaires, assurant ainsi la réticulation du cœur RLP hydrophobe. Ceci empêche le désassemblage dû à la concentration et à la température. Une comparaison a été effectuée *in vitro* et par SPR entre des micelles réticulées et non réticulées à des concentrations supérieures et inférieures à la concentration micellaire critique (CMC). Les résultats ont confirmé l'utilité de la réticulation. En effet, en dessous de la CMC ($\approx 1 \mu\text{M}$), les micelles simples se désassemblent et perdent leur activité anti-cancéreuse tandis que celles dont le cœur est réticulé la conserve jusqu'à une dilution 1000 fois plus importante. Leur bioactivité est donc nettement améliorée. Les auteurs concluent quant à la grande efficacité de leur système, dont la stabilité est maintenant assurée et permet le maintien de la multivalence et de l'internalisation.

En conclusion, les ELPs présentent donc de nombreux atouts. Polymères bioinspirés, leur production recombinante permet un contrôle parfait de la séquence primaire et de la masse molaire, pour l'instant inégalé par les polymères synthétiques. Ceci permet notamment des études structure-propriété précises. Parmi elles, la thermosensibilité de type LCST est particulièrement prometteuse : l'agrégation réversible des ELPs peut en effet être contrôlée par de nombreux paramètres structuraux (*e.g.* hydrophobie, masse molaire) ou environnementaux (*e.g.* concentration, sels). Le maintien de cette propriété lors du couplage avec une autre (macro)molécule permet la formation d'espèces amphiphiles sur une gamme de température et de concentration et un auto-assemblage en nano-objets de morphologies variées.

Ceci, couplé à une bonne biocompatibilité et biodégradabilité, a été mis à profit dans la recherche à l'interface de la chimie et de la biologie. En particulier, les ELPs sont de plus en plus utilisés pour la formation d'hydrogels ou de nanovecteurs pour la délivrance de principes actifs. Leur thermosensibilité leur confère en effet un caractère contrôlable à travers la réponse aux variations de température qui peut alors être utilisé pour la libération locale de principes actifs, notamment anticancéreux.

Une autre application prometteuse est la modulation de l'affinité d'une interaction ligand-récepteur à travers le contrôle de la multivalence. Le couplage d'un ligand sur un ELP permet en effet sa présentation sous forme de chaîne libre (interaction monovalente) ou à la surface d'une nanoparticule (interaction multivalente). Cette variation de formulation a montré une forte influence sur l'affinité et l'avidité de la reconnaissance du ligand par son récepteur. Une meilleure compréhension des conditions optimales de cet effet de multivalence pourrait être fondamentale pour l'amélioration de l'efficacité et de la sélectivité de futurs nanovecteurs.

Ce travail de thèse porte sur la synthèse un composé hybride ELP-*b*-polysaccharide soluble à froid et pouvant s'auto-assembler sous forme de nanoparticule à une température proche de celle du corps humain. La sélection d'un polysaccharide reconnaissant un récepteur surexprimé à la surface de cellules cancéreuses permettrait à la fois leur ciblage actif et une étude de l'effet de multivalence induite par la température sur l'interaction avec celles-ci.

I.B. Le hyaluronane et le récepteur CD44 : pour un ciblage actif des tumeurs

La nécessité de recourir à un ciblage actif des tumeurs est de plus en plus prise en compte dans l'élaboration de systèmes anticancéreux. Il doit permettre d'augmenter la concentration locale en principe actif et donc l'efficacité du traitement, tout en limitant ses effets secondaires.²⁶¹ Parmi les couples ligand-récepteur existants pour ce ciblage, le couple hyaluronane-CD44 est particulièrement étudié.^{262,263} Le CD44 est un récepteur surexprimé à la surface des cellules cancéreuses dans de nombreux cancers. C'est notamment un marqueur des cellules souches cancéreuses (CSCs), qui sont responsables des rechutes après traitement. Par ailleurs, il participe à un mécanisme d'internalisation indépendant des clatherines. Son ligand principal est le hyaluronane (HA). C'est un polysaccharide naturellement présent dans l'organisme et qui présente un caractère biocompatible* et biodégradable.²⁶² Ses propriétés chimiques et physico-chimiques particulières en font un excellent candidat pour le développement de systèmes de délivrance d'actifs ou de gènes (DDS). Il est par ailleurs d'ores et déjà approuvé par la FDA et utilisé à l'échelle industrielle pour des applications cosmétiques et pharmaceutiques²⁶⁴, ce qui simplifie le transfert laboratoire-industrie en cas de succès des essais cliniques.

Cette partie bibliographique présente donc les structures et rôles biologiques du HA et du CD44, ainsi que leur mécanisme d'interaction et leur implication dans le cancer. Une dernière partie est consacrée à l'état de l'art sur l'utilisation de ce couple CD44-HA pour l'élaboration de DDS anticancéreux ciblant.

**non cytotoxique, non antigénique, non immunogénique, non neurotoxique, non mutagène, non reprotoxique (définition de J. Necas et al).²⁶²*

I.B.1. Le hyaluronane : une molécule naturelle primordiale

I.B.1.1. Origine et généralités

I.B.1.1.1. Structure

Le hyaluronane (HA) est un polysaccharide linéaire formé de répétitions du motif disaccharidique acide D-glucuronique / N-acétyl-glucosamine : [(1→4)-D-GlcA – (1→3)-β-D-GlcNAc-]. Une chaîne de HA peut ainsi être composée de plusieurs milliers d'unités saccharidiques, pour une masse molaire (M_w) variant de 10^3 Da à 10^7 Da. Sa structure chimique est illustrée en **Figure I-32** : elle présente de nombreux groupements carboxylique, hydroxyle, et acétamide, très hydrophiles et donneurs de liaisons H. Avec un pKa de 3-4, la molécule est donc poly-anionique à pH physiologique (pH 7,4).

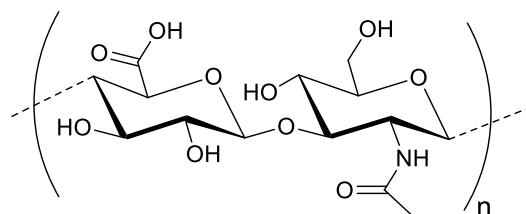


Figure I-32 : Structure chimique du hyaluronane : répétition du disaccharide [acide D-glucuronique – β – N-acétyl-glucosamine].

L'une des principales caractéristiques du HA est sa très grande affinité pour l'eau : il s'agit de l'une des molécules les plus hydrophiles présentes dans la nature, qui peut s'associer avec l'équivalent de 1000 fois son poids en eau.^{262,263} Une solution aqueuse de HA possède donc des propriétés particulières, notamment un caractère viscoélastique à haute concentration. Les chaînes de HA y adoptent des conformations en pelote statistique, en ruban vrillé ou encore en hélice rigide du fait de liaisons H intra/intermoléculaires ou avec le solvant.^{262,263}

I.B.1.1.2. Un peu d'Histoire

Le hyaluronane a été découvert en 1934 par Karl Meyer et John Palmer après extraction de l'humeur vitreuse d'un œil de bœuf.²⁶⁵ Son nom provient de l'association du mot grec *hyalos* (vitreux) et de l'acide uronique. Il a d'abord été utilisé commercialement en 1942 comme substitut de blanc d'œuf dans les produits boulangers.²⁶² Il a fallu attendre les années 1950 et la description totale de sa structure par Weissmann et Meyer²⁶⁶ pour voir apparaître sa première application médicale chez l'humain : il servait alors de substitut de l'humeur vitreuse pour la chirurgie oculaire.²⁶⁷⁻²⁶⁹ Durant ces années, les plus grands spécialistes de la recherche sur le HA étaient les équipes de J.W. Palmer et K. Meyer²⁷⁰⁻²⁷², ainsi que le couple E.A. Balazs et J. Denlinger^{268,273-276}. Plus tard, B.P. Toole a fait de grandes avancées sur les fonctions biologiques du hyaluronane et sur ses différentes interactions avec d'autres protéines.²⁷⁷⁻²⁸⁰ Il a alors été remarqué que le HA est présent sous plusieurs formes : il peut être observé sous forme d'acide (acide hyaluronique) ou de sel (hyaluronate de sodium). En 1986, E.A. Balazs a donc proposé un nom générique englobant toutes ces formes : le "hyaluronane", qui est le terme majoritairement utilisé depuis.²⁸¹

Historiquement extrait de crêtes de coq, sa production par fermentation microbienne a permis un passage à l'échelle industrielle et un développement croissant de son étude et de son exploitation. Depuis, son approbation par la FDA a encore accru l'intérêt porté par la communauté scientifique, en témoigne la forte augmentation du nombre de publications le concernant à partir des années 1990 (Figure I-33).

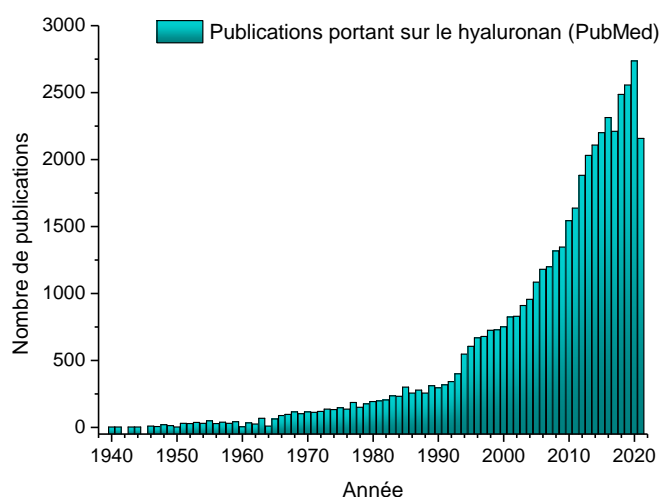


Figure I-33 : Évolution du nombre de publications scientifiques portant sur le HA de 1940 à 2021 (PubMed).

I.B.1.1.3. Production et élimination

Du fait de ses propriétés d'hydratation et de viscoélasticité, le hyaluronane se trouve majoritairement dans les tissus conjonctifs mous et dans les tissus qui subissent une compression mécanique régulière : peau, cordon ombilical, artères, humeur vitreuse, liquide synovial, disque intervertébral, etc. Dans une moindre mesure, il est également présent dans les poumons, les reins, le foie, le cerveau, et les muscles.^{262,263,282} Les principales cellules produisant le HA étant les fibroblastes, il est très abondant dans la peau (environ 50% de la quantité totale présente dans le corps).^{263,283}

Le hyaluronane fait partie de la famille des glycosaminoglycans (GAGs), mais contrairement aux autres membres de cette famille, il n'est pas synthétisé dans l'appareil de Golgi. À la place, il est produit par des enzymes nommées "hyaluronane synthases" (Has1/Has2/Has3) au niveau de la face interne de la membrane plasmique, avant d'être libéré dans l'espace extracellulaire à travers des pores.^{282,284}

Une fois produit, le HA subit un renouvellement important : sur les 15 g que contient un corps humain adulte, 5 g sont remplacés tous les jours (33%).²⁸⁵ Dans la circulation sanguine, le temps de demi-vie n'est que de 2 à 6 min, les fragments de HA les plus courts restant le plus longtemps.

Ainsi, si la production de HA est intense, son élimination l'est tout autant. Elle a lieu à différents niveaux : au niveau local, des enzymes spécifiques présentes dans la matrice extracellulaire (ECM) dégradent le HA. Tout d'abord les hyaluronidases le réduisent en petits fragments (oHA), qui sont ensuite eux-mêmes dégradés par la β -D-glucuronidase et la β -N-acétyl-hexosaminidase. Une dégradation similaire peut être due à la présence de ROS dans l'environnement immédiat.^{286,287} Les fragments de HA sont alors internalisés par les cellules pour être détruits dans les lysosomes (**Figure I-34**).^{262,283,288} Le HA présent dans la circulation sanguine, quant à lui, est principalement éliminé par le foie (à 88%) et la rate. L'élimination rénale reste très faible et ne représente que 1% du HA éliminé. Enfin, le HA peut également passer dans la lymphe où il est majoritairement éliminé dans les ganglions lymphatiques (à 50-90%).^{262,288,289}

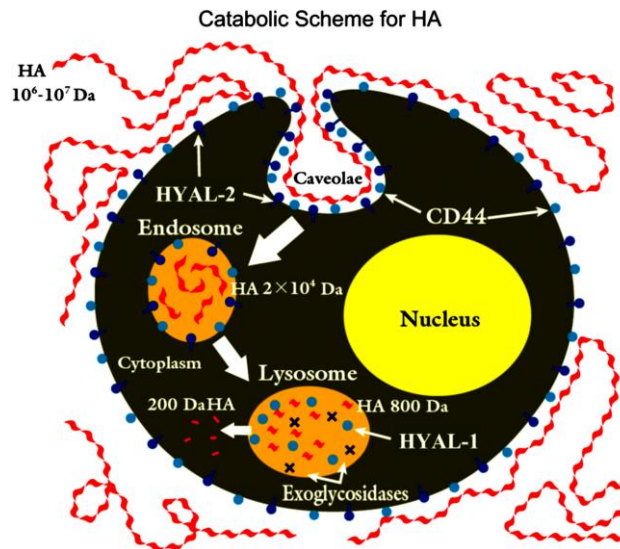


Figure I-34 : Mécanisme de dégradation enzymatique du HA à l'échelle locale. Reproduit de la thèse de H. Duan.²⁹⁰

I.B.1.2. De multiples fonctions biologiques

Le hyaluronane possède une réelle importance dans la nature. Composant essentiel de la matrice extracellulaire (ECM) et intervenant dans nombreux processus biologiques, il est conservé chez de multiples espèces, notamment chez tous les mammifères.^{262,263,267,282,291,292}

En premier lieu, du fait de son hydrophilie très marquée, les solutions aqueuses de hyaluronane possèdent des propriétés rhéologiques très intéressantes. Ainsi, même à faible concentration (1 g/L)²⁶⁹, une viscosité importante est observée. Elle est principalement due à la grande longueur des chaînes de HA et aux fortes interactions entre elles qui provoquent un enchevêtrement conséquent.^{293,294} Une telle solution présente un comportement rhéo-fluidifiant, qui peut être attribué à la rupture progressive des interactions intermoléculaires non covalentes sous l'effet de la pression mécanique.²⁹⁵ A l'inverse, dans une solution plus concentrée, une meilleure organisation des chaînes de HA mène à un comportement viscoélastique.^{296,297} Ainsi, le HA en solution est un lubrifiant idéal pour l'organisme : il joue un rôle crucial dans la séparation des tissus dont les surfaces glissent les unes contre les autres et réduit l'adhésion des tissus entre eux. Dans les cartilages, sa présence induit l'agrégation de l'aggrecan²⁹⁸, améliore la lubrification et l'absorption des chocs, et possède un effet chondroprotecteur.

Ces propriétés sont particulièrement fondamentales pour la peau. Le HA y assure le maintien de l'élasticité, de l'hydratation et le piégeage de molécules antigéniques. Il agit également comme piègeur de radicaux libres et protège des UVs du soleil. Il est donc considéré comme étant responsable de l'aspect "jeune" de la peau : à mesure que l'on avance en âge, la production de HA par les fibroblastes diminue, ce qui entraîne une perte d'élasticité, d'hydratation et de protection, et débouche sur l'apparition de rides et de taches. Tout ceci explique l'engouement de l'industrie cosmétique et du soin de la peau à son égard.^{283,299}

Enfin, il s'agit d'un composant essentiel de la matrice extracellulaire : il participe à sa formation et à sa stabilité et possède un rôle structurel dans le maintien du volume et de la morphologie des tissus. Sa concentration permet aussi de réguler l'accessibilité de certaines cellules aux autres protéines présentes dans l'ECM. Il est également très connu pour son effet sur l'inflammation et son intervention dans la cicatrisation des plaies et la réparation tissulaire, bien que son mécanisme d'action ne soit pas encore parfaitement compris.^{262,263,267,282,291,292}

Au-delà de ces fonctions directes, le HA intervient dans de nombreux processus biologiques à travers son interaction avec des récepteurs. Parmi eux, certains sont primordiaux pour les cellules, comme la différenciation, la prolifération ou la migration, mais on retrouve également l'implication du HA dans l'expression génique, la croissance tissulaire, ou la transduction de signaux biologiques. En particulier, la synthèse du HA est fondamentale lors de l'embryogénèse, où il maintient les cellules dans un état indifférencié.^{278,279,291}

Il est important de noter que ces fonctions biologiques peuvent fortement varier avec la masse molaire du HA. Ainsi, la plupart des fonctions citées ci-dessus sont liées à la présence de HA de haute, voire très haute, masse molaire, qui est majoritaire dans l'organisme. Mais les HA plus courts jouent également un rôle, notamment dans la formation du tissu cicatriciel, dans l'inflammation, et l'activation des macrophages. En effet, ils sont le plus souvent issus de la dégradation de plus longues chaînes de HA. Leur présence peut donc indiquer une blessure qui nécessite l'activation d'une réponse immunitaire et cicatrisante.^{262,300} Ainsi, le HA possède un effet anti- ou pro-inflammatoire selon sa taille. L'influence de celle-ci sur les fonctions biologiques est indiquée en **Figure I-35**.³⁰¹

Sizes (kDa, or disaccharide)	Function of HA
HA size > 10 ⁶ Da	Space-filling, providing structural frameworks for cells, functions as an extracellular molecule transmitting signals, and regulates a variety of cell behaviors, including cell adhesion, motility, and growth
HA size > 10 ⁶ Da	Rapid matrix remodeling that occurs during embryonic morphogenesis, as well as tumorigenesis
HA size > ~20 MDa	Ovulation, embryogenesis, wound repair, and tissue regeneration
HA size > 10 ⁶ Da	Tyrosine kinase in endothelial cells and Ras-transformed fibroblasts at lower level
Extremely HMW HA (five times larger than human HA)	Cancer resistance and longevity of naked mole rat
Excessive HMW HA production	Inhibit tumor growth, possibly by suppressing cell-cell interactions, or ligand access to cell surface receptors
HA size < 5 × 10 ⁵ Da	Cytokine and chemokine production for differentiation/activation of the macrophage
HA size ~250,000	Induces inflammatory genes in renal tubular epithelial cells, T-24 carcinoma cells, and in eosinophils
HA size 8–16 disaccharides (~3200–6400 Da)	Induce angiogenesis in a chick corneal assay whereas the native HA molecules do not
HA size ~6–20 kDa	Induce inflammatory gene expression in dendritic cells
HA of 40–400 kDa	NFκB-mediated gene expression for endocytosis
HA size ~2,500 Da	Upregulation of PTEN in tumor cells, and inhibit anchorage-independent growth as well as xenograft tumor growth

Figure I-35 : Exemple de fonctions adoptées par le HA selon sa taille. Reproduit de l'article de Misra et al.³⁰¹

I.B.1.3. Les hyaladherines

La participation du HA à tant de processus biologiques implique celle de récepteurs à HA tout aussi nombreux : les hyaladherines.²⁷⁷ La plupart d'entre eux appartiennent à la superfamille LINK, qui rassemble des récepteurs possédant un "module LINK". Il s'agit d'un domaine structural d'environ 100 acides aminés qui est commun à tous les membres de cette superfamille et qui permet la liaison avec le HA. Les principales hyaladherines sont listées ci-dessous en fonction de leur rôle biologique et présentées dans la **Figure I-36**.

Rôle global

- **CD44** : le cluster de différenciation 44 est considéré comme étant le récepteur principal du HA depuis 1990.³⁰² De très nombreux processus biologiques dépendent de l'interaction HA-CD44, parmi lesquels la mobilité cellulaire, l'internalisation et l'élimination du HA³⁰³, l'inflammation et l'invasion tumorale. Ainsi, la majorité des recherches effectuées sur les hyaladherines depuis les années 1990 se sont concentrées sur le CD44. Sa structure, son rôle biologique, et son interaction avec le HA sont détaillés plus loin dans ce chapitre (cf. **I.B.1.4** et **I.B.2.1**).
- **RHAMM** : ce récepteur pour la mobilité induite par le HA ("Receptor for HA-Mediated Mobility"), aussi noté CD168, est l'une des rares hyaladherines à ne pas posséder de module LINK. Il n'en est pas moins un récepteur majeur, impliqué notamment dans la mobilité et la migration cellulaires³⁰⁴⁻³⁰⁶, dans l'inflammation et la cicatrisation³⁰⁶⁻³¹⁰ et dans la réponse des cellules aux facteurs de croissance. Il peut être présent aussi bien sur la membrane cellulaire que dans le cytoplasme.³⁰⁶

Les récepteurs RHAMM et CD44 sont associés dans plusieurs processus biologiques. Ils interagissent alors directement à travers une association protéine-protéine, et/ou en influençant les propriétés de signalisation de l'autre.³¹¹ Leur rôle global leur confère également une grande importance dans le développement cancéreux.³⁰¹ (cf. **I.B.2.2**)

Rôle structurel

- **Aggrecan** : ce protéoglycan est l'un des principaux composants structuraux du cartilage, avec le collagène de type II. Son interaction avec le HA provoque la formation de gros agrégats multimoléculaires qui permettent la rétention d'eau dans le cartilage et améliore sa résistance à la compression. D'autres protéoglycans similaires peuvent s'associer avec le HA : le versican, neurocan et brevican qui sont des constituants de l'ECM dans la peau et le cerveau.^{298,312}
- **GHAP** : cette protéine gliale capable de se lier avec le HA ("Glyal Hyaluronate-binding Protein") se trouve exclusivement dans le cerveau. C'est une glycoprotéine d'environ 60 kDa qui est d'une grande importance structurelle pour l'ECM de la substance blanche (axones myélinisés des neurones). La séquence d'acides aminés de sa région de liaison avec le HA est identique à celle du versican.³¹³⁻³¹⁵

Rôle inflammatoire

- **TLR-2 / TLR-4** : les récepteurs de type Toll ("Toll-Like Receptors") sont principalement exprimés dans les cellules dendritiques, où ils jouent un rôle-clé dans le système immunitaire inné. Ils sont capables de reconnaître le HA de bas poids moléculaire et d'activer la réponse inflammatoire.^{316,317} Cependant, leur réponse étant couplée à celle du CD44, leur liaison directe avec le HA est encore sujette à controverse.³¹⁸
- **TSG6** : Cette protéine ("Tumour necrosis factor-Stimulated Gene-6") ne se trouve pas dans les tissus sains (excepté lors de l'ovulation). Elle n'est sécrétée qu'en réponse à une inflammation ou à la présence de certains facteurs de croissance.³¹⁹ Les principales cellules qui la synthétisent sont les fibroblastes, chondrocytes, et monocytes, ainsi que les cellules des muscles lisses vasculaires et les complexes ovocyte-cumulus. Si la TGS6 possède une action anti-inflammatoire et est capable de se lier au HA grâce à la présence du module LINK, le lien direct entre ces deux actions est toujours discuté.³²⁰ En revanche, il a été prouvé que sa présence promeut l'interaction entre HA et CD44 en aidant à la bonne présentation du HA.³¹⁸ Ceci a lieu notamment à la surface des leucocytes ce qui permet une modulation de leur migration.³²¹

Rôle d'élimination du HA

- **LYVE-1** : Ce récepteur ("Lymphatic Vessel HA Endothelial receptor of type I") est majoritairement exprimé par les tissus lymphatiques à la jonction entre les cellules endothéliales.³¹⁸ Il a un rôle significatif dans la régénération du HA : tout d'abord il participe à la captation du HA depuis les tissus jusque dans la lymphe en permettant l'absorption du HA par les cellules endothéliales lymphatiques. Une fois dans la lymphe, il aide à son transport jusqu'aux ganglions lymphatiques où le HA est éliminé.³²² Il joue également un rôle actif dans la migration des leucocytes et des cellules dendritiques dans les vaisseaux lymphatiques.^{318,323}
- **HARE** : ce récepteur pour l'endocytose du HA ("HA-Receptor for Endocytosis") est aussi connu sous le nom de Stabilin-2. Il est largement exprimé par les cellules endothéliales sinusoidales dans le foie, la rate et les ganglions lymphatiques. Il est primordial dans le renouvellement du HA de l'organisme. En effet, il est en charge de l'élimination systémique du HA et des autres glycosaminoglycans présents dans le sang ou la lymphe³²⁴. Il est ainsi responsable de l'élimination d'environ un tiers du HA total.^{267,323,325}

	A LINK-module superfamily				B non-LINK receptor
	TSG-6	LYVE-1	CD44	HARE	RHAMM
Localization	Soluble (ECM)	Cell surface	• Cell surface • Soluble (ECM)	• Cell surface* • Soluble: trimer / monomer (cytopl.)	• Cytoplasmic • Cell surface*
Expression	Inflamed milieu	• ECs of liver, spleen, and lymphatics • Macrophages	• Leukocytes • Fibroblasts and ECs • Tumors (overexp.) • Inflamed milieu	• ECs of liver, spleen, and lymphatics	• Leukocytes • ECs • Several tumors (overexp.)
Functional role	Anti-inflammatory	• Lymphatic HA transport • Metastasis	• Development • Inflammation • T-cell recruitment • Tumor progression	Systemic GAGs clearance	• Cell migration • Tissue injury and repair
Ligands	Main: HA Other: aggrecan, versican, TSP I & II, PTX-3, fibronectin	HA	Main: HA Other: OPN, collagen, MMPs, GAGs	HA, DS, and CnS (A, C, D, and E)	HA

Figure I-36 : Tableau récapitulatif des principales hyaladherines groupées selon leur appartenance ou non à la superfamille LINK. TSP: thrombospondine ; PTX-3: pentraxine-3 ; DS: sulfate de dextran ; CnS: sulfate de chondroïtine de type A, C, D, et E. Reproduit de l'article de J.M.R de la Rosa et al.³¹⁸

Le HA interagit donc avec de multiples récepteurs, et est impliqué dans de nombreux mécanismes. Cibler des récepteurs ou fonctions biologiques précis à l'exclusion des autres est donc extrêmement compliqué. En particulier, la capacité des récepteurs HARE et LYVE à capter et éliminer le HA peut se révéler problématique lors de nombreuses applications.

I.B.1.4. Principal récepteur du hyaluronane : le CD44

Comme évoqué plus haut, le cluster de différenciation CD44 est considéré comme le récepteur principal du hyaluronane et a donc fait l'objet de nombreuses recherches. C'est une protéine transmembranaire dont le gène est fortement conservé parmi les vertébrés. Chez les humains, il est situé sur le chromosome 11.^{262,263} Le CD44 est également présent sous forme soluble dans le plasma en moindre quantité.³²⁶ Le CD44 a été découvert en 1983 et classé en tant que récepteur résidant des lymphocytes ("lymphocyte homing receptor").³²⁷ Six ans plus tard, il a été cloné pour la première fois et identifié comme étant également une molécule liée au cartilage.³²⁸ Aujourd'hui, on lui connaît de nombreuses autres fonctions.

I.B.1.4.1. Structure biologique

La structure du CD44 est détaillée en **Figure I-37**. Elle se décompose en 3 parties^{263,318,329-331} :

- L'extrémité cytoplasmique (70 acides aminés, orange) permet le couplage du CD44 avec le cytosquelette. Elle participe ainsi aux processus d'adhésion et de mobilité cellulaires induites par le HA en interagissant directement avec le cytosquelette et diverses protéines intracellulaires telles que l'eitrine, la radixine et la moesine (ERM), ou encore l'ankyrine.
- Le domaine transmembranaire (23 acides aminés, vert clair) est principalement impliqué dans le positionnement du CD44 dans les radeaux lipidiques, ce qui permet sa clusterisation. Celle-ci est essentielle car elle permet l'activation des cascades biologiques induites par l'interaction avec le HA. Une perturbation de ces radeaux lipidiques et des clusters entraîne la perte du signal lié à cette interaction et de l'action biologique attendue.³³²
- Le domaine extracellulaire (vert foncé), aussi appelé ectodomaine, lui aussi divisé en 3 parties :
 - o La région la plus proche de la membrane (stem region, 44 acides aminés) a pour rôle principal de faire le lien avec le domaine transmembranaire. Elle contient des sites protéolytiques.
 - o La région variable (jusqu'à 381 acides aminés, rouge) est l'endroit où se trouve la majorité des modifications qui caractérisent les différentes isoformes du CD44 (cf. **I.B.1.4.2**). Ces modifications sont généralement dues à un épissage alternatif et/ou à des modifications post-traductionnelles.
 - o La région N-terminale, quant à elle, comprend en particulier le module LINK permettant l'interaction avec le HA, ainsi que les sites de liaisons d'autres ligands secondaires. Elle contient 6 cystéines, très bien conservées parmi les espèces, qui forment 3 ponts disulfures. Ces derniers sont indispensables pour le repliement correct du récepteur, sa stabilité, et son interaction avec ses ligands.

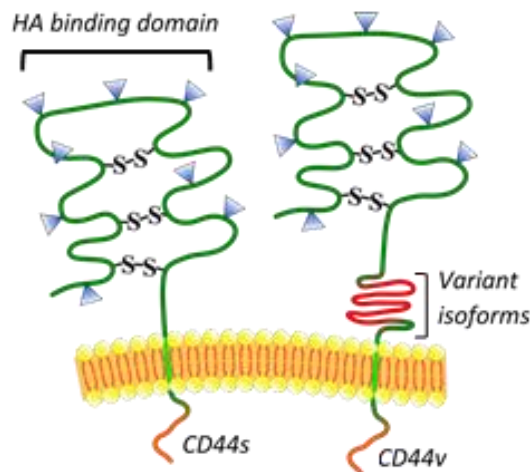


Figure I-37 : Illustration de la structure du CD44 sous forme standard (CD44s, gauche) et variante (CD44v, droite). Orange : extrémité cytoplasmique ; Vert clair : domaine transmembranaire ; Vert foncé : ectodomaine ; Rouge : partie variable des isoformes ; Triangles bleus : glycosylation. Adapté de l'article de M. Zöller.³³⁰

I.B.1.4.2. Isoformes

Le CD44 n'est pas une unique protéine, mais représente toute une famille : elle comprend plus de 20 isoformes dont la taille varie de 80 kDa à 200 kDa. Leurs différences proviennent de modifications post-traductionnelles (O- et N-glycosylations) et/ou d'un épissage alternatif de leur pré-ARN_m.^{263,329-331,333,334} La **Figure I-38** illustre cette diversité d'épissage : les exons 1 – 10, situés aux extrémités, codent la partie constante du récepteur CD44, tandis que les exons v1 – v10 codent les parties variables. C'est lors de l'épissage que la différence se fait : en fonction de l'isoforme, certains de ces exons variants sont éliminés. De nombreuses combinaisons des exons restants sont donc possibles, donnant naissance à la grande famille des CD44. Il est possible de répartir les membres de cette famille dans 3 catégories :

- La version standard du CD44 est notée CD44s. Sous cette forme, tous les exons variants ont été éliminés. Il s'agit donc de la protéine la plus courte de la famille (il n'y a pas de zone variable). Elle est la forme principale et est exprimée à la surface de la plupart des cellules eucaryotes.³²⁹
- Les isoformes variantes (CD44v) proviennent d'ARN_m dans lesquels une partie des exons variants demeure. Les modifications induites par cet épissage alternatif se trouvent dans la région variable du domaine extracellulaire (en rouge sur la **Figure I-37**). Ils sont donc plus longs que le CD44s. La seconde différence majeure est qu'ils sont principalement localisés sur des cellules spécifiques. Par exemple, l'isoforme CD44v10 est exprimée par les cellules endothéliales, tandis que la CD44v6 est d'une grande importance dans les tissus en phase de prolifération, où elle participe à la transmission de signaux cellulaires et agit comme corécepteur de la tyrosine kinase.³³⁵ Cette même CD44v6 et la CD44v9 sont par ailleurs des marqueurs de cellules malignes.^{336,337}
- Une isoforme se distingue des autres : seule exception à la notation CD44v, l'isoforme CD44st (short tail) n'a pas non plus de région variable dans l'ectodomaine. A la place, elle présente une extrémité cytoplasmique tronquée dont elle tire son nom. Elle est l'unique isoforme à la surface des chondrocytes, et, si elle est effectivement capable de se lier avec le HA, elle est incapable de mener à bien son internalisation. Ceci permet aux cartilages de conserver une certaine flexibilité.^{263,288}

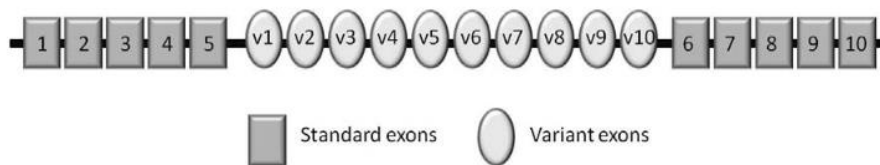


Figure I-38 : Structure schématique d'un pré-ARN_m du CD44 (avant épissage). Les rectangles correspondent aux exons présents dans la version standard du CD44 tandis que les ovales représentent les exons supplémentaires pouvant être présents dans les variants. Figure reproduite de l'article de H. Parkkola³³⁸

La plupart du temps, plusieurs isoformes du CD44 cohabitent à la surface des mêmes cellules, la forme CD44s étant mixée avec d'autres CD44v. Cependant, les CD44v étant exprimées par des cellules spécifiques, elles participent à des processus biologiques précis, et lors de moments particuliers. Ainsi, la présence en grand nombre de CD44v a été observée principalement durant le développement de l'embryon, mais également lors de la maturation et de l'activation des lymphocytes, ou encore dans le processus métastatique.³³⁰ Par ailleurs, il existe un phénomène de basculement entre les différentes isoformes en réponse à certains stimuli (*e.g.* stress oxydant, transduction de signaux biologiques).³²⁹ La distribution des CD44v est donc variable, non seulement selon le type de cellule mais également dans le temps.

I.B.1.4.3. Fonctions biologiques

Le CD44 intervient dans de nombreux processus biologiques (**Figure I-39**), la plupart ayant un lien avec l'interaction entre une cellule et son microenvironnement. Il est ainsi impliqué dans l'adhésion et la mobilité cellulaire : il joue un rôle dans l'adhésion d'une cellule avec ses voisines ou avec la matrice extracellulaire.^{331,339} Il intervient aussi dans le recrutement, l'activation, et la recirculation des lymphocytes^{340,341}, notamment lorsqu'il est assemblé avec des microdomaines enrichis en glycolipides (GEMs).^{330,342}

Une autre de ses principales missions est la reconnaissance et l'internalisation du HA dans les cellules, où il est dégradé dans les lysosomes.^{288,303,343} Cette capacité à éliminer le HA présent dans l'ECM permet, entre autres, de faciliter la mobilité des cellules et leur accès aux protéines de l'ECM.³⁴⁴

Il peut également agir dans la réponse d'une cellule à un stimulus extracellulaire *via* la transduction de signaux biologiques : les réponses pouvant varier de l'activation, différenciation, prolifération, à la survie, en passant par la mobilité cellulaire et l'hématopoïèse³³¹. A l'inverse, il peut altérer l'ECM en fonction de signaux intracellulaires, et ainsi servir de moyen de communication entre les cellules et leur environnement.^{263,331} Enfin, il peut agir comme corécepteur en se liant avec des protéines du cytosquelette ou des récepteurs des tyrosine kinases, et influencer les cascades réactionnelles qu'ils induisent.^{330,342,345} Tout ceci explique son très large champ d'action.

Phenotype	Experimental approach	CD44 function
Axon guidance in the optic chiasm	Interference by pan-CD44 antibodies and mimicry by membrane-bound CD44 molecules	Cell-surface CD44 as an axon deterrent
Uretic-bud and prostate-gland development	Interference by pan-CD44 antibodies	Role in branching morphogenesis
Lymphogenesis in foetal liver	Interference by CD44 v antibodies	T-cell differentiation
Limb-bud development	Interference by CD44 v antibodies	Proliferation of mesenchymal cells
Lymphocyte homing	Interference by pan-CD44 antibodies	Adhesion and migration
Lymphocyte rolling	Interference by pan-CD44 antibodies	Adhesion and migration
Lymphocyte activation	Interference by CD44 v antibodies, transgenic expression of CD44v4-7 (Thy1 promoter)	Proliferation and migration
Delayed-type hypersensitivity	Interference by CD44 v and pan-CD44 antibodies, CD44 mice with disruption of CD44 exons v6 and v7	Dendritic-cell migration
Inflammation	Interference by pan-CD44 antibodies	Mediates cytokine signalling
Autoimmune rheumatoid arthritis	Crosslinking by pan-CD44 antibodies	Induces upregulation of Fas
Autoimmune collagen-induced arthritis	Interference by pan-CD44 antibodies, CD44-null mice (by disruption of exons 4 and 5 or by promoter disruption)	Neutrophil accumulation
Autoimmune colitis	Interference by CD44 v antibodies, mice with disruption of exons v6 and v7	Mediates cytokine signalling
Experimental autoimmune encephalitis	Interference by pan-CD44 antibodies	Monocyte migration across the blood-brain barrier
Haematopoietic differentiation	Interference by CD44 v and pan-CD44 antibodies	Mediates cytokine signalling
Skin homeostasis	Transgenic expression of antisense CD44 (keratin 5-promoter), hyaluronidase treatment	Cell-cell interaction, hyaluronan distribution
Schwann-cell proliferation <i>in vitro</i>	Interference by antisense CD44	Cell-cell adhesion, receptor signalling
Tissue remodelling	CD44-null mice (disruption of exons 4 and 5)	Receptor signalling
Resistance to induced hepatitis	CD44-null mice (disruption of exons 2 and 3)	Pro-apoptosis signalling
Atherosclerosis	CD44-null mice (disruption of exons 2 and 3)	Mediation of inflammation, smooth muscle proliferation

CD44 v antibodies, antibodies against CD44 variant proteins; Thy1, thymus cell-surface antigen 1.

Figure I-39 : Exemples de processus biologiques dans lesquels le CD44 possède une fonction majeure, et les moyens de sa mise en évidence expérimentale. Reproduit de l'article de H. Ponta.³³³

I.B.2. L'interaction HA-CD44 et le cancer

I.B.2.1. Mécanismes d'interaction entre HA et CD44

I.B.2.1.1. Interaction HA-CD44

La plupart des fonctions biologiques dans lesquelles sont impliquées le HA et le CD44 sont liées à l'interaction entre eux.³⁴⁶ Elle joue notamment un rôle crucial dans la cicatrisation³⁰⁰ ou dans le processus qui permet aux cellules souches de se nichier à des endroits spécifiques³³⁰. Elle prend également part à l'élimination des cellules apoptotiques et au processus d'inflammation à travers le recrutement de lymphocytes, leucocytes et neutrophiles depuis la circulation sanguine.³⁴⁷⁻³⁴⁹ Cette interaction intervient aussi dans l'adhésion cellulaire, qui est modulée par la masse molaire du HA : le HA de bas poids moléculaire semble promouvoir l'adhésion, à l'inverse du HA de plus grande taille.³⁵⁰ Enfin, elle est essentielle pour le renouvellement et l'élimination locale du HA. Lorsque le HA se lie au CD44, ils sont tous les deux internalisés. Le HA va principalement dans les lysosomes, où il est dégradé en fragments plus petits que les monosaccharides. Le reste se retrouve dans le cytoplasme, ou dans le noyau, où son rôle demeure incertain.²⁸⁸ Quant au CD44, il est soit détruit dans les lysosomes, soit recyclé à la surface de la cellule.²⁸⁸ Ce mécanisme d'internalisation représente une bonne alternative aux mécanismes classiques de l'endocytose pour les ions et molécules liés au HA.³⁵¹

L'interaction HA-CD44 a lieu au niveau du module LINK du CD44, dans son domaine extracellulaire. Il s'agit d'une liaison électrostatique non covalente.³³¹ Cette interaction nécessite parfois la présence de cofacteurs. Il est ainsi possible de distinguer 3 états pour le CD44³⁵² :

- L'état actif, qui reconnaît et se lie au HA sans aide extérieure.
- L'état inductible, qui ne se lie pas ou peu avec le HA, excepté en présence de diverses molécules telles que des anticorps⁷², des cytokines^{353,354}, ou des facteurs de croissance^{355,356}.
- L'état inactif, qui ne reconnaît pas le HA même en présence de ces inducteurs.

La plupart du temps, c'est la glycosylation du CD44 qui est à l'origine de son état : le CD44 actif et inactif étant respectivement le plus et le moins glycosylé, et le CD44 inductible ayant une glycosylation intermédiaire.³⁵² Des stimuli externes peuvent conduire à la (dé)glycosylation du CD44 et ainsi influencer sur sa capacité à lier le HA.

I.B.2.1.2. Multivalence

L'interaction HA-CD44 ne concerne généralement pas un seul HA et un seul récepteur : il s'agit le plus souvent d'une interaction multivalente. Le récepteur CD44 ne possédant qu'un seul module LINK, il ne peut interagir qu'avec une seule chaîne de HA. A l'inverse, la structure du HA étant hautement répétitive, elle contient plusieurs sites de reconnaissance du CD44. Ainsi, une unique chaîne de HA peut se lier à plusieurs CD44 en même temps.

Cet effet est favorisé par la clusterisation du CD44 au sein de radeaux lipidiques, après palmitoylation. Cette clusterisation entraîne une augmentation de la densité locale de CD44, ce qui conduit à des interactions multivalentes fortes avec le HA. La prévention de cette association avec les radeaux lipidiques ne perturbe pas la liaison d'un récepteur CD44 avec le HA (affinité) mais prévient son internalisation (avidité) (cf. **I.B.2.1.3**).³⁵⁷ Cette capacité à former des clusters peut être modulée par certaines isoformes (non standards)^{358,359}, et par la densité locale et le poids moléculaire du HA. Un HA de masse molaire élevée et une densité de HA importante vont favoriser la clusterisation et une interaction forte. Celles-ci sont cependant susceptibles d'être inhibées en présence de HA de bas poids moléculaire (oHA), qui peut remplacer les interactions multivalentes fortes (1 HA – plusieurs CD44) par des interactions monovalentes plus faibles (1 oHA – 1 CD44) (**Figure I-42**).^{350,360}

Cette notion de multivalence a suscité de plus en plus d'intérêt ces dernières années. Récemment, deux études l'ont particulièrement mise en évidence.

En 2016, Bano *et al.* ont élaboré un système permettant de tester la force de l'interaction HA-CD44 par microbalance à quartz et microscopie à force atomique (AFM).³⁶¹ Le CD44 a été immobilisé sur une surface selon différentes densités. Une bicouche lipidique inerte a été utilisée comme base de greffage, afin de respecter l'orientation naturelle du CD44. D'un autre côté, des HA de haute masse molaire (250 kDa et 840 kDa) ont été fixés à l'extrémité d'une pointe AFM grâce à une association biotine/streptavidine. De cette façon, les chercheurs ont été capables de tester et de comparer la force d'une interaction monovalente (faible densité de CD44, le HA interagissant avec un seul récepteur) ou multivalente (forte densité de CD44, le HA interagissant avec plusieurs récepteurs). Les auteurs déduisent de cette étude que le HA a la possibilité de se lier de façon multivalente à plusieurs CD44 et que les multiples points de liaisons le long de la chaîne se rompent de manière séquentielle et indépendante lors de l'application d'une force d'arrachement. Ceci pourrait être un point clé de la compréhension du phénomène de roulement des leucocytes avant leur extravasation.

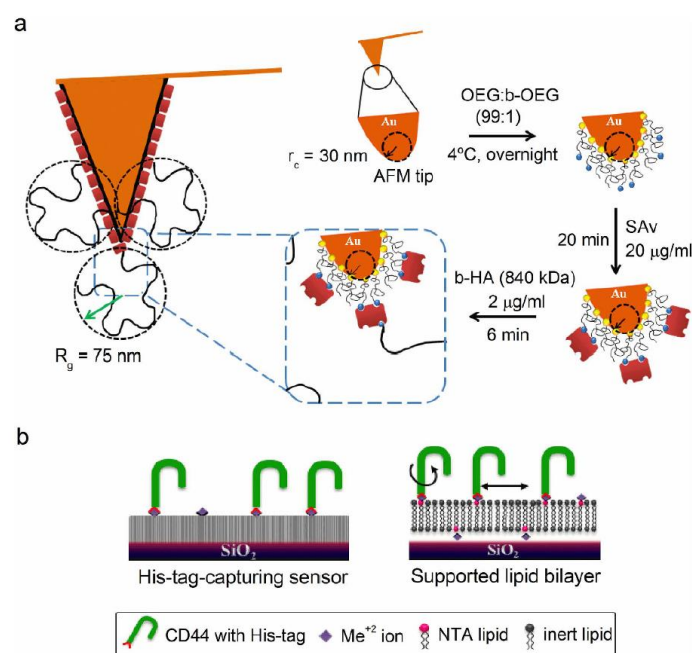


Figure I-40 : Illustration du principe de l'expérience menée par Bano et al. A : fonctionnalisation d'une pointe AFM avec des chaînes de HA de taille 250 kDa ou 840 kDa, par l'intermédiaire d'une association biotine/streptavidine. B : fonctionnalisation d'une surface par le CD44, et illustration de l'intérêt de la bicouche lipidique inerte dans la conservation de l'orientation naturelle du récepteur. Schéma reproduit de l'article de Bano et al.³⁶¹

Deux ans plus tard, H. Duan a mené une étude portant sur des copolymères à blocs HA-*b*-PBLG et LAM-*b*-PBLG (HA_{5k}, LAM = laminarine), lors de ses travaux de thèse en collaboration entre le LCPO et L'Oréal.³⁶² L'auto-assemblage de ces copolymères en nanoparticules a permis une comparaison de leur affinité pour le CD44 avec celles de chaînes de HA linéaires. Cette fois, l'analyse de l'interaction a été effectuée par SPR. Un tampon contenant soit des HA seuls de différentes tailles (5–1000 kDa), soit les nanoparticules de HA/LAM-*b*-PBLG a été mis en contact avec une surface recouverte de CD44. L'analyse par SPR a ensuite permis de déduire la masse totale adsorbée sur la surface et donc de détecter d'éventuelles interactions entre les ligands contenus dans le tampon et le CD44 (une description plus précise de cette technique est disponible dans le **chapitre IV, IV.B.1**). Les conclusions de cette étude confirment la concordance entre l'augmentation de la force de l'interaction et celle de la masse molaire du HA linéaire. Elles montrent également qu'en dépit de la faible taille du HA utilisé dans les diblocs, l'interaction avec le CD44 la plus importante est obtenue avec les nanoparticules. Cet effet de multivalence semble augmenter avec leur taille, celles de $R_H = 150 \text{ nm}$ donnant de meilleurs résultats que celles de $R_H = 30 \text{ nm}$.

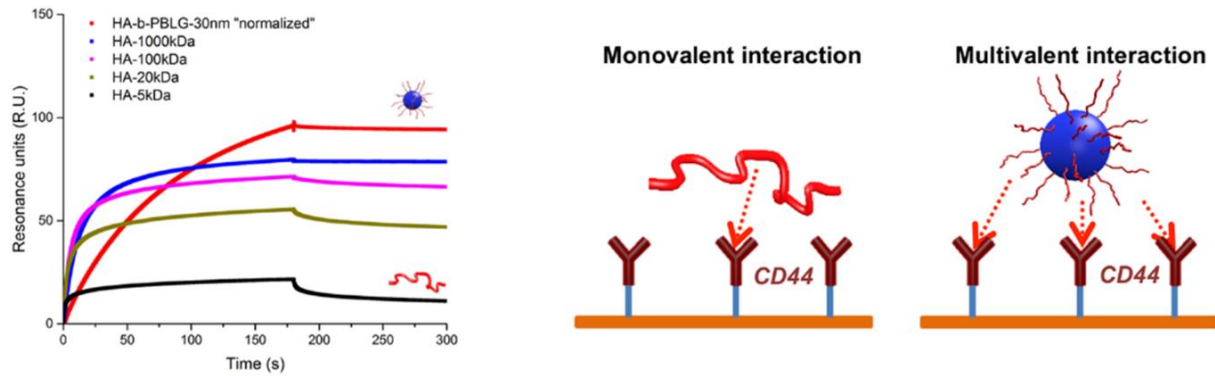


Figure I-41 : Gauche : Sensorgrammes de SPR obtenus pour des HA linéaires de taille 5 – 1000 kDa et une nanoparticule HA-b-PBLG de $R_H = 30$ nm (élimination de la participation du PBLG par normalisation). Droite : Représentation schématique de l'interaction HA-CD44 dans le cas d'un HA court linéaire (interaction monovalente) ou présenté à la surface d'une nanoparticule (interaction multivalente). Reproduit de l'article de H. Duan et al.³⁶²

Enfin, des expériences menées avec des assemblages mixtes de HA-b-PBLG et LAM-b-PBLG ont montré qu'ils conservent une double affinité pour le CD44 (HA) et pour la dectine-1 (LAM), ces affinités étant directement liées au pourcentage de chaque polysaccharide dans l'assemblage final. Cette étude a ainsi montré que, bien que les courtes chaînes de HA ne peuvent interagir avec le CD44 que de manière monovalente, leur association dans une nanoparticule permet de retrouver un effet de multivalence et des interactions similaires, voire meilleures, qu'avec le HA de grande masse molaire. Il semble également que la densité de HA présent à la surface ait une importance dans l'affinité au même titre que la densité de CD44.

Ces différentes études permettent de comprendre l'interaction HA-CD44 dans différentes situations résumées dans la Figure I-42 ci-dessous. Il semble donc possible de moduler l'affinité du HA pour son récepteur en jouant sur sa taille, sa présentation en solution ou au sein d'un assemblage et sur leur densité locale respective. Cela permet d'obtenir des réponses biologiques différentes selon l'application souhaitée.^{350,360,363,364}

La possibilité de contrôler cette affinité, et à travers elle la réponse biologique induite, au moyen d'un stimulus, est au cœur de ce projet de thèse. En s'inspirant de ces travaux, le remplacement du PBLG fortement hydrophobe par un polymère thermosensible laisse espérer une modulation fine de la présentation monovalente ou multivalente du HA en fonction de paramètres environnementaux contrôlables, en particulier par application locale d'une variation de température.

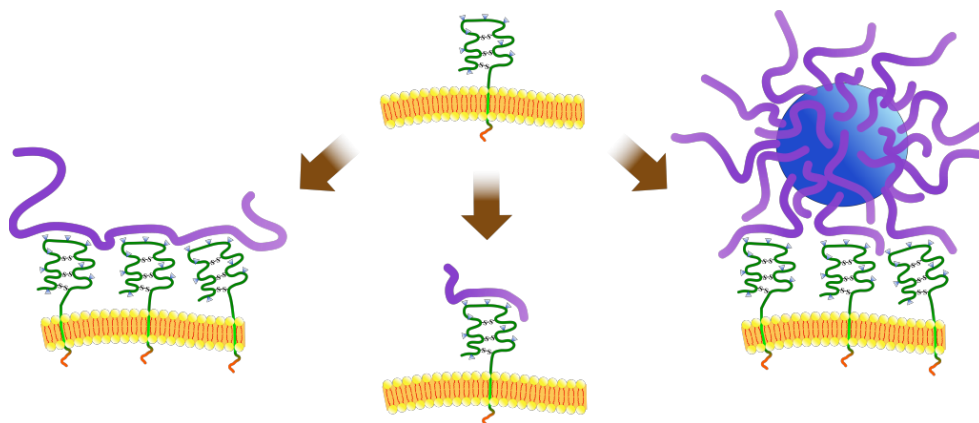


Figure I-42 : Schéma récapitulatif de l'interaction HA-CD44 en fonction de la taille du HA et de sa présentation. Gauche : HA interagissant avec plusieurs CD44 : interaction multivalente forte et clusterisation du CD44. Milieu : oHA interagissant avec un unique CD44 : interaction monovalente faible. Droite : oHA présenté à la

surface d'une nanoparticule. Interaction monovalente à l'échelle du oHA, mais multivalente à celle de la nanoparticule. Interaction cumulée forte et induction de la clusterisation du CD44.

I.B.2.1.3. Affinité versus Avidité

L'interaction HA-CD44 peut être décomposée en 2 phénomènes distincts : l'affinité et l'avidité. L'affinité du HA pour le CD44 est caractérisée par l'existence de l'interaction et sa force. L'avidité, quant à elle, traduit l'efficacité de l'interaction, au travers notamment du déclenchement de cascades biologiques et de l'internalisation du HA. Ces deux phénomènes, d'égale importance, sont influencés par différents facteurs. L'affinité dépend entre autres de la masse molaire, concentration, et présentation du HA, de l'effet de multivalence^{361,362}, et de l'état d'activation du CD44³⁵². Elle peut être perturbée par la présence de compétiteurs.³⁴³ D'un autre côté, l'avidité peut être modulée par la taille du HA^{288,362}, la densité locale du HA et du CD44, la capacité du CD44 à s'associer aux radeaux lipidiques³⁵⁷, la présence d'isoformes du CD44^{288,323} et celle d'anticorps ou de cytokines^{288,303,343}.

Il est à noter que certains facteurs influencent les deux phénomènes à la fois, et que l'affinité et l'avidité sont fortement liées. L'influence de la masse molaire du HA et des isoformes du CD44 est détaillée ci-dessous.

Masse Molaire

La masse molaire du HA joue un rôle crucial et ambivalent dans les deux phénomènes d'affinité et d'avidité. Un HA de haut poids moléculaire est en effet capable de former des liaisons multivalentes avec plusieurs récepteurs CD44, et ainsi d'améliorer l'affinité. Cependant, il existe une taille limite au-delà de laquelle l'internalisation par le CD44 est impossible, du fait de la gêne stérique. Cette taille critique peut être atteinte en cas de HA trop grand ou de son association dans une structure plus complexe, telle qu'un protéoglycane ou une nanoparticule de grande taille.^{288,365} Dans ce cas, des voies d'endocytoses plus classiques sont mises en œuvre.

Au contraire, les oligomères de HA (HA de faible masse molaire ou fragments de HA plus long) ne sont capables que d'interactions monovalentes, plus faibles. L'affinité est donc réduite, mais l'avidité favorisée par la petite taille qui permet une internalisation rapide.³⁶⁵ Cela explique le phénomène de renouvellement du HA, dans lequel le HA natif et les protéines qui lui sont liées doivent d'abord être dégradés (*e.g.* par des enzymes, ou des ROS) avant de pouvoir être internalisés.²⁸⁸

Isoformes du CD44

Bien que l'expression de formes variantes du CD44 semble d'une grande importance dans divers processus biologiques, elle n'a que peu d'influence sur l'affinité. En effet, les modifications ont lieu principalement dans la région variable du CD44, et non pas à proximité du module LINK, qui assure la liaison avec le HA (**Figure I-37**). En revanche, les choses sont différentes pour l'avidité et l'internalisation du HA. Par exemple, il a été prouvé que le CD44st, dont la partie cytoplasmique est tronquée, n'est pas capable de mener à bien l'internalisation du HA.³⁶⁶ Cela explique sa présence importante dans le cartilage, où le HA doit rester associé à l'aggrecan dans l'ECM pour assurer son rôle de lubrifiant et d'absorbeur de chocs.

Par ailleurs une étude récente menée par Spadea *et al* en 2019 a comparé l'expression de différents isoformes du CD44 et l'internalisation du HA pour plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (**Figure I-43**).³²³ Les chercheurs ont constaté que les cellules cancéreuses qui surexprimaient le CD44 dans sa forme standard (CD44s⁺) montraient la capacité d'internalisation la plus élevée contrairement à celles présentant une grande quantité de CD44 variants (CD44v⁺). Ceci est probablement dû à l'interaction de ces derniers avec d'autres ligands. Deux autres résultats intéressants ressortaient de cette étude : les cellules non-cancéreuses ne montraient qu'une faible internalisation du HA malgré leur forte expression de CD44, tout comme les cellules ne l'exprimant pas (CD44⁻). Ceci semble donc très encourageant quant à la sélectivité de systèmes basés sur le ciblage actif du CD44 par le HA.

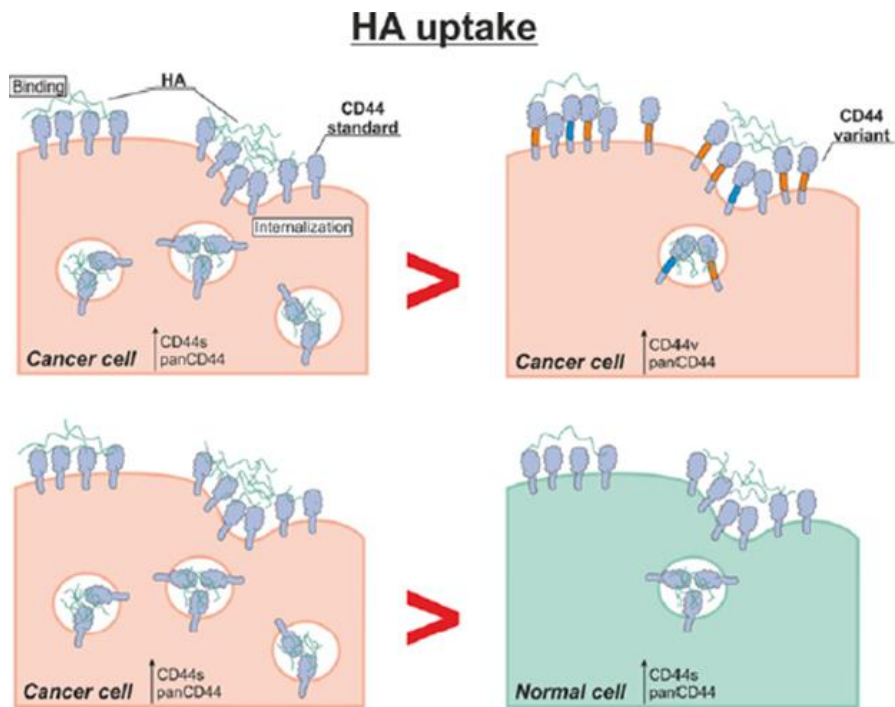


Figure I-43 : Illustration des résultats de l'étude portant sur l'internalisation du HA (HA uptake) en fonction des isoformes du CD44 et du type cellulaire. Haut : Comparaison de deux lignées cellulaires cancéreuses, surexprimant le CD44s (gauche) ou des isoformes CD44v (droite). Bas : Comparaison de deux lignées cellulaires surexprimant le CD44s : l'une cancéreuse (gauche) et l'autre non (droite). Schéma reproduit de l'article de Spadea et al.³²³

L'interaction HA-CD44 est essentielle dans beaucoup de processus biologiques et est régulée selon plusieurs facteurs. En particulier, la masse molaire du HA, la présence d'isoformes du CD44, et l'effet de multivalence (dépendant lui-même d'autres paramètres comme la densité locale du HA et CD44) modulent l'efficacité de l'interaction au travers de l'affinité et de l'avidité.

Dans le domaine de la nanomédecine, un compromis doit donc être trouvé entre une bonne affinité (interaction avec le CD44), une bonne avidité (internalisation du nanomédicament) et une bonne sélectivité (ciblage des cellules malades uniquement).

I.B.2.2. HA et CD44 promeuvent le cancer

Cette grande importance dans le bon fonctionnement de l'organisme a malheureusement un revers : l'interaction HA-CD44 est en effet également d'une grande influence dans le développement de tumeurs cancéreuses et de métastases. Le rôle du HA, du CD44, et de leur interaction dans la progression cancéreuse a été fortement documenté depuis vingt ans.^{262,263,280,301,367,368}

I.B.2.2.1. Influence du HA

Le HA possède en effet une action pro-cancéreuse. Il a été constaté qu'un fort niveau de HA est généralement un indicateur négatif pour la survie du patient, particulièrement dans les cancers du sein³⁶⁹ ou ovariens³⁷⁰. De même, la présence d'une grande quantité de HA et de hyaluronidases dans les urines est un marqueur de cancer de la vessie.³⁷¹ A mesure que le HA s'accumule dans le stroma des tumeurs, il active des cascades biologiques qui favorisent la prolifération et mobilité cellulaire, ainsi que l'angiogenèse et la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), ce qui entraîne la croissance tumorale et la formation de métastases.^{280,285,372}

Ce lien entre HA et de nombreux cancers a été mis en évidence selon deux méthodes principales. La première a consisté à surexprimer les hyaluronane synthases (Has). Des études ont ainsi montré que la présence du HA en plus grande quantité corrélait avec une croissance tumorale importante dans les fibrosarcomes et les carcinomes de la prostate^{373,374}, et avec une augmentation des métastases dans les cancers du sein³⁷⁵.

La seconde méthode est fondée sur la perturbation de l'interaction entre le HA endogène et son environnement (**Figure I-44**). Par exemple, l'injection de récepteurs CD44 solubles a permis de diminuer la croissance et l'invasion tumorale, ainsi que de limiter les métastases.^{344,376-378} Il a en effet été constaté que les hyaladhérines solubles entraînent en compétition avec les CD44 membranaires et les privaient du HA présent dans l'ECM, inhibant les cascades biologiques dues à leur interaction. De la même façon, l'injection d'oHA a semblé remplacer les interactions multivalentes et la clusterisation du CD44 par des interactions monovalentes, menant à la diminution de la croissance tumorale.³⁶³ La compétition avec des anticorps anti-CD44 a, elle aussi, menée aux mêmes effets.³⁷⁹

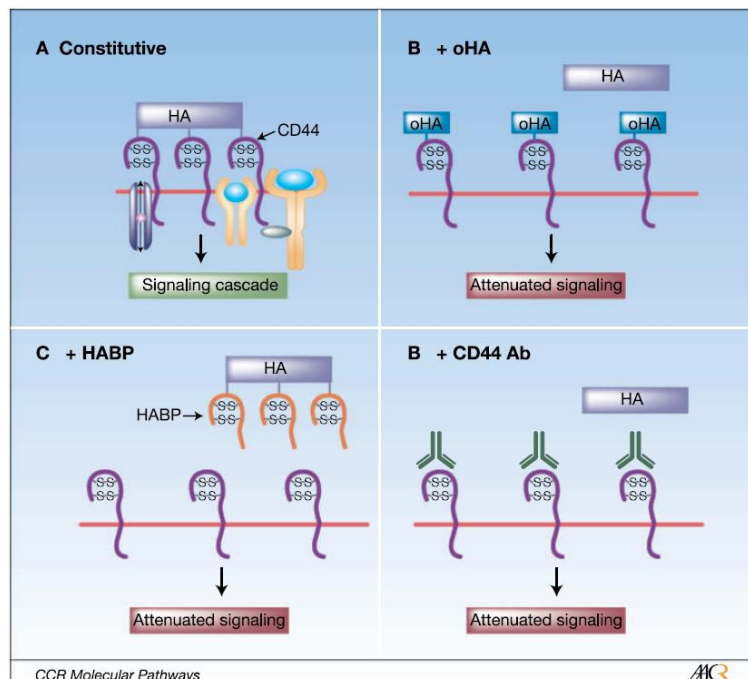


Figure I-44 : Illustration de l'interaction HA-CD44 en absence (A) ou en présence (B, C, D) de compétiteurs. A : Interaction multivalente constitutive entre un HA et des CD44 membranaires (induction de signal biologique). B : Compétition du HA avec des oHA. Formation de liaisons monovalentes. C : Compétition du CD44 membranaire avec des hyaladhérines solubles (HABP). HA peu disponible. D : Compétition du HA avec des anticorps anti-CD44. CD44 peu disponible. Reproduit de l'article de Toole et al.³⁶⁷

Tout ceci montre que l'interaction entre le HA et ses récepteurs cellulaires est un moteur de la progression cancéreuse. Il est toutefois intéressant de noter que cet effet dépend de la taille du HA.

Ainsi, le HA long semble promouvoir la croissance tumorale quand le HA plus court semble la freiner. De même, HA et oHA présentent une autre différence majeure dans leur influence sur la résistance des tumeurs à la chimiothérapie. Cette résistance aux principes actifs est en partie liée à l'expression de transporteurs "multi-drogues" (qui rejettent les molécules anticancéreuses hors de la cellule) tels que la MDR1 ("MultiDrug Resistance P-glycoprotein 1"), mais aussi de l'action de récepteurs de kinases (ErbB2), et de signaux anti-apoptotiques conduits par la phosphoinositide-3-kinase. L'interaction HA-CD44 semble former une boucle de rétroaction positive avec cette dernière et ErbB2 qui amplifie la production de MDR1 et conduit à une plus grande résistance des tumeurs aux traitements.³⁸⁰ A l'inverse, des études portant sur les oligomères de HA indiquent qu'ils sensibilisent les tumeurs résistantes à l'action des médicaments anticancéreux.³⁸¹

Ces bons résultats anti-cancéreux des oHA sont néanmoins tempérés par leur effet pro-angiogénique³⁶⁴, qui favorise l'irrigation sanguine des tumeurs. De même, il a été montré en 1996 que certaines tumeurs surexpriment les hyaluronidases, ce qui contribue à leur invasion.³⁸² Les auteurs de cette étude suggèrent en effet que ces enzymes dégradent le HA présent dans l'ECM, ce qui en fragilise la structure. Cela permet non seulement la croissance tumorale, mais également l'accès à certaines protéines jusqu'alors hors d'atteinte³⁴⁴, ou encore la séparation de la tumeur principale de cellules à caractère métastatique. Les fragments de HA générés aident par ailleurs à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.³⁸²

La surexpression du HA sous toutes ses formes semble donc être caractéristique d'un mauvais pronostic pour les patients.

I.B.2.2.2. Influence du CD44

Le CD44 possède également des propriétés favorisant le cancer. Ainsi, la surexpression du CD44 a été observée dans de nombreux cancers tels que le cancer colorectal, gastrique, du sein, du pancréas, de l'intestin, de la prostate, du poumon, et de la vessie.^{337,383-387} Cette surexpression du CD44 et son interaction avec le HA semble être des facteurs essentiels et universels dans le processus métastatique, et mener à un pronostic et une réponse aux traitements négatifs.^{263,329} La capacité du CD44 à former des clusters semble également augmenter la croissance invasive des tumeurs et le phénomène d'angiogénèse.³⁴⁴

Par ailleurs, l'existence de micro-domaines riches en cellules exprimant fortement le CD44 à l'intérieur des tumeurs a été découverte.³²³ Par exemple, dans le cancer du sein, un haut niveau de CD44 a été observé dans les zones hypoxiques et nécrotiques.³⁸⁸ Il semble ainsi que le microenvironnement tumoral joue un rôle dans la régulation de l'expression du CD44.

Les isoformes du CD44 ont également de l'influence. En effet, en 1991, il a été découvert que la présence de nombreuses isoformes variantes pouvait promouvoir le phénotype métastatique.^{389,390} Plus tard, d'autres études ont conclu à leur implication dans la croissance tumorale, le pronostic peu favorable et la surexpression de MDR1.^{263,323,391,392}

Finalement, l'absence de variants CD44v semble synonyme d'un meilleur pronostic concernant les métastases tandis que l'expression de CD44s favoriserait la progression de la tumeur initiale.³²⁹ Les différents types de cellules cancéreuses produisant des quantités variables d'isoformes, la présence d'un isoforme unique est extrêmement rare. L'expression de ces isoformes peut également varier dans le temps et selon l'avancement de la maladie. L'étude et la détection des différentes CD44v pourraient donc être des indicateurs pertinents pour le diagnostic et l'élaboration de traitements anticancéreux.

I.B.2.2.3. Cellules souches cancéreuses (CSCs)

Durant des années, l'hypothèse principale concernant les rechutes de cancer supposait que les tumeurs étaient constituées de cellules fortement prolifératives, qui pouvaient chacune causer la résurgence de la tumeur initiale. Depuis 20 ans, une nouvelle théorie s'est développée au sein de la communauté scientifique : le renouveau des tumeurs serait dû à la présence de cellules spéciales : les cellules souches cancéreuses (CSCs). Selon les promoteurs de cette théorie, cette petite sous-population de cellules tumorales possède des propriétés similaires aux cellules souches saines : elles sont rares, quiescentes, et capables d'auto-renouvellement.³⁹³ Ces CSCs sont donc responsables de l'initiation de la tumeur, de sa croissance et de son caractère métastatique. Leur capacité à se diviser de façon asymétrique, donnant naissance à une cellule-fille identique à la cellule-mère et à une cellule-fille différenciée, serait à l'origine de la grande hétérogénéité des tumeurs.^{394–396}

Plus problématique, les CSCs sont, semble-t-il, hautement résistantes thérapies anticancéreuses traditionnelles : elles sont insensibles à la radiothérapie et échappent aux principales chimiothérapies (**Figure I-45**). En effet, la plupart des traitements actuels ciblent spécifiquement les cellules en division rapide, et ne touchent donc pas les CSCs qui restent quiescentes sur de longues périodes. Ces dernières présentent également une forte activité anti-apoptotique, des mécanismes de résistance aux principes actifs, et leur affinité pour les régions en hypoxie les fait se développer loin des vaisseaux sanguins. Les nanomédicaments doivent donc pénétrer au cœur de la tumeur pour pouvoir les atteindre.

Tout ceci, associé à leur rareté, en fait des cellules très difficiles à éliminer. Or, la présence d'une seule d'entre elles peut mener à la résurgence de la tumeur. Leur disparition totale est donc essentielle pour la guérison des patients.^{394–396}

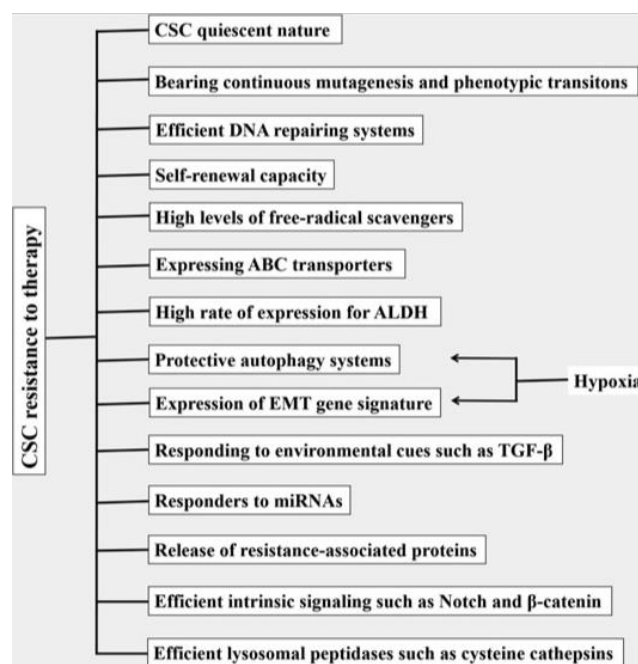


Figure I-45 : Exemples de mécanismes et propriétés intrinsèques des CSCs leur permettant d'échapper aux traitements anticancéreux traditionnels. ABC: ATP-Binding Cassette; ALDH: Aldehyde Dehydrogenase; miRNAs: microRNAs; TGF-β: Transforming Growth Factor-β. Reproduit de l'article de M. Najafi et al.³⁹⁶

En 2003, M. Al-Hajj *et al.* ont découvert que les cellules cancéreuses présentant un phénotype CD44⁺/CD24⁻ (c'est-à-dire avec une forte expression du récepteur CD44 et une expression très faible ou absente du récepteur CD24) étaient capables de générer une tumeur après administration chez une souris immunodéprimée.³⁹⁷ Elles présentaient également des propriétés d'autorenouvellement, de prolifération, et de différenciation. Ce phénotype est en outre associé avec les cancers du sein triplement négatifs les plus agressifs^{397,398} et avec une forte résurgence tumorale³⁹⁸. À la suite de ce travail, d'autres études ont confirmé que le CD44 est un marqueur fiable pour la détection de CSCs dans différents cancers (**Figure I-46**).^{335,393,396}

Type of cancer	Markers	References
Breast	CD44 and CD133	Bai et al. (2018)
CRC	CD24, CD29, CD44, CD51, CD133, CD166, Lrg5, Sox2, EpCAM, and BMI1	De Robertis et al. (2018); Medema and Vermeulen (2011); Sui et al. (2018); Visvader and Lindeman (2008); Wang, Fu, Sun, Guo, & DuBois (2015)
Glioblastoma	CD133, nestin, and A2B5	Gilbertson and Rich (2007); Haspels et al. (2018)
Lung	CD44, CD133, CD166, and EpCAM	Cao et al. (2018); Visvader and Lindeman (2008); Zakaria, Mohd Yusoff, Zakaria, Widera, & Yahaya (2018)
Ovary	CD44 and CD133	C. Liu et al. (2011); Xiang et al. (2015)
Pancreas	CD44 and CD133	C. Liu et al. (2011); Visvader and Lindeman (2008)
Prostate	CD44, CD51, and CD133	Sui et al. (2018); Visvader and Lindeman (2008)
Ependymoma	CD133 and nestin	Gilbertson and Rich (2007)
AML	CD34	Nguyen et al. (2012)
Skin	CD34	Malanchi et al. (2008)
HCC	CD44, CD90, CD133, and EpCAM	Gao et al. (2018); Visvader and Lindeman (2008); Yoshida (2018)
Bladder	CD44	C. Liu et al. (2011)
Gastric	CD44	Ji et al. (2018)

Note. AML: acute myeloid leukemia; CRC: colorectal cancer; HCC: hepatocellular carcinoma; Sox2: sex determining region y-box 2.

Figure I-46 : Marqueurs de CSCs dans divers cancers. Mise en évidence de la présence du CD44 dans la plupart d'entre eux. Tableau reproduit de l'article de revue de M. Najafi et al.³⁹⁶ Les références sont celles de l'article.

Ce phénotype particulier pourrait trouver une explication dans le processus à l'origine de la formation des CSCs. Deux théories prévalent dans ce domaine de recherche. La première statue que les CSCs étaient à l'origine des cellules souches normales qui auraient accumulé de nombreuses mutations jusqu'à devenir cancéreuses. La surexpression de CD44 leur permettrait alors d'adhérer dans une niche pour donner naissance à la tumeur.^{330,396}

La seconde explication se tourne plutôt vers la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). L'EMT est un processus biologique au cours duquel une cellule épithéliale acquiert progressivement un caractère mésenchymateux, et notamment des propriétés invasives. Ce phénomène, qui permet l'extravasation des cellules, est essentiel dans l'embryogénèse mais également dans la formation des métastases.³⁹⁹⁻⁴⁰² Certaines études ont également mis en évidence la capacité de l'EMT à générer des cellules ayant des propriétés d'autorenouvellement et un phénotype CD44⁺.³³⁵

En 2008, Mani *et al.* ont été les premiers à démontrer que l'EMT pouvait produire des CSCs,⁴⁰³ et Morel *et al.* que les CSCs induites par l'EMT présentaient un phénotype CD44⁺/CD24⁻ dans les cancers du sein.⁴⁰⁴ Par ailleurs, il a été constaté qu'une transition des CD44v vers le CD44s est nécessaire à l'EMT et favorise la progression tumorale et la métastase dans le cancer du sein⁴⁰⁵. Les CSCs issues de l'EMT présentent donc en majorité la forme standard du CD44 à leur surface. Les isoformes étant caractéristiques du processus métastatique^{389,390}, une seconde transition du CD44s vers les CD44v a très probablement lieu après l'EMT, afin de permettre l'adhésion de la CSCs à un second site et la croissance de la tumeur métastatique.

Il semble donc clair que si l'interaction HA-CD44 est nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme, la surexpression de l'un ou l'autre joue également un rôle proactif dans le développement du cancer.

I.B.2.3. Le ciblage actif du CD44 par le HA comme appui aux thérapies anticancéreuses

Si l'action pro-tumorale de l'interaction HA-CD44 est très problématique, de nombreux chercheurs ont tenté d'en tirer parti en l'intégrant dans l'élaboration de systèmes anticancéreux innovants. En effet, la surexpression du CD44 à la surface des cellules tumorales, et particulièrement des CSCs, permet d'envisager un ciblage actif des tumeurs à travers l'utilisation du hyaluronane.

De nombreux systèmes basés sur le HA ont donc vu le jour dans le domaine de la nanomédecine. Deux très bonnes revues de la littérature, récemment écrites par Dosio *et al.* et Lee *et al.*, présentent un vaste panel de ces systèmes, pour des applications de théranostique ou de délivrance de principes actifs et de gènes.^{372,406} (Figure I-47).

Quelques exemples sont donnés dans cette partie afin de rendre compte de leur grande diversité et ingéniosité. Ils consistent en priorité en des systèmes de délivrance de principes actifs anticancéreux, la délivrance de matériel génétique n'étant pas le cœur du sujet ici.

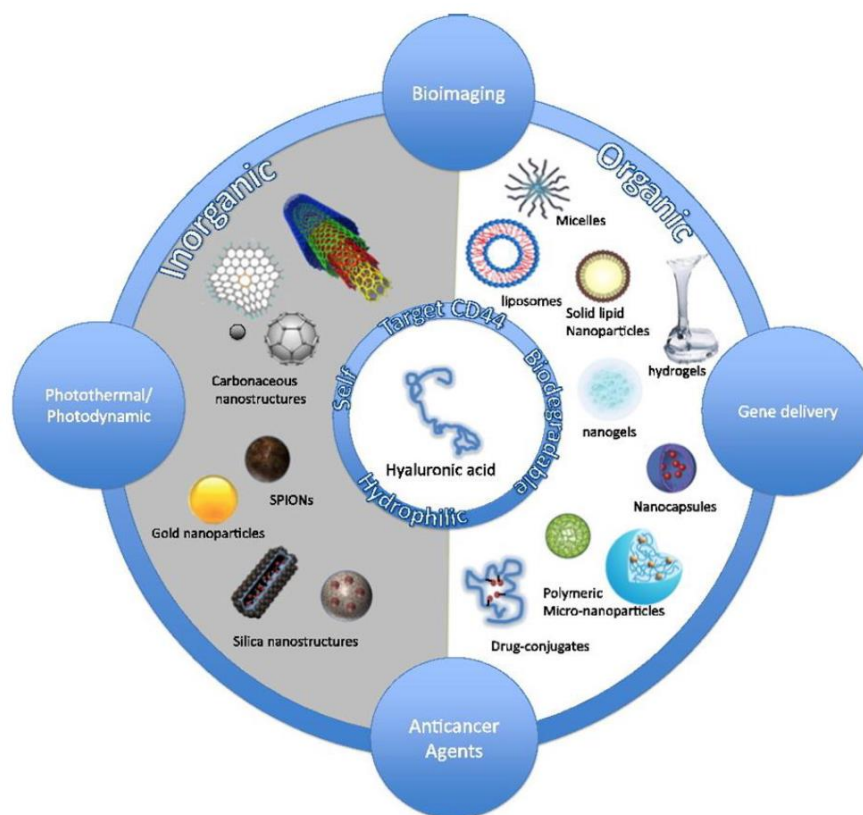


Figure I-47 : Exemples de la diversité des systèmes à base de HA pour différentes applications biomédicales. Reproduit de la revue de littérature de F. Dosio *et al.*³⁷²

I.B.2.3.1. Utilité du HA dans la conception d'un système de vectorisation

Outre sa capacité à cibler le CD44, la présence du hyaluronane dans un DDS est très avantageuse. Tout d'abord, le HA étant porteur de nombreux groupements carboxylique, hydroxyle, et acétamide, il est aisément fonctionnalisable et peut donc être intégré dans un grand nombre de systèmes (Figure I-47).⁴⁰⁷ Par ailleurs, sa très grande hydrophilie permet d'améliorer la solubilité et la biodisponibilité de principes actifs hydrophobes. Le HA peut également augmenter le temps de demi-vie d'un système dans la circulation sanguine. En effet, le HA de faible masse molaire (< 150 kDa) procure un effet furtif similaire à celui du PEG, en contournant l'activation du système du complément.⁴⁰⁸⁻⁴¹¹ En revanche, l'utilisation d'un HA plus long entraîne une élimination rapide par le foie et les reins, du fait de la forte affinité d'un tel HA pour le récepteur HARE (présent dans le foie, la rate et les ganglions lymphatiques).⁴⁰⁹

Des études de biodistribution ont confirmé cette observation : l'administration intraveineuse de composés fluorescents HA-rhodamine a montré une accumulation principalement dans le foie et la peau, lieux d'expression des récepteurs HARE et CD44, respectivement. L'administration de nanogels de HA a montré une biodistribution similaire, avec cependant une plus longue circulation dans le sang.^{412,413}

L'allongement du temps passé dans la circulation sanguine est un atout pour le ciblage passif des tumeurs. En effet, pourvu que le système ait une taille inférieure à 200 nm, il est susceptible de profiter de l'effet EPR (cf. I.A.3.1) pour traverser la membrane épithéliale des vaisseaux sanguins et pénétrer à l'intérieur des tumeurs. Là, le faible drainage lymphatique limite le retour dans la circulation générale et provoque son accumulation. Cependant, comme mentionné précédemment, si cet effet a été observé chez la souris, son efficacité chez l'Homme est encore sujette à controverse.⁴¹⁴

Le couplage avec un ciblage actif est donc requis. L'affinité du hyaluronane pour le CD44 laisse espérer une reconnaissance accrue des cellules cancéreuses surexprimant, en particulier les CSCs. Ce ciblage spécifique des tumeurs permettrait notamment une limitation des effets secondaires. Le principe théorique de l'action anticancéreuse d'un DDS à base de HA est illustré par la **Figure I-48**. Après administration, le DDS pénètre dans la tumeur par effet EPR et par reconnaissance du récepteur CD44. Celle-ci engendre une internalisation rapide, et indépendante des voies d'endocytoses classiques. Le principe actif est alors libéré dans la cellule. Toutefois, son action peut être limitée par la présence dans la membrane de transporteurs évacuant le principe actif hors du cytoplasme, participant ainsi à sa résistance au traitement.

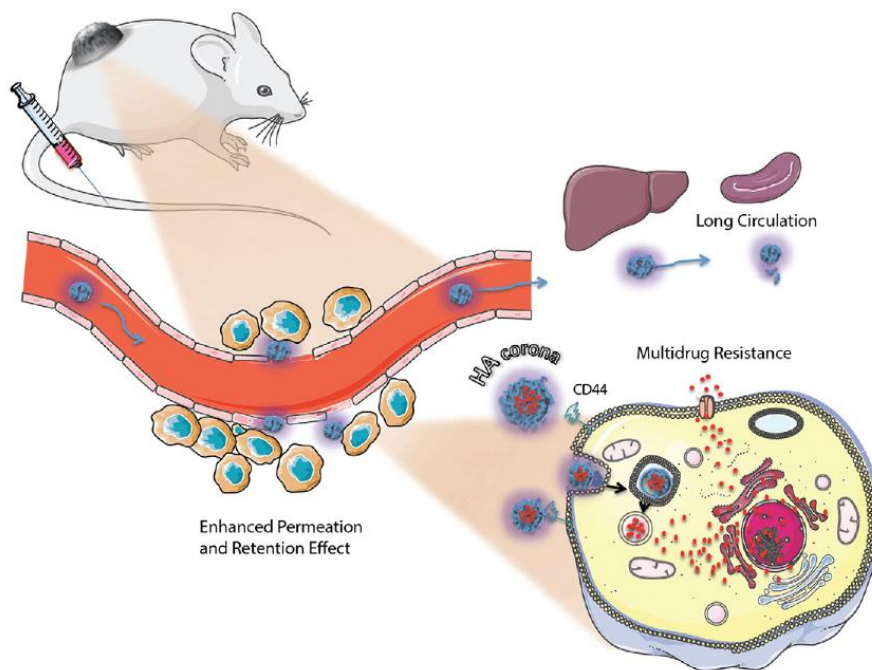


Figure I-48 : Illustration du devenir théorique d'un DDS présentant une couronne de HA après administration dans la circulation sanguine. Reproduction de l'article de revue de Dosio et al.³⁷²

I.B.2.3.2. Prodrogues & bioconjugués

La possibilité de coupler directement une chaîne de HA sur un principe actif pour améliorer sa solubilité, sa stabilité, et ses capacités de ciblage a été démontrée pour la première fois par K. Akima *et al.* en 1995. Cette équipe a synthétisé deux conjugués HA-Mitomycine C (MTC) et HA-Epirubicine qui se sont révélés respectivement actif et inactif contre des carcinomes métastatiques du poumon.⁴¹⁵

Dans le cas où le couplage entre une molécule active et un polymère entraîne la perte de l'activité de celle-ci, on parle de prodrogue. Une prodrogue n'est pas toxique tant qu'elle est intacte, ce qui limite les effets secondaires dus à l'atteinte de cellules non ciblées par la thérapie. La liaison covalente entre le principe actif et le polymère doit être rompue pour restaurer l'activité biologique.

L'action dépend de cette coupure qui peut être contrôlé dans le temps et l'espace par l'application d'un stimulus interne ou externe. Ce contrôle, couplé à l'extrême simplicité du système, en fait l'objet de plus en plus de recherches et de brevets depuis la fin des années 1990.⁴¹⁶⁻⁴¹⁹

Un tel système est développé par Rosato *et al.* depuis 2006 : ONCOFID-P-B est une prodrogue HA-Paclitaxel.⁴²⁰ Sa synthèse est décrite par les auteurs comme reposant sur la participation d'un groupement hydroxyle du Paclitaxel (PTX), essentiel à son action anti-cancéreuse, à un couplage avec un acide carboxylique du HA, formant un lien ester. Cet hydroxyle n'étant plus disponible, la possibilité d'agir sur des tissus sains est limitée.

Les études *in vitro* ont montré que la prodrogue était bien internalisée *via* son interaction avec le CD44 et se retrouvait dans les lysosomes. Là, le pH acide pouvait rompre le lien ester, libérant le Paclitaxel, restaurant son activité et menant à l'apoptose. Des études *in vivo* menées chez la souris sur des tumeurs ovariennes et de la vessie ont démontré une faible toxicité avant coupure (avec une dose tolérée atteignant les 100 mg/kg) et un temps de circulation dans le sang allongé. Une meilleure activité anti-tumorale après coupure a également été constatée, du fait d'un taux de survie amélioré comparé au Paclitaxel seul.⁴²⁰⁻⁴²²

Ces bons résultats ont mené le système jusqu'en étude clinique (phase I et II) pour le cancer de la vessie. Les résultats se sont à nouveau révélés positifs avec une bonne efficacité, une faible toxicité, et peu d'effets secondaires. Il semble donc représenter une bonne alternative à la cystectomie pour les patients atteints de certains cancer de la vessie (non répondants à la Bacille de Calmette-Guérin).^{423,424}

Le même principe a été utilisé par R.K. Mittapalli *et al.* en 2013.⁴²⁵ Cette fois, c'est un HA très court (5 kDa) qui a été couplé au Paclitaxel. Les auteurs suggèrent que la très faible taille de la prodrogue lui permet de passer la barrière hémato-encéphalique et d'atteindre des métastases au cerveau provoquées par des formes de cancer du sein métastatiques. Là, le HA permet une internalisation rapide *via* le CD44. Cette fois encore, le lien ester est supposé être rompu par le faible pH des lysosomes, permettant la libération du Paclitaxel dans le cytoplasme. *In vitro*, ces conjugués HA-PTX ont présenté une activité et un IC₅₀ similaires au PTX seul, mais un taux de survie *in vivo* significativement amélioré. Malgré ces résultats précliniques encourageants, les essais cliniques n'ont pas encore été décrits.

Un autre exemple intéressant est celui de la prodrogue développée par S. Yin *et al.* en 2015.⁴²⁶ Il s'agit une nouvelle fois d'une prodrogue HA-PTX, avec $Mw_{HA} = 9.5, 35$ ou 770 kDa. L'originalité se situe au niveau de la liaison HA-PTX qui est effectuée par un lien présentant un pont disulfure. Cette fois, la libération du PTX est donc liée à la présence d'un milieu réducteur.

Le principe de fonctionnement théorique de ce système est représenté en **Figure I-49** : du fait de l'hydrophobie du PTX, le conjugué HA-ss-PTX s'auto-assemble en milieu aqueux pour former des nanoparticules sphériques de diamètre inférieur à 200 nm. Celles-ci peuvent alors cibler la tumeur par effet EPR et reconnaissance du CD44, menant à leur internalisation. Une fois dans la cellule, la libération du PTX est assurée par le glutathion (GSH) qui rompt le pont disulfure et restaure l'activité cytotoxique. Lors d'études *in vivo*, le conjugué HA-ss-PTX a été comparé avec du Taxol (PTX seul) et un conjugué PEG-ss-PTX. Les auteurs en concluent que l'association avec le HA améliore le ciblage, l'internalisation, et l'efficacité du traitement en permettant une libération rapide du PTX dans la cellule et une inhibition de la croissance tumorale.

Si le Paclitaxel reste la molécule la plus courante⁴²⁷⁻⁴³⁰, d'autres agents anticancéreux ont également été utilisés. Ainsi, le travail de D.G. Vogus *et al.* sur la combinaison de la Gemcytabine (GEM) et de la Doxorubicine (DOX) est à mentionner.⁴³¹ Ces deux principes actifs ont été couplés à la même chaîne de HA avec des agents de liaison différents, permettant une libération plus rapide de la GEM que de la DOX. Cela a amélioré la synergie entre elles et permis une meilleure efficacité dans la lutte contre le cancer du sein triplement négatif.

L'utilisation de Docetaxel (DTX)⁴³², de Cisplatine (Cis)^{433,434}, ou d'acide butyrique⁴³⁵ a également été rapportée.

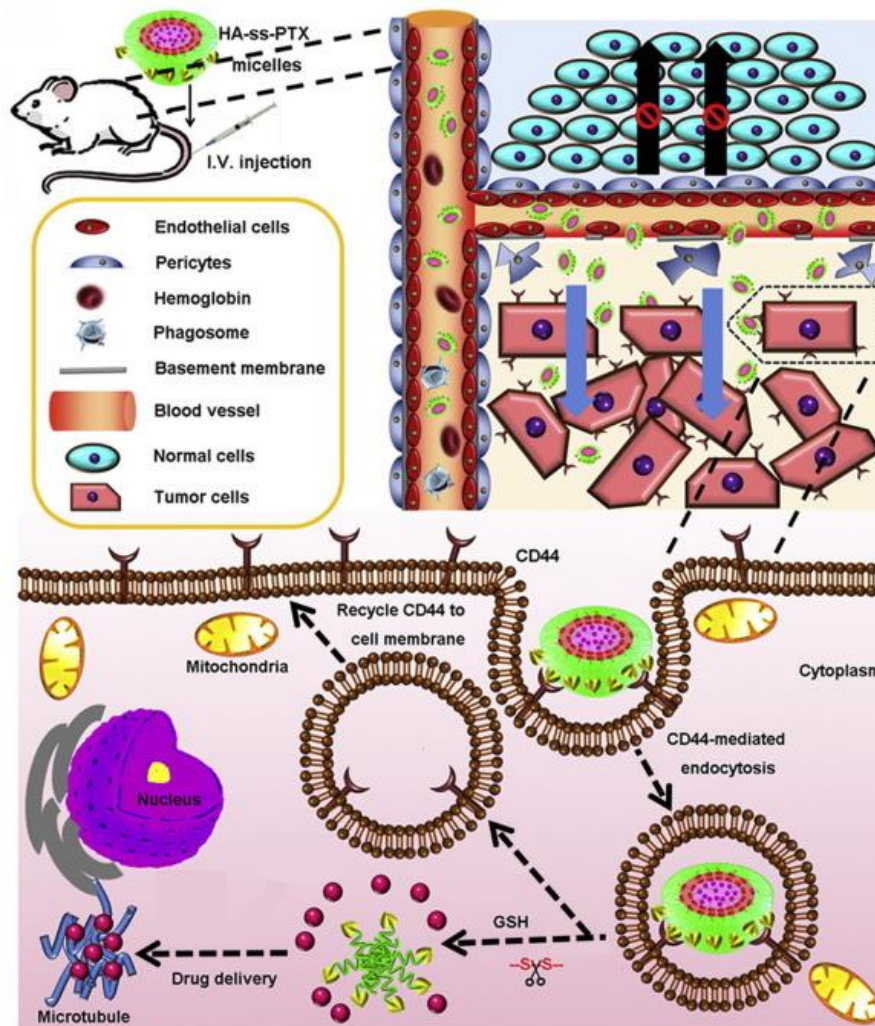


Figure I-49 : Principe de fonctionnement de micelles formées par l'auto-assemblage de prodrogues HA-ss-PTX après injection par intraveineuse chez la souris. Schéma reproduit de l'article de S.Yin et al.⁴²⁶

I.B.2.3.3. Le HA dans les systèmes de vectorisation

Si les conjugués HA-anticancéreux semblent très prometteurs, certains traitements nécessitent l'utilisation de systèmes plus complexes. De nombreux nanovecteurs ont ainsi été développés. Outre leurs avantages intrinsèques (cf. I.A.3.1), une fonctionnalisation de leur surface par du HA permet d'accroître leur biocompatibilité, furtivité, et capacité de ciblage. Ainsi, les nanovecteurs à base de HA sont régulièrement étudiés.^{263,372,406,409,436-439} Ils sont de nature variée, et forment notamment des micelles polymériques⁴⁴⁰⁻⁴⁴⁴, des liposomes⁴⁴⁵⁻⁴⁵⁴, des polymèresomes⁴⁵⁵⁻⁴⁵⁸, des nanogels⁴⁵⁹⁻⁴⁶², des nanoparticules d'or^{338,463-466} ou d'oxyde de fer⁴⁶⁷⁻⁴⁷¹, ou encore des nanotubes de carbones⁴⁷²⁻⁴⁷⁵ (Figure I-47).

Liposomes

Les liposomes représentent une part importante des DDS anticancéreux développés. Plusieurs voies de synthèse existent. Il est par exemple possible de co-assembler des conjugués HA-lipides avec d'autres composés, afin de former des liposomes fonctionnalisés. C'est la stratégie choisie par Arpicco et al. en 2013.⁴⁴⁸ Les liposomes formés par cette équipe étaient ainsi composés de lipides DPPC (1,2-dipalmitoyl-phosphatidylcholine) et cholestérol en ratio 70:30, co-assemblés avec des conjugués HA-DPPE (1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphoetanolamine) et des prodrogues de GEM (C₁₂GEM). Ils ont été obtenus par hydratation de film lipidique, pour atteindre une taille de 150-190 nm. Ils présentaient une bonne stabilité, une charge en GEM contrôlée et peu de fuite. Leur test *in vitro* a démontré un ciblage efficace des cellules surexprimant le CD44 et une meilleure internalisation en comparaison avec les liposomes sans HA.

Une autre stratégie consiste à former les liposomes pour ensuite fonctionnaliser leur surface avec du HA. Elle a été adoptée par N-K. Han *et al.*⁴⁵⁰ Cette fois, des liposomes composés d'EPC, DOPE, et cholestérol (ratio molaire 3:1:1) ont été assemblés par hydratation du film lipidique avec une solution de GEM. Une fois la GEM encapsulée et les liposomes obtenus, du HA a été greffé sur la surface par un couplage amine – ester activé. Des études *in vitro* et *in vivo* ont ensuite été menées sur des cellules souches cancéreuses du sein. D'après les auteurs, elles ont montré que les liposomes présentant le HA sur leur surface (HA-L-GEM) possédaient une plus grande furtivité vis-à-vis du système RES, une meilleure stabilité que leur équivalent non greffé, et qu'ils induisaient la rémission de souris porteuses de tumeurs du sein sans toxicité systémique apparente.

Polymèresomes

Cette structure vésiculaire semble donc bien adaptée à la délivrance ciblée d'anticancéreux. D'autres tentatives ont été menées en remplaçant les lipides par des polymères synthétiques : on parle alors de polymèresomes. Ils conservent les avantages des liposomes, avec notamment une encapsulation combinée de principes actifs hydrophiles et hydrophobes pour des applications synergiques, tout en apportant des améliorations propres, telle qu'une grande stabilité colloïdale. L'importante variété des polymères utilisables permet également d'acquérir des propriétés spécifiques, comme une modulation de l'épaisseur⁴⁷⁶ ou de la perméabilité de la membrane, ou encore de rendre le nanoobjet formé sensible à un stimulus. Récemment, une équipe iranienne a synthétisé un conjugué HA-PCL (poly-caprolactone) capable de former des polymèresomes après nanopréciipitation (Figure I-50).⁴⁵⁸

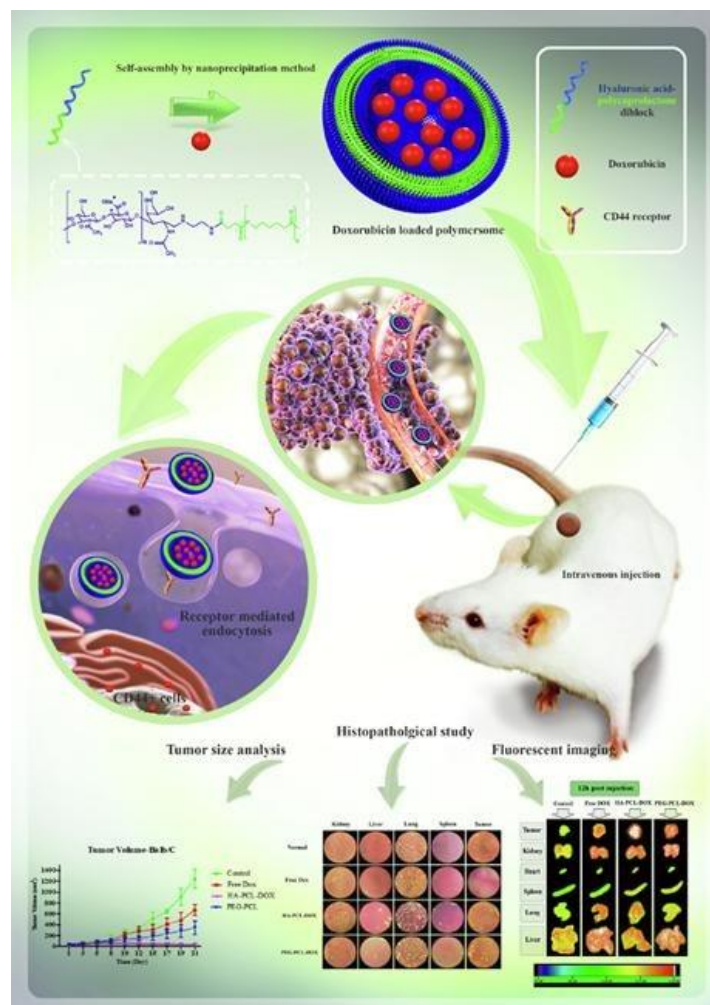


Figure I-50 : Synthèse et action antitumorale d'un polymèresome HA-PCL-DOX. Efficacité anticancéreuse avérée, avec une inhibition de la croissance tumorale. Accumulation principalement dans la tumeur et le foie, et induction de nécrose dans la tumeur. Illustration reproduite de l'article de M. Shahriari *et al.*⁴⁵⁸

La structure vésiculaire a été vérifiée par FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscopy) et AFM. Les tests biologiques effectués ont permis aux auteurs de constater que la Doxorubicine encapsulée dans ces polymèresomes était libérée progressivement et efficacement. La comparaison avec de la DOX libre ou des polymèresomes PEG-PCL-DOX a fait état de meilleurs résultats de ciblage et d'action anticancéreuse *in vitro* et *in vivo* sur des tumeurs du sein pour le système HA-PCL-DOX. Les chercheurs présentent donc leur système comme une bonne alternative au DOXIL, formulation liposomale de DOX approuvée par la FDA et actuellement utilisée dans le traitement de certains cancers.

Nanoparticules micellaires polymériques

Si les vésicules ont leurs avantages, la formation de micelles polymériques par nanopréciipitation ou auto-assemblage peut être plus simple et plus rapide. En 2020, X. Zhang *et al.* ont synthétisé un copolymère en brosse HA-ss-PLLZ (cf. lexique) dans lequel la liaison entre le HA et le PLLZ est maintenue par des ponts disulfures sensibles à la réduction.⁴⁴³ Les nanoparticules micellaires ont été formées par co-précipitation du HA-ss-PLLZ avec du Paclitaxel (PTX) et de l'Apatinib (APA). L'encapsulation de ces deux principes actifs avait pour but de lutter contre les cancers présentant une résistance "multidrogué". Le principe théorique est illustré en **Figure I-51**. Après administration par voie intraveineuse, les nanoparticules s'accumulent dans la tumeur et sont internalisées *via* le CD44. Une fois dans la cellule, le glutathion (GSH) brise les ponts disulfures, désassemblant la nanoparticule et libérant le PTX et le APA.

D'après cette étude, la présence du APA améliore considérablement les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*. En effet son rôle n'est pas de causer l'apoptose des cellules cancéreuses (qui est l'action du PTX), mais de lutter contre la résistance "multidrogué" en inhibant les mécanismes responsables de l'évacuation du PTX hors du cytoplasme (inhibition de la P-gp). Ainsi, les micelles co-encapsulant le PTX et le APA ont montré une réduction de la croissance tumorale de 85%, contre 67% pour celles contenant uniquement le PTX, et 28% pour le PTX libre. Par ailleurs, cette fois encore, la présence de HA a permis une circulation plus longue, une accumulation plus importante, et une toxicité moindre des nanoobjets. Ce système simple et permettant une amélioration de l'action anti-tumorale par la neutralisation de la résistance "multidrogué" paraît donc très prometteur pour le traitement des cancers du sein jusqu'ici résistants.

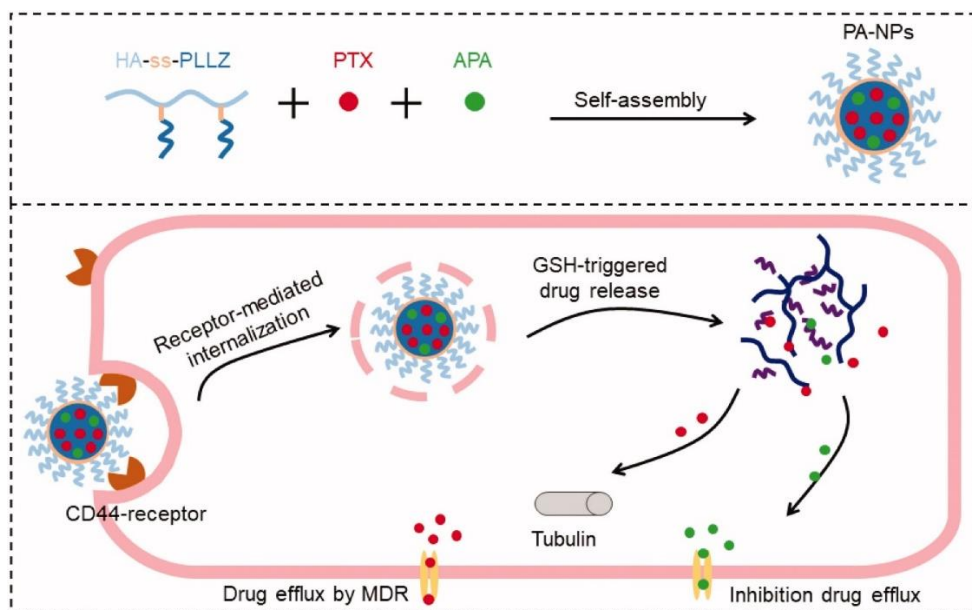


Figure I-51 : Haut : Formation de micelles polymériques à base de HA-ss-PLLZ co-encapsulant le PTX et le APA. Bas : Schéma de principe de l'internalisation des nanoparticules et de la libération des principes actifs. Illustration de leur double action anti-cancéreuse et anti-MDR. Reproduit de l'article de X. Zhang *et al.*⁴⁴³

Autre exemple intéressant : Fang *et al.* ont choisi en 2019 de présenter une nanoparticule entièrement d'origine naturelle et biocompatible.⁴⁷⁷ Cette nanoparticule était constituée d'un squelette de HA greffé avec un conjugué poly(tyrosine)-acide lipoiïque (HA-g-PTyr-LA, HA : 20 kDa, PTyr : 2.2 kDa). Elle a été formée par nanoprécipitation, étape lors de laquelle du Docetaxel (DTX) a été encapsulé. La stabilité du système a ensuite été assurée par la réticulation par ROP (Ring Opening Polymerisation) du cycle lipoiïque. Les auteurs affirment donc que le nanoobjet ainsi formé est stable en conditions physiologiques, fortement chargé en DTX, capable de reconnaître le récepteur CD44, et sensible à la réduction (**Figure I-52**). Cette dernière caractéristique permet la rupture de la réticulation en présence de glutathion (GSH) et donc la libération contrôlée de l'agent anticancéreux.

Des tests *in vitro* et *in vivo* ont été effectués sur des cellules de cancer du sein et du poumon CD44⁺ (4T1-Luc). La comparaison avec le DTX libre a montré une meilleure action anti-tumorale, anti-migratoire et anti-invasion ainsi qu'une circulation sanguine prolongée pour les nanoparticules contenant du DTX. *In vivo*, elles ont démontré une amélioration significative de l'inhibition de la croissance de la tumeur principale du sein et des métastases au poumon, associée à une toxicité globale plus faible et des effets secondaires moindres.

Ce système semble donc lui aussi prometteur pour la lutte combinée contre les tumeurs principales et leurs métastases, dans le cas de certains cancers du sein très agressifs.

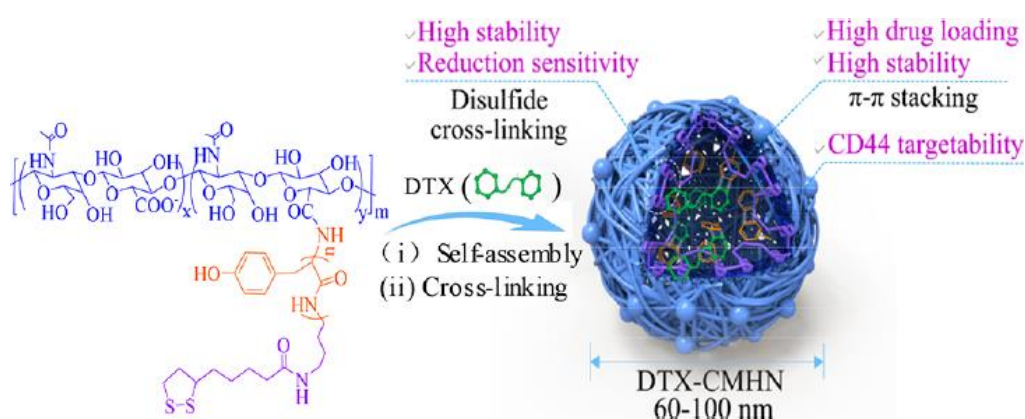


Figure I-52 : Formation d'une nanoparticule composée d'éléments entièrement naturels HA-g-PTyr-LA réticulée par ROP et chargée en DTX. Bleu : hyaluronane ; Orange : polytyrosine ; Violet : acide lipoiïque ; Vert : Docetaxel. Illustration reproduite de l'article de Fang *et al.*⁴⁷⁷

Nanovecteurs hybrides organique/inorganique

La formation de nanoobjets hybrides organique/inorganique a également ses avantages. Elle permet en effet de combiner plusieurs types de traitements ou d'associer traitement et diagnostique (théranostique). Un exemple très complet a été développé par W. Xu *et al.* et est présenté en **Figure I-53**.⁴⁶⁴ Les auteurs proposent une plateforme complète procurant un double ciblage des récepteurs CD44 et HER2 (tous deux surexprimés dans le cancer du sein) et une triple action d'imagerie, de thérapie photodynamique (PDT) et photothermique (PTT), contrôlée par trois stimuli différents.

Le système se compose d'un cœur de nano-bâtonnet d'or dont la surface a été fonctionnalisée de façon covalente par des chaînes de thiol-HA (GNR-HA). Un fluorophore (cyanine 7.5) et un photosensibilisateur (acide 5-amnolevulinique, ALA) ont ensuite été conjugués au GNR-HA *via* des liaisons amide et hydrazone, respectivement. Une seconde épaisseur de HA a enfin été ajoutée, en interaction avec le HA-thiol immobilisé sur la surface. Cette fois, les chaînes étaient fonctionnalisées par un anticorps anti-HER2 (HA-HER2).

Les chercheurs expliquent qu'une fois dans l'organisme, les nano-bâtonnets sont capables de repérer les cellules CD44⁺/HER2⁺ grâce à la présence conjointe du HA et de l'anticorps anti-HER2 en surface. Une fois internalisé par la voie du CD44, trois stimuli permettent alors la libération des différents éléments : le pH acide rompt le lien hydrazone entre ALA et HA, tandis que les hyaluronidases dégradent le HA, et que le glutathion brise les ponts disulfures retenant le HA sur le bâtonnet.

Chaque élément peut ainsi agir indépendamment. L'imagerie est assurée par la fluorescence de la cyanine 7.5. La PDT, quant à elle, repose sur la génération d'oxygène singulet (ROS) par ALA sous irradiation dans le proche infrarouge ($\lambda=635$ nm). Enfin, l'irradiation des bâtonnets à $\lambda=808$ nm provoque un échauffement par effet plasmon, entraînant lui aussi la mort cellulaire (PTT).

Les tests *in vitro* et *in vivo* de ce système ont confirmé un bon ciblage des cellules CD44⁺/HER2⁺ par HA et HER2, avec une accumulation conséquente dans les tumeurs. La combinaison de la PDT et PTT a donné de meilleurs résultats que leur application séparée, à la fois *in vitro* et *in vivo* : les tumeurs ont complètement été éliminées, sans observation de rechute ou de toxicité systémique. Ce système est donc très complet et efficace, mais également complexe à mettre en œuvre.

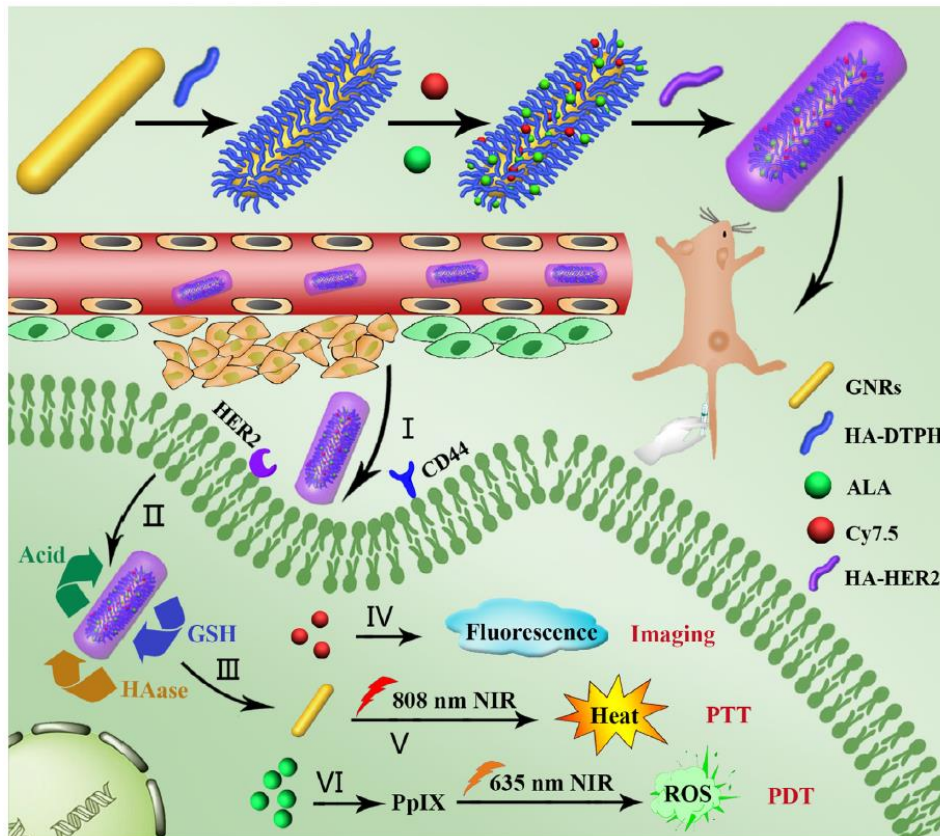


Figure I-53 : Schéma de la synthèse et de l'action de nano-bâtonnets d'or multifonctionnels et multi-sensibles développés par W. Xu et al. (reproduction de leur article).⁴⁶⁴ Des nano-bâtonnets d'or (GNR, jaune) sont fonctionnalisés avec des composés HA-DTPH (bleu) et HA-HER2 (violet), encapsulant un fluorophore (Cy7.5, rouge) et un photosensibilisateur (ALA, vert). Après internalisation, la présence de glutathion (GSH), de hyaluronidase (HAase) et le pH acide libèrent les différents composants. Ils peuvent alors accomplir des actions combinées d'imagerie, de thérapie photodynamique (PDT) et de thérapie photothermique (PTT).

I.B.2.3.4. Les nanovecteurs HA-polypeptides

Si le couplage du HA avec des polymères ou des lipides pour des applications anticancéreuses est assez courant, sa conjugaison avec des polypeptides naturels l'est moins. La plupart de ces systèmes consistent en une association non covalente dans laquelle le HA sert de matrice ou d'agent de ciblage/furtivité. On notera ainsi l'existence de nanogels⁴⁷⁸, de nanocomplexes^{479,480} ou de micro-aiguilles⁴⁸¹ de HA permettant la délivrance locale de peptides anti-tumoraux. La formation de bioconjugués HA-polypeptide covalents pour des applications anticancéreuse est donc un domaine qui demeure peu exploré. Quelques travaux sont néanmoins notables.

Ainsi, Lee *et al.* ont synthétisé un conjugué HA-OVA (ovalbumine) pour une application en immunothérapie cancéreuse.⁴⁸² Ici, le couplage a été effectué sur l'extrémité anomère du HA. L'ensemble peut alors être assimilé à un copolymère à blocs amphiphile, capable de former des nanoparticules.

L'action anticancéreuse théorique de ce composé assez originale. Elle est détaillée en **Figure I-54**. Elle repose sur la génération préalable de lymphocytes T anti-OVA par voie vaccinale. Après administration systémique chez la souris, les nanoparticules ciblent la tumeur, s'y accumulent et sont internalisées dans les cellules grâce à la reconnaissance du HA par le CD44. Une fois à l'intérieur du cytoplasme, le HA est dégradé, libérant l'OVA. Cet antigène étranger est alors présenté sur la membrane des cellules qui peuvent ainsi être reconnues et détruites par les lymphocytes anti-OVA.

Les auteurs ont donné dans cette étude la preuve de concept de ce fonctionnement. Ils ont par la suite optimisé le système, notamment à travers l'adjonction d'un bloc PEG au conjugué HA-OVA, qui a permis d'améliorer la furtivité des nanoparticules jusqu'à la tumeur. Là, la liaison PEG-HA est coupée par la MMP9 (Métalloprotéinase Matricielle 9), qui est une enzyme principalement localisée dans le microenvironnement tumoral. La couronne de PEG est alors ôtée, exposant le HA et revenant au système initial.⁴⁸³ Cette méthode ouvre donc la voie à un type d'immunothérapie innovant. Cependant, si la preuve de concept est faite, l'optimisation du système doit encore être poursuivie afin, entre autres, d'améliorer le ciblage des cellules cancéreuses, d'éviter tout emballement de la réponse immunitaire, et de limiter le risque de développement de maladies auto-immunes.

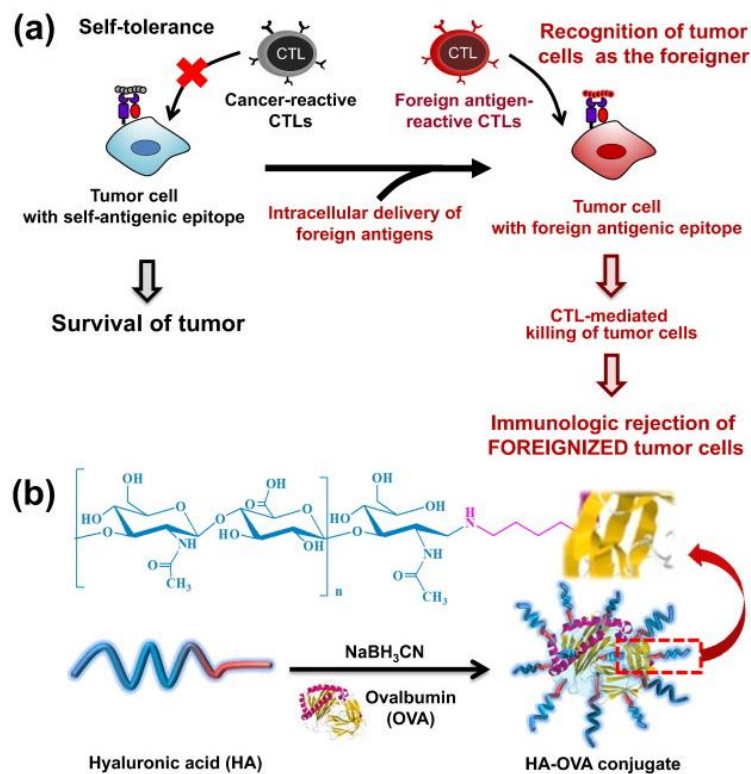


Figure I-54 : A : concept de l'immunothérapie anticancéreuse développée par Lee et al. Les cellules tumorales sont très similaires aux cellules saines et échappent donc au système immunitaire. La délivrance intracellulaire d'un antigène étranger et la génération des lymphocytes correspondant par vaccination permet la reconnaissance des cellules tumorales et leur destruction. B : Structure du conjugué HA-OVA utilisé pour vectoriser l'antigène OVA dans les cellules cancéreuses. Schéma reproduit de leur article.⁴⁸²

Enfin, un polypeptide synthétique, le poly(γ -benzyl-L-glutamate) (PBLG), a été utilisé en association avec le HA par le laboratoire LCPO à partir de 2009. Le copolymère à blocs HA-*b*-PBLG a été synthétisé par une cycloaddition catalysée au cuivre entre l'extrémité anomère du HA et l'extrémité C-terminale du PBLG, respectivement fonctionnalisées avec un groupement alcyne et azoture. Ce composé s'assemble en polymèresomes qui peuvent contenir à la fois des principes actifs hydrophiles et hydrophobes. Ils ont notamment été utilisés pour l'encapsulation de la DOX ou du DTX pour un taux de charge de 10%.⁴⁵⁵⁻⁴⁵⁷ Testés *in vitro* sur des cellules de cancer du sein, ce système a démontré une meilleure accumulation au niveau de la tumeur et une meilleure efficacité que l'anticancéreux libre, ainsi qu'une plus grande cytotoxicité envers les cellules surexprimant le CD44.

Une comparaison entre des nanoparticules sphériques de 30 nm et des disques de 300 nm a également été effectuée afin d'évaluer l'influence de la taille et de la morphologie. Il ressort de cette étude que les nanoparticules de 30 nm présentent une meilleure affinité et une meilleure internalisation que celles de 300 nm.³²⁵

Enfin, des études *in vivo* ont été menées sur un modèle murin de cancer du poumon non-à-petites-cellules (NSCLC) exprimant l'EGFR. Des nanovecteurs de 30 nm encapsulant du gefitinib (anti-EGFR) et du vorinostat (inhibiteur d'histone désacétylase, HDAC) ont été administré par nébulisation. Ils se sont révélés plus efficaces que les principes actifs seuls : la co-encapsulation et la libération contrôlée des deux molécules leur permettant d'agir en synergie.^{325,484}

Il est intéressant de noter que les nanoparticules formées par ces copolymères à blocs HA-*b*-PBLG ont été utilisées dans les expériences de multivalence décrites précédemment (cf. I.B.2.1.2, Figure I-41).

Les avantages liés à l'utilisation du HA dans des DDS pour améliorer la délivrance de principes actifs anticancéreux ont donc été largement prouvés : amélioration de la solubilité, de la furtivité, du ciblage, de l'internalisation... Tout ceci concourt à une activité antitumorale plus efficace, sans pour autant induire un surcroît de toxicité systémique. La présence de nombreux groupements fonctionnels permet au HA d'être intégré à des systèmes très variés, du simple conjugué HA-principe actif aux complexes hybrides multifonctionnels. Sa grande hydrophilie en fait un candidat de choix pour la synthèse de composés amphiphiles, capables de s'assembler dans des structures de morphologies diverses. Toutefois, le faible nombre de conjugués HA-polypeptide est étonnant : en effet, les polypeptides peuvent apporter une biocompatibilité, biodégradabilité et éventuellement une bioactivité que n'offrent pas les polymères synthétiques.

Ce projet de thèse se propose donc d'étudier un bioconjugué HA-polypeptide capable de s'auto-assembler en fonction de la température dans les conditions physiologiques pour une activité anticancéreuse.

CONCLUSION

Cette revue de bibliographie a mis en évidence les atouts respectifs des ELPs et du HA pour des applications biologiques et en particulier anticancéreuses. Tous deux sont d'origine naturelle et semblent biocompatibles et biodégradables.

La synthèse recombinante des ELPs apporte un contrôle sur la structure du composé très intéressante pour des études structure-propriétés. Parmi elles, la plus importante est la thermosensibilité de type LCST, qui permet une agrégation réversible en milieu aqueux en fonction de la température. Cette propriété peut être modulée par la séquence de l'ELP (sa longueur et son hydrophobie), mais également par la présence de sels ou par la concentration. Son maintien lors de son couplage avec d'autres (macro)molécules permet la synthèse de composés capables de s'auto-assembler en fonction de la température. Bien que les ELPs soient biologiquement inertes, il est donc possible de les associer avec d'autres composés bioactifs pour former des nanoobjets multifonctionnels.

Le HA quant à lui intervient dans de nombreux processus biologiques. Dans le contexte de la nanomédecine, sa forte hydrophilie facilite la solubilisation d'actifs hydrophobes, et son affinité pour le récepteur CD44 en fait un ligand de choix pour le ciblage actif des cellules tumorales.

L'association de ces deux macromolécules semble donc particulièrement prometteuse. Elle n'est d'ailleurs pas nouvelle : en effet, elle est déjà documentée pour la synthèse d'hydrogels thermosensibles et pour des applications d'ingénierie tissulaire.⁴⁸⁵⁻⁴⁸⁸

L'originalité de ce travail de recherche est de combiner les avantages de ces deux composés pour une application en nanomédecine anticancéreuse. Pour cela, nous proposons la synthèse d'un bioconjugué HA-*b*-ELP. Le HA hydrophilie associé à l'ELP thermosensible permet la formation d'un amphiphile capable de s'auto-assembler fonction de la température. Des nanoparticules peuvent ainsi être formulées en milieu aqueux sans nanopréciipitation ni usage de solvants organiques. La réversibilité de cet assemblage permet une présentation du HA sous forme de chaîne libre ou de nanoparticule, rendant ainsi possible une étude de la modulation de l'affinité des bioconjugués pour le CD44 contrôlée par la température. Tout ceci pourrait alors être utilisé pour le ciblage de cellules tumorales surexprimant le CD44, la combinaison avec un agent anticancéreux permettant alors leur élimination.

De nombreux exemples donnés lors de cette revue de littérature font état d'une efficacité certaine. Il faut toutefois noter qu'elle va généralement de pair avec une grande complexité du système, de sa synthèse à son utilisation. Ici, l'association de ce polypeptide et de ce polysaccharide donnerait naissance à un composé très simple, mais pourtant multifonctionnel et ciblant.

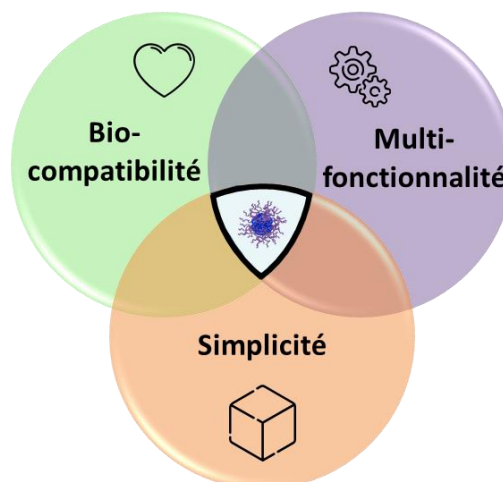


Figure I-55 : Schéma de l'objectif principal de ce projet : former un nanovecteur combinant la biocompatibilité, la multifonctionnalité (ciblage actif, thermosensibilité etc.) et la simplicité (synthèse et formulation).

RÉFÉRENCES

- (1) Debelle, L.; Tamburro, A. M. Elastin: Molecular Description and Function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1999**, *31* (2), 261–272. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(98\)00098-3](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(98)00098-3).
- (2) Mithieux, S. M.; Weiss, A. S. Elastin. In *Advances in Protein Chemistry; Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers*; Academic Press, 2005; Vol. 70, pp 437–461. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70013-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70013-9).
- (3) Lefevre, M.; Rucker, R. B. Aorta Elastin Turnover in Normal and Hypercholesterolemic Japanese Quail. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1980**, *630* (4), 519–529. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(80\)90006-9](https://doi.org/10.1016/0304-4165(80)90006-9).
- (4) Shapiro, S. D.; Endicott, S. K.; Province, M. A.; Pierce, J. A.; Campbell, E. J. Marked Longevity of Human Lung Parenchymal Elastic Fibers Deduced from Prevalence of D-Aspartate and Nuclear Weapons-Related Radiocarbon. *J. Clin. Invest.* **1991**, *87* (5), 1828–1834. <https://doi.org/10.1172/JCI115204>.
- (5) Wise, S. G.; Yeo, G. C.; Hiob, M. A.; Rnjak-Kovacina, J.; Kaplan, D. L.; Ng, M. K. C.; Weiss, A. S. Tropoelastin: A Versatile, Bioactive Assembly Module. *Acta Biomater.* **2014**, *10* (4), 1532–1541. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.08.003>.
- (6) Werb, Z.; Banda, M. J.; Mckerrow, J. H.; Sandhaus, R. A. Elastases and Elastin Degradation. *J. Invest. Dermatol.* **1982**, *79* (1, Supplement), 154–159. <https://doi.org/10.1038/jid.1982.28>.
- (7) Uitto, J. Connective Tissue Biochemistry of the Aging Dermis: Age-Related Alterations in Collagen and Elastin. *Dermatol. Clin.* **1986**, *4* (3), 433–446. [https://doi.org/10.1016/S0733-8635\(18\)30806-4](https://doi.org/10.1016/S0733-8635(18)30806-4).
- (8) Robert, L.; Robert, A. M.; Fülöp, T. Rapid Increase in Human Life Expectancy: Will It Soon Be Limited by the Aging of Elastin? *Biogerontology* **2008**, *9* (2), 119–133. <https://doi.org/10.1007/s10522-007-9122-6>.
- (9) Mora Huertas, A. C.; Schmelzer, C. E. H.; Hoehenwarter, W.; Heyroth, F.; Heinz, A. Molecular-Level Insights into Aging Processes of Skin Elastin. *Biochimie* **2016**, *128–129*, 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.08.010>.
- (10) Cardoso, W. V.; Sekhon, H. S.; Hyde, D. M.; Thurlbeck, W. M. Collagen and Elastin in Human Pulmonary Emphysema. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1993**, *147* (4), 975–981. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/147.4.975>.
- (11) Houghton, A. M.; Quintero, P. A.; Perkins, D. L.; Kobayashi, D. K.; Kelley, D. G.; Marconcini, L. A.; Mecham, R. P.; obert M. Senior; Shapiro, S. D. Elastin Fragments Drive Disease Progression in a Murine Model of Emphysema. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116* (3), 753–759. <https://doi.org/10.1172/JCI25617>.
- (12) Robert, L.; Robert, B.; Robert, A. M. Molecular Biology of Elastin as Related to Aging and Atherosclerosis. *Exp. Gerontol.* **1970**, *5* (4), 339–356. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(70\)90017-3](https://doi.org/10.1016/0531-5565(70)90017-3).
- (13) Robert, L.; Robert, A. M.; Jacotot, B. Elastin–Elastase–Atherosclerosis Revisited. *Atherosclerosis* **1998**, *140* (2), 281–295. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(98\)00171-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(98)00171-3).
- (14) Petersen, E.; Wågberg, F.; Ångquist, K.-A. Serum Concentrations of Elastin-Derived Peptides in Patients with Specific Manifestations of Atherosclerotic Disease. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **2002**, *24* (5), 440–444. <https://doi.org/10.1053/ejvs.2002.1750>.
- (15) Maurice, P.; Blaise, S.; Gayral, S.; Debelle, L.; Laffargue, M.; Hornebeck, W.; Duca, L. Elastin Fragmentation and Atherosclerosis Progression: The Elastokine Concept. *Trends Cardiovasc. Med.* **2013**, *23* (6), 211–221. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2012.12.004>.
- (16) Fornieri, C.; Quaglino, D.; Lungarella, G.; Cavarra, E.; Tiozzo, R.; Giro, M. G.; Canciani, M.; Davidson, J. M.; Ronchetti, I. P. Elastin Production and Degradation in Cutis Laxa Acquisita. *J. Invest. Dermatol.* **1994**, *103* (4), 583–588. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12396893>.
- (17) Tassabehji, M.; Metcalfe, K.; Hurst, J.; Ashcroft, G. S.; Kielty, C.; Wilmot, C.; Donnai, D.; Read, A. P.; Jones, C. J. P. An Elastin Gene Mutation Producing Abnormal Tropoelastin and Abnormal Elastic Fibres in a Patient with Autosomal Dominant Cutis Laxa. *Hum. Mol. Genet.* **1998**, *7* (6), 1021–1028. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.6.1021>.
- (18) Partridge, S. M. Elastin. In *Advances in Protein Chemistry*; Anfinsen, C. B., Bailey, K., Anson, M. L., Edsall, J. T., Eds.; Academic Press, 1963; Vol. 17, pp 227–302. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60055-8](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60055-8).
- (19) Partridge, S. M.; Davis, H. F.; Adair, G. S. The Chemistry of Connective Tissues. 2. Soluble Proteins Derived from Partial Hydrolysis of Elastin. *Biochem. J.* **1955**, *61* (1), 11–21.
- (20) Engeland, R. A New Hydrolysis Product from Elastin. *Biochem. J.* **1925**, *19* (5), 850–852.
- (21) Tamburro, A. M.; Bochicchio, B.; Pepe, A. Dissection of Human Tropoelastin: Exon-By-Exon Chemical Synthesis and Related Conformational Studies. *Biochemistry* **2003**, *42* (45), 13347–13362. <https://doi.org/10.1021/bi034837t>.
- (22) Le, D. H. T.; Sugawara-Narutaki, A. Elastin-like Polypeptides as Building Motifs toward Designing Functional Nanobiomaterials. *Mol. Syst. Des. Eng.* **2019**, *4* (3), 545–565. <https://doi.org/10.1039/C9ME00002J>.
- (23) Vrhovski, B.; Jensen, S.; Weiss, A. S. Coacervation Characteristics of Recombinant Human Tropoelastin. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250* (1), 92–98. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00092.x>.

- (24) Yeo, G. C.; Keeley, F. W.; Weiss, A. S. Coacervation of Tropoelastin. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *167* (1), 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.10.003>.
- (25) Hinek, A.; Keeley, F. W.; Callahans, J. Recycling of the 67-kDa Elastin Binding Protein in Arterial Myocytes Is Imperative for Secretion of Tropoelastin. *Exp. Cell Res.* **1995**, *220* (2), 312–324. <https://doi.org/10.1006/excr.1995.1321>.
- (26) Rosenbloom, J.; Abrams, W. R.; Mecham, R. Extracellular Matrix 4: The Elastic Fiber. *FASEB J.* **1993**, *7* (13), 1208–1218. <https://doi.org/10.1096/fasebj.7.13.8405806>.
- (27) Kagan, H. M.; Sullivan, K. A. [35] Lysyl Oxidase: Preparation and Role in Elastin Biosynthesis. In *Methods in Enzymology; Structural and Contractile Proteins Part A: Extracellular Matrix*; Academic Press, 1982; Vol. 82, pp 637–650. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(82\)82092-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(82)82092-2).
- (28) Bellingham, C. M.; Lillie, M. A.; Gosline, J. M.; Wright, G. M.; Starcher, B. C.; Bailey, A. J.; Woodhouse, K. A.; Keeley, F. W. Recombinant Human Elastin Polypeptides Self-Assemble into Biomaterials with Elastin-like Properties. *Biopolymers* **2003**, *70* (4), 445–455. <https://doi.org/10.1002/bip.10512>.
- (29) Hoeve, C. a. J.; Flory, P. J. The Elastic Properties of Elastin. *Biopolymers* **1974**, *13* (4), 677–686. <https://doi.org/10.1002/bip.1974.360130404>.
- (30) He, D.; Miao, M.; Sitarz, E. E.; Muiznieks, L. D.; Reichheld, S.; Stahl, R. J.; Keeley, F. W.; Parkinson, J. Polymorphisms in the Human Tropoelastin Gene Modify In Vitro Self-Assembly and Mechanical Properties of Elastin-Like Polypeptides. *PLOS ONE* **2012**, *7* (9), e46130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046130>.
- (31) Xu, J.; Shi, G.-P. Vascular Wall Extracellular Matrix Proteins and Vascular Diseases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **2014**, *1842* (11), 2106–2119. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.07.008>.
- (32) Martin, S. L.; Vrhovski, B.; Weiss, A. S. Total Synthesis and Expression in Escherichia Coli of a Gene Encoding Human Tropoelastin. *Gene* **1995**, *154* (2), 159–166. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)00848-M](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)00848-M).
- (33) Urry, D. W.; Starcher, B.; Partridge, S. M. Coacervation of Solubilized Elastin Effects a Notable Conformational Change. *Nature* **1969**, *222* (5195), 795–796. <https://doi.org/10.1038/222795a0>.
- (34) Cox, B. A.; Starcher, B. C.; Urry, D. W. Coacervation of α -Elastin Results in Fiber Formation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct.* **1973**, *317* (1), 209–213. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(73\)90215-8](https://doi.org/10.1016/0005-2795(73)90215-8).
- (35) Urry, D. W. What Is Elastin; What Is Not. *Ultrastruct. Pathol.* **1983**, *4* (2–3), 227–251. <https://doi.org/10.3109/01913128309140793>.
- (36) Urry, D. W.; Long, M. M.; Cox, B. A.; Ohnishi, T.; Mitchell, L. W.; Jacobs, M. The Synthetic Polypeptide of Elastin Coacervates and Forms Filamentous Aggregates. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct.* **1974**, *371* (2), 597–602. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(74\)90057-9](https://doi.org/10.1016/0005-2795(74)90057-9).
- (37) Urry, D. W. [39] Characterization of Soluble Peptides of Elastin by Physical Techniques. In *Methods in Enzymology; Structural and Contractile Proteins Part A: Extracellular Matrix*; Academic Press, 1982; Vol. 82, pp 673–716. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(82\)82096-X](https://doi.org/10.1016/0076-6879(82)82096-X).
- (38) Urry, D. W. Protein Elasticity Based on Conformations of Sequential Polypeptides: The Biological Elastic Fiber. *J. Protein Chem.* **1984**, *3* (5), 403–436. <https://doi.org/10.1007/BF01025061>.
- (39) Senior, R. M.; Griffin, G. L.; Mecham, R. P.; Wrenn, D. S.; Prasad, K. U.; Urry, D. W. Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, a Repeating Peptide in Elastin, Is Chemotactic for Fibroblasts and Monocytes. *J. Cell Biol.* **1984**, *99* (3), 870–874. <https://doi.org/10.1083/jcb.99.3.870>.
- (40) Urry, D. W.; Shaw, R. G.; Prasad, K. U. Polypeptide of Elastin: Temperature Dependence of Ellipticity and Correlation with Elastomeric Force. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1985**, *130* (1), 50–57. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(85\)90380-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(85)90380-8).
- (41) McPherson, D. T.; Morrow, C.; Minehan, D. S.; Wu, J.; Hunter, E.; Urry, D. W. Production and Purification of a Recombinant Elastomeric Polypeptide, G-(VPGVG)₁₉-VPGV, from Escherichia Coli. *Biotechnol. Prog.* **1992**, *8* (4), 347–352. <https://doi.org/10.1021/bp00016a012>.
- (42) Urry, D. W.; Luan, C. H.; Parker, T. M.; Gowda, D. C.; Prasad, K. U.; Reid, M. C.; Safavy, A. Temperature of Polypeptide Inverse Temperature Transition Depends on Mean Residue Hydrophobicity. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (11), 4346–4348. <https://doi.org/10.1021/ja00011a057>.
- (43) Urry, D. W.; Gowda, D. C.; Parker, T. M.; Luan, C.-H.; Reid, M. C.; Harris, C. M.; Pattanaik, A.; Harris, R. D. Hydrophobicity Scale for Proteins Based on Inverse Temperature Transitions. *Biopolymers* **1992**, *32* (9), 1243–1250. <https://doi.org/10.1002/bip.360320913>.
- (44) Urry, D. W. Molecular Machines: How Motion and Other Functions of Living Organisms Can Result from Reversible Chemical Changes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32* (6), 819–841. <https://doi.org/10.1002/anie.199308191>.
- (45) Urry, D. W.; Hugel, T.; Seitz, M.; Gaub, H. E.; Sheiba, L.; Dea, J.; Xu, J.; Parker, T.; Bailey, A. J.; Macmillan, J.; Shrewry, P. R.; Tatham, A. S. Elastin: A Representative Ideal Protein Elastomer. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2002**, *357* (1418), 169–184. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.1023>.

