



HAL
open science

Synthèse de composés amphiphiles par réaction click : applications à la conception de liposomes

Montassar Khalil

► **To cite this version:**

Montassar Khalil. Synthèse de composés amphiphiles par réaction click : applications à la conception de liposomes. Chimie organique. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2021. Français. NNT : 2021BRES0098 . tel-04125663

HAL Id: tel-04125663

<https://theses.hal.science/tel-04125663>

Submitted on 12 Jun 2023

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ECOLE DOCTORALE N° 596
Matière Molécules et Matériaux
Spécialité : Chimie moléculaire et macromoléculaire

Par

Montassar KHALIL

Synthèse de composés amphiphiles par réaction click Applications à la conception de liposomes

Thèse présentée et soutenue à Brest, le 09 décembre 2021

Unité de recherche : CEMCA, UMR CNRS 6521

Rapporteurs avant soutenance :

Michaela GULEA, Directrice de recherche CNRS

Mathieu MEVEL, Ingénieur de recherche - HDR

Composition du Jury :

Michaela GULEA (Rapporteur et président du jury)
Directrice de recherche CNRS, Université de
Strasbourg

Mathieu MEVEL (Rapporteur)
Ingénieur de recherche – HDR, Université de Nantes

Paul-Alain JAFFRES (Directeur de thèse)
Professeur des Universités, Université de Brest

Mathieu BERCHEL (Co-directeur de thèse)
Maître de conférences, Université de Brest

Invité(s)

Antony MEMBOEUF
Maître de conférences, Université de Brest

Aurore FRAIX
Enseignante-chercheur, Université de Catane, Italie

Vous êtes bon quand vous vous efforcez de donner de vous-même. Pourtant, vous n'êtes pas mauvais quand vous cherchez le profit pour vous-même. Car quand vous cherchez le profit vous n'êtes qu'une racine qui s'agrippe à la terre et tête à son sein. Certainement, le fruit ne peut dire à la racine, " Soit à mon image, plein et mûr et toujours généreux de ton abondance ". Car pour le fruit, donner est une nécessité, et recevoir est une nécessité pour la racine.

Gibran khalil Gibran « Le prophète »

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été effectués à l'université de Brest - France dans les laboratoires « Chimie, Electrochimie Moléculaire et Chimie Analytique (CEMCA, UMR CNRS 6521) ».

Le projet de thèse a été financé par le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR).

Je tiens donc à remercier cet organisme, sans qui cette thèse n'aurait jamais pu aboutir.

Je tiens à remercier vivement mon directeur de thèse Pr. Paul-Alain Jaffrès, Professeurs des Universités à l'université de Brest, pour m'avoir accueilli et m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet de thèse pluridisciplinaire. Merci de m'avoir prodigué de nombreux et précieux conseils. Merci pour votre patience durant ces trois années de thèse et notamment lors de la correction de ce manuscrit et des publications.

Je tiens à remercier également, Dr Mathieu Berchel, Maitre de conférences à l'université de Brest, d'avoir co-diriger cette thèse. Merci pour tes remarques ainsi que tes idées qui n'ont fait qu'avancer ce travail. Merci pour les discussions et les conseils que vous m'avez prodigués tout au long de cette thèse.

Mes plus sincères remerciements vont à Mme Michaela Gulèa, directrice de recherche CNRS à l'université de Strasbourg et à M. Mathieu Mevel, ingénieur de recherche à l'université de Nantes d'avoir accepté de rapporter ce travail de thèse.

J'adresse mes remerciements à Dr. Antony Memboeuf, maitre de conférences à l'université de Brest, et Dr. Dany Jeanne dit Fouque pour leur expertise en spectrométrie de masse. Les analyses effectuées au sein de votre laboratoire ont bien consolidé le projet de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

J'aimerai exprimer ma plus profonde gratitude à Pr. Salvatore Sortino, Professeur des Universités à l'université de Catane - Italie, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire dans le cadre d'une mobilité internationale. J'exprime également mes plus sincères remerciements à Aurore Fraix, Enseignante-chercheuse à l'université de Catane - Italie, qui est d'une extrême gentillesse et d'une grande rigueur. Je te remercie pour ton temps accordé tout au long de mon séjour ainsi que pour ton expertise en chrono-ampérométrie et en fluorescence. Au-delà de la science, merci à vous deux ainsi que les membres de votre équipe Mimi et Cristina pour votre générosité ainsi que votre sens de l'humour. Je garderai pour toujours les bons moments passés pendant les pauses café et la dégustation des nombreux plateaux de gâteaux Italiens.

J'exprime mes sincères remerciements au Pr Tristan Montier d'avoir accepté de m'accueillir dans son laboratoire pendant une semaine pour assister aux tests biologiques *in vitro* dédiés pour la transfection. Je tiens à remercier spécialement les deux doctorants, Raphaëlle et Alexis qui ont réalisé les études biologiques *in vitro*, sans qui l'aboutissement complet de ce projet n'aurait jamais pu avoir lieu.

Un spécial dédicace à Dr Stéphane Cerantola et à Dr Gaelle Simon pour les analyses RMN et Nelly Kervarec pour les analyses en spectrométrie de Masse (maldi-tof et ESI).

Un spécial merci aux membres de l'équipe, Hélène, Laure, Olivier, Wilfried, et Sylvie, c'était un grand plaisir de faire votre connaissance.

Enfin, j'aimerais adresser un immense merci à toutes les personnes qui m'ont entourées durant ces trois années au laboratoire. Parmi elles, je tiens à remercier Dorsaf, Nesrine, Amal et Lucia. Je tiens à remercier également toutes les personnes avec lesquelles j'ai passé d'agréables moments et de nombreux fous rires, que ce soit elles ont fait partie du laboratoire ou elles n'ont jamais fait partie : Nancy, Rym, Ines, Marco, Romain, Mathilde, Fatine, Alicia, Christophe, Thomas, Fatma, Aziza... Un grand

merci à tous mes potes dont ceux qui étaient très présents durant ces trois dernières années : Raouf, Montassar, Faicel, Salim et Hiba.

Finalement, je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux personnes qui me sont les plus chères.

Tout à bord, un énorme merci à mes parents Mokhtar et Messaouda, qui n'ont toujours pas compris ce que c'est un liposome, mais ils étaient toujours là à m'encourager et me pousser pour le meilleur. Ceci n'est qu'un modeste remerciement devant ce que vous valiez pour moi.

Un grand merci à mes nièces Eya, Assil et Jannah et mon neveu Youness pour leurs cris de joie quand ils m'appellent en vidéo. Je vous embrasse et je vous aime tous très fort. Je vous promets que je passerai plus de temps avec vous dans le futur. Je tiens à remercier également mes belles sœurs spécialement Antonella.

Enfin, un immense merci à mes trois frères Yasmine, Nidhal et Majdi pour tout ce qu'ils ont apporté dans ma vie. Je tiens à vous exprimer ma gratitude pour votre soutien et vos encouragements qui m'ont permis de franchir tous les obstacles...

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES	15
INTRODUCTION GENERALE	19
CHAPITRE I : INTRODUCTION A LA FONCTIONNALISATION DE LIPOSOMES	23
I. LIPOSOMES : GENERALITES, PREPARATION ET CARACTERISATION	25
I.1 Liposome	25
I.2 Applications de liposomes	29
I.3 Préparation de liposomes.....	33
I.3.1 Techniques de formation de liposomes	33
I.3.1.1 Préparation des solutions liposomales par hydratation d'un film lipidique	33
I.3.1.2 Préparation des solutions liposomales en phase inverse	34
I.3.1.3 Préparation de solutions liposomales par chauffage.....	34
I.3.1.4 Préparation des solutions liposomales par injection de solvants	34
I.3.1.5 La méthode par élimination de détergent	35
I.3.1.6 Préparation des solutions liposomales par microfluidique.....	35
I.3.1.7 Préparation des solutions liposomales en milieu CO ₂ supercritique.	36
I.3.2 Traitements possibles après la préparation de liposomes	38
I.3.2.1 Contrôle de la morphologie	38
I.3.2.2 Lyophilisation.....	39
I.4 Techniques de caractérisation de liposomes.....	40
I.4.1 Détermination de la taille par DLS.....	41
I.4.2 Détermination du potentiel zêta.	42
I.4.3 La microscopie électronique à transmission cryogénique (Cryo-MET).....	43
I.5 Liposomes : vers des agrégats polyfonctionnels	43
II. MODIFICATION DE LA SURFACE DE LIPOSOMES	47
II.1 Méthodes de fonctionnalisation de liposomes	48
II.2 Types de molécules utilisées pour la fonctionnalisation de liposomes	50
II.2.1 Les PEGs	50
II.2.2 Les anticorps.....	51
II.2.3 Les vitamines	52

II.2.4	Les carbohydrates (Glucides)	52
II.2.5	Les aptamères	53
II.3	Exemples de couplages utilisés pour la fonctionnalisation de liposomes.....	53
II.3.1	Fonctionnalisation d'un liposome possédant une fonction amine à sa surface.....	54
II.3.2	Fonctionnalisation d'un liposome comportant une fonction aldéhyde à sa surface.....	55
II.3.3	Fonctionnalisation d'un liposome incluant une fonction acide carboxylique à sa surface.....	56
II.3.4	Fonctionnalisation d'un liposome incluant une fonction thiol à sa surface	58
II.3.5	Fonctionnalisation d'un liposome incluant un maléimide à sa surface	59
II.3.6	Fonctionnalisation de liposomes en utilisant la chimie click bio-orthogonale	60
II.3.6.1	La conjugaison par couplage d'azoture avec un alcyne catalysé par un sel de cuivre (CuAAC).....	61
II.3.6.2	La conjugaison sans catalyse au cuivre : Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition (SPAAC)	63
II.3.6.3	Fonctionnalisation de liposomes par ligation de Staudinger	67
II.3.6.4	Fonctionnalisation de liposomes par Diels – Alder à demande inverse d'électrons (IEDDA)	70
II.3.6.5	Fonctionnalisation de liposomes par formation d'oxime	73
CHAPITRE II : ETUDE METHODOLOGIQUE DE LA FONCTIONNALISATION DES LIPOSOMES.....		78
I.	INTRODUCTION.....	80
II.	BIBLIOGRAPHIE.....	81
II.1	Généralités sur les dithioesters.....	81
II.2	Préparation des phosphonodithioformiates	82
II.3	Réactivité des phosphonodithioformiates	83
II.3.1	Diéophile dans les réactions d'hétéro Diels-Alder	83
II.3.2	Réaction des phosphonodithioformiates avec les amines	84
III.	FONCTIONNALISATION DE LA SURFACE DES LIPOSOMES PAR REACTION D'AMINOLYSE DE PHOSPHONODITHIOFORMIATES.	87
III.1	Synthèse des précurseurs nécessaires à la mise en place de la modification de la surface des liposomes.	87
III.1.1	Synthèse des phosphonodithioformiates (neutre et cationique).....	87
III.1.1.1	Synthèse du phosphonodithioformiate neutre	89
III.1.1.2	Synthèse du phosphonodithioformiate cationique	96
III.1.2	Synthèse de la sonde fluorescente.....	98
III.1.3	Synthèse de PEG600-NH ₂ /N ₃	99

III.1.4	Synthèse de l'amphiphile cationique BSV36	100
III.2	Mise au point de la réaction d'aminolyse de phosphonodithioformiates lipidiques.....	101
III.2.1	Caractéristiques spectroscopiques du composé 6	101
III.2.2	Synthèse et caractérisations des thioamides 8 et 9 et 10	103
III.2.3	Étude de la réaction entre des liposomes contenant le motif phosphonodithioformiate et l'amine fluorescente 6	107
III.2.3.1	Préparation des solutions liposomales	107
III.2.3.2	Purification des liposomes par dialyse.....	109
III.2.3.3	Étude de l'immobilisation de l'amine 6 sur les liposomes par UV-visible.....	110
III.2.3.4	Étude de l'immobilisation du composé 6 par ESI-MS	112
III.2.3.5	Caractérisation des solutions liposomales par DLS et Cryo-MET après fonctionnalisation	114
III.2.3.6	Efficacité de la post-fonctionnalisation	115
III.2.3.7	Étude par fluorescence de la localisation de l'amine fluorescente 6 immobilisée	117
III.2.3.8	Étude cinétique.....	121
III.2.4	Extension de la réaction PAC sur des liposomes constitués de phospholipides naturels et son potentiel d'application pour la fonctionnalisation par des chaînes PEG	130
III.2.4.1	Application de la réaction PAC à des liposomes formés par des lipides naturels.....	130
III.2.4.2	Fonctionnalisation de la surface des liposomes par un PEG600 et par un PEG5000	133
III.2.5	Mise au point d'un protocole rapide pour la fonctionnalisation de liposomes.....	136
IV.	CONCLUSION.....	139
I.	PARTIE EXPERIMENTALE.....	142
CHAPITRE III : MODIFICATION DE LA SURFACE DES LIPOSOMES PAR UNE MOLECULE PHOTOSENSIBLE ET		
INVESTIGATION DE L'EFFET ANTIMICROBIEN		
151		
I.	ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	153
I.1	Histoire de l'oxyde nitrique	153
I.2	Propriétés, caractéristiques et sources de production de NO.....	153
I.3	Utilisation des donneurs de NO comme agents antimicrobiens	155
I.4	Utilisation de composés amphiphiles pour la délivrance de NO	157
I.5	Utilisation des molécules photo-activables précurseurs de NO inclus dans des liposomes.	159
II.	RESULTATS ET DISCUSSION	164

II.1	La synthèse de la nitroaniline (NOP) et du phosphonothioamide-NOP.....	164
II.2	Préparation des liposomes.....	167
II.3	Caractérisation des solutions liposomales par ESI-MS.....	169
II.4	Photo-génération d'oxyde nitrique à partir des liposomes fonctionnalisés avec la NOP 12	170
II.4.1	Photo-excitation des liposomes	170
II.4.2	Préparation d'un liposome bifonctionnel.....	175
II.5	Tests antimicrobiens des préparations liposomales	182
II.5.1	Dispositifs utilisés pour la photo-activation	184
II.5.2	Protocole des essais antimicrobiens	184
II.5.3	Résultats des repiquages : effet photo-toxique immédiat de <i>S. aureus</i>	187
II.5.4	L'effet photo-toxique sur la croissance de bactérie <i>S. aureus</i> pendant 24h à faible concentration	189
II.5.5	Effet photo-toxique sur la croissance de <i>S. aureus</i> pendant 24h à forte concentration	191
II.5.6	Recherche de la provenance de l'effet antimicrobien de LF8 : quantification d'espèces réactives de l'oxygène.....	191
II.5.7	Visualisation des formulations fluorescente en microscopie fluorescence.....	194
II.5.8	Evaluation de la phototoxicité sur des cellules eucaryotes.....	195
III.	CONCLUSION.....	197
IV.	PARTIE EXPERIMENTALE.....	198

CHAPITRE IV : NOUVEAUX LIPIDES CATIONIQUES OBTENUS PAR REACTION CLICK – APPLICATIONS A LA

TRANSFECTION.....	200	
I.	INTRODUCTION.....	201
II.	ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	203
II.1	Les vecteurs viraux ^{217,218}	204
II.2	Les vecteurs non-viraux ^{216,221}	205
II.3	Mécanisme du transfert de gènes.....	207
II.4	Lipides cationiques développés au sein du laboratoire	209
III.	RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	212
III.1	La synthèse des amphiphiles cationiques	212
III.2	Synthèse des phosphites lipidiques	213

III.2.1	Synthèse des phosphonodithioformiates.....	215
III.2.2	Synthèse des phosphonothioamides par la réaction PAC	216
III.2.3	Quaternarisation des phosphonothioamides.....	217
III.3	Formulations des nouveaux lipides cationiques	219
III.4	Application en thérapie génique.....	222
III.4.1	Tests de complexation d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose.....	223
III.4.2	Évaluation de l'efficacité de transfection in vitro.....	224
III.4.2.1	Principe de mesure de l'efficacité de transfection par bioluminescence	224
III.4.2.2	Principe de mesure de la viabilité cellulaire par bioluminescence	224
III.4.2.3	Test de l'efficacité de transfection	225
III.4.2.4	Test de viabilité cellulaire	226
IV.	CONCLUSION.....	227
V.	PARTIE EXPERIMENTALE.....	228
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	233

Liste des abréviations et acronymes

ADN : Acide desoxyribonucléique

ADP : Adénosine DiPhosphate

AMP : Adénosine monophosphate

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine Triphosphate

BSV : Brest Synthetic Vector

Chol : Cholestérol

MET : Microscopie électronique à Transmission

Cryo-MET : Cryogénique TEM

CuAAC : Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition

DLS : Dynamic Light Scattering

DMF : Diméthylformamide

DOPC : Dioléoyl phosphatidylcholine

DOPE : Dioléoyl-phosphatidyléthanolamine

DOTAP : 1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium-propane

DOX : Doxorubicine

DPPC : 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine

DPPE : 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoryléthanolamine

DSC : Differential Scanning Calorimetry

DSPC : 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine

DSPE : 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoryléthanolamine

DSPG : 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphorylglycerol

DTT : Dithiothreitol

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

EPR effect : Enhanced Permeability and Retention effect

ESI-MS : Electro Spray Ionization - MS

FDA : Food and Drug Administration

FRET : Förster Resonance Energy Transfer

GTC : the UK Gene Therapy Consortium

HDA : Hétéro-Diels-Alder

HSPC : L- α -phosphatidylcholine (Soy)

IEDDA : Diels – Alder à demande inverse d'électrons

LF : Liposomal Formulation

LUV : Large Unilamellar Vesicles

MLV : Multilamellar Vesicles

MS : Mass Spectrometry

MVV : Multi Vesicular Vesicles

PAC : Phosphonodithioester-Amine Coupling

PC : phosphatidyl choline (lécithine)

PDP : Pyridylthiopropionoyl

PEG : Poly Ethylène Glycol

PPi : Pyrophosphate inorganique

PS : Phosphatidylsérine

RAFT : Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

siARN : Small interfering ARN

SL : Solution liposomale

SPAAC : Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition

SPM : Système Phagocytaire Mononuclées

SUV : Small Unilamellar Vesicles

TA : Température Ambiante

THF : Tetrahydrofurane

Tm : Température de transition

Introduction générale

Depuis les premiers liposomes élaborés par Alec Bengham en 1965, leurs utilisations ont connu un essor grandissant comme vecteurs pour le transport de principes actifs vers une cible cellulaire, ou comme outil d'étude en tant que modèle de membranes cellulaires. À noter que certains principes actifs, précédemment abandonnés compte tenu de leurs toxicités, leurs faibles solubilités ou stabilités, ont été reconsidérés en les incorporant dans des liposomes¹.

Cependant, les liposomes de première génération dits « conventionnels » ou « classiques » présentent l'inconvénient d'être rapidement éliminés par les éléments du sang avant d'atteindre leur cible cellulaire. Ce phénomène résulte d'interactions physiques avec des protéines spécifiques circulant dans le sang (les opsonines). Par la suite, le liposome opsonisé est transporté majoritairement vers le système immunitaire tel que le système phagocytaire mononucléé (SPM) localisé au niveau du foie et de la rate où il sera éliminé par phagocytose. Cette bio-distribution a conduit à utiliser ces liposomes de 1^{ère} génération pour le traitement d'organes du système immunitaire. Par contre, ces liposomes ne sont pas adaptés pour le traitement d'autres organes.

La modification de la surface des liposomes, qui a permis une stabilisation de ces nano-objets en milieu biologique, a été une avancée majeure pour des applications en vectorisation. En effet, la fonctionnalisation de la surface des liposomes par des chaînes hydrophiles PEGylées permet d'augmenter leur stabilité dans la circulation systémique par une réduction de la cinétique d'opsonisation. Ces liposomes PEGylés, dits de seconde génération, permettent dans certains cas un ciblage passif (e.g. effet EPR)², mais ne sont pas adaptés pour un adressage cellulaire universel.

Dans le but de développer des nanoparticules ciblant spécifiquement certaines cellules ou un tissu *via* une administration systémique, les liposomes ont été modifiés en surface afin d'y localiser un agent de ciblage spécifique (e.g. protéines, polysaccharides, vitamines, aptamères...), capable de reconnaître un récepteur surexprimé sur un tissu ou un type cellulaire cible. Ces nouvelles modifications de la surface

des liposomes ont été appliquées dans divers domaines tels que le transfert de gènes³, le dépistage⁴, le traitement des cancers⁵ et en médecine personnalisée⁶.

Au-delà de la vectorisation de principe actifs, la « décoration » de liposomes par des molécules d'intérêt peut être aussi utile pour le développement de nano-réacteurs⁷, de mimes de cellules ou pour la conception de cellules artificielles⁸ ... La fonctionnalisation de la surface des liposomes est réalisable principalement lors de l'étape de formulation (incorporation de plusieurs composés amphiphiles dont certains apporteront des fonctionnalités en surface) ou en effectuant une réaction à la surface des liposomes préformés (on parle alors de post-fonctionnalisation). Selon cette seconde approche, la chimie click a été très étudiée.

Ce manuscrit sera axé autour de quatre chapitres. Le premier rapportera des travaux de la littérature ayant conduit au développement de l'utilisation des liposomes et l'évolution de leurs conceptions. Une des évolutions principales concerne la modification de la surface des liposomes en greffant à leurs surfaces, *via* des réactions click, des chaînes polymères de type polyéthylène glycol (PEG) ou des molécules d'intérêt. Une réaction click doit répondre à certains critères comme l'utilisation de conditions douces de réaction (e.g. température ambiante), l'utilisation de solvants non-toxiques (e.g. l'eau), ou encore l'absence d'utilisation de catalyseurs.

L'objectif du deuxième chapitre consiste à concevoir une nouvelle réaction click intitulée 'Phosphonodithioformate-Amine Coupling' (PAC) qui peut s'opérer dans des conditions douces de réaction (température ambiante, dans l'eau et sans catalyse). Cette réaction pourrait être utilisée comme une nouvelle approche pour la post-fonctionnalisation de la surface des liposomes. Cette partie du manuscrit comportera une grande partie de mise au point de la réaction click dans l'eau. Le taux de fonctionnalisation des liposomes et la caractérisation des liposomes avant et après la réaction PAC par différentes méthodes (UV-Visible, spectrométrie de masse, fluorescence, DLS, Cryo TEM) seront présentés.

Le troisième chapitre fera l'objet d'une étude réalisée lors d'une mobilité internationale au département « Drug and Health sciences » de l'université de Catane sous la direction du Prof. Salvatore Sortino et Dr. Aurore Fraix. Le greffage d'un motif photosensible à la surface d'un liposome, *via* la réaction PAC, pouvant libérer des radicaux NO sera présenté. Les liposomes ainsi fonctionnalisés seront caractérisés par différentes techniques incluant la chrono-ampérométrie et la fluorescence. Le potentiel bactéricide des solutions liposomales sera alors présenté.

Le troisième chapitre présentera la synthèse d'amphiphiles cationiques utilisant comme étape clé la réaction PAC. Une évaluation de l'efficacité de transfection *in vitro* de ces nouveaux amphiphiles seront détaillés.

Chapitre I : Introduction à la fonctionnalisation de liposomes

Chapitre I - Introduction à la fonctionnalisation de liposomes

I. Liposomes : généralités, préparation et caractérisation

I.1 Liposome

Les liposomes sont des vésicules lipidiques sphériques constituées d'une ou de plusieurs bicouches et ont donc certaines similitudes avec les membranes biologiques. Les liposomes ont été décrits pour la première fois, dans la littérature en 1964 par le Dr. Alec D. Bangham à l'institut Babraham à Cambridge.⁹ Les premiers travaux avaient pour but de mimer les membranes biologiques afin d'en étudier les propriétés. Rapidement, ces vésicules ont montré leur potentiel en tant que nanovecteurs dans diverses disciplines telles que la médecine¹⁰, la cosmétique¹¹⁻¹³ et l'agroalimentaire^{14,15}.

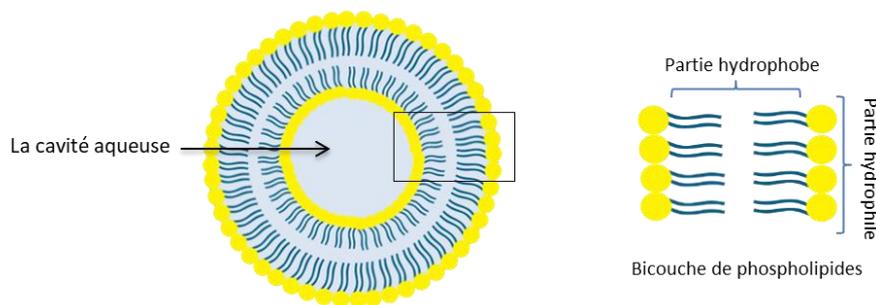


Figure 1. Représentation schématique d'un liposome

Initialement ces vésicules étaient préparées principalement à partir de glycérophospholipides naturels. Ces derniers sont des composés amphiphiles qui possèdent une tête hydrophile et deux chaînes hydrocarbonées hydrophobes. Ayant une très faible solubilité dans l'eau, ces molécules s'auto-organisent en bicouches et génèrent des vésicules qui font apparaître sur la surface externe et interne les groupements hydrophiles de phospholipides tandis que les chaînes hydrophobes sont centrées dans la bicouche^{16,17} (Figure 1).

Les phosphoglycérolipides comportent un motif glycérol estérifié à deux acides gras en position sn_1 et sn_2 et portant en sn_3 une tête polaire de structure variée : PhosphatidylCholine (lécithine) (PC), PhosphatidylEthanolamine (PE), PhosphatidylSerine (PS), PhosphoInositol (PI) (Figure 2).

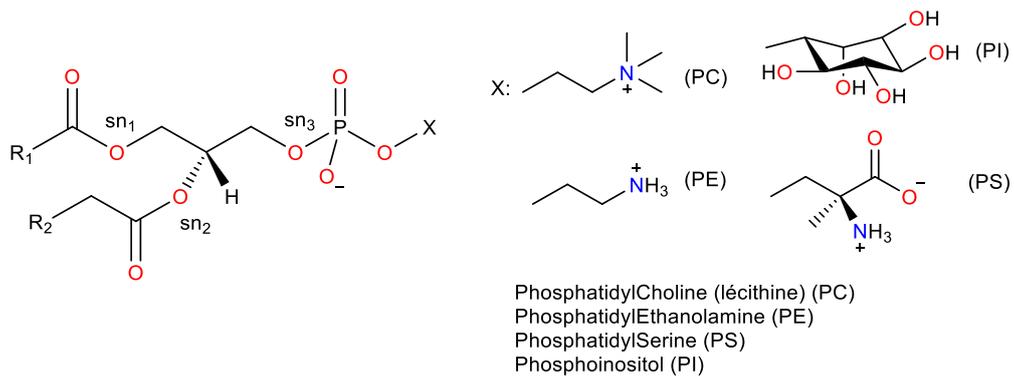


Figure 2. Représentation de la structure des phosphoglycérolipides (R1 et R2 correspondent à deux chaînes grasses).

À noter que la nature des chaînes lipidiques (saturée, insaturée, polyinsaturée) influence la dynamique des bicouches (e.g. fluidité, microviscosité)^{18,19}. Très souvent ces phospholipides sont associés dans les formulations avec du cholestérol (Figure 3) qui confère aux vésicules une plus grande rigidité et stabilité.^{18,20} Il contribue à la stabilisation des liposomes en présence de fluide biologique tel que le plasma et à réduire sa perméabilité aux molécules solubles dans l'eau. Le cholestérol qui ne forme pas de vésicule seul peut néanmoins être mis en quantité assez importante avec les phospholipides (rapport molaire de 1:1 à 2:1).

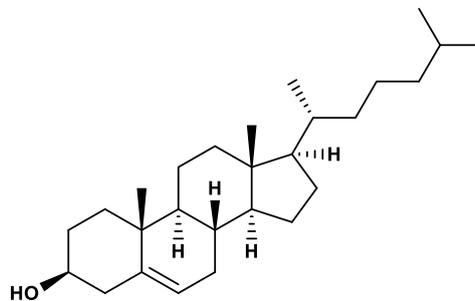


Figure 3. Structure du cholestérol

Les amphiphiles s'auto-assemblent en milieu aqueux pour former des agrégats de structures diverses. Selon la théorie de Israelachvili²¹, la formation de vésicules à partir des amphiphiles est directement liée à leurs géométries. Par conséquent, l'organisation de ces auto-assemblages en milieu aqueux est gouvernée par le paramètre d'empilement P (packing parameter).

$$P = \frac{v}{(a_0 * l_c)} \quad (1) \quad (\text{Équation 1})$$

Où v est le volume occupé par les chaînes hydrophobes, a₀ la surface de la tête polaire et l_c la longueur des chaînes hydrophobes.

En général, différents types d'agrégats peuvent être formés selon la géométrie des amphiphiles. Ce paramètre P va définir la morphologie de l'organisation (bicouches, micelles, micelles inverses...) selon la forme des molécules (cylindres, cônes, cônes inversés...) (Figure 4).

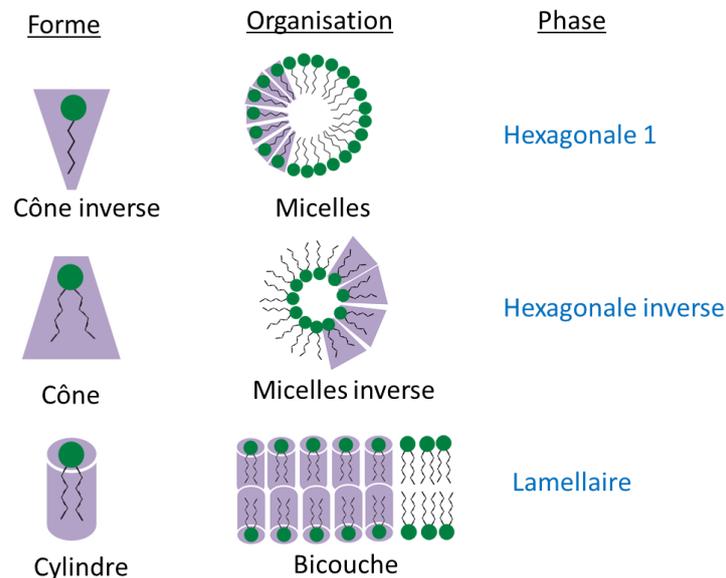


Figure 4. Relation entre la géométrie des amphiphiles et le type d'organisation supramoléculaire formé.

D'après la théorie de Israelachvili, trois cas de figures peuvent avoir lieu selon la valeur de P :

Si $P < 1$, c'est-à-dire ($v < a_0 l_c$), la taille de la partie hydrophobe est inférieure à la tête polaire et l'amphiphile s'inscrit dans un cône inversé pour former des micelles qui s'assemblent en phases hexagonales I notée H_I (phase hexagonale directe)

Si $P > 1$, c'est-à-dire ($v > a_0 l_c$), la taille de la partie hydrophobe est supérieure à la tête polaire, le lipide s'inscrit en cône et forme des micelles inverses qui s'assemblent en phases hexagonales II noté H_{II} (phase hexagonale inverse)

Si $P = 1$, ($v = a_0 l_c$), le lipide s'inscrit dans un cylindre et forme des membranes dites phases lamellaires.

Dans ce dernier cas, au contact de l'eau la phase lamellaire s'organise sous forme d'une ou de plusieurs bicouches délimitant un intérieur aqueux donnant naissance aux liposomes. Plusieurs procédés existent pour contrôler la taille et le caractère multi-lamellaire (lamellarité) des liposomes. Ces deux paramètres sont à la base de la classification de ces systèmes vésiculaires.

En effet, on peut distinguer les vésicules multi-lamellaires (multilamellar vesicles ou MLV) qui sont constituées de plusieurs bicouches concentriques avec une taille comprise entre 100 nm et quelques μm . Concernant les vésicules unilamellaires qui sont constituées par une seule bicouche, des distinctions sont faites selon leur taille : i) les vésicules unilamellaires de grande taille LUV (large unilamellar vesicles) se caractérisent par des tailles comprises entre 100 et 1000 nm, ii) les vésicules de petites tailles SUV (Small Unilamellar Vesicles) ont des tailles comprises entre 20 et 100 nm. Finalement, les vésicules multivésiculaires (multivesicular vesicles ou MVV) sont formées de plusieurs vésicules emprisonnées dans une vésicule plus grosse (Tableau 1).

Type de liposome	Les vésicules unilamellaires de petites tailles	Les vésicules unilamellaires de grande taille	Les vésicules multilamellaires	Les vésicules multivésiculaires
Schéma simplifié				
classe	SUV	LUV	MLV	MVV
Taille (μm)	0,02-0,1	0,1-1	0,1-1	1,6-10,5

Tableau 1. Récapitulatif des différentes classes de liposomes.

La structure vésiculaire des liposomes leur confère une capacité à encapsuler des molécules hydrophiles ou hydrophobes, respectivement à l'intérieur de la cavité aqueuse ou dans la bicouche lipidique. Ce pouvoir d'encapsulation est défini comme étant le rapport entre la quantité du composé encapsulée et la quantité initiale mise en jeu. Des traitements mécaniques peuvent être envisagés dans le but de réduire la taille de ces objets afin de répondre aux exigences de certaines applications en termes de morphologie. Cependant, ces ajustements vont conduire à équilibrer les concentrations du composé encapsulé entre le milieu aqueux interne et externe et par conséquent, réduire la quantité encapsulée avant traitement.

Les liposomes préparés à partir de glycérophospholipides sont biodégradables, biocompatibles, généralement non-toxiques et sont composés de molécules non-immunogènes. Ces avantages ont

conduit à utiliser les liposomes dans un grand nombre d'essais cliniques pour la délivrance de principes actifs. À ce jour la FDA (Food and Drug Administration) a approuvé plus de 18 médicaments formulés en liposomes pour le traitement de certains cancers, pour la vaccination et pour le traitement des douleurs. Certaines de ces formulations figurent dans le tableau ci-dessous^{18,22}.

Nom	Composition	Principe Actif	Compagnie/Année	Indication
Epaxal	DOPC : DOPE	Virus hépatite A inactivé (souche RGSB)	Berna Biotech 1993	Hépatite A (vaccin)
Doxil/Caelyx	HSPC : Chol : PEG2000 -DSPE	Doxorubicine	Ortho Biotech, Schering-Plough 1995	Cancers d'ovaires Cancer des seins Le sarcome de Kaposi
Inflexal	DOPC : DOPE	Hémagglutinine du virus influenza (souche A et B RTS, S/AS101)	Berna Biotech 1997	Influenza (vaccin)
AmBiosome or L-AmB Lipusu	HSPC : DSPG : Chol	Amphotéricine B	Gilead Sciences 1997	Infections fongiques
	PC : Chol	Paclitaxel	Luye Pharma Group 2013	Cancers gastriques, des ovaires et du poumons
CPX-351	DSPC : DSPG : Chol	Daunorubicine + Cytarabine	Vyxeos 2017	Leucémie myéloïde aiguë
Moderna mRNA-1273	SM-102 : Chol : DSPC : PEG2000 DMG	ARNm codant pour la protéine du virus (Spike)	Moderna 2021	Covid-19 (vaccin)
Pfizer-BioNTech COVID-19 VACCINE	ALC-0315 : ALC-0159 : DSPC: Chol	ARNm codant pour la protéine du virus (Spike)	BioNTech-Pfizer 2021	Covid-19 (vaccin)

Tableau 2. Liste non-exhaustive des formulations liposomales cliniquement approuvées par la FDA^{18,22,23}.

1.2 Applications de liposomes

Les premières applications des liposomes ont visé la réévaluation de quelques agents anticancéreux abandonnés précédemment compte tenu de leur toxicité, de leur durée de vie assez courte *in vivo*, à cause de leur nature hydrophobe ou compte tenu de leur faible sélectivité engendrant de graves effets secondaires. L'administration de ces principes actifs à visée anti-cancéreuse incorporés dans des formulations liposomales est un outil qui renforce la sélectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses et des

tissus tumoraux *via* un ciblage passif ou actif. Par conséquent, cette approche apportera une diminution de leurs effets secondaires, une amélioration de leurs pharmacocinétiques ainsi qu'une augmentation de leurs accumulations dans les tumeurs.

En 1995 la FDA a validé l'utilisation de la doxorubicine (DOX) un agent anticancéreux utilisé contre les tumeurs solides dans une formulation PEGylée (Doxil®) (Figure 5).

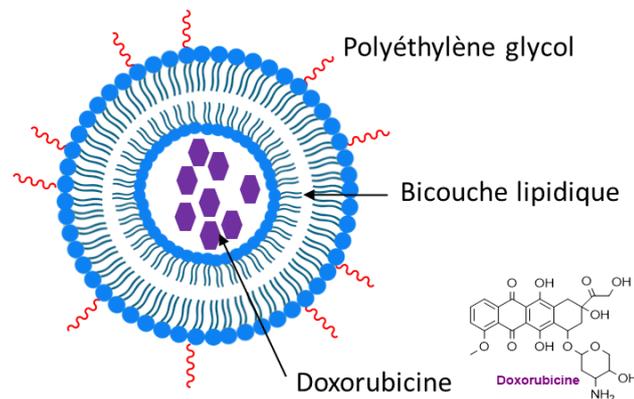


Figure 5. Représentation schématique de la solution liposomale PEGylée encapsulant la DOX (Doxil®)²⁴

Cette formulation a permis d'augmenter l'efficacité thérapeutique de la Doxorubicine tout en diminuant sa toxicité cardiaque. Cette avancée a ouvert la voie pour l'évaluation d'autres agents anticancéreux toxiques tels que, la Daunorubicine en 1996 (DaunoXome®), la Vincristine en 2012 (Marqibo®), le Paclitaxel en 2013 (Lipusu®),.. Actuellement, plusieurs autres formulations liposomales anticancéreuses sont dans différents stades d'essais cliniques ou en attente d'être approuvées par la FDA^{16,18,22}.

En plus de la chimiothérapie cancéreuse, les liposomes sont utilisés pour le traitement d'autres maladies telles que les maladies infectieuses. Ces dernières sont des maladies où leur agent pathogène est localisé dans les organes du système immunitaire (SPM), telles que la tuberculose, la leishmaniose, les infections fongiques... En tirant profit de l'accumulation spontanée des liposomes conventionnels dans les organes SPM, ce phénomène sera détaillé ultérieurement dans le manuscrit, le ciblage de ces infections a été effectué en encapsulant l'agent antifongique dans la structure de ces liposomes. Un exemple brillant de ce type de ciblage consiste à l'utilisation d'une formulation approuvée par la FDA

en 1980 sous le nom Ambisome® pour le traitement de sévères infections causées par des champignons microscopiques et de levures (Figure 6).



Figure 6. Ambisome® 50 mg, Formulation liposomale encapsulant Amphotéricine B commercialisée par GILEAD²⁵

C'est une formulation de HSPC:DSPG:Chol encapsulant l'amphotéricine B (un fongicide) qui a permis d'augmenter l'efficacité thérapeutique globale et de diminuer sa toxicité rénale et neuronale de 30 fois par rapport à l'amphotéricine B administrée seule.

En plus de l'administration de petites molécules thérapeutiques, les liposomes ont été utilisés pour délivrer des macromolécules telles que des acides nucléiques thérapeutiques (ADN plasmidique (pADN), des oligonucléotides antisens, des petits ARN interférents (siARN)) vers le site d'intérêt clinique. La structure macromoléculaire, polaire et chargée négativement des acides nucléiques constitue un handicap pour franchir par diffusion passive la membrane cellulaire qui est aussi chargée négativement. Plusieurs autres inconvénients tels que leur rapide dégradation, leur faible sélectivité pour les cellules désirées, limitent leur utilisation clinique. Les liposomes cationiques se présentent comme de bons candidats pour administrer des acides nucléiques. Ils sont capables d'interagir électrostatiquement avec les molécules polyanioniques d'ADN ou d'ARN pour former des complexes stables chargés positivement appelés lipoplexes. Ces derniers peuvent interagir avec la membrane cellulaire et y pénétrer par endocytose. Des essais cliniques sur des êtres humains ont été rapportés dans divers domaines y compris la mucoviscidose. La GTC (the UK Gene Therapy Consortium) a publié un résultat clinique positif d'une étude de phase I/II sur la sécurité et l'efficacité de la thérapie génique en utilisant des liposomes pour le traitement de la mucoviscidose^{26,27}.

La vaccination est une méthode préventive contre plusieurs maladies telles que les infections pathogènes, les lésions cancéreuses et même la polyarthrite rhumatoïde²⁸. En effet, il a été montré que

la préparation de liposomes composés de certains lipides spécifiques tels que les acides gras, DOTAP, phosphatidylsérine peuvent produire des liposomes capables de stimuler des réponses immunitaires une fois métabolisés dans les organes du système immunitaire. Ces liposomes peuvent aussi être modifiés afin d'y intégrer des antigènes de nature peptidique. Ainsi, l'antigène peut être encapsulé dans l'espace aqueux, greffé ou adsorbé à la surface, afin de pouvoir déclencher une réponse immunitaire lors de son absorption par les macrophages pour s'accumuler finalement dans les lysosomes. Après sa dégradation, les macrophages vont présenter l'antigène aux lymphocytes T, ce qui va engendrer la production des cytokines et des anticorps spécifiques via l'activation des lymphocytes B. Actuellement, plusieurs vaccins sont approuvés cliniquement^{16,18,20,22}, comme le vaccin contre l'Hépatite A commercialisé sous le nom Epaxal approuvé par la FDA en 1993. Sa composition est basée essentiellement sur un mélange de DOPC : DOPE. On peut également citer Inflexal qui est un vaccin contre l'influenza, il a été approuvé en 1997 et il est composé de DOPC : DOPE. D'autre part, notons qu'un vaccin contre la Malaria a été approuvé en 2015 et commercialisé sous le nom Mosquirix. Ces vaccins, qualifiés de virosomes, sont des vésicules à base de phospholipides qui enveloppent un virus dont le nucléocapside est éliminé. Ils sont inoffensifs, sont bien tolérés et efficaces pour pouvoir déclencher une réponse immunitaire. Plus récemment, plusieurs vaccins ont vu le jour pour lutter contre la propagation inquiétante dans le monde d'un coronavirus (le SARS-CoV-2), un virus avec un taux de contagion très élevé et une propagation rapide. Parmi ces vaccins on trouve les vaccins Pfizer/BioNtech et Moderna qui sont à base d'ARNm codant pour une partie d'une protéine virale (Spike)²³. Outre que ces applications biomédicales, il existe plusieurs autres domaines d'application des liposomes autre que le biomédical tels que la cosmétique¹² où la ressemblance entre la membrane biologique et la membrane lipidique du liposome a été exploitée pour développer des traitements médicamenteux ou esthétiques par exemple pour la peau, tels que des crèmes ou des pommades. En industrie alimentaire^{14,15}, les liposomes ont été utilisés pour délivrer des saveurs alimentaires et des nutriments. Ainsi, leur capacité à incorporer des antimicrobiens alimentaires a été investiguée pour lutter contre la croissance des parasites et des micro-organismes pathogènes.

I.3 Préparation de liposomes

Généralement, la préparation des liposomes comporte 3 étapes essentielles qui sont : la formation de vésicules, la réduction de leur volume et enfin leur purification. Toutes les méthodes consistent *in fine* à placer les composés amphiphiles dans un milieu aqueux où ils vont s'organiser spontanément pour former des vésicules avec une ou plusieurs bicouches²⁹. Les méthodes classiques (l'hydratation du film lipidique, la méthode d'inversion de phase, la méthode par injection de solvant, la méthode par élimination de détergent et la méthode par chauffage) et les nouvelles méthodes (micro-fluidique) sont détaillées dans le paragraphe suivant. Une seconde section sera dédiée aux traitements supplémentaires possibles dans le but de réduire la taille des liposomes ou d'homogénéiser leurs tailles.

I.3.1 Techniques de formation de liposomes

I.3.1.1 Préparation des solutions liposomales par hydratation d'un film lipidique

Cette méthode est considérée comme la méthode la plus ancienne, la plus utilisée et la plus simple à mettre en œuvre pour préparer des solutions liposomales. Cette technique, encore appelée méthode de Bangham², (Figure 7) consiste à placer les amphiphiles dans un solvant organique ou dans un mélange de solvants organiques (e.g. MeOH ; CHCl₃). Le solvant organique est ensuite évaporé, conduisant à la formation d'un film lipidique. Ce dernier est alors hydraté pour former des systèmes vésiculaires sous réserve que le ou les composés amphiphiles disposent de la bonne géométrie.

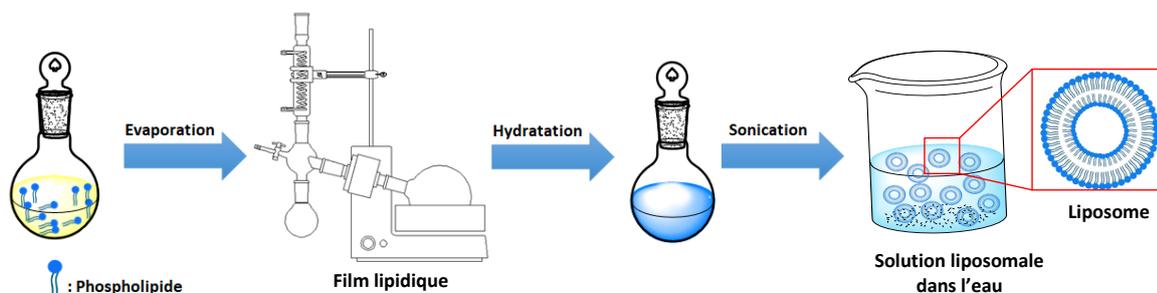


Figure 7. Préparation de liposomes par la méthode d'hydratation du film lipidique (méthode de Bangham)

Le temps de formation de ces systèmes membranaires dépend de leur capacité à s'hydrater. Cette technique permet d'obtenir généralement des MLVs avec un faible contrôle de taille et un volume aqueux interne relativement faible par rapport à la quantité de lipides^{30,31}. Afin d'obtenir des vésicules monodisperses, les solutions de MLVs subissent un traitement mécanique aux ultrasons (sonication).

I.3.1.2 Préparation des solutions liposomales en phase inverse

Cette technique est une alternative à la méthode de Bengham. Elle permet d'obtenir des SUVs de grandes cavités aqueuses. Elle est basée sur la formation d'une émulsion en soniquant un mélange d'une phase organique composée d'amphiphiles et une phase aqueuse. L'action des ultrasons va pousser les phospholipides à s'organiser sous forme de micelles inverses autour du milieu aqueux. Ensuite, l'évaporation du solvant organique sous pression réduite va permettre le rapprochement des micelles inverses jusqu'à la formation des liposomes^{31,32}.

I.3.1.3 Préparation de solutions liposomales par chauffage

Cette technique, à la différence des deux précédentes méthodes, ne nécessite pas l'utilisation de solvants organiques³³. Elle repose sur l'ajout des amphiphiles dans une solution aqueuse en présence de 3% en volume d'un agent hydratant (glycérol ou propylène glycol). La suspension est alors chauffée légèrement au-dessus de la température de transition des phospholipides présents conduisant à la formation de liposomes. Si la formulation contient du cholestérol, la suspension peut être chauffée à plus haute température (e.g. jusqu'à 100°C). Cette méthode peut assurer une production à grande échelle en une seule étape, sans utilisation de solvants organique ou détergents toxiques. Elle permet également, de produire des liposomes avec des tailles nanométriques et de stabilité importante allant jusqu'à 14 mois, ce qui est dû à la présence d'agents hydratants qui sont capables d'augmenter la stabilité des vésicules³⁴.

I.3.1.4 Préparation des solutions liposomales par injection de solvants

Selon cette technique, une solution de composés amphiphiles est préparée au préalable dans un volume minimum de solvant organique miscible à l'eau (éthanol, diéthyléther³⁵, isopropanol)^{30,34}. Cette solution

est injectée dans un milieu aqueux. Les traces de solvants peuvent être éliminées par évaporation sous pression réduite (à une température adaptée en fonction du solvant utilisé) ou par dialyse en cas d'utilisation de l'éthanol et de l'isopropanol comme solvants (Figure 8).

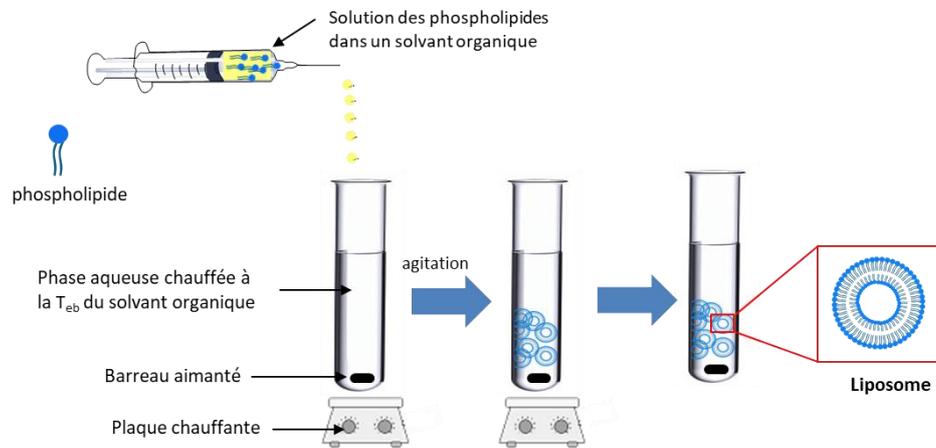


Figure 8. Préparation des solutions liposomales par injection de solvants

Avec cette méthode, il peut être difficile d'éliminer complètement le solvant organique utilisé. Par ailleurs, selon la température appliquée pour l'élimination du solvant, le principe actif inclus dans la formulation peut, s'il est fragile à la température, subir une dégradation.

I.3.1.5 La méthode par élimination de détergent

Selon cette méthode, les composés amphiphiles (e.g. phospholipides) sont solubilisés dans une solution aqueuse formée au préalable par des détergents³⁰. Le détergent est ensuite éliminé par dialyse, par chromatographie d'exclusion stérique sur un gel Sephadex G50 ou par adsorption sur des résines hydrophobes. Le principal inconvénient de cette approche est la présence de traces de détergent dans la composition finale des liposomes.

I.3.1.6 Préparation des solutions liposomales par microfluidique

Cette technologie utilise des microcanaux de faibles diamètres (e.g. 100 μm) pour assurer un mélange en continu de plusieurs constituants de la formulation finale³⁶ (Figure 9).

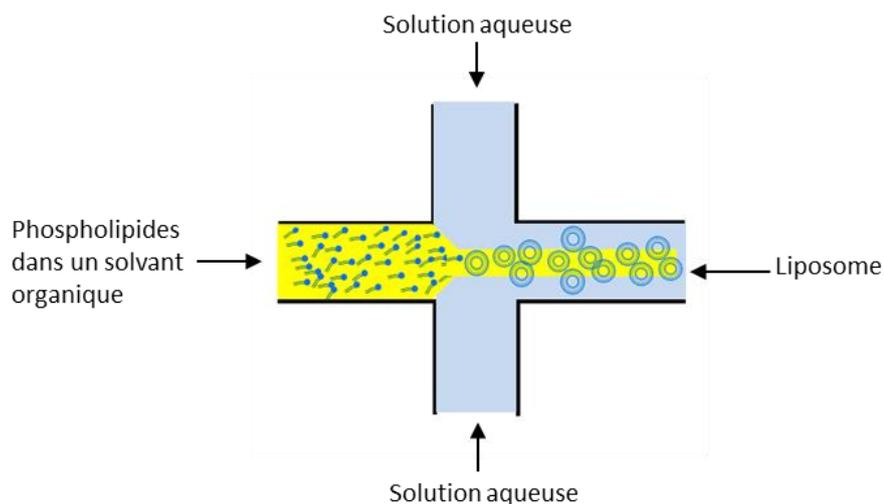


Figure 9. Préparation des solutions liposomales par microfluidique

Les composés amphiphiles sont dissous dans un solvant organique (éthanol ou isopropanol), puis cette solution est propulsée perpendiculairement ou dans la direction inverse du milieu d'hydratation au sein du microcanal. La rencontre de la solution organique et la solution aqueuse conduit à la formation des liposomes en continu. Cette formation est due à une diffusion locale des phospholipides dans la phase aqueuse ce qui contribue à leur autoassemblage. Cette méthode, en plein développement, présente l'inconvénient de générer des solutions liposomales avec des traces résiduelles de solvants organiques³⁷.

I.3.1.7 Préparation des solutions liposomales en milieu CO_2 supercritique.

Cette technique a été développée dans le but de préparer des solutions liposomales à une échelle industrielle mais également pour éviter ou limiter l'utilisation de solvants organiques, généralement le solvant le plus utilisé est l'éthanol. La figure ci-dessous montre une représentation schématique des différents compartiments d'une unité de production de liposomes par la méthode supercritique.

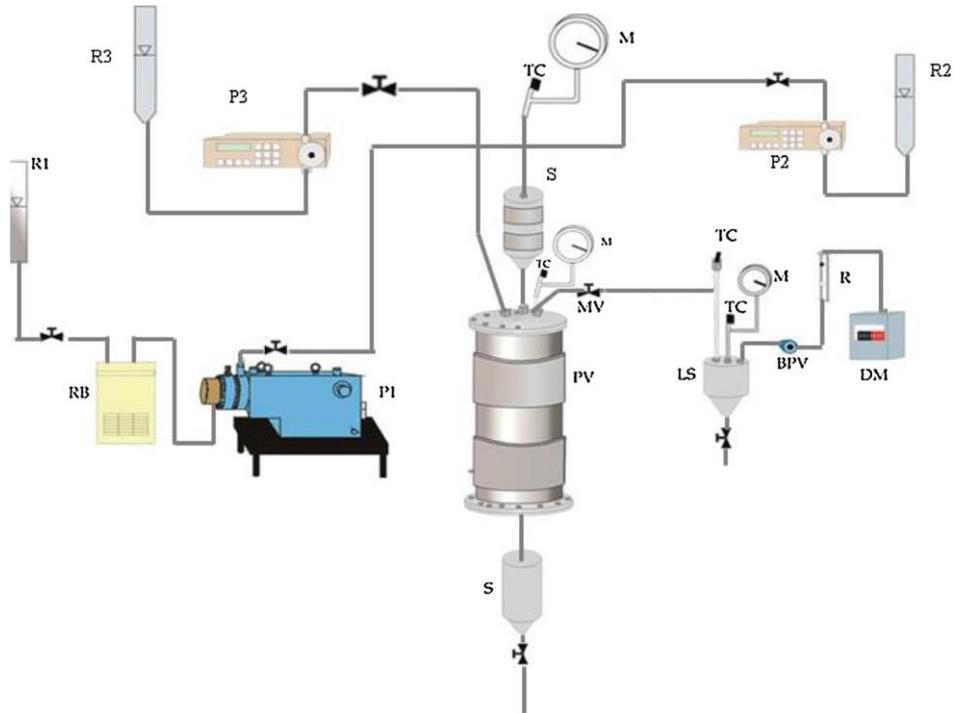


Figure 10. Représentation de la méthode supercritique : R1: réservoir à CO₂; R2: réservoir à lipides ; R3: réservoir contenant l'eau; RB: bain de refroidissement; P1: pompe de CO₂; P2: pompe de solutions lipidiques; P3: pompe à eau; S: Saturateur de liquide expansé; PV: enceinte de précipitation; S: suspension récupérée; LS: séparateur de liquide ; R: rotamètre; DM: essai à sec³⁸.

La technologie de CO₂ supercritique repose sur l'utilisation d'un liquide supercritique tel que le dioxyde de carbone CO₂ maintenu dans des conditions supercritiques (température et pression supercritique)³⁴. Cette technique est divisée en deux types de procédés : i) les procédés utilisant le CO₂ supercritique comme solvant. Une solution supercritique est préparée par dissolution des lipides mis en jeu dans le CO₂ supercritique à une pression élevée. Par la suite, on ajoute à cette solution un volume d'éthanol (inférieur à 7% en volume) à une température égale à 60°C. La suspension est ensuite introduite dans une phase aqueuse sous des conditions ambiantes pour former des liposomes avec un diamètre allant de 10 à 200 nm ; ii) les procédés qui utilisent le CO₂ supercritique comme anti-solvant. Leur principe est basé sur la solubilisation des lipides et des molécules à encapsuler auparavant dans un solvant organique. Par la suite, le mélange est injecté à l'aide d'un tuyau relié à un autoclave parcouru par un courant de CO₂ supercritique à haute pression. Finalement l'hydratation des phospholipides se fait sous agitation pour conduire à la formation des liposomes.

Ces méthodes présentent plusieurs avantages par rapport aux méthodes conventionnelles :

- Elles assurent une production de vésicules reproductible.

- Elles offrent des vésicules de tailles nanométriques avec une grande efficacité d'encapsulation.
- Elles permettent d'assurer un volume d'éthanol 15 fois inférieur au volume qui reste dans les liposomes formés par la méthode d'injection éthanolique.

Néanmoins, ces méthodes souffrent du coût élevé de production par rapport aux autres méthodes conventionnelles. Ainsi, elles nécessitent l'utilisation d'une infrastructure adaptée à la pression élevée nécessaire (200-350 bar). Cela présente une limitation importante à l'utilisation du CO₂ comme solvant.

I.3.2 Traitements possibles après la préparation de liposomes

I.3.2.1 Contrôle de la morphologie

Plusieurs techniques existent pour calibrer la morphologie des liposomes après leur préparation. Parmi ces techniques on trouve :

La sonication :

La sonication peut se faire soit dans un bain à ultrasons à température légèrement supérieure à la T_m des phospholipides, soit en plongeant une sonde à ultrasons directement dans la solution liposomale. Ce traitement est généralement utilisé pour former des liposomes de petite taille (SUV) à partir des MLV.

L'extrusion :

Cette technique consiste à faire passer de façon répétée la solution liposomale à travers une membrane de polycarbonate dont la taille des pores est définie (Figure 11). Cela va provoquer des phénomènes de rupture et de réarrangement des grosses vésicules en d'autres plus petites conduisant à une homogénéisation de la taille des liposomes.



Figure 11. Extrudeuse de liposome manuelle de la marque Avanti Polar Lipids, Inc.

L'extrusion peut aussi se faire *via* un Presse French en faisant extruder une solution liposomale contenue dans un cylindre à l'aide d'un piston sous haute pression. L'échantillon hautement comprimé est ensuite pressé à travers un petit orifice. Généralement cette méthode permet d'obtenir des LUV à partir des MLV¹¹ (Figure 12).

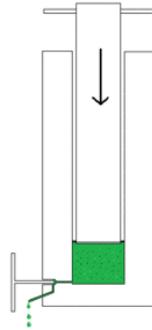


Figure 12. Représentation schématique du Presse French

La microfluidisation :

Le principe de la microfluidisation consiste à faire passer la suspension liposomale à travers un filtre appelé MicrofluidizerTM sous haute pression. La solution liposomale est divisée en deux jets de liquides identiques. Par la suite, ces deux microcanaux se retrouvent dans la chambre de réaction où les vésicules vont se heurter à grande vitesse ce qui va favoriser la réduction de leur taille.

La congélation-décongélation :

Cette méthode consiste à utiliser des suspensions liposomales de type MLV et de leur appliquer des cycles de congélation-décongélation respectivement par congélation dans l'azote liquide et par chauffage à une température au-dessus de la température de transition de phase des lipides qui les composent. Ce type de traitement va conduire à une homogénéisation de la taille des liposomes.

I.3.2.2 Lyophilisation

La lyophilisation de solutions liposomales a été envisagée pour leur stockage. En effet, des phénomènes d'agrégation des liposomes (par des phénomènes de fusion) ou de détérioration par hydrolyse de certaines fonctions (e.g. hydrolyse des fonctions esters) peuvent impacter la structure des liposomes. Ces phénomènes sont également dépendants de la température ou du pH. Les chaînes lipidiques

insaturées et polyinsaturées sont également sensibles à l'oxydation qui peut être initiée par la lumière, la chaleur ou la présence d'oxygène.

La lyophilisation a été proposée pour permettre un stockage des solutions liposomales. Elle se déroule en deux étapes. La première étape consiste à congeler la suspension liposomale à basse température. Par la suite, le chauffage de la glace à très basse pression permet d'éliminer progressivement l'eau par sublimation (Figure 13).

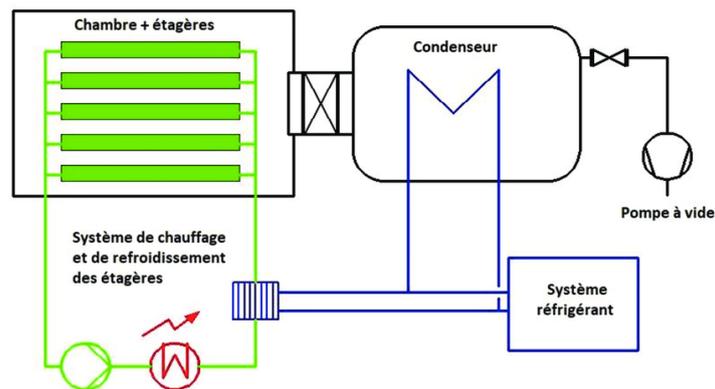


Figure 13. Principe de la lyophilisation

Cette méthode nécessite généralement d'utiliser des agents cryoprotecteurs tels que les carbohydrates (e.g. tréhalose) pour préserver leur stabilité au cours du processus de lyophilisation et pour faciliter la réhydratation des échantillons. L'absence d'agent cryoprotecteur peut engendrer des phénomènes de fusion/agrégation au cours de l'étape de déshydratation.

1.4 Techniques de caractérisation de liposomes

Il est important de caractériser les liposomes après leur préparation. Plusieurs paramètres peuvent être contrôlés et tout particulièrement la taille des particules, leur polydispersité (distribution de la taille) et leur morphologie. Ces premiers paramètres peuvent être déterminés par plusieurs méthodes telles que :

- La diffusion dynamique de lumière (DLS)
- La chromatographie d'exclusion de taille (SEC)
- Le fractionnement par flux de champ (FFF).

- Les méthodes microscopiques : la microscopie électronique à transmission (TEM) et cryogénique (Cryo-MET) et la microscopie à force atomique (AFM).

D'autres propriétés peuvent être déterminées telles que la charge de la surface (potentiel zêta) déterminée par mobilité électrophorétique. La dynamique des composés amphiphiles assemblés en liposomes peut être déterminée en observant la fluidité de la bicouche. Ainsi, la détermination de la T_m (Transition principale) peut être obtenue par calorimétrie différentielle à balayage (DSC), par anisotropie de fluorescence³⁹ ou par RMN $^2H^{40}$. Il est possible d'étudier les propriétés de fusion de la membrane par FRET ou par quenching de fluorescence^{41,42}. Enfin, certains paramètres de structure peuvent être obtenus par diffraction des rayons X.

Le but de cette rubrique n'est pas de détailler toutes les techniques de caractérisation de liposomes mais uniquement celles qui seront utilisées dans la suite de ce manuscrit.

I.4.1 Détermination de la taille par DLS

La détermination de la taille des liposomes est un paramètre crucial pour la caractérisation des solutions liposomales. La diffusion dynamique de la lumière (DLS : Dynamic Light Scattering) est une technique très utilisée pour déterminer la taille des nano-objets et leur distribution de taille ainsi que pour évaluer leur stabilité (évolution des tailles au cours du temps).

Le principe de la DLS repose sur les mouvements Browniens des particules en suspension dans un milieu liquide. Il se base sur la mesure de la variation de la lumière diffusée causée par ces mouvements au cours du temps. Cette variation de la lumière diffusée est associée à la vitesse de diffusion des particules en suspension qui est liée à la taille des particules. À savoir, les petites particules diffusent plus rapidement que celles qui sont plus grandes. Par conséquent, la DLS permet de déduire le diamètre hydrodynamique à partir du taux estimé de la lumière diffusée en se basant sur un traitement mathématique selon la loi de Stokes-Einstein. (Équation 2)

$$D = \frac{kT}{6\pi r\mu} \quad (2)$$

Avec, D : coefficient de diffusion, T : température en Kelvin, r : rayon de la particule, k : constante de Boltzmann, μ : viscosité dynamique.

1.4.2 Détermination du potentiel zêta.

Le potentiel zêta correspond à la charge de surface des nano-objets. Il s'agit de l'un des paramètres fondamentaux pour prévoir la stabilité des solutions liposomales vis-à-vis de l'agrégation. En effet, plus la charge des particules est élevée (positives ou négatives) plus les particules ont tendance à se repousser entre elles conduisant à une stabilité colloïdale plus importante⁴³.

Le principe de mesure utilisé est le principe de l'électrophorèse laser Doppler.

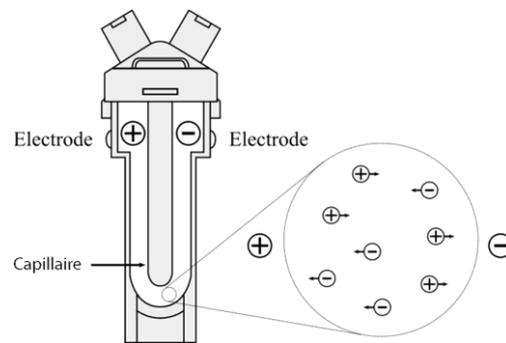


Figure 14. Illustration d'une cuve utilisée pour la détermination du potentiel zeta de solutions liposomales.

La méthode peut être décrite de la façon suivante. Une cuve en polystyrène dotée de deux électrodes est remplie par la solution liposomale (Figure 14). La mise sous tension crée un champ électrique dans lequel les particules chargées vont se déplacer. Un faisceau laser passe au travers de la solution liposomale, provoque une lumière diffusée qui est décalée en fréquence et ce décalage est directement proportionnel à la mobilité électrophorétique des particules et donc à leur potentiel zêta (Figure 15).

La mobilité des liposomes dépendra alors de leur charge de surface apparente qui inclut les charges de surface et les ions immobilisés dans la couche de Stern.

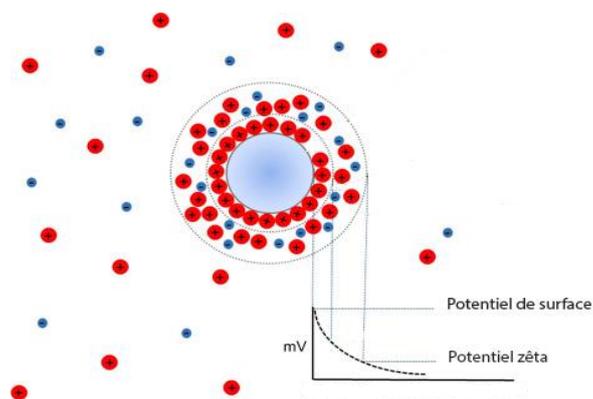


Figure 15. Courbe du potentiel zêta

1.4.3 La microscopie électronique à transmission cryogénique (Cryo-MET)

C'est une technique d'imagerie d'échantillons basée sur l'application d'un faisceau d'électrons qui traverse l'échantillon placé sur une grille recouverte de carbone. La préparation de la grille se fait en tamponnant une goutte contenant l'échantillon sur le film de carbone. Le film liquide est ensuite vitrifié par congélation rapide en plongeant la grille dans le propane refroidi par l'azote liquide. Les clichés obtenus résultent du passage d'un faisceau d'électron à travers l'échantillon (transmission) conduisant à un contraste qui est fonction de la quantité de matière traversée. Cette technique appliquée à l'étude des matériaux comme les liposomes permet de déterminer leur taille, leur forme et parfois leur composition interne⁴⁴.

1.5 Liposomes : vers des agrégats polyfonctionnels

Il a été montré que la durée de vie des liposomes conventionnels (Figure 16-A) placés dans la circulation sanguine est très courte car les interactions entre les liposomes et les nombreux constituants du sang (protéines, ions) les déstabilisent. Ils peuvent alors libérer rapidement voire instantanément (burst release) le principe actif transporté. Une telle instabilité est un frein majeur à leur utilisation en clinique *via* une injection systémique. Le mécanisme naturel d'élimination des liposomes par l'organisme implique également leur opsonisation qui conduit *in fine* à leur phagocytose. Ces liposomes opsonisés seront dirigés vers le système SPM localisé au niveau du foie et de la rate. Ce dernier se chargera de leur destruction, ce qui entraînera la libération de leurs contenus au niveau de ces organes (Figure 17).

La libération du principe actif au niveau des organes SPM a conduit à envisager leurs utilisations pour le traitement de certaines maladies telles que le cancer hépatique¹⁸.

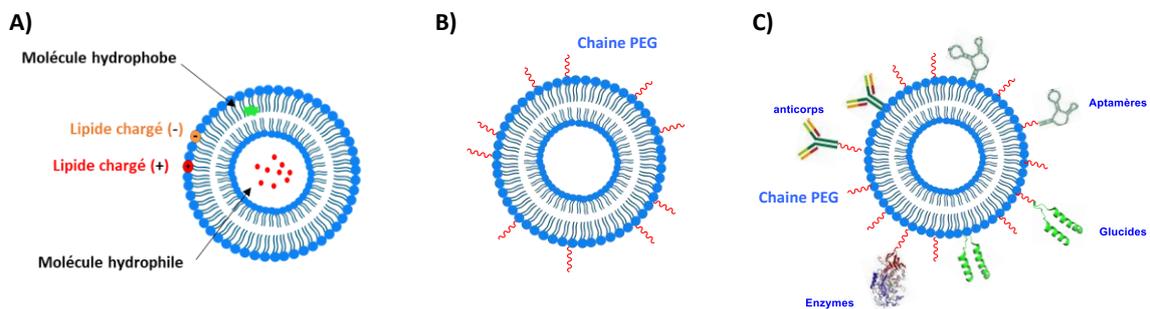


Figure 16. Illustration de l'évolution des liposomes ; A) liposome conventionnel B) liposome PEGylé C) Immunoliposome

L'incorporation de principes actifs au sein de liposomes modifie leur biodistribution ainsi que leur pharmacocinétique. Ainsi, les liposomes ont été très étudiés comme vecteurs de médicaments pour différents traitements (chimiothérapies anticancéreuses, actions bactéricides ou antifongiques, la délivrance d'hormones, d'enzymes ou d'acides nucléiques)^{18,45}.

Dans le but d'éviter ou de ralentir la déstabilisation des liposomes dans un milieu biologique *via* le mécanisme d'opsonisation, une seconde génération de liposomes est apparue. Elle consiste généralement à couvrir la surface des liposomes par des chaînes polyéthylène glycol (PEG, Figure 16-B).

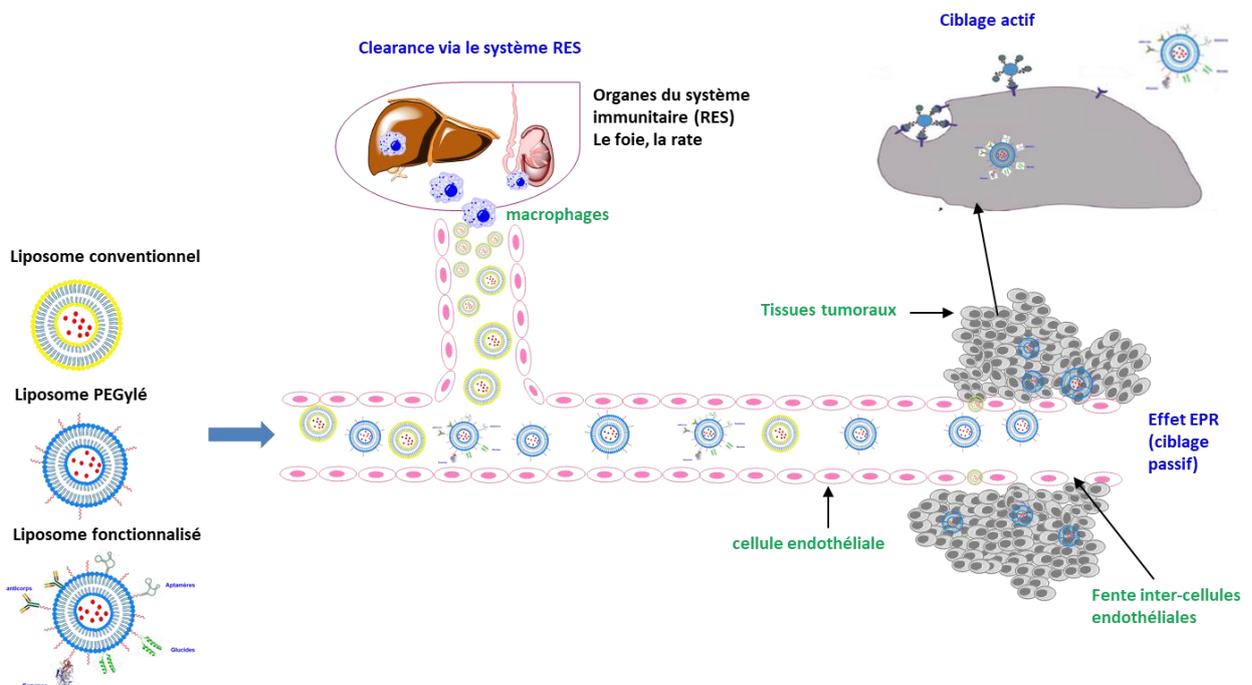


Figure 17. Pharmacocinétique des liposomes conventionnels, furtifs et fonctionnalisés

Ces liposomes PEGylés encore identifiés comme des liposomes furtifs ou « long-circulating liposomes » sont obtenus par le greffage covalent d'une chaîne PEG de longueur variable sur des phospholipides ou sur du cholestérol qui servent d'ancre lipidique. Ces chaînes polymères hydrophiles de type polyéthylène glycol créent une enveloppe stérique qui a pour rôle de limiter les interactions de la membrane des liposomes avec les éléments du sang et du système immunitaire. Par conséquent, ils offrent une circulation plus longue aux liposomes dans les voies sanguines comparés à leurs homologues non-PEGylés en raison d'une capture moins rapide par les macrophages⁴⁶.

Parmi les formulations liposomales PEGylées approuvées par la FDA pour la délivrance des médicaments, citons l'exemple du Doxil® (1995). Cette formulation, encapsulant la DOX, est prescrite pour le traitement du cancer ovarien et le Sarcome de Kaposi lié au SIDA⁴⁷. Dans le but d'examiner la pharmacocinétique de la DOX, Gabizon et al.⁴⁸ ont effectué une étude clinique sur 16 patients atteints de cancers (seins, poumons, ovaires, mésothéliome, sarcomes et pancréas). La pharmacocinétique de la doxorubicine associée aux liposomes chez sept patients a été analysée après injection de doses du Doxil®, et dans un groupe supplémentaire de neuf patients après injection de Doxil® uniquement. Le Doxil® a montré une concentration du principe actif dans les cellules tumorales des patients de 4 à 16 fois plus élevée que son homologue administré seul. De plus le Doxil® a permis de réduire la cardiotoxicité du principe actif qui est un effet secondaire de la DOX libre⁴⁹.

L'encapsulation d'agents chimio-thérapeutiques dans des liposomes PEGylés a permis d'améliorer la délivrance d'un principe actif ciblée aux cellules cancéreuses et aux tissus tumoraux par un ciblage passif connu sous le nom d'effet EPR (enhanced permeability and retention effect, Figure 17). Cet effet résulte d'une augmentation de la perméabilité capillaire qui est observée dans certaines situations pathologiques (inflammation, infection mais surtout dans certaines tumeurs solides). Au niveau des vaisseaux de la tumeur des pertes de jonctions entre les cellules endothéliales vont se créer pour garantir un approvisionnement important en nutriments et assurer la croissance de la tumeur. Ces défauts de jonction au niveau de l'épithélium vont engendrer une fuite des composés plasmatiques dont les liposomes administrés. Ainsi, les liposomes furtifs ayant une taille adaptée à la porosité des

endothéliums pathologiques (entre 100 et 600 nm)⁵⁰. Ils pourront s'y accumuler. Ce concept d'EPR reste néanmoins controversé car après une injection systémique, seule une faible proportion des nanoparticules atteint les tumeurs⁵¹.

La fonctionnalisation de liposomes furtifs (PEGylés) par des motifs de ciblage a conduit au développement d'une troisième génération de liposomes (Figure 16-C). Ces liposomes ambitionnent une délivrance spatio-temporelle d'un principe actif. Ce ciblage actif, basé sur la reconnaissance d'un récepteur par le motif de ciblage (anticorps, peptides, carbohydrates, aptamères), permet d'accroître la proportion de liposomes atteignant la cible cellulaire/tissulaire. La modification de la surface des liposomes avec des motifs de ciblage a augmenté drastiquement le nombre d'applications dans différents domaines tels que la thérapie^{5,52} et le diagnostic^{4,53,54} des cancers ou la combinaison d'une fonction de diagnostic et thérapeutique dans le cas des liposomes théranostiques⁵⁵⁻⁵⁷.

Si les premiers liposomes présentaient de nombreuses limitations pour des applications médicales par injection systémique, les liposomes de 2nd et de 3^{ème} génération ont été très largement utilisés lors d'études précliniques et ont conduit à des applications en clinique comme indiqué, à travers quelques exemples, dans le Tableau 3.

Nom	Principe actif	Ligand	Type de cancer
SGT-53	Le gène p53	Récepteur anti-transferrine scFv	Tumeurs solides
Anti-EGFR-IL-DOX	DOX	Fragment d'anticorps (Fab') (Cétuximab)	Tumeurs solides, cancer du sein
PROMITIL	Mitomycine-C	DSPE-PEG 2000	Tumeurs solides
ThermoDox	DOX	DSPE-PEG 2000	Carcinome hépatocellulaire et cancer du sein
MBP-426	Oxaliplatine	Transferrine	Adénocarcinome gastro-œsophagien
C225-ILs-dox	DOX	Fragment Fab anti-EGFR de l'AcM C225 (Cétuximab)	Glioblastome

Tableau 3. Quelques exemples de formulations liposomales de 2^{ème} et de 3^{ème} génération en cours d'essai cliniques¹⁸.

Pour ces liposomes de 2nd et 3^{ème} génération il est donc nécessaire de modifier la surface des liposomes.

Différentes méthodes de fonctionnalisation existent. Ces méthodes font l'objet de la section suivante.

II. Modification de la surface de liposomes

Comme mentionné sur la Figure 18, de nombreuses fonctionnalisations de liposomes ont été entreprises dans le but de les utiliser pour des applications spécifiques. Ces fonctionnalités incluent des PEG, comme un impératif de stabilité des vecteurs fonctionnalisés vis-à-vis des éléments du sang et des systèmes de défense de l'organisme. Des anticorps ou fragments d'anticorps sont également utilisés car ils présentent des spécificités et des affinités élevées pour tout type d'antigène. On trouve également, les vitamines et les carbohydrates qui sont surexprimés au niveau de la membrane cellulaire de nombreux types de cellules cancéreuses. Ces différentes molécules d'intérêt seront présentées dans la section suivante.

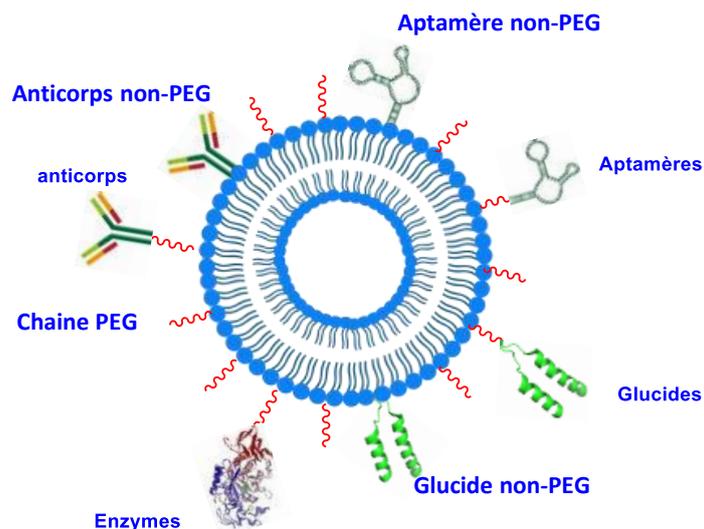


Figure 18. Illustration d'un liposome modifié par différents agents de ciblage

L'association de ces agents de ciblage, ayant une affinité pour une cible moléculaire de l'organisme, est souvent réalisée par l'accrochage de l'élément d'adressage directement ou via un espaceur, généralement une chaîne PEG, sur un lipide constitutif de liposomes. Ce couplage est réalisé par réaction chimique ou par affinité (le couple biotine-streptavidine). La section suivante est dédiée à la description des principales méthodes utilisées pour introduire ce type de fonctionnalité.