- (46) Lee, J.; Macosko, C. W.; Urry, D. W. Mechanical Properties of Cross-Linked Synthetic Elastomeric Polypentapeptides. *Macromolecules* **2001**, *34* (17), 5968–5974. <https://doi.org/10.1021/ma0017844>.
- (47) Lee, J.; Macosko, C. W.; Urry, D. W. Elastomeric Polypentapeptides Cross-Linked into Matrixes and Fibers. *Biomacromolecules* **2001**, *2* (1), 170–179. <https://doi.org/10.1021/bm0000900>.
- (48) Herrero-Vanrell, R.; Rincón, A. C.; Molina-Martínez, I. T.; Reguera, J.; Alonso, M.; Refojo, M. F.; Rodríguez-Cabello, J. C. Poly (VPAVG) as Potential Vehicle for Intraocular Drug Delivery Systems. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2003**, *44* (13), 4441.
- (49) Rincón, A. c.; Molina-Martínez, I. T.; de las Heras, B.; Alonso, M.; Baíllez, C.; Rodríguez-Cabello, J. c.; Herrero-Vanrell, R. Biocompatibility of Elastin-like Polymer Poly(VPAVG) Microparticles: In Vitro and in Vivo Studies. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**, *78A* (2), 343–351. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30702>.
- (50) Kim, W.; Chaikof, E. L. Recombinant Elastin-Mimetic Biomaterials: Emerging Applications in Medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (15), 1468–1478. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.04.007>.
- (51) Martino, M.; Coviello, A.; Tamburro, A. M. Synthesis and Structural Characterization of Poly(LGGVG), an Elastin-like Polypeptide. *Int. J. Biol. Macromol.* **2000**, *27* (1), 59–64. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00118-X](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00118-X).
- (52) Amiram, M.; Haimovich, A. D.; Fan, C.; Wang, Y.-S.; Aerni, H.-R.; Ntai, I.; Moonan, D. W.; Ma, N. J.; Rovner, A. J.; Hong, S. H.; Kelleher, N. L.; Goodman, A. L.; Jewett, M. C.; Söll, D.; Rinehart, J.; Isaacs, F. J. Evolution of Translation Machinery in Recoded Bacteria Enables Multi-Site Incorporation of Nonstandard Amino Acids. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33* (12), 1272–1279. <https://doi.org/10.1038/nbt.3372>.
- (53) Costa, S. A.; Simon, J. R.; Amiram, M.; Tang, L.; Zauscher, S.; Brustad, E. M.; Isaacs, F. J.; Chilkoti, A. Photo-Crosslinkable Unnatural Amino Acids Enable Facile Synthesis of Thermoresponsive Nano- to Microgels of Intrinsically Disordered Polypeptides. *Adv. Mater.* **2018**, *30* (5), 1704878. <https://doi.org/10.1002/adma.201704878>.
- (54) Cho, S.; Dong, S.; Parent, K. N.; Chen, M. Immune-Tolerant Elastin-like Polypeptides (ITEPs) and Their Application as CTL Vaccine Carriers. *J. Drug Target.* **2016**, *24* (4), 328–339. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1077847>.
- (55) Ayres, L.; Vos, M. R. J.; Adams, P. J. H. M.; Shklyarevskiy, I. O.; van Hest, J. C. M. Elastin-Based Side-Chain Polymers Synthesized by ATRP. *Macromolecules* **2003**, *36* (16), 5967–5973. <https://doi.org/10.1021/ma025727h>.
- (56) Ayres, L.; Koch, K.; van Hest, J. C. M. Stimulus Responsive Behavior of Elastin-Based Side Chain Polymers. *Macromolecules* **2005**, *38* (5), 1699–1704. <https://doi.org/10.1021/ma047923p>.
- (57) Fernández-Trillo, F.; Duréault, A.; Bayley, J. P. M.; van Hest, J. C. M.; Thies, J. C.; Michon, T.; Weberskirch, R.; Cameron, N. R. Elastin-Based Side-Chain Polymers: Improved Synthesis via RAFT and Stimulus Responsive Behavior. *Macromolecules* **2007**, *40* (17), 6094–6099. <https://doi.org/10.1021/ma070527x>.
- (58) Conrad, R. M.; Grubbs, R. H. Tunable, Temperature-Responsive Polynorbornenes with Side Chains Based on an Elastin Peptide Sequence. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (44), 8328–8330. <https://doi.org/10.1002/anie.200903888>.
- (59) Arias, S.; Freire, F.; Calderón, M.; Bergueiro, J. Unexpected Chiro-Thermoresponsive Behavior of Helical Poly(Phenylacetylene)s Bearing Elastin-Based Side Chains. *Angew. Chem.* **2017**, *129* (38), 11578–11583. <https://doi.org/10.1002/ange.201704821>.
- (60) Urry, D. W. Physical Chemistry of Biological Free Energy Transduction As Demonstrated by Elastic Protein-Based Polymers. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101* (51), 11007–11028. <https://doi.org/10.1021/jp972167t>.
- (61) Chang, D. K.; Venkatachalam, C. M.; Prasad, K. U.; Urry, D. W. Nuclear Overhauser Effect and Computational Characterization of the Beta-Spiral of the Polypentapeptide of Elastin. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1989**, *6* (5), 851–858. <https://doi.org/10.1080/07391102.1989.10506517>.
- (62) Groß, P. C.; Possart, W.; Zeppezauer, M. An Alternative Structure Model for the Polypentapeptide in Elastin. *Z. Für Naturforschung C* **2003**, *58* (11–12), 873–878. <https://doi.org/10.1515/znc-2003-11-1223>.
- (63) Chemistry (IUPAC), T. I. U. of P. and A. IUPAC - macromolecule (M03667) <https://goldbook.iupac.org/terms/view/M03667>. <https://doi.org/10.1351/goldbook.M03667>.
- (64) Smits, F. C. M.; Buddingh, B. C.; van Eldijk, M. B.; van Hest, J. C. M. Elastin-Like Polypeptide Based Nanoparticles: Design Rationale Toward Nanomedicine: Elastin-Like Polypeptide Based Nanoparticles: Design Rationale Toward Nanomedicine. *Macromol. Biosci.* **2015**, *15* (1), 36–51. <https://doi.org/10.1002/mabi.201400419>.
- (65) Bataille, L.; Dieryck, W.; Hocquelliet, A.; Cabanne, C.; Bathany, K.; Lecommandoux, S.; Garbay, B.; Garanger, E. Recombinant Production and Purification of Short Hydrophobic Elastin-like Polypeptides with Low Transition Temperatures. *Protein Expr. Purif.* **2016**, *121*, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2016.01.010>.
- (66) Sallach, R. E.; Conticello, V. P.; Chaikof, E. L. Expression of a Recombinant Elastin-like Protein in *Pichia Pastoris*. *Biotechnol. Prog.* **2009**, *25* (6), 1810–1818. <https://doi.org/10.1002/btpr.208>.

- (67) Schipperus, R.; Teeuwen, R. L. M.; Werten, M. W. T.; Eggink, G.; de Wolf, F. A. Secreted Production of an Elastin-like Polypeptide by *Pichia Pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *85* (2), 293–301. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2082-9>.
- (68) Schipperus, R.; Eggink, G.; de Wolf, F. A. Secretion of Elastin-like Polypeptides with Different Transition Temperatures by *Pichia Pastoris*. *Biotechnol. Prog.* **2012**, *28* (1), 242–247. <https://doi.org/10.1002/btpr.717>.
- (69) Herzog, R. W.; Singh, N. K.; Urry, D. W.; Daniell, H. Expression of a Synthetic Protein-Based Polymer (Elastomer) Gene in *Aspergillus Nidulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, *47* (4), 368–372. <https://doi.org/10.1007/s002530050942>.
- (70) Patel, J.; Zhu, H.; Menassa, R.; Gyenis, L.; Richman, A.; Brandle, J. Elastin-like Polypeptide Fusions Enhance the Accumulation of Recombinant Proteins in Tobacco Leaves. *Transgenic Res.* **2007**, *16* (2), 239–249. <https://doi.org/10.1007/s11248-006-9026-2>.
- (71) Conley, A. J.; Joensuu, J. J.; Jevnikar, A. M.; Menassa, R.; Brandle, J. E. Optimization of Elastin-like Polypeptide Fusions for Expression and Purification of Recombinant Proteins in Plants. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *103* (3), 562–573. <https://doi.org/10.1002/bit.22278>.
- (72) Conrad, U.; Plagmann, I.; Malchow, S.; Sack, M.; Floss, D. M.; Kruglov, A. A.; Nedospasov, S. A.; Rose-John, S.; Scheller, J. ELPylated Anti-Human TNF Therapeutic Single-Domain Antibodies for Prevention of Lethal Septic Shock. *Plant Biotechnol. J.* **2011**, *9* (1), 22–31. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00523.x>.
- (73) Kaldis, A.; Ahmad, A.; Reid, A.; McGarvey, B.; Brandle, J.; Ma, S.; Jevnikar, A.; Kohalmi, S. E.; Menassa, R. High-Level Production of Human Interleukin-10 Fusions in Tobacco Cell Suspension Cultures. *Plant Biotechnol. J.* **2013**, *11* (5), 535–545. <https://doi.org/10.1111/pbi.12041>.
- (74) Chu, H.-S.; Lee, K.-H.; Park, J.-E.; Kim, D.-M.; Kim, B.-G.; Won, J.-I. Expression Analysis of an Elastin-like Polypeptide (ELP) in a Cell-Free Protein Synthesis System. *Enzyme Microb. Technol.* **2010**, *46* (2), 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.10.003>.
- (75) Saha, S.; Banskota, S.; Roberts, S.; Kirmani, N.; Chilkoti, A. Engineering the Architecture of Elastin-Like Polypeptides: From Unimers to Hierarchical Self-Assembly. *Adv. Ther.* **2020**, *3* (3), 1900164. <https://doi.org/10.1002/adtp.201900164>.
- (76) Meyer, D. E.; Chilkoti, A. Genetically Encoded Synthesis of Protein-Based Polymers with Precisely Specified Molecular Weight and Sequence by Recursive Directional Ligation: Examples from the Elastin-like Polypeptide System. *Biomacromolecules* **2002**, *3* (2), 357–367. <https://doi.org/10.1021/bm015630n>.
- (77) Girotti, A.; Fernández-Colino, A.; López, I. M.; Rodríguez-Cabello, J. C.; Arias, F. J. Elastin-like Recombinamers: Biosynthetic Strategies and Biotechnological Applications. *Biotechnol. J.* **2011**, *6* (10), 1174–1186. <https://doi.org/10.1002/biot.201100116>.
- (78) Lee, T. a. T.; Cooper, A.; Apkarian, R. P.; Conticello, V. P. Thermo-Reversible Self-Assembly of Nanoparticles Derived from Elastin-Mimetic Polypeptides. *Adv. Mater.* **2000**, *12* (15), 1105–1110. [https://doi.org/10.1002/1521-4095\(200008\)12:15<1105::AID-ADMA1105>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1521-4095(200008)12:15<1105::AID-ADMA1105>3.0.CO;2-1).
- (79) Hassouneh, W.; Zhulina, E. B.; Chilkoti, A.; Rubinstein, M. Elastin-like Polypeptide Diblock Copolymers Self-Assemble into Weak Micelles. *Macromolecules* **2015**, *48* (12), 4183–4195. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b00431>.
- (80) Garanger, E.; MacEwan, S. R.; Sandre, O.; Brûlet, A.; Bataille, L.; Chilkoti, A.; Lecommandoux, S. Structural Evolution of a Stimulus-Responsive Diblock Polypeptide Micelle by Temperature Tunable Compaction of Its Core. *Macromolecules* **2015**, *48* (18), 6617–6627. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b01371>.
- (81) Meyer, D. E.; Chilkoti, A. Purification of Recombinant Proteins by Fusion with Thermally-Responsive Polypeptides. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17* (11), 1112–1115. <https://doi.org/10.1038/15100>.
- (82) Chow, D. C.; Dreher, M. R.; Trabbic-Carlson, K.; Chilkoti, A. Ultra-High Expression of a Thermally Responsive Recombinant Fusion Protein in *E. Coli*. *Biotechnol. Prog.* **2006**, *22* (3), 638–646. <https://doi.org/10.1021/bp0503742>.
- (83) Christensen, T.; Amiram, M.; Dagher, S.; Trabbic-Carlson, K.; Shamji, M. F.; Setton, L. A.; Chilkoti, A. Fusion Order Controls Expression Level and Activity of Elastin-like Polypeptide Fusion Proteins. *Protein Sci.* **2009**, *18* (7), 1377–1387. <https://doi.org/10.1002/pro.157>.
- (84) Petitdemange, R. Chemoselective Modifications of Recombinant Elastin-like Polypeptides: Tuning Thermosensitivity and Bioactivity. phdthesis, Université de Bordeaux, 2016.
- (85) McPherson, D. T.; Xu, J.; Urry, D. W. Product Purification by Reversible Phase Transition Following *Escherichia Coli* Expression of Genes Encoding up to 251 Repeats of the Elastomeric Pentapeptide GVGVP. *Protein Expr. Purif.* **1996**, *7* (1), 51–57. <https://doi.org/10.1006/prep.1996.0008>.
- (86) Hassouneh, W.; Christensen, T.; Chilkoti, A. Elastin-Like Polypeptides as a Purification Tag for Recombinant Proteins. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2010**, *61* (1), 6.11.1-6.11.16. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0611s61>.
- (87) Trabbic-Carlson, K.; Liu, L.; Kim, B.; Chilkoti, A. Expression and Purification of Recombinant Proteins from *Escherichia Coli*: Comparison of an Elastin-like Polypeptide Fusion with an Oligohistidine Fusion. *Protein Sci.* **2004**, *13* (12), 3274–3284. <https://doi.org/10.1110/ps.04931604>.

- (88) Trabbic-Carlson, K.; Meyer, D. E.; Liu, L.; Piervincenzi, R.; Nath, N.; LaBean, T.; Chilkoti, A. Effect of Protein Fusion on the Transition Temperature of an Environmentally Responsive Elastin-like Polypeptide: A Role for Surface Hydrophobicity? *Protein Eng. Des. Sel.* **2004**, *17* (1), 57–66. <https://doi.org/10.1093/protein/gzh006>.
- (89) Lim, D. W.; Trabbic-Carlson, K.; MacKay, J. A.; Chilkoti, A. Improved Non-Chromatographic Purification of a Recombinant Protein by Cationic Elastin-like Polypeptides. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (5), 1417–1424. <https://doi.org/10.1021/bm060849t>.
- (90) MacEwan, S. R.; Chilkoti, A. Elastin-like Polypeptides: Biomedical Applications of Tunable Biopolymers. *Pept. Sci.* **2010**, *94* (1), 60–77. <https://doi.org/10.1002/bip.21327>.
- (91) Urry, D. W.; Parker, T. M.; Reid, M. C.; Gowda, D. C. Biocompatibility of the Bioelastic Materials, Poly(GVGVP) and Its γ -Irradiation Cross-Linked Matrix: Summary of Generic Biological Test Results. *J. Bioact. Compat. Polym.* **1991**, *6* (3), 263–282. <https://doi.org/10.1177/088391159100600306>.
- (92) Shah, M.; Hsueh, P.-Y.; Sun, G.; Chang, H. Y.; Janib, S. M.; MacKay, J. A. Biodegradation of Elastin-like Polypeptide Nanoparticles. *Protein Sci.* **2012**, *21* (6), 743–750. <https://doi.org/10.1002/pro.2063>.
- (93) Kuna, M.; Mahdi, F.; Chade, A. R.; Bidwell, G. L. Molecular Size Modulates Pharmacokinetics, Biodistribution, and Renal Deposition of the Drug Delivery Biopolymer Elastin-like Polypeptide. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 7923. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24897-9>.
- (94) Sarangthem, V.; Seo, B.-Y.; Yi, A.; Lee, Y.-J.; Cheon, S.-H.; Kim, S. K.; Singh, T. D.; Lee, B.-H.; Park, R.-W. Effects of Molecular Weight and Structural Conformation of Multivalent-Based Elastin-like Polypeptides on Tumor Accumulation and Tissue Biodistribution. *Nanotheranostics* **2020**, *4* (2), 57–70. <https://doi.org/10.7150/ntno.39804>.
- (95) Seuring, J.; Agarwal, S. Polymers with Upper Critical Solution Temperature in Aqueous Solution. *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33* (22), 1898–1920. <https://doi.org/10.1002/marc.201200433>.
- (96) Bordat, A.; Boissenot, T.; Nicolas, J.; Tsapis, N. Thermoresponsive Polymer Nanocarriers for Biomedical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *138*, 167–192. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.10.005>.
- (97) Gandhi, A.; Paul, A.; Sen, S. O.; Sen, K. K. Studies on Thermoresponsive Polymers: Phase Behaviour, Drug Delivery and Biomedical Applications. *Asian J. Pharm. Sci.* **2015**, *10* (2), 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.08.010>.
- (98) Ghosh Dastidar, D.; Chakrabarti, G. Chapter 6 - Thermoresponsive Drug Delivery Systems, Characterization and Application. In *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems*; Mohapatra, S. S., Ranjan, S., Dasgupta, N., Mishra, R. K., Thomas, S., Eds.; Micro and Nano Technologies; Elsevier, 2019; pp 133–155. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814029-1.00006-5>.
- (99) Hogan, K. J.; Mikos, A. G. Biodegradable Thermoresponsive Polymers: Applications in Drug Delivery and Tissue Engineering. *Polymer* **2020**, *211*, 123063. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.123063>.
- (100) J. Phillips, D.; I. Gibson, M. Towards Being Genuinely Smart: ‘Isothermally-Responsive’ Polymers as Versatile, Programmable Scaffolds for Biologically-Adaptable Materials. *Polym. Chem.* **2015**, *6* (7), 1033–1043. <https://doi.org/10.1039/C4PY01539H>.
- (101) Seuring, J.; Agarwal, S. Non-Ionic Homo- and Copolymers with H-Donor and H-Acceptor Units with an UCST in Water. *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, *211* (19), 2109–2117. <https://doi.org/10.1002/macp.201000147>.
- (102) Seuring, J.; Bayer, F. M.; Huber, K.; Agarwal, S. Upper Critical Solution Temperature of Poly(N-Acryloyl Glycinamide) in Water: A Concealed Property. *Macromolecules* **2012**, *45* (1), 374–384. <https://doi.org/10.1021/ma202059t>.
- (103) Liu, F.; Seuring, J.; Agarwal, S. Controlled Radical Polymerization of N-Acryloylglycinamide and UCST-Type Phase Transition of the Polymers. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2012**, *50* (23), 4920–4928. <https://doi.org/10.1002/pola.26322>.
- (104) Liu, F.; Seuring, J.; Agarwal, S. Atom Transfer Radical Polymerization as a Tool for Making Poly(N - Acryloylglycinamide) with Molar Mass Independent UCST-Type Transitions in Water and Electrolytes. *Polym. Chem.* **2013**, *4* (10), 3123–3131. <https://doi.org/10.1039/C3PY00222E>.
- (105) Seuring, J.; Agarwal, S. First Example of a Universal and Cost-Effective Approach: Polymers with Tunable Upper Critical Solution Temperature in Water and Electrolyte Solution. *Macromolecules* **2012**, *45* (9), 3910–3918. <https://doi.org/10.1021/ma300355k>.
- (106) Zhang, H.; Tong, X.; Zhao, Y. Diverse Thermoresponsive Behaviors of Uncharged UCST Block Copolymer Micelles in Physiological Medium. *Langmuir* **2014**, *30* (38), 11433–11441. <https://doi.org/10.1021/la5026334>.
- (107) Käfer, F.; Liu, F.; Stahlschmidt, U.; Jérôme, V.; Freitag, R.; Karg, M.; Agarwal, S. LCST and UCST in One: Double Thermoresponsive Behavior of Block Copolymers of Poly(Ethylene Glycol) and Poly(Acrylamide-Co-Acrylonitrile). *Langmuir* **2015**, *31* (32), 8940–8946. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b02006>.
- (108) Mary, P.; Bendejacq, D. D.; Labeau, M.-P.; Dupuis, P. Reconciling Low- and High-Salt Solution Behavior of Sulfobetaine Polyzwitterions. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (27), 7767–7777. <https://doi.org/10.1021/jp071995b>.

- (109) Wolf, T.; Rheinberger, T.; Simon, J.; Wurm, F. R. Reversible Self-Assembly of Degradable Polymersomes with Upper Critical Solution Temperature in Water. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (32), 11064–11072. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b02723>.
- (110) Quiroz, F. G.; Chilkoti, A. Sequence Heuristics to Encode Phase Behaviour in Intrinsically Disordered Protein Polymers. *Nat. Mater.* **2015**, *14* (11), 1164–1171. <https://doi.org/10.1038/nmat4418>.
- (111) Urry, D. W.; Trapane, T. L.; Iqbal, M.; Venkatachalam, C. M.; Prasad, K. U. Carbon-13 NMR Relaxation Studies Demonstrate an Inverse Temperature Transition in the Elastin Polypentapeptide. *Biochemistry* **1985**, *24* (19), 5182–5189. <https://doi.org/10.1021/bi00340a034>.
- (112) Scarpa, J. S.; Mueller, D. Dean.; Klotz, I. M. Slow Hydrogen-Deuterium Exchange in a Non- α -Helical Polyamide. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89* (24), 6024–6030. <https://doi.org/10.1021/ja01000a006>.
- (113) Kokardekar, R. R.; Shah, V. K.; Mody, H. R. PNIPAM Poly (N-Isopropylacrylamide): A Thermoresponsive “Smart” Polymer in Novel Drug Delivery Systems. *Internet J. Med. Update - EJOURNAL* **2012**, *7* (2). <https://doi.org/10.4314/ijmu.v7i2>.
- (114) Qian, J.; Wu, F. Thermosensitive PNIPAM Semi-Hollow Spheres for Controlled Drug Release. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1* (28), 3464–3469. <https://doi.org/10.1039/C3TB20527D>.
- (115) Pippa, N.; Meristoudi, A.; Pispas, S.; Demetzos, C. Temperature-Dependent Drug Release from DPPC:C12H25-PNIPAM-COOH Liposomes: Control of the Drug Loading/Release by Modulation of the Nanocarriers’ Components. *Int. J. Pharm.* **2015**, *485* (1), 374–382. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.03.014>.
- (116) Cao, M.; Wang, Y.; Hu, X.; Gong, H.; Li, R.; Cox, H.; Zhang, J.; Waigh, T. A.; Xu, H.; Lu, J. R. Reversible Thermoresponsive Peptide–PNIPAM Hydrogels for Controlled Drug Delivery. *Biomacromolecules* **2019**, *20* (9), 3601–3610. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01009>.
- (117) Singh, A.; Vaishagya, K.; K. Verma, R.; Shukla, R. Temperature/PH-Triggered PNIPAM-Based Smart Nanogel System Loaded With Anastrozole Delivery for Application in Cancer Chemotherapy. *AAPS PharmSciTech* **2019**, *20* (5), 213. <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1410-3>.
- (118) Schild, H. G. Poly(N-Isopropylacrylamide): Experiment, Theory and Application. *Prog. Polym. Sci.* **1992**, *17* (2), 163–249. [https://doi.org/10.1016/0079-6700\(92\)90023-R](https://doi.org/10.1016/0079-6700(92)90023-R).
- (119) Hoogenboom, R.; L. Thijs, H. M.; C. Jochems, M. J. H.; Lankvelt, B. M. van; M. Fijten, M. W.; S. Schubert, U. Tuning the LCST of Poly(2-Oxazoline)s by Varying Composition and Molecular Weight: Alternatives to Poly(N-Isopropylacrylamide)? *Chem. Commun.* **2008**, *0* (44), 5758–5760. <https://doi.org/10.1039/B813140F>.
- (120) Costa, M. C. M.; Silva, S. M. C.; Antunes, F. E. Adjusting the Low Critical Solution Temperature of Poly(N-Isopropyl Acrylamide) Solutions by Salts, Ionic Surfactants and Solvents: A Rheological Study. *J. Mol. Liq.* **2015**, *210*, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.02.008>.
- (121) Fujishige, S.; Kubota, K.; Ando, I. Phase Transition of Aqueous Solutions of Poly(N-Isopropylacrylamide) and Poly(N-Isopropylmethacrylamide). *J. Phys. Chem.* **1989**, *93* (8), 3311–3313. <https://doi.org/10.1021/j100345a085>.
- (122) Vihola, H.; Laukkanen, A.; Valtola, L.; Tenhu, H.; Hirvonen, J. Cytotoxicity of Thermosensitive Polymers Poly(N-Isopropylacrylamide), Poly(N-Vinylcaprolactam) and Amphiphilically Modified Poly(N-Vinylcaprolactam). *Biomaterials* **2005**, *26* (16), 3055–3064. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.09.008>.
- (123) Wadajkar, A. S.; Koppolu, B.; Rahimi, M.; Nguyen, K. T. Cytotoxic Evaluation of N-Isopropylacrylamide Monomers and Temperature-Sensitive Poly(N-Isopropylacrylamide) Nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* **2009**, *11* (6), 1375–1382. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9526-5>.
- (124) Lima, L. H.; Morales, Y.; Cabral, T. Ocular Biocompatibility of Poly-N-Isopropylacrylamide (PNIPAM). *J. Ophthalmol.* **2016**, *2016*, e5356371. <https://doi.org/10.1155/2016/5356371>.
- (125) Dimitrov, I.; Trzebicka, B.; Müller, A. H. E.; Dworak, A.; Tsvetanov, C. B. Thermosensitive Water-Soluble Copolymers with Doubly Responsive Reversibly Interacting Entities. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32* (11), 1275–1343. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.07.001>.
- (126) Li, N. K.; Quiroz, F. G.; Hall, C. K.; Chilkoti, A.; Yingling, Y. G. Molecular Description of the LCST Behavior of an Elastin-Like Polypeptide. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (10), 3522–3530. <https://doi.org/10.1021/bm500658w>.
- (127) Khaled, M. A.; Venkatachalam, C. M.; Sugano, H.; Urry, D. W. Conformation Characterization of Cyclopentapeptide, L-Val-L-Pro-Gly-L-Val-Gly: A Repeating Analogue of Elastin. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1981**, *17* (1), 23–33.
- (128) Urry, D. W. Entropic Elastic Processes in Protein Mechanisms. I. Elastic Structure Due to an Inverse Temperature Transition and Elasticity Due to Internal Chain Dynamics. *J. Protein Chem.* **1988**, *7* (1), 1–34. <https://doi.org/10.1007/BF01025411>.
- (129) Yao, X. L.; Hong, M. Structure Distribution in an Elastin-Mimetic Peptide (VPGVG)₃ Investigated by Solid-State NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (13), 4199–4210. <https://doi.org/10.1021/ja036686n>.

- (130) MacKay, J. A.; Callahan, D. J.; FitzGerald, K. N.; Chilkoti, A. Quantitative Model of the Phase Behavior of Recombinant PH-Responsive Elastin-Like Polypeptides. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (11), 2873–2879. <https://doi.org/10.1021/bm100571j>.
- (131) Taylor, P. A.; Huang, H.; Kiick, K. L.; Jayaraman, A. Placement of Tyrosine Residues as a Design Element for Tuning the Phase Transition of Elastin-Peptide-Containing Conjugates: Experiments and Simulations. *Mol. Syst. Des. Eng.* **2020**, *5* (7), 1239–1254. <https://doi.org/10.1039/D0ME00051E>.
- (132) Luan, C.-H.; Harris, R. D.; Prasad, K. U.; Urry, D. W. Differential Scanning Calorimetry Studies of the Inverse Temperature Transition of the Polypentapeptide of Elastin and Its Analogues. *Biopolymers* **1990**, *29* (14), 1699–1706. <https://doi.org/10.1002/bip.360291403>.
- (133) W. Urry, D.; L. Trapane, T.; M. Long, M.; U. Prasad, K. Test of the Librational Entropy Mechanism of Elasticity of the Polypentapeptide of Elastin. Effect of Introducing a Methyl Group at Residue 5. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases* **1983**, *79* (4), 853–868. <https://doi.org/10.1039/F19837900853>.
- (134) Rapaka, R. S.; Okamoto, K.; Urry, D. w. Coacervation Properties in Sequential Polypeptide Models of Elastin. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *12* (2), 81–92. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1978.tb02871.x>.
- (135) Reguera, J.; Lagarón, J. M.; Alonso, M.; Reboto, V.; Calvo, B.; Rodríguez-Cabello, J. C. Thermal Behavior and Kinetic Analysis of the Chain Unfolding and Refolding and of the Concomitant Nonpolar Solvation and Desolvation of Two Elastin-like Polymers. *Macromolecules* **2003**, *36* (22), 8470–8476. <https://doi.org/10.1021/ma034572q>.
- (136) Wright, E. R.; Conticello, V. P. Self-Assembly of Block Copolymers Derived from Elastin-Mimetic Polypeptide Sequences. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54* (8), 1057–1073. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00059-5](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00059-5).
- (137) Urry, D. W.; Luan, C.-H.; Harris, C. M.; Parker, T. M. Protein-Based Materials with a Profound Range of Properties and Applications: The Elastin ΔT_t Hydrophobic Paradigm. In *Protein-Based Materials*; McGrath, K., Kaplan, D., Eds.; Bioengineering of Materials; Birkhäuser: Boston, MA, 1997; pp 133–177. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4094-5_5.
- (138) Meyer, D. E.; Chilkoti, A. Quantification of the Effects of Chain Length and Concentration on the Thermal Behavior of Elastin-like Polypeptides. *Biomacromolecules* **2004**, *5* (3), 846–851. <https://doi.org/10.1021/bm034215n>.
- (139) McDaniel, J. R.; Radford, D. C.; Chilkoti, A. A Unified Model for De Novo Design of Elastin-like Polypeptides with Tunable Inverse Transition Temperatures. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (8), 2866–2872. <https://doi.org/10.1021/bm4007166>.
- (140) VerHeul, R.; Sweet, C.; H. Thompson, D. Rapid and Simple Purification of Elastin-like Polypeptides Directly from Whole Cells and Cell Lysates by Organic Solvent Extraction. *Biomater. Sci.* **2018**, *6* (4), 863–876. <https://doi.org/10.1039/C8BM00124C>.
- (141) Xiao, Y. Synthesis and Self-Assembly of Polysaccharide-b-Elastin-like Polypeptide Bioconjugates. phdthesis, Université de Bordeaux, 2019.
- (142) Mills, C. E.; Ding, E.; Olsen, B. D. Cononsolvency of Elastin-like Polypeptides in Water/Alcohol Solutions. *Biomacromolecules* **2019**, *20* (6), 2167–2173. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01644>.
- (143) Winnik, F. M.; Ottaviani, M. F.; Bossmann, S. H.; Garcia-Garibay, M.; Turro, N. J. Consolvency of Poly(N-Isopropylacrylamide) in Mixed Water-Methanol Solutions: A Look at Spin-Labeled Polymers. *Macromolecules* **1992**, *25* (22), 6007–6017. <https://doi.org/10.1021/ma00048a023>.
- (144) Costa, R. O. R.; Freitas, R. F. S. Phase Behavior of Poly(N-Isopropylacrylamide) in Binary Aqueous Solutions. *Polymer* **2002**, *43* (22), 5879–5885. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(02\)00507-4](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(02)00507-4).
- (145) Osborne, J. L.; Farmer, R.; Woodhouse, K. A. Self-Assembled Elastin-like Polypeptide Particles. *Acta Biomater.* **2008**, *4* (1), 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.07.007>.
- (146) Reguera, J.; Urry, D. W.; Parker, T. M.; McPherson, D. T.; Rodríguez-Cabello, J. C. Effect of NaCl on the Exothermic and Endothermic Components of the Inverse Temperature Transition of a Model Elastin-like Polymer. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (2), 354–358. <https://doi.org/10.1021/bm060936l>.
- (147) Cho, Y.; Zhang, Y.; Christensen, T.; Sagle, L. B.; Chilkoti, A.; Cremer, P. S. Effects of Hofmeister Anions on the Phase Transition Temperature of Elastin-like Polypeptides. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (44), 13765–13771. <https://doi.org/10.1021/jp8062977>.
- (148) Rembert, K. B.; Paterová, J.; Heyda, J.; Hilty, C.; Jungwirth, P.; Cremer, P. S. Molecular Mechanisms of Ion-Specific Effects on Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (24), 10039–10046. <https://doi.org/10.1021/ja301297g>.
- (149) Okur, H. I.; Hladílková, J.; Rembert, K. B.; Cho, Y.; Heyda, J.; Dzubiella, J.; Cremer, P. S.; Jungwirth, P. Beyond the Hofmeister Series: Ion-Specific Effects on Proteins and Their Biological Functions. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121* (9), 1997–2014. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b10797>.

- (150) Cobb, J. S.; Engel, A.; Seale, M. A.; Janorkar, A. V. Machine Learning to Determine Optimal Conditions for Controlling the Size of Elastin-Based Particles. *Sci. Rep.* **2021**, *11* (1), 6343. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85601-y>.
- (151) Hassouneh, W.; MacEwan, S. R.; Chilkoti, A. Chapter Nine - Fusions of Elastin-Like Polypeptides to Pharmaceutical Proteins. In *Methods in Enzymology*; Wittrup, K. D., Verdine, G. L., Eds.; Protein Engineering for Therapeutics, Part A; Academic Press, 2012; Vol. 502, pp 215–237. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416039-2.00024-0>.
- (152) Aluri, S. R.; Shi, P.; Gustafson, J. A.; Wang, W.; Lin, Y.-A.; Cui, H.; Liu, S.; Conti, P. S.; Li, Z.; Hu, P.; Epstein, A. L.; MacKay, J. A. A Hybrid Protein–Polymer Nanoworm Potentiates Apoptosis Better than a Monoclonal Antibody. *ACS Nano* **2014**, *8* (3), 2064–2076. <https://doi.org/10.1021/nn403973g>.
- (153) Weitzhandler, I.; Dzuricky, M.; Hoffmann, I.; Garcia Quiroz, F.; Gradzielski, M.; Chilkoti, A. Micellar Self-Assembly of Recombinant Resilin-/Elastin-Like Block Copolypeptides. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (8), 2419–2426. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00589>.
- (154) Luginbuhl, K. M.; Mozhdehi, D.; Dzuricky, M.; Yousefpour, P.; Huang, F. C.; Mayne, N. R.; Buehne, K. L.; Chilkoti, A. Recombinant Synthesis of Hybrid Lipid–Peptide Polymer Fusions That Self-Assemble and Encapsulate Hydrophobic Drugs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (45), 13979–13984. <https://doi.org/10.1002/anie.201704625>.
- (155) Mozhdehi, D.; Luginbuhl, K. M.; Simon, J. R.; Dzuricky, M.; Berger, R.; Varol, H. S.; Huang, F. C.; Buehne, K. L.; Mayne, N. R.; Weitzhandler, I.; Bonn, M.; Parekh, S. H.; Chilkoti, A. Genetically Encoded Lipid–Polypeptide Hybrid Biomaterials That Exhibit Temperature-Triggered Hierarchical Self-Assembly. *Nat. Chem.* **2018**, *10* (5), 496–505. <https://doi.org/10.1038/s41557-018-0005-z>.
- (156) Mozhdehi, D.; Luginbuhl, K. M.; Dzuricky, M.; Costa, S. A.; Xiong, S.; Huang, F. C.; Lewis, M. M.; Zelenetz, S. R.; Colby, C. D.; Chilkoti, A. Genetically Encoded Cholesterol-Modified Polypeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (2), 945–951. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b10687>.
- (157) Scheibel, D. M.; Hossain, Md. S.; Smith, A. L.; Lynch, C. J.; Mozhdehi, D. Post-Translational Modification Mimicry for Programmable Assembly of Elastin-Based Protein Polymers. *ACS Macro Lett.* **2020**, *9* (3), 371–376. <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.0c00041>.
- (158) Janorkar, A. V.; Rajagopalan, P.; Yarmush, M. L.; Megeed, Z. The Use of Elastin-like Polypeptide–Polyelectrolyte Complexes to Control Hepatocyte Morphology and Function in Vitro. *Biomaterials* **2008**, *29* (6), 625–632. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.10.022>.
- (159) van Eldijk, M. B.; Smits, F. C. M.; Vermue, N.; Debets, M. F.; Schoffelen, S.; van Hest, J. C. M. Synthesis and Self-Assembly of Well-Defined Elastin-Like Polypeptide–Poly(Ethylene Glycol) Conjugates. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (7), 2751–2759. <https://doi.org/10.1021/bm5006195>.
- (160) Fer, G. L.; Portes, D.; Goudounet, G.; Guigner, J.-M.; Garanger, E.; Lecommandoux, S. Design and Self-Assembly of PBLG- b -ELP Hybrid Diblock Copolymers Based on Synthetic and Elastin-like Polypeptides. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (47), 10095–10104. <https://doi.org/10.1039/C7OB01945A>.
- (161) Ibrahimova, V.; González-Delgado, J. A.; Levêque, M.; Torres, T.; Garanger, E.; Lecommandoux, S. Photooxidation Responsive Elastin-Like Polypeptide Conjugates for Photodynamic Therapy Application. *Bioconjug. Chem.* **2021**, *32* (8), 1719–1728. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00251>.
- (162) Xiao, Y.; Chinoy, Z. S.; Pecastaings, G.; Bathany, K.; Garanger, E.; Lecommandoux, S. Design of Polysaccharide- b -Elastin-Like Polypeptide Bioconjugates and Their Thermoresponsive Self-Assembly. *Biomacromolecules* **2019**, *acs.biomac.9b01058*. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01058>.
- (163) McDaniel, J. R.; Bhattacharyya, J.; Vargo, K. B.; Hassouneh, W.; Hammer, D. A.; Chilkoti, A. Self-Assembly of Thermally Responsive Nanoparticles of a Genetically Encoded Peptide Polymer by Drug Conjugation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (6), 1683–1687. <https://doi.org/10.1002/anie.201200899>.
- (164) Madl, C. M.; Heilshorn, S. C. Tyrosine-Selective Functionalization for Bio-Orthogonal Cross-Linking of Engineered Protein Hydrogels. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28* (3), 724–730. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00720>.
- (165) Seifried, B. M.; Cao, J.; Olsen, B. D. Multifunctional, High Molecular Weight, Post-Translationally Modified Proteins through Oxidative Cysteine Coupling and Tyrosine Modification. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29* (6), 1876–1884. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00834>.
- (166) Dreher, M. R.; Raucher, D.; Balu, N.; Michael Colvin, O.; Ludeman, S. M.; Chilkoti, A. Evaluation of an Elastin-like Polypeptide–Doxorubicin Conjugate for Cancer Therapy. *J. Controlled Release* **2003**, *91* (1), 31–43. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(03\)00216-5](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00216-5).
- (167) Lim, D. W.; Nettles, D. L.; Setton, L. A.; Chilkoti, A. Rapid Cross-Linking of Elastin-like Polypeptides with (Hydroxymethyl)Phosphines in Aqueous Solution. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (5), 1463–1470. <https://doi.org/10.1021/bm061059m>.
- (168) Peixoto, C.; Soares, A. M. S.; Araújo, A.; Olsen, B. D.; Machado, A. V. Non-Isocyanate Urethane Linkage Formation Using l-Lysine Residues as Amine Sources. *Amino Acids* **2019**, *51* (9), 1323–1335. <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02770-x>.

- (169) Hollingshead, S.; Liu, J. C. PH-Sensitive Mechanical Properties of Elastin-Based Hydrogels. *Macromol. Biosci.* **2020**, *20* (4), 1900369. <https://doi.org/10.1002/mabi.201900369>.
- (170) Kramer, J. R.; Petitdemange, R.; Bataille, L.; Bathany, K.; Wirotius, A.-L.; Garbay, B.; Deming, T. J.; Garanger, E.; Lecommandoux, S. Quantitative Side-Chain Modifications of Methionine-Containing Elastin-Like Polypeptides as a Versatile Tool to Tune Their Properties. *ACS Macro Lett.* **2015**, *4* (11), 1283–1286. <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.5b00651>.
- (171) Rosselin, M.; Xiao, Y.; Belhomme, L.; Lecommandoux, S.; Garanger, E. Expanding the Toolbox of Chemoselective Modifications of Protein-Like Polymers at Methionine Residues. *ACS Macro Lett.* **2019**, *8* (12), 1648–1653. <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.9b00862>.
- (172) Lin, S.; Yang, X.; Jia, S.; Weeks, A. M.; Hornsby, M.; Lee, P. S.; Nichiporuk, R. V.; Iavarone, A. T.; Wells, J. A.; Toste, F. D.; Chang, C. J. Redox-Based Reagents for Chemoselective Methionine Bioconjugation. *Science* **2017**, *355* (6325), 597–602. <https://doi.org/10.1126/science.aal3316>.
- (173) Mónica Bravo-Anaya, L.; Rosselgong, J.; Gricelda Fernández-Solís, K.; Xiao, Y.; Vax, A.; Ibarboure, E.; Ruban, A.; Lebleu, C.; Joucla, G.; Garbay, B.; Garanger, E.; Lecommandoux, S. Coupling of RAFT Polymerization and Chemoselective Post-Modifications of Elastin-like Polypeptides for the Synthesis of Gene Delivery Hybrid Vectors. *Polym. Chem.* **2021**, *12* (2), 226–241. <https://doi.org/10.1039/D0PY01293A>.
- (174) Petitdemange, R.; Garanger, E.; Bataille, L.; Dieryck, W.; Bathany, K.; Garbay, B.; Deming, T. J.; Lecommandoux, S. Selective Tuning of Elastin-like Polypeptide Properties via Methionine Oxidation. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (2), 544–550. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01696>.
- (175) Dai, M.; Georgilis, E.; Goudounet, G.; Garbay, B.; Pille, J.; van Hest, J. C. M.; Schultze, X.; Garanger, E.; Lecommandoux, S. Refining the Design of Diblock Elastin-Like Polypeptides for Self-Assembly into Nanoparticles. *Polymers* **2021**, *13* (9), 1470. <https://doi.org/10.3390/polym13091470>.
- (176) Varanko, A. K.; Su, J. C.; Chilkoti, A. Elastin-Like Polypeptides for Biomedical Applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2020**, *22* (1), 343–369. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-092419-061127>.
- (177) Georgilis, E.; Abdelghani, M.; Pille, J.; Aydinlioglu, E.; van Hest, J. C. M.; Lecommandoux, S.; Garanger, E. Nanoparticles Based on Natural, Engineered or Synthetic Proteins and Polypeptides for Drug Delivery Applications. *Int. J. Pharm.* **2020**, *586*, 119537. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119537>.
- (178) Gurumurthy, B.; Bierdeman, P. C.; Janorkar, A. V. Spheroid Model for Functional Osteogenic Evaluation of Human Adipose Derived Stem Cells. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2017**, *105* (4), 1230–1236. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35974>.
- (179) Weeks, C. A.; Aden, B.; Zhang, J.; Singh, A.; Hickey, R. D.; Kilbey II, S. M.; Nyberg, S. L.; Janorkar, A. V. Effect of Amine Content and Chemistry on Long-Term, Three-Dimensional Hepatocyte Spheroid Culture atop Aminated Elastin-like Polypeptide Coatings. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2017**, *105* (2), 377–388. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35910>.
- (180) Zhang, Y.-N.; Avery, R. K.; Vallmajo-Martin, Q.; Assmann, A.; Vegh, A.; Memic, A.; Olsen, B. D.; Annabi, N.; Khademhosseini, A. A Highly Elastic and Rapidly Crosslinkable Elastin-Like Polypeptide-Based Hydrogel for Biomedical Applications. *Adv. Funct. Mater.* **2015**, *25* (30), 4814–4826. <https://doi.org/10.1002/adfm.201501489>.
- (181) McHale, M. K.; Setton, L. A.; Chilkoti, A. Synthesis and in Vitro Evaluation of Enzymatically Cross-Linked Elastin-Like Polypeptide Gels for Cartilaginous Tissue Repair. *Tissue Eng.* **2005**, *11* (11–12), 1768–1779. <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.1768>.
- (182) Nettles, D. L.; Chilkoti, A.; Setton, L. A. Applications of Elastin-like Polypeptides in Tissue Engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (15), 1479–1485. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.04.002>.
- (183) Amruthwar, S. S.; Janorkar, A. V. In Vitro Evaluation of Elastin-like Polypeptide–Collagen Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Dent. Mater.* **2013**, *29* (2), 211–220. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.10.003>.
- (184) Gurumurthy, B.; Griggs, J. A.; Janorkar, A. V. Optimization of Collagen-Elastin-like Polypeptide Composite Tissue Engineering Scaffolds Using Response Surface Methodology. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2018**, *84*, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.04.019>.
- (185) Paiva dos Santos, B.; Garbay, B.; Pasqua, M.; Chevron, E.; Chinoy, Z. S.; Cullin, C.; Bathany, K.; Lecommandoux, S.; Amédée, J.; Oliveira, H.; Garanger, E. Production, Purification and Characterization of an Elastin-like Polypeptide Containing the Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV) Peptide for Tissue Engineering Applications. *J. Biotechnol.* **2019**, *298*, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.04.010>.
- (186) Chen, T.-H. H.; Bae, Y.; Furgeson, D. Y. Intelligent Biosynthetic Nanobiomaterials (IBNs) for Hyperthermic Gene Delivery. *Pharm. Res.* **2008**, *25* (3), 683–691. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9382-5>.
- (187) Fluegel, S.; Buehler, J.; Fischer, K.; McDaniel, J. R.; Chilkoti, A.; Schmidt, M. Self-Assembly of Monodisperse Oligonucleotide-Elastin Block Copolymers into Stars and Compound Micelles. *Chem. - Eur. J.* **2011**, *17* (20), 5503–5506. <https://doi.org/10.1002/chem.201100436>.

- (188) Chen, T.-H. H.; Bae, Y.; Furgeson, D. Y.; Kwon, G. S. Biodegradable Hybrid Recombinant Block Copolymers for Non-Viral Gene Transfection. *Int. J. Pharm.* **2012**, *427* (1), 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.09.035>.
- (189) Lee, C. H.; Ingrole, R. S. J.; Gill, H. S. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Elastin like Polypeptides as a Non-Viral Gene Delivery System. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.01.031>.
- (190) Allen, T. M.; Cullis, P. R. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Science* **2004**, *303* (5665), 1818–1822. <https://doi.org/10.1126/science.1095833>.
- (191) Jatzkewitz, H. An Ein Kolloidales Blutplasma-Ersatzmittel (Polyvinylpyrrolidon) Gebundenes Peptamin (Glycyl-L-Leucyl-Mezcalin) Als Neuartige Depotform Für Biologisch Aktive Primäre Amine (Mezcalin). *Z. Für Naturforschung B* **1955**, *10* (1), 27–31. <https://doi.org/10.1515/znb-1955-0106>.
- (192) Ringsdorf, H. Structure and Properties of Pharmacologically Active Polymers. *J. Polym. Sci. Polym. Symp.* **1975**, *51* (1), 135–153. <https://doi.org/10.1002/polc.5070510111>.
- (193) Kopeček, J. Soluble Biomedical Polymers. *Polim. Med.* **1977**, *7* (3), 191–221.
- (194) Duncan, R. Polymer Conjugates as Anticancer Nanomedicines. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6* (9), 688–701. <https://doi.org/10.1038/nrc1958>.
- (195) Duncan, R.; Ringsdorf, H.; Satchi-Fainaro, R. Polymer Therapeutics—Polymers as Drugs, Drug and Protein Conjugates and Gene Delivery Systems: Past, Present and Future Opportunities. *J. Drug Target.* **2006**, *14* (6), 337–341. <https://doi.org/10.1080/10611860600833856>.
- (196) Kopeček, J. Biomaterials and Drug Delivery: Past, Present, and Future. *Mol. Pharm.* **2010**, *7* (4), 922–925. <https://doi.org/10.1021/mp1001813>.
- (197) Kopeček, J. Polymer–Drug Conjugates: Origins, Progress to Date and Future Directions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65* (1), 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.014>.
- (198) Pasut, G.; Veronese, F. M. PEG Conjugates in Clinical Development or Use as Anticancer Agents: An Overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61* (13), 1177–1188. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.02.010>.
- (199) Ali, I.; Nadeem Lone, M.; Suhail, M.; Danish Mukhtar, S.; Asnin, L. Advances in Nanocarriers for Anticancer Drugs Delivery. *Curr. Med. Chem.* **2016**, *23* (20), 2159–2187.
- (200) Das, R. P.; Gandhi, V. V.; Singh, B. G.; Kunwar, A. Passive and Active Drug Targeting: Role of Nanocarriers in Rational Design of Anticancer Formulations. *Curr. Pharm. Des.* **2019**, *25* (28), 3034–3056. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190830155319>.
- (201) Drbohlavova, J.; Chomoucka, J.; Adam, V.; Ryvolova, M.; Eckschlager, T.; Hubalek, J.; Kizek, R. Nanocarriers for Anticancer Drugs - New Trends in Nanomedicine. *Curr. Drug Metab.* **2013**, *14* (5), 547–564.
- (202) Mitchell, M. J.; Billingsley, M. M.; Haley, R. M.; Wechsler, M. E.; Peppas, N. A.; Langer, R. Engineering Precision Nanoparticles for Drug Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20* (2), 101–124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>.
- (203) Nicolas, J.; Couvreur, P. Les nanoparticules polymères pour la délivrance de principes actifs anticancéreux. *médecine/sciences* **2017**, *33* (1), 11–17. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173301003>.
- (204) Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2* (12), 751–760. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.387>.
- (205) Wang, Z.; Wu, Z.; Liu, J.; Zhang, W. Particle Morphology: An Important Factor Affecting Drug Delivery by Nanocarriers into Solid Tumors. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2018**, *15* (4), 379–395. <https://doi.org/10.1080/17425247.2018.1420051>.
- (206) Caster, J. M.; Patel, A. N.; Zhang, T.; Wang, A. Investigational Nanomedicines in 2016: A Review of Nanotherapeutics Currently Undergoing Clinical Trials. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2017**, *9* (1). <https://doi.org/10.1002/wnan.1416>.
- (207) Chariou, P. L.; Ortega-Rivera, O. A.; Steinmetz, N. F. Nanocarriers for the Delivery of Medical, Veterinary, and Agricultural Active Ingredients. *ACS Nano* **2020**, *14* (3), 2678–2701. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c00173>.
- (208) Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. Tumor Vascular Permeability and the EPR Effect in Macromolecular Therapeutics: A Review. *J. Controlled Release* **2000**, *65* (1), 271–284. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00248-5](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00248-5).
- (209) Greish, K. Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect for Anticancer Nanomedicine Drug Targeting. In *Cancer Nanotechnology: Methods and Protocols*; Grobmyer, S. R., Moudgil, B. M., Eds.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2010; pp 25–37. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-609-2_3.
- (210) Goldmann, E. The Growth of Malignant Disease in Man and the Lower Animals, with Special Reference to the Vascular System. *Proc. R. Soc. Med.* **1908**, *1* (Surg_Sect), 1–13. <https://doi.org/10.1177/003591570800101201>.

- (211) Taurin, S.; Nehoff, H.; Greish, K. Anticancer Nanomedicine and Tumor Vascular Permeability; Where Is the Missing Link? *J. Controlled Release* **2012**, *164* (3), 265–275. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.07.013>.
- (212) Xie, X.; Zhang, Y.; Li, F.; Lv, T.; Li, Z.; Chen, H.; Jia, L.; Gao, Y. Challenges and Opportunities from Basic Cancer Biology for Nanomedicine for Targeted Drug Delivery. *Curr. Cancer Drug Targets* **2019**, *19* (4), 257–276. <https://doi.org/10.2174/1568009618666180628160211>.
- (213) McDaniel, J. R.; Callahan, D. J.; Chilkoti, A. Drug Delivery to Solid Tumors by Elastin-like Polypeptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (15), 1456–1467. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.05.004>.
- (214) Liu, W.; MacKay, J. A.; Dreher, M. R.; Chen, M.; McDaniel, J. R.; Simnick, A. J.; Callahan, D. J.; Zalutsky, M. R.; Chilkoti, A. Injectable Intratumoral Depot of Thermally Responsive Polypeptide–Radionuclide Conjugates Delays Tumor Progression in a Mouse Model. *J. Controlled Release* **2010**, *144* (1), 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.032>.
- (215) Liu, W.; McDaniel, J.; Li, X.; Asai, D.; Quiroz, F. G.; Schaal, J.; Park, J. S.; Zalutsky, M.; Chilkoti, A. Brachytherapy Using Injectable Seeds That Are Self-Assembled from Genetically Encoded Polypeptides In Situ. *Cancer Res.* **2012**, *72* (22), 5956–5965. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2127>.
- (216) Schaal, J. L.; Li, X.; Mastria, E.; Bhattacharyya, J.; Zalutsky, M. R.; Chilkoti, A.; Liu, W. Injectable Polypeptide Micelles That Form Radiation Crosslinked Hydrogels In Situ for Intratumoral Radiotherapy. *J. Controlled Release* **2016**, *228*, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.02.040>.
- (217) Furgeson, D. Y.; Dreher, M. R.; Chilkoti, A. Structural Optimization of a “Smart” Doxorubicin–Polypeptide Conjugate for Thermally Targeted Delivery to Solid Tumors. *J. Controlled Release* **2006**, *110* (2), 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.10.006>.
- (218) MacKay, J. A.; Chen, M.; McDaniel, J. R.; Liu, W.; Simnick, A. J.; Chilkoti, A. Self-Assembling Chimeric Polypeptide–Doxorubicin Conjugate Nanoparticles That Abolish Tumours after a Single Injection. *Nat. Mater.* **2009**, *8* (12), 993–999. <https://doi.org/10.1038/nmat2569>.
- (219) Bhattacharyya, J.; Bellucci, J. J.; Weitzhandler, I.; McDaniel, J. R.; Spasojevic, I.; Li, X.; Lin, C.-C.; Chi, J.-T. A.; Chilkoti, A. A Paclitaxel-Loaded Recombinant Polypeptide Nanoparticle Outperforms Abraxane in Multiple Murine Cancer Models. *Nat. Commun.* **2015**, *6* (1), 7939. <https://doi.org/10.1038/ncomms8939>.
- (220) Bhattacharyya, J.; Ren, X.-R.; A. Mook, R.; Wang, J.; Spasojevic, I.; T. Premont, R.; Li, X.; Chilkoti, A.; Chen, W. Niclosamide-Conjugated Polypeptide Nanoparticles Inhibit Wnt Signaling and Colon Cancer Growth. *Nanoscale* **2017**, *9* (34), 12709–12717. <https://doi.org/10.1039/C7NR01973D>.
- (221) Zhao, P.; Dong, S.; Bhattacharyya, J.; Chen, M. ITEP Nanoparticle-Delivered Salinomycin Displays an Enhanced Toxicity to Cancer Stem Cells in Orthotopic Breast Tumors. *Mol. Pharm.* **2014**, *11* (8), 2703–2712. <https://doi.org/10.1021/mp5002312>.
- (222) Zhao, P.; Xia, G.; Dong, S.; Jiang, Z.-X.; Chen, M. An ITEP-Salinomycin Nanoparticle That Specifically and Effectively Inhibits Metastases of 4T1 Orthotopic Breast Tumors. *Biomaterials* **2016**, *93*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.03.032>.
- (223) Widder, K.; R. MacEwan, S.; Garanger, E.; Núñez, V.; Lecommandoux, S.; Chilkoti, A.; Hinderberger, D. Characterisation of Hydration and Nanophase Separation during the Temperature Response in Hydrophobic/Hydrophilic Elastin-like Polypeptide (ELP) Diblock Copolymers. *Soft Matter* **2017**, *13* (9), 1816–1822. <https://doi.org/10.1039/C6SM02427K>.
- (224) Dreher, M. R.; Simnick, A. J.; Fischer, K.; Smith, R. J.; Patel, A.; Schmidt, M.; Chilkoti, A. Temperature Triggered Self-Assembly of Polypeptides into Multivalent Spherical Micelles. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (2), 687–694. <https://doi.org/10.1021/ja0764862>.
- (225) Sun, G.; Hsueh, P.-Y.; Janib, S. M.; Hamm-Alvarez, S.; Andrew MacKay, J. Design and Cellular Internalization of Genetically Engineered Polypeptide Nanoparticles Displaying Adenovirus Knob Domain. *J. Controlled Release* **2011**, *155* (2), 218–226. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.06.010>.
- (226) Simnick, A. J.; Amiram, M.; Liu, W.; Hanna, G.; Dewhirst, M. W.; Kontos, C. D.; Chilkoti, A. In Vivo Tumor Targeting by a NGR-Decorated Micelle of a Recombinant Diblock Copolypeptide. *J. Controlled Release* **2011**, *155* (2), 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.06.044>.
- (227) Hsueh, P.-Y.; Edman, M. C.; Sun, G.; Shi, P.; Xu, S.; Lin, Y.; Cui, H.; Hamm-Alvarez, S. F.; MacKay, J. A. Tear-Mediated Delivery of Nanoparticles through Transcytosis of the Lacrimal Gland. *J. Controlled Release* **2015**, *208*, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.017>.
- (228) Shi, P.; Aluri, S.; Lin, Y.-A.; Shah, M.; Edman, M.; Dhandhukia, J.; Cui, H.; MacKay, J. A. Elastin-Based Protein Polymer Nanoparticles Carrying Drug at Both Corona and Core Suppress Tumor Growth in Vivo. *J. Controlled Release* **2013**, *171* (3), 330–338. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.05.013>.
- (229) Costa, S. A.; Mozhdehi, D.; Dzuricky, M. J.; Isaacs, F. J.; Brustad, E. M.; Chilkoti, A. Active Targeting of Cancer Cells by Nanobody Decorated Polypeptide Micelle with Bio-Orthogonally Conjugated Drug. *Nano Lett.* **2019**, *19* (1), 247–254. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b03837>.
- (230) Bidwell, G. L.; Raucher, D. Application of Thermally Responsive Polypeptides Directed against C-Myc Transcriptional Function for Cancer Therapy. *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4* (7), 1076–1085. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-04-0253>.

- (231) Sarangthem, V.; Kim, Y.; Singh, T. D.; Seo, B.-Y.; Cheon, S.-H.; Lee, Y.-J.; Lee, B.-H.; Park, R.-W. Multivalent Targeting Based Delivery of Therapeutic Peptide Using AP1-ELP Carrier for Effective Cancer Therapy. *Theranostics* **2016**, *6* (12), 2235–2249. <https://doi.org/10.7150/thno.16425>.
- (232) Veneti, E.; Tu, R. S.; Auguste, D. T. RGD-Targeted Liposome Binding and Uptake on Breast Cancer Cells Is Dependent on Elastin Linker Secondary Structure. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27* (8), 1813–1821. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00205>.
- (233) Zhang, W.; Garg, S.; Eldi, P.; Zhou, F. H.; Johnson, I. R. D.; Brooks, D. A.; Lam, F.; Rychkov, G.; Hayball, J.; Albrecht, H. Targeting Prostate Cancer Cells with Genetically Engineered Polypeptide-Based Micelles Displaying Gastrin-Releasing Peptide. *Int. J. Pharm.* **2016**, *513* (1), 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.039>.
- (234) Sun, M.; Guo, J.; Hao, H.; Tong, T.; Wang, K.; Gao, W. Tumour-Homing Chimeric Polypeptide-Conjugated Polypyrrole Nanoparticles for Imaging-Guided Synergistic Photothermal and Chemical Therapy of Cancer. *Theranostics* **2018**, *8* (10), 2634–2645. <https://doi.org/10.7150/thno.24705>.
- (235) Zhang, W.; Song, Y.; Eldi, P.; Guo, X.; Hayball, J. D.; Garg, S.; Albrecht, H. Targeting Prostate Cancer Cells with Hybrid Elastin-like Polypeptide/Liposome Nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **2018**, *13*, 293–305. <https://doi.org/10.2147/IJN.S152485>.
- (236) Na, K.; Lee, S. A.; Jung, S. H.; Hyun, J.; Shin, B. C. Elastin-like Polypeptide Modified Liposomes for Enhancing Cellular Uptake into Tumor Cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2012**, *91*, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.10.051>.
- (237) Park, S. M.; Kim, M. S.; Park, S.-J.; Park, E. S.; Choi, K.-S.; Kim, Y.; Kim, H. R. Novel Temperature-Triggered Liposome with High Stability: Formulation, in Vitro Evaluation, and in Vivo Study Combined with High-Intensity Focused Ultrasound (HIFU). *J. Controlled Release* **2013**, *170* (3), 373–379. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.06.003>.
- (238) Park, S. M.; Cha, J. M.; Nam, J.; Kim, M. S.; Park, S.-J.; Park, E. S.; Lee, H.; Kim, H. R. Formulation Optimization and In Vivo Proof-of-Concept Study of Thermosensitive Liposomes Balanced by Phospholipid, Elastin-Like Polypeptide, and Cholesterol. *PLOS ONE* **2014**, *9* (7), e103116. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103116>.
- (239) Kim, M. S.; Lee, D.-W.; Park, K.; Park, S.-J.; Choi, E.-J.; Park, E. S.; Kim, H. R. Temperature-Triggered Tumor-Specific Delivery of Anticancer Agents by CRGD-Conjugated Thermosensitive Liposomes. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2014**, *116*, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.12.045>.
- (240) Dai, M.; Goudounet, G.; Zhao, H.; Garbay, B.; Garanger, E.; Pecastaings, G.; Schultze, X.; Lecommandoux, S. Thermosensitive Hybrid Elastin-like Polypeptide-Based ABC Triblock Hydrogel. *Macromolecules* **2021**, *54* (1), 327–340. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.0c01744>.
- (241) Huang, H.-C.; Yang, Y.; Nanda, A.; Korla, P.; Rege, K. Synergistic Administration of Photothermal Therapy and Chemotherapy to Cancer Cells Using Polypeptide-Based Degradable Plasmonic Matrices. *Nanomed.* **2011**, *6* (3), 459–473. <https://doi.org/10.2217/nnm.10.133>.
- (242) Huang, H.-C.; Nanda, A.; Rege, K. Investigation of Phase Separation Behavior and Formation of Plasmonic Nanocomposites from Polypeptide-Gold Nanorod Nanoassemblies. *Langmuir* **2012**, *28* (16), 6645–6655. <https://doi.org/10.1021/la203340y>.
- (243) Kojima, C.; Fukushima, D. Applications of Gold Nanoparticle-Loaded Thermosensitive Elastin-Mimetic Dendrimer to Photothermal Therapy. *J. Photopolym. Sci. Technol.* **2016**, *29* (4), 519–523. <https://doi.org/10.2494/photopolymer.29.519>.
- (244) Sun, M.; Peng, D.; Hao, H.; Hu, J.; Wang, D.; Wang, K.; Liu, J.; Guo, X.; Wei, Y.; Gao, W. Thermally Triggered in Situ Assembly of Gold Nanoparticles for Cancer Multimodal Imaging and Photothermal Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (12), 10453–10460. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b16408>.
- (245) Huang, K.; Gao, M.; Fan, L.; Lai, Y.; Fan, H.; Hua, Z. IR820 Covalently Linked with Self-Assembled Polypeptide for Photothermal Therapy Applications in Cancer. *Biomater. Sci.* **2018**, *6* (11), 2925–2931. <https://doi.org/10.1039/C8BM00399H>.
- (246) Lee, H.; Kim, H. R.; Larson, R. G.; Park, J. C. Effects of the Size, Shape, and Structural Transition of Thermosensitive Polypeptides on the Stability of Lipid Bilayers and Liposomes. *Macromolecules* **2012**, *45* (17), 7304–7312. <https://doi.org/10.1021/ma301327j>.
- (247) Lee, H.; Ryoung Kim, H.; Chan Park, J. Dynamics and Stability of Lipid Bilayers Modulated by Thermosensitive Polypeptides, Cholesterols, and PEGylated Lipids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (8), 3763–3770. <https://doi.org/10.1039/C3CP52639A>.
- (248) Cha, J. M.; You, D. G.; Choi, E. J.; Park, S. J.; Um, W.; Jeon, J.; Kim, K.; Kwon, I. C.; Park, J. C.; Kim, H. R.; Park, J. H. Improvement of Antitumor Efficacy by Combination of Thermosensitive Liposome with High-Intensity Focused Ultrasound. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2016**, *12* (9), 1724–1733. <https://doi.org/10.1166/jbn.2016.2272>.
- (249) Kim, H. R.; You, D. G.; Park, S.-J.; Choi, K.-S.; Um, W.; Kim, J.-H.; Park, J. H.; Kim, Y. MRI Monitoring of Tumor-Selective Anticancer Drug Delivery with Stable Thermosensitive Liposomes Triggered by High-

- Intensity Focused Ultrasound. *Mol. Pharm.* **2016**, *13* (5), 1528–1539. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00013>.
- (250) Um, W.; Kwon, S.; Gil You, D.; Min Cha, J.; Ryoung Kim, H.; Hyung Park, J. Non-Thermal Acoustic Treatment as a Safe Alternative to Thermosensitive Liposome-Involved Hyperthermia for Cancer Therapy. *RSC Adv.* **2017**, *7* (47), 29618–29625. <https://doi.org/10.1039/C7RA02065A>.
- (251) Lee, S.; Kim, J.-S.; Chu, H. S.; Kim, G.-W.; Won, J.-I.; Jang, J.-H. Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Controlled Release of Adeno-Associated Viral Vectors. *Acta Biomater.* **2011**, *7* (11), 3868–3876. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.06.035>.
- (252) Meyer, D. E.; Kong, G. A.; Dewhirst, M. W.; Zalutsky, M. R.; Chilkoti, A. Targeting a Genetically Engineered Elastin-like Polypeptide to Solid Tumors by Local Hyperthermia. *Cancer Res.* **2001**, *61* (4), 1548–1554.
- (253) Raucher, D.; Chilkoti, A. Enhanced Uptake of a Thermally Responsive Polypeptide by Tumor Cells in Response to Its Hyperthermia-Mediated Phase Transition. *Cancer Res.* **2001**, *61* (19), 7163–7170.
- (254) Liu, W.; Dreher, M. R.; Furgeson, D. Y.; Peixoto, K. V.; Yuan, H.; Zalutsky, M. R.; Chilkoti, A. Tumor Accumulation, Degradation and Pharmacokinetics of Elastin-like Polypeptides in Nude Mice. *J. Controlled Release* **2006**, *116* (2), 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.06.026>.
- (255) McDaniel, J. R.; MacEwan, S. R.; Li, X.; Radford, D. C.; Landon, C. D.; Dewhirst, M.; Chilkoti, A. Rational Design of “Heat Seeking” Drug Loaded Polypeptide Nanoparticles That Thermally Target Solid Tumors. *Nano Lett.* **2014**, *14* (5), 2890–2895. <https://doi.org/10.1021/nl5009376>.
- (256) Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G. M. Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37* (20), 2754–2794. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19981102\)37:20<2754::AID-ANIE2754>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19981102)37:20<2754::AID-ANIE2754>3.0.CO;2-3).
- (257) Tjandra, K. C.; Thordarson, P. Multivalency in Drug Delivery—When Is It Too Much of a Good Thing? *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30* (3), 503–514. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00804>.
- (258) Simnick, A. J.; Valencia, C. A.; Liu, R.; Chilkoti, A. Morphing Low-Affinity Ligands into High-Avidity Nanoparticles by Thermally Triggered Self-Assembly of a Genetically Encoded Polymer. *ACS Nano* **2010**, *4* (4), 2217–2227. <https://doi.org/10.1021/nn901732h>.
- (259) Wang, J.; Min, J.; Eghtesadi, S. A.; Kane, R. S.; Chilkoti, A. Quantitative Study of the Interaction of Multivalent Ligand-Modified Nanoparticles with Breast Cancer Cells with Tunable Receptor Density. *ACS Nano* **2020**, *14* (1), 372–383. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b05689>.
- (260) Weber, P.; Dzuricky, M.; Min, J.; Jenkins, I.; Chilkoti, A. Concentration-Independent Multivalent Targeting of Cancer Cells by Genetically Encoded Core-Crosslinked Elastin/Resilin-like Polypeptide Micelles. *Biomacromolecules* **2021**. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00897>.
- (261) Pearce, A. K.; O'Reilly, R. K. Insights into Active Targeting of Nanoparticles in Drug Delivery: Advances in Clinical Studies and Design Considerations for Cancer Nanomedicine. *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30* (9), 2300–2311. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00456>.
- (262) Necas, J.; Bartosikova, L.; Brauner, P.; Kolar, J. Hyaluronic Acid (Hyaluronane): A Review. *Veterinárni Medicina* **2008**, *53* (No. 8), 397–411. <https://doi.org/10.17221/1930-VETMED>.
- (263) Mattheolabakis, G.; Milane, L.; Singh, A.; Amiji, M. M. Hyaluronic Acid Targeting of CD44 for Cancer Therapy: From Receptor Biology to Nanomedicine. *J. Drug Target.* **2015**, *23* (7–8), 605–618. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1052072>.
- (264) Pharmacopée Hyaluronate de Sodium. EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.0.
- (265) Meyer, K.; Palmer, J. W. The Polysaccharide of the Vitreous Humor. *J. Biol. Chem.* **1934**, *107* (3), 629–634.
- (266) Weissmann, B.; Meyer, K. The Structure of Hyalobiuronic Acid and of Hyaluronic Acid from Umbilical Cord 1,2 <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja01636a010>. <https://doi.org/10.1021/ja01636a010>.
- (267) Laurent, T. C.; Fraser, J. R. Hyaluronane. *FASEB J.* **1992**, *6* (7), 2397–2404. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.7.1563592>.
- (268) Balazs, E. A.; Denlinger, J. L. Clinical Uses of Hyaluronane. In *Ciba Foundation Symposium 143 - The Biology of Hyaluronane*; John Wiley & Sons, Ltd; pp 265–285. <https://doi.org/10.1002/9780470513774.ch16>.
- (269) Muir, H. The Biology of Hyaluronane. *Ciba Foundation Symposium 143*: Edited by D. Evered and J. Whelan John Wiley & Sons Ltd, Chichester, £32.50. *Int. J. Biol. Macromol.* **1991**, *13* (5), 318–319. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(91\)90034-R](https://doi.org/10.1016/0141-8130(91)90034-R).
- (270) Meyer, K. The Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides and Glycoproteins. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1938**, *6*, 91–102. <https://doi.org/10.1101/SQB.1938.006.01.011>.
- (271) Meyer, K.; Hobby, G. L.; Chaffee, E.; Dawson, M. H. THE HYDROLYSIS OF HYALURONIC ACID BY BACTERIAL ENZYMES. *J. Exp. Med.* **1940**, *71* (2), 137–146.
- (272) Meyer, K. THE BIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF HYALURONIC ACID AND HYALURONIDASE. *Physiol. Rev.* **1947**, *27* (3), 335–359. <https://doi.org/10.1152/physrev.1947.27.3.335>.
- (273) Denlinger, J. L.; Balazs, E. A. Replacement of the Liquid Vitreous with Sodium Hyaluronate in Monkeys: I. Short-Term Evaluation. *Exp. Eye Res.* **1980**, *31* (1), 81–99. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(80\)90092-5](https://doi.org/10.1016/0014-4835(80)90092-5).

- (274) Denlinger, J. L.; El-Mofty, A. A. M.; Balazs, E. A. Replacement of the Liquid Vitreous with Sodium Hyaluronate in Monkeys: II. Long-Term Evaluation. *Exp. Eye Res.* **1980**, *31* (1), 101–117. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(80\)90093-7](https://doi.org/10.1016/0014-4835(80)90093-7).
- (275) St, O. R.; Weiss, C.; Denlinger, J. L.; Balazs, E. A. A Preliminary Assessment of Na-Hyaluronate Injection into “No Man’s Land” for Primary Flexor Tendon Repair. *Clin. Orthop.* **1980**, No. 146, 269–275.
- (276) Balazs, E. A.; Denlinger, J. L. Sodium Hyaluronate and Joint Function. *J. Equine Vet. Sci.* **1985**, *5* (4), 217–228. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(85\)80102-7](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(85)80102-7).
- (277) Toole, B. P. Hyaluronane and Its Binding Proteins, the Hyaladherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1990**, *2* (5), 839–844. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(90\)90081-O](https://doi.org/10.1016/0955-0674(90)90081-O).
- (278) Toole, B. P. Proteoglycans and Hyaluronane in Morphogenesis and Differentiation. In *Cell Biology of Extracellular Matrix: Second Edition*; Hay, E. D., Ed.; Springer US: Boston, MA, 1991; pp 305–341. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3770-0_10.
- (279) Toole, B. P. Hyaluronane in Morphogenesis. *J. Intern. Med.* **1997**, *242* (1), 35–40. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.1997.00171.x>.
- (280) Toole, B. P.; Wight, T. N.; Tammi, M. I. Hyaluronane-Cell Interactions in Cancer and Vascular Disease *. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (7), 4593–4596. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100039200>.
- (281) Balazs, E. A.; Laurent, T. C.; Jeanloz, R. W. Nomenclature of Hyaluronic Acid. *Biochem. J.* **1986**, *235* (3), 903.
- (282) Karbownik, M. S.; Nowak, J. Z. Hyaluronane: Towards Novel Anti-Cancer Therapeutics. *Pharmacol. Rep.* **2013**, *65* (5), 1056–1074. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)71465-8](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(13)71465-8).
- (283) Robert, L. Hyaluronane, a Truly “Youthful” Polysaccharide. Its Medical Applications. *Pathol. Biol.* **2015**, *63* (1), 32–34. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2014.05.019>.
- (284) Prehm, P. Hyaluronate Is Synthesized at Plasma Membranes. *Biochem. J.* **1984**, *220* (2), 597–600. <https://doi.org/10.1042/bj2200597>.
- (285) Prajapati, V. D.; Maheriya, P. M. 7 - Hyaluronic Acid as Potential Carrier in Biomedical and Drug Delivery Applications. In *Functional Polysaccharides for Biomedical Applications*; Maiti, S., Jana, S., Eds.; Woodhead Publishing, 2019; pp 213–265. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102555-0.00007-8>.
- (286) Šoltés, L.; Mendichi, R.; Kogan, G.; Schiller, J.; Stankovská, M.; Arnhold, J. Degradative Action of Reactive Oxygen Species on Hyaluronane. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (3), 659–668. <https://doi.org/10.1021/bm050867v>.
- (287) Duan, J.; Kasper, D. L. Oxidative Depolymerization of Polysaccharides by Reactive Oxygen/Nitrogen Species. *Glycobiology* **2011**, *21* (4), 401–409. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwq171>.
- (288) Knudson, W.; Chow, G.; Knudson, C. B. CD44-Mediated Uptake and Degradation of Hyaluronane. *Matrix Biol.* **2002**, *21* (1), 15–23. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(01\)00186-X](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(01)00186-X).
- (289) Fraser, J. R. F.; Laurent, T. C.; Pertoft, H.; Baxter, E. Plasma Clearance, Tissue Distribution and Metabolism of Hyaluronic Acid Injected Intravenously in the Rabbit. *Biochem. J.* **1981**, *200* (2), 415–424. <https://doi.org/10.1042/bj2000415>.
- (290) Duan, H. Polymères à Activités Biologiques : Nanoparticules et Multivalence. These de doctorat, Bordeaux, 2016.
- (291) Volpi, N.; Schiller, J.; Stern, R.; Soltes, L. Role, Metabolism, Chemical Modifications and Applications of Hyaluronane <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmc/2009/00000016/00000014/art00003> (accessed 2020-04-01). <https://doi.org/info:doi/10.2174/092986709788186138>.
- (292) Cowman, M. K.; Matsuoka, S. Experimental Approaches to Hyaluronane Structure. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340* (5), 791–809. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.01.022>.
- (293) Laurent, T. C.; Laurent, U. B.; Fraser, J. R. Functions of Hyaluronane. *Ann. Rheum. Dis.* **1995**, *54* (5), 429–432.
- (294) Structure of hyaluronic acid - Université de Bordeaux <https://babordplus.hosted.exlibrisgroup.com> (accessed 2021-09-23).
- (295) Gibbs, D. A.; Merrill, E. W.; Smith, K. A.; Balazs, E. A. Rheology of Hyaluronic Acid. *Biopolymers* **1968**, *6* (6), 777–791. <https://doi.org/10.1002/bip.1968.360060603>.
- (296) Cowman, M. K.; Schmidt, T. A.; Raghavan, P.; Stecco, A. Viscoelastic Properties of Hyaluronane in Physiological Conditions. *F1000Research* **2015**, *4*. <https://doi.org/10.12688/f1000research.6885.1>.
- (297) Furlan, S.; La Penna, G.; Perico, A.; Cesàro, A. Hyaluronane Chain Conformation and Dynamics. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340* (5), 959–970. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.01.030>.
- (298) Hardingham, T. E.; Muir, H. The Specific Interaction of Hyaluronic Acid with Cartilage Proteoglycans. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1972**, *279* (2), 401–405. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(72\)90160-2](https://doi.org/10.1016/0304-4165(72)90160-2).
- (299) Stern, R.; Maibach, H. I. Hyaluronane in Skin: Aspects of Aging and Its Pharmacologic Modulation. *Clin. Dermatol.* **2008**, *26* (2), 106–122. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2007.09.013>.

- (300) Chen, W. Y. J. FUNCTIONS OF HYALURONANE IN WOUND REPAIR. In *Hyaluronane*; Kennedy, J. F., Phillips, G. O., Williams, P. A., Eds.; Woodhead Publishing, 2002; pp 147–156. <https://doi.org/10.1533/9781845693121.147>.
- (301) Misra, S.; Hascall, V. C.; Markwald, R. R.; Ghatak, S. Interactions between Hyaluronane and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. *Front. Immunol.* **2015**, *6*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00201>.
- (302) Aruffo, A.; Stamenkovic, I.; Melnick, M.; Underhill, C. B.; Seed, B. CD44 Is the Principal Cell Surface Receptor for Hyaluronate. *Cell* **1990**, *61* (7), 1303–1313. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90694-A](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90694-A).
- (303) Culty, M.; Nguyen, H. A.; Underhill, C. B. The Hyaluronane Receptor (CD44) Participates in the Uptake and Degradation of Hyaluronane. *J. Cell Biol.* **1992**, *116* (4), 1055–1062. <https://doi.org/10.1083/jcb.116.4.1055>.
- (304) Hall, C. L.; Lange, L. A.; Prober, D. A.; Zhang, S.; Turley, E. A. Pp60(c-Src) Is Required for Cell Locomotion Regulated by the Hyaluronanereceptor RHAMM. *Oncogene* **1996**, *13* (10), 2213–2224.
- (305) Hall, C. L.; Collis, L. A.; Bo A, J.; Lange, L.; McNicol, A.; Gerrard, J. M.; Turley, E. A. Fibroblasts Require Protein Kinase C Activation to Respond to Hyaluronane with Increased Locomotion. *Matrix Biol.* **2001**, *20* (3), 183–192. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(01\)00133-0](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(01)00133-0).
- (306) Kouvidi, K.; Berdiaki, A.; Nikitovic, D.; Katonis, P.; Afratis, N.; Hascall, V. C.; Karamanos, N. K.; Tzanakakis, G. N. Role of Receptor for Hyaluronic Acid-Mediated Motility (RHAMM) in Low Molecular Weight Hyaluronane (LMWHA)-Mediated Fibrosarcoma Cell Adhesion. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (44), 38509–38520. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.275875>.
- (307) Jiang, D.; Liang, J.; Noble, P. W. Hyaluronane in Tissue Injury and Repair. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2007**, *23* (1), 435–461. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123337>.
- (308) Zaman, A.; Cui, Z.; Foley, J. P.; Zhao, H.; Grimm, P. C.; DeLisser, H. M.; Savani, R. C. Expression and Role of the Hyaluronane Receptor RHAMM in Inflammation after Bleomycin Injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2005**, *33* (5), 447–454. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2004-0333OC>.
- (309) Schwertfeger, K. L.; Cowman, M. K.; Telmer, P. G.; Turley, E. A.; McCarthy, J. B. Hyaluronane, Inflammation, and Breast Cancer Progression. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 236. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00236>.
- (310) Tolg, C.; McCarthy, J. B.; Yazdani, A.; Turley, E. A. Hyaluronane and RHAMM in Wound Repair and the “Cancerization” of Stromal Tissues. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, e103923. <https://doi.org/10.1155/2014/103923>.
- (311) Turley, E., A. RHAMM and CD44 Peptides-Analytic Tools and Potential Drugs. *Front. Biosci.* **2012**, *17* (1), 1775. <https://doi.org/10.2741/4018>.
- (312) Kimata, K.; Habuchi, O.; Habuchi, H.; Watanabe, H. 4.10 - Knockout Mice and Proteoglycans. In *Comprehensive Glycoscience*; Kamerling, H., Ed.; Elsevier: Oxford, 2007; pp 159–191. <https://doi.org/10.1016/B978-044451967-2/00087-8>.
- (313) Perides, G.; Lane, W. S.; Andrews, D.; Dahl, D.; Bignami, A. Isolation and Partial Characterization of a Glial Hyaluronate-Binding Protein. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264* (10), 5981–5987.
- (314) Mansour, H.; Asher, R.; Dahl, D.; Labkovsky, B.; Perides, G.; Bignami, A. Permissive and Non-Permissive Reactive Astrocytes: Immunofluorescence Study with Antibodies to the Glial Hyaluronate-Binding Protein. *J. Neurosci. Res.* **1990**, *25* (3), 300–311. <https://doi.org/10.1002/jnr.490250306>.
- (315) Perides, G.; Asher, R. A.; Lark, M. W.; Lane, W. S.; Robinson, R. A.; Bignami, A. Glial Hyaluronate-Binding Protein: A Product of Metalloproteinase Digestion of Versican? *Biochem. J.* **1995**, *312* (2), 377–384. <https://doi.org/10.1042/bj3120377>.
- (316) Jiang, D.; Liang, J.; Fan, J.; Yu, S.; Chen, S.; Luo, Y.; Prestwich, G. D.; Mascarenhas, M. M.; Garg, H. G.; Quinn, D. A.; Homer, R. J.; Goldstein, D. R.; Bucala, R.; Lee, P. J.; Medzhitov, R.; Noble, P. W. Regulation of Lung Injury and Repair by Toll-like Receptors and Hyaluronane. *Nat. Med.* **2005**, *11* (11), 1173–1179. <https://doi.org/10.1038/nm1315>.
- (317) Campo, G. M.; Avenoso, A.; Campo, S.; D’Ascola, A.; Nastasi, G.; Calatroni, A. Small Hyaluronane Oligosaccharides Induce Inflammation by Engaging Both Toll-like-4 and CD44 Receptors in Human Chondrocytes. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *80* (4), 480–490. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.04.024>.
- (318) Rosa, J. M. R. de la; Tirella, A.; Tirelli, N. Receptor-Targeted Drug Delivery and the (Many) Problems We Know of: The Case of CD44 and Hyaluronic Acid. *Adv. Biosyst.* **2018**, *2* (6), 1800049. <https://doi.org/10.1002/adbi.201800049>.
- (319) Kahmann, J. D.; O’Brien, R.; Werner, J. M.; Heinegård, D.; Ladbury, J. E.; Campbell, I. D.; Day, A. J. Localization and Characterization of the Hyaluronane-Binding Site on the Link Module from Human TSG-6. *Structure* **2000**, *8* (7), 763–774. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00163-5](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00163-5).
- (320) Milner, C. M.; Day, A. J. TSG-6: A Multifunctional Protein Associated with Inflammation. *J. Cell Sci.* **2003**, *116* (10), 1863–1873. <https://doi.org/10.1242/jcs.00407>.

- (321) Lesley, J.; Gál, I.; Mahoney, D. J.; Cordell, M. R.; Rugg, M. S.; Hyman, R.; Day, A. J.; Mikecz, K. TSG-6 Modulates the Interaction between Hyaluronane and Cell Surface CD44 *. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 (24), 25745–25754. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313319200>.
- (322) Banerji, S.; Ni, J.; Wang, S.-X.; Clasper, S.; Su, J.; Tammi, R.; Jones, M.; Jackson, D. G. LYVE-1, a New Homologue of the CD44 Glycoprotein, Is a Lymph-Specific Receptor for Hyaluronane. *J. Cell Biol.* **1999**, 144 (4), 789–801. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.4.789>.
- (323) Spadea, A.; Rios de la Rosa, J. M.; Tirella, A.; Ashford, M. B.; Williams, K. J.; Stratford, I. J.; Tirelli, N.; Mehibel, M. Evaluating the Efficiency of Hyaluronic Acid for Tumor Targeting via CD44. *Mol. Pharm.* **2019**, 16 (6), 2481–2493. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00083>.
- (324) Zhou, B.; Weigel, J. A.; Fauss, L.; Weigel, P. H. Identification of the Hyaluronane Receptor for Endocytosis (HARE) *. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275 (48), 37733–37741. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003030200>.
- (325) Jeannot, V.; Mazzaferro, S.; Lavaud, J.; Vanwonderghem, L.; Henry, M.; Arboléas, M.; Vollaie, J.; Jossierand, V.; Coll, J.-L.; Lecommandoux, S.; Schatz, C.; Hurbin, A. Targeting CD44 Receptor-Positive Lung Tumors Using Polysaccharide-Based Nanocarriers: Influence of Nanoparticle Size and Administration Route. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2016**, 12 (4), 921–932. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.018>.
- (326) Bazil, V.; Horejsí, V. Shedding of the CD44 Adhesion Molecule from Leukocytes Induced by Anti-CD44 Monoclonal Antibody Simulating the Effect of a Natural Receptor Ligand. *J. Immunol.* **1992**, 149 (3), 747–753.
- (327) Gallatin, W. M.; Weissman, I. L.; Butcher, E. C. A Cell-Surface Molecule Involved in Organ-Specific Homing of Lymphocytes. *Nature* **1983**, 304 (5921), 30–34. <https://doi.org/10.1038/304030a0>.
- (328) Stamenkovic, I.; Amiot, M.; Pesando, J. M.; Seed, B. A Lymphocyte Molecule Implicated in Lymph Node Homing Is a Member of the Cartilage Link Protein Family. *Cell* **1989**, 56 (6), 1057–1062. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90638-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90638-7).
- (329) Prochazka, L.; Tesarik, R.; Turanek, J. Regulation of Alternative Splicing of CD44 in Cancer. *Cell. Signal.* **2014**, 26 (10), 2234–2239. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.07.011>.
- (330) Zöller, M. CD44: Can a Cancer-Initiating Cell Profit from an Abundantly Expressed Molecule? *Nat. Rev. Cancer* **2011**, 11 (4), 254–267. <https://doi.org/10.1038/nrc3023>.
- (331) Lesley, J.; Hyman, R.; Kincade, P. W. CD44 and Its Interaction with Extracellular Matrix. In *Advances in Immunology*; Dixon, F. J., Ed.; Academic Press, 1993; Vol. 54, pp 271–335. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)60537-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)60537-4).
- (332) Neame, S. J.; Uff, C. R.; Sheikh, H.; Wheatley, S. C.; Isacke, C. M. CD44 Exhibits a Cell Type Dependent Interaction with Triton X-100 Insoluble, Lipid Rich, Plasma Membrane Domains. *J. Cell Sci.* **1995**, 108 (9), 3127–3135.
- (333) Ponta, H.; Sherman, L.; Herrlich, P. A. CD44: From Adhesion Molecules to Signalling Regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, 4 (1), 33–45. <https://doi.org/10.1038/nrm1004>.
- (334) Günthert, U. CD44: A Multitude of Isoforms with Diverse Functions. In *Adhesion in Leukocyte Homing and Differentiation*; Dunon, D., Mackay, C. R., Imhof, B. A., Eds.; Current Topics in Microbiology and Immunology; Springer: Berlin, Heidelberg, 1993; pp 47–63. https://doi.org/10.1007/978-3-642-78253-4_4.
- (335) Orian-Rousseau, V. CD44 Acts as a Signaling Platform Controlling Tumor Progression and Metastasis. *Front. Immunol.* **2015**, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00154>.
- (336) Jiang, H.; Zhao, W.; Shao, W. Prognostic Value of CD44 and CD44v6 Expression in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer: Meta-Analysis. *Tumor Biol.* **2014**, 35 (8), 7383–7389. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2150-3>.
- (337) Kopp, R.; Fichter, M.; Schalhorn, G.; Danescu, J.; Classen, S. Frequent Expression of the High Molecular, 673-Bp CD44v3,v8-10 Variant in Colorectal Adenomas and Carcinomas. *Int. J. Mol. Med.* **2009**, 24 (5), 677–683. https://doi.org/10.3892/ijmm_00000279.
- (338) Parkkola, H. Hyaluronic Acid-Coated Gold Nanoparticles as an Anticancer Drug Delivery System - Biological Characterization and Efficacy. **2014**.
- (339) Thomas, L.; Byers, H. R.; Vink, J.; Stamenkovic, I. CD44H Regulates Tumor Cell Migration on Hyaluronate-Coated Substrate. *J. Cell Biol.* **1992**, 118 (4), 971–977. <https://doi.org/10.1083/jcb.118.4.971>.
- (340) Jalkanen, S. T.; Bargatze, R. F.; Herron, L. R.; Butcher, E. C. A Lymphoid Cell Surface Glycoprotein Involved in Endothelial Cell Recognition and Lymphocyte Homing in Man. *Eur. J. Immunol.* **1986**, 16 (10), 1195–1202. <https://doi.org/10.1002/eji.1830161003>.
- (341) Shimizu, Y.; Seventer, G. A. V.; Siraganian, R.; Wahl, L.; Shaw, S. Dual Role of the CD44 Molecule in T Cell Adhesion and Activation. *J. Immunol.* **1989**, 143 (8), 2457–2463.
- (342) Foger, N.; Marhaba, R.; Zoller, M. Involvement of CD44 in Cytoskeleton Rearrangement and Raft Reorganization in T Cells. *J. Cell Sci.* **2001**, 114 (6), 1169–1178.

- (343) Hua, Q.; Knudson, C. B.; Knudson, W. Internalization of Hyaluronane by Chondrocytes Occurs via Receptor-Mediated Endocytosis. *J. Cell Sci.* **1993**, *106* (1), 365–375. <https://doi.org/10.1242/jcs.106.1.365>.
- (344) Yu, Q.; Toole, B. P.; Stamenkovic, I. Induction of Apoptosis of Metastatic Mammary Carcinoma Cells In Vivo by Disruption of Tumor Cell Surface CD44 Function. *J. Exp. Med.* **1997**, *186* (12), 1985–1996. <https://doi.org/10.1084/jem.186.12.1985>.
- (345) Turley, E. A.; Noble, P. W.; Bourguignon, L. Y. W. Signaling Properties of Hyaluronane Receptors *. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (7), 4589–4592. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100038200>.
- (346) Naor, D.; Nedvetzki, S.; Golan, I.; Melnik, L.; Faitelson, Y. CD44 in Cancer. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2002**, *39* (6), 527–579. <https://doi.org/10.1080/10408360290795574>.
- (347) Teder, P.; Vandivier, R. W.; Jiang, D.; Liang, J.; Cohn, L.; Puré, E.; Henson, P. M.; Noble, P. W. Resolution of Lung Inflammation by CD44. *Science* **2002**, *296* (5565), 155–158. <https://doi.org/10.1126/science.1069659>.
- (348) Mohamadzadeh, M.; DeGrendele, H.; Arizpe, H.; Estess, P.; Siegelman, M. Proinflammatory Stimuli Regulate Endothelial Hyaluronane Expression and CD44/HA-Dependent Primary Adhesion. *J. Clin. Invest.* **1998**, *101* (1), 97–108. <https://doi.org/10.1172/JCI1604>.
- (349) McDonald, B.; Kubes, P. Interactions between CD44 and Hyaluronane in Leukocyte Trafficking. *Front. Immunol.* **2015**, *6*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00068>.
- (350) Yang, C.; Cao, M.; Liu, H.; He, Y.; Xu, J.; Du, Y.; Liu, Y.; Wang, W.; Cui, L.; Hu, J.; Gao, F. The High and Low Molecular Weight Forms of Hyaluronane Have Distinct Effects on CD44 Clustering. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (51), 43094–43107. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.349209>.
- (351) Müller, S.; Sindikubwabo, F.; Cañeque, T.; Lafon, A.; Versini, A.; Lombard, B.; Loew, D.; Wu, T.-D.; Ginestier, C.; Charafe-Jauffret, E.; Durand, A.; Vallot, C.; Baulande, S.; Servant, N.; Rodriguez, R. CD44 Regulates Epigenetic Plasticity by Mediating Iron Endocytosis. *Nat. Chem.* **2020**. <https://doi.org/10.1038/s41557-020-0513-5>.
- (352) Lesley, J.; English, N.; Perschl, A.; Gregoroff, J.; Hyman, R. Variant Cell Lines Selected for Alterations in the Function of the Hyaluronane Receptor CD44 Show Differences in Glycosylation. *J. Exp. Med.* **1995**, *182* (2), 431–437. <https://doi.org/10.1084/jem.182.2.431>.
- (353) Maiti, A.; Maki, G.; Johnson, P. TNF- α Induction of CD44-Mediated Leukocyte Adhesion by Sulfation. *Science* **1998**, *282* (5390), 941–943. <https://doi.org/10.1126/science.282.5390.941>.
- (354) Levesque, M. C.; Haynes, B. F. Activated T Lymphocytes Regulate Hyaluronane Binding to Monocyte CD44 Via Production of IL-2 and IFN- γ . *J. Immunol.* **2001**, *166* (1), 188–196. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.1.188>.
- (355) Cichy, J.; Puré, E. Oncostatin M and Transforming Growth Factor-B1 Induce Post-Translational Modification and Hyaluronane Binding to CD44 in Lung-Derived Epithelial Tumor Cells *. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (24), 18061–18069. <https://doi.org/10.1074/jbc.M907962199>.
- (356) Zhang, M.; Singh, R. K.; Wang, M. H.; Wells, A.; Siegal, G. P. Epidermal Growth Factor Modulates Cell Attachment to Hyaluronic Acid by the Cell Surface Glycoprotein CD44. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (9), 5407–5412.
- (357) Thankamony, S. P.; Knudson, W. Acylation of CD44 and Its Association with Lipid Rafts Are Required for Receptor and Hyaluronane Endocytosis. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (45), 34601–34609. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601530200>.
- (358) Bennett, K. L.; Modrell, B.; Greenfield, B.; Bartolazzi, A.; Stamenkovic, I.; Peach, R.; Jackson, D. G.; Spring, F.; Aruffo, A. Regulation of CD44 Binding to Hyaluronane by Glycosylation of Variably Spliced Exons. *J. Cell Biol.* **1995**, *131* (6), 1623–1633. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.6.1623>.
- (359) Sleeman, J.; Rudy, W.; Hofmann, M.; Moll, J.; Herrlich, P.; Ponta, H. Regulated Clustering of Variant CD44 Proteins Increases Their Hyaluronate Binding Capacity. *J. Cell Biol.* **1996**, *135* (4), 1139–1150. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.4.1139>.
- (360) Wolny, P. M.; Banerji, S.; Gounou, C.; Brisson, A. R.; Day, A. J.; Jackson, D. G.; Richter, R. P. Analysis of CD44-Hyaluronane Interactions in an Artificial Membrane System: INSIGHTS INTO THE DISTINCT BINDING PROPERTIES OF HIGH AND LOW MOLECULAR WEIGHT HYALURONANE *. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (39), 30170–30180. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.137562>.
- (361) Bano, F.; Banerji, S.; Howarth, M.; Jackson, D. G.; Richter, R. P. A Single Molecule Assay to Probe Monovalent and Multivalent Bonds between Hyaluronane and Its Key Leukocyte Receptor CD44 under Force. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep34176>.
- (362) Duan, H.; Donovan, M.; Foucher, A.; Schultze, X.; Lecommandoux, S. Multivalent and Multifunctional Polysaccharide-Based Particles for Controlled Receptor Recognition. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 14730. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32994-y>.
- (363) Zeng, C.; Toole, B. P.; Kinney, S. D.; Kuo, J.; Stamenkovic, I. Inhibition of Tumor Growth in Vivo by Hyaluronane Oligomers. *Int. J. Cancer* **1998**, *77* (3), 396–401. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19980729\)77:3<396::AID-IJC15>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19980729)77:3<396::AID-IJC15>3.0.CO;2-6).

- (364) Gao, F.; Yang, C. X.; Mo, W.; Liu, Y. W.; He, Y. Q. Hyaluronane Oligosaccharides Are Potential Stimulators to Angiogenesis via RHAMM Mediated Signal Pathway in Wound Healing. *Clin. Invest. Med.* **2008**, E106–E116. <https://doi.org/10.25011/cim.v31i3.3467>.
- (365) Danielson, B. T.; Knudson, C. B.; Knudson, W. Extracellular Processing of the Cartilage Proteoglycan Aggregate and Its Effect on CD44-Mediated Internalization of Hyaluronane *. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (15), 9555–9570. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.643171>.
- (366) Jiang, H.; Peterson, R. S.; Wang, W.; Bartnik, E.; Knudson, C. B.; Knudson, W. A Requirement for the CD44 Cytoplasmic Domain for Hyaluronane Binding, Pericellular Matrix Assembly, and Receptor-Mediated Endocytosis in COS-7 Cells *. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (12), 10531–10538. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108654200>.
- (367) Toole, B. P. Hyaluronane-CD44 Interactions in Cancer: Paradoxes and Possibilities. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15* (24), 7462–7468. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0479>.
- (368) Misra, S.; Heldin, P.; Hascall, V. C.; Karamanos, N. K.; Skandalis, S. S.; Markwald, R. R.; Ghatak, S. Hyaluronane-CD44 Interactions as Potential Targets for Cancer Therapy. *FEBS J.* **2011**, *278* (9), 1429–1443. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08071.x>.
- (369) Auvinen, P.; Tammi, R.; Parkkinen, J.; Tammi, M.; Ågren, U.; Johansson, R.; Hirvikoski, P.; Eskelinen, M.; Kosma, V.-M. Hyaluronane in Peritumoral Stroma and Malignant Cells Associates with Breast Cancer Spreading and Predicts Survival. *Am. J. Pathol.* **2000**, *156* (2), 529–536. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64757-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64757-8).
- (370) Anttila, M. A.; Tammi, R. H.; Tammi, M. I.; Syrjänen, K. J.; Saarikoski, S. V.; Kosma, V.-M. High Levels of Stromal Hyaluronane Predict Poor Disease Outcome in Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Res.* **2000**, *60* (1), 150–155.
- (371) Lokeshwar, V. B.; Öbek, C.; Pham, H. T.; Wei, D.; Young, M. J.; Duncan, R. C.; Soloway, M. S.; Block, N. L. URINARY HYALURONIC ACID AND HYALURONIDASE: MARKERS FOR BLADDER CANCER DETECTION AND EVALUATION OF GRADE. *J. Urol.* **2000**, *163* (1), 348–356. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)68050-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)68050-0).
- (372) Dosio, F.; Arpicco, S.; Stella, B.; Fattal, E. Hyaluronic Acid for Anticancer Drug and Nucleic Acid Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *97*, 204–236. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.011>.
- (373) Kosaki, R.; Watanabe, K.; Yamaguchi, Y. Overproduction of Hyaluronane by Expression of the Hyaluronane Synthase Has2 Enhances Anchorage-Independent Growth and Tumorigenicity. *Cancer Res.* **1999**, *59* (5), 1141–1145.
- (374) Liu, N.; Gao, F.; Han, Z.; Xu, X.; Underhill, C. B.; Zhang, L. Hyaluronane Synthase 3 Overexpression Promotes the Growth of TSU Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.* **2001**, *61* (13), 5207–5214.
- (375) Itano, N.; Sawai, T.; Miyaishi, O.; Kimata, K. Relationship between Hyaluronane Production and Metastatic Potential of Mouse Mammary Carcinoma Cells. *Cancer Res.* **1999**, *59* (10), 2499–2504.
- (376) Peterson, R. M.; Yu, Q.; Stamenkovic, I.; Toole, B. P. Perturbation of Hyaluronane Interactions by Soluble CD44 Inhibits Growth of Murine Mammary Carcinoma Cells in Ascites. *Am. J. Pathol.* **2000**, *156* (6), 2159–2167. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65086-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65086-9).
- (377) Yu, Q.; Stamenkovic, I. Localization of Matrix Metalloproteinase 9 to the Cell Surface Provides a Mechanism for CD44-Mediated Tumor Invasion. *Genes Dev.* **1999**, *13* (1), 35–48. <https://doi.org/10.1101/gad.13.1.35>.
- (378) Ahrens, T.; Sleeman, J. P.; Schempp, C. M.; Howells, N.; Hofmann, M.; Ponta, H.; Herrlich, P.; Simon, J. C. Soluble CD44 Inhibits Melanoma Tumor Growth by Blocking Cell Surface CD44 Binding to Hyaluronic Acid. *Oncogene* **2001**, *20* (26), 3399–3408. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204435>.
- (379) Naor, D.; Wallach-Dayana, S. B.; Zahalka, M. A.; Sionov, R. V. CHAPTER 8 - Involvement of CD44, a Molecule with a Thousand Faces, in Cancer Dissemination. In *Hyaluronane in Cancer Biology*; Stern, R., Ed.; Academic Press: San Diego, 2009; pp 127–146. <https://doi.org/10.1016/B978-012374178-3.10008-0>.
- (380) Misra, S.; Ghatak, S.; Toole, B. P. Regulation of MDR1 Expression and Drug Resistance by a Positive Feedback Loop Involving Hyaluronane, Phosphoinositide 3-Kinase, and ErbB2. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (21), 20310–20315. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500737200>.
- (381) Russo, R. I. C.; García, M. G.; Alaniz, L.; Blanco, G.; Alvarez, E.; Hajos, S. E. Hyaluronane Oligosaccharides Sensitize Lymphoma Resistant Cell Lines to Vincristine by Modulating P-Glycoprotein Activity and PI3K/Akt Pathway. *Int. J. Cancer* **2008**, *122* (5), 1012–1018. <https://doi.org/10.1002/ijc.23122>.
- (382) Liu, D.; Pearlman, E.; Diaconu, E.; Guo, K.; Mori, H.; Haqqi, T.; Markowitz, S.; Willson, J.; Sy, M. S. Expression of Hyaluronidase by Tumor Cells Induces Angiogenesis in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93* (15), 7832–7837. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.7832>.
- (383) Olsson, E.; Honeth, G.; Bendahl, P.-O.; Saal, L. H.; Gruvberger-Saal, S.; Ringnér, M.; Vallon-Christersson, J.; Jönsson, G.; Holm, K.; Lövgren, K.; Fernö, M.; Grabau, D.; Borg, Å.; Hegardt, C. CD44 Isoforms Are Heterogeneously Expressed in Breast Cancer and Correlate with Tumor Subtypes and Cancer Stem Cell Markers. *BMC Cancer* **2011**, *11* (1), 418. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-418>.

- (384) Li, X.-P.; Zhang, X.-W.; Zheng, L.-Z.; Guo, W.-J. Expression of CD44 in Pancreatic Cancer and Its Significance. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8* (6), 6724–6731.
- (385) Chen, Y.; Fu, Z.; Xu, S.; Xu, Y.; Xu, P. The Prognostic Value of CD44 Expression in Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *Biomed. Pharmacother.* **2014**, *68* (6), 693–697. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.08.001>.
- (386) Liu, A. Y. Expression of CD44 in Prostate Cancer Cells. *Cancer Lett.* **1994**, *76* (1), 63–69. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(94\)90135-X](https://doi.org/10.1016/0304-3835(94)90135-X).
- (387) Penno, M. B.; August, J. T.; Baylin, S. B.; Mabry, M.; Linnoila, R. I.; Lee, V. S.; Croteau, D.; Yang, X. L.; Rosada, C. Expression of CD44 in Human Lung Tumors. *Cancer Res.* **1994**, *54* (5), 1381–1387.
- (388) Marangoni, E.; Lecomte, N.; Durand, L.; Pinieux, G. de; Decaudin, D.; Chomiienne, C.; Smadja-Joffe, F.; Poupon, M.-F. CD44 Targeting Reduces Tumour Growth and Prevents Post-Chemotherapy Relapse of Human Breast Cancers Xenografts. *Br. J. Cancer* **2009**, *100* (6), 918–922. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604953>.
- (389) Günthert, U.; Hofmann, M.; Rudy, W.; Reber, S.; Zöller, M.; Haußmann, I.; Matzku, S.; Wenzel, A.; Ponta, H.; Herrlich, P. A New Variant of Glycoprotein CD44 Confers Metastatic Potential to Rat Carcinoma Cells. *Cell* **1991**, *65* (1), 13–24. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90403-L](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90403-L).
- (390) Klingbeil, P.; Marhaba, R.; Jung, T.; Kirmse, R.; Ludwig, T.; Zöller, M. CD44 Variant Isoforms Promote Metastasis Formation by a Tumor Cell-Matrix Cross-Talk That Supports Adhesion and Apoptosis Resistance. *Mol. Cancer Res.* **2009**, *7* (2), 168–179. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0207>.
- (391) Kiuchi, S.; Ikeshita, S.; Miyatake, Y.; Kasahara, M. Pancreatic Cancer Cells Express CD44 Variant 9 and Multidrug Resistance Protein 1 during Mitosis. *Exp. Mol. Pathol.* **2015**, *98* (1), 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2014.12.001>.
- (392) Wielenga, V. J. M.; Heider, K.-H.; Johan, G.; Offerhaus, A.; Adolf, G. R.; Berg, F. M. van den; Ponta, H.; Herrlich, P.; Pals, S. T. Expression of CD44 Variant Proteins in Human Colorectal Cancer Is Related to Tumor Progression. *Cancer Res.* **1993**, *53* (20), 4754–4756.
- (393) Prince, M. E.; Sivanandan, R.; Kaczorowski, A.; Wolf, G. T.; Kaplan, M. J.; Dalerba, P.; Weissman, I. L.; Clarke, M. F.; Ailles, L. E. Identification of a Subpopulation of Cells with Cancer Stem Cell Properties in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (3), 973–978. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610117104>.
- (394) Al-Hajj, M.; Becker, M. W.; Wicha, M.; Weissman, I.; Clarke, M. F. Therapeutic Implications of Cancer Stem Cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2004**, *14* (1), 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2003.11.007>.
- (395) Tirino, V.; Desiderio, V.; Paino, F.; De Rosa, A.; Papaccio, F.; La Noce, M.; Laino, L.; De Francesco, F.; Papaccio, G. Cancer Stem Cells in Solid Tumors: An Overview and New Approaches for Their Isolation and Characterization. *FASEB J.* **2012**, *27* (1), 13–24. <https://doi.org/10.1096/fj.12-218222>.
- (396) Najafi, M.; Farhood, B.; Mortezaee, K. Cancer Stem Cells (CSCs) in Cancer Progression and Therapy. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234* (6), 8381–8395. <https://doi.org/10.1002/jcp.27740>.
- (397) Al-Hajj, M.; Wicha, M. S.; Benito-Hernandez, A.; Morrison, S. J.; Clarke, M. F. Prospective Identification of Tumorigenic Breast Cancer Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (7), 3983–3988. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>.
- (398) Idowu, M. O.; Kmiecik, M.; Dumur, C.; Burton, R. S.; Grimes, M. M.; Powers, C. N.; Manjili, M. H. CD44+/CD24-/Low Cancer Stem/Progenitor Cells Are More Abundant in Triple-Negative Invasive Breast Carcinoma Phenotype and Are Associated with Poor Outcome. *Hum. Pathol.* **2012**, *43* (3), 364–373. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2011.05.005>.
- (399) Heerboth, S.; Housman, G.; Leary, M.; Longacre, M.; Byler, S.; Lapinska, K.; Willbanks, A.; Sarkar, S. EMT and Tumor Metastasis. *Clin. Transl. Med.* **2015**, *4* (1), 6. <https://doi.org/10.1186/s40169-015-0048-3>.
- (400) Chaffer, C. L.; San Juan, B. P.; Lim, E.; Weinberg, R. A. EMT, Cell Plasticity and Metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **2016**, *35* (4), 645–654. <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9648-7>.
- (401) Smith, B. N.; Bhowmick, N. A. Role of EMT in Metastasis and Therapy Resistance. *J. Clin. Med.* **2016**, *5* (2), 17. <https://doi.org/10.3390/jcm5020017>.
- (402) Diepenbruck, M.; Christofori, G. Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) and Metastasis: Yes, No, Maybe? *Curr. Opin. Cell Biol.* **2016**, *43*, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.06.002>.
- (403) Mani, S. A.; Guo, W.; Liao, M.-J.; Eaton, E. Ng.; Ayyanan, A.; Zhou, A. Y.; Brooks, M.; Reinhard, F.; Zhang, C. C.; Shipitsin, M.; Campbell, L. L.; Polyak, K.; Brisken, C.; Yang, J.; Weinberg, R. A. The Epithelial–Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* **2008**, *133* (4), 704–715. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>.
- (404) Morel, A.-P.; Lièvre, M.; Thomas, C.; Hinkal, G.; Ansieau, S.; Puisieux, A. Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial–Mesenchymal Transition. *PLoS ONE* **2008**, *3* (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002888>.
- (405) Brown, R. L.; Reinke, L. M.; Damerow, M. S.; Perez, D.; Chodosh, L. A.; Yang, J.; Cheng, C. CD44 Splice Isoform Switching in Human and Mouse Epithelium Is Essential for Epithelial–Mesenchymal Transition and Breast Cancer Progression. *J. Clin. Invest.* **2011**, *121* (3), 1064–1074. <https://doi.org/10.1172/JCI44540>.

- (406) Lee, S. Y.; Kang, M. S.; Jeong, W. Y.; Han, D.-W.; Kim, K. S. Hyaluronic Acid-Based Theranostic Nanomedicines for Targeted Cancer Therapy. *Cancers* **2020**, *12* (4), 940. <https://doi.org/10.3390/cancers12040940>.
- (407) Schanté, C. E.; Zuber, G.; Herlin, C.; Vandamme, T. F. Chemical Modifications of Hyaluronic Acid for the Synthesis of Derivatives for a Broad Range of Biomedical Applications. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *85* (3), 469–489. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.03.019>.
- (408) Han, X.; Li, Z.; Sun, J.; Luo, C.; Li, L.; Liu, Y.; Du, Y.; Qiu, S.; Ai, X.; Wu, C.; Lian, H.; He, Z. Stealth CD44-Targeted Hyaluronic Acid Supramolecular Nanoassemblies for Doxorubicin Delivery: Probing the Effect of Uncovalent Pegylation Degree on Cellular Uptake and Blood Long Circulation. *J. Controlled Release* **2015**, *197*, 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.10.024>.
- (409) Cadete, A.; Alonso, M. J. Targeting Cancer with Hyaluronic Acid-Based Nanocarriers: Recent Advances and Translational Perspectives. *Nanomed.* **2016**, *11* (17), 2341–2357. <https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0117>.
- (410) Mizrahy, S.; Raz, S. R.; Hasgaard, M.; Liu, H.; Soffer-Tsur, N.; Cohen, K.; Dvash, R.; Landsman-Milo, D.; Bremer, M. G. E. G.; Moghimi, S. M.; Peer, D. Hyaluronane-Coated Nanoparticles: The Influence of the Molecular Weight on CD44-Hyaluronane Interactions and on the Immune Response. *J. Controlled Release* **2011**, *156* (2), 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.06.031>.
- (411) Pasqui, D.; Golini, L.; Giovampaola, C. D.; Atrei, A.; Barbucci, R. Chemical and Biological Properties of Polysaccharide-Coated Titania Nanoparticles: The Key Role of Proteins. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (4), 1243–1249. <https://doi.org/10.1021/bm101521e>.
- (412) Montanari, E.; Oates, A.; Meo, C. D.; Meade, J.; Cerrone, R.; Francioso, A.; Devine, D.; Coviello, T.; Mancini, P.; Mosca, L.; Matricardi, P. Hyaluronane-Based Nanohydrogels for Targeting Intracellular *S. Aureus* in Human Keratinocytes. *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7* (12), 1701483. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701483>.
- (413) Montanari, E.; Mancini, P.; Galli, F.; Varani, M.; Santino, I.; Coviello, T.; Mosca, L.; Matricardi, P.; Rancan, F.; Di Meo, C. Biodistribution and Intracellular Localization of Hyaluronane and Its Nanogels. A Strategy to Target Intracellular *S. Aureus* in Persistent Skin Infections. *J. Controlled Release* **2020**, *326*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.06.007>.
- (414) Lázaro, I. de; Mooney, D. J. A Nanoparticle's Pathway into Tumours. *Nat. Mater.* **2020**, *19* (5), 486–487. <https://doi.org/10.1038/s41563-020-0669-9>.
- (415) Akima, K.; Ito, H.; Iwata, Y.; Matsuo, K.; Watari, N.; Yanagi, M.; Hagi, H.; Oshima, K.; Yagita, A.; Atomi, Y.; Tatekawa, I. Evaluation of Antitumor Activities of Hyaluronate Binding Antitumor Drugs: Synthesis, Characterization and Antitumor Activity. *J. Drug Target.* **1996**, *4* (1), 1–8. <https://doi.org/10.3109/10611869609046255>.
- (416) Stella, V. J.; Charman, W. N. A.; Naringrekar, V. H. Prodrugs. *Drugs* **1985**, *29* (5), 455–473. <https://doi.org/10.2165/00003495-198529050-00002>.
- (417) Stella, V. J. Prodrugs as Therapeutics. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2004**, *14* (3), 277–280. <https://doi.org/10.1517/13543776.14.3.277>.
- (418) Delplace, V.; Couvreur, P.; Nicolas, J. Recent Trends in the Design of Anticancer Polymer Prodrug Nanocarriers. *Polym. Chem.* **2014**, *5* (5), 1529–1544. <https://doi.org/10.1039/C3PY01384G>.
- (419) Rautio, J.; Meanwell, N. A.; Di, L.; Hageman, M. J. The Expanding Role of Prodrugs in Contemporary Drug Design and Development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.46>.
- (420) Rosato, A.; Banzato, A.; De Luca, G.; Renier, D.; Bettella, F.; Pagano, C.; Esposito, G.; Zanovello, P.; Bassi, P. HYTAD1-P20: A New Paclitaxel-Hyaluronic Acid Hydrosoluble Bioconjugate for Treatment of Superficial Bladder Cancer. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **2006**, *24* (3), 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2005.08.020>.
- (421) Banzato, A.; Bobisse, S.; Rondina, M.; Renier, D.; Bettella, F.; Esposito, G.; Quintieri, L.; Meléndez-Alafort, L.; Mazzi, U.; Zanovello, P.; Rosato, A. A Paclitaxel-Hyaluronane Bioconjugate Targeting Ovarian Cancer Affords a Potent In Vivo Therapeutic Activity. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14* (11), 3598–3606. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-2019>.
- (422) Montagner, I. M.; Banzato, A.; Zuccolotto, G.; Renier, D.; Campisi, M.; Bassi, P.; Zanovello, P.; Rosato, A. Paclitaxel-Hyaluronane Hydrosoluble Bioconjugate: Mechanism of Action in Human Bladder Cancer Cell Lines. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **2013**, *31* (7), 1261–1269. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2012.01.005>.
- (423) Hurle* Rodolfo; Guazzoni Giorgio Ferruccio; Colombo Piergiuseppe; Santoro Armando; De Cobelli Ottavio; Di Trapani Ettore; Nohales Gloria; Llorente Carlos; Duran-Merino Ramon; Lazzeri Massimo. Pd12-01 Oncofid-p-b for the Treatment of Bcg Unresponsive Carcinoma in Situ (Cis) of Bladder: Preliminary Results of European Multicentre Phase 1 Study at the End of 12 Consecutive Weeks Intensive Course and during Ongoing Monthly Maintenance Phase. *J. Urol.* **2020**, *203* (Supplement 4), e259–e259. <https://doi.org/10.1097/JU.0000000000000846.01>.

- (424) Bassi, P. F.; Racioppi, M.; Palermo, G.; Selli, C.; Battaglia, M.; Gontero, P.; Simeone, C.; Eisendhardt, A.; Dorp, F. V.; Neisius, A.; Arjona, M. F.; Diaz, D. C.; Backhaus, M. R.; Sierra, J. M.; Llorente, C.; Taurines, G. N.; Giordan, N.; Marinello, A. Oncofid-P-B (Paclitaxel-Hyaluronic Acid) in the Intravesical Therapy of Patients Affected by Primary or Recurrent Ta G1-G2 Papillary Cancer of the Bladder. A Phase II Marker Lesion Study. *Eur. Urol. Suppl.* **2018**, *17* (2), e1056–e1057. [https://doi.org/10.1016/S1569-9056\(18\)31567-7](https://doi.org/10.1016/S1569-9056(18)31567-7).
- (425) Mittapalli, R. K.; Liu, X.; Adkins, C. E.; Nounou, M. I.; Bohn, K. A.; Terrell, T. B.; Qhattal, H. S.; Geldenhuys, W. J.; Palmieri, D.; Steeg, P. S.; Smith, Q. R.; Lockman, P. R. Paclitaxel–Hyaluronic NanoConjugates Prolong Overall Survival in a Preclinical Brain Metastases of Breast Cancer Model. *Mol. Cancer Ther.* **2013**, *12* (11), 2389–2399. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0132>.
- (426) Yin, S.; Huai, J.; Chen, X.; Yang, Y.; Zhang, X.; Gan, Y.; Wang, G.; Gu, X.; Li, J. Intracellular Delivery and Antitumor Effects of a Redox-Responsive Polymeric Paclitaxel Conjugate Based on Hyaluronic Acid. *Acta Biomater.* **2015**, *26*, 274–285. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.08.029>.
- (427) Luo, Y.; Prestwich, G. D. Synthesis and Selective Cytotoxicity of a Hyaluronic Acid–Antitumor Bioconjugate. *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10* (5), 755–763. <https://doi.org/10.1021/bc9900338>.
- (428) Luo, Y.; Ziebell, M. R.; Prestwich, G. D. A Hyaluronic Acid–Taxol Antitumor Bioconjugate Targeted to Cancer Cells. *Biomacromolecules* **2000**, *1* (2), 208–218. <https://doi.org/10.1021/bm000283n>.
- (429) Leonelli, F.; La Bella, A.; Francescangeli, A.; Joudioux, R.; Capodilupo, A.-L.; Quagliariello, M.; Migneco, L. M.; Bettolo, R. M.; Crescenzi, V.; De Luca, G.; Renier, D. A New and Simply Available Class of Hydrosoluble Bioconjugates by Coupling Paclitaxel to Hyaluronic Acid through a 4-Hydroxybutanoic Acid Derived Linker. *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88* (1), 154–159. <https://doi.org/10.1002/hlca.200490289>.
- (430) Leonelli, F.; La Bella, A.; Migneco, L. M.; Bettolo, R. M. Design, Synthesis and Applications of Hyaluronic Acid–Paclitaxel Bioconjugates†. *Molecules* **2008**, *13* (2), 360–378. <https://doi.org/10.3390/molecules13020360>.
- (431) Vogus, D. R.; Evans, M. A.; Pusuluri, A.; Barajas, A.; Zhang, M.; Krishnan, V.; Nowak, M.; Menegatti, S.; Helgeson, M. E.; Squires, T. M.; Mitragotri, S. A Hyaluronic Acid Conjugate Engineered to Synergistically and Sequentially Deliver Gemcitabine and Doxorubicin to Treat Triple Negative Breast Cancer. *J. Controlled Release* **2017**, *267*, 191–202. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.08.016>.
- (432) Goodarzi, N.; Ghahremani, M. H.; Amini, M.; Atyabi, F.; Ostad, S. N.; Shabani Ravari, N.; Nateghian, N.; Dinarvand, R. CD44-Targeted Docetaxel Conjugate for Cancer Cells and Cancer Stem-Like Cells: A Novel Hyaluronic Acid-Based Drug Delivery System. *Chem. Biol. Drug Des.* **2014**, *83* (6), 741–752. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12288>.
- (433) Cai, S.; Xie, Y.; Bagby, T. R.; Cohen, M. S.; Forrest, M. L. Intralymphatic Chemotherapy Using a Hyaluronane–Cisplatin Conjugate. *J. Surg. Res.* **2008**, *147* (2), 247–252. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.02.048>.
- (434) Xie, Y.; Aillon, K. L.; Cai, S.; Christian, J. M.; Davies, N. M.; Berkland, C. J.; Forrest, M. L. Pulmonary Delivery of Cisplatin–Hyaluronane Conjugates via Endotracheal Instillation for the Treatment of Lung Cancer. *Int. J. Pharm.* **2010**, *392* (1), 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.03.058>.
- (435) Coradini, D.; Pellizzaro, C.; Miglierini, G.; Daidone, M. G.; Perbellini, A. Hyaluronic Acid as Drug Delivery for Sodium Butyrate: Improvement of the Anti-Proliferative Activity on a Breast-Cancer Cell Line. *Int. J. Cancer* **1999**, *81* (3), 411–416. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19990505\)81:3<411::AID-IJC15>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19990505)81:3<411::AID-IJC15>3.0.CO;2-F).
- (436) Choi, K. Y.; Saravanakumar, G.; Park, J. H.; Park, K. Hyaluronic Acid-Based Nanocarriers for Intracellular Targeting: Interfacial Interactions with Proteins in Cancer. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2012**, *99*, 82–94. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.10.029>.
- (437) Rao, N. V.; Yoon, H. Y.; Han, H. S.; Ko, H.; Son, S.; Lee, M.; Lee, H.; Jo, D.-G.; Kang, Y. M.; Park, J. H. Recent Developments in Hyaluronic Acid-Based Nanomedicine for Targeted Cancer Treatment. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2016**, *13* (2), 239–252. <https://doi.org/10.1517/17425247.2016.1112374>.
- (438) Kim, J. H.; Moon, M. J.; Kim, D. Y.; Heo, S. H.; Jeong, Y. Y. Hyaluronic Acid-Based Nanomaterials for Cancer Therapy. *Polymers* **2018**, *10* (10), 1133. <https://doi.org/10.3390/polym10101133>.
- (439) Kłodzińska, S. N.; Nielsen, H. M. Chapter 9 - Hyaluronic Acid-Based Nanosystems for Drug Delivery Applications. In *Biopolymer-Based Nanomaterials in Drug Delivery and Biomedical Applications*; Bera, H., Hossain, C. M., Saha, S., Eds.; Academic Press, 2021; pp 221–250. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820874-8.00021-X>.
- (440) Šmejkalová, D.; Nešporová, K.; Hermannová, M.; Huerta-Angeles, G.; Čožíková, D.; Vištejnová, L.; Šafránková, B.; Novotný, J.; Kučerík, J.; Velebný, V. Paclitaxel Isomerisation in Polymeric Micelles Based on Hydrophobized Hyaluronic Acid. *Int. J. Pharm.* **2014**, *466* (1), 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.03.024>.
- (441) Son, G. M.; Kim, H. Y.; Ryu, J. H.; Chu, C. W.; Kang, D. H.; Park, S. B.; Jeong, Y.-I. Self-Assembled Polymeric Micelles Based on Hyaluronic Acid-g-Poly(d,l-Lactide-Co-Glycolide) Copolymer for Tumor Targeting. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15* (9), 16057–16068. <https://doi.org/10.3390/ijms150916057>.

- (442) Liu, Y.; Sun, J.; Lian, H.; Cao, W.; Wang, Y.; He, Z. Folate and CD44 Receptors Dual-Targeting Hydrophobized Hyaluronic Acid Paclitaxel-Loaded Polymeric Micelles for Overcoming Multidrug Resistance and Improving Tumor Distribution. *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103* (5), 1538–1547. <https://doi.org/10.1002/jps.23934>.
- (443) Zhang, X.; Ren, X.; Tang, J.; Wang, J.; Zhang, X.; He, P.; Yao, C.; Bian, W.; Sun, L. Hyaluronic Acid Reduction-Sensitive Polymeric Micelles Achieving Co-Delivery of Tumor-Targeting Paclitaxel/Apatinib Effectively Reverse Cancer Multidrug Resistance. *Drug Deliv.* **2020**, *27* (1), 825–835. <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1770373>.
- (444) Yang, Y.; Li, Y.; Chen, K.; Zhang, L.; Qiao, S.; Tan, G.; Chen, F.; Pan, W. Dual Receptor-Targeted and Redox-Sensitive Polymeric Micelles Self-Assembled from a Folic Acid-Hyaluronic Acid-SS-Vitamin E Succinate Polymer for Precise Cancer Therapy. *Int. J. Nanomedicine* **2020**, *15*, 2885–2902. <https://doi.org/10.2147/IJN.S249205>.
- (445) Eliaz, R. E.; Szoka, F. C. Liposome-Encapsulated Doxorubicin Targeted to CD44: A Strategy to Kill CD44-Overexpressing Tumor Cells. *Cancer Res.* **2001**, *61* (6), 2592–2601.
- (446) Qhattal, H. S. S.; Liu, X. Characterization of CD44-Mediated Cancer Cell Uptake and Intracellular Distribution of Hyaluronane-Grafted Liposomes. *Mol. Pharm.* **2011**, *8* (4), 1233–1246. <https://doi.org/10.1021/mp2000428>.
- (447) Dufaÿ Wojcicki, A.; Hillaireau, H.; Nascimento, T. L.; Arpicco, S.; Taverna, M.; Ribes, S.; Bourge, M.; Nicolas, V.; Bochot, A.; Vauthier, C.; Tsapis, N.; Fattal, E. Hyaluronic Acid-Bearing Lipoplexes: Physico-Chemical Characterization and in Vitro Targeting of the CD44 Receptor. *J. Controlled Release* **2012**, *162* (3), 545–552. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.07.015>.
- (448) Arpicco, S.; Lerda, C.; Dalla Pozza, E.; Costanzo, C.; Tsapis, N.; Stella, B.; Donadelli, M.; Dando, I.; Fattal, E.; Cattel, L.; Palmieri, M. Hyaluronic Acid-Coated Liposomes for Active Targeting of Gemcitabine. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *85* (3, Part A), 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.06.003>.
- (449) Paliwal, S. R.; Paliwal, R.; Agrawal, G. P.; Vyas, S. P. Hyaluronic Acid Modified PH-Sensitive Liposomes for Targeted Intracellular Delivery of Doxorubicin. *J. Liposome Res.* **2016**, *26* (4), 276–287. <https://doi.org/10.3109/08982104.2015.1117489>.
- (450) Han, N.-K.; Shin, D. H.; Kim, J. S.; Weon, K. Y.; Jang, C.-Y.; Kim, J.-S. Hyaluronane-Conjugated Liposomes Encapsulating Gemcitabine for Breast Cancer Stem Cells. *Int. J. Nanomedicine* **2016**, *11*, 1413–1425. <https://doi.org/10.2147/IJN.S95850>.
- (451) Tian, Y.; Zhang, H.; Qin, Y.; Li, D.; Liu, Y.; Wang, H.; Gan, L. Overcoming Drug-Resistant Lung Cancer by Paclitaxel-Loaded Hyaluronic Acid-Coated Liposomes Targeted to Mitochondria. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2018**, *44* (12), 2071–2082. <https://doi.org/10.1080/03639045.2018.1512613>.
- (452) Tang, M.; Svirskis, D.; Leung, E.; Kanamala, M.; Wang, H.; Wu, Z. Can Intracellular Drug Delivery Using Hyaluronic Acid Functionalised PH-Sensitive Liposomes Overcome Gemcitabine Resistance in Pancreatic Cancer? *J. Controlled Release* **2019**, *305*, 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.05.018>.
- (453) Sun, Y.; Li, X.; Zhang, L.; Liu, X.; Jiang, B.; Long, Z.; Jiang, Y. Cell Permeable NBD Peptide-Modified Liposomes by Hyaluronic Acid Coating for the Synergistic Targeted Therapy of Metastatic Inflammatory Breast Cancer. *Mol. Pharm.* **2019**, *16* (3), 1140–1155. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b01123>.
- (454) Marengo, A.; Forciniti, S.; Dando, I.; Dalla Pozza, E.; Stella, B.; Tsapis, N.; Yagoubi, N.; Fanelli, G.; Fattal, E.; Heeschen, C.; Palmieri, M.; Arpicco, S. Pancreatic Cancer Stem Cell Proliferation Is Strongly Inhibited by Diethylthiocarbamate-Copper Complex Loaded into Hyaluronic Acid Decorated Liposomes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2019**, *1863* (1), 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.09.018>.
- (455) Upadhyay, K. K.; Meins, J.-F. L.; Misra, A.; Voisin, P.; Bouchaud, V.; Ibarboure, E.; Schatz, C.; Lecommandoux, S. Biomimetic Doxorubicin Loaded Polymersomes from Hyaluronane-Block-Poly(γ -Benzyl Glutamate) Copolymers. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (10), 2802–2808. <https://doi.org/10.1021/bm9006419>.
- (456) Upadhyay, K. K.; Bhatt, A. N.; Mishra, A. K.; Dwarakanath, B. S.; Jain, S.; Schatz, C.; Le Meins, J.-F.; Farooque, A.; Chandraiah, G.; Jain, A. K.; Misra, A.; Lecommandoux, S. The Intracellular Drug Delivery and Anti Tumor Activity of Doxorubicin Loaded Poly(γ -Benzyl L-Glutamate)-b-Hyaluronane Polymersomes. *Biomaterials* **2010**, *31* (10), 2882–2892. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.12.043>.
- (457) Upadhyay, K. K.; Bhatt, A. N.; Castro, E.; Mishra, A. K.; Chuttani, K.; Dwarakanath, B. S.; Schatz, C.; Le Meins, J.-F.; Misra, A.; Lecommandoux, S. In Vitro and In Vivo Evaluation of Docetaxel Loaded Biodegradable Polymersomes. *Macromol. Biosci.* **2010**. <https://doi.org/10.1002/mabi.200900415>.
- (458) Shahriari, M.; Taghdisi, S. M.; Abnous, K.; Ramezani, M.; Alibolandi, M. Synthesis of Hyaluronic Acid-Based Polymersomes for Doxorubicin Delivery to Metastatic Breast Cancer. *Int. J. Pharm.* **2019**, *572*, 118835. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118835>.
- (459) Park, W.; Kim, K. sub; Bae, B.; Kim, Y.-H.; Na, K. Cancer Cell Specific Targeting of Nanogels from Acetylated Hyaluronic Acid with Low Molecular Weight. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *40* (4), 367–375. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.04.008>.

- (460) Chen, J.; Zou, Y.; Deng, C.; Meng, F.; Zhang, J.; Zhong, Z. Multifunctional Click Hyaluronic Acid Nanogels for Targeted Protein Delivery and Effective Cancer Treatment *In Vivo*. *Chem. Mater.* **2016**, *28* (23), 8792–8799. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.6b04404>.
- (461) Sagbas Suner, S.; Ari, B.; Onder, F. C.; Ozpolat, B.; Ay, M.; Sahiner, N. Hyaluronic Acid and Hyaluronic Acid: Sucrose Nanogels for Hydrophobic Cancer Drug Delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *126*, 1150–1157. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.021>.
- (462) Ma, W.; Chen, Q.; Xu, W.; Yu, M.; Yang, Y.; Zou, B.; Zhang, Y. S.; Ding, J.; Yu, Z. Self-Targeting Visualizable Hyaluronate Nanogel for Synchronized Intracellular Release of Doxorubicin and Cisplatin in Combating Multidrug-Resistant Breast Cancer. *Nano Res.* **2021**, *14* (3), 846–857. <https://doi.org/10.1007/s12274-020-3124-y>.
- (463) Kumar, C. S.; Raja, M. D.; Sundar, D. S.; Gover Antoniraj, M.; Ruckmani, K. Hyaluronic Acid Co-Functionalized Gold Nanoparticle Complex for the Targeted Delivery of Metformin in the Treatment of Liver Cancer (HepG2 Cells). *Carbohydr. Polym.* **2015**, *128*, 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.010>.
- (464) Xu, W.; Qian, J.; Hou, G.; Wang, Y.; Wang, J.; Sun, T.; Ji, L.; Suo, A.; Yao, Y. A Dual-Targeted Hyaluronic Acid-Gold Nanorod Platform with Triple-Stimuli Responsiveness for Photodynamic/Photothermal Therapy of Breast Cancer. *Acta Biomater.* **2019**, *83*, 400–413. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.026>.
- (465) Sanfilippo, V.; Caruso, V. C. L.; Cucci, L. M.; Inturri, R.; Vaccaro, S.; Satriano, C. Hyaluronane-Metal Gold Nanoparticle Hybrids for Targeted Tumor Cell Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (9), 3085. <https://doi.org/10.3390/ijms21093085>.
- (466) Hosseinzadeh, H.; Atyabi, F.; Varnamkhasti, B. S.; Hosseinzadeh, R.; Ostad, S. N.; Ghahremani, M. H.; Dinarvand, R. SN38 Conjugated Hyaluronic Acid Gold Nanoparticles as a Novel System against Metastatic Colon Cancer Cells. *Int. J. Pharm.* **2017**, *526* (1), 339–352. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.060>.
- (467) Thomas, R. G.; Moon, M. J.; Lee, H.; Sasikala, A. R. K.; Kim, C. S.; Park, I.-K.; Jeong, Y. Y. Hyaluronic Acid Conjugated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle for Cancer Diagnosis and Hyperthermia Therapy. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *131*, 439–446. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.010>.
- (468) Vyas, D.; Lopez-Hisijos, N.; Gandhi, S.; El-Dakdouki, M.; Basson, M. D.; Walsh, M. F.; Huang, X.; Vyas, A. K.; Chaturvedi, L. S. Doxorubicin-Hyaluronane Conjugated Super-Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles (DOX-HA-SPION) Enhanced Cytoplasmic Uptake of Doxorubicin and Modulated Apoptosis, IL-6 Release and NF-KappaB Activity in Human MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2015**, *15* (9), 6413–6422. <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.10834>.
- (469) Yang, R.-M.; Fu, C.-P.; Fang, J.-Z.; Xu, X.-D.; Wei, X.-H.; Tang, W.-J.; Jiang, X.-Q.; Zhang, L.-M. Hyaluronane-Modified Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Bimodal Breast Cancer Imaging and Photothermal Therapy. *Int. J. Nanomedicine* **2016**, *12*, 197–206. <https://doi.org/10.2147/IJN.S121249>.
- (470) Luo, Y.; Li, Y.; Li, J.; Fu, C.; Yu, X.; Wu, L. Hyaluronic Acid-Mediated Multifunctional Iron Oxide-Based MRI Nanoprobes for Dynamic Monitoring of Pancreatic Cancer. *RSC Adv.* **2019**, *9* (19), 10486–10493. <https://doi.org/10.1039/C9RA00730J>.
- (471) Soleymani, M.; Velashjerdi, M.; Shaterabadi, Z.; Barati, A. One-Pot Preparation of Hyaluronic Acid-coated Iron Oxide Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia Therapy and Targeting CD44-Overexpressing Cancer Cells. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *237*, 116130. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116130>.
- (472) Yao, H.; Zhang, Y.; Sun, L.; Liu, Y. The Effect of Hyaluronic Acid Functionalized Carbon Nanotubes Loaded with Salinomycin on Gastric Cancer Stem Cells. *Biomaterials* **2014**, *35* (33), 9208–9223. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.07.033>.
- (473) Cao, X.; Tao, L.; Wen, S.; Hou, W.; Shi, X. Hyaluronic Acid-Modified Multiwalled Carbon Nanotubes for Targeted Delivery of Doxorubicin into Cancer Cells. *Carbohydr. Res.* **2015**, *405*, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.06.030>.
- (474) Liu, D.; Zhang, Q.; Wang, J.; Fan, L.; Zhu, W.; Cai, D. Hyaluronic Acid-Coated Single-Walled Carbon Nanotubes Loaded with Doxorubicin for the Treatment of Breast Cancer. *Pharm. - Int. J. Pharm. Sci.* **2019**, *74* (2), 83–90. <https://doi.org/10.1691/ph.2019.8152>.
- (475) Prajapati, S. K.; Jain, A.; Shrivastava, C.; Jain, A. K. Hyaluronic Acid Conjugated Multi-Walled Carbon Nanotubes for Colon Cancer Targeting. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *123*, 691–703. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.116>.
- (476) Lebleu, C.; Rodrigues, L.; Guigner, J.-M.; Brûlet, A.; Garanger, E.; Lecommandoux, S. Self-Assembly of PEG-b-PTMC Copolymers: Micelles and Polymersomes Size Control. *Langmuir* **2019**, *35* (41), 13364–13374. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b02264>.
- (477) Fang, H.; Zhao, X.; Gu, X.; Sun, H.; Cheng, R.; Zhong, Z.; Deng, C. CD44-Targeted Multifunctional Nanomedicines Based on a Single-Component Hyaluronic Acid Conjugate with All-Natural Precursors: Construction and Treatment of Metastatic Breast Tumors *In Vivo*. *Biomacromolecules* **2019**, *acs.biomac.9b01012*. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01012>.

- (478) Ding, L.; Jiang, Y.; Zhang, J.; Klok, H.-A.; Zhong, Z. PH-Sensitive Coiled-Coil Peptide-Cross-Linked Hyaluronic Acid Nanogels: Synthesis and Targeted Intracellular Protein Delivery to CD44 Positive Cancer Cells. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (2), 555–562. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01664>.
- (479) Tang, J. D.; Caliarì, S. R.; Lampe, K. J. Temperature-Dependent Complex Coacervation of Engineered Elastin-like Polypeptide and Hyaluronic Acid Polyelectrolytes. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (10), 3925–3935. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00837>.
- (480) Shu, J.; Li, X.; Dang, J.; Liu, Y.; Duan, S.; Zhu, R.; Yin, L.; Chen, Y. Drug Resistance Reversal by Intervening Cancer Bioenergetics with Spherical Helical Polypeptide-Potentiated Gene Silencing. *Chem. Eng. J.* **2021**, *414*, 128545. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.128545>.
- (481) Kim, H.; Seong, K.-Y.; Lee, J. H.; Park, W.; Yang, S. Y.; Hahn, S. K. Biodegradable Microneedle Patch Delivering Antigenic Peptide–Hyaluronate Conjugate for Cancer Immunotherapy. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2019**, *5* (10), 5150–5158. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00961>.
- (482) Lee, Y.-H.; Yoon, H. Y.; Shin, J. M.; Saravanakumar, G.; Noh, K. H.; Song, K.-H.; Jeon, J.-H.; Kim, D.-W.; Lee, K.-M.; Kim, K.; Kwon, I. C.; Park, J. H.; Kim, T. W. A Polymeric Conjugate Foreignizing Tumor Cells for Targeted Immunotherapy in Vivo. *J. Controlled Release* **2015**, *199*, 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.007>.
- (483) Shin, J. M.; Oh, S. J.; Kwon, S.; Deepagan, V. G.; Lee, M.; Song, S. H.; Lee, H.-J.; Kim, S.; Song, K.-H.; Kim, T. W.; Park, J. H. A PEGylated Hyaluronic Acid Conjugate for Targeted Cancer Immunotherapy. *J. Controlled Release* **2017**, *267*, 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.08.032>.
- (484) Jeannot, V.; Gauche, C.; Mazzaferro, S.; Couvet, M.; Vanwonderghem, L.; Henry, M.; Didier, C.; Vollaïre, J.; Jossierand, V.; Coll, J.-L.; Schatz, C.; Lecommandoux, S.; Hurbin, A. Anti-Tumor Efficacy of Hyaluronane-Based Nanoparticles for the Co-Delivery of Drugs in Lung Cancer. *J. Controlled Release* **2018**, *275*, 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.02.024>.
- (485) Zhu, D.; Wang, H.; Trinh, P.; Heilshorn, S. C.; Yang, F. Elastin-like Protein-Hyaluronic Acid (ELP-HA) Hydrogels with Decoupled Mechanical and Biochemical Cues for Cartilage Regeneration. *Biomaterials* **2017**, *127*, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.02.010>.
- (486) Shirzaei Sani, E.; Portillo-Lara, R.; Spencer, A.; Yu, W.; Geilich, B. M.; Noshadi, I.; Webster, T. J.; Annabi, N. Engineering Adhesive and Antimicrobial Hyaluronic Acid/Elastin-like Polypeptide Hybrid Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2018**, *4* (7), 2528–2540. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00408>.
- (487) Moss, I. L.; Gordon, L.; Woodhouse, K. A.; Whyne, C. M.; Yee, A. J. M. A Novel Thiol-Modified Hyaluronane and Elastin-Like Polypeptide Composite Material for Tissue Engineering of the Nucleus Pulposus of the Intervertebral Disc. *Spine* **2011**, *36* (13), 1022–1029. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3181e7b705>.
- (488) Leckie, A. E.; Akens, M. K.; Woodhouse, K. A.; Yee, A. J. M.; Whyne, C. M. Evaluation of Thiol-Modified Hyaluronane and Elastin-Like Polypeptide Composite Augmentation in Early-Stage Disc Degeneration: Comparing 2 Minimally Invasive Techniques. *Spine* **2012**, *37* (20), E1296. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e318266ecea>.