II.1 Méthodes de fonctionnalisation de liposomes

La fonctionnalisation de la surface d'un liposome peut se faire selon 3 stratégies (Figure 19) : pré-insertion, post-insertion et post-modification par la réalisation d'une réaction en surface des liposomes⁵⁸.

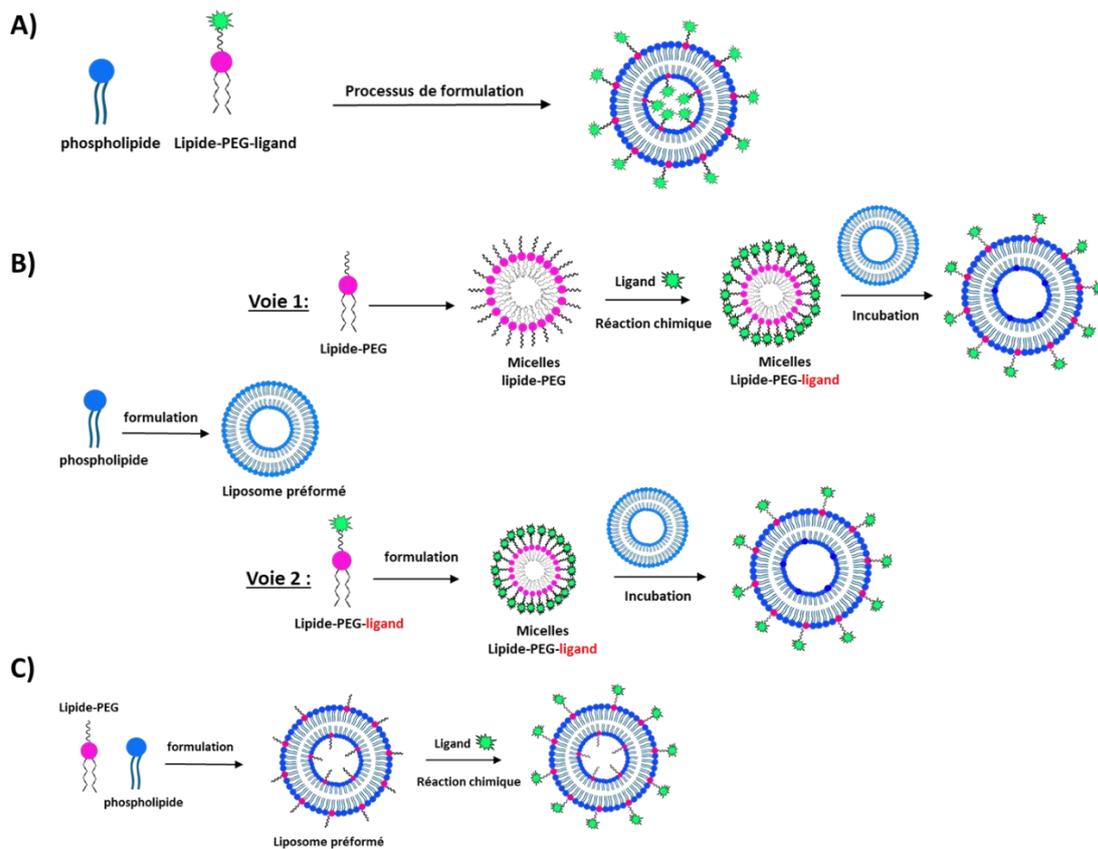


Figure 19. Fonctionnalisation de la surface de liposomes : A) par pré-fonctionnalisation, B) post-insertion, C) post-fonctionnalisation

La pré-fonctionnalisation (Figure 19-A), consiste au préalable à synthétiser le composé amphiphile comportant la fonctionnalité (e.g. ligand). Le lipide modifié est ensuite mélangé avec les autres composés de la formulation puis l'une des méthodes de formation des liposomes est appliquée (e.g. méthode d'hydratation d'un film lipidique). Un avantage de cette approche est la possibilité de contrôler la quantité d'agent de ciblage par liposome. Cependant, environ 50% des lipides fonctionnalisés ajoutés seront orientés vers l'intérieur du liposome et n'auront donc pas la possibilité d'interagir avec l'environnement extérieur^{58,59}.

La post-insertion^{58,59} (Figure 19-B), selon cette méthode, deux stratégies peuvent être envisagées :

i) Inclure un composé amphiphile (ayant à son extrémité distale une fonction réactive) dans un liposome déjà formé (post-insertion). Dans un second temps une réaction est mise en œuvre pour apporter la fonctionnalité souhaitée (réaction sur la solution liposomale, Figure 19-B- voie 1).

ii) Ajout à un liposome (post-insertion) d'un composé déjà fonctionnalisé (Figure 19-B- voie 2).

Une troisième possibilité consiste à faire une réaction à la surface d'un liposome via une **post-fonctionnalisation** (Figure 19-C)^{58,59}. Elle consiste à conjuguer directement des agents de ciblage ou autres éléments de fonctionnalisations à la surface des liposomes déjà préformés, ayant des fonctionnalités réactives à leurs surfaces.

II.2 Types de molécules utilisées pour la fonctionnalisation de liposomes

II.2.1 Les PEGs

Les PEGs sont des polymères linéaires constitués par une répétition d'unités d'éthylène d'oxyde avec des masses molaires inférieure à 20.000 g.mol⁻¹. Ils sont biocompatibles, solubles dans l'eau et dans les solvants organiques⁶⁰. C'est ce qui explique leur utilisation massive dans des préparations pharmaceutiques⁶¹ et cosmétiques⁶², notamment en tant qu'agents pour la vectorisation ou comme des tensioactifs.

De plus, ils sont caractérisés par l'absence de toxicité et présentent une faible immunogénicité quand ils sont administrés par voie orale ou voie dermale⁶³⁻⁶⁵. Néanmoins, quelques études sur la toxicité des PEG ont révélé une toxicité plus importante dans le cas où l'administration s'est fait à des doses élevées par voie parentérale^{66,67}. Les chaînes PEG de faible poids moléculaire sont aussi suspectées d'effets toxiques à long terme^{68,69}.

L'association d'un PEG sur un lipide peut se faire selon plusieurs types de couplage. Le couplage le plus utilisé consiste à préparer le lipide PEGylé par lien peptidique entre une molécule PEG terminée par une fonction acide carboxylique activée par un groupe NHS (*N*-hydroxysuccinimide) et la fonction amine NH₂ d'un phosphoglycérolipide comportant une tête polaire de type phosphatidyléthanolamine^{70,71} (Figure 20).

II.2.3 Les vitamines

La modification de la surface des liposomes par des vitamines a permis de développer des vecteurs efficaces et spécifiques pour diverses applications. L'acide folique est l'une des vitamines les plus utilisées pour ce type de ciblage. Cette molécule se fixe aux récepteurs à l'acide folique (RF) qui sont surexprimés au niveau de la membrane cellulaire de nombreux types de cellules cancéreuses⁷²⁻⁷⁴. La présence des RF surexprimés dans certaines cellules cancéreuses⁷⁵ a permis de l'utiliser comme agent de ciblage sélectif afin de véhiculer des agents thérapeutiques ou de diagnostic⁷⁶ à ces cellules.

Dans la littérature on ne trouve pas beaucoup d'exemples qui illustrent l'utilisation de vitamines autres que l'acide folique pour le ciblage. Néanmoins, les vitamines se trouvent dans divers usages dans la technologie des liposomes tels que la préparation de liposomes biotinylés par le fameux couplage par affinité biotine-streptavidine⁷⁷.

II.2.4 Les carbohydrates (Glucides)

Les glucides peuvent reconnaître et lier des sites de liaisons (des lectines) présents sur des cellules cancéreuses malignes. Par exemple des lectines comme la concanavaleine A, qui se lie préférentiellement au D-glucose et D-mannose, jouent un rôle majeur dans différentes activités cellulaires comme la reconnaissance, la réponse immunitaire, l'inflammation et la différenciation. Des liposomes fonctionnalisés par des motifs glucoses ou mannoses à leurs surfaces ont été développés pour cibler spécifiquement ces lectines⁷⁸.

Les cellules dendritiques et les macrophages présentent des sites de reconnaissances pour le mannose, le fructose et la *N*-acétyl glucosamine⁷⁹. Des liposomes fonctionnalisés par des motifs mannoses ont permis de cibler ce type de cellules pour l'administration de principes actifs⁵¹. Plusieurs autres carbohydrates ont été utilisés pour modifier la surface des liposomes. Le sucrose et le maltose ont été placés à la surface de liposomes utilisés pour véhiculer des agents chimiothérapeutiques comme la DOX⁸⁰.

Les liposomes fonctionnalisés avec des carbohydrates sont biodégradables, peu toxiques et dotés d'une capacité de protection contre les protéines du sang, ce qui leur permet d'éviter les risques d'opsonisation dans la circulation sanguine⁵⁰.

II.2.5 Les aptamères

Les aptamères sont de courts oligonucléotides monocaténares d'ADN ou d'ARN (généralement 20-100 bases nucléotidiques). Ce sont des composés de synthèse, généralement isolés *in vitro* par une méthode de sélection itérative appelée SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment).

Les aptamères sont capables de fixer une large gamme de molécules cibles, telles que des petites molécules de synthèse, des peptides, des protéines, des cellules vivantes entières ou même des organismes unicellulaires vivants, avec des affinités élevées de l'ordre du nanomolaire-picomolaire. Cela fait d'eux des agents de ciblage très proches des anticorps en termes de sensibilité de reconnaissance des cibles ainsi que pour la diversité de leur champ d'applications (diagnostique des maladies, délivrance de principes actifs et thérapie).

Ils présentent l'avantage d'être très spécifiques, assez résistants (solvants organiques, variation du pH), d'être faiblement immunogène et ils peuvent être synthétisés à l'échelle du gramme avec un coût relativement faible⁸¹. Néanmoins, ils sont sensibles à la dégradation par les nucléases ainsi qu'une rapide clairance dans la circulation sanguine.

II.3 Exemples de couplages utilisés pour la fonctionnalisation de liposomes

Dans la suite de ce paragraphe, seules les méthodes de fonctionnalisation des liposomes impliquant la réalisation d'une réaction avec un liposome préformé et générant un lien covalent seront décrites. Il s'agit donc dans tous les cas de réactions réalisées en milieux aqueux. Ces méthodes peuvent être évaluées selon plusieurs critères tels que la simplicité du couplage (conditions de la réaction, disponibilité des réactifs utilisés, ...), le temps et l'efficacité de la réaction, la reproductibilité, la toxicité des produits de couplage ainsi que le pouvoir de conservation de l'activité biologique du ligand une fois greffé.

Une large gamme de méthodes de couplage de composés à la surface des liposomes est basée sur la chimie click. Le choix des réactions mises en œuvre dépend directement des groupements fonctionnels disponibles à la surface des liposomes. La suite de cette rubrique rapporte des exemples de fonctionnalisation de liposomes en fonction de la nature des fonctions présentes à leurs surfaces. Il ne s'agit pas d'une description exhaustive mais simplement d'une volonté de présenter, *via* quelques exemples, des méthodes de fonctionnalisation de liposomes préformés en y indiquant leurs limites le cas échéant.

II.3.1 Fonctionnalisation d'un liposome possédant une fonction amine à sa surface

Cette méthode est l'une des méthodes les plus anciennes qui aient été reportées dans la littérature pour la fonctionnalisation d'un liposome incluant une fonction amine à sa surface.

En 1979, Torchilin et al.⁸² rapportent l'immobilisation d'une protéine à la surface de liposomes préformés incluant la 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoéthanolamine DPPE. Il s'agit d'une réaction de couplage entre la fonction amine de la tête polaire PE du phospholipide avec une fonction amine d'un anticorps anti-myosine cardiaque, hautement spécifique à la myosine, via un connecteur homo-bifonctionnels, le glutaraldéhyde ou le diméthyle suberimidate (Figure 21).

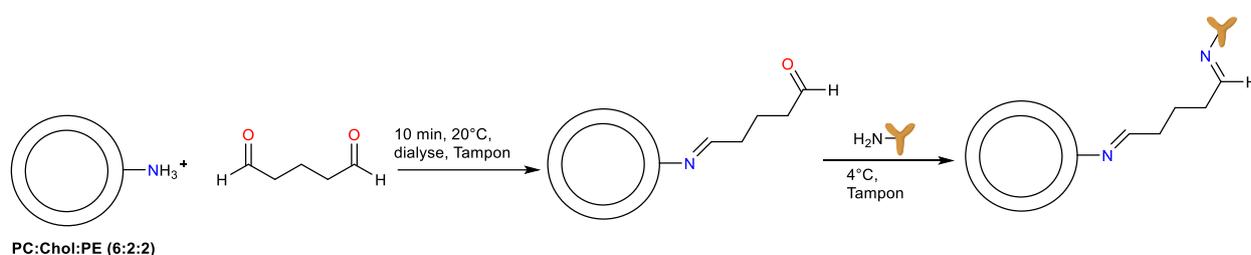


Figure 21. Les étapes nécessaires pour l'immobilisation de l'anticorps anti-myosine cardiaque

Cette opération se déroule en deux étapes, la première étape conduit à l'activation de 70% des groupements amines des PE, présents à la surface des liposomes, par la formation d'imine ou d'amidine respectivement en présence du connecteur homo-bifonctionnels. Dans la seconde étape, l'incubation des liposomes activés en présence de l'anticorps à 4°C dans un tampon aqueux a conduit à l'immobilisation de la protéine à la surface des liposomes avec un taux de conversion égale à 60%. Cette méthode de couplage de deux fonctions amines *via* un connecteur homo-difonctionnel présente

l'avantage d'utiliser des liposomes constitués de lipides naturels (comportant une tête polaire PE) qui peuvent être utilisés sans modification préalable. Cependant, des réactions secondaires incontrôlables peuvent avoir lieu (homopolymérisation)⁵⁸. La présence de plusieurs fonctions amines sur les protéines peut provoquer des attachements aléatoires, ce qui pourra par la suite limiter la fonctionnalité de la protéine immobilisée (e.g. reconnaissance par les anticorps).

II.3.2 Fonctionnalisation d'un liposome comportant une fonction aldéhyde à sa surface

En 2001, Bourel-Bonnet et son équipe⁸³ ont proposé une approche prometteuse pour fonctionnaliser la surface de liposomes par des peptides à partir de liposomes comportant des fonctions aldéhydes (Figure 22).

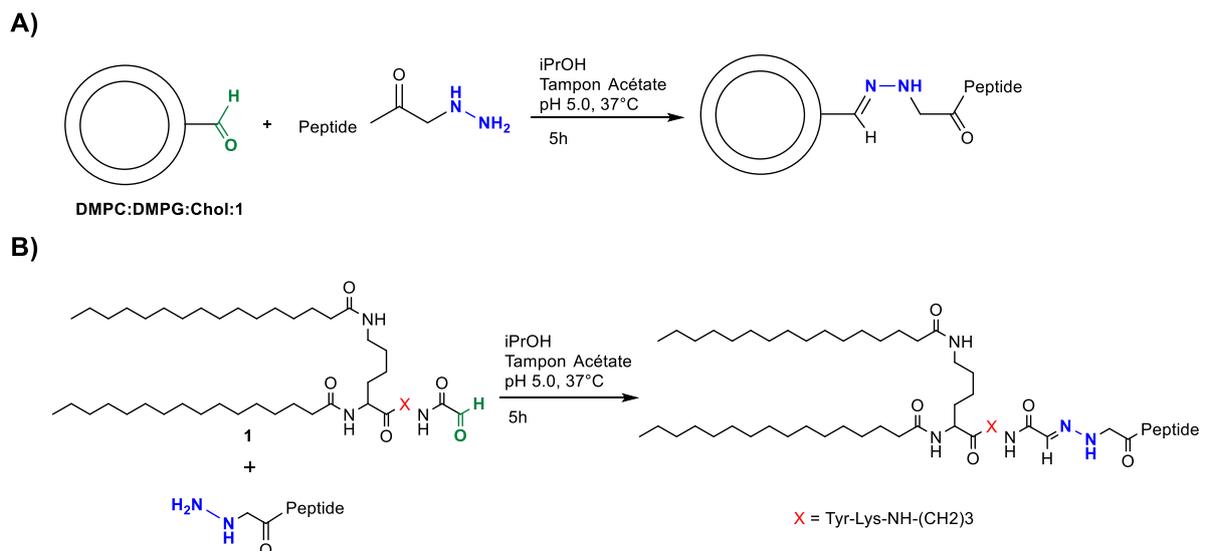


Figure 22. A) modification de la surface d'un liposome incluant une fonction aldéhyde par formation d'un lien hydrazone. B) Schéma de la réaction mise en jeu à la surface du liposome entre le lipide 1 et le peptide-hydrazine

Cette méthode repose sur la réaction entre une hydrazine mono-substituée et une fonction aldéhyde portée par le liposome pour former un lien hydrazone (Figure 22-A). Dans un premier temps, un peptide d'intérêt est modifié pour y introduire un motif hydrazine⁸⁴. Ce peptide est alors ajouté au liposome comportant les fonctions aldéhydes. Le taux de fonctionnalisation des fonctions aldéhydes présentes dans le liposome est de 50%. Les fonctions aldéhydes étant positionnées sur les deux feuillets du liposome, seuls 50% d'entre eux (ceux exposés sur la face extérieure des liposomes) sont susceptibles

de réagir. Le taux maximal (50% ; obtenu après 5h de réaction) correspond à une conversion maximale (en supposant l'absence du flip-flop). De façon intéressante cette étude offre une stratégie efficace pour lier un peptide synthétique à la surface d'un liposome sans utilisation de catalyse à 37°C. L'introduction de la fonction hydrazine sur un peptide se fait facilement en phase solide (sur résine). La difficulté dans cette méthode peut venir de l'incorporation de la fonction aldéhyde sur la molécule que l'on cherche à introduire à la surface des liposomes. Des problèmes de solubilité, de caractérisation et de purification ont été mentionnés. L'incorporation du motif hydrazine est également, problématique si on cherche à l'introduire sur des ligands autres que les peptides (e.g. anticorps).

II.3.3 Fonctionnalisation d'un liposome incluant une fonction acide carboxylique à sa surface

La fonctionnalisation de liposomes contenant une fonction acide carboxylique a été décrite initialement par Redemann et al.⁸⁵. La stratégie consiste dans un premier temps à introduire une fonction acide carboxylique sur une ancre lipidique qu'est la phosphatidyléthanolamine (PE). La modulation de la tête polaire du lipide (PE) est réalisée en le faisant réagir sur une gamme d'anhydrides avec différentes longueurs de chaînes carbonées (de n=2 à n=20) en présence de la triméthylamine utilisée comme base (Figure 23).

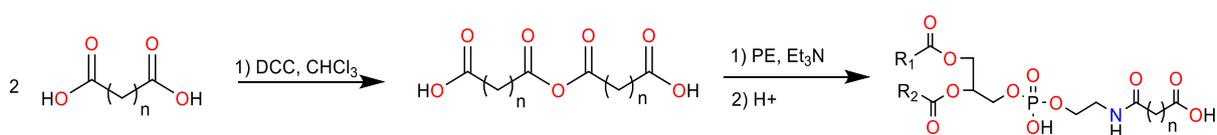


Figure 23. Incorporation d'une fonction acide à la structure du PE

Dans un second temps, les auteurs ont préparé une formulation formée avec du phosphatidylcholine et du cholestérol incluant 5% du lipide (PE) modifié. Par la suite, cette formulation a été activée pendant une heure en présence d'un activateur d'acide carboxylique soluble dans l'eau qu'est le EDCI (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide). Ce réactif agit sur la fonction acide carboxylique afin de former un ester activé, qui réagit avec une amine pour former une liaison amide très stable. Cette stratégie a été appliquée à l'immobilisation d'anticorps type IgG (Figure 24).

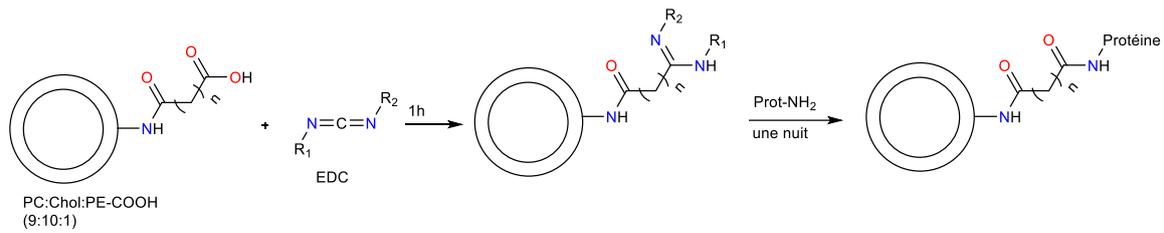


Figure 24. Conjugaison d'une protéine à la surface d'un liposome présentant des fonctions acides carboxyliques

La réaction a permis de former des liaisons amides stables entre la fonction ester activée et les amines présentes dans l'anticorps pendant une nuit à 4°C. L'efficacité de ce couplage était comprise entre 1% et 63% (pourcentage déterminé par la quantité de protéines immobilisée sur les liposomes) avec une efficacité optimale quand la longueur de l'espaceur est de 20 carbones. La variabilité significative du taux de couplage a été expliquée par l'effet de la longueur de l'espaceur entre la surface du liposome et la fonction réactive (l'ester activé).

Cette stratégie de couplage nécessite un temps relativement long ainsi qu'un traitement fastidieux, une centrifugation suivie d'une dialyse pendant une nuit, pour éliminer l'anticorps non couplé. Néanmoins, cette méthode de couplage par formation d'un lien peptidique est l'une des méthodes les plus fréquemment utilisées pour la fonctionnalisation des liposomes^{86,87}.

En 2001, Osamu Ishida et al.⁸⁸ ont utilisé la même méthode pour greffer la transferrine TF sur des liposomes incluant des fonctions acides carboxyliques à l'extrémité distale d'un PEG en présence de l'EDC (Figure 25).

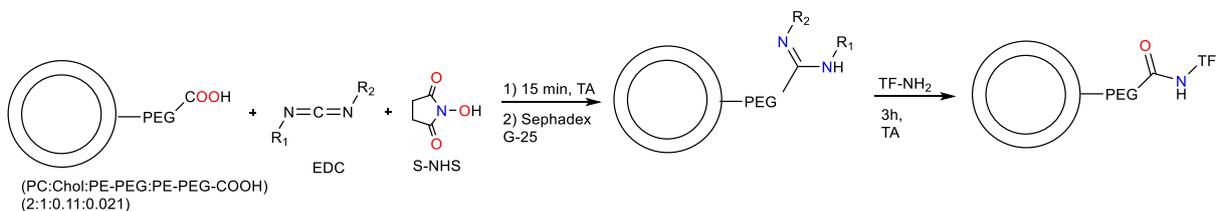


Figure 25. Fonctionnalisation de la surface d'un liposome par la Transferrine (TF)

Des analyses ont montré que ces liposomes portent chacun approximativement 25 molécules de TF. Par microscopie électronique, ils ont montré que la mise en contact de ces liposomes fonctionnalisés avec des cellules cancéreuses du colon CT26 *in vitro* fait apparaître une internalisation par endocytose médiée par les récepteurs à la transferrine. Ces vésicules incluant des TF à l'extrémité distale des chaînes

PEG ont montré un temps prolongé dans la circulation et une faible absorption dans le système réticulo-endothélial des souris porteuses de la tumeur du colon CT26. Ce résultat s'explique par une meilleure extravasation des liposomes dans le tissu tumoral solide *in vivo*. Cette méthode de fonctionnalisation présente l'avantage d'utiliser des ligands protéiques sans modification antérieure ce qui limite le risque de leur dénaturation. Cependant, l'application de cette stratégie pour l'immobilisation d'anticorps sur des liposomes comportant plusieurs fonctions amines risque de provoquer des attachements aléatoires pouvant entraîner une perte de reconnaissance de l'anticorps avec son récepteur.

II.3.4 Fonctionnalisation d'un liposome incluant une fonction thiol à sa surface

Cette méthode est basée sur la modification de la surface d'un liposome incluant un thiol par un ligand présentant une fonction maléimide. Le thiol est inclus dans la composition du liposome sous la forme d'un disulfure (pyridylthiopropionoylamino-PEG-distearoylphosphatidylethanolamine ; PDP-PEG-DSPE). Par la suite, le thiol est activé par thiolyse du groupement PDP en présence d'un agent réducteur, le dithiothreitol (DTT), avant qu'il soit engagé avec un anticorps modèle qui présente une fonction maléimide⁸⁹ (Figure 26).

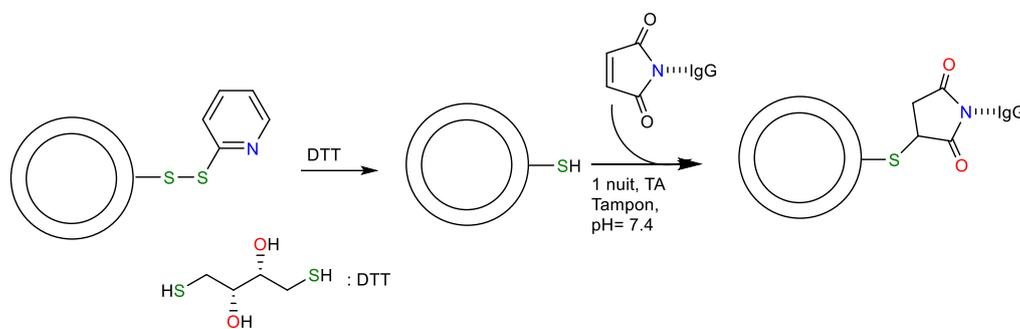


Figure 26. Couplage covalent d'un fragment d'anticorps à un liposome incluant des PE-PDP

La réaction à la surface du liposome nécessite une nuit à température ambiante dans un tampon à pH 7,4. Le meilleur taux d'immobilisation de la protéine obtenu était de 80%. La réaction s'accompagne par la formation de 2-thiopyridone qui peut être dosé.

La conjugaison de la surface d'un liposome incluant un thiol peut être également réalisée, par la formation d'un pont disulfure. Cette méthode a été utilisée par Francis J. Martin et al.⁹⁰ pour

l'immobilisation d'anticorps à la surface de liposomes. Le couplage se fait par métathèse d'un disulfure présent sur le liposome avec la fonction thiol d'un anticorps en présence du DTT (Figure 27).

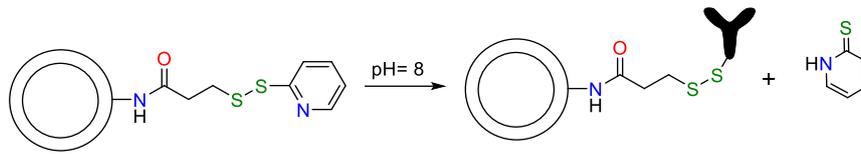


Figure 27. Couplage covalent d'un fragment d'anticorps à un liposome incluant des PE-PDP

Cette méthode offre la possibilité d'associer un anticorps ou un fragment d'anticorps sans aucune modification antérieure. Cependant, l'inconvénient qui peut accompagner cette stratégie est que les thiols libres peuvent réagir entre eux en formant des liaisons disulfures intermoléculaires, ce qui entraîne une homopolymérisation des ligands ou des liposomes qui portent des thiols.

II.3.5 Fonctionnalisation d'un liposome incluant un maléimide à sa surface

Dans le but de cibler les membranes riches en phosphatidylsérine, Garnier et al.⁹¹ ont développé des liposomes fonctionnalisés par la formation d'une liaison covalente entre les fonctions thiols portées par l'Annexine-A5 et les groupes maléimides disponibles à la surface des liposomes.

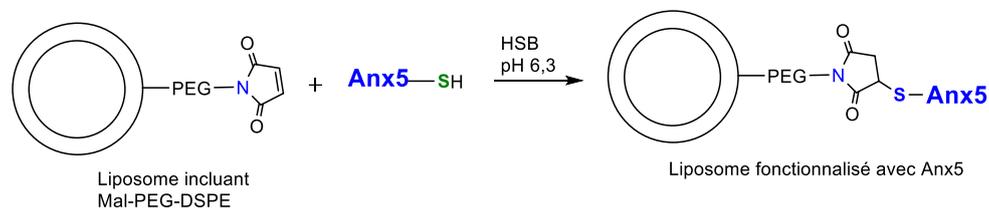


Figure 28. Schéma du couplage covalent de l'Anx5-SH au liposome incluant Mal-PEG2000-DSPE

Le couplage a été réalisé dans une solution tampon HBS à pH égal à 6,3 pendant 4h. Dans ces conditions de réaction, le pourcentage d'immobilisation de la protéine (Anx5-SH), *via* un lien covalent à la surface des liposomes exposant des fonctions maléimides, est de 80%. L'influence de l'Anx5 sur l'agrégation des liposomes fonctionnalisés a été étudiée par DLS. Ces liposomes fonctionnalisés avec l'Anx5 ont une grande stabilité en dessous d'une densité seuil, jusqu'à 250 molécules d'Anx5 par liposome. À des valeurs (≥ 250 Anx5/vesicle) une agrégation est observée. Les auteurs ont également confirmé par microbalance à cristal de quartz que les liposomes fonctionnalisés par l'Anx5 se lient spécifiquement à des membranes riches en PS.

Les motifs maléimides et bromoacétyles sont tous deux connus pour réagir avec les thiols. Schelté et son équipe⁹² ont étudié la fonctionnalisation de liposomes comportant ces deux motifs en regardant l'influence du pH (Figure 29).

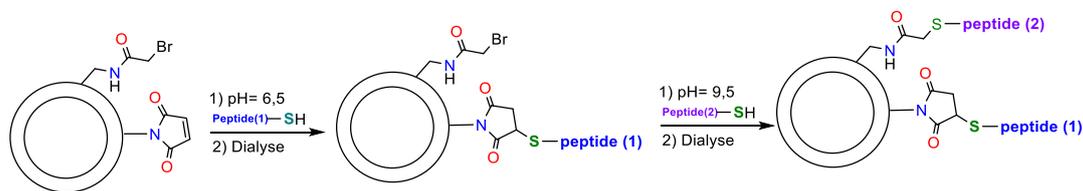


Figure 29. Fonctionnalisation de la surface d'un liposome incluant à la fois une fonction bromoacétyle et une fonction maléimide par deux peptide-SH

Les formulations étaient composées de fonctions maléimides ou bromoacétyles liées au DPPE. Ces amphiphiles étaient associés à un mélange de PC, PG et du cholestérol respectivement, avec un ratio molaire (10 :65 :25 :50). À des pH légèrement acides (pH=6,5) les maléimides ont montré une cinétique plus rapide (addition de Michael), vis-à-vis les thiols, par rapport aux bromoacétyles (substitution nucléophile). À des pH basiques (pH= 9,5) la chimiosélectivité est en faveur de la réaction des bromoacétyles avec les thiols par rapport aux maléimides. Cette différence de réactivité peut être utilisée pour fixer deux agents de ciblage de nature différente à la surface d'un même liposome incluant à la fois les fonctions maléimides et bromoacétyles.

Cette stratégie a également été utilisée par Boeckler et son équipe⁹³ pour fonctionnaliser des liposomes préformés avec deux épitopes différents à leurs surfaces. La méthode consiste à coupler une première molécule à pH 6,5 puis une deuxième molécule à pH 9,5. Ces molécules portent chacune une fonction thiol capable de se lier à des liposomes préformés incluant des fonctions maléimides et bromoacétyles.

II.3.6 Fonctionnalisation de liposomes en utilisant la chimie click bio-orthogonale

Une réaction dite click doit répondre à un maximum de critères énoncés par Sharpless⁹⁴. Idéalement la réaction doit se faire dans un solvant non toxique (e.g. eau), avec de bons rendements, dans des conditions douces, sans générer de produits secondaires et elle doit être sélective (chimiosélective, régiospécifique et le cas échéant stéréosélective). Dans le cas où ces réactions génèrent des sous-

produits, ils doivent être inoffensifs et pourront être éliminés par des méthodes non-chromatographiques.

Dans la partie qui suit, nous nous focaliserons sur les réactions click les plus connues et les plus utilisées pour la modification de la surface des liposomes avec des exemples de la littérature.

II.3.6.1 La conjugaison par couplage d'azoture avec un alcyne catalysé par un sel de cuivre (CuAAC)

Le premier exemple utilisant la cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le Cu(I) pour la modification de la surface des liposomes a été décrit par Hassane et al.⁹⁵. Ils ont développé une méthode efficace et chimiosélective pour fixer un mannose non protégé lié à un azoture, à la surface d'un liposome préformé incluant une fonction alcyne (Figure 30). La réaction a été conduite en une seule étape dans des conditions douces dans un système aqueux (HEPES 10 mM, NaCl: pH=6,5). L'utilisation d'un chélateur de Cu(I) tel que le bathophenanthroline disulfonate (L) en large excès est essentielle pour observer une conversion complète au bout de 6h de réaction. L'utilisation de CuSO₄ et d'ascorbate de sodium (conditions de Scharpless)⁹⁴ ne conduit qu'à 23% de conversion après 24h de réaction.

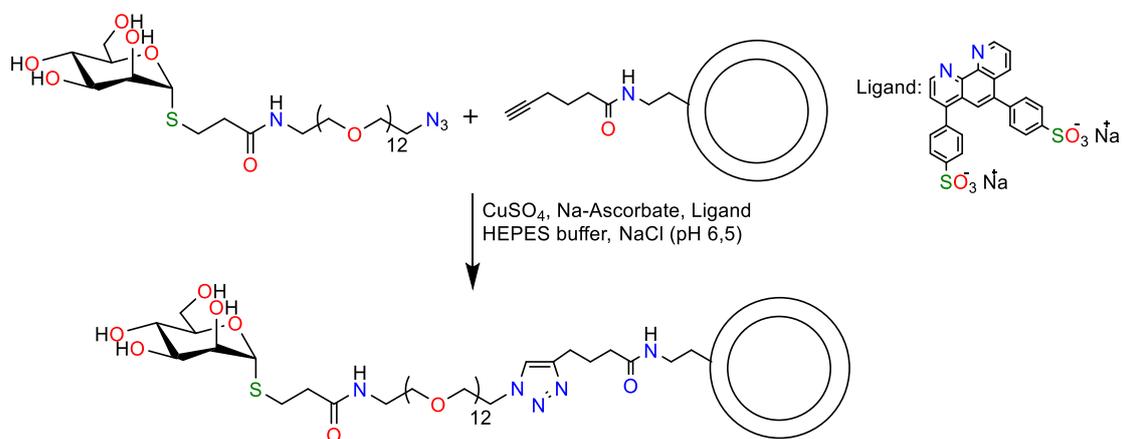


Figure 30. Fonctionnalisation de liposomes par réaction CuAAC

Les auteurs ont montré que les liposomes résistaient aux conditions de la réaction. Pour cela ils ont montré que la taille des liposomes était inchangée au cours de la réaction. De plus en utilisant des liposomes encapsulant la 5,6-carbofluoresceine, les auteurs ont montré que lors de la réaction click, la sonde fluorescente n'était pas libérée. L'exposition des liposomes mannosylés à la concanavalin A

(lectine) a permis de montrer l'accessibilité des mannoses à la surface qui se traduit par une agrégation instantanée des liposomes résultant de l'affinité entre les groupes mannoses et cette glycoprotéine.

Un second exemple assez comparable a été mentionné en 2006 par l'équipe d'Alexander Kros⁹⁶. Dans cette étude les auteurs rapportent un système qui permet de fonctionnaliser la surface de liposomes par réaction click de type CuAAC tout en permettant de quantifier l'efficacité du greffage par fluorescence. Comme indiqué dans la Figure 31, la réaction click implique d'une part un azoture fluorescent de type NBD (synthétisé à partir de la lysine) et d'autre part un liposome comportant des fonctions alcynes (portées par de la DOPE) et un lipide fluorescent de type rhodamine. La réaction click est réalisée en présence de CuBr comme catalyseur.

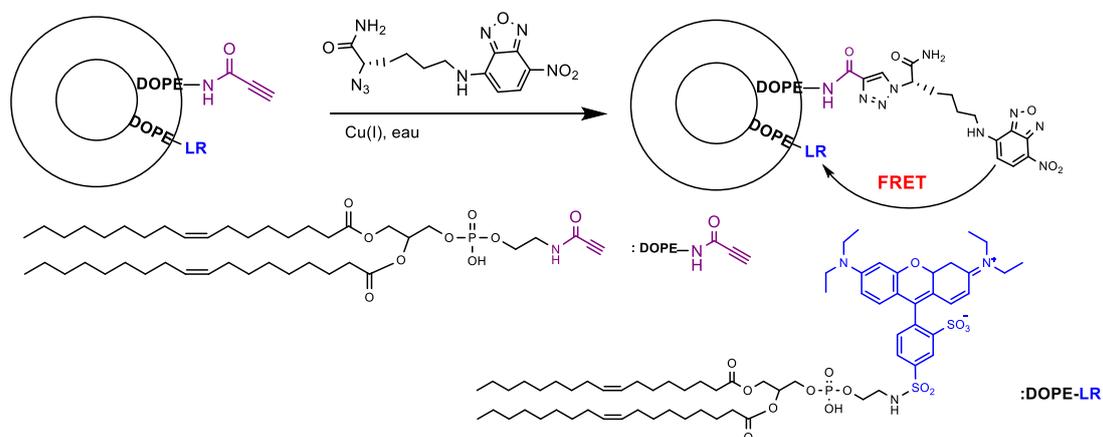


Figure 31. Représentation schématique de la réaction générale click-FRET

La réaction a été réalisée à température ambiante en suivant la vitesse de formation du produit de couplage par UV-visible en fonction du temps. Après 4h, la réaction a atteint un plateau qui confirme l'efficacité du couplage mais sans démontrer formellement l'existence d'un lien covalent (Figure 32).

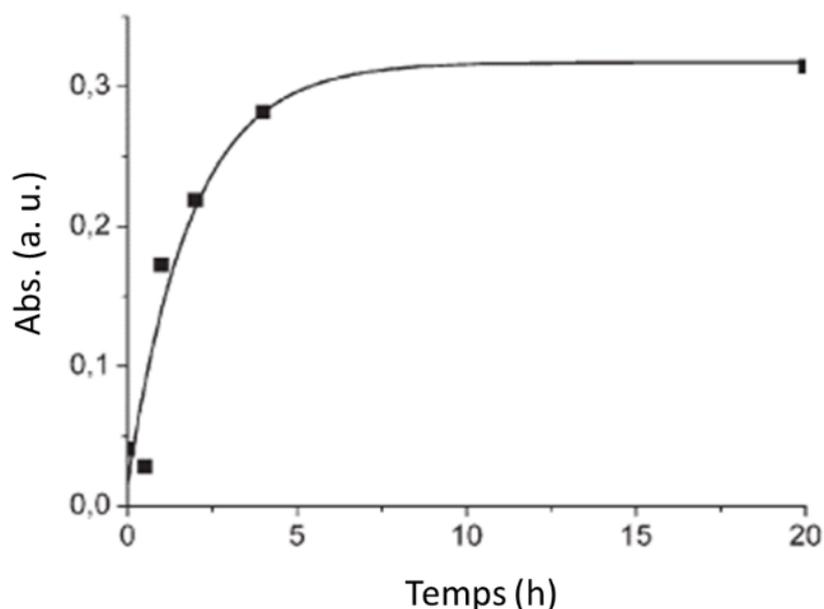


Figure 32. Absorbance UV du couplage du NBD à 472 nm en fonction du temps⁹⁶.

Le taux de conversion était de 57%, ce résultat a été interprété par le fait que seulement les alcynes exposés au feuillet externe de la membrane étaient accessibles. Ensuite, par le biais des études de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET), les auteurs ont pu déterminer que la réaction s'opère à la surface des liposomes.

Cette méthode de fonctionnalisation par cycloaddition [3 + 2] azoture-alkyne catalysée par le cuivre permet une modification de la surface des liposomes dans des conditions de réaction assez simples et qui offrent des taux de fonctionnalisation assez élevés avec des temps de réaction de quelques heures. Cette méthode de fonctionnalisation de liposomes présente comme principal inconvénient l'utilisation des sels de cuivre, potentiellement toxiques et difficiles à éliminer en fin de processus.

II.3.6.2 La conjugaison sans catalyse au cuivre : Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition (SPAAC)

Une méthode pour s'affranchir de la toxicité du cuivre consiste à utiliser des alcynes cycliques contraints qui pourront réagir à température ambiante avec des azotures par cycloaddition [3+2] en évitant l'utilisation du Cu(I). Cette méthode a été appliquée à la fonctionnalisation de liposomes.

En 2015, Oude Blenke et al.⁹⁷, ont rapporté la préparation de liposomes incluant des cyclooctynes réactifs placés sur une partie lipidique (Lipide 1 et 2 ; Figure 33).

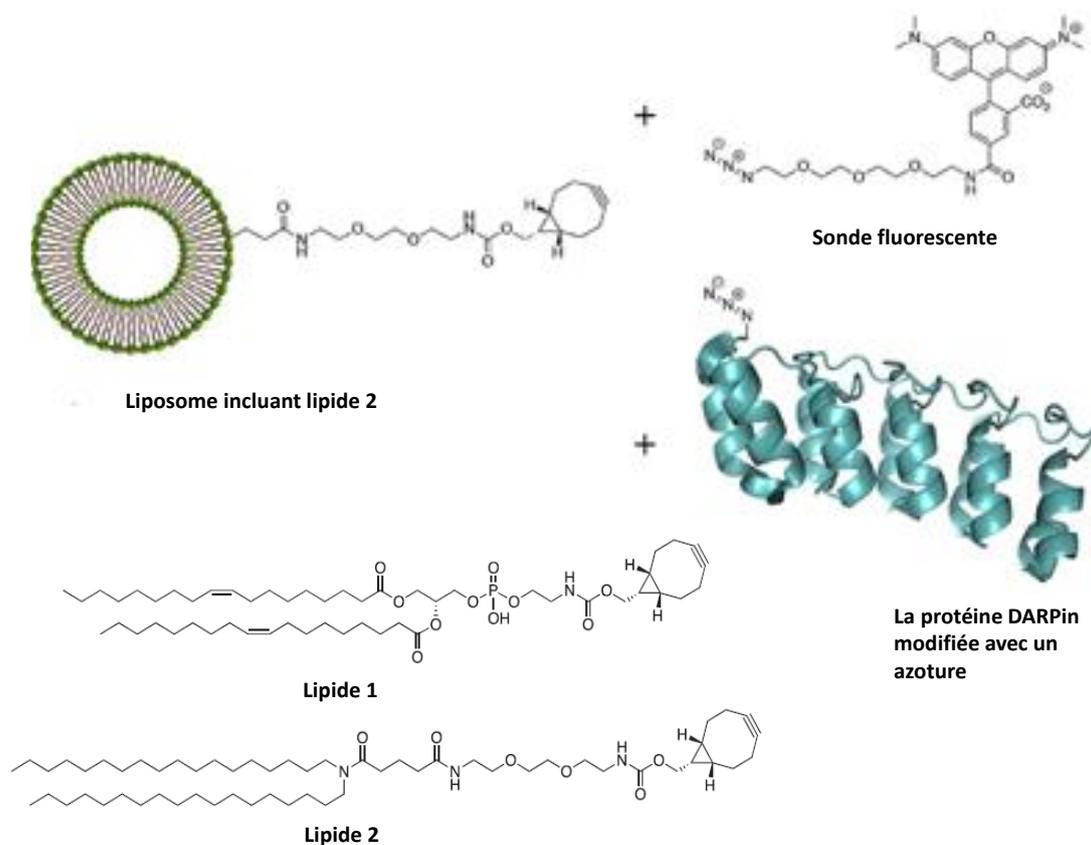


Figure 33. Ancres lipidiques 1 et 2 utilisées pour la modification des liposomes par une sonde fluorescente et une protéine

Les liposomes ont été fonctionnalisés par deux molécules différentes : une sonde fluorescente de type rhodamine portant une fonction azoture (5-TAMRA-azoture), et deux protéines modèles incluant chacune une fonction azoture ; azoture-DARPin "Ac2" (connue pour lier avec des affinités de l'ordre du nanomolaire les EpCAM, pour « Epithelial cell adhesion molecule », surexprimés par des cellules cancéreuses du colon humain HT-29) et la DARPin "Off7" (connue pour lier les maltoses "maltose binding protein", et utilisée comme un contrôle hors-cible). La conjugaison des liposomes avec la sonde fluorescente s'est avérée plus rapide avec le lipide 2 (par rapport aux liposomes incluant le lipide 1) et quantitative, après 24h d'incubation. Cette différence de réactivité est expliquée par la différence de la longueur de l'espaceur entre le groupe phosphate et l'alcyne contraint. En revanche, la fixation de la protéine Ac2 s'est avérée incomplète et moins efficace par rapport au greffage de la sonde fluorescente. Ce résultat a été expliqué par la grande taille de la protéine, qui peut créer des gênes stériques et par

conséquent limiter sa conjugaison. Malgré le faible taux de fonctionnalisation dans le cas de l'immobilisation de la protéine, le nombre de motifs fixés reste suffisant pour un ciblage spécifique des cellules humaines HT-29 du colon exprimant le récepteur EpCAM.

En 2016, Martin bak et al⁹⁸ ont rapporté une méthode efficace et chimioselective pour lier un peptide cyclique de type RGDfE (cadre rouge, Figure 34), ayant à la fois une fonction azoture (cadre bleu, Figure 34) et un marqueur à histidine (cadre vert, Figure 34), à la surface d'un liposome par post-fonctionnalisation.

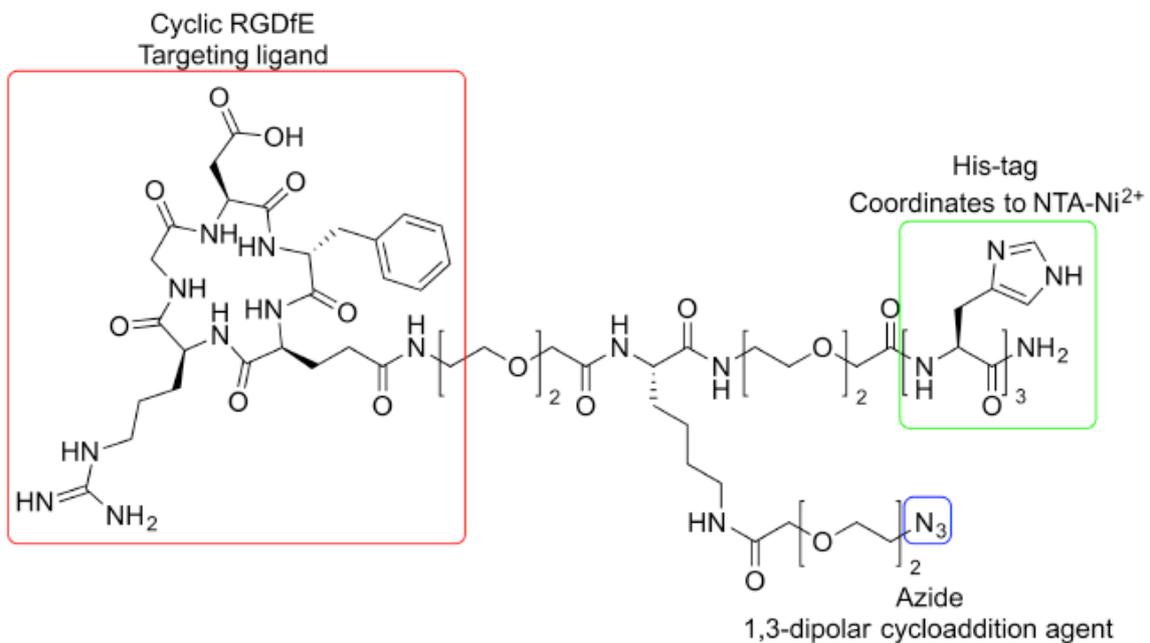


Figure 34. Structure du peptide utilisé : cadre bleu ; fonction azoture ; cadre vert Histidine tag qui peut chélater des fonctions acide nitrilotriacétique NTA en présence de Ni²⁺ ; cadre rouge ; ligand cyclique de ciblage RGDfE.

Pour ce faire, trois types de liposomes ont été utilisés pour lier le peptide cyclique de différentes manières (Figure 35) : i) Le liposome 1 exposant à la surface des alcynes contraints capables de coupler le peptide *via* son azoture en formant un triazole par réaction de type SPAAC. ii) Le liposome 2, incluant à la surface des têtes acide nitrilotriacétiques (NTA-chélates), peut lier le peptide à sa surface en chélatant la fonction histidine en présence de Ni²⁺. iii) Le liposome 3, exposant à la fois des alcynes contraints et des têtes NTA-chélates, peut lier le peptide par une réaction de type SPAAC assistée par une chélation en présence de Ni²⁺.

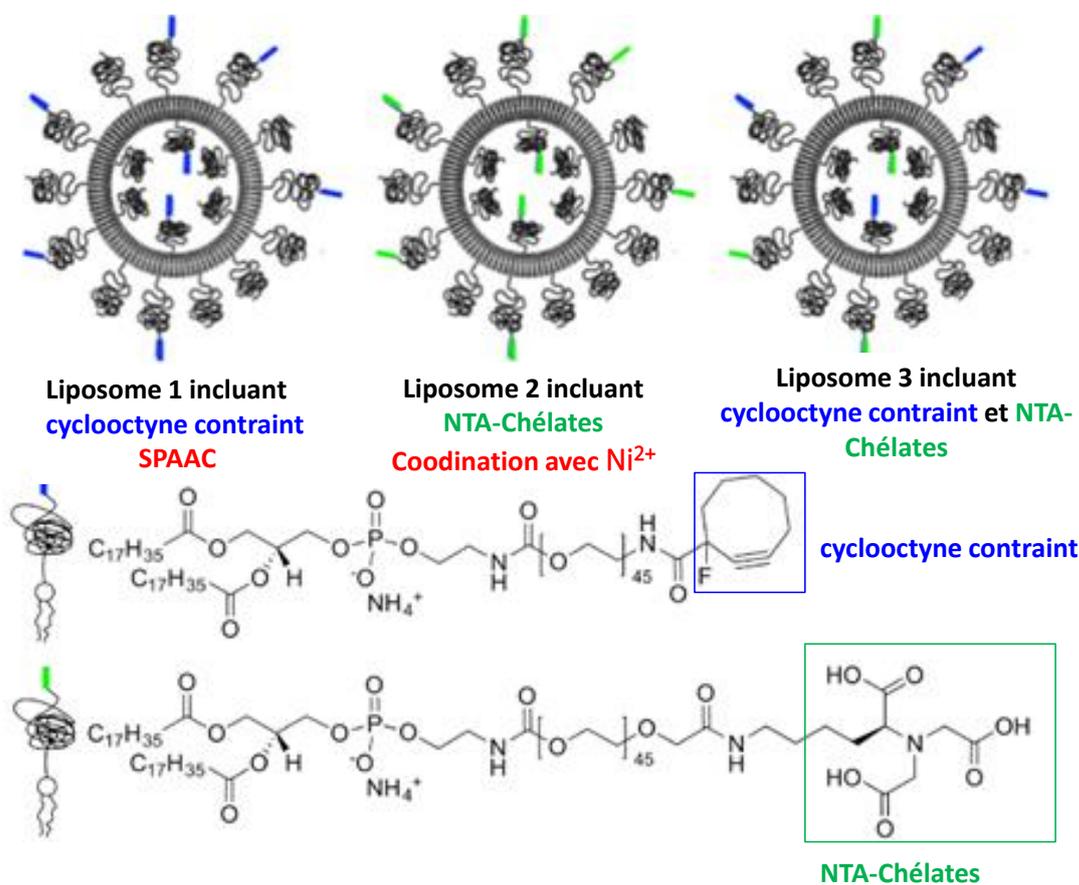


Figure 35. Représentation schématique des trois liposomes utilisés et des deux ancres lipidiques utilisées

La cinétique de la réaction pour fonctionnaliser les trois liposomes a été suivie pendant 72h, donnant une efficacité de couplage par SPAAC de $83 \pm 1,5\%$ pour le liposome 1 et un taux de couplage de $72 \pm 2,0\%$ dans le cas du liposome 2 par chélation en présence de Ni²⁺.

La présence des deux fonctions (alcyne contraint et NTA-chélate) dans le cas du liposome 3 a favorisé le greffage du peptide avec une efficacité de conjugaison égale à $98 \pm 2,0\%$ après 72h. À la fin de la réaction, la perturbation du complexe formé par affinité en ajoutant des aliquotes d'acide acétique, utilisées pour perturber les liaisons par affinité, n'a pas modifié le taux de fonctionnalisation. Ce résultat a confirmé que le greffage du peptide a été effectué d'une manière covalente par la formation d'un triazole et non par affinité.

Cette amélioration de 15% par rapport à la méthode du couplage SPAAC seule est probablement due aux interactions favorables entre la surface du liposome et le motif incluant l'histidine. En effet, ce type

d'interactions aide à augmenter la concentration du ligand à proximité de la surface du liposome ce qui améliore l'efficacité du couplage.

Le principal inconvénient de cette méthode de fonctionnalisation des liposomes provient du coût des cyclooctynes contraints et de leur synthèse qui requiert de nombreuses étapes. Néanmoins, cette méthode introduite par Bak promet une immobilisation quantitative du peptide utilisé à la surface du liposome. Par conséquent, elle offre la possibilité d'ajouter le ligand sur le liposome en stœchiométrie ce qui permet de s'affranchir de l'étape de purification du liposome fonctionnalisé en fin de réaction.

II.3.6.3 Fonctionnalisation de liposomes par ligation de Staudinger

Dans ce type de conjugaison le couplage se fait entre une phosphine et un azoture pour former, dans un premier temps, un iminophosphorane/ylure azoté comme intermédiaire réactionnel. Par la suite, dans le cas de la « ligation » de Staudinger avec trace (non-traceless) (Figure 36-A), le groupement méthoxycarbone en ortho de la phosphine piège l'ylure azoté de façon intramoléculaire ce qui permet d'obtenir un oxyde de phosphine et un lien amide après hydrolyse dans l'eau.

Dans le cas de la « ligation » de Staudinger sans trace (traceless) (Figure 36-B), le groupement acyl destiné pour la formation de la liaison amide est lié au cycle aromatique *via* un lien clivable. L'attaque du carbonyle par l'atome d'azote du groupement aza-ylide provoque la coupure du lien clivable et permet de produire un amide et un oxyde de phosphine. Cette méthode sans trace a été optimisée pour faire en sorte que l'oxyde de phosphine produit ne reste pas inclus dans la structure du composé conjugué⁹⁹.

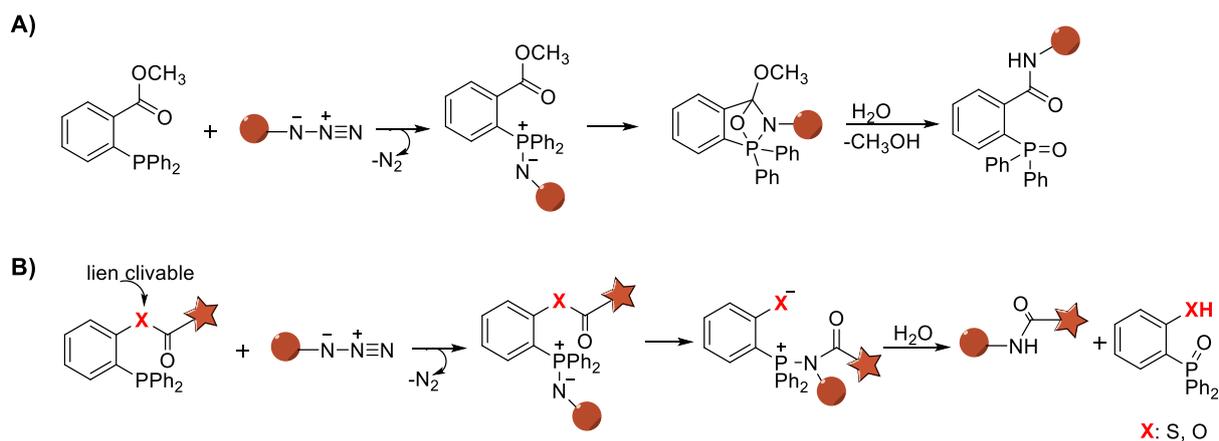


Figure 36. Ligation de Staudinger : A) avec trace B) sans trace

La méthode de ligation de Staudinger avec trace a été utilisée pour la fonctionnalisation de liposomes. En 2009, Zhang et al.¹⁰⁰ ont développé une méthode efficace et chimiosélective de glyco-fonctionnalisation pour coupler des agents de ciblage à la surface des liposomes en utilisant la ligation de Staudinger avec trace. Selon cette approche, un carbohydrate porteur d'un espaceur avec une fonction azoture terminale est conjugué à la surface du liposome préformé qui contient une fonction triarylphosphine (Figure 37). La réaction a été conduite dans un tampon aqueux (PBS, pH=7,4), sous argon, sans catalyseur et à température ambiante. Le couplage est obtenu, après 6 heures de réaction, avec un rendement de 80%, en estimant que 40% des phosphines ont été orientées à l'intérieur de la cavité.

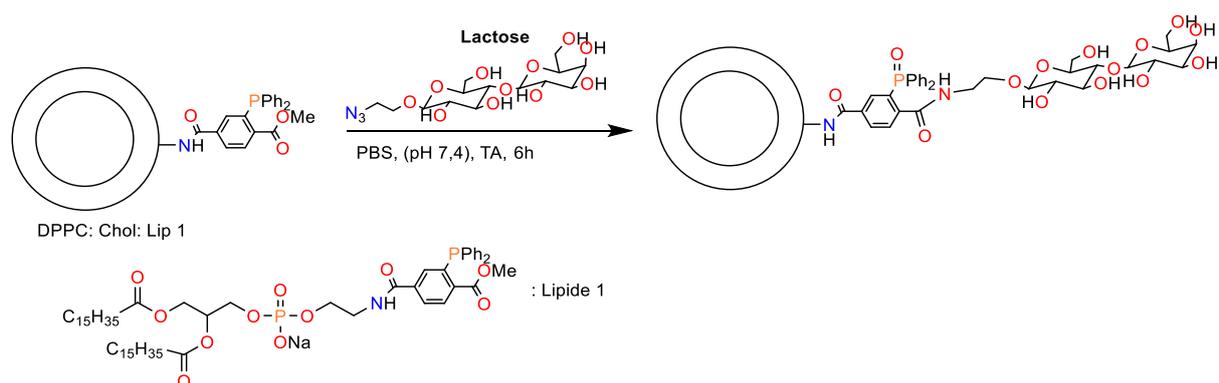


Figure 37. Illustration de la modification de la surface du liposome par glyco-conjugaison via la ligation de Staudinger

Les auteurs ont montré que la réaction n'altère pas la structure des liposomes (pas de fuite significative de 5,6-carboxyfluorescein encapsulée).

La même équipe a utilisé cette méthode de fonctionnalisation par ligation de Staudinger avec trace dans le but de produire des microréseaux liposomaux. L'idée a consisté à préformer des liposomes qui portent des motifs triarylphosphines fonctionnalisés à l'extrémité d'un PEG. Dans un premier temps, ces liposomes sont mis en réaction (6h) avec une biotine-N₃ dans un tampon aqueux (PBS) à pH=7,4 à température ambiante¹⁰¹ (Figure 38).

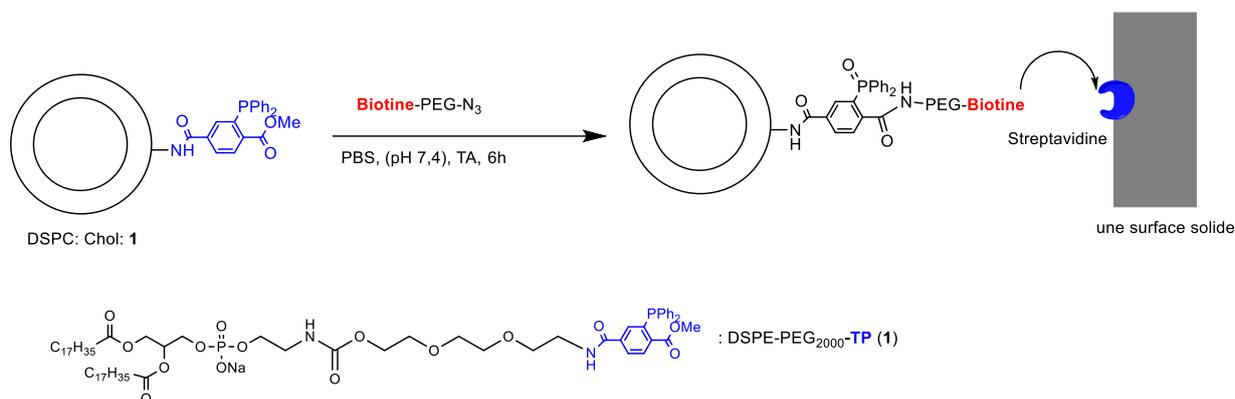


Figure 38. Schéma d'immobilisation d'un liposome biotinylé par ligation de Staudinger sur un microréseau modifié à l'avidine. La confirmation de la biotinylation de la surface des liposomes a été effectuée en immobilisant les liposomes biotinylés sur une lame de verre modifiée à la streptavidine. L'obtention d'une agrégation a été remarquée, ce qui implique que les liposomes ont été fonctionnalisés à la surface.

Il semblerait que la réaction de Staudinger sans trace n'ait pas encore été utilisée pour la modification de la surface des liposomes¹⁰².

Cette méthode de fonctionnalisation par ligation de Staudinger est une méthode efficace et chimiosélective mais avec une cinétique de réaction assez lente¹⁰³. Cette cinétique est de l'ordre de 0,001 M⁻¹ s⁻¹. Cette valeur a été rapportée dans une revue rédigée par Bernades¹⁰⁴ et son équipe.

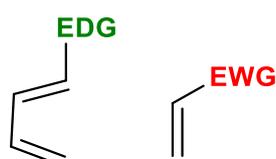
La réaction se déroule dans des conditions de réaction douces sans catalyse et à température ambiante. Cependant, l'accès aux triarylphosphine fonctionnalisées nécessite plusieurs étapes de synthèse et la sensibilité des phosphines à l'oxydation constitue une seconde difficulté.

II.3.6.4 Fonctionnalisation de liposomes par Diels – Alder à demande inverse d'électrons (IEDDA)

La réaction Diels Alder à demande inverse d'électrons (IEDDA) est l'une des réactions bioorthogonales les plus abouties (sans catalyse, à température ambiante, des rendements satisfaisants avec un seul sous-produit qui est le N_2 et compatible pour des applications *in vivo*, cinétique rapide). Comparée à la réaction de Diels Alder à demande normale d'électron, qui met en œuvre une cycloaddition [4+2] entre un diène riche en électrons et une diéophile pauvre en électron, la IEDDA décrit une réaction entre un diène pauvre en électron (e.g. 1,2,4,5-tétrazines) et un diéophile riche en électron (alcène ou alcyne) qui forme un cycle à 6 carbones entre 4 électrons π du diène et 2 électrons π du diéophile (Figure 39).

Demande normale d'électron

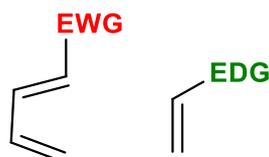
Diène riche en électron



Diéophile pauvre en électron

Demande inverse d'électron

Diène pauvre en électron



Diéophile riche en électron

Figure 39. Comparaison entre les réactions Diels Alder ; à demande normale d'électron et à demande inverse d'électron

En 2008 Blackman et al.¹⁰⁵ ont introduit une nouvelle méthode bioorthogonale basée sur la réaction de Diels Alder entre un trans-cyclooctène et une tétrazine cyclique (Figure 40). Elle permet d'obtenir 100% de conversion en 40 minutes de réaction, à température ambiante et à des concentrations de l'ordre du micromolaire.

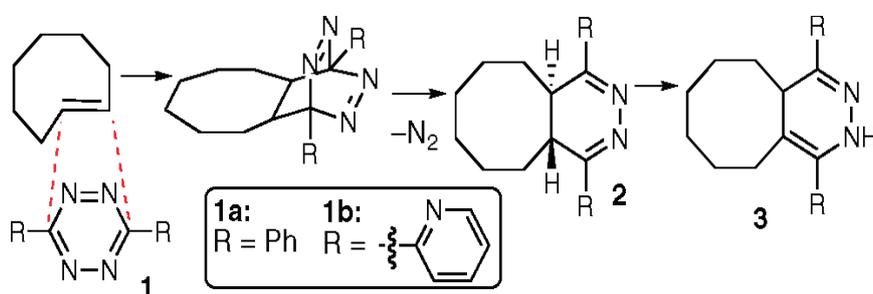


Figure 40. Schéma réactionnel de la réaction de Diels Alder¹⁰⁵.

Cette réaction est qualifiée de rapide et suit une loi cinétique du second ordre avec une constante de vitesse égale à $2000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Cette constante de vitesse est comprise dans l'intervalle des constantes de

vitesse de la réaction IEDDA, déterminée par Bernardes et son équipe¹⁰⁴. Ils ont décrit la cinétique de certaines réactions IEDDA, comme une cinétique rapide inégalée, comparée aux autres méthodes existantes (ligation de Staudinger, SPAAC, CuAAC...), où sa constante de vitesse peut aller de 1 jusqu'à $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A noter, cette étude menée par Blackman, à notre connaissance est la seule étude dans laquelle les auteurs ont déterminé une cinétique complète (ordre de réaction, constante de vitesse) en milieu aqueux et en milieu cellulaire. D'autres travaux similaires mais utilisant une autre réaction de couplage tel que la bioconjugaison par SPAAC font apparaître une cinétique de réaction bien plus faible ($2,3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^{106,107}. Cependant, la cinétique pour ces deux exemples a été effectuée dans des solvants organiques.

Cette réaction IEDDA peut s'opérer dans des solvants organiques, dans l'eau et dans un milieu cellulaire ou dans une lyse cellulaire. Le seul sous-produit de cette réaction est le dégagement de N_2 . Tous ces critères ont permis à cette méthode d'être utilisée dans divers domaines d'applications tels que la biochimie et la biophysique.

En 2019, Kannaka et al.¹⁰⁸ ont utilisé cette méthode de couplage pour développer de nouveaux systèmes efficaces pour la délivrance de médicaments. Plus précisément, ils ont utilisé cette réaction pour modifier la fluidité de la membrane du liposome (Figure 41). Ce changement de fluidité de la membrane provoque une libération accélérée de médicaments encapsulés. Cet effet peut promouvoir un contrôle spatio-temporel sur le relargage du médicament encapsulé.

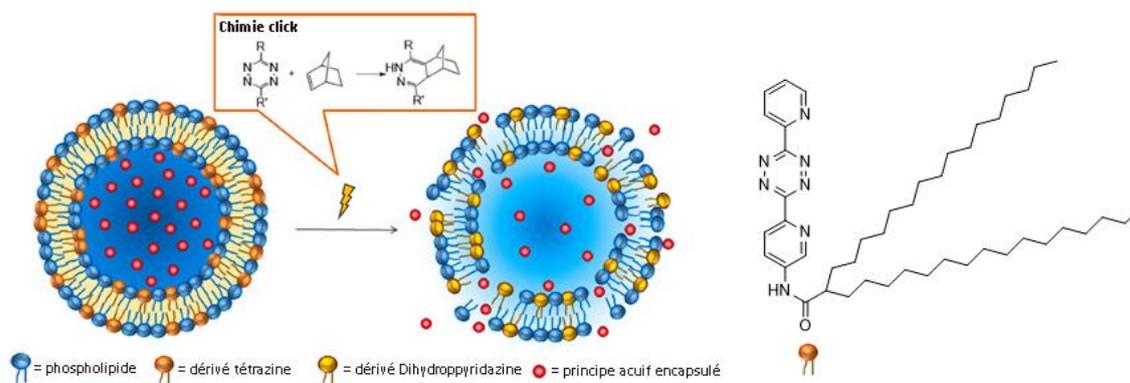


Figure 41. Modification de la surface d'un liposome par réaction Diels-Alder à demande inverse¹⁰⁸.

Pour cela, une tetrazine amphiphile (Tz) a été introduite sur un lipide mimant le DSPC. Ils ont ensuite préparé un liposome-Tz qui encapsule l'acide diéthylène triaminepentacétique marqué à l'indium-111 (DTPA-¹¹¹In) comme un modèle de médicament ainsi qu'un colorant cyanine (le vert d'indocyanine ICG, connu par le quenching de sa fluorescence une fois encapsulé et le déquenching une fois libéré du liposome). Ce liposome-Tz a été mis en réaction avec le 2-norbornene (2-NB) (le diénophile) (Figure 41). Il s'est avéré que le couplage qui en résulte permet le relargage immédiat du DTPA-¹¹¹In. Ce résultat suggère une rapide réaction chimique entre la tetrazine et le 2-norbornène. Ce relargage est expliqué par un changement de la fluidité de la membrane des liposomes. Le meilleur taux de libération (22,3%) de DTPA-¹¹¹In a été obtenu après 24h d'incubation.

En 2020 la même équipe¹⁰⁹, a évalué le relargage de DTPA-¹¹¹In *in vitro* en faisant réagir les liposomes-Tz, sur le norbornène (NB), ou le norbornène fonctionnalisé par un ou deux fonctions acide carboxylique. (NBCOOH et NB(COOH)₂). Par la suite, ces résultats ont été comparés aux résultats de libération de DTPA-¹¹¹In dans le cas du (2-NB) pour déterminer l'effet des substituants dans la structure du norbornène.

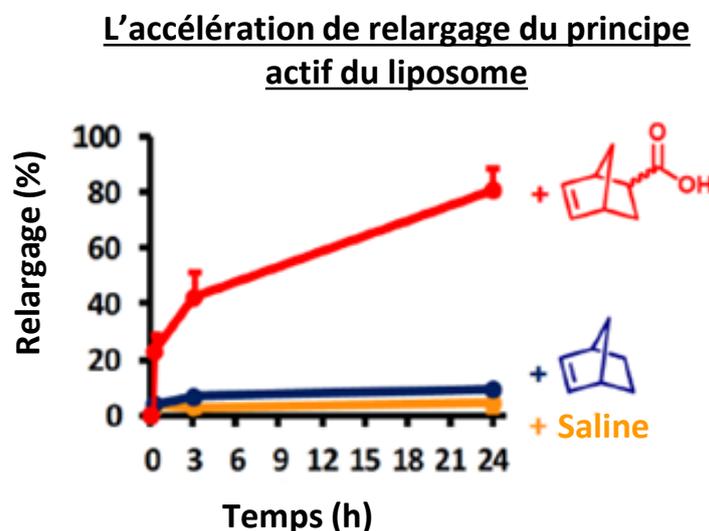


Figure 42. Comparaison du pourcentage de relargage du principe actif selon le NBD utilisé

Après 24h d'incubation avec 2-NB, NBCOOH et NB(COOH)₂, le taux de relargage de DTPA-¹¹¹In des liposomes post-fonctionnalisés était respectivement de 21,0% ; 80,8% et 23,3% (Figure 42).

Une augmentation significative du taux de relargage a été obtenue dans le cas des norbornènes incluant une fonction acide. Une évaluation thermodynamique à l'aide de l'isotherme de Langmuire a révélé que les changements de la fluidité de la membrane ainsi que les forces de répulsion entre les lipides et les composés couplés au norbornène au sein de la membrane contribuent principalement à la libération accélérée du composé fluorescent.

La méthode de fonctionnalisation par cycloaddition inverse de Diels-Alder entre un diène (e.g. 1,2,4,5-tétrazines) et un diénophile (norbornène) est une méthode efficace qui se déroule selon un mécanisme rapide et en absence de catalyse métallique avec des temps de réaction assez courts.

II.3.6.5 Fonctionnalisation de liposomes par formation d'oxime

La ligation par formation d'oxime est basée sur la condensation spontanée d'une hydroxylamine avec un aldéhyde ou une cétone.

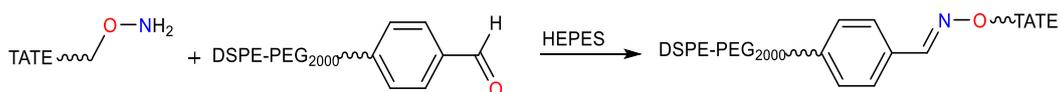


Figure 43. Schéma de réaction du couplage entre une fonction hydroxylamine et un aldéhyde pour la modification d'un liposome

En 2012 Feldborg et son équipe¹¹⁰ rapportent pour la première fois une méthode efficace et chimio-sélective pour la fonctionnalisation de la surface des liposomes basée sur la formation d'une fonction oxime entre une hydroxylamine et un lipide incluant une fonction aldéhyde. Cette méthode a été présentée comme une excellente alternative aux méthodes de post-fonctionnalisation qui existent dans la littérature. Les auteurs ont conjugué une protéine, ciblant les cellules neuroendocriniennes appelées TATE, qui présente une fonction hydroxylamine à la surface d'un liposome incluant le DSPE-PEG2000 qui possède une fonction aldéhyde à l'extrémité distale de la chaîne PEG. La réaction de couplage est réalisée dans l'HEPES (pH=6.5) sans catalyse. La formation de la fonction oxime en milieu organique s'est avérée bien plus rapide que lorsque la réaction est réalisée à la surface du liposome (un temps de 8 heures en milieu tamponné est alors nécessaire). En effet, pour atteindre une conversion complète il a fallu attendre 24 heures sans catalyse dans les deux milieux (organique et aqueux) (Figure 44).

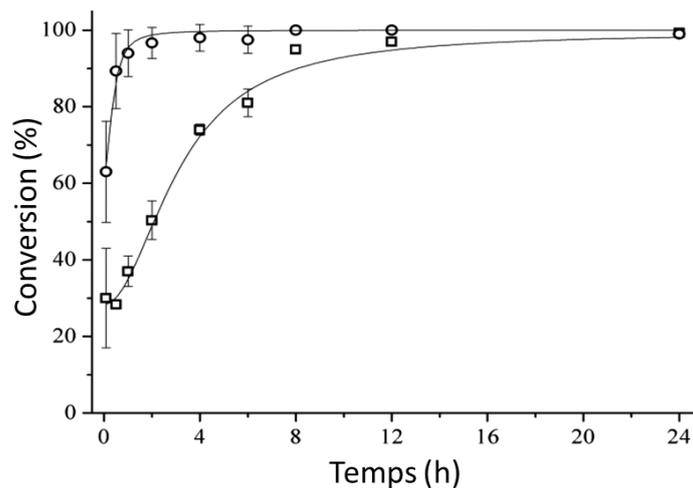


Figure 44. Conjugaison par la formation d'une liaison oxime, (○) en solution organique ; (□) à la surface des liposomes (dans un tampon)¹¹⁰.

La formation de la fonction oxime peut être accélérée en présence d'un catalyseur tel que l'aniline, l'acide acétique ou un acide de Lewis. En effet, l'addition de l'acide acétique (0,1% v/v) à la réaction de couplage a permis d'obtenir une conjugaison de 78% au bout de 5 minutes comparé à 30% de conversion au même temps sans utilisation de catalyse.

En présence de catalyse, cette méthode permet d'atteindre un pourcentage élevé de fonctionnalisation en quelques minutes. Cependant, l'utilisation de catalyse acide peut être un inconvénient pour l'utilisation de cette méthode pour certaines applications.

En 2018 Bartheldyová¹¹¹ et son équipe ont réussi à modifier la surface des liposomes, incluant à la surface des fonctions hydroxylamines par l'acide hyaluronique (HA) dont la fonction hémiacétal est en équilibre avec une forme ouverte faisant apparaître une fonction aldéhyde utilisée ici pour la conjugaison (Figure 45).

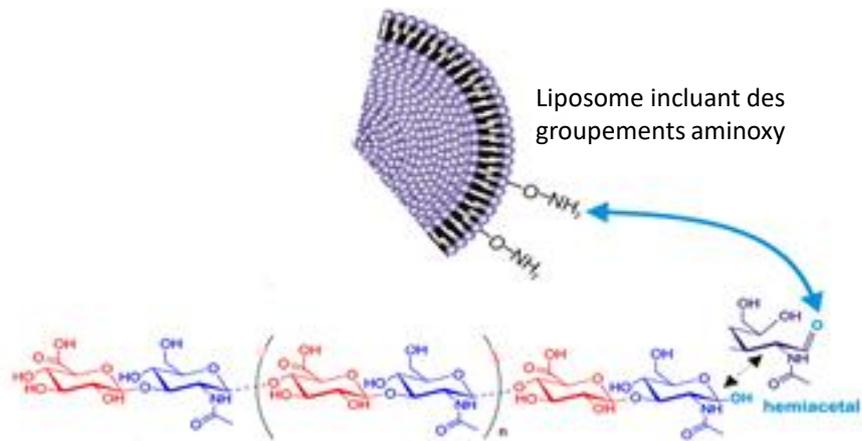


Figure 45. Fonctionnalisation des liposomes, par la formation sélective d'une oxime par l'acide hyaluronique (HA).

Les liposomes modifiés avec HA se sont montrés sélectifs vis-à-vis les cellules qui présentent des glycoprotéines de types CD44 à leur surface. À noter que cette glycoprotéine est impliquée dans divers processus biologiques tels que les réponses immunitaires, les inflammations, les cancers..., ce qui fait de ces liposomes fonctionnels des vecteurs intéressants pour la délivrance de médicaments ou pour la vaccination.

En 2019 cette même équipe¹¹² a utilisé la méthode de couplage par formation d'oxime pour la modification de la surface des liposomes par un polysaccharide tel que le mannane, connu pour ses capacités à stimuler les cellules dendritiques (Figure 46).

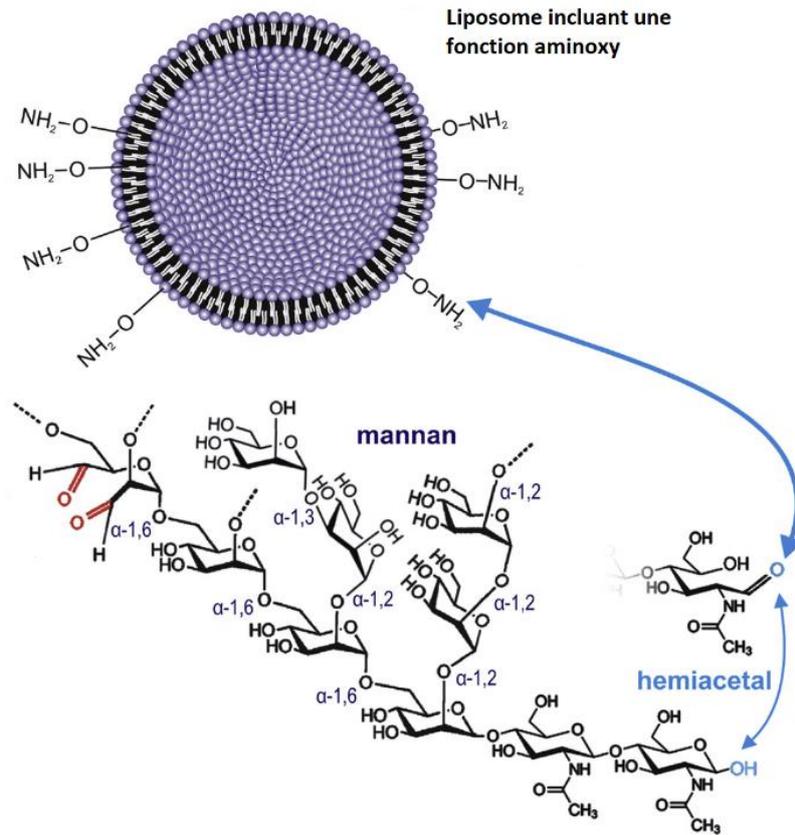


Figure 46. Fonctionnalisation de la surface des liposomes par formation d'oxime

Le greffage s'est avéré relativement rapide (quelques heures) dans des conditions douces de réaction. Après greffage, les mannanes ont préservé leur pouvoir pour stimuler les cellules dendritiques. Cette plateforme basée sur des liposomes modifiés à la mannane est en étude pour développer une méthode de vaccination des muqueuses.

Chapitre II : Etude méthodologique de la fonctionnalisation des liposomes

Chapitre II – Etude méthodologique de la fonctionnalisation des liposomes

I. Introduction

Les phosphonodithioformiates ne réagissant pas avec l'eau mais réagissent, comme il sera présenté dans le paragraphe suivant, rapidement avec des amines. Nous avons cherché à utiliser le potentiel de cette réaction d'aminolyse des phosphonodithioformiates pour modifier de façon covalente la surface des liposomes. Cette partie du manuscrit est dédiée à la modification de la surface des liposomes incluant dans leurs compositions une ancre lipidique de type phosphonodithioformiate (neutre ou cationique). L'objectif recherché est schématiquement présenté dans la Figure 47.