CHAPITRE II :
ÉLABORATION D'UNE LIBRAIRIE DE
BIOCONJUGUÉS HA-*b*-ELP :
SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION

TABLE DES MATIÈRES

Chapitre II : Élaboration d'une librairie de bioconjugués HA-<i>b</i>-ELP : synthèse et caractérisation	99
Introduction.....	101
II.A. Bioproduction et caractérisation des segments ELPs	103
II.A.1. Production recombinante des ELPn60, ELPn80, et ELPn100	103
II.A.2. Caractérisation chimique des ELPn60, ELPn80, et ELPn100	105
II.A.3. Caractérisation de la thermosensibilité des ELPs	108
II.B. Synthèse de bioconjugués HA-<i>b</i>-ELP par chimie click.....	111
II.B.1. Fonctionnalisation des blocs HA et ELP	111
II.B.1.1. Fonctionnalisation de l'extrémité réductrice du HA	111
II.B.1.2. Fonctionnalisation de l'extrémité N-terminale de l'ELP	113
<i>II.B.1.2.1. Fonctionnalisation par une fonction alcyne aliphatique</i>	<i>113</i>
<i>II.B.1.2.2. Fonctionnalisation par une fonction cyclooctyne (DBCO)</i>	<i>114</i>
II.B.2. Couplage par cycloaddition : comparaison de la CuAAC et de la SPAAC.....	116
II.B.2.1. Synthèse originelle : Cycloaddition Alcyne-Azoture catalysée au Cuivre (CuAAC)	116
II.B.2.2. Synthèse par chimie "click" sans cuivre : utilisation de la tension de cycle pour favoriser la réaction (SPAAC).....	120
II.B.2.3. Comparaison des deux voies de synthèse CuAAC et SPAAC.....	122
II.B.3. Élaboration d'une librairie de bioconjugués	122
Conclusion.....	124
Partie expérimentale.....	125
Annexes	132
Références	140

INTRODUCTION

Les deux revues de littérature présentées dans le chapitre précédent ont illustré les propriétés avantageuses respectives du HA et des ELPs. En particulier, la capacité de reconnaissance du récepteur CD44 par le premier et la thermosensibilité des seconds, associées à leur biocompatibilité, les rendent tout à fait pertinents pour des applications biomédicales.

La conception de nanovecteurs anticancéreux formés par l'assemblage de copolymères à blocs à base de HA est au cœur des travaux de recherche de notre équipe depuis plus de dix ans. L'association du HA avec le polypeptide synthétique PBLG a permis d'accéder à des nanoparticules capables d'encapsuler physiquement des principes actifs, et de présenter une action anticancéreuse *in vitro* comme *in vivo*.¹⁻⁵ Celles-ci ont également fait l'objet d'une étude de l'influence de la formulation du HA sur son affinité pour le CD44.⁶ Un HA court de 5 kDa a ainsi fait preuve d'une affinité très différente en fonction de sa présentation sous forme de chaîne libre ou à la surface d'une nanoparticule. En effet, si sa faible masse molaire en fait un mauvais ligand sous forme libre, l'auto-assemblage des conjugués HA-PBLG en nanoparticules permet d'induire un effet de multivalence du HA, accroissant considérablement la force de son interaction avec le CD44.

Ce concept d'assemblage HA-polypeptide ayant fait ses preuves, il a été envisagé de poursuivre son exploration. En effet, la très forte hydrophobie du PBLG contraint à une méthode d'auto-assemblage nécessitant l'utilisation de solvants organiques. Elle confère en outre aux nanoparticules une très grande stabilité, limitant les possibilités d'ajustement une fois formées, et compliquant une éventuelle libération de molécules-cargo.

Il a donc été choisi de le remplacer par un ELP, dont l'hydrophobie est dépendante de la température. Le caractère amphiphile du composé, et avec lui son auto-assemblage en nanoparticule, serait donc contrôlable par l'intermédiaire de ce stimulus. Cela permettrait une étude comparative des propriétés du conjugué en fonction de son état de chaîne libre ou de nanoobjet. En particulier, cela pourrait se révéler un facteur essentiel pour son affinité avec le récepteur CD44. Il serait alors possible de moduler celle-ci au moyen d'un stimulus externe, une variation de température permettant de contrôler la présentation monovalente ou multivalente du HA. À terme, cela pourrait ouvrir la voie à une amélioration de la sélectivité *in vivo* envers les cellules surexprimant le CD44, en conditionnant la reconnaissance et l'internalisation du système à l'application d'une hyperthermie locale.

Entre 2015 et 2019, le Dr. Ye Xiao a consacré ses travaux de thèse à la synthèse et l'étude de l'auto-assemblage d'une librairie de bioconjugués polysaccharide-*b*-ELP, parmi lesquels le HA-*b*-ELP (Figure II-1).^{7,8}

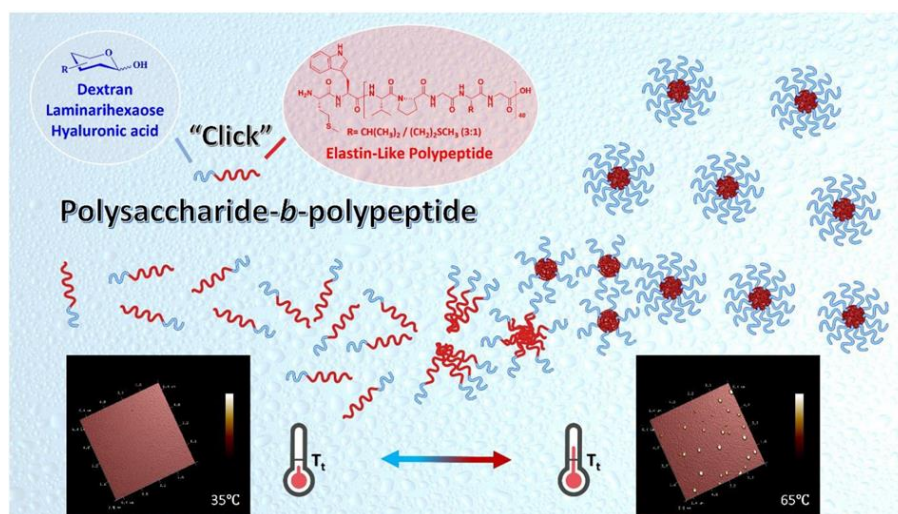


Figure II-1 : Schéma de principe de la synthèse par chimie "click" de bioconjugués polysaccharide-*b*-ELP et de leur auto-assemblage à haute température (> 35°C). Polysaccharides : Dextran, Laminarihexaose, Hyaluronane (bleu). Images AFM montrant l'apparition de nanoparticules à 65°C. Reproduit du manuscrit de thèse de Y. Xiao.⁷

Pour obtenir celui-ci, il a choisi un HA court de 5-7 kDa. D'après les résultats de l'étude précédemment menée sur l'affinité envers le CD44,⁶ un tel choix assurerait en effet une différence de comportement suffisamment importante entre les états soluble et auto-assemblé du bioconjugué. La séquence de l'ELP sélectionné présentait, quant à elle, 40 répétitions du pentapeptide (VPGXG), avec X = M/V (1:3). Elle est notée ELP[M₁V₃-40], ou ELPn40 dans ce manuscrit (cf. **p7**). Le choix du résidu méthionine a donné la possibilité de modifications chimiques le long de la chaîne.⁹ Cette séquence a conféré à l'ELP seul une T_{cp} de 32°C en solution à 125 μM dans l'eau déionisée. Dans les mêmes conditions, la température d'auto-assemblage du bioconjugué (CMT) s'élevait quant à elle à 48°C, du fait de l'association de l'ELP avec le HA très hydrophile. Cette CMT s'est donc révélée un peu trop élevée pour une application biologique, l'hyperthermie pratiquée *in vivo* étant généralement de 42°C.

La synthèse de ce bioconjugué a été réalisée par cycloaddition alcyne-azoture catalysée au cuivre (CuAAC). Cette réaction de chimie "click" présente en effet de nombreux avantages : elle est hautement sélective, bio-orthogonale, efficace en conditions douces, et a fait ses preuves dans la synthèse de nanovecteurs à base de molécules sensibles comme des peptides ou des saccharides.¹⁰⁻¹² Les extrémités anomères du HA et N-terminale de l'ELP ont ainsi été respectivement fonctionnalisées avec un groupement azoture (HA-N₃), et avec un groupement alcyne aliphatique (ELP-≡). Cette voie de synthèse présente cependant quelques inconvénients : elle nécessite l'usage de solvant organique et d'un catalyseur au cuivre potentiellement nocifs pour l'organisme, l'application d'une température de réaction relativement élevée (50°C), et peut durer jusqu'à 5 jours.

Nous proposons dans ce projet de thèse un approfondissement de l'étude du bioconjugué HA-b-ELP débutée par le Dr. Ye Xiao. Pour cela, un travail préliminaire d'optimisation a été nécessaire. Ce chapitre présente ainsi un ensemble de modifications du bioconjugué et de sa synthèse, réalisées afin de les rendre plus compatibles avec des applications biologiques.

Tout d'abord, si la séquence primaire des ELPs a été conservée, leur taille a été augmentée. La sélection d'ELPs comprenant 60, 80, et 100 répétitions du pentapeptide (M_w = 25,4 – 33,7 – 42 kDa) a permis une diminution de la T_{cp}, entraînant celle de la CMT des bioconjugués, et rapprochant celle-ci de la température physiologique. Cet allongement de la chaîne devait par ailleurs conduire à une plus grande stabilité des objets auto-assemblés vis-à-vis de la dilution. Différentes masses molaires de HA ont également été explorées (M_w = 4,6 – 24 – 42 kDa), afin d'étudier l'influence combinée de la taille du HA et de sa présentation multivalente sur l'affinité des bioconjugués pour le récepteur CD44, sous forme libres ou auto-assemblés.

Une librairie de bioconjugués HA-b-ELP (notés HA-ELP par la suite, cf. **p7**) a ainsi été conçue, la variation de la taille relative de chaque bloc rendant possible des études structure-propriété de leur thermosensibilité et réponse biologique.

Enfin, une modification de la voie de synthèse a également été mise en place. La volonté de maintenir les avantages inhérents à la réaction de cycloaddition, tout en limitant l'usage de solvants organiques et de catalyseur, nous a menés vers la cycloaddition azoture-alcyne favorisée par tension de cycle (SPAAC). Cette technique consiste à remplacer l'alcyne terminal par un alcyne cyclique. La contrainte structurelle induite par la courbure rend celui-ci très réactif, et dispense la réaction de l'ajout de catalyseur.¹³⁻¹⁵

Ce chapitre décrit ainsi la production et la caractérisation de trois nouveaux ELPs : ELPn60, ELPn80 et ELPn100, dans lesquels les résidus hôtes sont des résidus Valine ou Méthionine, en rapport 3:1, (ELP[M₁V₃-60,80,100]). La fonctionnalisation de l'extrémité N-terminale de ces ELPs avec une fonction alcyne aliphatique ou cyclique, et celle de hyaluronane de différentes tailles (M_w = 4,6 – 24 – 42 kDa) avec une fonction azoture est ensuite détaillée. Enfin, une comparaison de la bioconjugaison de ces deux blocs par CuAAC et SPAAC est effectuée. L'utilisation de celle-ci mène à la génération d'une librairie de 9 bioconjugués HA-ELP thermosensibles.

II.A. Bioproduction et caractérisation des segments ELPs

II.A.1. Production recombinante des ELPn60, ELPn80, ELPn100

Les ELPn60, ELPn80 et ELPn100 (**Figure II-2**) ont été conçus et produits par voie recombinante chez *E. coli* selon le principe présenté dans le **I.A.1.2** et suivant le protocole établi au LCPO (**Figure II-3 A**).^{16,17}

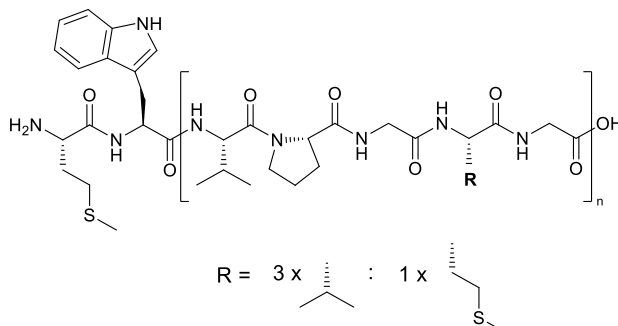


Figure II-2 : Structure chimique des ELPs produits par voie recombinantes durant ces travaux. $n = 60, 80, 100$.

Brièvement, les gènes codants pour ces séquences ont été obtenus par ligation récursive directionnelle (RDL) classique, par additions successives de séquences d'ADN codant pour 20 répétitions du pentapeptide (**étape 1**). Le laboratoire dispose donc d'une banque de plasmides d'expression (plasmides pET) et de clones bactériens permettant la production des ELPn20, n40, n60, n80, et n100. Ces gènes ont été transférés dans des plasmides possédant un gène de résistance à l'ampicilline (**étape 2**), qui ont eux-mêmes été introduits chez *E. coli* par choc thermique (**étape 3**). Toutes ces étapes ont été supervisées ou réalisées par le Prof. Bertrand Garbay au LCPO.

Une préculture a ensuite permis aux clones bactériens de se multiplier (**étape 4**), avant d'être placés en conditions de culture (**étape 5**). La production des ELPs a été déclenchée en fin de phase de croissance exponentielle par l'ajout d'IPTG dans le milieu, et poursuivie durant 22h (**étape 6**). Les ELPs n'étant pas sécrétés dans le milieu, une lyse des bactéries par sonication a été nécessaire (**étape 7**). Ils ont enfin été purifiés par ITC (**Figure II-3 B**). La précipitation ayant été favorisée par l'ajout de NaCl, une étape de dialyse a été réalisée pour l'éliminer avant lyophilisation. Les ELPs ont alors été récupérés sous la forme d'un solide blanc cotonneux et stockés à -18°C .

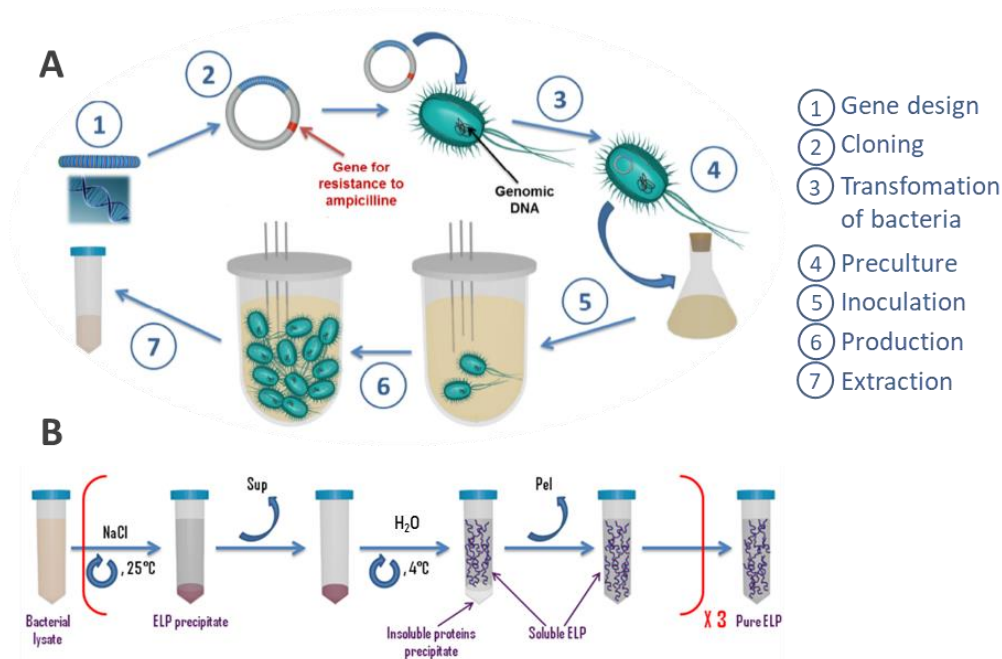


Figure II-3 : A : Principe de la production recombinante d'une protéine ; B : Purification du lysat bactérien par ITC. Adapté de la thèse de la Dr. Rosine Petitdemange.¹⁶

Le suivi de la production de chaque ELP a été effectué par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) d'aliqots prélevés à des temps-clés de la production et de la purification. Les résultats pour l'ELPn60 sont illustrés en **Figure II-4 A**. La piste 1 correspond aux protéines bactériennes présentes avant induction, et les pistes 2 et 3 au contenu protéique des prélèvements faits respectivement 5h et 22h après induction. Quant aux pistes 4 et 5, elles présentent les protéines insolubles et solubles récupérées après lyse bactérienne et centrifugation à froid. Enfin, la piste 6 montre les ELPs après purification.

Une bande à environ 25 kDa, absente de la piste 1, apparaît nettement sur la piste 2 et s'intensifie sur la piste 3. Cela traduit l'augmentation de la quantité d'ELP produit par les bactéries au cours du temps. Avant purification, cet ELP est présent uniquement dans la fraction soluble à froid, accompagné d'autres protéines bactériennes (piste 5), mais pas dans la fraction insoluble (piste 4). C'est donc cette fraction soluble qui est ensuite engagée dans les cycles de purification par ITC afin d'extraire sélectivement l'ELP. Après trois cycles d'ITC (piste 6), seule demeure la bande caractéristique de l'ELP : il a donc bien été efficacement isolé du lysat bactérien.

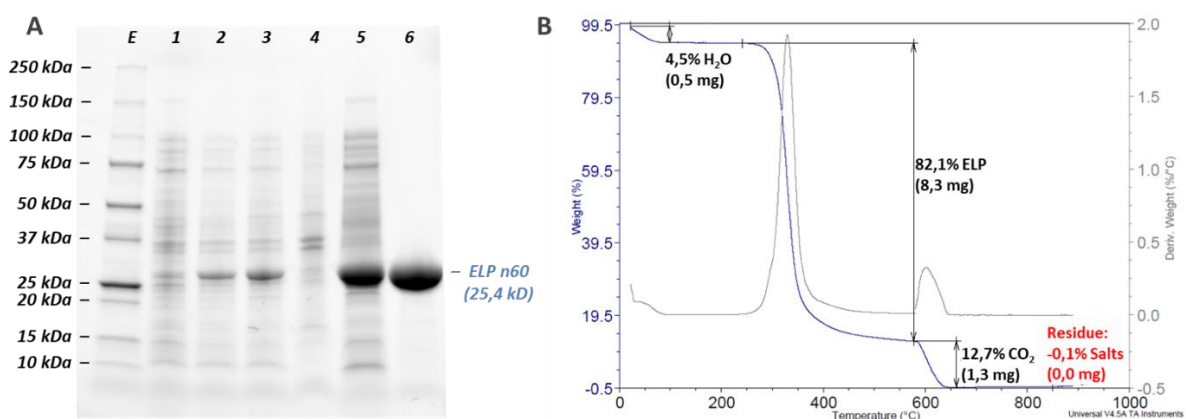


Figure II-4 : Caractérisation de la production et de la purification d'un ELPn60. A : Analyse sur gel d'électrophorèse (SDS-PAGE). E : échelle de taille, 1,2,3 : milieu de culture à l'induction, puis 5h (2), et 22h après (3). 4, 5 : fraction insoluble (4) et soluble (5) à froid avant purification, 6 : produit après purification. B : Thermogramme de TGA : évolution de la perte de masse en fonction de la température.

Une analyse thermogravimétrique (TGA) a ensuite permis de vérifier l'absence de sels dans le produit final obtenu après dialyse et lyophilisation. La **Figure II-4 B** présente le thermogramme d'un ELPn60. Il comporte trois pertes de masse principales. Une première autour de 100°C correspond à la vaporisation de l'eau liée à l'ELP. Une seconde de 300°C à 400°C correspond à la pyrolyse de l'ELP. La matière organique est ensuite dégradée par combustion à 600°C lors du changement de gaz azote-air. Les éventuels résidus demeurant au-dessus de cette température sont les sels inorganiques. Leur absence traduit l'efficacité de l'étape de dialyse.

Ce protocole a été appliqué à la production des ELPn60, n80 et n100 (**Annexe II-1**). Chacune d'entre elles a été effectuée sur environ 2 semaines, à l'échelle de 1-4 L, pour un rendement dépendant de la séquence (**Tableau II-1**). Les ELPn20 et n40, précédemment décrits dans d'autres travaux de l'équipe, n'ont été que peu utilisés dans ce projet.^{8,16} Les détails de leur production ne sont donc pas indiqués.

Tableau II-1 : Récapitulatif des rendements de production des ELPn60, ELPn80, et ELPn100.

ELP	M _w th (g/mol)	Rendement moyen (mg/L)	Nombre de productions
n60	25 385	110,4 (± 25,2)	10
n80	33 700	116,5 (± 4,1)	4
n100	42 000	72,9 (± 44,3)	8

La RDL est un procédé assez long et fastidieux pour l'obtention des séquences d'ELP les plus longues. L'utilisation de la technique par reconstruction de plasmide permettrait de les former plus aisément, en doublant la taille de l'ELP à chaque étape. La synthèse d'un gène codant pour un ELPn200 serait alors envisageable. Cependant, le **Tableau II-1** montre clairement que le rendement de production est plus faible à forte masse molaire de l'ELP. En effet, les séquences protéiques très répétitives sont difficiles à produire par les bactéries, en particulier celles qui contiennent des acides aminés naturellement peu abondants comme la méthionine. L'optimisation des protocoles (*e.g.* sélection de clones plus productifs, enrichissement du milieu) devrait néanmoins permettre d'améliorer leur rendement de production. Au vu des résultats physico-chimiques obtenus par la suite (**II.A.3**, **Figure II-9**), le gain apporté par un ELPn200 ne semble toutefois pas suffisant pour justifier un tel investissement.

D'abord effectuées en personne, les productions d'ELPs ont ensuite été assurées par 3 stagiaires (Mmes Clara Toulouse, Chloé Ilos, et Pauline Coutand), l'encadrement et la formation des deux premières m'ayant été confiés. Le **Tableau II-1** rassemble également les rendements de production d'autres membres de l'équipe. L'ELPn80 intervenant dans plusieurs projets, sa production à plus grande échelle a par la suite été confiée à la société Technicals Proteins Nanobiotechnology. Le passage à l'échelle industrielle, avec notamment l'utilisation de fermenteurs, permet d'obtenir des rendements plus importants (≈ 350 mg/L). L'utilisation des ELPs pour des applications à visées commerciales est donc envisageable.

II.A.2. Caractérisation chimique des ELPn60, ELPn80, et ELPn100

Les ELPs ainsi produits ont ensuite été caractérisés par chromatographie d'exclusion stérique (SEC), spectrométrie de masse (MALDI), et spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).

L'analyse par SEC a été effectuée à 25°C pour des solutions d'ELPs dans un tampon acétate et acétonitrile, ce dernier prévenant l'agrégation des ELPs dans les colonnes lors de l'analyse. Les chromatogrammes sont présentés en **Figure II-5 A** : les trois ELPn60, n80 et n100 apparaissent sous la forme d'un pic monomodal à respectivement 25.6 min, 24.8 min, et 24.2 min d'élution. La diminution du temps d'élution est en accord avec l'augmentation du rayon hydrodynamique et donc de la masse molaire de l'espèce (**Tableau II-2**). Les masses molaires calculées sont légèrement plus élevées que les valeurs théoriques mais demeurent dans un ordre de grandeur raisonnable. Par ailleurs, la présence d'un unique pic traduit la pureté des ELPs produits.

Ces résultats ont ensuite été confirmés par spectrométrie de masse de type MALDI. Les spectres des ELPn60, n80, et n100 sont présentés en **Figure II-5 B, C et D**. Trois pics principaux ressortent : le pic moléculaire $[M+X]^+$, encadré par le pic de l'espèce doublement chargée $[M + 2X]^{2+}$ aux faibles m/z et celui du dimère non covalent simplement chargé $[2M + X]^+$ aux grands m/z . Le pic moléculaire n'est pas symétrique mais possède un léger épaulement vers les m/z plus élevés, traduisant la présence d'une espèce minoritaire. Ceci pourrait être dû à une modification post-traductionnelle lors de la production ou chimique lors de la purification (*e.g.* oxydation des méthionines, formation de dimères). Une calibration du spectromètre n'ayant pas été effectuée, les masses molaires obtenues ne sont pas les masses exactes des ELPs. Elles sont néanmoins très proches de la théorie (**Tableau II-2**).

Les ELPs produits sont donc purs et de masses molaires conformes à celles attendues.

Tableau II-2 : Comparaison des masses molaires théoriques et expérimentales des ELPn60, ELPn80, et ELPn100

ELP	M_w th (g/mol)	M_n SEC (g/mol)	M_w SEC (g/mol)	M_w MALDI (g/mol)
n60	25 385	27 670	28 760	25 417
n80	33 700	35 830	37 570	33 788
n100	42 000	44 550	46 130	42 122

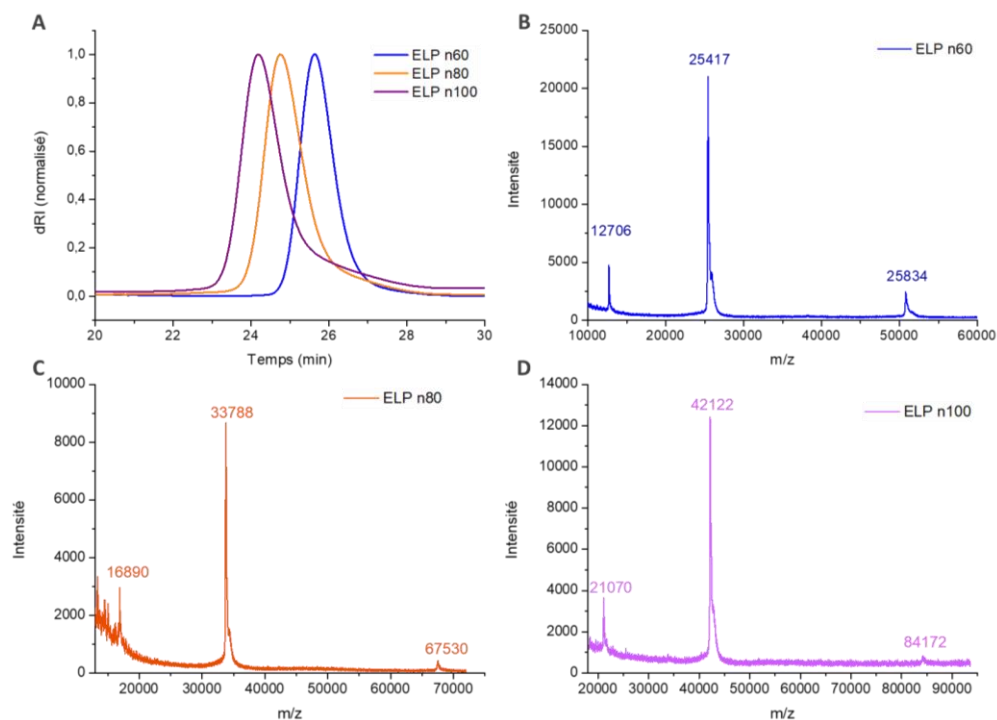


Figure II-5 : Caractérisation de la pureté et de la masse molaire des ELPs produits par SEC (A) et MALDI (B, C, D). A : Chromatogrammes de SEC, évolution du dRI normalisé en fonction du temps d'éluion. Tampon acétate. B, C, D : Spectres de masse de type MALDI des ELPn60 (B), n80 (C) et n100 (D). De gauche à droite : $[M+2X]^+$, $[M+X]^+$ (pic moléculaire), $[M+M+X]^+$, avec $X = H, Na$ ou K .

Enfin, des analyses RMN ont été effectuées dans le but de confirmer la structure chimique des ELPs. Cette fois encore, l'agrégation des ELPs au-dessus de leur T_{cp} pourrait limiter la précision de l'analyse. Elles ont donc toutes été réalisées à 4°C dans le D_2O . Les ELPn20 et n40 ayant déjà été caractérisés par RMN 1D et 2D au cours de la thèse de Rosine Petitdemange¹⁶, l'attribution des pics de résonance pour les ELPn60, n80 et n100 a donc été effectuée en se basant sur ses travaux.

L'analyse de l'ELPn60 est représentée en **Figure II-6**, et celles des ELPn80 et n100 en **Annexe II-1** et **Annexe II-3**. Les ELPs possédant la même séquence répétitive $[(VPGVG)(VPGMG)(VPGVG)]_n$, leurs signature en RMN sont similaires : sur le spectre 1H , seules les valeurs d'intégration changent avec l'augmentation du nombre de répétitions du pentapeptide. Les signaux principaux du squelette peptidique et des chaînes pendantes ont été attribués en **Figure II-6 A**. Celui du proton $^1H_\alpha$ du résidu hôte Valine $[(VPGVG)(VPGMG)(VPGVG)]_n$, noté **c2**) sert de référence pour l'intégration. C'est en effet l'un des pics les mieux définis et qui n'est pas influencé par d'éventuelles modifications des méthionines ou des bouts de chaînes. L'intégration des pics **k** et **n** du résidu méthionine, correspondant respectivement au proton $^1H_\alpha$ et à ceux du groupement méthylène (CH_2) le plus proche du soufre, permet de vérifier la présence du bon nombre de ces résidus, et de confirmer la séquence primaire.

Par ailleurs, ces méthionines peuvent subir une oxydation non désirée durant la production ou la purification, le thioéther devenant un sulfoxyde. La marque caractéristique de cet état oxydé est un déblindage des signaux **n** et **o**, correspondant aux protons les plus proches du soufre. Les spectres des ELPs dont toutes les méthionines sont oxydées en sulfoxydes et en sulfones sont donnés en **Annexe II-4**. Sur la **Figure II-6**, aucun signal d'oxydation n'apparaît, les méthionines sont donc sous forme thioéther.

Cette attribution des protons a été confirmée par de la RMN 2D (**Figure II-6 B** et **C**) : le spectre COSY permet de visualiser les interactions entre protons proches, et ainsi de faire apparaître les corrélations entre les protons du squelette peptidique (H_α) et ceux des chaînes pendantes les plus proches (H_β) ou plus éloignés (H_γ). Les protons aromatiques, quant à eux, ne sont corrélés qu'avec eux-mêmes. Enfin, le spectre HSQC met en lumière les interactions proton-carbone, et permet de préciser les attributions des massifs. Le tableau des intégrations théoriques et expérimentales est donné en **Annexe II-5**.

L'intégration est globalement en concordance avec la théorie, exceptée pour les deux massifs les plus blindés qui représentent un nombre de protons trop important. Ceci est actuellement en cours d'étude au sein de l'équipe.

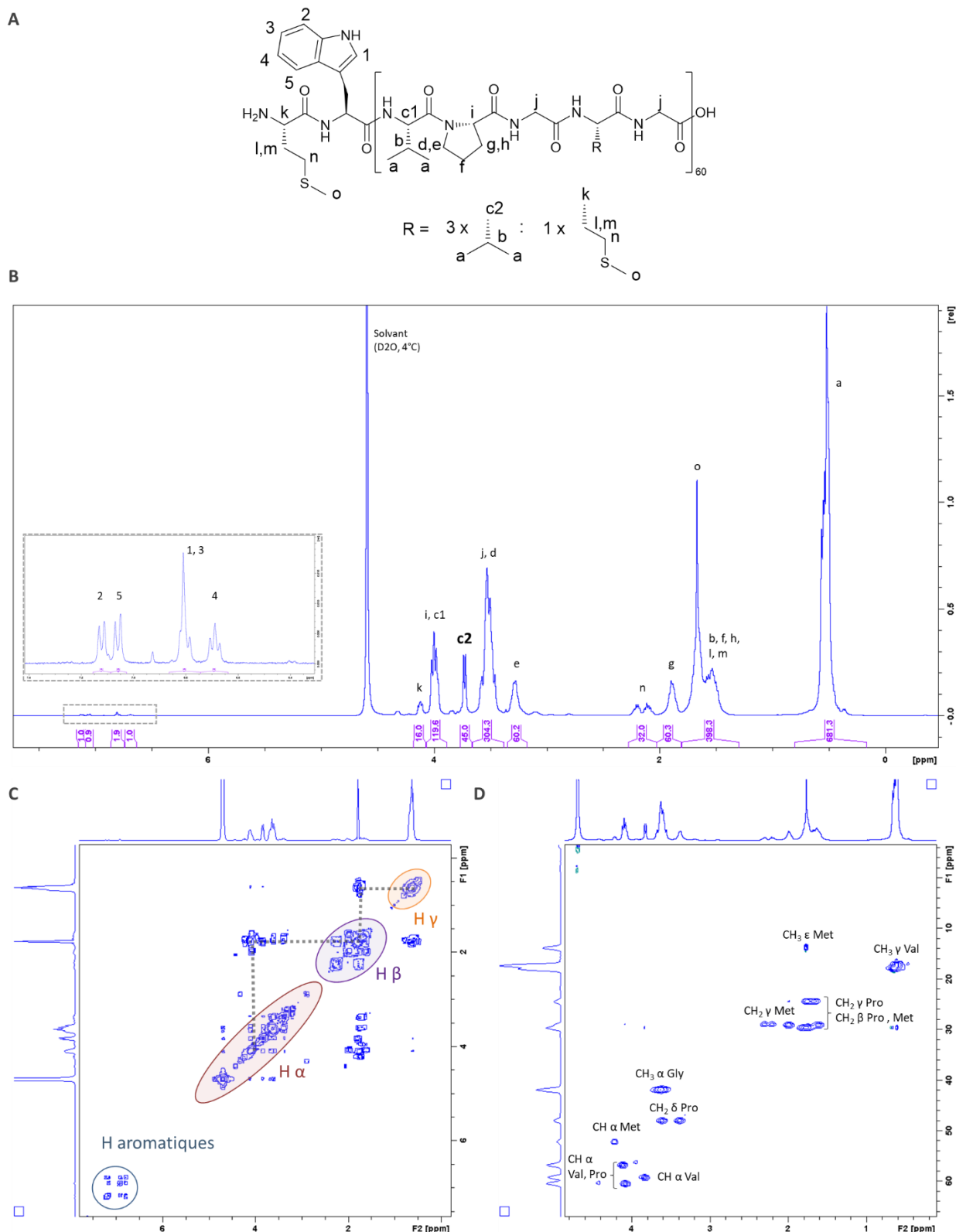


Figure II-6 : Caractérisation RMN de l'ELPn60 (400 MHz). A : Structure chimique et attribution des protons. B : Spectre RMN ^1H . Pic de référence pour l'intégration : c2 (CH Valine VPGVG, 45 H). Encart : protons aromatiques du tryptophane. B : Spectre COSY. Mise en évidence des protons en α , β , et γ de la chaîne peptidique, des protons aromatiques, et des couplages entre eux. C : Spectre HSQC.

Ces caractérisations confirment donc l'obtention des ELPn60, n80, et n100 avec une structure et une masse molaire conformes à celles attendues, ainsi que l'absence d'oxydation et de contaminant.

II.A.3. Caractérisation de la thermosensibilité des ELPs

La principale caractéristique des ELPs est leur thermosensibilité de type LCST : en-dessous de leur température de point de trouble (T_{cp}), ils sont solubles en solution aqueuse, tandis qu'ils s'agrègent réversiblement au-dessus (**Figure II-7**).

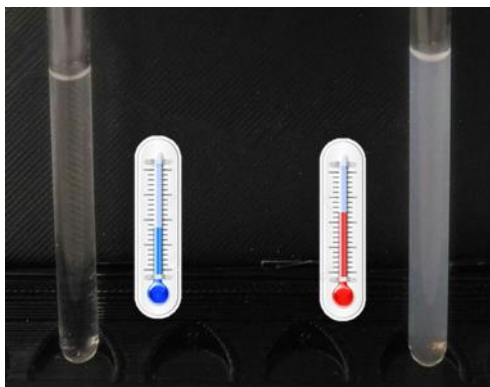


Figure II-7 : Illustration de la thermosensibilité d'une solution aqueuse d'ELPn80. Gauche : $T < T_{cp}$; Droite : $T > T_{cp}$.

Les différents paramètres influençant la thermosensibilité des ELPs ont été décrits dans le **chapitre I**. La séquence peptidique étant similaire pour tous les ELPs étudiés dans ce projet, la T_{cp} a été modulée suivant l'augmentation de leur masse molaire, la concentration des solutions et la présence de sels. L'effet de l'oxydation des méthionines sur la T_{cp} a également été étudié.

Cette étude a été réalisée par spectroscopie UV-Visible (turbidimétrie) ou diffusion dynamique de la lumière (DLS). Les résultats pour l'ELPn60 sont représentés en **Figure II-8**. Ceux des ELPn80 et n100 sont illustrés en **Annexe II-6**.

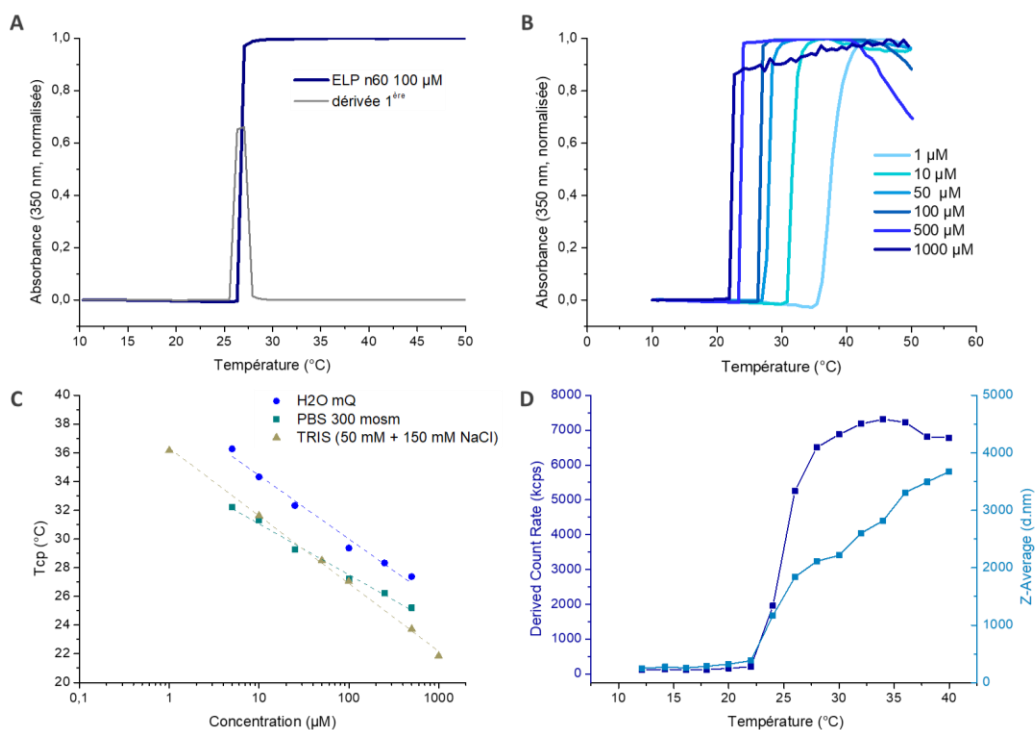


Figure II-8 : Étude de la thermosensibilité de solutions aqueuses d'un ELPn60 par spectroscopie UV-visible et diffusion de la lumière. A : Évolution de l'absorbance d'une solution d'ELPn60 (100 µM, TRISs) en fonction de la température. En gris, dérivée première de l'absorbance. B : Évolution de l'absorbance de solutions de concentrations croissantes en fonction de la température. C : Évolution de la T_{cp} en fonction de la concentration dans différents tampons : H_2O déionisée, PBS, et TRISs. D : Évolution de l'intensité diffusée (Derived Count Rate) et du diamètre (Z-Average) des objets présents en fonction de la température (100 µM, TRISs).

Lorsqu'une solution aqueuse d'ELP est soumise à une rampe croissante de température, son absorbance à $\lambda = 350$ nm présente une allure caractéristique, avec une augmentation abrupte, précédée et suivie de plateaux (**Figure II-8 A**). À basse température, l'ELP est sous forme d'unimère soluble, la solution est donc transparente. Lorsque la température atteint la T_{cp} , la transition de phase se produit rapidement : des agrégats se forment et la solution devient turbide. L'absorbance augmente alors drastiquement, puis se stabilise une fois tous les ELPs agrégés. La sédimentation de ces agrégats peut ensuite entraîner une nouvelle diminution de l'absorbance, à haute température. Dans ce travail, la T_{cp} a été définie comme étant la température pour laquelle la dérivée première de l'absorbance est maximale, soit 27°C pour l'ELPn60 à 100 μ M (**Figure II-8 A**). Cette mesure a été répétée sur une gamme de concentrations (**Figure II-8 B**). Un décalage de la T_{cp} est observé : elle diminue lorsque la concentration augmente. Les valeurs de T_{cp} ont ensuite été reportées en fonction de la concentration (**Figure II-8 C**) : la variation de la T_{cp} avec la concentration suit une loi logarithmique, conformément aux observations rapportées par Chilkoti *et al.* pour d'autres séquences.¹⁸

L'influence de la présence de sels dans le milieu a également été étudiée en exécutant ces mesures pour des solutions d'ELPn60 dans différents tampons aqueux : H₂O déionisée (référence), tampon phosphate salin (PBS) et tampon TRIS HCl salin (TRISs) (description **p125**). Si la présence de sels réduit effectivement la T_{cp} à concentration égale, elle ne semble toutefois pas influencer de manière significative sur la relation entre la T_{cp} et la concentration (**Figure II-8 C**). L'objectif étant de mimer les conditions physiologiques, toutes les T_{cp} ont par la suite été mesurées dans les conditions salines décrites plus haut, la différence de T_{cp} entre PBS et TRISs étant considérée comme négligeable.

La T_{cp} a également été déterminée par DLS (**Figure II-8 D**), où une évolution de l'intensité diffusée similaire à celle de l'absorbance est observée. La T_{cp} peut donc être calculée de la même façon. Le phénomène d'agrégation peut être visualisé par l'augmentation du diamètre moyen des objets présents en solution (Z-Average). L'évolution de la T_{cp} des ELPn60 et n80 en fonction de l'oxydation des méthionines est donnée en **Annexe II-7**. Conformément aux observations décrites précédemment¹⁹, la formation de sulfoxydes accroît fortement l'hydrophilie de l'ELP et par conséquent la valeur de sa T_{cp} . La sulfone, bien que plus oxydée, est capable de former des interactions sulfone-sulfone, réduisant ainsi son hydrophilie. Sa T_{cp} est donc intermédiaire.

Cette analyse par turbidimétrie a été reproduite pour des solutions d'ELPs de différentes tailles (nombre de répétitions $n = 20, 40, 60, 80, 100$) dans du tampon TRISs. Les T_{cp} obtenues par spectroscopie UV-Visible ont été reportées en fonction de la concentration en **Figure II-9 A**.

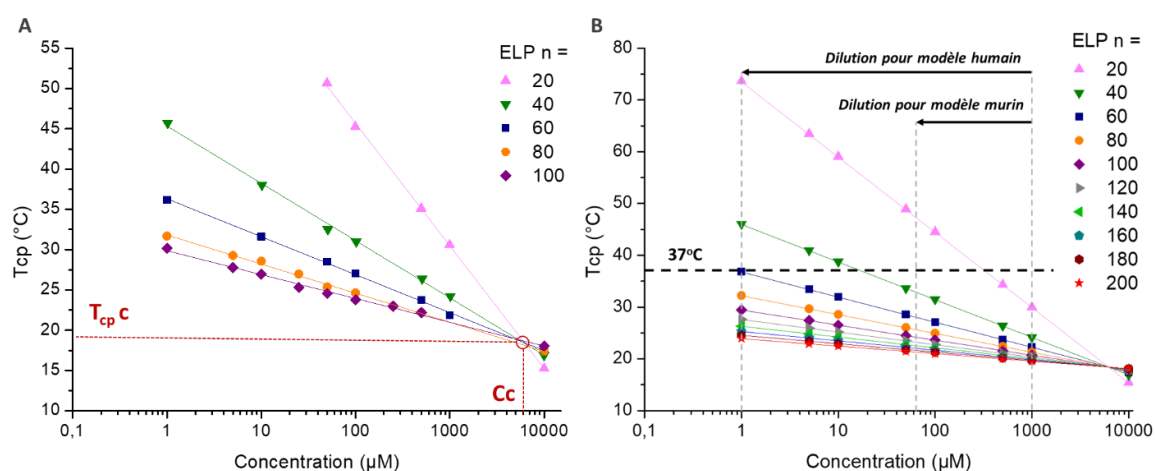


Figure II-9 : Évolution de la T_{cp} en fonction de la concentration pour des solutions d'ELPn20-200.

A : Données expérimentales obtenues par spectroscopie UV-Visible, sauf pour la concentration 10 mM (simulation). Pointillés : régressions logarithmiques des données expérimentales. **B :** Simulation des données selon l'équation $T_{cp} = T_{cp,c} + k/n \cdot \ln(C_c/C)$, avec $T_{cp,c}$ et C_c déterminées expérimentalement en A. Illustration de l'effet de la dilution sur la T_{cp} dans le cas d'une administration intraveineuse à une concentration initiale de 1 mM pour un modèle murin ou humain.

Conformément aux études reportées dans la littérature¹⁸, une dépendance logarithmique est observée quelle que soit la taille de l'ELP, mais avec une pente différente : plus l'ELP est court et plus l'influence de la concentration est forte. Il est à noter que les points pour la concentration de 10 mM ont été simulés d'après l'équation de droite obtenue à partir des autres points expérimentaux de la série. Ils permettent de faire apparaître le point d'intersection de toutes ces droites. Ses coordonnées sont appelées concentration critique (C_c) et température de point de trouble critique ($T_{cp,c}$). Ces valeurs caractéristiques peuvent ensuite être appliquées à une équation empirique précédemment établie par D.E. Meyer & A. Chilkoti¹⁸, qui permet de simuler la T_{cp} en fonction de la longueur d'un ELP (n) et de la concentration (C) :

$$T_{cp} = T_{cp,c} + \frac{k}{n} * \ln\left(\frac{C_c}{C}\right)$$

k étant une constante positive dépendant de la séquence, cette équation montre que plus un ELP est long (n grand), plus le terme k/n est petit, et donc plus l'influence de la concentration est faible. Pour un ELP infini, la T_{cp} serait égale à la LCST à toute concentration.

Les simulations issues de cette équation pour les ELPn20-200 sont représentées en **Figure II-9 B**. Apparaissent également la température physiologique (37°C) et l'effet de dilution que subirait une solution à 1 mM lors d'une administration systémique *in vivo*. Pour le modèle murin, on a considéré un volume sanguin de 1.5 mL pour une injection de 100 µL. Pour le modèle humain, le volume sanguin retenu est de 5 L pour une injection de 5 mL.

Ceci met en évidence le problème posé par la dépendance de la T_{cp} envers la concentration, récemment évoqué par Chilkoti *et al.*²⁰ En effet pour les ELPs les plus courts (ELPn20 et n40), la dilution entraînerait une telle augmentation de la T_{cp} qu'elle deviendrait supérieure à la température physiologique, menant à la redissolution des ELPs en unimères. Afin de contrôler au mieux le système injecté, il serait donc judicieux de travailler avec des ELPs beaucoup plus longs et ayant une T_{cp} moins sensible à la concentration. Cependant, ces ELPs présentent une T_{cp} assez éloignée de 37°C et sont difficiles à produire chez *E. coli* du fait du caractère très répétitif du polypeptide.

Le choix de travailler avec les ELPs de 60, 80, et 100 répétitions résulte donc d'un compromis entre la valeur de la T_{cp} , sa dépendance envers la concentration, la facilité de clonage et le rendement de production. Certaines caractéristiques de leur thermosensibilité sont données dans le Tableau II-3 ci-dessous. Tous ont une T_{cp} compatible avec des applications biologiques. L'ELPn100 présente la dépendance à la concentration (ratio k/n) la plus faible. Cependant le rendement de production assez faible obtenu durant ce projet en fait un moins bon candidat que les ELPn60 et ELPn80.

Tableau II-3 : Tableau récapitulatif des propriétés thermosensibles des ELPn60, n80, et n100

ELP	M_w th (g/mol)	T_{cp} à 100 µM (°C)	T_{cp} à 1 µM (°C)	k/n
n60	25 385	27	36	2,05
n80	33 700	25	32	1,57
n100	42 000	24	30	1,29

II.B. Synthèse de bioconjugués HA-b-ELP par chimie click

Les propriétés de thermosensibilité des ELPs ont ensuite été complétées par le couplage avec un bloc hyaluronane (HA) bioactif afin de former un copolymère à blocs biocompatible et thermosensible. La synthèse d'un tel bioconjugué par CuAAC a été précédemment décrite dans les travaux de thèse de Ye Xiao.^{7,8} Elle a été ici reproduite et optimisée afin d'en améliorer l'efficacité et la biocompatibilité. En particulier, le passage à une voie de synthèse par SPAAC a permis d'éliminer l'usage de catalyseur et de limiter celui de solvants organiques.

II.B.1. Fonctionnalisation des blocs HA et ELP

Afin de mettre en œuvre le couplage par cycloaddition alcyne-azoture (CuAAC ou SPAAC), ces fonctions ont dû être ajoutées aux extrémités de chaîne de chaque bloc : l'extrémité réductrice des HA a été fonctionnalisée avec l'azoture, et l'extrémité N-terminale des ELPs avec l'alcyne.

II.B.1.1. Fonctionnalisation de l'extrémité réductrice du HA

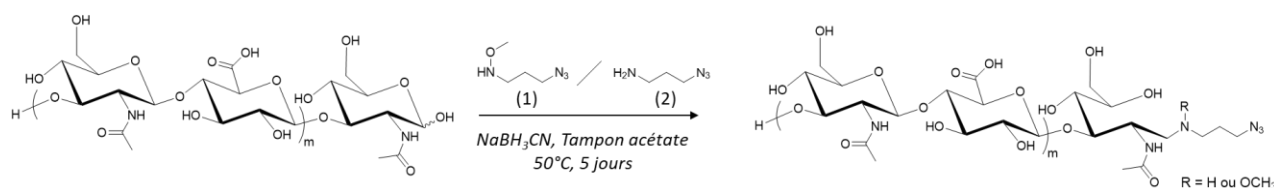


Schéma II-1 : Schéma de synthèse de la fonctionnalisation de la position anomère de l'acide hyaluronique avec une fonction azoture. La dernière unité saccharidique peut se trouver indifféremment sous forme ouverte ou fermée.

La modification chimique du bout de chaîne du HA a été réalisée par amination réductrice entre l'alcool anomère et une petite molécule portant les fonctions amine et azoture. Le HA 4,6 kDa a été fonctionnalisé avec le *N*-(3-azidopropyl)-*O*-méthylhydroxylamine (**1**) par le Dr. Ye Xiao. La présence du groupement méthoxy (-OCH₃) est en effet supposée favoriser la forme fermée de la dernière unité saccharidique. Cette forme n'étant pas primordiale dans ces travaux, une azidopropanamine commerciale (**2**) a été utilisée par la suite pour la fonctionnalisation des HA 24 kDa et 42 kDa. La réaction a été menée à chaud dans un tampon acétate à pH 5,5 en présence de l'agent réducteur NaBH₃CN, et purifiée par dialyse. Le solide blanc récupéré après lyophilisation a ensuite été caractérisé par RMN ¹H et SEC (**Figure II-10**, **Figure II-11**, **Annexe II-8**, **Annexe II-9**, **Annexe II-10**). Une modification similaire avait été utilisée par Niskanen *et al* en 2016 pour la synthèse de copolymères à blocs HA-PVLC thermosensibles.²¹

Le spectre RMN en **Figure II-10** présente les signaux caractéristiques du HA_{4,6k} et de la molécule (1), traduisant une fonctionnalisation efficace. L'intégration de ces derniers est cependant légèrement trop importante. En effet, une intégration précise de ces pics est compromise par l'approximation faite sur le nombre de répétitions du disaccharide dans la chaîne hyaluronique, notamment du fait de sa grande dispersité. Cette approximation se répercute sur l'intégration du pic de référence (proton anomère de l'unité glucuronique), et par conséquent sur toutes les autres intégrations. La détermination quantitative du taux de fonctionnalisation par RMN ¹H est donc compromise.

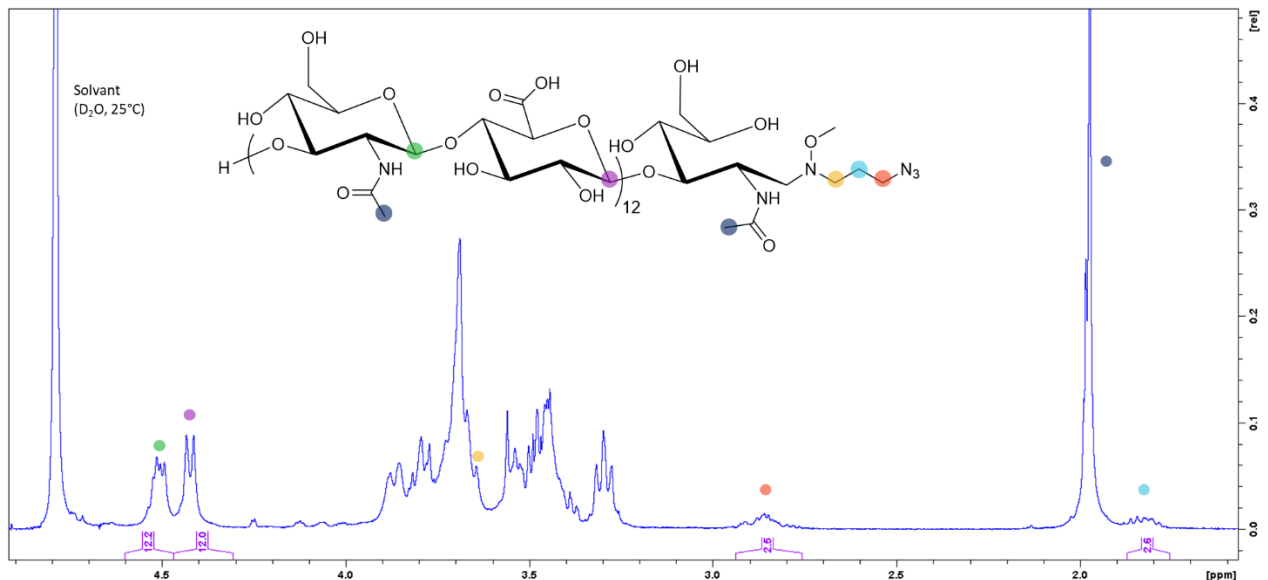


Figure II-10 : Spectre RMN ^1H du $\text{HA}_{4,6\text{k}}\text{-N}_3$ (400 MHz). Pic de référence pour l'intégration : violet (CH anomère de l'unité glucuronique, 12 H). L'approximation faite sur le nombre de répétition du disaccharide (≈ 12), entraîne une incertitude sur l'intégration des autres pics.

Cette fonctionnalisation est cependant confortée par l'analyse de SEC où un léger décalage vers les plus hautes masses molaires est observé (**Figure II-11**). L'un des risques de travailler à pH acide et haute température réside dans l'hydrolyse du HA.²² Ici, la présence d'un pic unique indique l'absence de produits de dégradation du HA, et donc l'absence d'hydrolyse.

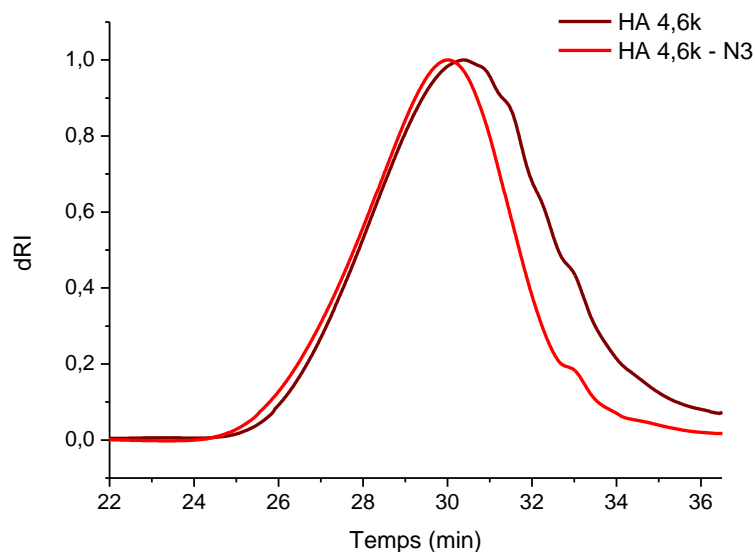


Figure II-11 : Chromatogrammes normalisés de SEC du $\text{HA}_{4,6\text{k}}$ en solution dans un tampon phosphate avant et après fonctionnalisation par une fonction azoture.

II.B.1.2. Fonctionnalisation de l'extrémité N-terminale de l'ELP

Deux types de fonctionnalisation de l'ELP ont été effectués : une première par un alcyne aliphatique, et une seconde par un alcyne contraint au sein d'un cyclooctyne (DBCO). Dans les deux cas, la fonctionnalisation du bout de chaîne a été réalisée par une amidation au cours de laquelle l'amine terminale de l'ELP s'additionne sur un ester activé provoquant le départ du groupement N-Hydroxysuccinimide.

II.B.1.2.1. Fonctionnalisation par une fonction alcyne aliphatique

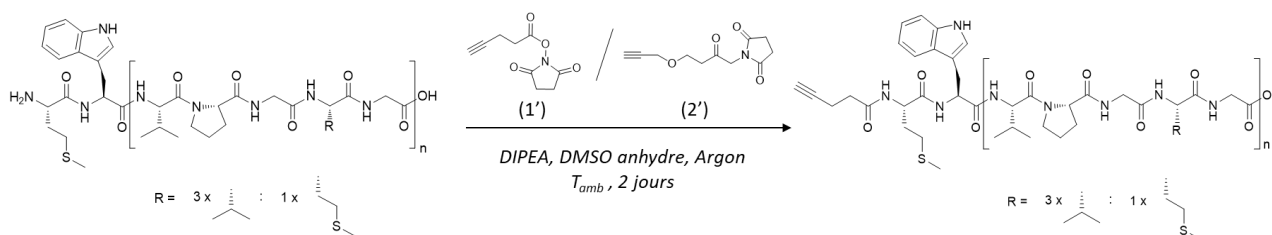


Schéma II-2 : Schéma de synthèse de la fonctionnalisation de l'extrémité N-terminale des ELPs par une fonction alcyne aliphatique.

Cette fois encore, deux molécules ont été utilisées : la première a été synthétisée au sein du laboratoire⁸ (**1'**), et la deuxième est commerciale (**2'**). La seule différence entre elles consiste en la présence d'une fonction éther (groupement CH₂-O-CH₂) dans la version commerciale, qui n'impacte ni la synthèse ni les propriétés de la molécule finale de manière significative. La réaction a lieu dans le DMSO en présence de DIPEA et à température ambiante pendant 2 jours. Des conditions inertes sont nécessaires (DMSO anhydre, argon) afin d'éviter l'oxydation des résidus méthionines. Après purification, le produit a été lyophilisé et caractérisé par RMN ¹H et spectrométrie de masse MALDI.

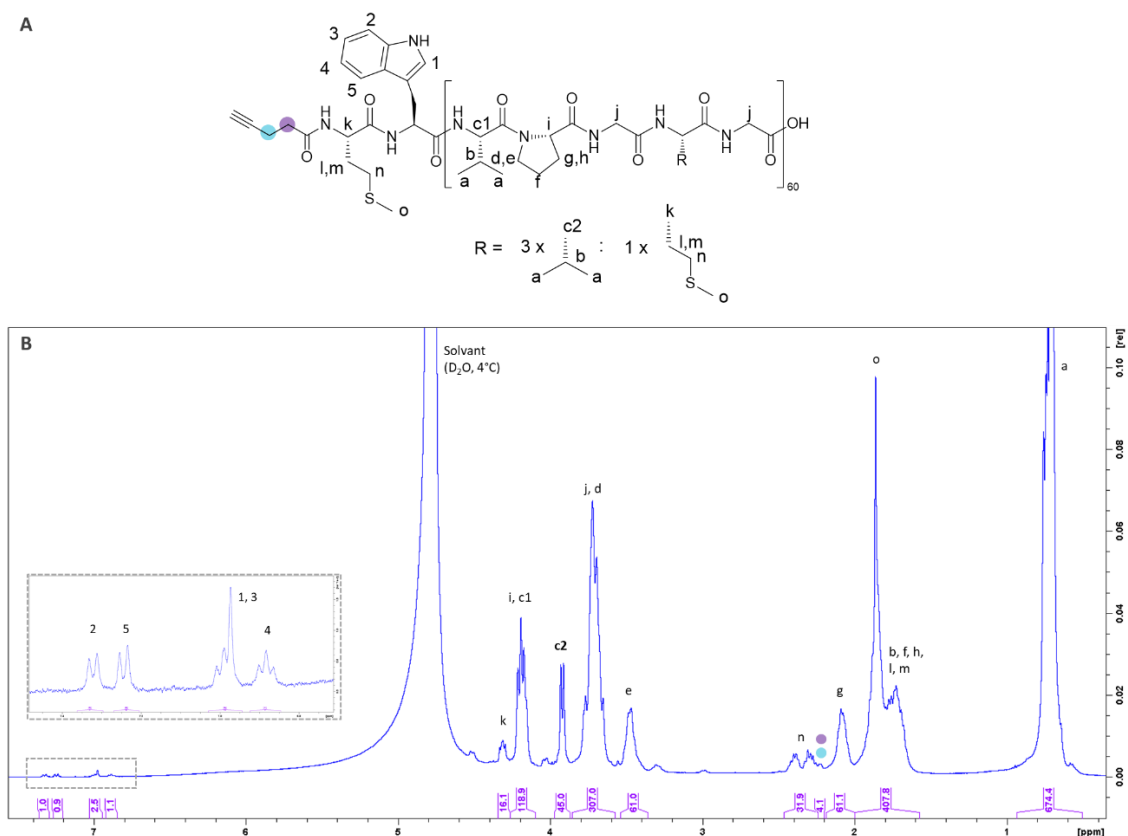


Figure II-12 : Structure chimique (A) et spectre RMN ¹H (B) de l'ELPn60-alcyne (**1'**) (400 MHz). Pic de référence pour l'intégration : c2 (CH Valine VPGVG, 45 H). Encart : protons aromatiques du tryptophane.

Sur le spectre en **Figure II-12**, les pics caractéristiques de l'ELP apparaissent non modifiés, à l'exception de l'apparition d'un pic à 2.22 ppm correspondant aux 4 protons apportés par (1'). Le proton de l'alcyne terminal, lui, n'apparaît pas. D'après les travaux de Ye Xiao, il est très probablement dans le massif entre 1.6-2.0 ppm. Cette hypothèse est cependant difficile à vérifier du fait du grand nombre de protons impliqués dans ce massif.

Le succès de cette fonctionnalisation est toutefois confirmé par spectrométrie de masse MALDI. Sur la **Figure II-13**, le spectre après fonctionnalisation est très similaire au spectre initial, avec un décalage vers les plus haut m/z de 84 g/mol, en bon accord avec le déplacement théorique de 80 g/mol (1'). La réaction de fonctionnalisation semble donc totale. Les spectres MALDI des espèces alcyne-ELPn80 et alcyne-ELPn100 sont données en **Annexe II-11** et confirment ces résultats.

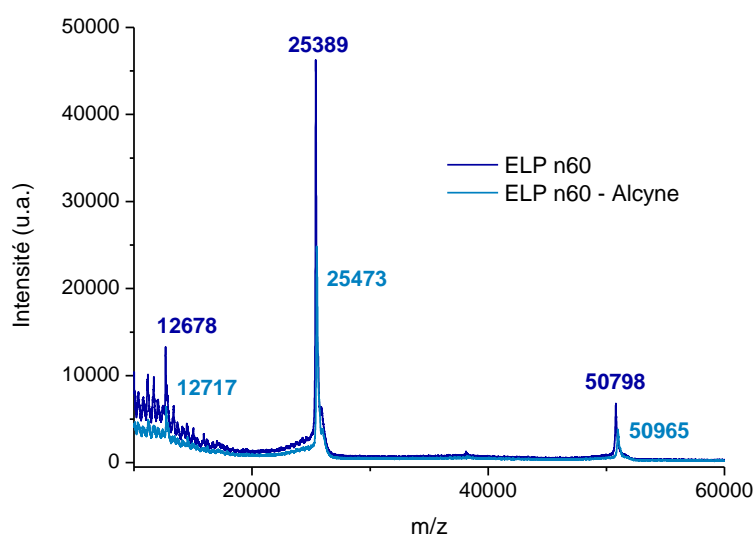


Figure II-13 : Spectre de masse MALDI de l'ELPn60 avant et après fonctionnalisation de l'extrémité N-terminale par un groupement alcyne aliphatique (molécule 1'). Déplacement de m/z théorique = 80 g/mol. Déplacement de m/z expérimental = 84 g/mol.

II.B.1.2.2. Fonctionnalisation par une fonction cyclooctyne (DBCO)

Afin de mettre en œuvre la voie de synthèse par SPAAC, l'utilisation d'un alcyne cyclique contraint est nécessaire. Cette contrainte structurelle rend les alcynes cycliques instables : le cyclooctyne est le plus petit alcyne cyclique isolable.²³ Les cycles plus petits n'ont été observés que comme intermédiaires réactionnels.²⁴ La réactivité étant directement liée à la contrainte de cycle, les alcynes cycliques plus grands sont plus stables mais moins réactifs. Si de nombreux cyclooctynes peuvent être utilisées pour la SPAAC,²⁵⁻²⁸ le dibenzocyclooctyne (DBCO ou DIBAC) est un des plus réactifs et le plus simple à synthétiser.²⁹⁻³¹ Malgré son insolubilité dans l'eau, le choix s'est donc porté sur ce composé pour la fonctionnalisation de l'extrémité N-terminale de l'ELP.

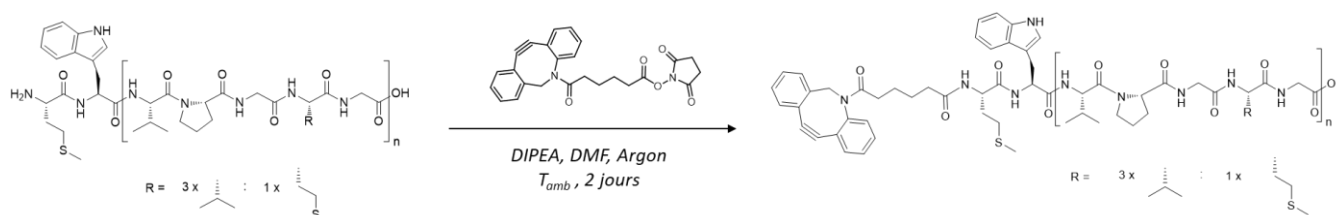


Schéma II-3 : Schéma de synthèse de la fonctionnalisation de l'extrémité N-terminale de l'ELP par une fonction cyclooctyne (DBCO)

La réaction d'amidation a été conduite de manière similaire à celle décrite précédemment. Plusieurs paramètres ont cependant été optimisés : la concentration a été élevée de façon à favoriser la réaction (≈ 100 mg/mL). Par ailleurs, le DMSO a été remplacé par le DMF, afin de limiter les risques d'oxydation et la nécessité de chauffage. La réaction a ainsi pu être menée à température ambiante. L'excès de DBCO a été également pu être réduit sans détériorer l'efficacité de la réaction, qui a alors atteint les 90% de rendement. Après purification et lyophilisation, le produit final a été caractérisé par RMN ^1H et MALDI.

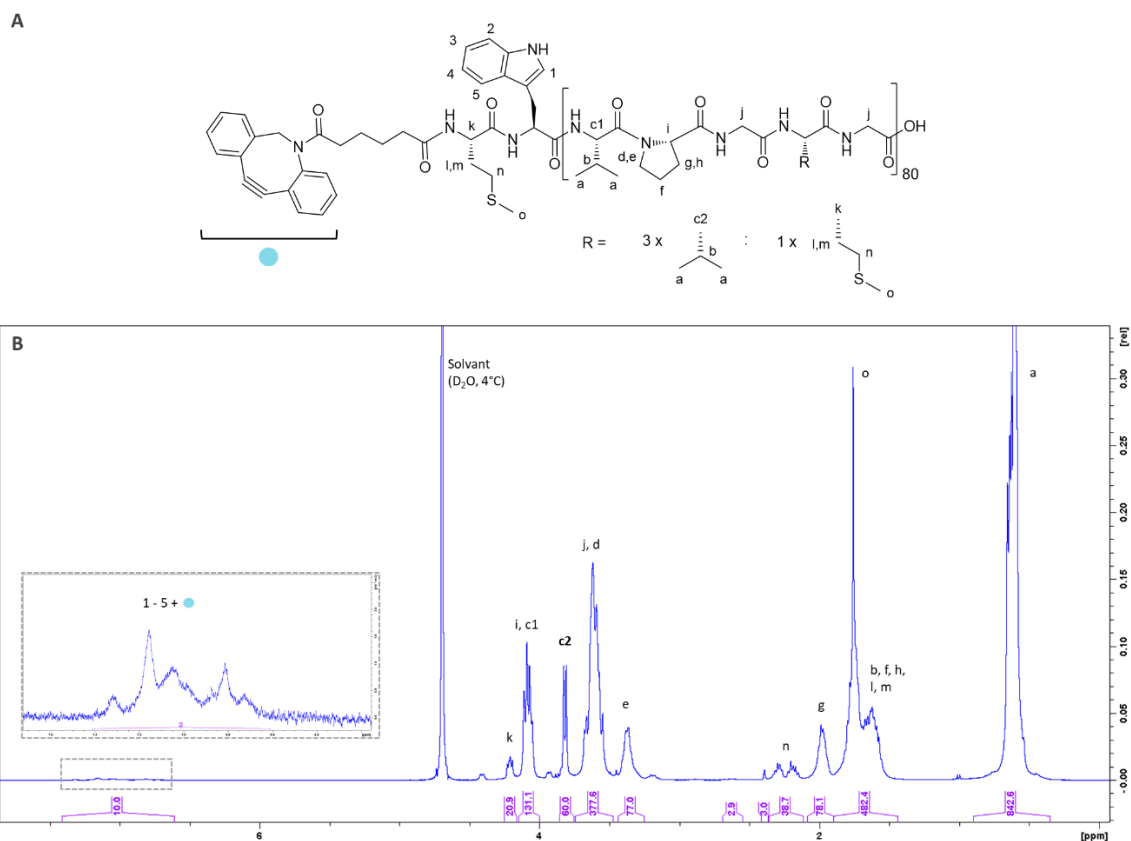


Figure II-14 : Structure chimique (A) et spectre RMN ^1H (B) de l'espèce DBCO-ELPn80 (400 MHz). Pic de référence pour l'intégration : c2 (CH Valine VPGVG, 45 H). Encart : protons aromatiques du tryptophane et du DBCO.

Le spectre ^1H du composé DBCO-ELPn80 est donné en **Figure II-14**. Cette fois encore, il est très semblable au spectre de l'ELPn80 natif. Cependant, la zone des protons aromatiques (6.6 - 7.4 ppm), auparavant bien résolue, présente maintenant un massif de pics dont l'intégration ne correspond pas à la somme des protons du tryptophane et du DBCO. En effet, le DBCO étant très hydrophobe et aromatique, il peut former des assemblages par interaction de " π - π stacking" avec un autre DBCO ou avec le tryptophane. Ce manque de solubilité nuit à la bonne résonance des protons et perturbe le signal des aromatiques. Celui-ci n'est alors plus exploitable. Par ailleurs, les signaux des protons de la chaîne carbonée du DBCO étant confondus avec ceux de l'ELP, il n'est pas possible de calculer un taux de fonctionnalisation. L'analyse ^1H RMN n'offrant que peu de renseignements, elle n'a pas beaucoup été exploitée par la suite.

En revanche, l'analyse par spectrométrie de masse MALDI du composé DBCO-ELPn80 en **Figure II-15** montre bien un décalage total du pic vers les plus hauts m/z plutôt conforme au décalage théorique (329 g/mol pour 315 g/mol en théorie). Les spectres de masse MALDI des espèces DBCO-ELPn60 et DBCO-ELPn100 sont données en **Annexe II-11** et confirment ces résultats. La fonctionnalisation semble donc effective, bien que non quantifiable.

Ces synthèses ont donc permis d'obtenir les blocs HA et ELP porteurs de fonctions azoture et alcyne (aliphatique ou cyclique) de manière efficace bien que parfois non quantifiable.

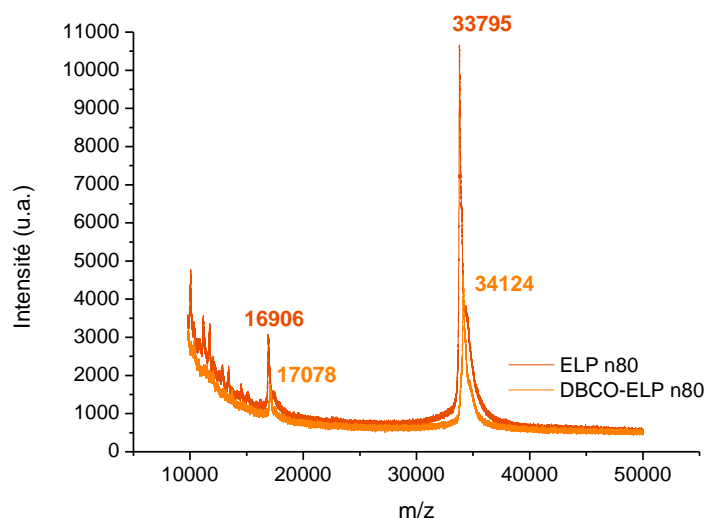


Figure II-15 : A : Spectre de masse MALDI de l'ELPn80 avant et après fonctionnalisation de l'extrémité N-terminale par un groupement DBCO. Déplacement m/z théorique = 315 g/mol. Déplacement m/z expérimental = 329 g/mol.

II.B.2. Couplage par cycloaddition : comparaison de la CuAAC et de la SPAAC

La fonctionnalisation effective des deux blocs HA et ELP a rendu la réaction de couplage possible. Elle consiste en une réaction de chimie "click" bio-orthogonale : une cycloaddition alcyne-azoture (AAC). Deux méthodes ont été comparées : une cycloaddition utilisant un catalyseur au cuivre (CuAAC) et une cycloaddition favorisée par tension de cycle (SPAAC) ne nécessitant pas de catalyseur chimique.

Les bioconjugués obtenus par ces deux voies de synthèse sont respectivement notés HA-ELP (Cu) et HA-ELP (SP) lorsqu'une comparaison entre eux est effectuée (cf. p7).

II.B.2.1. Synthèse originelle : Cycloaddition Alcyne-Azoture catalysée au Cuivre (CuAAC)

La synthèse du composé HA_{5k}-ELPn40 par CuAAC a été décrite par Ye Xiao dans ses travaux de thèse au laboratoire.⁸ Un HA-N₃ acidifié et un ELP-alcyne étaient alors dissous dans du DMSO anhydre, en présence de sulfate de cuivre (CuSO₄), de tris(benzyltriazolylmethyl)amine (TBTA) et d'ascorbate de sodium (Na Asc). La réaction était placée sous atmosphère inerte et laissée sous agitation à 40°C pendant 4 jours, avant d'être purifiée par chélation du cuivre (Cuprisorb®) et par dialyse.

Une optimisation de cette synthèse pour le HA_{4,6k}-ELPn60 a été menée afin d'améliorer son efficacité et sa mise en place.

Cette fois encore le DMSO a été remplacé. En effet, outre sa capacité à oxyder les méthionines, c'est également un mauvais solvant pour le HA, qui doit alors être acidifié afin de faciliter sa dissolution. L'hydrolyse du hyaluronane étant catalysée en milieu acide et basique^{22,32}, une acidification trop importante risque donc de l'endommager et d'augmenter encore sa dispersité.

Après plusieurs tests de mélanges de solvants, il s'est avéré que seul le mélange H₂O/DMF (1:1) présentait un couplage efficace à température ambiante (**Annexe II-12**). La présence de l'eau permet en effet une bonne dissolution du HA non acidifié et celle du DMF empêche l'agrégation de l'ELP, même à haute température. Le TBTA a alors été remplacé par du PMDETA et un suivi cinétique effectué afin d'estimer le temps de réaction optimal. Il est illustré en **Figure II-16** : des prélèvements du milieu réactionnel ont été faits à différents temps de réaction et analysés par électrophorèse (SDS-PAGE).

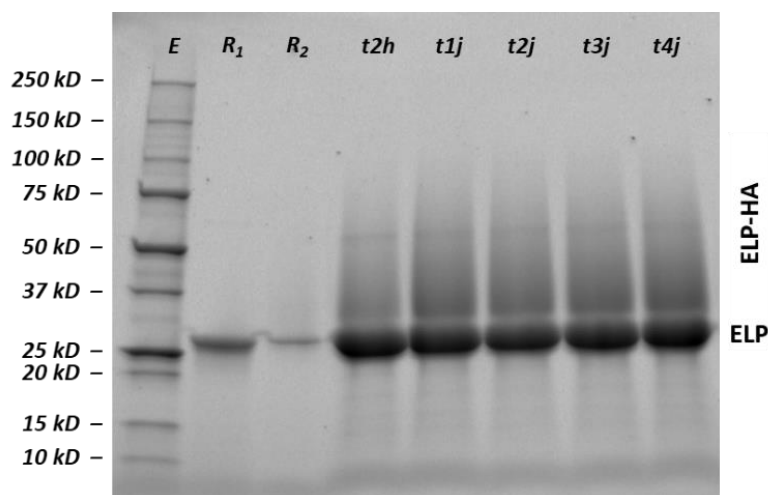


Figure II-16 : Suivi cinétique sur gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) de la synthèse du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn60. E : échelle de taille ; R₁ : ELP n60 (référence) ; R₂ : HA (référence + traces ELPn60) ; tx : prélèvement du milieu réactionnel après 2h, 1, 2, 3 et 4 jours de réaction. Bande intense à 25 kDa : ELP-alcyne non réagi ; smear : HA_{4,6k}-ELPn60 (Cu).

La bande correspondant à l'ELPn60 apparaît légèrement au-dessus du marqueur de taille 25 kDa, comme montré par la référence R₁. Le HA seul, lui, n'est pas visible avec cette technique (la faible bande observable en R₂ correspond à des traces d'ELP).

La forte dispersité du HA entraîne une toute aussi grande dispersité du bioconjugué final. Il ne forme donc pas une bande comme l'ELPn60 seul, mais une trainée ("smear"). L'intensité de ce smear et celle de la bande correspondant à l'ELPn60 seul n'ayant pas réagi ont été comparées : elles n'évoluent plus au bout de 2 jours, marquant la fin de la réaction, bien que le couplage ne soit pas total. S'il est inhabituel pour une réaction de chimie "click" de durer aussi longtemps, il faut considérer que la cycloaddition intervient entre les extrémités de chaîne de deux polymères, ce qui implique un temps de réaction conséquent.

Les conditions de synthèse optimisées sont résumées dans le **Schéma II-4** ci-dessous.

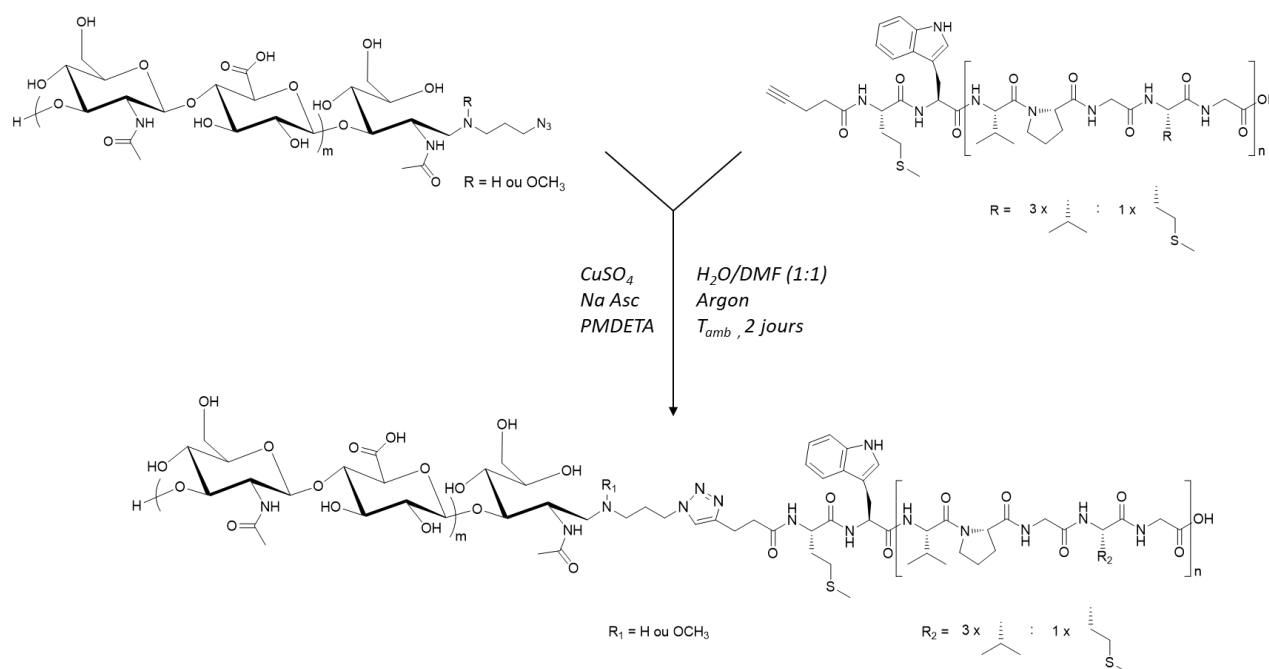


Schéma II-4 : Schéma de synthèse optimisée du bioconjugué HA-ELP par CuAAC, à partir des blocs HA-N₃ et ELP-alcyne précédemment obtenus.

Dans un premier temps, la réaction a été réalisée avec un léger excès de HA-N₃. Un couplage quantitatif devrait ainsi se traduire par une disparition totale de l'ELP seul en solution, rendant possible un calcul du taux de couplage à partir de l'analyse des gels d'électrophorèse (description **p129**). Après ajustement de la concentration et des équivalences, celui-ci a atteint les 80%.

La réaction n'étant pas totale, une purification a été nécessaire par captation du catalyseur au cuivre et dialyse. La séparation du bioconjugué et de l'ELP seul n'ayant pas réagi a, quant à elle, été effectuée par simple centrifugation à chaud. En effet, à haute température, l'ELP seul forme des agrégats et précipite, tandis que le bioconjugué HA-ELP s'auto-assemble en nanoparticules qui restent solubles. Cela permet donc de récupérer l'ELP seul dans le culot et le bioconjugué dans le surnageant.

Cette purification peut être observée en **Figure II-17**, où la bande caractéristique de l'ELP seul disparaît après centrifugation. Par ailleurs, cette figure démontre aussi la bonne reproductibilité de la synthèse : les six puits contenant les produits de six synthèses différentes menées en parallèle présentent en effet une apparence très similaire.

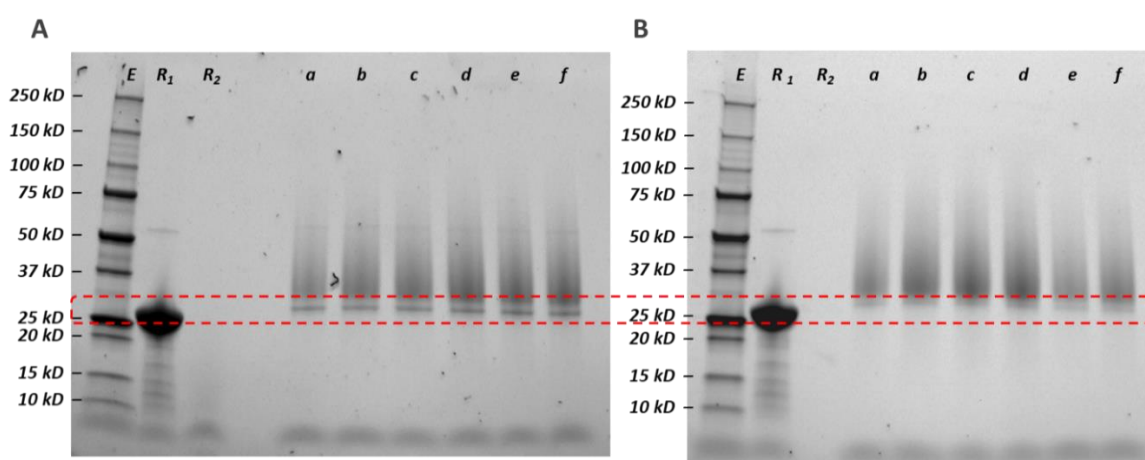


Figure II-17 : Gel d'électrophorèse (SDS-Page) de la synthèse du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn60.

E : échelle de taille ; *R*₁ : ELP n60 (référence) ; *R*₂ : HA (référence) ; *a,b,c,d,e,f* : répliques de la synthèse du bioconjugué avant purification (A) et après purification (B). Encadré rouge : disparition de la marque caractéristique de l'ELP non couplé après purification.

Après purification, la solution a été lyophilisée pour obtenir un solide blanc cotonneux caractérisé par RMN et SEC.

Les modifications du spectre ¹H de l'ELPn60 après couplage avec le HA_{4,6k} sont relativement légères. La **Figure II-18** montre une superposition des massifs de pics de l'ELP et du HA dans la zone 3.0-4.4 ppm qui apporte une légère incertitude sur l'intégration du pic de référence. Une autre différence notable est l'apparition du pic du proton du cycle triazole à 7.49 ppm. Ici, son intégration correspond à environ 0.5 H, ce qui traduit un taux de couplage de 50%, en cohérence avec les taux de couplage observés avant optimisation en **Figure II-16**.

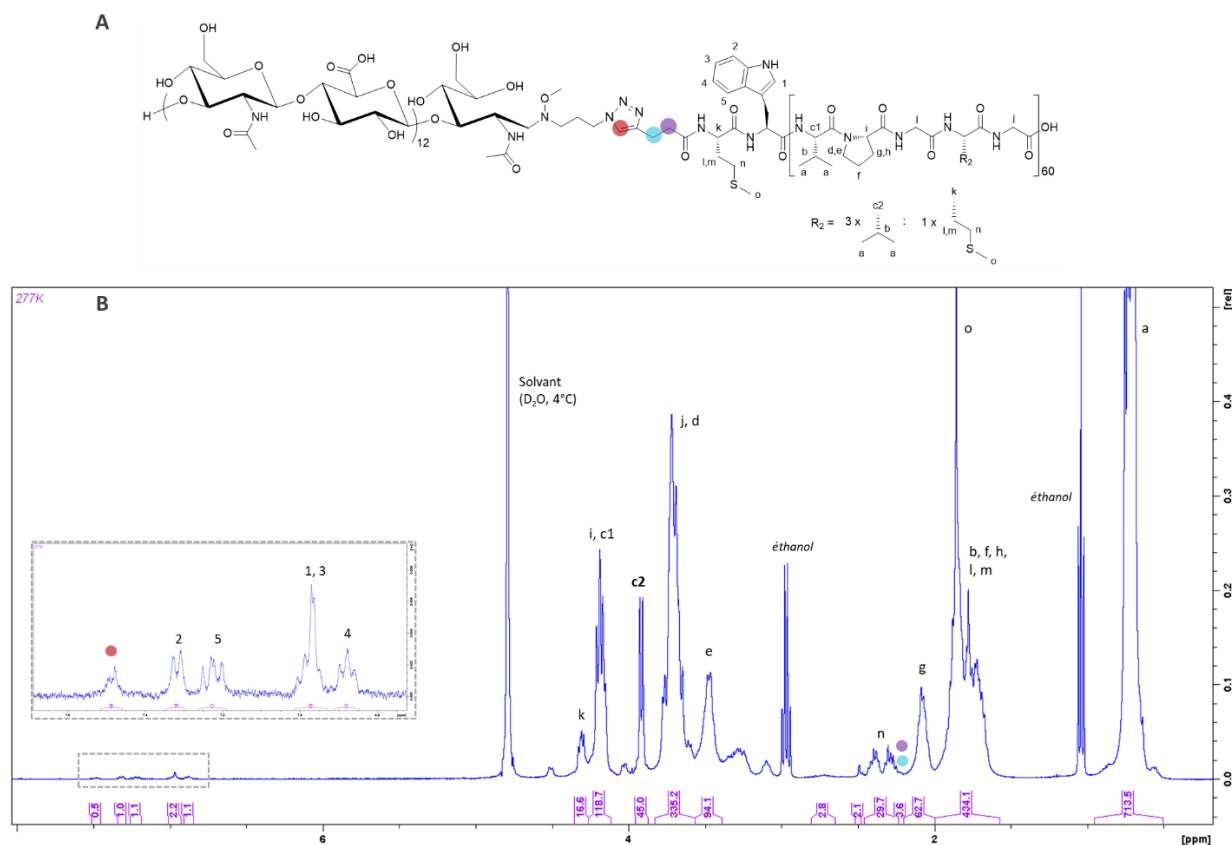


Figure II-18 : A : Structure chimique du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn60 (Cu) et attribution des protons.

B : Spectre RMN ¹H (400 MHz). Pic de référence pour l'intégration : c2 (CH Valine VPGVG, 45 H). Encart : zoom à 6.7-7.7 ppm, protons aromatiques du tryptophane et du cycle triazole.

Une caractérisation par SEC a également été menée sur ce bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn60 purifié. Le chromatogramme en **Figure II-19 A** montre un décalage vers les plus hautes masses molaires, traduisant l'ajout effectif du bloc HA sur l'ELP. Il ne semble pas y avoir d'épaule, ce qui indique une élimination efficace de l'ELP n'ayant pas réagi. Cependant, un second pic est observable vers les masses molaires plus faibles, correspondant à du HA libre. Ce pic est visible pour toutes les synthèses (**Figure II-19 B**), et est particulièrement important pour l'expérience a, qui présentait également le taux de couplage le plus faible. Il s'agit donc très probablement du HA n'ayant pas été couplé lors de la réaction. La dialyse s'est révélée une méthode peu efficace pour son élimination, l'utilisation de membrane de porosité plus grande ayant par ailleurs entraîné la perte du bioconjugué. La purification du HA s'est donc avérée complexe.

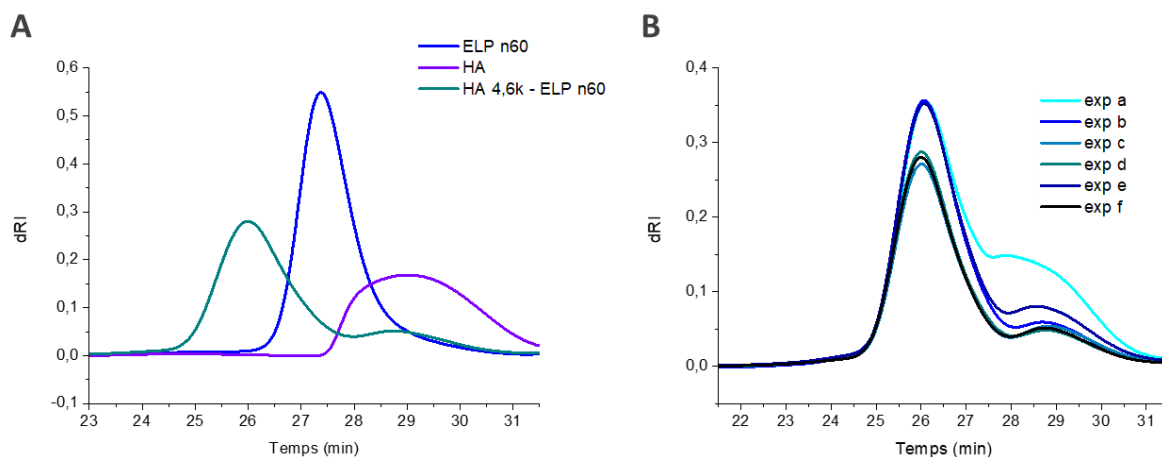


Figure II-19 : Caractérisation par SEC de la synthèse du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn60 (tampon acétate/ACN). A : Chromatogrammes des espèces ELPn60 et HA 4,6k natives et du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn60.

B : Chromatogrammes des 6 répliques de synthèse du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn60 illustrés en **Figure II-17 B**.

L'ELP semblant par conséquent le composé le plus facile à éliminer, il a été décidé de travailler avec ce bloc en double excès.

Le calcul du taux de couplage par la méthode précédente (cf. **p129**) devient alors plus compliqué et moins précis. Un rendement massique lui est donc préféré : la masse de produit pur obtenue après lyophilisation est divisée par la masse théorique qui serait obtenue pour un taux de couplage de 100%. Cette méthode présente également une certaine incertitude : en cas de présence de HA n'ayant pas réagi, le rendement ainsi calculé pourrait être plus élevé que le rendement réel. Cependant, elle présente l'avantage d'être très simple à mettre en place en routine.

II.B.2.2. Synthèse par chimie "click" sans cuivre : utilisation de la tension de cycle pour favoriser la réaction (SPAAC)

Dans le but de rendre la synthèse du bioconjugué la plus biocompatible possible, une autre voie ne nécessitant ni catalyseur au cuivre, ni solvant organique a été étudiée. Elle a d'abord fait l'objet du stage de Master 1 de Mme Laura Durand (Janvier-Février 2020). Au regard des résultats prometteurs obtenus avec le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80, son étude a été poursuivie.

Pour ce faire, l'ELPn80 fonctionnalisé par le DBCO a été utilisé. En effet, la contrainte physique appliquée sur l'alcyne du fait de son intégration dans une structure de type cyclooctyne le rend extrêmement réactif. L'utilisation d'un catalyseur chimique devient dès lors inutile. Le HA et l'ELP étant par ailleurs tous deux solubles dans l'eau, la présence d'un co-solvant organique n'est plus requise. La synthèse s'est donc nettement simplifiée : les deux blocs HA-N₃ et ELP-DBCO ont simplement été mis en solution dans de l'H₂O déionisée pendant 2 jours. La réactivité est cependant amoindrie, la réaction devant se faire à basse température afin d'éviter l'agrégation de l'ELP, ce qui a pour effet d'en ralentir la cinétique. Le schéma de couplage est illustré en **Schéma II-5**.

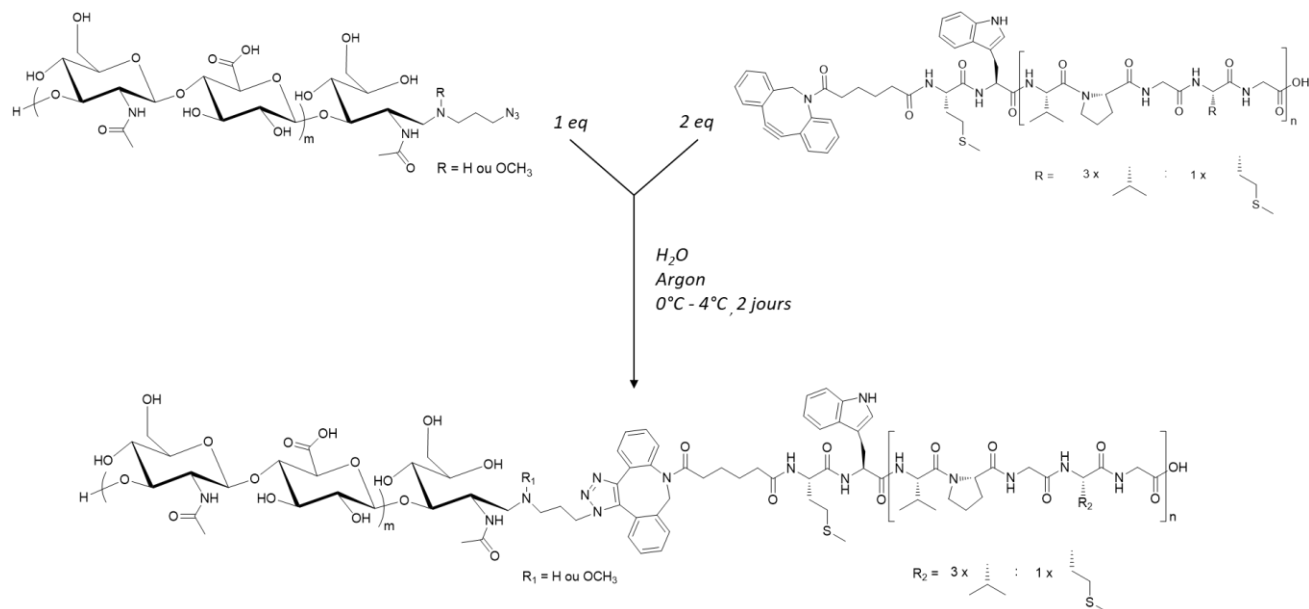


Schéma II-5 : Schéma de synthèse du bioconjugué HA-ELP par SPAAC, à partir des blocs HA-N₃ et ELP-DBCO précédemment synthétisés.

La purification s'est également trouvée grandement simplifiée : en l'absence de solvant et de co-réactifs, une centrifugation à chaud a suffi pour obtenir le bioconjugué pur. Son efficacité est illustrée en **Figure II-20 A** : la séparation entre le HA_{4,6k}-ELPn80 présent dans le surnageant ("sur") et l'ELPn80 seul ayant précipité dans le culot ("clt") est particulièrement visible.

Les bandes de plus hautes masses molaires observées dans le milieu avant purification et dans le culot après centrifugation correspondraient à des multimères d'ELP n'ayant pas réagi avec le HA.

Lors de la caractérisation par SEC (**Figure II-20 B**), le décalage du pic vers les hautes masses molaires traduit cette fois encore l'efficacité du couplage, tandis que le pic du HA seul semble avoir disparu. Le produit obtenu avec un excès d'ELPn80 est donc plus pur.

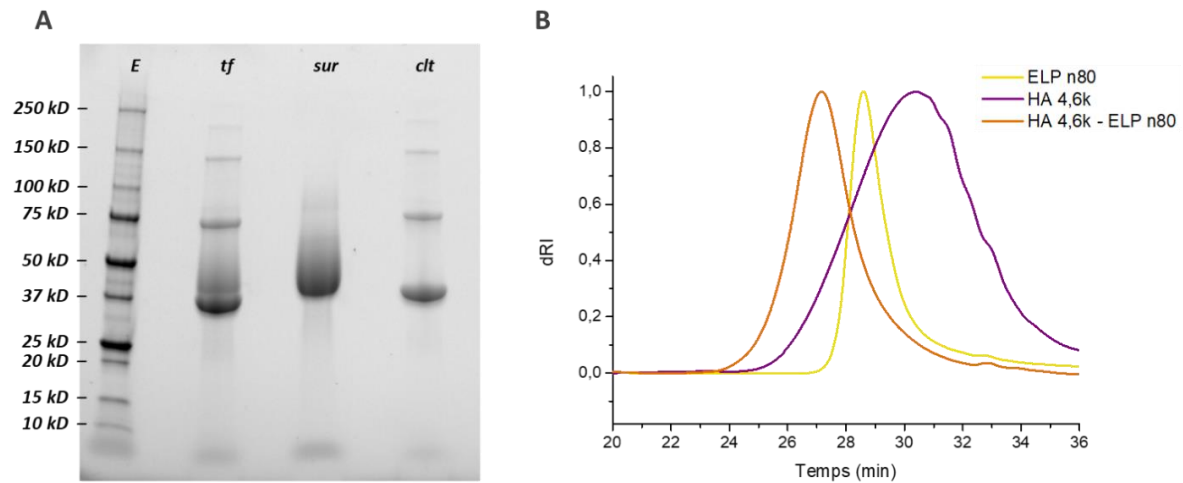


Figure II-20 : A : Gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) de la synthèse du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80. E : échelle de taille ; tf : milieu réactionnel avant purification ; sur : surnageant après purification (HA_{4,6k}-ELPn80) ; ctt : culot après purification (ELP n80 non réagi). B : Chromatogrammes des espèces ELPn80 et HA_{4,6k} natives et du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 (tampon phosphate).

La caractérisation par RMN ¹H a permis de confirmer cette analyse : le spectre du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 (bleu) présente effectivement les pics caractéristiques à la fois de l'ELPn80 (cyan) et du HA_{4,6k} (violet). Cependant, comme lors de l'analyse du composé DBCO-ELPn80 seul (**Figure II-14**), aucune quantification n'est possible : les pics des protons aromatiques étant dissimulés au cœur d'un massif non intégrable.

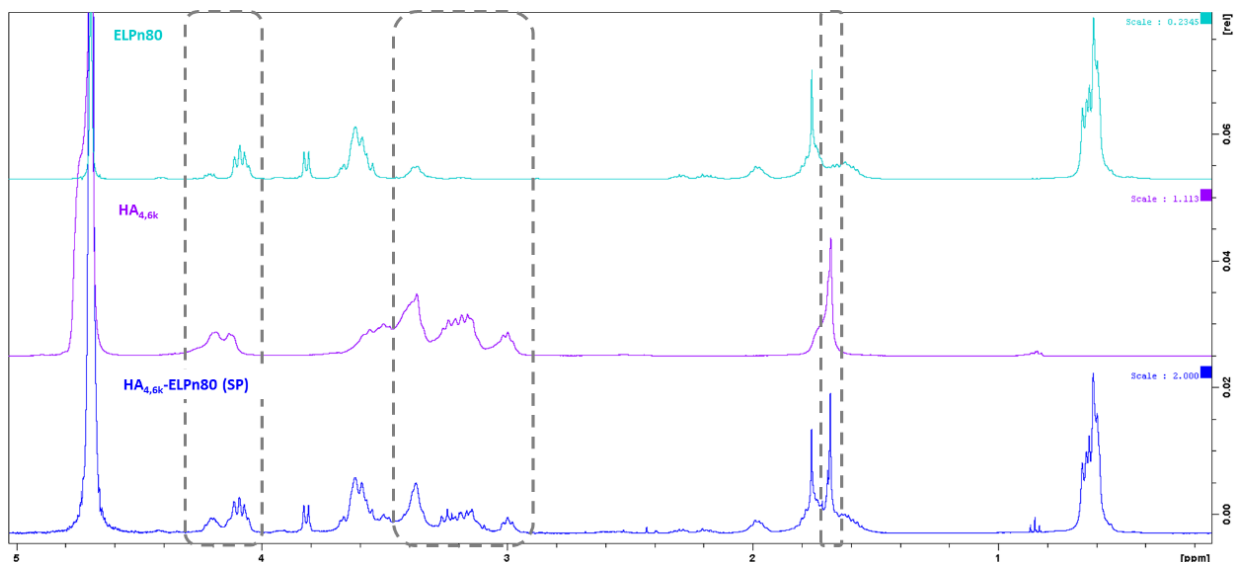


Figure II-21 : Spectres RMN ¹H de l'ELPn80 (cyan), du HA_{4,6k} (violet) et du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 (SP) (bleu) (400 MHz). Cadres pointillés : signaux caractéristiques des protons du HA_{4,6k} dans le spectre du bioconjugué.

II.B.2.3. Comparaison des deux voies de synthèse CuAAC et SPAAC

Ces deux cycloadditions ont été appliquées à la synthèse de bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn60, n80, et n100. Leurs principales caractéristiques ont été résumées dans le **Tableau II-4**.

Tableau II-4 : Tableau comparatif des deux méthodes de synthèse du bioconjugué par cycloaddition

Synthèse HA _{4,6k} -ELP		CuAAC	SPAAC
Catalyseur		CuSO ₄ (Cu ^I généré <i>in situ</i>)	Non
Solvant		DMF/H ₂ O (1:1)	H ₂ O
Purification		Cuprisorb [®] (min 12h) Dialyse (min 48h) Centrifugation à chaud	Centrifugation à chaud
Rendement	ELPn60	86% ± 1 (N=6)* 82% (N=1)**	84% ± 19 (N=4)**
	ELPn80	76% ± 8 (N=2)**	78% ± 10 (N=12)**
	ELPn100	75% (N=1)**	80% ± 12 (N=6)**
Caractérisation de l'ELP fonctionnalisé		MALDI SEC RMN	MALDI SEC RMN non quantitative
Caractérisation du bioconjugué		SDS-Page SEC RMN non quantitative	SDS-Page SEC RMN non quantitative

* Synthèse avec HA-N₃ en excès; ** Synthèse avec ELP-alcyne en excès; Rendement moyen ± écart-type, N = nombre de répliques de la synthèse.

Dans les deux cas, l'optimisation expérimentale a permis d'obtenir des rendements corrects (supérieurs à 70%) et comparables. La caractérisation des intermédiaires ELP fonctionnalisés et des produits finaux semble légèrement plus aisée dans le cas de la CuAAC, le DBCO perturbant notamment l'analyse RMN et rendant une quantification impossible. En revanche, la facilité de synthèse et de purification rend la SPAAC réellement intéressante. L'absence de solvant et de co-réactifs entraîne une meilleure biocompatibilité, un gain de temps considérable en termes de purification, et une éventuelle réutilisation de l'ELP engagé en excès puis isolé par centrifugation. En effet, une simple remise en solution en présence de HA-N₃ permet de relancer la réaction de couplage. Cependant, cette réaction devient de moins en moins efficace au fur et à mesure des recyclages ($\eta < 50\%$, cf. **p129**).

Au vu de ces avantages, la SPAAC a été sélectionnée comme voie de synthèse de référence pour l'obtention de la librairie de bioconjugués HA-ELP. Sauf mention contraire, les bioconjugués évoqués dans la suite de ce manuscrit ont donc été synthétisés par SPAAC.

II.B.3. Élaboration d'une librairie de bioconjugués

La stratégie de synthèse de bioconjugués HA-ELP a donc été optimisée afin d'être plus rapide et plus biocompatible. Elle présente un autre avantage de taille : sa simplicité et sa versatilité permettent de synthétiser un grand nombre de composés en faisant varier la nature du HA ou de l'ELP. Ainsi une librairie de bioconjugués a été élaborée à partir de trois HA de masse molaire 4,6 kDa, 24 kDa et 42 kDa, et des trois ELPn60, n80, et n100. Cette librairie est représentée en **Figure II-22** : le **tableau A** rassemble les masses molaires des bioconjugués formés, et le **graphique B** représente leurs compositions relatives et la proportion massique de HA et d'ELP au sein de chacun. Les rendements de réaction sont assez similaires pour tous les diblocs (cf. **p128**), la légère diminution avec l'augmentation de la taille du HA pouvant s'expliquer par la plus faible probabilité de rencontre des extrémités de chaîne.

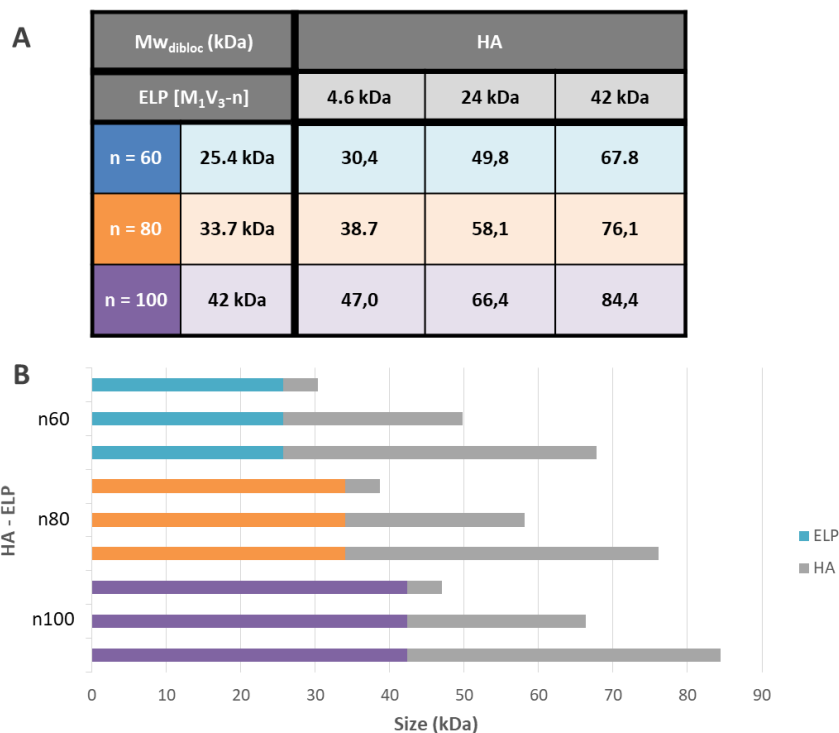


Figure II-22 : Représentation de la librairie de bioconjugués HA-ELP synthétisés. A : Tableau récapitulatif des masses molaires de chaque bioconjugué. La masse molaire des fonctionnalisations azoture et DBCO est prise en compte dans le total (+ 0.4 kDa). B : Représentation en histogramme de la composition de chaque bioconjugué. De haut en bas : ELP n60 – n80 – n100 + HA 4,6k – 24k – 42k

Les bioconjugués HA_{24k}-ELP et HA_{42k}-ELP ont eux aussi été caractérisés avant et après purification par électrophorèse (**Figure II-23**) et par SEC (**Figure II-24**).

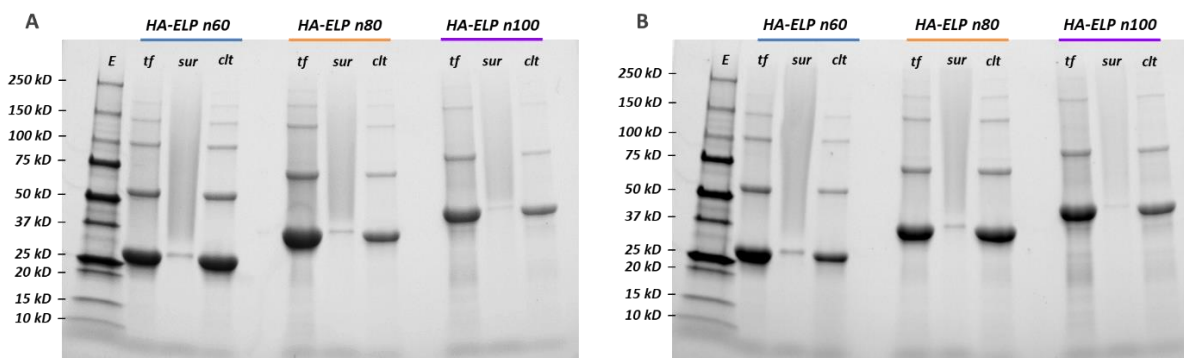


Figure II-23 : Gels d'électrophorèse (SDS PAGE) de la synthèse des bioconjugués HA_{24k}-ELP (A) et HA_{42k}-ELP (B) par SPAAC. E : échelle de taille ; tf : milieu réactionnel avant purification ; sur : surnageant après purification ; clt : culot après purification. Gauche : HA-ELPn60 ; Milieu : HA-ELPn80 ; Droite : HA-ELPn100

L'électrophorèse montre un couplage efficace dans tous les cas. La purification semble toutefois un peu plus difficile, avec une légère trace d'ELP seul restant après centrifugation à chaud. En revanche, les multimères sont bien tous éliminés dans le culot.

La caractérisation des HA natifs par SEC est présentée en **Figure II-24 A** : l'évolution vers les plus faibles temps d'éluion est en accord avec l'augmentation de la masse molaire. Par ailleurs, la largeur des pics indique une dispersité importante, du fait de leur forte dispersité. En **Figure II-24 B, C** et **D**, les chromatogrammes illustrent l'évolution de la masse molaire avant et après couplage des ELPs avec des HA de tailles différentes. L'augmentation de la masse molaire et de la dispersité pour les bioconjugués HA_{24k}-ELP et HA_{42k}-ELP est particulièrement visible. Pour les bioconjugués HA-ELPn100, un faible pic aux longs temps d'éluion traduit la présence d'un peu d'ELPn100 non couplé. Un deuxième cycle de centrifugation pourrait être mis en place pour améliorer la purification.

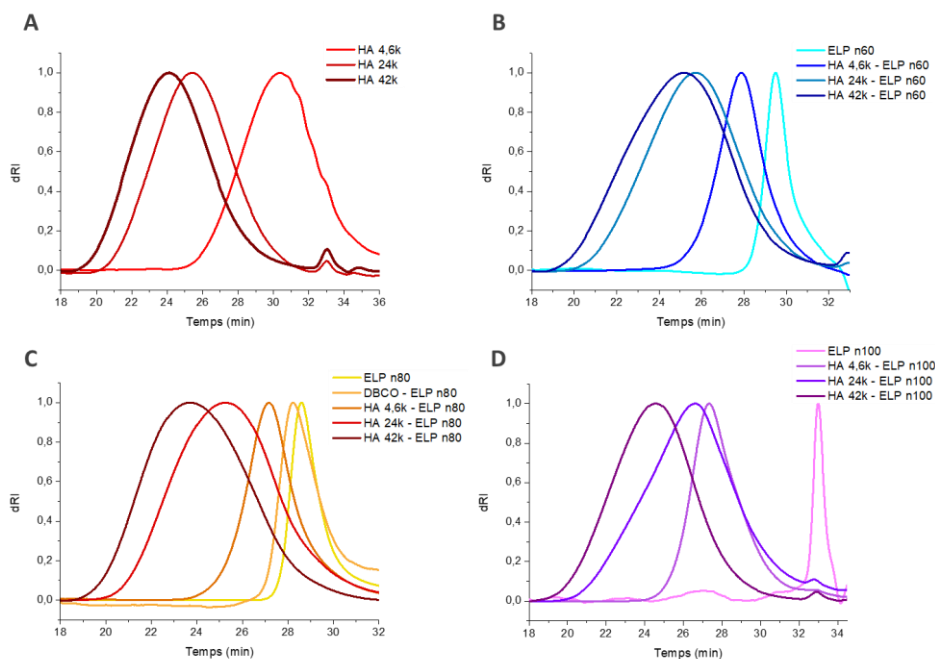


Figure II-24 : Caractérisation par SEC des HA et ELP natifs ainsi que des bioconjugués synthétisés (tampon phosphate). A : chromatogrammes des HA natifs de masses molaires : 4,6 kDa, 24 kDa et 42 kDa. B,C,D : chromatogrammes des ELPn60, n80 et n100 et des 3 bioconjugués HA-ELPn60 (B), n80 (C), et n100 (D). En C, signal du composé DBCO-ELP n80 également présent.

Nous avons donc synthétisé une librairie de neuf bioconjugués HA-ELP combinant trois tailles de HA et trois tailles d'ELP de façon simple et rapide. Leur purification est également aisée et efficace. Si l'obtention quantitative du taux de couplage semble compromise, il est toutefois possible de caractériser les composés obtenus par électrophorèse et SEC.

L'ensemble de cette librairie a été utilisée par la suite pour effectuer une étude structure-propriété assez complète et d'évaluer l'influence de la taille de l'ELP et du HA sur les propriétés physico-chimiques comme biologiques des bioconjugués.

CONCLUSION

La synthèse de bioconjugués HA-ELP thermosensibles a été présentée dans ce chapitre.

Après étude de plusieurs ELPs, le choix s'est porté sur les ELPn60, ELPn80, et ELPn100, qui possèdent un rendement de production recombinante bon ou correct, et des propriétés de thermosensibilité intéressantes. En particulier, ces ELPs possèdent une T_{cp} proche de la température du corps humain, et moins dépendante de la concentration que celle des ELPs précédemment étudiés au laboratoire.

Le couplage de ces ELPs avec un bloc HA avait déjà été décrit par Y. Xiao *et al.* en 2019.⁸ Si les étapes de fonctionnalisation des blocs sont demeurées inchangées, la synthèse par CuAAC a fait l'objet d'une optimisation afin d'améliorer son efficacité et sa simplicité de mise en œuvre. Par ailleurs, une deuxième voie de synthèse, n'utilisant ni catalyseur, ni solvant organique, ni co-réactifs a été étudiée. Ses avantages sont multiples : meilleure biocompatibilité avec une réalisation uniquement dans l'eau, grande simplicité de réaction et de purification, gain de temps, possibilité de recyclage de l'ELP en excès, etc. Ainsi, malgré une caractérisation non quantitative des réactions de fonctionnalisation et de couplage, la SPAAC a été choisie comme méthode de synthèse principale.

Forts d'une voie de synthèse à la fois simple et versatile, une librairie de bioconjugués HA-ELP combinant trois tailles de HA (4,6 kDa, 24 kDa, et 42 kDa) et trois tailles d'ELP (25,4 kDa, 33,7 kDa, et 42 kDa) a été élaborée. L'influence de ces différentes compositions est évaluée d'un point de vue physico-chimique dans le **chapitre III** et d'un point de vue biologique dans le **chapitre IV**.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Matériel

Solvants : les solvants éthanol (96.0%, EtOH), méthanol (98.5%, MeOH), diméthylformamide (DMF, 99%), acétonitrile (99.9%, ACN), éther diéthylique, et tétrahydrofurane (THF) ont été achetés chez **VWR**. Le diméthyle sulfoxyde (DMSO, 99.7%) a été acquis auprès de **Sigma-Aldrich** et le D₂O chez **Eurisotop**.

L'acide acétique (AcOH, 99.8%), acide formique (98%), cyanoborohydrure de sodium (NaBH₃CN, 95%), 3-Azido-1-propanamine (90%), triméthylamine (TEA, 99%), sulfate de cuivre (II) pentahydraté (CuSO₄·4H₂O, 99%), *N,N,N',N'',N''*-pentaméthyl-diéthylène-triamine (PMDETA), ester de propargyl-N-hydroxysuccinimidyl, acide sinapique, thiosulfate de sodium, et Trizma[®] ont été obtenus auprès de **Sigma-Aldrich**. Le *N,N* Diisopropyléthylamine (DIPEA, 99%), L-acétate de sodium (AcONa, 99%), ascorbate de sodium (NaAsc, 99%), acide trifluoroacétique (TFA), nitrate de sodium (NaNO₃) ont été acquis chez **Alfa Aesar**. L'acétate d'ammonium et l'hydroxyde de sodium (NaOH) ont été achetés chez **Fisher Scientific (FR)**, le Tris(benzyltriazolylmethyl)amine (TBTA, 97%) chez **TCl**, l'hydrogénophosphate de sodium (Na₂HPO₄) chez **VWR**, le Cuprisorb[®] chez **Seachem**, le DBCO-C6-NHS ester (DBCO) chez **Lumiprobe**, et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, 35%) chez **Acros**.

Le hyaluronate de sodium (HA5K, HA20K, HA40K) provient de chez **Lifecore Biomedical**. Les ELPn60, ELPn80, et ELPn100 ont été produits au laboratoire, puis l'ELPn80 a été produit et fourni par **Technical Proteins Nanobiotechnology**.

L'eau déionisée (18 MO-cm) a été obtenue grâce à une unité de purification *Milli-Q Biocel A10* **Millipore**.

Les dialyses ont été réalisées avec des membranes de dialyse ou des dispositifs *float-a-lyzer* de **Spectra/Por[®]**. Les étapes de filtration-centrifugation ont été effectuées avec des filtres à centrifuger *Amicon[®] Ultra-15* (3 000 – 15 000 MWCO, *Ultracel*, Cellulose Régénérée) de chez **Merck Millipore**.

L'agitateur chauffant pour eppendorfs de 1,5 – 2 mL est un *Thermomixer[™] comfort* **Eppendorf** de **ThermoFisher Scientific**.

Le lyophilisateur est un appareil *Benchtop Pro with Omnitronics* de **SP Scientific**.

Traitement informatique :

Les figures sous forme de graphes ont été réalisées sur le logiciel **OriginPro 8.5**, les illustrations 3D sur **Blender** et les structures chimiques sur **ChemDraw**.

Synthèses

Préparation des tampons salins

Le tampon TRIS salin (TRISs) a été préparé avec 0.05 M de Trisma-HCl (Trizma) et 0.15 M de NaCl dans de l'eau déionisée. Le pH a été ajusté à 7,4 avec une solution de NaOH 0,1 M.

Le PBS est préparé par dilution de PBS concentré 10X (*Euromedex*) à pH 7,0. Un ajustement à 300 mosm est effectué avec le PBS concentré et à pH 7,4 avec une solution de NaOH 0,1M.

Production des ELPn60, ELPn80, et ELPn100

Une colonie de clones bactériens contenant les plasmides codant pour les ELPn60, ELPn80 ou ELPn100 a été sélectionnée et pré-cultivée dans 100 mL de milieu LB Broth (*Lennox*) (1% bacto-tryptone, 5% NaCl et 1% d'extrait de levure) dans un agitateur-incubateur rotatif (37°C, 180 rpm) durant une nuit. Cette pré-culture a ensuite été utilisée pour ensemercer 1L de milieu contenant du LB Broth (20 g/L), de l'extrait de levure (5 g/L), du glycérol (1 g/L) et de l'ampicilline (100 µg/mL). Un suivi de la croissance bactérienne a été effectué par mesure de densité optique (DO) à 600nm sur un spectrophotomètre Ultrospec 10 (*Amersham Biosciences*). À l'inoculation des bactéries, DO = 0.15. Les bactéries ont été laissées à croître dans l'agitateur-incubateur (37°C, 180 rpm) durant 2h. Une fois une DO de 0.8 atteinte, la production de l'ELP a été induite par l'ajout dans le milieu de culture d'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) pour une concentration finale de 0,5 mM. La culture a ensuite été laissée dans l'agitateur-incubateur (25°C, 180 rpm) pendant 22h. Un suivi de cette production a été réalisé par prélèvement du milieu de culture à l'incubation (t0) et 5h et 22h plus tard (t5h, t22h). La DO a été mesurée et le contenu protéique analysé par électrophorèse sur gel SDS-PAGE.

Purification par Cycle de Transition Inverse ou ITC

La culture a été stoppée 22h après induction de la production par l'IPTG et les bactéries culotées par centrifugation (3 000 g, 4°C, 15 min). Le culot a été resuspendu dans de l'eau déionisée à une concentration de 50 mg/mL et congelé à -20°C durant une nuit. Après décongélation à 25°C, les cellules ont été lysées par sonication dans un bain de glace : impulsions de 4 s de sonication suivies de 8 s d'arrêt, pour une durée totale de sonication de 3 x 15 min (temps total = 3 x 45 min). Le lysat bactérien a ensuite été centrifugé (7 000 g, 4°C, 20 min) et le culot éliminé. Le surnageant a alors été purifié par cycle de transition inverse (ITC).

Un prélèvement du lysat bactérien avant centrifugation a été centrifugé séparément, et les fractions soluble et insoluble analysées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE.

Le protocole d'ITC correspond à des cycles de centrifugation-resolubilisation. Une première centrifugation du surnageant a été réalisée à chaud (8 000 g, 32°C, 10 min) et le surnageant éliminé. Le culot protéique a ensuite été resolubilisé dans 50 mL d'eau déionisée à 4°C durant une nuit. Une deuxième étape de centrifugation (8 000 g, 4°C, 10 min) a été effectuée à froid, et le culot éliminé. La précipitation des ELPs présents dans le surnageant a alors été favorisée par l'ajout de NaCl (1,5 M au cycle 1, 1 M au cycle 2, 0,5 M au cycle 3) et un maintien à 32°C pendant 35 min dans un bain marie. Ce cycle a été reproduit 3 fois.

À la fin de la dernière centrifugation à froid, le surnageant a été récupéré et le NaCl éliminé par dialyse (membrane de 3,5 kD) contre de l'eau déionisée. Un suivi par conductimétrie a été effectué pour déterminer la fin de la dialyse (environ 5 jours, 3 bains par jours). La solution a enfin été lyophilisée pour obtenir les ELPs sous forme de solide blanc cotonneux et peu dense avec des rendements d'environ 110 mg/L de culture (ELPn60), 116 mg/L de culture (ELPn80) et 73 mg/L de culture (ELPn100).

Un suivi de la production et de la purification a été effectué par analyse électrophorèse sur gel SDS-PAGE des différents prélèvements du milieu : au moment de l'induction (t0), 5h et 22h plus tard (t5h, t22h), après la lyse des cellules (fractions soluble et insoluble), et après purification. Les ELPs ont ensuite été caractérisés par TGA, RMN, SEC et MALDI.

Oxydation des résidus méthionine en sulfoxyde

Une solution d'ELPn60 (50 mg, 1,97 µmol) est préparée dans 5 mL d'un mélange de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 30% avec 1% d'acide acétique glacial. La réaction est laissée à température ambiante sous agitation durant 20 min, puis est stoppée par addition de thiosulfate de sodium à 1 M (≈ 100 µL). La solution est purifiée par dialyse (membre 1 kD) contre de l'eau déionisée pendant 3 jours (3 bains par jour). Après lyophilisation, un solide blanc est obtenu avec un rendement massique de 97%. Une analyse ¹H RMN traduit une oxydation totale des méthionines en sulfoxyde.

Oxydation des résidus méthionine en sulfone

Une solution d'ELPn80 (50 mg, 1,48 μmol) est préparée dans 1.5 mL d'un mélange de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 30% avec 1% d'acide formique glacial. La réaction est laissée à température ambiante sous agitation durant 6h, puis est stoppée par addition de thiosulfate de sodium à 1 M ($\approx 100 \mu\text{L}$). La solution est diluée avec 4 mL d'eau déionisée et purifiée par dialyse (membre 10 kD) contre de l'eau déionisée pendant 3 jours (3 bains par jour). Après lyophilisation, un solide blanc est obtenu avec un rendement massique de 99%. Une analyse ^1H RMN traduit une oxydation totale des méthionines en sulfone.

Synthèse du hyaluronane-azoture (HA-N₃)

Le hyaluronane HA_{5k} (500 mg, 110 μmol , 1 équiv.) est dissout dans 3 mL de tampon acétate (AcONa/AcOH , 2M, pH 5,5) à 50°C. Le linker azoture (390 mg, 3 mmol, 30 eq) et le sodium cyanoborohydrure (62,84 mg, 1 mmol, 10 eq) sont ajoutés et le mélange est laissé sous agitation à 50°C pendant 5 jours (Thermomixer, 600 rpm). La solution est purifiée par dialyse (membrane de pores 1 kD). Les deux premiers bains se font contre un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (1:1), les 4 suivants contre de l' H_2O déionisée. Après lyophilisation, le produit obtenu est un solide blanc très friable avec un rendement massique $r = 84\%$.

Un batch de 1 g de HA_{4,6k}-N₃ a été synthétisé selon ce protocole par le Dr Ye Xiao et a été utilisé durant toute la thèse. Le protocole pour la fonctionnalisation des HA_{24k} et HA_{42k} est sensiblement le même, à l'exception de l'utilisation d'un linker azoture commercial (3-Azido-1-propanamine) et des quantités plus faibles : 100 mg de HA, et 20 équivalents de 3-Azido-1-propanamine et de NaBH_3CN . Les rendements massiques moyens sont respectivement de $r_{24k} = 86\%$ (N=3) et $r_{42k} = 82\%$ (N=5).

Synthèse de l'ELP-alcyne aliphatique

L'ELPn60 est dissout dans 10 mL de DMF (200 mg, 7,88 μmol , 1 équiv.) sous atmosphère inerte (Ar) dans un ballon de 100 mL. Du DIPEA y est ajouté (15,3 mg, 118,2 μmol , 15 équiv.), puis de l'ester de propargyl-N-hydroxysuccinimidyl (30,7 mg, 157,6 μmol , 20 équiv.). L'ensemble est laissé sous agitation et atmosphère inerte à température ambiante pendant 2 jours.

La purification est effectuée après dilution avec 20 mL d'eau déionisée par dialyse (membrane de pores 3,5 kD) contre de l' H_2O déionisée pendant 4 jours. Après lyophilisation, le produit obtenu est un solide blanc cotonneux avec un rendement massique $r = 94\%$.

Un protocole similaire est appliqué pour la fonctionnalisation des ELPn80 et n100. Les rendements massiques sont alors respectivement de $r_{n80} = 97\%$ et $r_{n100} = 94\%$.

Synthèse de l'ELP-DBCO

L'ELPn80 (200 mg, 5,93 μmol , 1 équiv.) est dissout dans 2 mL DMF sous atmosphère inerte (Ar). Le DIPEA y est ajouté (3,07 mg, 23,74 μmol , 4 équiv.), puis l'ester de DBCO-C6-NHS (12,8 mg, 29,67 μmol , 5 équiv.). L'ensemble est laissé sous agitation, atmosphère inerte et à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 2 jours. La purification se fait par précipitation dans de l'éther diéthylique froid. L'ELP est culoté par centrifugation à froid (surnageant éliminé) puis redissout dans de l' H_2O déionisée à froid. La solution est ensuite dialysée (membrane de pore 3,5 kD) contre de l' H_2O déionisée pendant 1-4 jours (6 bains). Le produit final est obtenu par lyophilisation : il s'agit d'un solide blanc cotonneux. (Rendement massique moyen = 85% (N=8)).

Synthèse des bioconjugués HA-ELP par CuAAC

Du DMF et de l'eau déionisée sont préalablement dégazés à l'argon. Tout le protocole se fait sous atmosphère inerte (Ar).

Un tampon TEAA est préparé : 2,8 mL de triéthylamine + 1,2 mL d'acide acétique + 6,0 mL d'eau déionisé. $V_{\text{tot}} = 10 \text{ mL}$, ajustement à pH 7 avec une solution de soude à 5M.

L'ELPn80-alcyne (40 mg, 1,19 μmol , 1 équiv.) est dissout dans le DMF et le HA-N₃ (2,76 mg, 0,59 μmol , 0,5 équiv.) dans l'eau déionisée. Les deux solutions sont ensuite assemblées dans un ratio volumique 1:1 pour obtenir des concentrations finales en présence de tampon TEAA 10%. Des solutions de PMDETA, ascorbate de sodium et CuSO₄ sont préparées dans l'eau déionisée dégazée. Le PMDETA (0,31 mg, 1,78 μmol , 1,5 équiv.) et l'ascorbate de sodium (2,35 mg, 11,86 μmol , 10 équiv.) sont ajoutés sous agitation au mélange réactionnel. Après 2 minutes d'homogénéisation, la solution de CuSO₄ (0,44 mg, 1,78 μmol , 1,5 équiv.) est ajoutée. Un bullage à l'argon supplémentaire de 5-15 min est effectué. La réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 2 jours.

Après réaction, le mélange est dilué dans un volume au moins 5 fois supérieur d'eau déionisée. Le cuivre restant est éliminé par chélation durant 1 nuit, à raison d'au moins 20 mg de Cuprisorb (*SeaChem*) par mg de CuSO₄. La solution récupérée est purifiée par dialyse (membrane de pores 3,5 kD) contre de l'eau déionisée pendant 3 jours ou par filtration-centrifugation sur des filtres à centrifuger Amicon Ultra-15 (*Merck Millipore*) 3 kD : 4 cycles d'ajout d'eau déionisée suivi d'une centrifugation à 4500 rpm, 10°C, pendant 30 min.

La solution rincée est ensuite purifiée par centrifugation à chaud : chauffage à 35°C pendant 10 min dans un Thermomixer™ Eppendorf (*ThermoFisher Scientific*) puis centrifugation à 10 000 g, 35°C durant 10 min. Le surnageant contenant le bioconjugué est séparé du culot contenant l'ELP en excès. Celui-ci est repris dans 1 mL d'eau déionisée. Le bioconjugué est récupéré par lyophilisation, pour obtenir un solide blanc cotonneux.

Rendement massique total $r = 94\%$, taux de couplage $\eta = 96\%$.

Le protocole est appliqué pour la synthèse des bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn60 et HA_{4,6k}-ELPn100 pour des rendements massiques $r_{n60} = 82\%$ et $r_{n100} = 75\%$ et des taux de couplage $\eta_{n60} = 93\%$ et $\eta_{n100} = 75\%$

$$\text{Rendement massique total : } r = \frac{\text{masse surnageant} + \text{masse culot}}{\text{masse ELP} + \text{masse HA initiales}} \times 100$$

(estimation des pertes de matière)

$$\text{Taux de couplage : } \eta = \frac{\text{masse surnageant}}{\text{masse bioconjugué théorique}} \times 100$$

(estimation du succès de la réaction de couplage)

Synthèse des bioconjugués HA-ELP par SPAAC

L'ELPn80-DBCO (20 mg, 0,59 μmol , 1 équiv.) et le HA_{4,6k}-N₃ (1,37 mg, 0,29 μmol , 0,5 équiv.) sont séparément dissous dans 500 μL de l'eau déionisée préalablement dégazée à l'argon, puis assemblées. Une mise sous atmosphère inerte est effectuée (Ar) et le mélange est laissé sous agitation à froid (bain de glace ou frigo) pendant 2 jours.

Le mélange réactionnel est ensuite purifié par centrifugation à chaud : chauffage à 35°C pendant 5 min dans un Thermomixer™ Eppendorf (*ThermoFisher Scientific*) puis centrifugation à 10 000g, 35°C durant 5 min. Le surnageant contenant le bioconjugué est séparé du culot contenant l'ELP en excès. Celui-ci est repris dans 1 mL d'eau déionisée. Le bioconjugué est récupéré par lyophilisation, pour obtenir un solide blanc cotonneux. Rendement massique total moyen $r = 95\%$, taux de couplage moyen $\eta = 78\%$. Le protocole est le même pour les autres bioconjugués, ainsi que pour la synthèse du composé PEG_{5k}-ELPn80 ($r = 95\%$, $\eta = 83\%$ (N = 3)).

Tableau II-5 : Récapitulatif des rendements de synthèse de la librairie par SPAAC

Rendement (%)		HA		
		4.6 kDa	24 kDa	42 kDa
ELP [M ₁ V ₅ -n]				
n = 60	25.4 kDa	84% ± 19 (N=4)	74% ± 17 (N=4)	95% ± 3 (N=3)
n = 80	33.7 kDa	78% ± 10 (N=12)	62% ± 11 (N=6)	71% ± 13 (N=7)
n = 100	42 kDa	80% ± 12 (N=6)	55% ± 6 (N=5)	78% ± 12 (N=5)

Recyclage :

Le protocole ci-dessus a été appliqué en utilisant l'ELP-DBCO provenant de la lyophilisation du culot d'une expérience de SPAAC précédente.

Tableau II-6 : Rendements de synthèse par SPAAC avec recyclage de l'ELP engagé dans une synthèse précédente

Bioconjugué	r moyen (%)	η moyen (%)
HA _{4,6k} -ELPn80	91	39
PEG _{4,6k} -ELPn80	87	72
HA _{4,6k} -ELPn80-rhodamine	70	26



Mise sous atmosphère inerte (argon) des synthèses de bioconjugués HA-b-ELP

Caractérisations & Méthodes

Électrophorèse sur gel SDS-Page

Les analyses par électrophorèse ont été menées sur gel SDS-PAGE (*BioRad MiniPROTEAN TGX, non teinté, gradient 4%-20%*). Des prélèvements ont été effectués avant purification (tf), et après centrifugation à 35°C dans le surnageant (sur) et dans le culot (clt, préalablement repris dans 1 mL d'eau déionisée). Les échantillons ont été réalisés par dilution dans de l'eau déionisée d'un facteur 1/5 (tf), 3/10 (sur), et 1/10 (clt), en présence de tampon Laemmli (*Biorad*). Un volume de 10 µL de chaque solution a ensuite été déposé. Une échelle de taille (*Biorad Precision Plus Protein Unstained Standards*) de 10 kDa – 250 kDa a été utilisée. Le solvant d'analyse est un tampon Tris/Glycine/SDS obtenu par dilution d'un facteur 10 du tampon commercial (*Biorad 10X TGS*). L'analyse est menée sur un appareil BioRad MiniPROTEAN® Tetra System à tension constante (300 mV), pour une intensité de 25 mA par gel, durant 45 min. Le gel est ensuite rincé et imagé par un appareil BioRad GelDoc™ EZ Imager. L'acquisition et le traitement des données sont effectués sur le logiciel BioRad.

Dans le cas de l'analyse des espèces fonctionnalisées avec un fluorophore, la dilution des prélèvements est 5 fois plus importante et les dépôts sont de 7 µL.

Calcul du taux de couplage pour la synthèse des bioconjugués par CuAAC avec HA-N₃ en excès

Le calcul du taux de couplage peut être effectué à partir de l'analyse des gels d'électrophorèse au moyen du logiciel Image J (**Figure II-25**). Dans ce logiciel, une piste du gel correspondant à une synthèse avant purification est sélectionnée. L'intensité des niveaux de gris est ensuite tracée automatiquement selon une ligne verticale (flèche rouge pointillée). Deux zones se distinguent : une large aire A₁ correspond au smear et donc au dibloc HA-ELP, tandis qu'une plus petite A₂ est caractéristique de la bande d'ELP seul n'ayant pas réagi. Le rapport de l'aire A₁ sur l'aire totale (A₁ + A₂) permet de remonter au taux d'ELP ayant été intégré dans un dibloc, et donc de calculer le taux de couplage.

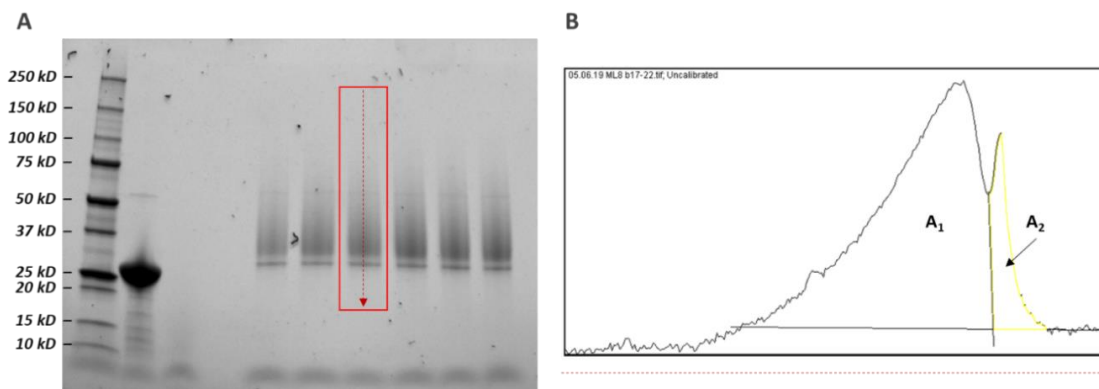


Figure II-25 : Illustration de la méthode de calcul du taux de conversion par le logiciel Image J. A : Gel d'électrophorèse SDS Page de synthèses du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn60. Encadré rouge : sélection de la piste à analyser. B : Plot de l'intensité des niveaux de gris selon la flèche rouge indiquée en A. Taux de conversion $\eta = A_1 / (A_1 + A_2) * 100$ avec A₁ : smear, HA-ELP et A₂ : bande, ELP-alcyne non couplé.

Analyse Thermogravimétrique (TGA)

Les analyses thermogravimétriques ont été réalisées sur un appareil Q500 (TA Instruments®). Environ 8 mg d'ELP lyophilisés ont été soumis à une rampe de température allant de 20°C à 900°C à 10°C/min. La première partie de la rampe (20°C-600°C) a été réalisée sous flux d'azote (100 cm³/min), et la deuxième (600°C-900°C) sous flux d'air (100 cm³/min). La perte de masse est représentée en fonction de la température. La masse perdue à 100°C correspond à l'eau liée à l'ELP, tandis que celle restant à la fin de l'analyse correspond aux sels inorganiques éventuellement présents après purification.

Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Les analyses de SEC ont été effectuées sur un appareil Ultimate 3000 (Thermoscientific®) équipé d'un système de triple détection : détection UV par barrettes de diodes, détection de diffusion de la lumière multi-angles (MALS, 18 angles) et détection d'indice de réfraction différentiel (dRI) par un capteur Wyatt®. Deux protocoles différents ont été appliqués :

Un éluant constitué d'un mélange d'acétonitrile (ACN, 35%) et d'un tampon aqueux (65%) d'acide acétique (0,3 M) et d'acétate d'ammonium (0,2 M) a été utilisé avec deux colonnes TOSOH : une première de limites d'exclusion : < 10⁶ g/mol (référence G4000PWXL, 7.8*300), et une deuxième de limite d'exclusion : < 2 x 10⁵ g/mol (référence G3000PWXL, 7.8*300).

Un autre éluant composé d'un tampon aqueux de nitrate de sodium (NaNO₃, 0,1 M), de dihydrogénophosphate de sodium (NaH₂PO₄, 0,05 M) et d'azoture de sodium (NaN₃, 0,02%) à pH 9 a été utilisé avec des colonnes Shodex OH Pack KD : une première SB G (guard 6*40) suivie de deux SB 804 HQ (8 * 300) de limite d'exclusion 5 x 10³ – 4 x 10⁵ g/mol.

Les échantillons ont été préparés dans cet éluant à une concentration de 2 mg/mL en présence d'éthylène glycol (référence). L'éluant comme les échantillons ont été filtrés à 0,22 µm sur de l'acétate de cellulose. L'analyse a été réalisée avec un débit de 0.6 mL/min à respectivement 50 bar et 35 bar et les colonnes sont thermostatées à 26°C.

Les données ont été traitées sur le logiciel Astra, et les masses molaires ont été calculées en employant une valeur de dn/dc de 0,1391, précédemment mesurée pour l'ELPn40.

Spectrométrie de masse (MALDI) :

Les analyses de spectrométrie de masse ont été effectuées par ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI) sur un spectromètre MALDI-TOF (*Autoflex maX TOF, Bruker Daltonics*) équipé d'un laser SMART-beam II (Nd:YAG, 355 nm).

Les échantillons ont été préparés par re-solubilisation des composés lyophilisés dans un mélange H₂O/ACN (1:1) à une concentration de 10 mg/mL. La matrice quant-à-elle est composée d'acide sinapic à 10 mg/mL dans un mélange H₂O/ACN (1:1) en présence de TFA 0.1%. Un mélange de 10% de solution d'échantillon et 90% de matrice a ensuite été déposé sur une plaque à raison de 2 x 1,5 µL. Les mesures ont été réalisées en mode linéaire positif, sans calibration. Une analyse de l'espèce avant fonctionnalisation est effectuée systématiquement afin de servir de référence.

Spectrométrie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) :

Les spectres de ¹H RMN, ¹³C RMN, HSQC et COSY acquis à 277 K (4°C) l'ont été sur un spectromètre Bruker Advance NEO 400 fonctionnant à 400,3 MHz et équipé d'une cryo-sonde (multinuclear z-gradient direct cryoprobe-head, 5mm, *Bruker*,). Les spectres de ¹H RMN acquis à 298 K (25°C) l'ont été sur un spectromètre Bruker AVANCE III HD-400 fonctionnant également à 400,3 MHz.

Les échantillons ont été préparés à partir des composés lyophilisés par re-solubilisation dans 400 µL de D₂O (*Eurisotop*) pour une concentration d'environ 8 mg/mL. Le pic de solvant a été pris comme référence ($\delta = 4,69$ ppm à 277 K). Les spectres ont été traités avec le logiciel TopSpin.

Turbidimétrie

La T_{cp} a été déterminée par mesure de turbidimétrie sur un spectrophotomètre UV-Visible Cary 100 équipé d'un dispositif multicellules régulé en température (*Agilent Technologies*). Les mesures ont été effectuées en simultanée à 350 nm pour des solutions d'ELP dans un tampon TRISs ou PBS sur une gamme de concentrations comprises entre 1 µM - 1000 µM. Elles ont été soumises à des rampes de température allant de 10°C à 50° - 70°C, à 1°C/min, et 3 mesures par degré. L'absorbance des échantillons est normalisée par celle du PBS seul, et tracée en fonction de la température. La T_{cp} est définie comme étant la température au point d'inflexion, repéré par le maximum de la dérivée première.

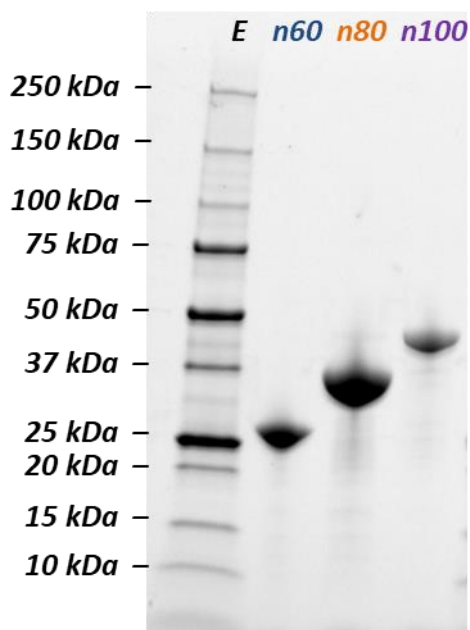
Diffusion dynamique de la Lumière (DLS)

Les analyses par DLS ont été réalisées sur un instrument NanoZS (Malvern, laser 633 nm) à un angle de 173°, à raison de 70 µL de solution dans une cuve en quartz (*Hellma Analytics High Precision Cell with Quartz SUPRASIL*, de chemin optique 3x3 mm).

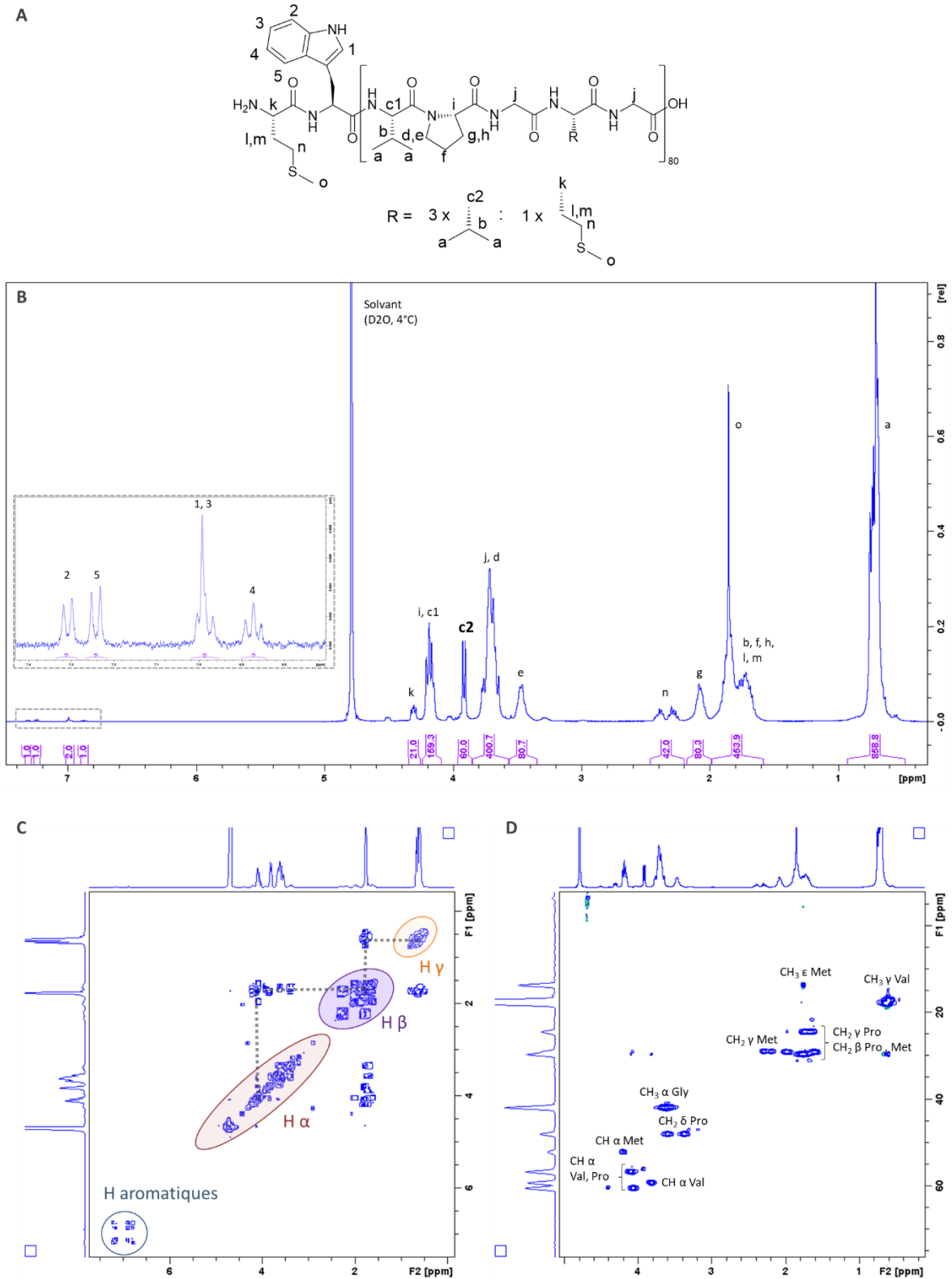
Les évolutions de l'intensité diffusée (DCR, intensité diffusée normalisée par le facteur d'atténuation) et de la taille des objets en solution (Z-Average) en fonction de la température ont été évaluées lors de rampes de température ascendantes, à raison de 3 mesures de 3 x 10s tous les 2°C.

La T_{cp} est définie comme étant la température au point d'inflexion de la DCR, repéré par le maximum de la dérivée première.

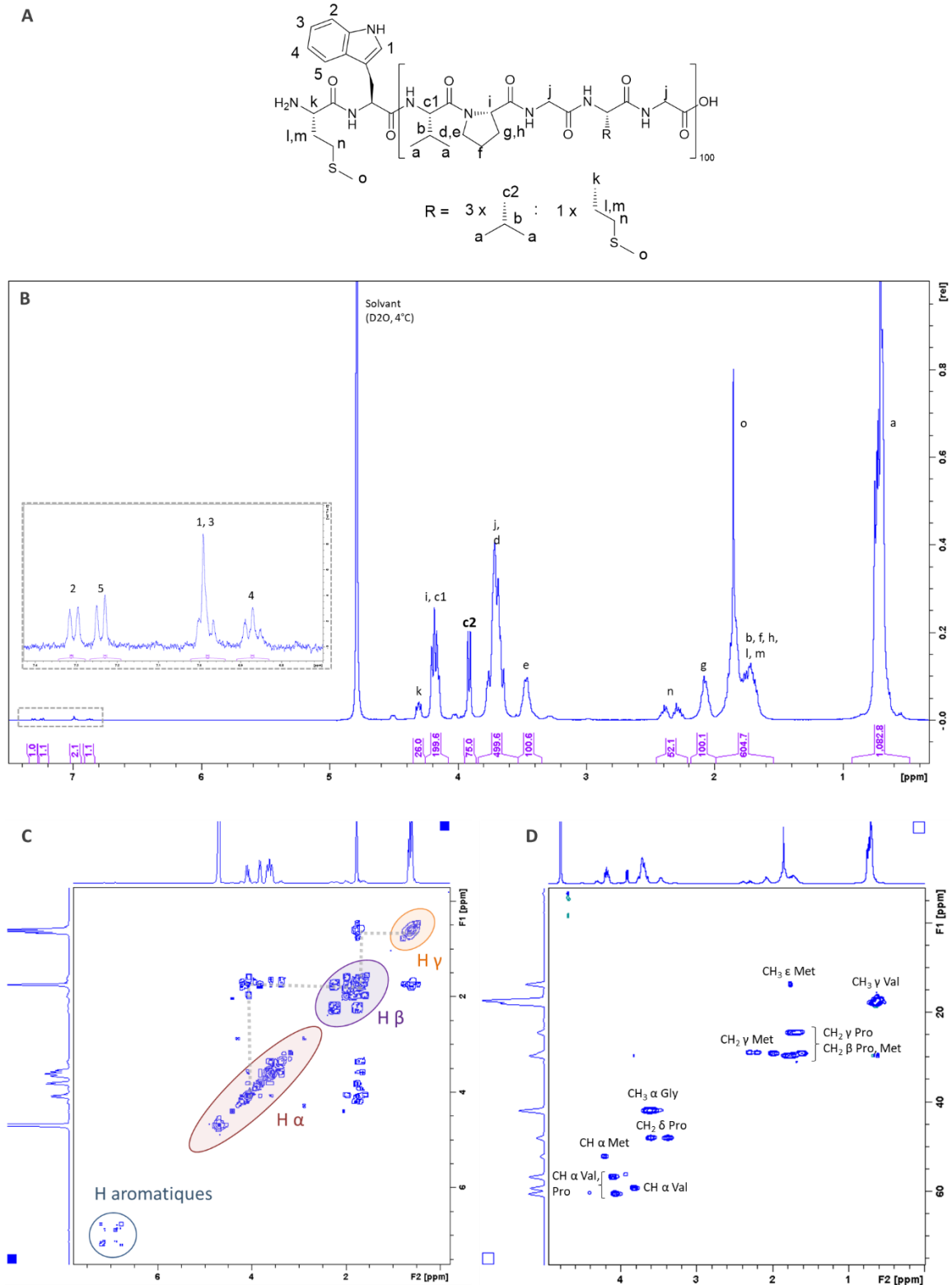
ANNEXES



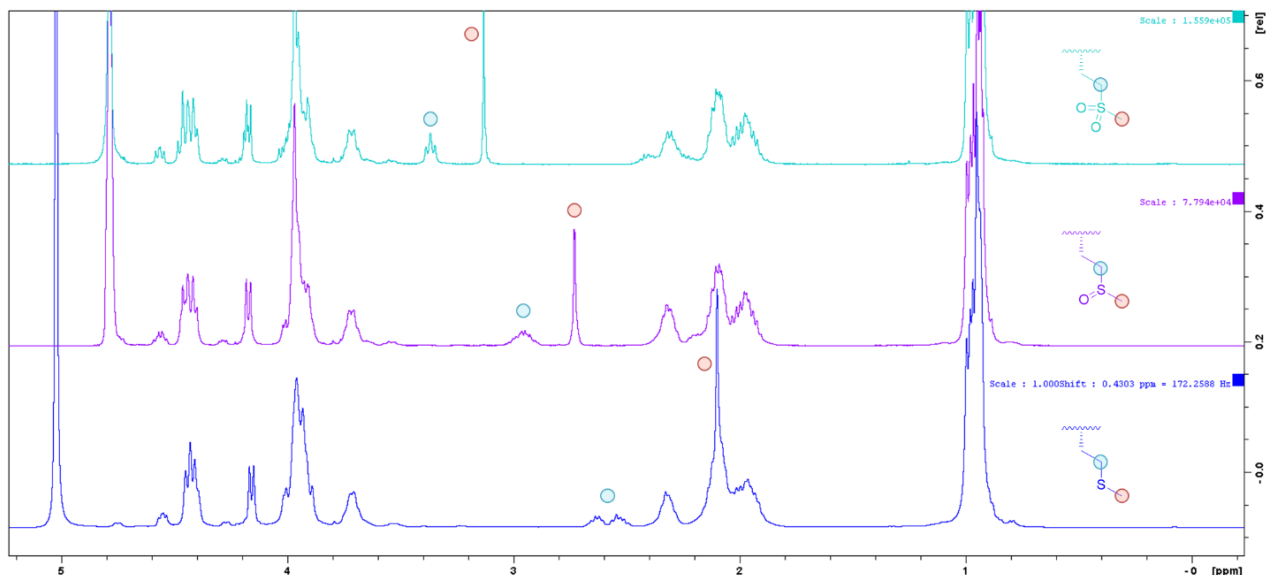
Annexe II-1 : Gel SDS-PAGE de la production des ELPn60, ELPn80 et ELPn100. E : échelle de tailles. Masses molaires calculées : ELPn60 : 25,6 kDa (th : 25,4 kDa), ELPn80 : 32,5 kDa (th : 33,7 kDa), ELPn100 : 42,5 kDa (th : 42,0 kDa)



Annexe II-2 : Caractérisation par RMN de l'ELPn80 (400 MHz). A : Structure chimique et attribution des protons. B : Spectre RMN ^1H . Pic de référence pour l'intégration : c2 (CH Valine VPGVG, 60 H). Encart : zoom à 6.5-7.4 ppm, protons aromatiques du tryptophane. C : Spectre COSY. Mise en évidence des protons en α , β , et γ de la chaîne peptidique, des protons aromatiques, et des couplages entre eux. D : Spectre HSQC, relation proton-carbone.



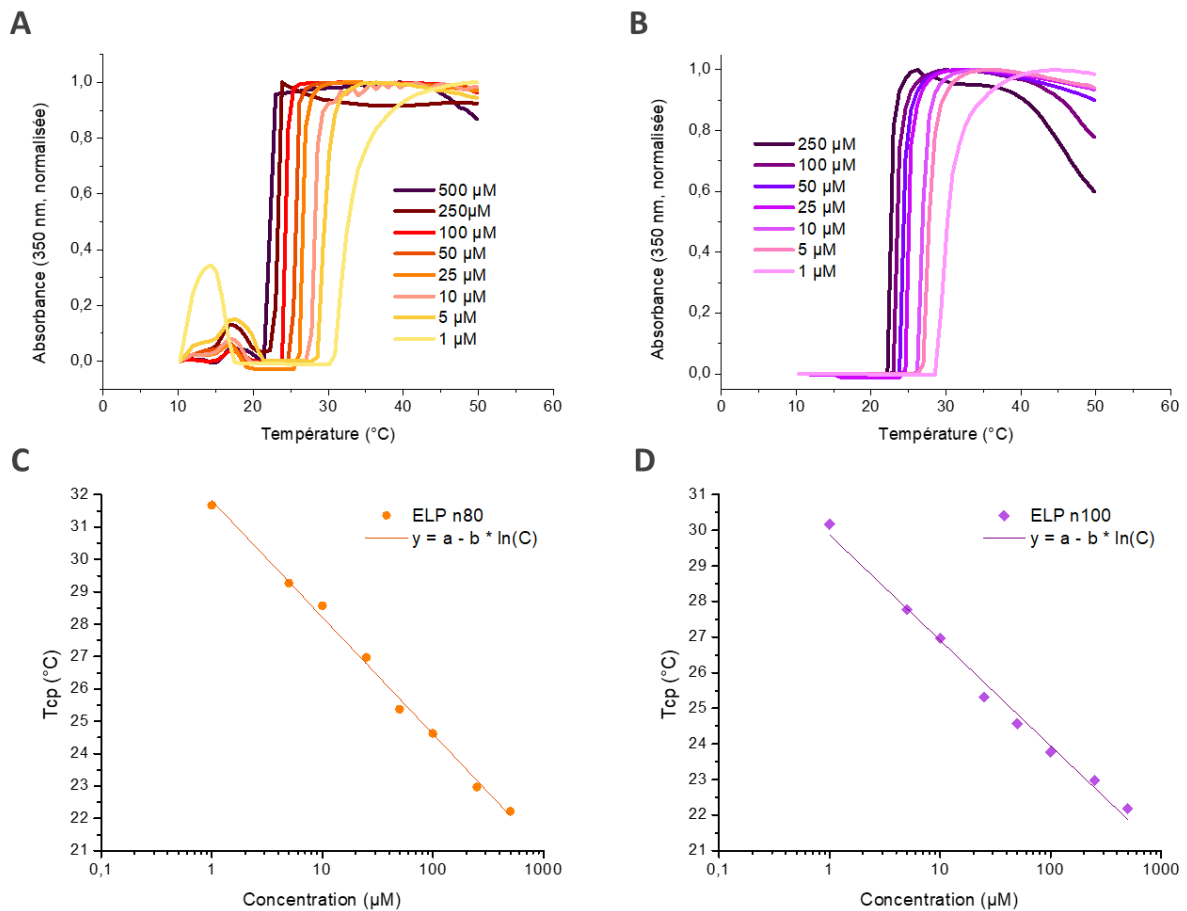
Annexe II-3 : Caractérisation par RMN de l'ELPn100 (400 MHz). A : Structure chimique et attribution des protons. B : Spectre RMN 1H . Pic de référence pour l'intégration : c2 (CH Valine VPGVG, 75H). Encart : zoom à 6.5-7.4 ppm, protons aromatiques du tryptophane. C : Spectre COSY. Mise en évidence des protons en α , β , et γ de la chaîne peptidique, des protons aromatiques, et des couplages entre eux. D : Spectre HSQC, relation proton-carbone.



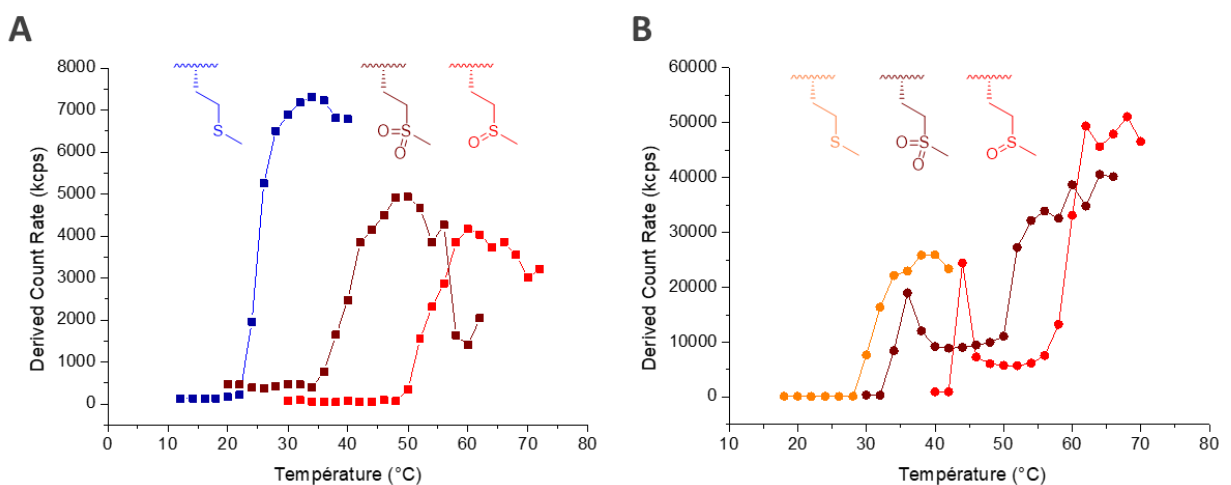
Annexe II-4 : Spectres RMN d'un ELP n60 en fonction du degré d'oxydation de ses méthionines. Bleu : ELP natif non oxydé (RMN Prodigy 400 MHz, 4°C), Violet : ELP avec oxydation des méthionines en sulfoxydes (RMN Advance 400 MHz, 25°C), Cyan : ELP avec oxydation des méthionines en sulfones (RMN Advance 400 MHz, 25°C). Déblindage progressif des signaux des protons du CH₃ (rouge) et du CH₂ (bleu clair) avec l'augmentation du degré d'oxydation.

Signaux expérimentaux	Intégration théorique			Intégration expérimentale		
	n60	n80	n100	n60	n80	n100
a	630	840	1050	<i>681,3</i>	<i>858,8</i>	<i>1082,8</i>
b,f,h,l,m,o	335	445	555	<i>398,3</i>	<i>453,9</i>	<i>604,7</i>
g	60	80	100	60,3	80,3	100,1
n	32	42	52	32,0	42,0	52,1
e	60	80	100	60,2	80,7	100,6
j,d	300	400	500	304,3	400,7	499,6
c2	45	60	75	45,0	60,0	75,0
i, c1	120	160	200	119,6	159,3	199,6
k	16	21	26	16,0	21,0	26,0
4	1	1	1	1,0	1,0	1,1
1, 3	2	2	2	1,9	2,0	2,1
5	1	1	1	0,9	1,0	1,1
2	1	1	1	1,0	1,0	1,0

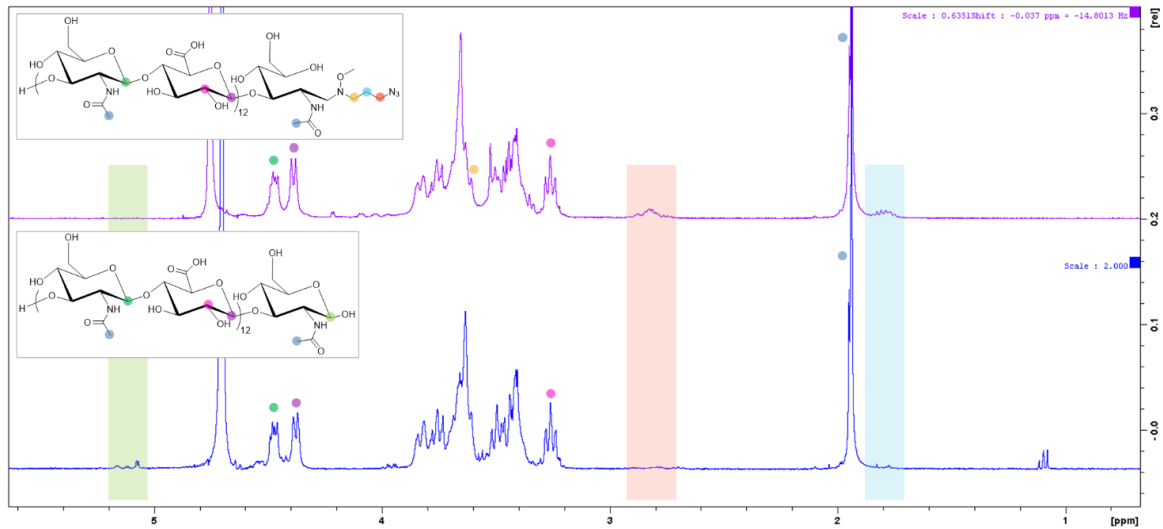
Annexe II-5 : Tableau récapitulatif des intégrations théoriques et expérimentales des signaux de ¹H RMN des ELPn60, n80 et n100. Le signal utilisé pour la calibration est le c2 (gras). Les deux premiers massifs (rouge italique) ont une intégration expérimentale trop élevée comparée à l'intégration théorique.



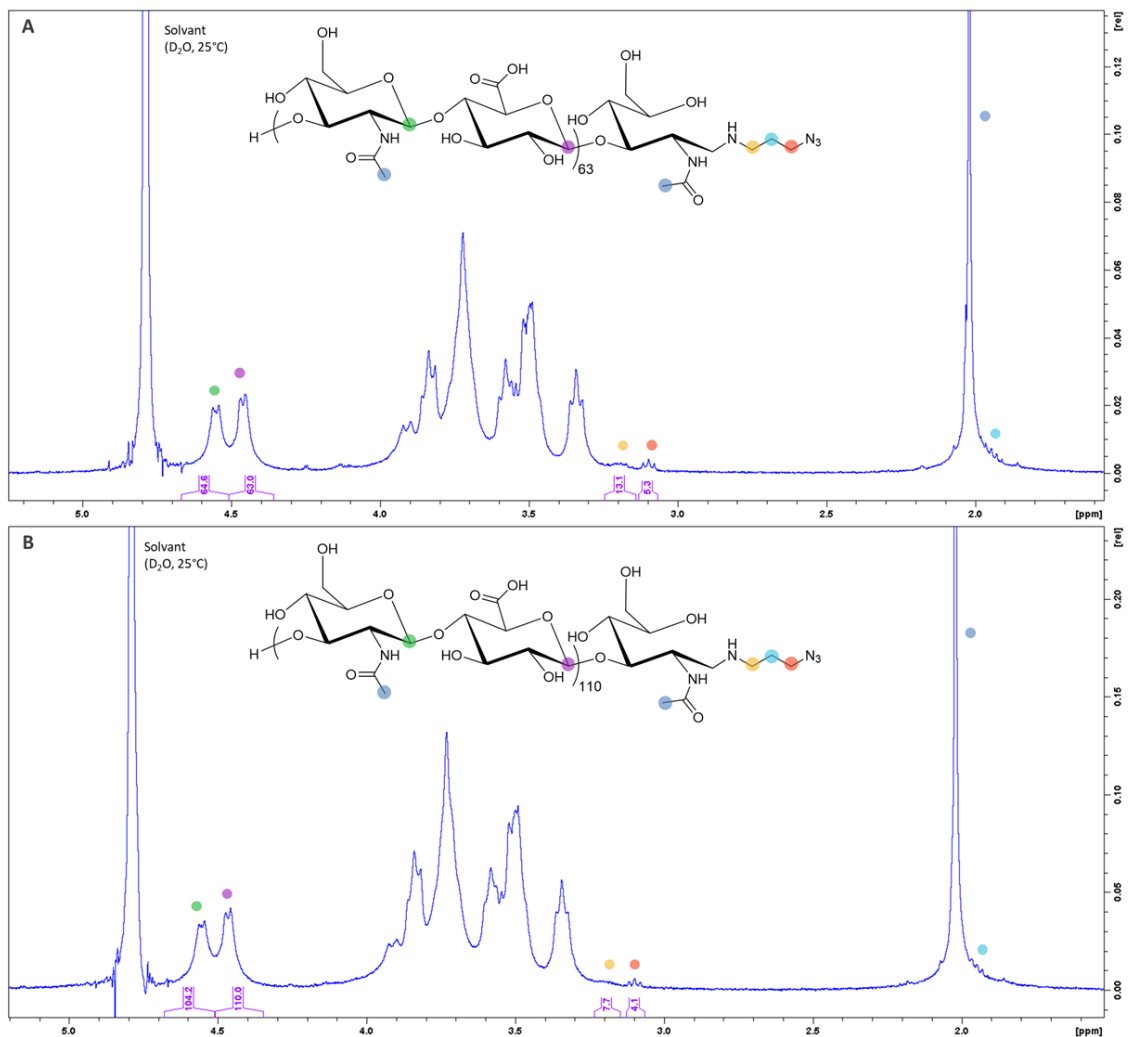
Annexe II-6 : Caractérisation de la thermosensibilité des ELP80 (A, C) et n100 (B, D) par turbidimétrie. A, B : évolution de l'absorbance (normalisée) en fonction de la température de solutions d'ELP à différentes concentrations (TRISs). C, D : Évolution de la T_{cp} en fonction de la concentration (échelle logarithmique). Les droites correspondent à une régression logarithmique d'équation $y = a - b \cdot \ln(C)$.



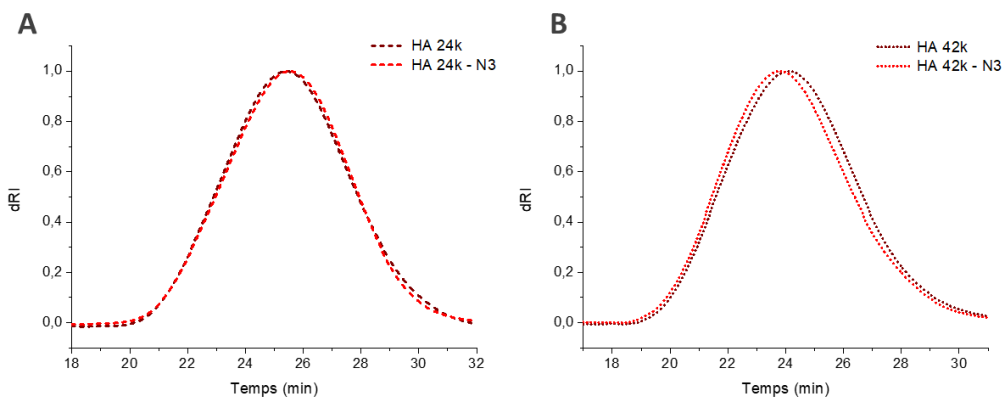
Annexe II-7 : Évolution de l'intensité diffusée mesurée par DLS en fonction de la température pour des ELPn60 (A, 100 μM TRISs) et n80 (B, 26 μM, PBS) à différents degrés d'oxydation de la méthionine : native (bleu), sulfoxide (orange), sulfone (bordeaux).



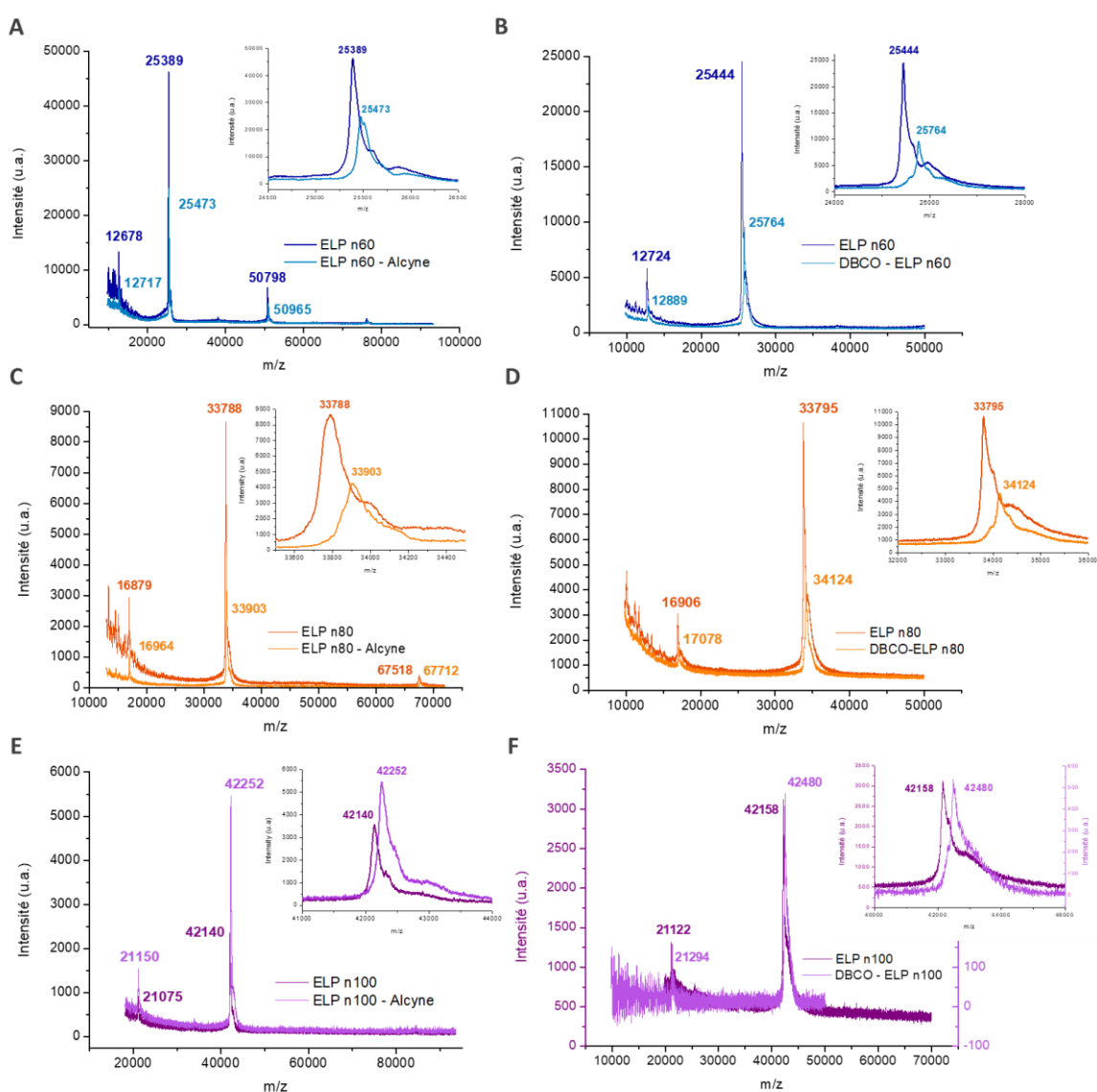
Annexe II-8 : Comparaison des spectres RMN ^1H du $\text{HA}_{4,6k}$ (400 MHz) avant et après fonctionnalisation avec un groupement azoture. Les bandes de couleur indiquent les différences principales (disparition du proton anomère et apparition des signaux de la molécule (1)).



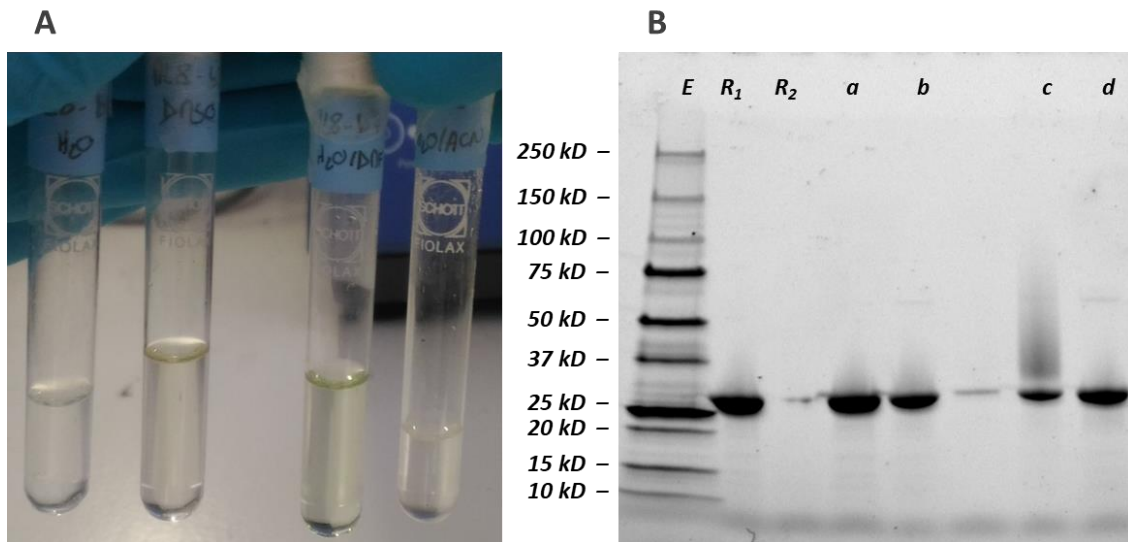
Annexe II-9 : Spectre RMN ^1H des espèces $\text{HA}_{24k}\text{-N}_3$ (A) et $\text{HA}_{42k}\text{-N}_3$ (B) (400 MHz). Une approximation est faite sur le nombre de répétition du disaccharide, ce qui entraîne une incertitude sur l'intégration des autres pics. Pic de référence pour l'intégration : violet (CH anomère de l'unité glucuronique).



Annexe II-10 : Spectrogrammes normalisés de SEC du HA_{24k} (A) et HA_{42k} (B) avant et après fonctionnalisation par une fonction azoture (tampon phosphate).



Annexe II-11 : Caractérisation par spectroscopie de masse MALDI des ELPn60 (bleu), n80 (orange), et n100 (violet) natifs et fonctionnalisés avec un alcyne terminal (gauche) ou un DBCO (droite). Encart : zoom sur la zone d'intérêt.



Annexe II-12 : Tests de différents solvants pour la synthèse du bioconjugué HA_{4,6k}-ELP n60 par CuAAC
 A : Illustration des solutions réactionnelles de CuAAC dans : H₂O mQ – DMSO – H₂O/DMF (1:1) – H₂O/ACN (1:1). La couleur jaune pâle provient de la présence d'ions Cu (I) en solution. B : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE de ces mêmes réactions. E : échelle de taille ; R₁ : ELPn60 (référence) ; R₂ : HA_{4,6k} (référence) ; a : DMSO ; b : H₂O ; c : H₂O/DMF ; d : H₂O/ACN. Seule la piste c présente un smear, donc la réaction la plus efficace se fait dans le mélange H₂O/DMF.

RÉFÉRENCES

- (1) Upadhyay, K. K.; Meins, J.-F. L.; Misra, A.; Voisin, P.; Bouchaud, V.; Ibarboure, E.; Schatz, C.; Lecommandoux, S. Biomimetic Doxorubicin Loaded Polymersomes from Hyaluronan- Block -Poly(γ -Benzyl Glutamate) Copolymers. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (10), 2802–2808. <https://doi.org/10.1021/bm9006419>.
- (2) Upadhyay, K. K.; Bhatt, A. N.; Mishra, A. K.; Dwarakanath, B. S.; Jain, S.; Schatz, C.; Le Meins, J.-F.; Farooque, A.; Chandraiah, G.; Jain, A. K.; Misra, A.; Lecommandoux, S. The Intracellular Drug Delivery and Anti Tumor Activity of Doxorubicin Loaded Poly(γ -Benzyl L-Glutamate)-b-Hyaluronan Polymersomes. *Biomaterials* **2010**, *31* (10), 2882–2892. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.12.043>.
- (3) Upadhyay, K. K.; Bhatt, A. N.; Castro, E.; Mishra, A. K.; Chuttani, K.; Dwarakanath, B. S.; Schatz, C.; Le Meins, J.-F.; Misra, A.; Lecommandoux, S. In Vitro and In Vivo Evaluation of Docetaxel Loaded Biodegradable Polymersomes. *Macromol. Biosci.* **2010**. <https://doi.org/10.1002/mabi.200900415>.
- (4) Jeannot, V.; Mazzaferro, S.; Lavaud, J.; Vanwonderghem, L.; Henry, M.; Arboléas, M.; Vollaïre, J.; Jossierand, V.; Coll, J.-L.; Lecommandoux, S.; Schatz, C.; Hurbin, A. Targeting CD44 Receptor-Positive Lung Tumors Using Polysaccharide-Based Nanocarriers: Influence of Nanoparticle Size and Administration Route. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2016**, *12* (4), 921–932. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.018>.
- (5) Jeannot, V.; Gauche, C.; Mazzaferro, S.; Couvet, M.; Vanwonderghem, L.; Henry, M.; Didier, C.; Vollaïre, J.; Jossierand, V.; Coll, J.-L.; Schatz, C.; Lecommandoux, S.; Hurbin, A. Anti-Tumor Efficacy of Hyaluronan-Based Nanoparticles for the Co-Delivery of Drugs in Lung Cancer. *J. Controlled Release* **2018**, *275*, 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.02.024>.
- (6) Duan, H.; Donovan, M.; Foucher, A.; Schultze, X.; Lecommandoux, S. Multivalent and Multifunctional Polysaccharide-Based Particles for Controlled Receptor Recognition. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 14730. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32994-y>.
- (7) Xiao, Y. Synthesis and Self-Assembly of Polysaccharide-b-Elastin-like Polypeptide Bioconjugates. phdthesis, Université de Bordeaux, 2019.
- (8) Xiao, Y.; Chinoy, Z. S.; Pecastaings, G.; Bathany, K.; Garanger, E.; Lecommandoux, S. Design of Polysaccharide- b -Elastin-Like Polypeptide Bioconjugates and Their Thermoresponsive Self-Assembly. *Biomacromolecules* **2019**, [acs.biomac.9b01058](https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01058). <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01058>.
- (9) Rosselin, M.; Xiao, Y.; Belhomme, L.; Lecommandoux, S.; Garanger, E. Expanding the Toolbox of Chemoselective Modifications of Protein-Like Polymers at Methionine Residues. *ACS Macro Lett.* **2019**, *8* (12), 1648–1653. <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.9b00862>.
- (10) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem.* **2002**, *114* (14), 2708–2711. [https://doi.org/10.1002/1521-3757\(20020715\)114:14<2708::AID-ANGE2708>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1521-3757(20020715)114:14<2708::AID-ANGE2708>3.0.CO;2-0).
- (11) Presolski, S. I.; Hong, V. P.; Finn, M. G. Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Click Chemistry for Bioconjugation. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* **2011**, *3* (4), 153–162. <https://doi.org/10.1002/9780470559277.ch110148>.
- (12) Pickens, C. J.; Johnson, S. N.; Pressnall, M. M.; Leon, M. A.; Berkland, C. J. Practical Considerations, Challenges, and Limitations of Bioconjugation via Azide–Alkyne Cycloaddition. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29* (3), 686–701. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00633>.
- (13) Ess, D. H.; Jones, G. O.; Houk, K. N. Transition States of Strain-Promoted Metal-Free Click Chemistry: 1,3-Dipolar Cycloadditions of Phenyl Azide and Cyclooctynes. *Org. Lett.* **2008**, *10* (8), 1633–1636. <https://doi.org/10.1021/ol8003657>.
- (14) Shea, K. J.; Kim, J. S. Influence of Strain on Chemical Reactivity. Relative Reactivity of Torsionally Distorted Double Bonds in MCPBA Epoxidations. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (8), 3044–3051. <https://doi.org/10.1021/ja00034a042>.
- (15) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047. <https://doi.org/10.1021/ja044996f>.
- (16) Petitdemange, R. Chemoselective Modifications of Recombinant Elastin-like Polypeptides : Tuning Thermosensitivity and Bioactivity. phdthesis, Université de Bordeaux, 2016.
- (17) Kramer, J. R.; Petitdemange, R.; Bataille, L.; Bathany, K.; Wirotius, A.-L.; Garbay, B.; Deming, T. J.; Garanger, E.; Lecommandoux, S. Quantitative Side-Chain Modifications of Methionine-Containing Elastin-Like Polypeptides as a Versatile Tool to Tune Their Properties. *ACS Macro Lett.* **2015**, *4* (11), 1283–1286. <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.5b00651>.

- (18) Meyer, D. E.; Chilkoti, A. Quantification of the Effects of Chain Length and Concentration on the Thermal Behavior of Elastin-like Polypeptides. *Biomacromolecules* **2004**, *5* (3), 846–851. <https://doi.org/10.1021/bm034215n>.
- (19) Petitdemange, R.; Garanger, E.; Bataille, L.; Dieryck, W.; Bathany, K.; Garbay, B.; Deming, T. J.; Lecommandoux, S. Selective Tuning of Elastin-like Polypeptide Properties via Methionine Oxidation. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (2), 544–550. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01696>.
- (20) Weber, P.; Dzuricky, M.; Min, J.; Jenkins, I.; Chilkoti, A. Concentration-Independent Multivalent Targeting of Cancer Cells by Genetically Encoded Core-Crosslinked Elastin/Resilin-like Polypeptide Micelles. *Biomacromolecules* **2021**. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00897>.
- (21) Niskanen, J.; Karesoja, M.; Aseyev, V.; Qiu, X.-P.; Winnik, F. M.; Tenhu, H. Thermal Response of a PVCL–HA Conjugate. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2016**, *54* (3), 425–436. <https://doi.org/10.1002/pola.27794>.
- (22) Tømmeraas, K.; Melander, C. Kinetics of Hyaluronan Hydrolysis in Acidic Solution at Various PH Values. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (6), 1535–1540. <https://doi.org/10.1021/bm701341y>.
- (23) Wittig, G.; Krebs, A. Zur Existenz niedergliedriger Cycloalkyne, I. *Chem. Ber.* **1961**, *94* (12), 3260–3275. <https://doi.org/10.1002/cber.19610941213>.
- (24) Krebs, A.; Wilke, J. Angle Strained Cycloalkynes. In *Wittig Chemistry; Topics in Current Chemistry*; Springer: Berlin, Heidelberg, 1983; pp 189–233. <https://doi.org/10.1007/BFb0018059>.
- (25) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. A Hydrophilic Azacyclooctyne for Cu-Free Click Chemistry. *Org. Lett.* **2008**, *10* (14), 3097–3099. <https://doi.org/10.1021/ol801141k>.
- (26) Codelli, J. A.; Baskin, J. M.; Agard, N. J.; Bertozzi, C. R. Second-Generation Difluorinated Cyclooctynes for Copper-Free Click Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (34), 11486–11493. <https://doi.org/10.1021/ja803086r>.
- (27) Jewett, J. C.; Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. Rapid Cu-Free Click Chemistry with Readily Synthesized Biarylazacyclooctynones. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (11), 3688–3690. <https://doi.org/10.1021/ja100014q>.
- (28) F. Debets, M.; Berkel, S. S. van; Schoffelen, S.; T. Rutjes, F. P. J.; Hest, J. C. M. van; Delft, F. L. van. Aza - Dibenzocyclooctynes for Fast and Efficient Enzyme PEGylation via Copper-Free (3+2) Cycloaddition. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (1), 97–99. <https://doi.org/10.1039/B917797C>.
- (29) Seitz, G.; Pohl, L.; Pohlke, R. 5,6-Didehydro-11,12-Dihydrodibenzo[a,e]-Cyclooctene. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1969**, *8* (6), 447–448. <https://doi.org/10.1002/anie.196904471>.
- (30) Kuzmin, A.; Poloukhine, A.; Wolfert, M. A.; Popik, V. V. Surface Functionalization Using Catalyst-Free Azide–Alkyne Cycloaddition. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21* (11), 2076–2085. <https://doi.org/10.1021/bc100306u>.
- (31) Chadwick, R. C.; Gyzen, S. V.; Liogier, S.; Adronov, A. Scalable Synthesis of Strained Cyclooctyne Derivatives. *Synthesis* **2014**, *46* (5), 669–677. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1340509>.
- (32) Ghosh, S.; Kobal, I.; Zanette, D.; Reed, W. F. Conformational Contraction and Hydrolysis of Hyaluronate in Sodium Hydroxide Solutions. *Macromolecules* **1993**, *26* (17), 4685–4693. <https://doi.org/10.1021/ma00069a042>.

CHAPITRE III :
DU COPOLYMÈRE THERMOSENSIBLE
À LA NANOPARTICULE : ÉTUDE DE
L'AUTO-ASSEMBLAGE DE
BIOCONJUGUÉS HA-*b*-ELP

TABLE DES MATIÈRES

Chapitre III : Du copolymère thermosensible à la nanoparticule : étude de l'auto-assemblage de bioconjugués HA- <i>b</i> -ELP.....	143
Introduction	145
III.A. Un auto-assemblage réversible contrôlé	148
III.A.1. Température Critique de Micellisation (CMT).....	148
III.A.1.1. Détermination par diffusion dynamique de la lumière (DLS)	148
III.A.1.2. Détermination par spectroscopie de fluorescence.....	154
III.A.2. Concentration Critique de Micellisation (CMC).....	159
III.A.3. Réversibilité.....	162
III.B. Caractérisation physico-chimique des nanoparticules	163
III.B.1. Mesure du diamètre hydrodynamique	163
III.B.2. Stabilité dans le temps.....	168
III.B.3. Potentiel Zêta	170
III.B.4. Microscopie Électronique en Transmission (TEM)	171
Conclusion.....	172
Partie expérimentale.....	174
Annexes	176
Références	189

INTRODUCTION

La synthèse de composés amphiphiles à base d'ELP est une pratique courante pour l'obtention d'assemblages de formes diverses.¹⁻³ La conservation des propriétés de thermosensibilité par l'ELP lors de son couplage avec une autre (macro)molécule permet la formation réversible de nanoobjets en solution, par simple modulation de la température (c.f. I.A). En effet, si en-dessous de la T_{cp} l'ELP est soluble, il devient hydrophobe au-dessus. L'association covalente avec une autre espèce hydrophile ou hydrophobe génère donc un amphiphile sur une gamme de températures précise. Cet amphiphile peut alors s'auto-assembler spontanément en structures nanoparticulaires. Dans le cas du couplage avec une molécule hydrophobe (e.g. principe actif⁴, lipides⁵), une structure micellaire est obtenue en dessous de la T_{cp} , qui s'agrège au-dessus. Dans le cas d'une association avec un composé hydrophile (e.g. polysaccharide⁶), le conjugué est soluble à froid et micellise au-dessus de la T_{cp} . En revanche, si le second bloc est également thermosensible, la situation se complexifie. Par exemple, avec un dibloc d'ELP, 3 états différents peuvent être atteints : conjugué soluble à basse température, assemblage micellaire entre les T_{cp} des deux blocs, et agrégat aux températures les plus élevées (Figure III-1).⁷

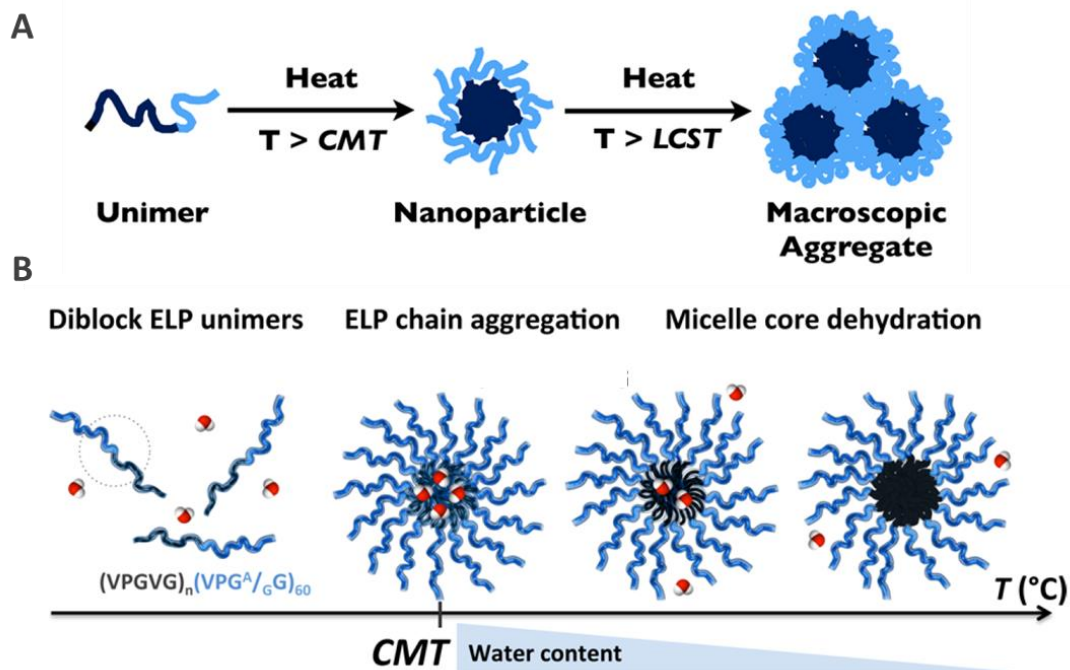


Figure III-1 : Illustration du comportement en solution d'un copolymère à blocs composé de deux ELP de séquences et T_{cp} différentes soumis à une rampe ascendante de température. A : Évolution de l'assemblage supramoléculaire des diblocs en fonction de la température. La CMT correspond à la température de formation des nanoparticules ($T_{cp, blocA} < T < T_{cp, blocB}$) et la LCST à la température de transition vers des agrégats macroscopiques ($T_{cp, blocA} < T_{cp, blocB} < T$). B : Illustration de la déshydratation du cœur de la nanoparticule à mesure de l'augmentation de la température. Figures reproduites de l'article de E. Garanger et al. ⁷

De la même façon, le couplage avec un bloc thermosensible de type UCST permet d'obtenir une inversion de micelle⁸ : à basse température le bloc ELP est soluble quand celui à UCST ne l'est pas. Une micelle possédant une couronne d'ELP se forme. Lors de l'augmentation de la température, le conjugué passe par une phase totalement soluble ou totalement agrégée selon si la T_{cp} de l'ELP est supérieure ou inférieure à celle du bloc à UCST. Enfin, au-dessus de ces deux valeurs, les caractères hydrophile/hydrophobe s'inversent et cette fois l'ELP se place au centre de la micelle. Ceci permet d'exposer spécifiquement des ligands situés sur l'un ou l'autre des blocs en fonction de la température. Tout ceci est particulièrement intéressant pour la délivrance d'actifs ou de matériel génétique : elle peut alors être contrôlée dans le temps et dans l'espace par un stimulus induisant le désassemblage local du nanovecteur.

Dans ces travaux de thèse, la forte hydrophilie du hyaluronan entraîne la formation de nanoparticules par autoassemblage au-dessus de la T_{cp} de l'ELP. Celle-ci étant proche de la température physiologique, plusieurs cas de figures peuvent se présenter. Si la $T_{cp} > 37^\circ\text{C}$, les bioconjugués sont sous forme solubles lors de l'administration. Une hyperthermie locale peut alors induire l'autoassemblage local et améliorer l'internalisation dans les cellules cancéreuses par effet de multivalence (en utilisant les propriétés de reconnaissance de HA pour le CD44). A l'inverse, si la $T_{cp} < 37^\circ\text{C}$, les objets administrés sont des nanoparticules. Cette fois, une cryothermie locale peut rendre aux conjugués leur solubilité, engendrant ainsi le désassemblage *in situ* de la micelle et la libération d'une molécule cargo. L'étude de la librairie de bioconjugués HA-ELP permet ainsi de choisir la combinaison la plus efficace en fonction de l'application souhaitée.

L'objectif de ce chapitre est donc d'étudier d'une part le phénomène d'autoassemblage et d'autre part de caractériser les propriétés colloïdales des objets formés.

Plusieurs techniques existent pour déterminer la température de micellisation (CMT), telles que l'analyse enthalpique différentielle (AED ou DSC)⁹, la diffusion aux petits angles de neutrons ou de rayons X (SANS, SAXS)¹⁰, ou encore la diffusion de la lumière statique et dynamique (SLS/DLS)¹¹⁻¹³. Cette dernière a été privilégiée durant ces travaux du fait de sa facilité de mise en œuvre et de sa pertinence. L'autre paramètre primordial dans la définition des conditions d'autoassemblage est la concentration. Celle-ci a en effet une grande influence sur la T_{cp} des ELPs et peut donc induire une transition de phase à température constante. La détermination de la concentration micellaire critique (CMC) dans la gamme de températures d'intérêt est donc fondamentale pour la compréhension du comportement des nanoparticules, en particulier *in vivo*.^{14,15} De même, de nombreuses techniques de caractérisation permettent de déterminer cette CMC directement ou indirectement. Une étude comparant plusieurs d'entre elles, à savoir des mesures de conductivité, de tension de surface, ainsi que trois techniques optiques (fluorescence du pyrène, du Nile Red et du 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH)) a récemment été publiée.¹⁶ Elle conclut que les mesures de fluorescence sont les plus versatiles, rapides et simples à mettre en œuvre. Le choix de la sonde de fluorescence est crucial et détermine la méthode à utiliser (**Figure III-2**).

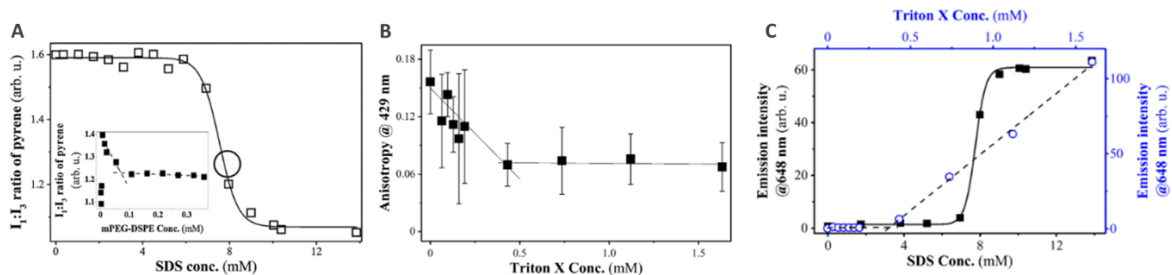


Figure III-2 : Détermination de la CMC par spectroscopie. A: Utilisation du pyrène, variation du ratio des bandes de vibration I_1/I_3 en fonction de la concentration en amphiphile. B : Utilisation de DPH, variation de l'anisotropie de fluorescence r en fonction de la concentration en amphiphile. C : Utilisation du Nile Red, évolution de l'intensité de fluorescence à 648 nm en fonction de la concentration en amphiphile. A,B,C : la CMC est déterminée par la concentration au point d'inflexion ou d'intersection entre les régressions linéaires. Reproduit de l'article de N. Scholz et al.¹⁶

Dans le cas du pyrène (**Figure III-2 A**), la structure vibronique de son spectre d'émission dépend de la polarité de son environnement. En particulier, l'intensité de la bande I_1 à 373 nm varie fortement avec la polarité, quand celle de la bande I_3 à 384 nm ne semble pas en être dépendante. Ainsi, l'évolution du rapport I_1/I_3 donne un aperçu de la polarité du milieu : égal à 1.6 dans l'eau pure, il diminue drastiquement lors de la formation de microdomaines hydrophobes. Ceci peut renseigner sur la formation de micelles ou de vésicules. Le DPH quant à lui repose sur la mesure de l'anisotropie de fluorescence : c'est-à-dire sur la dépolarisation partielle de la lumière durant l'état excité (**Figure III-2 B**). Celle du DHP est très dépendante de la polarité de l'environnement, le DHP formant des agrégats faiblement fluorescents et de désintégration d'anisotropie r élevée.

En milieu hydrophobe, r diminue fortement. Le suivi de r en fonction de la concentration en amphiphile présente une phase de décroissance puis une stabilisation au-dessus de la CMC, ce qui permet de la déterminer.

Si cette technique présente l'avantage d'être indépendante des variations de longueurs d'excitation et de concentration du fluorophore, elle est pondérée par plusieurs défauts : la mesure de r est fastidieuse et moins précise qu'une simple mesure d'intensité de fluorescence, d'autant plus quand la concentration en amphiphile est faible, et la photodégradation élevée peut poser problème. La dernière technique repose sur l'utilisation d'un fluorophore solvatochromique, ici le Nile Red (**Figure III-2 C**). Ses propriétés spectrales varient elles aussi en fonction de la polarité et permettent de déterminer la CMC par simple mesure d'intensité de fluorescence. Alliant simplicité, versatilité, et précision, elle est plébiscitée par les auteurs de l'étude. Elle présente également l'avantage de permettre la détermination conjointe de la CMC et de la CMT. C'est pourquoi cette sonde a été choisie dans ces travaux. Son fonctionnement et les méthodes appliquées pour la caractérisation de l'autoassemblage sont détaillés dans la première partie de ce chapitre.

D'autre part, les nanoparticules formées font l'objet d'une caractérisation spécifique. En effet, la connaissance précise de la morphologie est essentielle car celle-ci possède une grande influence sur le devenir du nanoobjet dans l'organisme et sur son interaction avec les cellules. De nombreuses techniques de caractérisation sont disponibles.¹⁷ Certaines d'entre elles sont listées en **Figure III-3**.

Technique	Size ^a	Morphology ^b	Internal structure ^b	3D structure ^b	Molecular weight ^b
DLS	R_H	X	X	X	X
MA-DLS	R_H	*	X	*	X
SLS	R_g	*	X	*	✓
MA-DLS + SLS	$R_H + R_g$	✓	✓	✓	✓
SANS	R_c, R_g, R	✓	✓	✓	✓
SAXS	R_c, R_g, R	✓	✓	✓	✓
Stained TEM ^c	R	*	X	X	X
Unstained TEM ^c	R	✓	✓	X	X
Cryo-TEM	R_c, R	✓	✓	*	*
ET (cryo/unstained ^c)	R_c, R	✓	✓	✓	*
AFM ^c	Height	✓	X	✓	X
SEM ^c	R	✓	*	✓	X

^a Which type of size is determined. ^b The information is either, directly measured (✓), inferred through interpretation or further calculation (*) or is not obtainable (X). ^c Corresponding to the radius of the dried structures.

Figure III-3 : Exemples de techniques de caractérisation applicables aux nanoparticules polymériques autoassemblées et les paramètres qu'elles permettent de déterminer. Extrait de l'article de revue de R.K. O'Reilly et al.¹⁷

Parmi elles, le choix s'est porté ici sur la DLS, la SLS, la TEM et la mesure du potentiel zêta. Leur combinaison permet une bonne compréhension des propriétés physico-chimiques des nanoparticules formées à haute température. Celles-ci sont illustrées dans la deuxième partie de ce chapitre.

III.A. Un auto-assemblage réversible contrôlé

Le chapitre précédent décrivait la synthèse par chimie click d'une librairie de bioconjugués HA_m-ELP[M₁V₃-n] avec n = 60, 80, 100 et m = 4.6 k, 24k, 42k. L'adjonction du hyaluronan extrêmement hydrophile sur le segment thermosensible d'ELP a permis la formation d'un copolymère à blocs lui-même sensible à la température. Soluble en-dessous de la T_{cp} de l'ELP, il peut s'auto-assembler en nanoparticule au-dessus.

Les conditions de température et de concentration permettant la formation d'objets auto-assemblés sont décrites dans cette partie. Pour plus de simplicité, elles seront nommées température et concentration critiques de micellisation (CMT, CMC), bien que la nature micellaire de ces objets n'ait pas été rigoureusement prouvée. La réversibilité de cet auto-assemblage est également abordée.

Toutes les analyses ci-après ont été effectuées dans des conditions pertinentes pour nos futures évaluations biologiques, à savoir des solutions préparées par dissolution d'une quantité précise de bioconjugués dans un tampon salin : TRISs (50 mM + NaCl 150 mM) ou PBS (300 mosm, pH 7,4) (cf. p125). Leur différence de salinité est considérée ici comme négligeable.

De même, la notation **HA-ELP** se réfère au bioconjugué obtenu par SPAAC. Dans le cas où une comparaison avec le bioconjugué obtenu par CuAAC est effectuée, ils sont notés respectivement **HA-ELP (SP)** et **HA-ELP (Cu)** (cf. p7).

III.A.1. Température Critique de Micellisation (CMT)

La température critique de micellisation (CMT) est la température à partir de laquelle les bioconjugués s'auto-assemblent en milieu aqueux pour former des nanoparticules. Elle est dépendante de la T_{cp} du bloc ELP, mais ne lui est pas égale : la conjugaison avec un bloc HA très hydrophile augmente en effet la valeur de cette température critique. Cette dépendance suggère néanmoins que la CMT est influencée par les mêmes paramètres internes et externes que la T_{cp} : concentration, salinité, hydrophobie globale du segment ELP, hydrophilie du bloc HA ...

Deux techniques de caractérisation de cette CMT ont été utilisées dans ces travaux : la diffusion dynamique de la lumière (DLS), qui a permis une détermination directe, et la spectroscopie de fluorescence, qui a permis une détermination indirecte, par l'intermédiaire d'une sonde de polarité. La CMT a ainsi été définie pour l'ensemble des bioconjugués de la librairie, et l'influence de leur composition étudiée.

III.A.1.1. Détermination par diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La mesure la plus simple et la plus directe de la CMT a consisté en une analyse par DLS d'une solution de bioconjugué soumise à une rampe de température.

La **Figure III-4** représente l'évolution de l'intensité diffusée (Derived Count Rate, DCR) et de la taille moyenne des objets en solution (Z-Average) pour une solution de bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 soumise à une rampe ascendante de température.

Le choix du Derived Count Rate permet de s'affranchir des problèmes d'atténuateurs utilisés par l'appareil durant la mesure. Rigoureusement, le Derived Count Rate correspond à l'intensité diffusée mesurée (Measured Count Rate) divisée par le facteur d'atténuation. À partir de cette intensité sont calculés le diamètre moyen des objets (Z-Average, taille moyenne harmonique pondérée en intensité) et un indice de polydispersité (PDI) qui traduit la largeur de la distribution de taille, et donne donc une indication sur l'homogénéité de l'échantillon.

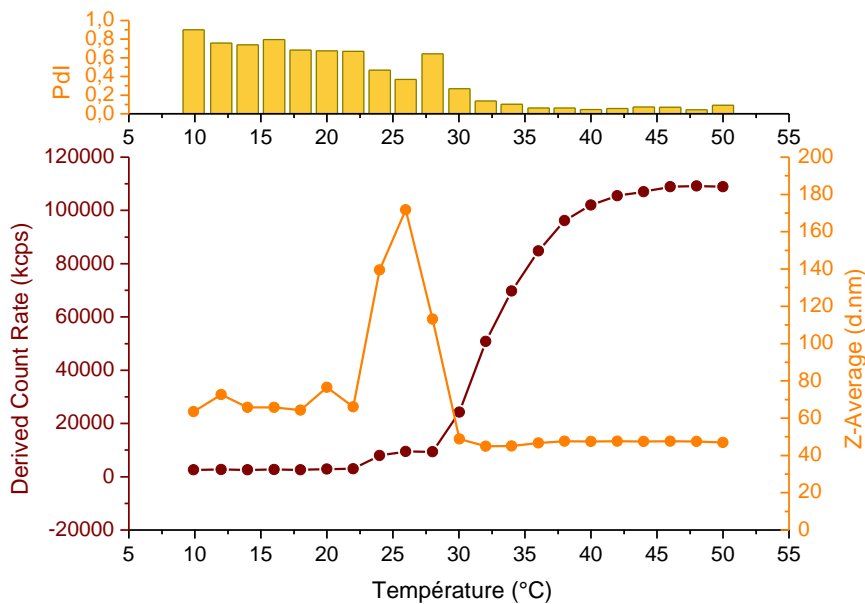


Figure III-4 : Évolution de l'intensité diffusée (DCR), du diamètre hydrodynamique (Z-Average) et de l'indice de polydispersité (Pdl) en fonction de la température pour une solution de bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 à 78 µM dans un tampon PBS.

L'intensité diffusée (DCR, marron), d'abord très faible, présente une forte augmentation autour de 28°C avant de se stabiliser vers 40°C. Or, la diffusion de Rayleigh indique (avec une approximation d'objets de petite taille) que : $I_s \propto N \times I_0 \times R^6$; avec I_s : intensité diffusée, I_0 : intensité initiale, N : nombre de particules par unité de volume, et R : rayon des particules. Ainsi, l'intensité mesurée dépend très fortement du rayon des objets diffusants. La différence d'indice entre l'objet et le milieu, autrement dit sa densité, a également son importance. Ici, l'évolution de l'intensité semble donc montrer le passage d'une solution contenant de petits objets peu denses à faible température à des objets plus gros et plus denses à haute température.

Ceci est en partie confirmé par l'évolution de la taille moyenne (Z-Average) et du Pdl :

A basse température, la solution semble contenir des objets de 60-80 nm de diamètre. Cependant, le Pdl très élevé traduit une forte hétérogénéité de l'échantillon. Le calcul du Z-average faisant l'hypothèse d'une population unique, la valeur donnée dans ces conditions n'est pas rigoureuse. Le diamètre augmente ensuite fortement à partir de 22°C pour culminer à 180 nm à 26°C, toujours accompagné d'un Pdl élevé. Enfin, une diminution brutale du Z-average mène à une taille stable d'environ 50 nm à partir de 30°C. Cette fois, le Pdl beaucoup plus faible, accompagné d'une augmentation de l'intensité diffusée (DCR), permet de conclure à une homogénéisation de l'échantillon et une bonne fiabilité de la valeur du diamètre mesuré. Une étude détaillée de la taille des objets en solution est présentée plus loin dans ce chapitre (cf. p 163).

Il est ainsi possible de séparer trois gammes de températures au sein desquelles le bioconjugué adopte des comportements différents. Une illustration est donnée en **Figure III-5**.

À basse température, ici pour $T < 24^\circ\text{C}$, la solution est très hétérogène et contient des objets très peu diffusants. Il s'agit probablement des bioconjugués sous forme de chaînes libres, accompagnés de quelques agrégats. Ensuite, une gamme de températures intermédiaire présente les caractéristiques d'objets très gros mais peu diffusants. Il pourrait s'agir d'une phase intermédiaire de coacervats : très larges mais très hydratés. Dans ce cas, la différence d'indice avec le solvant étant faible, l'intensité diffusée l'est également. Enfin, à plus haute température, les coacervats font place à des nanoparticules plus petites et beaucoup plus denses. Une fois formées, leur taille ne varie plus, mais l'intensité diffusée augmente jusqu'à atteindre un plateau. Cela traduit la déshydratation progressive du cœur d'ELP qui entraîne une densification des objets qui deviennent donc plus diffusants. Un comportement similaire a été précédemment reporté dans la littérature pour des diblocs d'ELP (**Figure III-1**).⁷

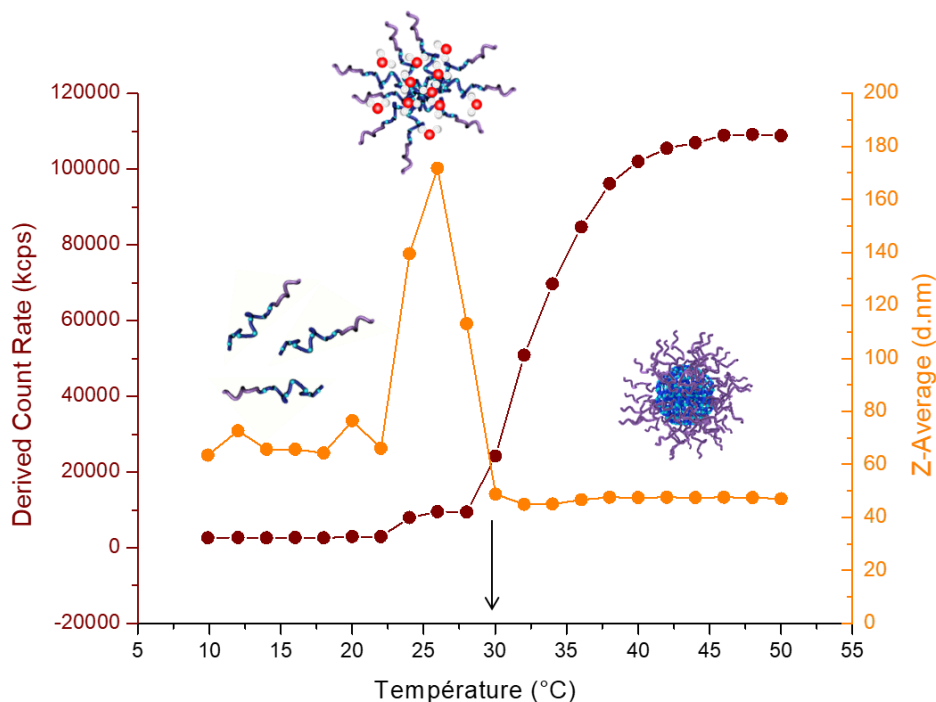


Figure III-5 : Illustration de l'état physique supposé du bioconjugé en fonction de la température : $T < 24^{\circ}\text{C}$: composé soluble, $24^{\circ}\text{C} < T < 30^{\circ}\text{C}$: coacervat hydraté, $T > 30^{\circ}\text{C}$: assemblage nanoparticulaire. La CMT est indiquée par la flèche : elle est déterminée comme étant la température à partir de laquelle l'état nanoparticulaire est atteint, et la taille des objets stabilisée. Ici, $\text{CMT} = 30^{\circ}\text{C} (\pm 1^{\circ}\text{C})$.

Bien que potentiellement intéressante, l'étape de coacervation n'a pas été étudiée. Le projet se concentre plutôt sur l'état nanoparticulaire et son obtention à partir des chaînes libres. Il est donc exclusivement question de température de micellisation (CMT) et pas de température de coacervation.

La température de micellisation CMT est déterminée dans cette étude comme étant la température à partir de laquelle la taille moyenne des objets se stabilise à un niveau bas. Elle est indiquée par une flèche. L'incertitude est définie comme étant la moitié de l'intervalle entre deux mesures : sur la **Figure III-5**, les mesures ayant lieu à un intervalle de 2°C , l'incertitude est de $\pm 1^{\circ}\text{C}$. Pour cette solution de bioconjugé HA_{4,6k} – ELP n80 à $78 \mu\text{M}$ dans du tampon PBS, la CMT est donc de $30^{\circ}\text{C} (\pm 1^{\circ}\text{C})$.

Ce comportement en 3 phases a été observé pour tous les bioconjugés de la librairie, comme illustré en **Annexe III-1**. Les CMT moyennes déduites de ces données sont rassemblées dans le **Tableau III-1**. Elles correspondent à des solutions de bioconjugés à $78 \mu\text{M}$ dans un tampon salin (PBS ou TRISs). Elles s'échelonnent de 30°C à 42°C , en bonne compatibilité avec des applications biologiques. Selon l'objectif visé, (modèle humain (37°C) ou murin (35°C), assemblage ($\text{CMT} < T_{\text{corps}}$) ou désassemblage ($\text{CMT} > T_{\text{corps}}$) *in situ* etc.), il est possible de sélectionner le bioconjugé qui conviendra le mieux. Cela confirme la versatilité de ce système HA-ELP.

Tableau III-1 : DLS : Tableau récapitulatif des CMT pour chaque bioconjugé en solution à $78 \mu\text{M}$ dans un tampon salin (PBS ou TRISs). Nombre de répliques $N = 3$ sauf pour les valeurs repérées par * pour lesquelles $N = 4$.

CMT ($^{\circ}\text{C}$)	HA 4,6k	HA 24k	HA 42k
ELP n60	36 ($\pm 1,6$)*	39,7 ($\pm 2,1$)	42,3 ($\pm 1,7$)
ELP n80	31 ($\pm 0,7$)*	34 ($\pm 0,8$)	35,7 ($\pm 0,5$)
ELP n100	30,3 ($\pm 1,2$)	31,3 ($\pm 2,5$)	32,7 ($\pm 0,9$)

Afin d'évaluer l'influence de la composition du bioconjugué sur la CMT, l'évolution de la taille moyenne des objets en solution en fonction de la température pour les différents diblocs est donnée **Figure III-6** et répartie en deux colonnes. La colonne de gauche (A,C,E) permet d'estimer l'influence de la masse molaire du HA sur la CMT : les bioconjugués sont rassemblés par bloc ELP identique et bloc HA de taille croissante. La colonne de droite (B,D,F) présente l'inverse : les bioconjugués sont rassemblés par bloc HA identique et bloc ELP de taille croissante, afin d'étudier l'influence de la taille du segment ELP.

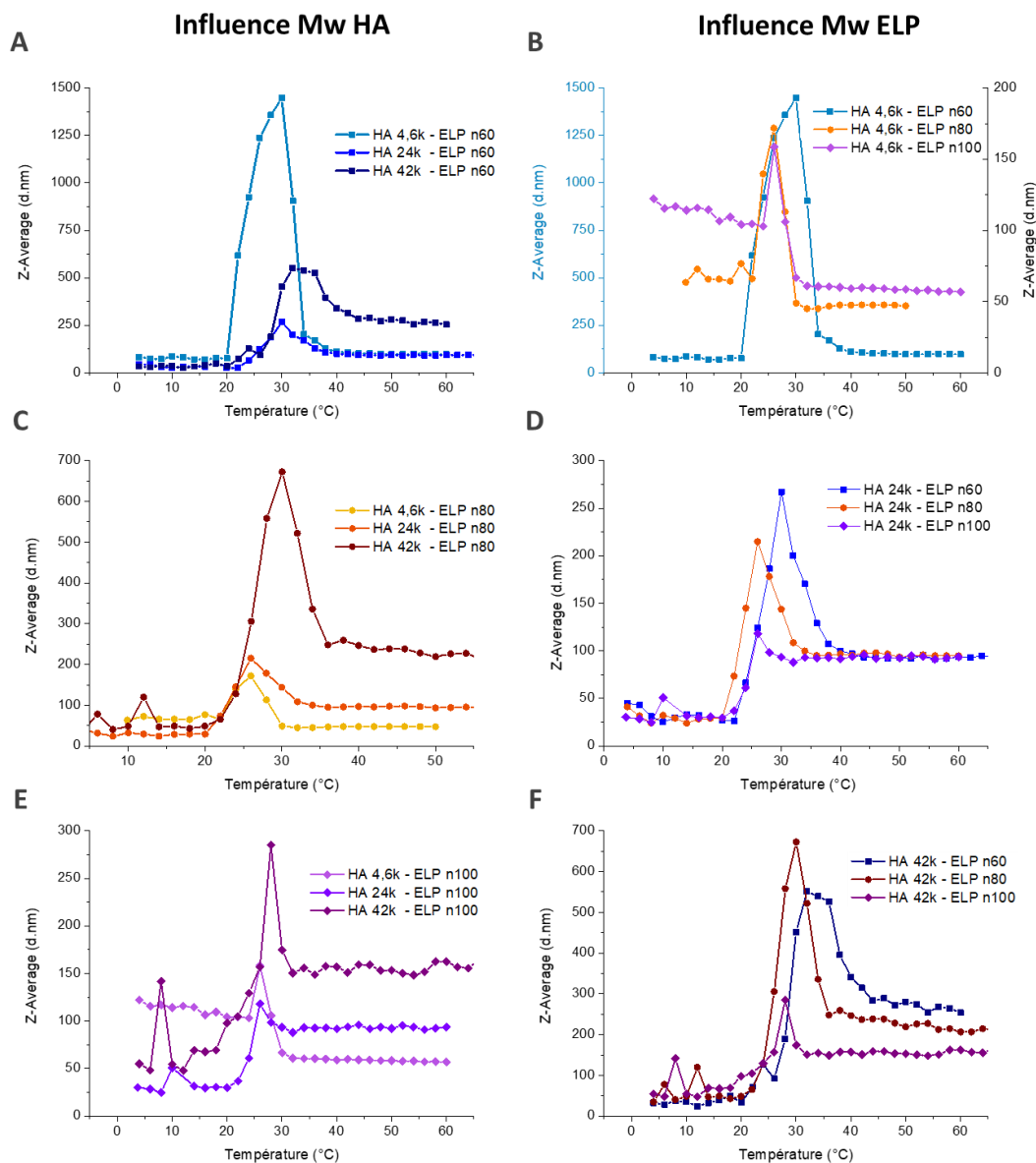


Figure III-6 : Comparaison de l'évolution de la taille des objets en solution (Z-Average) en fonction de la température pour la librairie de bioconjugués HA-ELP à 78 μ M dans un tampon PBS. Gauche : Variation de la taille du HA pour chaque ELP : n60 (A), n80 (C), n100 (E). Droite : Variation de la taille de l'ELP pour chaque taille de HA : 4.6k (B), 24k (D), 42k (F). B : L'axe des ordonnées de gauche correspond au bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn60 uniquement et celui de droite aux bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn80 et n100.

L'analyse des données illustrées dans le **Tableau III-1** et la **Figure III-6** permet d'extraire deux tendances globales. Tout d'abord, il semble que l'augmentation de la taille du bloc HA à taille d'ELP constante entraîne une augmentation de la CMT. Ceci est en cohérence avec les études de Urry *et al.* menées sur les ELPs seuls qui ont conclu que la T_{cp} varie selon l'hydrophobie globale de l'ELP.¹⁸ Ainsi, l'ajout de groupements hydrophiles ou hydrophobes en extrémité ou le long de la chaîne entraîne respectivement une augmentation ou une diminution de la T_{cp} . La CMT semble soumise à la même influence. Ici, l'allongement du bloc HA augmente l'hydrophilie générale du bioconjugué, ce qui mène à une CMT plus élevée. Cet effet est particulièrement visible pour les ELPn60 et ELPn80.

Dans un second temps, la longueur du segment ELP semble également avoir de l'influence pour les bioconjugués ayant les blocs HA les plus longs (HA_{24k} et HA_{42k}) : la CMT diminue lorsque l'ELP s'allonge (le nombre de répétition n augmente). Cet effet peut être expliqué selon le même principe : cette fois, l'allongement du bloc ELP entraîne une augmentation de l'hydrophobie générale, et donc une diminution de la CMT. Cet effet n'est qu'en partie constaté pour les bioconjugués possédant le HA de plus basse masse molaire : si la CMT du HA_{4,6k}-ELPn60 est plus élevée, celles des HA_{4,6k}-ELPn80 et HA_{4,6k}-ELPn100 sont similaires. Cette différence semble donc croître avec l'allongement du bloc HA, peut-être du fait de l'augmentation du caractère amphiphile du bioconjugué.

La composition du bioconjugué et en particulier la taille relative de chaque bloc semble par conséquent être un paramètre important régissant la température d'auto-assemblage.

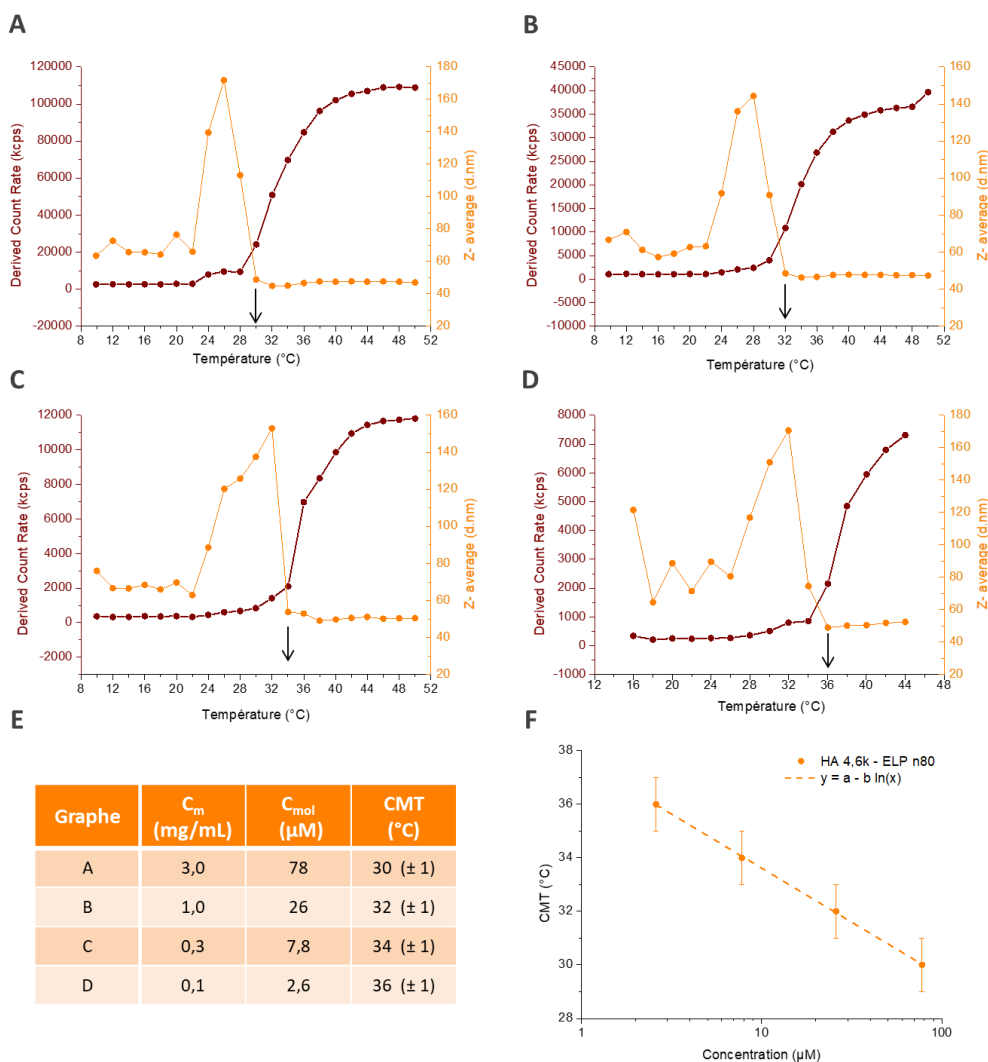


Figure III-7 : Influence de la concentration sur la CMT pour un bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 en solution dans un tampon PBS. A, B, C, D : Évolution de l'intensité diffusée et de la taille moyenne des objets en solution en fonction de la température pour des solutions de concentration 78 μM, 26 μM, 7.8 μM et 2.6 μM respectivement. La CMT est repérée par une flèche. E : Tableau récapitulatif des CMT pour chaque concentration. F : Évolution de la CMT en fonction de la concentration.

Dans une moindre mesure, une comparaison entre les bioconjugués HA_{4,6k}-ELP (SP) et HA_{4,6k}-ELP (Cu) en **Annexe III-2** a montré une CMT légèrement plus faible pour les premiers. La plus forte hydrophobie à la jonction des deux blocs pourrait expliquer cette différence.

La concentration étant un autre des principaux facteurs influençant la T_{cp} des ELPs seuls, une étude de son effet sur la CMT des bioconjugués est effectuée. Pour cela, la CMT est déterminée pour une gamme de 4 concentrations. Les résultats pour le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 sont indiqués en **Figure III-7**.

La CMT est reportée en fonction de la concentration molaire en **F**. Tout comme la T_{cp} de l'ELP seul, la CMT augmente avec la dilution selon une loi logarithmique de type $CMT = a - b * \ln(C)$. (cf. **II.A.3, p108**) Si la pente de cette droite n'est que peu influencée par l'adjonction du bloc HA hydrophile, la valeur de la température de transition est en revanche plus élevée ($CMT > T_{cp}$) à concentration équivalente (**Annexe III-3**). Les résultats pour les bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn60, HA_{4,6k}-ELPn100, HA_{24k}-ELPn80 et HA_{42k}-ELPn80 sont illustrés en **Annexe III-4**, **Annexe III-5**, **Annexe III-6**, et **Annexe III-7** respectivement.

L'influence de la composition du bioconjugué peut à nouveau être étudiée : l'évolution de la CMT en fonction de la concentration pour tous les composés cités ci-dessus est rassemblée en **Figure III-8**. En **A**, le bloc ELP reste constant et la masse molaire du HA varie, et inversement en **B**. Tout d'abord, les observations effectuées plus haut à 78 μ M (**Figure III-6**) se confirment ici à toutes les concentrations testées : à concentration égale, la CMT est plus élevée pour un bloc HA long et pour le bloc ELP le plus court (ELPn60). A concentration variable, la CMT de chaque composé augmente bien avec la dilution selon une loi logarithmique de type $CMT = a - b * \ln(C)$. En revanche, la valeur de chaque pente ne semble pas suivre de tendance particulière. Une duplication de cette analyse permettrait d'accéder à des valeurs moyennées et de confirmer ou d'infirmer cette absence de tendance claire.

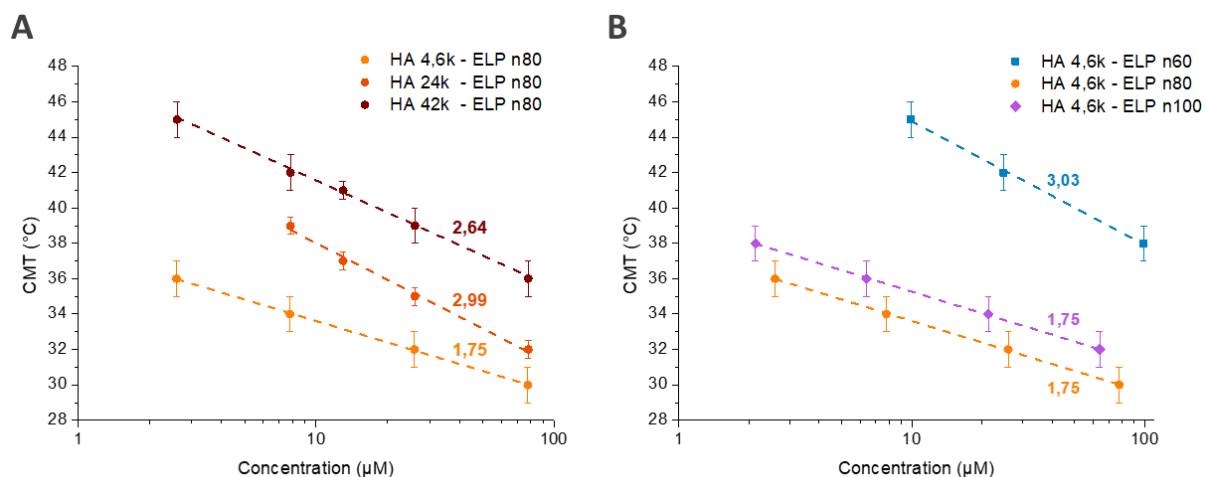


Figure III-8 : Évolution de la CMT en fonction de la concentration pour des bioconjugués HA-ELPn60, n80, n100 en solution dans un tampon PBS. A : Variation de la taille du HA à taille d'ELP constante pour les bioconjugués HA_{4,6k/24k/42k}-ELPn80. B : Variation de la taille de l'ELP à Mw HA constant pour les bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn60, n80, n100. Une régression logarithmique des données est effectuée selon le modèle : $y = a - b * \ln(x)$ et tracée en pointillés. La pente b est indiquée au-dessus de chacune. La CMT pour la solution de HA_{24k}-ELPn80 à 2,6 μ M n'ayant pas pu être définie avec une précision suffisante, elle n'apparaît pas ici.

Les analyses par DLS permettent donc d'accéder de manière assez directe à la CMT des bioconjugués de la librairie pour différentes concentrations. Dans l'ensemble, les résultats décrits ici sont en cohérence avec les observations faites pour les ELP seuls : la CMT obéit aux mêmes mécanismes que ceux qui régissent la T_{cp} . Des tests dans différentes conditions de pH et de salinité permettraient de le confirmer.

III.A.1.2. Détermination par spectroscopie de fluorescence

La CMT peut également être déterminée par spectroscopie de fluorescence, grâce à l'utilisation d'une sonde de polarité fluorescente relativement hydrophobe. Le Nile Red étant l'une des molécules les plus communes et les plus simples à utiliser pour ce type de caractérisation, c'est elle qui a été utilisée dans cette étude. L'application de cette technique à la détermination de la CMT et de la CMC (p 159) a été l'objet du stage de Master 2 de Mme Louise MASSÉ.

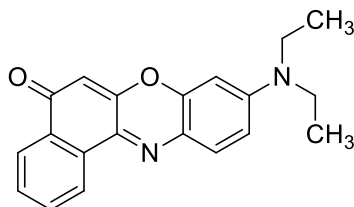


Figure III-9 : Structure chimique de la molécule "Nile Red"

Le Nile Red est une petite molécule hydrophobe et fluorescente dont les propriétés spectrales varient en fonction de l'environnement.¹⁹ En milieu hydrophile, les molécules de Nile Red interagissent préférentiellement entre elles et forment des liaisons H et des empilements π - π .²⁰ Ces derniers sont à l'origine d'une diminution de l'intensité de fluorescence émise (quenching), une désexcitation non radiative par transfert d'énergie étant alors privilégiée.²¹ L'émission maximale est donc faible et a lieu à une longueur d'onde d'environ 660 nm. En milieu hydrophobe, les molécules de Nile Red interagissent avec le solvant et se séparent les unes des autres. Les empilements π - π sont rompus, la fluorescence est restaurée. Son intensité maximale est alors bien plus élevée et la longueur d'onde correspondante subit un effet hypsochrome : de 660 nm elle diminue à 635 nm.^{22,23} Ces deux changements, en intensité et en longueur d'onde, sont utilisés pour étudier les variations de l'hydrophilie de l'environnement. Ils permettent notamment de détecter la formation de micelles ou de vésicules²³ dans un milieu aqueux au travers de l'apparition de micro-domaines hydrophobes. En effet, avant la formation des objets, le Nile Red se trouve dans un environnement hydrophile, sa fluorescence maximale est donc faible et émise à 660 nm. Lorsque les premières nanoparticules apparaissent, elles forment des domaines hydrophobes au sein du milieu. Le Nile Red diffuse alors vers cet environnement plus adéquat, et s'accumule au sein des micelles.^{20,24} L'intensité de fluorescence augmente et la longueur d'onde d'émission maximale se rapproche de 635 nm. Lorsque tous les objets sont formés, ces valeurs ne varient plus.

Dans ces travaux, le facteur déclencheur de l'auto-assemblage était la température. Une gamme de solutions de chaque bioconjugué a été préparée dans un tampon PBS à différentes concentrations en présence d'une quantité identique de Nile Red. Ces solutions ont ensuite été soumises à une rampe de température et des mesures de fluorescence effectuées. L'étude de l'évolution de cette fluorescence en intensité et en longueur d'onde en fonction de la température a permis de remonter à la CMT. La méthode est explicitée ci-après.

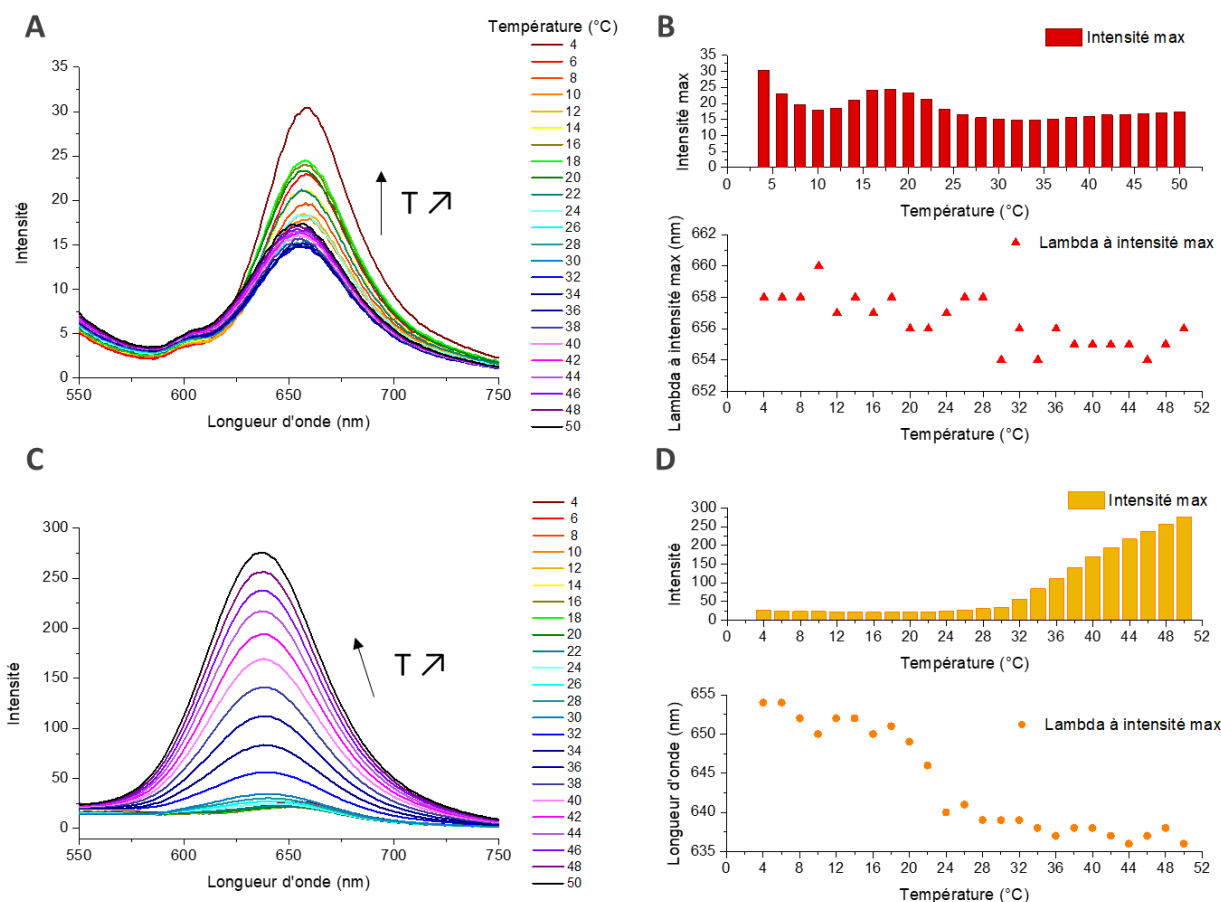


Figure III-10 : Évolution des propriétés spectrales du Nile Red en solution dans un tampon PBS, seul (A, B) ou en présence du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 (C, D). Gauche : Superposition des spectres d'intensité de fluorescence à différentes températures. Droite : Évolution de la valeur d'intensité maximale et de la longueur d'onde pour laquelle elle est atteinte en fonction de la température.

Une illustration du comportement du Nile Red en fonction de la température en absence ou en présence du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 est donnée en **Figure III-10**. Lorsque le Nile Red est seul en solution, l'intensité de sa fluorescence est effectivement basse et ne varie que très légèrement avec la température. Par ailleurs, la longueur d'onde pour laquelle l'intensité maximale de fluorescence est émise reste constante entre 654 nm et 660 nm. En revanche, en présence de bioconjugué, l'intensité maximale d'émission et sa longueur d'onde varient fortement avec la température. Ces variations montrent bien la formation de nanoparticules contenant un domaine hydrophobe sous l'effet de la température. Leur analyse peut donc permettre de remonter à la CMT.

La démarche est explicitée en **Figure III-11** pour le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 :

À partir des spectres de fluorescence en **A**, l'intensité maximale et la longueur d'onde pour laquelle elle est atteinte ont été repérées pour chaque température (**B**). La longueur d'onde minimale a été sélectionnée : elle correspond généralement à la longueur d'onde pour laquelle l'émission de fluorescence est maximale, toutes températures confondues (ici, $\lambda_{ref} = 636$ nm).

L'intensité de fluorescence émise à cette longueur d'onde de référence a ensuite été tracée en fonction de la température (**C**). Deux zones se distinguent : une première pour laquelle l'intensité est stable, et une deuxième où elle augmente fortement. La CMT a alors été définie comme étant la température au point de rupture de pente. Elle est repérée sur la **Figure III-11 C** par une flèche.

Ce travail a ensuite été reproduit pour les 8 solutions de la gamme de concentration. Afin de pouvoir les comparer entre elles, une seule longueur d'onde de référence a été sélectionnée pour toutes les solutions : il s'agit de la longueur d'onde minimale obtenue pour la solution la plus concentrée. Les représentations de l'évolution de l'intensité de fluorescence émise à cette longueur d'onde de référence en fonction de la température pour chaque concentration sont données en **Annexe III-8**.

Il a également été possible de les placer toutes sur le même graphe (D). L'influence de la concentration est alors évidente : l'intensité est plus élevée et la rupture de pente plus nette à haute concentration qu'en milieu dilué. À très faible concentration (1 μM), l'intensité était trop faible pour déterminer avec précision une CMT, cette solution a donc été exclue du reste de l'analyse.

Les différentes CMT ont été reportées en fonction de la concentration en E. Conformément aux résultats obtenus précédemment par DLS, la CMT présente une augmentation avec la dilution suivant une loi logarithmique $CMT = a - b * \ln(C)$.

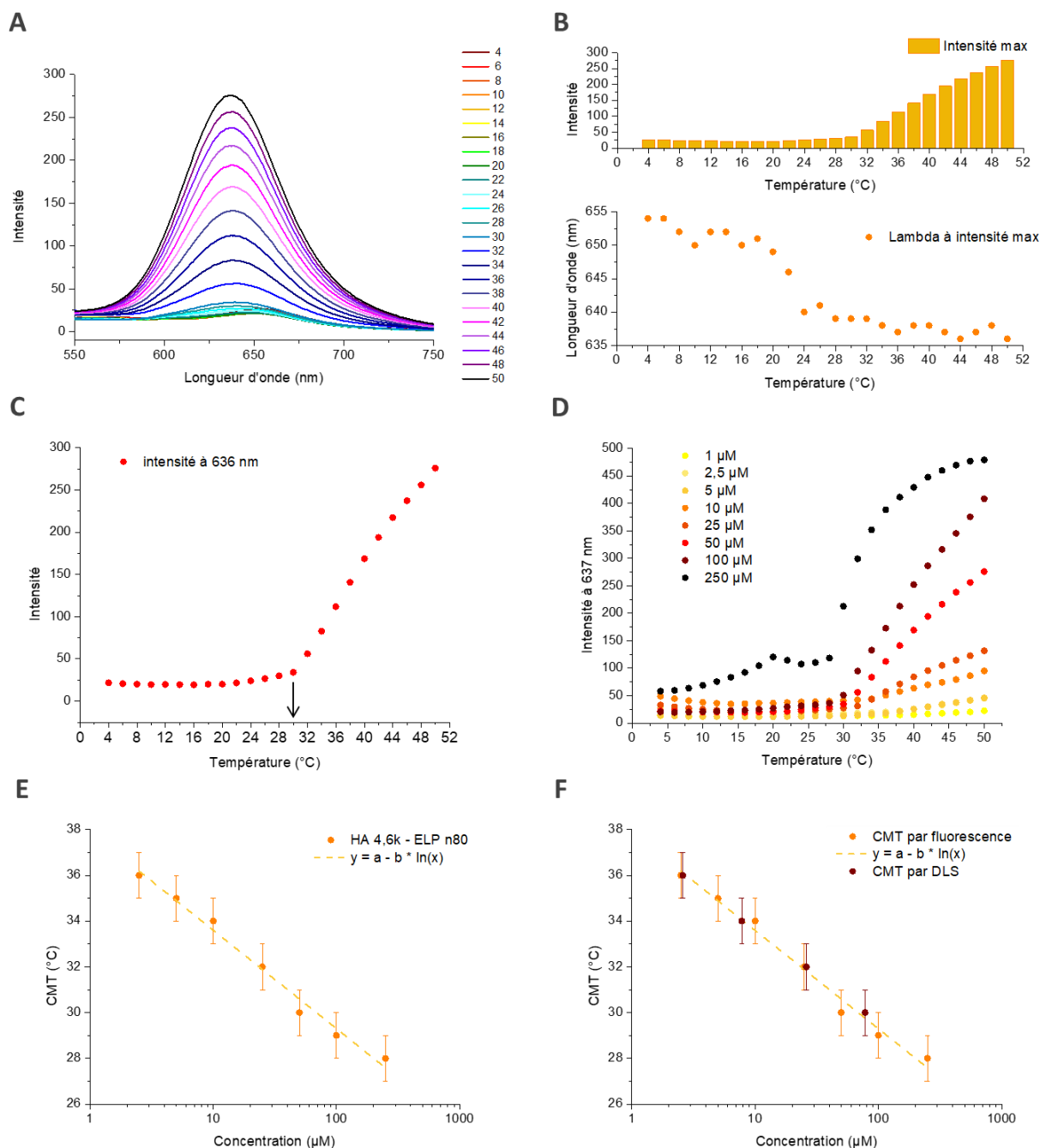


Figure III-11 : Détermination de la CMT et son évolution en fonction de la concentration pour une solution de bioconjugué $\text{HA}_{4,6\text{k}}\text{-ELPn80}$ dans un tampon PBS en présence de Nile Red par spectroscopie de fluorescence. A, B, C : Exemple à 50 μM . A : Superposition de spectres d'intensité de fluorescence pour des températures. B : Évolution de la valeur d'intensité maximale et de la longueur d'onde pour laquelle elle est atteinte en fonction de la température. C : Évolution de l'intensité de fluorescence à $\lambda_{\text{ref}} = 636 \text{ nm}$ en fonction de la température. La CMT est repérée par une flèche. Ici $CMT = 30^\circ\text{C} (\pm 1)$. D : Évolution de l'intensité de fluorescence à λ_{ref} en fonction de la température pour toutes les concentrations. E : Évolution de la CMT en fonction de la concentration. F : Comparaison des valeurs de CMT déterminées par spectroscopie de fluorescence et par DLS.

Cette méthode a été appliquée à l'ensemble des bioconjugués de la librairie. Les résultats présentés en **Annexe III-9** montrent un comportement similaire pour chacun d'entre eux.

Enfin, la comparaison avec les données obtenues par DLS illustrée en **F** semble montrer une très bonne concordance entre ces deux méthodes. Malheureusement, ce n'est pas le cas avec les autres bioconjugués testés, pour lesquels les CMT obtenues par DLS sont plus élevées que celles obtenues par spectroscopie de fluorescence (**Annexe III-10**). Une explication possible tiendrait en la différence de définition de la CMT entre ces deux techniques. En effet, la CMT obtenue par DLS a été définie ici comme étant la température de fin de transition coacervat-nanoparticules. A l'inverse, le Nile Red détectant la présence de microdomaines hydrophobes, il est possible que la CMT déterminée lors de son utilisation corresponde à la température de début de cette transition. L'écart entre elles serait ainsi lié à une transition progressive entre l'apparition de la première nanoparticule et la disparition du dernier coacervat.

L'influence de la taille de chaque bloc sur la CMT est également étudiée au travers des résultats présentés en **Figure III-12**. Selon le même principe que précédemment, la colonne de gauche rassemble les bioconjugués ayant un bloc ELP identique et bloc HA de taille croissante et inversement pour la colonne de droite. Cette fois, les conclusions sont moins franches. Les différences de CMT induites par la variation du bloc HA ne semblent pas suivre de tendance précise, tant dans les valeurs de CMT que dans la pente de la droite. De même, l'évolution de la CMT avec la concentration ne semble pas corrélée avec celle de la taille du bloc ELP. En revanche, dans la majorité des cas, à concentration égale, la CMT diminue lorsque la taille du segment ELP augmente, ce qui est cohérent avec les observations faites précédemment.

La duplication de cette expérience permettrait d'obtenir des réponses plus précises sur ces tendances et sur la corrélation avec les données obtenues par DLS. Cependant sa très longue durée ne rend pas la chose envisageable pour l'instant. **La technique de détermination de la CMT privilégiée reste donc l'analyse par DLS.**

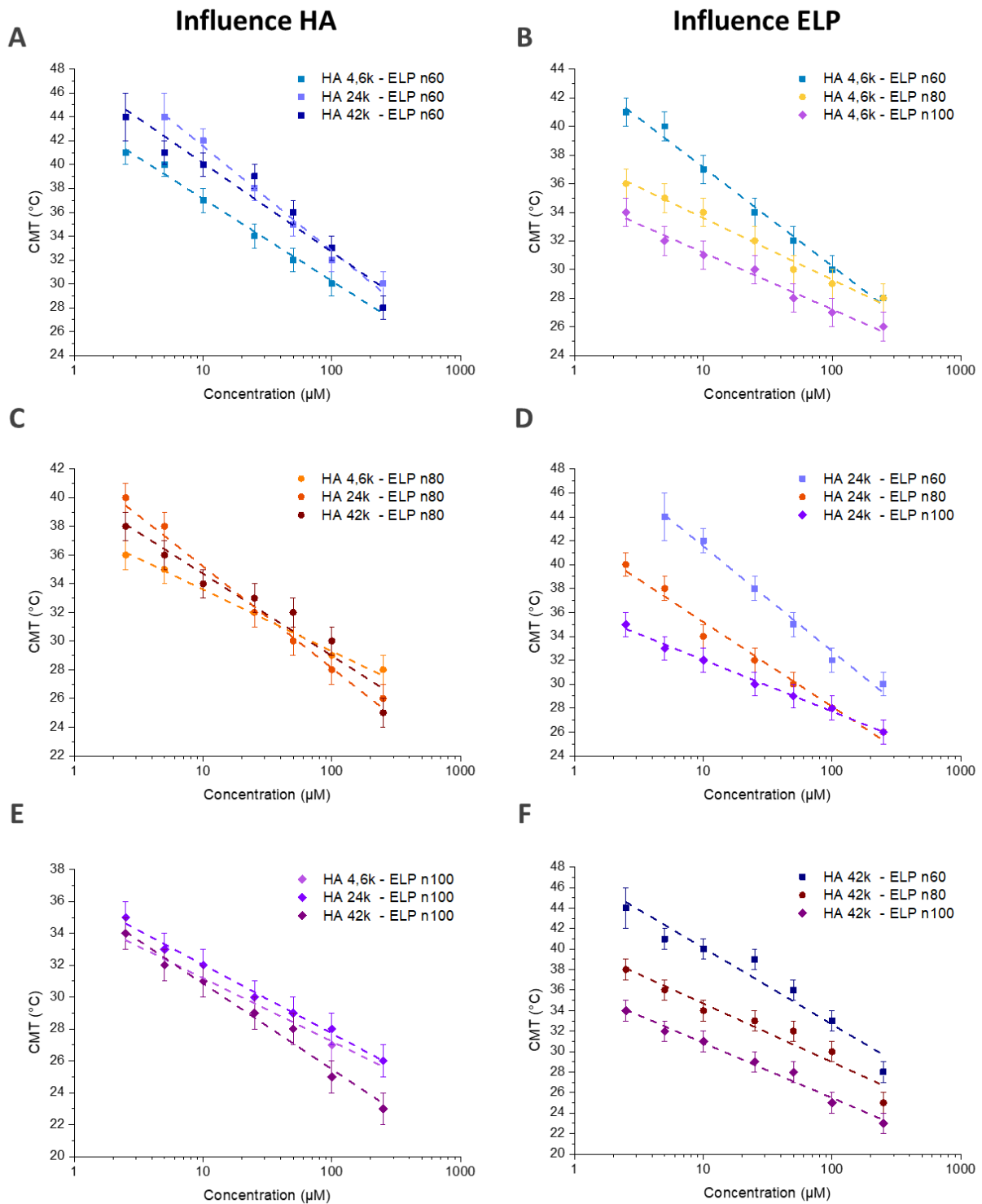


Figure III-12 : Spectroscopie de fluorescence : Évolution de la CMT en fonction de la concentration pour la librairie de bioconjugués HA-ELP. Gauche : Variation de la taille du HA pour chaque ELP : n60 (A), n80 (C), n100 (E). Droite : Variation de la taille de l'ELP pour chaque taille de HA : 4.6k (B), 24k (D), 42k (F). Une régression logarithmique des données est effectuée selon le modèle : $y = a-b \cdot \ln(x)$ et tracée en pointillés

III.A.2. Concentration Critique de Micellisation (CMC)

Si la spectroscopie de fluorescence n'est pas la technique de caractérisation de la CMT la plus simple, elle présente l'avantage de permettre de déterminer également la CMC. Une méthode d'analyse très similaire à celle décrite précédemment (p 154) a été appliquée aux mêmes spectres de fluorescence. Un exemple avec le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 est détaillé en **Figure III-13**.

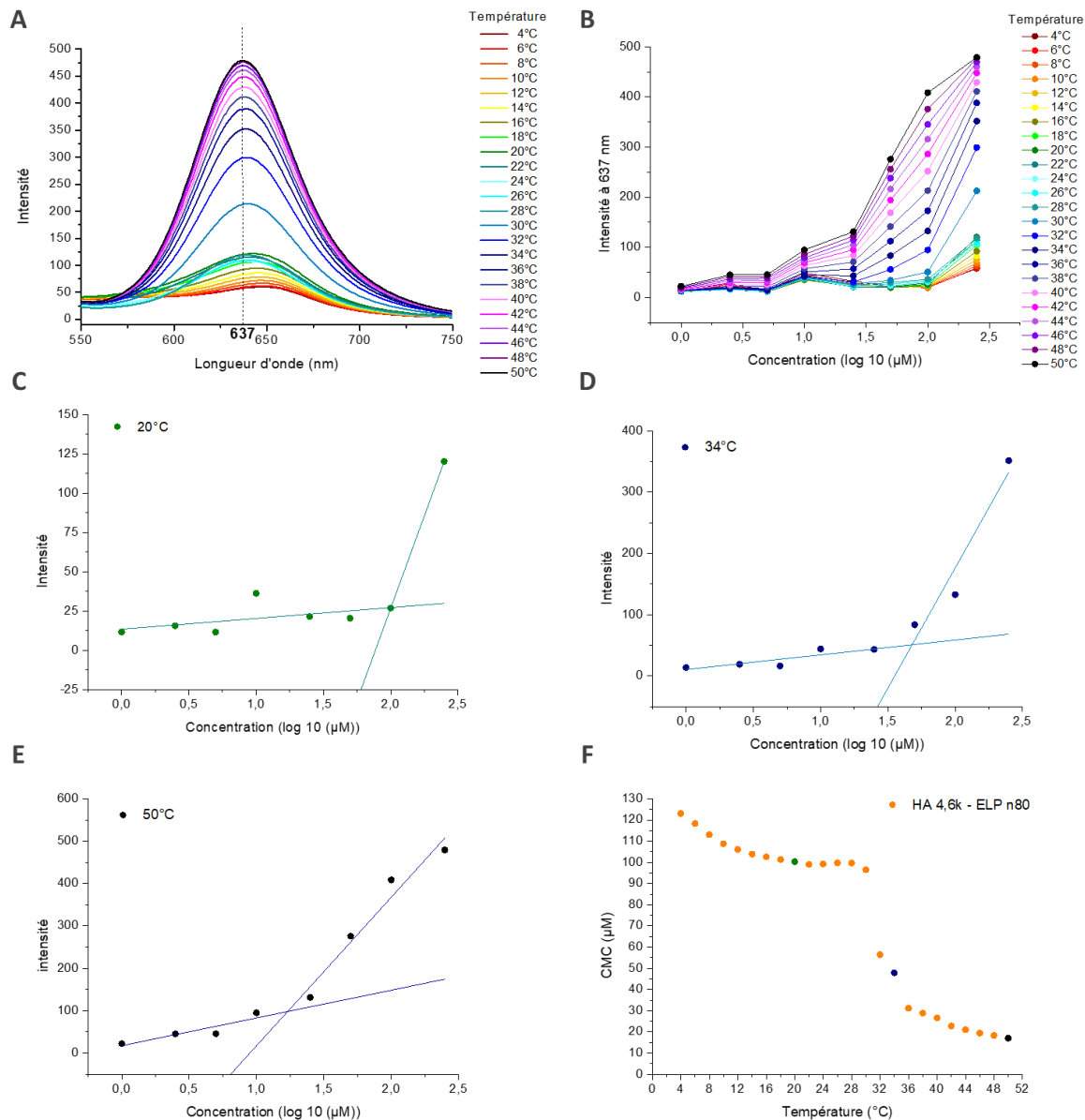


Figure III-13 : Détermination de la CMC en fonction de la température pour une solution de bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 dans un tampon PBS en présence de Nile Red par spectroscopie de fluorescence. A : Superposition des spectres d'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde à différentes températures. En pointillé : longueur d'onde de référence. B : Évolution de l'intensité de fluorescence à λ_{ref} en fonction de la concentration. C, D, E : Évolution de l'intensité de fluorescence à λ_{ref} en fonction de la concentration à 20°C, 34°C, et 50°C. La CMC est définie comme la concentration à l'intersection des deux régressions logarithmiques d'équation $y = a-b \cdot \ln(x)$. F : Évolution de la CMC en fonction de la température. Les CMC déterminées en C, D, et E sont représentées en couleur.

À partir des spectres obtenus pour la solution la plus concentrée, la longueur d'onde de référence a été sélectionnée. Il s'agit de la longueur d'onde pour laquelle l'intensité de fluorescence est maximale, toutes températures confondues (A). Cette longueur d'onde a été utilisée pour toutes les conditions de concentration et de température. L'intensité à cette longueur d'onde de référence a ensuite été tracée en fonction de la concentration pour toutes les températures (B).

Il est ainsi possible de constater l'influence de ces deux paramètres. À température fixe, l'intensité de fluorescence émise à λ_{ref} évolue suivant deux phases : une phase de plateau à basse concentration, suivie d'une phase de forte augmentation. Ce schéma est répété à toutes les températures. Il est intéressant de noter qu'à mesure que la température augmente, la valeur de l'intensité émise augmente également tandis que le point de départ de la phase d'augmentation se déplace vers les concentrations plus basses.

Afin de déterminer la CMC, une régression linéaire des données de ces deux phases a été effectuée. La CMC a été définie comme étant la concentration au point d'intersection de ces deux droites. Des exemples à basse, moyenne, et haute température sont donnés en **C**, **D**, et **E**. Chaque CMC ainsi déterminée a été reportée en fonction de la température sur le graphe **F**. À basse température, la CMC est assez élevée avec une tendance faiblement descendante. Puis une diminution brutale est observable entre 30°C et 36°C, suivie d'une dernière phase de diminution plus douce. Ainsi, à basse température la CMC est logiquement plus haute car les bioconjugués sont plus solubles et inversement à plus haute température, cette zone de transition brutale correspondant en fait à la zone de transition de la CMT des bioconjugués.

Il est intéressant de constater que l'évolution de la CMC n'est ni linéaire, ni logarithmique mais qu'il existe au contraire une gamme de températures critiques dans laquelle la CMC varie drastiquement. Cette gamme étant proche des températures physiologiques, il s'agit d'une donnée à surveiller lors d'éventuelles applications biologiques.

Cette méthode a été appliquée à tous les bioconjugués de la librairie. L'évolution de leur CMC en fonction de la température est donnée en **Figure III-14**. Un comportement similaire est observé pour la plupart d'entre eux. Certains 4,6k présentent cependant une évolution plus complexe, avec à basse température une première phase d'augmentation de la CMC en lieu et place de celle de faible décroissance. La méthode de fluorescence au Nile Red étant très sensible à l'environnement du milieu, des différences de polarité liées à des phases de coexistence de micelles, coacervats ou chaînes libres plus ou moins complexes et variables d'un échantillon à l'autre pourraient être à l'origine de ces variations.

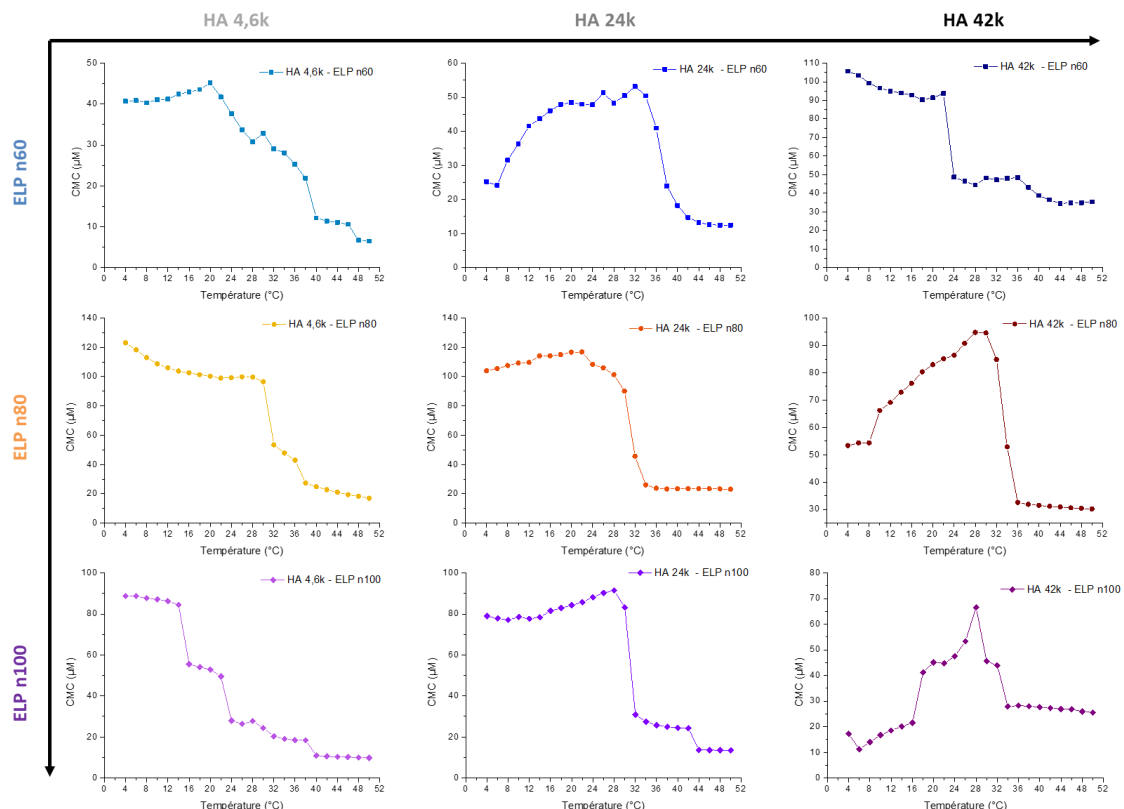


Figure III-14 : Évolution de la CMC en fonction de la température pour la librairie de bioconjugués HA-ELP en solution dans un tampon PBS.

Tout comme pour la CMT, une étude de l'évolution de la CMC en fonction de la taille relative des blocs HA et ELP est effectuée (**Figure III-15**). Selon le même principe que précédemment, la colonne de gauche rassemble les bioconjugués ayant un bloc ELP identique et bloc HA de taille croissante et inversement pour la colonne de droite. Cette fois, l'évolution de la composition des bioconjugués ne semble pas avoir d'influence : ni sur l'allure des courbes, pas plus que sur la gamme de températures critiques ou encore sur la valeur de la CMC à basse et haute température.

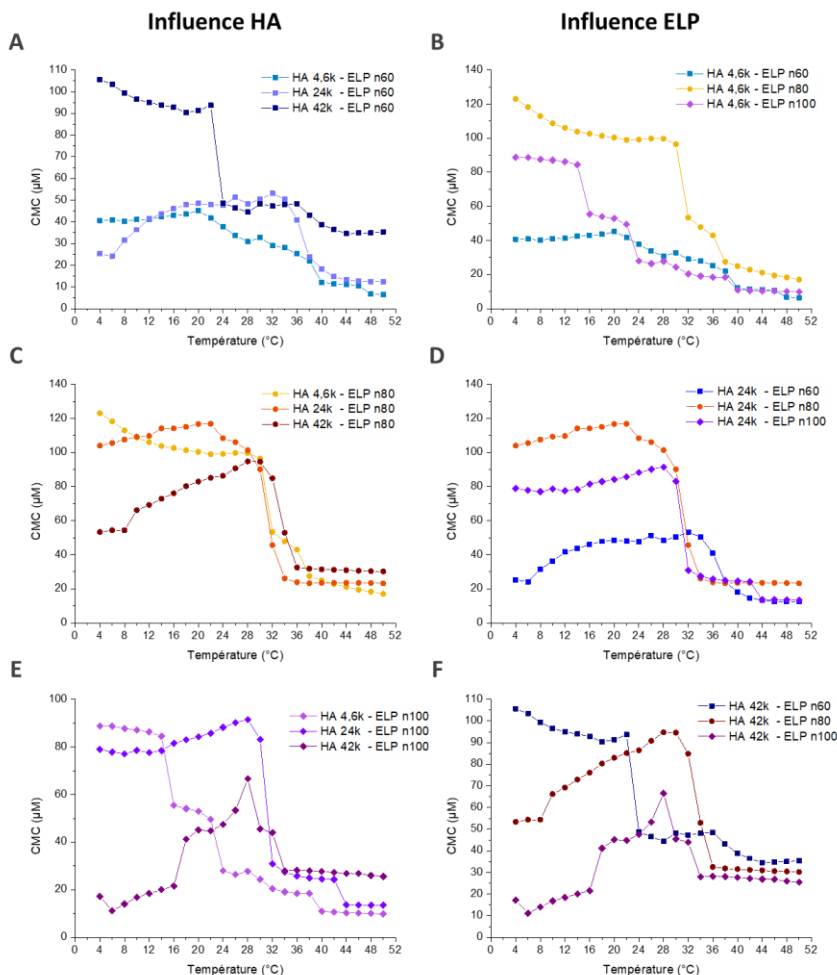


Figure III-15 : Évolution de la CMC en fonction de la température pour la librairie de bioconjugués HA-ELP. Gauche : Variation de la taille du HA pour chaque ELP : n60 (A), n80 (C), n100 (E). Droite : Variation de la taille de l'ELP pour chaque taille de HA : 4.6k (B), 24k (D), 42k (F).

S'il semble donc compliqué de faire des prévisions pour un bioconjugué non inclus dans cette librairie, il est à noter que les CMC à 37°C semblent toutes inférieures à 50 µM (Tableau III-2). Dans l'hypothèse d'une administration par voie intraveineuse chez un modèle murin (100 µL pour une souris de 25 g), une solution de concentration initiale de 35-80 µM devrait être injectée (selon le bioconjugué choisi), afin de conserver un état nanoparticulaire une fois dans la circulation sanguine. Pour l'injection de 5 mL de solution chez un modèle humain adulte, la concentration devrait alors être de 50 mM.

Tableau III-2 : Tableau récapitulatif des CMC mesurées par spectroscopie de fluorescence à 37°C pour des solutions de bioconjugués HA-ELP (78 µM, PBS) en présence de Nile Red.

CMC à 37°C (µM)	HA 4,6k	HA 24k	HA 42k
ELP n60	23	32	46
ELP n80	35	24	32
ELP n100	18	25	28

III.A.3. Réversibilité

Les conditions de température et de concentration critiques (CMT, CMC) auxquelles le phénomène d'auto-assemblage des bioconjugués HA-ELP se produit ont ainsi été déterminées. Sa réversibilité a également fait l'objet d'une étude. Les résultats d'analyse par DLS d'une solution de bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 à 78 µM dans un tampon PBS est présentée en **Figure III-16**.

La solution est soumise à 3 cycles composés chacun d'une rampe de température ascendante puis d'une rampe descendante. En **Figure III-16 A**, les trois cycles sont représentés chronologiquement, et illustrent la variation du diamètre moyen et de la dispersité. Pour permettre une meilleure compréhension, l'abscisse indique les températures atteintes à chaque point de mesure. Elle est identique pour la taille moyenne (Z-Average) et pour la dispersité (Pdl). L'allure de ces deux paramètres montre bien la nature réversible de l'auto-assemblage. En effet, les observations réalisées sur une unique rampe ascendante (**Figure III-4**) se confirment ici sur les rampes suivantes. On retrouve une répétition des 3 gammes de température décrites précédemment (**p 148**) : une première à basse température pour laquelle la taille moyenne est intermédiaire et la dispersité élevée, une deuxième de coacervation où les objets sont de taille bien plus grande avec une dispersité moyenne, et enfin à haute température une dernière phase d'auto-assemblage nanoparticulaire avec une stabilisation à une taille d'objet faible et une dispersité très basse. La symétrie de comportement au sein d'un même cycle entre les rampes ascendante et descendante montre par ailleurs que le désassemblage suit le même schéma que l'assemblage.

En **Figure III-16 B**, les cycles sont cette fois présentés sur une unique échelle de température. Cela permet de constater la bonne reproductibilité atteinte pour les tailles de coacervat et de nanoparticules d'un cycle à l'autre. En revanche une légère hystérèse est constatée entre les rampes ascendantes et descendantes lors de la formation des nanoparticules, cette dernière tendant à se réduire au fur et à mesure des cycles.

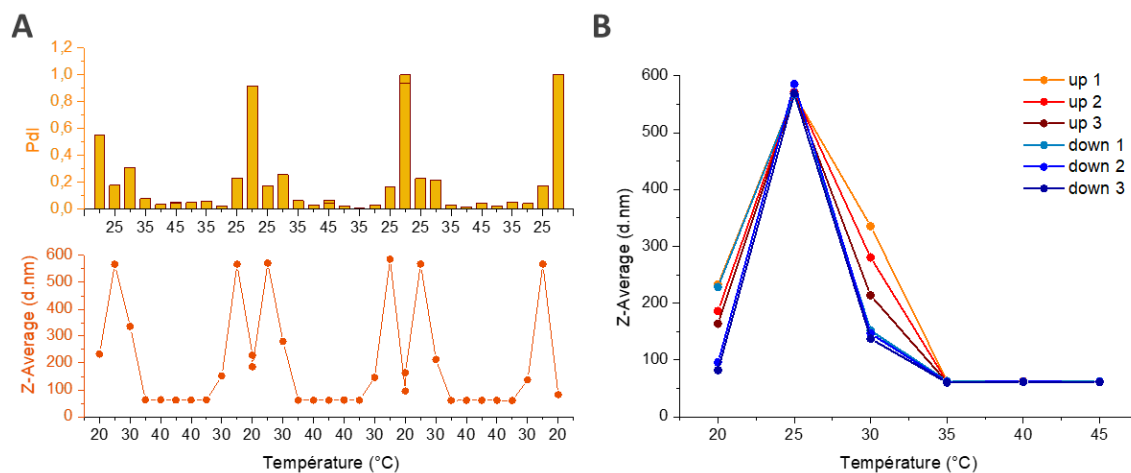


Figure III-16 : Étude de la réversibilité de l'auto-assemblage par DLS du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 en solution à 78 µM dans un tampon PBS. A : Évolution de la taille des objets en solution en fonction de la température et du Pdl lors des 3 cycles de température, représentés de façon séquentielle. B : Évolution de la taille des objets en solution en fonction de la température pour 3 cycles de rampes ascendantes ('up') et descendantes ('down').

Les bioconjugués de cette librairie présentent donc une capacité d'auto-assemblage réversible dont la dépendance en température (CMT) et en concentration (CMC) est mesurable et compatible avec des applications biologiques.

III.B. Caractérisation physico-chimique des nanoparticules

Les nanoparticules formées par l'auto-assemblage des bioconjugués HA-ELP ont elles aussi fait l'objet d'une caractérisation spécifique. En effet, la morphologie et la charge des nano-objets peuvent fortement influencer leur efficacité et leur devenir en conditions biologiques.^{25,26}

III.B.1. Mesure du diamètre hydrodynamique

La détermination du diamètre des nanoparticules formées par l'auto-assemblage des bioconjugués HA-ELP est une caractérisation primordiale, notamment pour anticiper leur devenir lors d'applications biologiques. En effet, plusieurs processus diffèrent selon la taille des objets administrés (e.g. élimination rénale ou hépatique, possibilité de ciblage passif par effet EPR).

La **Figure III-17** présente plus en détail l'influence de la température sur la taille des objets en solution.

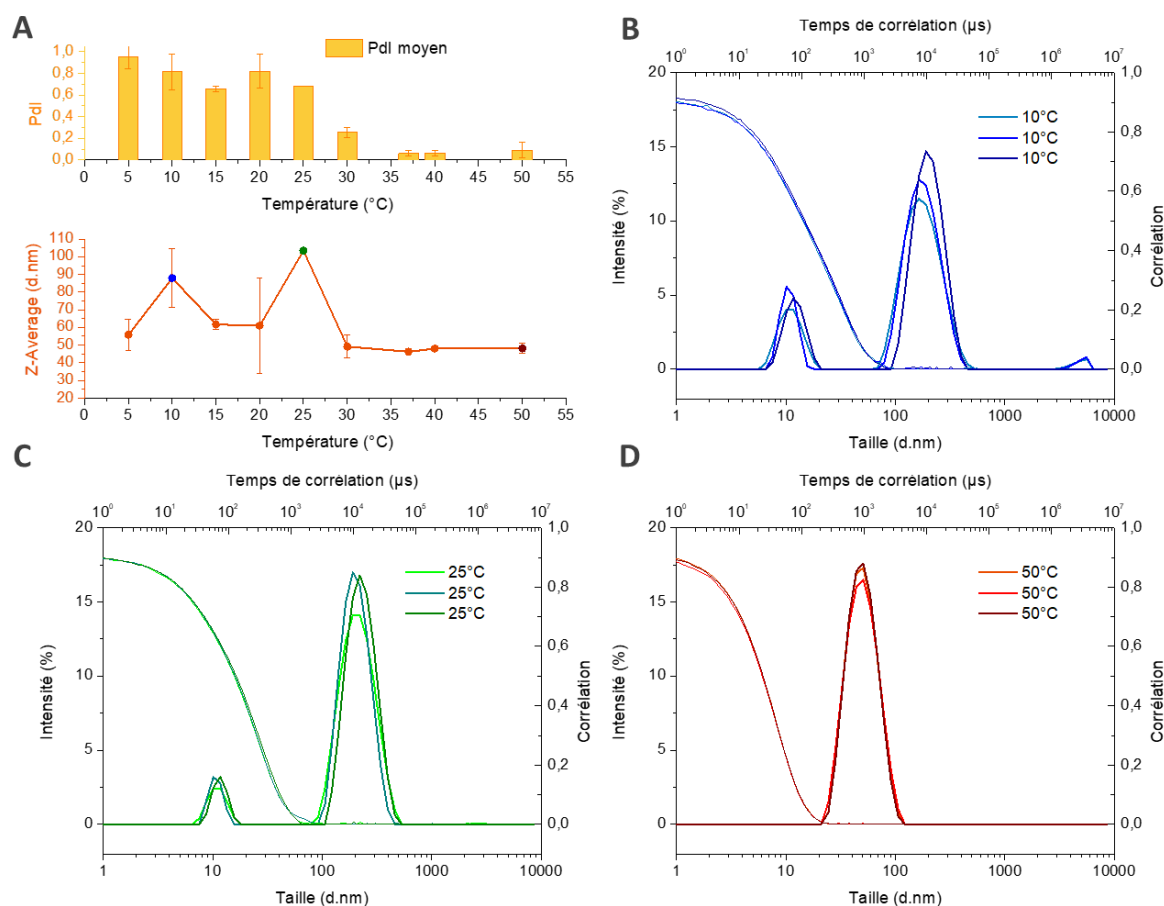


Figure III-17 : Étude de la taille des objets présents pour une solution de bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 (78 μM, PBS) par DLS. A : Évolution du Z-Average moyen et du Pdl moyen en fonction de la température. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type sur N solutions différentes et les cercles colorés aux températures pour lesquelles un exemple détaillé est donné en B, C, et D. Pour ces trois températures, la distribution de taille en intensité est représentée ainsi que les corrélogrammes associés.

En **Figure III-17 A**, une représentation de l'évolution de la taille moyenne et de la dispersité en fonction de la température pour une solution de bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 (78 μM, PBS) rappelle les 3 phases vues précédemment (**Figure III-5**) : solution très hétérogène à basse température, présence de coacervat à température intermédiaire, et formation de nanoparticules plus monodisperses au-dessus de la CMT. Les données mesurées sur N solutions différentes et moyennées sont rassemblées dans le tableau en **Annexe III-12**.

Un exemple des distributions de taille et des corrélogrammes correspondants est donné pour chaque état adopté par le bioconjugué (chaîne libre, coacervat, nanoparticule) en **B**, **C** et **D** respectivement. À 10°C, deux populations principales sont visibles : une d'environ 10 nm de diamètre et l'autre d'environ 200 nm. Quelques agrégats micrométriques sont également présents. Cela confirme bien l'hétérogénéité traduite par un fort Pdl. À 25°C, lors de la phase de coacervation, la proportion de chaînes libres est plus faible et celle de gros objets semble plus importante avec une distribution moins large. Le Pdl est donc plus faible. Enfin, à 50°C, une seule population est présente à 50 nm. La distribution est fine et très reproductible sur les 3 mesures consécutives. Les nanoparticules formées sont donc assez monodisperses et ont une taille compatible avec les applications envisagées (10-200 nm pour bénéficier de l'effet EPR). Elles possèdent une taille proche de celle des nanoparticules de HA_{5k}-PBLG préalablement étudiées dans l'équipe (30 nm), qui peuvent donc être utilisées comme référence.^{27,28}

Afin de vérifier la composition de la solution à basse et haute température, la distribution de taille est présentée en **Figure III-18** à la fois en intensité diffusée et en nombre d'objets. En observant cette dernière, il est clair qu'à 10°C la majorité des objets possède une taille de quelques nanomètres, tandis que la deuxième population de plus grande taille n'est plus apparente. Il s'agit donc bien principalement de chaînes libres en solution, en présence d'un nombre très faible d'agrégats. Ces derniers ayant une taille bien plus élevée, ils diffusent beaucoup plus la lumière, ce qui explique leur forte contribution dans la distribution en intensité. À haute température, la forme de la distribution n'est que peu modifiée : elle se décale vers des tailles légèrement plus faibles et s'affine, la contribution des nanoparticules les plus grandes n'étant plus surévaluée. Cela confirme la présence en solution de petites nanoparticules monodisperses.

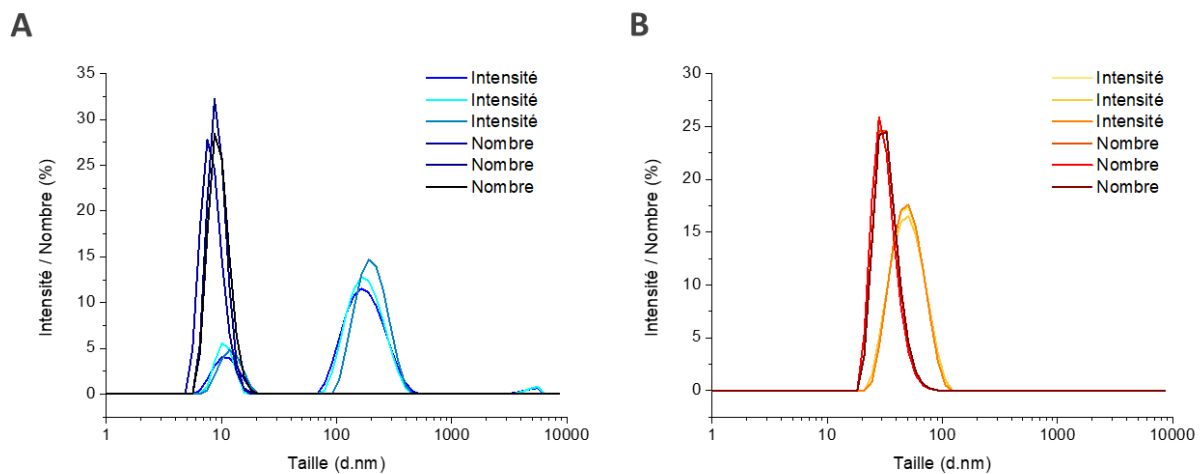


Figure III-18 : Comparaison des représentations de la distribution de taille en intensité (clair) ou en nombre (foncé) à 10°C (A) et 50°C (B) une solution de bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 (78 μM, PBS).

Si cette distribution de taille en nombre a donc l'avantage d'être plus représentative de la composition de l'échantillon en solution, elle peut occulter la présence d'agrégats potentiellement problématiques, même minoritaires. Les suivis de taille se font donc ici principalement en intensité.

Plusieurs paramètres pouvant affecter la taille des objets formés ont été étudiés. Les résultats sont présentés en **Figure III-19**.

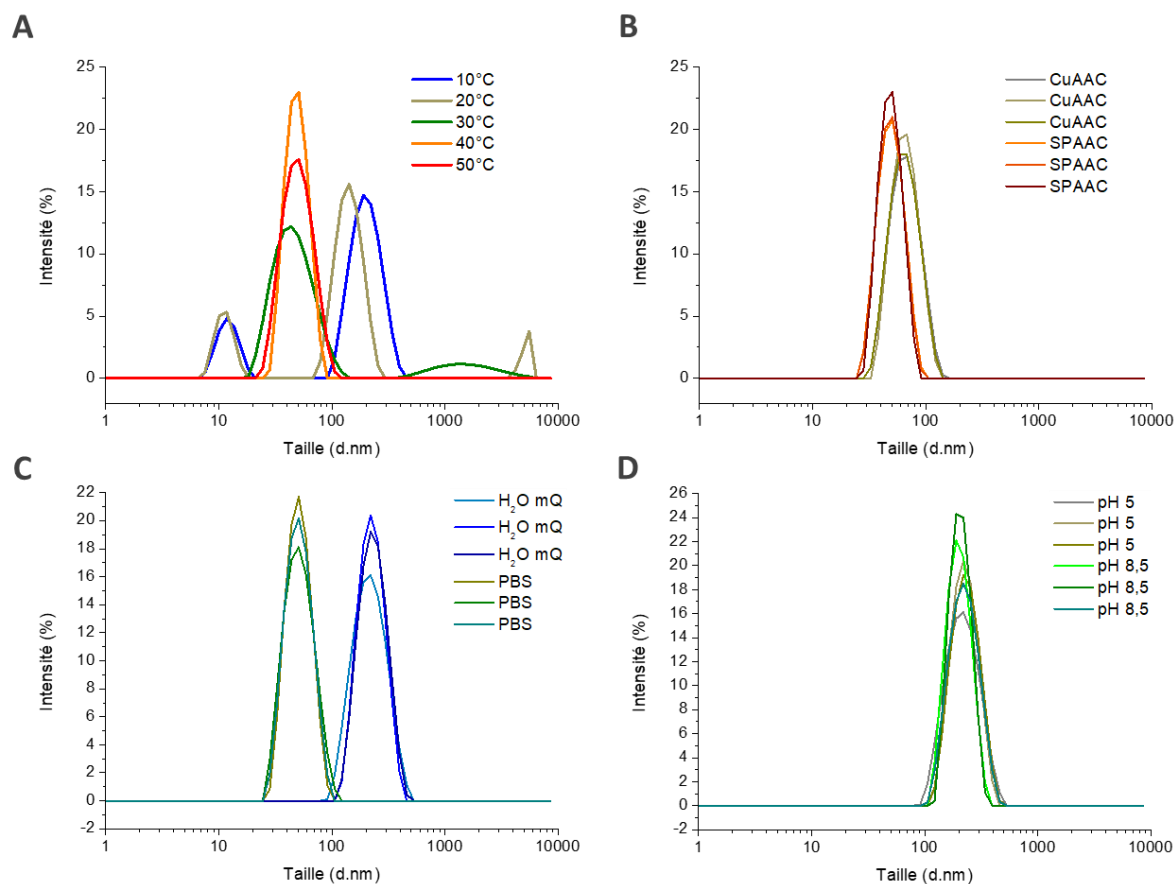


Figure III-19 : Influence de différents paramètres sur la taille des objets auto-assemblés formés par le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 (78 μM, PBS). A : Influence de la température sur la distribution de taille. B : Influence de la structure moléculaire sur la distribution de taille au-dessus de la CMT (40°C). C : Influence de la salinité sur la distribution de taille au-dessus de la CMT (37°C). Solutions à 78 μM dans de l'eau déionisée (mQ, bleu) ou dans un tampon PBS à 300 mosm à 37°C (vert). D : Influence du pH sur la distribution de taille au-dessus de la CMT (37°C). Solutions dans de l'eau déionisée à pH 5 (gris) ou 8,5 (vert).

La **Figure III-19 A** résume l'évolution de cette distribution de taille au cours d'une rampe de température ascendante. À 10°C et 20°C, l'allure est celle caractéristique des basses températures, avec notamment une population à très faible taille : les chaînes libres. À partir de 30°C, toutes les chaînes libres ont disparues et la distribution de taille se rapproche de 50 nm. Les objets en solution sont à présent des nanoparticules, la CMT a donc été atteinte. Par la suite, l'augmentation de la température n'a plus d'effet sur la taille et sur la dispersité : elles restent stables. Cela correspond bien aux observations faites précédemment sur l'évolution de la taille moyenne en fonction de la température (**Figure III-17**). Les distributions de tailles complètes et les corrélogrammes associés sont représentés en **Annexe III-11** pour chacune de ces températures.

En **Figure III-19 B**, il apparaît que la structure moléculaire liée au choix de la voie de synthèse présente un effet sur la taille : le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 (SP) forme des nanoparticules plus petites que le HA_{4,6k}-ELPn80 (Cu). La forte hydrophobie des cycles aromatiques dérivés du DBCO à la jonction entre les blocs influence certainement les propriétés d'auto-assemblage et participe probablement à la densification du cœur de la nanoparticule et donc à la diminution de son diamètre. Les données de tailles pour le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 (Cu) sont elles aussi présentées en **Annexe III-12**.

La salinité est également un facteur primordial (**Figure III-19 C**) : une solution dans un tampon PBS à 300 mosm donne lieu à des nanoparticules plus petites que dans de l'eau déionisée. Ainsi, une augmentation de la salinité diminue la solubilité des ELPs, conduisant à une plus grande densification du cœur des micelles. Il est donc important d'effectuer ces analyses en conditions physiologiques. En revanche, le pH ne semble pas avoir d'influence, dans la gamme d'intérêt (**Figure III-19 D**). Des pH plus extrêmes risquant d'endommager le bioconjugué par hydrolyse du HA, ils n'ont pas été testés.

Les conditions de salinité, de pH et la voie de synthèse étant fixées, il est possible de comparer les tailles des objets formés par les différents bioconjugués à différentes températures. Des études similaires à celle-ci ont été menées pour les bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn60 (Annexe III-14 & Annexe III-15) et HA_{4,6k}-ELPn100 (Annexe III-16 & Annexe III-17).

Les données mesurées pour la librairie entière à 5°C, 37°C et 50°C sont rassemblées dans le tableau en Annexe III-18 et présentées en Figure III-20. Comme précédemment, la colonne de gauche rassemble les bioconjugués ayant un bloc ELP identique et bloc HA de taille croissante et inversement pour la colonne de droite.

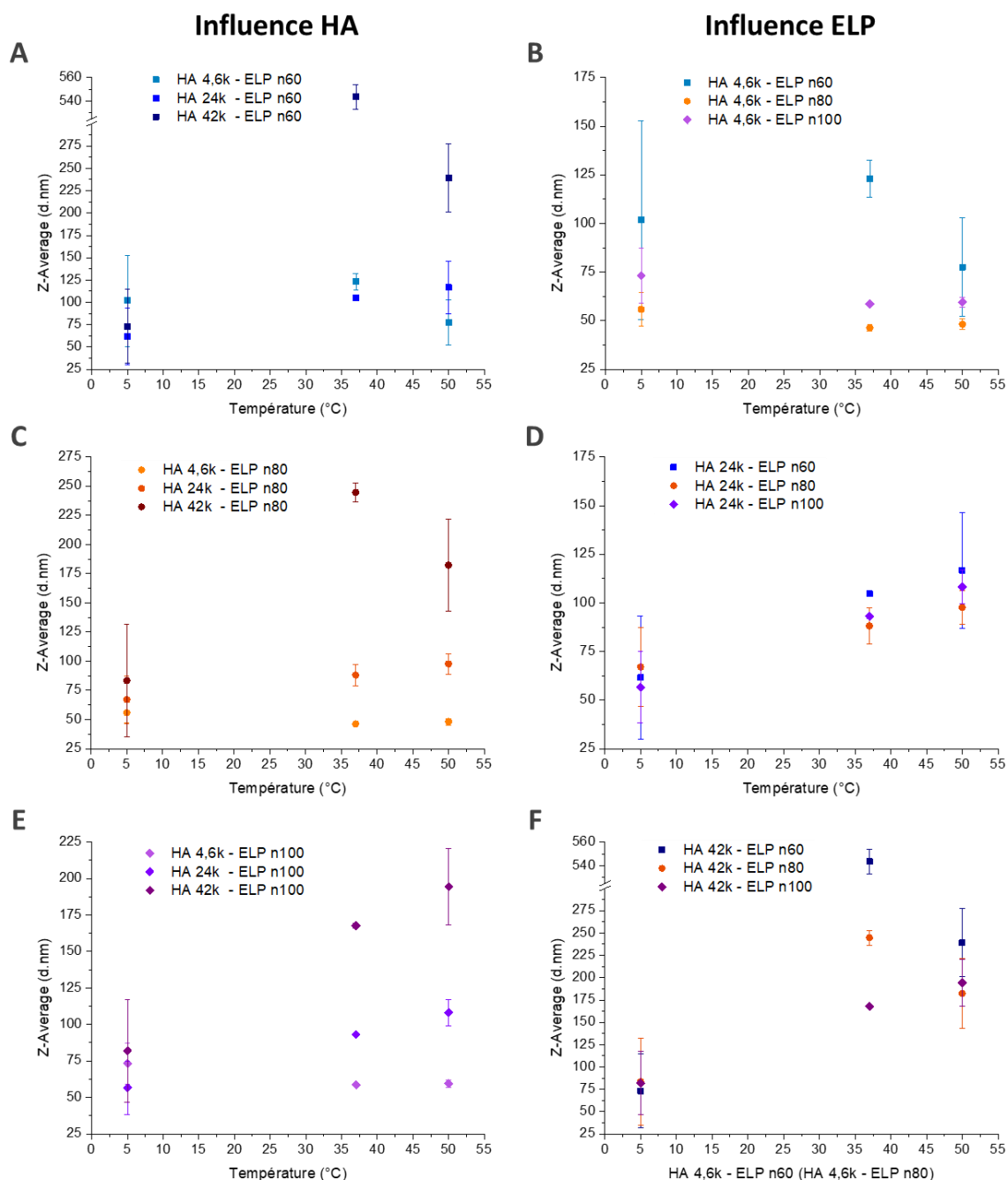


Figure III-20 : Comparaison de la taille des objets en solution à 5°C, 37°C et 50°C pour la librairie de bioconjugués HA-ELP. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type sur N répliques (solutions différentes). Gauche : Variation de la taille du HA pour chaque ELP : n60 (A), n80 (C), n100 (E). Droite : Variation de la taille de l'ELP pour chaque taille de HA : 4.6k (B), 24k (D), 42k (F). Sur les graphes A et F, troncature de l'axe des ordonnées (300-525 nm). Les données sont rassemblées dans le tableau en Annexe III-18.

Si à froid les résultats se confondent (les nanoparticules ne sont pas encore formées), il en va différemment pour les températures les plus hautes. Ainsi, une différence notable de la taille des nanoparticules est observée selon le bioconjugué, qui semble directement corrélée à la variation de la masse molaire du HA, mais pas à celle de l'ELP. Le HA se trouvant en théorie en surface de la nanoparticule et étant très hydrophile, il peut se déployer et ainsi avoir une forte influence sur le rayon hydrodynamique de celle-ci. À l'inverse, le bloc ELP étant condensé dans le cœur, sa taille n'a que peu d'effet sur celle des objets formés.

Une étude plus approfondie à 37°C permet d'apporter une autre explication aux différences de taille observées à cette température. La **Figure III-21 A** présente la taille des objets formés à 37°C par chacun des bioconjugués en solution à la même concentration (78 µM, PBS). Les différences liées à la taille du bloc HA sont toujours visibles. Cependant les graphes **B**, **C**, et **D** rappellent l'évolution de la taille moyenne en fonction de la température pour ces bioconjugués, groupés par bloc HA constant. La ligne pointillée repère la température de 37°C. On peut alors constater que dans le cas des bioconjugués HA-ELPn60, la CMT est très proche voire supérieure à 37°C. Il reste donc des coacervats en solution, qui augmentent la valeur du Z-average. L'utilisation de ces composés en conditions physiologiques n'est donc pas pertinente à cette concentration.

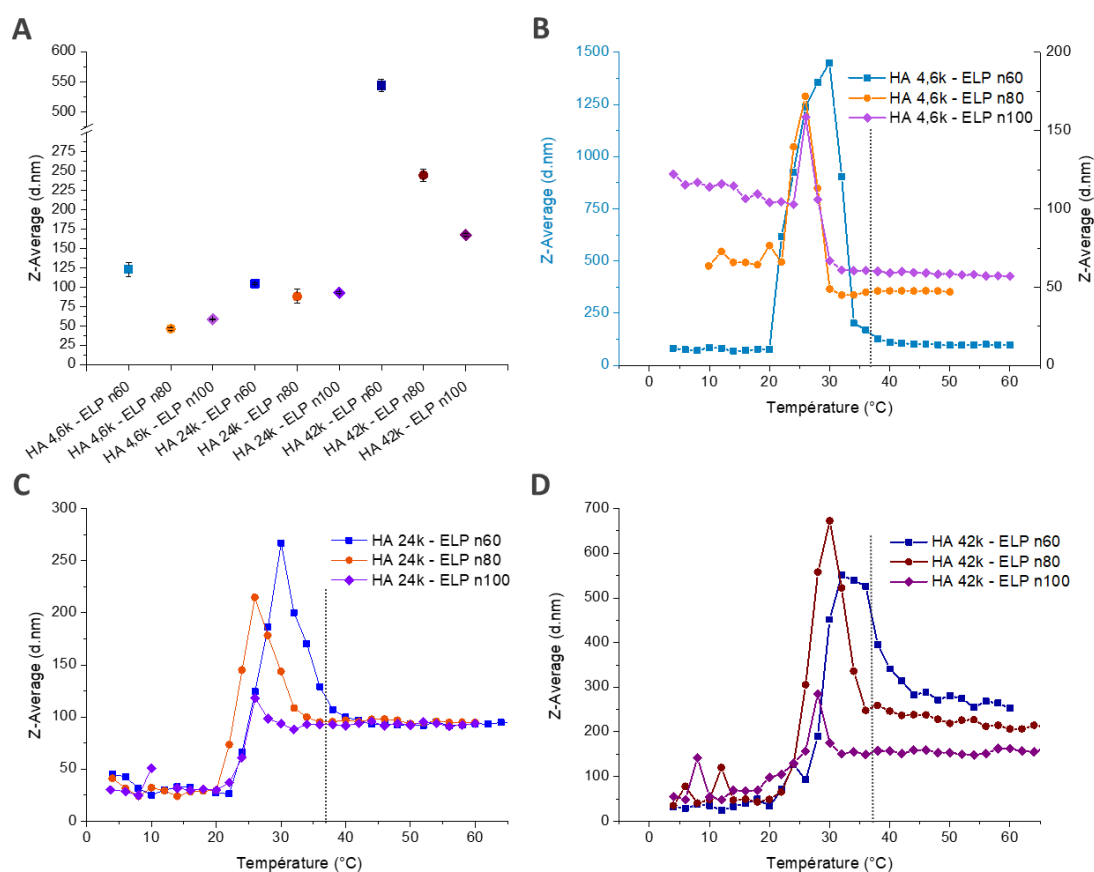


Figure III-21 : Comparaison de la taille des nanoparticules formées par les bioconjugués de la librairie dans des conditions physiologiques (78 µM, PBS, 37°C). Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type sur N répliques (solutions différentes). **A :** Taille des nanoparticules en fonction du bioconjugué. Troncature de l'axe des ordonnées (300-525 nm). **B, C, D :** Évolution de la taille des objets en solution en fonction de la température pour les bioconjugués HA_{4,6k}-ELP (**B**), HA_{24k}-ELP (**C**), et HA_{42k}-ELP (**D**). La ligne pointillée indique une température de 37°C. **B :** L'axe des ordonnées de gauche correspond au bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn60 uniquement et celui de droite aux bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn80 et n100.

Les nanoparticules formées ont donc dans l'ensemble une taille compatible avec une utilisation biologique. Leur diamètre inférieur à 200 nm leur permettrait une pénétration dans les tumeurs par effet EPR, tandis que leur taille supérieure à 20 nm impliquerait une élimination par le foie plutôt que par les reins.

III.B.2. Stabilité dans le temps

Une vérification de l'intégrité des objets formés au cours du temps a été entreprise. À court terme, l'objectif était de constater le maintien des nanoparticules dans un état supramoléculaire précis. À long terme, c'est la capacité des bioconjugués à s'auto-assembler pour donner des objets similaires après stockage qui a été étudiée.

La stabilité à court terme est représentée en **Figure III-22**. Le graphe **A** rappelle l'évolution de la taille moyenne en fonction de la température et les différentes formes adoptées par les bioconjugués une fois assemblés. Afin de vérifier la stabilité de l'état de coacervat (**B**) et de nanoparticule (**C**), la solution a été maintenue à la température correspondante (resp. 27°C et 37°C) pendant plusieurs heures et des mesures de DLS prises régulièrement.

Dans le cas du coacervat, les caractéristiques de cet état sont bien retrouvées sur le graphe **B**, avec une taille moyenne élevée, autour de 250 nm et un Pdl relativement faible d'environ 0,1. Ces caractéristiques varient légèrement autour de ces valeurs au cours du temps mais sont globalement stables. Sur cette échelle de temps, le coacervat n'est donc pas un état métastable, qui se déliterait au cours du temps, mais bien un état stable qui pourrait être étudié de manière plus approfondie.

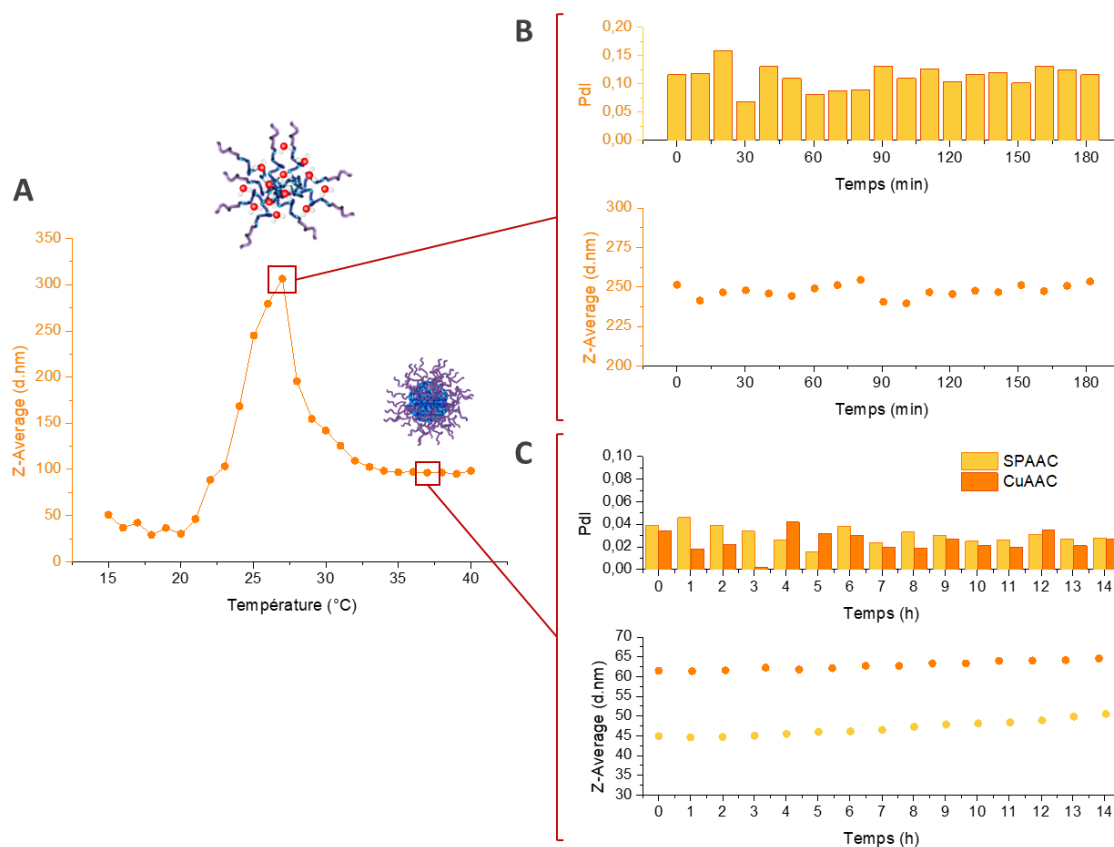


Figure III-22 : Étude de la stabilité sur des temps courts des nanoparticules formées par le bioconjugué $HA_{4,6k}$ -ELPn80 en solution (78 μ M, PBS). A : Évolution de la taille des objets en solution en fonction de la température. B,C : Étude de la stabilité de l'état de coacervat (B) et nanoparticulaire (C) au cours du temps. Suivi de la taille et de la dispersité d'une solution maintenue à resp. 27°C durant 3h (B) et 37°C durant 14h (C). Comparaison selon la voie de synthèse : SPAAC ou CuAAC.

D'autre part, le graphe **C** témoigne de la bonne stabilité des nanoparticules au cours du temps, avec une dispersité très faible ($<0,05$). Dans l'ensemble, les nanoparticules formées sont donc stables en conditions physiologiques durant plusieurs heures.

La stabilité à long terme a été étudiée sur plusieurs mois. Il s'agissait de vérifier si un stockage à 4°C durant une longue période est susceptible d'altérer les propriétés des bioconjugués et leur capacité à s'auto-assembler. La **Figure III-23** présente l'évolution des distributions de taille et de la taille moyenne en fonction de la température pour des solutions de bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn80 (SP/Cu) fraîchement préparées et après plusieurs mois de stockage à 4°C. Dans le cas du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 (Cu) (**A, C**), quelques modifications sont observables. Après 18 mois, la taille des objets a légèrement augmenté et la distribution s'est élargie, traduisant une plus grande dispersité. De plus, la CMT semble avoir diminué de 2°C.

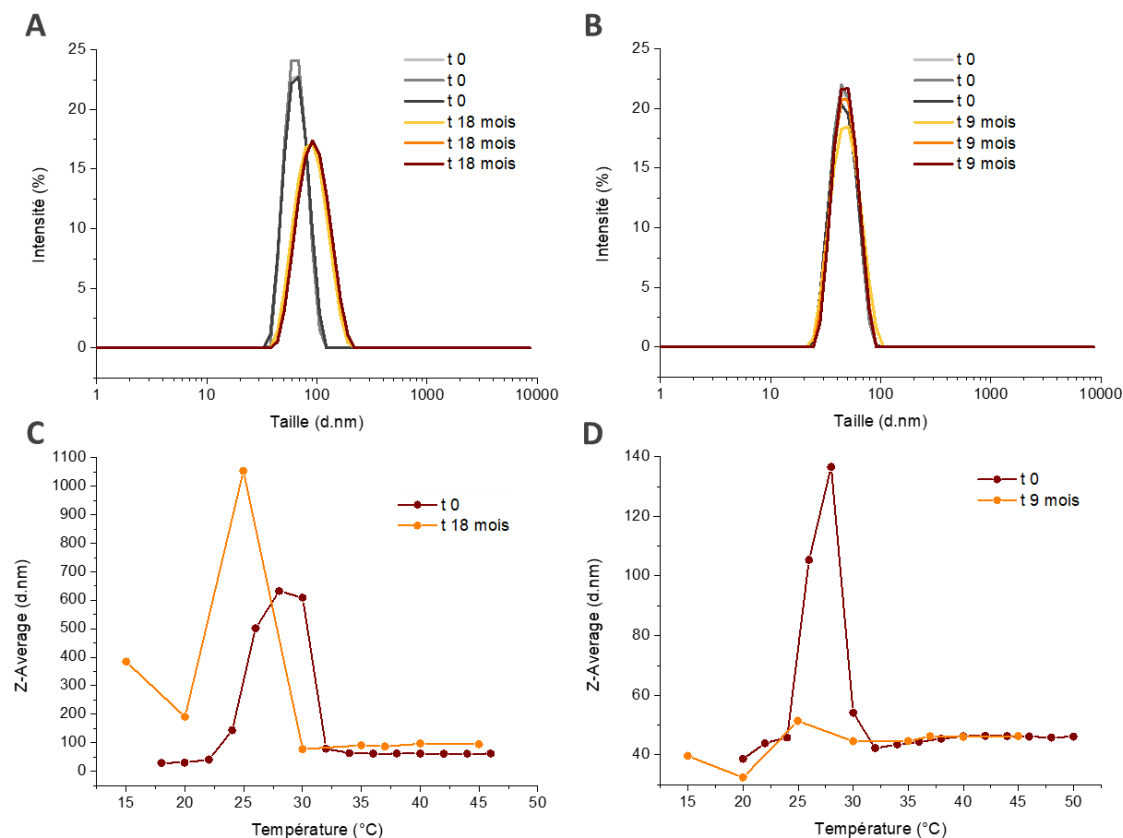


Figure III-23 : Étude de la stabilité à long terme des bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn80 stockés en solution à 4°C (78 μM, tampon salin). A, B : Représentation de la distribution de taille en intensité des nanoparticules formées à 37°C par un bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 (Cu) (A) et HA_{4,6k}-ELPn80 (SP) (B) dans une solution fraîchement préparée et 18 mois (A) ou 9 mois (B) plus tard. C, D : Évolution de la taille des objets en fonction de la température pour les mêmes solutions de bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn80 (Cu) (C) et HA_{4,6k}-ELPn80 (SP) (D).

Le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 (SP), quant à lui, semble n'avoir été que peu affecté par son stockage de 9 mois (**B, D**). La distribution de taille est quasiment identique, tout comme la CMT. Une différence notable est cependant à relever : la phase de coacervat n'est plus réellement visible, avec une augmentation de la taille moyenne avant la CMT qui demeure très faible. Un intervalle de mesure plus restreint permettrait peut-être de mieux la visualiser. Une étude similaire faite avec le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn100 (SP) est présenté en **Annexe III-19**.

Le système présenté ici est donc assez robuste, avec une formation de nanoparticules dont la taille est stable aussi bien augmentant la température (au-dessus de la CMT) qu'en la maintenant fixe pendant plusieurs heures. Par ailleurs, le stockage à 4°C pendant plusieurs mois ne semble pas avoir de conséquences néfastes. Néanmoins, un stockage en conditions stériles est recommandé afin d'éviter toute croissance bactérienne ou fongique dans les solutions.

III.B.3. Potentiel Zêta

Une autre caractéristique importante à prendre en compte dans le développement de nouvelles nanoparticules est leur charge en surface. Pour cela, des mesures de potentiel zêta ont été effectuées. Le HA possédant de nombreux groupes hydroxyles, carbonyles et acétamides, il est négativement chargé à pH physiologique ($pK_a \approx 3-4$). Une mesure de potentiel zêta permet ainsi de vérifier s'il se déploie bien à la surface ou s'il est au contraire piégé dans le cœur de la particule.

La **Figure III-24** illustre les mesures réalisées pour un bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80.

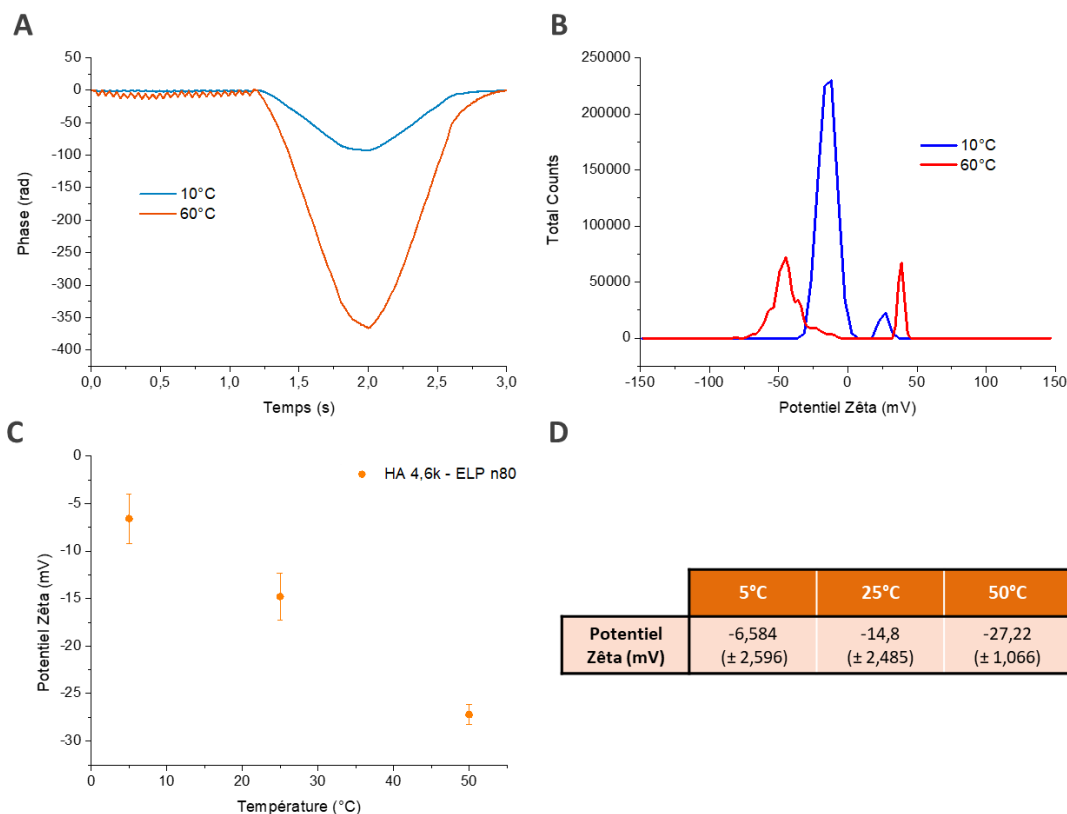


Figure III-24 : Mesure du potentiel zêta des espèces en solution pour un bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80. A : Représentation de la phase en fonction du temps pour une température inférieure à la CMT (10°C) et supérieure à la CMT (60°C). B : Représentation de la distribution de potentiel zêta à ces mêmes températures. C : Évolution du potentiel zêta en fonction de la température. Les valeurs des données sont indiquées en D.

La salinité du tampon PBS utilisé classiquement étant trop élevée (300 mosm), il n'a pas été possible d'estimer le potentiel zêta des nanoparticules dans les conditions physiologiques. Deux techniques différentes ont alors été utilisées.

La première dite "barrière diffusive" a permis d'analyser une faible quantité de produit dans des conditions compatibles avec la mesure. Les valeurs de potentiel zêta ont été mesurées à des températures très inférieure et très supérieure à la CMT afin d'étudier l'influence de l'état de chaîne libre ou de nanoparticule. Les résultats obtenus sont présentés sur les graphes **A** et **B** et en **Annexe III-20**. En **A**, l'évolution de la phase en fonction du temps montre une phase négative, qui s'amplifie à haute température. En **B**, les distributions de potentiel zêta à froid et à chaud témoignent sensiblement de la même chose. Dans les deux cas, le pic principal est présent dans la partie négative des potentiels. Si celui à froid est plus grand, celui à chaud se trouve dans les potentiels négatifs les plus élevés. Le potentiel zêta est donc plus négatif à chaud qu'à froid. Ceci semble aller dans le sens du modèle de nanoparticules envisagé tout au long de ces travaux. À froid, les chaînes adoptent une structure en pelote, qui masque partiellement les charges du HA. À chaud au contraire, l'auto-assemblage sous forme de nanoparticule permet le déploiement du HA à la surface ce qui augmente l'exposition des charges. Le potentiel zêta devient donc plus négatif.

L'aspect inhabituel de la distribution à 60°C pourrait provenir de facteurs externes tels qu'un endommagement des électrodes lors des mesures précédentes, ou de perturbations liées à l'agitation thermique. Cette technique présente cependant deux désavantages : elle est relativement longue à mettre en place, demande de la dextérité et ne permet pas de mesurer le potentiel zêta dans le tampon usuel.

Une méthode plus simple a donc été testée. Elle consiste à diluer par 10 une solution de bioconjugué de référence avec de l'eau déionisée pour en diminuer la salinité. Des mesures de potentiels zêtas ont donc été effectuées à 5°C, 25°C et 50°C. Les résultats sont rassemblés sur le graphe C et dans le tableau D. La diminution du potentiel zêta γ est confirmée, et semble de plus être linéaire avec la température. Cela confirme donc les observations faites avec la technique précédente.

La présence du HA en surface confère donc une charge globalement négative à la nanoparticule. Cela pourrait perturber sa capacité à approcher la membrane cellulaire, également chargée négativement, mais aussi limiter l'adhésion électrostatique non spécifique.

III.B.4. Microscopie Électronique en Transmission (TEM)

L'utilisation d'un microscope électronique en transmission a permis une visualisation des nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn80. Afin de maintenir un état auto-assemblé, le dépôt a été effectué à chaud et le contraste amélioré par un marquage à l'acétate de samarium.

Les images obtenues forment la **Figure III-25**. Des objets sphériques, d'aspect et de taille similaires et d'une centaine de nanomètres de diamètre tapissent la grille. Cela correspond bien aux caractérisations précédentes obtenues dans un milieu aqueux non salin. La plus grande concentration d'acétate de samarium au centre des nanoparticules est possiblement causée par une affinité particulière de l'acétate de samarium avec les protéines.

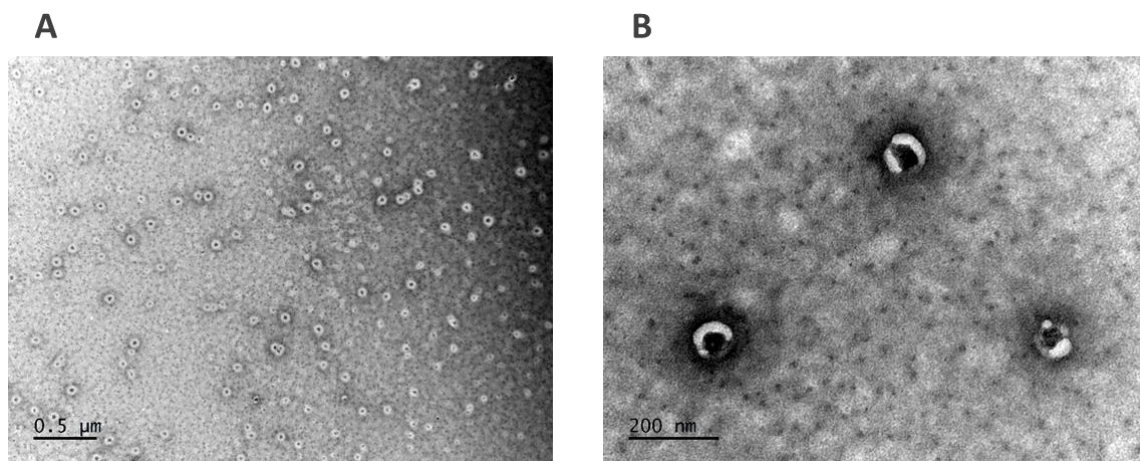


Figure III-25 : Images obtenues par TEM des nanoparticules formées par le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 en solution (26 µM, H₂O mQ, 70°C). Agent de contraste : acétate de samarium. Échelles : 0,5 µM (A) et 200 nm (B).

CONCLUSION

Après avoir synthétisé une librairie de bioconjugués HA-ELP dans le chapitre précédent, il s'agissait ici de caractériser leur auto-assemblage et les propriétés physico-chimiques des nanoparticules formées.

La thermosensibilité du segment ELP, conservée après couplage avec le bloc HA, est au cœur du phénomène d'auto-assemblage. Les facteurs les régissant sont donc les mêmes. Un intérêt particulier a donc été porté aux conditions de température et de concentration dans lesquelles l'assemblage pouvait avoir lieu. L'étude par DLS de l'évolution de la taille des objets en solution et de l'intensité qu'ils diffusent a permis de distinguer 3 états supramoléculaires : à faible température, le bioconjugué est soluble et se présente sous forme de chaîne libre. Lorsque la température augmente, ces chaînes s'associent pour former un coacervat, qui donne lui-même place à des nanoparticules micellaires stables à plus haute température.

La température à laquelle ces micelles apparaissent (CMT) a été définie selon deux techniques d'analyse différentes : par diffusion de la lumière (DLS) et par spectroscopie de fluorescence par l'entremise d'une petite molécule fluorescente appelée Nile Red. Cette dernière méthode étant plus longue et plus complexe à mettre en œuvre, c'est principalement la DLS qui a été utilisée. Plusieurs informations découlent de ces analyses : tout comme la T_{cp} de l'ELP seul, la CMT varie en fonction de la concentration selon une loi logarithmique de type $CMT = a - b \cdot \ln(C)$. L'adjonction d'un bloc HA très hydrophile sur l'ELP entraîne une augmentation de la CMT par rapport à la T_{cp} de l'ELP correspondant. Par ailleurs, une comparaison des différents bioconjugués de la librairie montre qu'à segment ELP constant, une masse moléculaire du bloc HA plus grande semble liée à une élévation de cette CMT, car elle augmente l'hydrophilie globale de la molécule. De même, à bloc HA constant, l'allongement du segment ELP semble diminuer la CMT en augmentant cette fois l'hydrophobie du composé. Cet effet est cependant moins visible pour les bioconjugués possédant le bloc HA le plus court. Enfin, à la concentration de référence (78 μM), la CMT de tous les bioconjugués est proche de la température physiologique. En fonction des applications visées, il est donc possible de varier soit la composition du bioconjugué, soit la concentration pour obtenir un état assemblé.

Il existe toutefois à chaque température une concentration minimale en-dessous de laquelle les objets ne se forment pas : la CMC. Celle-ci est déterminée par spectroscopie de fluorescence, en parallèle de la CMT. La méthode choisie ici, à travers l'utilisation du Nile Red, est la plus simple à mettre en œuvre compte tenu des très faibles quantités de matière disponibles. D'autres techniques, telles que la méthode de la goutte pendante ou l'utilisation de pyrène pourraient être utilisées afin de confirmer les résultats obtenus ici. Pour la plupart des bioconjugués testés, la CMC est assez élevée à basse température, puis diminue brutalement, pour atteindre quelques dizaines de μM à haute température. Ce comportement est cohérent avec l'évolution de la CMT en fonction de la concentration : l'auto-assemblage semble favorisé par une haute température et/ou une forte concentration. L'obtention de ces deux paramètres, CMT et CMC, permet donc de prévoir l'état adopté par le bioconjugué en solution pour des couples [température ; concentration] précis.

Enfin ce phénomène d'auto-assemblage semble parfaitement réversible, tant au niveau de la CMT que de la taille des objets formés.

Ceux-ci ont été étudiés plus en détails dans la seconde partie de ce chapitre. Au-dessus de la CMT et de la CMC, des nanoparticules d'une taille comprise entre 50 nm et 300 nm, selon le bioconjugué, se forment. L'ELP, hydrophobe dans ces conditions, se trouve principalement au cœur, tandis que le HA, très hydrophile, se place en surface, donnant lieu à des assemblages micellaires. Cette structure semble confirmée par un potentiel zêta fortement négatif à haute température et des images TEM montrant des objets sphériques d'une centaine de nanomètres de diamètre. Par ailleurs, la stabilité de ces composés a été prouvée, tant à froid par le maintien des capacités d'auto-assemblage après plusieurs mois de stockage à 4°C, qu'à l'état de coacervat ou de nanoparticules durant plusieurs heures.

Les bioconjugués synthétisés lors du chapitre précédent font donc tous preuve d'une capacité d'auto-assemblage parfaitement réversible, et principalement contrôlée par la température et la concentration, au travers des valeurs critiques de CMT et CMC. Ces valeurs, tout comme les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules formées, varient légèrement selon la composition du bioconjugué mais restent compatibles avec des applications biologiques, même si les températures de transitions sont très proches de la température physiologique.

Le chapitre suivant traite donc de l'adaptation de ces assemblages à des techniques d'analyse biologiques ainsi que de leurs résultats à l'échelle du récepteur, de la cellule et de l'organisme.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Matériel

Le Nile Red a été obtenu chez **Carl Roth**, l'acétate de samarium chez **Sigma Aldrich** et l'acide 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonique (HEPES) chez **Fisher**.

Caractérisations & Méthodes

Diffusion dynamique de la Lumière (DLS)

Les analyses par diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont été réalisées sur le même instrument et dans les mêmes cuves que décrits dans le chapitre II p125.

Le Z-average est calculé selon l'équation : $d_z = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_{\text{moy}}}$

avec d_z le diamètre hydrodynamique, k_B la constante de Boltzmann, T la température, η la viscosité dynamique et D_{moy} le coefficient de diffusion translationnel moyen (pondéré en intensité) mesuré.

Le Pdl caractérise l'uniformité de la taille et est calculé comme $Pdl = \left(\frac{\text{écart-type}}{\text{taille moyenne}}\right)^2$ en considérant une unique taille de population suivant une distribution gaussienne.

Mesure de diamètre hydrodynamique précis

Les mesures de taille ont été effectuées en mode automatique (3 mesures de 10-16 x 10s).

Mesure de CMT / rampe de température

Les évolutions de l'intensité diffusée (DCR, intensité diffusée normalisée par le facteur d'atténuation) et de la taille des objets en solution (Z-Average) en fonction de la température ont été évaluées lors de rampes de température ascendantes, à raison de 3 mesures de 3 x 10s tous les 2°C. Pour les mesures précises de CMT, ces mesures ont lieu tous les 1°C. La CMT est définie comme étant la température à partir de laquelle le Z-Average se stabilise. L'écart-type est défini comme étant au moins égal à la moitié de la valeur du pas ($\pm 1^\circ\text{C}$ si mesure tous les 2°C, $\pm 0.5^\circ\text{C}$ si mesure tous les 1°C).

Réversibilité

Pour les mesures de réversibilité, 2 ou 3 cycles sont effectués, comprenant une rampe ascendante et une rampe descendante de températures comprises entre 10°C et 45°C. 3 mesures de 3 x 10s sont réalisées tous les 5°C.

Stabilité

Stabilité à court terme : Coacervat : une solution de bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn80 a été maintenue à 27°C pendant 3h, avec une mesure de 10 fois 10s toutes les 10 min. Nanoparticules : des solutions de bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn80 (SP/Cu) à 78 µM dans un tampon PBS ont été maintenues à 37°C pendant 14h, avec une mesure de 16 fois 10s toutes les heures.

Stabilité à long terme : analyse de solutions de HA_{4,6k}-ELPn80 (SP/Cu) à 78 µM dans un tampon salin (PBS et TRISs respectivement) fraîchement préparées et après resp. 9 mois et 18 mois de stockage à 4°C. Mesure de taille automatique (3 mesures de 10-16 x 10s).

Détermination de la CMT et de la CMC par mesure de fluorescence (Nile Red)

Des solutions de chaque bioconjugué ont été préparées dans un tampon PBS en balayant une gamme de 8 concentrations (1 µM – 2.5 µM – 5 µM – 10 µM – 25 µM – 50 µM – 100 µM – 250 µM) et une solution de Nile Red a été ajoutée dans chacune d'elles pour une concentration finale identique $C_{\text{NR}} = 0.2 \mu\text{g/mL}$. Les mesures ont été effectuées sur un spectromètre de fluorescence FP-8500 (Jasco). Les solutions ont été soumises à une rampe ascendante de température allant de 4°C à 50 °C. Un spectre de fluorescence en émission ($\lambda_{\text{ex}} = 500 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}750 \text{ nm}$) a été acquis tous les 2°C. L'incertitude minimale sur chaque CMT est donc de $\pm 1^\circ\text{C}$.

Mesure de potentiel zêta :

Les mesures de potentiel zêta ont été réalisées sur un appareil Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical) dans des cuves adaptées (Zetasizer Nano Series, DTS1070, Malvern).

Méthode 1 "barrière diffusives" : une solution de bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 a été préparée à 26 µM dans un tampon HEPES à 20 mM. La cuve d'analyse a été remplie avec 1 mL de ce même tampon. Un volume de 100 µL de la solution d'échantillon a ensuite été injecté doucement au fond de la cuve, et 3 mesures de 3 s effectuées à 10°C et 60°C.

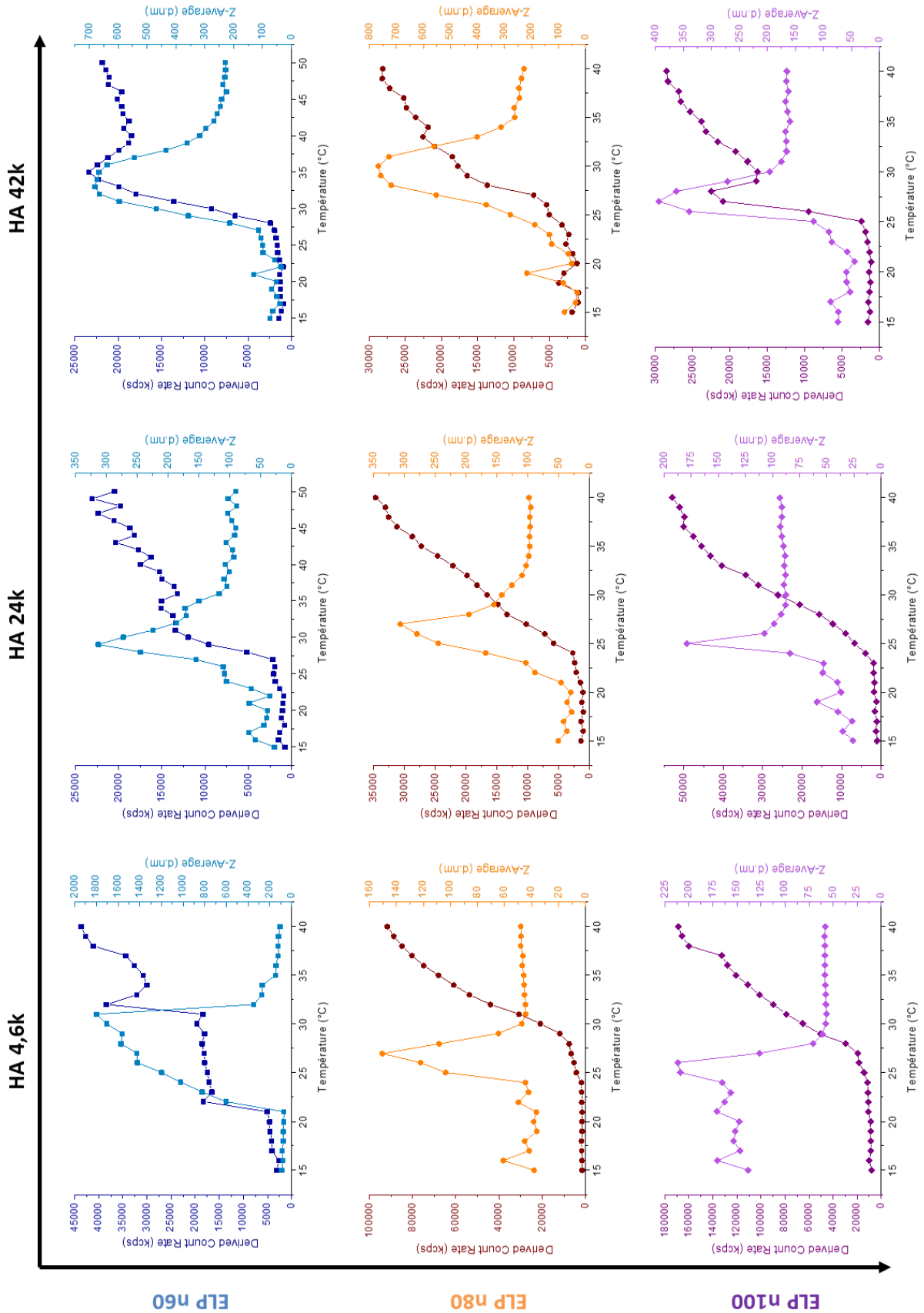
Méthode 2 : une solution de bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 a été préparées par dilution d'un facteur 10 d'une solution initiale à 78 µM dans du PBS (300 mosm, pH 7,4) avec de l'eau déionisée. La solution fille est donc une solution de bioconjugué à 7,8 µM dans un tampon PBS à 30 mosm. La salinité étant toujours élevée, le mode monomodal de l'appareil a été sélectionné, et seule la partie rapide de la mesure (Fast Field Reversal) a été effectuée, comprenant 5 mesures de 1.2s, à 25°C. Elles donnent accès à la valeur moyenne du potentiel zêta mais pas à sa dispersité. L'écart-type donné est celui sur ces 5 mesures.

Les données ont été traitées par le logiciel ZS Explorer (Malvern).

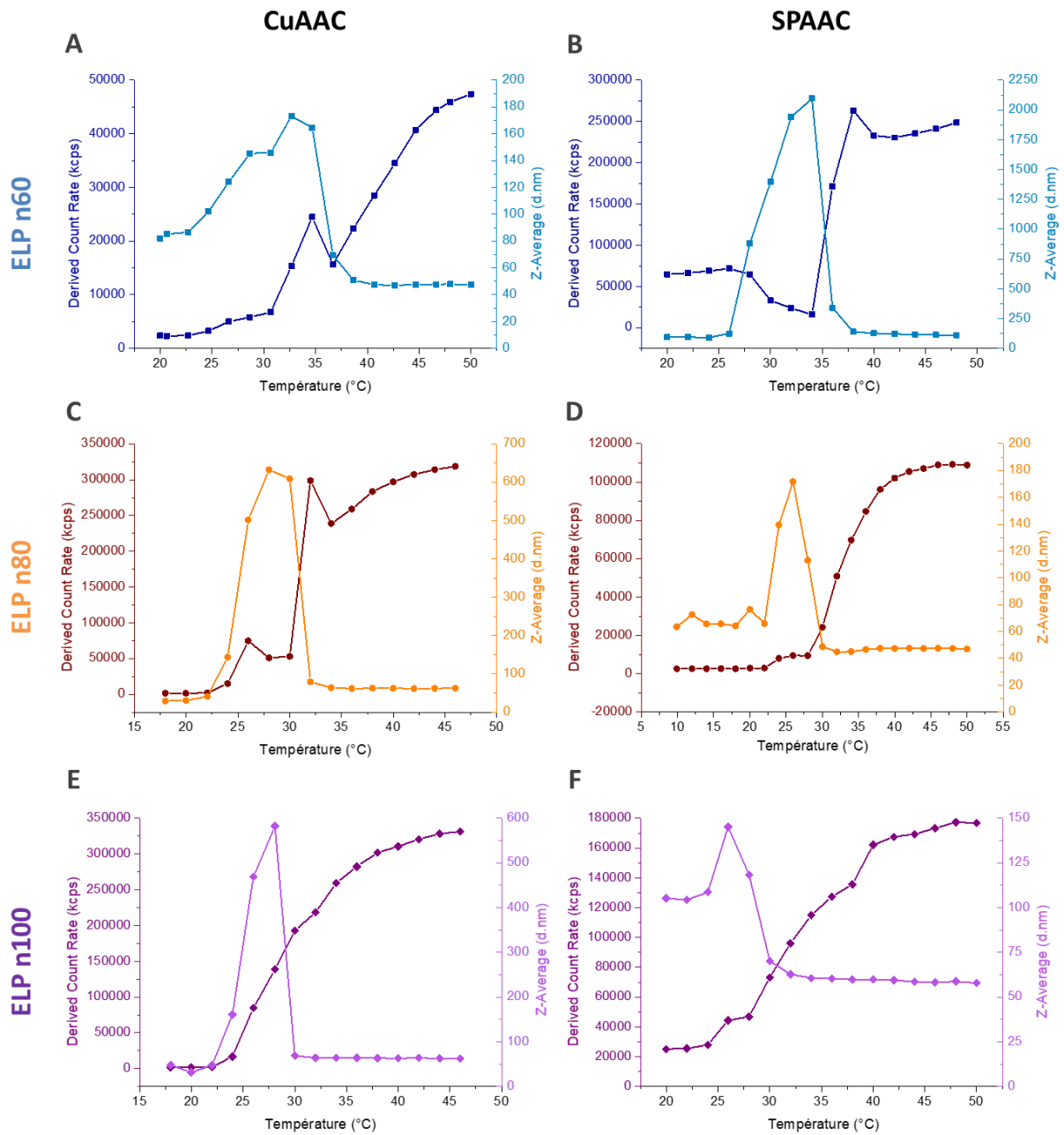
Microscopie Électronique à Transmission (TEM)

Les solutions de nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn80 ont été préparées à 1 mg/mL (26 µM) dans l'eau déionisée et chauffées à 70°C pendant 5 min. Un dépôt de 5 µL a été réalisé sur une grille de carbone à 80°C et laissé sécher 1 min. L'excédent a été retiré par capillarité et 5 µL d'une solution d'acétate de samarium (*Sigma Aldrich*) à 20 mg/mL chauffée à 70°C ont été ajoutés pour teinter l'échantillon. Après 1 min de temps de pose, l'excédent a été retiré par capillarité et la grille laissée à sécher à 80°C durant 1 min de plus. L'imagerie a été effectuée au Centre d'Imagerie de Bordeaux (BIC) sur un microscope Hitachi H7650 équipé avec une caméra SC1000 ORIUS 11 Mpx (GATAN) et fonctionnant à 80 kV.

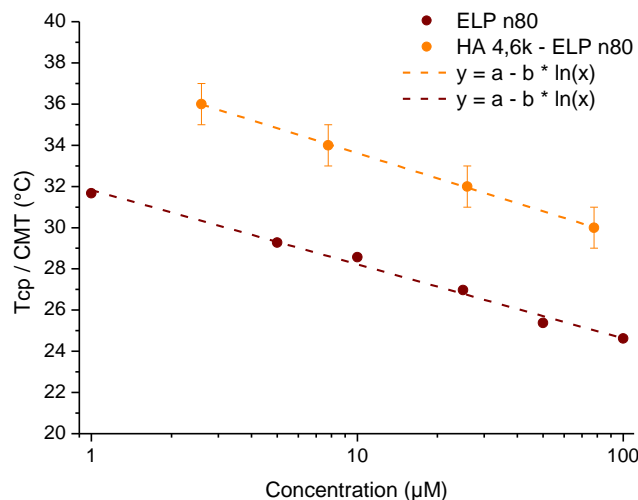
ANNEXES



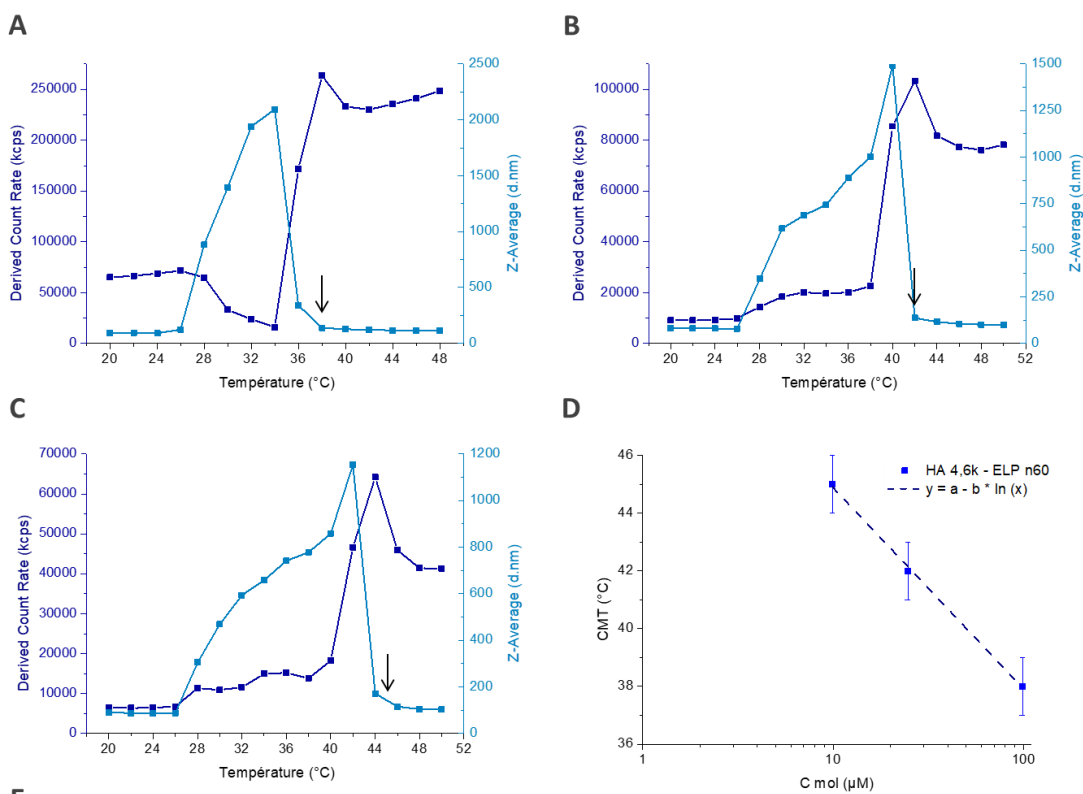
Annexe III-1 : Évolution de l'intensité et de la taille moyenne des objets en solution en fonction de la température pour la librairie de bioconjugués HA-ELP en solution (78 μ M, PBS).



Annexe III-2 : Évolution de l'intensité diffusée et de la taille des objets en solution en fonction de la température et de la structure moléculaire des bioconjugués HA_{4,6k}-ELP en solution (3 mg/mL, tampon salin). Gauche : Synthèse par CuAAC, tampon TRISs. Droite : Synthèse par SPAAC, tampon PBS.

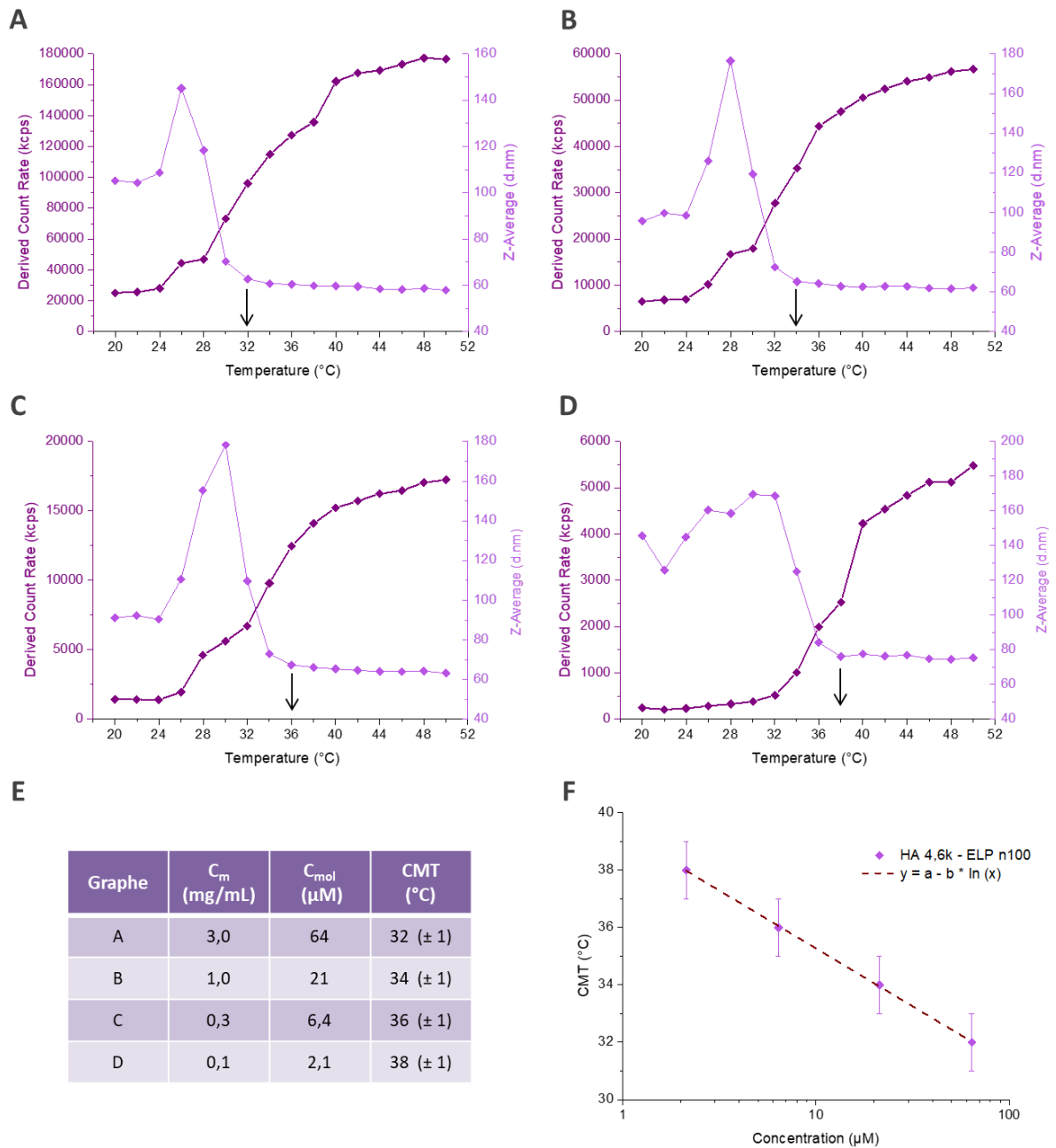


Annexe III-3 : Comparaison de l'évolution de la T_{cp} de l'ELPn80 seul et de la CMT du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 en fonction de la concentration. T_{cp} mesurée par absorbance UV-Visible, et CMT mesurée par DLS. Une régression logarithmique des données est effectuée selon le modèle : $y = a - b \cdot \ln(x)$ et tracée en pointillés.

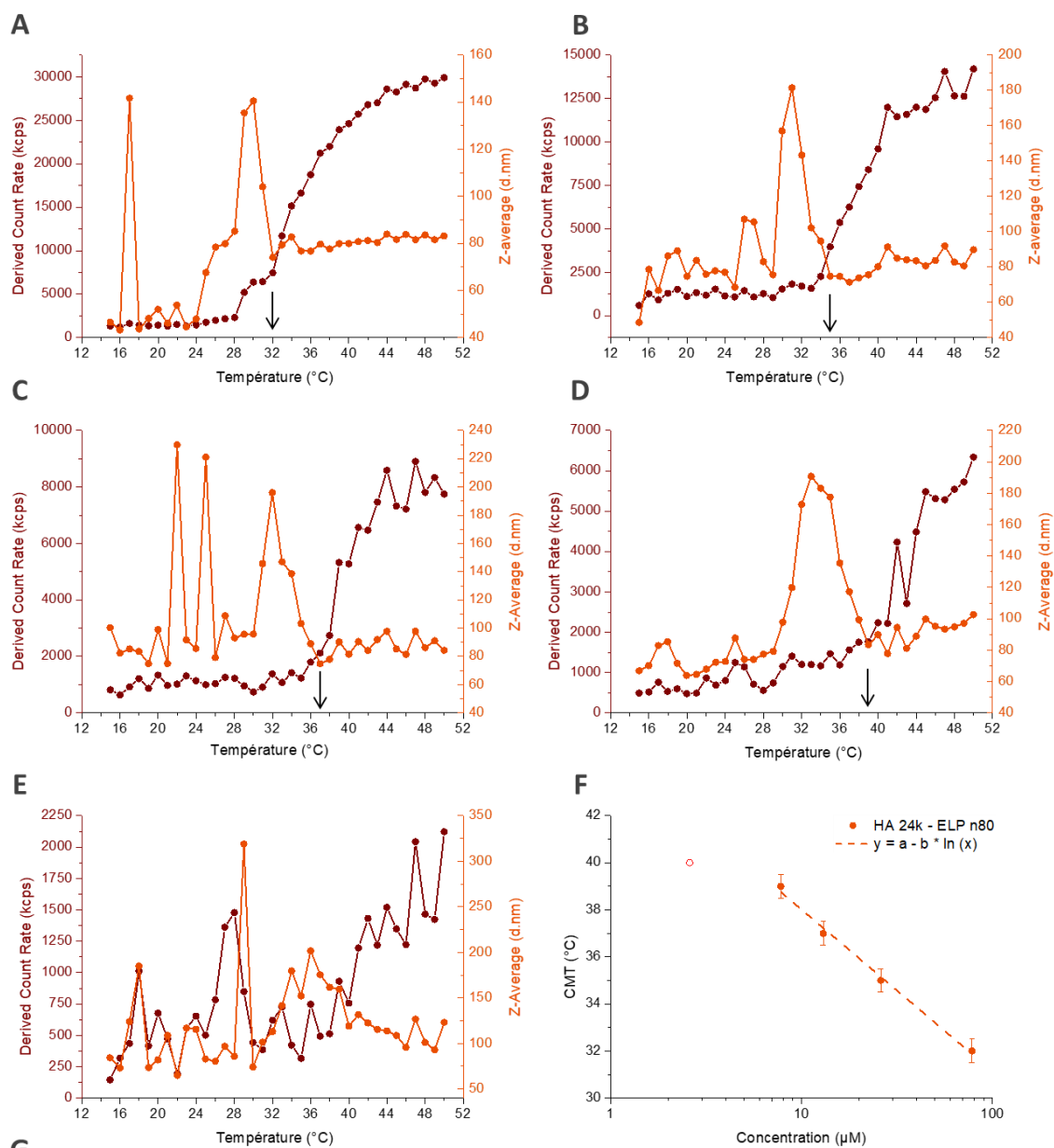


Graphe	C_m (mg/mL)	C_{mol} (µM)	CMT (°C)
A	3,0	100	38 (± 1)
B	0,75	25	42 (± 1)
C	0,3	10	45 (± 1)

Annexe III-4 : Influence de la concentration sur la CMT pour un bioconjugué HA_{4,6k}-ELP n60 en solution dans un tampon PBS. A, B, C : Évolution de l'intensité diffusée et de la taille moyenne des objets en solution en fonction de la température pour des solutions de concentration 100 µM, 25 µM, et 10 µM respectivement. La CMT est repérée par une flèche. D : Évolution de la CMT en fonction de la concentration. E : Tableau récapitulatif des CMT pour chaque concentration.

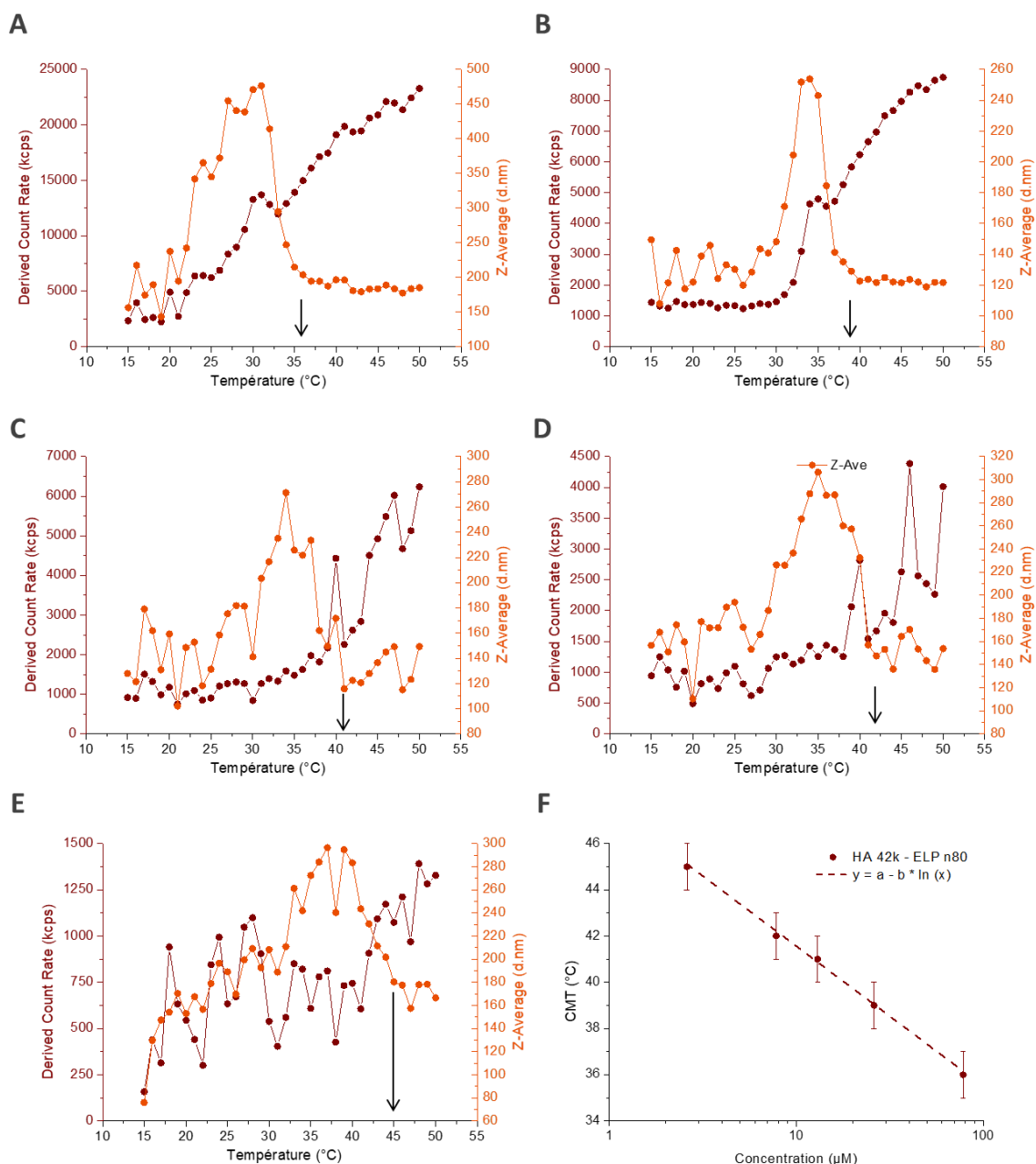


Annexe III-5 : Influence de la concentration sur la CMT pour un bioconjugué HA_{4,6k}-ELP_{n100} en solution dans un tampon PBS. A, B, C, D : Évolution de l'intensité diffusée et de la taille moyenne des objets en solution en fonction de la température pour des solutions de concentration 64 μM , 21 μM , 6.4 μM et 2.1 μM respectivement. La CMT est repérée par une flèche. E : Tableau récapitulatif des CMT pour chaque concentration. F : Évolution de la CMT en fonction de la concentration.



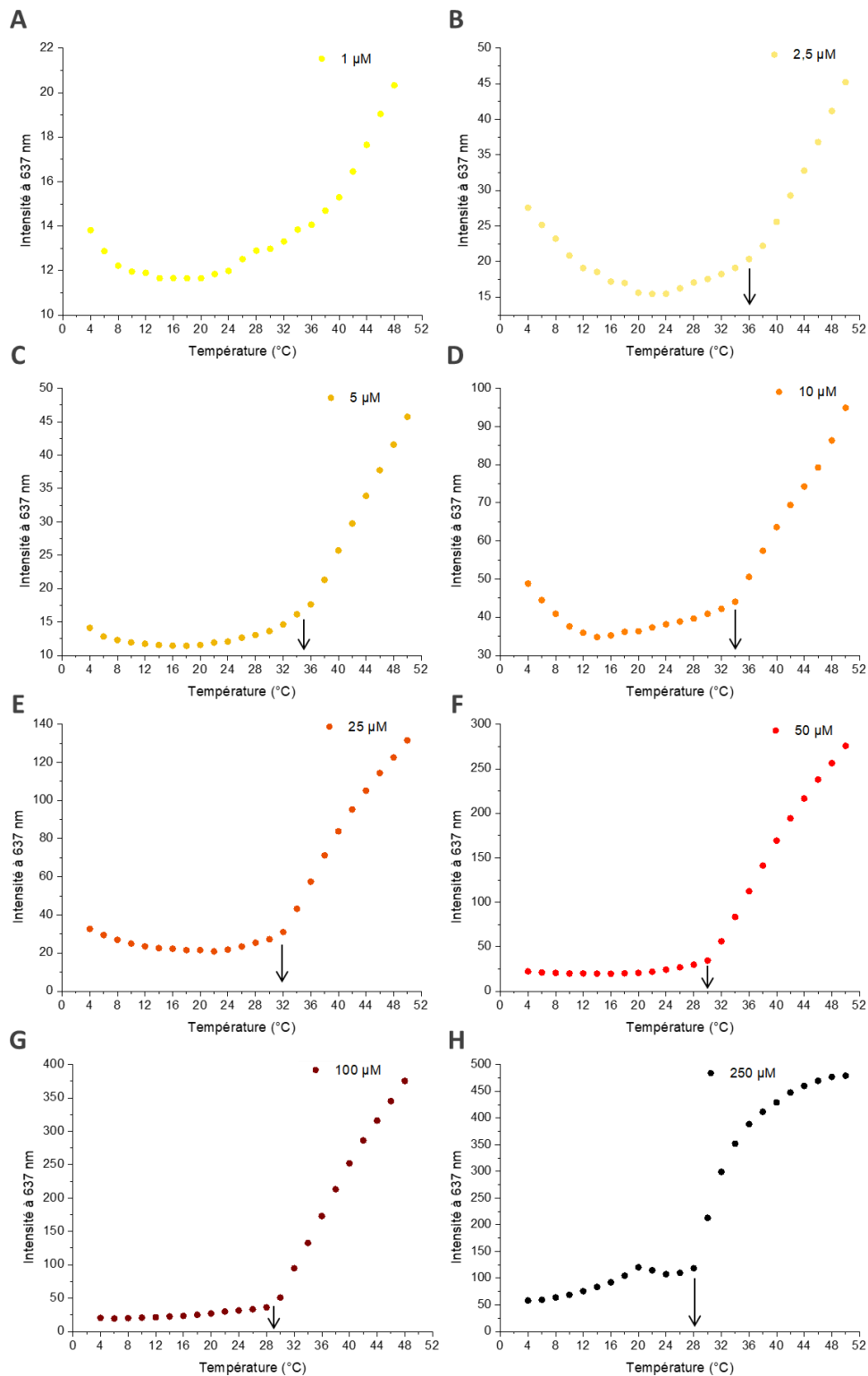
Graphe	C_m (mg/mL)	C_{mol} (μ M)	CMT ($^{\circ}$ C)
A	4,5	78	32 (\pm 0,5)
B	1,5	26	35 (\pm 0,5)
C	0,75	13	37 (\pm 0,5)
D	0,45	7,8	39 (\pm 0,5)
E	0,15	2,6	40

Annexe III-6 : Influence de la concentration sur la CMT pour un bioconjugué HA_{24k}-ELPn80 en solution dans un tampon PBS. A, B, C, D, E : Évolution de l'intensité diffusée et de la taille des objets en solution en fonction de la température pour des solutions de concentration 78 μ M, 26 μ M, 13 μ M, 7.8 μ M, et 2.1 μ M respectivement. La CMT est repérée par la flèche. F : Évolution de la CMT en fonction de la concentration. La CMT pour la solution à 2,6 μ M n'ayant pas pu être définie avec une précision suffisante (cercle vide), elle n'est pas prise en compte dans la régression. G : Tableau récapitulatif des CMT pour chaque concentration.

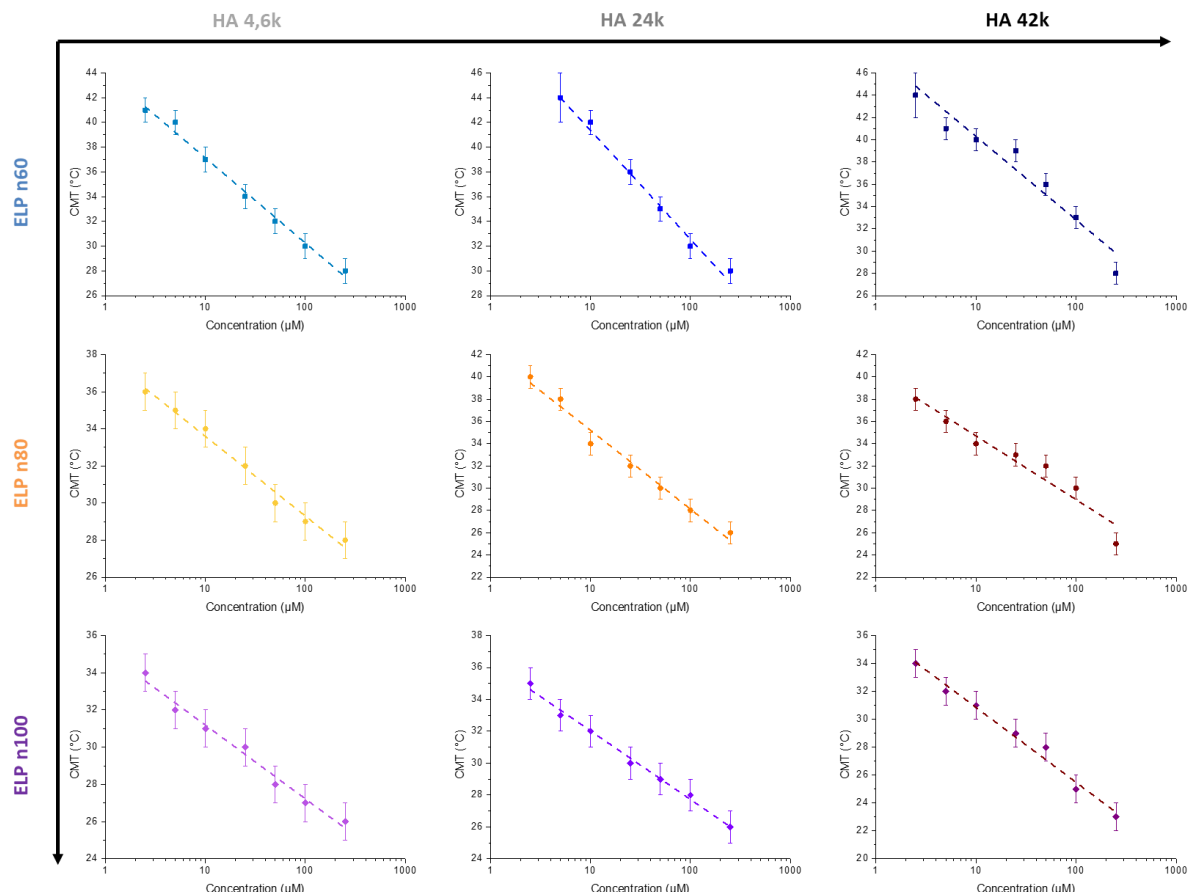


Graphe	C_m (mg/mL)	C_{mol} (μM)	CMT ($^{\circ}C$)
A	5,9	78	36 (± 1)
B	2,0	26	39 (± 1)
C	1,0	13	41 (± 1)
D	0,6	7,8	42 (± 1)
E	0,2	2,6	45 (± 1)

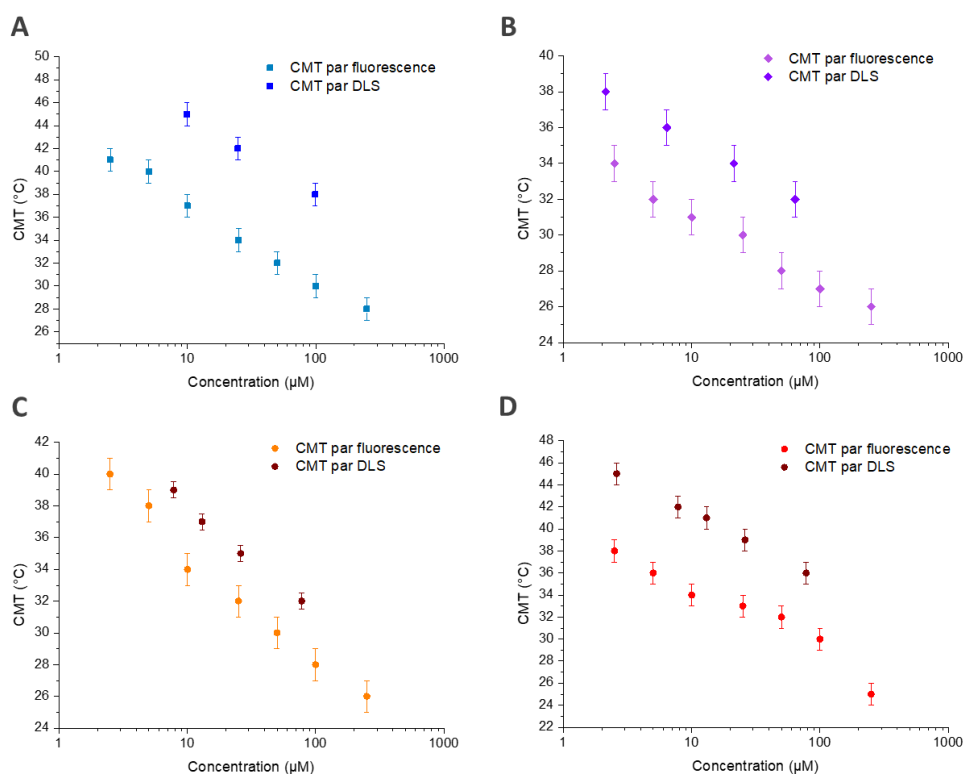
Annexe III-7 : Influence de la concentration sur la CMT pour un bioconjugé HA_{42k}-ELP_{n80} en solution dans un tampon PBS (300 mosm, pH 7,4). A, B, C, D, E : Évolution de l'intensité diffusée et de la taille des objets en solution en fonction de la température pour des solutions de concentration 78 μM , 26 μM , 13 μM , 7.8 μM , et 2.1 μM respectivement. La CMT est repérée par la flèche. F : Évolution de la CMT en fonction de la concentration. G : Tableau récapitulatif des CMT pour chaque concentration.



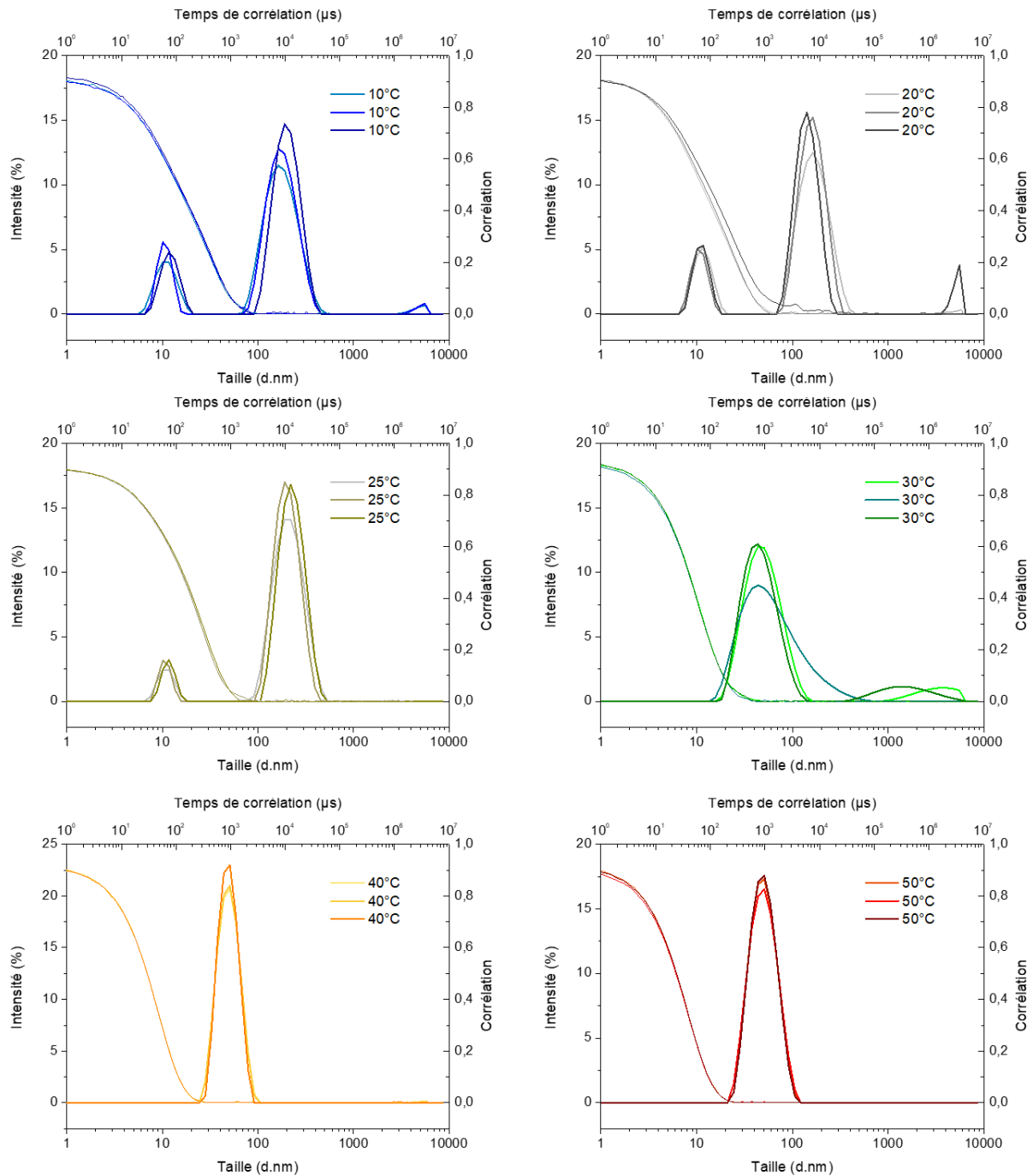
Annexe III-8 : Détermination de la CMT par spectroscopie de fluorescence pour des solutions de bioconjugué HA_{4,6K}-ELP_{n80} sur une gamme de concentrations. Évolution de l'intensité de fluorescence émise à $\lambda_{ref} = 637 \text{ nm}$ en fonction de la température. A : 1 μM ; B : 2.5 μM ; C : 5 μM ; D : 10 μM ; E : 25 μM ; F : 50 μM ; G : 100 μM ; H : 250 μM . La CMT est repérée par une flèche. Pour C = 1 μM (A), l'intensité de fluorescence est trop faible pour déterminer la CMT rigoureusement. Cette solution n'est donc pas prise en compte.



Annexe III-9 : Spectroscopie de fluorescence : Évolution de la CMT en fonction de la concentration pour la librairie de bioconjugués HA-ELP. Une régression logarithmique des données est effectuée selon le modèle : $y = a-b*\ln(x)$ et tracée en pointillés.



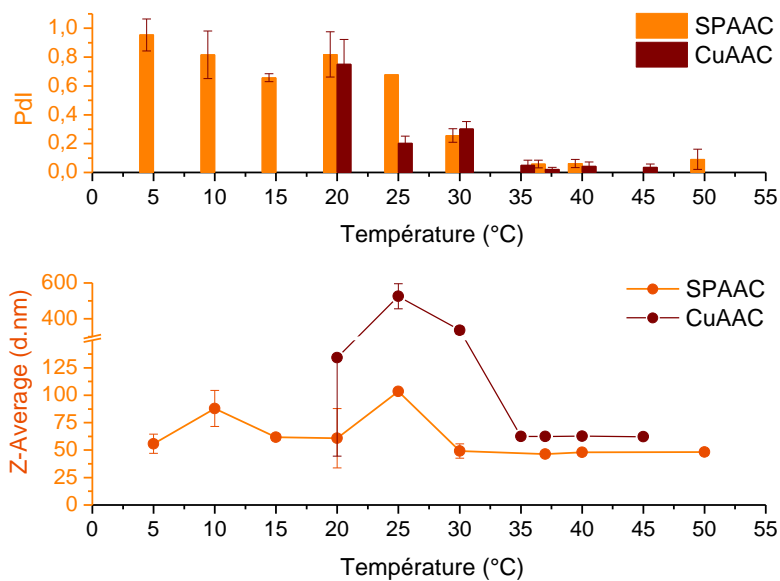
Annexe III-10 : Comparaison des méthodes de détermination de la CMT : spectroscopie de fluorescence (clair) et DLS (foncé). Évolution de la CMT en fonction de la concentration pour différents bioconjugués : A : HA_{4,6k}-ELPn60 ; B : HA_{4,6k}-ELPn100 ; C : HA_{24k}-ELPn80 ; D : HA_{42k}-ELPn80.



Annexe III-11 : Représentation de la distribution de taille en intensité et du corrélogramme associé pour 3 mesures de DLS. Mesures effectuées pour une solution de bioconjugué HA_{4,6k} – ELP n80 (78 µM, PBS) pour une gamme de températures 10 – 50°C.

Température (°C)	Z Average moyen (d.nm)	PdI moyen	Nombre de mesures N (x3)
5	55,8 (± 8,8)	0,95 (± 0,11)	5
10	88,0 (± 16,4)	0,82 (± 0,16)	5
15	61,7 (± 2,7)	0,66 (± 0,03)	2
20	60,9 (± 27,1) <i>134,1 (± 89,7)</i>	0,82 (± 0,16) <i>0,75 (± 0,17)</i>	4 3
25	103,5 <i>525,2 (± 70,3)</i>	0,68 <i>0,203 (± 0,049)</i>	1 3
30	49,2 (± 6,4) <i>335,7 (± 20,8)</i>	0,26 (± 0,05) <i>0,30 (± 0,05)</i>	4 2
35	62,6 (± 0,7)	0,05 (± 0,03)	3
37	46,3 (± 1,6) <i>62,4 (± 0,8)</i>	0,06 (± 0,03) <i>0,02 (± 0,01)</i>	4 2
40	48,0 (± 1,3) <i>62,8 (± 1,1)</i>	0,06 (± 0,03) <i>0,04 (± 0,03)</i>	6 3
45	62,3 (± 0,6)	0,03 (± 0,02)	5
50	48,1 (± 2,7)	0,09 (± 0,07)	6

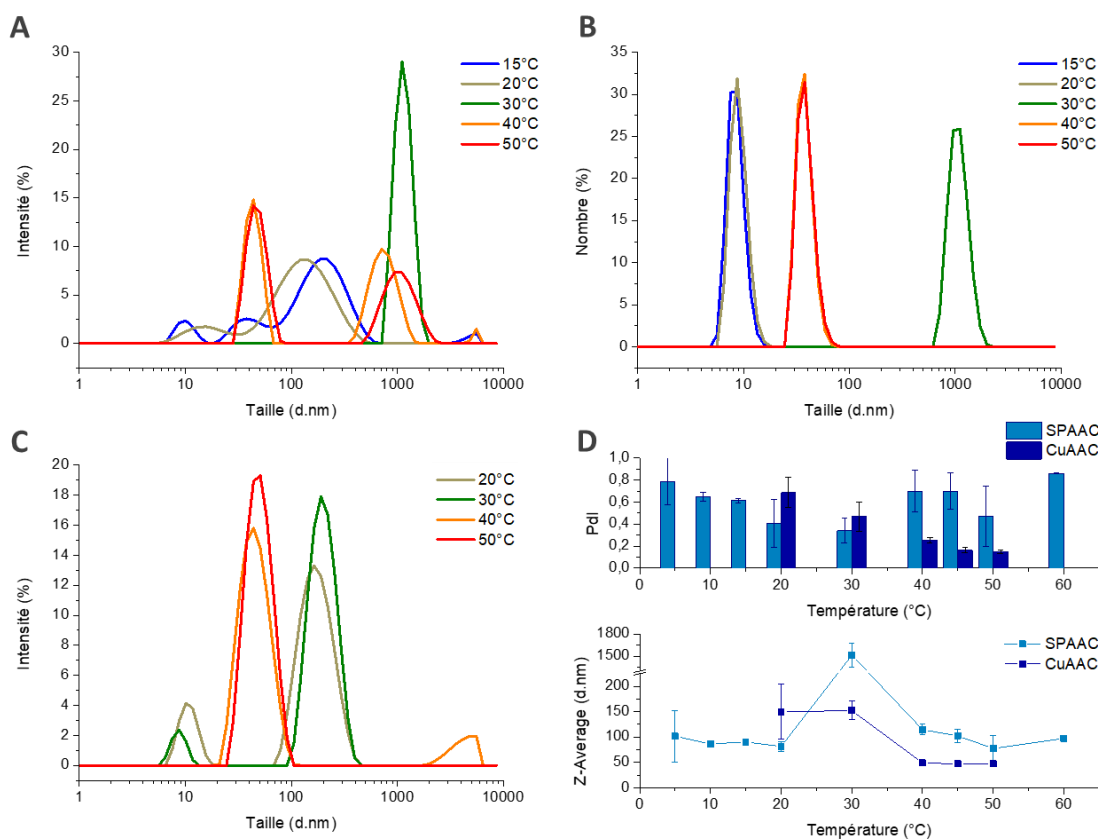
Annexe III-12 : DLS : Tableau récapitulatif de la taille des objets formés par le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 en solution (78 μM, PBS ou TRISs) sur une gamme de températures. N correspond au nombre de répliques de mesures (solutions différentes) pris en compte dans le calcul statistique de la taille moyenne et du PdI moyen. L'écart-type est indiqué entre parenthèse. Les valeurs en gris italique correspondent au HA_{4,6k}-ELPn80 (Cu).



Annexe III-13 : Évolution du Z-Average moyen et du PdI moyen mesurés pour une solution de bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 (78 μM, PBS) en fonction de la température et de la voie de synthèse : SPAAC ou CuAAC. La troncature de l'axe des ordonnées masque l'incertitude supérieure du point à 20°C de la série CuAAC. Les valeurs de chaque point sont données dans le tableau précédent (**Annexe III-12**).

Température (°C)	Z Average moyen (d.nm)	PdI moyen	Nombre de mesures N (x3)
5	101,7 (± 51,1)	0,79 (± 0,21)	5
10	86,2	0,65	1
15	90,5	0,61	1
20	81,4 (± 10,1) <i>149,5 (± 54,1)</i>	0,41 (± 0,22) <i>0,69 (± 0,14)</i>	3 3
30	1516,7 (± 160,5) <i>152,3 (± 18,5)</i>	0,34 (± 0,11) <i>0,47 (± 0,14)</i>	3 2
40	114,8 (± 10,4) <i>48,8 (± 0,6)</i>	0,70 (± 0,19) <i>0,25 (± 0,02)</i>	3 2
45	102,5 (± 12,8) <i>47,1 (± 0,8)</i>	0,70 (± 0,02) <i>0,16 (± 0,02)</i>	3 3
50	77,5 (± 25,3) <i>47,7 (± 0,2)</i>	0,47 (± 0,27) <i>0,15 (± 0,02)</i>	8 2
60	97,2	0,86	1

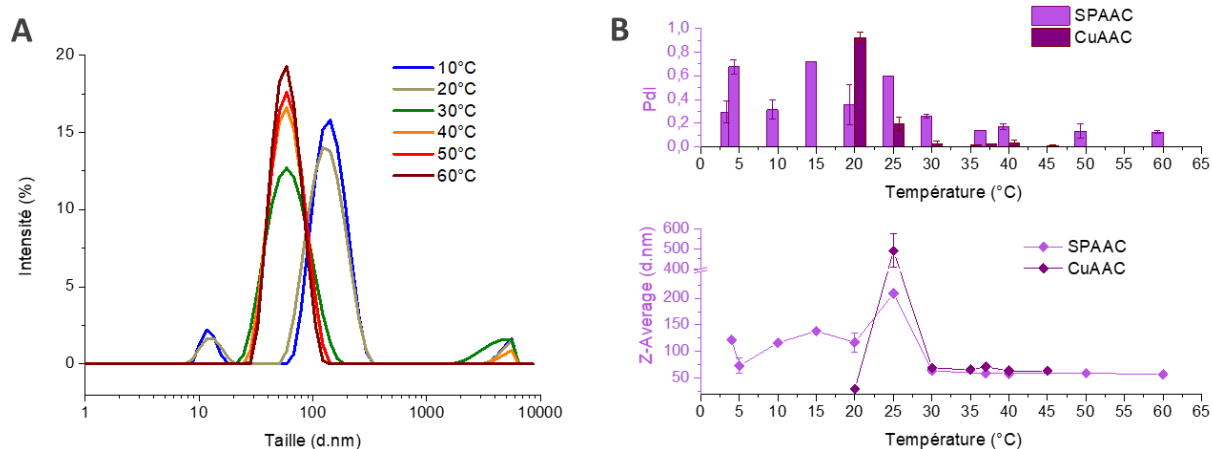
Annexe III-14 : DLS : Tableau récapitulatif de la taille des objets formés par le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn60 en solution (78 μM, PBS ou TRISs) sur une gamme de températures. N correspond au nombre de répliques de mesures (solutions différentes) pris en compte dans le calcul statistique de la taille moyenne et du PdI moyen. L'écart-type est indiqué entre parenthèse. Les valeurs en gris italique correspondent au HA_{4,6k}-ELPn60 (Cu).



Annexe III-15 : Étude de la taille des objets formés par le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn60 en solution (78 μM, tampon salin). A, B, C : Distribution de taille en intensité et en nombre des objets en solution selon la température pour les bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn60 (SP) (A, B) et HA_{4,6k}-ELPn60 (Cu) (C). D : Évolution du Z-Average moyen et du PdI moyen mesurés en fonction de la température et de la voie de synthèse : SPAAC (PBS) ou CuAAC (TRISs). Représentation de la moyenne de N répliques (différentes solutions). Les valeurs de chaque point sont données dans le tableau précédent (Annexe III-14).

Température (°C)	Z Average moyen (d.nm)	Pdl moyen	Nombre de mesures N (x3)
5	73,2 (± 14,3)	0,68 (± 0,06)	4
10	116,5 (± 3,1)	0,31 (± 0,08)	2
15	138,6	0,72	1
20	117,1 (± 18,5) 30,0 (± 2,3)	0,36 (± 0,17) 0,93 (± 0,05)	4 2
25	209,2 490,0 (± 84,1)	0,60 0,19 (± 0,06)	1 2
30	64,4 (± 4,8) 69,4 (± 0,6)	0,26 (± 0,02) 0,02 (± 0,02)	4 2
40	58,7 (± 1,0) 64,0 (± 1,4)	0,17 (± 0,02) 0,03 (± 0,02)	4 2
45	63,7 (± 0,9)	0,01 (± 0,01)	3
50	59,5 (± 2,6)	0,13 (± 0,06)	5
60	57,1 (± 0,4)	0,12 (± 0,01)	2

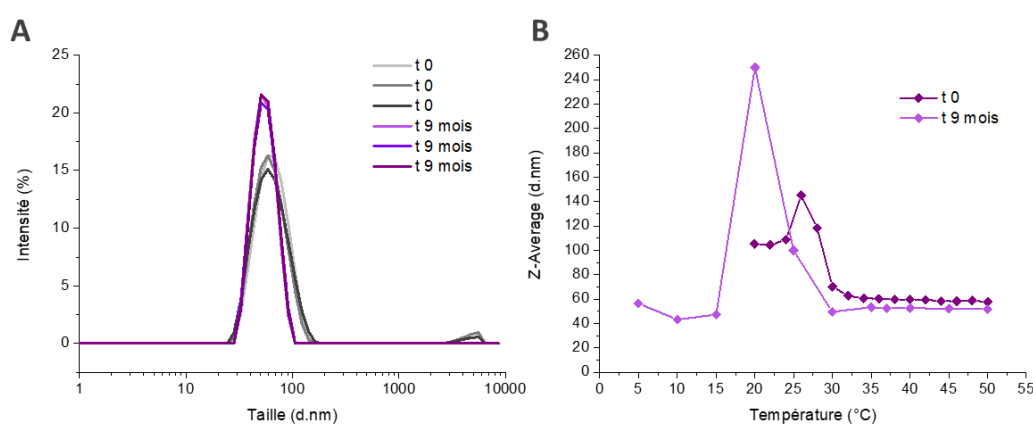
Annexe III-16 : Tableau récapitulatif de la taille des objets formés par le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn100 en solution (78 μM, PBS ou TRISs) sur une gamme de températures. N correspond au nombre de répliques de mesures (solutions différentes) pris en compte dans le calcul statistique de la taille moyenne et du Pdl moyen. L'écart-type est indiqué entre parenthèse. Les valeurs en gris italique correspondent au HA_{4,6k}-ELPn100 (Cu).



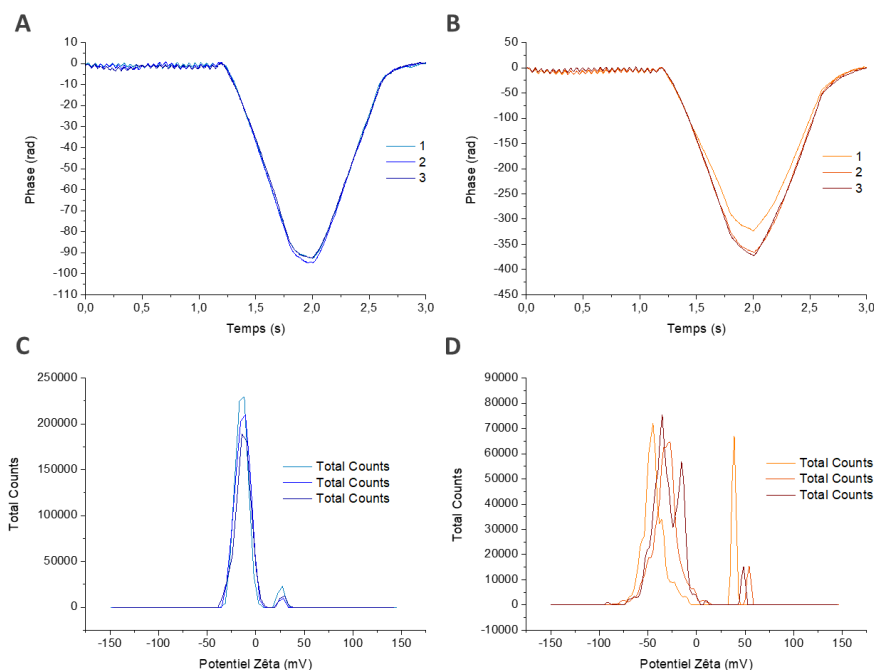
Annexe III-17 : Étude de la taille des objets formés par le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn100 en solution (78 μM, PBS). A : Distribution de taille en intensité sur une gamme de températures. B : Évolution du Z-Average moyen et du Pdl moyen mesurés en fonction de la température et de la voie de synthèse : SPAAC (PBS) ou CuAAC (TRISs). Représentation de la moyenne de N répliques (différentes solutions). Les valeurs de chaque point sont données dans le tableau précédent (Annexe III-16).

Bioconjugué	5°C		37°C		50°C	
	Z-average (d.nm)	Pdl	Z-average (d.nm)	Pdl	Z-average (d.nm)	Pdl
HA _{4,6k} – ELP n60	101,7 (± 51,1)	0,79 (± 0,21)	123,0	0,82	77,5 (± 25,3)	0,47 (± 0,27)
HA _{4,6k} – ELP n80	55,8 (± 8,8)	0,95 (± 0,11)	46,3 (± 1,6)	0,06 (± 0,03)	48,1 (± 2,7)	0,09 (± 0,07)
HA _{4,6k} – ELP n100	73,2 (± 14,3)	0,68 (± 0,06)	58,6	0,14	59,5 (± 2,6)	0,13 (± 0,06)
HA _{24k} – ELP n60	61,5 (± 31,7)	0,88 (± 0,22)	104,7	0,4	116,7 (± 29,6)	0,25 (± 0,07)
HA _{24k} – ELP n80	67,0 (± 20,4)	0,96 (± 0,09)	88,1 (± 9,2)	0,27 (± 0,05)	97,6 (± 8,8)	0,15 (± 0,05)
HA _{24k} – ELP n100	56,6 (± 18,4)	0,94 (± 0,10)	93,1	0,16	108,1 (± 8,7)	0,12 (± 0,04)
HA _{42k} – ELP n60	73,0 (± 41,4)	0,85 (± 0,12)	543,5	0,35	239,2 (± 38,0)	0,37 (± 0,13)
HA _{42k} – ELP n80	83,4 (± 48,4)	0,94 (± 0,09)	244,7 (± 8,2)	0,54 (± 0,02)	182,3 (± 39,1)	0,29 (± 0,09)
HA _{42k} – ELP n100	82,0 (± 35,3)	0,94 (± 0,08)	167,7	0,25	194,4 (± 26,1)	0,20 (± 0,07)

Annexe III-18 : Tableau récapitulatif de la taille des objets formés par les bioconjugués de la librairie en solution (78 µM, PBS ou TRIS) à 5°C, 37°C et 50°C. L'écart-type est indiqué entre parenthèse. Son absence indique que la mesure n'a été réalisée que sur une seule solution.



Annexe III-19 : Étude de la stabilité à long terme des nanoparticules formées par le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn100 en solution (78 µM, PBS). A : Représentation de la distribution de taille en intensité des nanoparticules formées à 37°C dans une solution fraîchement préparée (t 0) et 9 mois plus tard. B : Évolution de la taille des objets en fonction de la température pour cette même solution.



Annexe III-20 : Mesure du potentiel zêta des espèces en solution pour un bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 (26 µM, HEPES) par la méthode de la barrière diffusive. A, B : Représentation de 3 mesures de la phase en fonction du temps pour une température inférieure à la CMT (10°C, A) et supérieure à la CMT (60°C, B). C, D : Représentation de 3 mesures de la distribution de potentiel zêta à 10°C (C) et 60°C (D).

RÉFÉRENCES

- (1) Lee, T. a. T.; Cooper, A.; Apkarian, R. P.; Conticello, V. P. Thermo-Reversible Self-Assembly of Nanoparticles Derived from Elastin-Mimetic Polypeptides. *Adv. Mater.* **2000**, *12* (15), 1105–1110. [https://doi.org/10.1002/1521-4095\(200008\)12:15<1105::AID-ADMA1105>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1521-4095(200008)12:15<1105::AID-ADMA1105>3.0.CO;2-1).
- (2) Aluri, S. R.; Shi, P.; Gustafson, J. A.; Wang, W.; Lin, Y.-A.; Cui, H.; Liu, S.; Conti, P. S.; Li, Z.; Hu, P.; Epstein, A. L.; MacKay, J. A. A Hybrid Protein–Polymer Nanoworm Potentiates Apoptosis Better than a Monoclonal Antibody. *ACS Nano* **2014**, *8* (3), 2064–2076. <https://doi.org/10.1021/nn403973g>.
- (3) Hassouneh, W.; Zhulina, E. B.; Chilkoti, A.; Rubinstein, M. Elastin-like Polypeptide Diblock Copolymers Self-Assemble into Weak Micelles. *Macromolecules* **2015**, *48* (12), 4183–4195. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b00431>.
- (4) MacKay, J. A.; Chen, M.; McDaniel, J. R.; Liu, W.; Simnick, A. J.; Chilkoti, A. Self-Assembling Chimeric Polypeptide–Doxorubicin Conjugate Nanoparticles That Abolish Tumours after a Single Injection. *Nat. Mater.* **2009**, *8* (12), 993–999. <https://doi.org/10.1038/nmat2569>.
- (5) Luginbuhl, K. M.; Mozhdzhi, D.; Dzuricky, M.; Yousefpour, P.; Huang, F. C.; Mayne, N. R.; Buehne, K. L.; Chilkoti, A. Recombinant Synthesis of Hybrid Lipid–Peptide Polymer Fusions That Self-Assemble and Encapsulate Hydrophobic Drugs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (45), 13979–13984. <https://doi.org/10.1002/anie.201704625>.
- (6) Xiao, Y.; Chinoy, Z. S.; Pecastaings, G.; Bathany, K.; Garanger, E.; Lecommandoux, S. Design of Polysaccharide- b -Elastin-Like Polypeptide Bioconjugates and Their Thermoresponsive Self-Assembly. *Biomacromolecules* **2019**, [acs.biomac.9b01058](https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01058). <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01058>.
- (7) Garanger, E.; MacEwan, S. R.; Sandre, O.; Brûlet, A.; Bataille, L.; Chilkoti, A.; Lecommandoux, S. Structural Evolution of a Stimulus-Responsive Diblock Polypeptide Micelle by Temperature Tunable Compaction of Its Core. *Macromolecules* **2015**, *48* (18), 6617–6627. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b01371>.
- (8) Weitzhandler, I.; Dzuricky, M.; Hoffmann, I.; Garcia Quiroz, F.; Gradzielski, M.; Chilkoti, A. Micellar Self-Assembly of Recombinant Resilin-/Elastin-Like Block Copolypeptides. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (8), 2419–2426. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00589>.
- (9) Mitchard, N. M.; Beezer, A. E.; Mitchell, J. C.; Armstrong, J. K.; Chowdhry, B. Z.; Leharne, S.; Buckton, G. Thermodynamic Analysis of Scanning Calorimetric Transitions Observed for Dilute Aqueous Solutions of ABA Block Copolymers. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96* (23), 9507–9512. <https://doi.org/10.1021/j100202a079>.
- (10) Mao, G.; Sukumaran, S.; Beaucage, G.; Saboungi, M.-L.; Thiyagarajan, P. PEO–PPO–PEO Block Copolymer Micelles in Aqueous Electrolyte Solutions: Effect of Carbonate Anions and Temperature on the Micellar Structure and Interaction. *Macromolecules* **2001**, *34* (3), 552–558. <https://doi.org/10.1021/ma001095s>.
- (11) Dreher, M. R.; Simnick, A. J.; Fischer, K.; Smith, R. J.; Patel, A.; Schmidt, M.; Chilkoti, A. Temperature Triggered Self-Assembly of Polypeptides into Multivalent Spherical Micelles. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (2), 687–694. <https://doi.org/10.1021/ja0764862>.
- (12) Shah, M.; Hsueh, P.-Y.; Sun, G.; Chang, H. Y.; Janib, S. M.; MacKay, J. A. Biodegradation of Elastin-like Polypeptide Nanoparticles. *Protein Sci.* **2012**, *21* (6), 743–750. <https://doi.org/10.1002/pro.2063>.
- (13) Wang, Z.; Guo, J.; Liu, X.; Sun, J.; Gao, W. Temperature-Triggered Micellization of Interferon Alpha-Diblock Copolypeptide Conjugate with Enhanced Stability and Pharmacology. *J. Controlled Release* **2020**, *328*, 444–453. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.08.065>.
- (14) Su, H.; Wang, F.; Ran, W.; Zhang, W.; Dai, W.; Wang, H.; Anderson, C. F.; Wang, Z.; Zheng, C.; Zhang, P.; Li, Y.; Cui, H. The Role of Critical Micellization Concentration in Efficacy and Toxicity of Supramolecular Polymers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2020**, *117* (9), 4518–4526. <https://doi.org/10.1073/pnas.1913655117>.
- (15) Weber, P.; Dzuricky, M.; Min, J.; Jenkins, I.; Chilkoti, A. Concentration-Independent Multivalent Targeting of Cancer Cells by Genetically Encoded Core-Crosslinked Elastin/Resilin-like Polypeptide Micelles. *Biomacromolecules* **2021**. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00897>.
- (16) Scholz, N.; Behnke, T.; Resch-Genger, U. Determination of the Critical Micelle Concentration of Neutral and Ionic Surfactants with Fluorometry, Conductometry, and Surface Tension—A Method Comparison. *J. Fluoresc.* **2018**, *28* (1), 465–476. <https://doi.org/10.1007/s10895-018-2209-4>.
- (17) P. Patterson, J.; P. Robin, M.; Chassenieux, C.; Colombani, O.; K. O'Reilly, R. The Analysis of Solution Self-Assembled Polymeric Nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (8), 2412–2425. <https://doi.org/10.1039/C3CS60454C>.
- (18) Urry, D. W.; Gowda, D. C.; Parker, T. M.; Luan, C.-H.; Reid, M. C.; Harris, C. M.; Pattanaik, A.; Harris, R. D. Hydrophobicity Scale for Proteins Based on Inverse Temperature Transitions. *Biopolymers* **1992**, *32* (9), 1243–1250. <https://doi.org/10.1002/bip.360320913>.
- (19) Spectrofluorometric Studies of the Lipid Probe, Nile Red. *J. Lipid Res.* **1985**, *26* (7), 781–789. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)34307-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)34307-8).
- (20) Kurniasih, I. N.; Liang, H.; Mohr, P. C.; Khot, G.; Rabe, J. P.; Mohr, A. Nile Red Dye in Aqueous Surfactant and Micellar Solution. *Langmuir* **2015**, *31* (9), 2639–2648. <https://doi.org/10.1021/la504378m>.

- (21) Sarkar, N.; Das, K.; Nath, D. N.; Bhattacharyya, K. Twisted Charge Transfer Processes of Nile Red in Homogeneous Solutions and in Faujasite Zeolite. *Langmuir* **1994**, *10* (1), 326–329. <https://doi.org/10.1021/la00013a048>.
- (22) Greenspan, P.; Mayer, E. P.; Fowler, S. D. Nile Red: A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets. *J. Cell Biol.* **1985**, *100* (3), 965–973. <https://doi.org/10.1083/jcb.100.3.965>.
- (23) Goodwin, A. P.; Mynar, J. L.; Ma, Y.; Fleming, G. R.; Fréchet, J. M. J. Synthetic Micelle Sensitive to IR Light via a Two-Photon Process. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (28), 9952–9953. <https://doi.org/10.1021/ja0523035>.
- (24) Stuart, M. C. A.; van de Pas, J. C.; Engberts, J. B. F. N. The Use of Nile Red to Monitor the Aggregation Behavior in Ternary Surfactant–Water–Organic Solvent Systems. *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, *18* (9), 929–934. <https://doi.org/10.1002/poc.919>.
- (25) Wang, Z.; Wu, Z.; Liu, J.; Zhang, W. Particle Morphology: An Important Factor Affecting Drug Delivery by Nanocarriers into Solid Tumors. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2018**, *15* (4), 379–395. <https://doi.org/10.1080/17425247.2018.1420051>.
- (26) Jeannot, V.; Mazzaferro, S.; Lavaud, J.; Vanwonderghem, L.; Henry, M.; Arboléas, M.; Vollaie, J.; Josserand, V.; Coll, J.-L.; Lecommandoux, S.; Schatz, C.; Hurbin, A. Targeting CD44 Receptor-Positive Lung Tumors Using Polysaccharide-Based Nanocarriers: Influence of Nanoparticle Size and Administration Route. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2016**, *12* (4), 921–932. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.018>.
- (27) Duan, H.; Donovan, M.; Foucher, A.; Schultze, X.; Lecommandoux, S. Multivalent and Multifunctional Polysaccharide-Based Particles for Controlled Receptor Recognition. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 14730. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32994-y>.
- (28) Jeannot, V.; Gauche, C.; Mazzaferro, S.; Couvet, M.; Vanwonderghem, L.; Henry, M.; Didier, C.; Vollaie, J.; Josserand, V.; Coll, J.-L.; Schatz, C.; Lecommandoux, S.; Hurbin, A. Anti-Tumor Efficacy of Hyaluronan-Based Nanoparticles for the Co-Delivery of Drugs in Lung Cancer. *J. Controlled Release* **2018**, *275*, 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.02.024>.

CHAPITRE IV :
ÉVALUATION BIOLOGIQUE DES
NANOPARTICULES DE
BIOCONJUGUÉS HA-*b*-ELP

TABLE DES MATIÈRES

Chapitre IV : Évaluation biologique des nanoparticules de bioconjugués HA-b-ELP	191
Introduction	193
IV.A. Adaptation du système à une évaluation biologique	195
IV.A.1. Amélioration de la stabilité par réticulation du cœur ELP	195
IV.A.1.1. Fonctionnalisation chimiosélective des méthionines de l'ELP	195
IV.A.1.2. Réticulation des nanoparticules auto-assemblées	198
IV.A.1.2.1. Synthèse et thermosensibilité	198
IV.A.1.2.2. Caractérisation physicochimique des nanoparticules réticulées	201
IV.A.2. Conjugaison de sondes de fluorescence	205
IV.A.2.1. Stratégie de synthèse	205
IV.A.2.2. Caractérisation chimique	208
IV.A.2.3. Synthèse des bioconjugués HA-ELP-fluorophore	212
IV.B. Étude à l'échelle du récepteur par SPR	215
IV.B.1. Principe	215
IV.B.2. Résultats	218
IV.B.2.1. Nanoparticules non réticulées sur puce CM5 (NH ₂)	219
IV.B.2.2. Nanoparticules réticulées sur puce CM5 (NH ₂)	221
IV.B.2.3. Nanoparticules réticulées sur puce NTA (Ni ²⁺)	225
IV.C. Étude à l'échelle de la cellule : expériences <i>in vitro</i>	228
IV.C.1. Travail préliminaire	228
IV.C.2. Étude d'affinité et de spécificité	229
IV.C.2.1. Nanoparticules non réticulées	229
IV.C.2.1. Nanoparticules réticulées	230
IV.C.3. Étude cytotoxicologique	234
Conclusion	235
Partie expérimentale	237
Annexes	244
Références	268

INTRODUCTION

Les chapitres précédents ont détaillé la synthèse et la caractérisation d'une librairie de bioconjugués HA-ELP et l'étude de leur auto-assemblage en solution aqueuse. Celui-ci est réversible et dépend de deux paramètres majeurs : la température et la concentration. La diminution d'un de ces paramètres sous sa valeur critique (CMT ou CMC) entraîne le désassemblage spontané des objets et le retour à une forme de chaîne libre. Les propriétés physico-chimiques des nanoparticules formées par ces bioconjugués ayant été étudiées en laboratoire, une analyse plus spécifique de leur interaction avec un environnement biologique a été menée. Un intérêt particulier a été porté à deux aspects : le ciblage des cellules surexprimant le récepteur CD44 pour lequel le HA est un ligand naturel et l'effet de multivalence lié à la concentration de ces ligands à la surface des nanoparticules.

En s'inspirant des travaux de H. Duan *et al.*,¹ l'utilisation de la SPR a permis de caractériser l'affinité du HA pour le récepteur CD44 en fonction de la forme adoptée par les bioconjugués : chaînes libres ou nanoparticules. Cette technique permet en effet de déterminer les caractéristiques de l'interaction entre un ligand et son récepteur par mesure d'adsorption de masse sur une surface. Son principe est détaillé plus loin dans ce chapitre. L'objectif de cette étude était de mesurer l'intérêt de la présentation du HA à la surface d'une nanoparticule par rapport à sa forme de chaîne libre dans l'obtention d'une affinité accrue pour le récepteur CD44, du fait d'interactions multivalentes fortes. Celle-ci pourrait donc être modulée par un simple changement d'état des bioconjugués contrôlé par une variation de la température.

En parallèle, la possibilité d'utiliser ces nanoparticules pour le ciblage de cellules cancéreuses surexprimant le récepteur CD44 a également été explorée. Des études ont ainsi été menées *in vitro* par cytométrie en flux sur deux lignées de cellules tumorales : l'une surexprimant le CD44 et l'autre ne l'exprimant que très peu. Ces lignées sont les mêmes que celles utilisées précédemment par l'équipe dans le cadre des travaux de V. Jeannot *et al.*^{2,3} sur les nanoparticules de HA-b-PBLG dans le traitement du cancer du poumon. Des expériences de sélectivité et de cytotoxicité ont ainsi été réalisées afin d'évaluer le potentiel de ces bioconjugués dans la formation de nanovecteurs efficaces.

Ces études se sont assez rapidement heurtées à deux problèmes majeurs.

Des tests préliminaires ont révélé la fragilité du système auto-assemblé envers la dilution : les étapes de rinçage, très courantes dans les protocoles de tests biologiques, ont en effet été à l'origine d'un désassemblage spontané des nanoparticules, rendant leur analyse impossible. Ceci semblait particulièrement de mauvais augure concernant leur comportement *in vivo*. Une stabilisation de l'état nanoparticulaire a donc été nécessaire.

Ce constat a été partagé par l'équipe d'A. Chilkoti qui a récemment publié une étude dans lequel un système auto-assemblé de bioconjugués RLP-b-ELP a été stabilisé par la réticulation sous UV d'un résidu hôte non naturel, le *para*-azidophénylalanine (*pAzF*).⁴ Ceci leur a permis de maintenir un état nanoparticulaire et la présentation multivalente d'un ligand, y compris après dilution.

Ici, le choix s'est plutôt porté sur l'utilisation d'un agent réticulant chimique pouvant réagir sur des ELPs ne contenant que des acides aminés naturels. Pour cela, les travaux précédemment menés au sein de l'équipe sur la fonctionnalisation sélective des résidus méthionine ont été mis à profit.^{5,6}

L'utilisation d'un composé porteur de deux fonctions époxyde a permis une réticulation du cœur ELP des nanoparticules de manière simple et réalisable en conditions douces, compatibles avec des applications biologiques. La caractérisation de ces objets réticulés a révélé le maintien de propriétés de thermosensibilité, ne menant toutefois plus à leur désassemblage en-dessous de la CMT ou de la CMC. Ceci a donc rendu possible l'analyse biologique de l'état nanoparticulaire adopté par les bioconjugués au-dessus de la CMT.

De plus, si l'analyse par SPR ne nécessite pas de visualisation des nanoparticules, leur marquage par un fluorophore est indispensable pour les techniques de cytométrie en flux et de microscopie utilisées lors des expériences *in vitro*. Une fonctionnalisation des bioconjugués avec différents fluorophores a donc été réalisée et son impact sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules évalué.

Ce chapitre décrit donc en premier lieu l'adaptation du système de bioconjugués aux exigences liées aux analyses biologiques. En particulier, la réticulation des ELPs a permis une stabilisation des nanoparticules envers les variations de concentration, tandis que la fonctionnalisation avec des fluorophores de propriétés spectrales différentes a rendu possible leur visualisation lors des tests sur cellules. Le détail des analyses de SPR et de cytométrie en flux menées sur ces nanoparticules est donné dans une deuxième partie. Elles ont permis de caractériser l'interaction du HA présent à leur surface à l'échelle du récepteur CD44 et à celle de la cellule. Finalement, des études *in vivo* de biodistribution à l'échelle de l'organisme chez le modèle du poisson-zèbre sont actuellement en cours mais ne pourront pas être développées dans ce manuscrit.

IV.A. Adaptation du système à une évaluation biologique

La dernière étape pour les bioconjugués synthétisés dans le **chapitre II** et les nanoparticules formées par leur auto-assemblage caractérisées dans le **chapitre III** a été l'évaluation biologique. Pour cela, quelques modifications ont été nécessaires : une amélioration de la stabilité a été obtenue en réticulant le cœur des nanoparticules à chaud afin d'éviter leur désassemblage induit par la dilution. D'autre part, leur visualisation a été rendue possible par la synthèse de bioconjugués fluorescents, incorporés dans les nanoparticules au moment de l'auto-assemblage.

IV.A.1. Amélioration de la stabilité par réticulation du cœur ELP

Si le désassemblage induit par les changements de température est un atout dans le contrôle de la multivalence et par conséquent pour la modulation de l'affinité des nanoparticules pour le CD44, la dépendance de la CMT des bioconjugués avec la concentration pose problème pour les applications biologiques. En effet, comme évoqué dans le **chapitre II**, et expérimenté lors de travaux préliminaires (cf. **IV.B.2.1** & **IV.C.2.1**), les nanoparticules subissent un effet de dilution très important lors de leur étude *in vitro* et *in vivo*, menant à une forte modification de la CMT et à leur désassemblage spontané à 37°C. Les propriétés du système sont alors très différentes de celles observées en laboratoire, et il n'est pas certain que l'accumulation locale des unimères permette d'atteindre une concentration suffisante pour reformer les nanoparticules *in vivo*. Afin de préserver l'état auto-assemblé, il convient donc de stabiliser les nanoparticules par réticulation du cœur. Ici, le choix s'est porté sur une réticulation chimique des résidus méthionine présents le long de la chaîne d'ELP.

IV.A.1.1. Fonctionnalisation chimiosélective des méthionines de l'ELP

Dans un premier temps, une stabilisation de l'état auto-assemblé avait été envisagée par diminution de la dépendance de la CMT envers la dilution. Pour cela, deux méthodes étaient possibles : un allongement de la chaîne de l'ELP ou l'augmentation de son hydrophobie générale. L'usage de la première ayant déjà été écarté du fait des contraintes liées à la production d'ELPs très longs (cf. **chapitre II**), nous nous sommes penchés sur la deuxième. L'introduction de groupements hydrophobes le long de la chaîne a ainsi été envisagée.

Comme évoqué dans le **chapitre I (I.A.2.2.3, p28)**, le LCPO a développé une boîte à outils permettant une fonctionnalisation aisée et chimiosélective des résidus méthionine présents dans des ELPs de séquence [(VPGVP)(VPGMG)(VPGVG)₂]₁₀.^{6,7,5} Certaines de ces méthodes ont été appliquées ici pour la fonctionnalisation le long de la chaîne des ELPs. En particulier, l'utilisation d'halogénures d'alcane et de composés époxyde a permis d'introduire des groupements benzyle, alcyne, et azoture par thioalkylation (**Figure IV-1**), ces derniers permettant le couplage par CuAAC avec des composés plus hydrophobes encore. La chimiosélectivité de cette réaction a été assurée par un milieu réactionnel acide, permettant une plus meilleure réactivité du groupement thioéther des méthionines par rapport à l'amine terminale.

Les ELPs ainsi fonctionnalisés pourraient alors être couplés aux HA, pour former des bioconjugués présentant un caractère amphiphile plus marqué, et une CMT moins dépendante de la concentration.

Des composés glycidyl propargyl éther, glycidyl azoture, et époxypropyl benzène (EPBz) ont ainsi été utilisés pour la fonctionnalisation d'ELPn60 et d'ELPn80.

Pour les deux premiers, la réaction a été menée sur un ELPn60 dans de l'acide acétique glacial en présence d'HFIP. Ces conditions dégradent rapidement les dérivés époxydes, leur utilisation en très large excès (3 x 10 équiv. / méthionine) a été nécessaire. Après purification par filtration-centrifugation et lyophilisation, le produit final a été obtenu avec un rendement satisfaisant (65-90%). Un protocole similaire a été appliqué à la fonctionnalisation de l'ELPn80 par l'EPBz, dans des conditions plus douces (H₂O, pH 5, r = 85%).

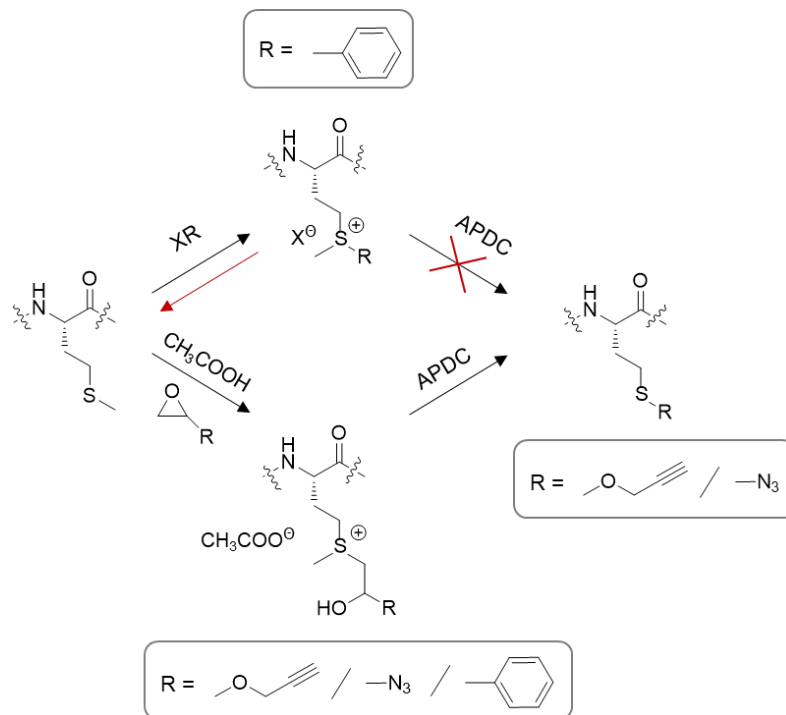


Figure IV-1 : Fonctionnalisation de la méthionine par alkylation avec un halogénure d'alcane ou un dérivé d'époxyde. Formation d'espèces chargées (sulfonium). Étape de déméthylation pour revenir à un composé thioéther neutre. Échec dans le cas de la fonctionnalisation avec BrBz (élimination du benzyl au lieu du méthyl).⁸

Une autre voie de fonctionnalisation de l'ELPn80, employant le bromure de benzyle (BrBz), a également été explorée. Cette fois, la réaction a été menée dans un mélange d'acide formique et de THF en présence d'un large excès de BrBz (15 équiv. / méthionine). Après purification et lyophilisation le produit final a été obtenu avec un rendement de 75%.

Les composés ainsi formés ont été caractérisés par RMN ¹H. Le spectre de l'ELPn60-g-alcyne est illustré en **Figure IV-2**, ceux de l'ELPn60-g-azoture et des deux ELPn80-g-benzène sont donnés en **Annexe IV-1** et **Annexe IV-2**.

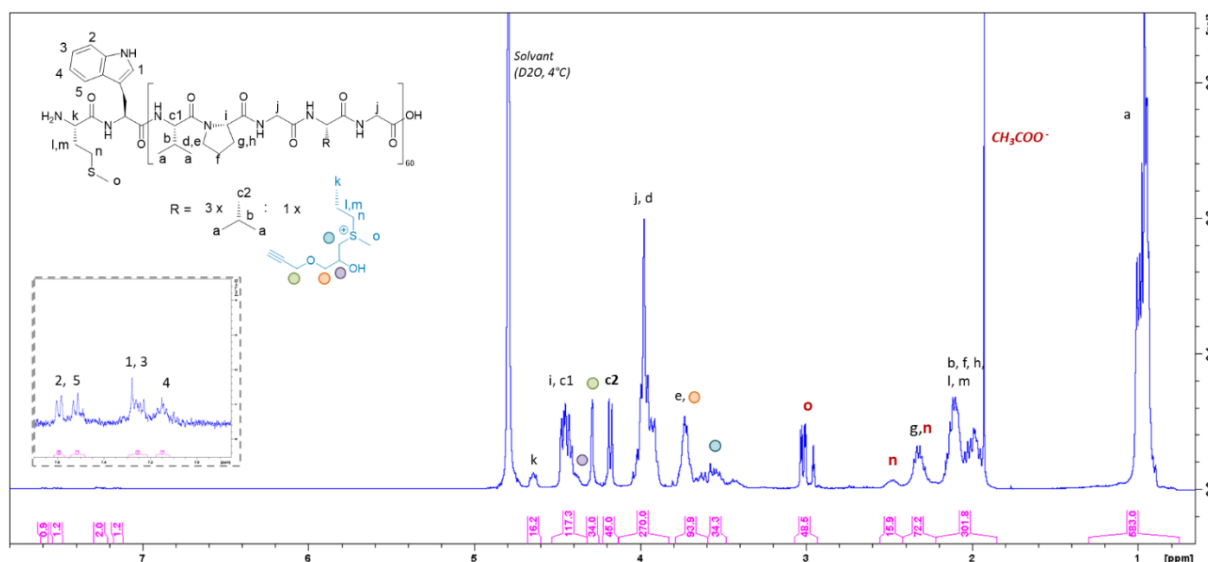


Figure IV-2 : Spectre RMN ¹H de l'ELPn60-g-alcyne (400 MHz). Pic de référence : c2 (CH Valine VPGVG, 45 H).

Les signaux de l'ELPn60 de départ sont tous présents et ne sont que peu affectés par la fonctionnalisation. Deux exceptions notables sont toutefois à relever : les pics de résonance des protons les plus proches du soufre de la méthionine subissent un léger blindage dans le cas du CH₂ (protons n) et un déblindage plus important pour le CH₃ (protons o).

Les signaux caractéristiques de la fonctionnalisation sont également visibles. Dans la **Figure IV-2**, l'intégration de certains d'entre eux (vert et bleu) permet de conclure à une réaction quantitative. Les taux de fonctionnalisation déterminés de la même manière pour la synthèse des espèces ELP-*g*-benzène restent également très satisfaisants ($\eta = 90\%$ EPBz, $\eta = 81\%$ BrBz). La détermination de ce taux n'est en revanche pas possible pour l'espèce ELP-*g*-azoture, les pics de résonance caractéristiques de la fonctionnalisation étant dissimulés dans des massifs.

Enfin, dans tous les cas, un pic très fin est observable entre 1,5 et 1,95 ppm (selon l'espèce). Il correspond aux protons du contre-ion CH_3COO^- . En effet, la fonctionnalisation par ces composés entraîne la transformation du thioéther neutre en sulfonium chargé positivement.

Cet apport de charges positives participe à l'augmentation de la T_{cp} de l'ELP fonctionnalisé. Pour revenir à une espèce neutre, une étape de déméthylation est nécessaire (**Figure IV-1**). Celle-ci a été effectuée dans de l'éthanol à 75% en présence d'ammonium pyrrolidinedithiocarbamate (APDC). Les sulfoniums ayant disparu, une purification par dialyse a été possible. Après lyophilisation les produits finaux ont été obtenus avec des rendements massiques variables (30%-80%).

Leur caractérisation a été menée par RMN ^1H . La **Figure IV-3** présente les spectres de l'ELPn60 natif (bleu), après fonctionnalisation par le glycidyl propargyl éther (violet), et après déméthylation (cyan).

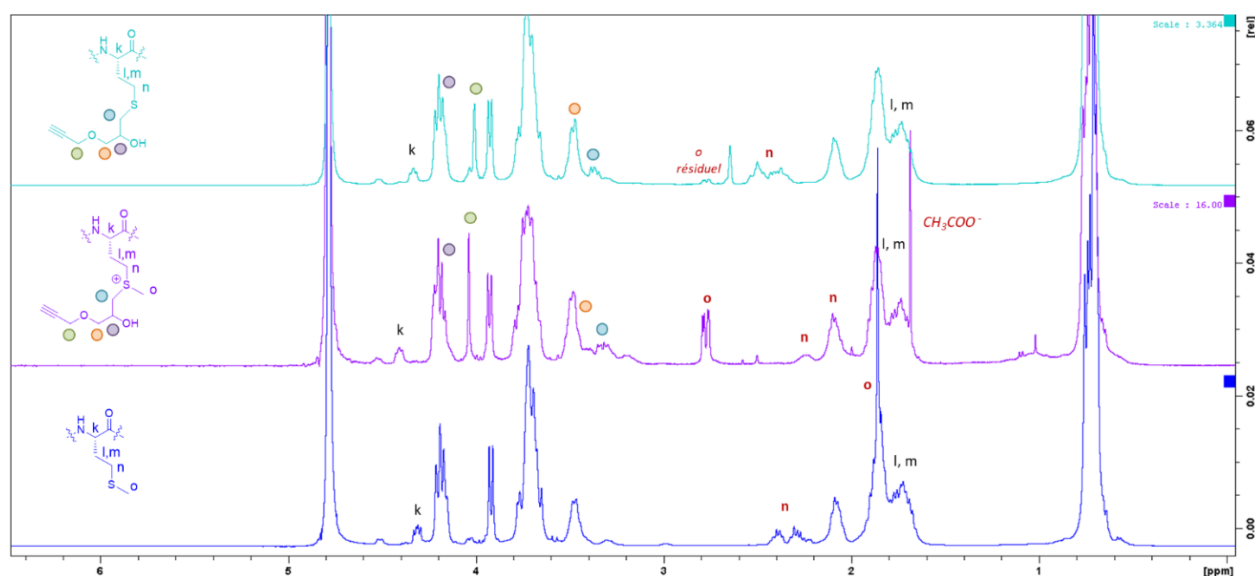


Figure IV-3 : Spectres RMN ^1H de l'ELPn60 natif (bleu), après fonctionnalisation des méthionines (violet), et après déméthylation (cyan). (400 MHz).

De la même façon, seuls les signaux des protons de l'ELP les plus proches du soufre sont réellement impactés : le signal du CH_2 (protons n) retrouve sa place initiale, accompagné d'un peu d'oxydation. Le signal caractéristique des protons du méthyl (o), quant à lui, disparaît quasiment totalement. Son intégration traduit la présence d'une méthionine non déméthylée. La charge positive ayant disparu le pic du contre-ion n'est également plus visible, contrairement aux autres signaux de la fonctionnalisation.

Les mêmes conclusions s'appliquent aux spectres de l'ELPn60-*g*-azoture déméthylé (**Annexe IV-3**). En revanche, la déméthylation de l'ELPn80 fonctionnalisé par le BrBz est un échec (**Annexe IV-4**). Le spectre après réaction est identique à celui de l'ELPn80 initial. Cela signifie que le benzyle a été éliminé en lieu et place du méthyle. Ce phénomène a également été constaté par E. G. Gharakhanian et T. J. Deming.⁸ Cette déméthylation n'a donc pas été tentée sur le composé ELPn80-*g*-benzène obtenu avec l'EPBz.

Une caractérisation de leur T_{cp} a été réalisée par DLS (**Annexe IV-5**, 3 mg/mL, TRISs/PBS). Les fonctions alcyne et azoture ne présentant pas une hydrophilie ou hydrophobie marquée, la T_{cp} des composés ELPn60-*g*-alcyne/azoture déméthylés n'est pas significativement différente de celle de l'ELP de départ.

Plus étonnant, la fonctionnalisation avec le benzyle ne semble pas non plus impacter grandement la T_{cp} . Ceci pourrait être dû à une compétition entre l'hydrophobie du benzène et l'hydrophilie du sulfonium. L'élimination de cette fonction par déméthylation n'étant pas possible, cette hypothèse n'a pas pu être confirmée.