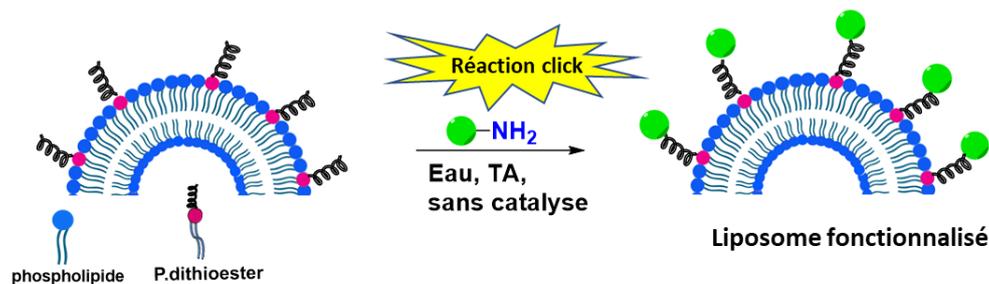


Figure 47. Illustration de l'objectif de l'étude : modification de la surface de liposomes par réaction d'aminolyse de phosphonodithioformiates lipidiques inclus dans la formulation de liposomes.

La première partie de ce chapitre est consacrée à une étude bibliographique sur les dithioesters incluant leurs utilisations ainsi que la préparation et la réactivité de leurs analogues les phosphonodithioformiates.

La deuxième partie de ce chapitre rapporte nos travaux dédiés à la mise au point d'une méthode de fonctionnalisation de la surface des liposomes basée sur l'aminolyse de phosphonodithioformiates. Pour cette étude nous avons choisi une amine fluorescente soluble dans l'eau afin de pouvoir évaluer l'efficacité de la réaction par spectroscopie UV-visible. Les problématiques auxquelles nous souhaitons répondre étaient les suivantes :

- Démontrer la faisabilité de l'approche.
- Déterminer le taux de fonctionnalisation des motifs phosphonodithioformiates

- Trouver une méthode de purification efficace des liposomes après modification de leur surface.
- Démontrer le lien covalent de l'amine fluorescente sur le liposome.
- Déterminer la cinétique de réaction.
- Démontrer l'intégrité des liposomes après modification de leurs surfaces.

Après l'étape de mise au point de la méthode de fonctionnalisation de liposomes, nous avons, dans un second temps, appliqué la méthodologie à d'autres type de liposomes et utilisé d'autres composés aminés et en particulier des amino-PEG afin de proposer une méthode de PEGylation de ces liposomes.

II. Bibliographie

II.1 Généralités sur les dithioesters

Les dithioesters (composé **a** - Figure 48) sont connus pour leur réactivité avec les composés nucléophiles et les diènes lors de réactions d'hétéro-Diels-Alder¹¹³. Par exemple, la réaction des dithioesters avec la cystéine a été utilisée comme méthode pour générer H₂S¹¹⁴. Les dithioesters ont également été utilisés comme agents de transfert en polymérisation RAFT (Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer)¹¹⁵ et comme agent de thioacylation de composés aminés¹¹⁶⁻¹¹⁸. Plus récemment, les dithioesters ont été utilisés comme précurseurs de 1,2,4-oxadiazoles-3,5 di-substitués. Cet hétérocycle est présent dans certains principes actifs¹¹⁹.

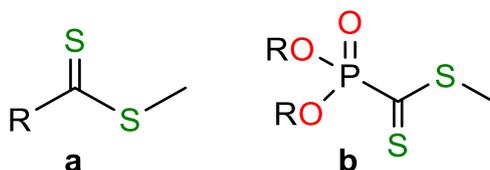


Figure 48. Structure de : **a**) dithioesters (R : phenyle ou chaines alkyles) et **b**) α-phosphonodithioformiate (R : Et, iPr)

La présence d'une fonction phosphonate, en position alpha du groupe dithioester génère les phosphonodithioformiates (composé **b** - Figure 48) qui sont des motifs très réactifs avec les nucléophiles, comme indiqué dans un prochain paragraphe.

II.2 Préparation des phosphonodithioformiates

La synthèse des dialkyl phosphonodithioformiates se fait généralement selon la méthode de Grisley¹²⁰. Il s'agit d'une synthèse qui se fait en trois étapes successives mais sans purification intermédiaire (one-pot) (Figure 49). La première étape consiste à former le sel de sodium du dialkylphosphite à partir de l'hydruure de sodium dans un solvant aprotique qui est très souvent le tetrahydrofurane (THF). Par la suite, la solution du sel de phosphite obtenue est ajoutée sur un excès de disulfure de carbone (CS_2) pour former une liaison C-P. Finalement, une étape d'alkylation avec l'iodométhane à température ambiante suivi d'une chromatographie sur gel de silice permet d'isoler le phosphonodithioformiate de méthyle.

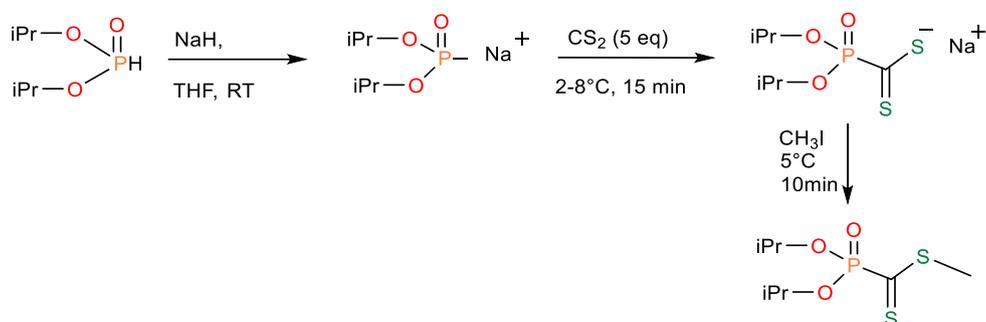


Figure 49. Schéma de synthèse du diisopropylphosphonodithioformiate de méthyle selon Grisley¹²⁰

Une modification de la méthode de Grisley a été introduite par Salvatore et al. en 2003¹²¹ (Figure 50). La synthèse consiste à faire réagir dans un solvant aprotique polaire (le diméthylformamide, DMF) trois réactifs qui sont le dialkyle phosphite, le disulfure de carbone et la carbonate de césium Cs_2CO_3 , en présence d'un catalyseur de transfert de phase (l'iodure de tetrabutyl-ammonium - TBAI). Une dernière étape comprend la réalisation d'une S-alkylation à partir du sel formé précédemment. Plusieurs phosphonodithioformiates ont ainsi été préparés. Les chaînes alkyles les plus longues incluses dans la structure du dialkylphosphite sont des chaînes lauryl (12 atomes de carbone). L'alkylation du sel de césium du phosphonodithioformiate intermédiaire avec le 2-bromobutane a conduit les auteurs à isoler le phosphonodithioformiate de butyle avec un rendement de 31% après 100 heures de réaction.

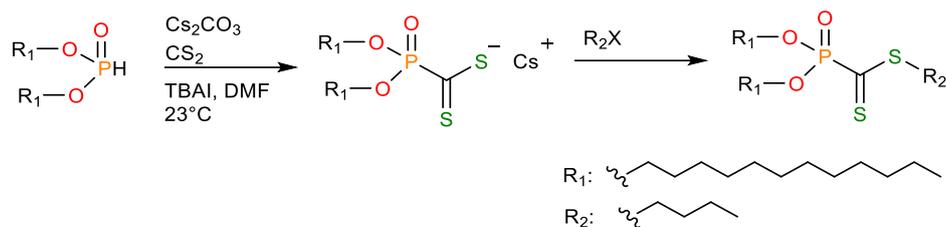


Figure 50. Synthèse selon la méthode de Salvatore et al.¹²¹

Abrunhosa et al.¹²² ont présenté une autre méthode de synthèse de phosphonodithioformates à partir d'un phosphonate lié à un groupement phényle sulfonyle en position β (Figure 51).

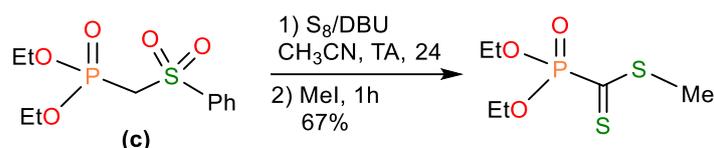


Figure 51. Synthèse de phosphonodithioformiate par la méthode de Abrunhosa et al.¹²²

La première étape est une étape de sulfuration du phosphonate (c) en ajoutant du soufre (S_8) avec une base DBU (1,8-diazabicyclo(5.4.0)undec-7-ene) à température ambiante pendant 24 heures, conduisant *in situ* à un sel de phosphonodithioacide. Ensuite, une S-alkylation par le CH_3I permet d'obtenir le phosphodithioformiate de méthyle avec un rendement de 67%.

II.3 Réactivité des phosphonodithioformates

II.3.1 Diénophile dans les réactions d'hétéro Diels-Alder

Les propriétés diénophiles des phosphonothioformates ont été examinées dans des réactions de cycloadditions [4+2]. Il s'est avéré que le groupement thiocarbonyle constitue un hétérodiénophile réactif conduisant, après réaction d'hétéro-Diels-Alder (HDA)¹²³, à un dihydrothiopyrane phosphorylé (Figure 52).

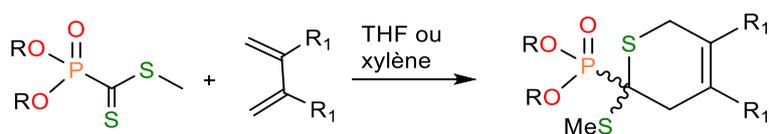


Figure 52. Schéma de réaction HDA entre un phosphonodithioformiate et un diène¹²³

Cette réaction d'HDA a été utilisée par Nebhani et al.¹²⁴ pour modifier la surface de microsphères, ayant des groupes phosphonodithioformates à leur surface. Dans cette étude, le motif phosphonodithioester

sert à la fois comme agent RAFT pour la polymérisation^{125,126} et comme agent de couplage par réaction d'hétéro-Diels-Alder¹²⁷ (HDA) (Figure 53).

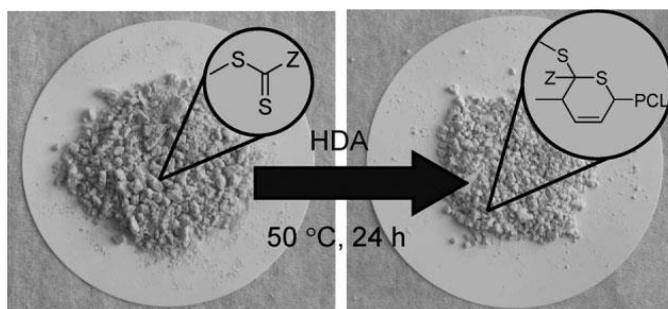


Figure 53. Modification de la surface des microsphères par HDA¹²⁴

J. Andrew¹²⁸ et son équipe ont utilisé deux phosphonodithioformiates pour synthétiser dans un premier temps, des polymères par polymérisation RAFT du styrène en présence d'AIBN (azobisisobutyronitrile). Par la suite, des blocks copolymères ont été obtenus par réaction d'HDA en faisant réagir ces polymères avec d'autres polymères (de type PEG) ayant un cyclopentadiène à leur extrémité (Figure 54).

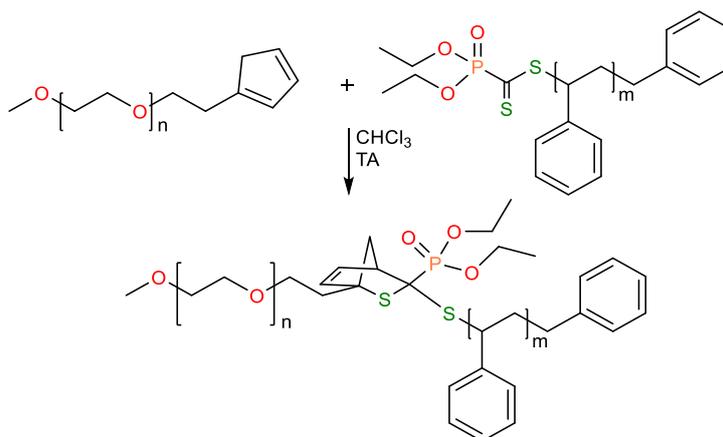


Figure 54. Illustration de la synthèse d'un block copolymères par réaction HDA impliquant le motif phosphonodithioformiate.

II.3.2 Réaction des phosphonodithioformiates avec les amines

La réaction des alkyles amines avec les phosphonodithioformiates a été peu étudiée. La première étude a été rapportée par l'équipe de S. Masson¹²⁹. C'est une réaction qui s'opère dans des conditions douces, à température ambiante et sans utilisation de base, conduisant à la formation d'un phosphonothioamide (Figure 55 - composé **d**). Cette réaction s'accompagne de la formation d'un dithioacétal-disulfure¹³⁰ (Figure 55 - composé **e**). Ce produit est obtenu par addition thiophile du thiol

phosphonothiazoline est majoritairement formée par réaction entre le phosphonodithioformiate de méthyle et la 2-bromoéthylamine en présence de triéthylamine.

La réaction des phosphonodithioformiates avec les semicarbazides a également abouti à une cyclisation, accompagnée de l'élimination d'ammoniac, pour donner un phosphono-thiadiazolone ou un thiosemicarbazide.

La réaction d'acide-amino (e.g. glycine) avec le phosphonodithioformiate de méthyle est réalisée dans un mélange THF/eau montrant la compatibilité de ces phosphonodithioesters avec le milieu aqueux. Le produit d'aminolyse est isolé avec un rendement de 95%.

Dans une étude effectuée par Lebouc et al.¹³² un phosphonothioamide fonctionnalisé par du chitosan a été préparé par réaction de thioacylation entre le chitosan et un diisopropylphosphono-dithioformiate de méthyle en présence de triéthylamine (Figure 57). Cette méthode permet de modifier la structure du chitosan qui est un polymère naturel.

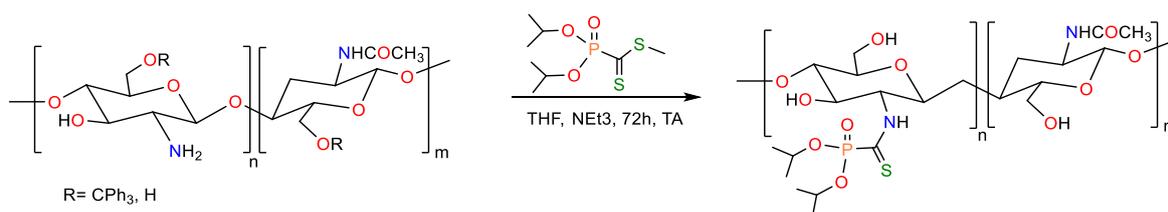


Figure 57. Synthèse du phosphonothioamide fonctionnalisé par du chitosan

L'introduction du motif phosphonate sur le chitosan a permis de rendre ce dernier soluble dans l'eau. Ces travaux de la littérature concernant la réaction entre les phosphonodithioformiates de méthyle et les amines montrent qu'il s'agit généralement d'une méthode efficace (rendements élevés) pour former les phosphonothioamides correspondants et que cette réaction peut être effectuée dans l'eau. Ces deux critères ont été déterminants afin d'optimiser cette réaction pour modifier la surface des liposomes.

III. Fonctionnalisation de la surface des liposomes par réaction d'aminolyse de phosphonodithioformiates.

Pour répondre aux objectifs fixés au début de ce chapitre, il nous a d'abord fallu préparer plusieurs composés dont les phosphonodithioformiates (neutre et cationique), les deux composés clés de l'étude, une amine fluorescente de type naphthalimide et une amine PEGylée ($MW = 600 \text{ g.mol}^{-1}$). La synthèse de ces deux amines (fluorescente et PEGylée) a été effectuée pour deux raisons ; i) pour les engager, dans un premier temps en milieu organique, dans une réaction d'aminolyse avec les phosphonodithioformiates et caractériser les phosphonothioamides résultants. ii) Utiliser ces deux amines par la suite, pour la modification de la surface des liposomes préformés.

Pour la formation des liposomes nous avons préparé un lipide cationique du laboratoire (BSV36). Il s'agit d'un amphiphile formé par deux chaînes grasses oléyles, une tête polaire de type ammonium et un espaceur de type phosphoramidate, utilisé au sein de notre équipe pour la délivrance d'acides nucléiques.¹³³ (Figure 58)



Figure 58. Structure du BSV36

III.1 Synthèse des précurseurs nécessaires à la mise en place de la modification de la surface des liposomes.

III.1.1 Synthèse des phosphonodithioformiates (neutre et cationique)

A notre connaissance, les phosphonodithioformiates comportant les deux chaînes alkyles les plus longues ont été rapportés par Salvatore¹²¹. En effet, dans cette étude, Salvatore et al. décrivent un phosphonodithioformiate comportant deux chaînes alkyles en C12 sans que ce composé n'ait été utilisé pour la formation de liposomes.

Pour notre étude, nous avons choisi d'utiliser des chaînes lipidiques saturées comportant 14 atomes de carbone (chaînes myristyles) pour les deux raisons principales suivantes :

- Les composés amphiphiles comportant ce type de chaîne forment à faible concentration des assemblages supramoléculaires (e.g. micelles ou liposomes selon la structure des amphiphiles).
- L'alcool myristique est un précurseur commercial bon marché et disponible avec une bonne pureté (>95%).

Ainsi, nous avons eu pour premier objectif de préparer deux phosphonodithioformiates comportant deux chaînes lipidiques de type myristique (Figure 59). L'un des deux composés est un phosphonodithioformiate de méthyle (composé **2**). Il s'agit d'un composé neutre qui ne possède pas véritablement une structure amphiphile car il ne détient pas de groupement très polaire. L'association d'un tel composé avec d'autres composés amphiphiles présentait le risque de rendre l'étape de formulation difficile. Pour cette raison, nous avons envisagé dès le début la synthèse d'un second composé possédant un groupe cationique (composé **4**). Ce composé possède une structure amphiphile caractérisée par la présence d'un domaine hydrophobe (deux chaînes lipidiques en C14) et un groupe polaire cationique.

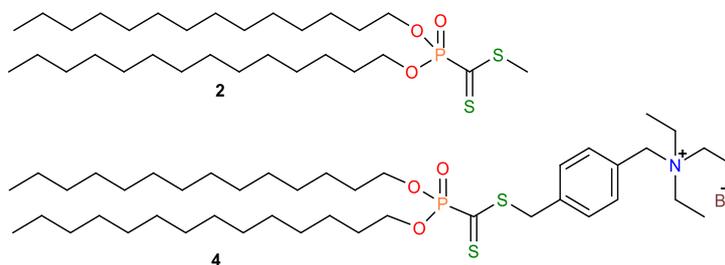


Figure 59. Structure des deux composés cibles : A) phosphonodithioformiate neutre, B) phosphonodithioformiate cationique

La première étape de synthèse est une étape commune aux deux phosphonodithioformiates, neutre et cationique. Elle consiste en la synthèse du phosphite de départ **1** à partir du tétradécan-1-ol. La réaction se fait selon un mécanisme de transestérification en plaçant un mélange d'alcool et du diphenyle phosphite dans un four à boule (Kugelrohr), tout en maintenant la température à 140°C pendant 4h à pression réduite (10^{-2} mbar) (Figure 60).

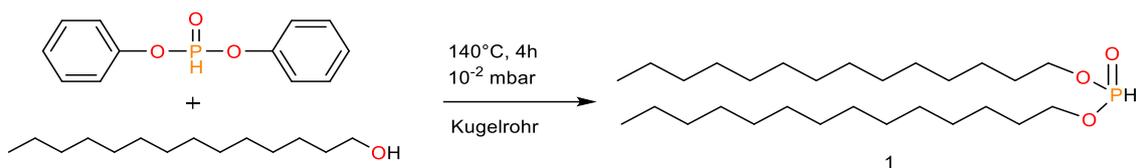


Figure 60. Synthèse du phosphite **1**

Le phénol formé au cours de la réaction est éliminé par sublimation. Le produit attendu est recueilli avec un rendement quantitatif à l'échelle de plusieurs grammes. La RMN- ^1H et ^{31}P confirment la structure du phosphite obtenu avec en particulier la constante de couplage $^1J_{\text{PH}} = 692\text{ Hz}$ (Figure 61).

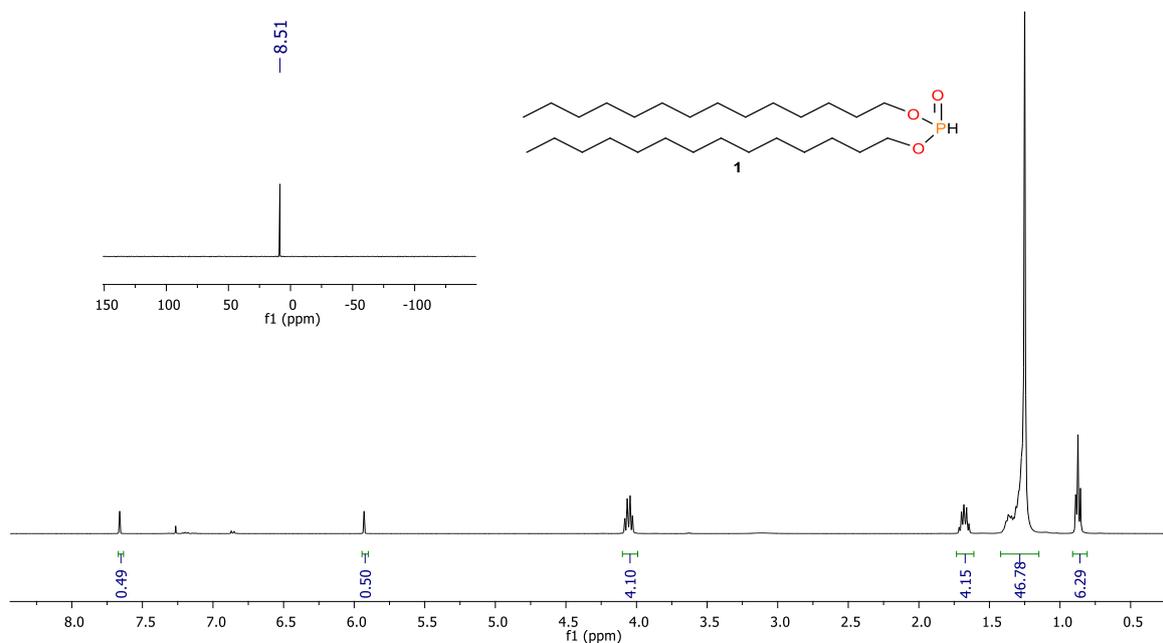


Figure 61. Spectres RMN- ^1H et $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ du phosphite **1**

Au cours de la deuxième étape, la synthèse du phosphonodithioester a été envisagée en appliquant la méthode de Grisley¹²⁰ au substrat lipidique **1**.

III.1.1.1 Synthèse du phosphonodithioformiate neutre

Dans le but de synthétiser le phosphonodithioester neutre **2** nous avons utilisé un protocole remanié de la méthode de Grisley¹²⁰. Ce protocole est introduit par Alberti et al.¹³⁴ pour la synthèse des phosphonodithioesters avec des chaînes alkyles courtes. Il consiste à ajouter un excès de CS_2 sur le sel

de phosphite en solution dans le THF préalablement refroidie à -78°C . Dans la méthode originale de Grisley¹²⁰, le sel de phosphite est ajouté sur un excès de CS_2 . Par ailleurs, il a été montré qu'un excès de CS_2 est nécessaire car une utilisation stœchiométrique conduit à une désulfuration du CS_2 accompagnée de la formation du sel de sodium du méthylène diphosphonate¹³⁵. Ainsi, en ajoutant à basse température l'excès de CS_2 sur le sel de sodium du dialkylphosphite, la réaction est figée et ne se produit qu'après réchauffement du milieu. La réaction est ensuite agitée pendant 2h à température ambiante. L'étape finale consiste à rajouter l'agent alkylant à température ambiante puis de laisser la réaction opérer pendant 2 heures (Figure 62).

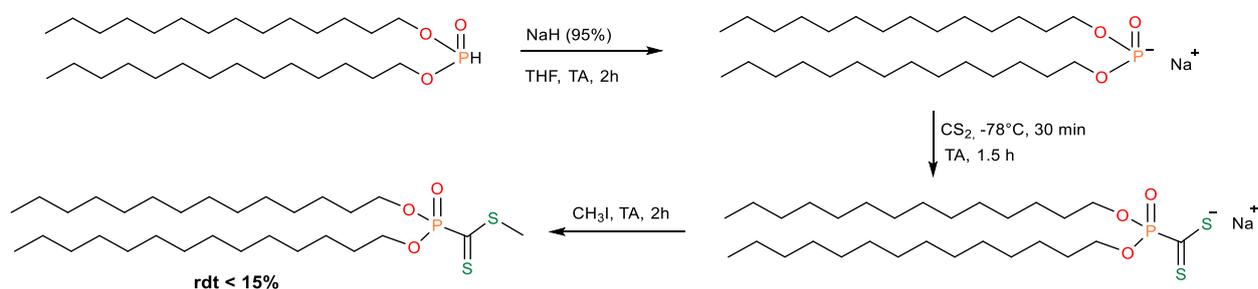


Figure 62. Schéma de synthèse du phosphonodithioformiate par la méthode d'Alberti¹³⁴

L'application de cette méthode sur le substrat lipidique **1** en formant le sel de phosphite pendant 2h à température ambiante, a abouti au produit final avec des rendements inférieurs à 15%. Le faible rendement résulte de la formation de plusieurs sous-produits dont la formation d'un xanthate, comme le montre le spectre RMN-1H (Figure 63).

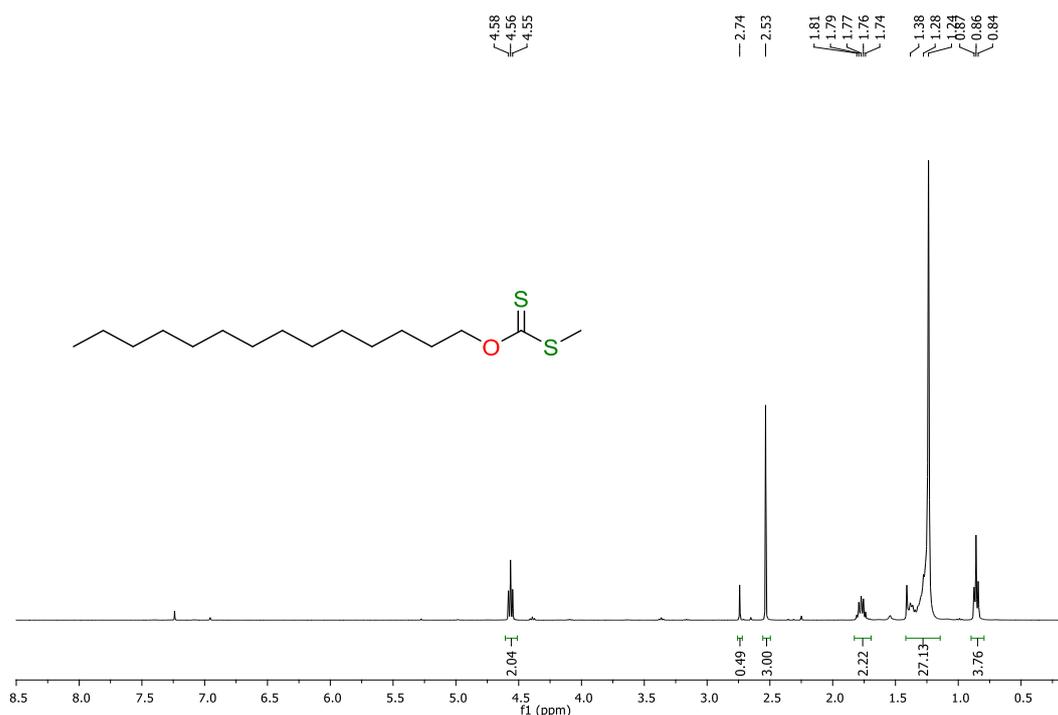


Figure 63. Spectre RMN ^1H du xanthate isolé lors de la préparation du phosphonodithioformate **2**.

Le rendement obtenu de 15% reste donc modeste par rapport aux travaux de Salvatore¹²¹ qui rapporte la synthèse d'un dithioformate avec deux alkyles en C12 avec un rendement de 31% après 100 heures de réaction. Notre premier résultat et ceux de Salvatore montrent que l'utilisation de chaînes lipidiques diminue fortement les rendements (15 à 31%) par rapport à cette même réaction réalisée avec des chaînes éthyles ou isopropyles pour lesquelles les rendements sont décrits entre 50% et 90%.

Dans le but d'optimiser les conditions de synthèse, nous avons dans un premier temps travaillé avec des phosphites comportant un faible nombre d'atomes de carbone (diéthylphosphite **f**, diphenylphosphite **g** et diisopropylphosphite **h** ; Figure 64). Le but d'utiliser ces phosphites était d'identifier les paramètres expérimentaux susceptibles d'améliorer l'efficacité de la réaction.

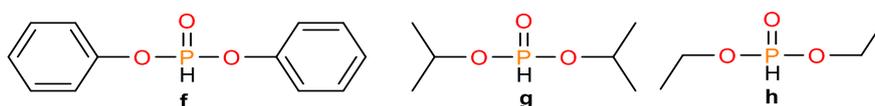


Figure 64. Structure des trois phosphites utilisés

Les résultats obtenus sont récapitulés dans le Tableau 4.

Entrée	Phosphite R	Formation du sel de phosphite	Addition de CS ₂	Rdt
1	Ph	2h à TA	-78°C puis TA (2h)	35%
2	iPr	2h à TA	-78°C puis TA (2h)	26%
3	Et	2h à TA	-78°C puis TA (2h)	22%
4	Ph	30 min à 50°C	-78°C puis TA (2h)	33%
5	iPr	30 min à 50°C	-78°C puis TA (2h)	28%
6	iPr	30 min à 50°C	0°C puis 50°C (30 min)	27%
7	iPr	30 min à 50°C	0°C puis TA (2h)	30%

Tableau 4. Les différentes conditions essayées pour la synthèse des phosphonodithioesters

Dans les entrées 1, 2 et 3 nous avons conservé les mêmes conditions initialement appliquées pour la synthèse du phosphonodithioester avec la chaîne C14. Les résultats obtenus suggèrent que la nature de la chaîne influence les rendements obtenus ainsi que la longueur de chaîne. Le meilleur rendement (35%) est obtenu avec le phosphite de diphenyle.

Les entrées 3 et 4 montrent que le temps nécessaire pour former le sel de phosphite peut être raccourci de 2h à 30 minutes en chauffant à 50°C pour un rendement plus au moins identique.

L'entrée 7 montre que l'addition de CS₂ à 0°C ne modifie pas le rendement. Par ailleurs la comparaison entre les entrées 6 et 7, montre des rendements comparables entre un chauffage à 50°C (entrée 6) ou une réaction à TA (entrée 7) après l'addition du CS₂.

Il ressort de ces expériences que la préparation du sel de phosphite à 50°C pourrait être appliquée à la préparation de sel de sodium de phosphite gras qui semble moins réactif. Le mélange du phosphite **1** en présence de l'hydrure de sodium dans le THF, a été chauffé à 54°C. L'évolution de la réaction a été suivie par RMN-³¹P en utilisant une sonde interne D₂O dans un tube RMN contenant le mélange réactionnel dans le THF. Ce suivi par RMN ³¹P, montre l'apparition du sel de sodium du phosphite **1** à 152 ppm et la disparition complète du phosphite de départ à 8,5 ppm (Figure 66-spectre A). Après 4 h de reflux, la solution obtenue est limpide (Figure 65-1). Nous montrons aussi qu'un chauffage de 30 minutes est insuffisant car après ce temps de chauffage uniquement une trace de sel de phosphite est détectée (Figure 66). Le chauffage est ensuite arrêté et le mélange est refroidi à -78°C ; le mélange réactionnel devient solide. 6 équivalents de CS₂ sont ajoutés au mélange réactionnel à -78°C. La solution

vire progressivement vers une coloration marron (Figure 65-2 et 3). La RMN ^{31}P fait apparaître un pic vers 2,4 ppm (Figure 66-spectre C). La réaction est par la suite laissée réagir pendant 2h à TA.

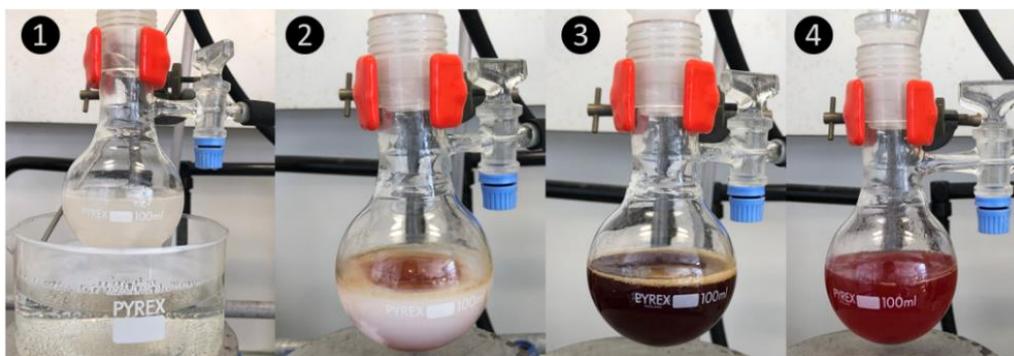


Figure 65. Les différentes étapes de la réaction au cours du temps : **1)** le sel de phosphite après 4h à 54°C, **2)** addition de CS_2 à $T=-78^\circ\text{C}$, **3)** le mélange réactionnel après addition de CS_2 après 2h à TA, **4)** Le mélange réactionnel après l'étape d'alkylation.

À l'étape d'alkylation, l'iodométhane est rajouté (1,1 équivalents), une coloration rouge brique apparaît (Figure 65-4) en donnant un signal en phosphore vers -1,57 ppm (Figure 66-spectre D). Sur ce spectre il apparaît des sous-produits à 18.34 ppm, 14.86 ppm, 12.62 ppm et -3.13. Le pic à 18.34 ppm pourrait correspondre au méthylènediphosphonate mais il devrait alors s'accompagner par un pic correspondant au thiophosphate à un déplacement chimique d'environ 60 ppm, ce qui n'est pas observé ici¹³⁵.

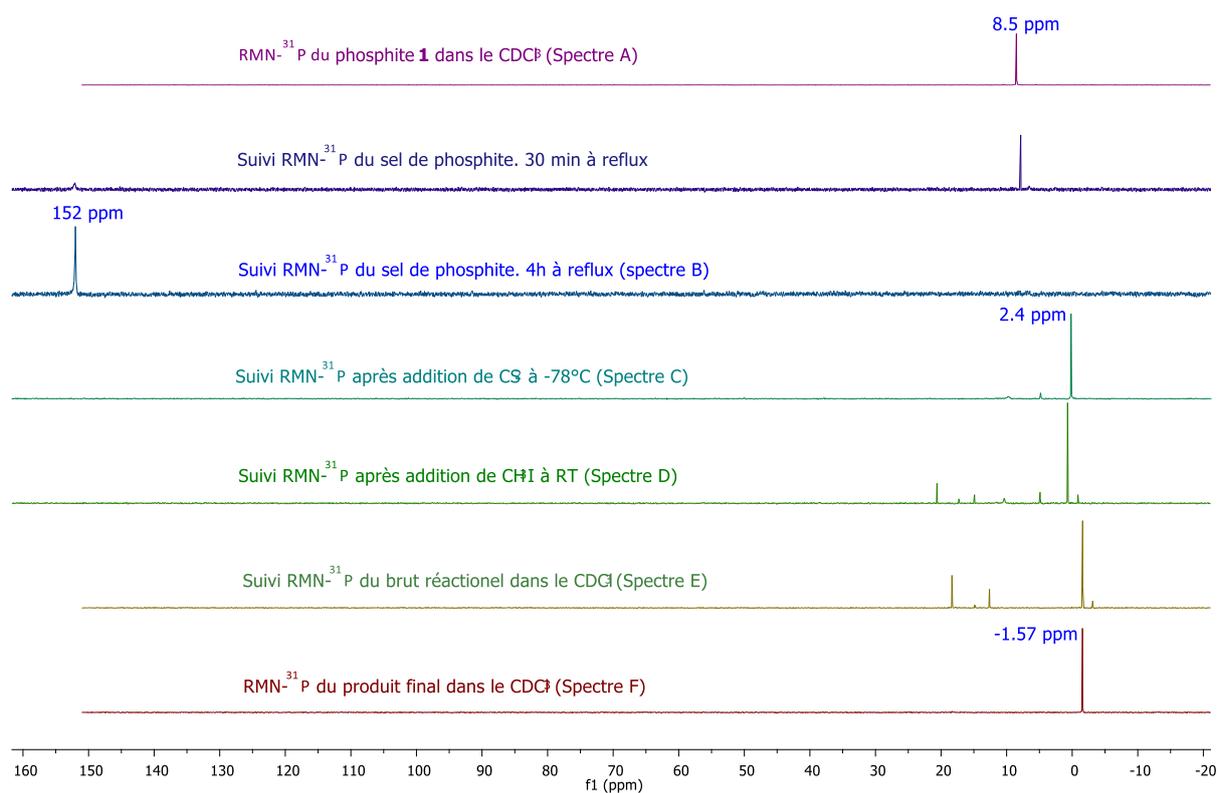


Figure 66. Suivi RMN-³¹P{¹H} de la synthèse du phosphonodithioester **2**.

Le produit final a été obtenu après une purification par flash chromatographie avec un rendement de 32%. La structure a été confirmée par RMN-¹H (Figure 67), RMN-³¹P, (Figure 68). Le phosphonodithioformiate de méthyle obtenu présente un signal caractéristique au C=S en RMN ¹³C à 229.63 ppm avec une constante de couplage ¹J_{CP} = 176.6 Hz.

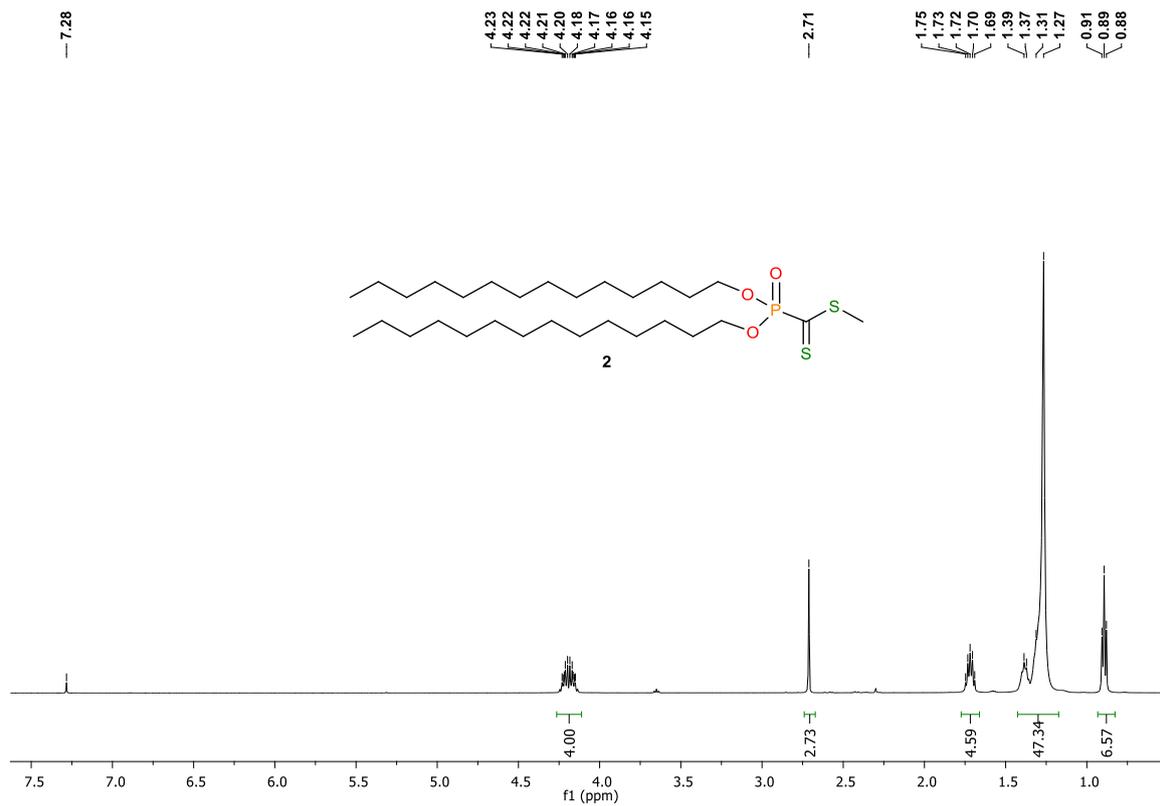


Figure 67. RMN-¹H du phosphonodithioester **2**

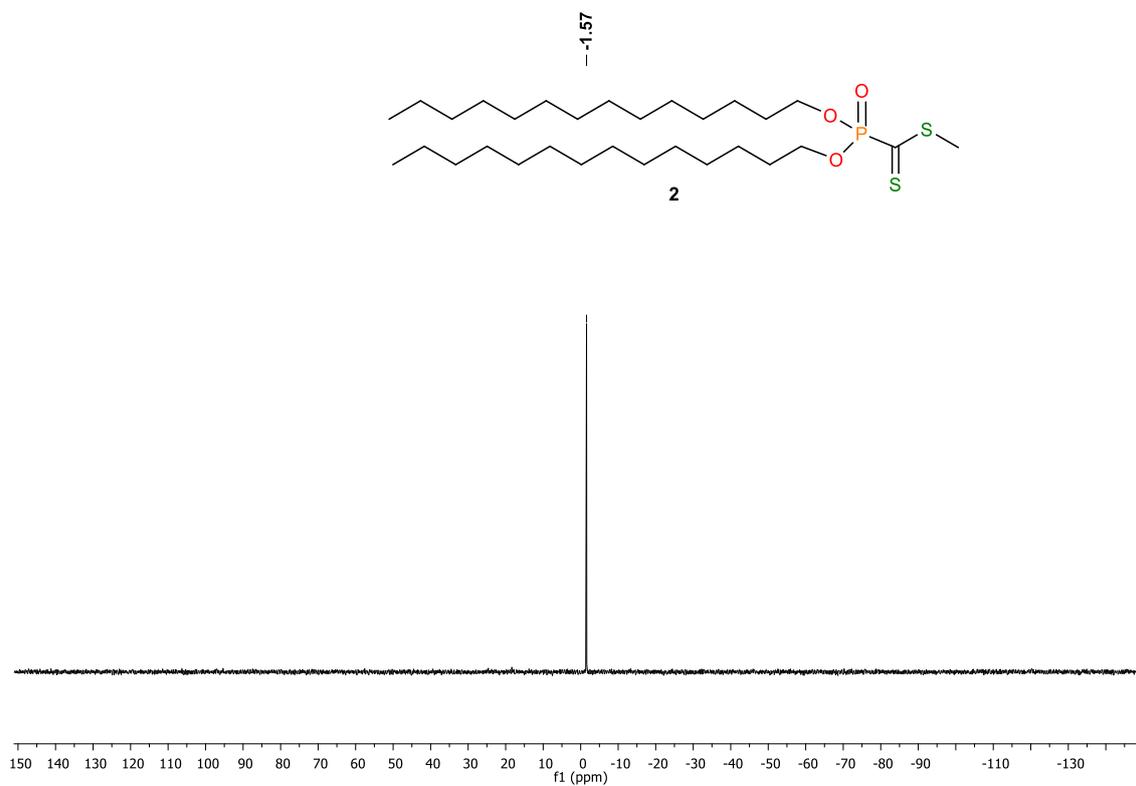


Figure 68. RMN-³¹P{¹H} du phosphonodithioester **2**

Au final, les conditions de réaction adaptées du protocole de Grisley sont résumées sur la Figure 69.

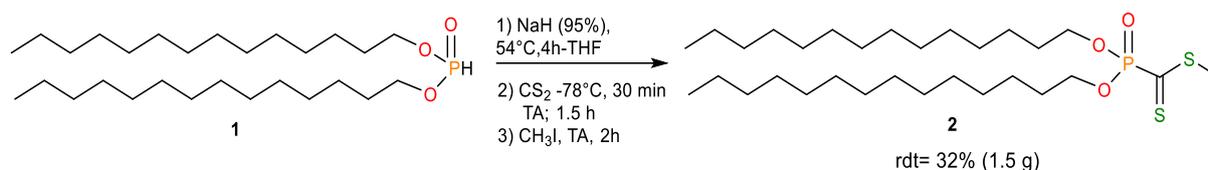


Figure 69. Adaptation de la procédure de Grisley pour la synthèse du phosphonodithioformiate **2**

Le rendement a été amélioré, entre les conditions initiales et les conditions optimisées, de 15% à 32% avec la possibilité d'obtenir la brique lipidique **2** à l'échelle du gramme. Néanmoins, le phosphonodithioester **2** est une molécule neutre et peu polaire, cela exclut sa classification en tant que molécule amphiphile. Par conséquent, son utilisation comme un co-lipide avec d'autres amphiphiles peut empêcher ou perturber la formation de liposomes. Nous avons donc entrepris la synthèse d'un phosphonodithioester cationique. La stratégie retenue était d'introduire la partie cationique au niveau du groupe *S*-méthyle du composé **2**. La synthèse est décrite dans la rubrique suivante.

III.1.1.2 Synthèse du phosphonodithioformiate cationique

La voie de synthèse du phosphonodithioester cationique **4** se déroule en deux étapes (Figure 70). Nous avons choisi d'utiliser comme agent alkylant le dibromoparaxylène car l'utilisation du dibromoéthane présentait le risque d'une seconde *S*-alkylation pouvant conduire à une cyclisation. Une telle cyclisation a été observée par Masson et al. lors de la réaction d'aminolyse avec le 2-bromoéthylamine¹²⁹.

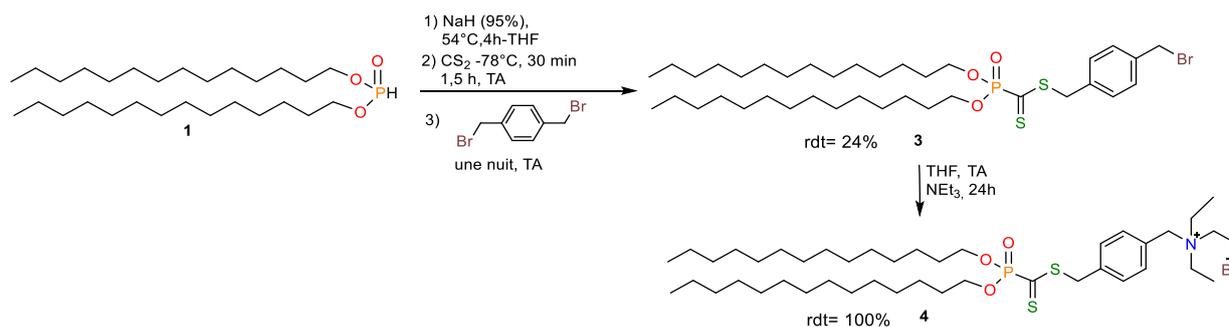


Figure 70. Schéma de synthèse du phosphonodithioester cationique

Le phosphonodithioester **3** est obtenu selon la procédure de Grisley précédemment optimisée pour le phosphite de ditétradécyle. Cette synthèse diffère seulement par la nature de l'agent alkylant qui est de type 1,4-Bis(bromométhyl)benzène utilisé en excès (3eq). Lors de cette synthèse, le temps de réaction avec l'agent alkylant a été allongé (une nuit). À la fin de la réaction, l'excès de l'agent alkylant

est éliminé par précipitation dans l'hexane puis le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice. Le composé **3** est obtenu avec un rendement de 24%.

Lors de la deuxième étape, le phosphonodithioester bromé **3** réagit avec la triéthyle amine dans le THF à température ambiante pendant 24 heures. Le suivi spectroscopique RMN-¹H (Figure 71) permet de montrer la substitution de l'atome du brome au cours du temps, conduisant au sel d'ammonium.

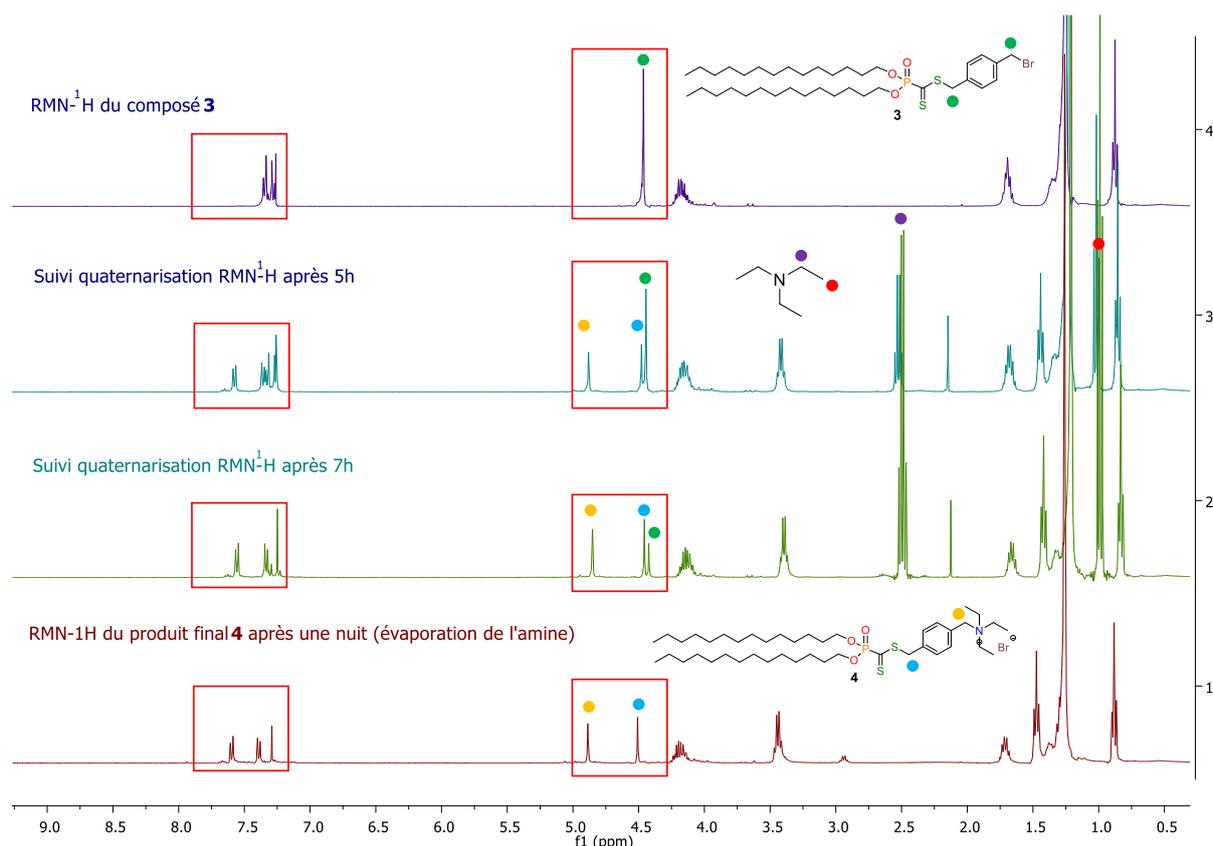


Figure 71. Superposition des spectres RMN-¹H au cours de l'étape de quaternarisation réalisée à température ambiante.

La superposition des spectres RMN-¹H (Figure 71) des deux composés **3** et **4** confirme la synthèse du phosphonodithioester cationique **4**. Pour le composé **3** nous observons une isochronie inattendue pour les deux groupements méthylène portés par le cycle aromatique. La courbe d'intégration (non représentée ici) indique néanmoins que ce signal à 4,5 ppm correspond bien à 4 protons. Lors de la réaction avec la triéthylamine, nous observons la formation de deux signaux à 4,85 ppm correspondant au CH₂ en position alpha de l'ammonium et à 4,51 ppm (très proche du déplacement chimique observé dans le composé **3**) pour le CH₂ lié à l'atome du soufre. Par ailleurs dans le composé **4**, les deux signaux des protons aromatiques sont observés à des déplacements chimiques plus éloignés (7,58 et 7,48 ppm).

Après évaporation du solvant, le composé **4** est obtenu quantitativement après une purification par chromatographie.

Lors de cette synthèse, nous avons réussi à isoler le phosphonodithioester cationique **4** avec un rendement global de 24% (204 mg). Cependant, l'étape limitante est la synthèse du phosphonodithioester intermédiaire **3**.

III.1.2 Synthèse de la sonde fluorescente

Dans le but de pouvoir suivre par spectroscopie UV la réaction d'aminolyse des phosphonodithioformiates dans l'eau, nous avons choisi de préparer une amine primaire, soluble dans l'eau¹³⁶ et absorbant dans l'UV. Pour cela nous avons retenu une sonde fluorescente de type 1,8-naphthalimide, connue d'absorber dans l'UV à 437 nm et d'émettre par fluorescence à 536 nm¹³⁶. Nous avons donc suivi les travaux de Ou et al. pour la synthèse de l'amine **6**¹³⁶. La synthèse du composé **6** a également été rapportée par Hong et al.¹³⁷ (Figure 72).

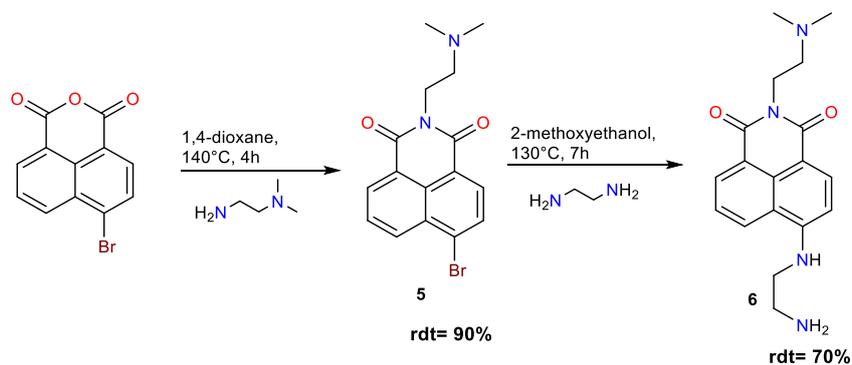


Figure 72. Synthèse de la sonde fluorescente **6** selon Ou et al.¹³⁶

Le 4-bromo-1,8-anhydride naphthalique est un composé commercial qui réagit avec le *N,N*-diméthyléthylènediamine pour conduire au composé **5** avec un rendement de 90%. Lors de la deuxième étape, le composé **6** est obtenu après une substitution nucléophile aromatique du brome présent sur le composé **5** par l'éthylènediamine, avec un rendement de 70% après une purification par chromatographie. La Figure 73 montre les spectres RMN-¹H des composés **5** et **6**. La structure du composé **6** a par ailleurs été caractérisée par RMN-¹³C et par spectrométrie de masse HRMS (ESI-qTOF).

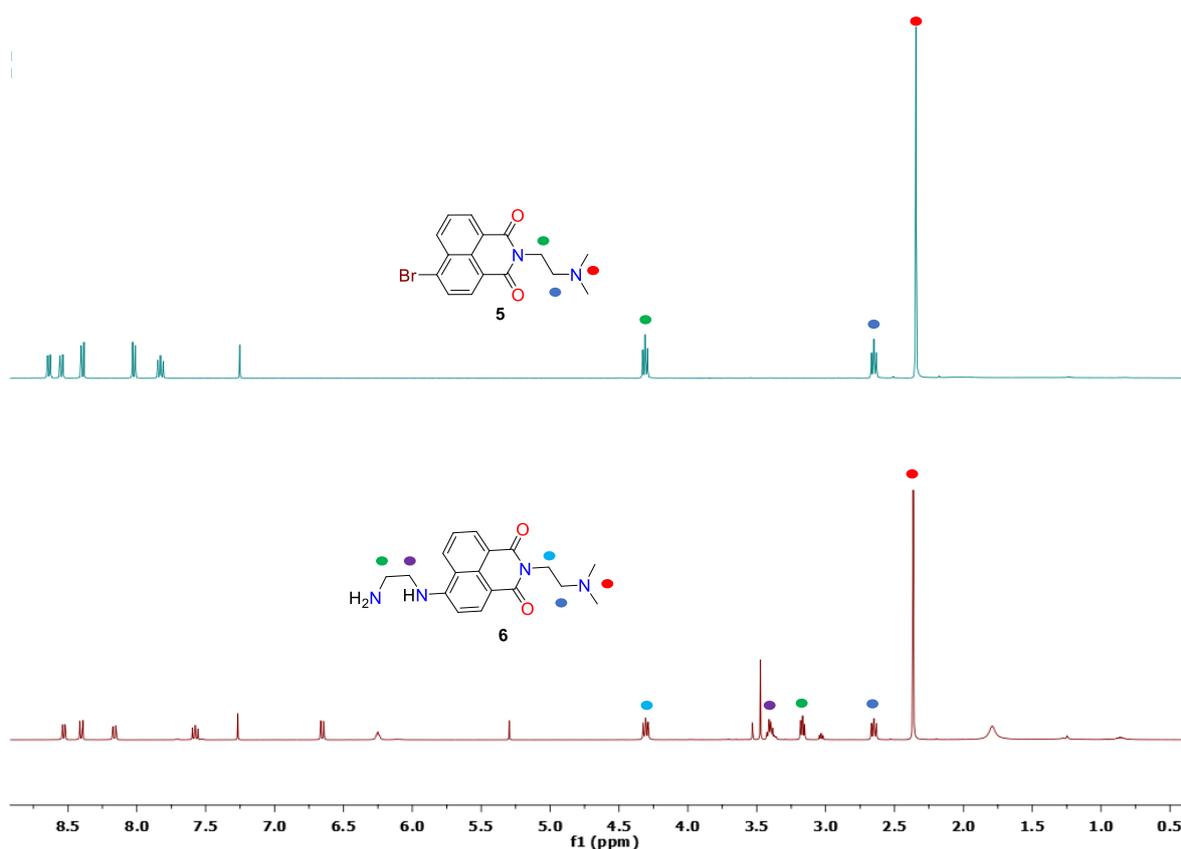


Figure 73. Superposition des spectres RMN-1H des composés 5 et 6

La sonde fluorescente **6** a été obtenue avec un rendement global de 63%.

III.1.3 Synthèse de PEG600-NH₂/N₃

Comme indiqué précédemment, l'un des objectifs de ce chapitre est d'appliquer la réaction d'aminolyse de phosphonodithioformiates présents à la surface des liposomes par des dérivés PEGylés. Certains dérivés PEGylés sont commerciaux comme le PEG5000-NH₂ que nous avons utilisé. Nous nous sommes également intéressés à un composé PEGylé difonctionnel comportant en ω une fonction amine et un azoture (Composé **7**, Figure 74). Un tel composé permet d'une part la réaction avec les phosphonodithioformiate grâce à la fonction amine et pourrait d'autre part permettre une fonctionnalisation en ω grâce à la fonction azoture. Ce composé **7** a été préparé selon une méthode décrite par Chen et al.¹³⁸.

La première étape est une méthylation des deux fonctions alcools du poly(oxyéthylène). Le composé **7a** a été obtenu avec un rendement quantitatif après une étape de lavage.

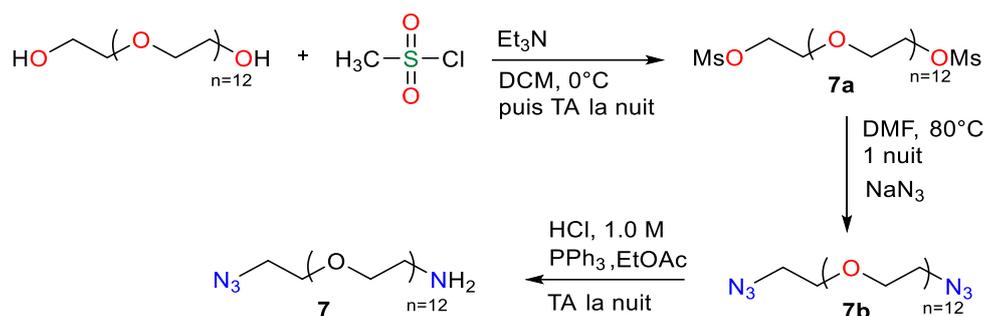


Figure 74. Schéma de synthèse du composé **7**

La seconde étape consiste en une substitution nucléophile avec l'azoture de sodium pour conduire au composé **7b** avec un rendement de 83%. Finalement le composé bifonctionnel **7a** été obtenu après une mono-réduction sélective en milieu biphasique (H₂O : EtOAc ; [1 : 5 (v/v)]) avec la triphénylène phosphine. Cette mono-réduction nécessite un équivalent de triphénylène phosphine, qui aura pour rôle de réagir avec l'azoture selon la réaction de Staudinger^{139,140} pour former un iminophosphorane intermédiaire. Cet intermédiaire est hydrolysé en présence d'eau pour conduire à l'amine primaire soluble dans la phase aqueuse et l'oxyde de triphénylène phosphine.

III.1.4 Synthèse de l'amphiphile cationique BSV36

Le composé BSV36 (Figure 75) est un amphiphile cationique précédemment synthétisé par l'équipe P&V¹³³. Il a été choisi dans cette étude pour la formation de liposomes pour les raisons suivantes : i) l'utilisation d'un composé amphiphile chargé produit des liposomes également chargés qui présentent généralement une meilleure stabilité colloïdale ; ii) Le BSV36 est obtenu avec de bons rendements et selon un schéma de synthèse court (2 étapes à partir du dioléylphosphite ; Figure 75).



Figure 75. Synthèse de lipide cationique BSV36.

La première étape consiste en une réaction d'Atherton-Todd avec le *N,N*-diméthyléthylène diamine pour former un phosphoramidate. Ce dernier est par la suite quaternarisé en présence d'un excès d'iodométhane. Cette synthèse a permis d'obtenir le composé BSV36 avec une masse de 8g (rendement global : 73 %).

III.2 Mise au point de la réaction d'aminolyse de phosphonodithioformiates lipidiques.

Cette partie est dédiée à la mise au point de la réaction click d'aminolyse, Phosphonodithioester-Amine Coupling (PAC), des phosphonodithioformiates inclus dans un liposome. Pour cette mise au point nous avons travaillé avec l'amine fluorescente **6** (Figure 76) qui permet de suivre son immobilisation à la surface de liposome par spectroscopie UV-visible. La caractérisation spectroscopique du composé **6** est présentée dans le paragraphe III.2.1. Ensuite, (paragraphe III.2.2) nous décrivons les réactions (en solvant organique) entre le phosphonodithioformiate **2** et l'amine **6** ou le PEG₆₀₀ **7** (Figure 76) afin de pouvoir caractériser les thioamides formés. La section suivante (III.2.3) est alors dédiée à la réaction de couplage entre les phosphonodithioformiates placés dans un liposome et l'amine **6**.

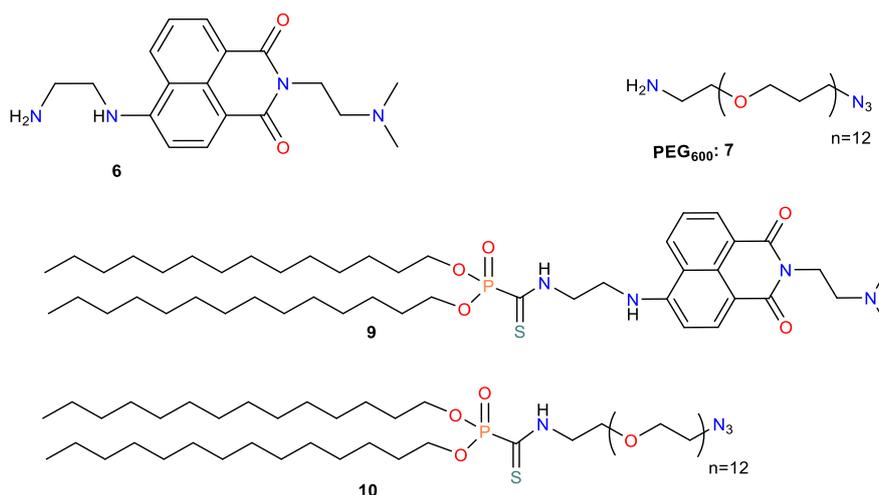


Figure 76. Structure des composés **6**, **7**, **9** et **10**.

III.2.1 Caractéristiques spectroscopiques du composé **6**.

Le spectre d'absorption du composé **6** réalisé dans l'eau à une concentration de 0,75 mM, fait apparaître un maximum d'absorption à 430 nm ($\lambda_{\max} = 430$ nm ; courbe noire Figure 77). L'excitation à 430 nm se traduit par une émission de fluorescence dans le vert avec un maximum d'émission à 540 nm ($\lambda_{\text{em}} = 540$ nm ; courbe rouge Figure 77). Le déplacement de Stokes est suffisamment important pour éviter le phénomène d'auto-inhibition de fluorescence.

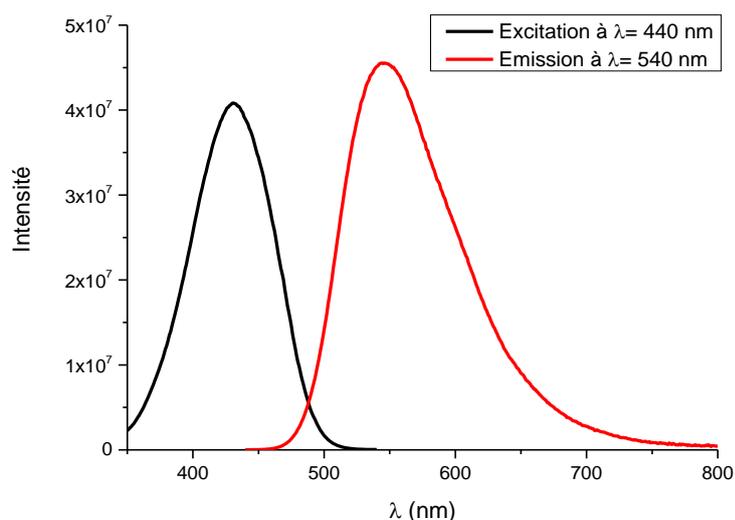


Figure 77. Courbe d'excitation-émission de la sonde fluorescente **6** dans l'eau

Les propriétés d'absorption dans l'UV visible du composé **6** doit permettre de le quantifier afin de déterminer la quantité du composé qui n'a pas réagi avec les liposomes lors de la réaction et donc de déterminer implicitement la quantité ayant réagi. Pour cela il est nécessaire de réaliser une courbe de calibration dans les gammes de concentrations d'intérêt (5 μM et 15 μM). La courbe de calibration est représentée dans la Figure 78. La valeur de la pente donne une valeur approximative du coefficient d'extinction molaire qui est de $11834 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

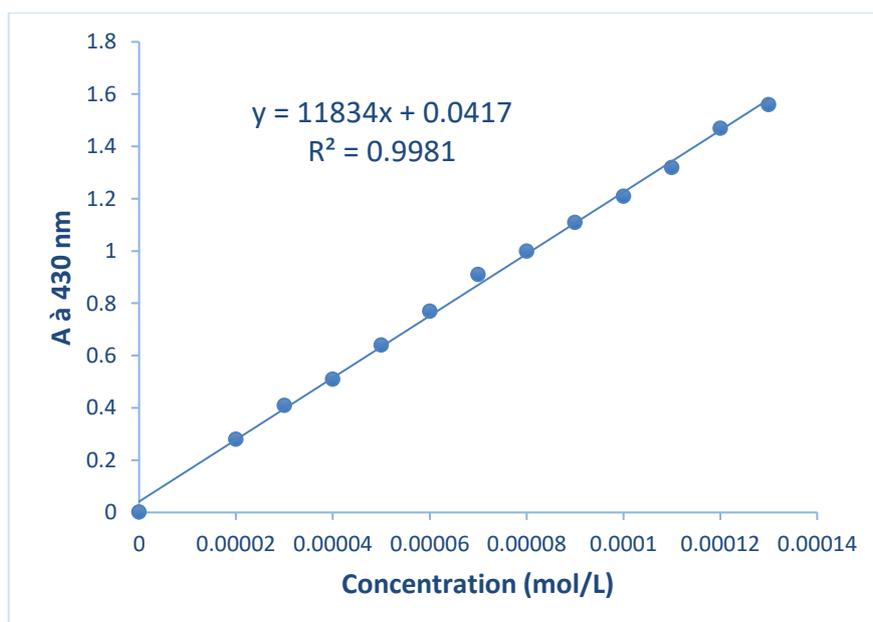


Figure 78. Courbe de calibration de la sonde fluorescente **6**

III.2.2 Synthèse et caractérisations des thioamides **8** et **9** et **10**

Avant d'entreprendre la réaction PAC en milieu aqueux, la réaction a tout d'abord été réalisée avec la benzylamine (comme réaction test), en léger excès, sur le phosphonodithioester neutre dans le THF.

(Figure 79)

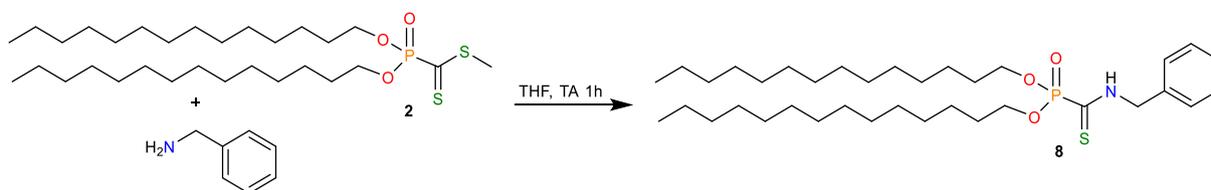


Figure 79. Schéma de la réaction de couplage du composé **2** avec de la benzylamine

La réaction a été conduite à température ambiante. La couleur de la solution initialement violette vire instantanément au jaune. À la fin de la réaction, le milieu réactionnel est évaporé. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice. Le composé de couplage **8** est obtenu avec un rendement de 90%. Les spectres RMN-¹H et RMN-³¹P confirment la structure du phosphonothioamide souhaité. En effet, on note la disparition du signal du S-méthyle vers 2,71 ppm, caractéristique du phosphonodithioester, ainsi qu'un léger déblindage du signal du phosphore qui est passé de -1,57 à -0,92 ppm (Figure 80).

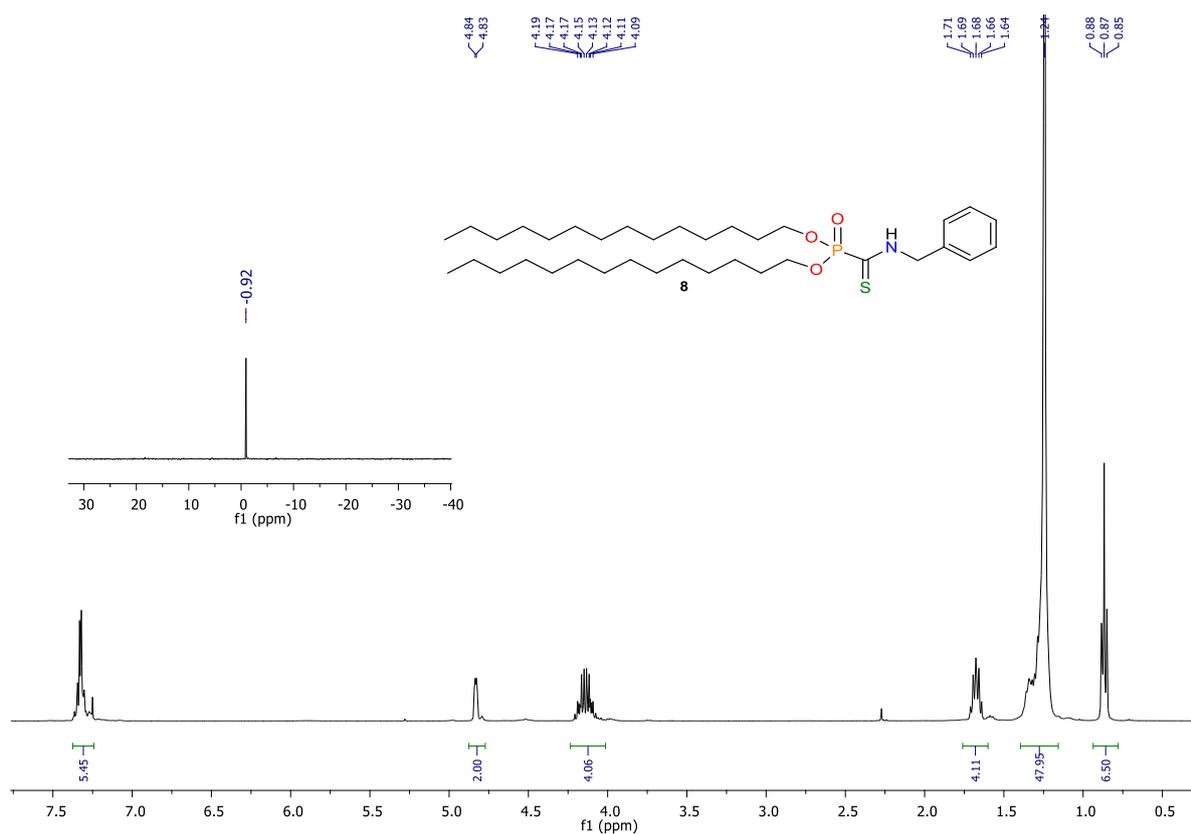


Figure 80. Spectres RMN- ^1H et RMN- $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ du phosphonothioamide **8**

Dans un second temps, nous avons réalisé la réaction PAC avec les précurseurs aminés précédemment synthétisés (amine fluorescente **6**, PEG-amine **7**) afin de caractériser les produits de la réaction.

Pour ce faire, la réaction des deux précurseurs a été conduite dans le THF pendant une heure à température ambiante. Les deux amines ont été utilisées légèrement en excès (1,1 équivalents) par rapport au phosphonodithioester (Figure 81).



Figure 81. Synthèse de phosphonothioamides par réaction PAC : A) réaction avec l'amine fluorescente **6** B) réaction avec le PEG-amine **7**.

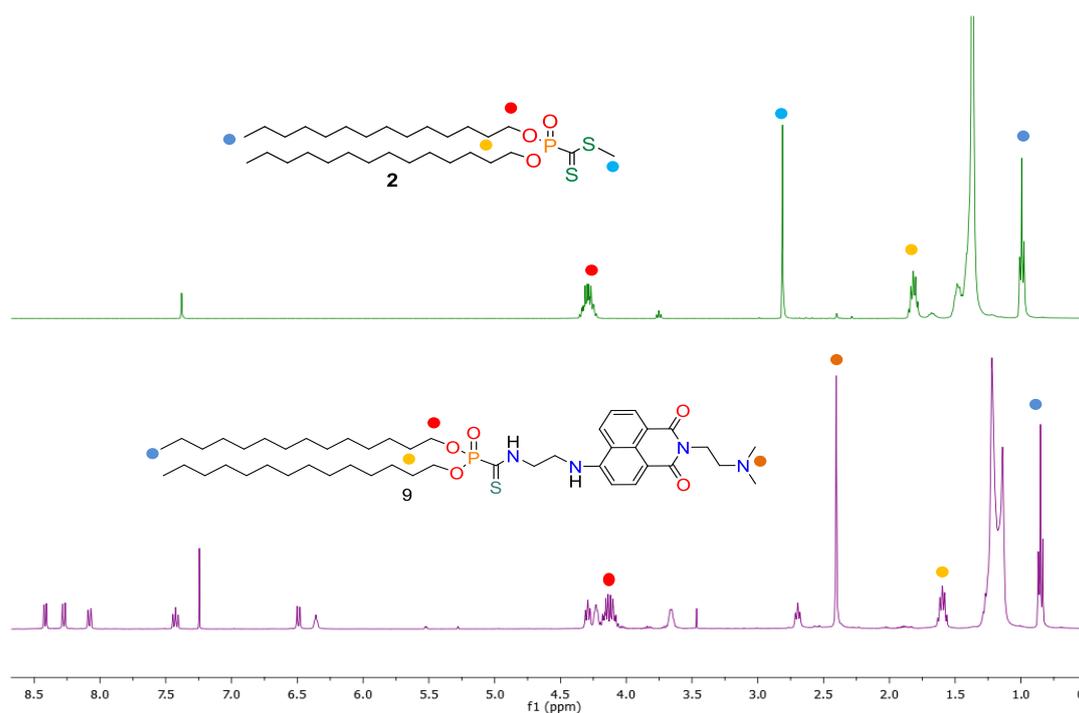
Une chromatographie sur gel de silice a permis d'obtenir les composés désirés avec de bons rendements (Tableau 5). Les spectres de masse haute résolution sont cohérents entre les valeurs théoriques et les

valeurs expérimentales. À noter que pour le composé **10**, possédant une structure polymérique au niveau du motif polyéthylène glycol, seul l'un des pics ($n=12$) est indiqué dans le Tableau 5.

Composé	Rendement	Masse théorique	m/z (HRMS-ESI-TOF)
9	74%	$[C_{47}H_{79}N_4O_5PS+H] = 843.5587$	$[M+H]^+ = 843,5588$
10	74%	$[C_{55}H_{111}N_4O_{15}PS+K] = 1169.7141$	$[M+K]^+ = 1169,7159$

Tableau 5. Rendements et masses exactes des composés **9** et **10**.

La caractérisation des deux composés a été réalisée, par RMN- 1H , ^{31}P et ^{13}C . Pour le composé **9**, la RMN 1H montre la disparition du méthyle de la fonction dithioester. En RMN du ^{13}C , le motif C=S du phosphonodithioester de départ, observé à 229,63 ppm sous forme d'un doublet ($^1J_{CP} = 176,6$ Hz), possède un déplacement chimique à 197,05 ppm pour le thioamide ($^1J_{CP} = 180,8$ Hz). Concernant le composé **10**, les attributions en RMN- 1H sont indiquées dans la Figure 82. En RMN- ^{13}C le C=S du composé **10** est observé à 193.3 ppm sous forme d'un doublet avec une constante de couplage ($^1J_{CP} = 181,3$ Hz).



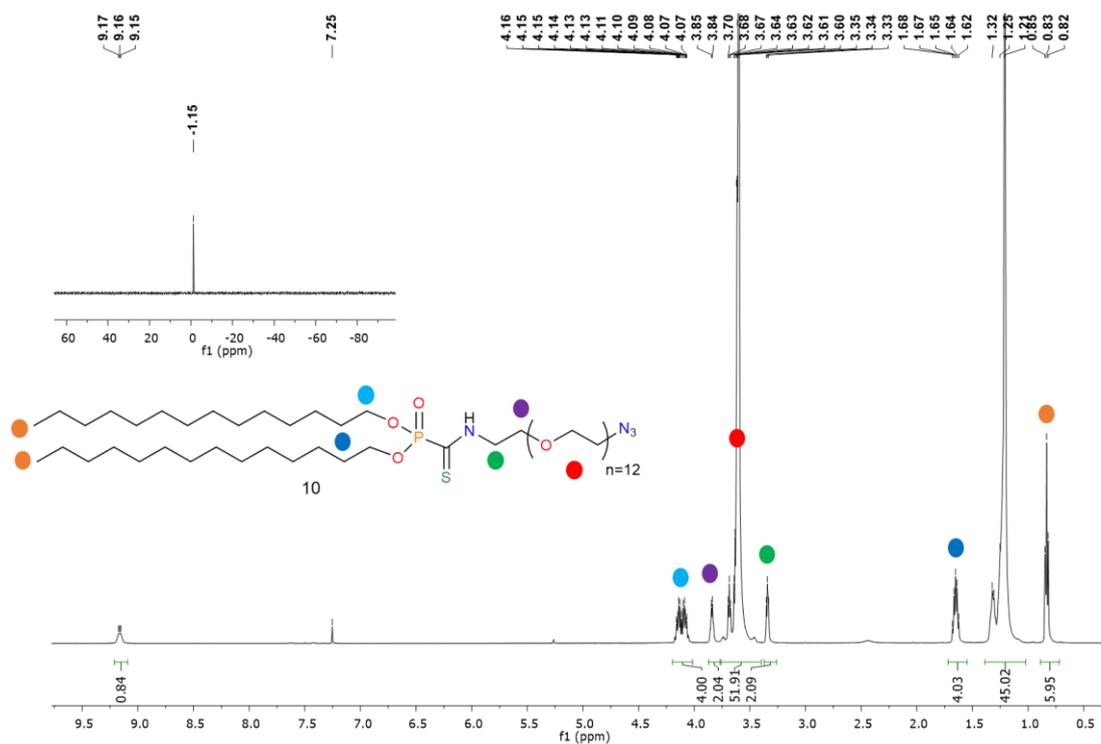


Figure 83. Spectre RMN- ^1H du composé **10**

La caractérisation du composé **9** par UV-Visible montre la présence d'une bande d'absorbance à 443 nm (Figure 84).

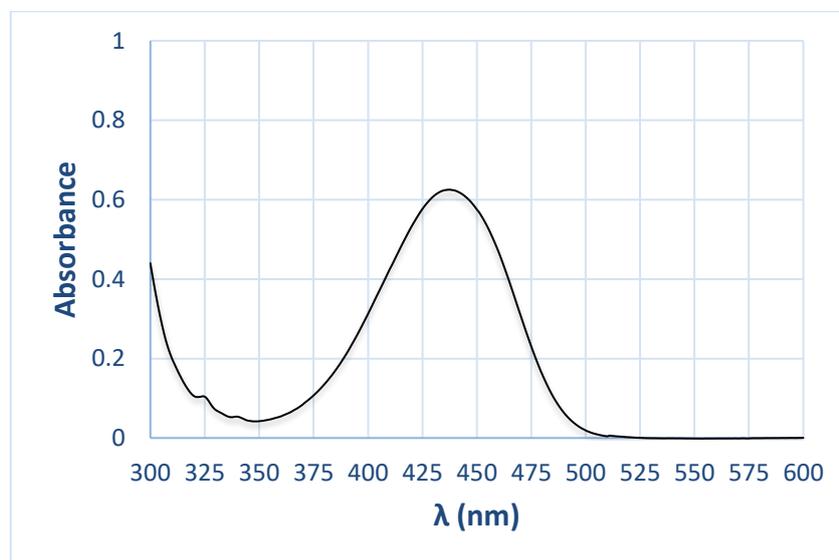


Figure 84. Courbe d'absorbance du phosphonothioamide fluorescent **9** dans le CHCl_3 à $7,5 \times 10^{-5}$ M

III.2.3 Étude de la réaction entre des liposomes contenant le motif phosphonodithioformiate et l'amine fluorescente 6

Cette partie s'intéresse à la mise au point de la réaction click (PAC) à la surface d'un liposome composé du lipide cationique BSV36 et d'un phosphonodithioformiate (**2** ou **4**). Dans un premier temps nous décrirons la préparation et la caractérisation des solutions liposomales. Nous aborderons ensuite la méthode mise en place pour purifier les liposomes (rubrique III.2.3.2) puis nous étudierons par spectroscopie UV cette réaction (rubrique III.2.3.3). Ensuite nous verrons successivement la caractérisation par spectrométrie de masse des liposomes modifiés (rubrique III.2.3.4), la stabilité des solutions liposomales (rubrique III.2.3.5), l'efficacité du greffage basé sur la conversion du phosphonodithioformiate intégré dans le liposome (rubrique III.2.3.6), l'étude par spectroscopie de fluorescence de la modification du feuillet externe des liposomes (rubrique III.2.3.7) puis nous étudierons la cinétique de cette réaction (rubrique III.2.3.7).

III.2.3.1 Préparation des solutions liposomales

Dans cette étude, les liposomes sont formés à partir de la méthode de Bangham. Une hydratation d'un film lipidique à 4°C pendant une nuit ainsi qu'un traitement mécanique aux ultrasons pendant 30 minutes permet d'obtenir les liposomes souhaités. Les liposomes obtenus ont été caractérisés par DLS afin de déterminer leur taille et leur potentiel zêta des liposomes formés.

Dans un premier temps, nous avons choisi de préparer les liposomes à partir d'un lipide cationique (BSV36) développé par notre équipe. Le choix de ce lipide est dû à sa facilité d'accès qui permet sa synthèse à l'échelle de plusieurs grammes.

Trois solutions liposomales ont été préparées et sont identifiées sous les noms (LF1, LF2 et LF4) comme indiqué dans le Tableau 6.

Les formulations liposomales (LF) La composition des formulations ; Volume 2 mL

LF1	BSV36 (25 mM)
LF2	BSV36 (25 mM), 2 (2,5 mM)
LF4	BSV36 (25 mM), 4 (2,5 mM)

Tableau 6. La composition des solutions liposomales préparées

LF1 est une formulation préparée exclusivement à partir du BSV36. Il s'agit donc d'une solution liposomale « non-clickable » qui servira de référence.

LF2 est une formulation incluant le BSV36 et le phosphonodithioester **2** dans un ratio molaire de (10 :1)

LF4 est une formulation à base de BSV36 et incluant le phosphonodithioester cationique **4** dans un ratio molaire (10 :1)

La taille et les potentiels zêta de ces solutions liposomales ont été déterminés (Tableau 7). Cette étude a montré que les tailles varient entre 130 nm et 170 nm. Le potentiel zêta de ces formulations est logiquement positif car ces solutions sont préparées à partir du BSV36 qui est un amphiphile cationique. La variation de la charge de surface n'est pas facilement explicable. En effet, la formulation LF2, qui inclue un amphiphile neutre, aurait pu faire apparaître une charge positive moins marquée que pour LF4. Nous retiendrons donc le caractère positif de ces trois formulations sans expliquer les différences du potentiel zêta entre elles.

	Taille (nm)	PDI	Zeta (mV)
LF1	168±9	0,24	+58±0,1
LF2	150±25	0,41	+57±0,7
LF4	127±2	0,22	+60±0,5

Tableau 7. Caractérisation des liposomes formés par DLS

Afin d'évaluer la morphologie des vésicules formées et de montrer l'existence de liposomes une étude par Cryo-microscopie électronique à transmission (Cryo-MET) a été réalisée (Figure 85).

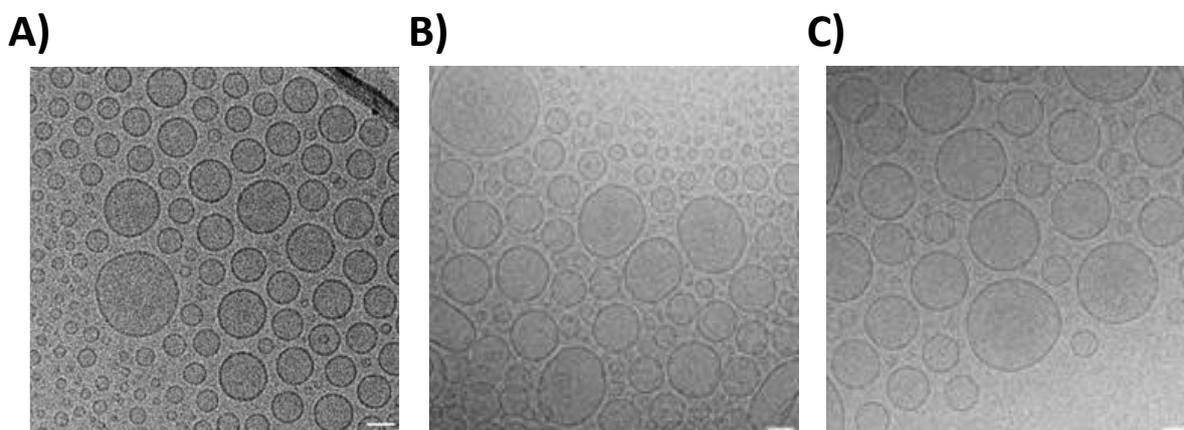


Figure 85. Analyse Cryo-microscopie électronique avant réaction de A) LF1 (BSV36 seul) B) LF2 (BSV36/2 10 :1 ratio molaire) C) LF4 (BSV36/4 ratio molaire). Échelle 50 nm.

L'incorporation du composé **2** ou **4** n'altère pas la morphologie des liposomes et permet d'obtenir des vésicules plus au moins uniformes. Les tailles obtenues par Cryo-MET sont plus dispersées que celles obtenues par DLS. Pour la formulation de référence composée exclusivement de BSV36 (Figure 85-A) la taille est comprise entre 20 nm et 150 nm. Pour les formulations incluant en plus les composés **2** ou **4** nous observons des tailles et morphologie assez comparables (Figure 85-B et C).

III.2.3.2 Purification des liposomes par dialyse

La dialyse est une technique de purification qui a pour but d'éliminer des molécules de faible masse molaire. Son principe consiste à transvaser la solution à purifier dans un boudin de dialyse. Par la suite, le sac de dialyse est plongé dans un bécher qui contient un grand volume de solution aqueuse, généralement égal à 100 fois le volume contenu dans le boudin de dialyse (indication du constructeur). Pour la purification de nos solutions liposomales nous avons utilisé un sac de dialyse ayant des tailles de pores comprises entre 6 et 8 KD. Dans notre cas la sonde fluorescente non immobilisée à la surface du liposome pourra diffuser au travers du sac de dialyse tandis que les liposomes seront séquestrés à l'intérieur du sac.

Pour valider cette méthode de purification nous avons mélangé 3 équivalents de sonde fluorescente **6** avec le liposome formé exclusivement par le BSV36, (Formulation LF1). Par la suite, nous avons dialysé le mélange en maintenant un changement de dialysat toutes les deux heures. Au bout de 6 heures toute la quantité de sonde engagée a été relarguée et le 4^{ème} dialysat donne une valeur nulle en absorbance (Figure 86-A).

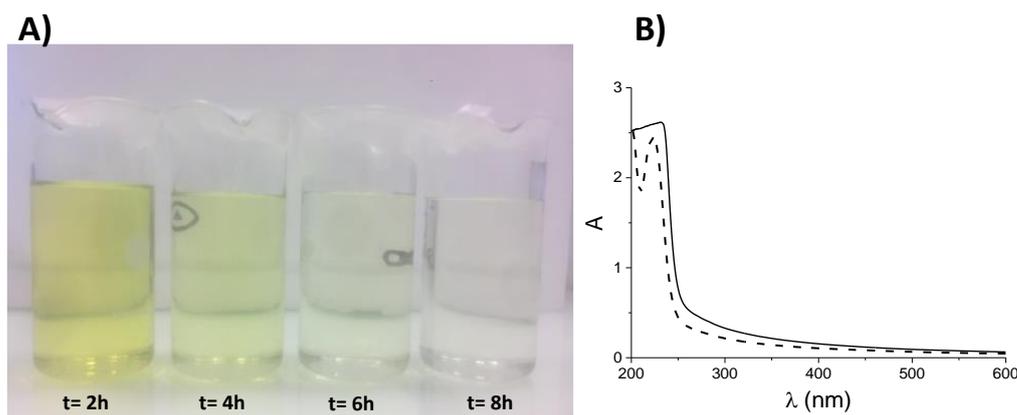


Figure 86. A) différents dialysats obtenus toutes les deux heures. B) Spectres UV-vis des solutions liposomales (ligne solide-LF1) et LF1 mélangée avec la sonde fluorescente **6** suivie d'une purification par dialyse (ligne hachée).

L'analyse UV-visible du contenu du sac (LF1+6) après dialyse en le comparant au spectre d'absorbance du LF1 (solution liposomale de BSV36) ne montre aucune trace de la sonde fluorescente ce qui confirme l'efficacité de la dialyse en 6 heures (Figure 86-B). Pour la suite de l'étude, nous avons retenu qu'un seul changement de dialysat après trois heures.

III.2.3.3 Étude de l'immobilisation de l'amine **6** sur les liposomes par UV-visible

Notre objectif est de fonctionnaliser la surface des liposomes préformés (fonctionnalisation dans l'eau) en utilisant la sonde fluorescente **6** comme modèle. Afin de comparer cette stratégie de post-fonctionnalisation de liposomes, nous avons aussi préparé des liposomes fonctionnalisés par le thioamide **9** mais selon la méthode de Bangham, par pré-fonctionnalisation. Ces deux approches sont schématisées dans la Figure 87.

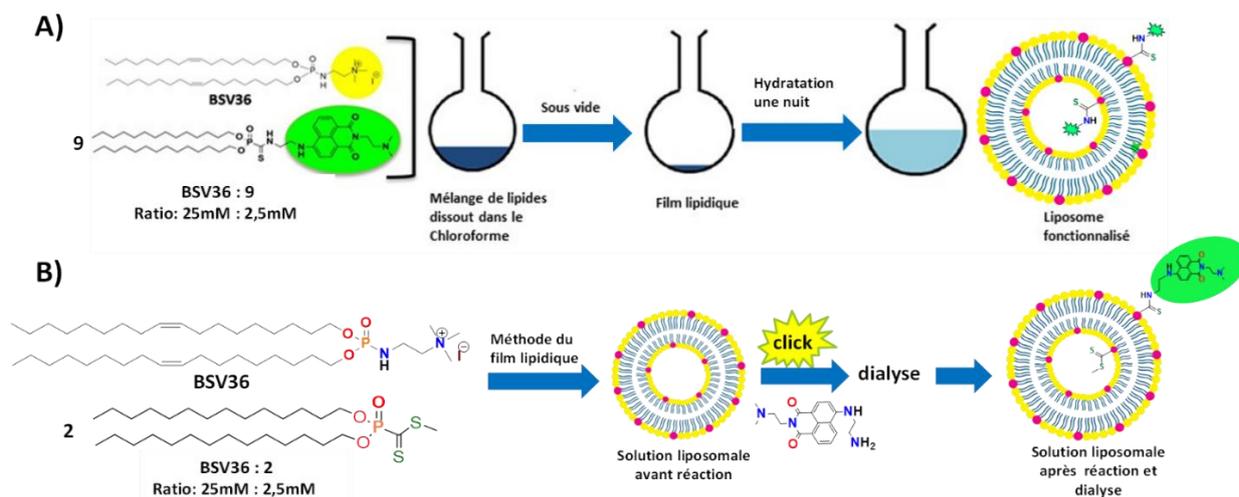


Figure 87. Stratégies de fonctionnalisation. A) pré-fonctionnalisation B) post-fonctionnalisation

La méthode de pré-fonctionnalisation (Figure 87-A) consiste à préparer un film lipidique à partir de BSV36 à une concentration de 25 mM avec 10% en phosphonothioamide **9**, nous allons appeler cette formulation LF**9** dans la suite de l'étude. A l'issue d'une étape d'hydratation pendant une nuit suivie d'une période de sonication pendant 30 minutes, cette solution a été analysée par spectroscopie UV-Visible. Une bande d'absorption à $\lambda = 443$ nm (Figure 88-A) a été observée. Ce résultat doit être comparé au spectre UV-visible du composé BSV36 seul (Figure 88-B) sur lequel aucune absorption n'apparaît à 443 nm. Nous pouvons donc conclure que la bande d'absorption à 443 nm de la formulation LF**9** est due à la présence du composé **9** dans la formulation et donc à la sonde fluorescente naphthalimide immobilisée *via* un lien thioamide.

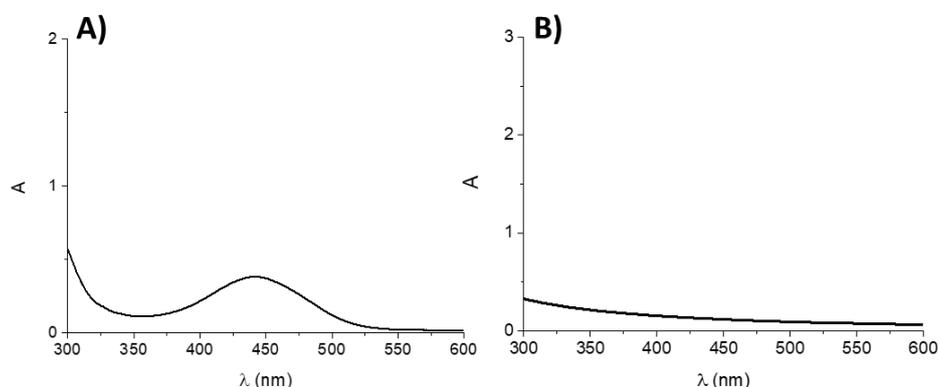


Figure 88. A) spectre de la solution LF**9** après sonication 5×10^{-4} M B) spectre de LF**1** (BSV36 seul)

La méthode de post-fonctionnalisation consiste à ajouter à une solution liposomale (LF**2** ou LF**4**) trois équivalents de la sonde fluorescente **6** dissoute au préalable dans l'eau. Le mélange est agité pendant

4 heures à température ambiante, puis transvasé dans un sac de dialyse dans le but d'éliminer l'excès de la sonde n'ayant pas réagi. Au bout de deux dialyses, le contenu du sac montre en UV-Visible une bande d'absorption à $\lambda = 443$ nm (Figure 89-Spectres A et B – ligne solide) qui correspond à la formation du produit de couplage souhaité **9**. Dans le même temps nous avons remarqué la disparition de la forte absorbance à $\lambda = 330$ nm causée par une transition permise $\pi - \pi^*$ du phosphonodithioformiate (Figure 89-Spectres A et B - ligne hachée). A noter que le phosphonodithioformiate présente une deuxième bande d'absorbance visible causée par la transition $n - \pi^*$ à $\lambda = 520$ nm provenant de la couleur rose du composé. Cette deuxième bande n'est pas observée aux concentrations utilisées.

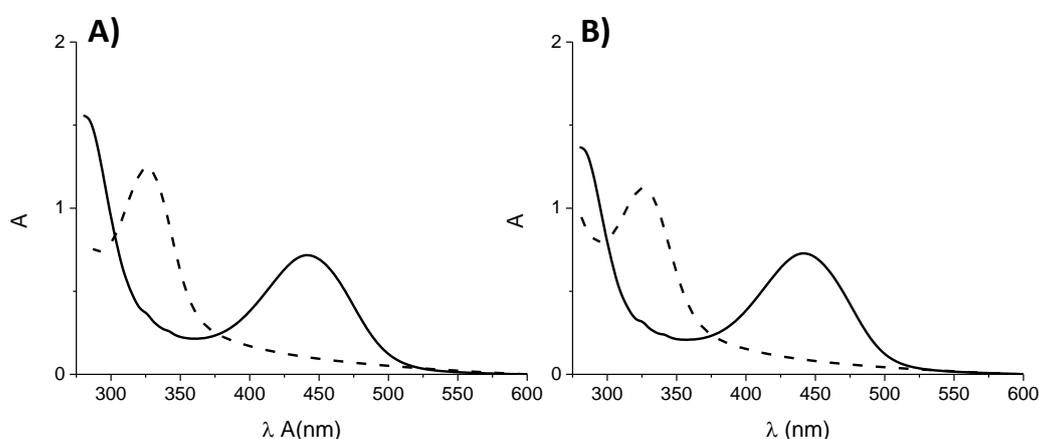


Figure 89. A) LF2 (ligne hachée) 1.25×10^{-4} M en composé **2**, LF2 après réaction avec **6** et dialyse (ligne continue) 1.25×10^{-3} M en BSV36, B) LF4 (ligne hachée) 1.25×10^{-4} M en composé **2**, LF4 après réaction avec **6** et dialyse (ligne continue) 1.25×10^{-3} M en BSV36.

Au vu des résultats obtenus par les deux stratégies, la pré-fonctionnalisation et la post-fonctionnalisation, nous pouvons conclure que lors de la post-fonctionnalisation la signature à $\lambda = 443$ nm provient du greffage de la sonde fluorescente **6** par un lien covalent. Afin de confirmer la nature de ce greffage covalent, une étude par spectrométrie de masse fera l'objet de la rubrique suivante.

III.2.3.4 Étude de l'immobilisation du composé **6** par ESI-MS

La caractérisation d'échantillons par spectrométrie de masse permet la mesure du ratio masse sur charge (m/z) des ions présents dans une solution. Pour cette étude nous avons collaboré en interne du laboratoire avec l'équipe CIEL (Dr. A. Memboeuf) afin de caractériser les solutions liposomales par ESI-MS. Dans notre étude, certains composés qui sont cationiques (BSV36, phosphonodithioformiate **4**)

devraient être facilement détectés par ESI-MS alors que d'autres composés comme le phosphonodithioformate **2** et le phosphonothioamide **9** qui sont neutres nécessitent une ionisation lors de l'analyse et peuvent donc être plus difficile à détecter.

Les solutions liposomales (LF**2** et LF**4**), avant et après réaction click avec la sonde fluorescente **6**, ont été diluées dans l'eau jusqu'à une concentration de 1×10^{-5} M en composé BSV36 puis introduites par injection directe dans le spectromètre de masse. Le spectre ESI-MS de la solution liposomale LF**2** présentée sur la Figure 90-A a mis en évidence la présence du pic du BSV36 (m/z 683.55) tandis que le phosphonodithioformiate **2** dont la forme protonée est attendue à m/z 565 n'est pas observé. L'absence du signal à m/z 565 peut s'expliquer par plusieurs facteurs : i)- le composé **2** doit être protoné pour être observé. Cette protonation se fait probablement difficilement dans les conditions de cette expérience. ii)- le composé BSV36 est cationique (il ne nécessite donc pas d'une étape de protonation pour être détecté) et est présent en plus grande quantité (il existe un facteur 10 entre la concentration de BSV36 et le composé **2**).

Après la réaction de cette solution liposomale **2** avec l'amine fluorescente **6**, le spectre ESI-MS (Figure 90-B) montre en plus du signal du BSV36 (m/z 683.55) la formation du phosphonothioamide **9** sous sa forme protonée à m/z 843.50 (Figure 90-B). Ce signal résulte de la réaction de couplage entre le phosphonodithioformiate **2** et le composé fluorescent **6**. Le produit de couplage **9**, qui atteste la formation d'un lien covalent, est détecté facilement car la sonde fluorescente possède une fonction amine qui est facilement protonée.

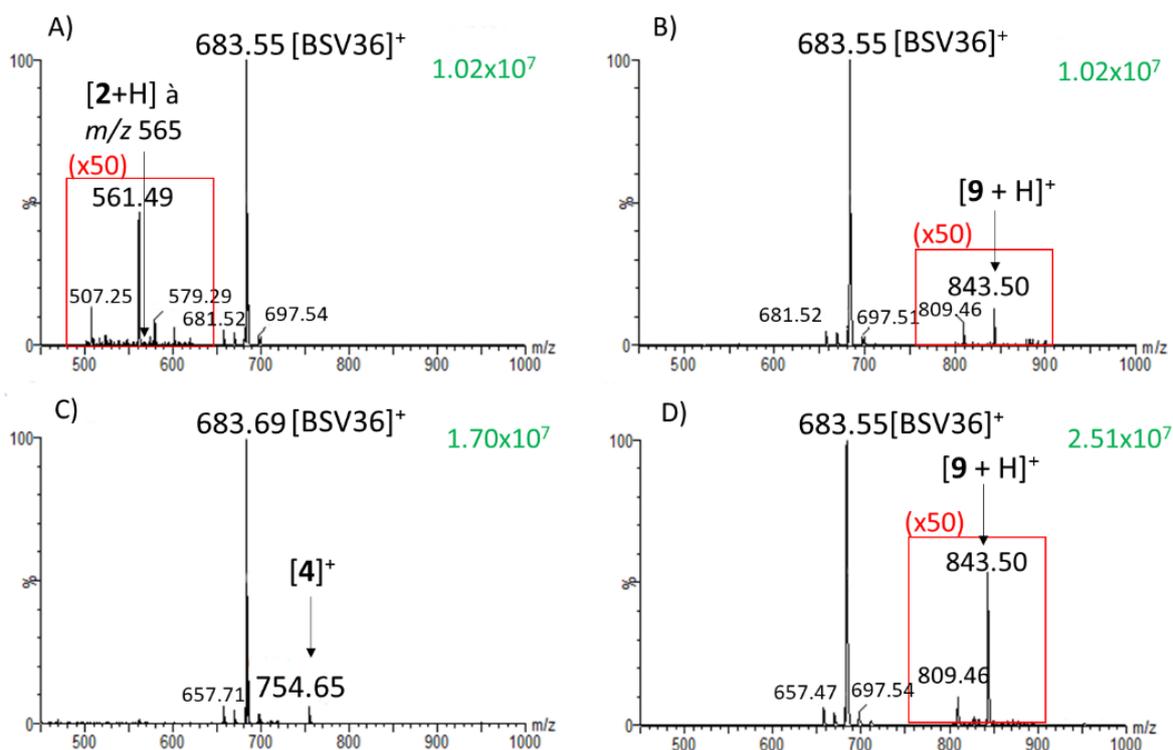


Figure 90. ESI-MS de : LF2 (A), LF2 après la réaction PAC avec **6** (B) et LF4 (C), LF4 après la réaction PAC avec **6** (D). Pour les spectres (B) et (D) une étape de purification par dialyse a été effectuée avant injection. Le cadre rouge représente un zoom fois 50.

Pour la formulation LF4 qui inclut deux composés cationiques (BSV36 et le phosphonodithioformiate **4**), nous observons, avant réaction de couplage, les deux composés (BSV36 m/z 683.69 et le composé **4** m/z 754.65 ; Figure 90-C). L'intensité des deux composés est assez-proche de leur ratio molaire dans la formulation LF4 (ratio BSV36/composé **4** : 10/1). Après la réaction PAC (Figure 90-D), nous observons la disparition du signal du composé **4** ainsi que l'apparition du signal à m/z 843.50 attestant la formation du composé de couplage **9** protoné.

Ces résultats montrent que la réaction de l'amine fluorescente **6** sur les solutions liposomales **2** ou **4** conduit à la formation du phosphonothioamide **9** et atteste de la formation d'un lien covalent.

III.2.3.5 Caractérisation des solutions liposomales par DLS et Cryo-MET après fonctionnalisation

Les solutions liposomales LF2 et LF4 après la réaction PAC avec l'amine fluorescente **6** ont été analysées par DLS (Tableau 8) et par Cryo-MET (Figure 91).

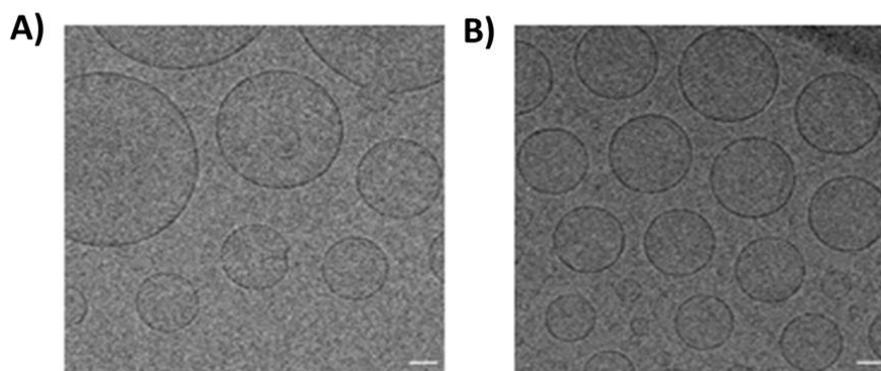


Figure 91. Solutions liposomales après réaction click avec la sonde fluorescente **6** ; A) LF2 après réaction B) LF4 après réaction

	Mesures DLS avant réaction PAC		Mesures DLS après réaction PAC	
	Taille (nm)	Potential zeta (mV)	Taille (nm)	Potential zeta (mV)
LF2	150±25	+57±0,7	263±16	+61±0,4
LF4	127±2	+60±0,5	193±25	+79±4

Tableau 8. Mesures DLS des formulations LF2 et LF4 avant et après la réaction PAC

Les analyses par DLS montrent une légère modification, non-significative, des tailles de liposomes après couplage par rapport à celles mesurées avant la réaction. Les images obtenues par Cryo-MET ont montré, également, la présence de vésicules avec des formes régulières allant de 50 à 200 nm après la réaction PAC. A la vue de ces résultats, nous pouvons conclure que les conditions de la réaction PAC n'ont pas de conséquences majeures sur la structuration en liposomes.

III.2.3.6 Efficacité de la post-fonctionnalisation

La détermination de l'efficacité de la réaction PAC pour post-fonctionnaliser la surface des liposomes peut se faire en déterminant le taux de conversion des fonctions phosphonodithioesters présentes dans les liposomes. Pour cela nous avons utilisé une méthode indirecte qui consiste à quantifier la proportion d'amine fluorescente récupérée par dialyse, en faisant l'hypothèse que la partie non-récupérée a été immobilisée au sein des liposomes par lien covalent comme montré précédemment.

Après la réaction PAC, les liposomes sont dialysés 2 fois. L'ensemble des dialysats, qui inclut l'amine fluorescente **6**, sont analysés par UV-visible afin de déterminer le nombre de mole de la sonde fluorescente **6** récupérée, qui sera noté : n(**6** dialysé). Pour cela nous avons utilisé la courbe de calibration de la sonde fluorescente **6** dans l'eau présentée au début de ce chapitre (Figure 78). Le

nombre de mole de l'amine fluorescente ayant réagit avec les liposomes est noté $n(\text{réagit } \mathbf{6})$ et est obtenu à partir de l'équation (1).

$$n(\text{réagit } \mathbf{6}) = n(\text{total } \mathbf{6}) - n(\text{dialysé } \mathbf{6}) \quad (1)$$

$n(\text{réagit } \mathbf{6})$: nombre de mole du composé $\mathbf{6}$ immobilisé sur les liposomes.

$n(\text{total } \mathbf{6})$: nombre de mole total du composé $\mathbf{6}$ engagé dans la réaction PAC.

$n(\mathbf{6}$ dialysé) : nombre de mole du composé $\mathbf{6}$ récupéré pendant l'étape de dialyse.

Le taux de conversion des phosphonodithioesters $\mathbf{2}$ ou $\mathbf{4}$ est déterminé en utilisant l'équation (2).

$$\%(\text{conversion}) = \frac{n(\text{réagit } \mathbf{6})}{n(\text{phosphonodithioester})} * 100 \quad (2)$$

Les expériences destinées à la quantification du taux de conversion des fonctions phosphonodithioformiates présentes dans les solutions liposomales LF $\mathbf{2}$ et LF $\mathbf{4}$ ont été effectuées en triplicat. Les résultats obtenus pour les formulations liposomales LF $\mathbf{2}$ (liposomes incluant le phosphodithioester neutre $\mathbf{2}$), ont montré un taux de conversion proche à $100\% \pm 8\%$. Cependant, pour les formulations de type LF $\mathbf{4}$ (liposomes incluant le phosphonodithioformiate $\mathbf{4}$ cationique), le taux de conversion des fonctions dithioesters est de $66\% \pm 6\%$. Cet écart dans le pourcentage de fonctionnalisation entre les formulations, peut être attribuée à la façon dont les composés $\mathbf{2}$ et $\mathbf{4}$ se localisent dans la bicouche des liposomes. Le composé $\mathbf{2}$ est neutre et peu polaire, donc il aura tendance à se loger dans l'espace situé entre les deux feuillets, ce qui lui offre la possibilité de réagir avec la sonde fluorescente $\mathbf{6}$ à la surface du liposome conduisant à une conversion complète. Cependant, le composé $\mathbf{4}$ est un amphiphile cationique ce qui devrait lui conférer la possibilité de se positionner dans les deux feuillets de la bicouche des liposomes avec une répartition approximative de 50 : 50. Puisque la réaction entre l'amine fluorescente et le liposome se fait au niveau du feuillet externe, la conversion théorique, dans le cas de la formulation LF $\mathbf{4}$, est donc de 50%. Néanmoins certains processus dit de flip-flop (échange de lipides entre les deux feuillets), qui sont des phénomènes lents, pourraient expliquer le taux de conversion de $66\% \pm 6\%$ supérieur à la valeur théorique de 50%.

Les spectres UV-visibles des deux solutions liposomales après la réaction PAC avec la sonde fluorescente $\mathbf{6}$ et une étape de dialyse (Figure 89- A et B – lignes solides) montrent la même signature, disparition de la forte absorbance à $\lambda = 330$ nm, que ce soit la solution incluant le phosphonodithioformiate neutre $\mathbf{2}$

ou cationique **4** dans sa composition. Dans le cas où la solution liposomale contient le composé **2** dans sa composition, le résultat peut être interprété par une totale consommation du composé **2**. Cependant, dans le cas où la solution liposomale comporte le composé **4**, une conversion non totale ($66\% \pm 6\%$) est déterminée sans que la bande à 330 nm ne soit repérée en UV-visible ou que même le signal à (m/z 754) responsable à la présence du composé **4** soit détecté en masse (Figure 90 - D). Ces observations peuvent suggérer que la quantité restante est faible pour être détectée. A ces résultats, qui peuvent apparaître contradictoires, nous paraissent difficiles à expliquer.

À la vue de ces résultats, nous pouvons conclure que l'incorporation du phosphonodithioester neutre **2** dans les solutions liposomales permet d'atteindre un taux de conversion plus important que lors de l'incorporation de son homologue cationique **4**. Cela, nous oriente vers l'utilisation du composé **2** pour la suite de l'étude. Néanmoins, le composé **4** est plus facile à détecter par spectrométrie de masse. Ce composé reste donc intéressant dès lors que l'on souhaite suivre la réaction PAC par spectrométrie de masse.

III.2.3.7 Étude par fluorescence de la localisation de l'amine fluorescente **6** immobilisée

Cette partie du travail a été réalisée dans le cadre d'une mobilité internationale à l'Université de Catane (Italie ; Equipe du Pr. S. Sortino) pendant une durée de 1 mois.

Comme nous l'avons vu précédemment, la réaction PAC entre une amine fluorescente et les solutions liposomales LF**2** et LF**4** s'accompagne par la formation d'un lien covalent qui doit se faire au niveau du feuillet externe des liposomes. Certaines techniques de fluorescence permettent d'apporter des preuves supplémentaires pour démontrer cette localisation pour la sonde fluorescente immobilisée.

Dans un premier temps, nous avons étudié par fluorescence deux solutions liposomales résultant soit d'une post-fonctionnalisation de l'amine fluorescente **6** (LF**2** + composé **6** suivie d'une dialyse : noté LF**2p6**) soit d'une pré-fonctionnalisation (LF**9**). Les spectres d'émission de ces deux solutions liposomales ont été comparés à la sonde fluorescente libre **6**. Dans les deux cas les concentrations en

BSV36 était de 0,75 mM au moment de l'analyse. Les spectres d'émission ont été enregistrés (Figure 92) ainsi que le temps de vie de fluorescence (Incrustation dans la Figure 92).

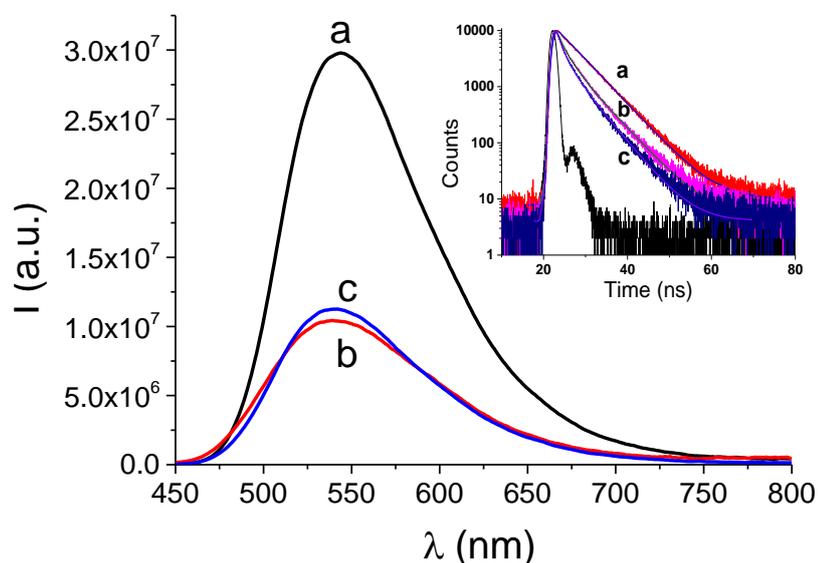


Figure 92. Spectres d'émissions de fluorescence de **6** dans l'eau (a) LF9 (b) et LF2p6 (c), $\lambda_{exc.} = 430$ nm. La figure en haut à droite montre le fit de la décroissance de fluorescence des mêmes solutions $\lambda_{exc.} = 455$ nm, $\lambda_{em} = 530$ nm.

L'émission, des deux solutions liposomales LF9 et LF2p6, est moins intense avec un décalage de 4 nm vers le bleu ($\lambda_{max} = 540$ nm) comparée au spectre d'émission de la sonde libre dans l'eau ($\lambda_{max} = 544$ nm). Ces faibles différences peuvent être expliquées par l'environnement différent de la sonde fluorescente. Par ailleurs, nous n'observons pas de grande différence entre le spectre d'émission de LF2p6 et de LF9. Ces résultats sont donc cohérents avec une localisation de la sonde fluorescente dans un environnement liposomal.

La cinétique de décroissance de fluorescence est un phénomène qui est aussi fonction de l'environnement dans lequel est placé la sonde fluorescente. Nous avons donc enregistré la décroissance de fluorescence pour la sonde fluorescente **6** dans l'eau et pour les formulations LF9 et LF2p6 (Incrustation Figure 92). Les mesures de la durée de vie de fluorescence montrent que l'émission de la sonde fluorescente libre **6** dans l'eau suit une décroissance mono-exponentielle ($\tau = 4,42$ ns) alors que les formulations liposomales (LF2p6 et LF9) suivent une décroissance bi-exponentielle ($\tau_1 = 1,06$ ns

and $\tau_2= 3,57$ ns et $\tau_1= 1,12$ ns and $\tau_2= 4,82$ ns, respectivement). Ces résultats confirment que les sondes fluorescentes des formulations LF9 et LF2p6 ne sont pas dans un environnement purement aqueux.

La stratégie de la post-fonctionnalisation de la surface des liposomes garantit préférentiellement, une localisation de la sonde sur le feuillet externe de la bicouche lipidique comparée à la stratégie de la pré-fonctionnalisation qui ne garantit qu'une distribution théorique (50 :50) sur les deux feuillets. Pour essayer de mettre en évidence cette répartition différente selon la méthode de préparation des liposomes, nous avons entrepris des expériences de quenching de fluorescence en utilisant une solution d'iodure de potassium (KI).^{141,142} Selon ces expériences, l'interaction entre les iodures et la sonde fluorescente va diminuer l'émission de fluorescence. Nous faisons l'hypothèse que l'ajout d'une solution de KI à une solution liposomale va entrainer des interactions principalement au niveau du feuillet externe et donc accroître le quenching de fluorescence quand la sonde fluorescente sera localisée uniquement sur ce feuillet.

La méthode consiste à ajouter des aliquotes de quencher (KI) aux trois échantillons (composé **6** dans l'eau, LF9 et LF2p6) et par la suite d'enregistrer le spectre d'émission de fluorescence (Figure 93).

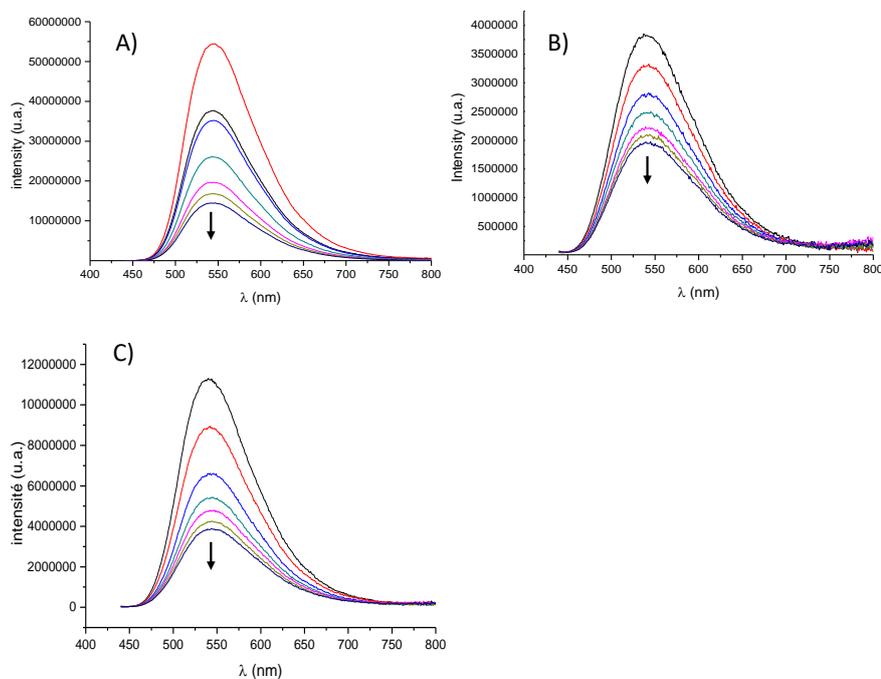


Figure 93. Superposition de la diminution de fluorescence associée à l'augmentation de la concentration en iodure respectivement pour A) la sonde fluorescente **6**, B) LF9 et C) LF2p6.

Une diminution de l'intensité de fluorescence a été observée en augmentant la concentration de [I] pour les trois échantillons. L'analyse classique de Stern Volmer est adaptée à l'analyse des résultats de fluorescence obtenus par quenching. Cette analyse est basée sur la relation entre l'intensité de la fluorescence en absence (I_0) et en présence du quencher (I) en fonction de la concentration quencher ([Q]) ($\frac{I_0}{I}$ vs [Q]).

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{sv} [I] \quad (3)$$

I_0 est l'intensité de fluorescence en absence du quencher ; I est l'intensité de la fluorescence avec le quencher ; K_{sv} est la constante de Stern Volmer et [I] est la concentration du quencher.

Cette relation est appliquée pour déterminer la constante de Stern Volmer quand le tracé de l'évolution de l'émission de fluorescence est linéaire.

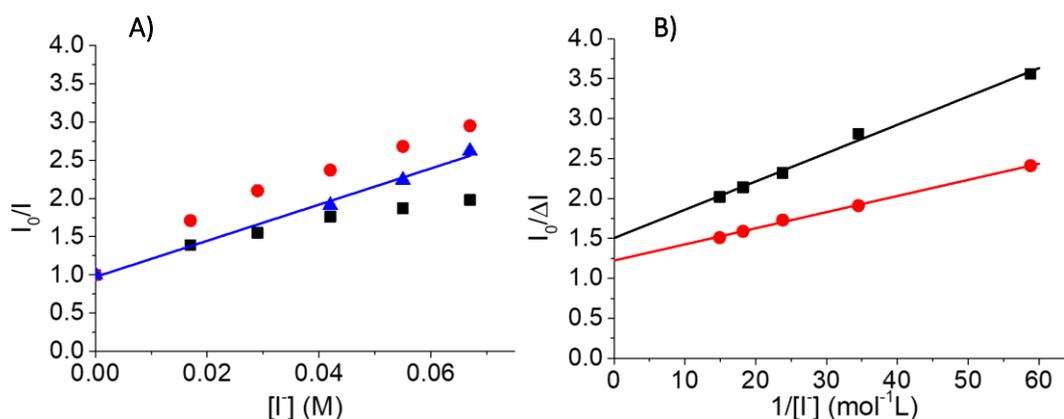


Figure 94. Le tracé de Stern-Volmer pour le quenching de fluorescence avec l'iode de : la sonde 6 dans l'eau (▲) ainsi que son fit linéaire ; la solution pré-fonctionnalisée LF9 (■) et la solution LF2p6 (●). À droite : Le tracé Stern-Volmer modifié pour le quenching de fluorescence avec l'iode pour : LF9 (■) ; LF2p6 (●) ainsi que leurs tracés linéaires.

Dans notre cas, l'évolution de l'émission de fluorescence à 540 nm selon l'équation de Stern Volmer pour le quenching dynamique montre que seule pour la sonde fluorescente libre une relation linéaire est observée, avec un $K_{sv} = 23,17 \text{ M}^{-1}$, comparée aux deux formulations liposomales, qui présentent des déviations à la linéarité dans les mêmes conditions d'expérience (Figure 94-A).

La détermination de la constante du Stern-Volmer avec l'équation (3) devient impossible pour les deux formulations liposomales (LF2p6 et LF9). Pour déterminer la valeur de cette constante il est donc

nécessaire de passer par un autre moyen qui est l'équation de Lehrer (L'équation de Stern-Volmer modifiée) (Équation 4).

$$\frac{I_0}{\Delta I} = \frac{1}{fa} + \frac{1}{fa K_{sv}} \cdot \frac{1}{[I^-]} \quad (4)$$

En appliquant cette équation aux différentes données obtenues, les valeurs de fa (la fraction du fluorophore qui est accessible au quencher) et de K_{sv} (la constante modifiée de Stern-Volmer) peuvent être déterminées à partir de la pente du tracé linéaire. Les résultats sur la Figure 94-B, montrent la possibilité de distinguer deux populations de fluorophore, une accessible au quencher et l'autre non-accessible. Dans le cas de LF2p6 nous avons trouvé une fraction molaire plus élevée de fluorophore accessible au quencher par rapport à son homologue préparé par pré-fonctionnalisation LF9. Les valeurs sont respectivement ($fa=82\%$, $K_{sv}= 60,59 \text{ M}^{-1}$) et ($fa=66\%$ et $K_{sv}= 42,44 \text{ M}^{-1}$).

Ce résultat démontre que la post-fonctionnalisation favorise une modification de la surface externe du liposome. Ces résultats convergent avec les pourcentages de quantification obtenus par UV-visible.

III.2.3.8 Étude cinétique

À ce stade de l'étude, la durée de réaction entre la sonde fluorescente et la solution liposomale incluant des phosphonodithioesters a été fixée à 4 heures à température ambiante sans optimisation du temps de réaction. Néanmoins, nous avons observé, par un changement de couleur immédiat, que la réaction entre une amine et le phosphonodithioester **2** réalisée en milieu organique semble rapide. L'objectif ici sera de quantifier la cinétique de la réaction réalisée lors de la post-fonctionnalisation des liposomes (e.g. détermination de la constante de vitesse).

Dans un premier temps, des essais préliminaires ont été effectués par spectrométrie de masse. En utilisant la solutions liposomale LF4 (contenant le phosphonodithioester cationique **4**), il est possible de suivre au cours de la réaction la disparition du phosphonodithioester cationique **4** (m/z 754.65) ainsi que la formation du produit de couplage **9** (m/z 843.50).

La méthode consiste à faire réagir 2 mL de la solution liposomale LF4 à 25 mM en BSV36 avec 3 équivalents de sonde fluorescente **6**. Des prélèvements du mélange réactionnel, à $t= 0$ min et toutes les

minutes pendant 20 minutes, ont été effectués. Chaque prélèvement est dilué dans l'eau jusqu'à obtenir une concentration de 1×10^{-5} M en BSV36. L'enregistrement des spectres de masse a été fait en suivant au même temps la disparition du composé cationique **4** et la formation du phosphonothioamide fluorescent **9**. (Figure 95)

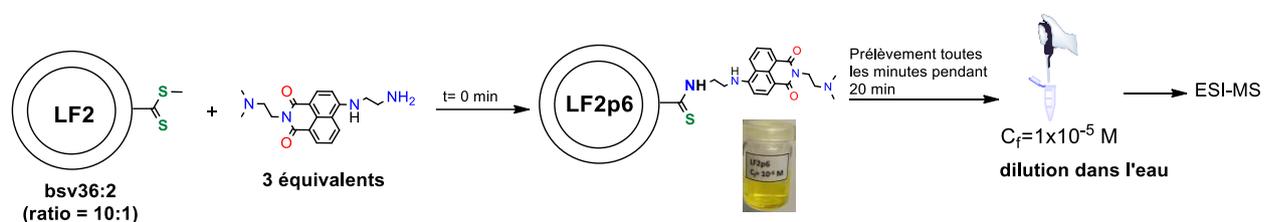


Figure 95. La méthode utilisée pour le suivi cinétique par ESI-MS

La Figure 96 montre une rapide disparition du composé **4** (m/z 754) ainsi que la formation dans le même temps du composé **9** (m/z 843). Au bout de 3 minutes le composé **4** n'est plus détecté tandis que le composé **9** se forme jusqu'à environ 6 minutes. Ce décalage pourrait être due au seuil de détection du composé **4** qui après 3 minutes n'est plus ou peu détectable. Ces résultats suggèrent une cinétique rapide et indiquent que la réaction est complète au bout de 10 minutes. Cependant, le processus d'élimination des solvants lors de l'analyse par ESI-MS est susceptible de modifier la cinétique de réaction. Ces résultats ne peuvent donc être considérés que comme des données préliminaires qui nécessitent une autre validation.

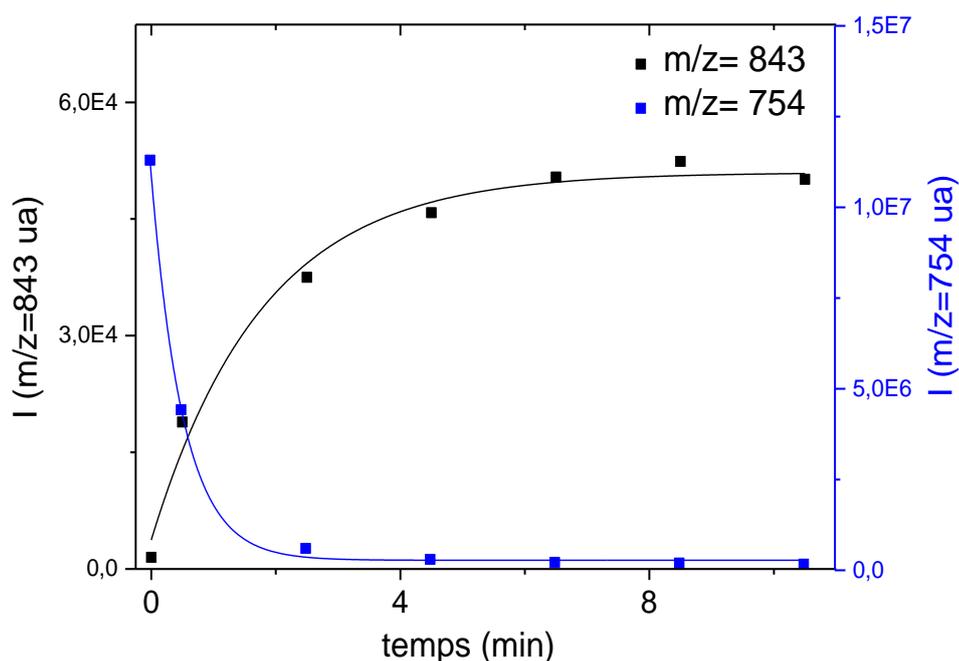


Figure 96. Analyse ESI-MS montrant la formation du phosphonothioamide **9** (intensité du pic à m/z 843, courbe noire, échelle de gauche) et la disparition du composé phosphonodithioformiate **4** (intensité de pic à m/z 754, courbe bleue, échelle de droite)

Afin d'éviter toutes modifications de la cinétique de réaction lors de l'analyse, nous avons pensé à déterminer la cinétique de cette réaction par UV-visible. Pour cela, nous avons retenu cette fois-ci la formulation LF2 avec laquelle nous avons observé une conversion complète du phosphonodithioformiate.

En partant d'une solution liposomale LF2, (BSV36 :2, 25 mM :2,5 mM), 100 μL ont été prélevés puis placés dans une cuve de 3 mL vide munie d'un agitateur magnétique. Par la suite, 2883 μL d'eau pure y sont ajoutée pour atteindre une concentration finale égale à $8,3 \times 10^{-5}$ M ($n = 2,5 \times 10^{-7}$ moles) en composé **2**. La cuve est ensuite placée dans le spectromètre sous agitation. Au temps $t=0$, 17 μL de sonde **6** ($C = 8,33 \times 10^{-5}$ M, $n = 2,5 \times 10^{-7}$ moles, 1 équivalent par rapport au composé **2**) prélevé d'une solution mère de **6** dans l'eau sont ajoutés. Le spectromètre enregistre alors un spectre (entre 370 et 500 nm) toutes les minutes et pendant 40 minutes. Les spectres obtenus sont représentés dans la Figure 97.

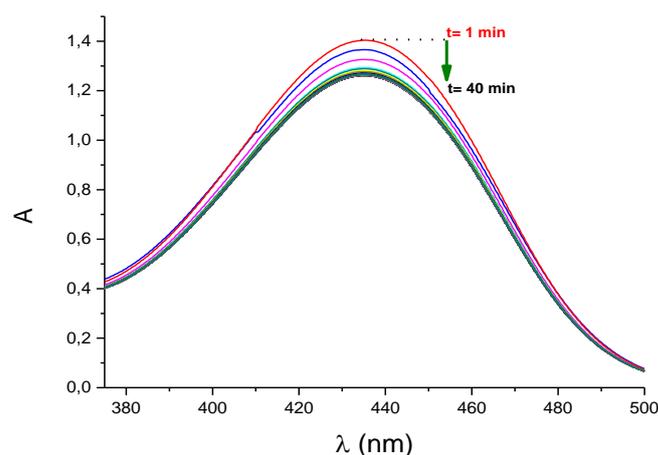
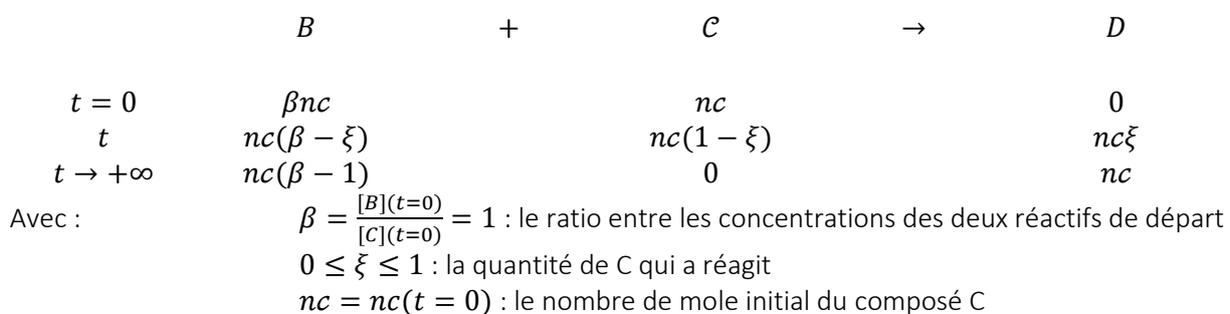


Figure 97. Spectres UV-visible entre 370-500 nm durant la réaction de LF2 avec l'amine **6**. Un spectre est enregistré chaque minute

Ces résultats montrent une différence d'absorbance à $\lambda = 436$ nm entre le composé de départ **6** et le composé d'arrivé **9** ce qui s'explique par des coefficients d'extinctions molaires différents entre ces deux composés.

Après avoir repéré les paramètres nécessaires pour le déroulement d'un suivi cinétique, tels que les concentrations des espèces mises en jeu, le maximum d'absorbance, le coefficient d'extinction molaire ainsi que le temps approximatif de réaction, nous avons essayé de déterminer un modèle cinétique pour la réaction PAC entre l'amine **6** et la solution liposomale LF2.

L'équation chimique de la réaction entre le composé **2** (représenté par **B**) et le composé **6** (représenté par **C**) conduit à la formation du produit de couplage **9** (représenté par **D**), peut être décrite par le tableau d'avancement ci-dessous.



Nous avons établi l'hypothèse que la réaction suit une loi cinétique du second ordre. Cela peut être donc écrit sous la forme :

$$\frac{d[C](t)}{dt} = -k[B](t)[C](t) = -k[C]^2(t)$$

En changeant les paramètres de l'équation par les données du tableau d'avancement chimique à l'instant t, on obtient :

$$C_0 \frac{d(1 - \xi(t))}{dt} = -kC_0^2(1 - \xi(t))^2 \Rightarrow \frac{d\xi(t)}{dt} = kC_0(1 - \xi(t))^2$$

$$\frac{d\xi(t)}{(1 - \xi(t))^2} = kC_0 dt$$

Après une intégration dans l'intervalle temps (0, t), l'équation devient :

$$\frac{1}{1 - \xi(t)} = 1 - kC_0 t \text{ ou } \xi(t) = 1 - \frac{1}{1 - kC_0 t} \text{ (équation. 1)}$$

A partir du suivi UV-visible (Figure 97), la valeur maximale de l'absorbance est déterminée à partir de l'absorbance de la sonde fluorescente, représentée par C dans l'équation chimique de la réaction, à $\lambda = 436$ nm. Généralement, l'absorbance d'un composé C peut être écrit en fonction de sa concentration selon la loi de Beer-Lambert.

$$A_C(t, \lambda) = \epsilon_C(\lambda, [C](t)) \cdot [C](t)$$

Avec : $\epsilon_C(\lambda, [C](t))$ est le coefficient d'extinction molaire pour le composé C qui dépend à la fois de la concentration et de la longueur d'onde, seulement si, les autres paramètres restent invariants (e.g. T= 25°C, l= 1 cm)

Conformément à la loi de Beer-Lambert, une courbe d'étalonnage (Figure 98) a été établie à $\lambda = 436$ nm. La valeur du coefficient d'atténuation molaire $\epsilon_C = 12292 \pm 80 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a été obtenue par un ajustement linéaire sur la gamme de concentrations étudiées [0 ; C_0] et l'incertitude déterminée par l'utilisation de la distribution t (12 degrés de liberté, 98% de confiance). La valeur est en concordance avec la valeur déterminée dans la littérature ($\epsilon_C = 12800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à $\lambda = 437$ nm).¹³⁶

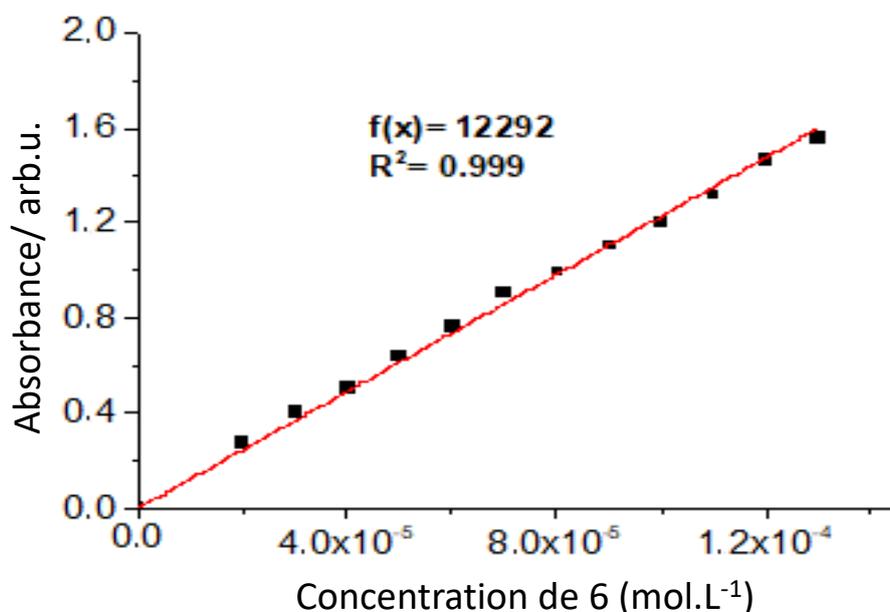


Figure 98. Courbe de calibration établie pour déterminer ϵ_C du composé 6 en solution dans l'eau.

Il est important de souligner que la sonde fluorescente C et le produit de couplage fluorescent 9 absorbent à la même longueur d'onde mais avec des intensités d'absorbance différentes, donc avec des coefficients d'extinction molaire différents. Dans ce cas, l'absorbance peut être écrite sous forme d'une somme de contribution par les deux composés, $A(\lambda = 436nm, t) = A_{436}(t)$.

$$A_{436}(t) = \epsilon_C \cdot [C](t) + \epsilon_D \cdot [D](t) \quad (\text{équation. 2})$$

Par l'introduction de $\xi(t)$, une fraction des composés ayant réagit, on obtient donc, l'évolution temporelle de l'absorbance sous la forme :

$$A_{436}(t) = \epsilon_C \frac{(1 - \xi(t))n_C}{V} + \epsilon_D \frac{\xi(t)n_C}{V}$$

Après réorganisation ;

$$A_{436}(t) = (\epsilon_D - \epsilon_C)\xi(t)C_0 + \epsilon_C C_0$$

Où :

$$A_{436}(t) = a\xi(t) + b \quad (\text{équation. 3})$$

Avec $C_0 = n_C/V$; est la concentration initiale du composé C, en posant l'hypothèse ϵ_C et ϵ_D sont des constantes dans la gamme de concentration d'intérêt, également, $a = (\epsilon_D - \epsilon_C)C_0$ et $b = \epsilon_C C_0$ sont des constantes.

L'insertion de l'équation 1 dans l'équation 3, nous permet d'obtenir cette équation 4 à trois paramètres :

$$A_{436}(t) = \frac{-a}{1 - kC_0t} + (b + a) \quad (\text{équation. 4})$$

Avec : $a = (\epsilon_D - \epsilon_C)C_0$ et $b = \epsilon_C C_0$ et k est la constante de vitesse à déterminer.

Une solution liposomale LF2 est préparée à une concentration à $C_0 = 8,3 \times 10^{-5} M$, puis un volume de 17 μL (1 équivalent) de sonde fluorescente est ajouté sous agitation dans une cuve de 3 mL. Une valeur d'absorbance est enregistrée à $\lambda = 436$ nm toutes les 20 secondes durant (3000 sec ; 50 min) puis l'ensemble des données est représenté ci-dessous (Figure 99).

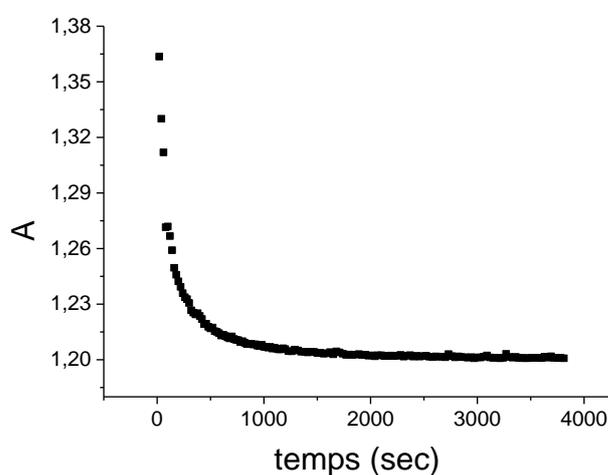


Figure 99. L'évolution de l'absorbance au cours du temps de la réaction PAC de LF2 avec le composé 6 en quantités molaires égales.

La fonction à 3 paramètres (équation.4) a été utilisée comme fonction d'ajustement pour modéliser la cinétique de la réaction et pour extraire une estimation de la constante de vitesse k . À cette fin, les valeurs des 3 paramètres a , b et k devaient être déterminées simultanément en tenant compte des inconnues ϵ_D , k , ainsi que des imprécisions dans les valeurs de ϵ_C et C_0 . Le solveur algorithmique (fonction intrinsèque du programme LibreOffice) a été utilisé pour minimiser la somme des carrés des résidus entre les données expérimentales et l'équation. 4.

Le comportement asymptotique de A_{436} vers le grand temps a été obtenu en faisant la moyenne de l'absorbance mesurée pendant les 400 dernières secondes et, les paramètres a et b ont été déterminés selon le raisonnement ci-après :

$$\lim_{t \rightarrow \infty} A_{436}(t) = \lim_{t \rightarrow \infty} \left(\frac{-a}{1 - kC_0 t} + (b + a) \right) = (a + b) = \frac{\sum_{i=(N-19)}^N A_{436}(t_i)}{20}$$

$$a = A_{436}(t \rightarrow +\infty) - \epsilon_c C_0$$

En raison de la nécessité de quelques secondes pour la sonde fluorescente afin de s'homogénéiser dans la cuve, on a considéré que la réaction commençait avec un retard de 30 secondes (les données expérimentales ont donc été décalées de 30 secondes). Les données expérimentales ont ensuite été ajustées (voir la Figure 100 ci-dessous), laissant les variables suivantes à modifier avec des valeurs entre crochets pour tenir compte des imprécisions expérimentales $k > 0,6 \times 10^{-5} \text{ M} < C_0 < 1 \times 10^{-4} \text{ M}$ et $15\,000 < \epsilon_c < 20\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Avec les conditions énumérées ci-dessus, la loi de vitesse du second ordre conduit à $k = 842 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Les paramètres optimaux ont été trouvés à $C_0 = 6,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ et $\epsilon_c = 15000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ avec la somme des résidus 5×10^{-3} avec 147 points de données utilisés et un maximum de 2,5% de déviation absolue par rapport aux données expérimentales (à $t=50 \text{ s}$ sur les données cinétiques modifiées).

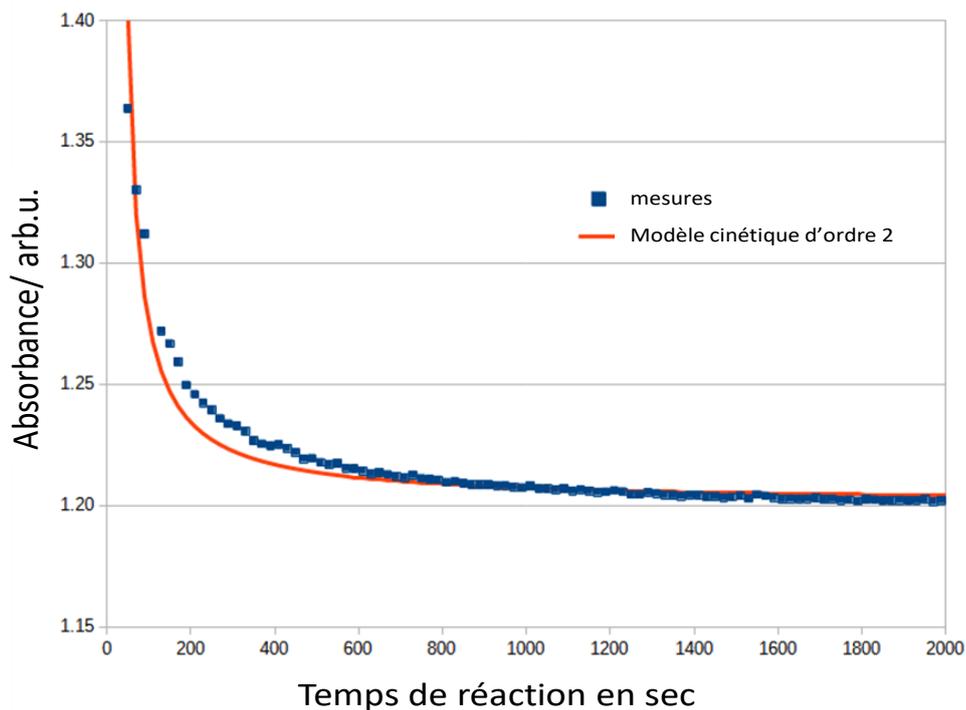


Figure 100. Absorbance en fonction du temps (carreaux bleu) et le modèle d'un fit du second ordre (courbe rouge)

A la fin de l'étude cinétique un test de robustesse du modèle a été effectué pour évaluer une gamme raisonnable de variation de la constante de vitesse en fonction d'éventuelles imprécisions dans les conditions initiales ou les valeurs des paramètres (Voir Tableau 9).

La section « expérimentale » est la section qui englobe les données obtenues en se basant sur les mesures expérimentales.

La section « meilleur fit » ne suppose aucune contrainte.

La section « initiale » tient compte de l'absorbance mesurée initialement (l'absorbance de la sonde libre et de la sonde greffée est pas la même au sein du mélange réactionnel).

La section « fit choisi » rapporte le compromis fait entre les données expérimentales et les imprécisions (retard d'homogénéisation, coefficient d'extinction molaire entre la sonde libre et la sonde greffée dans le mélange, préparation du mélange).

	Expérimentale	Meilleur fit	Initiale	Fit choisi
Constante de vitesse k ($M^{-1} s^{-1}$)	1 150	945	766	842
Coefficient d'extinction M^{-1}	12 292 (calibration)	11 565	15 500 (Initiale)	15 000
Concentration initiale (M)	$8,3 \times 10^{-5}$ (préparée)	$6,0 \times 10^{-5}$	$5,4 \times 10^{-5}$	$6,0 \times 10^{-5}$
Temps de retard (s)	0	49.1	55.9	30
La somme des résidus	$2,8 \times 10^{-2}$	$1,7 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-3}$

Tableau 9. Test de robustesse du modèle cinétique développé

Cette étude montre que la réaction PAC réalisée à la surface d'un liposome est en effet rapide avec une constante de vitesse du second ordre proche de $8 \cdot 10^2 M^{-1} s^{-1}$. Selon la revue publiée en 2017 par l'équipe de Oliveira¹⁰⁴, cette réaction se place donc dans la catégorie des réactions click rapide avec une cinétique 8 fois plus grande que celle de la CuAAC ($k \approx 10 - 100 M^{-1} s^{-1}$) et avec un ordre de grandeur comparable aux réactions de cycloaddition Diels-Alder à demande inverse d'électrons ($k \approx 1 - 10^6 M^{-1} s^{-1}$). La cinétique rapide de la réaction PAC, l'inutilité d'une catalyse ainsi que les conditions douces de réaction (eg. Utilisation de l'eau, température ambiante) peuvent être des atouts prometteurs pour une utilisation de cette réaction en biologie.

III.2.4 Extension de la réaction PAC sur des liposomes constitués de phospholipides naturels et son potentiel d'application pour la fonctionnalisation par des chaînes PEG

Dans cette partie, nous envisageons dans un premier temps, d'appliquer la méthode de post-fonctionnalisation par réaction PAC, en utilisant des liposomes formés par des phospholipides naturels.

L'objectif vise à étendre la méthodologie de fonctionnalisation à d'autres types de liposomes.

Dans un second temps, nous souhaitons démontrer le potentiel d'application de cette méthode de fonctionnalisation de liposomes, préparés à base de BSV36 ou à base de lipides naturels, par réaction PAC. Pour cela nous avons retenu une modification de la surface de liposomes par deux types d'amines PEGylées (Un PEG 600 difonctionnel - PEG600-NH₂/N₃ et un PEG amine commercial - PEG5000-NH₂).

III.2.4.1 Application de la réaction PAC à des liposomes formés par des lipides naturels

Pour commencer nous avons retenu le 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) et le cholestérol (chol) comme des lipides naturels commerciaux. Nous avons préparé une formulation à base de DPPC et du chol, incluant soit le phosphonodithioformiate cationique **4** soit le phosphonodithioformiate neutre **2**. Ces formulations ont été préparées par la méthode d'hydratation du film lipidique (Tableau 10).

Nom de la formulation	Composition en lipides	Ratios	Concentrations
LF5	DPPC : Chol : 2	2 : 1 : 0,2	12,5 : 6,25 : 2,5
LF6	DPPC : Chol : 4	2 : 1 : 0,2	12,5 : 6,25 : 2,5

Tableau 10. Noms, composition, ratios et concentrations des formulation à base de lipides naturels

L'analyse par DLS a montré des tailles de 107±7 nm pour LF5 et de 138±4 nm pour LF6. Le potentiel zêta de LF6 affiche des valeurs positives (+57±1 mV) qui s'expliquent par la nature cationique du phosphonodithioester **4** présent dans la composition de LF6. Cependant, dans le cas de LF5, formée à base de DPPC, des valeurs de zêta potentiel légèrement négatives (-36±0,6 mV) ont été obtenues. Ces valeurs peuvent être expliquées par la présence du DPPC, qui a une forme zwitterionique, en plus de deux composés neutres, le cholestérol et le phosphonodithioester **2**, dans la composition de LF5.

Les formulations LF5 et LF6 ont été engagées dans une réaction PAC après ajout de l'amine fluorescente 6. Les analyses par DLS n'ont pas montré de changements significatifs de la taille des liposomes après la réaction d'aminolyse. Des tailles de 200 ± 41 nm pour LF5 et de 129 ± 3 nm pour LF6 ont été obtenues. Le potentiel zêta de la formulation LF6 reste positif avec une valeur de $+53 \pm 3$ mV. En revanche, la mesure du potentiel zêta de la solution liposomale LF5, après réaction, a montré un shift vers des valeurs positives (de -36 ± 0.6 mV à $+46 \pm 0.3$ mV). Cette modification de la charge de surface n'est qu'une preuve supplémentaire pour confirmer que la sonde fluorescente est localisée à la surface du liposome. En effet, la molécule fluorescente possède une amine tertiaire capable d'être protonée facilement ce qui peut expliquer la charge positive enregistrée en mesurant le potentiel zêta.

Ayant à disposition les deux formulations LF5 et LF6, nous avons voulu confirmer que le couplage à la surface des liposomes se fait par un lien covalent. Pour cela, les deux formulations ont été analysées avant et après réaction par spectrométrie de masse (Figure 101).

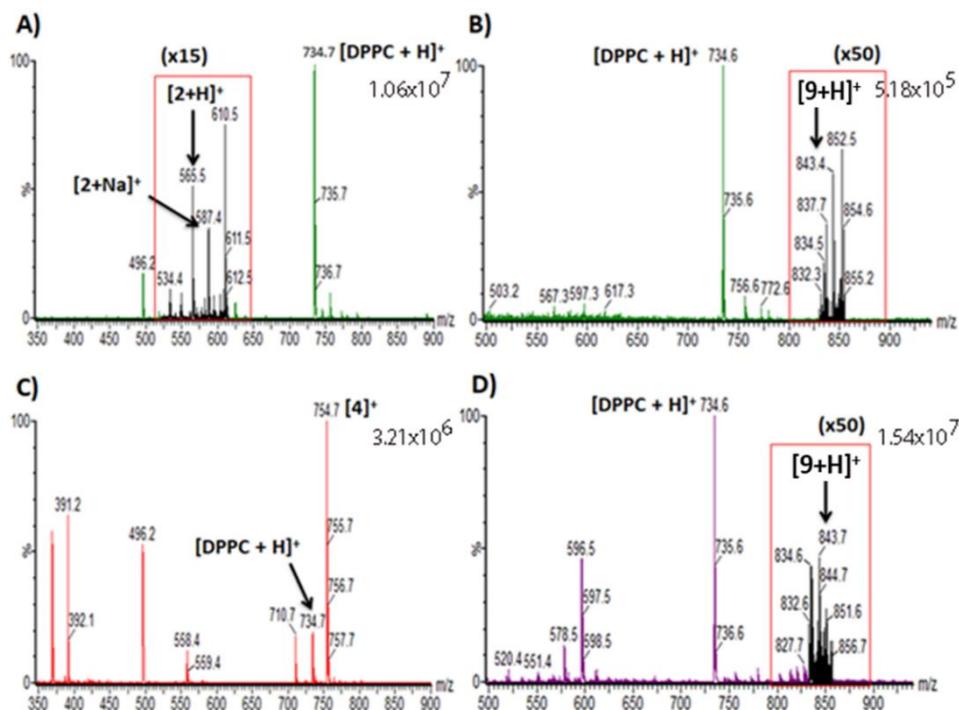


Figure 101. Spectres ESI-MS : A) LF5 (DPPC : chol : 2) avant la réaction PAC (la dilution a été effectuée dans un mélange eau : méthanol 7 : 3) ; B) LF5 après réaction PAC et une dialyse dans l'eau ; C) LF6 (DPPC : chol : 4) avant la réaction PAC ; D) LF6 après la réaction PAC dans l'eau et une dialyse. Concentration finale après dilution = 10^{-5} M en BSV36.

Afin de favoriser l'ionisation du phosphonodithioester neutre 2 dans le cas de LF5 avant la réaction PAC, nous avons effectué la dilution cette fois-ci dans un mélange (eau : méthanol ; 7 : 3). Le fait de rajouter

du méthanol dans l'étape de dilution a permis d'observer le phosphonodithioester **2** sous la forme $[2+H]$ à (m/z 565.5) et sous la forme $[2+Na]$ à (m/z 587.4). (Figure 101-A)

La Figure 101.B, montre la présence d'un pic à (m/z 843.4) qui confirme la formation d'un lien covalent entre les fonctions dithioesters du liposome LF5 avec la sonde fluorescente **6**.

Dans le cas de la solution liposomale LF6 nous avons assisté la disparition du pic à (m/z 754.7) qui correspond au phosphonodithioester cationique **4** et l'apparition d'un pic à (m/z 843.7) qui confirme la formation du composé **9**.

La morphologie des liposomes, issus de la formulation LF5, avant et après la réaction PAC a été investiguée par analyse Cryo-MET (Figure 102).

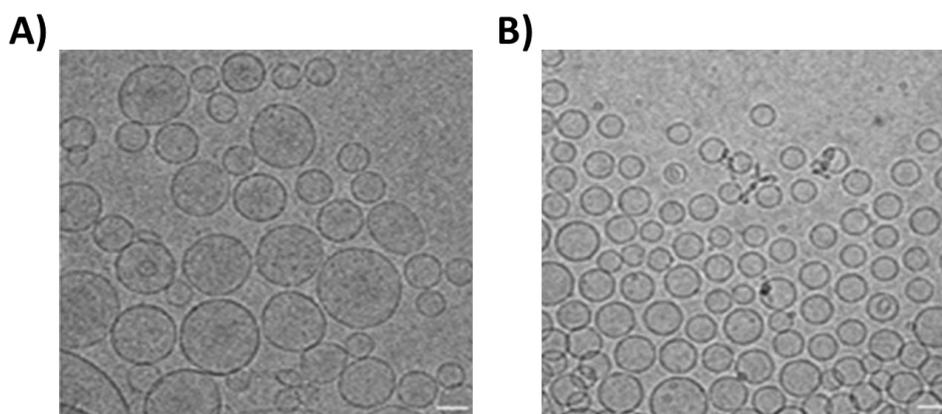


Figure 102. Cryo-MET du LF5 A) avant et B) après la réaction PAC.

Ces résultats de Cryo-MET permettent de conclure que l'incorporation du phosphonodithioester **2** dans des formulations à base de DPPC et de chol, permet également de former, avant réaction, des vésicules bien définies avec des formes régulières et sans altération de leurs morphologies après réaction.

L'ensemble de ces résultats montre que la réaction PAC est réalisable sur des liposomes comprenant un amphiphile naturel zwitterionique (DPPC), du cholestérol et un phosphonodithioformiate neutre (**2**) ou cationique (**4**).

III.2.4.2 Fonctionnalisation de la surface des liposomes par un PEG600 et par un PEG5000

Cette partie se consacre à la fonctionnalisation de la surface des liposomes incluant des fonctions dithioesters par des chaînes poly(éthylène) glycol (de masse moléculaire différentes) portant une fonction amine primaire.

La fonctionnalisation des liposomes est réalisée selon le protocole précédemment mis-au point. Brièvement, trois équivalents du PEG (PEG-600 NH₂/N₃ **7** ou le PEG-5000-NH₂), par rapport aux phosphonodithioformiates, sont dissous au préalable dans de l'eau milli Q. La solution est par la suite ajoutée aux liposomes (LF2 ou LF4) incluant les phosphonodithioformiates **2** et **4**. Le mélange est laissé sous agitation pendant 4h puis transvasé dans un sac de dialyse et dialysé pour éliminer l'excès du PEG. La seule différence avec le protocole développé précédemment est que l'étape de dialyse nécessite une nuit supplémentaire (Figure 103).

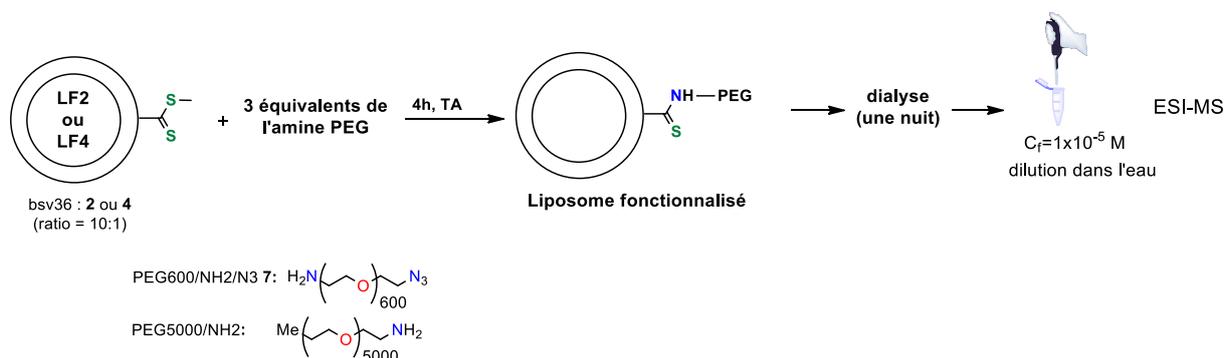


Figure 103. Représentation schématique du protocole de fonctionnalisation des liposomes (LF2 et LF4) par un PEG600/NH₂/N₃ et un PEG5000/NH₂.