Afin d'observer une plus grande diminution de la T_{cp} , une fonctionnalisation par un groupement naphthalène a été tentée (**Annexe IV-6**). Pour cela, un composé naphthalène présentant une fonction alcyne a été couplé à l'ELPn80-*g*-azoture (méthylé et déméthylé) par CuAAC, selon le même protocole que celui appliqué pour la synthèse des bioconjugués. Dans les deux cas, une espèce jaune-orange vif a été obtenue, malheureusement totalement insoluble dans l'eau et difficilement purifiable.

Cette méthode de stabilisation par introduction de groupements hydrophobes le long de la chaîne s'est donc avérée peu pertinente pour ce projet. La modulation de la T_{cp} par cette voie semble en effet assez délicate et nécessite plusieurs étapes de synthèse. Une stabilisation par réticulation du cœur ELP des nanoparticules lui a donc été préférée.

Si cette voie n'a finalement pas été poursuivie, elle confirme néanmoins la faisabilité de la fonctionnalisation le long de la chaîne par modification de la méthionine et chimie click précédemment démontrée par l'équipe.⁵

IV.A.1.2. Réticulation des nanoparticules auto-assemblées

Cette modification aisée et chimiosélective de la méthionine a été mise à profit pour la réticulation des nanoparticules. La réaction de CuAAC entre un ELP-*g*-alcyne et un ELP-*g*-azoture entrant en conflit avec la synthèse du bioconjugué par SPAAC, cette voie n'a pas été tentée. Une réticulation *via* l'utilisation d'un composé possédant deux fonctions époxyde lui a été préférée. Elle est détaillée ci-dessous.

IV.A.1.2.1. Synthèse et thermosensibilité

Le choix du réticulant s'est porté sur l'hexanediol diglycidyl éther. Sa structure est proche des composés époxydes précédemment étudiés, qui ont fait preuve d'une bonne efficacité de réaction. Le schéma de cette réaction de réticulation est indiqué en **Figure IV-4**. Chacune des fonctions époxydes du réticulant est capable de réagir sur une méthionine, permettant des liaisons intra- et intermoléculaires.

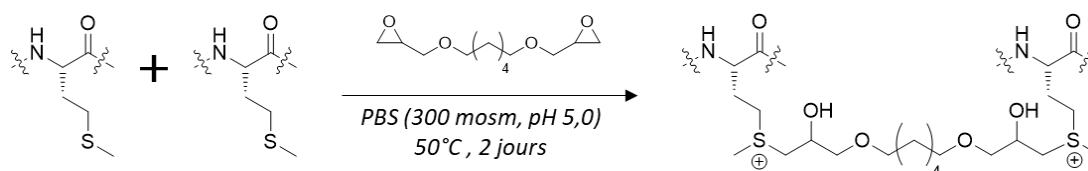


Figure IV-4 : Schéma de la réaction de réticulation par l'hexanediol diglycidyl éther.

Un premier test sur les ELPn60 et ELPn80 seuls a prouvé la faisabilité de la réaction. À partir de cette expérience préliminaire, la réticulation a été menée directement sur les bioconjugués HA-ELP. Elle a été effectuée dans un tampon PBS à pH 5, afin d'assurer une bonne chimiosélectivité. Les nanoparticules ont tout d'abord été formées par auto-assemblage à chaud, avant d'être réticulées par ajout d'hexanediol diglycidyl éther en large excès (6 équiv./méthionine), toujours à chaud. L'élimination du réticulant en excès et le retour à un pH physiologique ont ensuite été obtenus par dialyse (PBS, pH 7,4).

Un suivi de la réaction de réticulation des nanoparticules formées par le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 a été réalisé. Des prélèvements du milieu réactionnels ont été effectués à différents temps de réaction et analysés par DLS à 10°C (< CMT) et 40°C (> CMT). Les résultats sont indiqués en **Figure IV-5 A & B**. Les distributions de taille sont présentées en nombre, pour plus de clarté. A chaud (**B**), peu de différences sont observées, exceptée une légère augmentation de la taille des nanoparticules au cours du temps.

À froid, en revanche, une évolution importante de la taille des objets en solution est observable (A) : de 10 nm avant l'ajout du réticulant, elle atteint environ 50 nm en fin de réaction, soit très proche des tailles observées à chaud. Ceci prouve de manière indirecte le succès de la réticulation : après 23h de réaction, la population principale en solution à 10°C est composée de nanoparticules et non de chaînes libres : il n'y a plus de désassemblage.

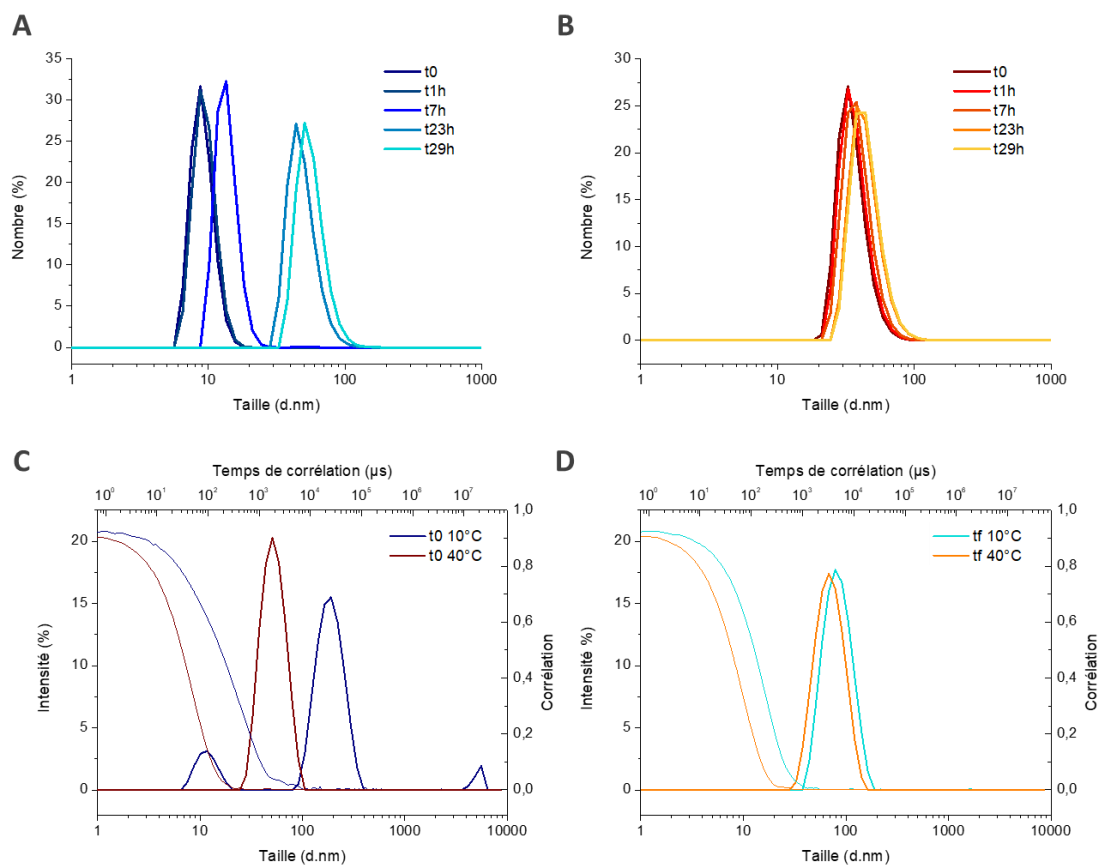


Figure IV-5 : Caractérisation de la réticulation des nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn80 (78 µM, PBS pH 5,1).

A, B : Suivi cinétique de la réticulation par prélèvement du milieu réactionnel à différents temps de réaction et mesures à 10°C (A) et à 40°C (B). Distributions de taille **en nombre** en fonction du temps de réaction. C, D : comparaison des distributions de taille en intensité et des corrélogrammes associés à 10°C et à 40°C avant (C) et après (D) réticulation.

La **Figure IV-5 C & D** compare les distributions de taille en intensité et les corrélogrammes associés pour une solution de bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn80 (78 µM, PBS pH 5) avant (C) et après (D) réticulation à 10°C et 40°C. Avant réticulation, l'effet habituel de la thermosensibilité est observé, avec une disparition des chaînes libres (≈ 10 nm) et des agrégats à chaud, au profit d'une population unique de nanoparticules d'environ 50 nm de diamètre. Après réticulation, malgré la disparition de la réversibilité de l'assemblage, la thermosensibilité est toujours visible : une variation de la taille des nanoparticules est en effet observée entre 10°C et 40°C. Ce phénomène est également constaté pour les nanoparticules réticulées formées par les bioconjugués HA_{24k}-ELPn80 et HA_{42k}-ELPn80, bien que son amplitude semble décroître lorsque la taille du bloc HA augmente (**Annexe IV-7**).

Ce maintien de la thermosensibilité a été étudié plus en détails. Il est présenté ici pour une solution de nanoparticules réticulées formées par l'auto-assemblage du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 (78 µM, PBS). Ainsi, la **Figure IV-6 A** illustre l'évolution de l'intensité diffusée et de la taille des nanoparticules réticulées en fonction de la température. À mesure que celle-ci s'élève, une augmentation régulière de l'intensité diffusée accompagne la diminution tout aussi régulière de la taille. Ceci est dû à la condensation du cœur de la nanoparticule lorsque l'ELP devient hydrophobe.

La réticulation, cependant, gomme toute transition brutale et limite fortement l'amplitude du phénomène ($\Delta_{Z-Ave} \approx 10$ nm). Celui-ci, bien que modeste, est réversible. La **Figure IV-6 B** montre le comportement de la solution de nanoparticules réticulées soumise à deux cycles de chauffage et refroidissement. Les variations de taille et d'intensité sont réversibles et semblent reproductibles d'un cycle à l'autre. En outre, il ne semble pas y avoir de différence notable de comportement entre les phases de chauffage et celles de refroidissement (**Annexe IV-8 A**).

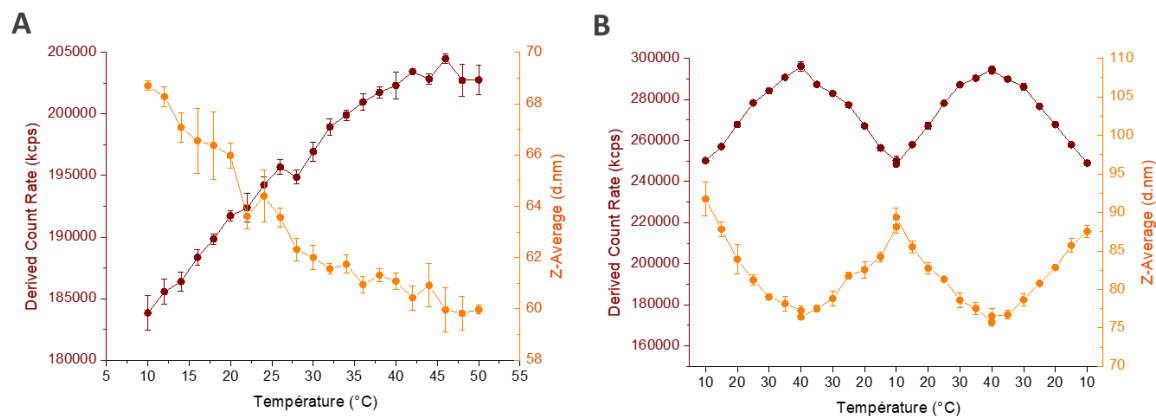


Figure IV-6 : Illustration de la conservation des propriétés de thermosensibilité des nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn80 après réticulation (78 μ M, PBS pH 5 (A) ou 7,4 (B)). A : Évolution de l'intensité diffusée et de la taille des objets en solution en fonction de la température. B : Évolution sur 2 cycles de rampes de température montantes et descendantes. Représentation chronologique. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type sur les 3 mesures consécutives faites par l'appareil.

L'objectif principal de la réticulation est de limiter l'influence de la dilution sur l'objet auto-assemblé. Une étude de l'effet de la concentration sur la taille des nanoparticules réticulées a donc été menée. Elle est illustrée en **Figure IV-7** et en **Annexe IV-8 B** : pour une solution de nanoparticules réticulées formées par le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 dans le PBS à 25°C. Cette fois encore, aucun désassemblage n'est observé et les différences de taille induites par la dilution sont minimales (1 nm), de l'ordre de grandeur de l'erreur expérimentale. **La stabilisation envers la dilution par réticulation a donc été atteinte, ouvrant la voie à une caractérisation biologique plus aisée.**

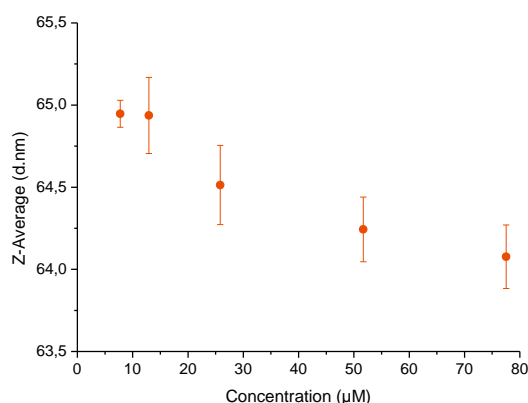


Figure IV-7 : Évolution de la taille des nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn80 réticulée en fonction de la concentration (PBS, 25°C). Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type sur les 3 mesures consécutives de l'appareil.

Des variations du protocole de réticulation ont été réalisées (**Annexe IV-9**) pour le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80. Ainsi, l'ajout d'hexanediol diglycidyl éther à seulement 3 équivalents par méthionine a permis d'obtenir une réticulation au bout de 24h. Par ailleurs, le résorcinol diglycidyl éther a également montré son efficacité comme réticulant (**Figure IV-8 & Annexe IV-9**). Il est toutefois intéressant de noter que l'utilisation de cette molécule, plus courte et disposant d'un cycle aromatique capable de former des liaisons π - π , limite fortement l'effet de la température sur la taille des nanoparticules réticulées, rendant probablement le cœur plus hydrophobe et compact.

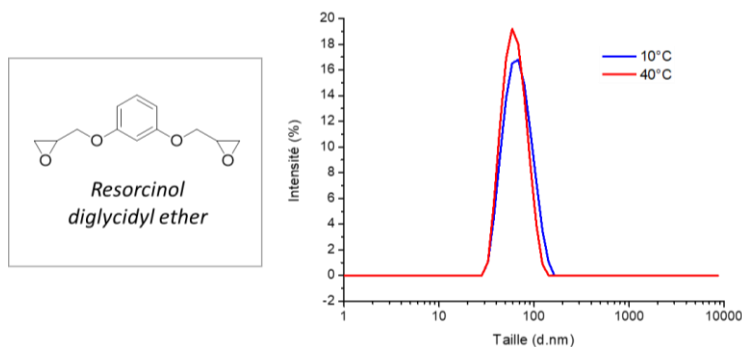


Figure IV-8 : Distributions de taille à 10°C et 40°C de nanoparticules d'HA_{4,6k}-ELPn80 réticulées avec le résorcinol diglycidyl ether (78 μM, PBS pH 5).

IV.A.1.2.2. Caractérisation physicochimique des nanoparticules réticulées

Le protocole décrit plus haut ayant prouvé son efficacité, il a été appliqué à la réticulation de l'ensemble des bioconjugués de la librairie. Les nanoparticules stabilisées ont ensuite fait l'objet d'une caractérisation physico-chimique détaillée.

Diamètres hydrodynamiques des nanoparticules réticulées

Tout comme pour leurs homologues non réticulées, une étude de la variation de la taille des nanoparticules en fonction de la composition du bioconjugué a été menée. Elle a été mesurée par DLS juste après réticulation à 5°C et 50°C (PBS pH 5) et après dialyse à 25°C (PBS pH 7,4). Le **Tableau IV-1** rassemble les valeurs de diamètre hydrodynamique (Z-Average) et de dispersité (Pdl) moyennes obtenues. Du fait de la méthode de calcul du Z-Average, la présence d'agrégats a parfois posé problème, en particulier pour les nanoparticules de HA-ELPn60. Certaines valeurs sont donc peu fiables (*), ou ont été écartées de l'analyse statistique (N<3).

Tableau IV-1 : Tableau récapitulatif de la taille et de la dispersité des nanoparticules réticulées de la librairie à 5°C, 25°C et 50°C (78 μM, PBS pH 5 ou 7,4**). N = nombre de répliques (solutions différentes). * plusieurs population (agrégats ou chaînes libres restantes), mesure moins fiable.

Bioconjugué	5°C			25°C**			50°C		
	Z-average (d.nm)	Pdl	N	Z-average (d.nm)	Pdl	N	Z-average (d.nm)	Pdl	N
HA _{4,6k} – ELP n60	81 (± 4)	0,3 (± 0,1)	2	65	0,2	1	59 (± 10)	0,2 (< 0,1)	2
HA _{4,6k} – ELP n80	87 (± 10)	0,2 (± 0,1)	7	65 (± 5)	0,1 (< 0,1)	4	57 (± 4)	0,1 (± 0,1)	7
HA _{4,6k} – ELP n100	122 (± 32)	0,04 (< 0,01)	2	72	0,1	1	72 (± 0,2)	0,1 (< 0,1)	2
HA _{24k} – ELP n60	100 (± 9)	0,3 (± 0,1)	3	89	0,2	1	89 (± 3)	0,2 (< 0,1)	3
HA _{24k} – ELP n80	114 (± 11)	0,2 (< 0,1)	5	95 (± 5)	0,2 (< 0,1)	3	98 (± 10)	0,1 (< 0,1)	6
HA _{24k} – ELP n100	126 (± 9)	0,1 (< 0,1)	3	106 (± 3)	0,1 (< 0,01)	2	107 (± 5)	0,1 (< 0,1)	4
HA _{42k} – ELP n60	207*	0,4*	1	253* (± 2)	0,3* (< 0,01)	2	238* (± 45)	0,3* (< 0,01)	2
HA _{42k} – ELP n80	178 (± 37)	0,3 (< 0,1)	5	140 (± 19)	0,2 (< 0,1)	3	167 (± 40)	0,2 (< 0,1)	6
HA _{42k} – ELP n100	197 (± 18)	0,2 (< 0,01)	3	197 (± 18)	0,2 (< 0,01)	2	166 (± 14)	0,2 (< 0,1)	4
PEG _{5k} – ELP n80	223	0,1	1	136	0,1	1	119	0,1	1

Tout comme les nanoparticules non réticulées, à bloc ELP identique, l'augmentation de la masse molaire du HA semble entraîner celle du diamètre hydrodynamique des nanoobjets. La taille de l'ELP semble avoir un effet similaire, bien que dans une moindre mesure. Ceci n'était pas observé pour les nanoparticules non réticulées. Par ailleurs, le remplacement du HA_{4,6k} par du PEG_{5k} engendre la formation de nanoparticules bien plus grandes.

Les valeurs de taille à 50°C répertoriées ici sont comparables ou légèrement supérieures à celles obtenues avant réticulation (**Chapitre III, Annexe III-18, p188**). L'une de nos hypothèses est que les charges apportées par la formation des sulfoniums le long de la chaîne ELP limitent la condensation du cœur par répulsion électrostatique.

Ces mesures de taille ont à nouveau été réalisées après un mois de stockage en solution à 4°C (**Figure IV-9, Annexe IV-10**). Aucune différence significative n'ayant été observée, il est possible de conclure quant à une bonne stabilité dans le temps de ces nanoparticules réticulées.

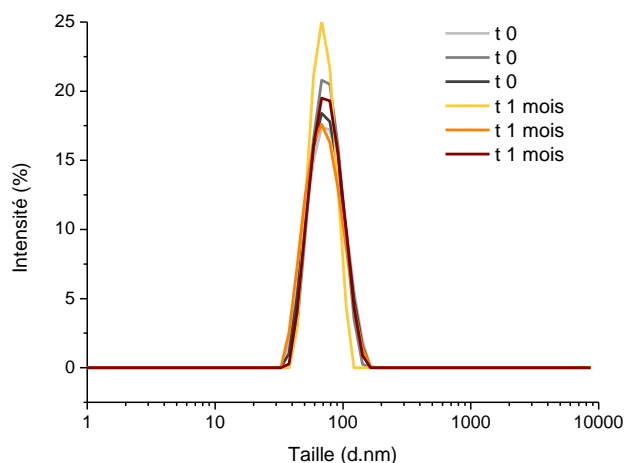


Figure IV-9 : Stabilité dans le temps des nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn80 en solution (78 µM, PBS). Évolution de la distribution de taille juste après réticulation et après 1 mois de stockage à 4°C.

Potentiel zêta des nanoparticules réticulées

Le potentiel zêta de toutes les nanoparticules de la librairie a également été mesuré. Pour ce faire, les solutions initiales de nanoparticules réticulées (78 µM, PBS 300 mosm) ont été diluées par 10 afin d'obtenir des solutions d'une salinité plus compatible avec l'analyse (7,8 µM, PBS 30 mosm). Malgré tout, seule la partie rapide de la mesure (FFR) a pu être effectuée, ne donnant accès qu'à la valeur moyenne du potentiel zêta, et non pas à sa distribution. Cette mesure est illustrée en **Figure IV-10 A** pour les nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn80 et en **Annexe IV-11** pour toutes les autres.

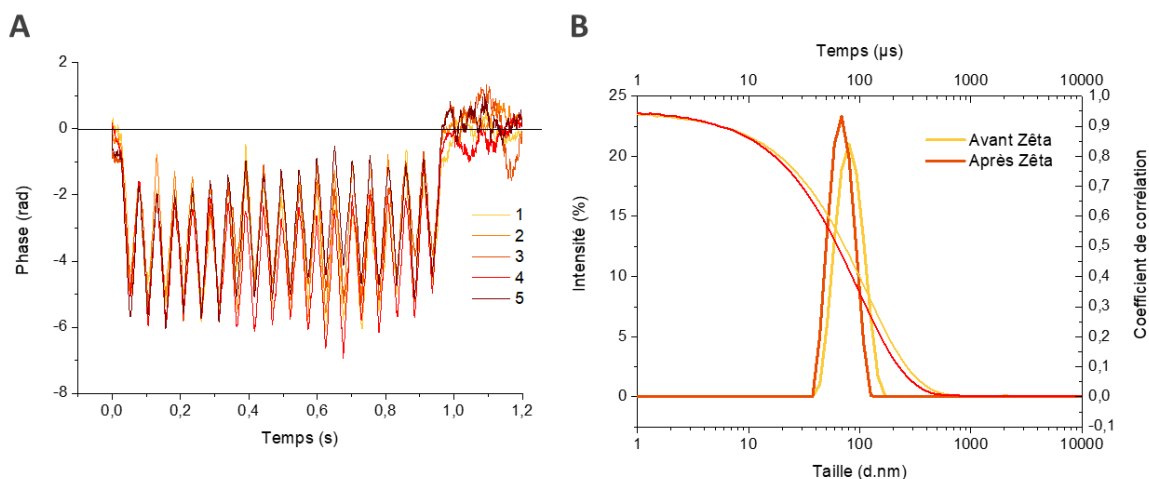


Figure IV-10 : Caractérisation des nanoparticules réticulées de HA_{4,6k}-ELPn80 (7,8 µM, PBS 30 mosm). A : mesure du potentiel zêta. Évolution de la phase en fonction du temps. B : Mesure de la taille des nanoparticules avant et après mesure du potentiel zêta. Distributions de taille et corrélogrammes associés.

Les mesures pour les espèces de références (HA libres et nanoparticules de PEG_{5k}-ELPn80 réticulées) sont quant à elles présentées en **Annexe IV-12**. Dans presque tous les cas, la phase reste bien en dessous de zéro, ce qui se traduit par une valeur moyenne de potentiel zêta négative.

Ces valeurs sont rassemblées dans le **Tableau IV-2**. À l'exception des nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn100, pour lesquelles la présence d'agrégats a faussé la mesure, toutes les nanoparticules de la librairie présentent effectivement un potentiel zêta négatif. La composition des bioconjugués ne semble avoir que peu d'influence sur sa valeur : les valeurs sont proches et s'échelonnent entre -16 mV et -32 mV, sans tendance particulière concernant la taille du bloc ELP ou du bloc HA.

Les HA libres de référence ont également un potentiel zêta négatif, indépendant de la taille du HA. Enfin, le potentiel zêta des nanoparticules de PEG_{5k}-ELPn80 est neutre. Le PEG n'étant pas chargé, cela traduit l'enfouissement dans le cœur des fonctions sulfonium générées par la réticulation, qui ne sont alors pas détectables.

Tout ceci confirme donc l'hypothèse d'une structure cœur-couronne pour ces nanoparticules, avec une couronne de HA négativement chargé en surface, et un cœur d'ELP réticulé.

*Tableau IV-2 : Tableau récapitulatif des mesures de taille et de potentiel zêta des nanoparticules de la librairie réticulées (7,8 µM, PBS 30 mosm). * présence de plusieurs populations ** agrégation. L'écart-type = variabilité entre les mesures consécutives d'un même échantillon.*

Bioconjugué	Avant mesure Zêta		Après mesure Zêta		Mesure Zêta
	Z-average (d.nm)	Pdl	Z-average (d.nm)	Pdl	Potentiel Zêta (mV)
HA _{4,6k} – ELP n60	67	0,1	59	< 0,1	-17,3 (± 1,2)
HA _{4,6k} – ELP n80	78	0,1	66	< 0,1	-15,8 (± 0,7)
HA _{4,6k} – ELP n100	n.d. **				
HA _{24k} – ELP n60	119*	0,2*	114*	0,3*	-19,8 (± 3,8)
HA _{24k} – ELP n80	103	0,1	92	0,1	-22,8 (± 2,5)
HA _{24k} – ELP n100	119	0,1	109	0,1	-28,8 (± 5,0)
HA _{42k} – ELP n60	126	0,2	115	0,2	-31,6 (± 3,0)
HA _{42k} – ELP n80	127	0,2	114	0,2	-22,0 (± 2,1)
HA _{42k} – ELP n100	147	0,1	135	0,1	-23,9 (± 1,6)
PEG _{5k} – ELP n80	162	0,1	n.d. **		0,4 (± 0,6)
HA _{4,6k}	Chaines libres				-11,4 (± 3,4)
HA _{24k}	Chaines libres				-6,5 (± 3,1)
HA _{42k}	Chaines libres				-12,6 (± 2,9)

En marge de cette analyse, il a été observé que le diamètre des nanoparticules diminue après avoir été soumises aux mesures de potentiel zêta, d'environ 10 nm en moyenne. Cet effet est illustré en **Figure IV-10 B** pour les nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn80 et dans le **Tableau IV-2** pour toutes. Les nanoparticules de PEG_{5k}-ELP se voient quant à elles complètement déstabilisées par la mesure de potentiel zêta et s'agrègent. Cet effet inattendu demeure pour l'heure inexplicé et mériterait une étude en soi plus précise en faisant varier la salinité et les conditions de mesure.

Morphologie des nanoparticules réticulées (TEM)

Enfin, les nanoparticules réticulées de HA_{4,6k}-ELPn80 ont été imagées par TEM. Une solution de nanoparticules (2,6 µM, H₂O déionisée) a été déposée par spray sur une grille et teintée à l'acétate d'uranyle. Les images obtenues **Figure IV-11** montrent des objets sphériques d'un diamètre inférieur à 100 nm relativement monodisperses. La réticulation ne semble donc pas impacter de manière significative la morphologie des nanoparticules.

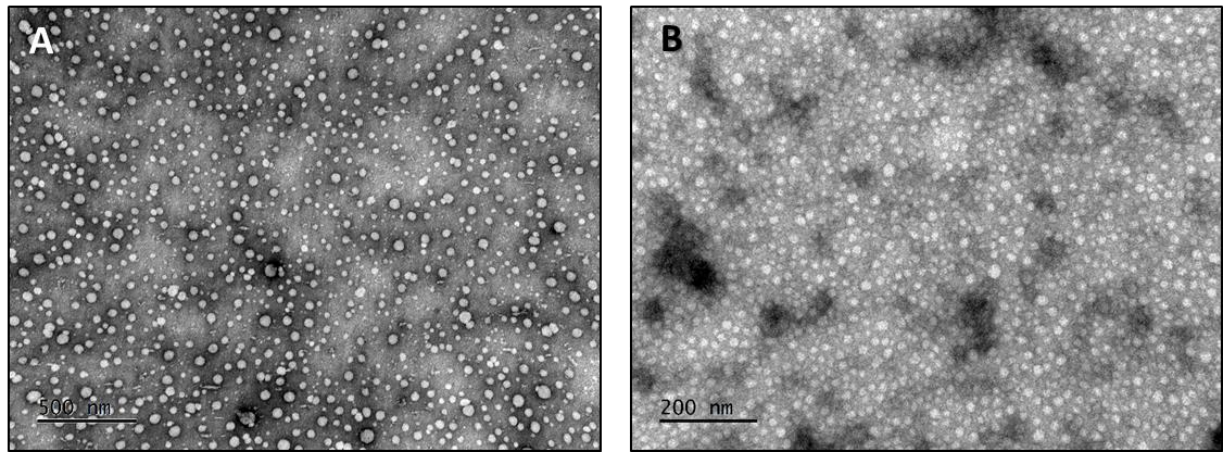


Figure IV-11 : Images TEM de nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn80 réticulées (formvar, acétate d'uranyle). Échelles : 500 nm (A), 200 nm (B).

Une méthode simple de stabilisation par réticulation a donc été mise en place dans ces travaux de thèse. L'utilisation de l'hexanediol diglycidyl éther dans du PBS à pH 5 a permis une réaction chimio-sélective sur les résidus méthionine de l'ELP en conditions douces. Des analyses RMN n'ayant pas été possibles, le taux de réticulation n'a pas pu être estimé. Cependant, une caractérisation indirecte par DLS a permis de confirmer le succès de cette réticulation à travers l'absence de désassemblage au refroidissement tout comme à la dilution. Elles ont aussi montré le maintien de la propriété de thermosensibilité après réticulation. Des mesures de potentiel zêta ont, quant à elles, confirmé la structure des nanoparticules réticulées, avec un cœur ELP et une couronne de HA. Enfin l'imagerie par TEM a montré que ces nanoparticules adoptent bien une morphologie sphérique et assez monodisperse.

IV.A.2. Conjugaison de sondes de fluorescence

L'évaluation du comportement de nanoobjets dans des milieux physiologiques, intrinsèquement complexes, nécessite des méthodes de caractérisation adaptées. Nombre d'entre elles reposent sur le marquage des objets par un émetteur de radiations, lumineuses ou radioactives. La manipulation d'espèces radioactives nécessitant des précautions accrues, le choix s'est porté ici sur le couplage des bioconjugués avec quatre fluorophores de propriétés spectrales différentes : fluorescéine, rhodamine (rhod), DY700 et DY410. Ceci a permis d'obtenir un système adaptable à des applications variées. Ainsi, il a été possible de le visualiser par cytométrie ou microscopie, d'étudier l'affinité et la spécificité des nanoparticules pour des cellules cibles *in vitro*, ou encore leur biodistribution *in vivo*.

IV.A.2.1. Stratégie de synthèse

Deux stratégies de marquage des nanoparticules ont été explorées dans cette étude. Toutes deux sont basées sur le co-assemblage d'espèces fonctionnalisées avec un fluorophore (flu) avec des bioconjugués HA-ELP non modifiés. Dans la première, le fluorophore a été couplé à l'extrémité N-terminale de l'ELP, en lieu et place du bloc HA. À l'inverse, dans la deuxième, le positionnement du fluorophore à l'extrémité C-terminale a permis la formation de bioconjugués HA-ELP-fluo. Ces deux voies de synthèse sont présentées dans la **Figure IV-12**, pour le couplage de la fluorescéine sur un ELPn60.

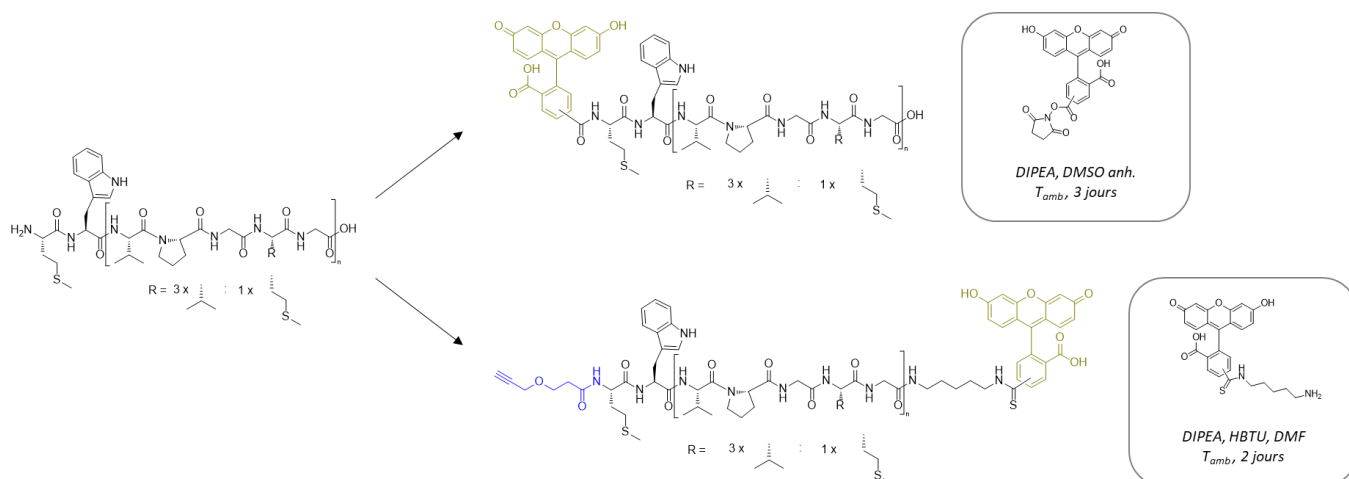


Figure IV-12 : Schéma de fonctionnalisation des extrémités N- et C-terminale de l'ELP par un fluorophore (ici, la fluorescéine).

Fonctionnalisation de l'extrémité N-terminale

La fonctionnalisation de l'amine terminale a été réalisée par réaction avec une fluorescéine présentant un ester activé dans du DMSO anhydre en présence de DIPEA. La purification sur une colonne Sephadex G25 après dialyse a permis de séparer efficacement l'ELPn60-fluo de la fluorescéine en excès. Après lyophilisation, un solide jaune vif a été obtenu ($r = 66\%$).

Il a été analysé par spectrométrie de masse MALDI (**Figure IV-13 A**). Cette dernière a confirmé le couplage de la fluorescéine, avec un déplacement du pic moléculaire vers les hauts m/z de 328 g/mol pour une augmentation théorique de 375 g/mol. En revanche la présence d'un pic à 25 500 g/mol indique la présence résiduelle d'ELPn60 natif. À partir de ce spectre, le taux de fonctionnalisation a donc été estimé à environ 75%.

Une tentative de co-assemblage des espèces HA_{4,6k}-ELPn60 et ELPn60-fluorescéine a ensuite été menée, avec 13% d'espèces marquées (100 μ M, TRISs). L'auto-assemblage des composés de ce mélange a ensuite été induit par chauffage à 50°C et analysé par DLS.

La **Figure IV-13 B** donne une superposition des distributions de taille à cette température de solutions des deux espèces séparées et de leur mélange. Si la présence du bioconjugué limite effectivement l'agrégation des ELPn60-fluo, l'existence de deux populations traduit un co-assemblage au mieux partiel, et non contrôlable.

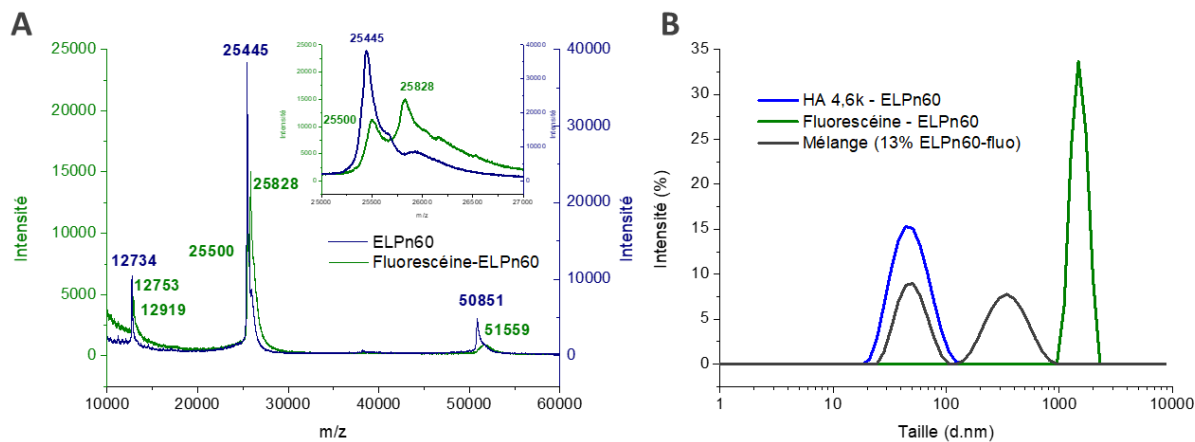


Figure IV-13 : Étude de la voie de fonctionnalisation de l'extrémité N-terminale de l'ELPn60 par la fluorescéine. A : Spectre de masse MALDI de l'ELPn60 avant et après fonctionnalisation. Δ_{th} m/z = 375 g/mol. Δ_{exp} m/z = 328 g/mol. Estimation du taux de couplage \approx 75%. Encart : zoom sur la zone d'intérêt. B : Distributions de taille pour des solutions de bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn60 (bleu), d'ELPn60-fluorescéine (vert), ou d'un mélange HA_{4,6k}-ELPn60 (13% ELPn60-fluorescéine) (100 μ M, TRISs, 50°C).

Fonctionnalisation de l'extrémité C-terminale

La deuxième stratégie de fonctionnalisation, permettant cette fois d'obtenir un bioconjugué HA-ELP marqué, a donc été privilégiée. Pour cela, un fluorophore porteur d'une fonction amine primaire a été ajouté à l'extrémité C-terminale des blocs ELP. La fonctionnalisation a dû être effectuée sur l'intermédiaire alcyne-ELP ou DBCO-ELP. En effet, elle repose sur le couplage entre deux fonctions amine et acide carboxylique, *via* l'activation de ce dernier. Une fonctionnalisation de l'ELP natif risquerait donc de provoquer sa polymérisation, par réaction des extrémités N-terminale et C-terminale entre elles. A l'inverse, celle du bioconjugué HA-ELP verrait une addition du fluorophore sur le bloc HA, porteur de nombreux acides carboxyliques, ce qui pourrait nuire à la reconnaissance du récepteur CD44 (**Annexe IV-15**).

Quatre fluorophores ont ainsi été utilisés pour le marquage des bioconjugués. Leurs structures et propriétés spectrales sont indiquées en **Figure IV-14**.

La fluorescéine est un fluorophore courant et a été utilisée pour les expériences préliminaires. La rhodamine a ensuite été choisie pour limiter les perturbations liées au phénomène d'auto-fluorescence des cellules lors des études *in vitro*. Par la suite, le DY700 a été sélectionné pour sa longueur d'onde d'excitation dans le proche infrarouge. Les radiations dans ce domaine pénètrent en effet plus profondément dans les tissus, le rendant compatible avec des études à la fois *in vitro* et *in vivo*. Enfin, le DY410 a été choisi spécifiquement pour une étude *in vivo* chez le poisson-zèbre. En effet, la lignée transgénique utilisée possède des vaisseaux sanguins marqués en rouge, nécessitant une fluorescence des nanoparticules dans une autre gamme de longueurs d'onde pour être visibles.

Après quelques essais préliminaires sur le couplage de la fluorescéine, le même protocole de synthèse a été appliqué pour tous : le composé alcyne-ELP ou DBCO-ELP a été solubilisé dans du DMF avec un excès de fluorophore, en présence de DIPEA et d'HBTU. La purification dépend ensuite du fluorophore utilisé. Après lyophilisation, des solides cotonneux très peu denses respectivement jaune vif, rose vif, vert turquoise et jaune très pâle ont été obtenus (**Figure IV-15**) avec des rendements supérieurs à 75%.

Les composés alcyne-ELPn60-fluorescéine, DBCO-ELPn60, n80, n100-rhodamine, DBCO-ELPn80-DY700 et DCBO-ELPn80-DY410 ont ainsi été synthétisés.

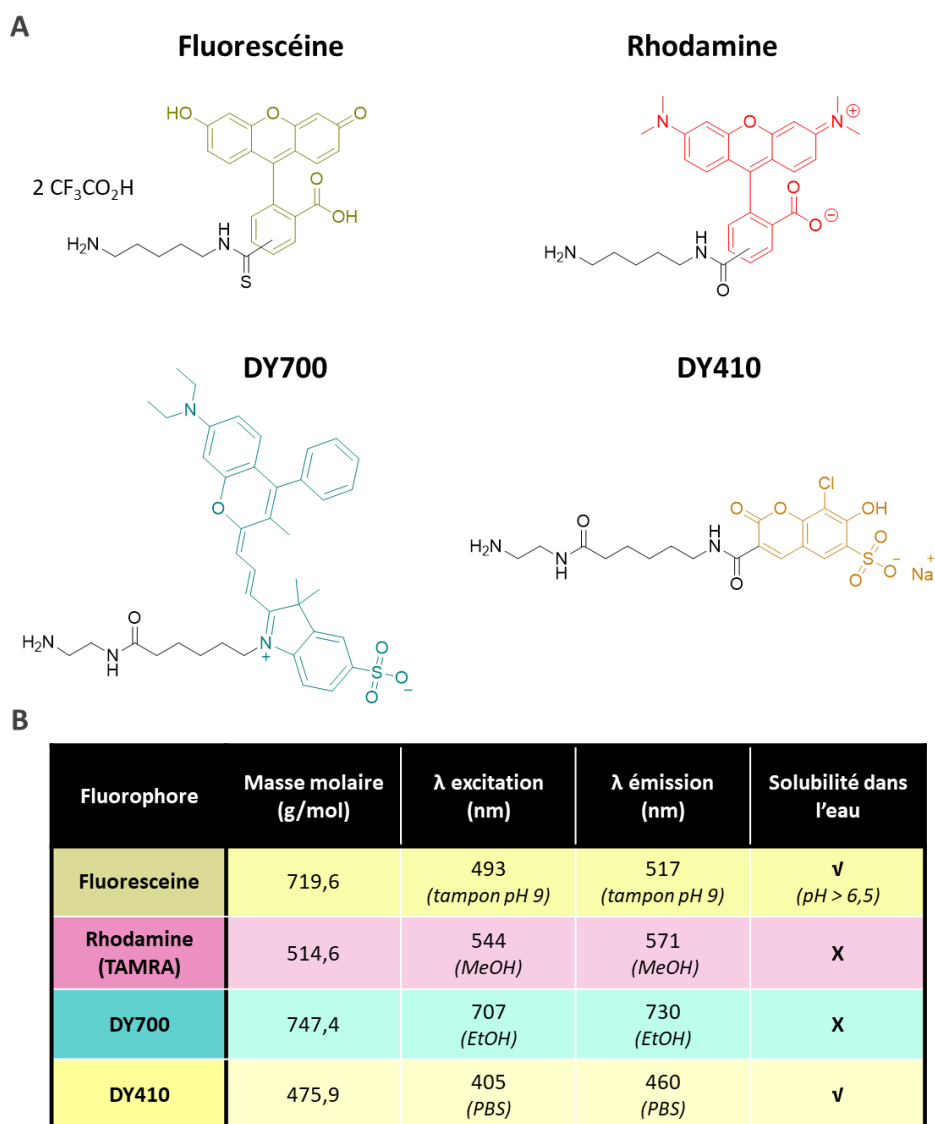


Figure IV-14 : Fluorophores utilisés pour la fonctionnalisation de l'extrémité C-terminale des ELPs. A : Structures chimiques des fluorophores porteurs d'une fonction amine pour permettre le couplage. B : Tableau récapitulatif de certaines de leurs propriétés physico-chimiques. Les longueurs d'onde d'émission et d'excitation sont données par le fournisseur, mesurées dans le solvant indiqué entre parenthèses.



Figure IV-15 : Alcyne-ELPn60 et DBCO-ELPn80 fonctionnalisés avec les différents fluorophores après lyophilisation. De gauche à droite : fluorescéine, rhodamine, DY700, DY410, aucun (ELPn80 natif)

IV.A.2.2. Caractérisation chimique

Les ELPs ainsi fonctionnalisés ont ensuite été caractérisés par RMN ^1H et spectrométrie de masse MALDI. Les spectres RMN sont donnés en **Figure IV-16** pour l'espèce alcyne-ELPn60-fluorescéine, en **Figure IV-17** pour le composé DBCO-ELPn80-DY410 et en **Annexe IV-16** pour les composés DBCO-ELPn80-rhod/DY700. Les spectres obtenus pour ces fonctionnalisations avec les autres ELPs étant sensiblement similaires, ils ne sont pas donnés ici.

La **Figure IV-16** indique l'allure des spectres de l'espèce alcyne-ELPn60-fluorescéine (bleu) ainsi que des composés initiaux alcyne-ELPn60 (violet) et fluorescéine libre (cyan). Les signaux des protons de l'ELP ne montrent de changements que dans la zone des aromatiques, détaillée dans l'encart. Les signaux des protons du tryptophane y apparaissent accompagnés de nouveaux pics correspondant à ceux de la fluorescéine avec un léger blindage. La fonctionnalisation semble donc avoir fonctionné, bien que la quantification soit délicate.

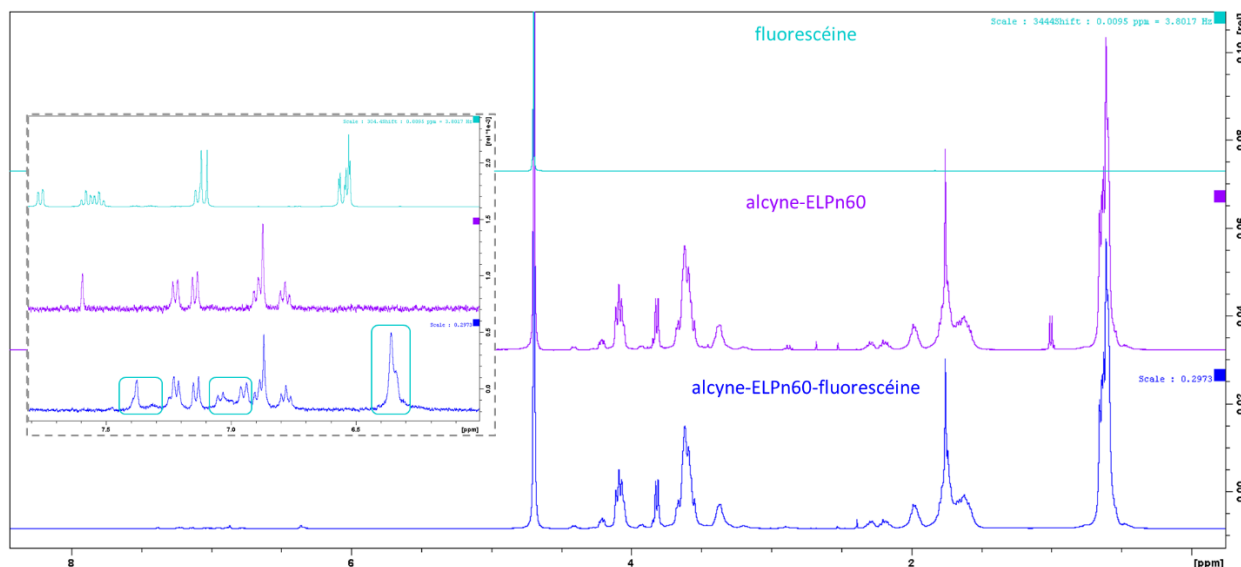


Figure IV-16 : Spectres RMN ^1H de l'espèce alcyne-ELPn60-fluorescéine (bleu) et de ses précurseurs l'ELP-alcyne (violet) et la fluorescéine (cyan) (400 MHz). Encart : zoom sur les protons aromatiques. Encadrés cyan : signaux caractéristiques des protons de la fluorescéine.

En revanche, l'analyse RMN n'offre que peu de renseignements concernant les espèces DBCO-ELP-fluo (**Annexe IV-16**). En effet, cette fois encore, la présence du DBCO perturbe grandement la zone des protons aromatiques, rendant toute analyse quantitative impossible. Or, comme pour l'alcyne-ELPn60-fluorescéine, seule cette zone est impactée par le couplage avec le fluorophore. Cette analyse permet donc uniquement de vérifier l'état d'oxydation des méthionines après la fonctionnalisation. En l'occurrence, 3 méthionines ont été oxydées dans les exemples donnés ici. La seule exception notable est l'espèce DBCO-ELPn80-DY410 (**Figure IV-17**). Cette fois, les signaux de 2 protons aromatiques sont suffisamment déblindés pour être visibles. Leur intégration est légèrement supérieure à 1H, ce qui semble indiquer une fonctionnalisation totale. Quelques traces de DMF demeurent, indiquant une étape de dialyse trop courte, mais aucune oxydation n'est observable.

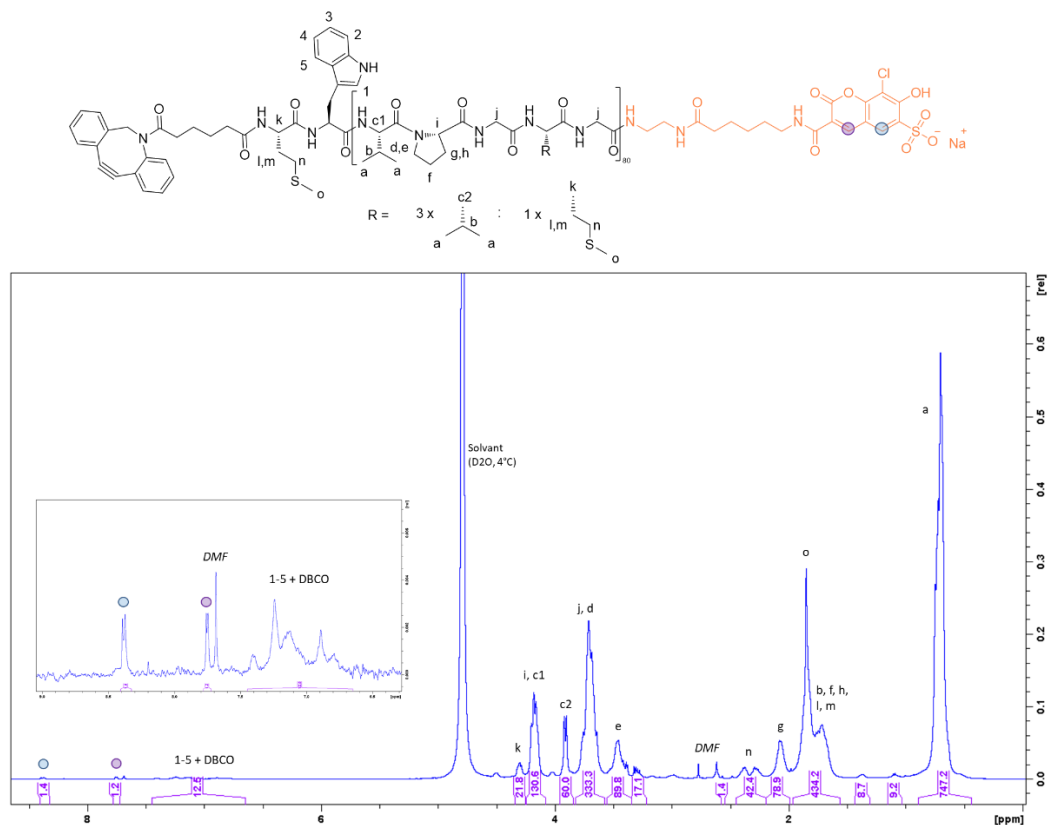


Figure IV-17 : Spectres RMN ^1H de l'espèce DBCO-ELPn80-DY410 (400 MHz). Encart : zoom sur les protons aromatiques. Cercles colorés : signaux pris en compte pour la détermination du taux de fonctionnalisation.

La RMN ne fournissant que peu d'informations, une caractérisation par spectrométrie de masse a été effectuée. Les spectres sont donnés en **Figure IV-18** et un zoom sur la zone d'intérêt pour chacun est présenté en **Annexe IV-17**. Bien que les analyses RMN et de fluorescence semblent indiquer une fonctionnalisation effective de l'alcyne-ELPn60, le spectre MALDI (**A**) ne présente aucun décalage du pic moléculaire vers les plus hauts m/z . Si couplage il y a, celui-ci est donc non covalent. Pour les autres fluorophores (**B**, **C**, **D**), une augmentation du m/z est constatée, en cohérence avec les valeurs théoriques. Dans le cas du composé DBCO-ELPn80-DY700, la présence d'un deuxième pic indique une fonctionnalisation non totale. Son taux est estimé à 70%. Ces résultats sont résumés en **Tableau IV-3**.

Tableau IV-3 : Tableau récapitulatif des résultats de MALDI. La masse molaire théorique indiquée ici correspond à la somme de la valeur expérimentale du m/z de l'espèce non fonctionnalisée et du m/z théorique lié à l'ajout du fluorophore.

Espèce	Masse molaire théorique (g/mol)	Masse molaire expérimentale (g/mol)	Fonctionnalisation
Alcyne-ELPn60-fluorescéine	26042 (25550 + 492)	25553	échec
DBCO-ELPn80-rhodamine	34635 (34120 + 515)	34651	succès
DBCO-ELPn80-DY700	34956 (34209+747)	34187 34919	$\eta \approx 70\%$
DBCO-ELPn80-DY410	34608 (34133 + 475)	34603	succès

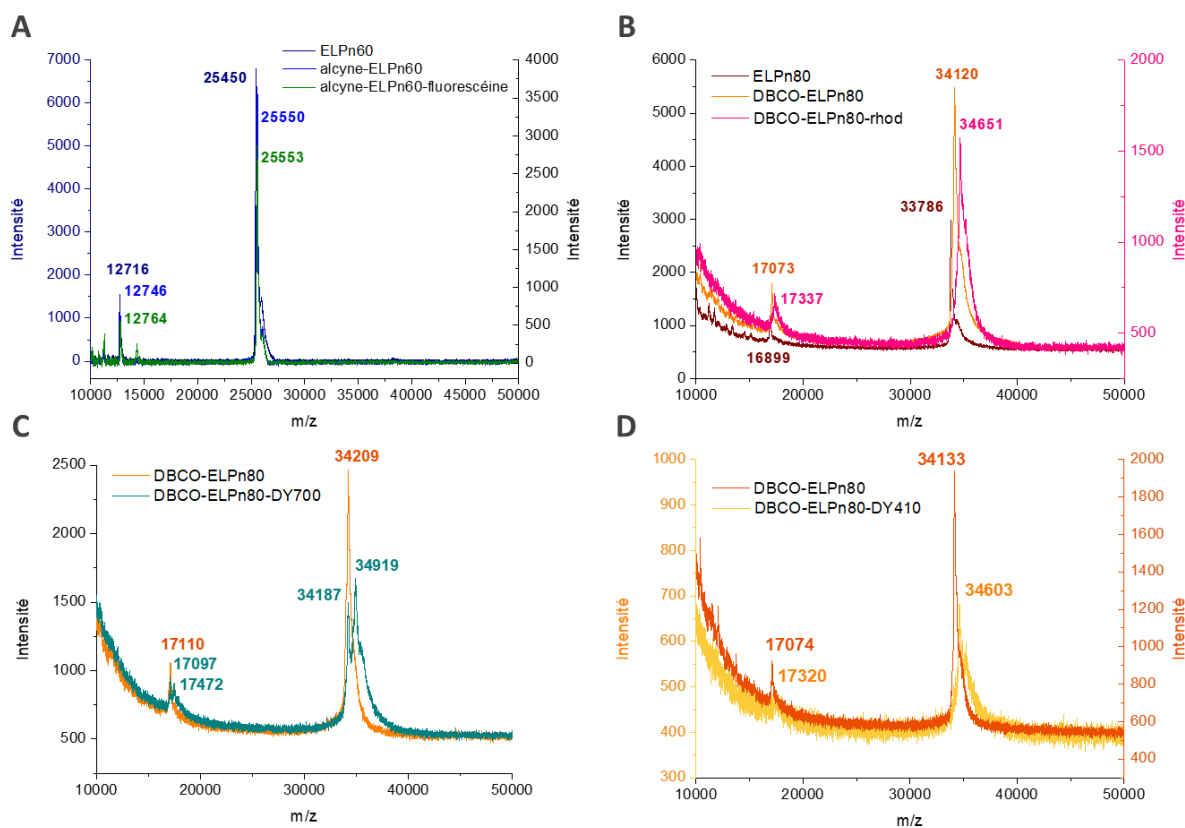


Figure IV-18 : Spectres de masse MALDI des composés alcyne-ELPn60 (A) et DBCO-ELPn80 (B, C, D) avant et après fonctionnalisation de l'extrémité C-terminale par différents fluorophores.

A : alcyne-ELPn60-fluoresceine. B : DBCO-ELPn80-rhodamine. $\Delta_{th} m/z = 514$ g/mol. $\Delta_{exp} m/z = 531$ g/mol. C : DBCO-ELPn80-DY700. $\Delta_{th} m/z = 747$ g/mol. $\Delta_{exp} m/z = 732$ g/mol. Estimation du taux de couplage $\approx 70\%$. D : DBCO-ELPn80-DY410. $\Delta_{th} m/z = 475$ g/mol. $\Delta_{exp} m/z = 470$ g/mol.

L'utilisation de la rhodamine TAMRA a donné lieu à des réactions secondaires inattendues. Les spectres MALDI des différents DBCO-ELPn80-rhodamine (DBCO-ELPn80-rhod) synthétisés sont présentés en **Figure IV-19**.

Tout d'abord, le protocole commun décrit plus haut a été appliqué avec succès à la fonctionnalisation d'espèces DBCO-ELP. Le spectre **A** présente ainsi un pic moléculaire unique avec un déplacement chimique conforme à la théorie ($\Delta_{th} m/z = 515$ g/mol).

Cependant, après un changement de fournisseur de la TAMRA, une altération des propriétés spectrales du composé fonctionnalisé a été constatée. L'étude du spectre MALDI de l'espèce DBCO-ELPn80-rhod montre l'apparition de pics multiples, écartés d'environ 515 g/mol. Il semble donc qu'une addition multiple de TAMRA se soit produite lors de la fonctionnalisation. Ce phénomène a également été constaté lors de la formation des espèces DBCO-ELPn60, n100-rhod (**Annexe IV-18**). Il ne s'agit donc pas d'un artefact propre à une seule synthèse.

L'ELP ne possédant qu'un seul acide carboxylique, à son extrémité C-terminale, une addition multi-site de la rhodamine le long de la chaîne semble peu probable. Une autre hypothèse pourrait toutefois expliquer ce phénomène (**Figure IV-20**). En effet, la TAMRA présente un acide carboxylique dans sa structure. Celui-ci est d'ordinaire peu réactif et peut participer à la conjugaison avec les cycles à proximité. Il a donc une influence sur les propriétés de fluorescence. Il est possible que dans le cas du 2^e fournisseur, la forme non cyclisée soit favorisée, permettant à l'acide carboxylique de réagir avec le groupement amine d'une autre TAMRA pour former une liaison amide. Ceci engendrerait une oligomérisation de la rhodamine en extrémité de chaîne de l'ELP. La participation de l'acide carboxylique à la conjugaison ayant disparue, les propriétés optiques seraient effectivement affectées.

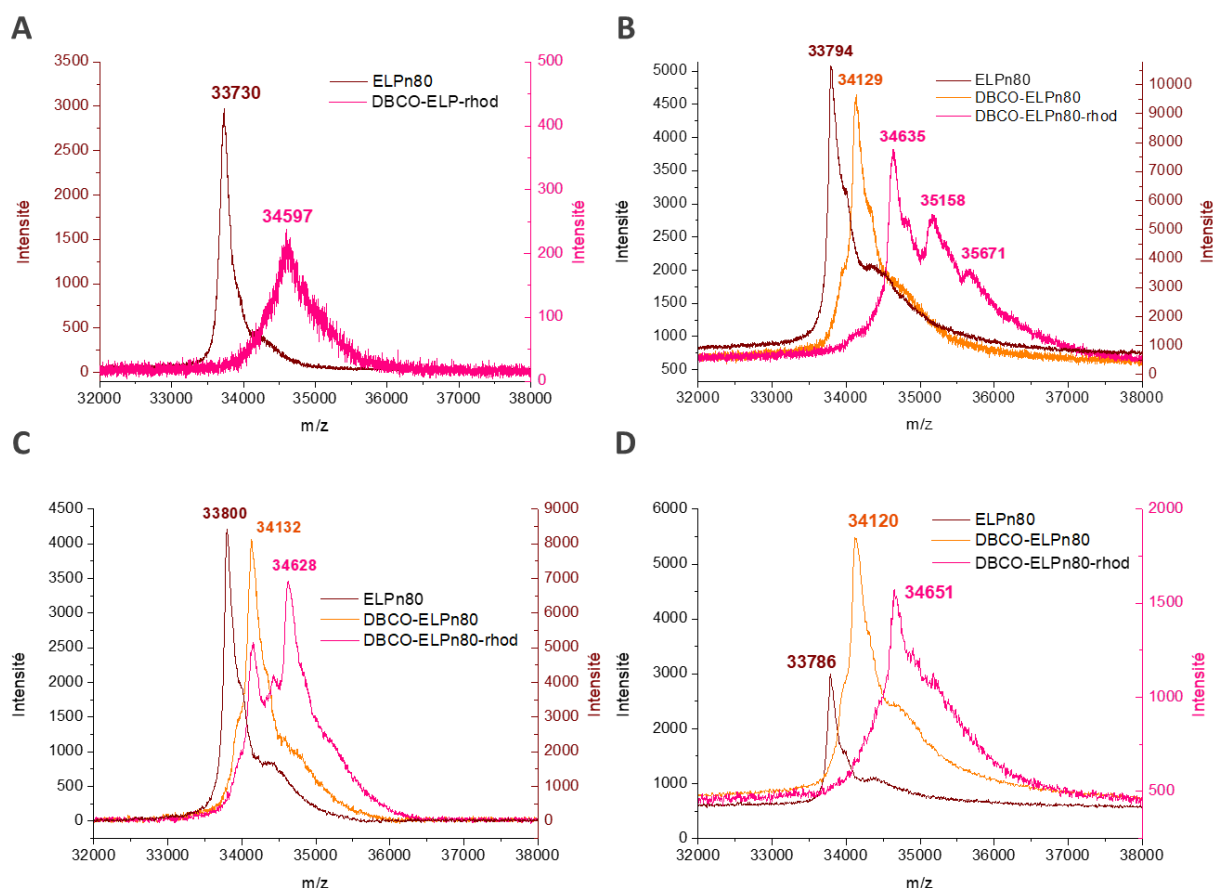


Figure IV-19 : Influence du changement de fournisseur de la rhodamine (TAMRA) sur la synthèse du composé DBCO-ELPn80-rhod. Extraits des spectres de masse MALDI du DBCO-ELPn80 avant et après addition de TAMRA en extrémité C-terminale. $\Delta_{th} m/z = 515$ g/mol. **A : Synthèse initiale.** Un seul pic avec un $\Delta_{exp} m/z \approx 551$ g/mol ($\Delta_{th} m/z$ DBCO = 315 g/mol). **B : Changement de fournisseur, protocole identique.** Pics multiples après fonctionnalisation. $\Delta_{exp} m/z$ entre chaque pic ≈ 500 g/mol. **C : Changement de protocole pour limiter l'ajout multiple.** Succès ($\Delta_{exp} m/z = 496$ g/mol) mais perte de l'aspect quantitatif de la fonctionnalisation. **D : Retour aux fournisseur et protocole initiaux.** Récupération d'une fonctionnalisation quantitative, sans ajout multiple ($\Delta_{exp} m/z = 531$ g/mol).

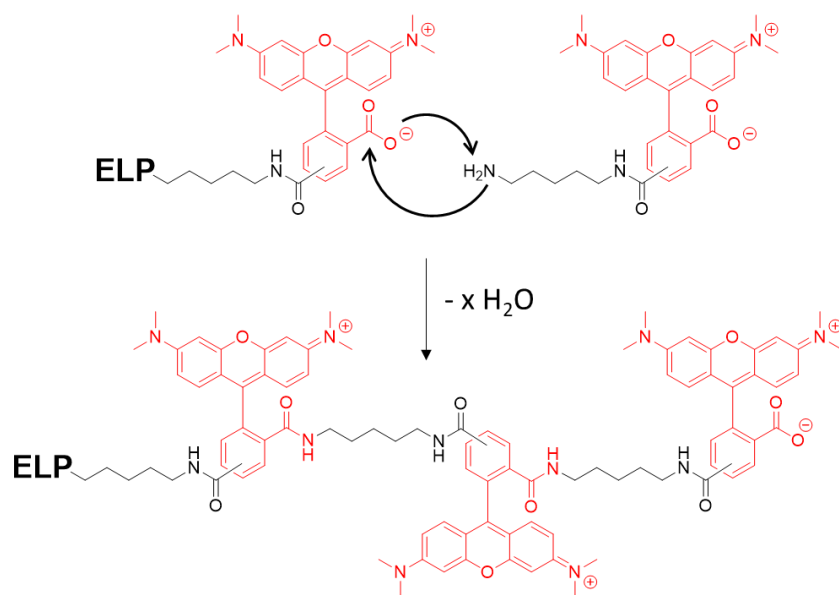


Figure IV-20 : Hypothèse de l'origine de l'ajout multiple de TAMRA sur l'extrémité C-terminale de l'ELP. Couplage entre l'amine primaire de la cadavérine et le groupement COO de la rhodamine, avec génération d' H_2O .

Afin d'éviter ce problème, le protocole a été légèrement modifié en diminuant les excès des composés TAMRA, DIPEA et HBTU, afin de limiter les réactions secondaires. Le résultat est donné par le spectre **C** de la **Figure IV-19**. Cette fois, il ne semble pas y avoir eu d'addition multiple de la rhodamine. Cependant, ces conditions de réaction entraînent une fonctionnalisation non quantitative ($\eta \approx 60\%$). Finalement, un retour aux fournisseur et protocole d'origine a permis de retrouver une fonctionnalisation simple et totale, confirmant l'influence du changement de fournisseur dans ce comportement problématique (spectre **D**).

IV.A.2.3. Synthèse des bioconjugués HA-ELP-fluorophore

À partir des blocs ELP fonctionnalisés par un fluorophore (fluo), des bioconjugués HA-ELP-fluo ont été synthétisés par CuAAC ou SPAAC, selon les protocoles décrits dans le **chapitre II**. Les espèces $HA_{4,6k}$ -ELPn60-fluorescéine ($\eta = 73\%$), HA-ELPn80-DY700 ($\eta \approx 67\%$), et $HA_{4,6k}$ -ELPn80-DY410 ($\eta = 87\%$) ont ainsi été obtenues relativement aisément. L'obtention de tous les bioconjugués de la librairie fonctionnalisés à la rhodamine s'est en revanche révélée un peu plus délicate, menant à des rendements plus faibles que lors de la synthèse de leurs équivalents non fluorescents ($\eta \approx 40\% - 75\%$).

Une caractérisation de la réaction de couplage et de l'efficacité de la purification a été réalisée par électrophorèse (SDS-PAGE). Un exemple pour la synthèse des bioconjugués HA-ELPn80-rhod est donné en **Figure IV-21**, et pour tous les autres en **Annexe IV-19**.

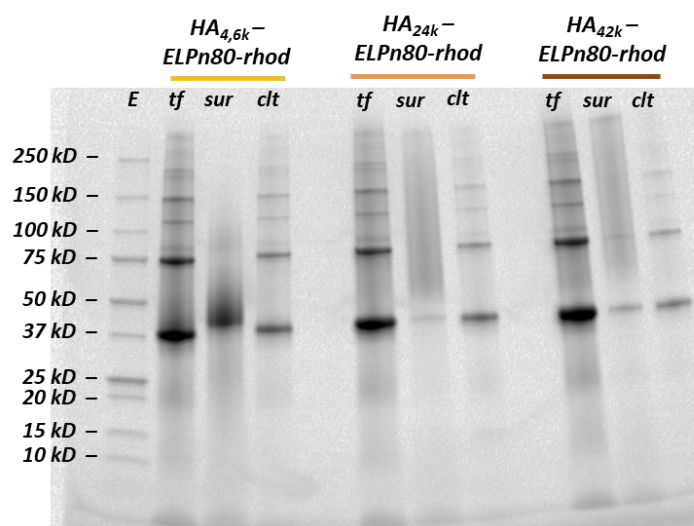


Figure IV-21 : Caractérisation par SDS-Page de la synthèse par SPAAC des bioconjugués HA-ELPn80-rhod. E : échelle de taille ; tf : milieu réactionnel avant purification ; sur : surnageant après purification ; clt : culot après purification.

Comme pour les bioconjugués non marqués, le prélèvement du milieu réactionnel en fin de réaction (tf) montre un mélange de bandes nettes correspondant à l'ELP-fluo seul et aux multimères non covalents et le smear caractéristique de la présence du bioconjugué. Après centrifugation à chaud et séparation du culot (clt) et du surnageant (sur), leur analyse confirme la bonne purification du bioconjugué, le smear n'étant visible que dans le surnageant. Il est parfois accompagné d'une légère bande, traduisant la présence d'un peu d'ELP-fluo seul. Cette purification moins aboutie concerne majoritairement les bioconjugués à base de HA_{42k} .

Les propriétés de thermosensibilité des bioconjugués ainsi formés ont été évaluées. La **Figure IV-22** rassemble les analyses effectuées par DLS pour les bioconjugués $H_{4,6k}$ -ELPn60-fluorescéine (A), $H_{4,6k}$ -ELPn80-rhodamine (B), et $H_{4,6k}$ -ELPn80-DY410 (C). Le DY700 ayant une absorbance importante dans une gamme de longueurs d'onde proche de celle du laser de la DLS (633 nm), l'analyse de l'espèce $H_{4,6k}$ -ELPn80-DY700 n'a pas été raisonnablement possible. Les évolutions de l'intensité diffusée et de la taille des objets en solution sont très similaires à celles du bioconjugué non fluorescent correspondant.

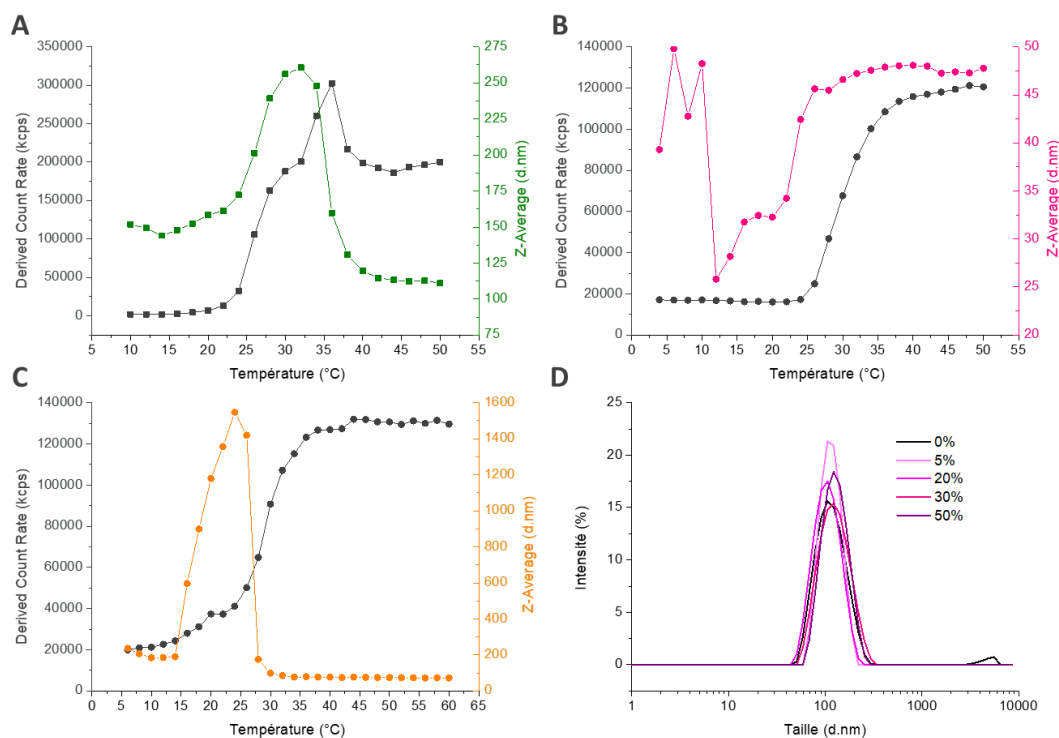


Figure IV-22 : Caractérisation par DLS de solutions de bioconjugués HA_{4,6k}-ELP-fluo. A, B, C : Évolution de l'intensité diffusée et de la taille des objets en solution en fonction de la température pour des bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn60-fluorescéine (A), HA_{4,6k}-ELPn80-rhodamine (B) et HA_{4,6k}-ELPn80-DY410 (C) (78 µM, PBS). D : Distribution de taille des nanoparticules formées à 50°C pour des mélanges de bioconjugués HA_{24k}-ELPn80 avec un pourcentage massique croissant de HA_{24k}-ELPn80-rhodamine (78 µM, PBS).

Une comparaison des valeurs de CMT et de tailles des nanoparticules est permise par le **Tableau IV-4**. La CMT des bioconjugués marqués est légèrement plus faible, probablement du fait de l'hydrophobie apportée par le fluorophore. Quant à la taille des nanoparticules formées, seule la fluorescéine semble avoir de l'influence en doublant leur diamètre.

Tableau IV-4 : Tableau récapitulatif des propriétés d'auto-assemblage de solutions de bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn60, n80-fluo (78 µM, PBS). Pour le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80, la CMT et son écart-type sont ceux déterminés au **chapitre III**.

Bioconjugué	Fluorophore	Masse molaire (g/mol)	CMT (°C)	Taille des nanoparticules (d.nm)
HA _{4,6k} - ELPn60 (CuAAC)	Aucun	30160	44 (± 1)	49
	Fluoresceine	30540	41 (± 1)	106
HA _{4,6k} - ELPn80 (SPAAC)	Aucun	38700	31 (± 0,7)	48
	Rhodamine (TAMRA)	39200	27 (± 1)	47
	DY410	32175	29 (± 1)	50

Le co-assemblage des bioconjugués fonctionnalisés avec leurs équivalents non marqués a été effectué, avec des pourcentages divers en espèces fluorescentes. Un exemple est donné en **Figure IV-22 D** pour le bioconjugué HA_{24k}-ELPn80. Des mélanges de concentration totale 78 µM avec 0%, 5%, 20%, 30% et 50% (massique) du composé HA_{24k}-ELPn80-rhodamine ont été réalisés dans un tampon PBS et analysés par DLS à 50°C. Cette fois, une seule population est observée dans tous les cas, sans variation de taille ou de dispersité significative. Un co-assemblage efficace a donc lieu, quel que soit le pourcentage d'espèces marquées.

Par la suite, la notation HA_m-ELPn (x% fluo) se rapporte à un co-assemblage du bioconjugué HA_m-ELPn avec x% massique de l'espèce HA-ELP-fluo (**cf. p7**).

En collaboration avec les personnes responsables des essais *in vitro*, un premier choix s'est porté sur un mélange contenant 5% d'espèces marquées. Après quelques essais infructueux, les nanoparticules ainsi formées ont été réticulées afin d'éviter leur désassemblage. Les solutions obtenues pour toute la librairie de nanoparticules HA-ELP (5% rhodamine) réticulées sont présentées en **Figure IV-23**.

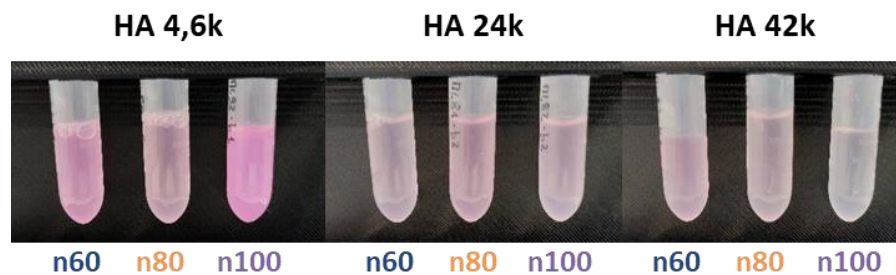


Figure IV-23 : Solutions de nanoparticules réticulées de HA-ELP (5% rhodamine) (78 μ M, PBS).

Bien qu'étant issus du même intermédiaire DBCO-ELP-rhodamine, une grande différence des propriétés optiques est observée pour les solutions de bioconjugués issus des HA_{4,6k}, HA_{24k} et HA_{42k}. Plus la masse molaire du bloc HA augmente et plus la solution devient pâle et peu fluorescente. Ceci s'est révélé très problématique lors des essais *in vitro*, la fluorescence des nanoparticules de HA_{24k}-ELP et HA_{42k}-ELP étant souvent trop faible pour pouvoir tirer des conclusions fiables des résultats observés.

Afin d'améliorer la fluorescence globale des nanoparticules et obtenir une intensité de fluorescence relativement comparable entre les différents échantillons, des pourcentages différents d'espèces marquées ont finalement été appliqués aux mélanges. Un exemple est donné en **Figure IV-24** pour deux séries de nanoparticules de HA-ELPn80-rhodamine (**A**) et HA-ELPn80-DY700 (**B**).

Malgré un pourcentage massique de bioconjugués fonctionnalisés à la rhodamine plus de deux fois plus élevé, l'intensité de fluorescence des nanoparticules de HA_{42k}-ELPn80 reste très inférieure à celle des nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn80. Cet effet est toujours présent, mais dans une moindre mesure lors de la fonctionnalisation avec le DY700.

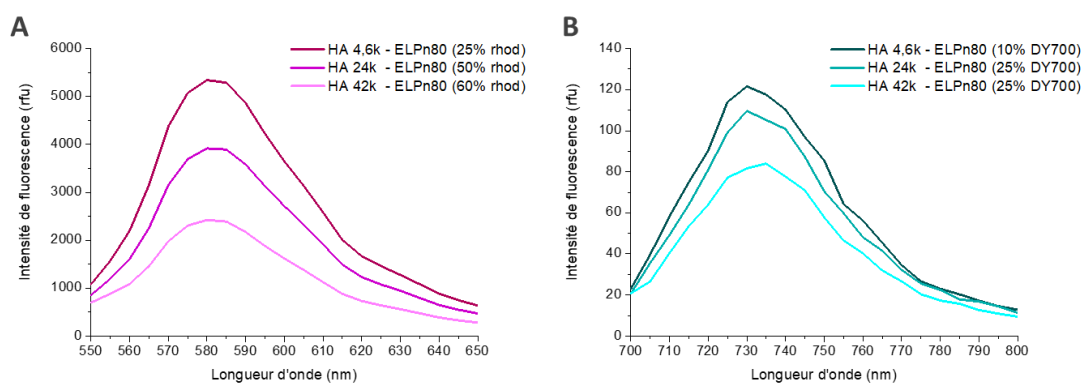


Figure IV-24 : Spectres de fluorescence en émission pour des solutions de nanoparticules réticulées formées par le co-assemblage d'HA-ELPn80 (78 μ M, PBS pH 7,4). A : HA_{4,6k}-ELPn80 (25% rhod), HA_{24k}-ELPn80 (50% rhod), HA_{42k}-ELPn80 (60% rhod) B : HA_{4,6k}-ELPn80 (10% DY700), HA_{24k}-ELPn80 (25% DY700), HA_{42k}-ELPn80 (25% DY700).

L'intermédiaire de départ DBCO-ELP-fluo étant identique, la différence se fait lors de la synthèse des bioconjugués par SPAAC. Son origine n'est malheureusement pas encore élucidée à ce jour. Par ailleurs, l'étape de réticulation ne semble pas être en cause. Des mesures de fluorescence avant et après ne montrent une diminution de l'intensité qu'après l'étape de dialyse (**Annexe IV-20**). Celle-ci est observée pour tous les composés.

Le marquage des bioconjugués par des fluorophores, nécessaire à l'évaluation biologique de notre système, s'est donc révélé assez laborieux, ce qui a malheureusement eu des répercussions sur la réalisation et la reproductibilité des expériences *in vitro*. En particulier, la rhodamine est à proscrire dans ce projet, tandis que le DY700 et DY410 font preuve d'une bonne efficacité.

IV.B. Étude à l'échelle du récepteur par SPR

La première évaluation biologique des bioconjugués HA-ELP a consisté en une étude par résonance plasmonique de surface (SPR) de l'interaction entre les nanoparticules et le récepteur CD44. Elle a été menée à l'Institut Européen de Chimie et Biologie (IECB) en collaboration avec le Dr. Carmelo Di Primo et Mme Laetitia Minder. Ce laboratoire se situant à Pessac, j'ai pu me rendre sur place pour participer aux expériences.

IV.B.1. Principe

Le principe de la SPR repose sur l'interaction entre une espèce en solution et un récepteur situé à la surface d'une puce à revêtement d'or fonctionnalisé. Il est schématisé plus précisément sur la **Figure IV-25**. Une des faces de la puce est recouverte de fonctions chimiques permettant l'immobilisation de molécules capables de reconnaître un ligand. Elle est insérée dans un système microfluidique, formant la partie supérieure des canaux, tandis qu'un prisme est appliqué de l'autre côté. Lorsqu'une lumière polarisée vient frapper la surface d'or à travers le prisme, une partie est absorbée et génère un plasmon de surface, tandis que l'autre est réfléchiée et récupérée par un capteur. Il est alors possible de tracer l'intensité lumineuse en fonction de l'angle de réflexion θ_r (graphe du haut). L'angle pour lequel l'intensité est minimale est dit "angle de résonance". Il correspond à l'angle pour lequel l'absorption par les plasmons de surface est maximale. La valeur de cet angle est directement liée aux propriétés de la surface, et en particulier à la masse qui y est adsorbée. Il est donc possible de visualiser les interactions entre les récepteurs fixés sur la surface et leurs ligands en suivant les variations de l'angle de résonance au cours du temps. Cela forme un sensorgramme (graphe du bas). L'ordonnée est exprimée en unités de résonance (RU) : 1 RU correspondant à une variation de l'angle de résonance de 10^{-4} degrés et à une masse adsorbée de 1 pg/mm^2 .

De manière plus concrète : après insertion dans le système, la face de la puce portant les récepteurs se retrouve en contact avec des canaux microfluidiques dans lesquels circule en permanence un tampon. Le ligand n'étant pas présent, la masse adsorbée sur la surface ne change pas au cours du temps : la résonance reste stable et forme la ligne de base (situation 1). Lors de l'injection de l'échantillon, celui-ci s'intercale dans le flux de solvant, séparé de part et d'autre par une bulle d'air pour éviter tout phénomène de mixtion ou de dilution. À son passage sur la puce, les ligands qu'il contient (triangles rouges) interagissent avec les récepteurs (situation 2). Ce faisant, ils augmentent la masse totale adsorbée sur la surface. Cette modification se traduit par une variation de l'angle de résonance et une augmentation de la réponse. Lorsque tous les récepteurs sont saturés, aucun ligand ne peut plus s'ajouter sur la surface, il n'y a plus de modification et la résonance forme un plateau.

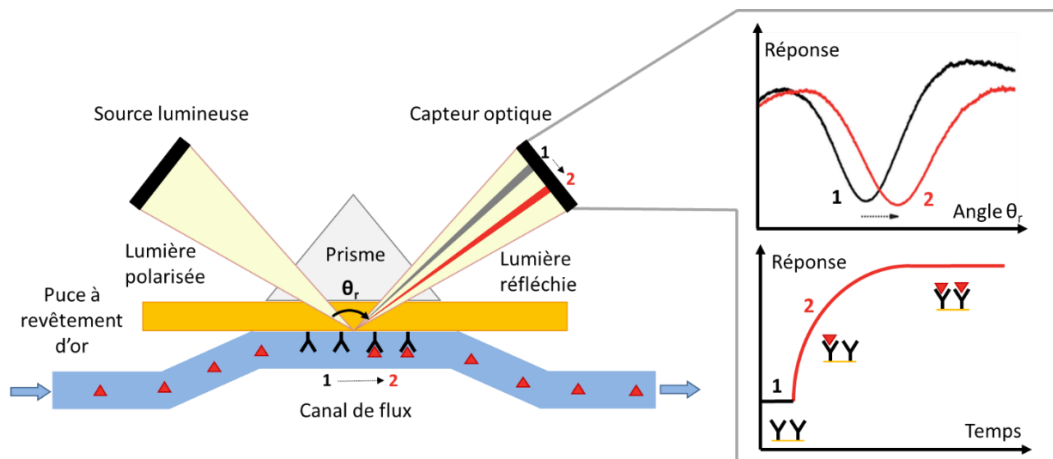


Figure IV-25 : Principe de fonctionnement d'une analyse par SPR, en absence (situation 1, noir) et en présence (situation 2, rouge) de ligands. Gauche : schéma de principe de l'analyse. Droite : Haut : évolution de l'intensité lumineuse en fonction de l'angle de réflexion selon la situation 1 ou 2. Bas : Sensorgramme traduisant l'évolution de la résonance au cours du temps. Adapté d'un schéma de L. Minder.

La **Figure IV-26** donne un exemple de sensorgramme typique obtenu lors d'une analyse de SPR.

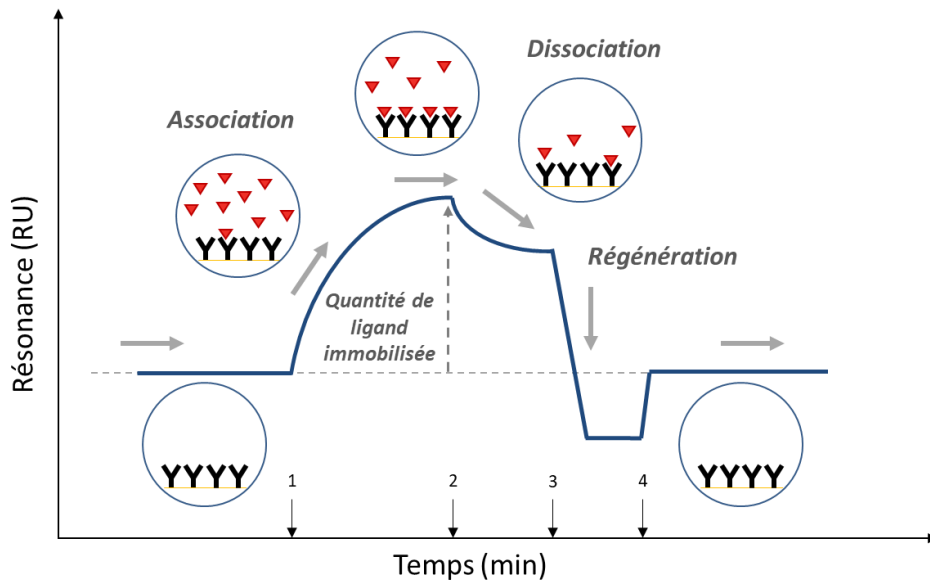


Figure IV-26 : Explication d'un sensorgramme classique de SPR. La résonance (variation de l'angle de résonance, en RU) est indiquée en fonction du temps. Les flèches indiquent les temps de changements de milieu : 1 : solvant → échantillon, 2 : échantillon → solvant, 3 : solvant → régénérant, 4 : régénérant → solvant. Les cercles présentent les différentes situations rencontrées au cours du temps, lors des phases d'association, de dissociation et de régénération.

Comme précédemment, la ligne de base correspond à la situation dans laquelle les récepteurs sur la surface ne sont en contact qu'avec le solvant de flux. Au temps 1, l'échantillon commence à passer dans les pistes microfluidiques, contre la puce. Les ligands interagissent alors avec les récepteurs, provoquant une augmentation de la résonance. Une fois la saturation atteinte, elle forme un plateau. Il est alors possible de déterminer la quantité de ligand adsorbé sur la surface *via* les récepteurs. Au temps 2, l'échantillon fait à nouveau place au flux de solvant. Une phase de dissociation a alors lieu, au cours de laquelle les ligands se séparent des récepteurs et sont éliminés dans le flux. La résonance diminue alors en conséquence. Une fois l'analyse terminée (temps 3), un tampon régénérant est injecté pour forcer la dissociation des ligands restés sur les récepteurs. Ce tampon étant différent du solvant de flux, les propriétés de la surface sont affectées et la résonance peut diminuer sous son niveau initial. À la fin de la phase de régénération (temps 4), le régénérant est remplacé par le solvant de flux, et les récepteurs ne sont plus en interaction avec des ligands. La situation est la même qu'au début, la résonance retourne donc à la ligne de base. Il est alors possible de recommencer ce cycle avec un autre échantillon.

L'étude de la cinétique des phases d'association et de dissociation permet de déterminer les constantes de vitesse d'association k_a et de dissociation k_d . Il est alors possible d'en déduire la valeur de la constante de dissociation K_D qui est égale au rapport k_d/k_a et qui caractérise de manière quantitative l'affinité du ligand pour son récepteur.

La nature de la surface et la façon dont sont arrangés les récepteurs sont primordiales pour le bon fonctionnement de cette analyse. Il existe donc plusieurs types de puces, permettant des fonctionnalisations différentes de la surface. Dans ces travaux, deux d'entre elles ont été utilisées. Elles sont présentées en **Figure IV-27** et leurs avantages et inconvénients respectifs rassemblés dans le tableau en **Annexe IV-21**.

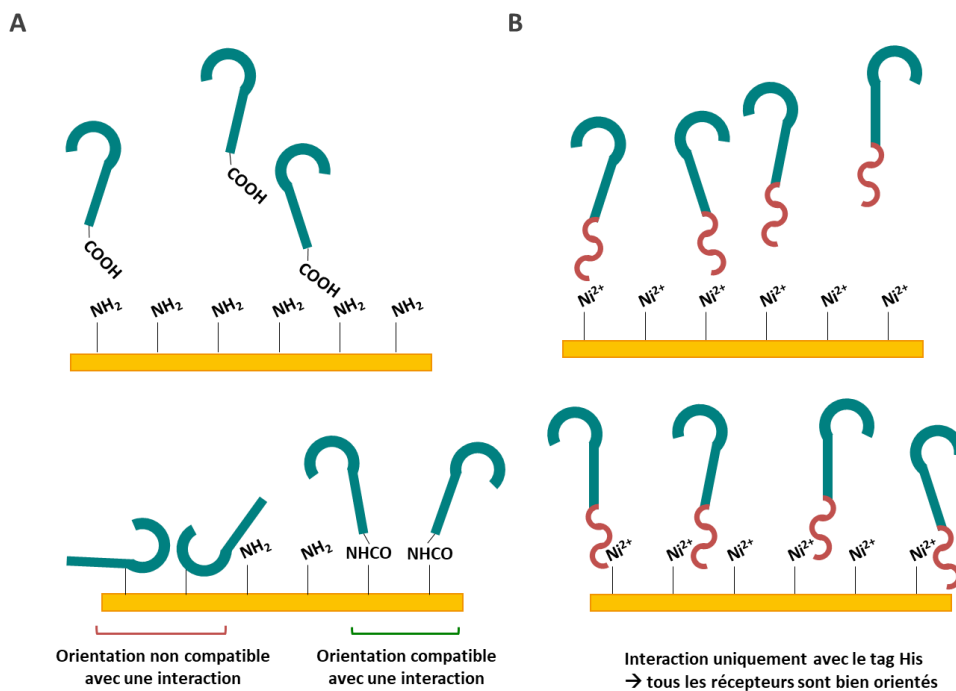


Figure IV-27 : Exemples de puces utilisées pour l'immobilisation du CD44. A : Puce CM5, fonctionnalisation amine, liaison covalente avec l'extrémité C-terminale du CD44. B : Puce NTA, fonctionnalisation Ni^{2+} , interaction non covalente entre le nickel et un tag Histidine ajouté à l'extrémité C-terminale du CD44.

La première est la puce standard CM5 (A). Sa surface d'or est fonctionnalisée avec du dextran carboxyméthylé, qui se déploie sur une longueur d'environ 100 nm au-dessus de la surface. Il est possible de coupler sur ce dextran toutes sortes de protéines porteuses de groupements amine, thiol, aldéhyde, ou acide carboxylique. Elle est donc adaptée à l'immobilisation d'un grand nombre de molécules biologiques. Ici, c'est la présence des amines qui permet l'immobilisation des récepteurs CD44 natifs, par formation d'un lien amide entre les amines de la surface et l'extrémité C-terminale. Cette réaction a lieu en présence d'EDC et de NHS, en général à pH acide pour favoriser l'adsorption du récepteur. Ce pH d'immobilisation a de l'importance : un pH trop élevé risque de limiter l'approche du CD44 de la surface, tandis qu'un pH trop faible peut endommager le récepteur. Un des désavantages majeurs de cette puce consiste en la formation d'une liaison covalente entre la surface et le récepteur. En effet, une fois l'étape d'immobilisation terminée, il est impossible d'effectuer des modifications. Si ceci est une bonne chose pour la reproductibilité à court terme, l'impossibilité de rafraichir la surface pose des problèmes à plus long terme, à mesure que les récepteurs s'endommagent. De même, il n'est pas possible de changer la densité de récepteurs en cours d'analyse. Enfin, des problèmes d'orientation des récepteurs peuvent survenir. En effet, s'ils possèdent d'autres groupements réactifs dans les conditions d'immobilisation, ils peuvent se fixer dans une orientation non compatible avec la reconnaissance d'un ligand. Ils sont alors perdus pour l'analyse. En revanche, cette puce présente l'avantage de ne pas nécessiter de modification du récepteur et de n'en utiliser que très peu.

Le deuxième type de puce utilisé est une puce NTA. Cette fois, la surface d'or est couverte avec du dextran carboxyméthylé porteur d'acide nitrilotriacétique (NTA). Celui-ci vient chélater des ions Ni^{2+} qui pourront ensuite interagir avec le récepteur, à condition qu'il présente un tag histidine. La liaison formée est donc non covalente et sa formation spécifiquement entre le nickel et le tag force tous les récepteurs à se positionner sur la surface avec la même orientation. Avec cette technique, l'immobilisation peut avoir lieu dans des conditions physiologiques, évitant ainsi d'endommager le récepteur. Après le passage de l'échantillon, la régénération se fait au moyen d'une injection d'EDTA qui vient chélater le nickel et le sépare de la surface. Contrairement aux puces CM5, cette phase élimine donc à la fois le ligand et le récepteur. Il faut ainsi à chaque cycle réactiver la surface avec du nickel et ré-immobiliser le récepteur, avant d'injecter l'échantillon.

Ceci prend donc plus de temps et consomme plus de récepteur. De même, il peut être difficile d'immobiliser rigoureusement la même quantité de récepteur à chaque cycle. La reproductibilité cycle-à-cycle est donc moindre comparée à celle obtenue avec les puces CM5. En revanche, cela permet d'éviter tous les problèmes de vieillissement de la surface et de tester plusieurs densités de récepteurs sans avoir à changer de puce.

Dans tous les cas, il est important de garder à l'esprit que la représentation schématique en deux dimensions des récepteurs fixés directement sur la surface d'or est une vision simplifiée. Dans la réalité, la présence du dextran permet une immobilisation du récepteur en 3 dimensions et une certaine souplesse. Une représentation plus exacte serait similaire à celle présentée en **Figure IV-28**. Attention toutefois, dans le cas du CD44, sa taille est inférieure à celle du dextran, il peut donc se trouver dans la matrice plutôt qu'en surface.

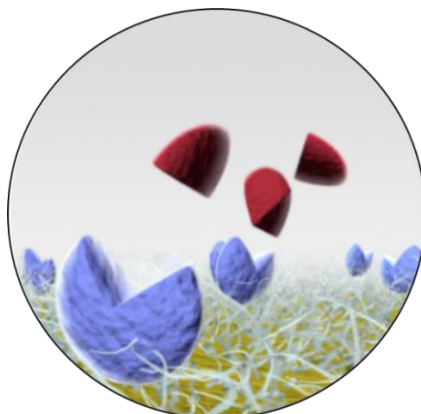


Figure IV-28 : Représentation de la surface d'une puce de SPR. Les récepteurs (bleu) sont en contact avec le dextran (blanc) et non pas directement avec la surface (jaune). Ils disposent ainsi d'une certaine liberté de mouvement pour interagir au mieux avec les ligands (rouge). (Reproduit de la documentation de Cityva, Biacore)

IV.B.2. Résultats

Les travaux précédemment menés par H. Duan *et al.* sur les nanoparticules de HA-PBLG incluaient une étude par SPR des interactions entre le CD44 et des HA libres de différentes tailles (5 kDa – 1000 kDa) ou une nanoparticule de HA-PBLG de 30 nm de diamètre.¹ Les résultats sont rappelés en **Figure IV-29**.

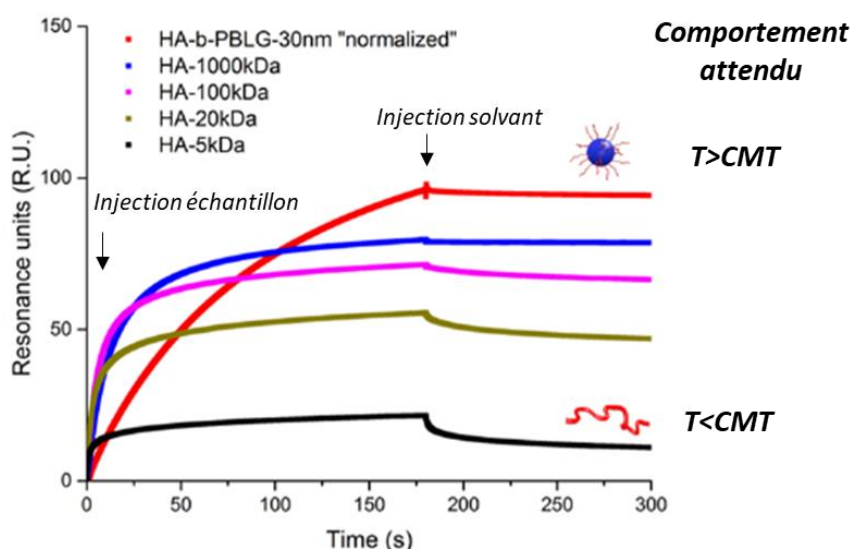


Figure IV-29 : Analyse par SPR de l'interaction entre le CD44 et des HA libres de différentes tailles ou une nanoparticule HA_{5k}-PBLG menée par H. Duan *et al.*¹ Dans ce dernier cas, la réponse a été normalisée pour éliminer la participation du PBLG. Le comportement attendu pour les bioconjugués HA-ELP étudiés ici est : similaire à celui du HA_{5k} libre en-dessous de la CMT, et similaire à celui de la nanoparticule HA_{5k}-PBLG au-dessus. Adapté de l'article de H. Duan *et al.*¹

La réponse de la nanoparticule a été normalisée par la masse du bloc PBLG afin d'éliminer sa contribution, ne faisant apparaître que celle du HA. Ces sensorgrammes montrent que l'affinité entre le HA libre et le CD44 augmente avec la masse molaire du HA, conformément à la théorie.

La valeur maximale atteinte par la résonance est plus élevée pour les HA les plus longs et la dissociation lors du retour au flux de solvant est plus faible. En revanche, la présentation du HA le plus court (5 kDa) à la surface d'une nanoparticule permet une interaction multivalente très forte, qui surpasse celles de tous les HA libres. L'affinité est tellement forte qu'aucune dissociation n'est observée. Comme indiqué dans l'introduction de ce manuscrit, le remplacement du PBLG par l'ELP est supposé permettre la modulation de l'affinité des bioconjugués pour le CD44 en agissant sur cette multivalence au moyen de la température. En-dessous de la CMT, le bioconjugué est sous forme de chaîne libre. Le HA ne peut alors former que des interactions monovalentes faibles. Le sensorgramme devrait donc être similaire à celui obtenu pour le HA_{5k} libre. En revanche, au-dessus de la CMT, l'auto-assemblage des bioconjugués devrait permettre de retrouver des interactions multivalentes fortes, et un sensorgramme similaire à celui des nanoparticules de HA-PBLG. Des expériences de SPR ont donc été réalisées afin de vérifier cette hypothèse.

IV.B.2.1. Nanoparticules non réticulées sur puce CM5 (NH₂)

Une première série de mesures a été réalisée avec les bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn80 obtenus par CuAAC et SPAAC. Un bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80_{ox} pour lequel les méthionines ont été oxydées en sulfoxides a servi de référence "non thermosensible" (dans la gamme de températures appliquée), et un dibloc PEG_{5k}-ELPn80 a été utilisé pour estimer les éventuelles interactions non spécifiques. Seuls les résultats du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 (SP) sont présentés ici. Un tampon PBS a été utilisé comme solvant de flux.

Des essais préliminaires sur la puce nue, sans CD44, ont montré l'absence d'interaction non spécifique entre les bioconjugués et la surface (**Annexe IV-22**). Le CD44 a ensuite été immobilisé sur la surface. L'appareil permet de contrôler le flux passant sur chacune des 4 pistes microfluidiques de la puce séparément. Il a donc été possible de moduler la densité de récepteurs immobilisés sur chaque piste en injectant des solutions de concentrations en CD44 différentes. En effet, une concentration importante traduit la présence d'un plus grand nombre de récepteurs disponibles pour s'accrocher sur la surface et permet donc d'atteindre une densité plus élevée. La piste 1 a toujours été gardée nue afin de servir de référence (**Annexe IV-23 A**).

La procédure d'immobilisation s'est déroulée à pH 4 comme suit : la surface des 4 pistes a été activée en simultané par l'injection d'une solution de composés EDC et NHS. Des solutions de concentrations en CD44 différentes ont ensuite été injectées de manière consécutive, chaque piste s'ouvrant et se fermant pour ne laisser passer qu'une seule d'entre elle, la piste 1 restant toujours fermée, et n'étant ainsi en contact qu'avec le PBS de flux. Un rinçage à l'éthanolamine a ensuite été effectué pour neutraliser les fonctions de la surface n'ayant pas réagi. Un exemple pour l'immobilisation sur les pistes 2 et 4 est donné en **Annexe IV-23 B**. La ligne de base correspond donc ici à la puce nue, sans récepteur. À la fin du cycle d'immobilisation, les pistes 2 et 4 ont une densité de CD44 faible (728 RU) et forte (2672 RU).

Une fois le CD44 immobilisé, les expériences d'interaction ligand-récepteur ont été menées à trois températures : 15°C (< CMT), 32°C (≈ CMT) et 37°C (> CMT), pour des solutions à 78 μM dans un tampon PBS identique au tampon de flux. Les résultats sont présentés en **Figure IV-30**.

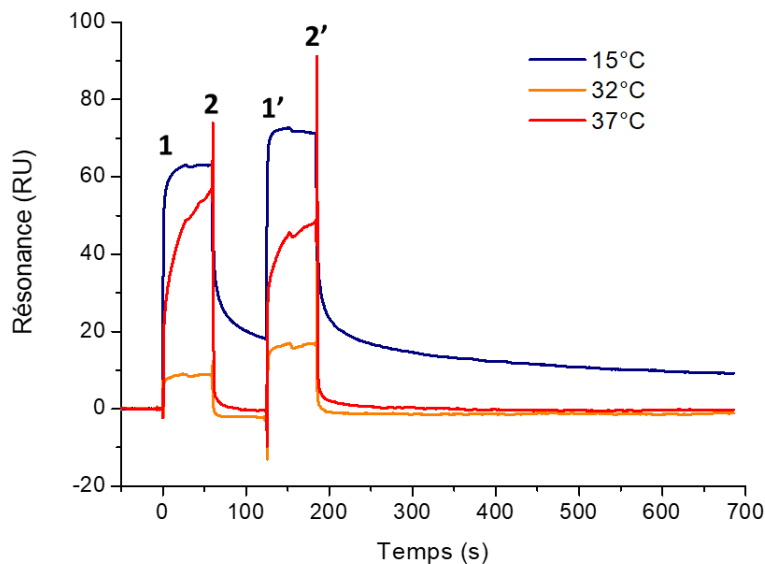


Figure IV-30 : Sensorgrammes de SPR obtenus pour une solution de bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 (SP) (78 μ M, PBS) à 15°C (< CMT), 32°C (\approx CMT), et 37°C (> CMT). Puce CM5, Piste 4 : 2672 RU de CD44. 1, 1' : début d'injection de l'échantillon, 2, 2' : injection du PBS de flux.

Deux cycles consécutifs d'injection de l'échantillon sont représentés. Ils sont composés d'une phase d'association lors du passage de l'échantillon (1, 1') et d'une phase de dissociation lors du retour au tampon de flux (2, 2'). La température semble avoir une influence sur la cinétique d'association. Elle est plus rapide à froid qu'à chaud, ce qui est cohérent avec l'expérience menée par H. Duan. Cependant, lors du retour au tampon de flux, la dissociation est très rapide et quasiment totale à toutes les températures, traduisant une interaction faible dans tous les cas. Paradoxalement, l'interaction semble même plus importante à froid qu'à chaud : la quantité de matière adsorbée sur la surface est plus importante et la dissociation plus lente. Ceci contredit totalement notre hypothèse de départ.

Des résultats similaires ont été obtenus pour les nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn80 (Cu), et HA_{4,6k}-ELPn80_{ox} (Cu) (Annexe IV-25 A, B). Le PEG_{5k}-ELPn80 (Cu) montre une faible interaction non spécifique sur la piste d'analyse à 32°C et sur la piste de référence à 37°C (valeur négative) (Annexe IV-25 C). Une vérification a donc été faite avec des nanoparticules HA-PBLG à 32°C. Les résultats, donnés en Annexe IV-24, sont conformes à ceux précédemment publiés. Le problème était donc bien dû aux bioconjugués HA-ELP.

Il est cependant possible d'avancer une explication : dans le chapitre III, l'influence de la concentration sur l'auto-assemblage a été démontrée. La CMT augmentant avec la dilution, il est possible d'induire le désassemblage à température constante en diminuant la concentration sous la CMC. Ce principe est illustré en Figure IV-31. Dans le cas de la SPR, la solution contenant le bioconjugué étant séparée du solvant de flux par une bulle d'air de chaque côté, la concentration reste à 78 μ M durant tout le passage de l'injection. À 37°C, les bioconjugués sont sous forme nanoparticulaire et interagissent avec la surface. Lors du retour au PBS de flux, la concentration en bioconjugué chute brutalement à zéro. La CMT devient supérieure à 37°C, et les nanoparticules se désassemblent. La majorité des bioconjugués n'est alors plus retenue à la surface et est évacuée dans le flux. La masse adsorbée sur la surface chute donc drastiquement. De plus, l'effet de multivalence étant perdu, l'interaction retrouve sa faiblesse et les bioconjugués associés au CD44 s'en dissocient.

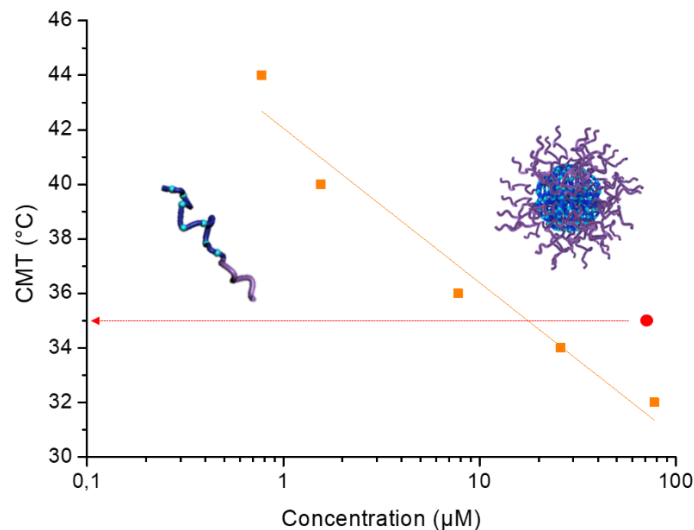


Figure IV-31 : Effet de la dilution sur l'état libre ou auto-assemblé des bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn80.

IV.B.2.2. Nanoparticules réticulées sur puce CM5 (NH₂)

Pour lutter contre ce problème et permettre une analyse fiable de l'effet de multivalence apporté par l'état auto-assemblé, une réticulation des nanoparticules a été décidée. Les bioconjugués de l'ensemble de la librairie ont ainsi été mis en solution à 78 µM dans un tampon PBS et réticulés à chaud selon le protocole décrit en IV.A.1.2.1. Après purification, les solutions de nanoparticules ainsi stabilisées ont été analysées par SPR sur une puce CM5 à 25°C. Les résultats, non normalisés, sont présentés en Figure IV-32 et Figure IV-33.

La Figure IV-32 montre l'influence de la composition du bioconjugué formant la nanoparticule sur l'affinité avec le CD44, pour une forte densité de celui-ci. Celle de la masse molaire de l'ELP est illustrée à gauche et celle de la taille du HA à droite. La première constatation est l'efficacité de la réticulation. Cette fois, au moment du retour au PBS de flux, aucun retour brutal à la ligne de base n'est observé. Les sensorgrammes se rapprochent beaucoup plus de celui obtenu avec les nanoparticules de HA-PBLG. Une analyse plus approfondie est donc possible.

A bloc HA constant, la résonance augmente avec la taille de l'ELP. Ceci est cohérent puisqu'un ELP plus long possède une masse plus grande. La masse adsorbée sur la surface lors de l'interaction d'un bioconjugué est donc plus importante. Ceci n'est en revanche pas constaté pour les bioconjugués possédant le HA de 42 kDa : dans ce cas, la valeur maximale de la résonance est relativement similaire d'un ELP à l'autre. D'autre part, les cinétiques d'association et de dissociation semblent assez proches pour les bioconjugués de même HA.

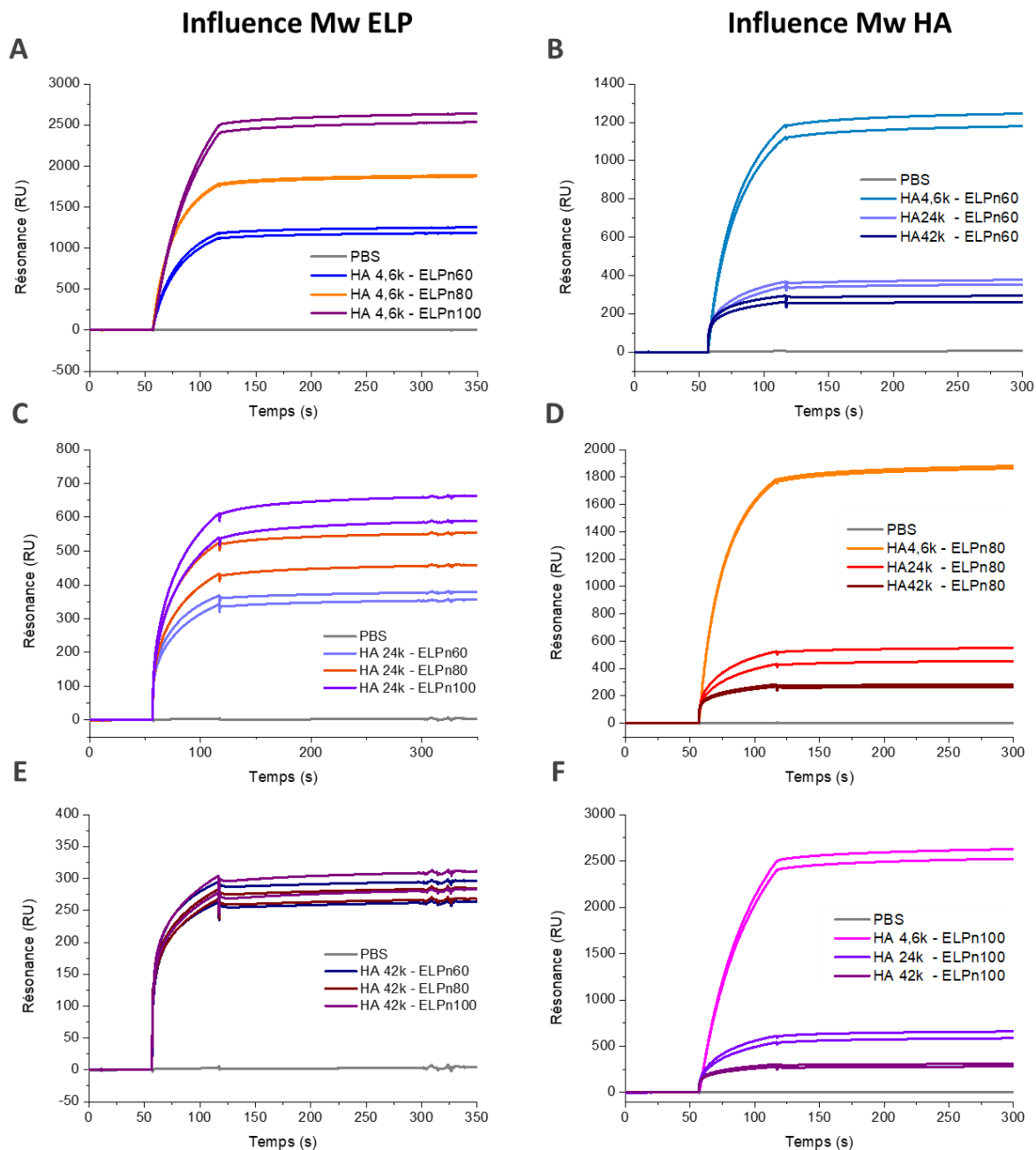


Figure IV-32 : Influence de la constitution des nanoparticules sur l'interaction avec le CD44. Sensorgrammes de SPR obtenus pour des solutions de nanoparticules réticulées à base des bioconjugués HA-ELP de la librairie (78 μ M, PBS pH 7,4). Puce CM5, 25°C, piste 3 : 3860 RU. Gauche : Variation de la taille de l'ELP pour chaque taille de HA : 4.6k (A), 24k (C), 42k (E). Droite : Variation de la taille du HA pour chaque ELP : n60 (B), n80 (D), n100 (F).

A l'inverse, les sensorgrammes diffèrent sensiblement pour les nanoparticules présentant des HA de masses molaires différentes. Tout d'abord, la résonance maximale suit un ordre inverse à celui attendu : elle est bien plus élevée pour le HA_{4,6k}, qui est le plus léger, et est la plus faible pour le HA_{42k}, malgré son plus haut poids moléculaire. L'injection des HA sous forme libre confirme pourtant la théorie : la résonance maximale augmente bien avec la masse molaire du HA (Annexe IV-26 A). L'une des hypothèses pouvant expliquer ce résultat surprenant tiendrait en un phénomène de gêne stérique. La taille des nanoparticules augmente en effet avec la masse molaire du HA (Tableau IV-1). Ainsi, à surface égale, un plus faible nombre de nanoparticules de HA_{42k}-ELP pourrait s'adsorber, comparé à celles de HA_{4,6k}-ELP. De plus, la petite taille de ces dernières pourrait leur permettre de pénétrer dans la matrice de dextran, atteignant ainsi un plus grand nombre de récepteurs CD44. La quantité supérieure de nanoparticules adsorbées compenserait alors la plus faible masse de chacune pour donner un signal plus intense.

Une autre différence entre les nanoparticules de bloc HA différents est à noter. À bloc ELP constant, la cinétique d'association diffère : elle est très rapide pour les nanoparticules de HA_{4,6k}-ELP et plus faible pour les HA_{24k}-ELP et HA_{42k}-ELP. Cette différence de comportement est encore plus visible à la dissociation : inexistante pour les nanoparticules de HA_{4,6k}-ELP, elle augmente avec la masse molaire du HA. Elle demeure cependant assez faible : de nombreuses nanoparticules restent adsorbées sur la surface par association avec le CD44. La présentation multivalente du HA permet en effet l'interaction de la nanoparticule avec plusieurs récepteurs, démultipliant ainsi sa force. Il peut également se produire un phénomène de roulement : en cas de dissociation de certains HA avec leurs CD44, d'autres sont capables de reformer des associations un peu plus loin. La nanoparticule reste donc toujours en contact avec un nombre suffisant de récepteurs pour la maintenir sur la surface.

Cette interaction très forte des nanoparticules réticulées est bien différente du comportement observé pour les bioconjugués libres. L'effet de multivalence apportée par la forme auto-assemblée et sa grande influence sur l'affinité du HA court pour le CD44 sont donc confirmés.

Les résultats présentés en **Figure IV-33** vont également dans ce sens. Cette fois, c'est l'influence de la densité de récepteurs sur l'affinité qui est évalué pour les nanoparticules de HA-ELPn80 et de HA-ELPn100 (**Annexe IV-27**). La méthode employée ici est la méthode SCK (Single Cycle Kinetics). Elle consiste en un seul cycle d'injections successives de 3 solutions du même échantillon à des concentrations croissantes, sans régénération entre chaque injection. L'objectif est de vérifier la saturation de la surface signe d'une interaction spécifique et de déterminer les constantes cinétiques k_a et k_d pour en déduire la constante d'équilibre de dissociation K_D .

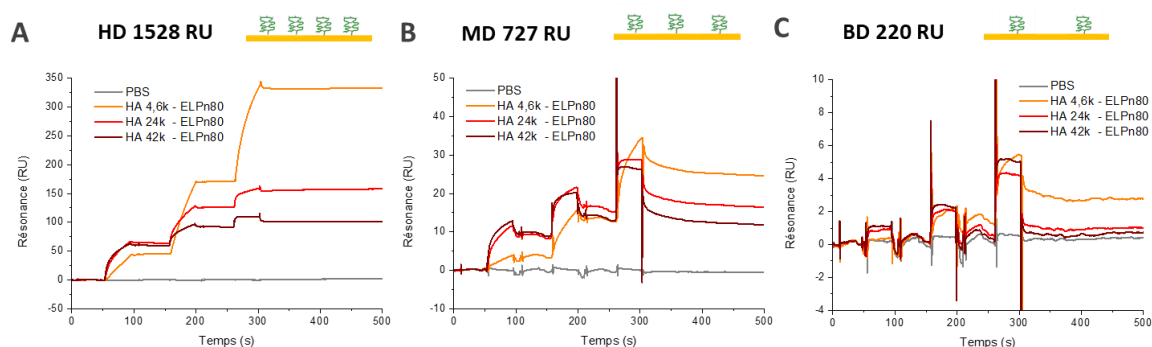


Figure IV-33 : Influence de la densité de CD44 sur l'interaction avec les nanoparticules. Sensorgrammes de SPR obtenus pour des solutions de nanoparticules réticulées à base des bioconjugués HA-ELPn80 (78 μ M, PBS pH 7,4). Méthode SCK : injections successives à 3 concentrations croissantes (1,6 μ M, 11 μ M, 78 μ M). HD : haute densité de CD44 immobilisé (1528 RU), MD : densité médium (727 RU), BD : basse densité (220 RU).

De façon qualitative, les sensorgrammes obtenus pour les nanoparticules à haute densité de CD44 (**A**) sont très similaires à ceux détaillés plus haut. Ils n'atteignent pas encore la saturation. A densité moyenne (**B**), l'interaction semble plus faible et la dissociation plus importante et plus rapide : elle est cette fois également observée pour les nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn80. Cette tendance se confirme à faible densité (**C**) : au retour du flux de PBS, la dissociation est très rapide et quasi-totale pour les nanoparticules de HA_{24k}-ELPn80 et HA_{42k}-ELPn80.

Ceci s'explique à nouveau par la notion de multivalence. À mesure que la densité de récepteurs diminue, le nombre de liaisons HA-CD44 par nanoparticule décroît également. Finalement, des récepteurs trop éloignés les uns des autres ne permettent plus que des interactions monovalentes. Les nanoparticules se comportent alors comme les bioconjugués libres. Ce phénomène est particulièrement intéressant car cela prouve à nouveau l'effet de multivalence sur l'affinité, cette fois en agissant non plus sur la quantité de ligands mais sur celle du récepteur. D'un point de vue applicatif, cela laisse également espérer une bonne efficacité de ciblage lors des études *in vitro* et *in vivo*. En effet, l'affinité des nanoparticules serait plus importante pour les cellules surexprimant le CD44 à leur surface (forte densité), tandis que celles ne l'exprimant que peu seraient protégées par la faiblesse de l'interaction à basse densité.

Enfin, une caractérisation plus quantitative de cette affinité a été tentée, à travers la détermination de la constante d'affinité K_A . Pour cela, des modèles correspondant à des interactions de type 1:1 ont été appliqués aux sensorgrammes obtenus par la méthode SCK. La **Figure IV-34** reprend l'exemple précédent pour les nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn80 aux 3 densités de CD44. À haute densité, la très grande lenteur de la dissociation perturbe le modèle. L'attribution arbitraire de la valeur minimale de k_d mesurable par l'appareil donne un K_D de l'ordre du nanomolaire, non compatible avec les concentrations injectées. Cette valeur n'est donc pas fiable.

Pour les densités plus faibles, un autre problème se pose : la dissociation semble suivre deux cinétiques, respectivement rapide puis lente. Les modèles mathématiques appliqués interprètent cette cinétique rapide comme un saut d'indice de réfraction dû à un changement de solvant, ce qui n'est pas le cas. La valeur du R_{max} , correspondant à la valeur théorique de saturation, est inférieure aux valeurs atteintes expérimentalement. Le doute est donc permis quant à la fiabilité des valeurs des autres constantes déterminées par ce modèle. Une estimation quantitative de l'affinité semble impossible en l'état.

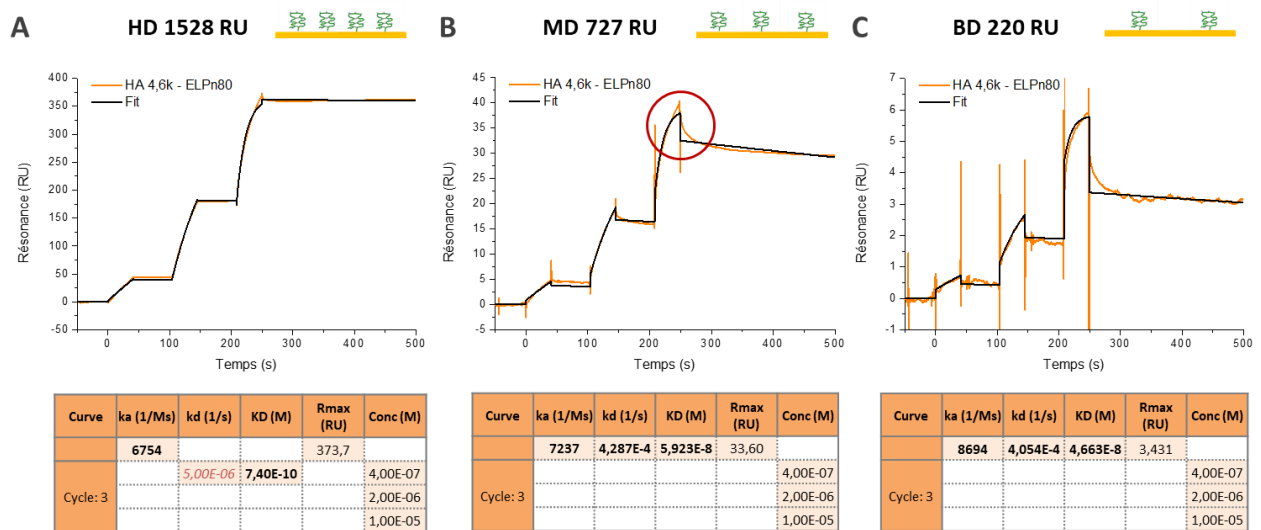


Figure IV-34 : Tentative de détermination des constantes d'association (k_a) et de dissociation (K_D) pour l'interaction entre le CD44 et des nanoparticules réticulées à base des bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn80 (78 μ M, PBS pH 7,4). Méthode SCK : injections successives à 3 concentrations croissantes (1,6 μ M, 11 μ M, 78 μ M). A : HD : haute densité de CD44 immobilisé (1528 RU). B : MD : densité médium (727 RU). Cercle rouge : problème de modèle mathématique : diminution brutale caractéristique d'un saut d'indice inexistant. C : BD : basse densité (220 RU). Mêmes conclusions qu'en B.

Cette série d'expériences a donc consisté en une étude détaillée du comportement des nanoparticules issues des bioconjugués de la librairie selon 3 critères principaux : la masse molaire du bloc ELP, celle du bloc HA, et la densité de récepteurs CD44. Elle a permis de confirmer l'effet de multivalence acquis par la présentation du HA sous forme nanoparticulaire et laisse espérer une bonne sélectivité du système envers les cellules CD44⁺. Cependant, la quantification de l'affinité s'est révélée compliquée. Par ailleurs, d'autres problèmes inhérents à l'utilisation de cette puce CM5 sont apparus. En particulier, la surface a montré de forts signes de vieillissement au cours de la série d'analyses. En **Annexe IV-26**, des comparaisons ont été faites entre l'affinité des nanoparticules et celle des HA libres sur la piste à haute densité de CD44, à la fin de la semaine d'analyse. L'allure des sensorgrammes est alors beaucoup plus proche de ceux obtenus en début de session sur les pistes à basse densité. La reproductibilité des résultats est donc difficile à prouver. Il a donc été décidé de refaire une série d'expériences sur une puce NTA.

IV.B.2.3. Nanoparticules réticulées sur puce NTA (Ni^{2+})

Une troisième session d'analyse de l'ensemble des nanoparticules de la librairie a donc été effectuée. Cette fois encore, des tests préliminaires sur la puce nue ont démontré l'absence d'interaction non spécifique pour les nanoparticules de HA-ELP et pour leurs références (HA libres, PEG_{5k}-ELPn80) (**Annexe IV-29**).

Les puces NTA permettant une régénération totale de la surface, le problème de son vieillissement a été éliminé. Cependant, la difficulté à immobiliser toujours la même quantité de CD44 impacte la reproductibilité cycle-à-cycle. En effet, la nécessité d'effectuer le protocole intégral d'immobilisation du récepteur à chaque injection d'échantillon a considérablement allongé le temps d'analyse. Afin de conserver des délais raisonnables, les 12 échantillons ont été séparés en 2 séries de 12h d'analyse chacune. Toutes les solutions ont donc été préparées à l'avance et stockées sur le rack durant tout le temps de la série. Malgré un maintien de l'enceinte à 10°C, il semble que le CD44 ait mal supporté ces conditions expérimentales. Au fur et à mesure des cycles, la quantité immobilisée a ainsi été de plus en plus faible, comme illustré sur les sensorgrammes de la **Figure IV-35**. Ici, chaque ligne correspond à un cycle, et chaque couleur à un échantillon. Entre le premier échantillon (magenta) et le dernier (cyan), la quantité de CD44 immobilisée est divisée par deux, ce qui entraîne une diminution de la ligne de base. Celle-ci n'étant pas identique pour tous les bioconjugués, leur comparaison directe n'est pas possible. Une normalisation par la valeur de la ligne de base juste avant injection de l'échantillon a donc été nécessaire.

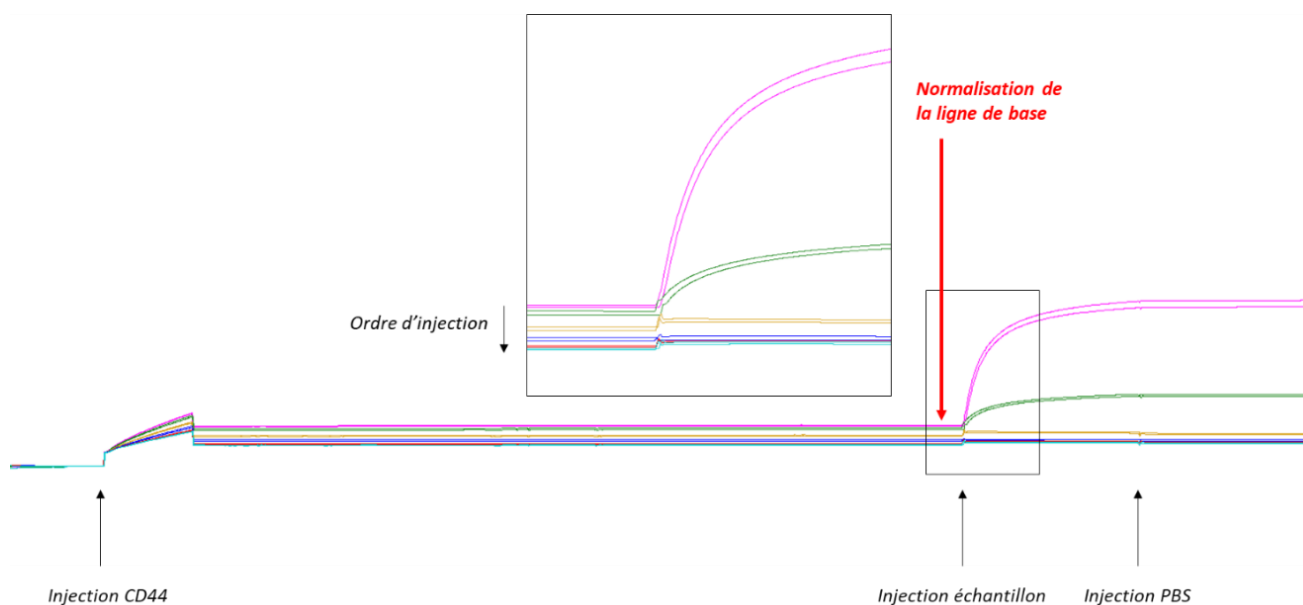


Figure IV-35 : Superposition des sensorgrammes de SPR pour une série d'expériences (passage de 6 échantillons). Pour chaque échantillon, représentation du cycle : immobilisation du CD44, (PBS de flux), injection de l'échantillon (PBS de flux). La régénération n'est pas montrée. Diminution de la ligne de base avant injection de l'échantillon : normalisation nécessaire.

Les tableaux en **Annexe IV-30** rassemblent les valeurs de ces lignes de base après immobilisation du CD44 pour tous les bioconjugués, lors des deux expériences menées. Chaque série se déroule dans le même ordre : HA_{4,6k}-ELP_A – HA_{24k}-ELP_A – HA_{42k}-ELP_A – HA_{4,6k}-ELP_B – HA_{24k}-ELP_B – HA_{42k}-ELP_B. La diminution de l'immobilisation du CD44 entre les échantillons HA_{4,6k}-ELP_A et HA_{42k}-ELP_B est nette. Cette normalisation, bien qu'indispensable, induit cependant un biais dans les résultats : en effet, le signal sur la piste 4 est divisé par un nombre supérieur de 2 ordres de grandeur à celui de la piste 2. Sa résonance maximale est donc artificiellement plus faible. Lors de l'interprétation des résultats selon la densité de CD44, seule la comparaison de l'allure des sensorgrammes a donc du sens.

La **Figure IV-36** résume les conclusions de ces expériences. L'ensemble des résultats est disponible en **Annexe IV-31**, **Annexe IV-32**, **Annexe IV-33**, **Annexe IV-34**, **Annexe IV-35**, et **Annexe IV-36**. Outre la normalisation par la ligne de base, les résultats ont également été normalisés par la masse molaire totale du bioconjugué, afin de ne conserver que les différences due à l'interaction.

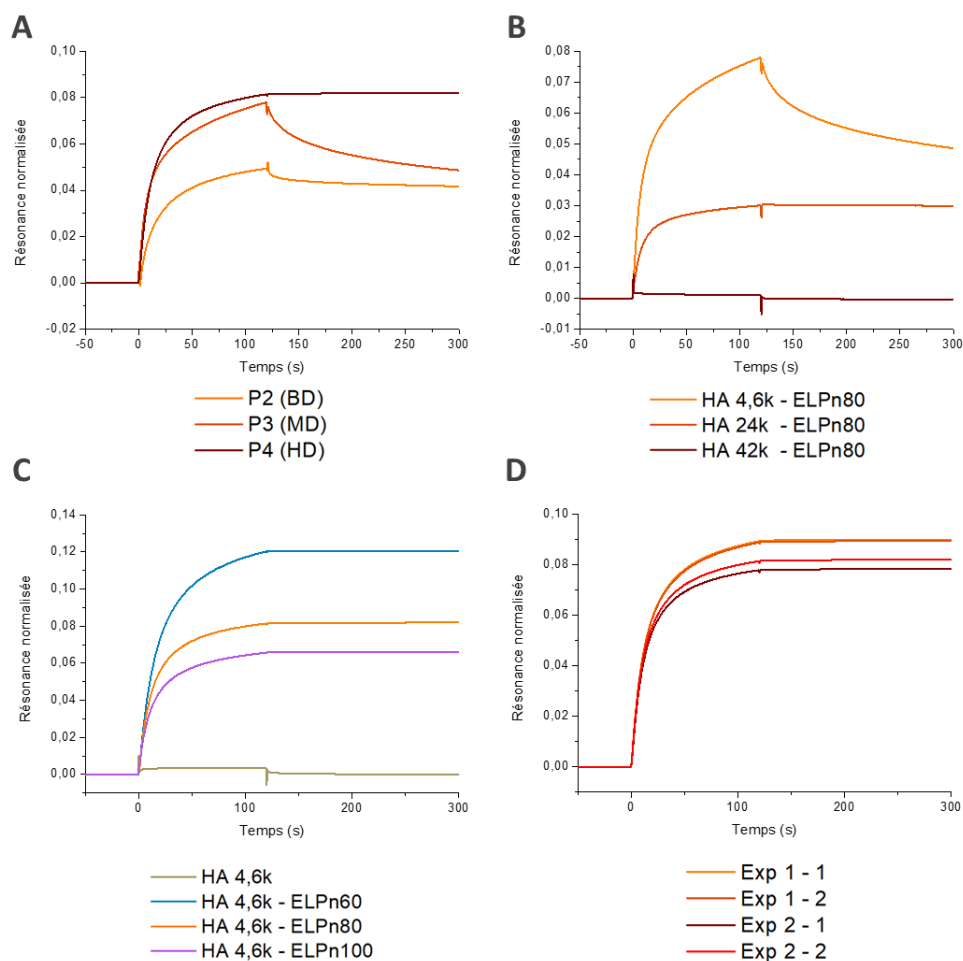


Figure IV-36 : Illustration des principaux résultats d'analyses SPR pour des nanoparticules réticulées à base de bioconjugués HA-ELP de la librairie (78 μ M, PBS pH 7,4). Puce NTA, 25°C. Résonance doublement normalisée par la valeur de la ligne de base avant injection et par la masse molaire du bioconjugué. A : Influence de la densité de CD44 sur son interaction avec une nanoparticule de HA_{4,6k}-ELPn80. P2 : basse densité (80 RU), P3 : densité moyenne (170 RU), P4 : haute densité (845 RU). B : Influence de la masse molaire du HA sur l'affinité entre le CD44 et une nanoparticule de HA-ELPn80. Piste 3 : densité moyenne (\approx 205 RU). C : Influence de la masse molaire de l'ELP sur l'affinité entre le CD44 et une nanoparticule de HA_{4,6k}-ELP. Piste 4 : haute densité (565-1090 RU). D : Reproductibilité entre les 4 analyses d'un même échantillon (2 cycles consécutifs par expérience) pour une nanoparticule de HA_{4,6k}-ELPn80. Piste 4 : haute densité (840-915 RU).

La **Figure IV-36 A** compare les résultats obtenus pour les nanoparticules de bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn80 selon la densité de récepteurs immobilisés. Conformément aux résultats obtenus avec la puce CM5, une haute densité permet une interaction multivalente forte et aucune dissociation n'est observée. La cinétique d'association est également plus rapide que pour des densités moindres. Si une dissociation totale n'est pas constatée à faible densité pour ce bioconjugué, elle l'est en revanche pour ceux possédant un bloc HA plus long (**Annexe IV-31**, **Annexe IV-34**).

En effet, à bloc ELP constant, l'importance de la variation de la taille du HA se confirme. Sur la **Figure IV-36 B**, le signal des nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn80 est bien plus élevé que ceux des HA_{24k}-ELPn80 et HA_{42k}-ELPn80, après normalisation par la masse du dibloc. L'interaction diminue donc avec l'augmentation de la taille du HA, en concordance avec les résultats obtenus lors de la session précédente, mais en contradiction avec le comportement du HA libre (**Annexe IV-32**, **Annexe IV-35**).

Cette fois encore, l'hypothèse stérique paraît la plus pertinente. Il est toutefois intéressant de noter que si la résonance maximale est bien inférieure pour les nanoparticules de HA_{24k}-ELPn80, celui-ci ne présente qu'une très faible dissociation à moyenne densité en CD44, contrairement à celles de HA_{4,6k}-ELPn80. Le HA plus long permet peut-être d'atteindre des récepteurs plus éloignés, augmentant ainsi le nombre de liaisons et diminuant les chances de dissociation totale de la nanoparticule de la surface.

Si la **Figure IV-36 C** semble suggérer une influence de la taille de l'ELP à bloc HA constant, avec une augmentation de la résonance maximum lors de la diminution de la longueur, ceci n'est toutefois pas confirmé avec les autres bioconjugués (**Annexe IV-33, Annexe IV-36**). De même, la seule variation de l'ELP ne semble pas impacter les cinétiques d'association et le comportement de dissociation des nanoparticules selon une tendance particulière.

Enfin, la reproductibilité est représentée en **Figure IV-36 D** pour le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 à haute densité. La normalisation par la ligne de base avant injection de l'échantillon permet bien de limiter la variabilité cycle-à-cycle au sein d'une même série. Par ailleurs, la reproductibilité d'une expérience à l'autre est également très raisonnable.

Ces trois sessions d'analyse par SPR ont donc permis de mieux caractériser l'interaction entre les nanoparticules de HA-ELP et le récepteur CD44.

L'effet de multivalence a été prouvé de deux manières différentes. Les nanoparticules réticulées, présentant de nombreux HA à leur surface, ont ainsi fait montre d'une interaction forte avec le CD44, quand les bioconjugués libres ne présentent qu'une interaction faible, avec une dissociation quasi-immédiate. De la même façon, la densité en récepteurs a également prouvé son importance. Une haute densité améliore l'affinité des nanoparticules jusqu'à réduire la dissociation à néant, tandis que ces dernières ne présentent que des interactions faibles à basse densité en CD44. Ceci est particulièrement prometteur pour la sélectivité envers les cellules CD44⁺.

La composition du bioconjugué semble aussi influencer sur l'affinité. Si la taille du bloc ELP est indifférente, une interaction bien plus forte est obtenue pour les bioconjugués possédant le HA le plus court. La limitation de la dissociation à densité moyenne pour les nanoparticules de HA_{24k}-ELP pourrait également se révéler intéressante.

Bien que l'évaluation de la reproductibilité ait été compliquée par le vieillissement de la surface des puces CM5, et la dégradation progressive du CD44 et de son immobilisation sur les puces NTA, la confirmation de ces conclusions sur ces deux puces de nature différente au cours de plusieurs expériences et de plusieurs sessions leur confère une certaine robustesse.

Au vu de ces résultats et de ceux de synthèse, le choix de candidat de référence s'est porté sur le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80.

IV.C. Étude à l'échelle de la cellule : expériences *in vitro*

En parallèle de l'étude de l'affinité des nanoparticules pour le récepteur CD44 par SPR, des expériences sur cellules ont été menées *in vitro* afin d'évaluer leurs propriétés de ciblage et de toxicité. Elles ont été réalisées à l'Institut des Biosciences Avancées (IAB) à Grenoble, par le Dr. Amandine Hurbin et Mme. Laetitia Vanwonderghem-Falcon.

IV.C.1. Travail préliminaire

Une étude préliminaire a été effectuée pour déterminer les lignées cellulaires les plus pertinentes. Le choix s'est finalement porté sur deux lignées de cellules de cancer du poumon non-à-petites-cellules (CPNPC) dont les profils d'expression des récepteurs CD44 et RHAMM sont indiqués en **Figure IV-37**. Les cellules A549 surexpriment fortement le CD44 pour une expression relativement faible du RHAMM (CD44⁺⁺/RHAMM^{+/-}). A l'inverse, les cellules H322 n'expriment que très peu le CD44 mais beaucoup plus le RHAMM (CD44⁻/RHAMM⁺⁺). Elles ont donc été sélectionnées comme références de surexpression du CD44 respectivement positive et négative.

Si les cellules A549 expriment principalement le CD44 standard, d'autres isoformes ont aussi été détectés, à savoir les CD44v3, CD44v6, et CD44v10. En particulier, l'isoforme CD44v6 est associé aux tissus prolifératifs et est un marqueur de caractère métastatique.

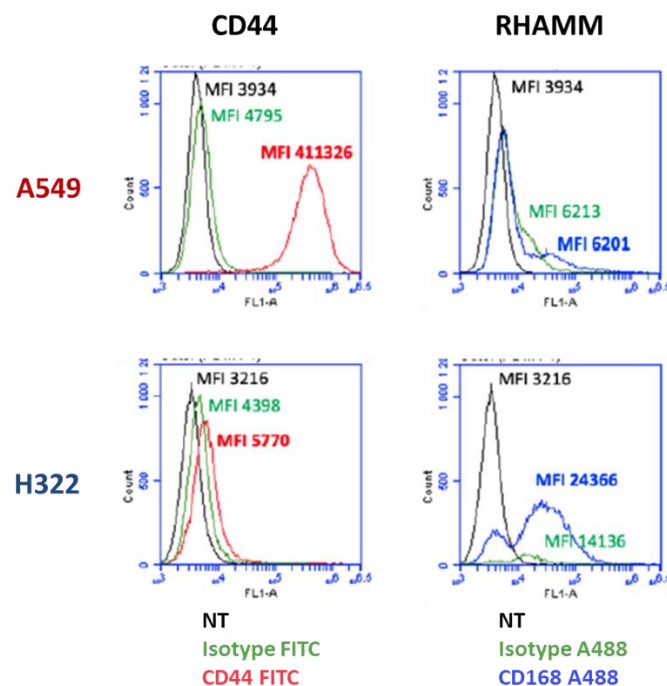


Figure IV-37 : Profils d'expression des hyaladhérines CD44 et RHAMM par les lignées cellulaires sélectionnées. A549 et H322 : cellules CPNPC (cancer du poumon non à petites cellules). A549 : profil CD44⁺⁺/RHAMM^{+/-}, H322 : profil CD44⁻ /RHAMM⁺⁺. MFI : intensité de fluorescence médiane.

Afin de visualiser les nanoparticules par microscopie ou lors des expériences de cytométrie en flux, les échantillons ont été préparés par co-assemblage de bioconjugués HA-ELP avec un certain pourcentage massique d'espèces HA-ELP-fluo, pour une concentration totale de 78 μ M dans un tampon PBS. La réticulation des nanoparticules s'étant révélée ici aussi nécessaire, elle a été effectuée dans les conditions les plus stériles possibles (travail sous PSM, stérilisation du matériel et du PBS etc.). En effet, il est essentiel d'éviter tout développement bactérien durant les analyses sur cellules. Or, une stérilisation post-synthèse par filtration entraînerait la perte des nanoparticules tandis que l'utilisation d'un autoclave ou de rayons UV risquerait de les endommager. Un suivi de l'étape de réticulation a été effectué par DLS, afin de s'assurer de la qualité des échantillons transmis à l'IAB.

IV.C.2. Étude d'affinité et de spécificité

Une évaluation de la capacité des nanoparticules de la librairie à cibler les cellules surexprimant le CD44 a donc été menée, la comparaison entre les cellules A549 et H322 devant permettre de vérifier la spécificité de ce ciblage. Elle a été réalisée sur des cellules adhérentes (en contact avec une surface) et en suspension (**Figure IV-38**).

Brièvement, les cellules ont été cultivées dans un milieu de culture complet puis incubées (1h, 37°C) soit avec du PBS (non traitées, NT) soit avec une solution de nanoparticules fluorescentes HA-ELP (78 μ M, PBS). Elles ont ensuite été rincées avec du PBS. Dans le cas des cellules adhérentes, leur récupération a nécessité l'utilisation de trypsine et une étape de rinçage supplémentaire.

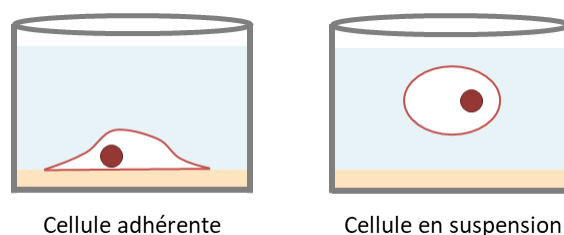


Figure IV-38 : Illustration des deux types de cellules testées. Les cellules adhérentes nécessitent d'être détachées du fond du puit avant analyse.

L'analyse a été réalisée par cytométrie en flux. Celle-ci consiste en la comptabilisation systématique des cellules fluorescentes et en la mesure de leur intensité de fluorescence. Deux facteurs peuvent ainsi être étudiés : le pourcentage de cellules fluorescentes et l'intensité de fluorescence médiane (MFI). Cette dernière est normalisée et exprimée comme le ratio de la MFI des cellules traitées sur celle des cellules non traitées (MFI/NT) afin de pouvoir comparer les lignées cellulaires.

Les résultats des études les plus représentatives sont détaillés ci-dessous. Un résumé de toutes les expériences menées et de leurs conclusions générales est donné en **Annexe IV-37** et **Annexe IV-38**.

IV.C.2.1. Nanoparticules non réticulées

Les premiers essais ont été réalisés avec des bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn60 (5% fluorescéine) sur des cellules adhérentes (**Figure IV-39 A**). Plusieurs protocoles ont été testés : la fluorescence a été mesurée sur les cellules non fixées à 37°C, et sur cellules fixées à 37°C et 25°C. Cette différence de température permet de comparer l'influence de l'état auto-assemblé ou non des bioconjugués sur l'interaction avec les cellules.

Une première constatation concerne l'absence de sélectivité des nanoparticules envers les cellules CD44⁺. Dans les trois situations testées, la fluorescence équivalente entre les cellules A549 (CD44⁺) et les cellules H322, pourtant CD44⁻. L'interaction est donc nettement non-spécifique.

Par ailleurs, si le ratio MFI/NT est très élevé pour les cellules non fixées, il chute drastiquement dès lors que le protocole de fixation est appliqué. Tout comme pour les analyses de SPR, cela peut s'expliquer par le manque de stabilité des nanoparticules auto-assemblées lors des étapes de rinçage. La concentration diminuant en-dessous de la CMC, elles se désassemblent et les bioconjugués sont évacués dans les tampons de rinçage. Ceci est appuyé par l'expérience à 25°C : la fluorescence après incubation et fixation est très faible, ce qui confirme la faible interaction du bioconjugué seul.

A ces résultats préliminaires très mitigés s'ajoute un problème lié à l'emploi de la fluorescéine. En effet, la fluorescence émise par celle-ci se trouve dans la gamme d'auto-fluorescence des cellules, ce qui perturbe les analyses. Le choix a donc été fait de la remplacer par la rhodamine.

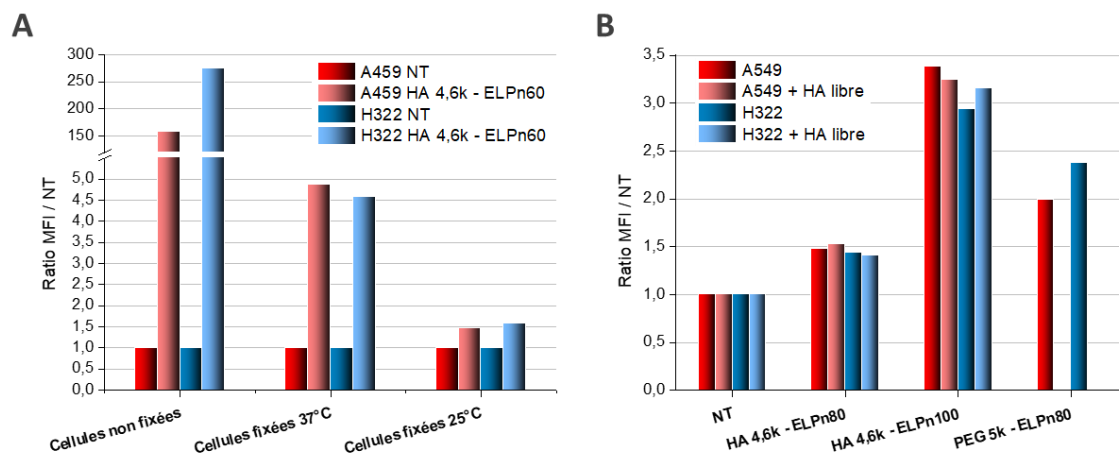


Figure IV-39 : Expériences préliminaires de cytométrie en flux sur des nanoparticules non réticulées. Comparaison des ratios MFI/NT. A : HA_{4,6k}-ELPn60 (5% fluorescéine). Plusieurs traitements des cellules adhérentes : non fixées et non rincées, ou fixées et rincées à 37°C ou 25°C. B : Co-assemblage de HA_{4,6k}-ELPn80, n100 ou PEG_{5k}-ELPn80 (5% rhodamine). Cellules fixées et rincées. Compétition avec du HA_{200k} libre (préincubation).

Une autre série de tests a donc été menée, toujours sur cellules adhérentes, mais avec des bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn80 et HA_{4,6k}-ELPn100 (5% rhodamine). Une expérience de compétition a également été réalisée afin de vérifier l'implication du CD44 dans l'interaction des nanoparticules avec les cellules. Pour cela, une étape de pré-incubation des cellules avec du HA_{200k} libre a été effectuée avant l'incubation avec les nanoparticules fluorescentes. Les résultats présentés en **Figure IV-39 B** ne sont pas plus concluants : le ratio MFI/NT est sensiblement équivalent quel que soit le profil d'expression du CD44 par les cellules et n'est pas impacté par la présence de HA libre. La fixation des bioconjugués à la surface des cellules n'est donc pas liée à l'interaction HA-CD44, et est purement non spécifique. Ceci est confirmé par les résultats obtenus avec l'espèce de référence PEG_{5k}-ELPn80.

Comme pour les analyses de SPR, le choix a donc été fait de réticuler les nanoparticules afin d'améliorer leur stabilité et d'éviter leur désassemblage au rinçage. D'autres compositions de bioconjugués, porteurs de HA plus longs (HA_{24k} et HA_{42k}), ont également été testées.

IV.C.2.1. Nanoparticules réticulées

Une nouvelle expérience a été menée sur des nanoparticules de HA_{24k}-ELP et HA_{42k}-ELP réticulées (5% rhodamine). Des nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn80 (5% rhodamine) ont également été préparées, à titre de référence. L'utilisation de la trypsine étant suspectée d'endommager les bioconjugués, les expériences ont été menées à la fois sur des cellules adhérentes et en suspension. Les résultats sont présentés en **Figure IV-40**, en pourcentage de cellules marquées. La principale observation de cette expérience est la fluorescence quasi nulle pour toutes les nanoparticules. Les cellules en suspension incubées avec les nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn80 présentent une faible fluorescence, plus importante pour les A549 (CD44⁺) que pour les H322 (CD44⁻). Une légère spécificité semble donc se dessiner, mais la faiblesse du pourcentage de cellules fluorescentes ne permet pas de tirer de conclusions solides. Les mêmes solutions testées sur les cellules adhérentes montrent un pourcentage de cellules marquées encore plus faible. La trypsine est donc bien à éviter.

Malgré plusieurs autres tentatives, comprenant notamment des changements de protocoles de synthèse, le retour à une rhodamine non polymérisable, et une augmentation du pourcentage d'espèces marquées au sein des co-assemblages, la fluorescence des nanoparticules de HA_{24k}-ELP et HA_{42k}-ELP fonctionnalisées à la rhodamine est malheureusement toujours demeurée trop faible pour en tirer des conclusions fiables (**Annexe IV-37**, **Annexe IV-38**, **Annexe IV-39**, **Annexe IV-41**).

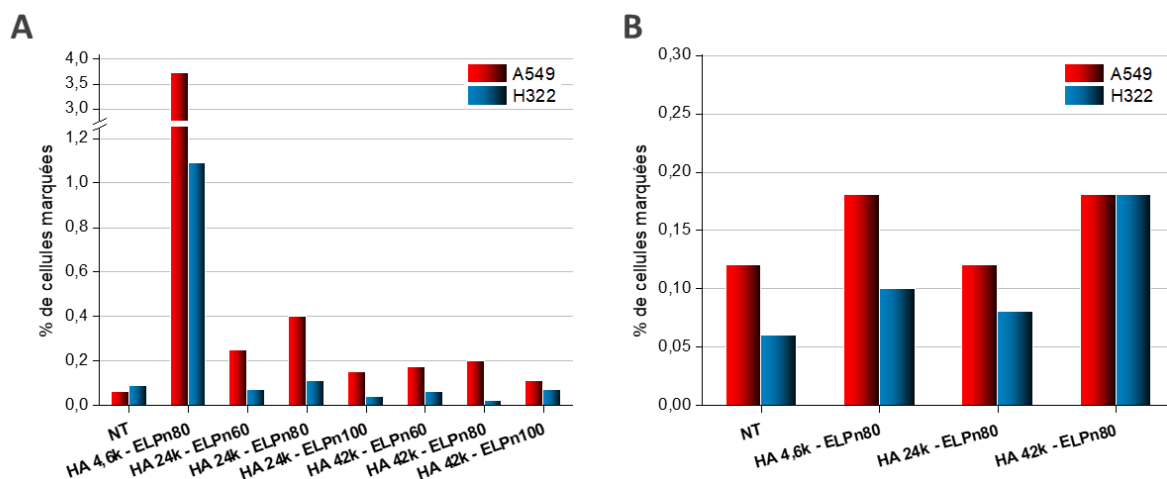


Figure IV-40 : Étude par cytométrie des nanoparticules réticulées de la librairie (sauf HA_{4,6k}-ELPn60,n100). Co-assemblage avec 5% de HA-ELP-rhodamine. Indication du % de cellules fluorescentes selon la nanoparticule. A : cellules en suspension. B : Cellules adhérentes. Utilisation de trypsine et rinçage supplémentaire.

L'analyse systématique de toute la librairie se révélant contre-productive, une focalisation a été faite sur deux séries, HA_{4,6k}-ELP et HA-ELPn80, permettant respectivement d'estimer l'influence de la taille de l'ELP et de celle du HA.

La **Figure IV-41** illustre les résultats obtenus après l'incubation de cellules en suspension avec des solutions de nanoparticules de HA_{4,6k}-ELP (20% rhodamine) (lot A). Un échantillon de nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn80 (30% rhodamine) (lot C) a également été analysé afin d'estimer l'influence de la quantité de fluorophore sur l'analyse.

Une première expérience, représentée en couleurs vives, a montré une nette amélioration du marquage des cellules et de la fluorescence moyenne. Une bonne sélectivité en faveur des cellules A549 (CD44⁺) est observée pour les nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn60 et HA_{4,6k}-ELPn80 (20%, lot A). En revanche, le pourcentage de cellules H322 marquées par les solutions de HA_{4,6k}-ELPn100 et HA_{4,6k}-ELPn80 (30%, lot C) est très élevé. La présence d'agrégats dans ces deux échantillons est suspectée de favoriser ce marquage non spécifique.

Une deuxième expérience a donc été effectuée après filtration de ces deux solutions. Celles de HA_{4,6k}-ELPn60 et HA_{4,6k}-ELPn80 (20%, lot A) ont été réutilisées sans modification, afin de servir de références. Les résultats sont indiqués sur la **Figure IV-41** en couleurs pastel. Le premier constat est que la fluorescence a été pratiquement intégralement perdue après filtration. Cela confirme l'impossibilité de filtrer après réticulation et donc la nécessité de préparer les solutions en conditions stériles. La reproductibilité des résultats pour les solutions de nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn60 et HA_{4,6k}-ELPn80 (20%, lot A) confirme cependant leur affinité préférentielle pour les cellules CD44⁺.

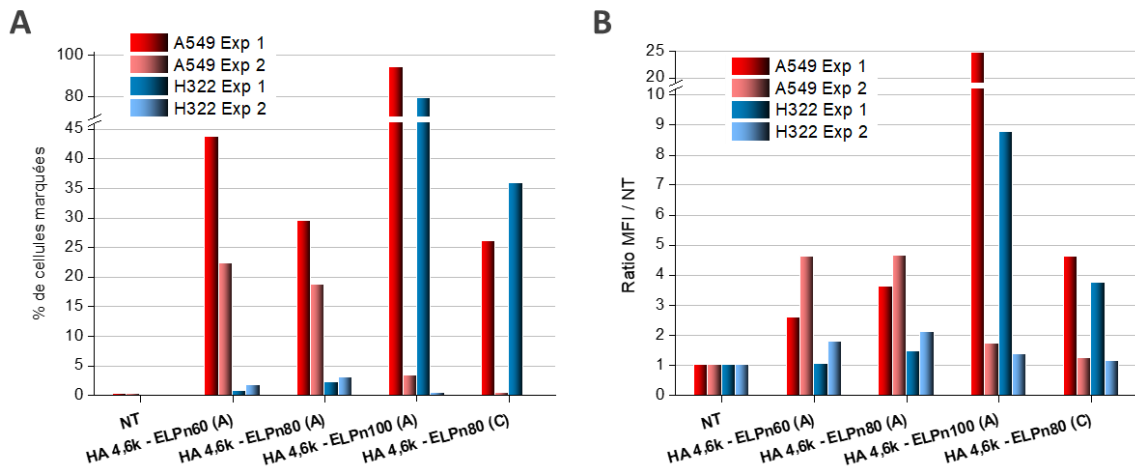


Figure IV-41 : Reproductibilité et effet de la filtration des nanoparticules sur les résultats de cytométrie pour des cellules en suspension. Étude de nanoparticules réticulées de HA_{4,6k}-ELPn60, n80, n100 (lot A : 20% rhodamine, lot C : 30% rhodamine). Indication du % de cellules fluorescentes (A) ou du ratio MFI/NT (B) selon la nanoparticule. Expérience 2 : filtration des solutions de HA_{4,6k}-ELPn100 (lot A) et HA_{4,6k}-ELPn80 (lot C), HA_{4,6k}-ELPn60, n80 (lot A) inchangées.

L'utilisation de la rhodamine ayant donné lieu à de nombreuses imprécisions, il a été décidé de confirmer les résultats précédents au moyen d'un autre fluorophore. Une série de bioconjugués HA-ELPn80-DY700 a donc été synthétisée et co-assemblée avec leurs équivalents non marqués. Les études de fluorescence préliminaires ayant montré des différences en fonction du bioconjugué formé, la composition des mélanges a été adaptée afin d'obtenir une intensité de fluorescence du même ordre de grandeur pour tous. Ainsi, le HA_{4,6k}-ELPn80 a été co-assemblé avec 10% de HA_{4,6k}-ELPn80-DY700, tandis que ce pourcentage a été élevé à 25% pour les deux autres composés.

Des expériences à différentes concentrations ont été réalisées, ainsi qu'une adaptation de protocole consistant à effectuer une étape de rinçage supplémentaire. Celle-ci ne pose plus de problème étant donnée la stabilisation des nanoparticules par réticulation. Les résultats sont présentés en **Figure IV-42** en fonction du pourcentage de cellules marquées (A) et du ratio MFI/NT (B).

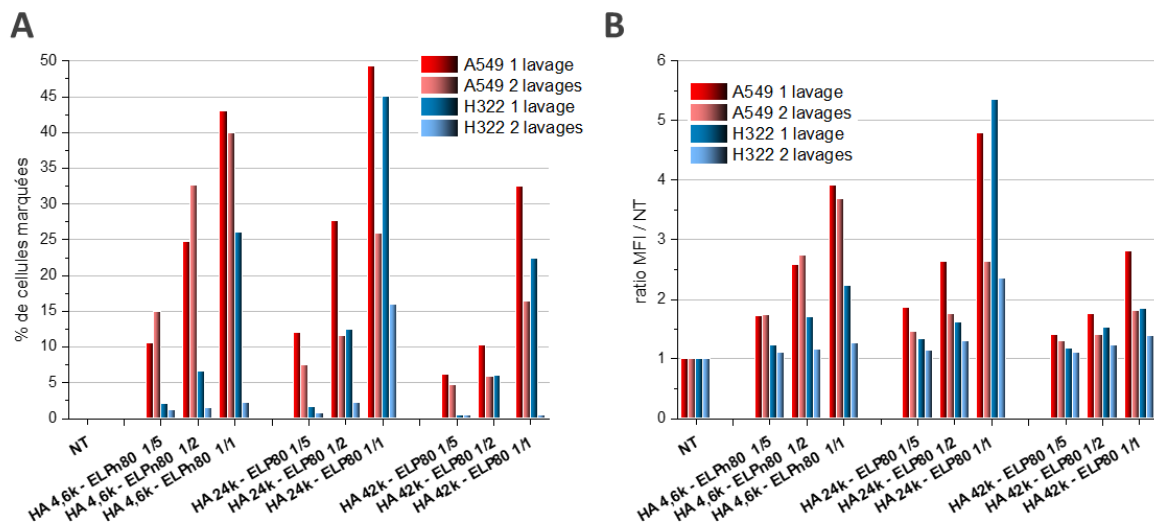


Figure IV-42 : Étude de cytométrie en flux pour des nanoparticules réticulées à base des bioconjugués HA-ELPn80. Co-assemblage avec 10% (HA_{4,6k}) ou 25% (HA_{24k} et HA_{42k}) de bioconjugués marqués. Indication du % de cellules fluorescentes (A) ou du ratio MFI/NT (B) selon la nanoparticule et sa dilution. Concentration initiale 1/1 = 78 μM. Comparaison entre 1 et 2 lavages après incubation des cellules avec les nanoparticules fluorescentes.

Cette fois, la fluorescence est bien meilleure, le pourcentage de cellules marquées est suffisant pour obtenir des résultats fiables, y compris avec les nanoparticules de HA_{24k}-ELPn80 et HA_{42k}-ELPn80. Le ratio MFI/NT est également bien plus élevé pour les HA les plus courts. Plusieurs enseignements peuvent dès lors être tirés de cette expérience. Tout d'abord, la sélectivité des nanoparticules envers les cellules A549 (CD44⁺) est bien confirmée dans tous les cas, à l'exception des nanoparticules de HA_{24k}-ELPn80 à une concentration de 78 µM. Cette sélectivité est encore plus visible après l'application d'un second lavage.

D'autre part, un effet dose est clairement observable pour les cellules A549, avec une augmentation de la réponse avec la concentration en nanoparticules. Cela tend également à confirmer l'implication et le caractère spécifique de l'interaction HA-CD44.

Enfin, les nanoparticules de HA_{42k}-ELPn80 témoignent d'une affinité moindre pour les cellules A549 comparée à celle des nanoparticules à HA plus court, ce qui est cohérent avec les observations faites en SPR. De même, les nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn80 présentent les meilleures affinité et sélectivité, avec un pourcentage de cellules marquées et un ratio MFI/NT nettement supérieur pour les cellules A549 que pour les cellules H322.

Des études similaires menées avec une fonctionnalisation rhodamine sont représentées en **Annexe IV-39** pour cette même série et **Annexe IV-41** pour l'intégralité de la librairie. Elles confirment les conclusions précédentes, avec toutefois une fluorescence bien plus faible.

Une dernière expérience a finalement été menée afin de vérifier la reproductibilité de cette analyse. Quatre échantillons ont été étudiés : les échantillons HA_{4,6k}-ELPn80 (10% DY700) et HA_{24k-42k}-ELPn80 (25% DY700) ont été re-synthétisés afin de confirmer les résultats précédents. Une solution de HA_{4,6k}-ELPn80 (25% DY700) a été ajoutée pour évaluer l'influence du pourcentage de fluorophore. Les résultats sont donnés en **Figure IV-43**.

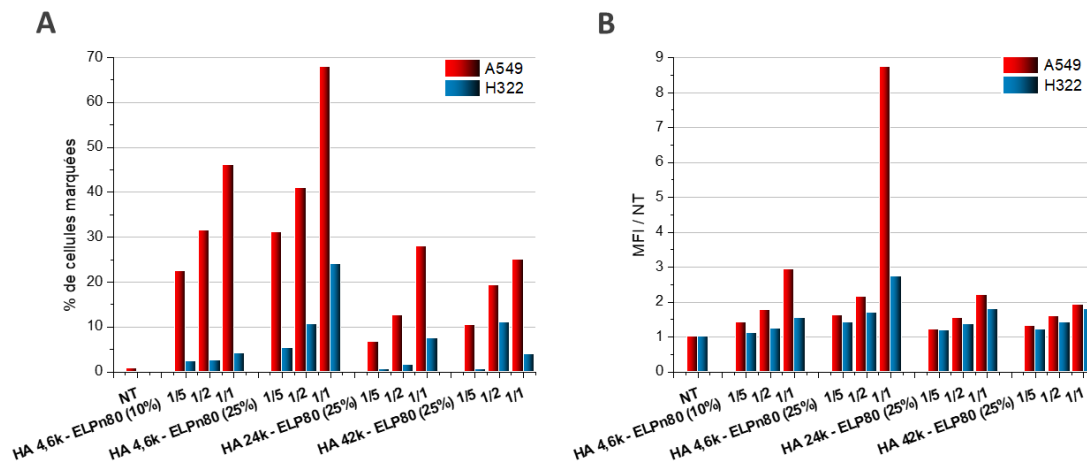


Figure IV-43 : Reproductibilité de l'expérience précédente. Étude de cytométrie en flux pour des nanoparticules réticulées à base des bioconjugués HA-ELPn80. Co-assemblage avec 10% (HA_{4,6k}) ou 25% (HA_{4,6k}, HA_{24k} et HA_{42k}) de bioconjugués marqués. Indication du % de cellules fluorescentes (A) ou du ratio MFI/NT (B) selon la nanoparticule et sa dilution. Concentration initiale 1/1 = 78 µM.

Les conclusions précédentes se confirment : tout comme lors des analyses par SPR, l'augmentation de la taille du HA semble diminuer la réponse, ici le nombre de cellules marquées et la sélectivité. Pour tous les échantillons, l'effet dose est toujours observable, de même que la sélectivité envers les cellules A549 (CD44⁺). Celle-ci est à nouveau particulièrement importante pour les nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn80 (10% DY700).

Il est intéressant de noter que si la fluorescence est effectivement plus élevée pour les nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn80 (25% DY700), l'augmentation du pourcentage d'espèces marquées va de pair avec une diminution de la sélectivité. La présence du fluorophore semble donc favoriser les interactions non spécifiques. Un compromis entre intensité de fluorescence et sélectivité doit être trouvé.

Une formulation optimisée se dégage donc : des nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn80 comprenant 10% d'espèces fonctionnalisées au DY700 semblent efficaces pour le ciblage sélectif des cellules CD44⁺.

IV.C.3. Étude cytotoxicologique

En parallèle, une étude de cytotoxicité a été menée sur les bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn80 et sur les nanoparticules réticulées HA_{4,6k}-ELPn80 (10% rhodamine). Les résultats sont donnés en **Figure IV-44**. La toxicité a été évaluée sur les lignées cancéreuses pulmonaires précédemment étudiées (A549 et H322), ainsi que sur une lignée de fibroblastes pulmonaires (MRC5). Ces cellules ont été incubées durant 72h avec la solution de bioconjugués ou de nanoparticules réticulées fluorescentes à différentes concentrations. La référence est donnée par les cellules n'ayant pas subi de traitement particulier (NT), ou incubées avec la quantité de PBS seul équivalente à celle utilisée avec les nanoparticules (véhicule).

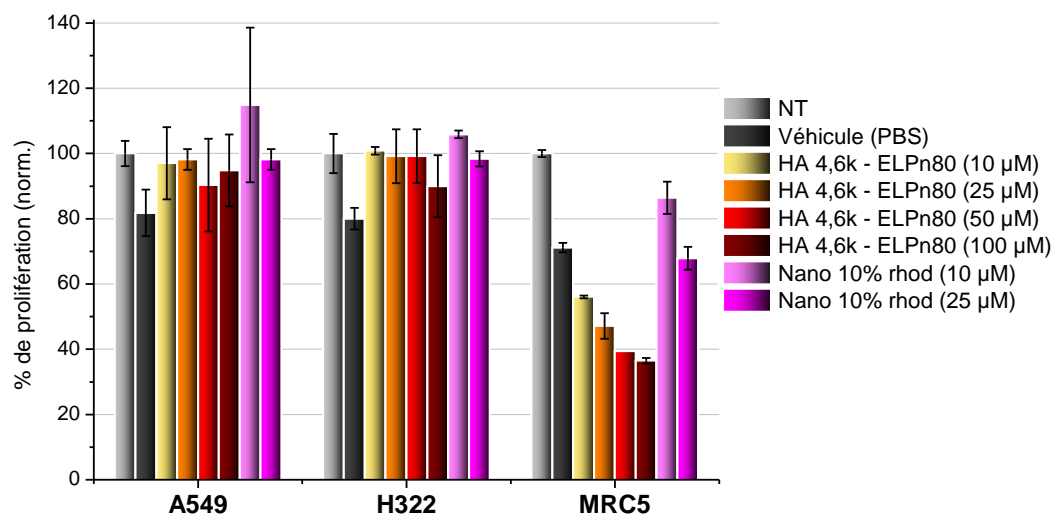


Figure IV-44 : Étude de cytotoxicité des bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn80 (jaune-rouge) et des nanoparticules réticulées de HA_{4,6k}-ELPn80 (10% rhodamine) (rose). Évaluation de la toxicité sur les cellules cancéreuses A549 et H322, et sur les cellules saines MRC5 après 72h d'incubation à plusieurs concentrations. Les références sont les cellules non traitées (NT, gris) ou mises en contact avec du PBS sans bioconjugués ni nanoparticules (véhicule, noir).

Un premier constat est que les bioconjugués tout comme les nanoparticules ne semblent pas toxiques pour les lignées A549 et H322 quelle que soit la concentration. En revanche, les cellules MRC5 sont fortement affectées par la présence des bioconjugués non réticulés, avec une diminution du taux de prolifération à 30% à 100 µM. L'injection du bioconjugué à forte concentration risque donc d'être nocive pour certaines cellules saines. Cette constatation est assez étonnante, les ELPs et le HA ayant séparément été décrits comme non cytotoxiques dans la littérature.^{9,10} Les cellules MRC5 incubées avec les nanoparticules réticulées et fluorescentes, quant-à-elles, présentent également une diminution de la prolifération, qui reste cependant similaire à celle obtenue avec le PBS seul. Leur toxicité n'est donc pas supérieure à celle du tampon. La formulation en nanoparticules semble ainsi permettre d'améliorer la tolérance des bioconjugués par l'organisme.

Une étude similaire portant sur des nanoparticules réticulées HA_{4,6k}-ELPn80 (25% rhodamine) a conclu à leur innocuité apparente sur les cellules A549 et H322, mais à une légère toxicité sur les cellules MRC5 à 25 µM (**Annexe IV-40**). Une dernière expérience de cytotoxicité est donc nécessaire pour trancher.

Ces expériences menées *in vitro* ont finalement bien confirmé la capacité de ciblage des nanoparticules envers les cellules surexprimant le CD44. La plus grande fluorescence constatée (en nombre de cellules comme en intensité) pour la lignée A549 couplée à un effet dose clair indique une bonne sélectivité. Elle demeure toutefois plus faible que celle observée lors des études précédemment menées avec des nanoparticules de HA-PBLG.

Ces expériences ont par ailleurs confirmé les tendances observées lors des analyses de SPR : la taille de l'ELP ne semble pas avoir d'influence spécifique, contrairement à celle du HA. Tout comme en SPR, et en contradiction avec les observations faites pour le HA libre, la meilleure affinité est obtenue pour les bioconjugués présentant le HA le plus court. Il est probable que la présentation du HA est optimale dans ce cas, mais des études structurales complémentaires sont complémentaires pour éclaircir ce point. Le choix du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 comme candidat de référence est donc conforté.

Dans une moindre mesure, ces analyses ont également montré l'importance du choix du fluorophore dans l'obtention de résultats fiables et distinguent le DY700 comme étant le plus adapté à ce système.

Enfin, des analyses de cytotoxicité ont confirmé l'intérêt d'une présentation du bioconjugué sous forme de nanoparticule réticulée, permettant une meilleure résistance à la dilution et une toxicité moindre envers les cellules saines.

CONCLUSION

Après une optimisation de la synthèse et une caractérisation des propriétés physico-chimiques d'auto-assemblage, les bioconjugués ont pu être utilisés pour répondre aux objectifs initiaux : étude de l'effet de multivalence du HA sur l'interaction avec le CD44 et ciblage de cellules cancéreuses CD44⁺.

Pour cela, quelques adaptations ont été nécessaires :

Tout d'abord, la fonctionnalisation avec un fluorophore, indispensable pour l'évaluation des nanoparticules *in vitro* et *in vivo*, a été réalisée sur l'extrémité C-terminale du bloc ELP. Trois fluorophores, la fluorescéine, la rhodamine, et le DY700 ont servi lors des études *in vitro*, tandis qu'un quatrième, le DY410 a été sélectionné pour des études *in vivo* chez le poisson-zèbre (en cours). L'auto-fluorescence des cellules a rapidement éliminé la première, tandis que les problèmes de synthèse et la faiblesse de l'intensité de fluorescence médiane ont finalement mené à l'abandon de la deuxième. Le DY700 semble donner pour l'heure les résultats sur cellules les plus fiables.

Ensuite, plusieurs études préliminaires par SPR et *in vitro* ont souligné la fragilité des objets auto-assemblés envers la dilution, rendant toute analyse de l'état nanoparticulaire impossible. Une stabilisation par réticulation a donc été mise en œuvre, par alkylation de la méthionine au moyen d'un composé porteur de deux fonctions époxyde. Un protocole très simple et applicable en conditions physiologiques a été développé. La caractérisation des objets formés a montré le maintien des propriétés de thermosensibilité, ne s'exprimant plus en assemblage-désassemblage mais en variation de taille. Par ailleurs, la réticulation mène à l'augmentation de la taille des nanoparticules, qui reste cependant compatibles avec des applications biomédicales. Enfin, la mesure du potentiel zêta des nanoparticules et leur imagerie par TEM a permis de confirmer leur structure sphérique de type cœur-couronne, avec le HA en surface.

L'affinité de ces nanoparticules réticulées pour le récepteur CD44 a alors pu être analysée par SPR. L'intérêt de la présentation du HA à la surface d'une nanoparticule a été confirmé : elle permet en effet des interactions multivalentes fortes. La diminution de la densité en récepteurs, en les éloignant les uns des autres, diminue également la force de l'interaction. À très faible densité, la multivalence n'est plus possible et les nanoparticules se comportent alors comme les bioconjugués libres. Il est donc bien possible de moduler l'affinité de ces bioconjugués pour le CD44 uniquement en fonction de leur état auto-assemblé ou non.

La composition des bioconjugués a également démontré son importance. Il est connu, et il a été confirmé ici, que l'affinité d'un HA libre augmente avec sa masse molaire. Paradoxalement, le comportement inverse a été observé pour le HA lié aux ELPs, avec une affinité très supérieure obtenue pour les bioconjugués HA_{4,6k}-ELP. Une hypothèse stérique peut être avancée : les nanoparticules de HA_{42k}-ELP étant plus volumineuses, elles sont plus susceptibles de gêner l'interaction d'autres d'entre-elles à proximité, et de limiter ainsi le nombre adsorbé sur la surface. Un repliement des chaînes de HA vers l'intérieur, les rendant moins disponibles pour des interactions, est également envisageable. A l'inverse, la taille de l'ELP ne semble pas avoir d'importance.

Enfin, les capacités de ciblage des nanoparticules de la librairie ont été évaluées *in vitro*. Pour cela, les bioconjugués ont été co-assemblés avec leurs équivalents fonctionnalisés avec des fluorophores et réticulés à chaud en conditions stériles. Après incubation avec des cellules cancéreuses A549 (CD44⁺) et H322 (CD44⁻) à 37°C, des analyses de cytométrie en flux ont permis de démontrer une sélectivité des nanoparticules pour les premières. Un effet dose constaté semble indiquer l'implication spécifique de l'interaction HA-CD44 dans cette affinité. Par ailleurs, ces expériences sur cellules ont confirmé les conclusions de l'analyse SPR : si la taille de l'ELP ne paraît pas avoir d'influence, l'affinité est plus importante pour les nanoparticules porteuses du HA le plus court.

Une étude de cytotoxicité sur les cellules cancéreuses pulmonaires A549 et H322 et les fibroblastes pulmonaires MRC5 a confirmé l'importance de la formulation du système : la forme nanoparticulaire réticulée présentant une toxicité bien moindre que la forme non réticulée sur les cellules MRC5. Les deux formulations sont en revanche non toxiques pour les lignées cancéreuses.

Au vu de tous ces résultats, les nanoparticules réticulées issues du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 semblent les meilleures candidates. Le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80-DY410 est donc actuellement en cours d'étude *in vivo* chez le poisson-zèbre afin de connaître sa biodistribution. Une expérience sur la forme nanoparticulaire suivra, afin de confirmer les conclusions des études présentées dans ce manuscrit.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Matériel

Solvants : les solvants éthanol (96.0%, EtOH), méthanol (98.5%, MeOH), diméthylformamide (DMF, 99%), éther diéthylique, dichlorométhane, tétrahydrofurane (THF) ont été achetés chez **VWR**. Le diméthyl sulfoxyde (DMSO, 99.7%) a été acquis auprès de **Sigma-Aldrich** et le D₂O et DMSO d₆ chez **Eurisotop**.

Fluorophores : les fluorophores TAMRA cadavérine (mixed isomers) et fluorescéine cadavérine ont été achetés chez **Biotium**, le 5(6)-Carboxyfluorescein N-hydroxysuccinimide ester chez **Sigma-Aldrich**, le TAMRA (TetraMethylRodhamine) amine 5-isomer chez **Lumiprobe**, et le DY700, DY410 chez **Dyomics**.

L'azoture de sodium (NaN₃, 99.5%), acide acétique (AcOH, 99.8%), acide formique, triméthylamine (TEA, 99%), sulfate de cuivre (II) pentahydraté (CuSO₄·4H₂O, 99%), sulfate de magnésium, glycidyl propargyl ether, *N,N,N',N'',N'''*-pentaméthyl-diéthylène-triamine (PMDETA), hexafluoroisopropanol (HFIP), *N,N,N',N'*-Tetraméthyl-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate (HBTU), époxy-2,3-propyl benzène (EPBz), Ammonium Pyrrolidinecarbodithioic acid (APDC), et resorcinol diglycidyl ether ont été obtenus auprès de **Sigma-Aldrich**. Le *N,N* Diisopropyléthylamine (DIPEA, 99%), ascorbate de sodium (NaAsc, 99%), et Bromure de benzyle 99% ont été acquis chez **Alfa Aesar**. L'hydroxyde de sodium (NaOH) a été acheté chez **Fisher Scientific (FR)**, l'épichlorhydrine chez **TCI**, l'hexanediol diglycidyl ether chez **BOC Sciences** et le Cuprisorb[®] chez **Seachem**.

Les dialyses ont été réalisées avec des membranes de dialyse ou des dispositifs *float-a-lyzer* de **Spectra/Por**[®]. Les étapes de filtration-centrifugation ont été effectuées avec des filtres à centrifuger *Amicon*[®] *Ultra-15* (3 000 – 15 000 MWCO, *Ultracel*, Cellulose Régénérée) de chez **Merck Millipore**. La purification sur colonne a été effectuée sur les colonnes Sephadex PD10 – G25 de **GE Healthcare**.

L'agitateur chauffant pour eppendorfs de 1.5 – 2 mL est un *Thermomixer*[™] *comfort* *Eppendorf* de **ThermoFisher Scientific**.

Le lyophilisateur est un appareil *Benchtop Pro with Omnitronics* de **SP Scientific**.

Traitement informatique :

Les figures sous forme de graphes ont été réalisées sur le logiciel **OriginPro 8.5**, les illustrations 3D sur **Blender** et les structures chimiques sur **ChemDraw**.

Synthèses

Synthèse du glycidyl azoture

Synthèse de l'intermédiaire 1-azido-3-chloropropan-2-ol

Une solution d'azoture de sodium (1 g, 15,38 mmol, 1,2 équiv.) est préparée dans 5 mL d'éthanol 25% dans un ballon de 50 mL fermé par un septum. Après dissolution, 0,9 mL d'acide acétique pur sont ajoutés, suivis par 1 mL d'épichlorhydrine. La réaction est laissée sous agitation à température ambiante durant 24h.

La réaction est ensuite stoppée par l'ajout de 6 mL de saumure. Elle est purifiée par extraction liquide-liquide avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est mise de côté et la phase aqueuse lavée 2 fois de plus à l'acétate d'éthyle. Les fractions organiques sont rassemblées et séchées avec du sulfate de magnésium. Après filtration, le solvant est évaporé sous vide. Un liquide incolore est récupéré avec un rendement massique $r = 99\%$.

Synthèse du glycidyl azoture (explosif)

Le 1-azido-3-chloropropan-2-ol est inséré dans un ballon de 50 mL en présence de 14 mL de soude à 1 M. Une vive agitation est maintenue à température ambiante pendant 40 min.

La purification se fait par extraction liquide-liquide dans 3 x 10 mL de dichlorométhane. Les fractions organiques sont rassemblées et lavées avec 5 mL de saumure. La phase organique est ensuite récupérée et séchée avec du $MgSO_4$. Après filtration sur Büchner, le dichlorométhane est évaporé sous vide. Le produit final récupéré est un liquide incolore, avec un rendement massique $r = 56\%$.

Alkylation des méthionines par des composés époxydes

Composés époxydes : Glycidyl propargyl éther / Glycidyl d'azoture / Epoxy Propyl Benzène

Une solution d'ELPn60 (20 mg, 0,79 μmol , 1 équiv.) est préparée sous atmosphère inerte (Ar) par dissolution dans un mélange HFIP/AcOH glacial (10/90). Elle est ensuite laissée sous agitation et à température ambiante. Trois injections du composé époxyde (126 μmol , 10 équiv./méthionine) sont effectuées à t_0 , t_6h et t_{23h} , pour un temps de réaction total de 48h. La solution est ensuite purifiée par filtration-centrifugation (Amicon Ultra-15 3 kD) : 4 cycles d'ajout d'eau déionisée suivi d'une centrifugation à 3800 rpm, 10°C, pendant 30 min. Elle est enfin lyophilisée pour obtenir un solide blanc cotonneux avec un rendement massique moyen : $r_{\text{alk}} = 79\%$, $r_{N_3} = 75\%$ (N=2).

Ils sont notés respectivement ELPn60-g-Alk⁽⁺⁾ et ELPn60-g-N₃⁽⁺⁾, le (+) traduisant la présence de sulfonium. Le protocole appliqué pour la fonctionnalisation de l'ELPn80 par l'époxy propyl benzène est le même, avec un rendement massique $r_{\text{bz}} = 43\%$.

Attention : Si la purification par filtration-centrifugation est loin d'être optimale, il faut noter qu'une purification par dialyse a entraîné la perte de la quasi-totalité des produits, par interaction avec la membrane. Elle est donc à éviter.

Alkylation des méthionines par un halogénure d'alcane

L'ELPn80 (60 mg, 1,78 μmol , 1 équiv.) est dissout dans 3 mL d'acide formique à 0,2 M. La solution est laissée à température ambiante sous agitation durant 2h. Une solution de bromure de benzyle (96 mg, 561 μmol , 15 équiv./méthionine) est préparée dans 1,9 mL de THF et ajoutée à la solution d'ELP ($V_{\text{tot}} = 4,9$ mL). La réaction est maintenue sous vive agitation à température ambiante pendant 5 jours. Le BrBz non réagit est ensuite extrait avec 2,5 mL d'éther diéthylique. La phase organique est éliminée et la phase aqueuse laissée 24h à température ambiante pour l'évaporation de l'éther restant. Elle est ensuite purifiée par filtration-centrifugation (Amicon Ultra-15 3 kD) : 4 cycles d'ajout d'eau déionisée suivi d'une centrifugation à 4500 rpm, 10°C, pendant 20 min. Elle est enfin lyophilisée pour obtenir un solide blanc cotonneux avec un rendement massique $r_{\text{bz}} = 75\%$ et un taux de fonctionnalisation $\eta \approx 81\%$ (17 méthionines fonctionnalisées).

Déméthylation des méthionines fonctionnalisées

Une solution d'ELPn60-g-N₃⁽⁺⁾ (25 mg, 0,93 μmol , 1 équiv.) est préparée par dissolution dans 1,25 mL d'éthanol à 75% en présence d'APDC (12,18 mg, 74,12 μmol , 5 équiv./méthionine) et mise sous atmosphère inerte (Ar). La réaction est laissée sous agitation à température ambiante durant 1 jour. La solution est ensuite purifiée par dialyse (membrane 1 kD) à 4°C, d'abord contre une solution de méthanol à 50% (3 bains, 24h), puis contre de l'eau déionisée (3 bains, 24h). Après lyophilisation, un solide blanc est obtenu avec un rendement massique moyen $r = 67\%$ et un taux de déméthylation $\eta \approx 94\%$ (1 méthionine non déméthylée).

Un protocole similaire est appliqué pour la déméthylation de l'ELPn60-g-Alk⁽⁺⁾, avec un rendement massique moyen $r = 39\%$ et un taux de déméthylation $\eta \approx 94\%$ (1 méthionine non déméthylée).

Un protocole identique mené pour la déméthylation de l'ELPn80-g-Bz⁽⁺⁾ (obtenu à partir du BrBz) est un échec : si un solide blanc est bien récupéré après lyophilisation avec un rendement massique $r = 65\%$, il s'agit d'un ELP dont les méthionines sont revenues à leur état originel, le benzyle étant éliminé préférentiellement par rapport au méthyle.

Couplage de fonction naphthalène le long de la chaîne par CuAAC

Couplage sur l'espèce neutre ELPn60-g-N₃ (déméthylée)

Un tampon TEAA est préparé : 2,8 mL de triéthylamine + 1,2 mL d'acide acétique + 6,0 mL d'eau déionisé. $V_{\text{tot}} = 10$ mL, ajustement à pH 7 avec une solution de soude à 5M.

L'ELPn60-g-N₃ (10 mg, 0,39 μmol , 1 équiv.) est dissout dans de l'eau déionisée et le 2-ethynynaphthalène (1,92 mg, 12,61 μmol , 32 équiv., 2 équiv./met) dans de l'éthanol absolu. Les deux solutions sont ensuite assemblées en présence de tampon TEAA 10%. Des solutions de PMDETA, ascorbate de sodium et CuSO₄ sont préparées dans l'eau déionisée. Le PMDETA (1,64 mg, 9,45 μmol , 1.5 équiv./met) et l'ascorbate de sodium (12,49 mg, 63,03 μmol , 10 équiv./met) sont ajoutés sous agitation au mélange réactionnel. Après 2 minutes d'homogénéisation, la solution de CuSO₄ (2,36 mg, 9,45 μmol , 1.5 équiv./met) est également ajoutée. Enfin de l'éthanol absolu est ajouté pour atteindre un mélange H₂O/EtOH (1:1) pour un volume final de 1,6 mL. Un bullage à l'argon de 5 min est effectué. La réaction est laissée sous agitation à 20°C pendant 4 jours. Un précipité orange apparaît au fond et sur les bords du tube.

Après réaction, le mélange est dilué 4 mL d'eau déionisée. Le précipité est insoluble et reste sur les parois du tube. Il n'a pas pu être récupéré.

Couplage sur l'espèce chargée positivement ELPn60-g-N₃⁺ (non déméthylée)

L'ELPn60-g-N₃⁺ (10 mg, 0,37 μmol , 1 équiv.) et le 2-ethynynaphthalène (1,13 mg, 7,41 μmol , 20 équiv., 1,25 équiv./met) sont dissouts dans du DMSO anhydre. Des solutions d'ascorbate de sodium et de CuSO₄ sont également préparées du DMSO anhydre. L'ascorbate de sodium (3,70 mg, 18,68 μmol , 3.5 équiv./met) est ajouté sous agitation au mélange réactionnel, malgré quelques problèmes de solubilisation. Après 2 minutes d'homogénéisation, la solution de CuSO₄ (1,9 mg, 7,61 μmol , 1.5 équiv./met) est également ajoutée pour un volume final de 1,6 mL. Un bullage à l'argon de 5 min est effectué. La réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 2 jours.

Le cuivre est éliminé par chélation durant 1 nuit, à raison d'au moins 20 mg de Cuprisorb (SeaChem) par mg de CuSO₄. La solution récupérée est purifiée par 2 cycles de précipitation dans l'éther diéthylique, un précipité marron se forme après vortexation. Après séchage sous vide, le solide récupéré est insoluble dans l'eau, et sa resolubilisation dans le DMSO d6 est très longue (3 jours).

Réticulation

Pour une utilisation *in vitro* ou *in vivo*, cette étape doit être réalisée en conditions stériles. Le matériel (ependorfs, cônes, récipients pour dialyse) et les tampons (PBS pH 5, PBS pH 7,4, H₂O) utilisés font l'objet d'une stérilisation préalable par autoclave. Le travail se fait sous un poste de sécurité microbiologique (PSM), avec une désinfection de tout le matériel et des gants à l'éthanol à 70%. Le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 (3 mg, 0,08 μmol , 1 équiv.) est solubilisé dans 1 mL de PBS (300 mosm, pH 5). La solution est ensuite maintenue à 50°C pendant 10 min (Thermomixer™ Eppendorf, 800 rpm) et l'hexanediol diglycidyl éther introduit (1,13 mg, 4,93 μmol , 63 équiv. (6 équiv. par méthionine)). Après homogénéisation par vortexation, la solution est maintenue à 50°C (Thermomixer™ Eppendorf, 800 rpm) pendant 2 jours. La solution est ensuite dialysée contre du PBS (300 mosm, pH 7,4) pendant 2 jours, 3 bains par jour (float-a-lyzer, 100 kD, préalablement rincé avec un bain d'éthanol 10% stérile, et un bain d'eau déionisée stérile). La solution de nanoparticules réticulées est enfin récupérée et stockée à 4°C. Elle ne peut être ni filtrée, ni stérilisée aux UV.

Ce même protocole a été appliqué avec le résorcinol diglycidyl éther comme réticulant.

Remarque 1 : un suivi par DLS est assuré durant la réaction. Des prélèvements faits avant l'ajout du réticulant, avant purification, et après dialyse, sont analysés à 5°C et 50°C pour vérifier l'efficacité de la réaction. Les conditions de stérilité doivent s'appliquer aussi lors de cette étape.

Remarque 2 : une altération de ce protocole semble possible, en réduisant la quantité de réticulant à 3 équivalents par méthionine, et le temps de réaction à 24h.

Synthèse du composé fluorescéine-ELPn60

L'ELPn60 (20 mg, 0,79 μmol , 1 équiv.) est dissout dans 1 mL de DMSO anhydre, et laissé à réagir en présence de DIPEA (0,31 m, 2,36 μmol , 3 équiv.) et de NHS-fluorescéine (1,49 mg, 3,15 μmol , 4 équiv.) sous atmosphère inerte (argon) à température ambiante pendant 3 jours. La solution est ensuite diluée dans 5 mL d'eau déionisée et dialysée (membrane 1 kD) contre de l'eau déionisée pendant 3 jours. Après lyophilisation, le solide obtenu est resolubilisé dans 2,5 mL d'eau déionisée et purifié sur une colonne PD10 Sephadex. L'élution est faite avec 4 x 3.5 mL d'eau déionisée froide. Un suivi est effectué par spectroscopie de fluorescence pour déterminer les fractions contenant l'espèce ELPn60-fluorescéine. Les 4 premières fractions présentant à la fois les signaux de l'ELP et de la fluorescéine sont lyophilisées. Le solide obtenu est jaune vif avec un rendement massique de 66%. Il est analysé par RMN et MALDI.

Synthèse des composés alcyne/DBCO-ELP-fluorophore

Un protocole similaire a été appliqué à toutes les synthèses des composés alcyne- ou DBCO-ELP-fluorophore. Les exceptions seront détaillées ci-dessous.

Protocole général

Des solutions de DBCO-ELPn80 (30 mg, 0,88 μmol , 1 équiv.), de rhodamine TAMRA (*Biotium*) (1,36 mg, 3,65 μmol , 3 équiv.), de DIPEA (1,71 mg, 13,23 μmol , 15 équiv.), et d'HBTU (2,3 mg, 6,17 μmol , 7 équiv.) sont préparées dans du DMF préalablement dégazé à l'argon. Elles sont ajoutées dans un tube à hémolyse en verre dans l'ordre : DIPEA, HBTU, fluorophore, avec un temps d'homogénéisation entre chaque ajout, pour un volume final de 1 mL. Une mise sous atmosphère inerte par bullage d'argon durant 10 min est effectuée. La solution est ensuite laissée sous agitation à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 24h.

Elle est ensuite purifiée par précipitation dans 20 mL d'éther diéthylique froid, suivie d'une étape de vortexation et une centrifugation à 3800 rpm à 5°C pendant 2 min. L'éther est ensuite éliminé par prélèvement et par évaporation durant 1 nuit à température ambiante. Le solide restant est ensuite resolubilisé dans 10 mL d'eau déionisée et dialysé (membrane de pore 10 kD) contre de l'eau déionisée à 4°C durant 4 jours (3 bains par jour). La solution purifiée est enfin lyophilisée pour récupérer un solide rose vif cotonneux et peu dense ($r = 96\%$). L'analyse de masse par MALDI révèle une fonctionnalisation qui semble totale, $\eta \approx 100\%$.

Variation due à l'addition multiple de la rhodamine Lumiprobe

Le protocole appliqué est sensiblement le même que le protocole général, à l'exception des quantités de matière utilisées. DBCO-ELPn80 (30 mg, 0,88 μmol , 1 équiv.), rhodamine TAMRA (*Lumiprobe*) (0,68 mg, 1,32 μmol , 1,5 équiv.), DIPEA (0,60 mg, 4,63 μmol , 5,25 équiv.), et HBTU (1,7 mg, 4,41 μmol , 5 équiv.). Après réaction et purification, une étape supplémentaire de centrifugation à 35°C est ajoutée afin d'éliminer toute rhodamine restant en solution (chauffage 5 min à 35°C, centrifugation 5 min à 35°C à 11 000 rcf). Après lyophilisation, un solide rose vif cotonneux est obtenu, avec un rendement massique $r = 78\%$. L'analyse de masse par MALDI révèle une fonctionnalisation non totale, estimée à $\eta \approx 60\%$.

Variations de purification dues aux fluorophores

Fluorescéine : Après la purification dans l'éther diéthylique froid, le produit est resolubilisé dans 2,5 mL d'eau déionisée et purifié sur une colonne contenant une résine Sephadex G25 (colonne de désalage PD10, Cytiva). Après équilibration de la colonne, l'échantillon est élué avec 3,5 mL d'eau déionisée froide (fraction 1-3) puis la fluorescéine en excès est récupérée avec 2 x 3,5 mL d'eau déionisée froide. Des fractions d'environ 1 – 1,5 mL sont récupérées dans des eppendorfs de 2 mL et analysées par spectroscopie de fluorescence. Une fois les premières fractions contenant l'ELP fonctionnalisé lyophilisées, un solide jaune vif est obtenu avec un rendement massique $r = 72\%$. L'analyse de masse par MALDI révèle toutefois l'absence de fonctionnalisation covalente.

DY700 : Le protocole appliqué est similaire à celui décrit pour la variation due à l'addition multiple de rhodamine. Une précipitation dans l'acétone froid remplace celle dans l'éther diéthylique. Après lyophilisation, un solide bleu turquoise cotonneux est obtenu, avec un rendement massique $r = 90\%$. L'analyse de masse par MALDI révèle une fonctionnalisation non totale, estimée à $\eta \approx 70\%$.

DY410 : Le protocole est similaire au protocole général, à l'exception de la purification. A la fin de la synthèse, le mélange réactionnel est dilué avec 2 mL d'eau déionisée et purifié par dialyse (float-analyzer, 5 mL, 3,5-5 kD) contre de l'eau déionisée durant 4 jours (3 bains par jour). Après lyophilisation, un solide jaune très pâle cotonneux est obtenu, avec un rendement massique $r = 86\%$. L'analyse de masse par MALDI révèle une fonctionnalisation qui semble totale, $\eta \approx 100\%$.

Synthèse des bioconjugués HA-ELP-fluorophore par SPAAC

Le protocole appliqué est le même que celui décrit au **chapitre II**, la seule différence étant l'utilisation de DBCO-ELP-rhodamine comme bloc ELP.

Rendements :

Bioconjugué - rhodamine	η moyen (%)	Bioconjugué - rhodamine	η moyen (%)	Bioconjugué - rhodamine	η moyen (%)
HA _{4,6k} -ELPn60	59	HA _{24k} -ELPn60	66	HA _{42k} -ELPn60	84
HA _{4,6k} -ELPn80	50	HA _{24k} -ELPn80	54	HA _{42k} -ELPn80	69
HA _{4,6k} -ELPn100	36	HA _{24k} -ELPn100	56	HA _{42k} -ELPn100	39

Bioconjugué – DY700/DY410	η moyen (%)
HA _{4,6k} -ELPn80-DY700	69
HA _{24k} -ELPn80-DY700	62
HA _{42k} -ELPn80-DY700	72
HA _{4,6k} -ELPn80-DY410	87

Caractérisations & Méthodes

Les analyses par **RMN**, **DLS**, **spectrométrie de masse MALDI** suivent les mêmes protocoles que ceux décrits dans les **chapitre II (p125)** et **chapitre III**.

Électrophorèse sur gel SDS-Page

Le protocole et le matériel sont identiques à ceux décrits dans le **chapitre II (p125)**. Toutefois, dans le cas de l'analyse des espèces fonctionnalisées avec un fluorophore, la dilution des prélèvements est 5 fois plus importante et les dépôts sont de 7 μ L.

Mesure du potentiel Zêta :

Les mesures de potentiel zêta ont été réalisées sur le même appareil et dans les mêmes cuves que décrits en chapitre III. Pour l'analyse des nanoparticules réticulées, les solutions ont été préparées par dilution d'un facteur 10 d'une solution initiale à 78 μM dans du PBS (300 mosm, pH 7,4) avec de l'eau déionisée. La salinité étant toujours élevée, le mode monomodal de l'appareil a été sélectionné, et seule la partie rapide de la mesure (Fast Field Reversal) a été effectuée, comprenant 5 mesures de 1,2s, à 25°C. Elles donnent accès à la valeur moyenne du potentiel zêta mais pas à sa dispersité. L'écart-type donné est celui sur ces 5 mesures. Les données ont été traitées par le logiciel ZS Xplorer (Malvern).

Microscopie Électronique à Transmission (TEM)

L'imagerie a été effectuée au même endroit et sur le même appareil que décrit en chapitre III. Les solutions de nanoparticules réticulées de HA_{4,6k}-ELPn80 ont été obtenues par dialyse dans l'eau déionisée d'une solution initialement à 78 μM dans un tampon PBS après dilution par 3 avec de l'eau déionisée. Une dilution supplémentaire pour atteindre une concentration de 0,1 mg/mL (2,6 μM) a été effectuée. Le dépôt a été réalisé par spray à température ambiante sur une grille de formvar et teinté avec une solution d'acétate d'uranyle à 1%.

Mesure de Fluorescence

Les mesures de fluorescence ont été effectuées sur un appareil SpectraMax M2 multiplate reader (Molecular Devices).

Mesures de fluorescence après purification par colonne Sephadex (alcyne-ELPn60-fluorescéine)

Un volume de 200 μL de chaque fraction éluée est inséré dans un puit d'une plaque de 96 puits à fond opaque Nunc™ F96 MicroWell™ (ThermoFisher Scientific). Une mesure d'intensité de fluorescence est effectuée à deux longueurs d'onde :

Émission due au tryptophane : $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$

Émission due à la fluorescéine : $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$

Une réponse à ces deux longueurs d'onde d'excitation traduit la présence conjointe de l'ELP et de la fluorescéine dans la fraction.

Mesures de fluorescence des bioconjugués HA-ELP-rhodamine et HA-ELP-DY700

Un volume de 2 x 20 μL d'un mélange de bioconjugués contenant 5%-60% d'espèces marquées à 78 μM dans un tampon PBS (avant et après réticulation) a été inséré dans 2 puits d'une plaque de 384 puits à fond opaque (greiner bio-one). Des spectres d'émission de fluorescence ont été mesurés :

Rhodamine : $\lambda_{\text{ex}} = 540 \text{ nm}$, cutoff = 550 nm, $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}650 \text{ nm}$, pas : 10 nm

DY700 : $\lambda_{\text{ex}} = 650 \text{ nm}$, pas de cutoff, $\lambda_{\text{em}} = 700\text{-}800 \text{ nm}$, pas : 10 nm

Il est à noter que, pour des raisons techniques, la longueur d'onde d'excitation utilisée pour obtenir les spectres de fluorescence des espèces HA-ELPn80-DY700 n'est pas optimale. L'intensité de fluorescence est donc plus faible que celle obtenue avec un laser émettant à la longueur d'onde d'absorbance maximale (utilisé lors des études *in vitro*).

Résonance de plasmon de surface (SPR)

Les expériences ont été menées à l'IECB (Pessac) par le Dr. C. Di Primo et Mme. L. Minder sur un appareil Biacore T200.

Le tampon de flux choisi était le PBS (300 mosm, pH 7,4). Toutes les solutions ont été préparées à partir de ce tampon, à une concentration de référence 78 μM , à l'exception des nanoparticules HA-PBLG provenant d'un ancien stock (12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, HBS-EP+). La piste 1 a été conservée nue subissant tout le protocole de capture à l'exception de l'injection de CD44. Sa réponse (référence) a été systématiquement soustraite à celles obtenues sur autres pistes pour éliminer la contribution de l'interaction non spécifique.

Puce CM5 (GE Healthcare)

Récepteur : CD44 humain recombinant (*Sino Biological*), repris selon le protocole conseillé par le fournisseur : 100 µg/mL dans un tampon d'acétate de sodium 10 mM à pH 4. 10% de glycérol ont été ajoutés pour le stockage (-80°C). Il a été couplé sur la puce selon le protocole standard de couplage amine. Brièvement, la puce a été activée par injection d'une solution EDC/NHS pendant 420 s. Différentes densités de récepteurs ont ensuite été obtenues par injection de solutions à 20 µg/mL (P3) et 10 µg/mL (P4) pendant 300 s, menant à l'immobilisation d'environ 3700 RU (P3) et 600 RU (P4). Une solution de CD44 à 5 µg/mL dans le tampon acétate à pH 5 a été injectée de la même façon, menant à l'immobilisation de 200 RU sur la piste 2 (P2). Les fonctions restantes sur la surface ont ensuite été désactivées par injection d'éthanolamine à 1M et pH 8,5 pendant 300 s. Les solutions d'échantillons ont été injectées à 25°C et à un débit de 25 µL/min durant 120 s suivies d'une dissociation de 180 s. La surface a été régénérée entre chaque échantillon avec une solution de glycine 10 mM pH 1,5-2.

Puce NTA (NiHC1000M, Xantec)

Récepteur : CD44 humain recombinant avec tag Histidine (*Sino Biological*), repris selon le protocole conseillé par le fournisseur à 250 µg/mL dans un tampon PBS. Brièvement, la puce a été préparée par une injection d'EDTA 0.5 M, pH 8,5 à 200 µL/min pendant 5 min, suivie d'un équilibrage avec le tampon de flux durant 2 min. Une solution de NiCl₂ à 5 mM a été injectée pendant 2 min, suivie d'une nouvelle phase d'équilibrage. Le CD44 a ensuite été capturé par injection à 5 µL/min pendant 60 s. Après une nouvelle phase d'équilibrage, une solution d'échantillon a été injectée à 20 µL/min durant 120 s, suivie d'une phase de dissociation de 180 s. La surface a ensuite été régénérée par injection d'EDTA 500 mM à 30 µL/min pendant 180 s suivie d'une injection de NaOH 100 mM à 30 µL/min pendant 180 s.

Les résultats ont été normalisés par la valeur de la ligne de base avant injection de l'échantillon et par la masse molaire des bioconjugués.

Expériences *in vitro* sur cellules

Culture cellulaire

Les cellules H322 et A549 (CPNPC) ont été obtenues à partir de l'*American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA). Elles ont été maintenues dans un milieu de culture RPMI 1640 (*Gibco*) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) dans une atmosphère humidifiée avec 5 % de CO₂. Des vérifications de la morphologie ont été entreprises de manière régulière sur toutes les lignées cellulaires, qui ne sont gardées que 3 mois. Elles ont également toutes été testées régulièrement pour vérifier l'absence de mycoplasma (*MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit, Lonza*).

Cytométrie en flux

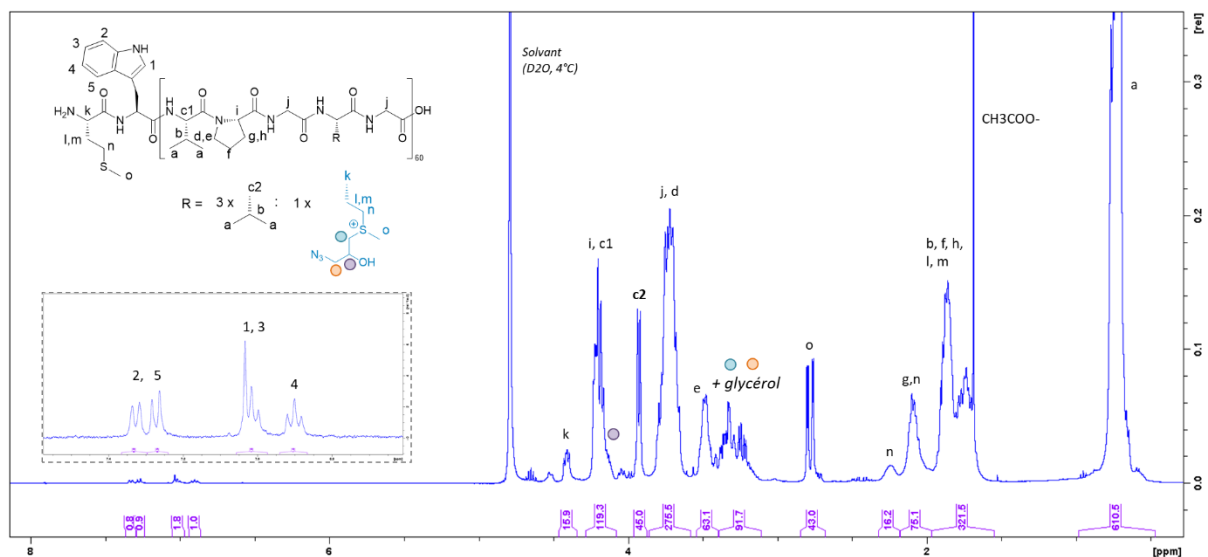
Les cellules ont été cultivées et récoltées à 70% de confluence. L'expression du CD44 a été déterminée après leur incubation pendant 1h à 4°C avec un anticorps murin anti-CD44 conjugué avec de la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (*BD Pharmingen*). Les nanoparticules marquées à la rhodamine ou au DY700 ont été incubées avec les cellules pendant 1h à 37°C. Après 1 ou 2 lavages avec du PBS, l'intensité de fluorescence a été analysée avec un cytomètre en flux Accuri C6 (*BD Biosciences*).

Les cellules adhérentes ont été lavées avec du PBS et récoltées avec de la Trypsine-EDTA (*Gibco*). La trypsine a ensuite été neutralisée avec du milieu de culture RPMI 1640 (*Gibco*) supplémenté avec 10 % de SVF, et rincée deux fois avec du PBS.

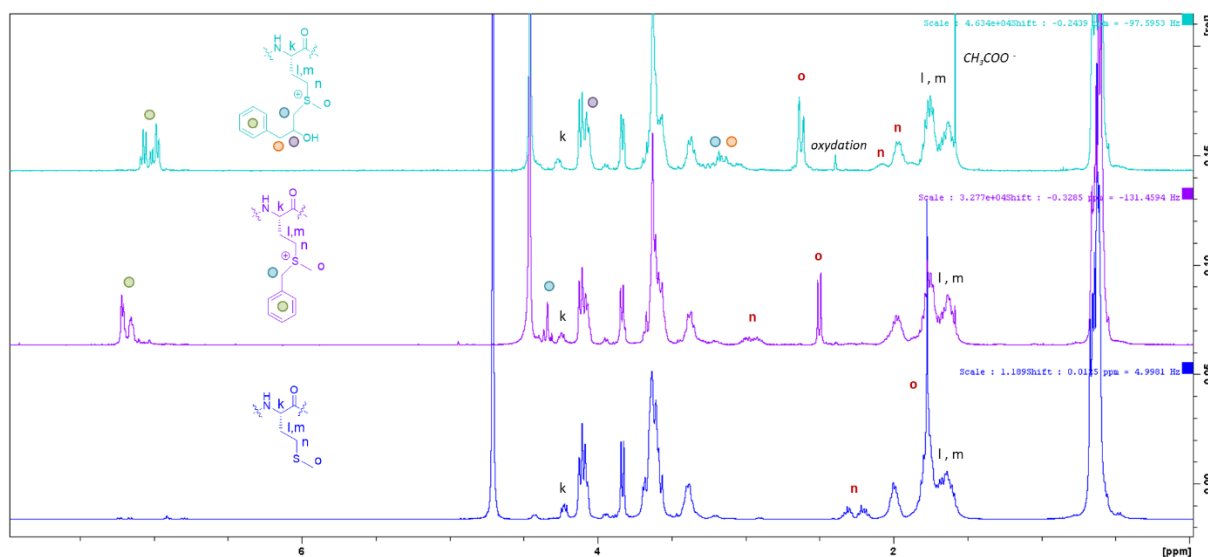
Évaluation de la cytotoxicité *in vitro*

Des expériences de prolifération cellulaire ont été menées dans des plaques de culture de 96 puits. Les cellules ont été cultivées durant 24h avant un traitement avec les nanoparticules de 72h. La viabilité cellulaire a été quantifiée avec la méthode colorimétrique CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (*Promega*). L'inhibition de la croissance a été exprimée comme le pourcentage de cellules vivantes après traitement comparées aux cellules contrôles non traitées.

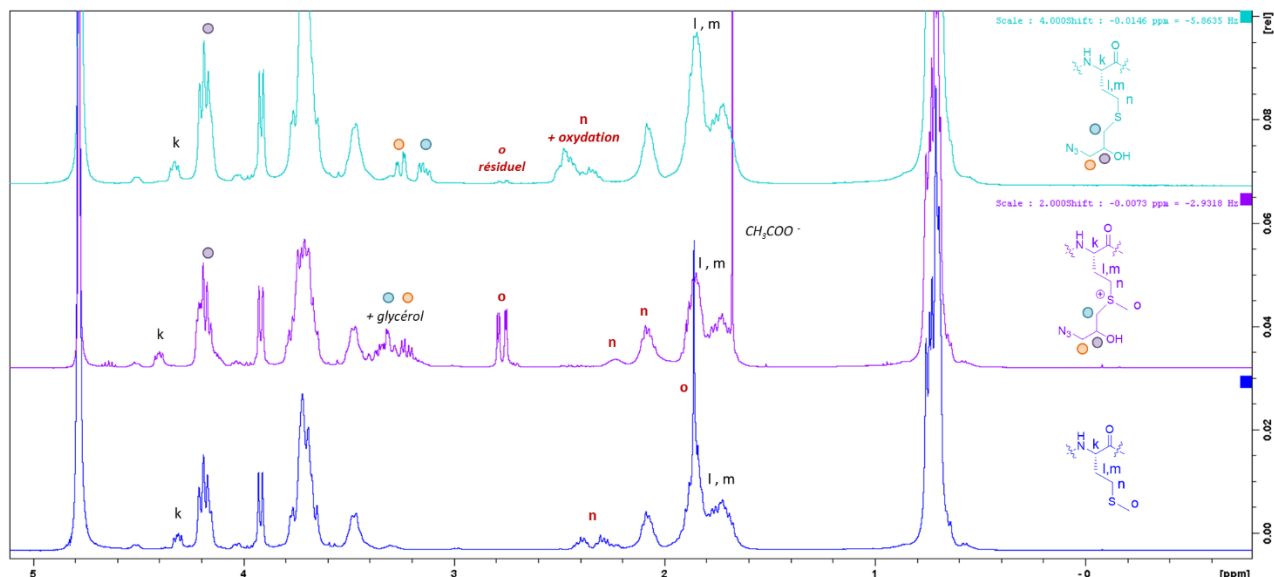
ANNEXES



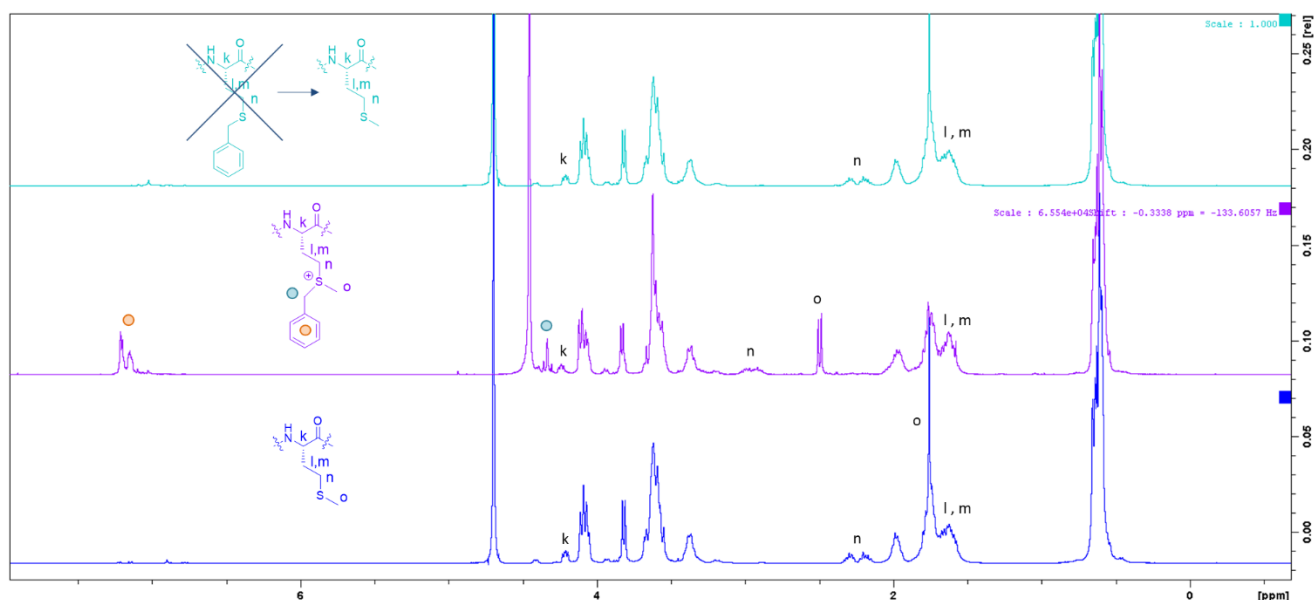
Annexe IV-1 : Spectre RMN ^1H de l'ELPn60-g- $\text{N}_3^{(+)}$ (400 MHz). Pic de référence pour l'intégration : c2 (CH_2 Valine VPGVG, 45 H). Les traces de glycérol empêchent la quantification de la fonctionnalisation.



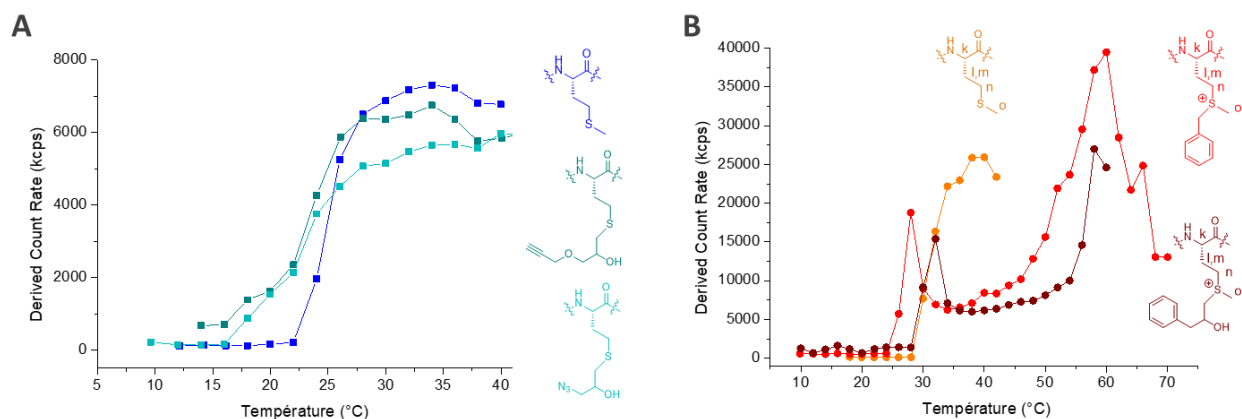
Annexe IV-2 : Spectres RMN ^1H de l'ELPn60 natif (bleu), après fonctionnalisation des méthionines par le BrBz (violet), ou l'EPBz (cyan). Les signaux de l'ELP de départ présentant une modification du déplacement chimique sont indiqués en rouge gras. Les signaux des protons apportés par la fonctionnalisation sont repérés par des cercles colorés. (400 MHz).



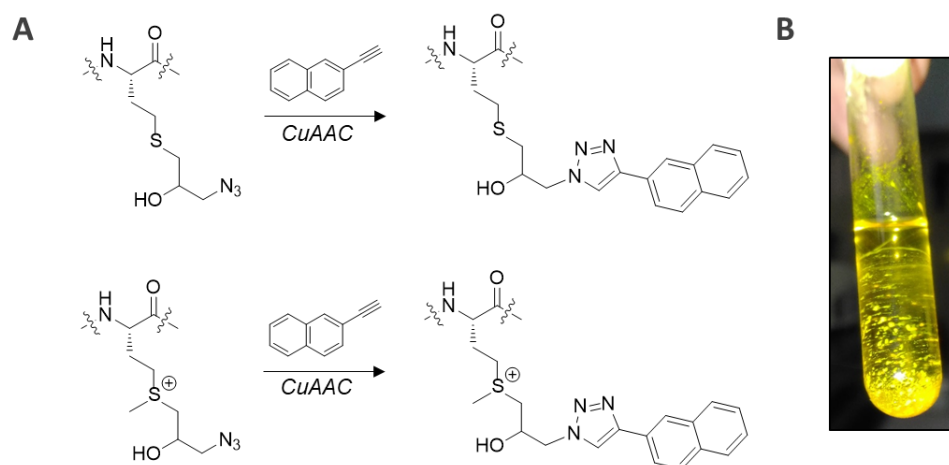
Annexe IV-3 : Spectres RMN ^1H de l'ELPn60 (bleu), de l'ELPn60-g-N₃⁽⁺⁾ (violet), de l'ELPn60-g-N₃ (cyan). 1 méthionine n'est pas déméthylée. Présence d'un peu d'oxydation. (400 MHz, 4°C, D₂O).



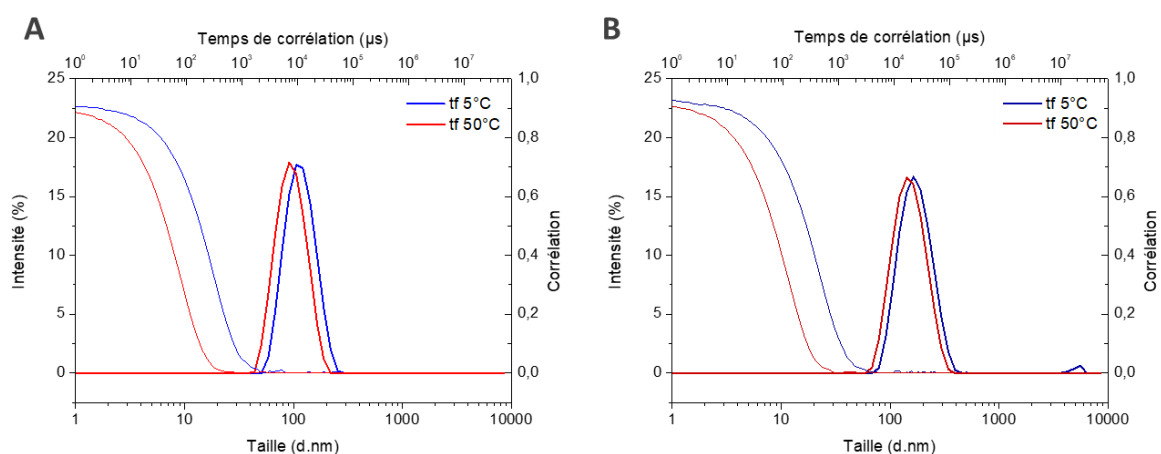
Annexe IV-4 : Spectres RMN ^1H de l'ELPn60 (bleu), de l'ELPn60-g-Bz⁽⁺⁾ (violet), et après tentative de déméthylation (cyan). Échec de la déméthylation, retour à l'ELP d'origine. (400 MHz, 4°C, D₂O).



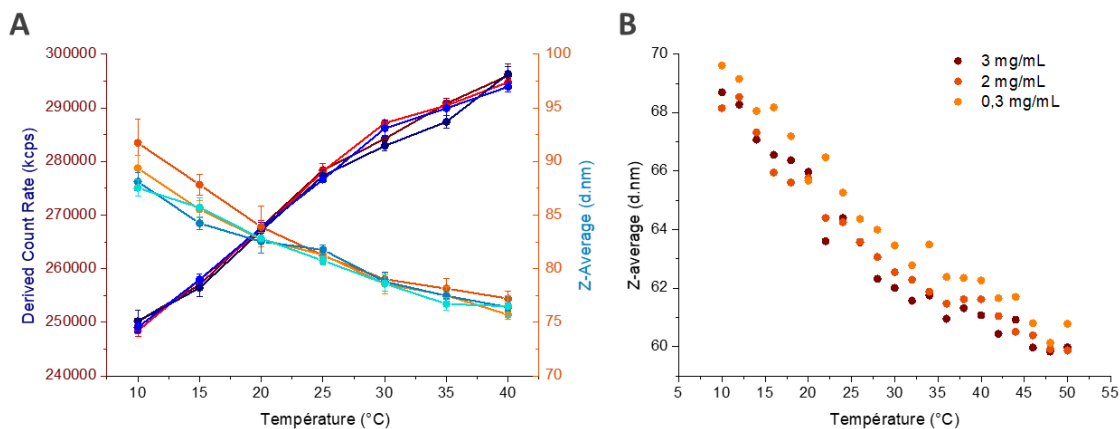
Annexe IV-5 : Caractérisation de la thermosensibilité par DLS. Évolution de l'intensité en fonction de la température et de la fonctionnalisation des méthionines d'un ELP en solution (3 mg/mL, TRISs/PBS). A : ELPn60 (bleu), ELPn60-g-alcyne (vert), ELPn60-g-N₃ (cyan). B : ELPn80 (orange), ELPn80-g-Bz⁽⁺⁾ (BrBz) (rouge), ou ELPn80-g-Bz⁽⁺⁾ (EPBz) (bordeaux).



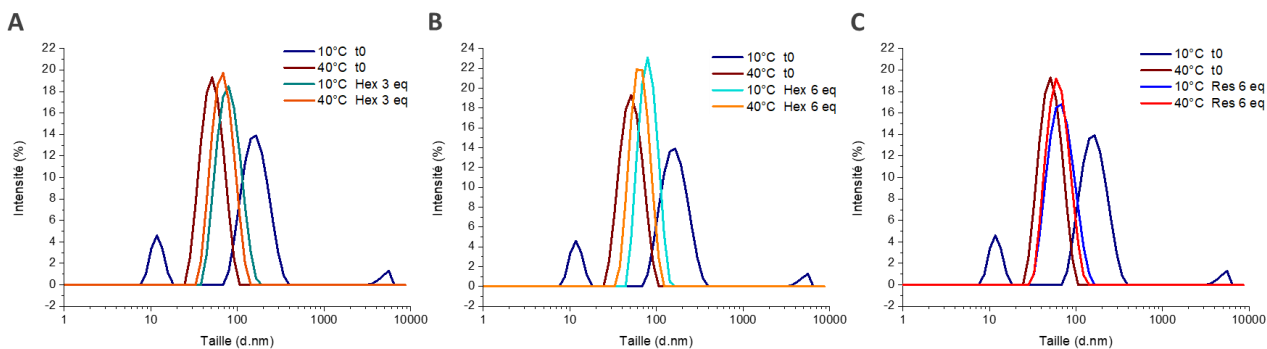
Annexe IV-6 : A : Introduction de groupements naphtalène le long de la chaîne par réaction de CuAAC. Les méthionines ont été préalablement fonctionnalisées avec un azoture et se trouvent sous forme neutre (haut, thioéther) ou chargée (bas, sulfonium). B : Obtention d'un composé ELPn80-g-naphtalène jaune et insoluble dans l'eau (dans les deux cas).



Annexe IV-7 : Comparaison des distributions de taille des nanoparticules réticulées formées par les bioconjugués HA_{24k}-ELPn80 (A) et HA_{42k}-ELPn80 (B) et leurs corrélogrammes associés à 5°C et à 50°C.



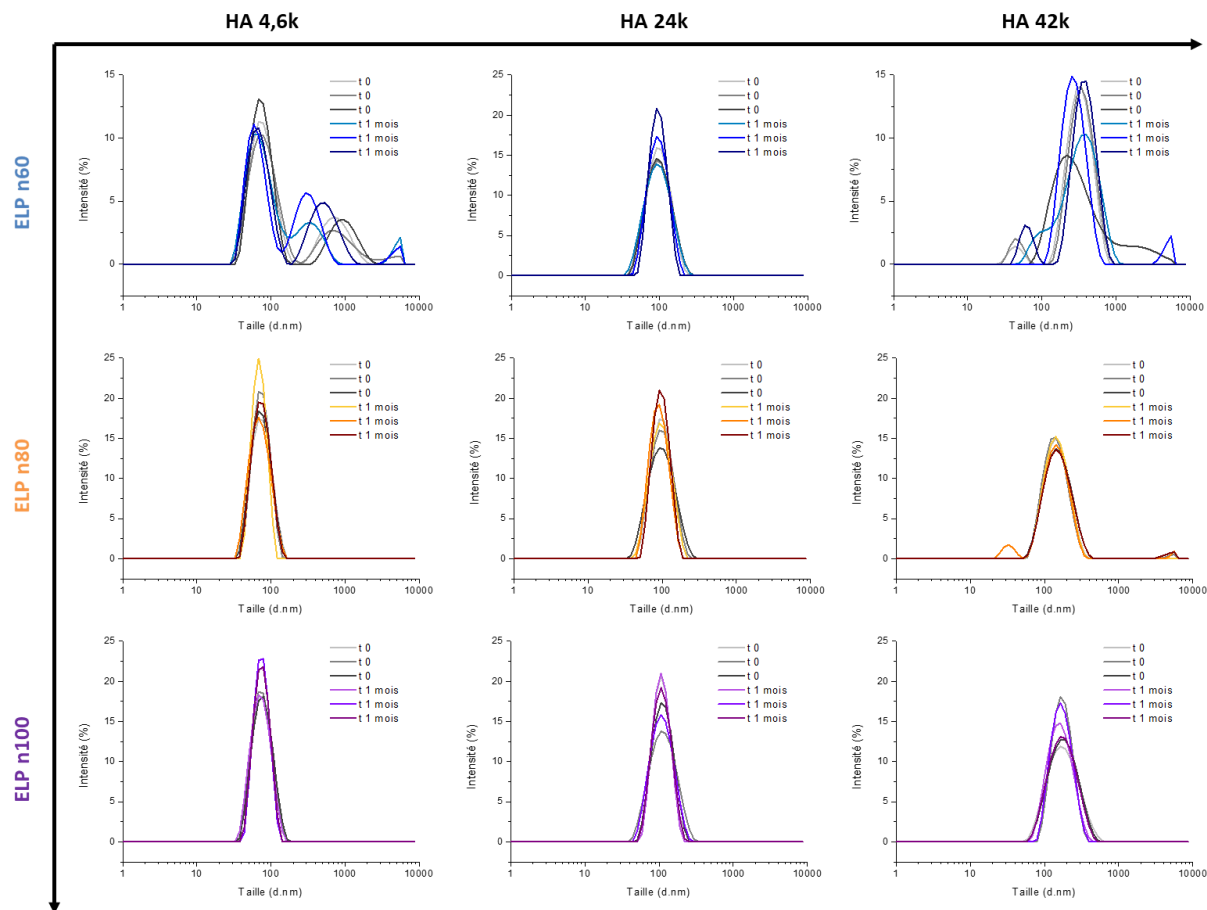
Annexe IV-8 : Caractérisation de la propriété de thermosensibilité de nanoparticules réticulées à base de bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 par DLS. A : Évolution de l'intensité diffusée (foncé) et de la taille des nanoparticules (clair) en fonction de la température (78 μM, PBS pH 5). 2 cycles de chauffage (rouge-orange) et de refroidissement (bleu-cyan) entre 10°C et 40°C. Les barres d'erreur représentent l'écart-type des 3 mesures consécutives de l'appareil. B : Évolution de la taille des nanoparticules en fonction de la température et de la concentration.



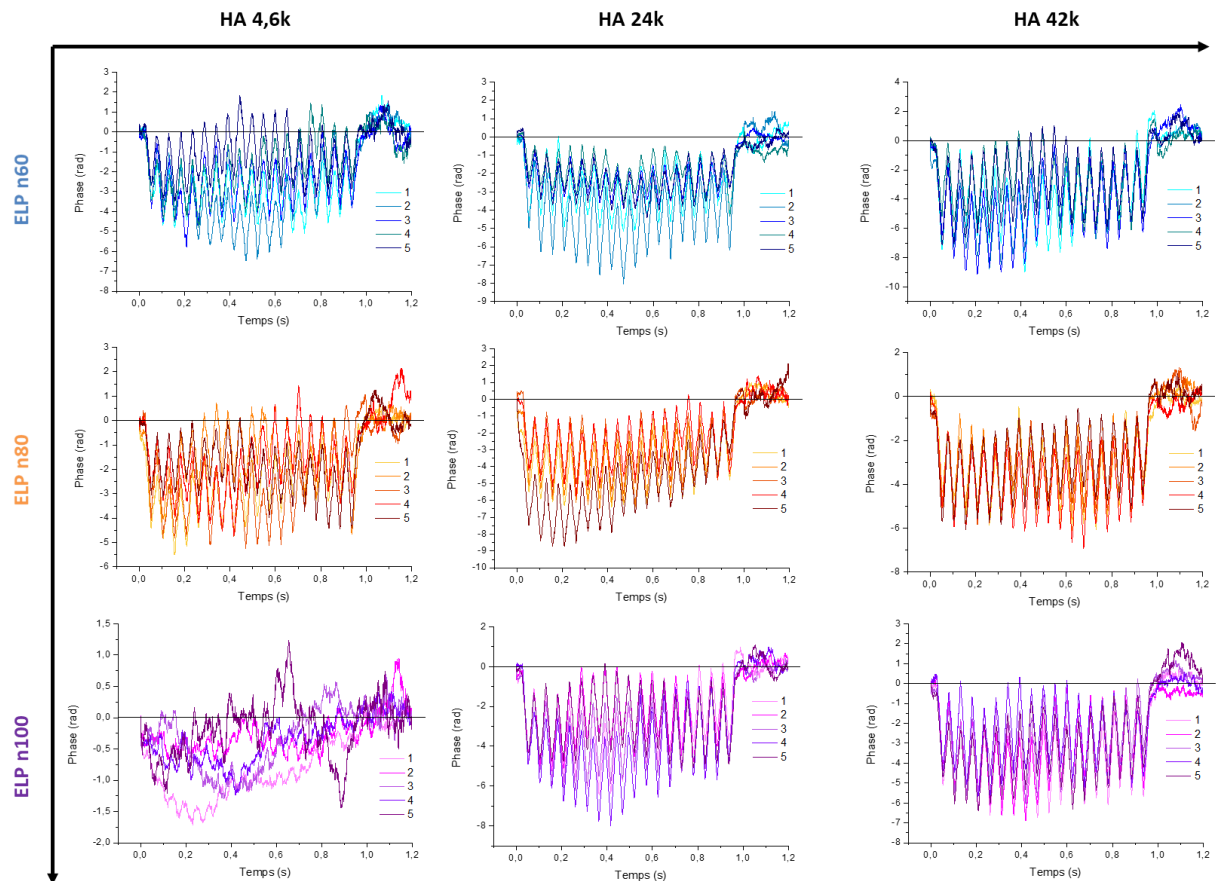
D

Réticulant	10°C		40°C	
	Z-average (d.nm)	Pdl	Z-average (d.nm)	Pdl
Avant réticulation	92,92	0,668	49,65	0,068
Hexanediol 3 eq	76,33	0,091	62,63	0,093
Hexanediol 6 eq	78,01	0,060	61,65	0,073
Résorcinol 6 eq	64,43	0,059	58,70	0,105

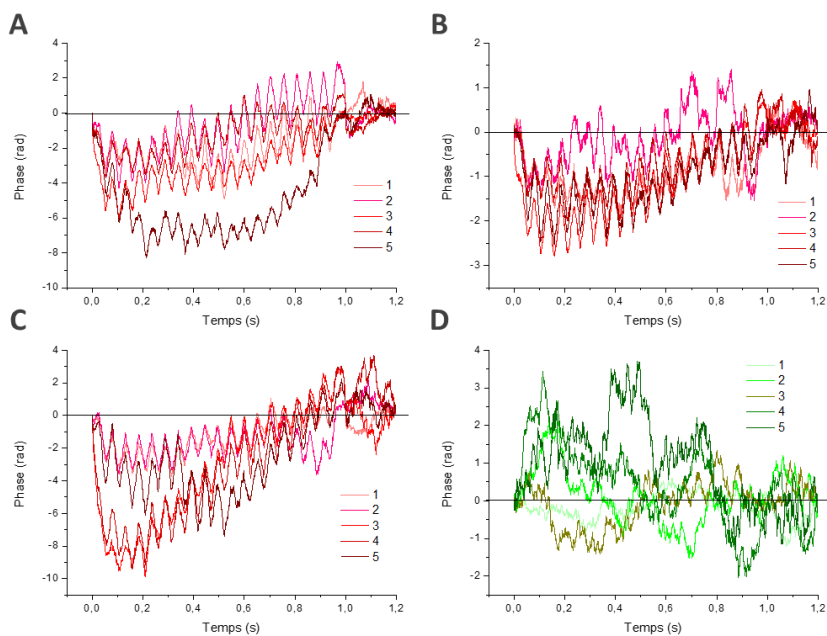
Annexe IV-9 : Variation de protocole de réticulation de nanoparticules de bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn80 (78 μM, PBS pH 5). A, B, C : distribution de taille avant et après réticulation à 10°C et 40°C. A : Réticulant : hexanediol diglycidyl éther, 3 équivalents par méthionine. B : protocole de référence. Réticulant : hexanediol diglycidyl éther, 6 équivalents par méthionine. C : Réticulant : résorcinol diglycidyl éther, 6 équivalents par méthionine. D : tableau récapitulatif de la taille et de la dispersité des nanoparticules après réticulation à 10°C et 40°C en fonction du protocole appliqué.



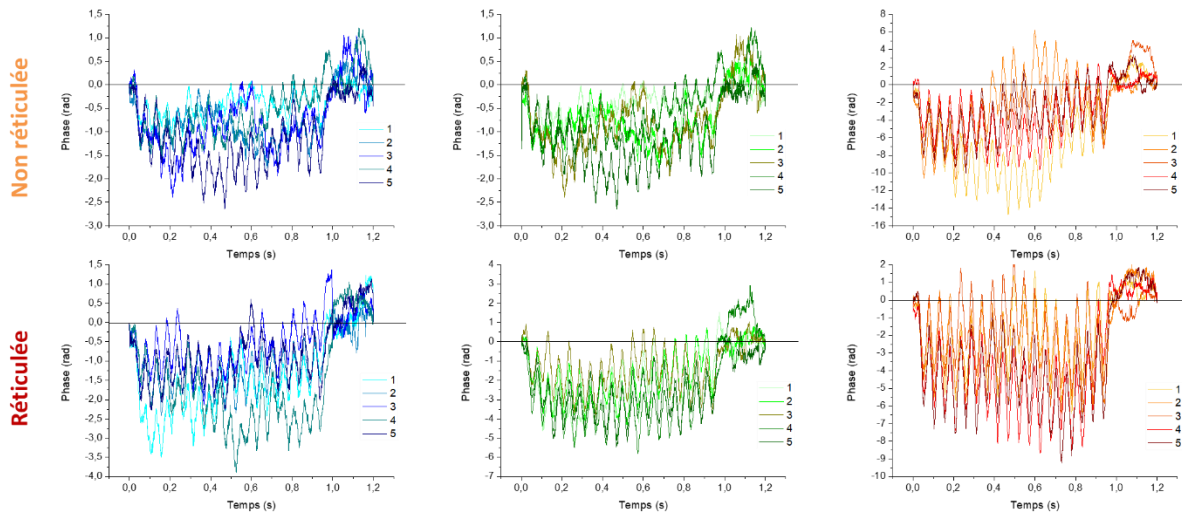
Annexe IV-10 : Stabilité des nanoparticules réticulées formées par les bioconjugués de la librairie en solution dans du PBS. Évolution de la distribution de taille juste après réticulation et après 1 mois de stockage en solution à 4°C. Pour les bioconjugués HA_{4,6k}/42k-ELPn60, la réticulation n'est pas parfaite et plusieurs populations sont présentes en solution.



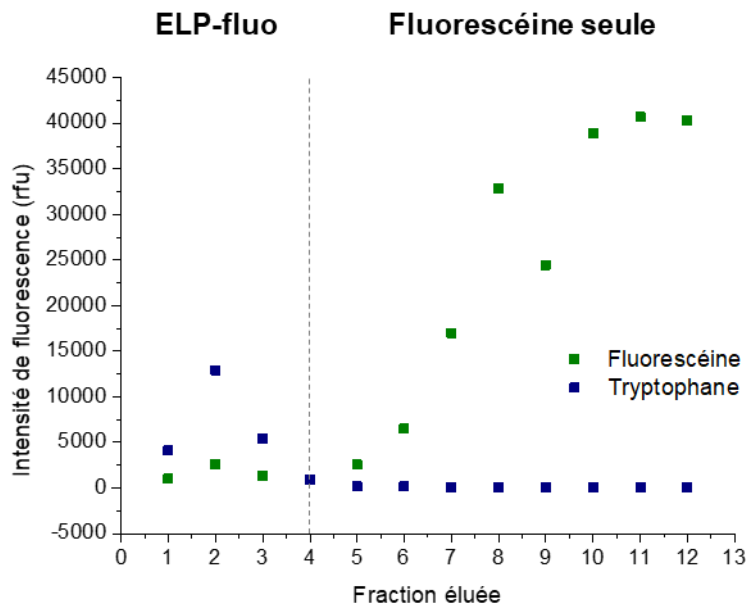
Annexe IV-11 : Mesures du potentiel zêta des nanoparticules de la librairie réticulées (7,8 μ M, PBS 30 mosm). Évolution de la phase en fonction du temps. HA_{4,6k}-ELPn100 : présence de trop d'agrégats pour obtenir des résultats fiables.



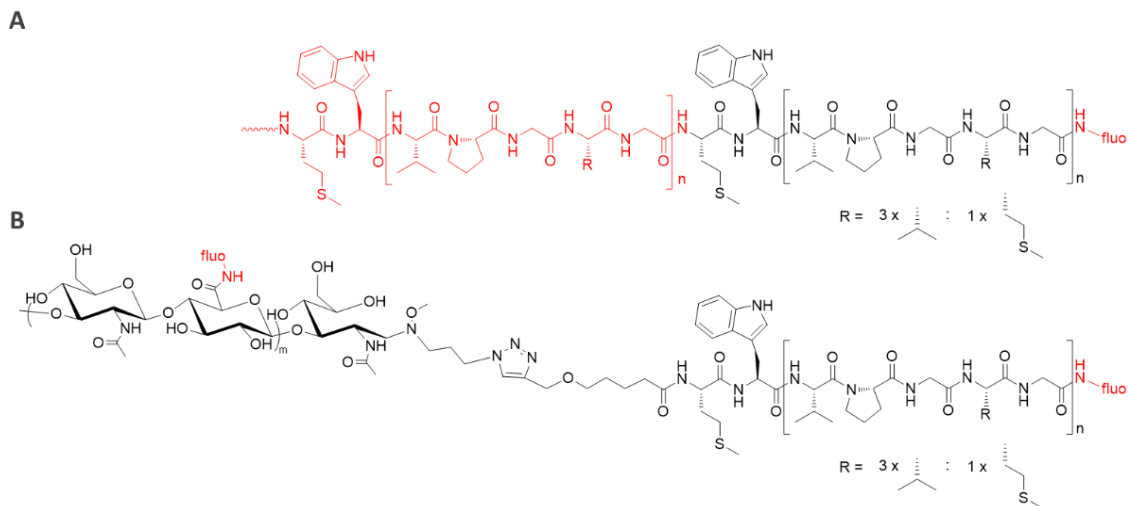
Annexe IV-12 : Mesures du potentiel zêta des espèces de référence (7,8 μ M, PBS 30 mosm). Évolution de la phase en fonction du temps. A : HA_{4,6k} B : HA_{24k} C : HA_{42k} D : PEG_{5k}-ELPn80.



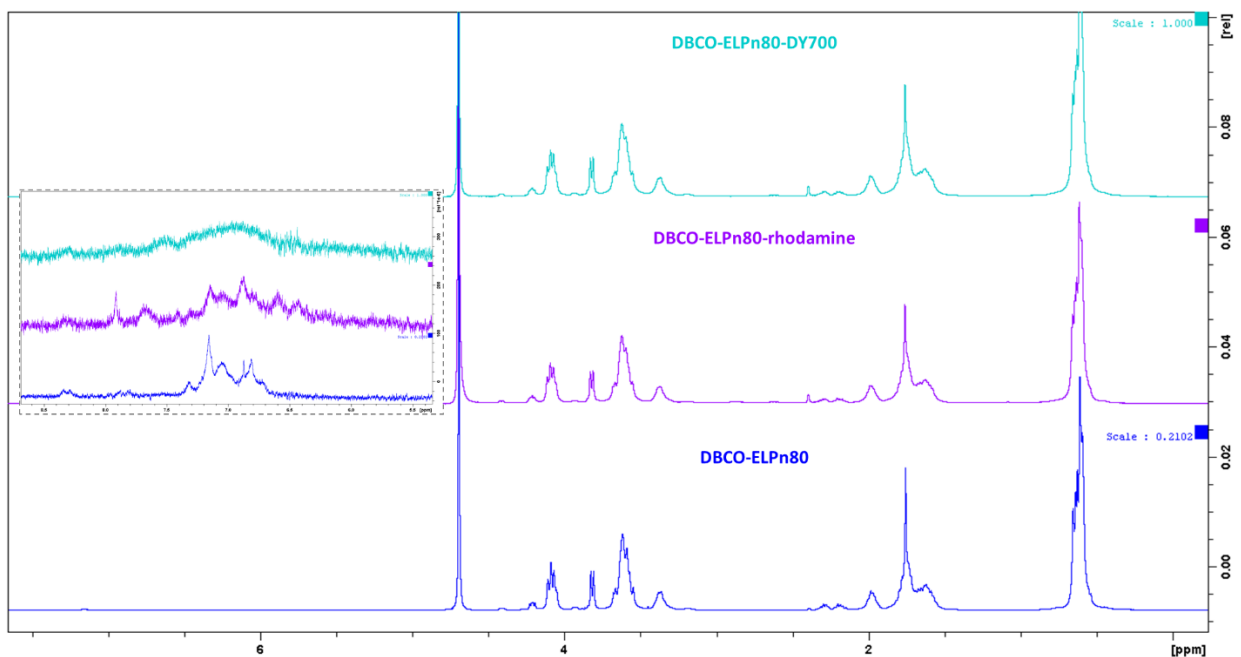
Annexe IV-13 : Mesures du potentiel zêta des nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn80 réticulées (bas) ou non (haut) à 5°C, 25°C et 50°C (de gauche à droite). Évolution de la phase en fonction du temps. (7,8 μM, PBS 30 mosm).



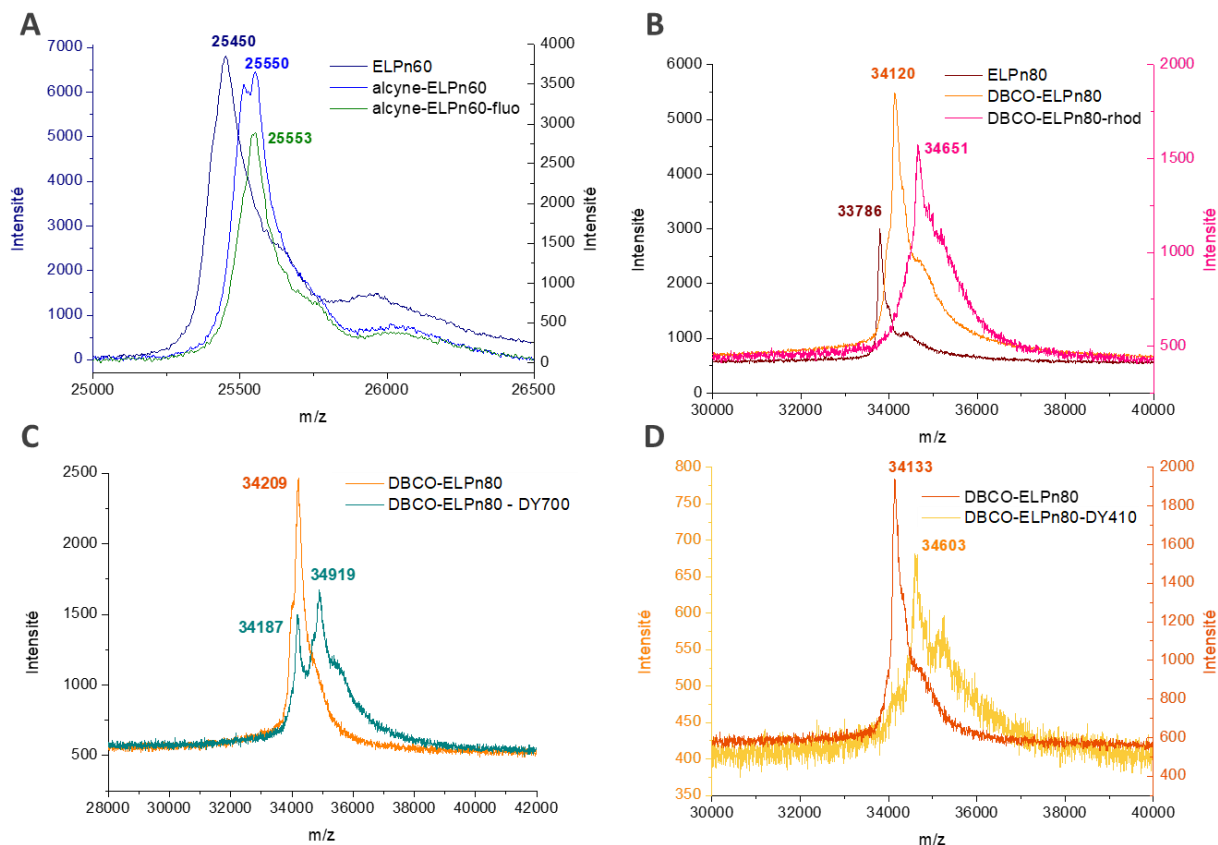
Annexe IV-14 : Purification par colonne Sephadex PD10 G25 de l'espèce alcyne-ELPn60 après fonctionnalisation par la fluorescéine. Analyse par spectroscopie de fluorescence des différentes fractions éluées à deux longueurs d'onde : tryptophane : $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 350 \text{ nm}$; fluorescéine : $\lambda_{ex} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$. Comparaison de l'intensité de fluorescence due au tryptophane (bleu) et à la fluorescéine (vert). Fractions 1-3 : présence des deux espèces fluorescentes, espèce alcyne-ELPn60-fluorescéine. Fractions 5-12 : seule la fluorescence de la fluorescéine est visible, fluorescéine en excès correctement séparée de l'ELP.



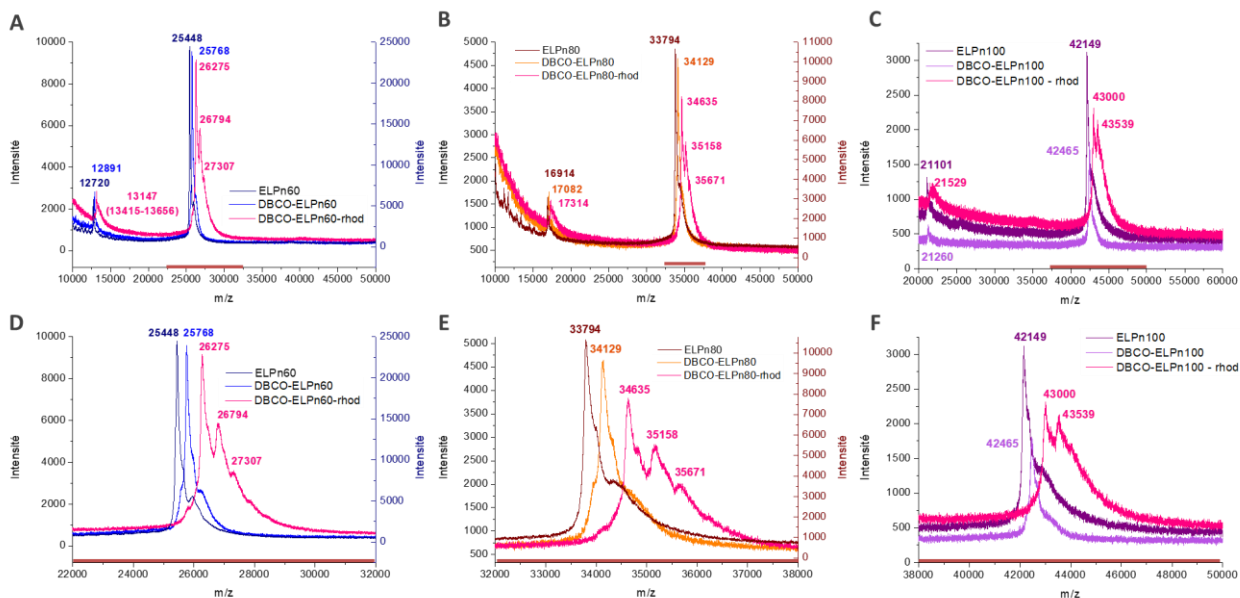
Annexe IV-15 : Illustration des problèmes liés à d'autres choix de voie de synthèse. A : l'ajout du fluorophore sur l'extrémité C-terminale sans protection préalable de l'amine peut entraîner une polymérisation de l'ELP par réaction des groupements COOH et NH₂ des deux extrémités. B : La fonctionnalisation de l'extrémité C-terminale d'un bioconjugué HA-ELP risque d'entraîner celle des groupements COOH présents sur le HA, ce qui pourrait gêner l'interaction ligand-récepteur.



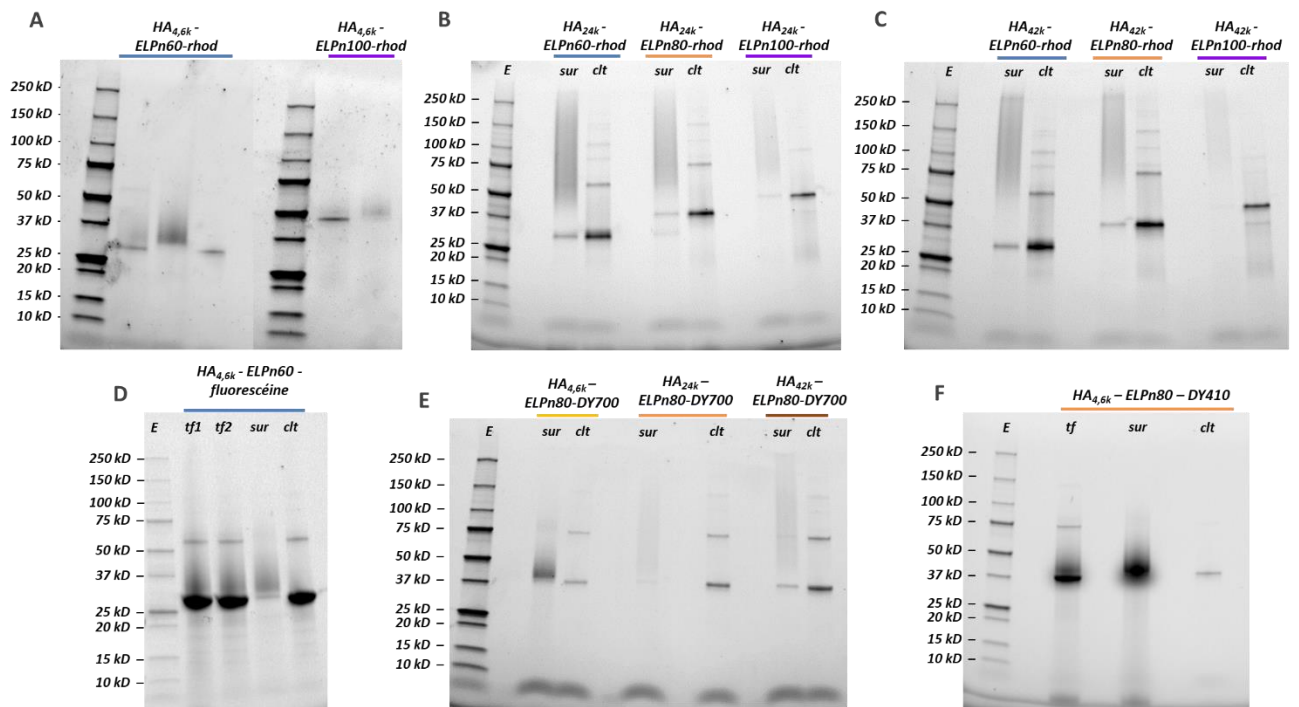
Annexe IV-16 : Spectres RMN ¹H de l'espèce DBCO-ELPn80 (bleu) et de ses versions fonctionnalisées avec la rhodamine (violet) et le DY700 (cyan). Encart : zoom sur les protons aromatiques. Tous ces composés présentent une oxydation des méthionines (1 méthionine oxydée pour le DBCO-ELPn80, 3 après fonctionnalisation).



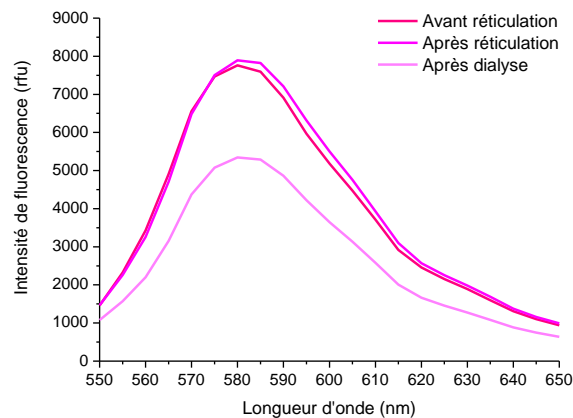
Annexe IV-17 : Zoom sur la zone d'intérêt des spectres de masse MALDI des composés alcyne-ELPn60 (A) et DBCO-ELPn80 (B, C, D) avant et après fonctionnalisation de l'extrémité C-terminale par différents fluorophores. A : alcyne-ELPn60-fluorescéine. B : DBCO-ELPn80-rhodamine. C : DBCO-ELPn80-DY700. D : DBCO-ELPn80-DY410.



Annexe IV-18 : Spectres de masse MALDI des composés DBCO-ELPn60, 80, 100 (resp. A, B, C) avant et après fonctionnalisation de l'extrémité C-terminale par la TAMRA Lumiprobe. La zone indiquée en rouge sur l'axe des abscisses correspond à la zone détaillée en dessous (D, E, F). Présence de plusieurs pics écartés d'environ 500 g/mol, traduisant l'addition multiple de rhodamine sur ces composés.



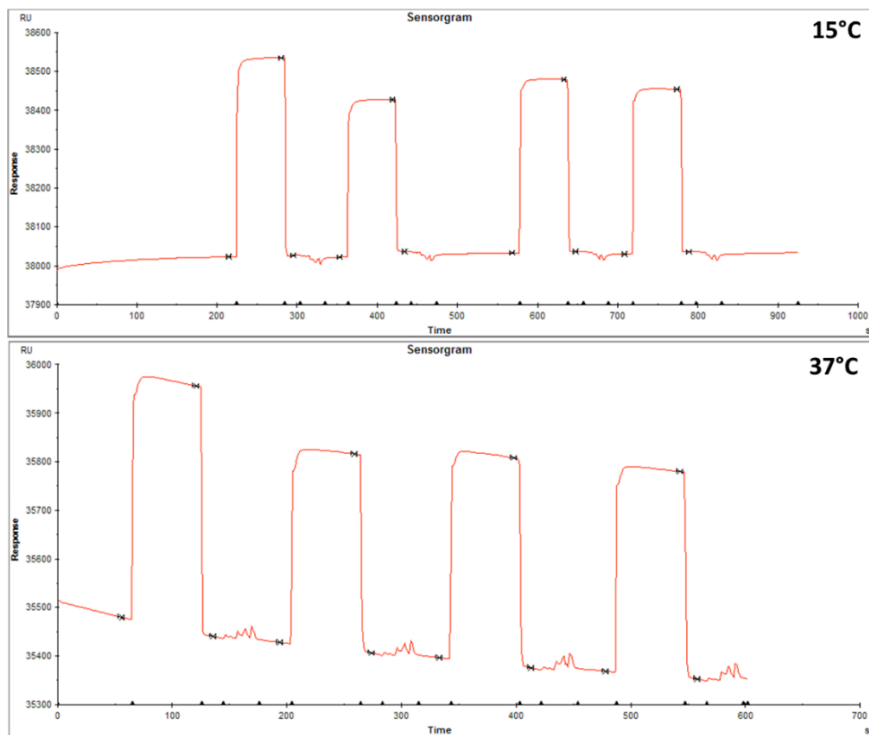
Annexe IV-19 : Caractérisation par gel d'électrophorèse (SDS-Page) de la synthèse par SPAAC des bioconjugués HA-ELP-rhodamine (A, B, C), HA_{4,6k}-ELPn60-fluoresceine (D), HA-ELPn80-DY700 (E) et HA_{4,6k}-ELPn80-DY410 (F). E : échelle de taille ; tf : milieu réactionnel avant purification ; sur : surnageant après purification ; clt : culot après purification.



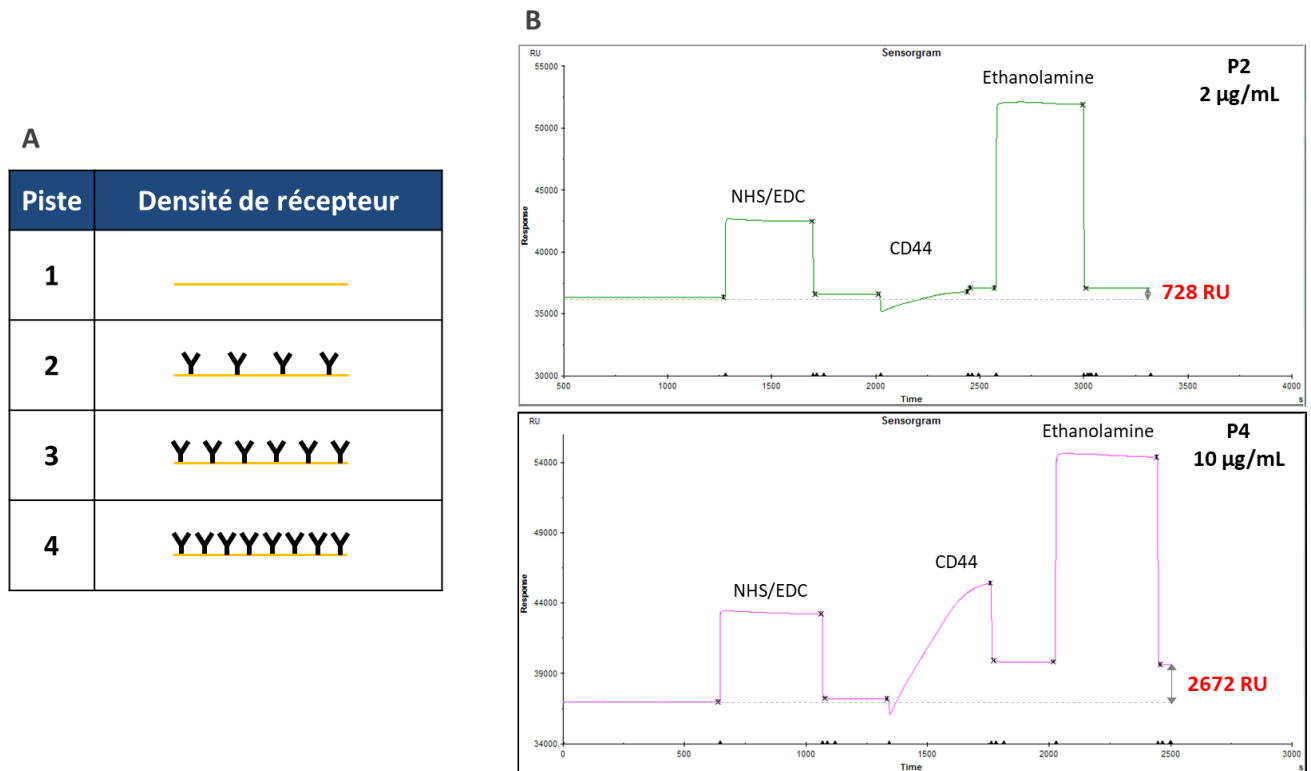
Annexe IV-20 : Illustration de l'évolution de l'intensité de fluorescence d'un co-assemblage de HA_{4,6k}-ELPn80 (25% rhodamine) au cours de l'étape de réticulation. Si la réticulation ne semble pas avoir d'influence, la dialyse entraîne une forte diminution de l'intensité de fluorescence.

Puce	Avantages	Inconvénients
CM5 Biacore (NH ₂)	Peu chère Récepteur natif Peu de récepteur utilisé (1 immobilisation par piste pour toute la série)	Liaison covalente (amide) : → mauvaise orientation du récepteur possible → pas de régénération de la surface → vieillissement de la surface à mesure de la session → pas de changement de densité possible après immobilisation Puce non réutilisable une fois sortie de l'appareil
NTA Xantec (Ni ²⁺)	Liaison non covalente entre Ni ²⁺ et le tag His → orientation souple du récepteur → tous les récepteurs sont disponibles pour l'interaction → régénération totale de la surface, pas de vieillissement du récepteur → changement de densité possible entre deux expériences Meilleur contrôle de la densité de récepteur immobilisé Possibilité de réutiliser la puce (≈100 cycles)	Onéreuse Récepteur modifié (tag Histidine) Régénération totale de la surface : → pas reproductible d'une fois sur l'autre → consommation importante du récepteur → dégradation du récepteur, immobilisation différente à chaque échantillon

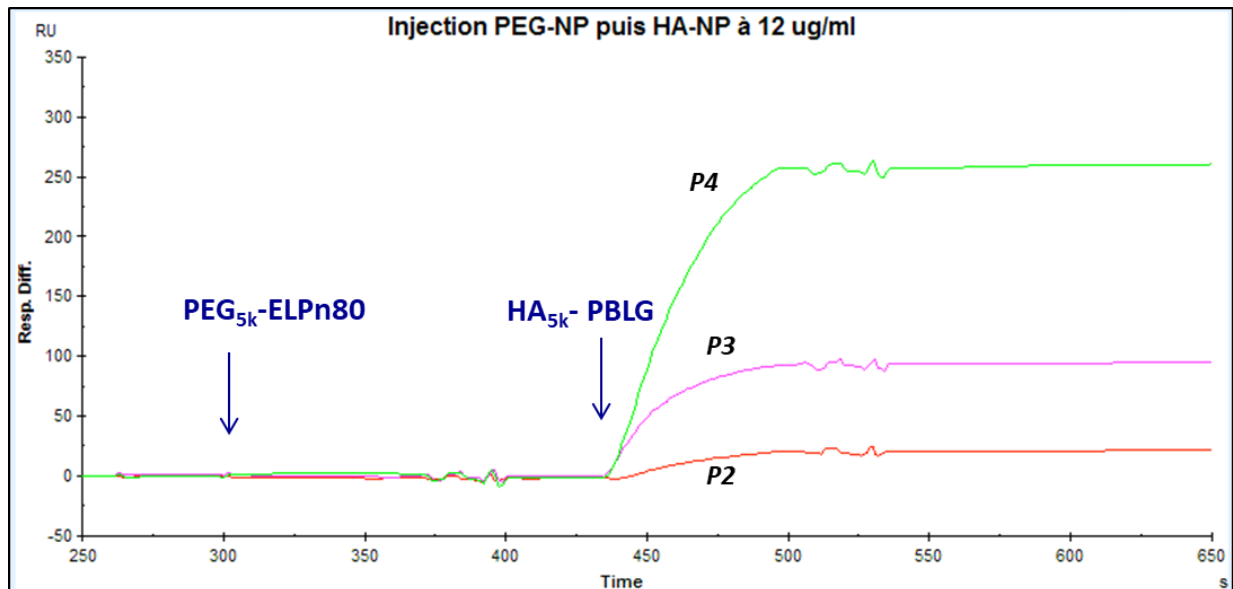
Annexe IV-21 : Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients liés aux deux puces utilisées dans ces travaux pour les expériences de SPR.



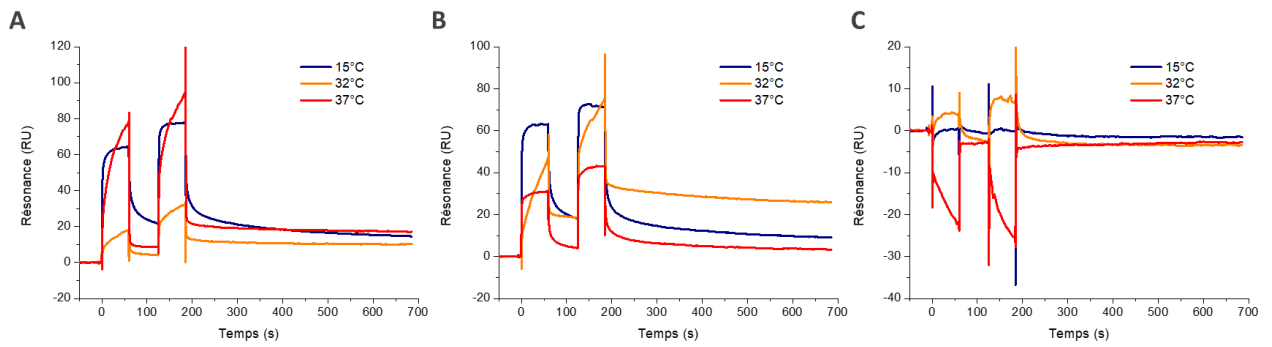
Annexe IV-22 : Tests d'interaction non spécifique : passage des échantillons sur une puce CM5 nue (sans CD44) à 15°C et 37°C. Retour à la ligne de base à la fin de l'injection, pas d'interaction non spécifique.



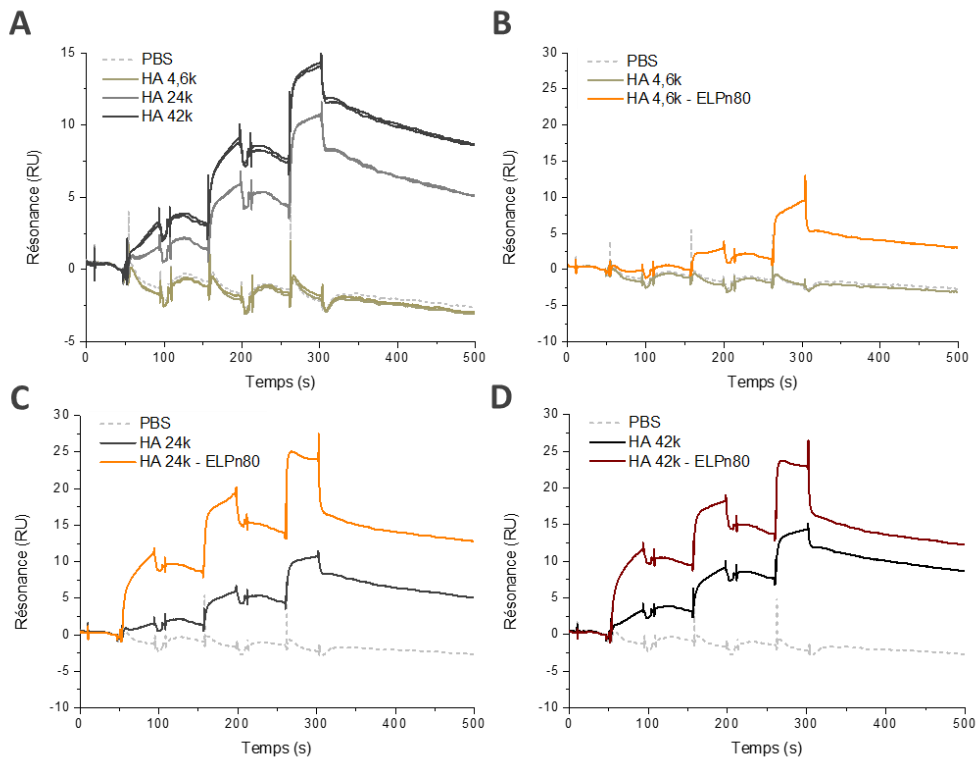
Annexe IV-23 : Immobilisation du CD44 sur une puce CM5. A : Représentation schématique des quantités de récepteur immobilisées sur chaque piste. La densité de greffage en surface est contrôlée par la concentration de la solution de CD44 libre injectée. B : Exemples de spectres obtenus pour l’immobilisation du CD44. Sur la piste 2 (haut) : préparation de la puce par injection d’une solution de EDC/NHS pendant 500s. Après un rinçage au tampon de base (PBS), injection d’une solution de CD44 à 2 µg/mL (AcNa, pH 4) pendant 400s. Nouveau rinçage puis injection d’une solution d’éthanolamine. A la fin, l’immobilisation covalente de CD44 correspond à 728 RU. Sur la piste 4 (bas) : idem, sauf injection d’une solution de CD44 à 10 µg/mL. À la fin, l’immobilisation covalente de CD44 correspond à 2672 RU.



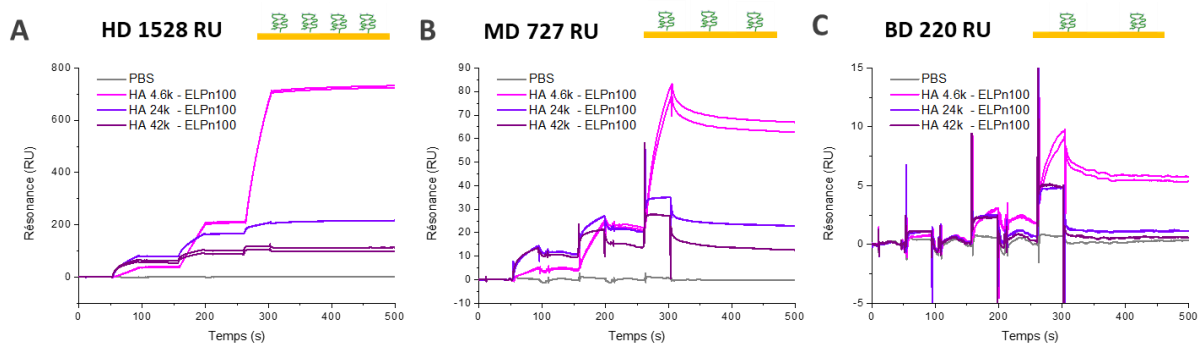
Annexe IV-24 : Sensorgramme des références lors de l’injection à 32°C sur puce CM5 (CD44 : P2 : 728 RU, P3 : 200 RU*, P4 : 2672 RU). Injection d’une solution de bioconjugués PEG_{5k}-ELPn80 à 12 µg/mL → pas d’interaction avec le CD44. Injection des nanoparticules HA_{5k}-PBLG précédemment étudiées à 12 µg/mL → interaction forte avec la surface, dissociation très lente.



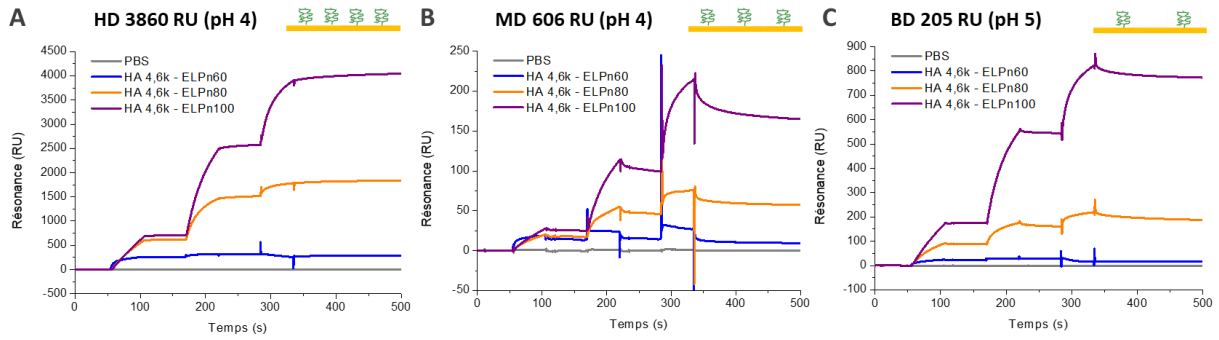
Annexe IV-25 : Sensorgrammes à 15°C, 32°C, et 37°C des nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn80 (Cu), HA_{4,6k}-ELPn80_{ox} (Cu), et PEG_{5k}-ELPn80 (Cu) non réticulées. Puce CM5, Piste 4 : 2672 RU de CD44.



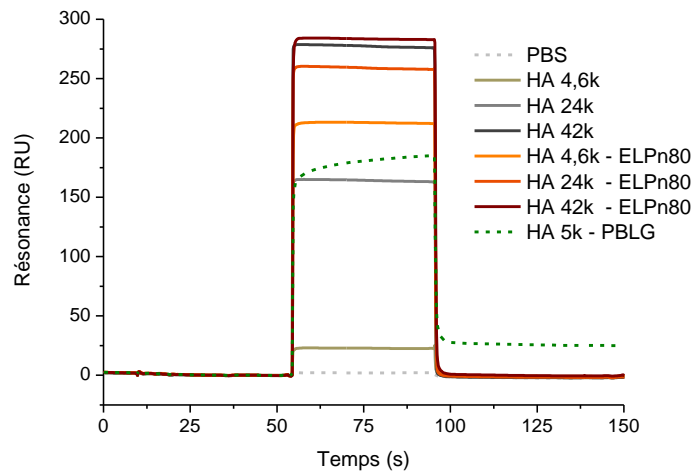
Annexe IV-26 : Comparaison par SPR de l'interaction HA-CD44 pour le HA libre et les nanoparticules réticulées à base de bioconjugués HA-ELPn80 correspondantes. Méthode SCK : injections successives à 3 concentrations croissantes (1,6 µM, 11 µM, 78 µM). A : Injection des solutions de HA_{4,6k-24k-42k} libres (référence). B, C, D : comparaison de l'interaction entre le HA libre et la nanoparticule pour le HA_{4,6k}, HA_{24k} et HA_{42k} respectivement.



Annexe IV-27 : Influence de la densité de CD44 sur l'interaction avec les nanoparticules. Sensorgrammes de SPR obtenus pour des solutions de nanoparticules réticulées à base des bioconjugués HA-ELPn100 dans un tampon PBS. Méthode SCK : injections successives à 3 concentrations croissantes (1,6 µM, 11 µM, 78 µM). HD : haute densité de CD44 immobilisé (1528 RU), MD : densité médium (727 RU), BD : basse densité (220 RU).



Annexe IV-28 : Influence du pH d’immobilisation sur l’affinité avec le ligand. Méthode SCK : injections successives à 3 concentrations croissantes (1,6 μ M, 11 μ M, 78 μ M). A, B : immobilisation à pH 4 pour une haute densité (3860 RU) et une densité moyenne (606 RU) de CD44. C : immobilisation à pH 5 pour une densité faible (205 RU) de CD44. Interaction plus forte en C qu’en B malgré une densité plus faible \rightarrow un pH d’immobilisation trop acide abime le CD44, qui ne peut plus interagir avec le HA.