Pour commencer, nous avons choisi de modifier la surface de la solution liposomale LF2 et LF4 par le PEG600/NH₂/N₃ **7** puis par un PEG5000/NH₂. La formulation LF2 (BSV36 : **2** / 10 : 1) a été choisie car elle permet une conversion complète du phosphonodithioformiate **2** et la solution LF4 (BSV36 : **4**) a été choisie car elle permet de suivre, par spectrométrie de masse, la disparition du composé **4**. L'analyse ESI-MS de la solution liposomale LF4 après la réaction PAC avec le composé **7** a montré la disparition du phosphonodithioformiate **4** (m/z 754) ainsi que la formation du produit de couplage sous forme d'une

distribution d'adduit potassé $[9+K]^+$ centrée à (m/z 1169.58) qui correspond à $n=12$ unités de PEG (Figure 104). Le résultat obtenu confirme le greffage du PEG *via* un lien covalent.

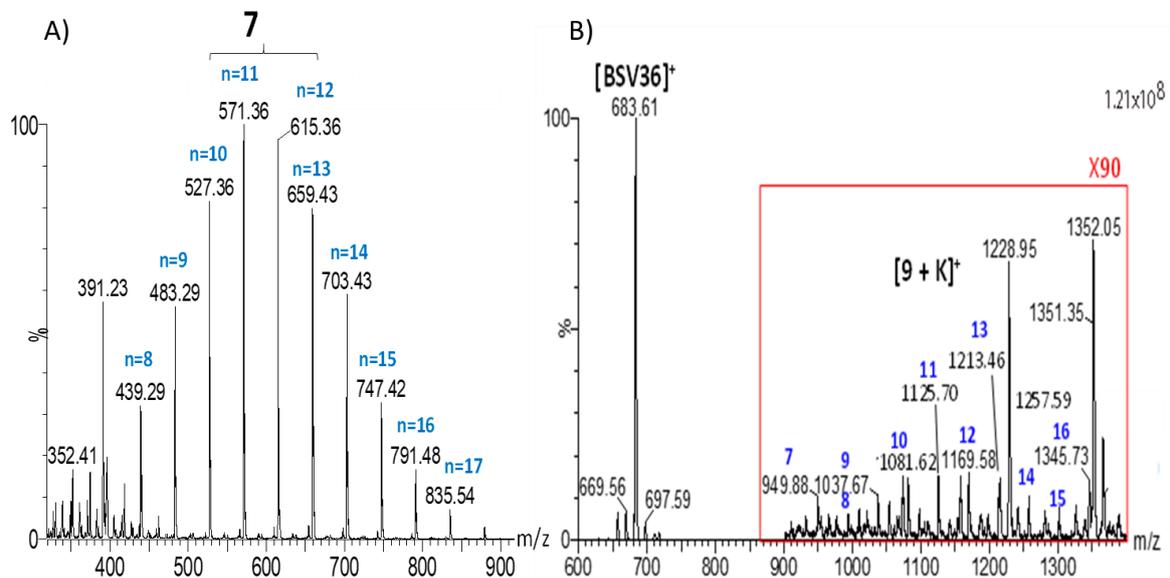


Figure 104. A) structure du PEG600/NH₂/N₃, B) analyse ESI-MS du LF4 (BSV36 :4) après la réaction PAC avec PEG600/NH₂/N₃ 7 et dialyse

Des analyses par DLS et par Cryo-MET ont été effectuées, seulement pour LF2 après réaction, pour s'assurer que les conditions de la réaction PAC n'altèrent pas la taille des liposomes formés. Une analyse par DLS ne montre pas de changement significatif entre la solution liposomale LF2 avant la réaction PAC (taille : 150±25 nm ; zêta : +57±0,7) et après (Taille : 161±12 nm ; zêta : +69±1 mV).

L'analyse par Cryo-MET (Figure 105) de la solution liposomale après la réaction PAC avec le PEG 7 montre l'obtention de vésicules sphériques avec des formes bien définies. Ces résultats montrent que la fonctionnalisation n'a pas altéré la structure des liposomes.

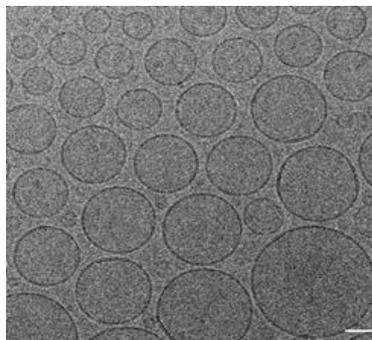


Figure 105. LF2 (BSV36 :2) après la réaction PAC avec PEG600/NH₂/N₃ 7 et dialyse. Echelle : 50 nm

Afin de déployer la méthodologie de greffage nous avons envisagé d'utiliser un PEG commercial plus long (PEG5000/NH₂) pour modifier la surface des liposomes LF4 et former un phosphonothioamide-PEG5000, noté **11** dans la suite (Figure 106).

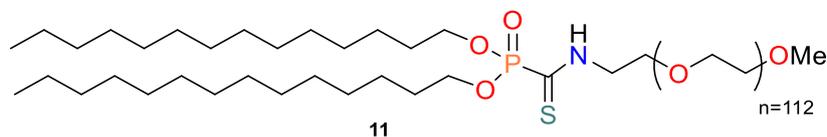


Figure 106. Structure du composé **11**

Selon le même protocole et après l'étape de dialyse, la solution liposomale est analysée par ESI-MS. La Figure 107-A montre d'une part l'analyse ESI-MS du PEG5000/NH₂ utilisé qui apparaît sous forme polychargée et d'autre part la solution liposomale à base de BSV36 après la réaction PAC (Figure 107-B). Sur le spectre B-Figure 107, plusieurs populations d'espèces ioniques sont formées : des espèces tri-chargées [**11**+Na+2K]³⁺ avec m/z allant de 1700 à 2300 et des espèces di-chargées [**11**+2K]²⁺ avec m/z allant de 2300 à 3200. Ces résultats sont en accord avec l'existence d'un lien covalent entre le PEG5000/NH₂ et la solution liposomale LF4.

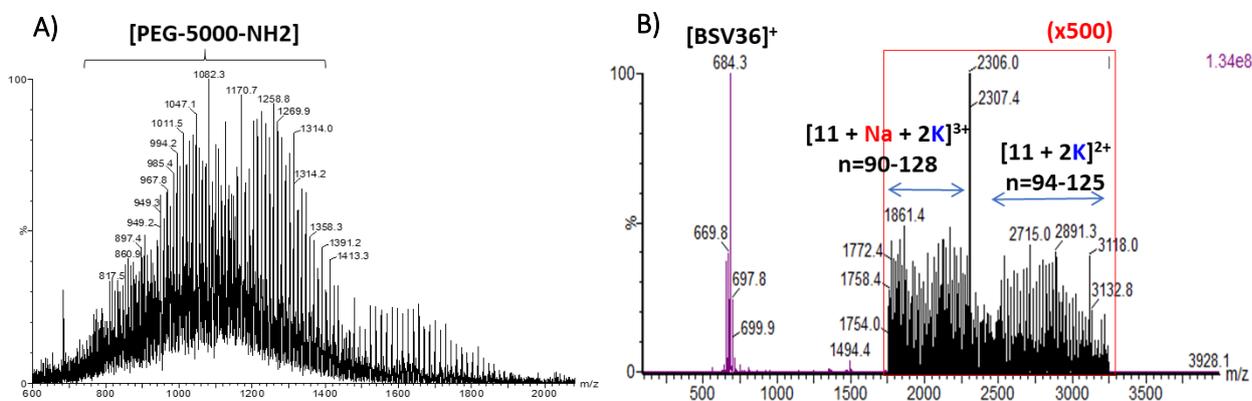


Figure 107. **A)** L'analyse ESI-MS du PEG5000/NH₂ dans l'eau. **B)** Analyse ESI-MS de LF4 après la réaction PAC avec PEG5000/NH₂ et dialyse.

Une analyse par DLS ne montre pas de changement majeur entre la solution liposomale LF4 avant réaction PAC (Taille : 127±2 nm ; zêta : +60±0,5) et après (Taille : 155±4 nm ; zêta : +64±0,5 mV).

Pour s'assurer que la stratégie de fonctionnalisation des liposomes avec des chaînes PEG par réaction PAC reste applicable à une solution liposomale à base de phospholipides naturels tels que le DPPC, nous avons appliqué cette méthode à la fonctionnalisation des liposomes LF6 (DPPC : Chol :**4** / 2 :1 :0,2) par

le composé **7**. La formulation LF6 nous permet de suivre par ESI-MS la disparition du phosphonodithioester cationique **4** à (m/z 754).

L'analyse ESI-MS de la solution LF6, après la réaction PAC avec le PEG600/N₃/NH₂ **7** et sa purification, a montré la formation du produit de couplage **10** en deux populations : adduits potassiques [10+K]⁺ et sodiques [10+Na]⁺. (Figure 108)

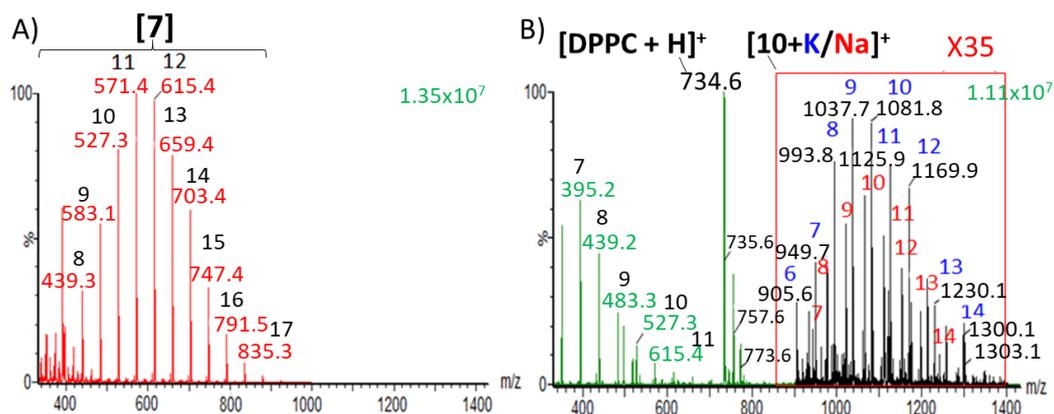


Figure 108. L'analyse ESI-MS de A) PEG600/NH₂/N₃ **7** dans l'eau, B) LF6 (DPPC : Chol:4, 2:1:0.2) après la réaction PAC , avec **7**, et une étape de dialyse. Cadre rouge est un zoom fois 35.

La détection du composé **10** par spectrométrie de masse confirme le lien covalent du PEG600/N₃/NH₂ **7** au liposome ainsi que l'extension de la méthode de fonctionnalisation par des PEG à des liposomes formés exclusivement avec des lipides naturels. Cependant, nous avons remarqué que la purification par dialyse n'est pas efficace à 100% car nous détectons le PEG600/N₃/NH₂ de départ entre (m/z 395 et m/z 615) après dialyse (Figure 108-B).

III.2.5 Mise au point d'un protocole rapide pour la fonctionnalisation de liposomes

Nous avons vu précédemment que la conversion du phosphonodithioformiates **2** inclus dans une solution liposomale est complète après l'addition d'une amine et que la cinétique de la réaction est rapide. Le protocole mis en place qui utilise 3 équivalents de l'amine par rapport au phosphonodithioformiate **2** présent dans la solution liposomale, nécessite une étape de dialyse coûteuse en temps (6h environ) pour éliminer l'excès d'amine.

Dans le but de s'affranchir de l'étape de dialyse nous avons cherché à développer un protocole simple et efficace sans avoir besoin de passer par cette étape de purification des liposomes. L'idée consiste à

appliquer la réaction PAC en utilisant un défaut d'amine (0,5 équivalent) par rapport aux phosphonodithioesters disponibles à la surface de la solution liposomale. Nous avons décidé de retenir un temps de contact de 30 minutes et de procéder à 40°C en utilisant l'amine fluorescente **6** pour la mise au point de ce protocole rapide. Cette stœchiométrie implique donc que la conversion du phosphonodithioformiate sera partielle. Afin de ne pas obtenir des liposomes avec des motifs phosphonodithioformiates, qui pourraient réagir avec des amines, nous avons souhaité convertir la totalité des phosphonodithioformiates en phosphonothioamides. Pour cela, nous avons opté pour ajouter dans un second temps une amine non-toxique, soluble dans l'eau dont il ne serait pas nécessaire d'éliminer l'excès. Pour cela nous avons retenu le 2-aminoéthanol. Masson et al. ont montré que ce composé réagit avec le diisopropylphosphonodithioformiate de méthyle pour conduire au phosphonothioamide correspondant avec un très bon rendement (94%)¹²⁹. Du point de vue toxicité, selon la fiche INRS¹⁴³, l'éthanolamine est présente dans les urines chez l'homme. Dans des conditions physiologiques, les niveaux d'excrétion sont en moyenne de 0,162 mg/kg/jour et 0,492 mg/kg/jour respectivement, chez l'homme et la femme. À noter également, que l'éthanolamine ne présente pas de toxicité aiguë recensée par voie cutanée ou par voie respiratoire et présente une toxicité modérée par voie orale. Le protocole rapide de fonctionnalisation de liposomes par réaction PAC est donc schématiquement représenté ci-dessous (Figure 109).

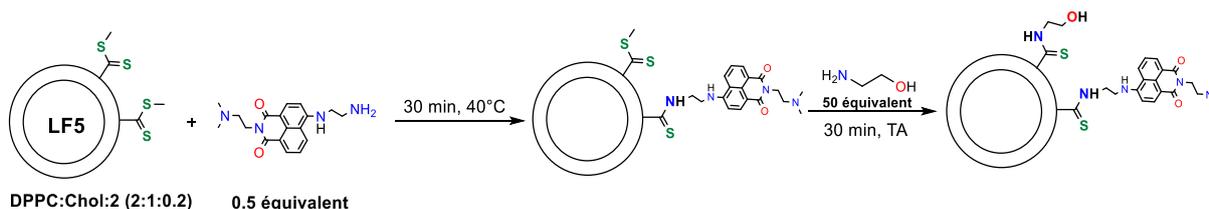


Figure 109. Protocole de fonctionnalisation de la surface d'un liposome incluant un phosphonodithioester en une heure
Après réaction d'une solution liposomale LF5 (DPPC :Chol : 2 ; 1 mL, $2,5 \times 10^{-6}$ moles de **2**) avec 0,5 équivalent de l'amine fluorescente **6** ($1,25 \times 10^{-6}$ moles ; 30 minutes à 40°C) et ajout de 50 équivalents d'éthanolamine ($1,25 \times 10^{-4}$ moles, 7,41 μ L ; 30 minutes à TA) la solution liposomale est analysée par ESI-MS.

Dans un premier temps, nous avons analysé la solution liposomale de départ LF5, par spectrométrie de masse. Pour cette opération, la solution LF5 a été diluée dans un mélange (eau : méthanol ; 7 :3) jusqu'à une concentration de 1×10^{-5} M, 0,1% d'acide formique a été ajouté pour favoriser l'ionisation du phosphonodithioester neutre **2**. Le composé **2** a donné une réponse sous la forme protonée [M+H] à m/z 565.5 et sous la forme sodée [M+Na] à m/z 587.7 en plus du signal protoné du DPPC à m/z 734.4. (Figure 110)

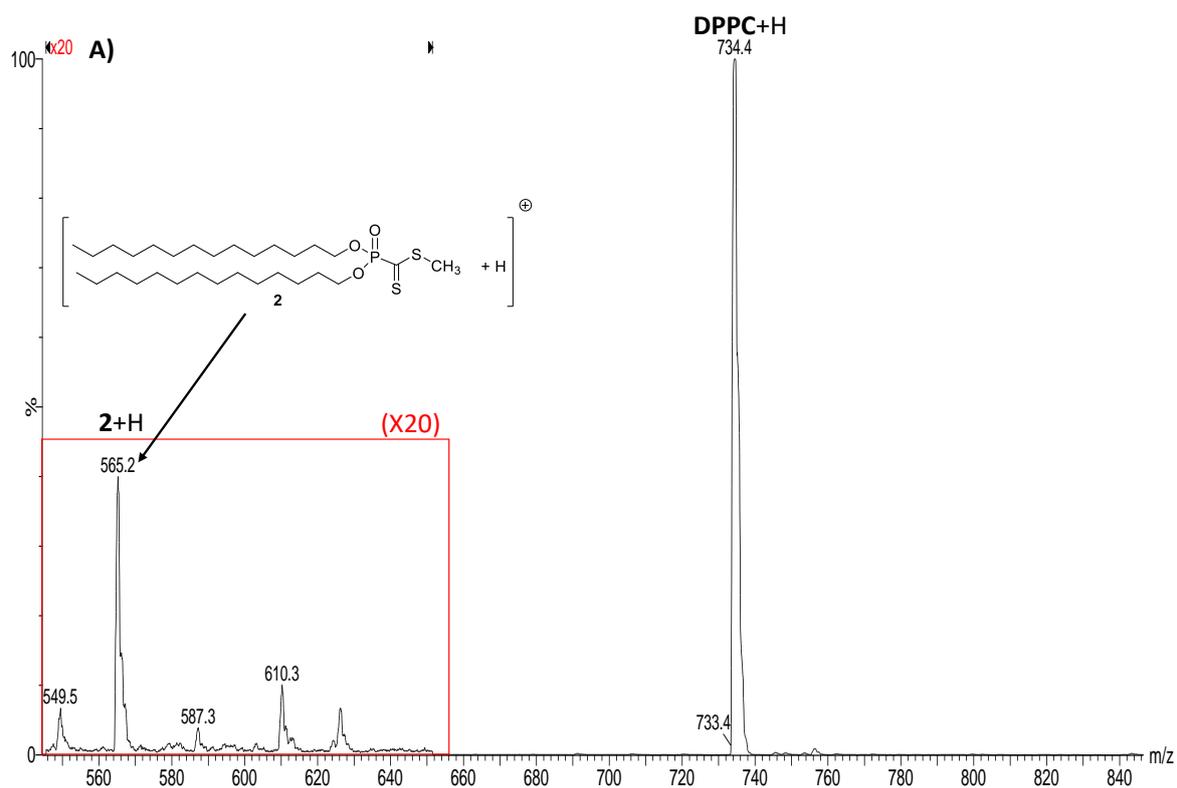


Figure 110. L'analyse ESI-MS de LF5 avant la réaction PAC dans (eau : méthanol 7 :3 + 01% d'acide formique). Le cadre rouge est un zoom fois 20

Ensuite, nous avons analysé le mélange réactionnel à la fin du protocole c'est-à-dire après l'addition de la sonde fluorescente **6** et l'addition de l'excès d'éthanolamine mais sans étape de dialyse. La Figure 111 montre, la formation du phosphonothioamide **9** qui est le produit de couplage attendu entre le composé **6** et le phosphonodithioester **2**, à m/z 843.5. Nous observons également la présence du produit de couplage entre l'éthanolamine et le phosphonodithioformiate **2** sous forme d'un adduit avec le [2-aminoéthanol + H] à m/z 639.3. La formation de cet adduit est favorisée par la tendance du phosphonothioamide formé à créer des liaisons hydrogènes¹⁴⁴.

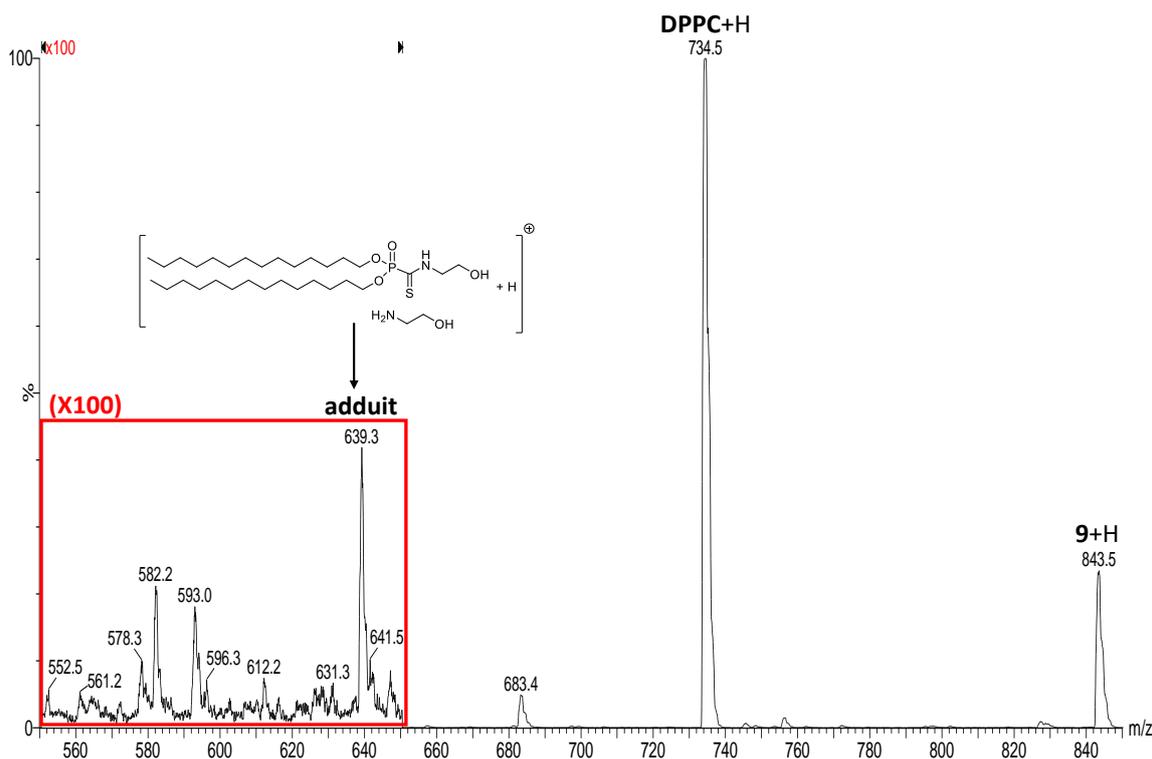


Figure 111. L'analyse ESI-MS du LF5 après réaction avec **6** puis avec l'éthanolamine sans dialyse. Le cadre rouge est un zoom fois 100.

Au vu des résultats obtenus par spectrométrie de masse, nous pouvons conclure que la modification des liposomes, incluant le phosphonodithioformate **2**, a été réalisée en une heure. Cette méthode suggère que nous pouvons appliquer un protocole semblable pour fonctionnaliser la surface de liposomes avec deux (ou plus) groupements différents en ajustant la stœchiométrie des ajouts.

IV. Conclusion

En s'inspirant de la méthode de Grisley, deux nouveaux phosphonodithioformates lipidiques (neutre et cationique) ont été obtenus à l'échelle du gramme. Leur incorporation dans des liposomes préparés à partir d'amphiphiles cationiques de synthèse ou d'amphiphiles zwitterioniques naturels conduit à former des liposomes bien définis en taille et de morphologie sphérique.

Le greffage d'une amine fluorescente à leur surface est réalisé *via* une réaction PAC (Phosphonodithioester-Amine Coupling) qui est une réaction d'aminolyse du phosphonodithioformate. Cette réaction de couplage est réalisée dans l'eau, à température ambiante et sans catalyse. Cette stratégie de fonctionnalisation a permis de rapporter des taux de conversion des

phosphonodithioformiates élevés (jusqu'à 100%) et les conditions de réaction n'altèrent pas la morphologie des liposomes.

La rapidité de la réaction en milieu organique visible par un changement de couleur immédiat nous a encouragé à déterminer la cinétique de réaction lorsque celle-ci est réalisée dans l'eau au niveau des liposomes. Nous savons que la réaction PAC s'opère selon une cinétique du second ordre avec une constante de vitesse $k = 800 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ qui en fait une réaction click parmi les plus rapides¹⁰⁴.

Les techniques de caractérisations utilisées ont participé à mettre en évidence la modification de la surface de liposomes et la formation d'un lien covalent. En particulier, les expériences d'extinction de la fluorescence ont montré que la stratégie de post-fonctionnalisation est la meilleure stratégie pour fonctionnaliser la surface externe d'un liposome. La stratégie de greffage a été aussi, appliquée pour fonctionnaliser la surface des liposomes, à base de lipides synthétiques ou naturels, avec deux chaînes PEG de différentes longueurs.

Pour étendre l'intérêt de cette réaction PAC, nous avons modifié le protocole de post-fonctionnalisation afin de réduire le temps de réaction et de s'affranchir de l'étape de dialyse. Ce protocole, qui utilise l'amine réactive en quantité sub-stœchiométrique, permet d'avoir une solution liposomale dont la surface a été modifiée en une heure.

Les principaux résultats de ce chapitre ont conduit à une publication dont les références sont les suivantes :

Phosphonodithioester-Amine Coupling in water: A fast reaction to modify the surface of liposomes.

Montassar Khalil, Dany Jeanne Dit Fouque, Mathieu Berchel, Aurore Fraix, Aurélien Dupont, Salvatore Sortino, Antony Memboeuf and Paul-Alain Jaffrès, **Org. Biomol. Chem.**, 2021, **19**, 6392-6396

Par ailleurs, ces travaux ont été présentés au congrès « 23rd International Conference on Phosphorus chemistry » à UJD, Częstochowa, Poland, 5-9 juillet 2021 qui a eu lieu en ligne. A l'issue de ce congrès, une revue courte dédiée à la réaction des phosphonodithioformiates avec les amines a été soumise pour publication :

Phosphonodithioformate-Amine Coupling reaction: from basic discovery to application for the functionalization of liposomes.

Montassar Khalil, Dany Jeanne Dit Fouque, Mathieu Berchel, Aurore Fraix, Salvatore Sortino, Antony Memboeuf and Paul-Alain Jaffrès

Phosphorus, Sulfur and silicon and the related elements, Accepté le 25/11/2021

Le chapitre suivant, présentera les résultats obtenus lors d'une mobilité internationale et qui vise à modifier la surface d'un liposome par un motif pouvant libérer des radicaux NO dans le but de développer des solutions liposomales bactéricides.

I. Partie expérimentale

This part is common for all experiment sections:

Materials: All reagents were purchased from commercial sources (Aldrich, TCI) and used as received. Solvents were dried with a MBRAUN solvent purification system and kept under molecular sieve. Water milli Q was used as a solvent in all formulations.

NMR Spectra: For NMR spectroscopy, Bruker Avance 400 (^1H : 400.1 MHz, ^{13}C : 100.6 MHz, T = 293 K) or Bruker Avance 500 (^1H : 500.1 MHz, ^{13}C : 125 MHz, T = 293 K) were used. All chemical shifts are reported in δ [ppm] (multiplicity, coupling constant J , number of protons) relative to the solvent's residual peaks as the internal standard (CDCl_3 : ^1H : δ = 7.26 ppm, ^{13}C : δ = 77.16 ppm). The coupling constants are given in Hertz [Hz]. Abbreviations used for signal multiplicity: ^1H -NMR: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet.

Mass Spectra:

Characterization of organic compounds: Mass spectra were recorded with the autoflex III Brucker MALDI-TOF mass spectrometer (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) was used as matrix) and with a SYNAPT XS High Resolution Mass Spectrometer (ESI-qTOF).

Analysis of liposomal solutions: Mass spectrometry experiments were carried out using a QqQ Ultima Platinum (Waters) mass spectrometer equipped with a Z-spray ionization source and operated in the positive ion mode.

Dynamic Light Scattering (DLS): The mean particle diameter and zeta potential (ξ) were measured using a Malvern Zetasizer Nano ZS at 25 °C using 1 cm disposable polystyrene cuvettes.

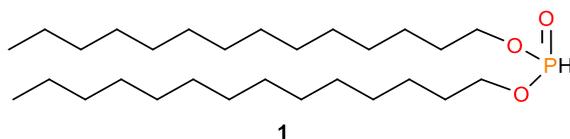
Dialysis: Dialysis step was performed with Cellu-Sep regenerated cellulose tubular membranes with a molecular weight cut off (MWCO) of 6-8 KDa.

Absorbance measurements: Absorbance spectra were recorded with JASCO V-760 spectrometer using quartz cells with a path length of 1 cm.

Fluorescence measurements: Fluorescence emission spectra were recorded with a Spex Fluorolog-2 (mod. F-111) spectrofluorimeter using quartz cells with a path length of 1 cm. Fluorescence lifetimes were recorded with the same fluorimeter equipped with a TCSPC Triple Illuminator.

Cryo-TEM: Vitrification of liposomal solutions was performed using an automatic plunge freezer (EM GP, Leica) under controlled humidity and temperature. The samples were deposited to glow-discharged electron microscope grids followed by blotting and vitrification by rapid freezing into liquid ethane. Grids were transferred to a single-axis cryo-holder (model 626, Gatan) and were observed using a 200kV electron microscope (Tecnai G² T20 Sphera, FEI) equipped with a 4k × 4k CCD camera (model USC 4000, Gatan). Micrographs were acquired under low electron doses using the camera in binning mode 1 and at a nominal magnification of 29.000x.

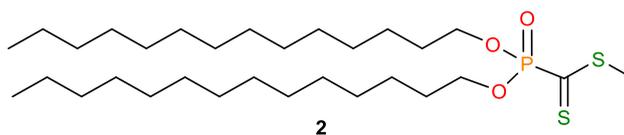
Ditetradecylphosphite **1**



To a solution of diphenylphosphite (2 g, 8.54 mmol) was added 1-tetradecanol (3.84 g, 17.83 mmol). The mixture was placed in Kugelrohr distillation apparatus at 140°C under reduced pressure (4.10⁻² mbar) for 4h. Phenol is removed by distillation and the undistilled compound corresponds to the desired product.

1 (4.2 g; Yield 98%): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ= 6.76 (d, ¹J_{HP} = 692 Hz ; 1H), 4.03 (m, 4H), 1.64 (m, 4H), 1.39 – 1.14 (m, 44H), 0.84 (t, ³J_{HH} = 6.7 Hz, 6H) ; ³¹P{¹H} NMR (162 MHz, CDCl₃) : δ= 8.46 ; ¹³C{¹H} NMR (125 MHz, CDCl₃) : δ=65.87 (d, ³J_{CP} = 5.85, CH₂-O-P), 31.93, 30.44, 30.39, 29.66, 29.56, 29.50, 29.36, 29.12, 25.50, 22.69, 14.11; HRMS (ESI-qTOF): m/z calcd for C₂₈H₅₉O₃PNa [M+Na]⁺= 497.4099; observed [M+Na]⁺=497.4095.

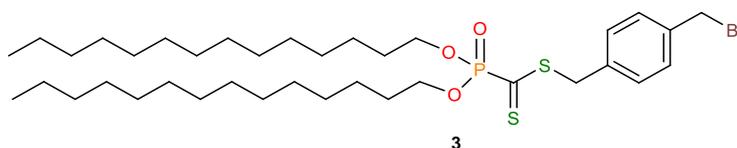
Methyl (bis(tetradecyloxy)phosphoryl)methanedithioate **2**



To a mixture of NaH (262 mg, 10.92 mmol) in 40 mL of anhydrous tetrahydrofuran placed in a schlenk flask under nitrogen, a solution of phosphite **1** (4g, 8.4 mmol) in 10 mL of THF is added at room temperature. After the addition, the mixture is heated at 54°C for 4h (leading to a limpid solution) (monitoring by ^{31}P NMR with D_2O as an internal standard in a sealed capillary, a peak at +151 ppm is observed). Then, the solution was cooled up to -78°C and carbon disulfide was added (3.83 g, 3 mL, 50.4 mmol 6eq) for 30 min. The mixture is stirred for 1.5h at room temperature and methyl iodide (1.3 g, 0.57 mL, 9.2 mmol, 1.1eq) is subsequently added. After stirring for an additional 2h, the mixture is washed with a saturated aqueous solution of ammonium chloride and is extracted twice with 60 mL of ethyl acetate. The organic phase is washed with a saturated solution of sodium chloride, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated in vacuum. The crude product was purified by chromatography on silica gel (eluent: n-hexane/ethyl acetate: from 100:0 to 70/30 in volume). Compound **2** was isolated as a purple solid (1.5 g; 32% yield).

Rf (0.42 n-hexane : ethyl acetate 90 : 10) : ; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ = 4.23 – 4.15 (m, 4H), 2.71 (s, 3H), 1.75 – 1.69 (m, 4H), 1.39 – 1.27 (m, 49H), 0.89 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, 6H) ; $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3) : δ = -1.71, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, CDCl_3) : δ = 229.63 (d, $^1J_{\text{CP}} = 176.6$ Hz, C=S), 68.61 (d, $^3J_{\text{CP}} = 6.98$, $\text{CH}_2\text{-O-P}$), 31.93, 29.69, 29.66, 29.57, 29.50, 29.37, 29.11, 25.41, 22.69, 19.22, 14.12 , MALDI- TOF (matrix: UTL HCCA) : m/z calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{61}\text{O}_3\text{PS}_2+\text{K}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 587.369$; observed $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 587.478$. HRMS (ESI-qTOF): m/z calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{61}\text{O}_3\text{PS}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 565.3878$; observed $[\text{M}+\text{H}]^+ = 565.3878$, purity (Flash chromatography – detection EDLS) : >95%.

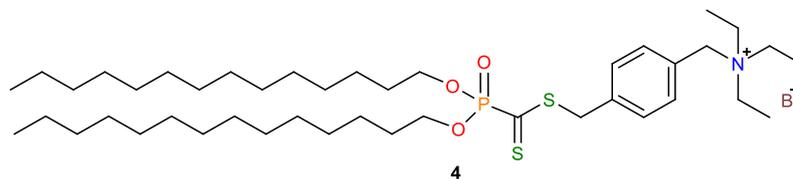
4-(Bromomethyl)benzyl (bis(tetradecyloxy)phosphoryl)methanedithioate **3**



To a mixture of NaH (197 mg, 8.21 mmol 1.3 eq) in 30 mL of anhydrous THF, a solution of phosphite **1** (3 g, 6.32 mmol) in 7.5 mL of THF is added under stirring at room temperature. At the end of the addition the mixture is heated to 54°C for 4h, then cooled down to -78°C and treated with anhydrous carbon disulfide (2.89 g, 37.92 mmol, 2.29 mL, 6 eq). Then, the solution is stirred for 1h at room temperature and dibromo-para-xylene (5 g, 18.96 mmol, 3 eq) in 15 mL of anhydrous DMF and 10 mL of anhydrous THF under heat is subsequently added. After stirring at 25°C for an additional night, the mixture is filtrated and then concentrated in vacuum. The crude product is precipitated, filtered and evaporated several times in hexane. The precipitation aims to remove most of the excess of para-xylene. Finally, the mixture is evaporated a last time and chromatographed on silica gel by using a mixture of n-hexane/ethyl acetate 10:0.5 as eluent. The final product is obtained with a 24% yield with a 1.1 g of pure product **3**.

Rf (0.2 Hexane : ethyl acetate 10 : 0.5): $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ = 7.38 – 7.30 (m, 4H), 4.49 (s, 4H), 4.24 – 4.16 (m, 4H), 1.74 – 1.64 (m, 4H), 1.38 – 1.27 (m, 49H), 0.90 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, 6H) ; $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3) : δ = -1.28 ; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, CDCl_3) : δ = 228.14 (d, $^1J_{\text{CP}} = 175.46$ Hz, C=S), 137.68, 134.12, 129.75, 129.49, 129.36, 68.76 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.2$ Hz, 6H, $\text{CH}_2\text{-O-P}$), 40.00, 32.80, 31.94, 30.40, 30.36, 29.69, 29.67, 29.58, 29.51, 29.37, 29.12, 25.41, 22.70, 14.13.

N-(4-(((bis(tetradecyloxy)phosphoryl)carbonothioyl)thio)methyl)benzyl)-*N,N,N*-triethylammonium bromide **4**



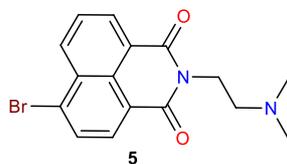
To a solution of phosphonodithioester **3** (200 mg, 0.27 mmol) in 5 mL of CHCl_3 we added 2 equivalents of triethylamine (73 μL) and the mixture was stirred at room temperature. The formation of the final product was monitored by $^1\text{H NMR}$ and $^{31}\text{P NMR}$. The reaction was stopped after 24h and the crude

product was purified by chromatography on silica gel (eluent: methylene chloride/methanol: 100/5 in volume). The final product is obtained with a quantitative yield (204 mg).

Rf (0.4 DCM: MeOH 90: 10): $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.58 (d, $^3J_{\text{HH}}$ = 8.1 Hz, 2H), 7.48 (d, $^3J_{\text{HH}}$ = 8.1 Hz, 2H), 4.85 (s, 2H), 4.51 (s, 2H), 4.23 – 4.16 (m, 4H), 3.44 – 3.40 (m, 6H), 1.73 – 1.69 (m, 4H), 1.48 – 1.45 (m, 4H), 1.38 – 1.36 (m, 12H), (m, 54H), 0.88 (t, $^3J_{\text{HH}}$ = 6.8 Hz, 19H). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3): δ = -1.42; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 227.80 (d, $^1J_{\text{CP}}$ = 175.31 Hz, C=S), 137.11, 133.11, 132.91, 130.29, 126.97, 68.76 (d, $^3J_{\text{CP}}$ = 7.06 Hz, $\text{CH}_2\text{-O-P}$, 4H), 61.01, 53.18, 39.26, 31.92, 30.42, 30.37, 29.69, 29.66, 29.58, 29.51, 29.36, 29.12, 25.41, 22.68, 14.12, 8.62; MALDI-TOF (matrix: UTL HCCA): m/z calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{81}\text{NO}_3\text{PS}_2[\text{M}]^+$ = 754.539; observed $[\text{M}]^+$ = 754.641. HRMS (ESI-qTOF): m/z calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{81}\text{NO}_3\text{PS}_2[\text{M}]^+$ = 754.5396; observed $[\text{M}]^+$ = 754.5397; Purity (Flash chromatography – detection EDLS) > 95%

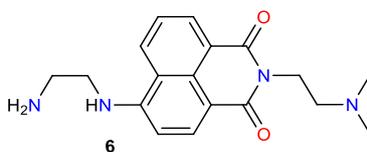
6-((2-aminoethyl)amino)-2-(2-(dimethylamino)ethyl)-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione **6**

The compound **6** was synthesized in two steps (**A** and **B**) as detailed below:



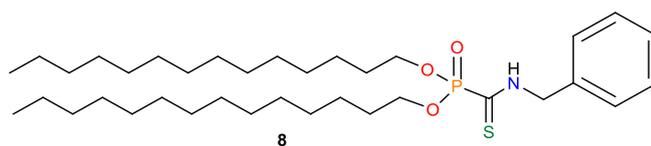
A) A solution of 4-bromo-1,8-naphthalic anhydride (1.193 g, 4,307 μmol), N,N-dimethylethylenediamine (515 μL , 4,715 μmol , 1.1 equiv) in EtOH (45 mL) was heated for 4h at $^{\circ}\text{C}$. After cooling to ambient temperature, the reaction mixture was diluted with H_2O and the precipate was collected using vacuum filtration and washed with H_2O to give the title compound as a beige powder.

5 (1.34 g, Yield 90%) : $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ = 8.64 (d, $^3J_{\text{HH}}$ = 7.2 Hz, 1H), 8.55 (d, $^3J_{\text{HH}}$ = 8.4 Hz, 1H), 8.39 (d, $^3J_{\text{HH}}$ = 7.9 Hz, 1H), 8.02 (d, $^3J_{\text{HH}}$ = 7.9 Hz, 1H), 7.87 – 7.78 (m, 1H), 4.35 – 4.26 (m, 2H), 2.65 (t, $^3J_{\text{HH}}$ = 7.0 Hz, 2H), 2.34 (s, 6H).



B) Compound **5** (0.52g, 1.5 mmol) and ethylenediamine (200.34 μ L, 3mmol) were dissolved in methoxyethanol (12 ml). The reaction mixture was refluxed at 130°C for 7h. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography using CH₂Cl₂/MeOH/ammonium hydroxide (10 :1 : 0,1) as the eluent to afford compound **5** as an orange solid. **6** (340 mg, Yield 70%) : ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ = 8.53 (m, 1H), 8.40 (d, ³J_{HH} = 8.4 Hz, 1H), 8.16 (d, ³J_{HH} = 7.9 Hz, 1H), 7.57 (t, ³J_{HH} = 7.86, 7.9 Hz, 1H), 6.65 (d, ³J_{HH} = 8.5 Hz, 1H), 6.25 (s, 1H), 4.37 – 4.24 (m, 2H), 3.39 (m, 2H), 3.21 – 3.12 (m, 2H), 2.71 – 2.56 (m, 2H), 2.36 (s, 6H). Maldi TOF (matrix: UTL HCCA): [M]⁺ calcd for C₁₈H₂₂N₄O₂= 326.17; observed [M+H]⁺=327.30; λ_{abs} = 430 nm in water.

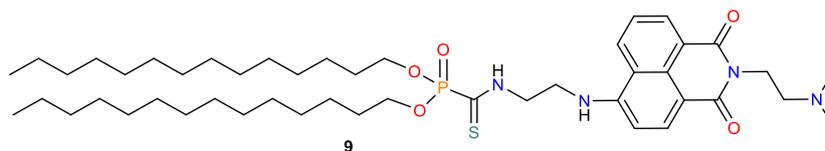
Ditetradecyl (benzylcarbamothioyl)phosphonate **8**



A solution of the purple compound **2** (60mg, 0.1 mmol) in 10 mL of anhydrous THF is placed in a round-bottom flask. Phenylmethanamine (13mg, 0.12 mmol, 14.2 μ l) in 5 ml of THF was added slowly to the solution of compound **2** under magnetic stirring at room temperature. The purple color of the reaction turned instantly into yellow color. Then, the solvent is evaporated and the unreacted phenylmethanamine is removed by distillation. The undistilled compound correspond to the desired product.

8 (56 mg ; Yield 90%) : ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ = 9.24 (s, 1H), 7.41 – 7.23 (m, 5H), 4.82 (t, ³J_{HH} = 8.5 Hz, 2H), 4.25 – 4.03 (m, 4H), 1.75 – 1.60 (m, 4H), 1.44 – 1.14 (m, 45H), 0.87 (t, ³J_{HH} = 6.8 Hz, 6H). ³¹P{¹H} NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = -0.92, ¹³C{¹H} NMR (75 MHz, CDCl₃) : δ = 193.2, 141.3, 128.5, 126.3, 64.2, 44.7, 29.4, 25.2, 13.9, Maldi TOF (matrix: UTL HCCA): [M]⁺ calcd for C₃₆H₆₆NO₃PS= 623.45 ; observed [M+H]⁺=624.45.

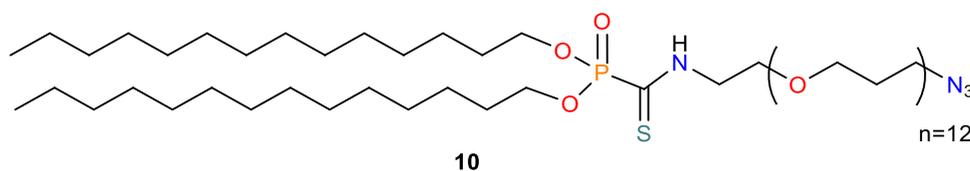
Ditetradecyl((2-((2-(2-(dimethylamino)ethyl)-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinolin-6-yl)amino)ethyl)carbamothioyl)phosphonate **9**



6 (58 mg, 0.177 mmol) in 5 mL of THF was added dropwise at 20°C to a solution of compound **2** (100 mg, 0.177 mmol) in 5 mL of anhydrous tetrahydrofuran. The purple color of the reaction turned instantly into yellow color. Then, the solvent is evaporated and the crude product was purified by chromatography silica gel (methylene chloride/methanol: from 95/5 to 80/20 in volume). Compound **6** was isolated as an orange wax (150 mg; 74%).

Rf (0.36 DCM : MeOH 95 : 5): $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ = 8.42 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, 1H), 8.27 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 1H), 8.08 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 1H), 7.43 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, 1H), 6.49 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, 1H), 6.36 (s, 1H), 4.34 – 4.26 (m, 2H), 4.26 – 4.18 (m, 2H), 4.13 (m, 4H), 3.66 (m, 2H), 2.70 (m, 2H), 2.40 (s, 6H), 1.66 – 1.52 (m, 4H), 1.18 (m, 45H), 0.85 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz, 6H). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, CDCl_3) : δ = -1.10, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, CDCl_3) : δ = 197.05 (d, $^1J_{\text{CP}} = 180.8$ Hz, C=S), 167.24 (C=O), 167.60 (C=O), 151.97 (C_{quat}-NH), 136.85, 133.72, 132.32, 129.53, 127.28, 125.49, 122.90, 113.18, 106.50, 72.54 (d, $^3J_{\text{CP}} = 7.36$, CH₂-O-P), 59.62, 48.23 (N(CH₃)₂), 45.94 (d, $^1J_{\text{C-H}} = 8.65$, NH-CH₂-CH₂-NH), 45.52, 40.31, 34.63, 32.99, 32.38, 32.26, 32.17, 32.07, 31.17, 28.04, 25.40, 16.83. (MALDI-TOF (matrix: UTL HCCA): m/z calcd for C₄₇H₇₉N₄O₅PS+H [M+H]⁺=843.550; observed [M+H]⁺=843.811; HRMS (ESI-qTOF): m/z calcd for C₄₇H₇₉N₄O₅PS+H [M+H]⁺ = 843.5587 ; observed [M+H]⁺=843.5588; λ_{abs} = 443 nm in CHCl₃. Purity (HPLC) > 98%.

Synthesis of compound **10**



A solution of PEG600-amine/N₃ **7** (240 mg, 0.389 mmol) in 5 mL of THF was added slowly to the solution of compound **2** (200 mg, 0.354 mmol) in 5 mL of tetrahydrofuran. The purple color of the solution turned instantly into yellow color. Then, the solvent is evaporated and the residue is purified by

chromatography on silica gel (eluent: methylene chloride/methanol: from 90/10 to 60/40 ratio).

Compound **9** was isolated as a yellow wax (295 mg; 74% yield).

Rf (0.62 DCM : MeOH 95 : 5); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ = 4.07 – 4.16 (m, 4H), 3.85 – 3.84 (m, 2H), 3.70-3.62 (m, 52H), 3.33-3.36 (m, 2H), 1.64-1.67 (m, 4H), 1.21 – 1.26 (m, 45H), 0.82-0.85 (t, $^3J_{\text{HH}}$ = 6.9 Hz, 6H). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}\text{NMR}$ (162 MHz, CDCl_3) : δ = -1.15, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) : δ = 193.3 (d, $^1J_{\text{C-P}}$ = 181.3 Hz, C=S), 70.4(m), 69.89, 68.8 (d, $^3J_{\text{C-P}}$ = 6.91, CH₂-O-P, 4H), 67.5, 50.5, 44.7, 31.7, 29.5, 25.23, 23.9, 13.97, MALDI-TOF (matrix: UTL HCCA): m/z calcd for $\text{C}_{55}\text{H}_{111}\text{N}_4\text{O}_{15}\text{PS}+\text{K}$ $[\text{M}+\text{K}]^+$ = 1169.714 ; observed $[\text{M}+\text{K}]^+$ =1169.742 ; HRMS (ESI-TOF): m/z calcd for $\text{C}_{55}\text{H}_{111}\text{N}_4\text{O}_{15}\text{PSK}$ $[\text{M}+\text{K}]^+$ = 1169.7141 ; observed $[\text{M}+\text{K}]^+$ =1169.7159;

Chapitre III : Modification de la surface des liposomes par une molécule photosensible et investigation de l'effet antimicrobien

Chapitre III : modification de la surface des liposomes par une molécule photosensible et investigation de l'effet antimicrobien

I. Etude bibliographique

I.1 Histoire de l'oxyde nitrique

Au début de sa découverte l'oxyde nitrique a été considéré comme un polluant atmosphérique. Il est généralement produit par certains procédés industriels ou encore par les gaz d'échappements¹⁴⁵ de moteurs thermiques (e.g. diesel). Il peut également être formé lors des phénomènes naturels tels que les orages.¹⁴⁶ L'oxyde nitrique peut s'oxyder en présence d'oxygène atmosphérique pour former le dioxyde d'azote (NO₂) qui est un puissant gaz à effet de serre impliqué dans le dérèglement climatique.¹⁴⁷

Cette mauvaise réputation des propriétés chimiques du NO a persisté longtemps jusqu'à la découverte de son rôle dans divers processus cellulaires et physiologiques par les trois chercheurs Murad, Furchgott et Ignarro. Dans une étude fondatrice publiée en 1980 dans la revue scientifique *Nature*, un phénomène inconnu a été rapporté pour la première fois par Furchgott et Zawadzki¹⁴⁸. Les deux auteurs ont montré que l'endothélium libère un agent aux propriétés vasodilatatrices et que son action peut être bloquée par la présence de l'hémoglobine. Cet agent est alors baptisé comme le « facteur relaxant dépendant de l'endothélium » (EDRF). Cette étude a ensuite été consolidée par les travaux de Murad¹⁴⁹ en 1983 et ceux d'Ignarro¹⁵⁰ et Palmer¹⁵¹ en 1987 conduisant à identifier l'EDRF qui est en fait l'oxyde nitrique NO. Avec cette découverte l'oxyde nitrique a reçu le titre de « Molécule de l'année » en 1992 par le magazine *Science*¹⁵², et en 1998 les trois chercheurs ont obtenu le prix Nobel de médecine.

I.2 Propriétés, caractéristiques et sources de production de NO

L'oxyde nitrique NO est une espèce radicalaire constituée par un atome d'oxygène et un atome d'azote dont le radical est placé à 60% sur l'atome d'azote¹⁵³. Ce radical diatomique, de nature liposoluble et non chargée, est caractérisé par une courte durée de demi-vie *in vivo* de l'ordre de 1 à 5 secondes¹⁵⁴,

due à sa réactivité très élevée. Sa petite taille moléculaire et sa faible solubilité dans l'eau, d'environ 2 mmol/L¹⁵⁵ à température ambiante, lui permettent de franchir les membranes cellulaires. L'oxyde nitrique présente plusieurs propriétés en biologie. Il joue un rôle important dans la régulation de plusieurs processus biologiques tels que la vasodilatation¹⁵⁶, la neurotransmission¹⁵⁷ ou la sécrétion hormonale¹⁵⁸. NO pourrait également être utilisé à des fins thérapeutiques comme : i) agent anticancéreux¹⁵⁹, en inhibant les voies métaboliques clés, pour bloquer la croissance ou tuer les cellules cancéreuses. ii) agent antimicrobien¹⁶⁰, en exerçant des effets cytotoxiques envers les microorganismes pathogènes ou en tant qu'agent anti-oxydant^{161,162,163}.

La production de l'oxyde nitrique dans l'organisme est assurée par la présence d'un acide α -aminé, la L-arginine, qui subit deux oxydations catalysées par une enzyme oxygénase de type NO-synthase (NOS) en présence d'une coenzyme de type nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) pour donner L-citruline et NO.



L'implication de NO dans divers processus biologiques et la diminution de la sécrétion de L-arginine par le corps humain en avançant dans l'âge ont incité les scientifiques à chercher d'autres sources exogènes pour produire NO. Il existe plusieurs classes de donneurs de NO selon leur réactivité chimique ou selon le mécanisme de relargage de NO. La libération de ce radical peut être provoquée par divers dispositifs externes (température, ultrasons, champ magnétique) ou internes (faible pH tissulaire, présence d'enzymes¹⁶⁴). La libération de NO après une photo-activation a été également utilisée dans le cadre de la thérapie photodynamique. La stimulation lumineuse apparaît comme une stratégie prometteuse pour introduire un agent actif dans un environnement biologique avec un contrôle spatio-temporel du site de délivrance. Dans d'autres cas la libération de NO peut être provoquée *via* des réactions chimiques du donneur avec les acides, des métaux (fer, cobalt, ruthénium)¹⁶⁵ ou des thiols¹⁶⁶. Le Tableau 11 résume d'une manière non-exhaustive quelques donneurs de NO décrits dans la littérature^{163,166,167}.

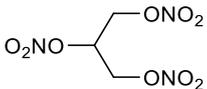
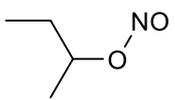
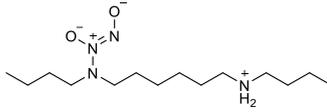
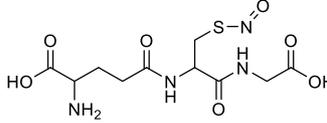
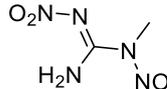
Famille	Exemple commun	Structure	Autres exemples	Mode d'activation
Nitrates (RONO₂)	Nitroglycérine		Glycéryl trinitrate pentaerythryl tetranitrate	Thiols Enzymes
Nitrite	Isobutyl nitrite		Butyl nitrite Amyl nitrite Tert-butyl nitrite	Hydrolyse Trans-nitrosation Thiols Lumière Température Enzymes
N-diazaniumdiolates (NONOates)	<i>N,N'</i> -dibutylhexaméthylènediamine diazeniumdiolates		Polyéthylèneimine(N ONOates) Polyméthacrylate(N ONOates)	Hydrolyse Température Lumière Enzymes
S-nitrosothiols (RSNOs)	<i>S</i> -nitrosoglutathione		<i>S</i> -nitroso-Nacétylcystéine <i>S</i> -nitroso- <i>N</i> -acétylpénicillamine	Spontanément Thiols Lumière
Complexes-NO	Nitroprusside de sodium (SNP)	$\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]_2\text{H}_2\text{O}$	Nitrosyl ruthénium Trans- $[\text{RuCl}(\text{NO})(\text{cyclam})]_2^+$	Réducteurs Nucléophiles Lumière Thiols Enzymes
N-nitrosamines	<i>N</i> -nitrosoguanidines		<i>N</i> -nitrosamides <i>N</i> -nitrosocarbamates	·OH (radical) Lumière

Tableau 11. Liste non-exhaustive des donneurs de NO développés dans la littérature et leurs modes d'activation^{163,166,167}.

Il est important de rappeler que les effets biologiques de ce radical ne sont pas les mêmes selon le site, la concentration et la dose administrée et cela peut conduire à des effets totalement antagonistes. Par exemple, l'administration de fortes doses de NO induit l'apoptose alors qu'à des faibles doses il favorise la prolifération cellulaire. La durée de demi-vie assez courte de NO en milieu biologique est un facteur limitant son utilisation à des fins thérapeutiques.

I.3 Utilisation des donneurs de NO comme agents antimicrobiens

Afin d'exploiter le potentiel antibactérien du NO pour des applications médicales, il est impératif de contrôler son relargage. Deux familles de donneurs exogènes de NO sont fréquemment utilisées dans la lutte antibactérienne, les NONOates^{168,169} et les RSNOs^{170,171}, et relarguent NO sous différentes conditions (spontanément dans des conditions physiologique, température, UV-visible, acides, enzymes...). Récemment, la 4-nitro-3-(trifluorométhyl)aniline¹⁶² et ses dérivés ont été utilisés comme

donneurs de NO pour une action antibactérienne. Cette famille de donneurs de NO permet un contrôle du relargage de NO qui est déclenché par activation lumineuse sans générer de sous-produits toxiques. Le précurseur est stable dans l'obscurité¹⁷²⁻¹⁷⁴ (Figure 112).

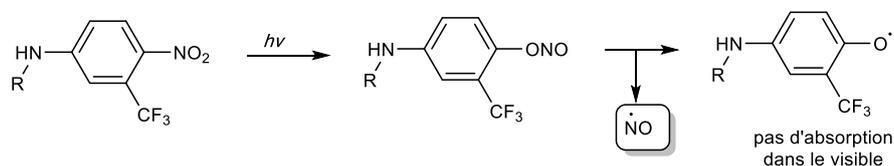


Figure 112. Mécanisme de libération du NO à partir du 4-nitro-3-(trifluorométhyl)aniline après une excitation avec une lumière visible ($\lambda_{exc} = 420$ nm).

Di Bari et al.¹⁷⁵ ont encapsulé une molécule hydrophobe donneuse de NO, le *N*-dodecyl-3-(trifluorométhyle)-4-nitrobenzenamine (Figure 113 – composé **a**), dans des nanoparticules à base de calix[4]arène polycationiques (Figure 113 – composé **b**).

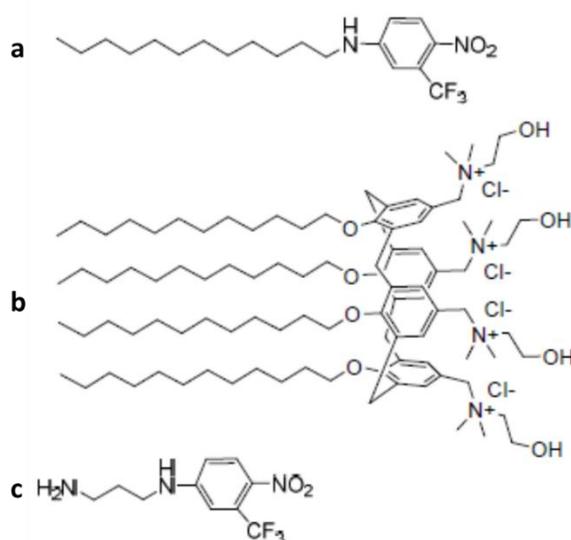


Figure 113. Structures des molécules utilisées dans l'étude de Di Bari et al.¹⁷⁵

L'excitation de ces plateformes supramoléculaires avec une lumière visible a montré une efficacité remarquable de production de NO comparée à celle de la molécule **c** libre (Figure 113- composé **c**). Cette production de NO a montré une activité antibactérienne importante vis-à-vis les souches bactériennes, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538, Gram positive) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027, Gram négative).

Marino et al.¹⁷⁶ ont préparé un film polymère antibactérien en intégrant la molécule photosensible (**d**, Figure 114) pouvant libérer NO. La molécule a été préparée en reliant la nitroaniline avec une structure

de la famille des coumarines via un espaceur alkyle de 8 carbones. La molécule photosensible **d** est non fluorescente et est capable de produire du NO sous excitation lumineuse avec la libération d'un sous-produit fluorescent.

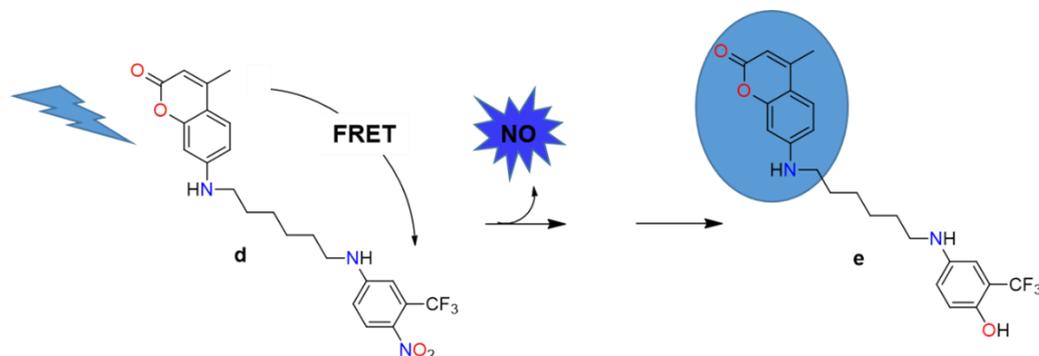


Figure 114. Schématisation du processus de formation de NO et du sous-produit fluorescent **e** à partir du composé **d** (non fluorescent), après excitation avec une lumière visible.

L'incorporation de la molécule **d** avec un polymère de type poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA) a permis de former un film non-fluorescent. Le film préparé s'est avéré stable dans l'obscurité et génère du NO avec un contrôle spatio-temporel après activation par la lumière visible. Le relargage de NO peut être activé également, par la lumière du soleil et peut être suivi par la fluorescence du sous-produit **e** qui peut jouer le rôle d'un indicateur optique pour déterminer la concentration du NO. Le film biocompatible PLGA obtenu a montré une activité antibactérienne significative contre *E. coli*.

Plusieurs difficultés peuvent limiter l'utilisation de petites molécules précurseurs de NO *in vivo* telles que le manque de stabilité, de spécificité ainsi qu'une libération rapide et incontrôlée de NO. Pour éviter ce type de difficultés, l'utilisation d'un système de transport (vectorisation) a été envisagée.¹⁷⁷ Des polymères^{178,179}, des gels¹⁸⁰, des films nanostructurés¹⁷⁶, des nanoparticules¹⁸¹ (liposomes, micelles) ont été utilisés comme systèmes de transport de précurseurs de NO. Les deux rubriques (I.4 et I.5) font l'objet d'une étude bibliographique sur l'utilisation des liposomes pour véhiculer des donneurs de NO (I.4) puis sur les systèmes photo-activables véhiculés par des liposomes (I.5).

I.4 Utilisation de composés amphiphiles pour la délivrance de NO

L'utilisation des liposomes en tant que plateformes pour administrer NO a reçu beaucoup d'intérêt dans la littérature.

En 2009 Huang¹⁸² et al. ont développé une nouvelle technique d'encapsulation de NO sous sa forme gazeuse seul (NO-LP {NO-liposomes}) ou coencapsulé avec de l'Argon (NO/Ar- LP) en utilisant des liposomes formés à base de DPPC, DOPC et du cholestérol. L'étude du profil de relargage du NO à partir du premier système (NO-LP) a montré un relargage de NO égale à 50% de la quantité de NO encapsulée en 10 minutes suivie d'un relargage régulier pendant 8 heures. L'utilisation du système (NO/Ar-LP) comme une plateforme de vectorisation a montré une augmentation de la quantité de NO administrée de sept fois par rapport au NO libre. Cette étude souligne le rôle des liposomes en la protection et l'administration du NO sous sa forme gazeuse.

Jardeleza et al.¹⁸³ ont démontré la présence d'un effet anti-biofilm significatif de formulations liposomales (LUV et MLV) à base de lécithine d'œuf et de DPPG en encapsulant un donneur de NO de type mononitrate d'isosorbide (ISMN) *in vitro* contre la souche *Staphylococcus aureus*. Ils ont démontré également, qu'à des concentrations élevées (25 mM) en lipides la réduction du biofilm est plus importante qu'à des faibles concentrations (5 mM). De plus, la concentration a influencé le taux d'encapsulation qui a été 5 fois plus important à une concentration élevée qu'à une concentration faible.

En 2017 Suchyta et al.¹⁸⁴ ont démontré la possibilité de contrôler la libération de NO, à partir de liposomes encapsulant quatre molécules donneuses de NO de type *N*-diazoniumdiolate (NONOate) en faisant varier la composition de la bicouche lipidique. Le profil de relargage du NO de chacun des quatre donneurs de NO encapsulés a montré une cinétique de libération de NO prolongée par rapport aux donneurs de NO libres. Cette augmentation du temps de demi-vie a été attribuée au rôle de la bicouche lipidique qui constitue une barrière physique qui limite la diffusion ou l'échange de protons entre la bicouche et la cavité aqueuse. Aussi, ils ont démontré que plus le donneur de NO encapsulé est stable plus la libération de NO à partir de ces liposomes est importante. De plus, le choix de la bonne composition du liposome est un facteur déterminant pour contrôler cette cinétique de libération de NO. Par exemple, l'utilisation d'un mélange de DPPE/DPPC 10 : 90 conduit à une libération de NO avec

une demi-vie ($t_{1/2} = 3,7$ h) alors qu'un système mono-lipidique fait apparaître des temps de $\frac{1}{2}$ vie plus court ou plus long selon la nature du composé amphiphile (DPPC $t_{1/2} = 2,5$ h ; DPPE $t_{1/2} = 6,6$ h).

Le bon choix du donneur de NO, le choix de la bonne composition en lipides ainsi que la concentration en lipides sont des facteurs qui peuvent augmenter le profil de relargage du NO dans des liposomes.

Dans le but d'élargir le champ d'application de NO, des liposomes encapsulant ou incorporant des molécules photo-activables donneuses de NO respectivement dans la cavité aqueuse ou greffées à leurs surfaces, ont été préparés. Le relargage de NO à partir de ces liposomes est alors déclenché par stimulation lumineuse (e.g. utilisation de la lumière visible). La rubrique suivante a pour objectif de rappeler les quelques études utilisant des donneurs de NO photo-activables qui ont été inclus dans des liposomes.

1.5 Utilisation des molécules photo-activables précurseurs de NO inclus dans des liposomes.

L'utilisation de liposomes en tant que plateforme pour la délivrance de NO à partir de molécules photosensibles, pouvant libérer du NO après une excitation avec une lumière visible, ont gagné beaucoup d'intérêt car ils permettent un relargage localisé et pourraient être utilisés pour diverses applications. En 2008, Koehler et al.¹⁸⁵ ont réussi à encapsuler un photo-donneur de NO de type nitrosothiol dans des liposomes caractérisés par une taille moyenne de 150 nm de diamètre (Figure 115).

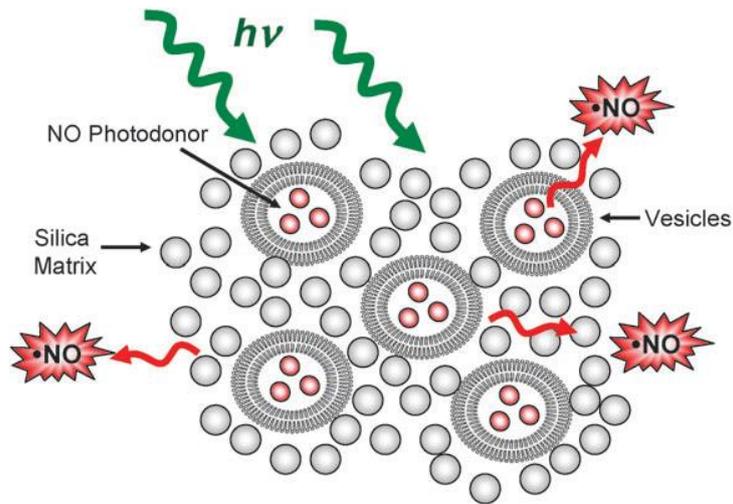


Figure 115. Représentation schématique du piégeage des liposomes encapsulant un photo-donneurs NO dans une matrice en silice¹⁶².

Par la suite, les vésicules ont été piégées dans des pores d'une matrice de culture cellulaire en silice. Au moment de l'excitation lumineuse, le dispositif libère NO dont la concentration se situe dans la gamme du nano-molaire. Les auteurs ont mis en évidence la possibilité de calibrer la concentration de NO libérée par l'existence d'une relation linéaire entre le flux de photons et la concentration de NO relarguée.

En 2015 Nakanishi¹⁸⁶ et son équipe ont préparé des liposomes photosensibles en incorporant à leur surface un donneur de NO photosensible et lipophile (un complexe de Ru nitrosyl $\{[Ru(L)Cl(NO)]\}$; L= *N,N'*-éthylène-bis(4-cholesteryl-hemisuccinate-salicylideneamine)). Le complexe est fonctionnalisé par deux motifs cholestérol puis ancré dans la membrane lipidique *via* l'interaction hydrophobe spécifique entre le cholestérol et la bicouche lipidique (Figure 116).

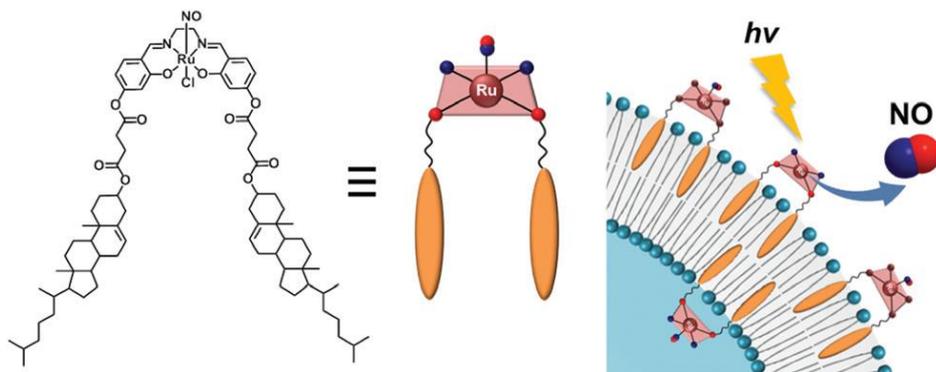


Figure 116. Illustration de la stratégie envisagée Nakanishi et al.¹⁸⁶

Cette plateforme moléculaire a montré un relargage de NO relativement efficace durant une période de 90 minutes. La concentration de NO relarguée est de l'ordre de $2,3 \times 10^{-6}$ M, qui constitue une concentration adéquate pour des applications anti-cancéreuses. Leur stratégie peut être généralisée à diverses molécules donneuses de NO.

Récemment, Sharma et al.¹⁸⁷ ont rapporté la fonctionnalisation de liposome par un donneur du NO, la 4-nitro-3-(trifluorométhyle) aniline (NTA) (Figure 117 - A). La molécule photosensible (NTA) a été introduite au moment de la formulation des liposomes par pré-fonctionnalisation *via* l'hexadécylamine modifié par la NTA (Figure 117 - B).

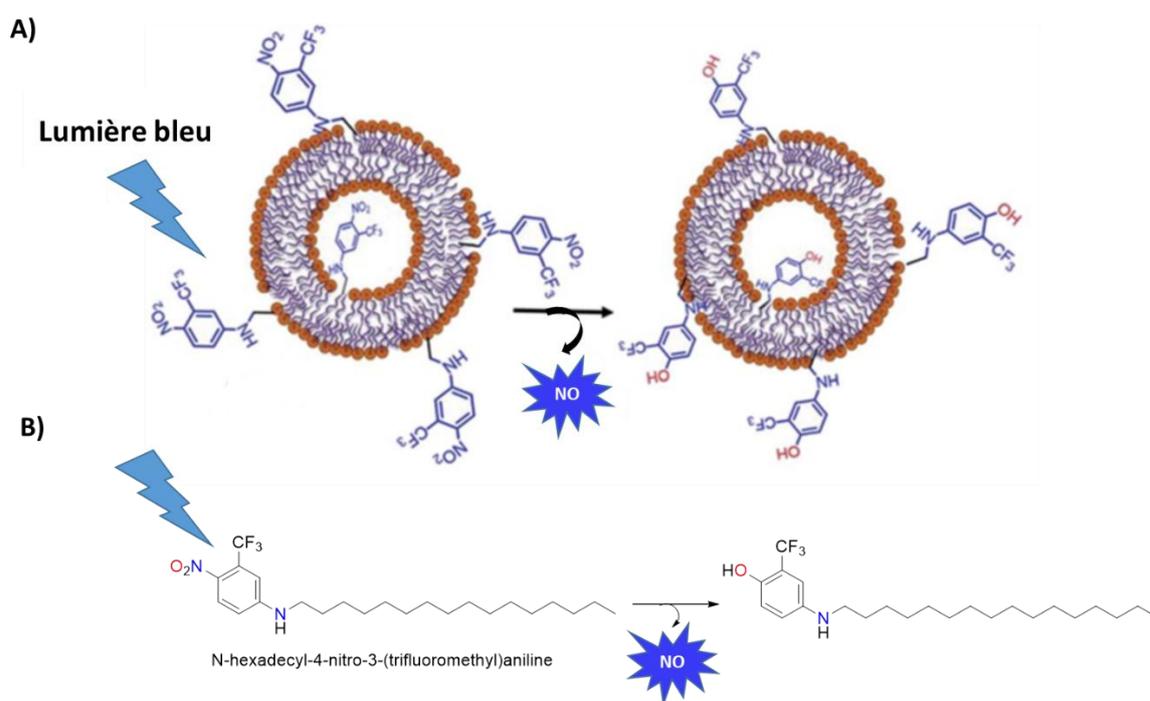


Figure 117. Représentation schématique de la fonctionnalisation des liposomes par NTA

Les liposomes modifiés par des molécules NTA ont montré une efficacité de photo-libération du NO au moment de l'irradiation avec une lumière bleue à 410 nm. La cinétique de relargage de NO a été suivie par des méthodes spectroscopiques, par UV-visible et par fluorescence. La détection et la quantification de NO ont été déterminées respectivement, par fluorescence (utilisation de la diaminofluorescein DAF) et par le test colorimétrique de Griess. L'évaluation de la toxicité des liposomes modifiés par les NTA sur des cellules Neuro 2A, une lignée cellulaire de neuroblastome de souris à croissance rapide, a montré l'absence de toxicité sur les cellules avant et après relargage de NO.

La préparation d'une plateforme unique qui combine simultanément un agent de diagnostic (sonde fluorescente) et un donneur de NO comme un agent thérapeutique a également été envisagée. Cette approche de théranostique impliquant l'utilisation de liposomes a été étudiée^{188,189}. Ostrowski et al.¹⁹⁰ ont préparé des liposomes encapsulant deux complexes, trans-Cr(L)(ONO)₂⁺ (L = cyclam = 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane, **CrONO**, ou L = mac = 5,7-diméthyle-6-anthracenylcyclam, **mac-CrONO**, fluorescent) dans le but de préparer des plateformes théranostiques libérant du NO pouvant être utilisées pour la thérapie des cancers (Figure 118).

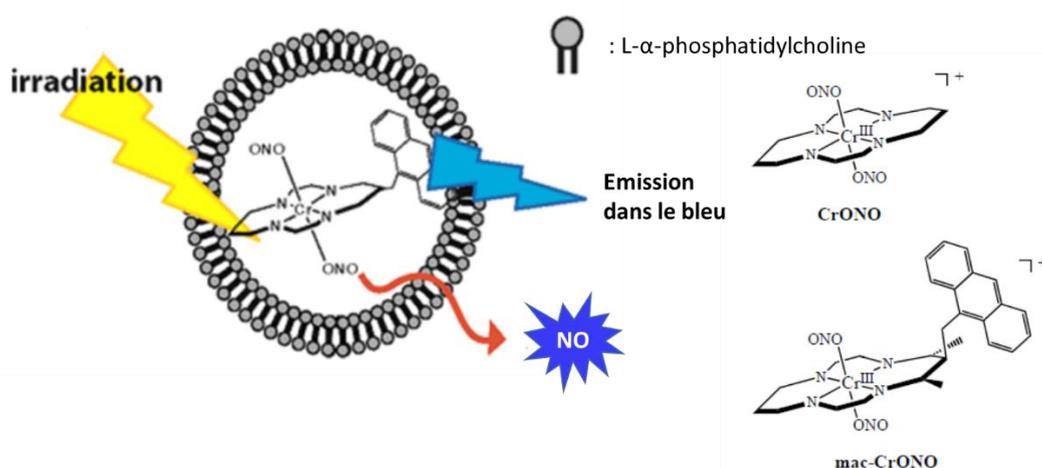


Figure 118. Représentation schématique de l'objectif de l'étude présentée par Ostrowski et al.¹⁹⁰

Les liposomes encapsulant les complexes CrONO et mac-CrONO ont montré une libération régulière et contrôlée de NO avec une concentration 5 fois plus grande, après photolyse, par rapport aux mêmes complexes non-encapsulés, qui présentent un relargage brusque de NO. De plus, le complexe fluorescent (mac-CrONO), présente l'émission d'une lumière bleue en plus du relargage de NO, ce qui promet le développement d'une thérapie théranostique dans laquelle le diagnostic et l'agent thérapeutique peuvent se produire simultanément par photolyse.

L'équipe de Tedesco¹⁹¹ a développé des liposomes PEGylés incluant un photosensibilisateur fluorescent donneur d'oxygène singulet (¹O₂), le phtalocyanine de zinc (ZnPC), et un complexe nitrosyl ruthénium [Ru(NH.NH)(tpy)NO]³⁺ en tant que composé photo-donneur de NO (Figure 119).

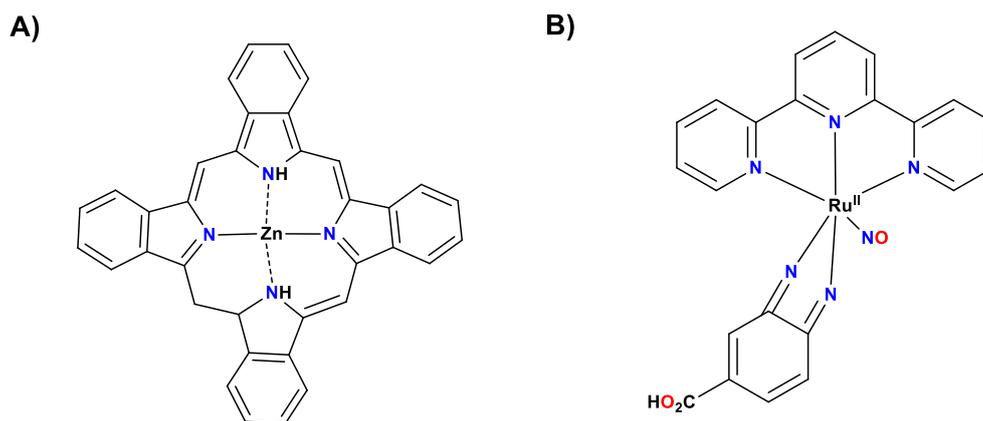


Figure 119. A) phthalocyanine de zinc (ZnPC), B) Complexe nitrosyl ruthénium [Ru(NH.NH)(tpy)NO]³⁺

Les auteurs ont observé une diminution de la fluorescence de ZnPC ainsi qu'une synergie entre le complexe nitrosyl ruthénium et le photosensibilisateur ZnPC qui a entraîné la production d'¹O₂ et du NO sous une simulation par une lumière visible continue à 675 nm. En effet, ils ont démontré la présence d'une interaction entre les deux composés qui déclenche un processus de transfert d'électrons du ZnPC au complexe nitrosyl provoquant un relargage de NO. Des études de toxicité *in vitro* sur des lignées cellulaires de mélanome de souris (B-16 F-10) comme modèle biologique n'ont pas montré de toxicité en l'absence de lumière. En revanche, 90% de cellules sont mortes à 5 μmol L⁻¹ de ZnPC et 0.05 mmol L⁻¹ du complexe nitrosyl ruthénium en présence d'une stimulation lumineuse. En effet, il s'agit de la combinaison optimale entre le photosensibilisateur et le donneur de NO pour obtenir un minimum de toxicité et un maximum d'efficacité pour agir sur les cellules cancéreuses.

Les études décrites dans cette introduction bibliographique montrent l'implication de l'oxyde nitrique dans divers processus physiologiques et pathologiques tels que son utilisation comme agent antimicrobien. L'assemblage de donneurs de NO avec des liposomes a montré une augmentation significative de l'efficacité du relargage de NO avec un contrôle spatio-temporel par rapport aux donneurs de NO administrés seuls. L'immobilisation de précurseurs de NO à la surface des liposomes a été effectuée dans la littérature seulement par pré-insertion et à notre connaissance leur immobilisation par post-fonctionnalisation n'a jamais été rapportés. La suite de ce chapitre s'intéressera à l'immobilisation d'une molécule photosensible, capable de relarguer du NO, à la surface d'un liposome

préformé par post-fonctionnalisation. Une caractérisation du relargage de NO par une méthode ampérométrique et une étude sur l'effet antimicrobien seront discutées.

II. Résultats et discussion

La première partie de cette étude consiste en la synthèse du composé photodonneur de NO qui sera appelé dans la suite du manuscrit NOP pour (NO Photo-donneur), la 4-nitro-3-(trifluorométhyl)aniline (composé **12**, Figure 120). Ce composé comportant une fonction amine primaire, il pourra ensuite être engagé dans une réaction PAC, avec le phosphonodithioformiate neutre dans un solvant organique dans le but d'isoler et de caractériser le produit de couplage. La suite du travail sera divisée en trois parties : La rubrique II-2 s'intéressera à la préparation des liposomes fonctionnalisés par le photo-donneur de NO. La photo-génération du NO à partir des liposomes fonctionnalisés avec la NOP par détection ampérométrique et par UV-visible fera l'objectif de la rubrique II-3. Cette partie a été réalisée en Italie (Catane) dans le cadre d'une mobilité internationale dans l'équipe de Pr S. Sortino.

La dernière partie s'intéressera à l'étude de l'activité photo-toxique des liposomes fonctionnalisés par du NO. Cette étude a été effectuée par l'équipe du Professeur T. Montier (INSERM U1078, Brest).

II.1 La synthèse de la nitroaniline (NOP) et du phosphonothioamide-NOP

La synthèse a été effectuée en une seule étape selon la procédure rapportée par Caruso et al.¹⁷² en faisant réagir le 4-chloro-1-nitro-2-(trifluorométhyle) benzène avec le propylène diamine à reflux pendant 3 jours (Figure 120).