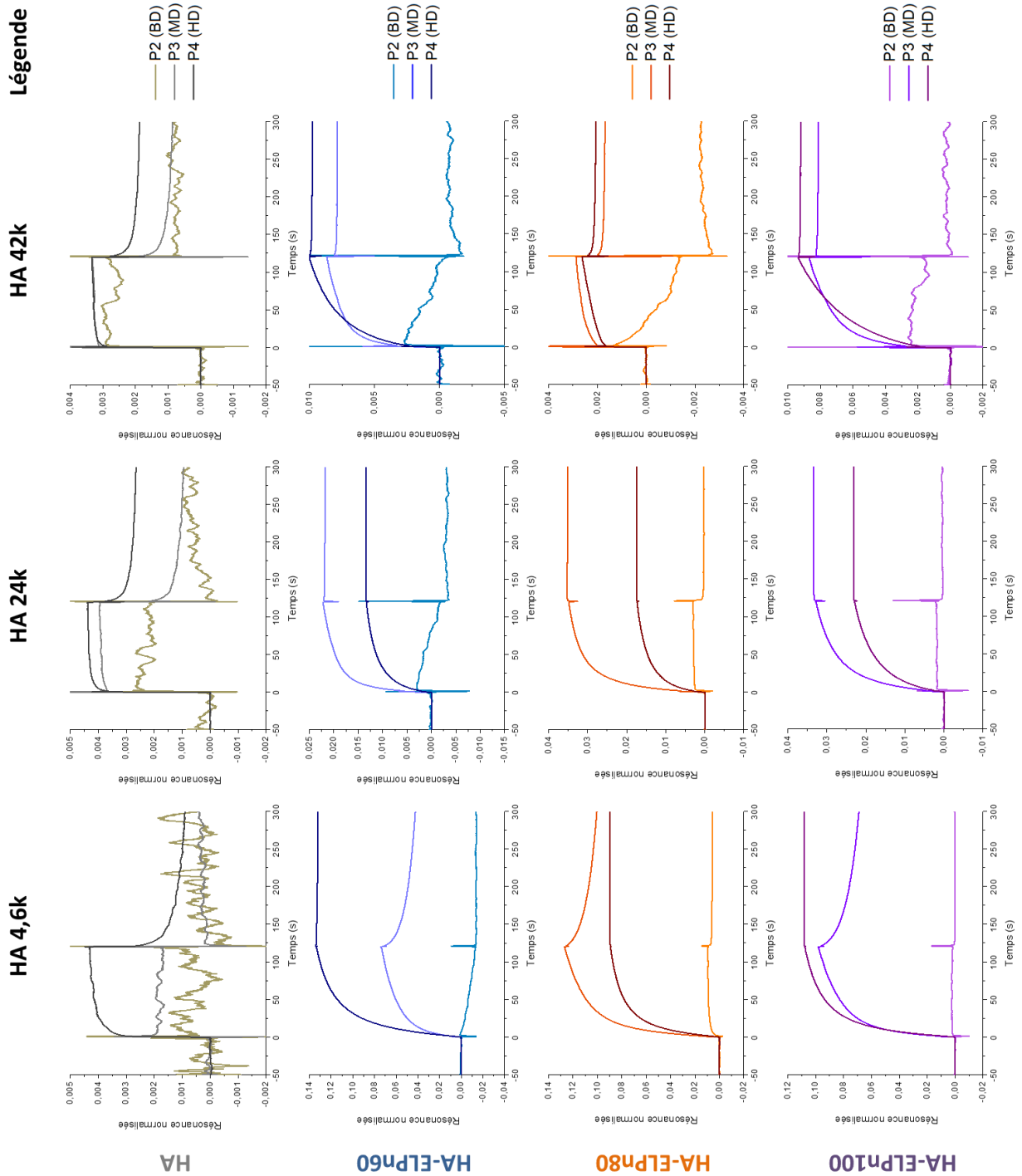


Annexe IV-29 : Sensorgramme des tests d’interaction non spécifique sur la puce NTA (Ni^{2+}) nue. Pas d’interaction exceptée pour les nanoparticules témoins HA_{5k} -PBLG.

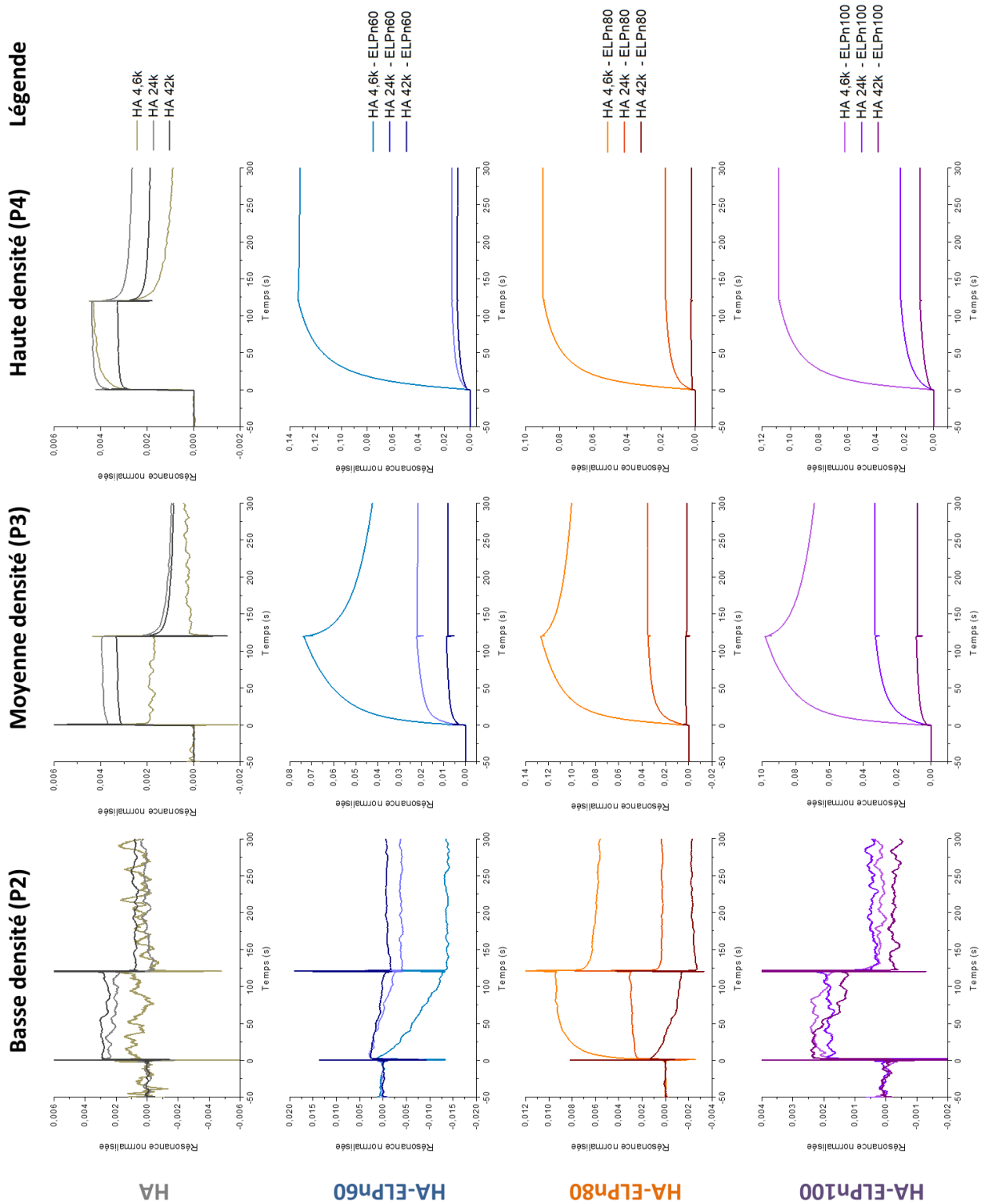
Immobilisation CD44 (RU)	P2 (10 nM)			P3 (50 nM)			P4 (200 nM)			Ordre d’injection
Exp 1	4,6	24	42	4,6	24	42	4,6	24	42	
HA	25	16	12	205	203	183	820	615	513	A'
HA-ELPn60	8	6	5	170	160	150	475	450	430	B'
HA-ELPn80	39	26	17	216	210	195	840	760	645	A
HA-ELPn100	12	8	6	184	172	160	560	495	458	B

Immobilisation CD44 (RU)	P2 (25 nM)			P3 (50 nM)			P4 (250 nM)			Ordre d’injection
Exp 2	4,6	24	42	4,6	24	42	4,6	24	42	
HA	50	45	42	137	130	125	580	505	475	B
HA-ELPn60	36	30	25	140	130	113	565	505	466	B'
HA-ELPn80	80	64	52	170	164	105	915	845	685	A
HA-ELPn100	110	60	45	237	180	150	1090	890	664	A'

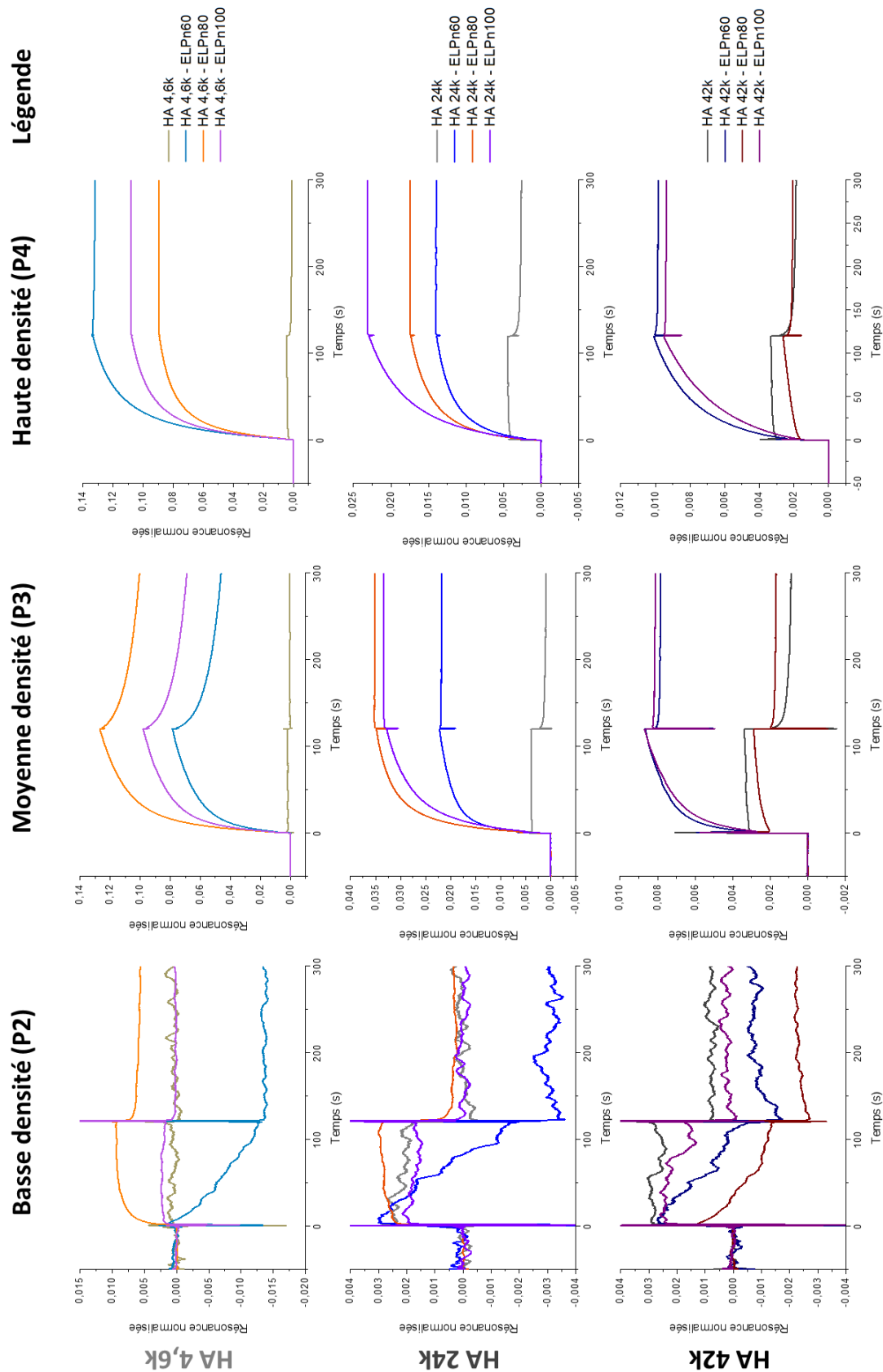
Annexe IV-30 : Tableau rassemblant les valeurs d’immobilisation du CD44 (en RU) pour chaque échantillon et chaque piste lors des 2 expériences menées. Chacune d’entre elles a été découpée en 2 séries AB et A'B' avec renouvellement de la solution de CD44 entre elles. Au sein de chaque série, les échantillons ont été analysés dans l’ordre $HA_{4,6k}$ -ELP_A, HA_{24k} -ELP_A, HA_{42k} -ELP_A puis $HA_{4,6k}$ -ELP_B, HA_{24k} -ELP_B, HA_{42k} -ELP_B. En revanche, l’immobilisation et l’analyse a lieu quasi simultanément sur les 3 pistes. Une diminution de la quantité de CD44 immobilisé est observée au fur et à mesure des cycles (représentée par des flèches dans le tableau 1, non représentée dans le tableau 2 pour une meilleure lisibilité des données). Pour l’expérience 2, la densité de CD44 visée pour les pistes 2 et 4 est légèrement plus élevée que lors de l’expérience 1 (concentration de la solution de CD44 plus grande).



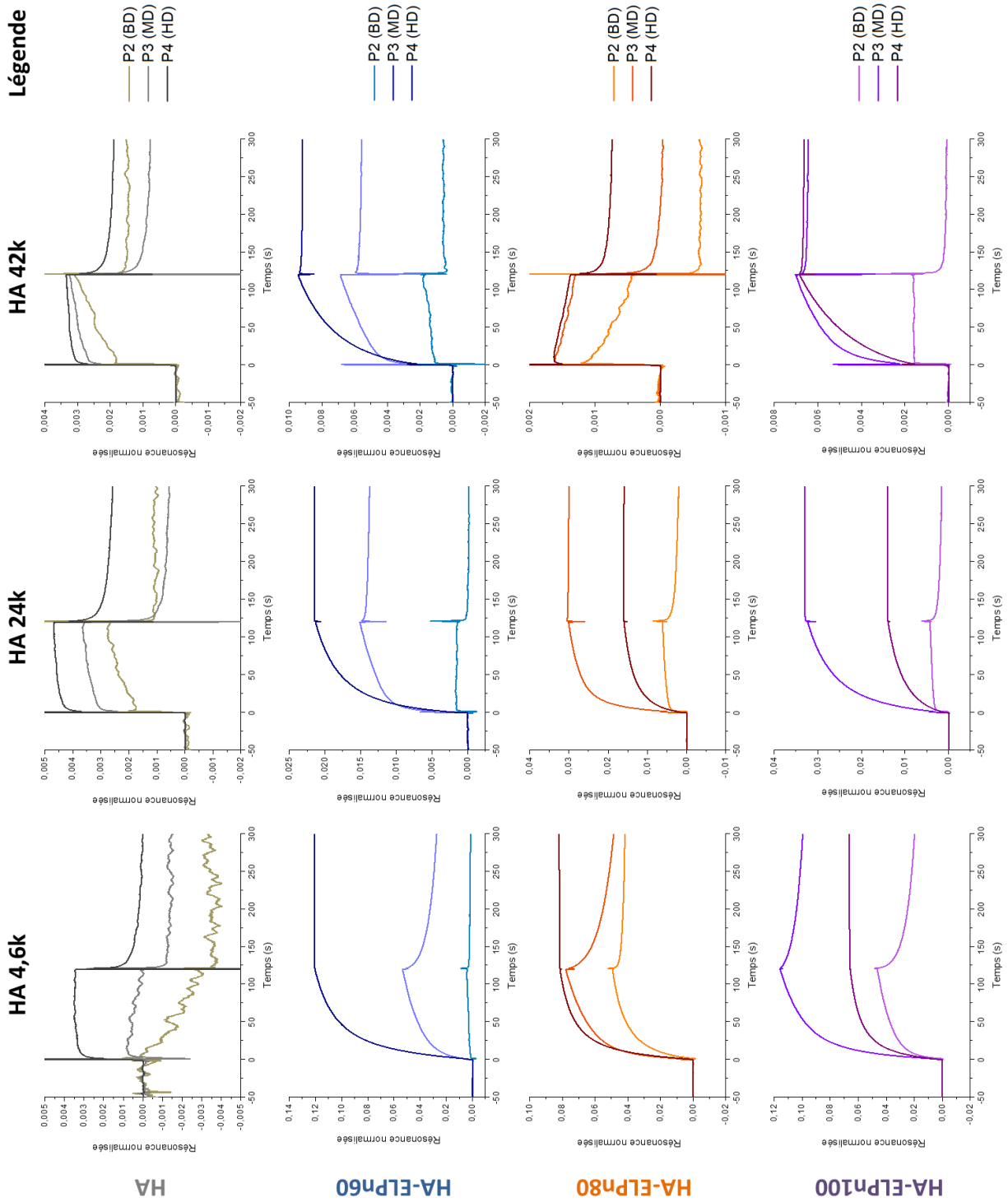
Annexe IV-31 : Expérience 1. Influence de la densité de CD44 sur son interaction avec le HA libre ou des nanoparticules réticulées à base des bioconjugués HA-ELP de la librairie (78 μ M, PBS). Puce NTA, 25°C. Résonance doublement normalisée par la valeur de la ligne de base avant injection et par la masse molaire du bioconjugué. P2 : basse densité (< 40 RU), P3 : densité moyenne (150-210 RU), P4 : haute densité (> 430 RU). **Attention : la normalisation par la valeur de la ligne de base avant injection entraine un biais : les valeurs de P4 étant divisées par un nombre beaucoup plus grand, elles sont artificiellement plus basses qu'elles ne devraient. Les valeurs négatives sont dues à des interactions non spécifiques sur la piste de référence (Piste 1, sans CD44).**



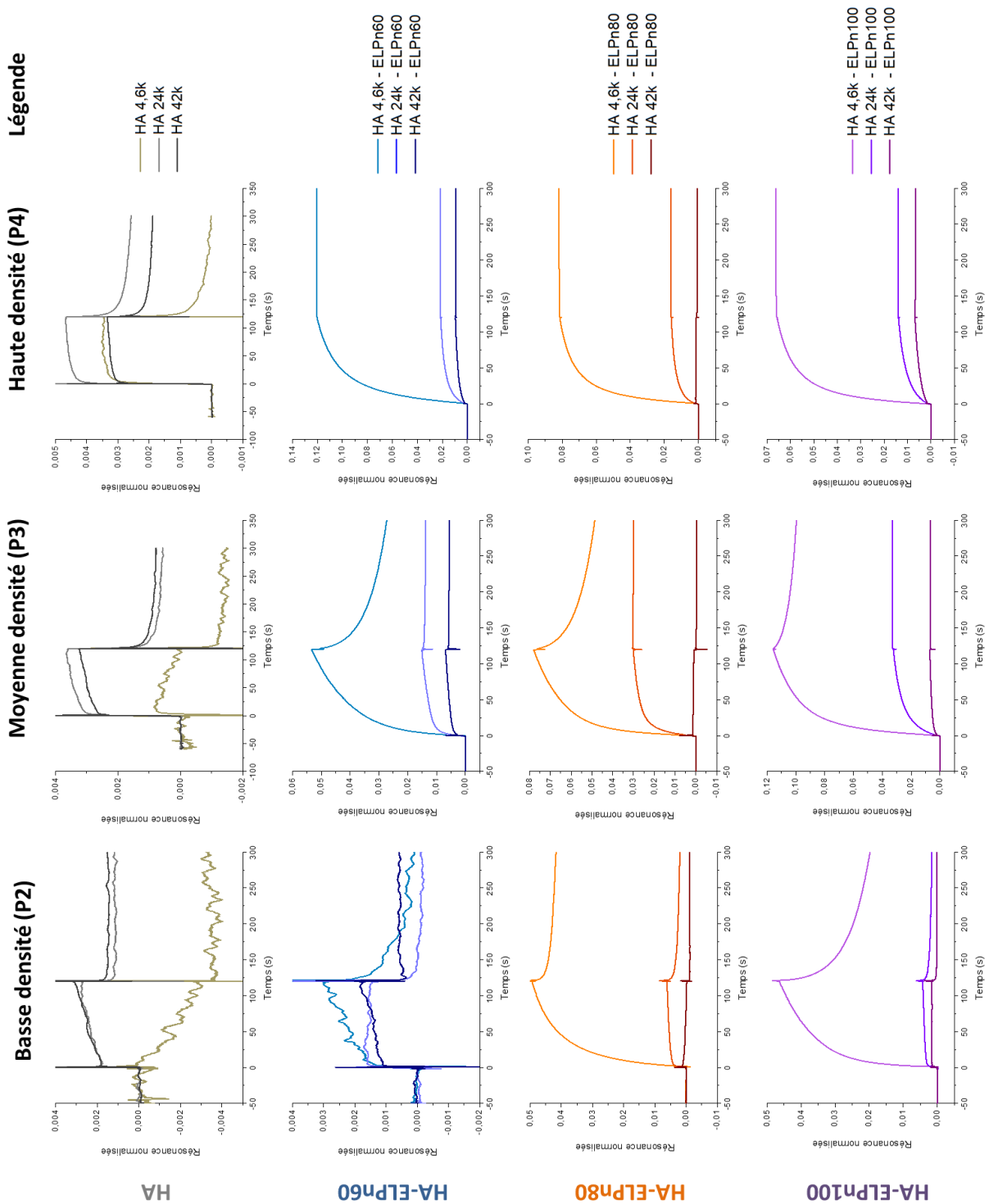
Annexe IV-32 : Expérience 1. Influence de la masse molaire du HA sur l’affinité entre le CD44 et le HA libre ou des nanoparticules réticulées à base des bioconjugués HA-ELP de la librairie (78 μ M, PBS). Puce NTA, 25°C. Résonance doublement normalisée par la valeur de la ligne de base avant injection et par la masse molaire du bioconjugué. P2 : basse densité (< 40 RU), P3 : densité moyenne (150-210 RU), P4 : haute densité (> 430 RU). **Attention : la normalisation par la valeur de la ligne de base avant injection entraine un biais : les valeurs de P4 étant divisées par un nombre beaucoup plus grand, elles sont artificiellement plus basses qu’elles ne devraient. Les valeurs négatives sont dues à des interactions non spécifiques sur la piste de référence (Piste 1, sans CD44).**



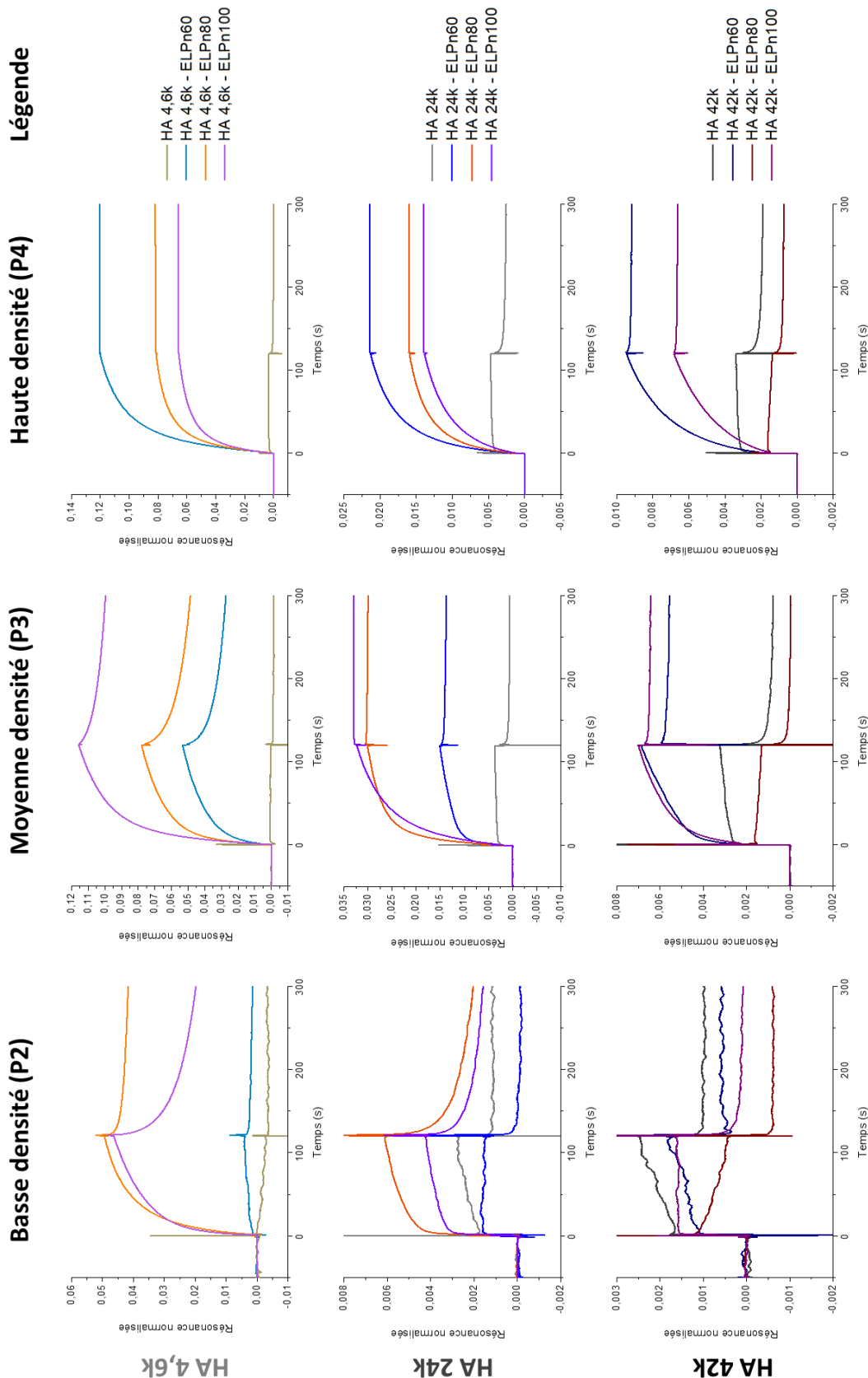
Annexe IV-33 : Expérience 1. Influence de la masse molaire de l'ELP sur l'affinité entre le CD44 et le HA libre ou des nanoparticules réticulées à base des bioconjugués HA-ELP de la librairie (78 μ M, PBS). Puce NTA, 25°C. Résonance doublement normalisée par la valeur de la ligne de base avant injection et par la masse molaire du bioconjugué. P2 : basse densité (< 40 RU), P3 : densité moyenne (150-210 RU), P4 : haute densité (> 430 RU). **Attention : la normalisation par la valeur de la ligne de base avant injection entraîne un biais : les valeurs de P4 étant divisées par un nombre beaucoup plus grand, elles sont artificiellement plus basses qu'elles ne devraient. Les valeurs négatives sont dues à des interactions non spécifiques sur la piste de référence (Piste 1, sans CD44).**



Annexe IV-34 : Expérience 2. Influence de la densité de CD44 sur son interaction avec le HA libre ou des nanoparticules réticulées à base des bioconjugués HA-ELP de la librairie (78 μ M, PBS). Puce NTA, 25°C. Résonance doublement normalisée par la valeur de la ligne de base avant injection et par la masse molaire du bioconjugué. P2 : basse densité (< 110 RU), P3 : densité moyenne (110-240 RU), P4 : haute densité (> 465 RU). **Attention : la normalisation par la valeur de la ligne de base avant injection entraine un biais : les valeurs de P4 étant divisées par un nombre beaucoup plus grand, elles sont artificiellement plus basses qu'elles ne devraient. Les valeurs négatives sont dues à des interactions non spécifiques sur la piste de référence (Piste 1, sans CD44).**



Annexe IV-35 : Expérience 2. Influence de la masse molaire du HA sur l’affinité entre le CD44 et le HA libre ou des nanoparticules réticulées à base des bioconjugués HA-ELP de la librairie (78 μ M, PBS). Puce NTA, 25°C. Résonance doublement normalisée par la valeur de la ligne de base avant injection et par la masse molaire du bioconjugué. P2 : basse densité (< 110 RU), P3 : densité moyenne (110-240 RU), P4 : haute densité (> 465 RU). **Attention : la normalisation par la valeur de la ligne de base avant injection entraîne un biais : les valeurs de P4 étant divisées par un nombre beaucoup plus grand, elles sont artificiellement plus basses qu’elles ne devraient. Les valeurs négatives sont dues à des interactions non spécifiques sur la piste de référence (Piste 1, sans CD44).**



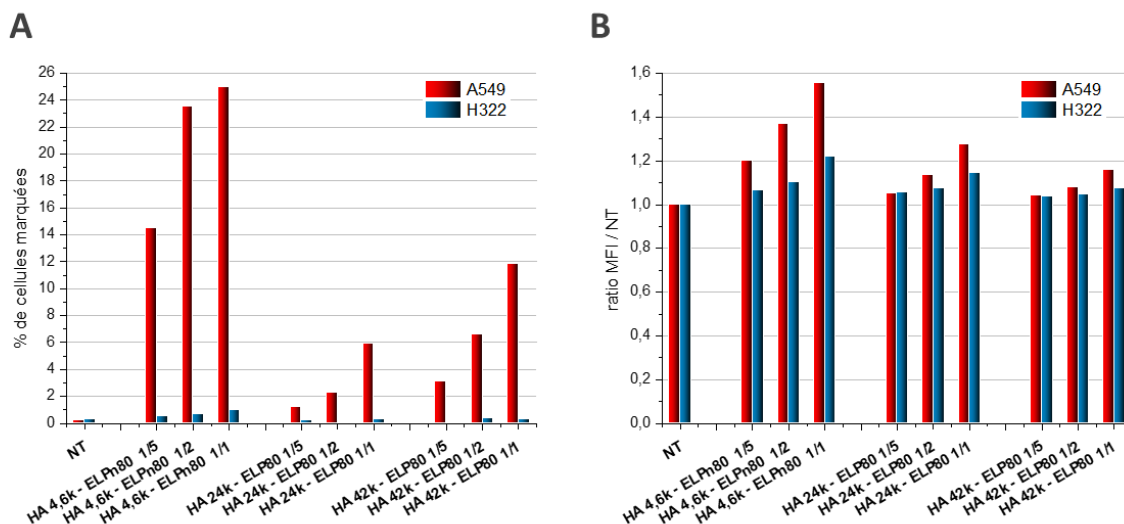
Annexe IV-36 : Expérience 2. Influence de la masse molaire de l'ELP sur l'affinité entre le CD44 et le HA libre ou des nanoparticules réticulées à base des bioconjugués HA-ELP de la librairie (78 μM, PBS). Puce NTA, 25°C. Résonance doublement normalisée par la valeur de la ligne de base avant injection et par la masse molaire du bioconjugué. P2 : basse densité (< 110 RU), P3 : densité moyenne (110-240 RU), P4 : haute densité (> 465 RU). Attention : la normalisation par la valeur de la ligne de base avant injection entraîne un biais : les valeurs de P4 étant divisées par un nombre beaucoup plus grand, elles sont artificiellement plus basses qu'elles ne devraient. Les valeurs négatives sont dues à des interactions non spécifiques sur la piste de référence (Piste 1, sans CD44).

Envoi	Bioconjugué	Réticulation	Fluorophore	% massique HA-ELP-fluo	Coloration	Nombre échantillons	Résultats <i>in vitro</i>	Problèmes
1 02/20	HA _{4,6k} – ELPn60	Non	Fluorescéine	5%	moyenne	5 x 6 mg	Fort marquage à 37°C mais pas de spécificité pour les cellules CD44 ⁺ . Perte totale du marquage après rinçage.	Auto-fluorescence des cellules, Nécessité de travailler à 37°C pile Mauvaise stabilité au rinçage Utilisation de trypsin
	HA _{4,6k} – ELPn80	Non	Rhodamine (Biotium)	5%	moyenne	3 x 6 mg	Traité avec envoi 3	/
3 07/20	HA _{4,6k} – ELPn80, 100	Non	Rhodamine (Biotium)	5%	moyenne	5 + 3 (x 6 mg)	Fort marquage à 37°C mais pas de spécificité pour les cellules CD44 ⁺ . Marquage plus important pour ELPn100	Pas de spécificité pour les cellules CD44 ⁺ , pas de compétition avec le HA et fort marquage non spécifique avec le PEG Utilisation de trypsin et rinçage
	PEG _{5k} – ELPn80	Non	Rhodamine (Biotium)	5%	moyenne	5 x 6 mg	Fort marquage non spécifique	
4 12/20	HA _{4,6k} – ELPn80	Oui	Rhodamine (Lumiprobe)	5%	Faible	1 (78 µM)	% de cellules marquées faible, légèrement plus important pour cellules CD44 ⁺	
	HA _{24k} – ELPn60, 80, 100	Oui	Rhodamine (Lumiprobe)	5%	Très faible	3 x 1 (≈ 78 µM)	% de cellules marquées très faible, non concluants	Fluorescence trop faible
	HA _{42k} – ELPn60, 80, 100	Oui	Rhodamine (Lumiprobe)	5%	Très faible	3 x 1 (≈ 78 µM)		
5 03/21	HA _{4,6k} – ELPn60, 80, 100	Oui	Rhodamine (Lumiprobe)	20%	intense	3 x 1 (≈ 78 µM)	Résultats ok pour ELPn60, 80 : spécificité pour les cellules CD44⁺ , le 2 ^e lavage diminue le marquage non spécifique. (confirmés par 2 ^e essai)	HA _{4,6k} – ELPn100 : présence d'agrégats, résultats non représentatifs
	HA _{24k} – ELPn60, 80, 100	Oui	Rhodamine (Lumiprobe)	20%	Faible	3 x 1 (≈ 78 µM)	% de cellules marquées très faible, non concluants	Fluorescence trop faible
	HA _{42k} – ELPn60, 80, 100	Oui	Rhodamine (Lumiprobe)	20%	Faible	3 x 1 (≈ 78 µM)	Sauf HA _{42k} -ELPn60 : 20% de cellules marquées, légère spécificité pour cellules CD44⁺	
	HA _{4,6k-24k-42k} – ELPn80	Oui	Rhodamine (Lumiprobe)	30%	Moyenne à faible	3 x 1 (≈ 78 µM)	Marquage des cellules : correct (HA _{4,6k}) - faible (HA _{24k}) - inexistant (HA _{42k}) Légère spécificité pour les cellules CD44⁺	Fluorescence trop faible pour HA _{24k} et HA _{42k} Résultats différents pour les deux HA _{4,6k} -ELPn80 → influence du % d'espèce fluo ?

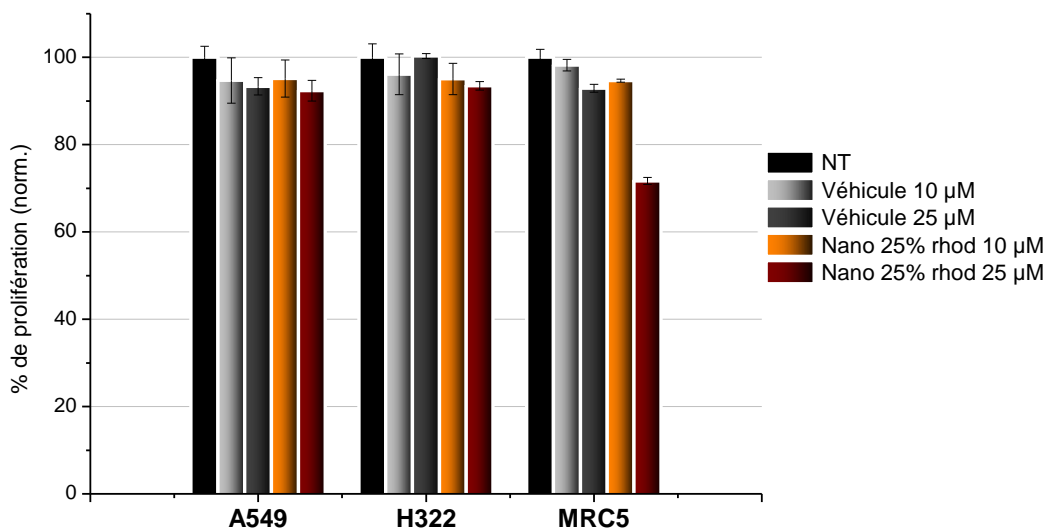
Annexe IV-37 : Tableau récapitulatif des expériences *in vitro* sur cellules - Partie 1. Détails des échantillons testés, des conclusions principales et des problèmes rencontrés.

Envoi	Bioconjugué	Réticulation	Fluorophore	% massique HA-ELP- fluo	Coloration	Nombre échantillons	Résultats <i>in vitro</i>	Problèmes
6 06/21	HA _{4,6k} – ELPn80	Oui	Rhodamine (Biotium)	25%	Moyenne	3 x 1 (= 78 µM)	Fluorescence ok à faible, % de cellules marquées diminuant quand Mw HA augmente. Effet dose, légère spécificité pour les cellules CD44⁺. HA_{4,6k} – ELPn80 meilleur marquage et spécificité	Fluorescence toujours un peu faible pour les bioconjugués avec les HA les plus longs
	HA _{24k} – ELPn80			Faible				
	HA _{42k} – ELPn80			Faible				
7 07/21	HA _{4,6k} – ELPn80	Oui	DY700	10%	Moyenne	1 (78 µM) 1 (94 µM) 2 (93 µM)	Fluorescence ok, fort % de cellules marquées. 2^e lavage nécessaire pour enlever le marquage non spécifique. Effet dose, 7 marquage et MFI avec la concentration. HA_{4,6k} – ELPn80 meilleur marquage et spécificité.	Aucun, résultats à reproduire
	HA _{24k} – ELPn80			25%	Faible			
	HA _{42k} – ELPn80			25%	Faible			
	HA _{4,6k} – ELPn60, 80, 100	Oui	Rhodamine (Biotium)	10%	Moyenne à faible			
HA _{4,6k} – ELPn80			30%	Intense				
8 10/21	HA _{24k} – ELPn60, 80, 100	Oui	Rhodamine (Biotium)	20%	Faible	3 x 1 (= 78 µM)	Confirmation des résultats précédents (06/21), bonne reproductibilité.	Aucun
	HA _{42k} – ELPn60, 80, 100	Oui	Rhodamine (Biotium)	20%	Faible	3 x 1 (= 78 µM)		
	HA _{4,6k} – ELPn80	Oui	DY700	10% - 25%	Faible - Intense	4 x 1 (= 78 µM)		
	HA _{24k} – ELPn80			25%	Faible		Pas de cytotoxicité apparentes sur les cellules A549 et H322. Légère cytotoxicité des bioconjugués libres sur les fibroblastes sains MRC5.	Cellules ayant peu proliféré, y compris celles non traitées. Expérience à reproduire.
	HA _{42k} – ELPn80			25%	Faible			
	HA _{4,6k} – ELPn80	Non	/ (cytotoxicité)	0%	/	6 mg / 2,5 mg		

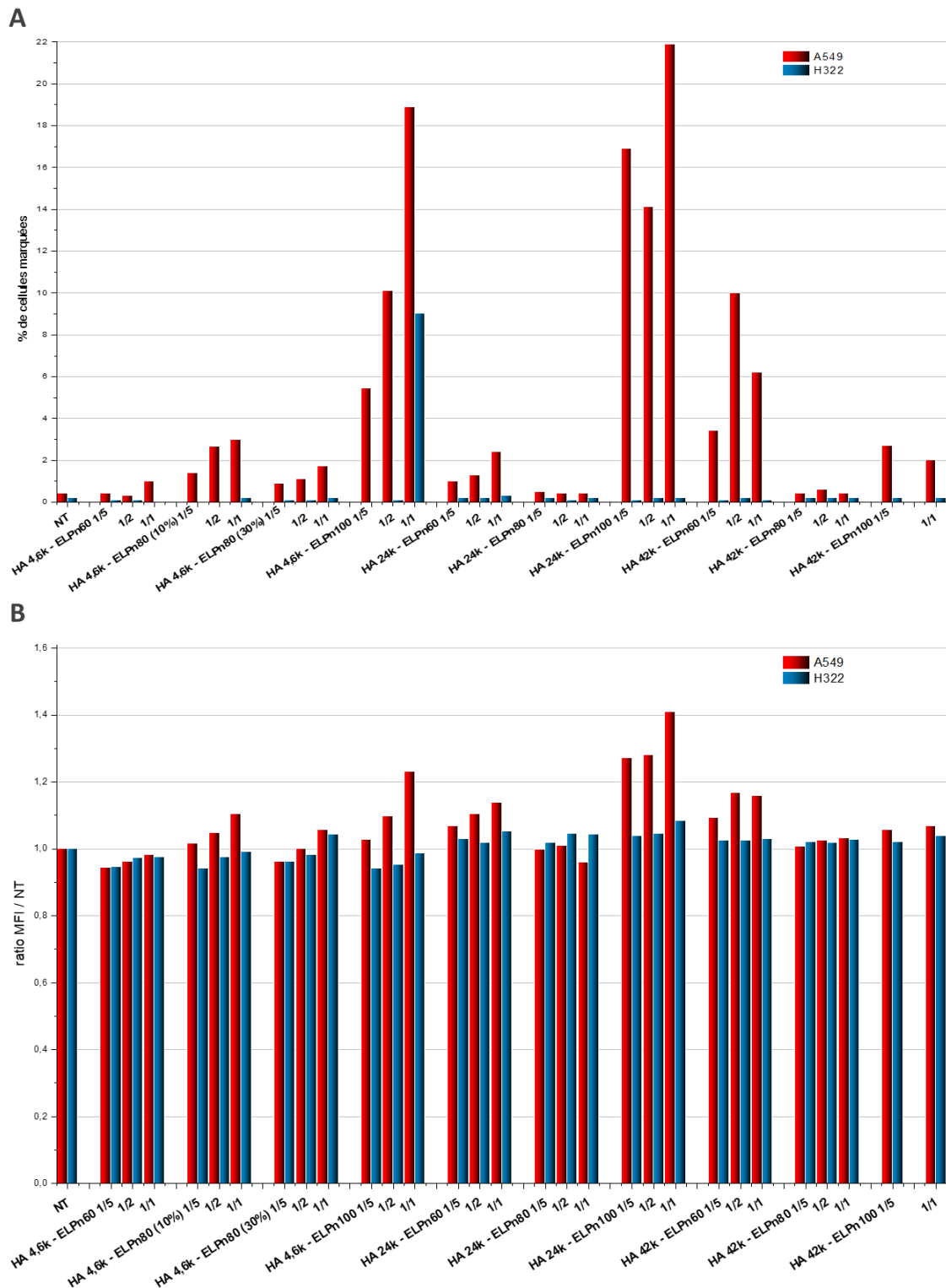
Annexe IV-38 : Tableau récapitulatif des expériences *in vitro* sur cellules - Partie 2. Détails des échantillons testés, des conclusions principales et des problèmes rencontrés.



Annexe IV-39 : Étude de cytométrie en flux pour des nanoparticules réticulées de HA_{4,6k-24k-42k}-ELPn80 (10% rhodamine). Représentation du % de cellules fluorescentes (A) ou du ratio de l'intensité moyenne de fluorescente (MFI) sur celle des cellules non traitées (NT) (B) selon la nanoparticule et sa dilution. Concentration initiale (1/1) = 78 µM. Comparaison entre 1 et 2 lavages après incubation des cellules avec les nanoparticules fluorescentes.



Annexe IV-40 : Étude de cytotoxicité des nanoparticules réticulées de HA_{4,6k}-ELPn80 (25% rhodamine) (orange). Évaluation de la toxicité sur les cellules cancéreuses A549 et H322, et sur les cellules saines MRC5 (fibroblastes embryonnaires) après 72h d'incubation à plusieurs concentrations. Les références sont les cellules non traitées (NT, noir) ou mises en contact avec du PBS sans bioconjugués ni nanoparticules (véhicule, gris).



Annexe IV-41 : Étude de cytométrie complète des nanoparticules réticulées formées par l'auto-assemblage des bioconjugués HA-ELP de la librairie : HA_{4,6k}-ELP (10% rhodamine), HA_{24k-42k}-ELP (20% rhodamine) et HA_{4,6k}-ELPn80 (30% rhodamine). Représentation du % de cellules fluorescentes pour chaque nanoparticule en fonction de sa dilution. Concentration initiale (1/1) = 78 µM.

RÉFÉRENCES

- (1) Duan, H.; Donovan, M.; Foucher, A.; Schultze, X.; Lecommandoux, S. Multivalent and Multifunctional Polysaccharide-Based Particles for Controlled Receptor Recognition. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 14730. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32994-y>.
- (2) Jeannot, V.; Mazzaferro, S.; Lavaud, J.; Vanwonderghem, L.; Henry, M.; Arboléas, M.; Vollaïre, J.; Josserand, V.; Coll, J.-L.; Lecommandoux, S.; Schatz, C.; Hurbin, A. Targeting CD44 Receptor-Positive Lung Tumors Using Polysaccharide-Based Nanocarriers: Influence of Nanoparticle Size and Administration Route. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2016**, *12* (4), 921–932. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.018>.
- (3) Jeannot, V.; Gauche, C.; Mazzaferro, S.; Couvet, M.; Vanwonderghem, L.; Henry, M.; Didier, C.; Vollaïre, J.; Josserand, V.; Coll, J.-L.; Schatz, C.; Lecommandoux, S.; Hurbin, A. Anti-Tumor Efficacy of Hyaluronan-Based Nanoparticles for the Co-Delivery of Drugs in Lung Cancer. *J. Controlled Release* **2018**, *275*, 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.02.024>.
- (4) Weber, P.; Dzuricky, M.; Min, J.; Jenkins, I.; Chilkoti, A. Concentration-Independent Multivalent Targeting of Cancer Cells by Genetically Encoded Core-Crosslinked Elastin/Resilin-like Polypeptide Micelles. *Biomacromolecules* **2021**. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00897>.
- (5) Rosselin, M.; Xiao, Y.; Belhomme, L.; Lecommandoux, S.; Garanger, E. Expanding the Toolbox of Chemoselective Modifications of Protein-Like Polymers at Methionine Residues. *ACS Macro Lett.* **2019**, *8* (12), 1648–1653. <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.9b00862>.
- (6) Kramer, J. R.; Petitdemange, R.; Bataille, L.; Bathany, K.; Wirotius, A.-L.; Garbay, B.; Deming, T. J.; Garanger, E.; Lecommandoux, S. Quantitative Side-Chain Modifications of Methionine-Containing Elastin-Like Polypeptides as a Versatile Tool to Tune Their Properties. *ACS Macro Lett.* **2015**, *4* (11), 1283–1286. <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.5b00651>.
- (7) Petitdemange, R.; Garanger, E.; Bataille, L.; Dieryck, W.; Bathany, K.; Garbay, B.; Deming, T. J.; Lecommandoux, S. Selective Tuning of Elastin-like Polypeptide Properties via Methionine Oxidation. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (2), 544–550. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01696>.
- (8) Gharakhanian, E. G.; Deming, T. J. Versatile Synthesis of Stable, Functional Polypeptides via Reaction with Epoxides. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (6), 1802–1806. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00372>.
- (9) Urry, D. W.; Parker, T. M.; Reid, M. C.; Gowda, D. C. Biocompatibility of the Bioelastic Materials, Poly(GVGVP) and Its γ -Irradiation Cross-Linked Matrix: Summary of Generic Biological Test Results. *J. Bioact. Compat. Polym.* **1991**, *6* (3), 263–282. <https://doi.org/10.1177/088391159100600306>.
- (10) Necas, J.; Bartosikova, L.; Brauner, P.; Kolar, J. Hyaluronic Acid (Hyaluronan): A Review. *Veterinární Medicina* **2008**, *53* (No. 8), 397–411. <https://doi.org/10.17221/1930-VETMED>.

CHAPITRE V :
DE LA NANOPARTICULE AU
NANOVECTEUR ANTICANCÉREUX :
UTILISATION DE BIOCONJUGUÉS
HA-*b*-ELP POUR DES APPLICATIONS
DE THÉRAPIE PHOTODYNAMIQUE

TABLE DES MATIÈRES

Chapitre V : De la nanoparticule au nanovecteur anticancéreux : utilisation de bioconjugués HA-<i>b</i>-ELP pour des applications de thérapie photodynamique	269
Introduction	271
VI.A. Synthèse d'un bioconjugué HA-ELPn80 cytotoxique.....	273
VI.A.1. Conjugaison de l'ELPn80 avec un photosensibilisateur.....	273
VI.A.2. Synthèse de bioconjugués HA-ELPn80-PS	274
VI.B. Génération de ROS sous irradiation	277
Conclusion.....	282
Partie expérimentale.....	283
Annexes	286
Références	287

INTRODUCTION

La thérapie photodynamique (PDT) est une voie de traitement du cancer non invasive prometteuse, qui fait l'objet de plus en plus d'attention.¹⁻³

Son principe est simple et illustré en **Figure V-1** : un photosensibilisateur (PS) est exposé à une irradiation lumineuse, générant le passage d'électrons à un état excité (S_1 , i). Contrairement à un fluorophore, la désexcitation n'a alors pas lieu par émission de lumière (ii) mais par conversion intersystème (ICT, iii) et transfert d'énergie (iv) à une autre molécule. En cas de présence d'oxygène à proximité, ce transfert d'énergie peut mener à la formation d'oxygène singulet (1O_2) extrêmement réactif, et à la génération de multiples espèces actives oxydantes (ROS). Celles-ci peuvent alors causer des dommages importants, perturbant les processus biologiques, et menant à la mort cellulaire.⁴ Si cet oxygène singulet est très destructeur, sa zone d'impact est cependant limitée du fait de sa durée de vie très courte (0.01–0.04 μ s).⁵

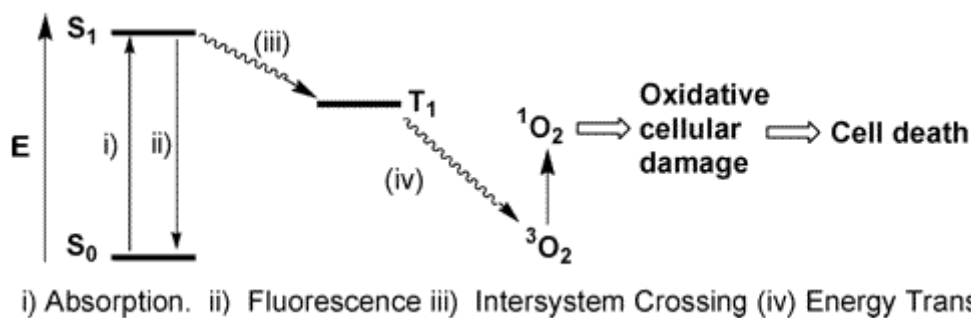


Figure V-1 : Diagramme de Jablonski simplifié pour la PDT. Reproduit de l'article d'A. Groman et al.⁶

La PDT présente une sélectivité accrue en comparaison avec les autres formes de traitement que sont la radiothérapie, la chirurgie, et la chimiothérapie.^{2,7} En effet, les éléments qui la composent (PS, lumière, et oxygène) ne sont pas nocifs pris séparément. Seule la zone où ils sont réunis est impactée par les effets destructeurs des ROS. Ainsi, dans le cas d'une accumulation sélective du PS dans la tumeur et de la focalisation du faisceau d'irradiation, il est possible de contrôler précisément la zone traitée, ce qui limite fortement les effets secondaires.

La synthèse de PS capables de générer une grande quantité de ROS tout en restant inoffensif dans l'obscurité est donc le principal enjeu du développement de cette PDT. Ils doivent remplir plusieurs critères : avoir un rendement quantique de fluorescence faible, un rendement de conversion intersystème élevé, un fort coefficient d'extinction molaire pour des longueurs d'onde dans le rouge ou le proche infrarouge, et une grande différence de toxicité entre l'état irradié et non irradié.⁸

A l'heure actuelle, le PS le plus utilisé en traitement clinique est le Photofrin[®], bien qu'il soit reconnu comme non idéal.¹ De nombreux autres PS basés sur un motif de porphyrine existent, mais ils peuvent être difficiles à synthétiser.^{8,9} C'est pourquoi certains chercheurs se sont penchés sur d'autres types de structures.

Parmi elles, les dérivés de borondipyrométhène (Bodipy) sont particulièrement intéressants.^{3,8} En effet, ils présentent plusieurs caractéristiques recherchées pour un bon PS : ils possèdent des coefficients d'extinction et un ratio de toxicité lumière/obscurité élevés, et sont résistants au photoblanchiment. De plus, ils sont très aisément fonctionnalisables, ce qui permet de leur conférer des propriétés spécifiques et de les intégrer facilement dans des systèmes plus complexes.^{3,8} Ainsi, il a été reporté que la substitution de la position meso du cycle central par un azote, formant un aza-bodipy, permettait d'obtenir un déplacement bathochrome de la gamme d'absorbance maximale.¹⁰ Une irradiation dans le domaine du rouge ou du proche infrarouge pénètre en effet plus profondément dans les tissus, et est donc à favoriser (≈ 0.5 cm pour $\lambda = 600$ nm et ≈ 1 cm pour $\lambda = 700-800$ nm).⁴

Par ailleurs, l'efficacité de ces dérivés de bodipy et d'aza-bodipy peut encore être améliorée par la fonctionnalisation avec des halogènes.^{6,9,11} Ainsi, le BF₂-azadipyrométhène a prouvé un rendement quantique de génération d'oxygène singulet de 74%, une efficacité de conversion intersystème de 72% et une bonne photostabilité.¹¹

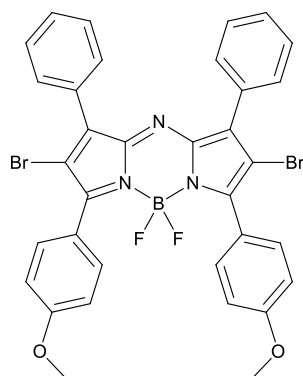


Figure V-2 : Structure chimique du BF₂-azadipyrométhène

Ce sont ces qualités qui ont motivé notre choix envers ce composé. L'équipe du Prof. Nathan McClenaghan de l'Institut des Sciences Moléculaires de Bordeaux (ISM) nous a fourni un dérivé de ce composé porteur d'un groupement amine primaire permettant un couplage avec nos bioconjugués. L'addition de ce PS conférerait en effet à ces derniers la bioactivité qui leur manquait. Ainsi, la sélectivité du système pourrait être améliorée. Les nanoparticules présentant le HA en surface permettraient le ciblage actif des cellules cancéreuses surexprimant le récepteur CD44, induisant une accumulation du PS dans les tumeurs. L'action anticancéreuse de génération de ROS pourrait alors être déclenchée par une irradiation locale de la zone à traiter.

L'objectif de ce chapitre d'ouverture est donc de présenter les résultats préliminaires obtenus pour la synthèse de bioconjugués HA-ELPn80-PS bioactifs et pour l'évaluation de leur génération de ROS sous irradiation dans le rouge.

VI.A. Synthèse d'un bioconjugué HA-ELPn80 cytotoxique

Afin d'ajouter une propriété de bioactivité aux bioconjugués développés précédemment, un couplage avec un photosensibilisateur a été effectué.

Le PS a été synthétisé à façon par le Dr. A. Kumar Das, post-doctorant dans l'équipe du Prof. N. McClenaghan (ISM). Comme illustrée en **Figure V-3**, sa structure est basée sur un motif aza-bodipy. Il présente une absorption dans le rouge (600-700 nm) et son coefficient d'extinction molaire à 700 nm est indiqué comme étant égal à $8 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Par ailleurs, la présence d'une amine primaire permet son couplage sur l'extrémité C-terminale de l'ELP.

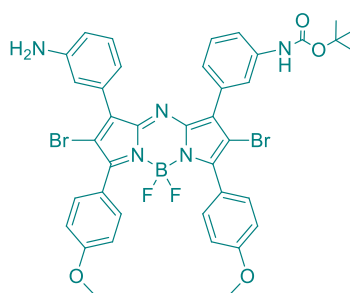


Figure V-3 : Structure chimique du photosensibilisateur utilisé dans cette étude.

VI.A.1. Conjugaison de l'ELPn80 avec un photosensibilisateur

La stratégie de couplage du PS sur l'ELPn80 est très similaire à celle décrite pour celui des sondes de fluorescence au **chapitre IV** (cf. **IV.A.2**). La fonctionnalisation a ainsi été effectuée sur l'extrémité C-terminale de l'intermédiaire DBCO-ELPn80, dans le DMF et en présence de DIPEA et d'HBTU (**Figure V-4**). La génération de ROS étant induite par les rayonnements lumineux, il a été essentiel de travailler dans les conditions les plus inertes possibles et à l'abri de la lumière. Après purification, un solide cassant bleu intense et totalement insoluble dans l'eau a été obtenu. Il a donc été caractérisé dans le DMSO.

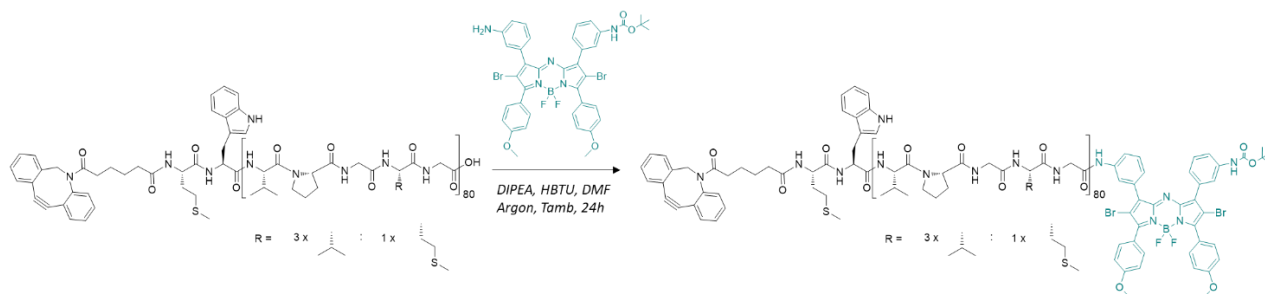


Figure V-4 : Schéma réactionnel du couplage du PS générateur de ROS sur l'extrémité C-terminale de l'espèce DBCO-ELPn80.

La caractérisation par spectrométrie de masse est présentée en **Figure V-5 A**. Deux pics moléculaires sont observables : l'un traduisant la présence d'espèces DBCO-ELPn80 non fonctionnalisées, l'autre présentant un décalage de m/z de 784 g/mol par rapport au premier et correspondant aux composés DBCO-ELPn80-PS ($\Delta_{\text{th}} m/z = 746 \text{ g/mol}$). Bien que la spectrométrie de masse soit une méthode d'analyse non quantitative, ce spectre a permis d'estimer le taux de fonctionnalisation à $\eta \approx 67\%$.

Une analyse par RMN ^1H a également été réalisée et est illustrée en **Annexe V-1**. Malheureusement, le spectre de l'espèce DBCO-ELPn80-PS est identique à celui du DBCO-ELPn80 : les signaux caractéristiques du PS n'apparaissent pas.

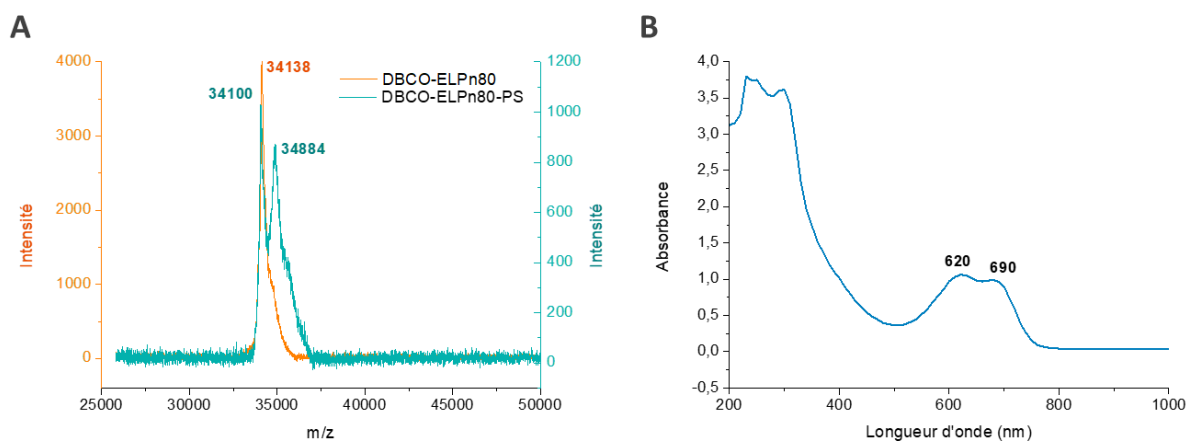


Figure V-5 : Caractérisation du composé DBCO-ELPn80-PS. A : Spectre de masse MALDI avant et après couplage. $\Delta_{th} m/z = 746 \text{ g/mol}$, $\Delta_{exp} m/z = 746 \text{ g/mol}$. Estimation du taux de couplage $\eta \approx 67\%$. B : Spectre d'absorbance dans le DMSO.

Enfin, les propriétés spectrales du composé DBCO-ELPn80-PS ont été vérifiées. Le spectre d'absorbance en **Figure V-5** montre effectivement deux maximums à 620 nm et 690 nm. Une irradiation à ces longueurs d'onde devrait donc permettre la génération de ROS.

VI.A.2. Synthèse de bioconjugués HA-ELPn80-PS

À partir du composé DBCO-ELPn80-PS, les bioconjugués HA-ELPn80-PS ont été synthétisés par SPAAC. Cette synthèse est présentée en **Figure V-6**. Des modifications de protocole ont été nécessaires du fait des problèmes d'insolubilité des deux blocs. Le DBCO-ELPn80-PS a ainsi été préalablement dissout dans du DMSO et le HA-N₃ dans de l'eau déionisée, avant d'être rassemblés pour former le mélange réactionnel (DMSO/H₂O, 3:1). La présence de DMSO empêchant l'agrégation du bloc ELP, la réaction a pu être menée à température ambiante, toujours dans des conditions inertes et abritées de la lumière.

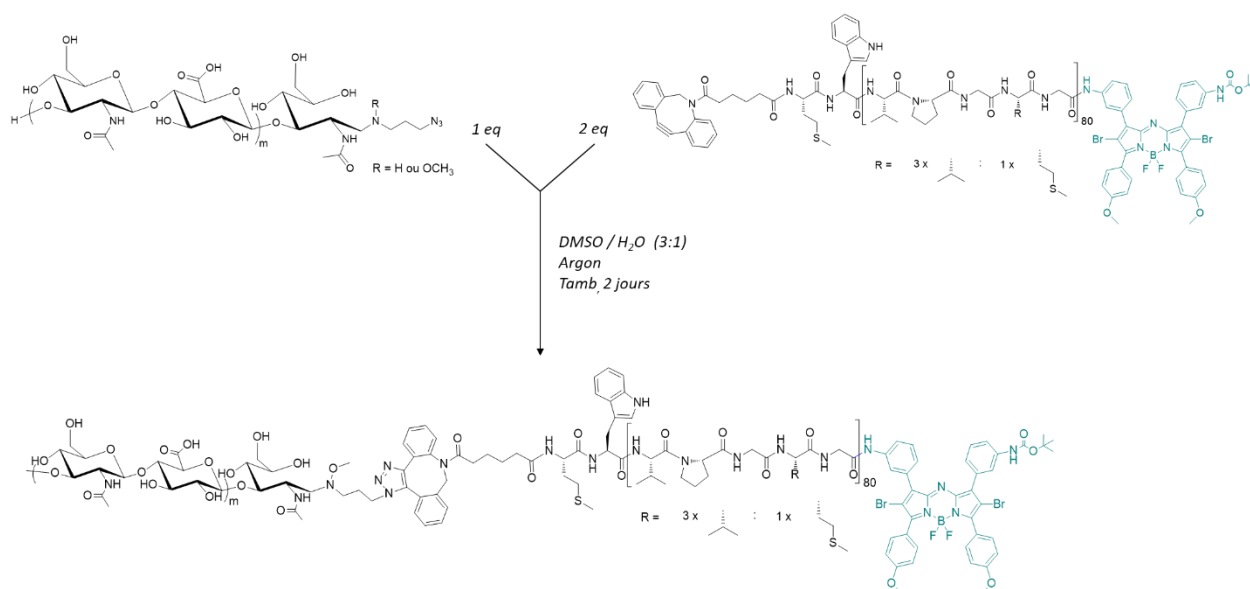


Figure V-6 : Schéma de synthèse des bioconjugués HA-ELPn80-PS par SPAAC.

Une étape de purification par dialyse a également été nécessaire afin d'éliminer le DMSO. Par ailleurs, la purification par centrifugation à chaud n'a montré qu'une réussite partielle, une quantité importante de DBCO-ELPn80-PS restant avec le bioconjugué.

Ceci est particulièrement visible sur la **Figure V-7**, lors de l'analyse de la purification par SDS-PAGE : si le smear caractéristique des bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn80-PS est bien présent sur les pistes correspondant aux surnageants, une bande nette est également observable autour de 34 kDa, traduisant la présence d'espèces n'ayant pas réagi.

Après lyophilisation, des solides bleus cotonneux ont été obtenus, cette purification seulement partielle empêchant une estimation du taux de couplage. Si les trois bioconjugués ont été synthétisés avec succès, seuls les HA_{4,6k}-ELPn80-PS et HA_{24k}-ELPn80-PS ont fait l'objet d'une réelle étude et seule celle du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80-PS est présentée ici.

Bien qu'elle soit très lente, la solubilisation des bioconjugués dans l'eau a été possible. La **Figure V-7 B** illustre le maintien de la thermosensibilité pour les solutions de HA_{4,6k}-ELPn80-PS et HA_{24k}-ELPn80-PS dans le D₂O, avec un trouble apparaissant à chaud.

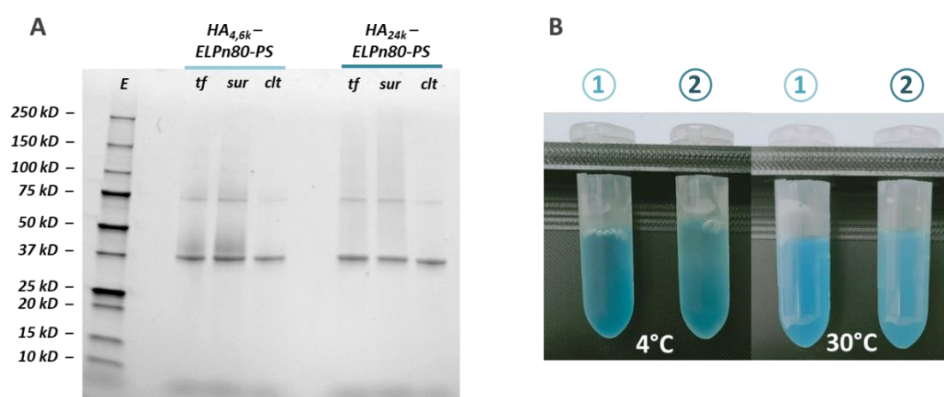


Figure V-7 : A : Gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) de la synthèse des bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn80-PS et HA_{24k}-ELPn80-PS. E : échelle de taille ; tf : milieu réactionnel avant purification ; sur : surnageant après purification clt : culot après purification. B : Illustration de la thermosensibilité de solutions de bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn80-PS (1) et HA_{24k}-ELPn80-PS (2) (78 µM, D₂O).

Une solution de bioconjugués HA_{4,6k}-ELPn80-PS a donc été étudiée par DLS (78 µM, D₂O). Les résultats sont présentés en **Figure V-8**. Si l'évolution de l'intensité diffusée est similaire à celle observée pour les bioconjugués non fonctionnalisés, celle du diamètre des objets en solution diffère. En effet, elle présente une allure décroissante à mesure de l'augmentation de la température, avec une stabilisation à partir d'environ 45°C. La phase de coacervation n'est plus observable, et la transition est beaucoup moins nette. L'explication se trouve en **Figure V-8 B**. La distribution de taille en intensité à 10°C ne montre en effet qu'une seule population d'environ 200 nm de diamètre : à cette température, les bioconjugués ne sont donc pas sous forme de chaînes libre, mais d'ores et déjà assemblés en nanoparticules.

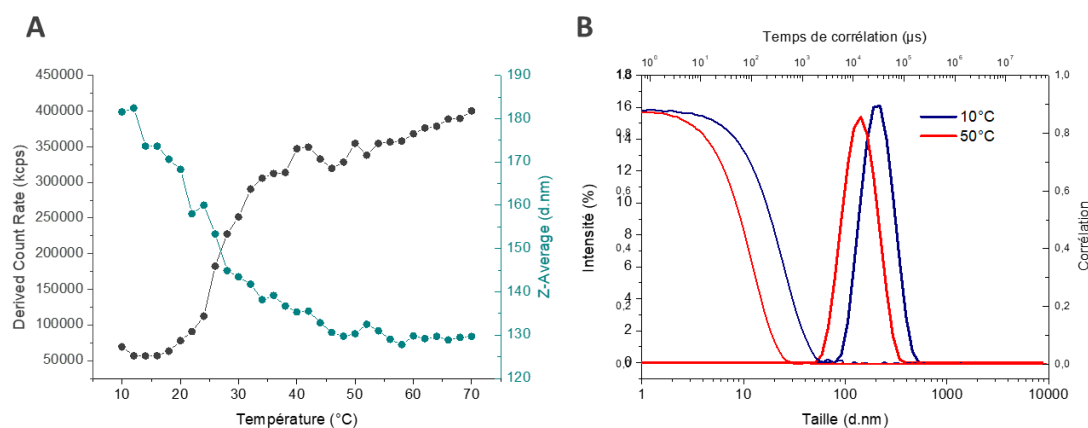


Figure V-8 : Caractérisation du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80-PS (78 µM, D₂O) par DLS (A, B) et spectroscopie (C, D). A : Évolution de l'intensité diffusée et du diamètre moyen des objets en fonction de la température. B : Distribution de taille en intensité à 10°C et 50°C.

La forte hydrophobie du PS est en cause. Sa présence induit en effet une amphiphilie permanente avec le HA, quel que soit l'état d'hydrophobie de l'ELP. Celui-ci conserve cependant toujours une influence. Ainsi, c'est lui qui est responsable des variations de taille des nanoparticules : lors que la température augmente, l'ELP se condense, entraînant une diminution du diamètre de l'objet auto-assemblé. Par ailleurs, il est à noter que la différence de taille observée par rapport aux nanoparticules formées par les bioconjugués non fonctionnalisés n'est pas due à la présence du PS, mais à l'absence de sels dans la solution. Comme indiqué dans le **chapitre III**, la salinité du tampon influe fortement sur le diamètre des nanoparticules. Une nouvelle analyse devrait donc être effectuée dans un tampon PBS, afin de vérifier l'influence réelle du PS sur la taille des nanoparticules.

Le désassemblage n'ayant pas lieu dans cette gamme de température, la CMT n'est pas mesurable ($CMT < 10^{\circ}C$). En revanche, l'augmentation de l'intensité diffusée et de la turbidité traduit le maintien d'une T_{cp} . Elle a été déterminée de la même façon que pour les ELPs seuls : elle a ainsi été définie comme étant la température au maximum de la dérivée première de l'évolution de l'intensité diffusée. Pour le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80-PS, elle est de 26°C. À nouveau, une analyse en milieu salin serait nécessaire pour effectuer des comparaisons fiables avec l'ELPn80 et les bioconjugués non fonctionnalisés. Une estimation de la CMC à 37°C permettrait une caractérisation plus précise de ce système en conditions physiologiques.

Les propriétés spectrales du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80-PS ont également été vérifiées. Le spectre d'absorbance en **Figure V-9** présente toujours deux maximums à 600 nm et 700 nm (léger effet hypsochrome). En revanche, alors que ces deux maximums étaient relativement équivalents en intensité, celui à 600 nm est à présent bien plus important. La longueur d'onde d'irradiation optimale s'éloigne donc du proche infrarouge visé.

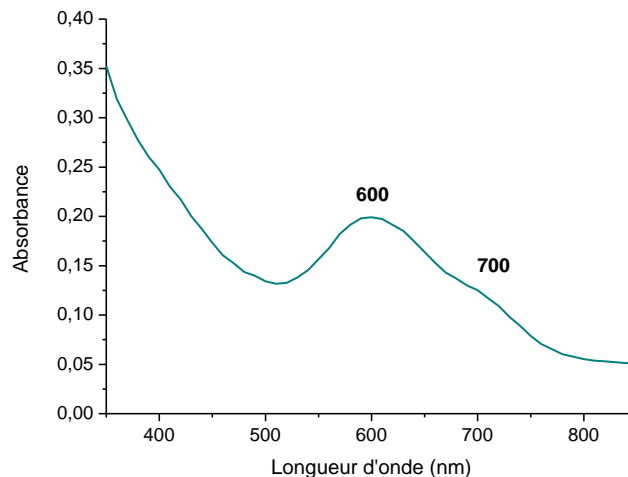


Figure V-9 : Spectre d'absorbance du composé DBCO-ELPn80-PS dans le D₂O

Trois bioconjugués HA-ELPn80-PS ont ainsi été synthétisés par couplage du PS sur l'extrémité C-terminale de l'espèce DBCO-ELPn80, puis par SPAAC. Ces bioconjugués et leurs propriétés physico-chimiques ont ensuite été caractérisés.

Du fait de la forte hydrophobie du PS, des nanoparticules sont présentes à toute température : il n'y a pas de désassemblage. La thermosensibilité est cependant toujours visible dans la diminution de taille des nanoparticules à chaud, par condensation de l'ELP dans le cœur.

Ces nanoparticules présentent une absorbance dans le visible, avec un maximum à 600 nm. Leur spectre d'émission de fluorescence ($\lambda_{ex} = 650$ nm, Annexe V-2) ne présente cependant aucune intensité. La désexcitation du PS se fait donc bien par une autre voie que la radiation dans le visible.

VI.B. Génération de ROS sous irradiation

La génération de ROS pouvant mener à la mort cellulaire est au cœur du principe de la thérapie photodynamique. La capacité du PS couplé aux bioconjugués HA-ELPn80 à les produire a donc été étudiée. Pour cela, nous avons tiré parti de la possibilité d'oxydation des résidus méthionine de l'ELP, se traduisant par une modification franche et exploitable du spectre RMN ^1H . Les pics de résonance des protons les plus proches de l'atome de soufre subissent en effet un déblindage sensible après oxydation, dans une zone ne présentant pas d'autres massifs. Une étude récemment publiée par notre équipe a montré que la génération de ROS menait à l'oxydation des fonctions thioéther des résidus méthionines en sulfoxyde (mais pas en sulfone).¹² L'apparition de leurs signaux caractéristiques est donc au cœur de cette expérience.

La **Figure V-10** illustre la structure chimique du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80-PS et son spectre RMN ^1H . Tout comme pour l'intermédiaire DBCO-ELPn80-PS, le spectre est sensiblement identique à celui du bioconjugué non fonctionnalisé. La différence majeure tient en la disparition totale des signaux des protons aromatiques. Si ce spectre ne fournit donc aucune indication concernant le couplage avec le PS, il renseigne néanmoins sur l'état d'oxydation des résidus méthionines de l'ELPn80. Ici, un petit pic à environ 2.4 ppm traduit la présence d'une méthionine oxydée en sulfoxyde. L'étude se concentre donc sur la zone encadrée en rouge et en particulier sur l'évolution des pics n et o (thioéther), devenant n_{ox} et o_{ox} après oxydation (sulfoxyde).

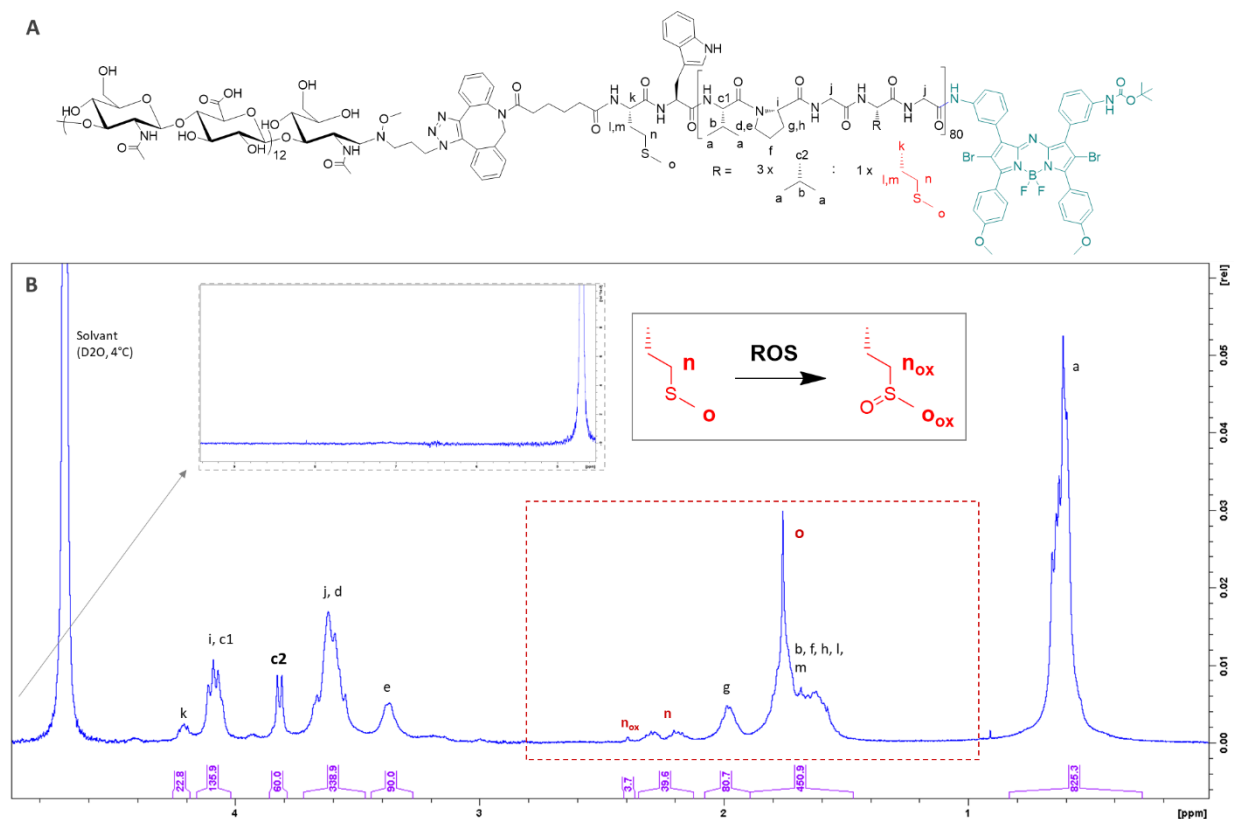


Figure V-10 : Structure chimique (A) et spectre ^1H RMN du bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80-PS (400 MHz) (B). Encart : zone des protons aromatiques (aucun signal). Cadre rouge : zone d'intérêt pour l'étude de l'oxydation de la méthionine. En rouge : signaux de la méthionine présentant de grandes variations après oxydation en sulfoxyde.

Un protocole d'irradiation a donc été mis en œuvre. Une solution de HA_{4,6k}-ELPn80-PS (78 μM , D₂O) a été irradiée par une diode à 632 nm (100 mWatt/cm²), soit des conditions proches de celles utilisées lors d'études *in vitro* sur cellules.¹³ L'introduction de bulles d'air dans la solution s'est révélé nécessaire pour assurer à la fois l'oxygénation et l'homogénéisation de la solution durant l'expérience. Un suivi cinétique par RMN ^1H a permis de déterminer l'état d'oxydation des méthionines en fonction du temps total d'exposition (temps d'irradiation cumulé).

Celui-ci est illustré en **Figure V-11**. Les spectres rassemblés en A montrent bien la diminution des pics n et o, corrélée à l'augmentation des pics n_{ox} et o_{ox} . La **Figure V-11 B** présente un zoom et une superposition de ces spectres faisant clairement apparaître ces évolutions. Par ailleurs, elle permet de constater une oxydation totale des méthionines au bout de 15 min d'irradiation cumulée.

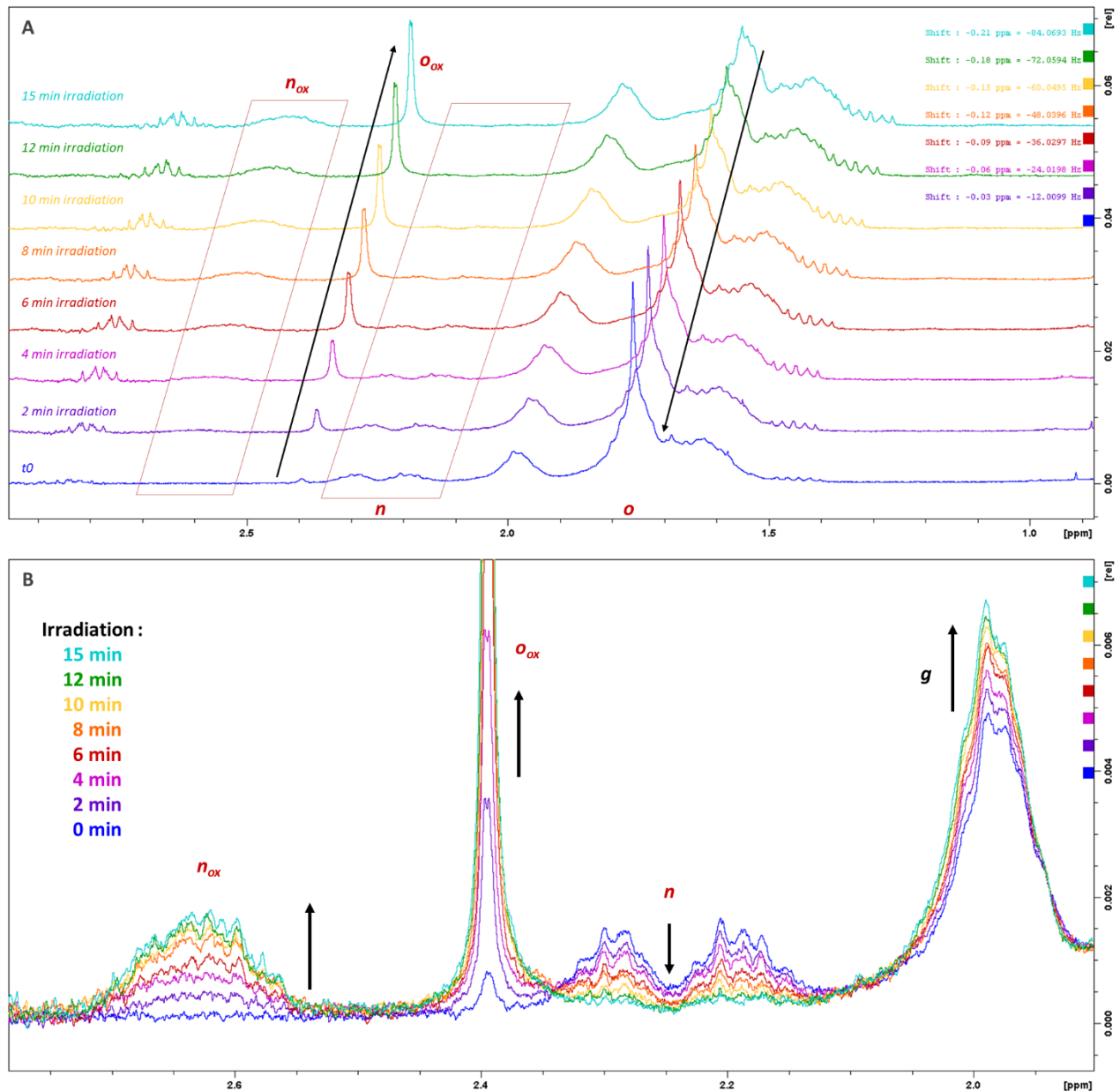


Figure V-11 : Suivi de l'oxydation des résidus méthionines d'un bioconjugué HA_{4.6k}-ELPn80-PS (78 μM, D₂O) en fonction du temps d'irradiation à $\lambda_{ex} = 630$ nm. A : Evolution des pics n et o du bioconjugué initial en n_{ox} et o_{ox} après oxydation. B : Zoom sur les pics n, n_{ox} et o_{ox} .

Afin de vérifier que cette oxydation des méthionines a bien pour origine l'exposition à la radiation émise par la diode, un test a été effectué sans irradiation, simplement avec l'apport d'air. Le spectre RMN ¹H donné en **Annexe V-3** ne présente pas de différence avec le spectre du bioconjugué non irradié.

L'oxydation en sulfoxyde des fonctions thioéther des résidus méthionine est donc bien liée à l'irradiation et à la génération de ROS par le PS.

Ce suivi par RMN ^1H a également permis une analyse plus quantitative de la cinétique d'oxydation sous irradiation. Elle est présentée en **Figure V-12**. Tout d'abord les signaux n, o, n_{ox} et o_{ox} ont été intégrés sur chaque spectre. Après normalisation, ces intégrations ont pu être étudiées en fonction du temps total d'irradiation. Ainsi, la **Figure V-12 A** montre une relation linéaire entre le logarithme népérien de l'intégration des pics n et o et le temps d'irradiation. Cela est caractéristique d'une cinétique d'ordre 1.

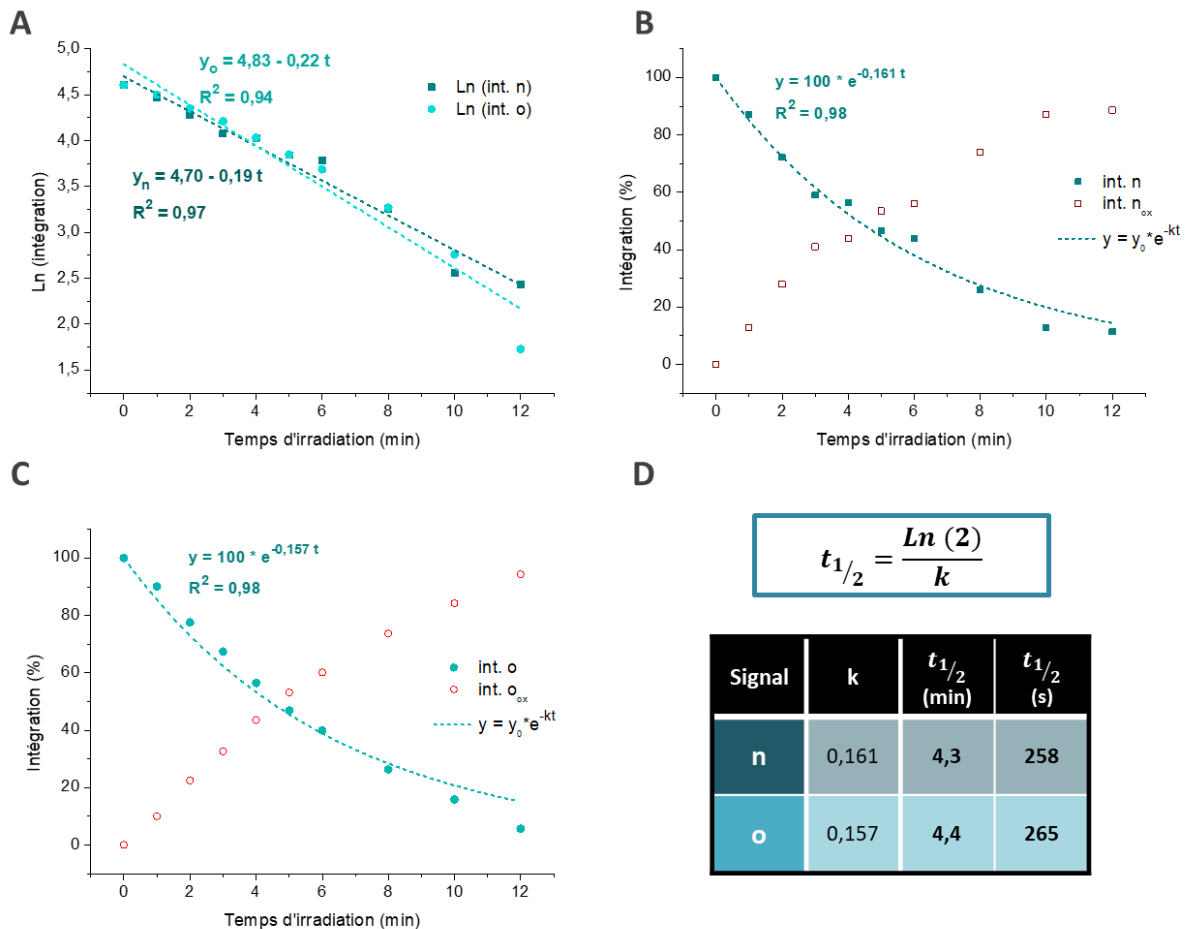


Figure V-12 : Étude cinétique de la réaction d'oxydation des résidus méthionines en fonction du temps d'irradiation par ^1H RMN. A : Détermination de l'ordre de cinétique : évolution du logarithme népérien de l'intégration des pics n et o. Cinétique d'ordre 1. B : Évolution de l'intégration des pics n et n_{ox} . C : Évolution de l'intégration des pics o et o_{ox} . D : Détermination des constantes cinétiques k et $t_{1/2}$.

Ceci est confirmé par les **Figure V-12 B et C**. Cette fois, les intégrations ont été exprimées en pourcentage, les intégrations initiales de n et o étant fixées à 100% et celles de n_{ox} et o_{ox} à 0%. La croissance des signaux des résidus méthionine oxydés semble bien corrélée à la décroissance des signaux des résidus méthionine non-oxydés. Cette dernière peut être modélisée selon une équation $y = y_0 * e^{-kt}$, avec y_0 la valeur d'intégration initiale (100%), k une constante positive, et t le temps total d'irradiation. Cette équation est similaire à celle observée pour une cinétique de réaction d'ordre 1 : $[A] = [A_0] * e^{-kt}$. Il a ainsi été possible de déterminer la constante de vitesse k pour les pics n et o et d'en déduire le temps de demi-réaction $t_{1/2}$. Les valeurs sont rassemblées dans le tableau en **Figure V-12 D**. Elles sont proches pour les évolutions des signaux n et o, avec une constante $k \approx 0.16 \text{ s}^{-1}$ et $t_{1/2} \approx 4.3 \text{ min}$. Cette valeur de temps de demi-réaction est comparable à celle observée lors d'une étude similaire menée en parallèle dans notre équipe et publiée récemment.¹² Un PS dérivé de Phthalocyanine avait été couplé à l'extrémité N-terminale d'un ELPn40 par CuAAC. Une solution de ces composés (6 mg/mL, D_2O) avait alors été irradiée à $\lambda = 630\text{-}640 \text{ nm}$ (210 mW/cm^2). Un $t_{1/2} \approx 5 \text{ min}$ et un temps total d'irradiation $t \approx 30 \text{ min}$ avait été nécessaires pour oxyder les 11 résidus méthionine présents. Ici, il semblerait qu'un temps et une puissance deux fois moindre soit suffisants pour en oxyder deux fois plus. Ce PS paraît donc efficace.

Si ce temps est assez long comparé aux durées d'irradiation pratiquées en biologie cellulaire ($t \approx 1-2$ min)¹³, l'objectif à terme n'est pas l'oxydation totale des méthionines mais la mort cellulaire, qui pourrait intervenir plus rapidement. Des expériences *in vitro* doivent donc être menées afin de le vérifier.

Enfin, les conséquences de l'irradiation sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules ont été étudiées et sont présentées en **Figure V-13**. Tout d'abord, les évolutions de l'intensité diffusée et du diamètre des nanoparticules présentent des allures similaires à celles observées avant irradiation mais légèrement décalées. Ainsi, la T_{cp} mesurée, et rapportée en **Figure V-13 C**, est plus élevée après irradiation. Cela concorde avec l'augmentation de l'hydrophilie de l'ELP après oxydation des fonctions thioéther des méthionines en fonctions sulfoxyde, et le comportement observé pour les ELPs seuls, oxydés ou non (cf. **chapitre II**).

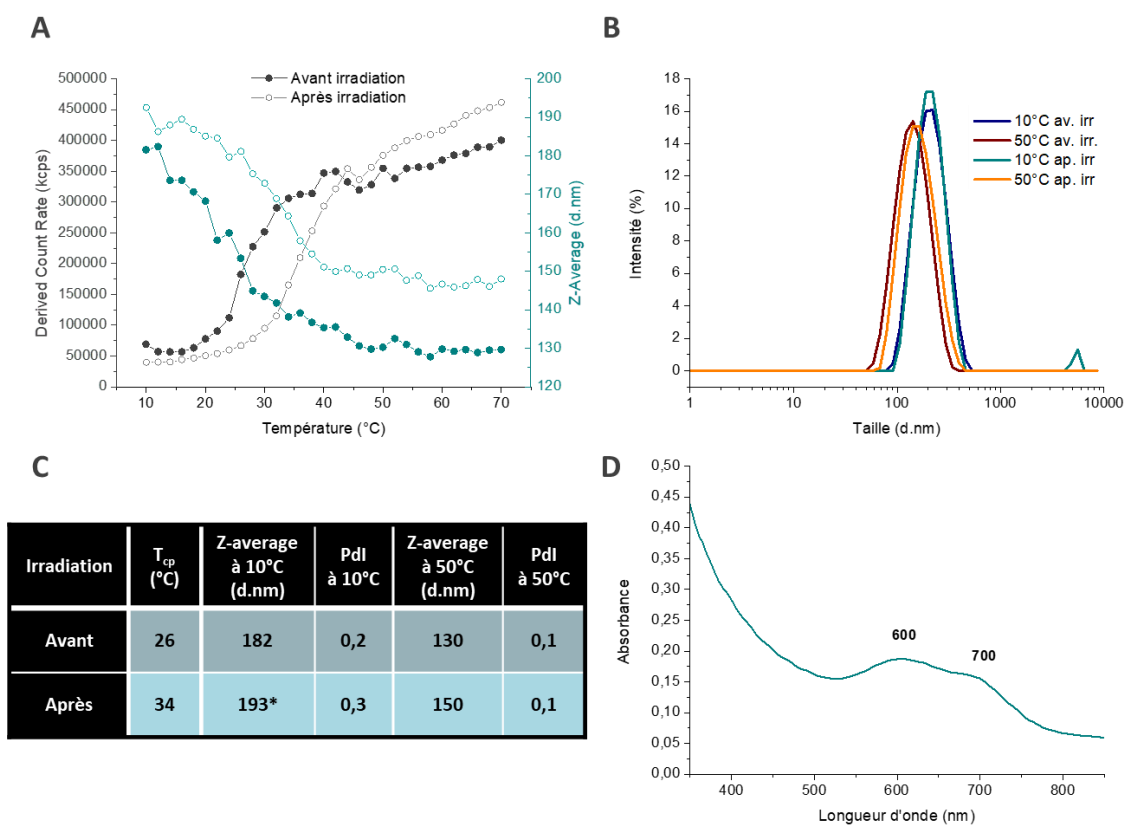


Figure V-13 : Comparaison des propriétés physico-chimiques du bioconjugué HA_{4.6k}-ELPn80-PS (78 μ M, D₂O) avant et après 15 min d'irradiation par DLS (A, B, C) et spectroscopie (D). A : Évolution de l'intensité diffusée et du diamètre moyen des objets en fonction de la température. B : Distribution de taille en intensité à 10°C et 50°C. C : Tableau récapitulatif. D : Spectre d'absorbance après irradiation.

L'irradiation semble également avoir une influence sur la taille des nanoparticules, avec un Z-Average légèrement plus important après irradiation. Ceci est en partie confirmé par l'étude des distributions de taille en **Figure V-13 B et C**. Une légère augmentation du diamètre est en effet observée à 50°C, confirmée par le maintien d'un Pdl faible. Ceci est probablement dû à la forte hydrophilie des fonctions sulfoxyde qui peuvent se lier avec un plus grand nombre de molécules d'eau, et ainsi empêcher une condensation du cœur trop importante. En revanche, la faible différence de Z-Average observée à froid peut avoir une autre explication. En effet, la distribution de taille et l'augmentation du Pdl traduisent la présence d'agrégats, qui perturbent le calcul du Z-Average. L'observation des distributions de taille semble au contraire suggérer une taille d'objets similaire avant et après irradiation à cette température. Cette fois, les ELPs étant hydrophiles, l'hydrophilie supplémentaire apportée par les sulfoxydes n'aurait effectivement que peu d'impact.

Enfin, une analyse spectrométrique illustrée en **Figure V-13 D** montre un spectre d'absorbance similaire à celui obtenu avant irradiation. Le PS ne semble donc pas avoir été endommagé par son exposition prolongée à cette longueur d'onde et cette puissance lumineuses.

La capacité du PS à générer des ROS a donc été prouvée indirectement par l'oxydation effective des résidus méthionine des bioconjugués HA-ELPn80-PS. Le suivi réalisé par RMN ¹H a permis de conclure à une oxydation totale au bout d'une durée d'irradiation cumulée de 15 min.

Une analyse quantitative de cette oxydation a été menée par l'étude de l'évolution de l'intégration des signaux de résonances des protons les plus proches du soufre. Elle a permis de conclure à une cinétique d'ordre 1, de constante de vitesse $k \approx 0.16 \text{ s}^{-1}$ et de temps de demi-réaction $t_{1/2} \approx 4.3 \text{ min}$. Enfin, une caractérisation des nanoparticules après irradiation a montré une évolution de la T_{cp} et de leur diamètre cohérente avec la formation de sulfoxides, tandis que les propriétés spectrales sont demeurées inchangées. En revanche, il semble que l'hydrophilie apportée par les sulfoxides n'est pas suffisante pour induire à nouveau un désassemblage à basse température.

CONCLUSION

Dans ce projet, la capacité d'action anticancéreuse n'a pas été apportée par l'encapsulation ou le couplage d'un principe actif cytotoxique, mais par celui d'un photosensibilisateur capable de générer des ROS sous irradiation. De cette façon, la sélectivité du traitement envers les cellules cancéreuses pourrait être assurée à la fois par le ciblage actif des cellules surexprimant le CD44 à leur surface, et par l'application locale d'une irradiation. Cette combinaison permettrait de diminuer les risques d'action hors-cible et les effets secondaires.

Pour cela, un PS a été synthétisé par un laboratoire partenaire. Il présente une unique amine primaire non modifiée et une absorbance maximale vers 600-700 nm. Ce PS a ensuite été couplé à l'extrémité C-terminale d'un composé DBCO-ELPn80 selon un protocole semblable à celui utilisé précédemment pour le couplage de fluorophores. Cet intermédiaire DBCO-ELP-PS a ensuite été associé au HA par SPAAC pour former les bioconjugués HA-ELPn80-PS.

Si la présence du PS très hydrophobe perturbe les réactions de synthèse, il procure cependant aux bioconjugués des propriétés particulières. Ainsi, sa présence est responsable d'une amphiphilie permanente du bioconjugué, empêchant le désassemblage à basse température. La réticulation de ces nanoparticules n'est donc pas nécessaire pour leur utilisation en biologie.

La thermosensibilité est cependant maintenue : la condensation de l'ELP à haute température engendre en effet une diminution de la taille des nanoparticules et une augmentation de l'intensité diffusée, permettant de déterminer la T_{cp} .

L'analyse des propriétés spectrales de ces bioconjugués indique une absorbance maximale vers 600 nm et une émission de fluorescence nulle. La désexcitation par génération de ROS a donc été explorée.

Pour cela, une solution de bioconjugués dans le D₂O a été soumise à une irradiation à 632 nm et un suivi par RMN ¹H réalisé. La génération de ROS est étudiée de façon indirecte par leur capacité à oxyder les résidus méthionine présents dans la chaîne d'ELP. Les signaux caractéristiques de cette oxydation étant bien définis, il a été possible de déterminer les constantes cinétiques de cette réaction d'oxydation. Si celles-ci sont un peu élevées, elles ne semblent pas incompatibles avec une étude *in vitro* sur cellules.

Enfin, une caractérisation post-irradiation a montré que son influence était majoritairement liée à la génération de fonctions sulfoxyde hydrophiles le long de la chaîne de l'ELP, avec une augmentation de la T_{cp} et de la taille des nanoparticules à chaud. Les propriétés spectrales, quant à elles, ne semblent pas impactées. Une expérience de nouvelle irradiation d'une solution de ces bioconjugués HA-ELPn80-PS en présence de bioconjugués non oxydés pourrait renseigner sur la capacité du PS à continuer de produire des ROS, après 15 min d'irradiation.

Ce système semble donc compatible avec une application biologique, la faiblesse envers la dilution précédemment observée étant contrecarrée par l'hydrophobie du PS. Une étude *in vitro* est donc actuellement en cours de réalisation par le Dr. A. Hurbin de l'IAB. Elle devrait nous renseigner sur la capacité de notre système à déclencher la mort cellulaire sous irradiation.

Idéalement, une expérience *in vivo* chez le poisson-zèbre permettrait enfin de clôturer l'étude de ce système biocompatible, thermosensible, et bioactif.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Matériel

Le *N,N,N',N'*-Tetraméthyl-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate (HBTU) et le diméthyl sulfoxyde (DMSO, 99.7%) ont été acquis auprès de **Sigma-Aldrich**, et le *N,N*-Diisopropyléthylamine (DIPEA, 99%) chez **Alfa Aesar**. L'éther diéthylique a été acheté chez **VWR**, et le D₂O et DMSO d₆ chez **Eurisotop**.

Le photosensibilisateur générateur de ROS (PS) a été synthétisé par le Dr. Avijit Kumar Das du groupe de recherche du Prof. Nathan D. McClenaghan à l'Institut des Sciences Moléculaires (ISM, Bordeaux).

Synthèses

Synthèse du composé DBCO-ELPn80-PS

Attention : PS très sensible, conditions anhydres, inertes et sans lumière requises.

Des solutions de DBCO-ELPn80 (30 mg, 0.88 μmol, 1 équiv.), de sonde bodipy (2.24 mg, 2.65 μmol, 3 équiv.), de DIPEA (1.71 mg, 13.23 μmol, 15 équiv.) et d'HBTU (2.3 mg, 6.17 μmol, 7 équiv.) sont préparées sous atmosphère inerte dans du DMSO anhydre (volume total = 1 mL). Les solutions de DIPEA et HBTU sont ajoutées à celle de l'ELP, puis celle de PS après homogénéisation. La solution devient bleu nuit et est maintenue sous atmosphère inerte, agitation, à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 2 jours. Le produit est ensuite purifié par deux cycles de précipitation dans l'éther diéthylique puis lavé avec 5 mL d'eau déionisé. Le solide insoluble est ensuite lyophilisé. Un solide bleu intense et cassant est obtenu avec un rendement massique de 96%. La caractérisation par spectrométrie de masse (MALDI) indique un taux de fonctionnalisation $\eta \approx 67\%$.

Synthèse des bioconjugués HA-ELPn80-PS par SPAAC

Les solutions de DBCO-ELPn80-PS (10 mg, 0.29 μmol, 1 équiv.) et de HA_{4.6k}-N₃ (0.67 mg, 0.14 μmol, 0.5 équiv.) sont préparées sous atmosphère inerte dans respectivement 450 μL de DMSO et 150 μL d'eau déionisée. Après dissolution totale, elles sont combinées et laissées sous agitation, atmosphère inerte, à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 2 jours.

La solution est ensuite diluée dans 7 mL d'eau déionisée et dialysée (membrane 10 kD) contre de l'eau déionisée pendant 3 jours. Le composé reste soluble. La purification est ensuite effectuée par centrifugation à chaud : chauffage de la solution 3 min à 35°C, puis centrifugation 5 min, 35°C, 11 000 g, et séparation du culot et du surnageant. Très peu de culot récupéré, séparation difficile. Après lyophilisation, un solide bleu cotonneux est obtenu avec un rendement massique $r = 77\%$. L'analyse par SDS-PAGE confirme la présence de DBCO-ELPn80-PS n'ayant pas réagi dans le surnageant. Produit non pur, taux de couplage non estimable.

Le même protocole a été appliqué pour la synthèse des bioconjugués HA_{24k}-ELPn80-PS et HA_{42k}-ELPn80-PS avec une purification tout aussi compliquée et des rendements massiques respectifs $r_{24k} = 95\%$ et $r_{42k} = 82\%$ (non purs).

Remarque : après lyophilisation, reprise dans le D₂O très lente (> 24h) et filtration à 0.45 μm sur filtre PVDC pouvant être nécessaire.

Caractérisations & Méthodes

Les protocoles d'analyse par SDS-PAGE, spectrométrie de masse MALDI, et DLS sont les mêmes que ceux décrits dans le **chapitre II (p125)**.

RMN

Les conditions d'analyse sont les mêmes celles décrites dans le Chapitre II.

Les composés DBCO-ELPn80-PS ont été préparés par dissolution dans 400 μL de DMSO d6 (*Eurisotop*) pour une concentration d'environ 8 mg/mL et analysés à 298 K (25°C).

Les bioconjugués HA-ELPn80-PS ont quant à eux été analysés dans les conditions habituelles (D_2O , 277 K).

Mesure d'absorbance et de fluorescence

Les mesures de fluorescence ont été effectuées sur un appareil SpectraMax M2 multiplate reader (*Molecular Devices*).

Un volume d'environ 500 μL de solution a été inséré dans une cuve en quartz de chemin optique 10 mm. Les spectres en absorbance ont été acquis avec un pas de 10 nm.

Spectre de fluorescence : $\lambda_{\text{ex}} = 650 \text{ nm}$, cutoff = 665nm, $\lambda_{\text{em}} = 700\text{-}850 \text{ nm}$, pas : 10 nm.

Génération de ROS par irradiation

Une solution de HA-ELPn80-PS a été soumise à une irradiation par une diode dans le domaine d'absorbance du photosensibilisateur. La génération de ROS par ce dernier a été estimée par RMN ^1H en suivant l'oxydation des résidus méthionine.

Montage expérimental : Figure V-14

Diode : - $\lambda_{\text{em}} = 638 \text{ nm}$ à 20°C. Refroidie à 10°C : $\lambda_{\text{réel}} \approx 632 \text{ nm}$ (effet hypsochrome).

- Puissance : **200 mWatt** ; I = 300 mA. (**Figure V-15**)

- Puissance surfacique : **100 mWatt/cm²** (diamètre du faisceau à 30 cm de la diode $\approx 2 \text{ cm}^2$)

Tube : - solution de bioconjugué à 78 μM dans du D_2O

- sonde de température (suivi de l'échauffement de la solution pendant l'irradiation)

- bullage d'air (apport d'oxygène et homogénéisation de la solution)

Protocole :

Irradiation du tube pendant une durée d'chronométrée puis analyse RMN ^1H .

Temps d'irradiation = durées d'irradiation cumulées depuis le début de l'expérience.

Spectre RMN ^1H effectué tous les : d = 1 min pour t = 0-6 min

d = 2 min pour t = 6-12 min

d = 3 min pour t = 12-15 min

RMN 400 MHz, 277 K (4°C), 32 scans.

Analyse cinétique :

Les pics de résonance des protons de la méthionine les plus proches du soufre (pics n et o) et leurs équivalents après oxydation (pics n_{ox} et o_{ox}) ont été intégrés sur chaque spectre (Pic de référence pour l'intégration : c2 (CH Valine VPGVG, 60 H)).

Afin de rendre ces intégrations comparables, elles ont été normalisées afin que le nombre total des protons N ($n + n_{\text{ox}}$) et O ($o + o_{\text{ox}}$) soit identique pour tous les spectres. Elles ont ensuite été transformées en pourcentage, en attribuant la valeur de 100% à l'intégration des pics n et o avant irradiation.

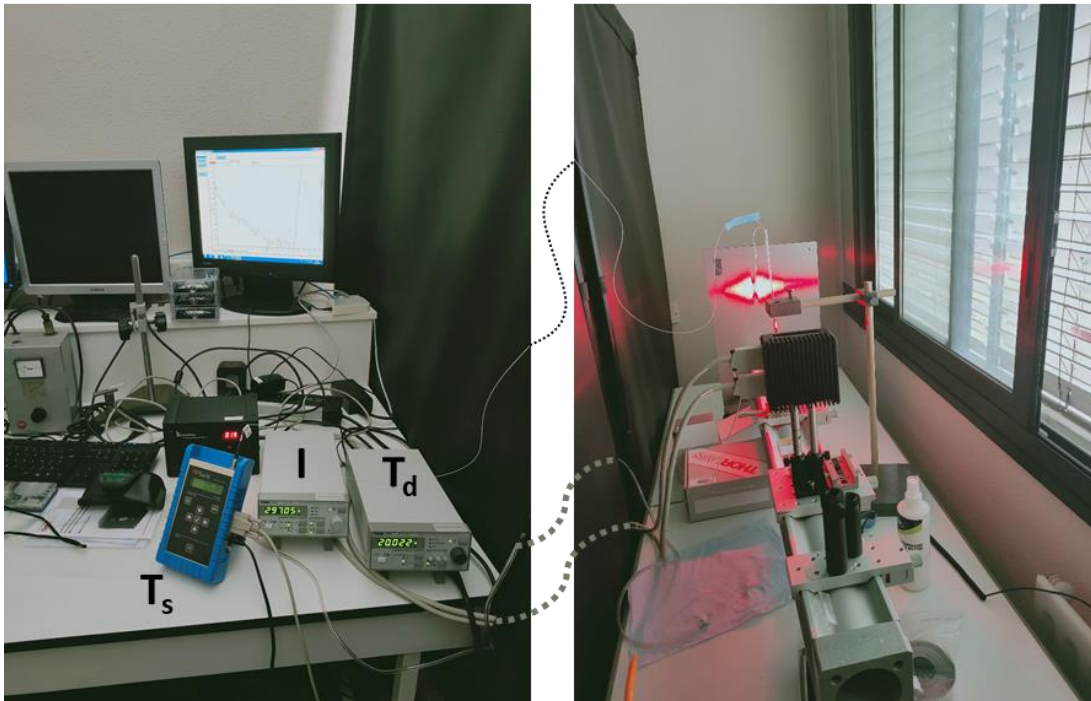
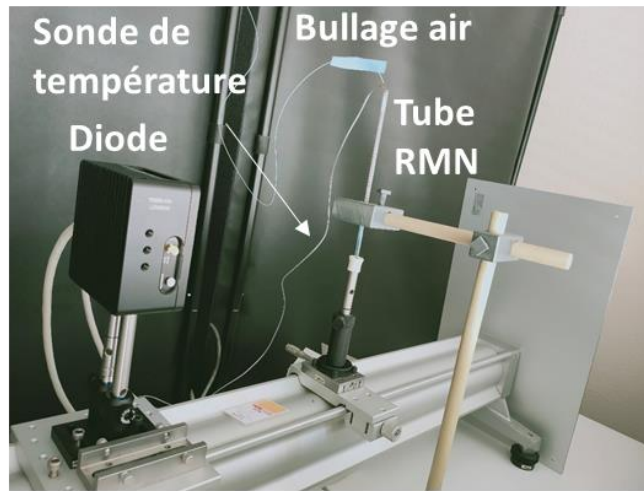


Figure V-14 : Montage expérimental d'irradiation. T_s : température de la solution. I : intensité de courant d'alimentation de la diode. T_d : température de la diode.

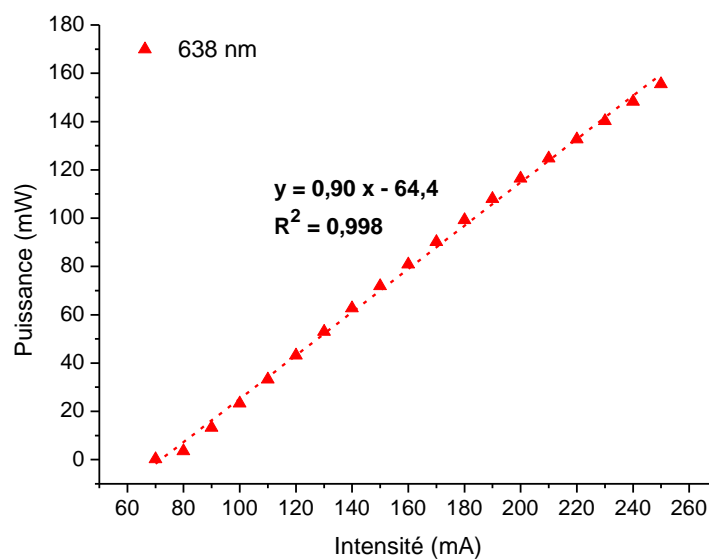
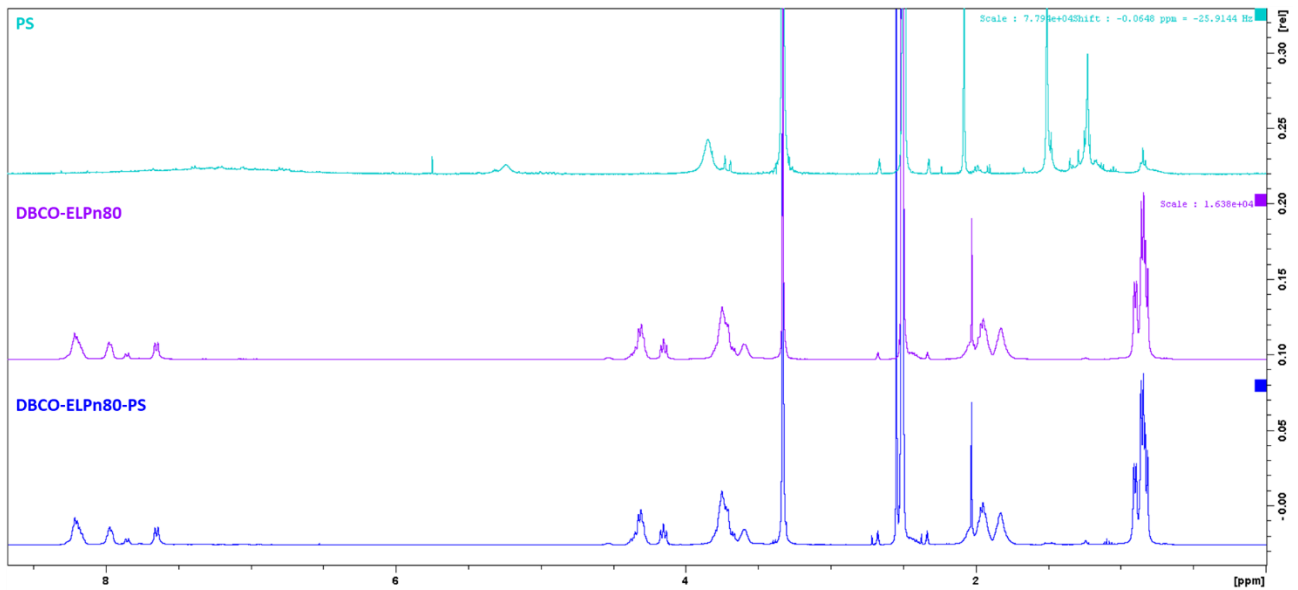
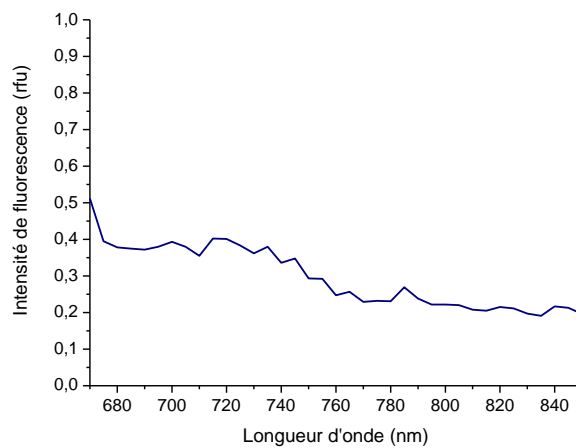


Figure V-15 : Courbe de calibration courant/puissance de la diode utilisée pour l'irradiation.

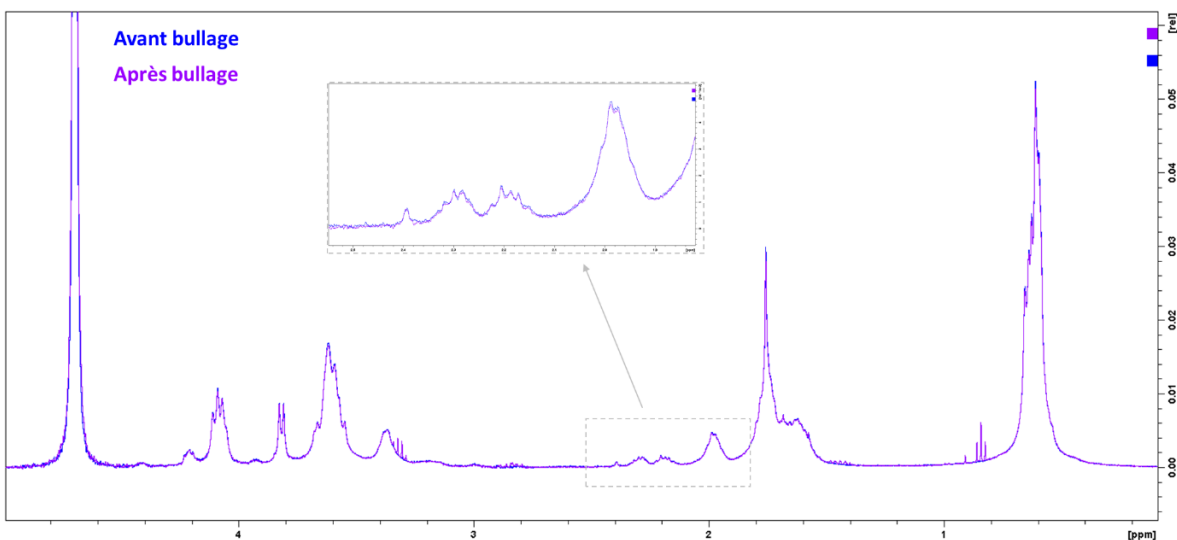
ANNEXES



Annexe V-1 : Spectres ^1H RMN des composés DBCO-ELP-PS (bleu), DBCO-ELP (violet), et du photosensibilisateur (cyan) (400 mHz, DMSO d_6).



Annexe V-2 : Spectre d'émission de fluorescence du bioconjugué $\text{HA}_{4,6k}\text{-ELPn80-PS}$ ($78 \mu\text{M}$, D_2O , $\lambda_{\text{ex}} = 650 \text{ nm}$).



Annexe V-3 : Spectres ^1H RMN du bioconjugué $\text{HA}_{4,6k}\text{-ELPn80-PS}$ avant et après bullage d'air. Pas d'oxydation.

RÉFÉRENCES

- (1) Ochsner, M. Photodynamic Therapy: The Clinical Perspective. Review on Applications for Control of Diverse Tumorous and Non-Tumorous Diseases. *Arzneimittelforschung*. **1997**, *47* (11), 1185–1194.
- (2) Allison, R. R.; Sibata, C. H. Oncologic Photodynamic Therapy Photosensitizers: A Clinical Review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2010**, *7* (2), 61–75. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.02.001>.
- (3) Zhang, W.; Ahmed, A.; Cong, H.; Wang, S.; Shen, Y.; Yu, B. Application of Multifunctional BODIPY in Photodynamic Therapy. *Dyes Pigments* **2021**, *185*, 108937. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108937>.
- (4) Plaetzer, K.; Krammer, B.; Berlanda, J.; Berr, F.; Kiesslich, T. Photophysics and Photochemistry of Photodynamic Therapy: Fundamental Aspects. *Lasers Med. Sci.* **2009**, *24* (2), 259–268. <https://doi.org/10.1007/s10103-008-0539-1>.
- (5) Moan, J.; Berg, K. The Photodegradation of Porphyrins in Cells Can Be Used to Estimate the Lifetime of Singlet Oxygen. *Photochem. Photobiol.* **1991**, *53* (4), 549–553. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1991.tb03669.x>.
- (6) Gorman, A.; Killoran, J.; O’Shea, C.; Kenna, T.; Gallagher, W. M.; O’Shea, D. F. In Vitro Demonstration of the Heavy-Atom Effect for Photodynamic Therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (34), 10619–10631. <https://doi.org/10.1021/ja047649e>.
- (7) Hackbarth, S.; Islam, W.; Fang, J.; Šubr, V.; Röder, B.; Etrych, T.; Maeda, H. Singlet Oxygen Phosphorescence Detection in Vivo Identifies PDT-Induced Anoxia in Solid Tumors. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2019**, *18* (6), 1304–1314. <https://doi.org/10.1039/C8PP00570B>.
- (8) Kamkaew, A.; Hui Lim, S.; Boon Lee, H.; Voon Kiew, L.; Yong Chung, L.; Burgess, K. BODIPY Dyes in Photodynamic Therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (1), 77–88. <https://doi.org/10.1039/C2CS35216H>.
- (9) Simone, B. C. D.; Mazzone, G.; Pirillo, J.; Russo, N.; Sicilia, E. Halogen Atom Effect on the Photophysical Properties of Substituted Aza-BODIPY Derivatives. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19* (3), 2530–2536. <https://doi.org/10.1039/C6CP07874E>.
- (10) Killoran, J.; Allen, L.; Gallagher, J. F.; Gallagher, W. M.; O’Shea, D. F. Synthesis of BF₂ Chelates of Tetraarylazadipyrrromethenes and Evidence for Their Photodynamic Therapeutic Behaviour. *Chem. Commun.* **2002**, No. 17, 1862–1863. <https://doi.org/10.1039/B204317C>.
- (11) Batat, P.; Cantuel, M.; Jonusauskas, G.; Scarpantonio, L.; Palma, A.; O’Shea, D. F.; McClenaghan, N. D. BF₂-Azadipyrrromethenes: Probing the Excited-State Dynamics of a NIR Fluorophore and Photodynamic Therapy Agent. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115* (48), 14034–14039. <https://doi.org/10.1021/jp2077775>.
- (12) Ibrahimova, V.; González-Delgado, J. A.; Levêque, M.; Torres, T.; Garanger, E.; Lecommandoux, S. Photooxidation Responsive Elastin-Like Polypeptide Conjugates for Photodynamic Therapy Application. *Bioconjug. Chem.* **2021**, *32* (8), 1719–1728. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00251>.
- (13) Michy; Massias; Bernard; Vanwonderghem; Henry; Guidetti; Royal; Coll; Texier; Josserand; Hurbin. Verteporfin-Loaded Lipid Nanoparticles Improve Ovarian Cancer Photodynamic Therapy In Vitro and In Vivo. *Cancers* **2019**, *11* (11), 1760. <https://doi.org/10.3390/cancers11111760>.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Le développement de nanovecteurs à la fois simples et multifonctionnels est essentiel pour permettre l'amélioration des traitements anticancéreux actuels. En particulier l'accumulation des DDS au sein des tumeurs demeure encore bien souvent trop faible pour espérer une efficacité et une sélectivité suffisantes. Elle pourrait pourtant être favorisée par l'application de stimuli physiques localisés (température, ultrasons, irradiation), pouvant être combinée avec une reconnaissance chimique entre un récepteur exprimé à la surface des cellules cancéreuses et un ligand présenté par le nanovecteur. Une meilleure compréhension de cette interaction ligand-récepteur et la possibilité de moduler son intensité par l'entremise d'un stimulus (externe ou interne) devrait permettre une amélioration sensible du ciblage des tumeurs et de la sélectivité des traitements, ainsi qu'une élimination efficace.

Afin de répondre à cet enjeu, nous avons synthétisé une librairie de bioconjugués HA-*b*-ELP capables de s'auto-assembler en nanoparticules sous l'effet de la chaleur, et compatibles avec des applications biologiques, en particulier anticancéreuses.

Après un chapitre bibliographique (**chapitre I**) permettant de positionner la problématique scientifique, le **chapitre II** a présenté la synthèse de ces bioconjugués à partir d'un hyaluronane court, de masse molaire 4,6 kDa, 24 kDa, ou 42 kDa, et d'un ELP[M₁V₃-n], avec n = 60, 80 ou 100 répétitions, produit par voie recombinante. La thermosensibilité de ces derniers a été exploitée pour leur purification et étudiée en détail. La combinaison de ces blocs a permis l'obtention d'une librairie de neuf bioconjugués de taille et composition variables.

Le couplage entre les blocs HA et ELP a été réalisé par cycloaddition alcyne-azoture, d'abord catalysée au cuivre, puis rapidement remplacée par une promotion par tension de cycle. Celle-ci présente en effet de multiples avantages : elle ne nécessite notamment ni solvant organique, ni catalyseur, ni co-réactif. Elle est donc très simple à mettre en œuvre et à purifier. Ceci la rend ainsi compatible à la fois avec des applications biologiques et avec un changement d'échelle.

Cette voie de synthèse a été rendue possible par la fonctionnalisation de l'extrémité réductrice du HA par un groupement azoture et celle de l'extrémité N-terminale de l'ELP par une fonction alcyne cyclique (DBCO). Elle est donc extrêmement versatile : il est en effet possible de modifier la composition du bioconjugué par simple changement de l'un des deux blocs. A titre d'exemple, le couplage du bloc ELP avec un polysaccharide reconnaissant un autre récepteur permettrait de changer les cellules ciblées sans modifier ni le principe, ni la voie de synthèse du système. Tous leurs avantages seraient alors conservés. Il serait également envisageable de mêler des bioconjugués porteurs de différents polysaccharides pour obtenir le ciblage simultané de plusieurs récepteurs avec le même nanovecteur, augmentant encore la sélectivité.

La SPAAC a donc permis la synthèse simple et versatile de bioconjugués HA-*b*-ELP bioinspirés et thermosensibles.

L'étude de l'auto-assemblage de ces bioconjugués en nanoparticules a été développée dans le **chapitre III**. Ce phénomène a lieu en milieu aqueux et est contrôlé par la température. En effet, il est mené par la thermosensibilité du bloc ELP. À basse température, celui-ci est hydrophile. Le bioconjugué est donc en solution sous forme de chaînes libres. Au-dessus d'une température critique (CMT), l'ELP devient hydrophobe. Le bioconjugué acquiert donc un caractère amphiphile et s'auto-assemble en nanoparticules de type cœur-couronne, le HA hydrophile permettant la stabilisation de l'interface.

La réversibilité de ce phénomène ayant été établie, les conditions précises de température (CMT) et de concentration (CMC) menant à l'auto-assemblage des neuf bioconjugués de la librairie ont été déterminées en tampons salins. Elles se révèlent toutes compatibles avec des applications biologiques variées, bien que certaines soient un peu trop proches des conditions physiologiques, laissant entrevoir des problèmes d'instabilité. Cette détermination permet en outre la prédiction de l'état du système pour des couples [température ; concentration] précis. La confirmation de ces valeurs pourrait être obtenue par comparaison avec d'autres techniques d'analyse (e.g. SANS (CMT), fluorescence du pyrène (CMC)).

Les objets auto-assemblés ont ensuite été caractérisés. Leur diamètre varie avec la masse molaire du HA, mais pas avec celle de l'ELP. Il reste cependant compatible avec une accumulation passive dans les tumeurs (10-200 nm). Une mesure de potentiel zêta négatif a confirmé le déploiement du HA en surface et de l'imagerie par TEM a permis de vérifier la morphologie sphérique des nanoparticules. Enfin, elles ont fait preuve d'une bonne stabilité sous forme auto-assemblées à haute température pendant plusieurs heures et sous forme de chaînes libres après un stockage à froid de plusieurs mois. Une caractérisation par diffusion multiangle de la lumière a été tentée, sans donner de résultats concluants. Son optimisation permettrait pourtant de déterminer le ratio R_g/R_H des objets ainsi que leur nombre d'agrégation, donnant accès au nombre de HA disponibles par nanoparticule.

Ce système permet donc l'obtention très simple et rapide en milieu aqueux de nanoparticules stables de diamètre 50-200 nm, sans nécessiter l'utilisation de solvants organiques.

Le comportement de ces nanoparticules en conditions biologiques a été évalué dans le **chapitre IV**. Une fragilité envers la dilution ayant été constatée, elles ont été stabilisées par réticulation du cœur ELP. Le protocole mis en œuvre est simple, versatile, et compatible avec des applications biologiques subséquentes. Il consiste en l'alkylation chimiosélective des résidus méthionine par un composé porteur de deux fonctions époxyde, qui peuvent donc former des liens intra- et intermoléculaires. Le maintien de la thermosensibilité après réticulation a été observé, le désassemblage étant remplacé par une simple augmentation de la taille hydrodynamique des objets. A 50°C, celle-ci est comparable à celle des nanoparticules non réticulées (50-250 nm) et demeure donc dans la gamme permettant une accumulation passive. Cette réticulation ne semble par ailleurs pas avoir eu d'impact sur la morphologie sphérique et la structure cœur-couronne des nanoparticules, confirmées par imagerie TEM et mesure de potentiel zêta (≈ -25 mV).

Cette réticulation permet donc la stabilisation des nanoparticules sans impacter leurs propriétés physico-chimiques de manière conséquente.

La possibilité de visualiser les nanoparticules *in situ* a été assurée par la fonctionnalisation de l'extrémité C-terminale de l'ELP par quatre fluorophores de propriétés spectrales différentes. Trois d'entre eux, la fluorescéine, la rhodamine et le DY700, étaient destinés aux études *in vitro*. La fluorescéine a rapidement été abandonnée du fait de son émission dans la gamme d'auto-fluorescence des cellules. La rhodamine a elle aussi été écartée après l'observation de problèmes de synthèse et de propriétés spectrales, ayant un impact fort sur la fiabilité des résultats *in vitro*. Le DY700 a en revanche fait preuve de propriétés satisfaisantes, avec notamment une émission conséquente dans le proche infrarouge. Le dernier fluorophore, le DY410, a été sélectionné pour une étude de biodistribution *in vivo* chez un modèle de poisson-zèbre. Son émission dans le bleu permet un bon contraste avec les vaisseaux sanguins teintés en rouge de la lignée étudiée. Cette étude est actuellement en cours de réalisation par le Dr. Leslie Dubrana.

Ce protocole permet donc le couplage de différentes sondes de fluorescence sur le bioconjugué, les DY700 et DY410 étant ici privilégiés pour les études *in vitro* et *in vivo* respectivement.

L'étude de la reconnaissance du récepteur CD44 par le HA a ensuite été menée par SPR sur des nanoparticules réticulées. L'influence bénéfique de l'effet de multivalence a été démontrée de deux manières différentes : une comparaison entre nanoparticules réticulées et non réticulées (retrouvant un état de chaînes libres avec la dilution) a permis de confirmer la très forte interaction des premières avec le CD44 et la dissociation quasi-immédiate des secondes. La présentation de multiples exemplaires du ligand est donc favorable à l'affinité.

Une expérience réalisée avec différentes densités de récepteur CD44 a mené à des conclusions similaires : l'affinité des nanoparticules pour la surface était bien plus importante en présence d'une forte densité de récepteurs. Par ailleurs, la composition du bioconjugué semble avoir un impact sur l'interaction. Ainsi, les nanoparticules présentant le HA_{4,6k} à leur surface semblent posséder une affinité plus importante que celles présentant les HA_{24k} et HA_{42k}. Ceci est en contradiction avec les observations effectuées sur les HA libres, pour lesquels l'affinité augmente avec la masse molaire. Une hypothèse de gêne stérique peut être avancée. En revanche, la taille de l'ELP ne semble pas avoir d'influence.

La meilleure affinité pour le récepteur CD44 a donc été obtenue pour une nanoparticule réticulée présentant de multiples exemplaires du HA_{4,6k} à sa surface, en présence d'une forte densité de récepteur. La sélectivité envers les cellules surexprimant le CD44 semble donc possible, tout comme la modulation de l'affinité par le contrôle du désassemblage.

Enfin, le ciblage de cellules surexprimant le récepteur CD44 a été étudié *in vitro* sur les lignées cellulaires A549 (CD44⁺) et H322 (CD44⁻). Une bonne sélectivité a été observée envers les premières, un effet dose suggérant fortement l'implication de l'interaction spécifique ligand-récepteur dans le marquage des cellules. Tout comme en SPR, le ciblage le plus élevé a été observé pour les nanoparticules présentant le HA le plus court, tandis que la taille de l'ELP ne semble pas avoir d'effet. En parallèle, une étude de cytotoxicité a montré l'innocuité des nanoparticules réticulées jusqu'à une concentration de 25 µM. En revanche une toxicité a été observée pour les nanoparticules non réticulées sur les fibroblastes pulmonaires MRC5 dès 10 µM. Ces résultats sont toutefois en cours de confirmation.

Ces tests *in vitro* confirment donc la biocompatibilité et la capacité de notre système à cibler activement les cellules cancéreuses surexprimant le récepteur CD44.

Dans toutes ces études, un candidat se démarque : le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80. Les nanoparticules réticulées formées par son auto-assemblage présentent en effet une couronne de HA_{4,6k} court, responsable d'une bonne affinité pour le CD44, et un cœur d'ELPn80 dont les caractéristiques et propriétés sont adaptées aux applications biologiques.

Propriété	Résultat pour HA _{4,6k} -ELPn80
Rendement de production (ELPn80)	117 mg/L
CMT (78 µM)	31°C
CMC (37°C)	35 µM
Stabilité à 37°C / 4°C	> 14 h / > 18 mois
Taille des nanoparticules non réticulée / réticulée (50°C)	48 nm / 57 nm
Potentiel Zêta	- 16 mV
Affinité pour le récepteur CD44 (SPR)	Forte
Sélectivité envers les cellules A549 (CD44 ⁺)	Forte
Cytotoxicité (nanoparticules réticulées)	Non toxiques à 25 µM

Ce bioconjugué a donc fait l'objet d'analyses plus poussées. Outre l'étude *in vivo* mentionnée précédemment, le **chapitre V** a décrit sa conjugaison à un photosensibilisateur (PS) afin d'acquérir une composante cytotoxique contrôlable. La forte hydrophobie du PS dérivé d'aza-bodipy empêche le désassemblage des nanoparticules même à froid, la thermosensibilité n'étant plus visible que par variation du diamètre des objets. Ces nanoparticules sont donc stables sans réticulation. Une vérification de la génération de ROS par le PS ainsi couplé a été effectuée par irradiation à 632 nm d'une solution de nanoparticules de HA_{4,6k}-ELPn80 et suivi RMN ¹H de l'état d'oxydation des résidus méthionine. Une oxydation totale a été observée au bout de 15 min. L'application d'un modèle de cinétique d'ordre 1 a permis de déduire un temps de demi-réaction d'environ 4 min. Une étude *in vitro* est actuellement en cours sur les mêmes cellules A549 et H322 en culture 2D pour évaluer sa capacité à déclencher l'apoptose ou la nécrose sous irradiation. Par ailleurs cette irradiation ne paraît pas avoir d'effets délétères sur le système, le PS ne semblant pas impacté et le bioconjugué présentant des propriétés physico-chimiques caractéristiques de la formation de sulfoxydes le long de la chaîne.

La capacité d'action thérapeutique a donc été obtenue par le couplage sur le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80 d'une composante cytotoxique contrôlable. Lors d'une irradiation dans le rouge, celle-ci génère des ROS capables d'altérer l'environnement immédiat par oxydation. La forte hydrophobie du PS employé prévenant également le désassemblage à froid des nanoparticules, leur stabilisation par réticulation n'est donc plus nécessaire.

En conclusion, ces travaux ont permis la conception d'un bioconjugué HA-*b*-ELP bioinspiré, biocompatible, bioactif, et thermosensible. Il est capable de s'auto-assembler en nanoparticules possédant des propriétés de ciblage actif de cellules cancéreuses, par reconnaissance HA/CD44, et d'action thérapeutique, le couplage avec un photosensibilisateur permettant la génération de ROS sous irradiation pouvant mener à la mort de ces dernières. Les différentes étapes de synthèse et de formulation ont été optimisées pour être les plus simples et les plus biocompatibles possibles, rendant une montée d'échelle envisageable. Ce système se rapproche donc des recommandations pour la conception d'un nanovecteur efficace présentées dans l'introduction.

Par ailleurs, la thermosensibilité de l'ELP confère à ce système d'autres avantages, tels que l'amélioration de la sélectivité par l'application d'une hyperthermie locale, permettant une meilleure accumulation dans la tumeur, et une modulation spatiotemporelle de l'affinité du HA présent à la surface du nanovecteur pour les cellules surexprimant le récepteur CD44. Le couplage avec un photosensibilisateur le rend compatible avec une application potentielle en thérapie photodynamique.

La poursuite de l'étude de ce système est actuellement en cours, avec de nouvelles expériences *in vitro* de cytotoxicité, et d'induction de mort cellulaire sous irradiation par le bioconjugué HA_{4,6k}-ELPn80-PS. Une étude *in vivo* de biodistribution chez le poisson-zèbre est également en cours.

Pour aller plus loin, une expérience de biodistribution et d'efficacité *in vivo* sur modèle animal porteur d'une xénogreffe tumorale pourrait compléter joliment ce travail. Par ailleurs, la possibilité de retrouver un désassemblage contrôlé *in situ* pourrait être obtenue grâce à l'utilisation d'agents de réticulation clivables sous l'effet d'un stimulus. Des applications d'encapsulation et de libération contrôlée de principes actifs pourraient alors être envisagées.

Titre : Conception et évaluation de nanoparticules auto-assemblées à base de copolymères à blocs bioactifs et thermosensibles pour des applications anticancéreuses

Résumé : La reconnaissance ligand-récepteur est de plus en plus utilisée pour la conception de nanovecteurs de principes actifs anticancéreux capables de cibler activement les tumeurs. Parmi elles, l'interaction entre le hyaluronane et son récepteur CD44 est particulièrement étudiée. La modulation de cette affinité devrait donc permettre d'améliorer la sélectivité du ciblage et de limiter les effets secondaires des traitements. Pour cela, nous avons conçu et élaboré un système de copolymères à bloc hyaluronane-*b*-ELP capables de s'auto-assembler pour former des nanoparticules bioactives et thermosensibles. La réversibilité de cet assemblage permet une modulation de l'affinité du système pour le CD44 : mauvais ligand sous forme de chaîne libre, son assemblage en nanoparticule rend possible la formation d'interactions multivalentes fortes. La synthèse d'une librairie de neufs bioconjugués HA-*b*-ELP, explorant trois tailles différentes de chaque bloc, a permis l'étude de l'influence de la composition sur l'auto-assemblage et sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules formées. Celles-ci ont ensuite fait l'objet d'une évaluation biologique, leur interaction avec le CD44 étant évaluée à l'échelle du récepteur par SPR, et à l'échelle de la cellule lors d'études *in vitro*. Des adaptations ont alors été apportées pour accorder au système une résistance à la dilution par réticulation, et lui conférer des propriétés spectrales ou cytotoxiques par couplage avec une sonde de fluorescence ou un photosensibilisateur.

Mots clés : polypeptide d'élastine (ELP), hyaluronane, thermosensibilité, auto-assemblage, récepteur CD44, affinité ligand-récepteur, multivalence, réticulation, cancer

Title: Design and evaluation of self-assembled nanoparticles based on bioactive and thermosensitive block copolymers for anticancer applications

Abstract: Ligand-receptor recognition is more and more used in the conception of active targeting anticancer drug delivery systems. Among them, the interaction between hyaluronan and the CD44 receptor is particularly studied. The modulation of their affinity could be tuned in order to increase targeting and treatment selectivity. To this aim, we propose a system based on hyaluronan-elastin-like-polypeptide block copolymers (HA-*b*-ELP) able to self-assemble into bioactive and thermosensitive nanoparticles. The reversibility of this self-assembly makes it possible to tune the affinity of the system for the CD44 receptor: from a weak monovalent interaction as free chains, the affinity of HA is highly improved by its presentation at the surface of nanoparticles, providing strong multivalent interactions. The synthesis of nine HA-*b*-ELP bioconjugates, based on three different sizes of each block, has enabled the establishment of structure-properties relationships. The potential of the nanoparticles for biological applications was then evaluated at the receptor scale by SPR analysis, and at the cellular scale by *in vitro* studies. Some optimizations of the system were then achieved to increase its resistance against dilution by core cross-linking and provide it with optical or cytotoxic properties by coupling with a fluorescent dye or a photosensitizer.

Keywords: elastin-like-polypeptide, hyaluronan, thermosensitivity, self-assembly, CD44 receptor, ligand-receptor affinity, multivalency, crosslink, cancer