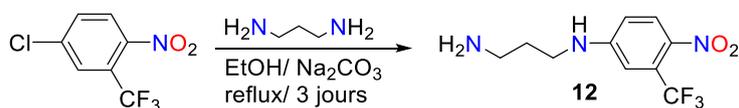


Figure 120. Schéma de synthèse de la nitroaniline (NOP) **12**

Le produit souhaité a été isolé après une purification par colonne à l'abri de lumière sous la forme d'un solide jaune avec un rendement de 36%. La structure du composé final a été confirmée par RMN-¹H, RMN-¹³C et par maldi-TOF.

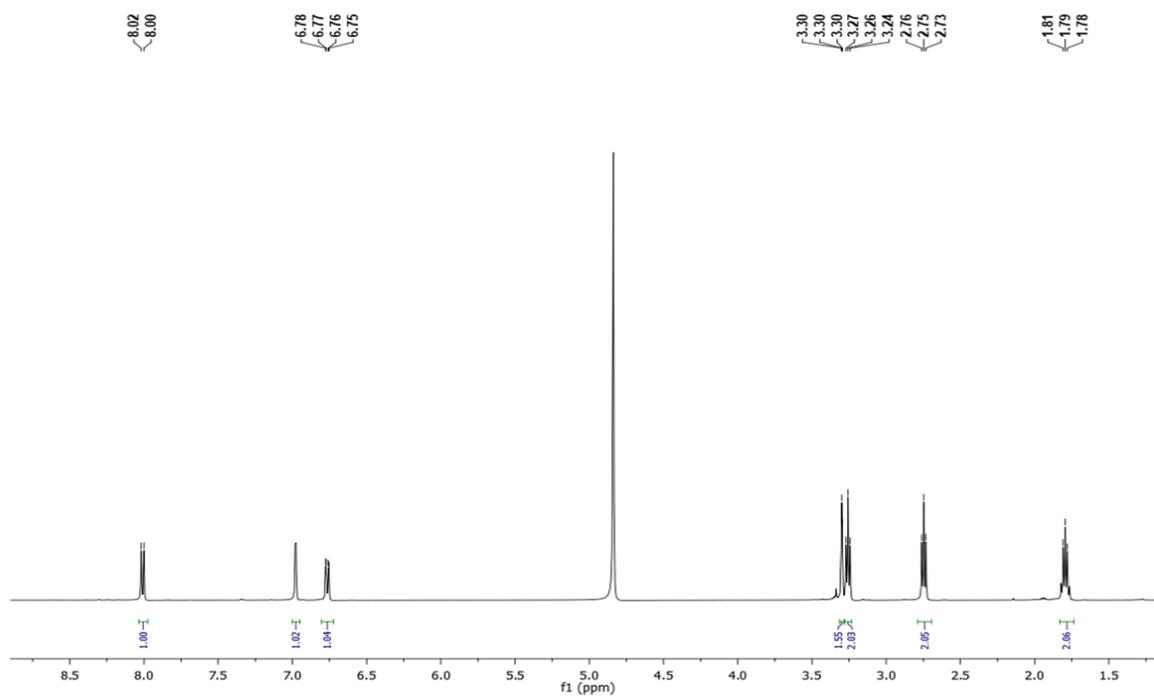


Figure 121. Spectre RMN-¹H de la NOP (**12**)

L'analyse UV-visible d'une solution NOP dans l'eau à une concentration 4×10^{-5} M montre un maximum d'absorbance vers 396 nm.

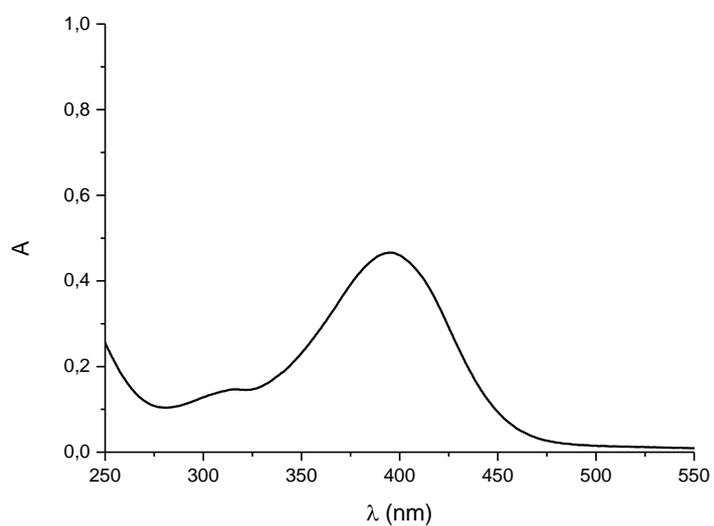


Figure 122. Courbe d'absorbance du composé NOP à 4×10^{-5} M dans l'eau

Le nitroaniline **12** a ensuite été engagée dans une réaction avec le phosphonothioformiate **2** dans le THF (Figure 123).

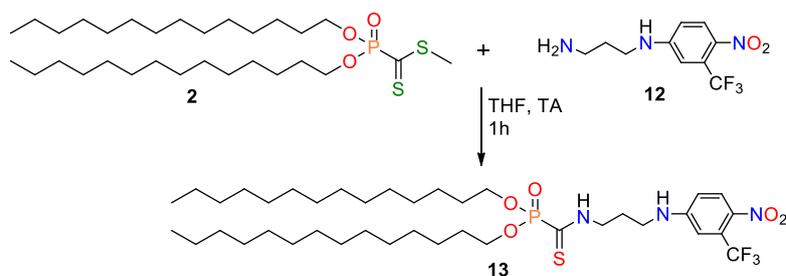


Figure 123. Synthèse du produit de couplage **13**

Le produit de couplage a été isolé avec un rendement de 58% après une purification sur colonne de silice. Le composé **13** a été caractérisé par RMN-¹H, RMN-¹³C, RMN-³¹P ainsi que par maldi-TOF.

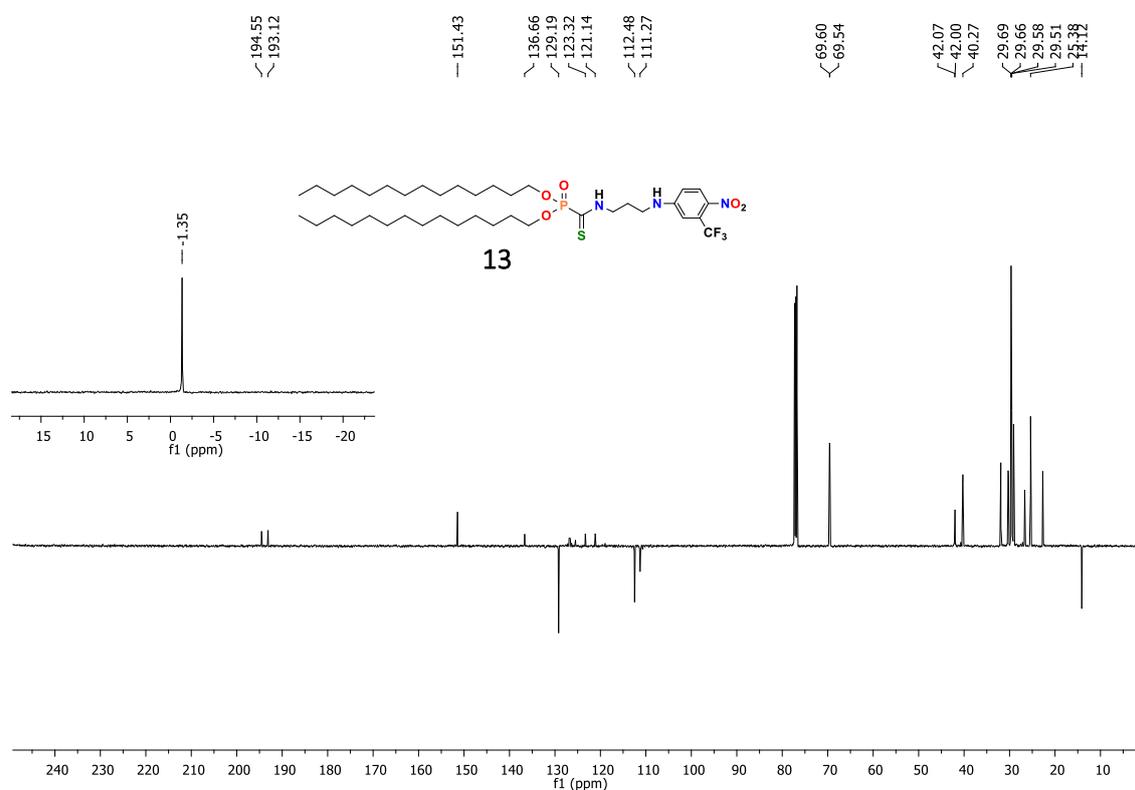


Figure 124. Spectre RMN-¹³C du composé **13**

Le spectre RMN-¹³C du composé **13** présente un signal caractéristique au C=S en RMN-¹³C à 193.38 ppm avec une constante de couplage $^1J_{CP} = 180.12$ Hz.

Cette synthèse avait pour but de montrer la faisabilité de la réaction PAC en solvant organique et de caractériser le phosphonothioamide **13** obtenu. Ce composé pourra être inclus dans des formulations pour préparer des liposomes fonctionnels (potentiellement donneur de NO) par pré-insertion. Ce type de liposomes pré-fonctionnalisés servira comme un témoin positif et sera comparé aux liposomes

obtenus par post-fonctionnalisation avec la NOP (**12**). La modification de la surface des liposomes préformés incluant des phosphonodithioesters par post-fonctionnalisation et l'étude des propriétés de relargage de NO constitue les principaux objectifs de cette étude.

II.2 Préparation des liposomes

Pour cette première partie de l'étude, 3 formulations ont été préparées (LF1-3) dont les caractéristiques figurent ci-dessous ainsi que dans le Tableau 12 :

- LF1 : incorporation du phosphonothioamide-NOP **13** (10% molaire) dans une formulation à base de BSV36.
- LF2 : formulation à base de BSV36 incluant le phosphodithioformiate **2**. Cette formulation sera utilisée pour greffer des molécules NOP (**12**) à sa surface par post-fonctionnalisation en utilisant la réaction PAC.
- LF3 : la formulation issue de la post-fonctionnalisation de LF2 par la NOP (**12**).

	Compositions	Ratios molaires	Concentration (mM)
LF1	BSV36 : thioamide-NOP 13	10 : 1	25 :2,5
LF2	BSV36 : dithioformiate 2	10 : 1	25 :2,5
LF3	LF2 post-fonctionnalisée par NOP 12	10 :1	25 :2,5

Tableau 12. Liste des formulations liposomales utilisées

Pour préparer les formulations (LF1-3) nous avons eu recours à la méthode d'hydratation du film lipidique. Brièvement, cette méthode consiste à former un film lipidique en évaporant un mélange de BSV36 avec **2** ou **13** préalablement dissous dans du chloroforme selon un ratio 10 :1 et à une concentration finale de 25 mM en BSV36. Par la suite, le film est hydraté pendant une nuit à 4°C. Enfin, une agitation mécanique au vortex pendant 1 minute et une sonication de 15 minutes à 45°C ont permis d'obtenir des vésicules avec des tailles comprises entre 106 nm et 147 nm, déterminées par DLS (Tableau 13).

	Taille (nm)	PDI	Zeta (mV)
LF1	133±4	0,24	57±4
LF2	106±6	0,34	63±8
LF3	147±7	0,27	68±3

Tableau 13. Caractérisation des formulations préparées par zêtasizer

L'analyse UV-visible de la solution LF1 a montré la présence d'une bande à 382 nm. Cette absorbance est caractéristique de la présence du phosphonothioamide-NOP **13** (Figure 125).

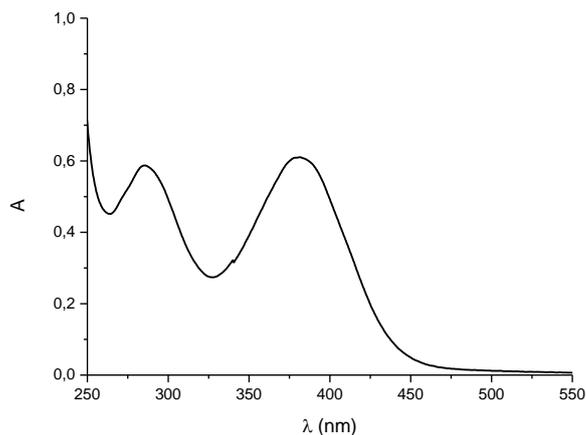


Figure 125. Courbe d'absorbance de la solution liposomale LF1, [BSV36] = 0.58 mM

La conjugaison de la nitroaniline (NOP) à la solution LF2 a été effectuée en faisant réagir trois équivalents de NOP pendant 4 heures à température ambiante. La solution obtenue a été dialysée 6 heures pour enlever l'excès du NOP. L'analyse du contenu du sac de dialyse par UV-visible a montré une absorbance à 382 nm (Figure 126) semblable à la formulation LF1 (Figure 125) qui est cohérente avec une immobilisation covalente de NOP sur le liposome conduisant à la formation du phosphonothioamide-NOP **13**.

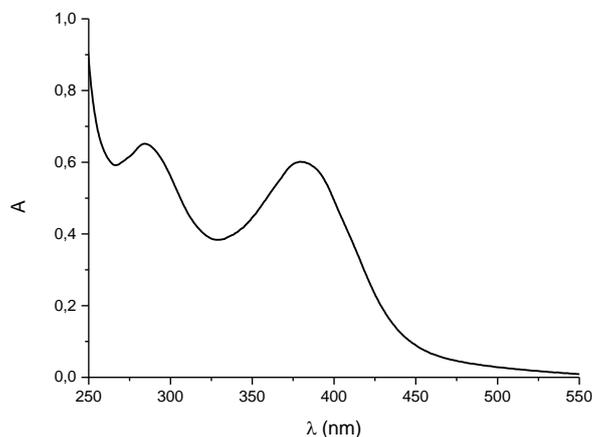


Figure 126. Spectre UV-visible (absorbance) de la solution LF3 après immobilisation de NOP et dialyse, [BSV36] = 0.58 mM

La superposition des trois spectres d'absorbances des solutions LF1, LF3 et d'une solution de NOP **12** libre dans l'eau montre un décalage de 15 nm vers le violet entre la NOP libre et la NOP greffée, dans le cas de LF1 et LF3. Cette même figure montre également que les deux solutions LF1 et LF3 présentent la

même signature avec un maximum d'absorbance à 382 nm. Ce résultat est en cohérence avec une immobilisation covalente de NOP après post-fonctionnalisation de LF2.

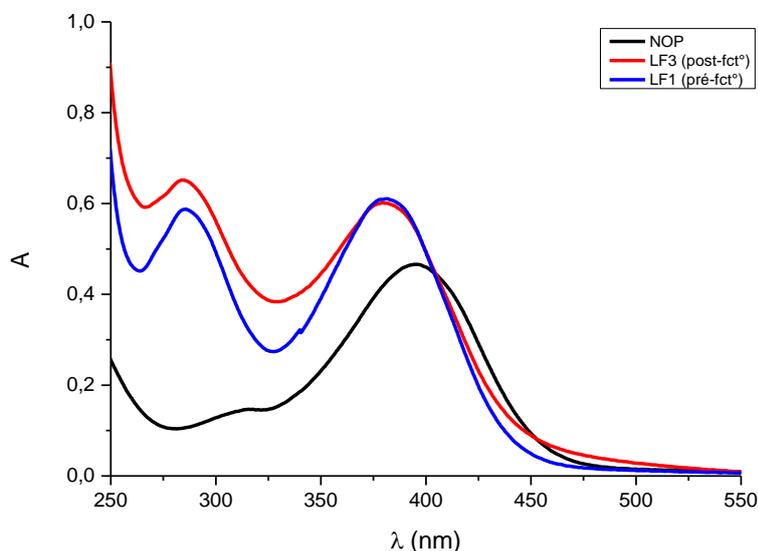


Figure 127. Superposition de LF1, [BSV36] = 0.58 mM (—), LF3 après dialyse, [BSV36] = 0.58 mM (—) et une solution du NOP **12** libre dans l'eau, 0.04 mM (—)

Ces résultats montrent la possibilité de post-modifier la surface des liposomes préformés avec la NOP. Nous avons aussi accès aux liposomes pré-fonctionnalisés (LF1) qui permettra de comparer les propriétés de relargages de NO selon le mode d'incorporation du motif NOP (pré-fonctionnalisation *versus* post-fonctionnalisation).

II.3 Caractérisation des solutions liposomales par ESI-MS

Les solutions liposomales LF1 (obtenue par pré-fonctionnalisation) et LF3 (obtenue par post-fonctionnalisation de LF2 par NOP **12**) ont été diluées dans l'eau en présence de 0,1% d'acide formique à une concentration 1×10^{-5} M en composé BSV36 puis introduites par injection directe dans le spectromètre de masse. Le spectre ESI-MS de la solution LF1 représenté dans la Figure 128-A a mis en évidence la présence du signal du BSV36 (m/z 683.9) ainsi que le composé **13** à (m/z 780.9). L'injection de la solution liposomale diluée de LF3 obtenue après réaction PAC et dialyse a mis en évidence la présence du BSV36 ainsi que la formation du produit de couplage **13** à (m/z 780.7) (Figure 128-B).

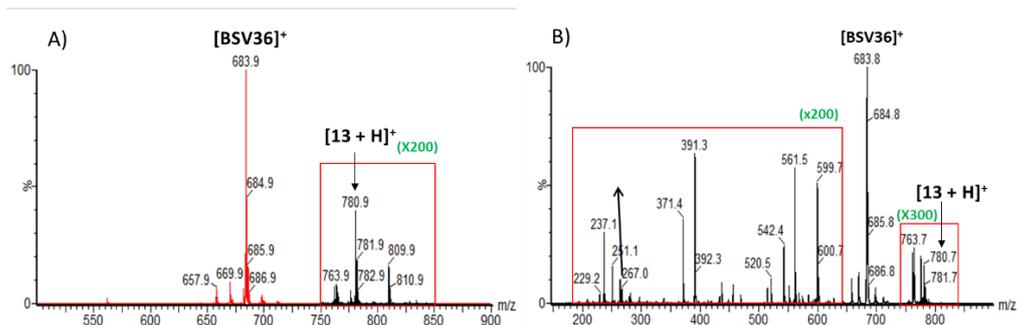


Figure 128. A) Spectre ESI-MS de LF1, B) Spectre ESI-MS de LF3. Les cadres rouges représentent un zoom fois 200 et 300.

Ces résultats montrent que la post-fonctionnalisation des liposomes (LF2) avec le composé NOP **12** conduit bien à une immobilisation covalente résultant de la réaction PAC.

II.4 Photo-génération d'oxyde nitrique à partir des liposomes fonctionnalisés avec la NOP **12**

II.4.1 Photo-excitation des liposomes

Cette partie est dédiée au suivi du relargage de NO en temps réel, à partir des liposomes précédemment préparés, par la méthode ampérométrique *via* une électrode spécifique (chronoampérométrie). Un suivi par UV-visible est également effectué pour suivre la conversion du motif nitroaniline présent dans le composé NOP.

La détection du NO par la méthode ampérométrique repose sur l'utilisation d'un montage composé d'une source laser avec une longueur d'onde de 405 nm à 20 mW. Le processus se fait en appliquant des cycles on/off pour irradier une solution liposomale placée dans une cuve en quartz, dans laquelle une électrode est immergée. L'électrode utilisée doit être calibrée au préalable avant le déroulement de l'expérience. Au moment de l'irradiation, le photo-donneur de NO subit un photo-réarrangement avec rupture d'une liaison conduisant simultanément à la formation de NO et d'un phénol qui n'absorbe pas dans le visible. Le NO est détecté au niveau de l'électrode où il subit une oxydation conduisant à sa détection grâce à l'analyse du courant produit qui est proportionnel à sa concentration. La quantité de NO relarguée est donc détectée tout au long de l'expérience (Figure 129).

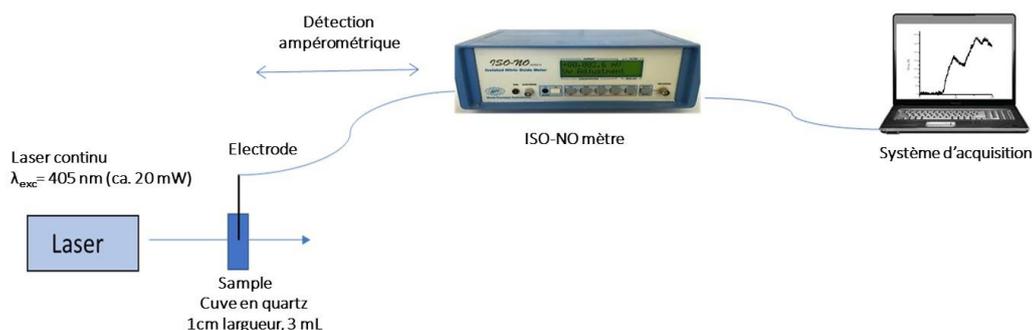


Figure 129. Illustration du montage utilisé pour la détection de NO par chrono-ampérométrie

Lors de ces expériences, quatre solutions ont été utilisées. Leurs compositions et/ou préparations sont détaillées ci-dessous et sont schématiquement représentées dans la Figure 130:

- LF1 : une solution obtenue par pré-fonctionnalisation incluant le (BSV36 : thioamide-NO **13**) diluée à 0,58 mM par rapport au BSV36.
- LF2 : une solution de (BSV36 : dithioformiate **2**) diluée à 0,58 mM par rapport au BSV36.
- LF3 : une solution liposomale obtenue après la post-fonctionnalisation de LF2 par la nitroaniline diluée à 0,58 mM par rapport au BSV36.
- Une solution incluant la nitroaniline **12** à 0,58 mM dans l'eau désignée comme une référence (Ref) pour le suivi du NO libéré.

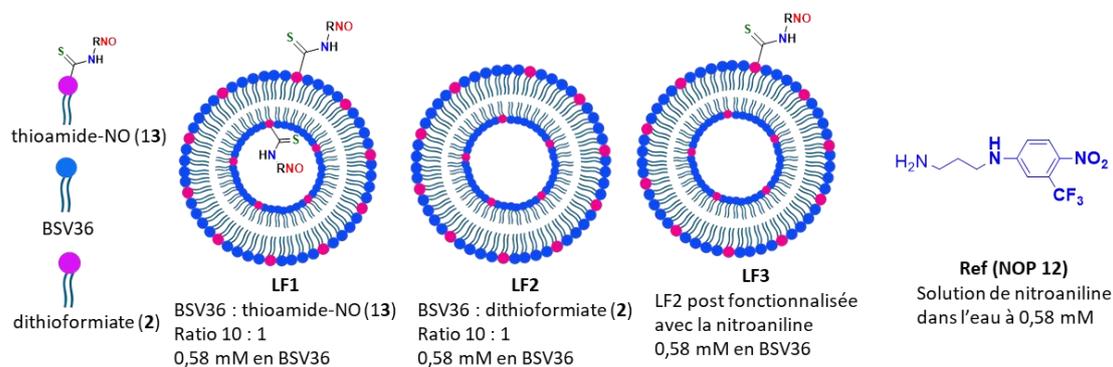


Figure 130. Les solution liposomales utilisées lors de l'étude ampérométrique

Les expériences ont été effectuées sur une durée de 5 minutes en alternant des cycles lumière/obscurité. La Figure 131 montre que le relargage de NO dans la gamme du micromolaire est observé lors de l'excitation à 405 nm et s'arrête lorsque la lumière est éteinte et reprend au moment où la lumière est rallumée.

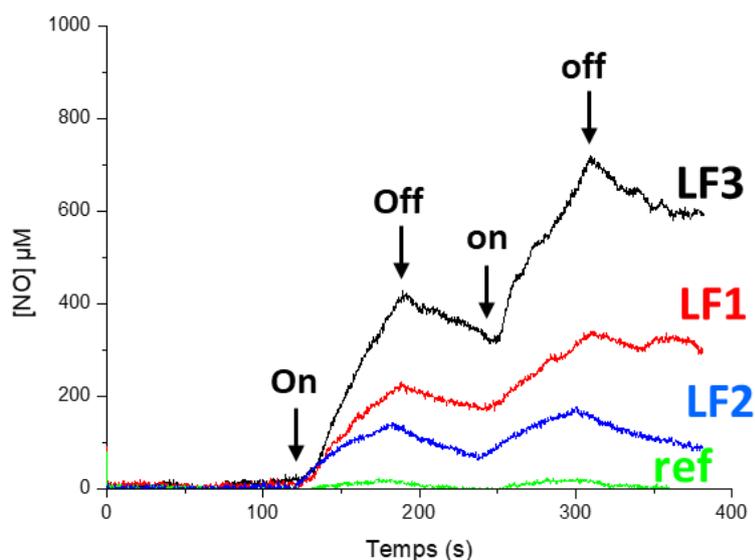


Figure 131. Chrono-ampérométrie permettant d'observer le relargage de NO pour LF1, LF2, LF3 à 0,58 mM en BSV36 et la Ref (composé **12** à 0,58 mM)

Nous pouvons distinguer 4 profils de production de NO différents pour chacune des solutions examinées. La mesure de NO montre une augmentation significative, pratiquement le double, dans le cas du LF3 (liposome post-fonctionnalisé par NOP) par rapport à LF1, le liposome préparé par pré-fonctionnalisation. Les résultats obtenus pour LF2 et pour la référence (NOP **12**) seront discutés dans un second temps.

Le suivi de l'évolution de la bande NOP à 382 nm par UV-visible au cours du temps, a été réalisée pour ces deux solutions LF1 et LF3 comme présentée dans la Figure 132. Nous pouvons constater une cinétique identique de relargage de NO qui se manifeste par une diminution de la bande à 382 nm au cours du temps pour les deux solutions LF1 et LF3.

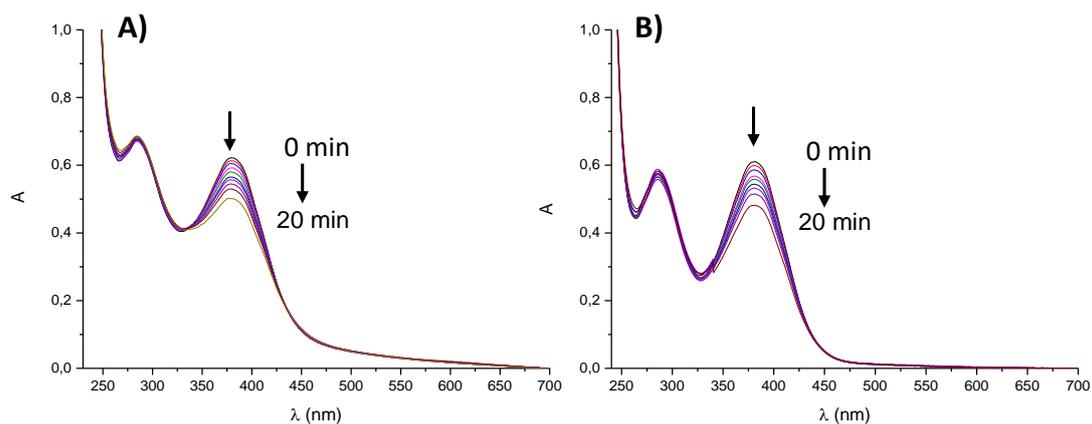


Figure 132. Dégradation de l'absorbance observée à 382 nm après l'irradiation de A) LF1 et B) LF3, pour un temps d'irradiation 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15 et 20 minutes.

La cinétique de décroissance de la bande attribuée à NOP révèle que les deux solutions liposomales (LF1 et LF3) possèdent des quantités comparables du précurseur NOP et quel qu'en soit la localisation de ce précurseur NOP (sur le feuillet interne ou externe du liposome), leur photo-réarrangement semble être cinétiquement identique.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que dans le cas du liposome LF3, préparé par post-fonctionnalisation, la nitroaniline réagit à la surface du liposome ce qui conduit à une exposition des motifs NOP majoritairement sur le feuillet externe du liposome. Par conséquent, l'essentiel du NO produit après photo-activation se retrouve dans la solution où se trouve l'électrode de mesure qui peut donc être détecté. Dans le cas du liposome LF1, préparé par pré-fonctionnalisation, les motifs de nitroaniline sont distribués sur les deux feuillets du liposome. Après photo-activation, une partie de la production de NO se retrouve dans le compartiment aqueux interne du liposome. Cette partie ne peut donc pas être détectée. Cette différence de localisation des motifs NOP dans les formulations LF1 et LF3 peuvent donc expliquer que pour LF3 une quantité plus importante de NO (près du double) soit détectée.

Dans cette expérience nous avons également inclus une solution liposomale jouant le rôle de témoin négatif (LF2, formulation sans le motif NOP) ainsi que le composé NOP **12** en solution dans l'eau. Nous observons sur le chrono-ampérogramme pour le composé de référence NOP **12** (courbe verte - Figure 131) une très faible production de NO ($\approx 30 \mu\text{M}$) par rapport aux formulations incluant la nitroaniline

greffée (LF1, LF3) où des concentrations de 200 à 700 μM de NO sont détectées. Cette observation peut être expliquée par des interactions entre le motif NOP et le liposome (e.g. interactions dipolaires), qui facilite le photo-réarrangement $\text{NO}_2 \rightarrow \text{Phenol}$. La formulation de LF2 correspond à une formulation qui ne comporte pas de motif NOP. L'observation de la production de NO dans ce cas en faible quantité (entre 0 et 150 μM) doit être considéré comme un résultat aberrant qui pourrait résulter d'interaction entre le liposome et la sonde ampérométrique. Nous pouvons aussi faire l'hypothèse que les mêmes interactions interviennent entre les liposomes des solutions LF1 et LF3. En conséquence, le courant ampérométrique attribuable à la production de NO, correspond à la concentration brute de NO mesurée à laquelle nous pouvons soustraire le courant ampérométrique observé pour LF2. Ce traitement conduit à la Figure 133 où figurent pour les solutions liposomale LF1 et LF3 la production de NO en présence d'une photostimulation.

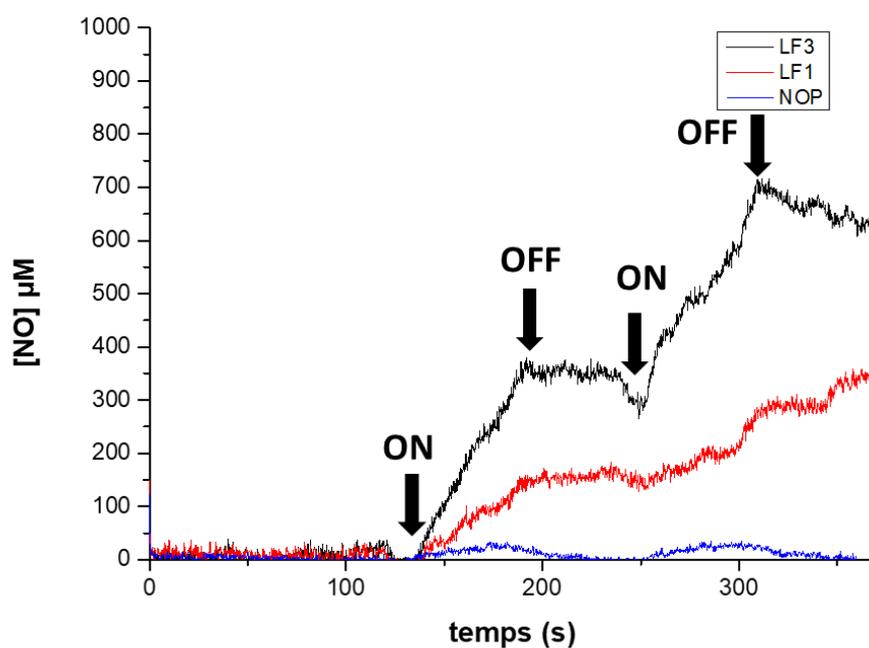


Figure 133. Chrono-ampérogrammes permettant d'observer le relargage de NO pour LF1 (-) et LF3 (-) corrigés par rapport au courant ampérométrique de LF2 à 0,58 mM en BSV36 et la Ref (-) (composé **12** à 0,58 mM)

Dans cette partie, nous avons réussi à post-fonctionnaliser par réaction PAC un liposome, incluant des motifs dithioesters accessibles à sa surface, avec une molécule photosensible (composé **12**) pouvant libérer du NO. La formation d'un lien covalent pour lier la NOP a été confirmée par spectrométrie de

masse. La photoexcitation du liposome formé a permis d'observer un relargage continu de NO par chrono-ampérométrie. La concentration de NO relarguée mesurée, dans le cas du liposome post-fonctionnalisé, est égale au double de la quantité obtenue à partir d'un liposome fonctionnalisé par NOP par pré-fonctionnalisation. Ce résultat confirme que la post-fonctionnalisation favorise un relargage efficace de NO par rapport au NOP libre, ce qui conduit à conclure que la post-fonctionnalisation est la bonne stratégie pour fonctionnaliser la surface d'un liposome avec ce type de composés précurseurs de NO.

II.4.2 Préparation d'un liposome bifonctionnel

Dans cette partie d'étude nous avons planifié de préparer, en se servant de la réaction PAC, un liposome incluant deux groupements fonctionnels dont l'un est la nitroaniline (NOP) et le second une sonde fluorescente de type 1,8-naphthalimide utilisée au cours du chapitre 2. L'objectif d'une telle association serait de pouvoir produire NO pour exercer une action thérapeutique tout en permettant une localisation des nanoparticules grâce à la sonde fluorescente. Il s'agit donc de préparer des liposomes difonctionnels. A noter également que le motif 1,8-naphthalimide est aussi capable de produire des ROS comme le montre certains travaux^{192,193}. L'association de ROS et de NO pourrait avoir un effet synergique pour certaines applications biomédicales (e.g. effet biocide).

L'enjeu de cette rubrique est donc de montrer une preuve de concept *via* une mesure du NO (produit par photo-stimulation) par une méthode ampérométrique et de détecter les liposomes par fluorescence.

La stratégie envisagée est illustrée dans la figure ci-dessous (Figure 134).

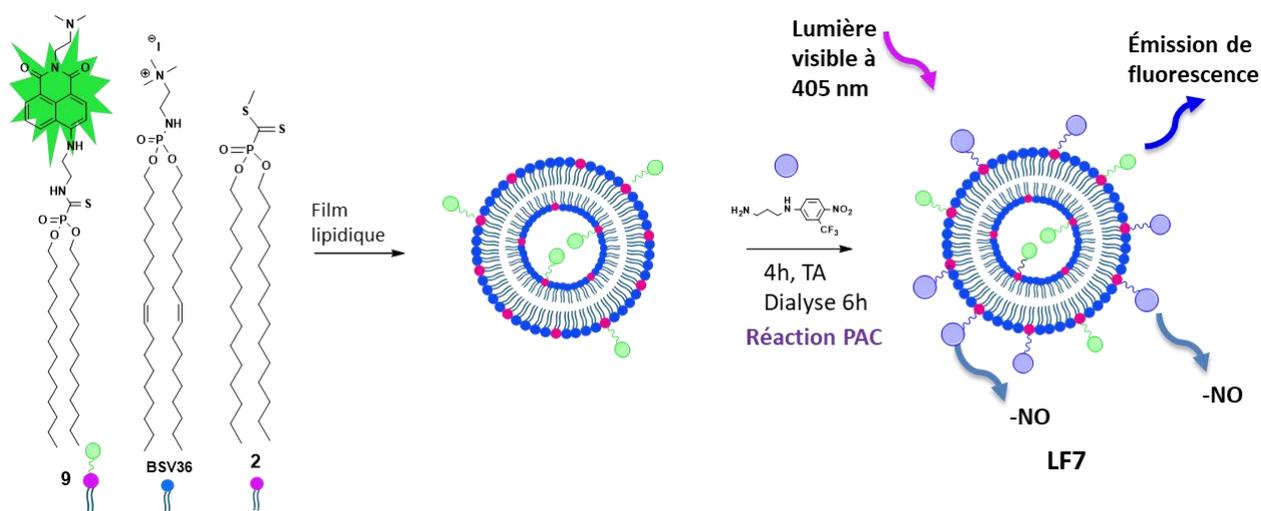


Figure 134. Illustration schématique de la préparation d'un liposome bifonctionnel incluant une pré-fonctionnalisation pour l'incorporation du motif fluorescent

Cette stratégie consiste à préformer dans un premier temps un liposome en utilisant un mélange de trois lipides, le BSV36, le phosphonothioamide fluorescent **9** et le phosphonodithioformiate **2** selon les ratios (100, 2,5, 7,5), à une concentration égale à 10 mM en BSV36. La sonde fluorescente est introduite dans la composition du liposome par pré-fonctionnalisation en formulant le phosphonothioamide correspondant **9** avec les deux autres lipides. Par la suite, nous avons procédé à l'immobilisation de la nitroaniline à la surface du liposome préformé en appliquant la réaction PAC entre les phosphonodithioformiates **2** accessibles à la surface du liposome et la NOP. Le liposome final obtenu présente donc, deux fonctionnalités exposées à sa surface de type naphthalimide et nitroaniline. Le choix d'introduire la NOP par la post fonctionnalisation est dû aux résultats obtenus dans la rubrique précédente qui montrent que la post-fonctionnalisation du NOP favorise un relargage plus important de NO dans le milieu.

Néanmoins, afin de comparer les propriétés des liposomes (fluorescence et production de NO) obtenus selon cette stratégie de préparation, nous avons aussi préparés d'autres solutions liposomales dont le mode de préparation/composition est indiqué ci-dessous :

LF4 : est une solution liposomale à base de BSV36 incluant 2,5% de phosphonodithioformiate **2**, puis post-fonctionnalisée par la sonde fluorescente (composé **6**) et dialysée. Cette formulation servira comme témoin positif pour la fluorescence.

LF5 : est une solution liposomale à base de BSV36 incluant 7,5% de phosphonothioamide-NOP **13** (La nitroaniline est immobilisée sur les deux feuillets par pré-fonctionnalisation).

LF6 et LF7 : sont les deux liposomes bifonctionnels, ils se différencient seulement par la méthode d'incorporation de NOP. Dans le cas de LF6 la solution liposomale est à base de BSV36 incluant 7,5 % de phosphonothioamide-NOP **13** et de 2,5% de phosphonodithioformiate **2**, puis post-fonctionnalisée avec la sonde fluorescente **6** et dialysée. Dans le cas de LF7 la solution liposomale est formée à base de BSV36, 2,5% de phosphonothioamide fluorescent **9** et 7,5% de phosphonodithioformiate **2**, puis post-fonctionnalisée avec le précurseur NOP **12** et dialysée.

La composition de ces formulations figure dans le Tableau 14 et sont schématiquement représentés dans la Figure 135.

Formulations	Composition	Ratios	Concentration en BSV36
LF4	BSV36 : 9 (9 produit par post fonctionnalisation)	100 :2,5	10 mM
LF5	BSV36 : 13	100 :7,5	10 mM
LF6	BSV36 : 13 : 9 (9 produit par post fonctionnalisation)	100 :7,5 :2,5	10 mM
LF7	BSV36 : 9 : 13 (13 produit par post-fonctionnalisation)	100 :2,5 :7,5	10 mM

Tableau 14. Liste des formulations liposomales préparées

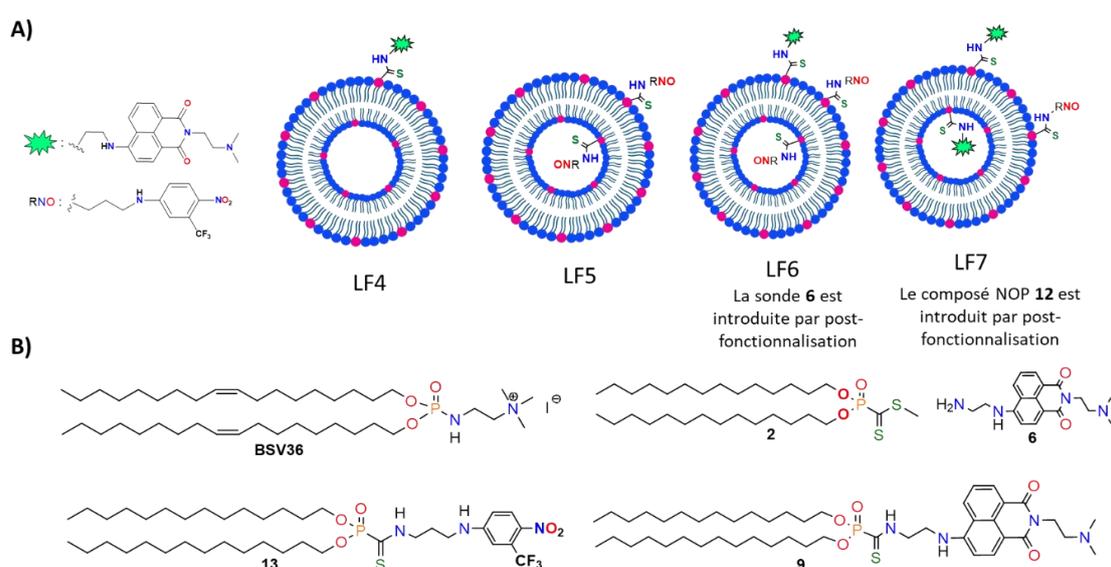


Figure 135. A) Schéma des liposomes préparés, B) Structure des composés utilisés

Les spectres d'absorption des quatre solutions liposomales ont été réalisés à une concentration de 0,8 mM en BSV36 et montrent que LF6 et LF7, les deux liposomes bifonctionnels, présentent des concentrations comparables en NOP (bande à 382 nm). Pour la formulation LF5 (NOP seul par pré-fonctionnalisation), la quantité de NOP est inférieure aux deux formulations précédentes.

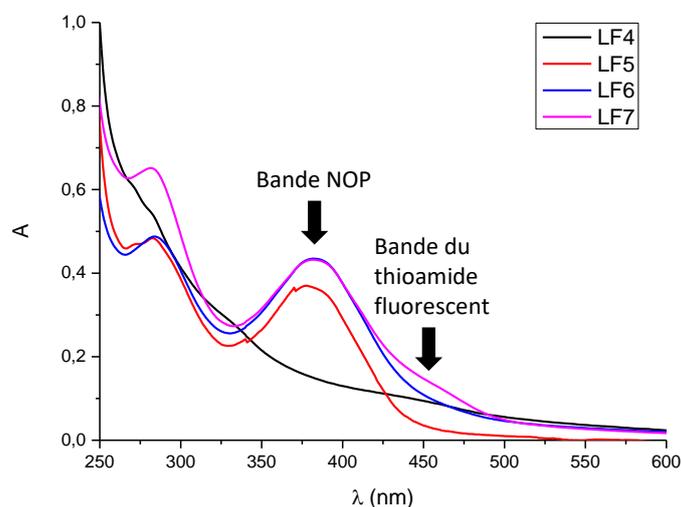


Figure 136. Superposition des spectres d'absorption de LF4, LF5, LF6 et LF7 à une concentration de 0,8 mM en BSV36

On observe, également, dans le cas des formulations LF6 et LF7 une légère bande d'absorption caractéristique du phosphonothioamide fluorescent **9** vers 450 nm qui est comparable à celle observée pour LF4 (liposomes post-fonctionnalisés par la sonde fluorescente **6**). La présence de cette bande d'absorption à 450 nm confirme que la sonde fluorescente est bien incorporée aux solutions liposomales LF4 et LF7 (par pré-fonctionnalisation) et LF6 (par post-fonctionnalisation).

Pour confirmer que la présence de cette légère bande en absorbance est due à l'incorporation du phosphonothioamide fluorescent **9** dans la solution liposomale, nous avons enregistré le spectre d'émission de LF7 à un maximum d'absorbance ($\lambda_{\text{abs}} = 430 \text{ nm}$) et son émission de fluorescence a été comparée à l'émission de fluorescence de la solution liposomale LF4, utilisée comme un contrôle positif (Figure 137).

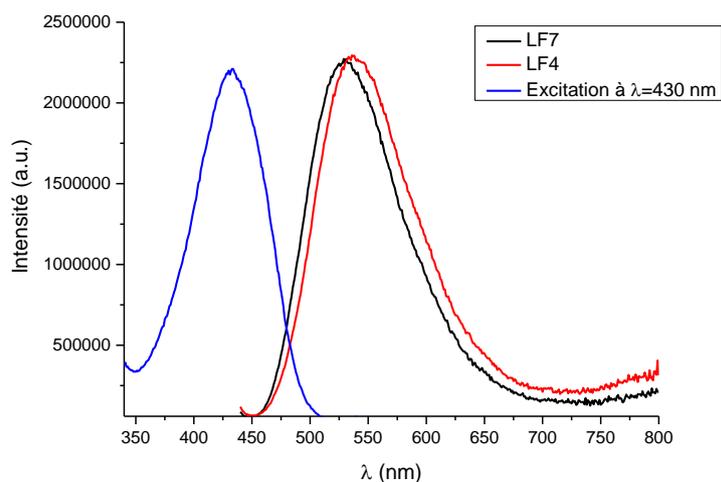


Figure 137. (—) Spectre d'excitation à 430 nm ($\lambda_{em} = 530$ nm), (—) Le spectre d'émission de fluorescence de ($\lambda_{ex} = 430$ nm) de LF7 incluant la NOP et la fluorescence, (—) Le spectre d'émission de fluorescence ($\lambda_{ex} = 430$ nm) du contrôle positif LF4 incluant seulement la fluorescence.

La Figure 137 présente des spectres d'excitation de LF7 et LF4 comparables avec une longueur d'onde d'émission égale vers 530 nm, avec un décalage de 4 nm vers le vert pour LF4. Ce résultat confirme que la sonde fluorescente a bien été incorporée dans les deux cas. La différence du λ_{em} pourrait s'expliquer par des environnements légèrement différents (LF4 ne comporte pas du motif NOP).

Pour réaliser les expériences d'excitation des solutions incluant NOP, afin de mettre en évidence la présence de NO dans ces formulations, les trois formulations LF5, LF6 et LF7 ont été diluées à une concentration de 0,23 mM en BSV36. Par la suite, chaque mesure a été effectuée pendant une durée de 5 minutes en alternant entre des cycles de lumière/obscurité en utilisant un laser avec une longueur d'onde égale à 405 nm.

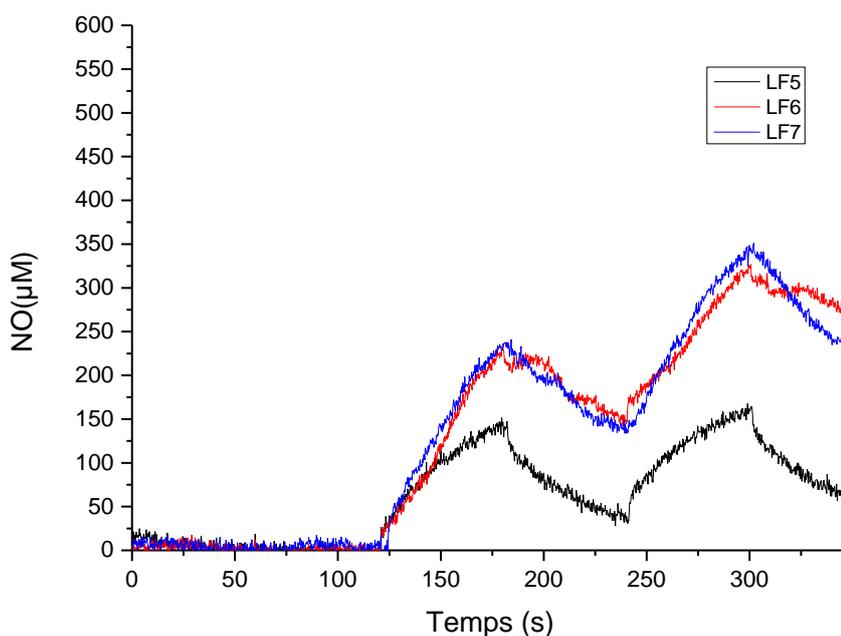


Figure 138. Profil de production de NO observé pour LF5 (—), LF6 (—) et LF7 (—) dans l'eau à 0,23 mM en BSV36

La Figure 138 montre des ampérogrammes similaires dans le cas des deux liposomes bifonctionnels (LF6 et LF7). Les résultats de ces expériences nous conduisent à quelques remarques.

i) Lors de cette série d'expérience, nous aurions dû inclure la solution liposomale LF4. En effet, comme nous l'avons vu précédemment des liposomes dépourvus de motifs NOP peuvent induire une réponse au niveau de l'électrode de mesure de NO. Néanmoins les expériences n'ont pas été faites dans un ordre chronologique si bien que nous n'avons toutes ces informations au moment de cette expérience.

ii) Toutes les solutions (LF5, LF6 et LF7) incluant du NOP produisent du NO après activation lumineuse. Compte tenu des résultats précédents, nous attendions une production de NO supérieure lors de l'immobilisation de NOP par post-fonctionnalisation (LF7) par rapport à son incorporation par pré-insertion (LF5, LF6). Si l'on compare la production de NO par LF7 (NOP par post-insertion) par rapport à LF5 (NOP par pré-insertion) alors le résultat attendu est observé. Ce résultat est alors très comparable à celui observé dans la Figure 131. Néanmoins, si on compare la production de NO par LF7 (NOP par post-insertion) et LF6 (NOP par pré-insertion), nous observons une production identique. La seule différence entre LF6 et LF5 résulte de la présence dans LF6 de la sonde fluorescente introduite par post-insertion. Pour expliquer ce résultat, nous pouvons faire l'hypothèse que la présence de la sonde

fluorescente dans le liposome en plus du motif NOP pourrait conduire à un liposome poreux qui laisse échapper NO quand il est produit au niveau du feuillet interne. La limite de cette hypothèse est que le trajet est quand même plus long entre le feuillet interne des liposomes (lieux de production d'une partie de NO) et l'électrode. Ainsi avec un trajet plus long nous devrions avoir une dégradation de NO et donc avoir une détection plus faible. La seconde hypothèse est qu'en présence de la sonde fluorescente, l'assemblage supramoléculaire le plus stable serait celui où le motif NOP se trouve sur le feuillet externe (on peut suggérer la formation d'interactions π - π entre le motif NOP et la sonde fluorescente).

La Figure 139 montre une vitesse de dégradation de NOP à 382 nm dans le cas de LF5, LF6 et LF7 qui suit une allure identique. Ce résultat confirme que quel qu'en soit la localisation des motifs NOP sur le feuillet interne ou externe leur photo-réarrangement suit une même cinétique.

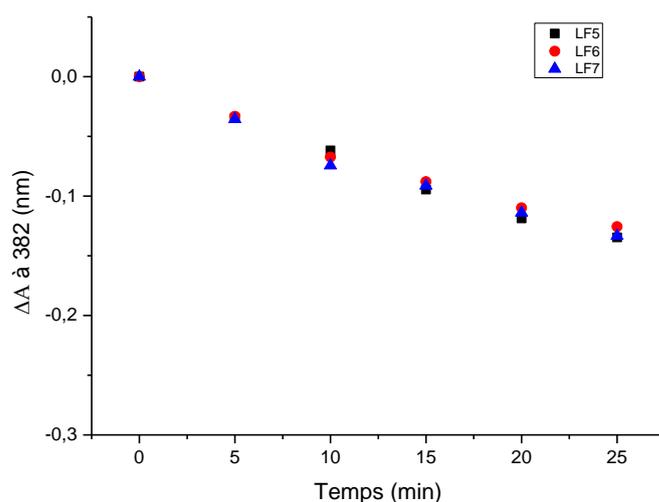


Figure 139. Vitesses de dégradation de NOP dans LF5 (●), LF6 (Δ), LF7 (■)

Pour résumer, en se basant sur cette étude ampérométrique et par fluorescence nous avons réussi à confirmer la bis-fonctionnalisation d'un liposome à base de BSV36 par deux motifs, la nitroaniline (NOP **12**) pouvant libérer du NO et une sonde fluorescente **6** pouvant émettre dans le vert. L'excitation de ce liposome par une lumière visible bleu peut donner une émission de fluorescence dans le vert et un relargage de NO de façon concomitante.

II.5 Tests antimicrobiens des préparations liposomales

Nous avons montré que les liposomes fonctionnalisés par le motif NOP peuvent relarguer NO sous l'action d'un stimulus lumineux. Son potentiel antimicrobien a été investigué dans plusieurs études de la littérature^{166,169,175,176}. Par ailleurs d'autres études ont également montré que les dérivés fluorescents de type 1,8-naphtalimide fluorescents peuvent également avoir un potentiel anti-microbien via la formation d'espèces réactives d'oxygène ROS^{192,193}.

Dans cette perspective des tests antimicrobiens ont été réalisés au sein de l'équipe du Pr ; T. MONTIER (INSERM U1078 - Brest) dans le but d'explorer l'effet phototoxique des liposomes fonctionnalisés par le motif NOP seul (LF9), par le dérivé 1,8-naphtalimide greffé seul (LF8) ou en combinant les deux fonctionnalités (LF10). Ces essais biocides ont été réalisés sur une souche de bactérie *Staphylococcus Aureus* RN4220 (Gram +).

LF8 : il s'agit d'une formulation à base de BSV36 et du phosphonothioamide fluorescent **9** (100 :5). Cette formulation qui ne comporte pas le motif NOP, servira de témoin négatif pour la production de NO et pour évaluer le potentiel de phototoxicité induite par le motif fluorescent 1,8-naphtalimide.

LF9 : Il s'agit d'une solution liposomale incluant BSV36 et phosphonodithioester **2**, puis post-fonctionnalisée avec la NOP (**12**) par la réaction PAC et dialysée pendant 6h. Cette solution liposomale expose à la surface les motifs NOP pouvant libérer du NO par photo-excitation.

LF10 : Il s'agit d'une solution liposomale incluant BSV36, le phosphonothioamide fluorescent **9** et le phosphodithioester **2** avec le ratio (100 :5 :10), puis post-fonctionnalisée avec la NOP par réaction PAC et dialysée pendant 6h.

LF11 : Une solution liposomale à base de BSV36 incluant 20% du chol-NOP (composé préparé par Dr. A. Fraix), inclus par pré-fonctionnalisation sera utilisée comme un contrôle positif lors de ces tests.

Les structures des composés utilisés dans chaque formulation ainsi que leurs compositions (ratios et concentrations) sont présentées dans la Figure 140 et le Tableau 15.

Formulations	Composition	Ratio	Concentration (mM)
LF8	BSV36 : 9	100 : 5	25 : 1,25
LF9	BSV36 : 13 (13 produit par post fonctionnalisation)	100 : 10	25 : 2,5
LF10	BSV36 : 9 : 13 (13 produit par post-fonctionnalisation)	100 : 5 : 10	25 : 1,25 : 2,5
LF11	BSV36 : Cholestérol-NOP (Obtenue par pré-fonctionnalisation)	100 : 20	

Tableau 15. Liste des formulations utilisées pour les tests antimicrobiens

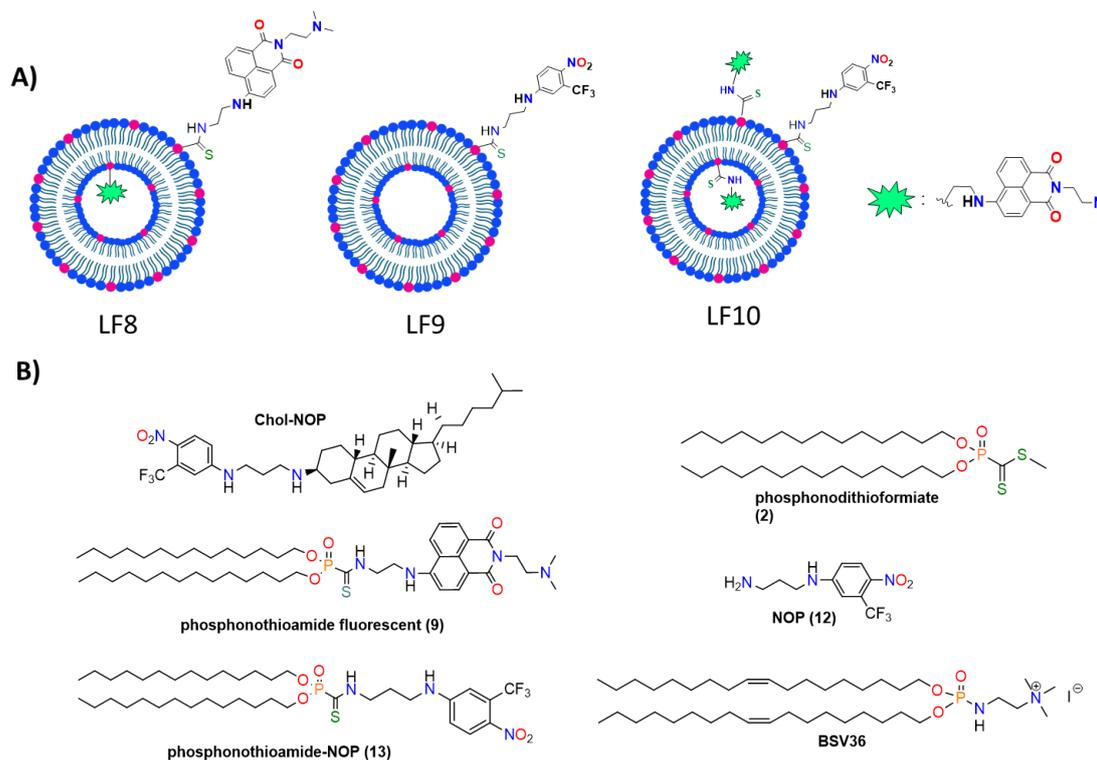


Figure 140. A) Schéma des solutions liposomales utilisées ; B) Structures des composés utilisés dans cette étude

La taille et le potentiel zêta de ces trois formulations ont été déterminés (Tableau 16). La taille des objets obtenus varie entre 144 nm et 157 nm avec un potentiel zêta positif.

	Taille (nm)	PDI	Zeta (mV)
LF8	157±2	0,25	+67±8
LF9	144±9	0,38	+69±1
LF10	148±10	0,36	+82±2

Tableau 16. Les formulations LF8, LF9 et LF10 caractérisées par DLS

Les formulations préparées ont été étudiées afin de déterminer leur potentiels biocides. Chacune des formulations permet de renseigner sur la toxicité induite par NOP, l'effet phototoxique induit par la sonde fluorescente ou par la combinaison des deux motifs, NOP et fluorescent, comme indiqué ci-dessous :

- L'effet toxique provenant du relargage photo-déclenché de NO à partir de la formulation LF9.
- L'effet toxique induit par l'irradiation du motif 1,8-naphthalimide seul (LF8) ou en le combinant avec le motif NOP (LF10).

Ajouté à cela, nous avons cherché à caractériser les formulations liposomales en présence de bactéries par microscopie de fluorescence, à quantifier une éventuelle libération d'espèces réactives d'oxygène (ROS) par le motif 1,8-naphthalimide et enfin à regarder l'effet de ces formulations, en présence de lumière, sur des cellules eucaryotes (cellules A549 et CFBE).

II.5.1 Dispositifs utilisés pour la photo-activation

Le protocole établi par nos collaborateurs biologistes est basé sur l'utilisation de deux systèmes d'irradiation :

- 1- Système d'irradiation S1 avec un λ_{ex} = 415-420 nm : ce système est adapté pour l'excitation des plateformes moléculaires incluant la NOP (Figure 141-A).
- 2- Système d'irradiation S2 avec un λ_{ex} = 450-470 nm : ce système est adapté pour l'excitation des solutions liposomales incluant le dérivé 1,8-naphtalimide (Figure 141-B).

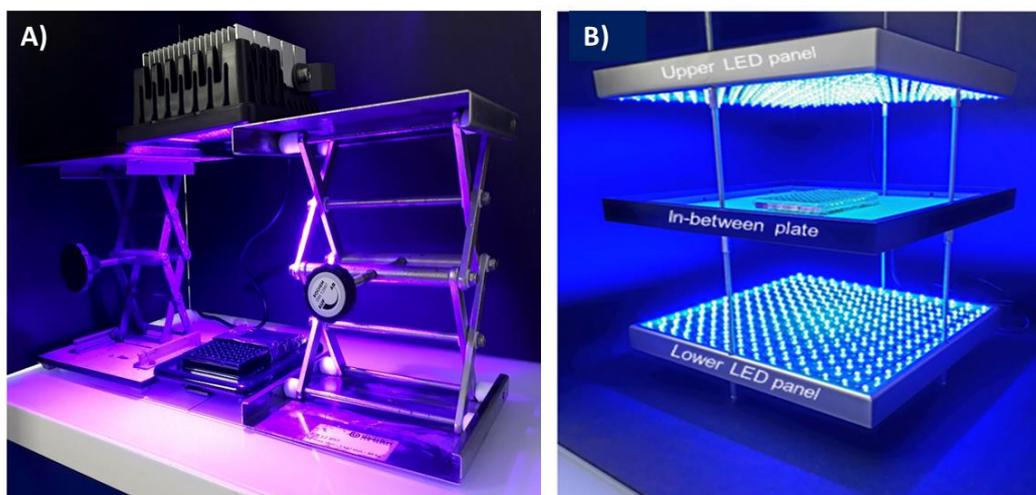


Figure 141. A) Système d'irradiation S1, B) système d'irradiation S2

II.5.2 Protocole des essais antimicrobiens

Le protocole utilisé pour les essais antimicrobiens se déroule en 4 étapes.

Les premières préparations consistent à mettre en contact dans une plaque en 96 puits noire à fond transparent les formulations utilisées à deux concentrations (300 μ M et 30 μ M en eau) avec *S. aureus* à deux densités bactériennes moyennes différentes (inoculum fort à 10⁵ CFU/mL et inoculum faible 10³

CFU/mL). Deux contrôles ont été utilisés lors de ces essais ; un contrôle de croissance qui est basé sur une suspension de bactérie sans les composés et un contrôle positif qui consiste à un mélange de bactéries avec un composé de référence (LF11 : BSV36 : Chol-NOP). Chaque condition a été réalisée en triplicat.

Une fois la plaque **P1** prête, comme la montre Figure 142, la première étape consiste à repiquer sur gélose un volume de 5µL de chaque puits pour obtenir le repiquage **1** avant le processus d'irradiation à une concentration finale en BSV36 égale à 150 µM. Par la suite, le processus d'irradiation avec le système S1 est appliqué selon l'enchaînement suivant : 30 minutes d'excitation sur la moitié droite de la plaque **P2** (identique à la moitié gauche), suivi de 30 minutes d'obscurité pour toute la plaque et enfin 30 autres minutes d'excitation avec le même système S1 sur la moitié droite de la plaque (Figure 142 – étape 1). A l'issue de l'irradiation avec S1, la plaque est indiquée **P3** dans la Figure 142.

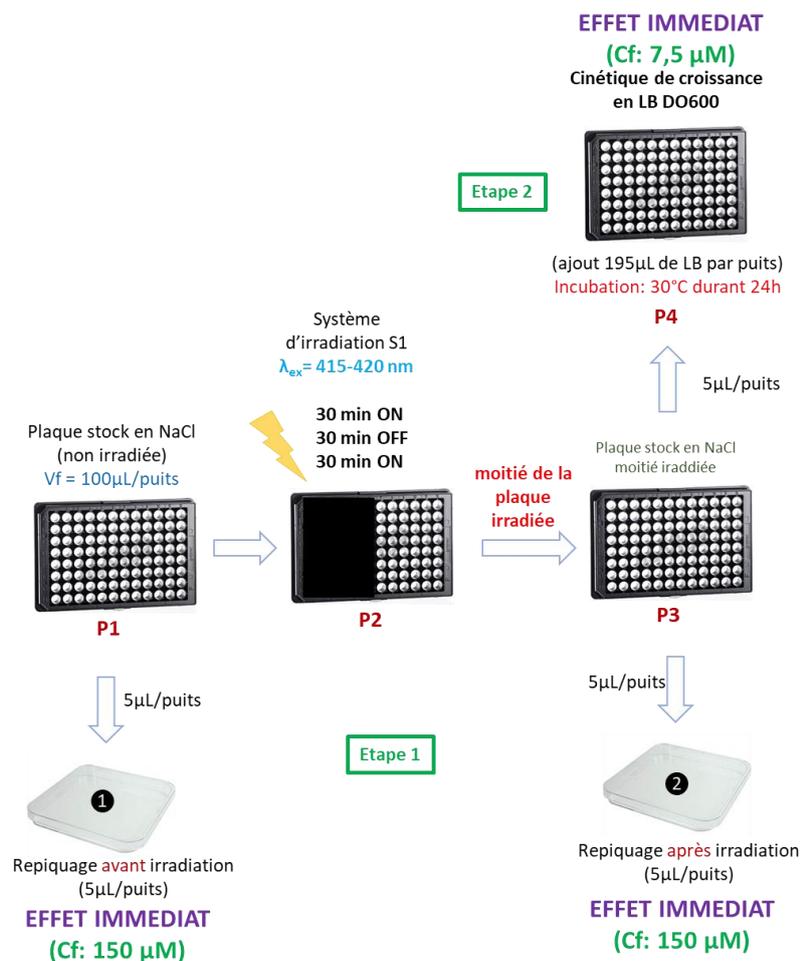


Figure 142. Schématisation de la première et de la deuxième étape de la procédure. Cf : concentration en BSV36.

A la fin de la première étape un nouveau repiquage de 5 μL de chaque puits de la plaque **P3** a été effectué aussitôt sur gélose pour obtenir le repiquage ② à une concentration égale à 150 μM en BSV36.

La préparation des deux repiquages avant ① et après irradiation ② a pour but de voir l'effet photo-toxique immédiat des formulations sur les bactéries utilisées à forte concentration 150 μM .

La longueur d'onde du système d'irradiation (S1) est adaptée pour exciter la molécule NOP incluse dans les formulations LF9 et LF10 et s'attendre à un relargage de NO.

Au cours de la deuxième étape une cinétique de croissance a été réalisée sur la plaque **P4** avec une détermination de la croissance régulière pendant 24h (par lecture de la DO). Ce test permet de voir le temps nécessaire pour que les bactéries repoussent dans un milieu où la concentration des composés qui ont subi l'irradiation est très réduite à cause d'une dilution, de l'ordre de 7,5 μM en BSV36. Cette cinétique de croissance réalisée en **P4** (sur une durée de 24h et à faible concentration 7,5 μM) est complémentaire aux repiquages réalisés en ① et ② qui permettent d'observer uniquement l'effet toxique visible (immédiat) à fortes concentrations (150 μM).

De point de vue expérimental, la plaque **P4** est préparée en déposant un volume de 5 μL de chaque puits (concentration de 150 μM par prélèvement) provenant de la plaque **P3**, puis un volume de 195 μL d'un milieu de culture nutritif LB est ajouté dans la nouvelle plaque **P4**. Cette dernière est, ensuite incubée 30 minutes à 30°C et enfin, une cinétique de croissance pendant 24 heures à faibles concentration est déterminée en enregistrant une densité optique à 600 nm (DO600) toutes les 10 minutes à l'aide d'un lecteur de plaque (Figure 142 – étape 2).

Pendant la 3ème étape (Figure 143), le volume restant dans chaque puits (85 μL) dans la plaque **P3** a été séparé en deux plaques **P5** et **P6** en y déposant 45 μL et 40 μL respectivement. Dans le cas de la plaque **P6**, un volume de 40 μL d'un milieu LB 2X a été ajouté sur les 40 μL déjà existants de la suspension par puits, ce qui fait une concentration de 150 μM à inoculum moyen. L'objectif de la préparation de la plaque **P6** est d'évaluer l'effet de l'exposition longue durée (cinétique 24h) à forte concentration (Cf=150 μM en BSV36), après l'application du système d'irradiation (S1) (étape 3 - Figure 143).

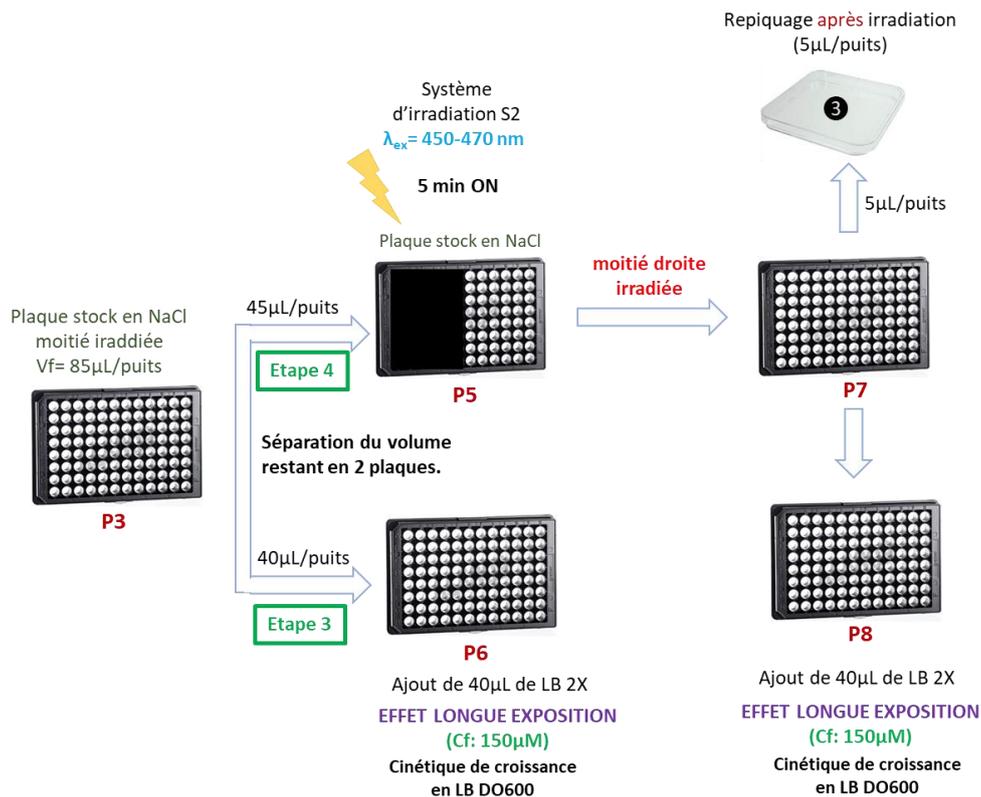


Figure 143. Déroulement de l'étape 3 et l'étape 4

La dernière étape (étape 4) consiste à irradier la moitié droite de la plaquette **P5**, qui a précédemment subi une irradiation avec le système d'irradiation (S1), avec le système d'irradiation (S2) pendant 5 minutes pour obtenir la plaquette **P7**. La plaquette P7 a donc été irradiée deux fois 30 minutes avec le système S1 et une fois 5 minutes avec le système S2. Ensuite, 5 µL de chaque condition de la plaquette **P7** a été repiqué aussitôt sur gélose (boîte 3) pour voir l'effet immédiat après l'exposition aux deux systèmes d'irradiation S1 et S2. Finalement, un volume de 40 µL de LB 2X a été ajouté aux 40 µL restants de la suspension à la plaquette **P7** dans le but de voir l'effet de l'exposition longue durée (cinétique de croissance en LB DO600) aux deux systèmes d'irradiation à fortes concentrations (Cf= 150 µM en BSV36).

II.5.3 Résultats des repiquages : effet photo-toxique immédiat de *S. aureus*

Tout au long de l'expérience trois repiquages ont été réalisés pour *S. aureus*, avant l'irradiation, après irradiation avec S1 et après irradiation avec S1 puis S2 (Figure 144).

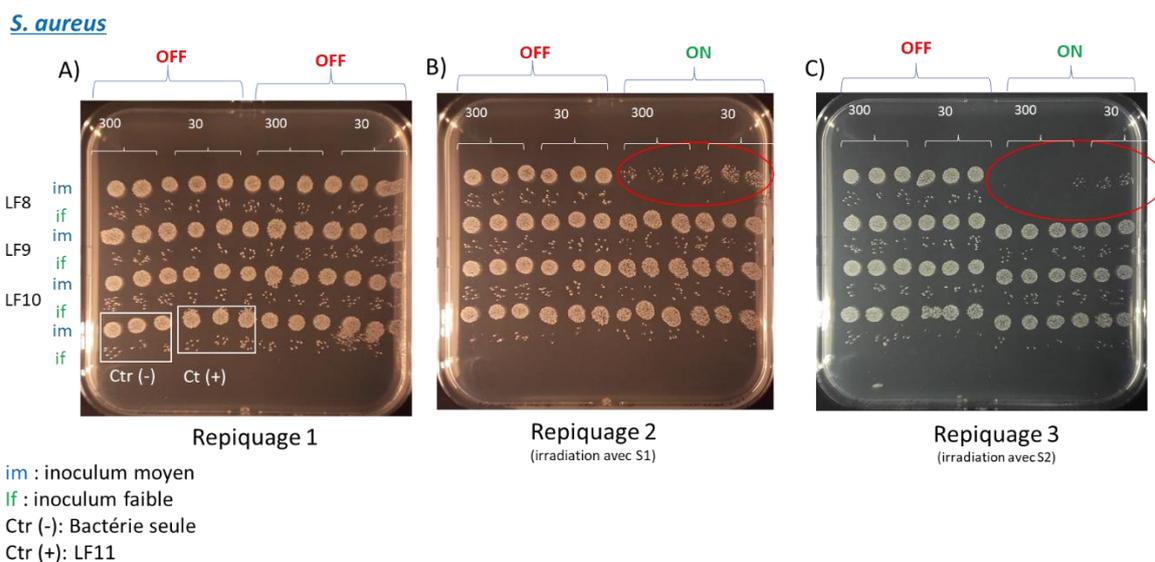


Figure 144. Résultats des trois repiquages, A) repiquage avant irradiation, B) repiquage après irradiation avec S1, C) repiquage après irradiation avec S1 puis S2. 300 μM et 30 μM sont les concentrations des formulations utilisées en BSV36 ; im : (inoculum moyen, densité à 10^5 CFU/mL) et lf : (inoculum faible, densité à 10^3 CFU/mL).

La Figure 144 peut nous apporter les informations suivantes :

- Le repiquage 1 réalisé avant l'irradiation montre une bonne répartition des inocula dans les puits de la plaque stock en NaCl.
- Le repiquage 2 réalisé après l'excitation par le système d'irradiation S1 ($\lambda_{\text{ex}} = 415\text{-}420$ nm) sur la partie droite de la plaque peut nous renseigner sur l'effet immédiat de la photo-activation par S1.
- Le repiquage 3 a pour objectif de nous renseigner sur l'effet immédiat sur les bactéries en appliquant les deux systèmes d'irradiation (S1 puis S2) sur la partie droite de la plaque (noté ON sur la Figure 144).

Comme le montre la Figure 144, après l'excitation avec le système d'irradiation S1, une inhibition totale à inoculum faible a été observée avec *S. Aureus* en présence de la formulation incluant la 1,8-naphtalimide LF8 à 30 μM en BSV36 avec seulement une inhibition partielle à inoculum moyen à une concentration égale à 300 μM en BSV36. Une absence totale d'effet immédiat visible dans les deux suspensions incluant la NOP (LF9 et LF10) ainsi que la référence LF11. En cumulant une irradiation avec le système S2 pendant 5 min une inhibition totale a été obtenue à inoculum moyen et à inoculum faible en présence de la formulation LF8. Cependant, aucun effet n'a été observé pour les formulations incluant NO (LF9, LF10 et la référence LF11). En général, les repiquages ont pour rôle de voir l'effet de la courte exposition aux formulations utilisées à forte concentration et ces tests sont généralement

complétés avec une cinétique de croissance à faible concentration pour voir des petits effets qui ne seraient pas visible avec les repiquages.

II.5.4 L'effet photo-toxique sur la croissance de bactérie *S. aureus* pendant 24h à faible concentration

Dans le but de visualiser l'effet d'inhibition de croissance précis qui n'a pas pu être observé par repiquage, une cinétique de croissance sur 24 heures a été réalisée par la détermination des temps de virages. (Plaque 4, Figure 143) L'intérêt consiste à regarder si les formulations utilisées induit un retard de croissance par rapport à la suspension non traitée par ces formulations (bactéries seules).

En effet, la cinétique permet d'obtenir des lectures de DO600 toutes les 10 minutes pendant 24 heures. Si le temps de virage (traité) égale au temps de virage du control cela implique l'absence d'effet antimicrobien, par contre si le temps de virage (traité) est supérieur au temps de virage (contrôle) cela implique un effet antimicrobien.

Comme le montre la Figure 145, à un seuil de DO600 = 0,1 pour *S. Aureus*, le contrôle (bactérie seule sans irradiation) atteint cette DO à t=12,5 heures. La suspension traitée par irradiation avec S1 atteint cette DO à t=20 heures. Par conséquent, le traitement de la suspension par la formulation LF8 plus une irradiation, induit un retard de croissance de 7,5 heures, ce qui implique la présence d'un effet antimicrobien.

**Cinétiques de croissance :
détermination du temps de virage**

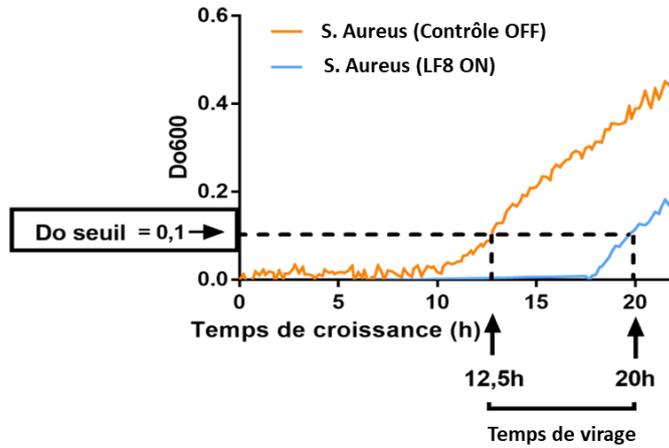


Figure 145. Cinétique de croissance : détermination du temps de virage pour *S. Aureus*

Les temps de virages calculés à partir de la cinétique de croissance ont montré un effet photo-toxique important à des inocula moyens pour l'ensemble des formulations LF8, LF9, LF10 ainsi que la référence LF11. L'effet est moins important à des inocula faibles. Cependant, l'effet photo-toxique est plus marqué avec la formulation LF8 incluant la 1,8-naphtalimide. Cela suggère un effet antimicrobien induit par le dérivé fluorescent 1,8-naphtalimide. Cet effet pourrait provenir de la production d'espèce réactives de l'oxygène (ROS).

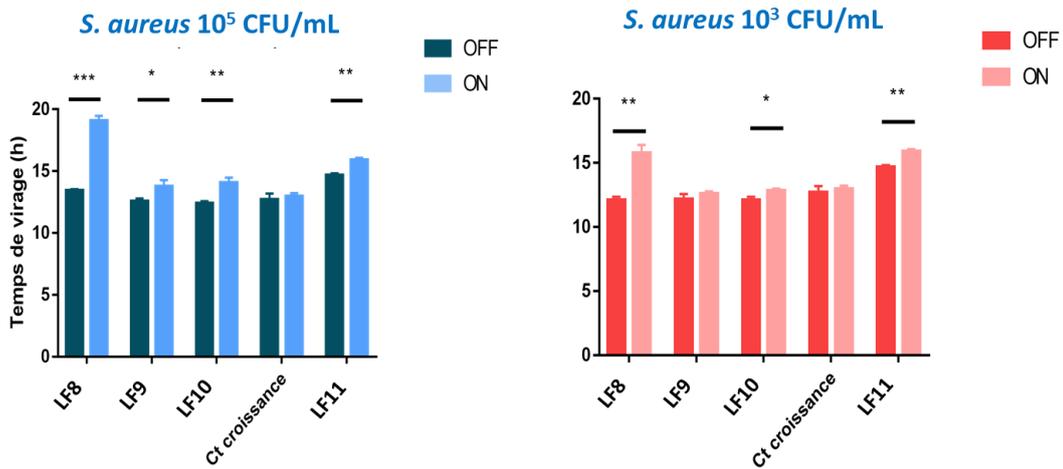


Figure 146. Effet photo-toxique sur la croissance des bactéries déterminé à partir des temps de virage. Expériences réalisées en 24h à faible concentration (7.5 µM en BSV36)

II.5.5 Effet photo-toxique sur la croissance de *S. aureus* pendant 24h à forte concentration

La DO600 a été mesurée 24 heures après traitement dans les plaques **P6** (plaque irradiée avec le système S1) et **P8** (plaque irradiée avec les deux systèmes S1 et S2) (Figure 143). Dans ces deux plaques la concentration finale des formulations en BSV36 est forte (150 µM), contrairement à la cinétique précédente de la plaque **P4** où la concentration était de 7,5 µM. Ici plus la DO600 est élevée plus la densité bactérienne est forte.

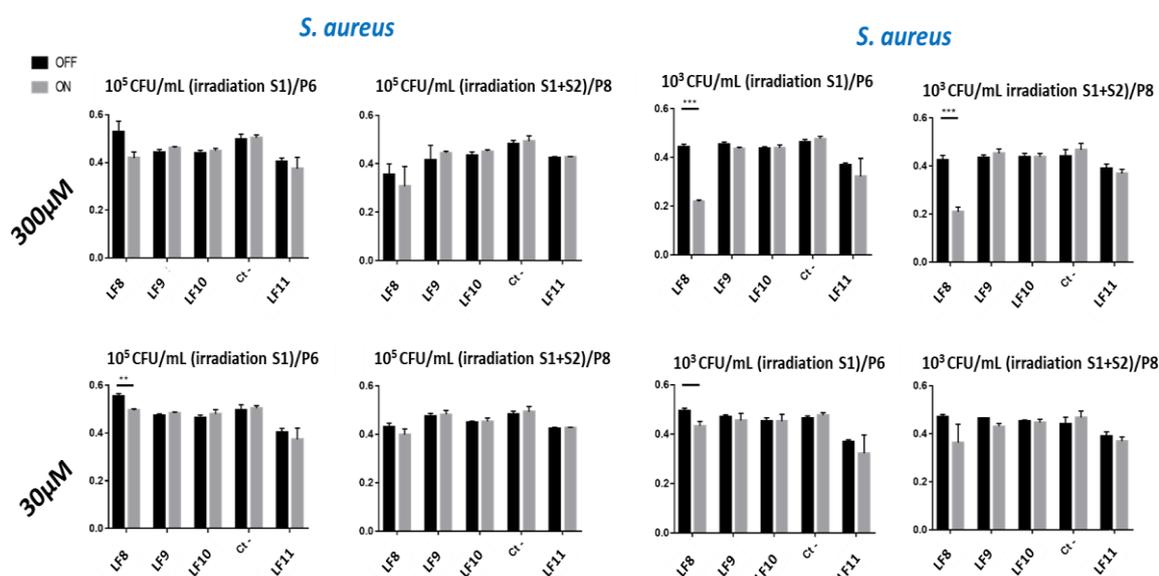


Figure 147. Cinétique de croissance de *S. aureus* pendant 24h à forte concentration par mesure de la DO600.

A partir des résultats présentés sur la Figure 147, nous pouvons conclure que l'effet antimicrobien n'est pas observable sur le long terme (après 24h) avec l'ensemble des suspensions libérant du NO (LF9, LF10 et la référence LF11). Seule une phototoxicité est observée avec LF8, formulation incluant la sonde fluorescente.

II.5.6 Recherche de la provenance de l'effet antimicrobien de LF8 : quantification d'espèces réactives de l'oxygène

Dans cette rubrique nous avons cherché à déterminer la provenance de l'activité photo-toxique observée dans le cas de LF8 en présence de *S. aureus*. Lors de ces travaux préliminaires, les essais ont été effectués en simplicat. Pour cela, nos échantillons ont été préparés de la manière suivante :

- Une solution liposomale incluant exclusivement le BSV36 à 300 μM . Cette solution a été préparée pour chercher l'éventuel effet photo-toxique induit par BSV36.
- Deux solutions références LF8 et LF11 à une concentration 300 μM en BSV36.
- Une solution dans l'eau du dérivé 1,8-naphtalimide à une concentration de 15 μM , concentration à laquelle se trouve ce composé dans la formulation LF8 par rapport au BSV36.

Toutes ces solutions ont été comparées à un contrôle positif (les bactéries sans composés, noté Ct+).

Dans un premier temps, une cinétique par calcul des temps de virage a été effectuée (Figure 148).

Temps de virage - effet phototoxique (415nm)

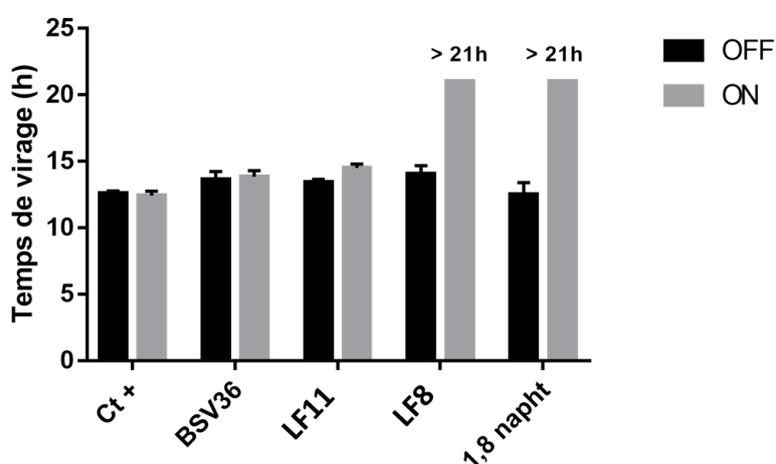


Figure 148. Effet photo-toxique (évalué par la détermination du temps de virage) sur la croissance des bactéries après 24h

Par le biais de cette cinétique, nous avons observé un effet photo-toxique similaire entre LF8 et le dérivé 1,8-naphtalimide seul. Aucun effet photo-toxique n'est observé en présence de BSV36. Ces résultats suggèrent que l'effet photo-toxique obtenu avec LF8 provient de la présence du 1,8-naphtalimide dans sa composition. Pour comprendre l'origine de cet effet, des tests complémentaires ont été effectués pour quantifier une éventuelle présence de ROS en particulier de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$).

En effet, la présence de l'oxygène au voisinage d'un photosensibilisateur (noté, PS), génère un transfert d'énergie entre ce dernier et l'oxygène. Comme l'oxygène se trouve à l'état fondamental sous un état triplet, la présence d'un transfert d'énergie va favoriser son passage d'un état triplet à un état singulet très réactif. Cette espèce réactive ou d'autres ROS peuvent réagir avec de nombreuses sondes chimiques ce qui facilite leurs caractérisations. La réaction entre l'oxygène singulet et ces sondes aide à la formation de peroxydes stables qui vont induire une modification de leurs propriétés photophysiques.

Pour la détection de l'oxygène singulet, nous avons utilisé le test SOSG (Singlet Oxygen Sensor Green) caractérisée par une fluorescence faible due à un transfert interne d'électrons. Une fois que cette sonde est mise dans un milieu contenant de l' $^1\text{O}_2$ le transfert interne d'électron est freiné et par conséquent une fluorescence intense est observée. Pour la détection d'autres espèces réactives d'oxygènes nous avons eu recours à la DCFH (2'-7'-dichlorodihydrofluorescein), une sonde qui donnera une fluorescence intense en présence de ROS (Figure 149).

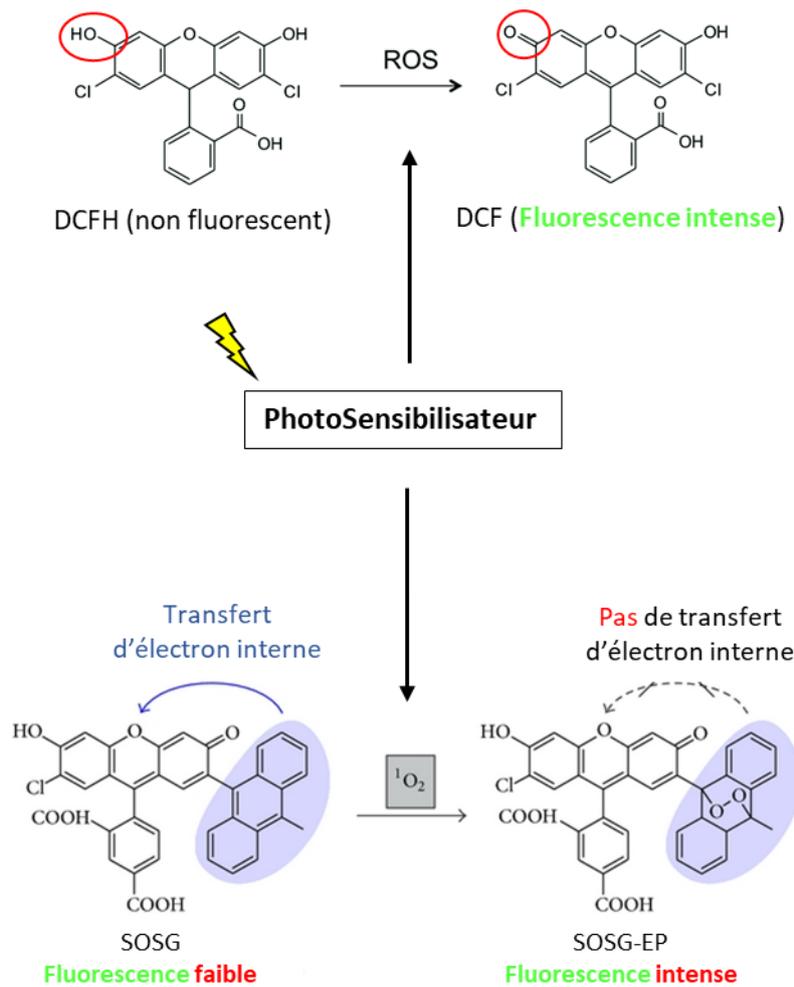


Figure 149. Protocole de détection de ROS et $^1\text{O}_2$ par les sondes DCFH et SOSG

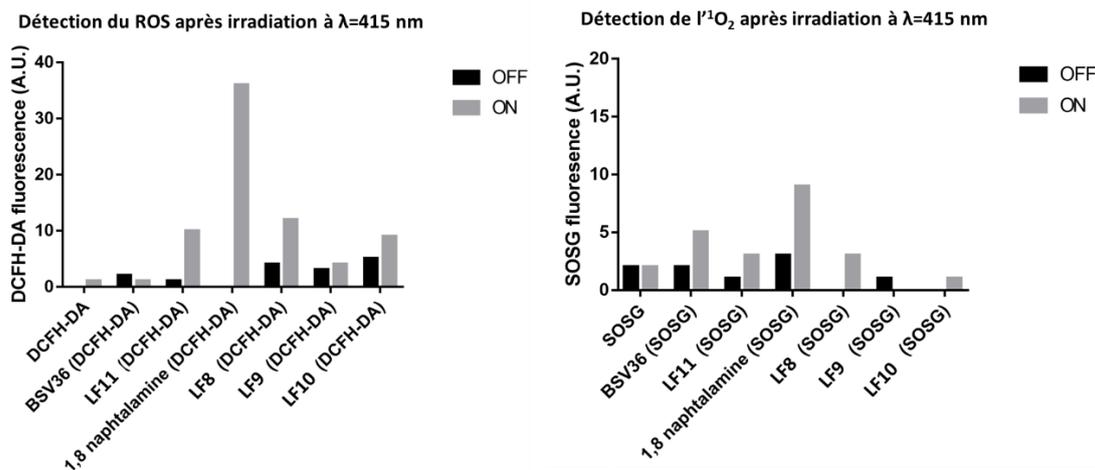


Figure 150. Détection du ROS et de l' 1O_2 par fluorescence

A partir de la Figure 150, les essais préliminaires ont montré une production de ROS très importante après irradiation du dérivé 1,8-naphtalimide libre dans l'eau. Les formulations LF9 et LF10 produisent également du ROS mais à des quantités plus faibles. En ce qui concerne la production de l'oxygène singulet, une faible production est observée pour le dérivé 1,8-naphtalimide seul et aucune production n'est observée pour les formulations LF8 et LF10. Les résultats préliminaires de phototoxicité ainsi que la quantification de ROS et de l' 1O_2 laissent supposer que la sonde 1,8-naphtalimide pourrait être un agent qui par photo-activation produit des ROS. Cependant, ces résultats préliminaires réalisés en simplicat doivent être réalisés en triplicat et complétés par d'autres essais complémentaires pour pouvoir trancher sur l'effet induit par la présence du motif 1,8-naphtalimide dans les formulations LF8 et LF9.

II.5.7 Visualisation des formulations fluorescente en microscopie fluorescence

Dans le but de visualiser les liposomales en présence des bactéries, nous avons effectué des tests en microscopie de fluorescence à filtre FITC (Fluoresceine Iso Thio Cyanate) (450 nm – 530 nm). Les tests ont été réalisés en NaCl 0,9% avec *S. aureus* et les clichés obtenus sont présentés dans la Figure 151.

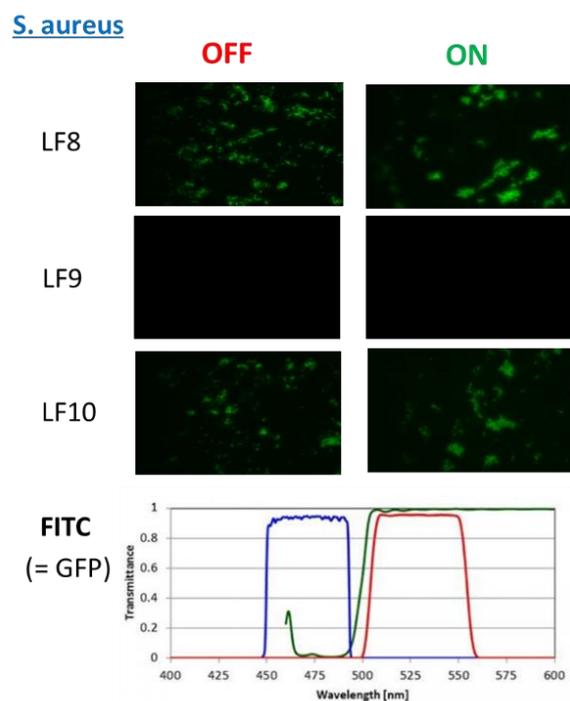


Figure 151. Clichés obtenus des formulation LF8, LF9 et LF10 en présence de *S. aureus* par microscopie fluorescence en utilisant un filtre FITC (450 nm – 530 nm). OFF avant excitation ; ON en excitant à 450 nm

Nous n'avons pas obtenu d'auto-fluorescence dans le cas où les bactéries sont en présence de la formulation LF9, cela confirme que le motif NOP n'est pas un composé fluorescent. Dans le cas, des suspensions de bactéries plus LF8 ou LF10, une bonne distribution de fluorescence caractérisée par une fluorescence intense est observée où il y a des agrégats de bactéries. Cependant, ce type de microscopie (agrandissement x40) ne permet d'avoir une localisation précise des liposomes.

II.5.8 Evaluation de la phototoxicité sur des cellules eucaryotes

Cette rubrique s'intéresse par l'évaluation de la toxicité et la phototoxicité des formulations précédemment utilisées sur des cellules eucaryotes (A549, lignée cancéreuse du poumon humain ; CFBE, cellules pulmonaires bronchiques mucoviscidiques). Les protocoles utilisés (préparation et lyse des cellules) dans cette rubrique seront détaillés dans le chapitre suivant qui portera sur l'évaluation de nouveaux lipides cationiques, obtenus par réaction PAC, en transfection.

Pour cette évaluation, des aliquotes de 20µL de chaque condition (LF8, LF9, LF10 et une solution de BSV36) ont été ajoutées à (300, 225, 150, 112,5 µM ; concentrations en BSV36 dans ces formulations) en eau ou seulement de l'eau pour les témoins (cellules sans formulations). Par la suite, les deux plaques

ont subi une irradiation avec le système S1 (2 fois x30 minutes), avant d'être incubées 24h à 37°C avec 5% de CO₂ puis lysées.

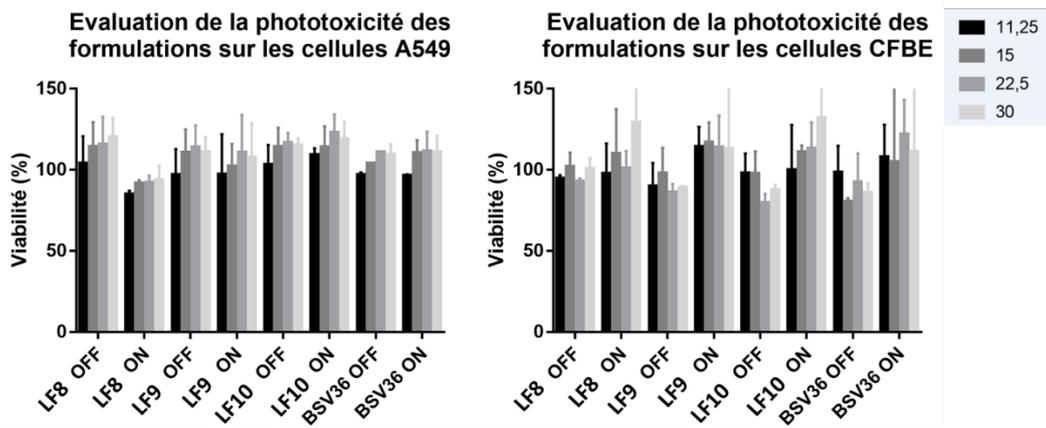


Figure 152. Évaluation de la phototoxicité des formulations sur des cellules CFBE et A549

Globalement, les formulations testées présentent une faible toxicité sur les deux lignées cellulaires. Sur la lignée A549 toutes les formulations testées avant et après exposition à la lumière maintiennent un taux de viabilité supérieur à 80% sauf pour LF8 qui semble induire une légère toxicité en présence de lumière. Sur la lignée CFBE toutes les formulations maintiennent un taux de viabilité supérieur à 80%.

III. Conclusion

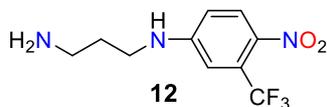
Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'application de la réaction PAC en modifiant la surface d'un liposome par une molécule photosensible pouvant libérer du NO (NOP). Cette étude a été réalisée lors d'une mobilité internationale en Italie - Catane au sein de l'équipe de Professeur Salvatore Sortino. Lors de cette mobilité, deux types de liposomes ont été préparés, un liposome incluant la NOP seule et un liposome bifonctionnel incluant la NOP et une sonde fluorescente de type 1,8-naphthalimide. Une caractérisation chrono-ampérométrique et UV-visible du relargage de NO a confirmé le greffage de la NOP à la surface du liposome. Une étude par fluorescence et par chrono-ampérométrie a suggéré que les deux motifs NOP et 1,8-naphthalimide ont été bien introduites à la surface du liposome bifonctionnel. Ces premiers résultats ont montré que la surface des liposomes a été modifiée par l'immobilisation du motif NOP puis par l'immobilisation des motifs NOP et 1,8-naphthalimide. De plus, la post-fonctionnalisation du NOP à la surface du liposome s'est avérée intéressante en termes d'efficacité de relargage de NO.

Dans un second temps, l'activité photo-toxique des formulations obtenues a été investiguée dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Professeur Tristan MONTIER (INSERM-U1078 Brest). Les liposomes incluant le motif fluorescent seul (LF8), le motif NOP seul (LF9) ou en combinant les deux motifs NOP et 1,8-naphthalimide (LF10) ont montré un effet photo-toxique immédiat important contre *S. aureus*, plus au moins marqué pour LF8. Cet effet apparait à long terme (cinétique de croissance pendant 24h) seulement pour la formulation incluant le motif fluorescent seul (LF8). La présence de cet effet photo-toxique à long terme pourrait être attribué à la production d'espèces réactives de l'oxygènes.

L'évaluation de la toxicité et phototoxicité des formulations utilisées lors de cette étude sur des cellules eucaryotes (A549 et CFBE) a montré une absence de toxicité ou une très faible toxicité.

IV. Partie expérimentale

N1-(4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenyl)propane-1,3-diamine **12**

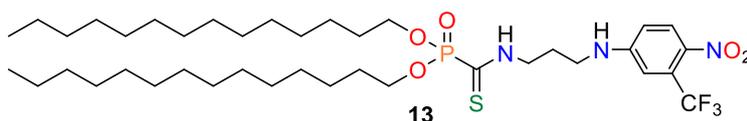


1,3-propyldiamine (1.64g, 44.33 mmol, V=3.7 ml) (5 eq) and Na₂CO₃ (2.29g, 44.33 mmol) (5 eq) were refluxed in acetonitrile for 15 min. 4-chloro-2-(trifluoromethyl)-1-nitrobenzene (1g, 8.86 mmol, V=655μL) (1 eq) was then added and the mixture was kept under continuous stirring for 3 days. After cooling down to ambient temperature the resulting suspension was filtered. The organic solution was concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography (MeOH/DCM/Ammoniac 10 :1 :0.1).

12 (850 mg ; Yield 36%) : ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ= 8.01 (d, ³J_{HH} = 9.1 Hz, 1H), 6.98 (d, ³J_{HH} = 2.2 Hz, 1H), 6.78 – 6.75 (m, 1H), 3.30 – 3.24 (m, 4H), 2.75 (t, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 2H), 1.84 – 1.74 (m, 2H). ¹³C{¹H} NMR (125 MHz, CDCl₃) : δ= 153.0, 134.9, 129.0, 125.8, 123.7, 121.5, 111.5, 110.7, 40.1, 38.4, 30.4.

MALDI- TOF (matrix: UTL HCCA) : m/z calcd for C₁₀H₁₂F₃N₃O₂ + H, [M+H]⁺= 264.09 ; observed [M+H]⁺= 264.23.

Ditetradecyl ((3-((4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenyl)amino)propyl)carbamothioyl)phosphonate **13**



To a mixture of phosphonodithioester **2** (100mg, 0.177 mmol) in 5 mL of THF is added the amine **12** (51 mg, 0.195 mmol) and then the mixture is stirred for one hour. The final product is obtained after two successive chromatographies : the first one with DCM:MeOH (10:2) as eluent and the second with hexane/AcOEt (10:2) as eluent.

13 (80mg ; Yield 58%) : ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ= 9.52 (s), 8.01 (d, ³J_{HH} = 9.0 Hz, 1H), 6.89 (d, ³J_{HH} = 2.5 Hz, 1H), 6.68 – 6.65 (m, 1H), 4.20 – 4.10 (m, 4H), 3.89 – 3.88 (m, 2H), 3.31 (t, ³J_{HH} = 6.1 Hz, 2H), 2.12 – 1.94 (m, 2H), 1.94 – 1.40 (m, 8H), 1.40 – 1.13 (m, 49H), 0.87 (t, ³J_{HH} = 6.9 Hz, 6H), ³¹P{¹H} NMR (162 MHz, CDCl₃) : δ= -

1.35, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, CDCl_3) : $\delta = 193.8$ (d, $^1J_{\text{CP}} = 180.12$ Hz), 151.4, 136.6, 121.1, 69.5, 42.0, 40.2, 31.9, 30.2, 29.5, 29.1, 26.6, 25.3, 22.6, 14.1.

Maldi TOF (matrix: UTL HCCA): $[\text{M}]^+$ calcd for $\text{C}_{39}\text{H}_{69}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_5\text{PS} + \text{H}$, $[\text{M}+\text{H}]^+ = 780.46$, observed $[\text{M}+\text{H}]^+ = 780.62$.

**Chapitre IV : Nouveaux lipides
cationiques Obtenus par réaction click
– Applications à la transfection**

Chapitre IV : Nouveaux lipides cationiques Obtenus par réaction click – Applications à la transfection

I. Introduction

Plusieurs familles d'amphiphiles cationiques ont été développées, par l'équipe « Phosphore et Vectorisation, P&V ». Elles possèdent toutes une architecture commune qui relie une partie hydrophobe à une partie polaire par le biais d'une fonction phosphorée. Ces composés amphiphiles ont la capacité de s'auto-organiser en solution aqueuse sous forme de liposomes ou d'agrégats supramoléculaires ayant une structure non-lamellaire (e.g. phase hexagonale inverse) et ont été utilisés comme agents de vectorisation de plasmides^{133,194–199}, de siARN^{200,201} ou d'ARN messenger^{202–204}. Au cours de ces études, la structure des composés amphiphiles a été modifiée au niveau de la partie hydrophobe, de la partie polaire mais également au niveau de la partie phosphorée.

Nous avons, au cours du deuxième chapitre, montré l'efficacité de la réaction click (PAC) entre un phosphonodithioformiate (neutre ou cationique) et une amine primaire. L'intérêt de cette réaction résulte de la simplicité de sa mise en œuvre (température ambiante, absence de catalyseur, temps de réaction court, conversion élevée).

Dans ce chapitre nous avons choisi d'appliquer la réaction PAC comme outil de synthèse permettant la construction de composés amphiphiles cationiques pour une application à la vectorisation de plasmides. La réaction PAC conduit à la formation d'un lien phosphonothioamide dans leur structure (voir encadré dans la Figure 153). Ce motif phosphonothioamide est susceptible de former des liaisons hydrogène avec les motifs P=O ou C=S comme accepteur. Si le motif P=O est un bon accepteur de liaison hydrogène^{205,206}, le groupe thiocarbonyle (e.g. dithioester) est également susceptible de former des liaisons hydrogènes fortes comme dans le cas des thioamides^{207,208}. Avec la présence de ces deux motifs susceptibles d'accepter des liaisons hydrogènes, les assemblages supramoléculaires générés par l'autoassemblage de ces amphiphiles ou lors de leur interaction avec une séquence d'acides nucléiques (lipoplexes ou lipopolyplexes) pourraient être stabilisés. Cette stabilisation peut contribuer à compacter

et protéger efficacement la séquence d'acide nucléique, qui est une étape importante du processus de transfection. Pour cette première étude visant à appliquer la réaction PAC pour construire des amphiphiles cationiques, nous avons envisagé une seule variation de la structure au niveau de la partie lipidique. Nous avons en effet retenu deux chaînes grasses comme indiqué dans la Figure 153. La première est une chaîne mono-insaturée (C18 :1 ω 9 ; chaîne oleyle). Ce type de chaîne lipidique est largement utilisé pour la conception de vecteurs d'acides nucléiques car l'insaturation génère un assemblage qui reste fluide. L'équipe P&V a largement utilisé cette chaîne lipidique que l'on trouve par exemple dans le composé BSV36¹³³. Le second type de chaîne lipidique correspond à une chaîne saturée mais ramifiée. Cette chaîne lipidique, que nous avons récemment utilisée dans la construction de composés amphiphiles²⁰⁹, conduit également à des efficacités de transfection élevées. La présence d'une ramification génère un assemblage non-lamellaire qui peut expliquer les bons résultats en transfection.

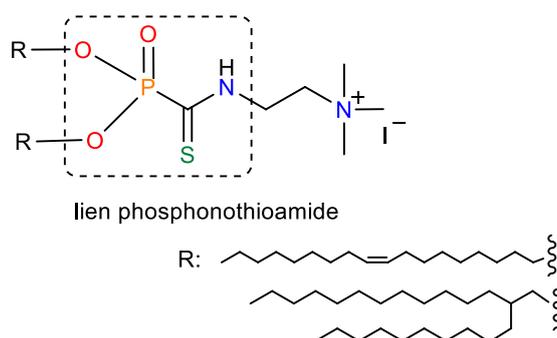


Figure 153. Structure générale des lipides cationiques cibles dans cette étude, nouvelle fonction phosphorée (encadrée)

Le premier objectif de ce chapitre a donc été de synthétiser les deux composés présentés dans la Figure 153. Ces composés seront, ensuite formulés puis évalués pour leur capacité à délivrer *in vitro* un plasmide codant la luciférase. Ces résultats de transfection seront comparés à des composés de référence du laboratoire tels que le BSV36 et le KLN47 pour déterminer l'effet de la modification de la chaîne lipidique et l'effet de l'incorporation d'un nouveau lien de type phosphonothioamide dans la structure des amphiphiles cationiques.

La partie bibliographique qui suit a pour objectif d'introduire ce chapitre en présentant brièvement la thérapie génique. Certains travaux antérieurs de l'équipe seront présentés avec un focus sur les travaux qui ont concernés la modification de la fonction phosphorée ou la modification de la partie lipidique.

II. Étude bibliographique

Le concept de la thérapie génique consiste à suppléer un gène altéré ou défectueux dans le cas des maladies monogéniques (liées au dysfonctionnement d'un seul gène, telles que la mucoviscidose²¹⁰). L'une des stratégies consiste à introduire du matériel génétique (e.g. ADN, ARN) dans des cellules ou des tissus pour soigner une maladie. S'il s'agit d'un gène, il faudra alors viser une délivrance nucléaire afin que l'étape de transcription puis celle de traduction puisse conduire à la formation de la protéine d'intérêt. Rapidement après la mise au point de cette stratégie thérapeutique, son champ d'application s'est élargi *via* l'utilisation de siARN ou ARN messenger, lui permettant d'être appliquée pour d'autres maladies telles que des cancers²¹¹ ou encore des maladies infectieuses (influenza virus²¹², SIDA²¹³, covid 19²¹⁴), ce qui a fait de cette thérapie un élément essentiel de l'arsenal thérapeutique.

Le succès de la thérapie génique dépend de la réussite de l'adressage du matériel génétique vers une cible cellulaire ou tissulaire, avec un minimum de toxicité²¹⁵. Les acides nucléiques étant chargés négativement, ils ne peuvent pas franchir seuls la membrane plasmique. De plus, l'ADN (ou ARN) est une molécule fragile susceptible de subir une dégradation rapide par les DNAses. C'est pourquoi, afin d'assurer un meilleur transport de l'ADN vers sa cible cellulaire, il est nécessaire de protéger la séquence d'acides nucléiques. Les vecteurs ont donc pour rôle de protéger, de compacter et de transporter le plasmide (ou autre séquence d'acide nucléique) vers les cellules cibles. Le choix du vecteur est déterminant pour le succès de la délivrance de la séquence d'acide nucléique. En effet, le vecteur idéal doit permettre une délivrance spécifique et efficace dans des cellules cibles sans engendrer trop d'effets secondaires. Par ailleurs, le vecteur doit idéalement être produit à large échelle et à moindre coûts.

Les deux principales classes de vecteurs utilisées dans le domaine de la thérapie génique sont les vecteurs viraux et les vecteurs non-viraux (synthétiques). Ces deux catégories seront succinctement discutées dans les deux rubriques suivantes.

II.1 Les vecteurs viraux^{216,217}

Les vecteurs viraux, utilisés en thérapie génique, sont des virus désactivés où leurs gènes viraux pathogènes responsables de l'infection sont éliminés et remplacés par le gène d'intérêt. Ils ont la capacité de délivrer efficacement le gène thérapeutique d'intérêt au sein des cellules hôtes, sans être dotés d'une capacité d'auto-réplication. On peut classer les différents types de virus utilisés en thérapie génique dans trois grandes familles :

- Les virus dont le génome est constitué d'ARN, se répartissent en deux catégories : les rétrovirus simples et les rétrovirus complexes (les lentivirus ou les virus dérivés de l'immunodéficience humaine VIH). Leur cycle viral comprend une étape essentielle de rétro-transcription de l'ARN viral en ADN viral.
- Les virus à ADN dont le génome est constitué d'ADN double brin linéaire (e.g. adénovirus) ou d'ADN simple brin (virus adéno-associés).
- Les virus dérivés de l'herpès qui possèdent un ADN double brin qui devient circulaire dans le noyau.

Plusieurs avancées thérapeutiques ont été rapportées avec l'utilisation des vecteurs viraux, avec par exemple les travaux réalisés par l'équipe de O. Danos sur la myopathie de Duchenne, une maladie caractérisée par l'absence de production d'une protéine musculaire qu'est la dystrophine²¹⁸. L'injection du gène codant la dystrophine *via* l'utilisation d'un virus associé aux adénovirus a permis la sécrétion d'une protéine fonctionnelle à un taux normal par 80% des fibres musculaires permettant de corriger les effets pathologiques de la maladie.

Les vecteurs viraux représentent près de 70% des essais cliniques²¹⁹. Cependant, l'utilisation de ces vecteurs peut faire apparaître des problèmes d'immunogénicité liés à l'activation du système de défense de l'organisme. Ce type d'agent de vectorisation permet difficilement de transférer des gènes

thérapeutiques de grandes tailles et présentent également l'inconvénient d'être coûteux à produire et à purifier. C'est pourquoi la recherche s'est orientée vers le développement de vecteurs non-viraux.

II.2 Les vecteurs non-viraux^{215,220}

Les vecteurs synthétiques représentent une alternative aux vecteurs viraux. Différents types de systèmes de vectorisation ont été développés, tels que les liposomes²²¹, les micelles²²², les nanoparticules métalliques et ioniques²²³, les dendrimères²²⁴, les gélatines²²⁵, etc... Ces vecteurs présentent plusieurs avantages comparés aux vecteurs viraux tels qu'une production à priori plus simple ou une immunogénicité réduite. Cependant, ces vecteurs sont à ce jour généralement moins efficaces que les vecteurs viraux²²⁶.

Dans ce chapitre nous nous intéresserons uniquement aux amphiphiles cationiques comme système de vectorisation d'ADN. La structure d'un amphiphile cationique est généralement constituée de trois parties: i) un domaine hydrophobe formé par une ou plusieurs chaînes alkyles, ii) une tête polaire hydrophile porteuse d'une charge positive, iii) un espaceur qui a pour rôle de lier le domaine hydrophobe à la partie hydrophile cationique (Figure 154).



Figure 154. Structure générale des amphiphiles cationiques.

Le premier lipide cationique utilisé comme vecteur synthétique en thérapie génique est le *N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-triméthylammonium (DOTMA), développé par Felgner et son équipe²²⁷ (Figure 155).

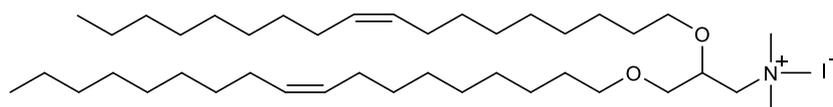


Figure 155. Structure chimique du DOTMA

Après les travaux de Felgner, de nombreux autres lipides cationiques ont été développés. Ils se différencient par la variation des trois parties qui constituent un amphiphile cationique. Bien que l'enjeu de cette partie ne soit pas d'énumérer de façon exhaustive les composés décrits dans la littérature, nous

soulignons néanmoins *via* le tableau ci-dessous quelques exemples, les plus connus, qui présentent la modulation de la tête polaire et/ou la partie hydrophobe. (Tableau 17)

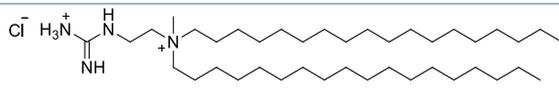
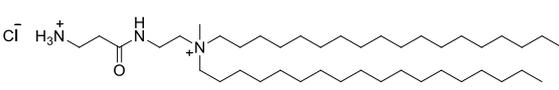
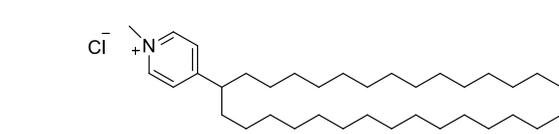
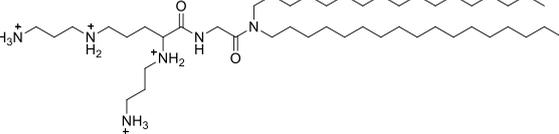
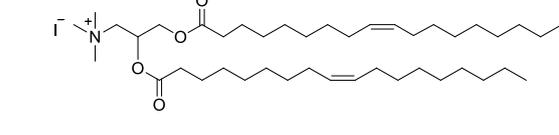
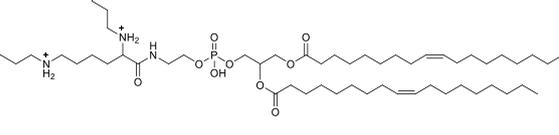
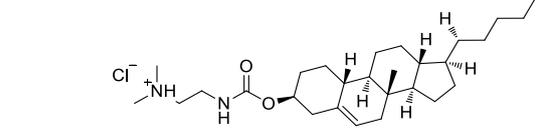
Structure	Nom	Nature de la chaîne hydrophobe	Nature de la tête polaire
		Chaîne C18 saturée	Guanidinium ²²⁸
	Alanine ²²⁹	Chaîne C18 saturée	Acides aminés
	SAINTS ²³⁰		Pyridinium
	DOGS ²³¹	Chaîne C17 saturée	Polyamines
	DOTAP ²³²	Chaîne C18 :1 instaturée	Ammonium quaternaire
	DPPES ²³¹	Chaîne C18 :1 instaturée	Polyamines
	DC-chole ²³³	Chaîne cholestérol	Chlorure d'ammonium

Tableau 17. Quelques exemples de lipides cationiques développés dans littérature après la découverte du DOTMA

Les liposomes cationiques, formés en solution aqueuse par ce type de composés amphiphiles, peuvent interagir par des interactions électrostatiques avec les molécules polyanioniques d'ADN ou d'ARN pour former un agrégat supramoléculaire appelé « lipoplexe »²³⁴. Cet agrégat doit être suffisamment stable lors de l'acheminement de l'ADN jusqu'à sa cible cellulaire. La stabilité colloïdale dépend fortement de la charge globale du lipoplexe. Cette charge globale dépend des ratios molaires utilisés entre

l'amphiphile cationique et le plasmide et qui représente théoriquement le rapport entre les charges positives, apportées par le lipide cationique, et les charges négatives, apportées par l'acide nucléique. Les lipoplexes chargés positivement ou négativement présentent généralement une bonne stabilité colloïdale. Néanmoins, il est important de souligner qu'un lipoplexe ayant une charge globale négative fait généralement apparaître une complexation incomplète de l'ADN. De ce fait, pour obtenir une complexation complète de l'ADN il est indispensable d'utiliser le lipide cationique en excès. Il est également essentiel de noter que les lipoplexes doivent présenter une certaine instabilité à l'arrivée dans la cellule pour faciliter la libération du plasmide dans le cytosol.

II.3 Mécanisme du transfert de gènes

Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, l'ADN est incapable de franchir seul les membranes cellulaires d'où l'utilité de former un lipoplexe chargé. Lors du transfert de gènes non-viral, ce complexe doit franchir les nombreuses barrières biologiques énumérées ci-dessous (Figure 156) :

- 1- La circulation sanguine : Lors de cette étape plusieurs interactions peuvent avoir lieu avec les éléments du sang et du système immunitaire. Généralement, ce sont des interactions de nature électrostatique qui peuvent se produire entre les complexes ADN/vecteurs (chargés) et des espèces ioniques ou polaires présentes dans la circulation sanguine, telles que les opsonines qui rendent ces complexes reconnaissables par les organes du système réticulo-endothélial (RES), où se passera leur métabolisation. Ces phénomènes peuvent provoquer une déstabilisation des lipoplexes et par conséquent une libération précoce de la séquence d'acides nucléiques (ADN ou ARN) avant d'atteindre la cible cellulaire. Il est donc recommandé d'utiliser des complexes stables pour garantir un transport de la séquence d'acides nucléiques jusqu'aux cellules cibles.
- 2- L'entrée dans la cellule : Avec sa structure chargée positivement le lipoplexe interagit avec la structure anionique de la membrane cellulaire. La suite de l'internalisation cellulaire se fait le plus souvent par endocytose. La nanoparticule se retrouve alors dans un compartiment cellulaire appelé endosome.

- 3- Échappement endosomal de la séquence d'ADN : Après endocytose, l'ADN se trouve dans un endosome qui va naturellement évoluer (maturation) vers la formation de lysosome. À ce stade, une acidification marquée de ce compartiment et l'activation de certains systèmes enzymatiques entraînent une dégradation du contenu du lysosome, dont la séquence d'ADN transportée. Il est donc essentiel que la séquence d'ADN puisse quitter l'endosome avant sa dégradation, pour se localiser dans le cytosol. Cette libération peut être initiée par une déstabilisation de la membrane endosomale par les lipides présents dans le lipoplexe, *via* un mélange des composés amphiphiles du lipoplexe et de la membrane endosomale, selon un mécanisme de flip-flop²³⁵. Ce mécanisme va engendrer une réorganisation des assemblages supramoléculaires et ainsi provoquer la neutralisation de la charge du lipoplexe, ce qui va contribuer à libérer la séquence d'ADN dans le cytoplasme.
- 4- Le transport dans le cytosol et l'entrée dans le noyau : Une fois que le plasmide est localisé dans le cytoplasme, il migrera vers le noyau par diffusion passive. Le franchissement de la membrane nucléaire peut se faire soit par les pores nucléaires soit, de façon plus probable, lors de la mitose (division cellulaire).

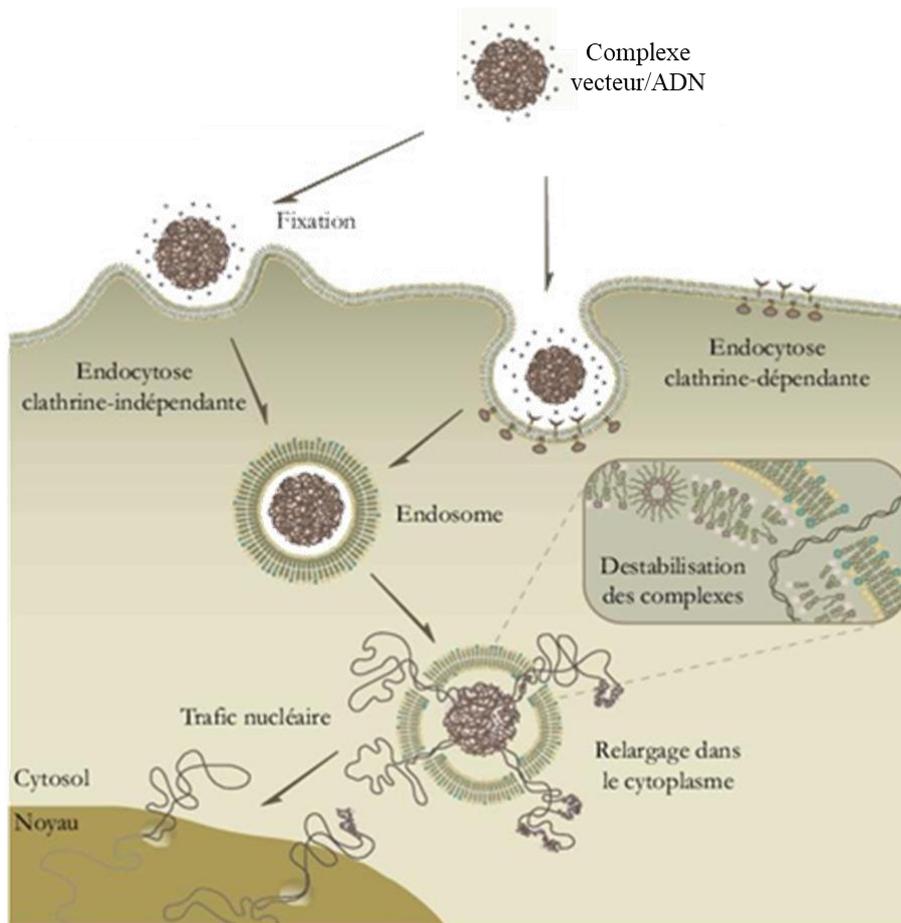


Figure 156. Différentes étapes de la transfection au niveau cellulaire²³⁶

II.4 Lipides cationiques développés au sein du laboratoire

Dans l'équipe « Phosphore et Vectorisation » les lipides synthétisés comportent tous une fonction phosphorée qui lie une partie lipophile et une partie hydrophile (Figure 157). Durant les deux dernières décennies plusieurs structures et modulations de ces trois parties ont été effectuées au sein de l'équipe.

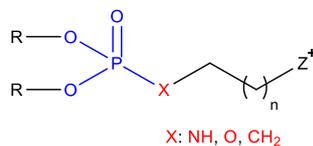


Figure 157. Structure générale des lipides cationiques développés au sein de l'équipe

Une première famille de lipides cationiques de type lipophosphonates a vu le jour dans le cadre de la thèse de G. Le Bolc'h²³⁷ en s'inspirant des travaux de l'équipe de Behr²³⁸. Une série de lipides a été synthétisée avec ce lien phosphonate et des variations de la partie lipidique et de la partie polaire cationique (Figure 158).

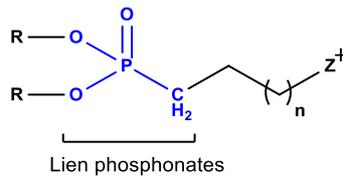


Figure 158. Modulations de la partie hydrophobe et la partie polaire dans le cadre des travaux de G. Le Bolc'h

G. Le Bolc'h a étudié la modulation de la partie polaire et de la partie hydrophobe en préparant des lipophosphonates ayant des chaînes tétradécyle ($C_{14}H_{29}$), oléyle ($C_{18}H_{35}$), stéaryle ($C_{18}H_{36}$) et hexadécyle ($C_{16}H_{33}$). Ces composés préparés avaient pour tête polaire un groupe ammonium, guanidinium ou de type polyamine.

Cette étude a souligné l'impact de la chaîne grasse pour avoir une meilleure efficacité en transfection. En effet, la présence de chaînes de lipides insaturées dans la partie hydrophobe assure une meilleure efficacité que dans le cas où la partie hydrophobe est formée avec des chaînes lipidiques saturées. Une difficulté à formuler les lipides cationiques a été rapportée dans le cas où la partie hydrophobe est exclusivement formée de chaînes lipidiques saturées. Il a été observé qu'un allongement des chaînes saturées s'accompagne d'une diminution de l'efficacité de transfection.

Une nouvelle famille de lipides cationiques a été développée en remplaçant la fonction phosphonate par une fonction phosphoramidate. Cette famille est préparée en trois étapes de synthèse et a permis de développer le KLN47 dans le cadre de la thèse de K. Le Ny²³⁹. Il s'agit d'un lipophosphoramidate constitué d'une partie hydrophobe de type oléyle et une partie polaire de type triméthylarsonium (Figure 159).

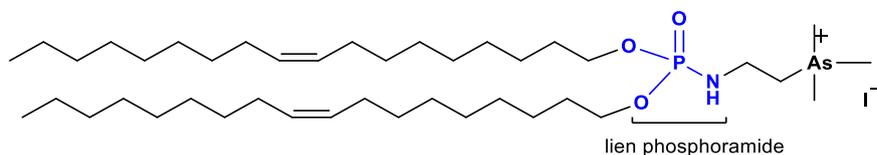


Figure 159. Structure du KLN47

À ce jour, ce composé est considéré comme une référence du laboratoire P&V étant donné son efficacité en transfection.

Plusieurs modulations de la partie hydrophobe ont été effectuées sur cette nouvelle génération de phospholipides en fixant une tête polaire de type arsonium. Deux insaturations ont été introduites par

E. Picquet, conduisant au composé BSV4 (Figure 160) qui inclut deux chaînes linoléyles¹⁹⁴. Dans le but de minimiser les interactions inter-chaînes lipidiques, un nouveau lipide présentant des ramifications (chaînes méthyles) a été synthétisé²⁴⁰. Ce nouveau lipide cationique (BSV18) inclut deux chaînes phytanyles (Figure 160).

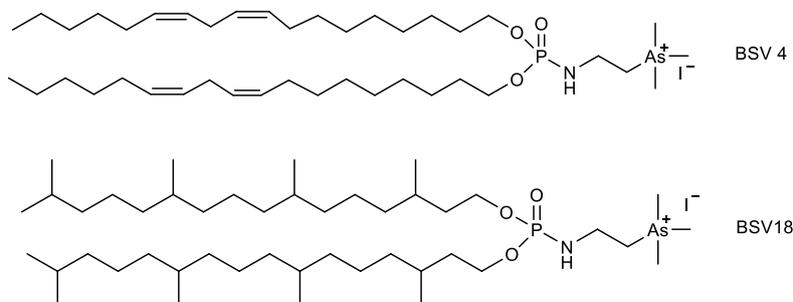


Figure 160. Structure chimique du BSV4 et BSV 18

Mattias. F. Lindberg et al.²⁴⁰ ont montré que l'introduction de chaînes hydrophobes de type phytanyle conduit à une augmentation de l'efficacité en transfection *in vivo* comparé aux expériences utilisant l'amphiphile cationique comportant des chaînes linoléyles (BSV4).

Dans le cadre de la thèse d'Aurore Fraix¹⁹⁵, une autre série de composés de types thiophosphoramides a été préparée et qui présente une liaison P=S à la place du groupe phosphoryl (P=O) dans leur structure dans le but de moduler la force des liaisons hydrogènes (Figure 161).

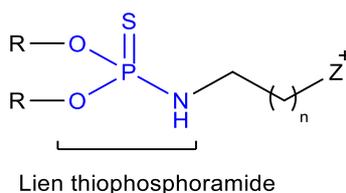


Figure 161. Structure du thiophosphoramide

Stéphanie Le Corre a développé, également durant sa thèse de nouveaux types de vecteurs, en modifiant la fonction phosphorée. Cette modification porte sur la formation d'un lien phosphate en changeant les liens P-C et P-N existants par un lien P-O¹³³ (Figure 162). L'objectif était de préparer des lipides cationiques plus facilement dégradables par coupure chimique ou enzymatique.

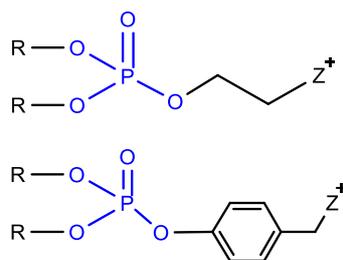


Figure 162. Structure de lipophosphates cationiques

À travers ce résumé bibliographique des travaux antérieurs de l'équipe, nous avons montré que la modulation de la partie phosphorée a permis de préparer diverses familles de lipides cationiques (lipophosphonates, lipophosphoramide, thiophosphoramides, lipophosphates). Nous avons montré également à travers ces travaux que la modulation de la partie hydrophobe a une grande influence sur les propriétés de transfection.

La suite de ce chapitre sera dédiée à la synthèse d'une nouvelle famille de lipides cationiques incluant un lien phosphonothioamide en se basant sur la réaction PAC comme une étape clé de synthèse. Deux chaînes hydrophobes (oléyle et ramifiée) seront utilisées dans ce chapitre pour moduler la partie lipidique. Dans cette étude la partie polaire sera identique (cation triméthylamonium).

Les propriétés de transfection et la viabilité cellulaire de ces nouveaux composés seront comparées aux deux références du laboratoire BSV36 et KLN47.

III. Résultats et discussions

III.1 La synthèse des amphiphiles cationiques

Cette rubrique sera consacrée à la synthèse de deux amphiphiles cationiques obtenus par réaction PAC. Pour disposer de ces composés 4 étapes sont nécessaires (Figure 163) : i) préparation des deux phosphites, ii) préparation des phosphonodithioformiates selon la méthode de Grisley, iii) préparation des phosphonothioamides par la réaction PAC, iv) quaternarisation de l'amine tertiaire.

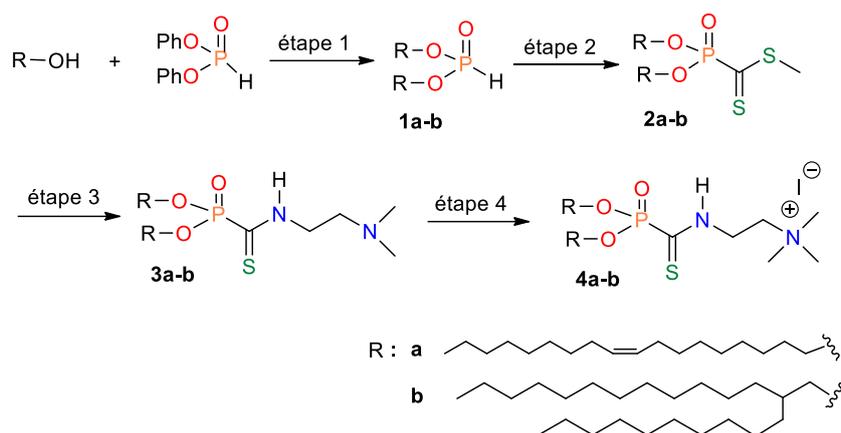


Figure 163. Les 4 étapes de la synthèse d'amphiphiles cationiques incluant un lien phosphonothioamide

III.2 Synthèse des phosphites lipidiques

Le protocole de synthèse des phosphites est semblable à celui décrit dans les deux chapitres précédents.

Un léger excès d'alcool oléique ou de 2-decyltétradécanol par rapport au diphenyle phosphite est placé dans un montage de distillation Kugelroch. Le mélange est chauffé pendant 4h à 140°C sous pression réduite ($4 \cdot 10^{-2}$ mbar), puis pendant une heure à 180°C pour éliminer l'excès d'alcool n'ayant pas réagi (Figure 164).

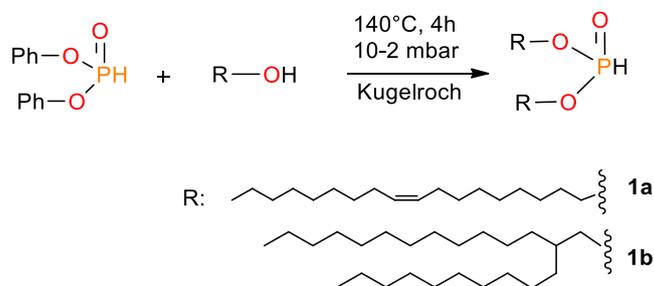


Figure 164. Synthèse des phosphites **1a** et **1b** par distillation

La présence d'un seul pic en RMN- ^{31}P à 9.12 ppm pour le phosphite **1a** et à 9.61 ppm pour le phosphite **1b** contribue à montrer la pureté de ces deux composés. En RMN- ^1H la liaison P-H fait apparaître un doublet caractéristique ($^1J_{\text{HP}} = 692$ Hz pour le composé **1a** et $^1J_{\text{HP}} = 691$ Hz pour le composé **1b**) qui contribue à confirmer la structure des composés **1a** et **1b** (Figure 165). Les deux phosphites ont été obtenus avec des rendements 97% et de 95% respectivement pour **1a** et **1b**, sans purification supplémentaire. Les composés **1a** et **1b** ont été isolés à l'échelle de quelques grammes (3 g).

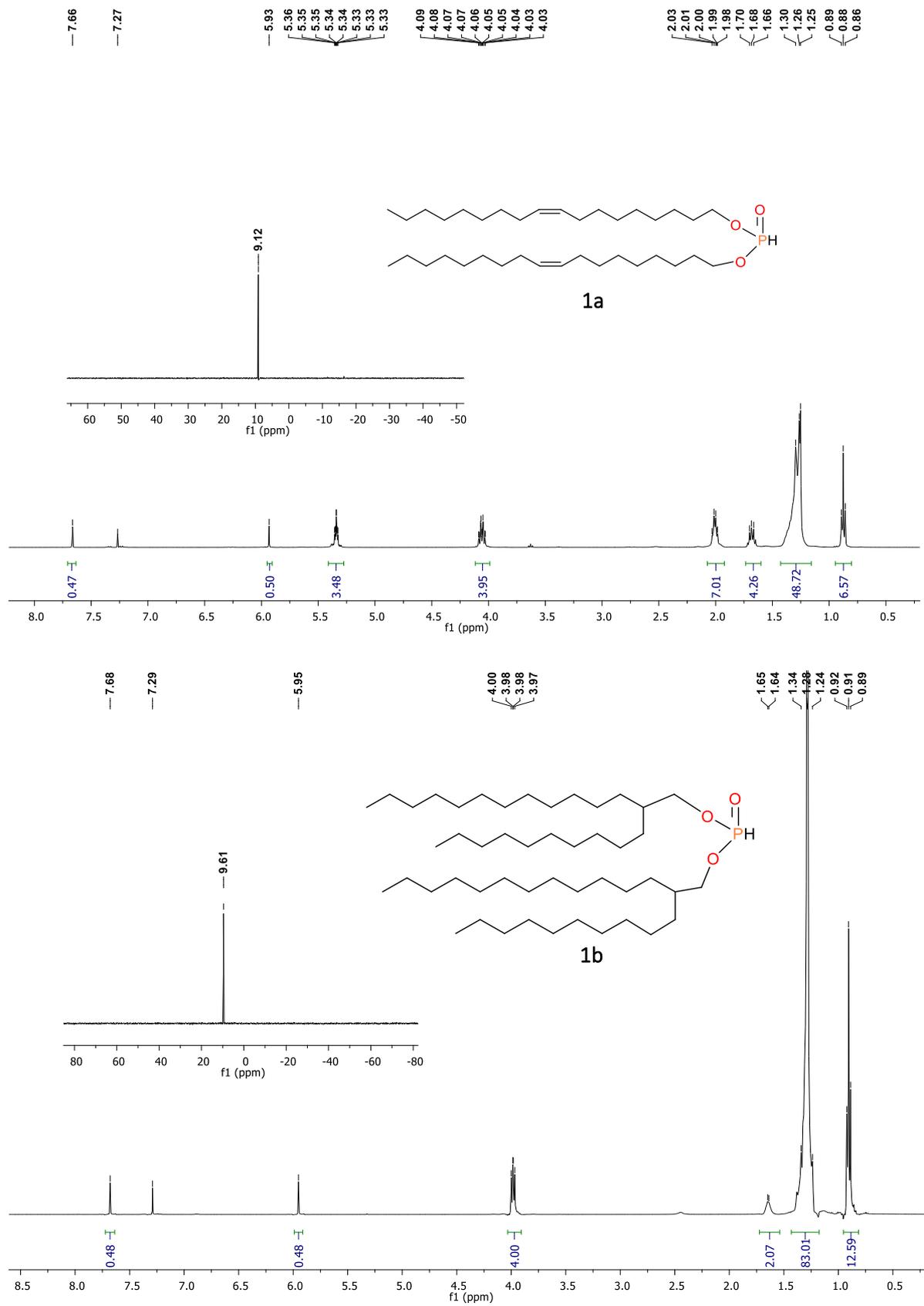


Figure 165. Spectres RMN-¹H et RMN-³¹P des phosphites **1a** et **1b**

III.2.1 Synthèse des phosphonodithioformiates

La deuxième étape de synthèse consiste en la préparation des phosphonodithioformiates **2a** et **2b**. La synthèse des phosphonodithioesters à chaînes hydrophobes longues a été mise au point au cours du chapitre 2. Brièvement, un sel de phosphite est formé en faisant réagir le phosphite (**1a** ou **1b**) avec NaH pendant 4h en chauffant à 54°C dans le THF. Par la suite, le disulfure de carbone (CS₂) est additionné à la solution de sels de phosphites préalablement refroidie à -78°C. Finalement, les composés finaux sont obtenus après une alkylation en présence de l'iodométhane à température ambiante suivie d'une purification par chromatographie sur colonne de silice (Figure 166).

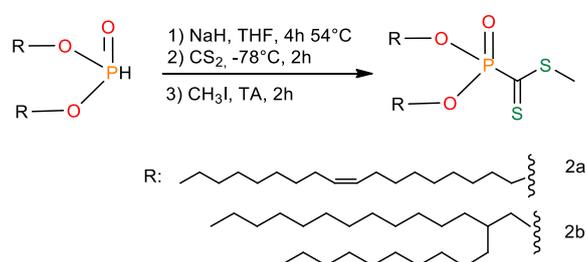


Figure 166. Synthèse des phosphonodithioformiates **2a** et **2b**

L'avancement de la réaction peut être suivi par RMN-³¹P en utilisant une sonde D₂O. La structure finale du phosphonodithioester a été confirmée par RMN ¹H. L'analyse RMN-¹H du produit final **2a** montre la disparition du doublet caractéristique de la liaison P-H ainsi que l'apparition d'un singulet à 2.76 ppm qui atteste la présence du groupe méthyle du dithioester (S-CH₃). Le spectre RMN-³¹P montre un seul pic à -1.69 ppm.

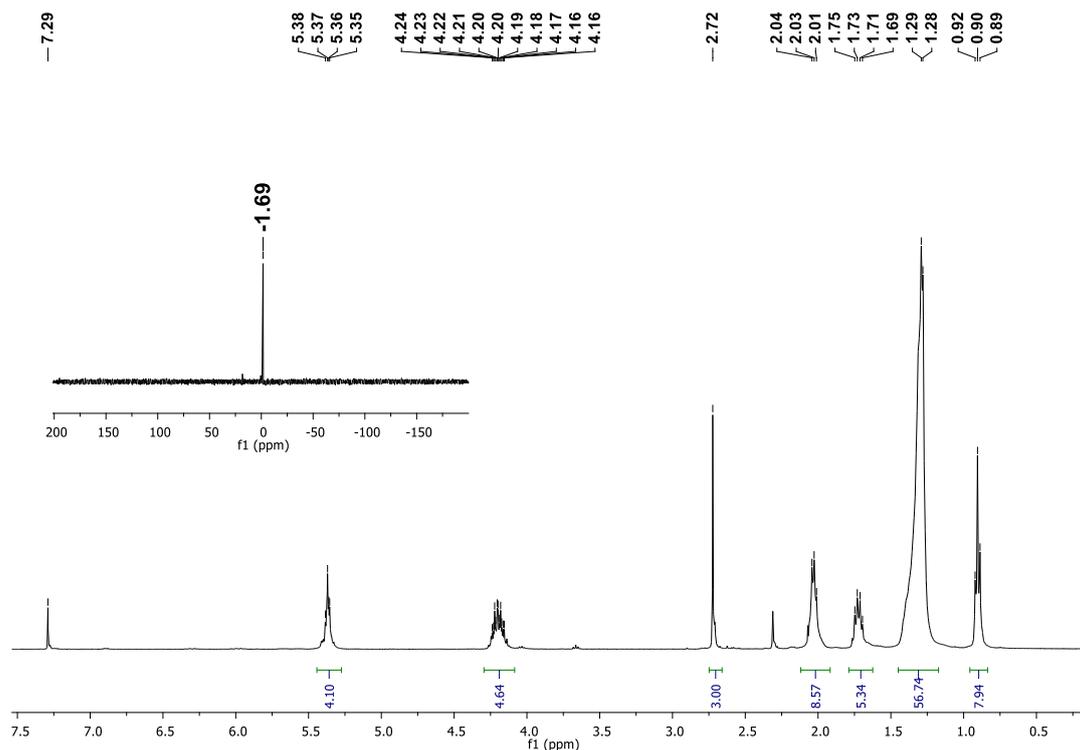


Figure 167. RMN ^1H du phosphonodithioesters **2a** après purification

La structure des deux phosphonodithioformiates (**2a** et **2b**) a également été confirmée par RMN- ^{13}C et par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les deux composés ont été isolés avec un rendement faible de 20%. Néanmoins, les quantités obtenues (450 mg et 400 mg respectivement pour **2a** et **2b**) nous ont permis de disposer de quantités suffisantes pour réaliser la suite de notre étude.

III.2.2 Synthèse des phosphonothioamides par la réaction PAC

Cette étape consiste à réaliser un couplage par réaction PAC entre le phosphonodithioformiate **2a** ou **2b** et la *N,N*-diméthyléthylènediamine. La réaction a été effectuée dans le THF à température ambiante pendant une heure (Figure 168).

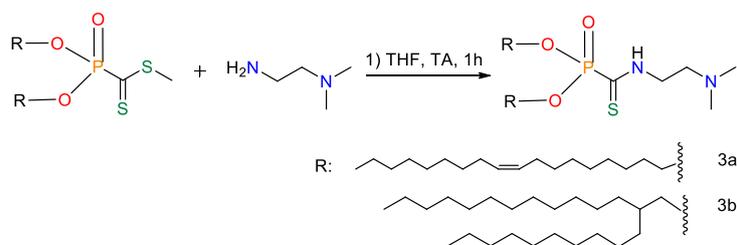


Figure 168. Synthèse des phosphonothioamides **3a** et **3b** par la réaction PAC

L'avancement de la réaction peut être suivi par RMN du proton où il est possible de repérer la disparition du singulet S-CH₃ aux alentours de 2.70 ppm et l'apparition d'un autre singulet, qui intègre pour 6 protons, caractéristique du groupe N-(CH₃)₂ à 2.25 ppm. On note, aussi la présence de deux signaux qui intègrent pour 2 protons chacun et qui correspondent aux deux CH₂ du motif éthylènediamine. La Figure 169 présente le spectre RMN-¹H et RMN-³¹P du composé **3a** comme exemple.

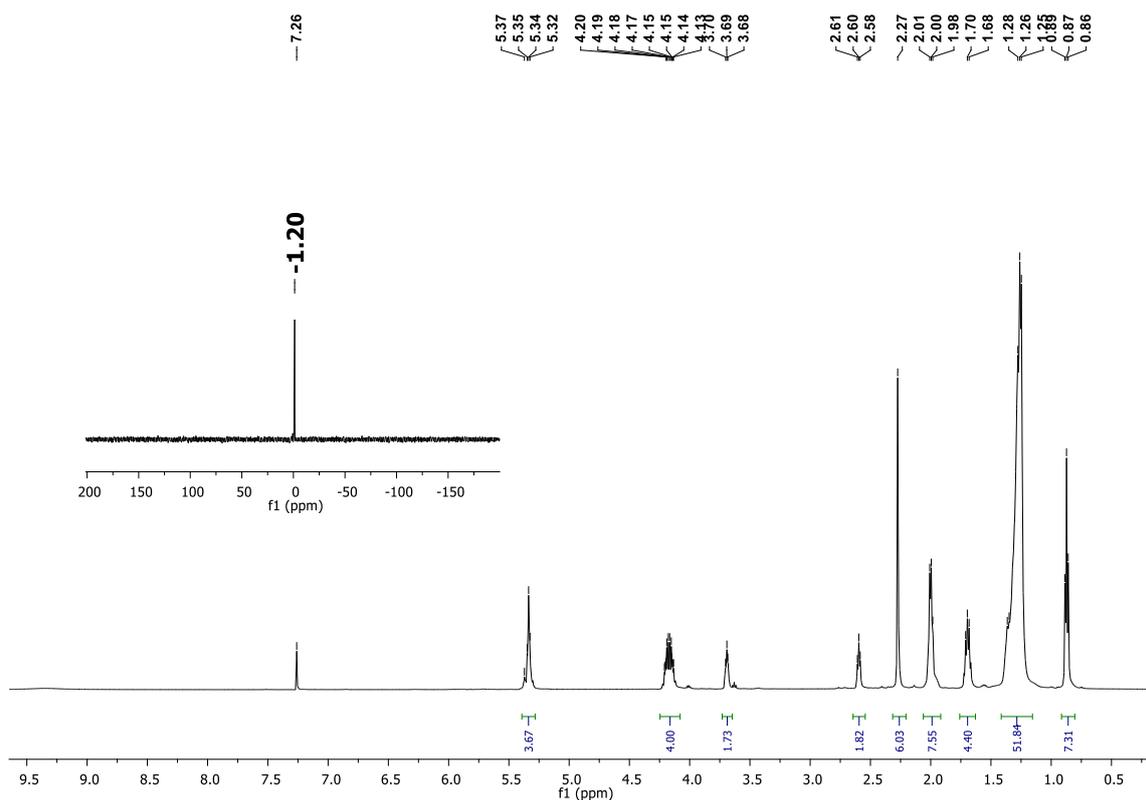


Figure 169. Spectre RMN ¹H et ³¹P du composé **3a** après la réaction PAC après purification

Les phosphonothioamides **3a** et **3b** ont été obtenus respectivement avec un rendement de 57% et 49% après une chromatographie sur colonne et des masses de 121 mg et 51mg.

III.2.3 Quaternarisation des phosphonothioamides

Cette quatrième et dernière étape consiste à former les deux phosphonothioamides cationiques recherchés (**4a** et **4b**) après introduction de la tête triméthylammonium (Figure 170).

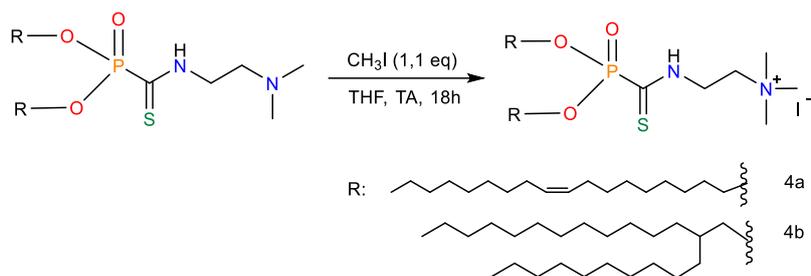


Figure 170. Formation des phosphonothioamides cationiques **4a** et **4b**

Un excès d'iodométhane est ajouté à la solution du phosphonothioamide (**3a** et **3b**) obtenue lors de l'étape précédente. Le produit final est obtenu après une agitation pendant une nuit à température ambiante. Le composé **4a** se caractérise en RMN-³¹P par un déplacement chimique à -2.34 ppm. En RMN-¹H, le signal à 2.25 ppm caractéristique du groupe N(CH₃)₂ présents dans le composé **3a** disparaît et donne place à un signal à 3.54 ppm qui intègre pour 9 protons et qui correspond au groupe N(CH₃)₃ du composé **4a** (Figure 171).

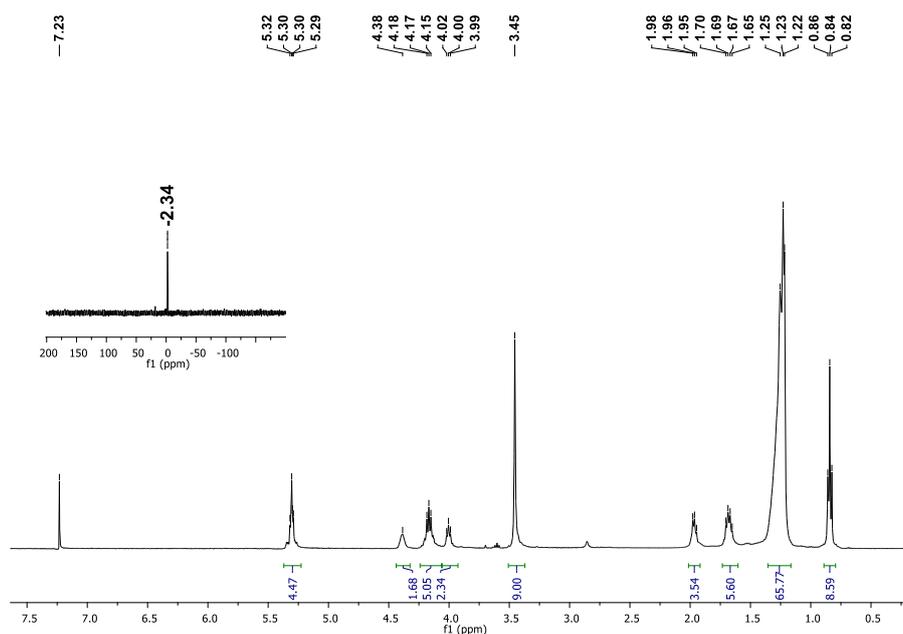


Figure 171. Spectre RMN ¹H et ³¹P du composé **4a** après l'étape de quaternarisation

Les deux composés **4a** et **4b** ont été obtenus respectivement avec un rendement de 75% et 85% après une chromatographie sur gel de silice (76 et 44 mg respectivement).

Au final, la synthèse des deux nouveaux lipides cationiques (**4a** et **4b**) a été effectuée en 4 étapes avec un rendement global égal à 8%. Malgré ce faible rendement global, nous avons pu isoler les composés finaux avec des quantités largement suffisantes pour la suite de l'étude.

III.3 Formulations des nouveaux lipides cationiques

Disposant des deux nouveaux lipides cationiques **4a** et **4b** (Figure 172) ainsi que les deux composés de référence BSV36 et KLN47, nous avons commencé la préparation des solutions liposomales en utilisant la méthode d'hydratation du film lipidique, comme détaillée au chapitre 2. Pour ces formulations nous n'avons, dans un premier temps, utilisé aucun co-lipide.

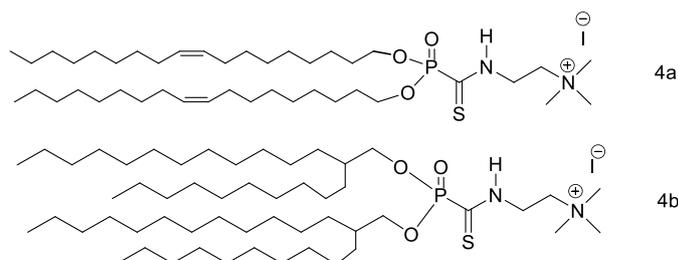


Figure 172. Structure des lipides cationiques **4a** et **4b**.

Les composés **4a** et **4b** ont été préparés sous forme d'un film lipidique puis hydratés à 4°C pendant un temps variable (1 nuit, 1 semaine ou 2 semaines ; hydratation à 4°C). Ensuite ces films hydratés ont été soniqués pour une durée maximale d'une heure. Néanmoins quel que soit le temps d'hydratation et le temps de sonication (jusqu'à une heure), nous n'avons pas obtenu de formulation homogène pour le composé **4a** (observation à l'œil d'agrégats). Les analyses par DLS pour la formulation incluant **4a** indiquent la présence majoritaire d'agrégats de grandes tailles (505 ± 24 nm avec une distribution égale à 71%, zêta potentiel $+61 \pm 2$ mV). On peut noter que pour le composé BSV36, qui ne diffère du composé **4a** que par l'espaceur (phosphoramidate pour BSV36 et phosphonothioamide pour **4a**), le temps d'hydratation d'une nuit suivi de 15 minutes de sonication conduit à une formulation homogène caractérisable par DLS (taille entre 120 et 200 nm ; potentiel zêta : $> +30$ mV). Ce résultat montre donc que l'incorporation du motif thiocarbonyl induit une difficulté de formulation que l'on peut attribuer soit à un espaceur moins polaire pour le composé **4a** par rapport à BSV36, soit à la formation de liaisons hydrogènes qui rend la réorganisation et la structuration des agrégats en milieu aqueux plus difficile. Dans le cas du composé **4b** nous n'avons pas réussi à décoller le film lipidique des parois des tubes à hémolyses, même en allant au-delà d'une heure de sonication.

Au vu de ces résultats, nous avons choisi d'associer aux composés **4a** ou **4b** un co-lipide lors de l'étape de formulation, afin de faciliter la formation d'une solution liposomale homogène. Dans ce but, nous avons retenu le 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) et le cholestérol (Figure 173). D'une part, la DOPE, utilisée généralement en ratio 1/1 avec un lipide cationique, est connue pour sa capacité à améliorer significativement l'efficacité de transfection²⁴¹. D'autre part, la présence du cholestérol peut contribuer à la structuration des liposomes et apporte une rigidité aux assemblages supramoléculaires.

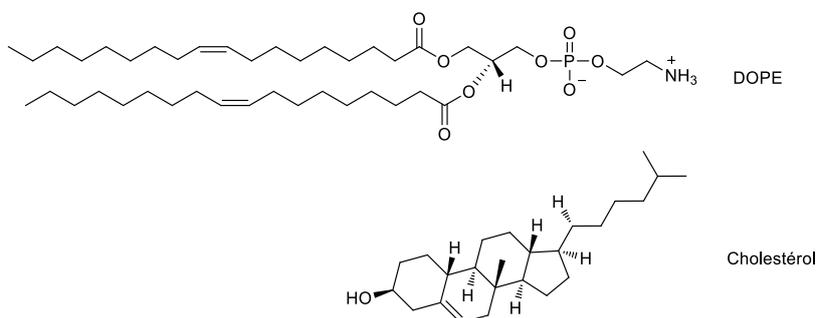


Figure 173. Structure de la DOPE et du cholestérol

Sept solutions liposomales ont été préparées comme indiqué dans le Tableau 18. Parmi ces formulations, une solution liposomale à base de KLN47 a également été préparée, comme décrit par Le Gall et al.¹⁹⁴ Des vésicules, de taille moyenne égale à 180 nm, ont été obtenues et serviront comme référence lors de l'étape de transfection.

Formulations	Composition	Ratio molaire	Concentration	Méthode de préparation
ref 1	BSV36	1	1.5 mM	Film lipidique
ref 2	KLN47	1	1.5 mM	Film lipidique
SL1	4a : DOPE	1 : 1	1.5 mM	Film lipidique
SL2	4a : Chol : DOPE	1 : 1 : 1	1.5 mM	Film lipidique
SL3	4b : DOPE	1 : 1	1.5 mM	Film lipidique
SL4	4b : Chol : DOPE	1 : 1 : 1	1.5 mM	Film lipidique
SL5	4b : DOPE	1 : 1	1.5 mM	Injection éthanolique

Tableau 18. Compositions des Solutions Liposomales (SL) utilisées incluant deux références^{133,194}

Les formulations (SL1-4, ainsi que les deux références) ont été préparées par la méthode d'hydratation du film lipidique. Ici le BSV36 a été préparé pour servir de référence pour les tests de transfection. Après un temps d'hydratation d'une nuit à 4°C suivi d'une étape de sonication (15 min), nous avons obtenu une solution liposomale caractérisée par des tailles d'agrégats moyens de 169±9 nm, et une charge positive égale à +58 mV.

Pour la suite, nous avons formulé les composés **4a** et **4b** avec la DOPE (SL1 et SL3) ou la DOPE et du cholestérol (SL2 et SL4) pour une concentration finale en lipide cationique **4a** ou **4b** égale à 1.5 mM. L'hydratation du film lipidique pendant une nuit suivie d'une étape de sonication (30 min) a permis d'obtenir des solutions liposomales homogènes pour les deux formulations du composé **4a** (SL1 et SL2). Pour le composé **4b** des solutions non-homogènes sont obtenues, même en allant jusqu'à 1h de sonication et en chauffant jusqu'à 60°C pour la solution incluant du cholestérol. Les difficultés rencontrées avec le composé **4b** lors des essais de préparation des solutions liposomales SL3 et SL4, nous ont incité à utiliser la méthode d'injection éthanolique pour les préparations des liposomes dans l'espoir de résoudre ces soucis de formulation.

Cette méthode consiste à solubiliser le composé **4b** avec la DOPE dans un volume minimum d'éthanol (volume d'éthanol inférieur à 1% du volume total de la solution liposomale). Par la suite, ce mélange de lipides est additionné goutte à goutte dans une solution d'eau milli Q sous agitation. Enfin, la solution obtenue SL5 est placée dans un évaporateur rotatif dans le but d'évaporer le maximum d'éthanol. La formulation SL4 par injection éthanolique n'a pas été réalisée.

L'analyse DLS des solutions liposomales BSV36, SL1 et SL2, obtenues par la méthode d'hydratation du film lipidique, et SL5, obtenue par la méthode d'injection éthanolique, est résumée dans le Tableau 19.

Formulation	Composition	taille (nm)	PDI	Zeta Potentiel
ref 1	BSV36	169±9	0.2	58±0.06
SL1	4a : DOPE	227±41	0.4	61±1.7
SL2	4a : Chol : DOPE	194±16	0.4	79±0.6
SL5	4b : DOPE	229±15	0.3	57±0.8

Tableau 19. Analyse DLS des solutions liposomales utilisées

On observe des tailles moyennes de particules entre 170 nm et 230 nm. L'indice de polydispersité des échantillons analysés est compris entre 0,2 et 0,4. Les potentiels zêta des solutions liposomales sont positifs, comme attendu pour des solutions liposomales préparées à partir d'amphiphiles cationiques, et sont compris entre +57 mV et +79 mV.

III.4 Application en thérapie génique

Une évaluation *in vitro* des formulations (SL1, SL2 et SL5) a été réalisée et leurs résultats ont été comparés aux deux lipides cationiques de référence, le KLN47 et le BSV36 incluant tous les deux un lien phosphoramidate (Figure 174).

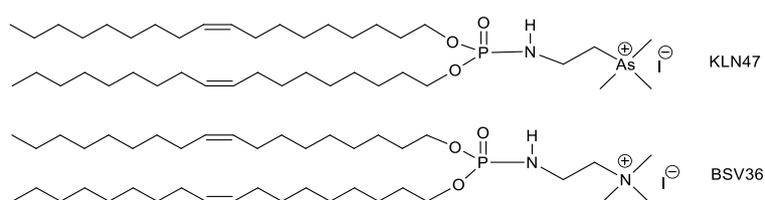


Figure 174. Structures des amphiphiles cationiques BSV36 et KLN47

Lors de cette étude, des tests de complexation de l'ADN, des tests d'efficacité de transfection et des tests de cytotoxicités ont été réalisés au sein de l'équipe du Pr. Tristan MONTIER (INSERM U1078). Ces tests ont été réalisés sur cinq lignées cellulaires (A549, 16HBE, CFBE, C2C12 et Calu3). A549 est une lignée cancéreuse du poumon humain, 16HBE est une lignée cellulaire de l'épithélium bronchique, CFBE est une lignée cellulaire des cellules pulmonaires bronchiques mucoviscidiques, C2C12 est une lignée cellulaire de myoblastes de souris immortalisées et Calu3 est une lignée cellulaire de cancer du poumon

humain. Les rapports de charges utilisés sont 0,7 ; 1 ; 2 et 4 pour les trois solutions liposomales ainsi que pour les références BSV36 et KLN47.

III.4.1 Tests de complexation d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

Les solutions liposomales préparées précédemment ont été utilisées pour évaluer leur potentiel de compaction de l'ADN en utilisant des tests de retard sur gel d'agarose. Cette méthode permet de déterminer à quel charge ratio (CR) l'ADN est totalement compacté. L'ADN utilisé dans cette expérience est un plasmide (pGM144) qui code pour la Luciférase. La méthode consiste en une électrophorèse sur gel d'agarose qui contient 0,8 % de bromure d'éthidium, un révélateur qui s'intercale dans l'ADN pour le rendre visible lors de l'exposition aux UV, sur lequel sont déposés les complexes (lipoplexes). Une révélation UV permet d'observer le potentiel des vecteurs pour complexer l'ADN. L'absence d'une bande indique une complexation complète de l'ADN. La migration de l'ADN libre est utilisée comme témoin où on peut observer une bande qui révèle la présence d'ADN libre. Les tests de complexation ont montré que les lipides testés sont capables de compacter l'ADN à partir d'un rapport de charge égal à 0,7, mais la compaction complète dépend de la formulation utilisée. Pour SL1 une compaction complète est observée à CR=2 tandis que pour SL2, SL5 et KLN47 un CR de 4 est nécessaire pour avoir une compaction complète ou quasi-complète (Figure 175).

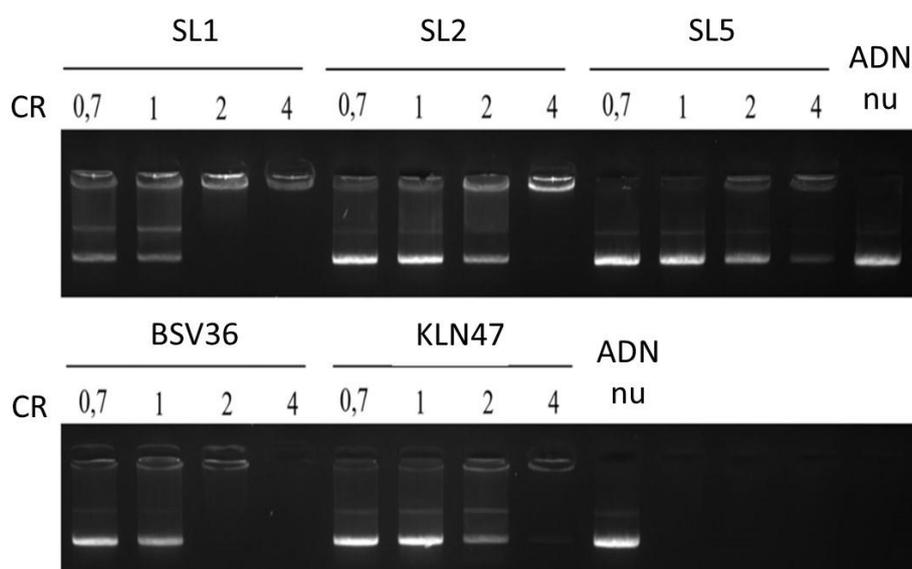


Figure 175. Gel retard (100V pendant 20 min) des différents complexes obtenus à partir des formulations SL1, SL2, SL5, BSV36 et KLN47 avec pGM144 à différents charges ratios. Gels retards effectués dans l'eau.

III.4.2 Évaluation de l'efficacité de transfection *in vitro*

III.4.2.1 Principe de mesure de l'efficacité de transfection par bioluminescence

Les tests de transfection ont été réalisés en utilisant le plasmide pGM144. Il s'agit d'un double brin d'ADN circulaire qui code pour la Luciférase. La mesure de l'efficacité de transfection est réalisée grâce à un test de bioluminescence qui détecte les photons produits lors de la réaction présentée dans la Figure 176. Il s'agit d'une catalyse par la protéine Luciférase de l'oxydation de la Luciférine en Oxyluciférine.

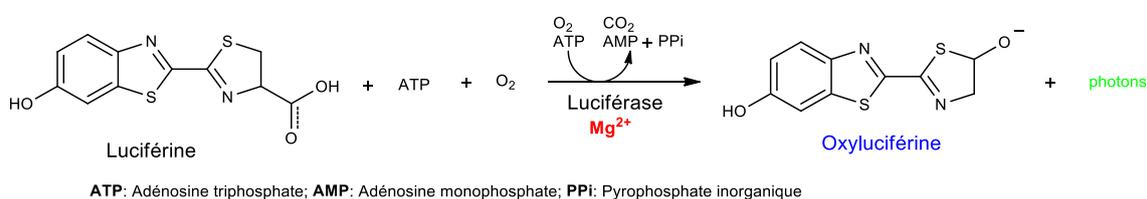


Figure 176. La transformation de la luciférine en oxyluciférine sous l'action de la Luciférase

Cette méthode ne permet pas de déterminer le pourcentage de cellules transfectées mais elle permet de renseigner sur le nombre de photons émis *via* un luminomètre. Plus le nombre de photons émis est important, plus l'efficacité de transfection sera jugée importante.

III.4.2.2 Principe de mesure de la viabilité cellulaire par bioluminescence

La toxicité des agrégats (vecteur/ADN) est évaluée par une méthode de bioluminescence (Kit Bioassay Toxilight). Cette méthode est basée sur la mesure de la quantité d'adénylate kinase secrétée par les cellules mortes dans le milieu extracellulaire. La présence de cette enzyme localisée exclusivement dans le cytoplasme, est un indicateur de la toxicité dès lors qu'elle se retrouve dans le milieu extracellulaire. La réaction se déroule en deux étapes comme présentées dans la Figure 177.

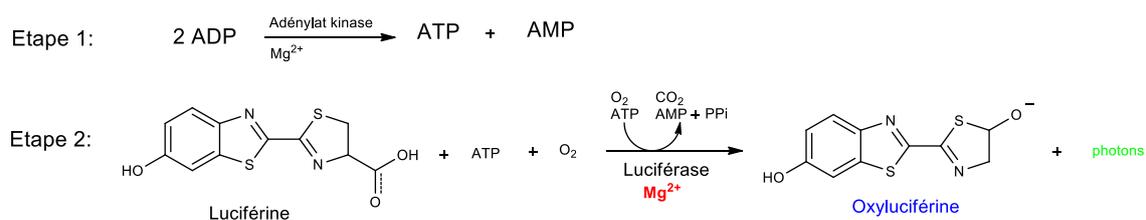


Figure 177. Réaction du dosage de l'adénylate kinase

Le bon déroulement des deux réactions induit la production de photons, qui est liée à la présence de l'adénylate kinase dans le milieu extracellulaire.

III.4.2.3 Test de l'efficacité de transfection

Les trois solutions liposomales retenues sont testées à différents rapport de charge (CR=0,7 ; 1 ; 2 et 4) et comparées aux deux références BSV36 et KLN47 aux mêmes CR. Les résultats obtenus pour les différents complexes lipide cationique/ADN sont présentés sur Figure 178.

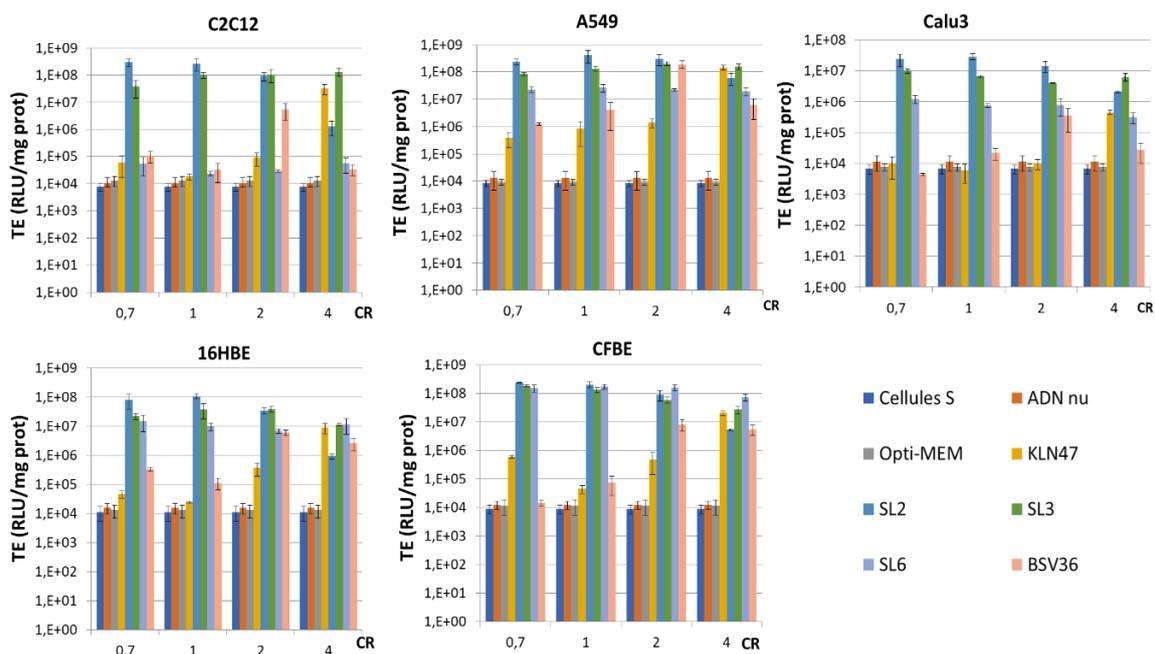


Figure 178. L'efficacité de transfection *in vitro* (RLU/mg de protéine) en fonction du charge ratio (CR de 0,7 à 4) de 5 lignées cellulaires : C2C12; A549; Calu3; 16HBE; CFBE. Cellules S : cellules seules ; Opti-MEM : milieu à sérum réduit.

Les résultats obtenus montrent que les trois formulations SL1, SL2 et SL5 présentent une efficacité de transfection importante à des charges ratios faibles (CR = 0,7 ou 1). Une faible efficacité de transfection du SL5 a été observée en présence de cellules de type C2C12. Une meilleure efficacité de transfection est observée pour SL1 et SL2 aux CR (0,7 et 1) par rapport aux deux références.

La formulation SL1, formulation à base du phosphonothioamide **4a**, est par ailleurs nettement plus efficace que toutes les autres formulations et cela pour les 5 lignées cellulaires testées à CR=0,7 ; 1 ou 2.

Ces résultats de transfection montrent que l'introduction d'un lien phosphonothioamide dans la structure d'un amphiphile associée à une formulation avec la DOPE permet d'obtenir des lipides

cationiques plus efficaces que les deux références BSV36 et KLN47. Une meilleure efficacité de transfection est en faveur de la chaîne lipidique oléyle (SL1 et SL2) pour la plupart des lignées cellulaires, comparé à la chaîne lipidique ramifiée (SL5) pour laquelle une efficacité importante de transfection est observée seulement pour la lignée CFBE. Cependant, cette même formulation (SL5) est complètement inefficace pour la lignée cellulaire C2C12.

III.4.2.4 Test de viabilité cellulaire

Les mêmes formulations utilisées en transfection sont testées pour évaluer leurs toxicités par bioluminescence. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure ci-dessous.

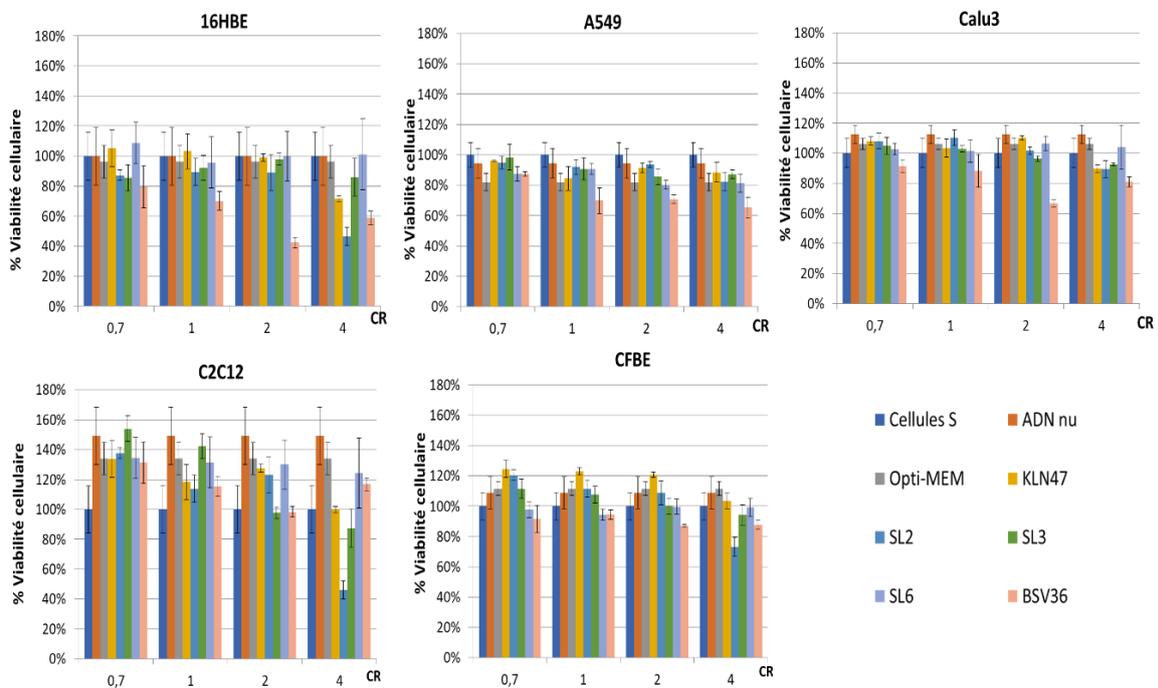


Figure 179. Viabilité cellulaire en fonction du charge ratio (CR = 0,7 à 4) de 5 lignées cellulaires : C2C12; A549; Calu3; 16HBE; CFBE.

Globalement, les formulations testées présentent une faible toxicité à des CR = 0,7 ; 1 ou 2. Une augmentation de la toxicité est observée pour le BSV36 et la SL1 à des CR = 4. Cependant, ces deux formulations sont non-toxiques aux faibles CR (0,7 ; 1 et 2), qui sont efficaces en transfection.

IV. Conclusion

Dans ce chapitre deux amphiphiles cationiques incluant un motif phosphonothioamide comme espaceur ont été synthétisés. Leurs synthèses, en 4 étapes, utilisent comme étape clé la réaction PAC entre un phosphonodithioformiate et une amine primaire.

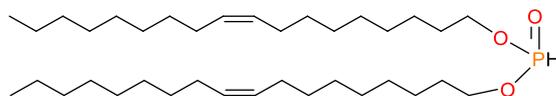
Les deux amphiphiles cationiques ont été formulés en présence de la DOPE ou de DOPE avec du cholestérol et ont permis d'obtenir des solutions liposomales avec des tailles proches de 200 nm. La complexation d'ADN avec ces deux vecteurs a montré la possibilité de compacter partiellement l'ADN à partir d'un CR égal à 0,7 tandis qu'une compaction complète ou quasi complète est observée à des CR = 2 ou 4.

Les tests de transfection des deux formulations incluant le phosphonothioamide **4a** (SL1 et SL2) se sont avérés les plus efficaces vis-à-vis les 5 lignées cellulaires testées (A549, Calu3, CFBE, 16HBE, C2C12) même à des faibles charges ratios, c'est-à-dire en présence d'une compaction incomplète de l'ADN.

Ces formulations présentent aux CR efficaces en transfection (CR= 0,7 ; 1 ou 2) peu ou pas d'effet néfaste sur la viabilité cellulaire.

V. Partie expérimentale

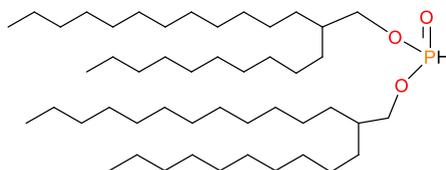
Dioleoylphosphite **1a**



A mixture of oleyl alcohol (3 g, 11.2 mmol) and diphenylphosphite (1.25 g, 5.3 mmol) were placed in a Kugelrohr distillation apparatus. The mixture was heated at 140°C under reduced pressure ($4 \cdot 10^{-2}$ mbar) for 4h. Phenol, which is sublimed during this heating period, was discarded. Then, the temperature was increased to 180°C ($4 \cdot 10^{-2}$ mbar) for 1 hour to remove the excess of alcohol. The undistilled compound **1a** was isolated as a pale-yellow oil (3g, 97% yield).

$^1\text{H NMR}$ (399.85 MHz, CDCl_3): δ = 6.79 (d, $^1J_{\text{HP}}$ = 692 Hz, 1H), 5.36 – 5.33 (m, 4H), 4.09 – 4.03 (m, 4H), 2.03 – 1.98 (m, 8H), 1.70 – 1.66 (m, 4H), 1.30 – 1.25 (m, 49H), 0.88 (t, $^3J_{\text{HH}}$ = 6.9 Hz, 6H). $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (161.86 MHz, CDCl_3): δ = 9.12.

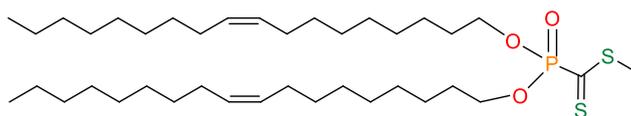
Bis(2-decyltetradecyl)phosphite **1b**



The same protocol than for **1a** was applied. Diphenylphosphite (0.99 g, 4.2 mmol) 2-decyltetradecan-1-ol (3 g, 8.45 mmol). Compound **1b** was isolated as a colorless oil (3 g; Yield 95%).

$^1\text{H NMR}$ (399.85 MHz, CDCl_3): δ = 6.81 (d, $^1J_{\text{HP}}$ = 691 Hz, 1H), 4.00 – 3.97 (m, 4H), 1.65 – 1.64 (m, 4H), 1.34 – 1.24 (m, 83H), 0.91 (t, $^3J_{\text{HH}}$ = 6.8 Hz, 12H); $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (161.86 MHz, CDCl_3): δ = 9.61.

Methyl dioleoylphosphonodithioformate **2a**

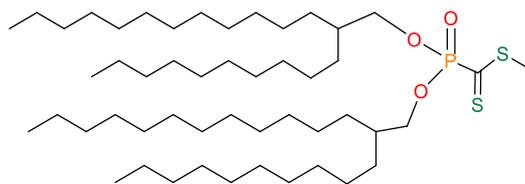


To a mixture of NaH (107 mg, 4.46 mmol) in 15 mL of anhydrous tetrahydrofuran placed in a shlenck flask under nitrogen, a solution of phosphite **1a** (2 g, 3.43 mmol) solubilized in 15 mL of THF is added under stirring at room temperature. At the end of the addition, the mixture was heated to 54°C for 4h

(a limpid solution is formed). ^{31}P NMR monitoring (D_2O in capillary used as internal standard) revealed a peak at 152 ppm for the phosphite sodium salt. Then, the solution was cooled down at -78°C and treated with anhydrous carbon disulfide (1.56 g, 1.25 mL, 20.6 mmol). The mixture was stirred for 2h at room temperature and methyl iodide (536 mg, 3.77 mmol) was subsequently added. After stirring for an additional 2h, the mixture was washed with a saturated aqueous solution of ammonium chloride and was extracted twice with 40 mL of ethyl acetate. The organic phase was washed with brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtrated and concentrated. A purification by chromatography on silica gel (eluent of n-hexane/ethylacetate from 100:0 to 70:30 in volume) gave **2a** as a purple oil obtained in 20% yield (450 mg).

^1H NMR (399.85 MHz, CDCl_3) : δ = 5.38 – 5.35 (m, 4H), 4.24 – 4.16 (m, 4H), 2.72 (s, 3H), 2.04 – 2.01 (m, 8H), 1.75 – 1.69 (m, 4H), 1.29 – 1.28 (m, 56H), 0.90 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, 6H) ; $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (161.86 MHz, CDCl_3) : δ = -1.69, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ JMOD NMR (125.78 MHz, CDCl_3) : δ = 229.58 (d, $^1J_{\text{CP}} = 176.6$ Hz, C=S), 129.96 + 129.74 ($\text{CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2$), 68.57 (d, $^2J_{\text{CP}} = 6.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O-P}$), 31.91 to 22.68 (CH_2 fatty chains), 19.20 (S- CH_3), 14.11 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$), Maldi TOF (matrix: UTL HCCA): $[\text{M}+\text{Na}]$ calculated for $\text{C}_{38}\text{H}_{73}\text{O}_3\text{PS}_2\text{Na}$ = 695.463 ; observed $[\text{M}+\text{Na}] = 695.719$.

Methyl bis-(2-decanyltetradecyl)phosphonodithioformate **2b**

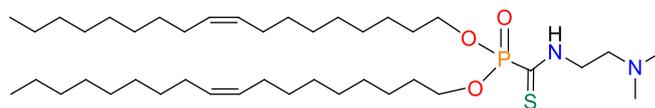


The same protocol than for **2a** was used. NaH (83 mg, 3.44 mmol), phosphite **1b** (2 g, 2.65 mmol). intermediate ^{31}P NMR (D_2O in a capillary used as an internal standard) : 152 pm; carbon disulfide (1.21 g, 960 μL , 15.9 mmol), methyl iodide (414 mg, 180 μL , 2.92 mmol). Purification by chromatography on silica gel (eluent n-hexane/ethylacetate : 100:0 to 70:30). Compound **2b** was isolated in 20% yield (400 mg).

^1H NMR (399.85 MHz, CDCl_3) : δ = 4.12 - 4.09 (m, 4H), 2.72 (s, 3H), 1.67 (m, 2H), 1.33-1.28 (m, 93H), 0.91 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, 13H) ; $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (161.86 MHz, CDCl_3) : δ = -1.87 ppm. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ JMOD NMR (125.78

MHz, CDCl₃): δ = 229.64 (d, $^1J_{CP}$ = 177.0 Hz, C=S), 70.91 (d, $^2J_{CP}$ = 7.4 Hz, CH₂-O-P), 38.74 (d, $^3J_{CP}$ = 6.4 Hz, CH-CH₂-O-P), 31.95 to 22.71 (CH₂, fatty chains), 19.11 (S-CH₃), 14.12 (CH₃-CH₂), Maldi TOF (matrix: UTL HCCA): [M+Na] calculated for C₅₀H₁₀₁O₃PS₂Na= 867.682; observed [M+Na] =867.874.

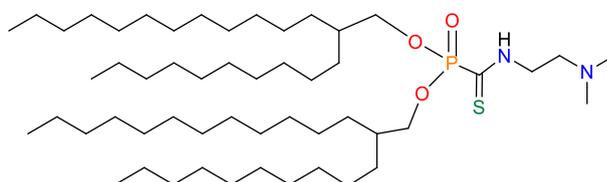
Dioleyl ((2-(dimethylamino)ethyl)carbamothioyl)phosphonate **3a**



To a solution of **2a** (200 mg, 2.97×10^{-4} mole, 1 eq.) in 10 mL of CHCl₃ was added slowly *N,N*-dimethylethylenediamine (28.81 mg, 35 μ L, 3.26×10^{-4} mole, 1.1 eq.). The reaction was stirred at room temperature for 2h. The excess of amine was removed under vacuum. The compound was purified by chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH : 90/10 (v/v)) to produce **3a** as a yellow wax (121mg ; Yield 57%).

$^1\text{H NMR}$ (399.85 MHz, CDCl₃): δ = 5.37 – 5.32 (m, 4H), 4.21- 4.13 (m, 4H), 3.69 (t, $^3J_{HH}$ = 4.6 Hz, NH-CH₂-, 2H), 2.60 (t, $^3J_{HH}$ = 5.9, N(CH₃)₂-CH₂-, 2H), 2.27 (s, 6H), 2.01 – 1.98 (m, 8H), 1.71 – 1.68 (m, 4H), 1.36 – 1.25 (m, 52H), 0.87 (t, $^3J_{HH}$ = 6.8 Hz, 6H) ; $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (161.86 MHz, CDCl₃) : δ = -1.20, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ JMOD NMR (125.78 MHz, CDCl₃) : δ = 193.07 (d, $^1J_{CP}$ = 182.4 Hz, C=S), 129.98 + 129.77 (CH₂-CH=CH-CH₂), 68.87 (d, $^2J_{CP}$ = 7.0, CH₂-O-P), 55.67 (CH₂-N(CH₃)₂), 44.95 (N(CH₃)₂-CH₂-), 42.39 (d, $^3J_{CP}$ = 7.85, P-CS-NH-CH₂-), 31.91 to 22.69 (m, CH₂ fatty chains), 14.12 (CH₃-CH₂). Maldi TOF (matrix: UTL HCCA): [M+H] calculated for C₄₁H₈₂N₂O₃PS = 713.578; observed [M+H] =713.742.

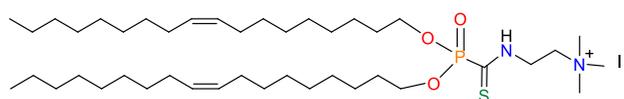
bis(2-decanyltetradecyl) ((2-(dimethylamino)ethyl)carbamothioyl)phosphonate **3b**



The same protocol than for **3a** was used. **2b** (100 mg, 1.18×10^{-4} mole, 1 eq.), *N,N*-dimethylethylenediamine (11.47 mg, 14 μ L, 1.3×10^{-4} mole, 1.1 eq.). After purification by chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH : 90/10 (v/v)), **3b** was isolated as a yellow wax (51 mg, yield 49%).

$^1\text{H NMR}$ (399.85 MHz, CDCl_3): δ = 4.10 - 4.04 (m, 4H), 3.67 (t, $^3J_{\text{HH}}$ = 5.9 Hz, NH-CH_2 -, 2H), 2.57 (t, $^3J_{\text{HH}}$ = 5.6 Hz, $\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{-CH}_2$ -, 2H), 2.25 (s, 6H), 1.62 (m, 2H), 1.29 - 1.24 (m, CH_2 fatty chains), 0.87 (t, $^3J_{\text{HH}}$ = 6.8 Hz, 12H); $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (161.86 MHz, CDCl_3) : δ = -1.66, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ JMOD NMR (125.78 MHz, CDCl_3) : δ = 192.95 (d, $^1J_{\text{CP}}$ = 182.9 Hz, $\text{C}=\text{S}$), 71.23 (d, $^2J_{\text{CP}}$ = 7.5 Hz, $\text{CH}_2\text{-O-P}$), 65.70 ($-\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)_3$ -), 55.67 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 44.98 ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$ -), 38.71 (d, $^3J_{\text{CP}}$ = 6.3 Hz, $\text{CH-CH}_2\text{-O-P}$), 31.93 to 29.37 (m, CH_2 fatty chains), 22.69 ($-\text{CH}_2\text{-CH}_3$) 14.11 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$). Maldi TOF (matrix: UTL HCCA): $[\text{M}+\text{H}]$ calculated for $\text{C}_{53}\text{H}_{110}\text{N}_2\text{O}_3\text{PS}$ = 885.797; observed $[\text{M}+\text{H}]$ = 885.934.

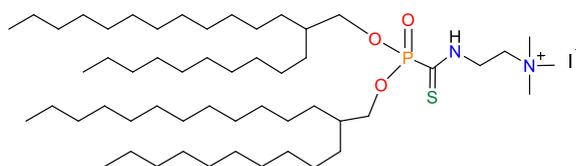
2-((dioleoyloxyphosphoryl)methanethioamido)-*N,N,N*-trimethylethan-1-aminium iodide **4a**



Methyl iodide (200 mg, 1.4×10^{-3} moles, 86 μL , 10 eq.) was added to a solution of **3a** (100 mg, 1.4×10^{-4} mole, 1 equivalent) in CHCl_3 (5 mL). The solution was stirred overnight at 20°C . The solvent and the excess of methyl iodide were evaporated under vacuum. After purification by chromatography on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 100/0 to 90/10 (v/v)), **4a** was isolated as a yellow wax (76 mg ; Yield 75%).

$^1\text{H NMR}$ (399.85 MHz, CDCl_3): δ = 5.32 – 5.29 (m, 4H), 4.38 ($\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)_3$, 2H), 4.18 - 4.15 (m, $\text{CH}_2\text{-O-P}$, 4H), 4.00 (t, $^3J_{\text{HH}}$ = 6.3 Hz, NH-CH_2 -, 2H), 3.45 (s, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$, 9H), 1.98 – 1.95 (m, 4H), 1.70 – 1.67 (m, 4H), 1.25 – 1.22 (m, fatty chains), 0.84 (t, $^3J_{\text{HH}}$ = 6.8 Hz, 6H); $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (161.86 MHz, CDCl_3) : δ = -2.34, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ JMOD NMR (125.78 MHz, CDCl_3) : δ = 196.18 (d, $^1J_{\text{CP}}$ = 186.0 Hz, $\text{C}=\text{S}$), 130.01 + 129.77 ($\text{CH}_2\text{-CH}=\text{CH-CH}_2$), 69.42 (d, $^2J_{\text{CP}}$ = 7.0 Hz, $\text{CH}_2\text{-O-P}$), 62.83 ($\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)_3$), 54.63 ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$ -), 38.82 (d, $^3J_{\text{CP}}$ = 8.6 Hz, P-CS-NH-CH_2 -), 29.80 to 27.25 (m, CH_2 fatty chains), 14.15 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$). HRMS (ESI-qTOF): m/z calcd for $\text{C}_{41}\text{H}_{83}\text{N}_2\text{O}_3\text{PSK}$ $[\text{M}+\text{K}]$ = 765.5499; observed $[\text{M}+\text{K}]$ = 765.6133.

2-((bis(2-decanyltetradecyloxy)phosphoryl)methanethioamido)-*N,N,N*-trimethylethan-1-aminium iodide **4b**



The same protocol than for **4a** was used. **3b** (51 mg, 5.76×10^{-5} mole, 1equivalent), methyl iodide (82mg, 5.76×10^{-4} moles, 35 μ L, 10 eq). After purification by chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH : 90/0 to 10 (v/v)), **4a** was isolated as wax (44 mg ; Yield 85%).

¹H NMR (399.85 MHz, CDCl₃): δ = 4.42 (t, ³J_{HH}= 5.9, NH-CH₂-, 2H), 4.12 - 4.05 (m, 4H), 4.03 (t, ³J_{HH}= 6.4 Hz, N(CH₃)₂-CH₂-, 2H), 3.48 (s, 9H), 1.81 (m, 2H), 1.68 (m, 2H), 1.30 - 1.25 (m, CH₂ fatty chains), 0.87 (t, ³J_{HH} = 6.9 Hz, 12H) ; **³¹P{¹H} NMR** (161.86 MHz, CDCl₃) : δ = -2.24, **¹³C{¹H} JMOD NMR** (125.78 MHz, CDCl₃) : δ = 196.24 (d, ¹J_{CP} = 184.5 Hz, C=S), 72.03 (d, ²J_{CP}= 7.5 Hz, CH₂-O-P), 62.68 (-CH₂-N(CH₃)₃-), 54.62 (N(CH₃)₃-), 38.73 (d, ³J_{CP}= 6.1 Hz, CH-CH₂-O-P), 31.95 (NH-CH₂-), 30.55 to 29.41 (m, CH₂ fatty chains), 14.11 (CH₂-CH₃). HRMS (ESI-qTOF): m/z calcd for C₅₄H₁₁₂N₂O₃PS⁺ [M]⁺ = 899.8131; observed [M]⁺=899.8121.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale

L'objectif de cette thèse était de concevoir une nouvelle réaction click qui puisse s'opérer dans des conditions douces de réaction (température ambiante et sans catalyse) et dans l'eau. L'objectif étant d'appliquer cette réaction à la fonctionnalisation de liposomes.

Dans la première partie, deux phosphonodithioformiates lipidiques (neutre et cationique) ont été synthétisés par la méthode de Grisley. Ces deux briques lipidiques 'clickables' ont été synthétisées en une seule étape avec un rendement de 35% pour le composé neutre et en deux étapes pour le composé cationique avec un rendement global de 24%. Les rendements obtenus sont faibles, néanmoins, leurs synthèses ont pu être obtenues à l'échelle du gramme.

Des formulations liposomales à base d'un amphiphile cationique (BSV36) et incluant l'un des deux phosphonodithioformiates lipidiques ont été caractérisées par diffusion dynamique de la lumière (DLS) et par microscopie électronique à transmission (MET) permettant de conclure sur la formation de liposomes de formes et de tailles comparables aux liposomes préparés à partir du composé BSV36 seul. À la suite de ces travaux, la mise au point de la fonctionnalisation de la surface des vésicules a été réalisée. Pour cela, une amine fluorescente a été greffée *via* la réaction de phosphonodithioformiate-Amine Coupling' (PAC) qui est une aminolyse du phosphonodithioformiate. Cette réaction s'effectue dans l'eau, sans catalyse et dans des conditions douces (température ambiante). Cette réaction d'aminolyse a été très peu décrite dans la littérature (deux articles) et n'a jamais été appliquée à la fonctionnalisation de liposomes. La réaction PAC dans l'eau a été confirmée par UV-visible et par spectrométrie de masse. L'étude par Cryo-microscopie (MET) montre que la réaction PAC n'altère pas la morphologie des vésicules.

Lors du processus de fonctionnalisation, le taux de conversion des phosphonodithioformiates était quantitatif pour les liposomes incluant le phosphonodithioformiate neutre et 60% dans le cas des liposomes incluant le phosphonodithioformiate cationique. Ce dernier résultat peut être expliqué par une distribution 50 : 50 du phosphonodithioformiate cationique entre les deux feuillettes des liposomes (feuillet interne et externe). Des études de quenching de fluorescence ont montré que la stratégie de

post-fonctionnalisation est la meilleure stratégie pour fonctionnaliser la surface externe d'un liposome car elle garantit l'exposition des molécules greffées à la surface des liposomes. En parallèle de ces études, la cinétique de la réaction PAC a été déterminée par UV-Visible. Une cinétique du second ordre avec une constante de vitesse égale à $800 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a été obtenue. Cette réaction PAC appliquée à la fonctionnalisation des liposomes peut donc être classée parmi les réactions click rapides.

La méthode de fonctionnalisation des liposomes par réaction PAC a ensuite été étendue à la fonctionnalisation de liposomes préparés à partir de phospholipides naturels. La méthodologie permet également, de former des vésicules bien définies et n'altère pas la morphologie des liposomes. Cette réaction PAC a ensuite été appliquée pour modifier les deux types de liposomes (à base de BSV36 et/ou à base de phospholipides naturels) par des chaînes de type polyéthylène glycol de différentes longueurs (PEG600 et PEG5000). Dans les deux cas, la formation du produit de couplage par un lien covalent a été confirmée par spectrométrie de masse. Pour étendre l'intérêt de cette réaction PAC, le temps de réaction a été réduit en s'affranchissant de l'étape de dialyse. Un protocole, qui utilise l'amine réactive en quantité sub-stœchiométrique, permet d'obtenir une solution liposomale fonctionnalisée en une heure.

Au cours de la seconde partie, la stratégie de fonctionnalisation, obtenue précédemment, a été utilisée pour modifier la surface d'un liposome à base de BSV36, incluant le phosphonodithioformiate neutre dans sa composition, par une molécule photosensible (NOP) capable de libérer l'oxyde nitrique NO après photo-activation. Cette étude a été réalisée lors d'une mobilité internationale en Italie. Une étude chrono-ampérométrique nous a permis de suivre le relargage de NO au cours du temps. Les résultats ampérométriques obtenus ont démontré que la post-fonctionnalisation est la meilleure stratégie de fonctionnalisation de la surface d'un liposome pour le relargage de NO après photo-activation. Cette stratégie permet de garantir une production plus importante de NO disponible à l'extérieur des liposomes comparé à l'immobilisation du même motif NOP par pré-fonctionnalisation des liposomes. Par ailleurs, le greffage de la molécule photosensible (NOP) à la surface d'un liposome (par pré ou par post fonctionnalisation) conduit à un relargage photo-déclenché beaucoup plus important que dans le

cas d'une solution aqueuse de NOP. Ce résultat montre que les interactions entre le liposome et le motif NOP jouent un rôle important dans le mécanisme de formation de NO. Ensuite, des liposomes bifonctionnels incluant un motif libérant du NO et un motif fluorescent (de type 1,8-naphthalimide) ont été préparés et caractérisés par fluorescence et par chrono-ampérométrie.

Ces plateformes, mono et difonctionnelles, ont ensuite été étudiées afin d'évaluer leur potentiel antimicrobien. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Pr. T. Montier (UMR INSERM 1078, Brest). Des tests de phototoxicité *in vitro* ont été réalisés sur la souche *Staphylococcus Aureus*. Cette étude a été complétée par l'évaluation de la toxicité sur des cellules eucaryotes humains (A549 et CFBE).

Les observations ont été réalisées immédiatement après irradiation ou après 24 heures. Les liposomes incluant le motif fluorescent seul, le motif NOP seul ou en combinant les deux motifs NOP et 1,8-naphthalimide ont montré un effet photo-toxique immédiat important contre *S. aureus*. Il apparaît également que les formulations les plus efficaces pour limiter la croissance bactérienne sont les formulations associant la sonde fluorescente 1,8-naphthalimide. Nous avons alors montré que la sonde fluorescente, dans les conditions de photo-stimulation, pourrait produire des espèces réactives d'oxygène (ROS). En effet, cette possible production des ROS est à l'origine des effets bactéricides les plus importants. Concernant la cytotoxicité, la plupart des formulations maintiennent un taux de viabilité supérieur à 80% sauf la formulation qui inclue seulement le motif fluorescent qui s'est avérée plus toxique.

La dernière partie de cette thèse a porté sur la préparation de nouveaux lipides cationiques incluant un motif phosphonothioamide introduit *via* la réaction PAC. Deux nouveaux lipides cationiques ont été synthétisés en 4 étapes. Les deux vecteurs ont montré une complexation partielle de l'ADN à CR= 0,7 et une compaction complète à des CR = 2 ou 4. Les tests de transfection des formulations incluant ces deux vecteurs se sont avérés plus efficaces vis-à-vis des 5 lignées cellulaires testées (A549, Calu3, CFBE, 16HBE, C2C12) par rapport aux références utilisées. Les formulations essayées se sont montrées non-toxiques sur les lignées cellulaires testées à des (CR = 0,7, 1 ou 2).

Perspectives

Concernant la synthèse des phosphonodithioformiates des optimisations et des variations de structure sont encore possibles. A propos de l'optimisation de la synthèse, la différence de réactivité entre les phosphites à chaînes courtes (e.g. diéthylphosphite), qui permettent selon la littérature l'obtention de phosphonodithioformiates avec de bons rendements, et les phosphites à chaînes lipidiques n'est pas complètement élucidée. L'optimisation des conditions de Grisley pour la préparation des phosphonodithioformiates lipidiques serait une avancée importante. Concernant la variation de structure, plusieurs pistes sont envisageables : i) la synthèse d'un phosphonodithioformiate non fluorescent mais qui après la réaction PAC puisse libérer un thiolate fluorescent. Ainsi nous aurions un système de « visualisation » de l'avancée de la réaction. ii) la synthèse de phosphonodithioformiates comportant deux chaînes hydrophiles (e.g. PEG) à la place des deux chaînes lipidiques. Un tel composé pourrait permettre la modification de la surface de liposomes disposant de fonctions amines à leur surface. iii) les phosphonodithioformiates sont également de bons substrats (diénophiles) de la réaction d'hétéro-Diels-Alder. En conséquence avec le même type de composés une autre réaction permettant la fonctionnalisation de liposomes est possible. Cette réaction pourrait être réversible et être réalisée en présence d'un milieu biologique (réaction bio-orthogonale). iv) La fonctionnalisation des liposomes a été réalisée avec des chaînes PEG. Il serait intéressant d'étendre la fonctionnalisation des liposomes avec des motifs de ciblage (e.g : mannose).

Ce travail ouvre donc des perspectives intéressantes pour la fonctionnalisation de liposomes et, au-delà, pour la fonctionnalisation de matériaux ou de matériels biologiques.

Bibliographie

- 1 V. P. Torchilin, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2006, **58**, 1532–1555.
- 2 V. Torchilin, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2011, **63**, 131–135.
- 3 R. N. Wadetwar and A. P. Godbole, *Nanopharmaceutical Advanced Delivery Systems*, John Wiley & Sons, Ltd, 2021, 161–185.
- 4 M. Silindir, S. Erdoğan, A. Y. Özer, A. L. Doğan, M. Tuncel, Ö. Uğur and V. P. Torchilin, *J. Liposome Res.*, 2013, **23**, 20–27.
- 5 S. Saraf, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 2020, 14.
- 6 A. L. Petersen, A. E. Hansen, A. Gabizon and T. L. Andresen, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2012, **64**, 1417–1435.
- 7 S. Gudlur, C. Sandén, P. Matoušková, C. Fasciani and D. Aili, *J. Colloid Interface Sci.*, 2015, **456**, 206–209.
- 8 D. Shi, M. Fu, P. Fan, W. Li, X. Chen, C. Li, X. Qi, T. Gao and Y. Liu, *Arch. Dermatol. Res.*, 2007, **299**, 327–336.
- 9 A. D. Bangham, M. M. Standish and J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.*, 1965, **13**, 238–IN27.
- 10 S. Sindhvani and W. C. W. Chan, *J. Intern. Med.*, 2021, 290, 486–498.
- 11 D. D. Lasic and Y. Barenholz, *Handbook of Nonmedical Applications of Liposomes, Vol IV From Gene Delivery and Diagnosis to Ecology*, CRC Press, 1996.
- 12 G. Betz, A. Aeppli, N. Menshutina and H. Leuenberger, *Int. J. Pharm.*, 2005, **296**, 44–54.
- 13 L. Mu and R. L. Sprando, *Pharm. Res.*, 2010, **27**, 1746–1749.
- 14 M. R. Mozafari, C. Johnson, S. Hatziantoniou and C. Demetzos, *J. Liposome Res.*, 2008, **18**, 309–327.
- 15 T. M. Taylor, J. Weiss, P. M. Davidson and B. D. Bruce, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2005, **45**, 587–605.
- 16 A. S. Abu Lila and T. Ishida, *Biol. Pharm. Bull.*, 2017, **40**, 1–10.
- 17 A. Krupa, M. Descamps, J.-F. Willart, B. Strach, E. Wyska, R. Jachowicz and F. Danède, *Mol. Pharm.*, 2016, **13**, 3891–3902.
- 18 E.-M. Kim and H.-J. Jeong, *Chonnam Med. J.*, 2021, **57**, 27–35.
- 19 H. Daraee, A. Etemadi, M. Kouhi, S. Alimirzalu and A. Akbarzadeh, *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.*, 2016, **44**, 381–391.
- 20 H. He, Y. Lu, J. Qi, Q. Zhu, Z. Chen and W. Wu, *Acta Pharm. Sin. B*, 2019, **9**, 36–48.
- 21 J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell and B. W. Ninham, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2 Mol. Chem. Phys.*, 1976, **72**, 1525–1568.
- 22 V. P. Torchilin, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2005, **4**, 145–160.
- 23 <https://www.infovac.fr/docman-marc/public/covid-19/1726-lien-a-fiche-vaccin-covid-contenus-def/file>, (accessed April 21, 2021).
- 24 S. A. Engelberth, N. Hempel and M. Bergkvist, *Crit. Rev. Oncog.*, 2014, **19**, 281–315.
- 25 <https://www.omnia-Health.com/product/Alimta-500Mg>.
- 26 E. W. F. W. Alton, A. C. Boyd, D. J. Porteous, G. Davies, J. C. Davies, U. Griesenbach, T. E. Higgins, D. R. Gill, S. C. Hyde and J. A. Innes, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2015, **192**, 1389–1392.
- 27 J.-S. Kim, *J. Pharm. Investig.*, 2016, **46**, 387–392.
- 28 N. Wang, M. Chen and T. Wang, *J. Controlled Release*, 2019, **303**, 130–150.
- 29 L. Rangel, *Cancer Treatment: Conventional and Innovative Approaches*, BoD – Books on Demand, 2013.
- 30 C. I. Nkanga, A. M. Bapolisi, N. I. Okafor and R. W. M. Krause, *Liposomes - Adv. Perspect.*, , DOI:10.5772/intechopen.84255.
- 31 D. D. Lasic, *Biochem. J.*, 1988, **256**, 1–11.
- 32 F. Szoka and D. Papahadjopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1978, **75**, 4194–4198.
- 33 M. R. Mozafari, *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2005, **10**, 711–719.
- 34 P. Trucillo, R. Campardelli and E. Reverchon, *Processes*, 2020, **8**, 1022.
- 35 D. W. Deamer, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1978, **308**, 250–258.
- 36 A. Jahn, W. N. Vreeland, D. L. DeVoe, L. E. Locascio and M. Gaitan, *Langmuir*, 2007, **23**, 6289–6293.

- 37 D. Carugo, E. Bottaro, J. Owen, E. Stride and C. Nastruzzi, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 1–15.
- 38 P. Trucillo, R. Campardelli and E. Reverchon, *J. CO2 Util.*, 2017, **18**, 181–188.
- 39 G. D. Bothun, B. L. Knutson, H. J. Strobel and S. E. Nokes, *Langmuir*, 2005, **21**, 530–536.
- 40 P. Lesot, *Liq. Cryst.*, 2020, **47**, 1886–1910.
- 41 R. Pal, Y. Barenholz and R. R. Wagner, *Biochemistry.*, 1988, **27**, 30–36.
- 42 K. T. Kim, Y. Moon, Y. Jang, K. T. Lee, C. Lee, Y. Jun and S. Lee, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 8700.
- 43 J. du Plessis, C. Ramachandran, N. Weiner and D. G. Müller, *Int. J. Pharm.*, 1996, **127**, 273–278.
- 44 J. Kuntsche, J. C. Horst and H. Bunjes, *Int. J. Pharm.*, 2011, **417**, 120–137.
- 45 M. A. M. Agrawal, S. Jawade, S. Khan and M. I., *Int. J. Adv. Res. Pharm. Amp Bio Sci.*, 2012, **2**, 453–465.
- 46 A. Kolate, D. Baradia, S. Patil, I. Vhora, G. Kore and A. Misra, *J. Controlled Release*, 2014, **192**, 67–81.
- 47 E. Beltrán-Gracia, A. López-Camacho, I. Higuera-Ciapara, J. B. Velázquez-Fernández and A. A. Vallejo-Cardona, *Cancer Nanotechnol.*, 2019, **10**, 11.
- 48 A. Gabizon, R. Catane, B. Uziely, B. Kaufman, T. Safra, R. Cohen, F. Martin, A. Huang and Y. Barenholz, *Cancer Res.*, 1994, **54**, 987–992.
- 49 G. Batist, *Cardiovasc. Toxicol.*, 2007, **7**, 72–74.
- 50 F. Yuan, M. Dellian, D. Fukumura, M. Leunig, D. A. Berk, V. P. Torchilin and R. K. Jain, *Cancer Res.*, 1995, **55**, 3752–3756.
- 51 A. Bah and I. Vergne, *Front. Immunol.*, 2017, **8**, 1483.
- 52 T. Minko, R. I. Pakunlu, Y. Wang, J. J. Khandare and M. Saad, *Anti-Cancer Agents Med. Chem. - Anti-Cancer Agents*, 2006, **6**, 537–552.
- 53 C. Heneweer, S. E. M. Gendy and O. Peñate-Medina, *Ther. Deliv.*, 2012, **3**, 645–656.
- 54 F. Man, P. J. Gawne and R. T M de Rosales, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2019, **143**, 134–160.
- 55 C. Rangger, A. Helbok, J. Sosabowski, C. Kremser, G. Koehler, R. Prassl, F. Andreae, I. J. Virgolini, E. von Guggenberg and C. Decristoforo, *Int. J. Nanomedicine*, 2013, **8**, 4659–4671.
- 56 Y. Dai, B. Wang, Z. Sun, J. Cheng, H. Zhao, K. Wu, P. Sun, Q. Shen, M. Li and Q. Fan, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2019, **11**, 39410–39423.
- 57 W. Lee and H.-J. Im, *Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2019, **53**, 242–246.
- 58 R. I. Jølcck, L. N. Feldborg, S. Andersen, S. M. Moghimi and T. L. Andresen, *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, 2011, **125**, 251–280.
- 59 L. Guyon, A.-C. Groo and A. Malzert-Fréon, *Mol. Pharm.*, 2021, **18**, 44–64.
- 60 G. M. Powell and R. I. Davidson, N. Y. NY McGrawHill, 1980.
- 61 A. A. D'souza and R. Shegokar, *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2016, **13**, 1257–1275.
- 62 F. Guo, M. Lin, Y. Gu, X. Zhao and G. Hu, *Eur. Food Res. Technol.*, 2015, **240**, 1013–1021.
- 63 S. Dreborg and E. B. Akerblom, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 1990, **6**, 315–365.
- 64 H. F. Smyth, C. P. Carpenter and C. S. Weil, *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed*, 1955, **44**, 27–30.
- 65 T. W. Tusing, J. R. Elesa and A. B. Sauveur, *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed*, 1954, **43**, 489–490.
- 66 W. Thiele, L. Kyjacova, A. Köhler and J. P. Sleeman, *Lab. Anim.*, 2020, **54**, 391–396.
- 67 R. Webster, V. Elliott, B. K. Park, D. Walker, M. Hankin and P. Taupin, *PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications*, ed. F. M. Veronese, Birkhäuser, Basel, 2009, 127–146.
- 68 G. Liu, Y. Li, L. Yang, Y. Wei, X. Wang, Z. Wang and L. Tao, *RSC Adv.*, 2017, **7**, 18252–18259.
- 69 O. Biondi, S. Motta and P. Mosesso, *Mutagenesis*, 2002, **17**, 261–264.
- 70 M. C. Woodle and D. D. Lasic, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.*, 1992, **1113**, 171–199.
- 71 S. Zalipsky, *Bioconjug Chem.*, 1993, **4**, 296–299.
- 72 G. Pasut, F. Canal, L. Dalla Via, S. Arpicco, F. M. Veronese and O. Schiavon, *J. Controlled Release*, 2008, **127**, 239–248.
- 73 D. C. Drummond, K. Hong, J. W. Park, C. C. Benz and D. B. Kirpgtin, *Vitam Horm.*, 2000, **60**, 285–332.
- 74 J. F. Ross, P. K. Chaudhuri and M. Ratnam, *Cancer*, 1994, **73**, 2432–2443.
- 75 D. Lee, R. Lockey and S. Mohapatra, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2006, **6**, 2860–2866.

- 76 G. M. van Dam, G. Themelis, L. M. A. Crane, N. J. Harlaar, R. G. Pleijhuis, W. Kelder, A. Sarantopoulos, J. S. de Jong, H. J. G. Arts, A. G. J. van der Zee, J. Bart, P. S. Low and V. Ntziachristos, *Nat. Med.*, 2011, **17**, 1315–1319.
- 77 A. Jain and K. Cheng, *J. Controlled Release*, 2017, **245**, 27–40.
- 78 R. Abu-Dahab, U. F. Schäfer and C.-M. Lehr, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2001, **14**, 37–46.
- 79 W. Wijagkanalan, S. Kawakami, M. Takenaga, R. Igarashi, F. Yamashita and M. Hashida, *J. Controlled Release*, 2008, **125**, 121–130.
- 80 W. Song, Y. Wang, J. Qu and Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 9654–9655.
- 81 A. A. Khan, K. S. Allemailem, S. A. Almatroodi, A. Almatroudi and A. H. Rahmani, *3 Biotech*, 2020, **10**, 163.
- 82 V. P. Torchilin, B. A. Khaw, V. N. Smirnov and E. Haber, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1979, **89**, 1114–1119.
- 83 L. Bourel-Bonnet, H. Gras-Masse and O. Melnyk, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 6851–6853.
- 84 D. Bonnet, N. Ollivier, H. Gras-Masse and O. Melnyk, *J. Org. Chem.*, 2001, **66**, 443–449.
- 85 V. T. Kung and C. T. Redemann, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, 1986, **862**, 435–439.
- 86 G. Bendas, U. Rothe, G. L. Scherphof and J. A. A. M. Kamps, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, 2003, **1609**, 63–70.
- 87 G. Blume, G. Cevc, M. D. J. A. Crommelin, I. A. J. M. Bakker-Woudenberg, C. Kluft and G. Storm, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, 1993, **1149**, 180–184.
- 88 O. Ishida, K. Maruyama, H. Tanahashi, M. Iwatsuru, K. Sasaki, M. Eriguchi and H. Yanagie, *Pharm. Res.*, 2001, **18**, 1042–1048.
- 89 T. M. Allen, E. Brandeis, C. B. Hansen, G. Y. Kao and S. Zalipsky, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, 1995, **1237**, 99–108.
- 90 F. J. Martin, W. L. Hubbell and D. Papahadjopoulos, *Biochem.*, 1981, **20**, 4229–4238.
- 91 B. Garnier, A. Bouter, C. Gounou, K. G. Petry and A. R. Brisson, *Bioconjug. Chem.*, 2009, **20**, 2114–2122.
- 92 Schelté Philippe, C. Boeckler, B. Frisch and F. Schuber, *Bioconjug. Chem.*, 2000, **11**, 118–123.
- 93 C. Boeckler, D. Dautel, P. Schelté, B. Frisch, D. Wachsmann, J.-P. Klein and F. Schuber, *Eur. J. Immunol.*, 1999, **29**, 2297–2308.
- 94 V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin and K. B. Sharpless, *Angew. Chem.*, 2002, **114**, 2708–2711.
- 95 F. Said Hassane, B. Frisch and F. Schuber, *Bioconjug. Chem.*, 2006, **17**, 849–854.
- 96 S. Cavalli, A. R. Tipton, M. Overhand and A. Kros, *Chem Commun*, 2006, 3193–3195.
- 97 E. Oude Blenke, G. Klaasse, H. Merten, A. Plückthun, E. Mastrobattista and N. I. Martin, *J. Controlled Release*, 2015, **202**, 14–20.
- 98 M. Bak, R. I. Jøck, R. Eliassen and T. L. Andresen, *Bioconjug. Chem.*, 2016, **27**, 1673–1680.
- 99 E. Saxon, J. I. Armstrong and C. R. Bertozzi, *Org. Lett.*, 2000, **2**, 2141–2143.
- 100 H. Zhang, Y. Ma and X.-L. Sun, *Chem. Commun.*, 2009, 3032–3034.
- 101 Yong Ma, Hailong Zhang, Valentinas Gruzdy, and Xue-Long Sun ; *Langmuir.*, 2011, **27**, 13097–13103, 2011.
- 102 C. Bednarek, I. Wehl, N. Jung, U. Schepers and S. Bräse, *Chem. Rev.*, 2020, **120**, 4301–4354.
- 103 S. S. van Berkel, M. B. van Eldijk and J. C. M. van Hest, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 8806–8827.
- 104 B. L. Oliveira, Z. Guo and G. J. L. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.*, 2017, **46**, 4895–4950.
- 105 M. L. Blackman, M. Royzen and J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 13518–13519.
- 106 J. A. Codelli, J. M. Baskin, N. J. Agard and C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 11486–11493.
- 107 X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert and G.-J. Boons, *Angew. Chem.*, 2008, **120**, 2285–2287.
- 108 K. Kannaka, K. Sano, M. Hagimori, T. Yamasaki, M. Munekane and T. Mukai, *Bioorg. Med. Chem.*, 2019, **27**, 3613–3618.
- 109 K. Kannaka, K. Sano, H. Nakahara, M. Munekane, M. Hagimori, T. Yamasaki and T. Mukai, *Langmuir*, 2020, **36**, 10750–10755.
- 110 L. N. Feldborg, R. I. Jøck and T. L. Andresen, *Bioconjug. Chem.*, 2012, **23**, 2444–2450.
- 111 E. Bartheldyová, R. Effenberg, J. Mašek, L. Procházka, P. T. Knötigová, P. Kulich, F. Hubatka, K. Velínská, J. Zelníčková, D. Zouharová, M. Fojtíková, D. Hřebík, P. Plevka, R. Mikulík, A. D. Miller, S.

- Macaulay, D. Zyka, L. Drož, M. Raška, M. Ledvina and J. Turánek, *Bioconjug. Chem.*, 2018, **29**, 2343–2356.
- 112 E. Bartheldyová, P. Turánek Knotigová, K. Zachová, J. Mašek, P. Kulich, R. Effenberg, D. Zyka, F. Hubatka, J. Kotouček, H. Čelechovská, R. Héžová, A. Tomečková, E. Mašková, M. Fojtíková, S. Macaulay, P. Bystrický, L. Paulovičová, E. Paulovičová, L. Drož, M. Ledvina, M. Raška and J. Turánek, *Carbohydr. Polym.*, 2019, **207**, 521–532.
- 113 P. Metzner, *Synthesis*, 1992, 1185–1199.
- 114 M. M. Cerda, T. D. Newton, Y. Zhao, B. K. Collins, C. H. Hendon and M. D. Pluth, *Chem. Sci.*, 2019, **10**, 1773–1779.
- 115 D. B. Thomas, A. J. Convertine, R. D. Hester, A. B. Lowe and C. L. McCormick, *Macromolecules*, 2004, **37**, 1735–1741.
- 116 G. Levesque, P. Arsène, V. Fanneau-Bellenger and T.-N. Pham, *Biomacromolecules*, 2000, **1**, 387–399.
- 117 G. Levesque, P. Arsène, V. Fanneau-Bellenger and T.-N. Pham, *Biomacromolecules*, 2000, **1**, 400–406.
- 118 M. Deletre and G. Levesque, *Macromolecules*, 1990, **23**, 4733–4741.
- 119 H. A. Swarup, N. Chaithra, K. Mantelingu and K. S. Rangappa, *ChemistrySelect*, 2018, **3**, 5390–5394.
- 120 D. Grisley, Jr, *J. Org. Chem.*, 1961, **26**, 2544–2546.
- 121 D. L. Fox, N. R. Whitely, R. J. Cohen and R. N. Salvatore, *Synlett*, **2003**, 2037–2041.
- 122 I. Abrunhosa, M. Gulea and S. Masson, *Synthesis*, **2004**, 928–934.
- 123 B. Heuzé, R. Gasparova, M. Heras and S. Masson, *Tetrahedron Lett.*, 2000, **41**, 7327–7331.
- 124 L. Nebhani, S. Sinnwell, A. J. Inglis, M. H. Stenzel, C. Barner-Kowollik and L. Barner, *Macromol. Rapid Commun.*, 2008, **29**, 1431–1437.
- 125 A. Hess, B. V. K. J. Schmidt and H. Schlaad, *Polym. Chem.*, 2020, **11**, 7677–7684.
- 126 S. Sinnwell, A. J. Inglis, T. P. Davis, M. H. Stenzel and C. Barner-Kowollik, *Chem. Commun.*, 2008, **17**, 2052–2054.
- 127 A. J. Inglis, S. Sinnwell, T. P. Davis, C. Barner-Kowollik, M. H. Stenzel, *Macromolecules.*, 2008, **41**, 4120–4126.
- 128 A. J. Inglis, S. Sinnwell, M. H. Stenzel and C. Barner-Kowollik, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, **48**, 2411–2414.
- 129 A. Bulpin, S. L. Roy-Gourvenec and S. Masson, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.*, 1994, **89**, 119–132.
- 130 A. Bulpin and S. Masson, *J. Org. Chem.*, 1992, **57**, 4507–4512.
- 131 S. Masson, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.*, 1994, **95**, 127–144.
- 132 F. Lebouc, I. Dez, M. Gulea, P.-J. Madec and P.-A. Jaffrès, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.*, 2009, **184**, 872–889.
- 133 S. S. L. Corre, M. Berchel, N. Belmadi, C. Denis, J.-P. Haelters, T. L. Gall, P. Lehn, T. Montier and P.-A. Jaffrès, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 1463–1474.
- 134 A. Alberti, M. Benaglia, M. Laus and K. Sparnacci, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 7911–7914.
- 135 B. Heuzé, M. Lemarié, M. Vazeux, M. Gulea, S. Masson, A. Sene, P. A. Jaffrès, A. Alberti and D. Macciantelli, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.*, 2009, **184**, 820–829.
- 136 Z. Ou, Y. Qian, Y. Gao, Y. Wang, G. Yang, Y. Li, K. Jiang and X. Wang, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 36923–36931.
- 137 J.-A. Hong, N.-E. Choi, Y.-K. La, H. Y. Nam, J. Seo and J. Lee, *Org. Biomol. Chem.*, 2017, **15**, 8018–8022.
- 138 H. Chen, C. Cai, S. Li, Y. Ma, S. Luozhong and Z. Zhu, *Chem. Eur. J.*, 2017, **23**, 4730–4735.
- 139 H. Staudinger and J. Meyer, *Helv. Chim. Acta*, 1919, **2**, 635–646.
- 140 D. Masseroni, S. Mosca, M. P. Mower, D. G. Blackmond and J. Rebek, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2016, **55**, 8290–8293.
- 141 V. Reshetov, D. Kachatkou, T. Shmigol, V. Zorin, M.-A. D’Hallewin, F. Guillemin and L. Bezdetsnaya, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2011, **10**, 911–919.
- 142 N. Angelini, R. Cubeddu, F. Lenci, A. Losi, A. Pifferi, A. Sgarbossa, P. Taroni, A. Vecchi and C. Viappiani, *J. Photochem. Photobiol. B*, 1997, **38**, 245–252.

- 143 https://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_146.
- 144 T. Mes, S. Cantekin, D. W. R. Balkenende, M. M. M. Frissen, M. A. J. Gillissen, B. F. M. De Waal, I. K. Voets, E. W. Meijer and A. R. A. Palmans, *Chem. – Eur. J.*, 2013, **19**, 8642–8649.
- 145 M. Iwamoto and H. Hamada, *Catal. Today*, 1991, **10**, 57–71.
- 146 A. W. Carpenter and M. H. Schoenfish, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 3742–3752.
- 147 https://Fr.Wikipedia.Org/Wiki/Monoxyde_d%27azote.
- 148 R. F. Furchgott and J. V. Zawadzki, *Nature*, 1980, **288**, 373–376.
- 149 R. M. Rapoport, M. B. Draznin and F. Murad, *Nature*, 1983, **306**, 174–176.
- 150 L. J. Ignarro, G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns and G. Chaudhuri, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1987, **84**, 9265–9269.
- 151 R. M. Palmer, A. G. Ferrige and S. Moncada, *Nature*, 1987, **327**, 524–526.
- 152 J. Daniel E. Koshland, *Science*, 1992, **258**, 1861–1862.
- 153 G. C. Dousmanis, *Phys. Rev.*, 1955, **97**, 967–970.
- 154 T. S. Hakim, K. Sugimori, E. M. Camporesi and G. Anderson, *Physiol. Meas.*, 1996, **17**, 267–277.
- 155 I. G. Zacharia and W. M. Deen, *Ann. Biomed. Eng.*, 2005, **33**, 214–222.
- 156 J. Pepke-Zaba, T. W. Higgenbottom, A. T. Dinh-Xuan, D. Stone and J. Wallwork, *The Lancet*, 1991, **338**, 1173–1174.
- 157 K. M. Sanders and S. M. Ward, *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.*, 1992, **262**, G379–G392.
- 158 M. Moretto, F. J. López and A. Negro-Vilar, *Endocrinology*, 1993, **133**, 2399–2402.
- 159 S. Singh and A. K. Gupta, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2011, **67**, 1211–1224.
- 160 M. A. De Groote and F. C. Fang, *Clin. Infect. Dis.*, 1995, **21**, 162–165.
- 161 J. Kanner, S. Harel and R. Granit, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1991, **289**, 130–136.
- 162 S. Sortino, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 2903–2913.
- 163 P. G. Wang, M. Xian, X. Tang, X. Wu, Z. Wen, T. Cai and A. J. Janczuk, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 1091–1134.
- 164 H. I. Kilian, D. Miranda and J. F. Lovell, in *Handbook of In Vivo Chemistry in Mice*, John Wiley & Sons, Ltd, 2020, 433–449.
- 165 A. Franke, F. Roncaroli and R. van Eldik, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2007, **2007**, 773–798.
- 166 Y. Wo, E. J. Brisbois, R. H. Bartlett and M. E. Meyerhoff, *Biomater. Sci.*, 2016, **4**, 1161–1183.
- 167 N. Naghavi, A. de Mel, O. S. Alavijeh, B. G. Cousins and A. M. Seifalian, *Small*, 2013, **9**, 22–35.
- 168 N. A. Stasko and M. H. Schoenfish, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 8265–8271.
- 169 E. M. Hetrick, J. H. Shin, N. A. Stasko, C. B. Johnson, D. A. Wespe, E. Holmuhamedov and M. H. Schoenfish, *ACS Nano*, 2008, **2**, 235–246.
- 170 D. A. Riccio, K. P. Dobmeier, E. M. Hetrick, B. J. Privett, H. S. Paul and M. H. Schoenfish, *Biomaterials*, 2009, **30**, 4494–4502.
- 171 B. M. Grommersch, J. Pant, S. P. Hopkins, M. J. Goudie and H. Handa, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018, **10**, 2291–2301.
- 172 E. B. Caruso, S. Petralia, S. Conoci, S. Giuffrida and S. Sortino, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 480–481.
- 173 S. Sortino, G. Marconi and G. Condorelli, *Chem. Commun.*, 2001, 1226–1227.
- 174 S. Sortino, S. Giuffrida, G. De Guidi, R. Chillemi, S. Petralia, G. Marconi, G. Condorelli and S. Sciuto, *Photochem. Photobiol.*, 2001, **73**, 6–13.
- 175 I. Di Bari, R. Picciotto, G. Granata, A. R. Blanco, G. M. L. Consoli and S. Sortino, *Org. Biomol. Chem.*, 2016, **14**, 8047–8052.
- 176 N. Marino, M. Perez-Lloret, A. R. Blanco, A. Venuta, F. Quaglia and S. Sortino, *J. Mater. Chem. B*, 2016, **4**, 5138–5143.
- 177 F. Rong, Y. Tang, T. Wang, T. Feng, J. Song, P. Li and W. Huang, *Antioxid. Basel Switz.*, 2019, **8**, E556.
- 178 M. C. Jen, M. C. Serrano, R. van Lith and G. A. Ameer, *Adv. Funct. Mater.*, 2012, **22**, 239–260.
- 179 D. J. Smith, D. Chakravarthy, S. Pulfer, M. L. Simmons, J. A. Hrabie, M. L. Citro, J. E. Saavedra, K. M. Davies, T. C. Hutsell, D. L. Mooradian, S. R. Hanson and L. K. Keefer, *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 1148–1156.
- 180 B. J. Nablo, A. R. Rothrock and M. H. Schoenfish, *Biomaterials*, 2005, **26**, 917–924.

- 181 J. F. Quinn, M. R. Whittaker and T. P. Davis, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, 2015, **205**, 190–205.
- 182 S.-L. Huang, P. H. Kee, H. Kim, M. R. Moody, S. M. Chrzanowski, R. C. MacDonald and D. D. McPherson, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2009, **54**, 652–659.
- 183 C. Jardeleza, S. Rao, B. Thierry, P. Gajjar, S. Vreugde, C. A. Prestidge and P.-J. Wormald, *PLoS One*, 2014, **9**, e92117.
- 184 D. J. Suchyta and M. H. Schoenfish, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2017, **3**, 2136–2143.
- 185 J. J. Koehler, J. Zhao, S. S. Jedlicka, D. M. Porterfield and J. L. Rickus, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 15086–15093.
- 186 K. Nakanishi, T. Koshiyama, S. Iba and M. Ohba, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 14200–14203.
- 187 N. Sharma, A. Kumar Dhyani, S. Marepally and D. Amilan Jose, *Nanoscale Adv.*, 2020, **2**, 463–469.
- 188 S. M. Janib, A. S. Moses and J. A. MacKay, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2010, **62**, 1052–1063.
- 189 S. S. Kelkar and T. M. Reineke, *Bioconjug. Chem.*, 2011, **22**, 1879–1903.
- 190 A. D. Ostrowski, B. F. Lin, M. V. Tirrell and P. C. Ford, *Mol. Pharm.*, 2012, **9**, 2950–2955.
- 191 D. S. Maranhão, R. G. D. Lima, F. L. Primo, R. S. D. Silva and A. C. Tedesco, *Photochem. Photobiol.*, 2009, **85**, 705–713.
- 192 S. Rykowski, D. Gurda-Woźna, M. Orlicka-Płocka, A. Fedoruk-Wyszomirska, M. Giel-Pietraszuk, E. Wyszko, A. Kowalczyk, P. Stączek, A. Bak, A. Kiliszek, W. Rypniewski and A. B. Olejniczak, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, **22**, 2772.
- 193 D. Staneva, E. Vasileva-Tonkova, P. Grozdanov, N. Vilhelmovalieva, I. Nikolova and I. Grabchev, *J. Photochem. Photobiol. Chem.*, 2020, **401**, 112730.
- 194 T. Le Gall, D. Loizeau, E. Picquet, N. Carmoy, J.-J. Yaouanc, L. Burel-Deschamps, P. Delépine, P. Giamarchi, P.-A. Jaffrès, P. Lehn and T. Montier, *J. Med. Chem.*, 2010, **53**, 1496–1508.
- 195 A. Fraix, T. Montier, N. Carmoy, D. Loizeau, L. Burel-Deschamps, T. L. Gall, P. Giamarchi, H. Couthon-Gourvès, J.-P. Haelters, P. Lehn and P.-A. Jaffrès, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 2422–2432.
- 196 M. Berchel, T. Le Gall, J.-P. Haelters, P. Lehn, T. Montier and P.-A. Jaffrès, *Mol. Pharm.*, 2015, **12**, 1902–1910.
- 197 M. F. Lindberg, T. Le Gall, N. Carmoy, M. Berchel, S. C. Hyde, D. R. Gill, P.-A. Jaffrès, P. Lehn and T. Montier, *Biomaterials*, 2015, **59**, 1–11.
- 198 M. Berchel, S. Akhter, W. Berthe, C. Gonçalves, M. Dubuisson, C. Pichon, P.-A. Jaffrès and P. Midoux, *J. Mater. Chem. B*, 2017, **5**, 6869–6881.
- 199 A. Bouraoui, M. Berchel, R. Ghanem, V. Vié, G. Paboeuf, L. Deschamps, O. Lozach, T. L. Gall, T. Montier and P.-A. Jaffrès, *Org. Biomol. Chem.*, 2019, **17**, 3609–3616.
- 200 C. Gonçalves, M. Berchel, M.-P. Gosselin, V. Malard, H. Cheradame, P.-A. Jaffrès, P. Guégan, C. Pichon and P. Midoux, *Int. J. Pharm.*, 2014, **460**, 264–272.
- 201 T. Colombani, P. Peuziat, L. Dallet, T. Haudebourg, M. Mével, M. Berchel, O. Lambert, D. Habrant and B. Pitard, *J. Controlled Release*, 2017, **249**, 131–142.
- 202 F. Perche, T. Benvegno, M. Berchel, L. Lebegue, C. Pichon, P.-A. Jaffrès and P. Midoux, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, 2011, **7**, 445–453.
- 203 A. Le Moignic, V. Malard, T. Benvegno, L. Lemiègre, M. Berchel, P.-A. Jaffrès, C. Baillou, M. Delost, R. Macedo, J. Rochefort, G. Lescaille, C. Pichon, F. M. Lemoine, P. Midoux and V. Mateo, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, 2018, **278**, 110–121.
- 204 K. Van der Jeught, S. De Koker, L. Bialkowski, C. Heirman, P. Tjok Joe, F. Perche, S. Maenhout, S. Bevers, K. Broos, K. Deswarte, V. Malard, H. Hammad, P. Baril, T. Benvegno, P.-A. Jaffrès, S. A. A. Kooijmans, R. Schiffelers, S. Lienenklaus, P. Midoux, C. Pichon, K. Breckpot and K. Thielemans, *ACS Nano*, 2018, **12**, 9815–9829.
- 205 E. Yu. Tupikina, M. Bodensteiner, P. M. Tolstoy, G. S. Denisov and I. G. Shenderovich, *J. Phys. Chem. C*, 2018, **122**, 1711–1720.
- 206 A. M. Modro and T. A. Modro, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.*, 2002, **177**, 2067–2067.
- 207 V. R. Mundlapati, S. Gautam, D. K. Sahoo, A. Ghosh and H. S. Biswal, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2017, **8**, 4573–4579.
- 208 H.-J. Lee, Y.-S. Choi, K.-B. Lee, J. Park and C.-J. Yoon, *J. Phys. Chem. A*, 2002, **106**, 7010–7017.

- 209 A. Bouraoui, R. Ghanem, M. Berchel, L. Deschamps, V. Vié, G. Paboeuf, T. L. Gall, T. Montier and P.-A. Jaffrès, *Org. Biomol. Chem.*, 2020, **18**, 337–345.
- 210 N. J. Caplen, E. W. Alton, P. G. Middleton, J. R. Dorin, B. J. Stevenson, X. Gao, S. R. Durham, P. K. Jeffery, M. E. Hodson and C. Coutelle, *Nat. Med.*, 1995, **1**, 39–46.
- 211 G. Giamas and T. Gagliano, *Cancer Gene Ther.*, 2021, 1–3.
- 212 A. B. Balazs, J. D. Bloom, C. M. Hong, D. S. Rao and D. Baltimore, *Nat. Biotechnol.*, 2013, **31**, 647–652.
- 213 A. B. Balazs, J. Chen, C. M. Hong, D. S. Rao, L. Yang and D. Baltimore, *Nature*, 2011, **481**, 81–84.
- 214 J. Lu, G. Lu, S. Tan, J. Xia, H. Xiong, X. Yu, Q. Qi, X. Yu, L. Li, H. Yu, N. Xia, T. Zhang, Y. Xu and J. Lin, *Cell Res.*, 2020, **30**, 936–939.
- 215 S. Li and L. Huang, *Gene Ther.*, 2000, **7**, 31–34.
- 216 C. E. Thomas, A. Ehrhardt and M. A. Kay, *Nat. Rev. Genet.*, 2003, **4**, 346–358.
- 217 R. Waehler, S. J. Russell and D. T. Curiel, *Nat. Rev. Genet.*, 2007, **8**, 573–587.
- 218 A. Goyenvalle, A. Vulin, F. Fougerousse, F. Leturcq, J.-C. Kaplan, L. Garcia and O. Danos, *Science*, 2004, **306**, 1796–1799.
- 219 <http://Www.Wiley.Co.Uk/Clinical>.
- 220 H. Zu and D. Gao, *AAPS J.*, 2021, **23**, 78.
- 221 A. Sharma and U. S. Sharma, *Int. J. Pharm.*, 1997, **154**, 123–140.
- 222 K. Kataoka, A. Harada and Y. Nagasaki, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, **47**, 113–131.
- 223 T. C. Yih and M. Al-Fandi, *J. Cell. Biochem.*, 2006, **97**, 1184–1190.
- 224 A.-M. Caminade, C.-O. Turrin and J.-P. Majoral, *Chem. – Eur. J.*, 2008, **14**, 7422–7432.
- 225 M. C. Morán, N. Rosell, G. Ruano, M. A. Busquets and M. P. Vinardell, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2015, **134**, 156–168.
- 226 T. Niidome and L. Huang, *Gene Ther.*, 2002, **9**, 1647–1652.
- 227 P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold and M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1987, **84**, 7413–7417.
- 228 J. Sen and A. Chaudhuri, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 812–820.
- 229 J. Sen and A. Chaudhuri, *Bioconjug. Chem.*, 2005, **16**, 903–912.
- 230 I. van der Woude, A. Wagenaar, A. A. Meekel, M. B. ter Beest, M. H. Ruiters, J. B. Engberts and D. Hoekstra, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997, **94**, 1160–1165.
- 231 A. V. Kabanov and V. A. Kabanov, *Bioconjug. Chem.*, 1995, **6**, 7–20.
- 232 U. Massing, J. T. Kley, L. Gürtesch and S. Fankhaenel, *Chem. Phys. Lipids*, 2000, **105**, 189–191.
- 233 X. Gao and L. Huang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, **179**, 280–285.
- 234 P. L. Felgner, Y. Barenholz, J. P. Behr, S. H. Cheng, P. Cullis, L. Huang, J. A. Jessee, L. Seymour, F. Szoka, A. R. Thierry, E. Wagner and G. Wu, *Hum. Gene Ther.*, 1997, **8**, 511–512.
- 235 Y. Xu and F. C. Szoka, *Biochemistry*, 1996, **35**, 5616–5623.
- 236 S. Bertin, S. Neves, M. Pedroso de Lima and V. Pierrefite-Carle, *Bull. Cancer (Paris)*, 2007, **94**, 243–252.
- 237 G. Le Bolc’h. Synthèse de phosphonolipides pour la transfection non-virale ; *Brest*, 1997.
- 238 J. P. Behr, B. Demeneix, J. P. Loeffler and J. Perez-Mutul, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1989, **86**, 6982–6986.
- 239 K. Le Ny, K. Synthèse de nouveaux lipides cationiques pour la vectorisation d’ADN ; *Brest*, 2004.
- 240 M. F. Lindberg, N. Carmoy, T. Le Gall, A. Fraix, M. Berchel, C. Lorilleux, H. Couthon-Gourvès, P. Bellaud, A. Fautrel, P.-A. Jaffrès, P. Lehn and T. Montier, *Biomaterials*, 2012, **33**, 6240–6253.
- 241 J. H. Felgner, R. Kumar, C. N. Sridhar, C. J. Wheeler, Y. J. Tsai, R. Border, P. Ramsey, M. Martin and P. L. Felgner, *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 2550–2561.

Titre : Synthèse de composés amphiphiles par réaction click – Applications à la conception de liposomes

Mots clés : Liposome, Post-fonctionnalisation, Libération de NO, Antibactérien, Thérapie génique.

Résumé : Les réactions click sont utilisées pour de nombreuses applications telle que la fonctionnalisation de la surface des liposomes. Lors de ce travail, le but a été de développer et d'appliquer une nouvelle réaction click intitulée 'phosphonodithioformate-Amine Coupling' (PAC) pour la synthèse de composés amphiphiles et pour la fonctionnalisation de la surface de liposomes.

Une première partie méthodologique a eu pour but de former des briques lipidiques 'clickables'. La réaction PAC qui a ensuite été étudiée en utilisant une amine fluorescente, s'effectue dans l'eau, à température ambiante et sans catalyse. Cette réaction permet la fonctionnalisation de liposomes sans altérer leur structure vésiculaire. L'étude de la cinétique de réaction a conduit à la classer parmi les réactions click rapides. Cette méthodologie a ensuite été appliquée pour modifier la surface de liposomes par des chaînes polymères de type PEG.

La deuxième partie de cette étude a été consacrée à la fonctionnalisation de la surface de liposomes par des motifs photosensibles pouvant libérer NO. Ces liposomes fonctionnalisés ont montré une libération de NO déclenchée par un stimulus lumineux. Une double fonctionnalisation des liposomes par des motifs précurseurs de NO et une sonde fluorescente a ensuite été étudiée. La production de NO et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) a été observée après stimulation lumineuse. L'action bactéricide de ces espèces (NO, ROS) a été étudiée.

La dernière partie de cette étude a été consacrée à l'application de la réaction click de type PAC pour préparer de nouveaux lipides cationiques. Ces composés démontrent une bonne capacité à délivrer de l'ADN dans plusieurs types cellulaires et avec une faible cytotoxicité.

Title: Synthesis of amphiphilic compounds by click reaction – Applications to the design of liposomes

Keywords: Liposome, Post-functionalization, NO release, Antibacterial, gene therapy.

Abstract: Click reactions are used for a large panel of applications that include the functionalization of liposomes. The goal of this study aims developing a new click reaction named 'Phosphonodithioformate-Amine Coupling' (PAC). This reaction was applied for the synthesis of amphiphilic compounds and to functionalize the surface of liposomes.

A first methodologic part reports the synthesis of clickable lipid building blocks. These compounds were engaged in the PAC reaction with a fluorescent amine. This coupling is efficient in water, without any catalyst and at room temperature. It was applied for the modification of the surface of liposomes. Interestingly, the morphology of the liposomes was not altered by the application of the PAC reaction. Then, some liposomes were functionalized with polymeric chains (PEG).

The second part of this study reports the modification of the surface of liposomes by molecules having the capacity to release NO under light exposure. Liposomes featuring a double functionalization with a NO-precursor and a fluorescent probe produce NO and Reactive Oxygen Species (ROS) triggered by light. These liposomes were studied for their potent bactericidal action.

Finally, the last part of this study was devoted to apply the new click reaction to prepare new cationic amphiphilic compounds. These compounds demonstrate a good capacity to deliver DNA in a few cell lines and with a low cytotoxicity.