THÈSE

Pour obtenir le grade de Docteur

Délivré par **l'Université de Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale ED 459 Sciences Chimiques Balard
En collaboration entre l'unité de recherche UMR 5253 - Institut Charles Gerhardt et l'UMR 5247 - Institut des Biomolécules Max Mousseron

Spécialité : **Chimie des matériaux**

Présentée par **Jérémie CICCIONE**

Synthèse de peptides silylés pour la conception de matériaux hybrides

Soutenue le 27/11/2015 devant le jury composé de

Mr. François GANACHAUD DR CNRS, INSA de Lyon	Rapporteur
Mr. Didier BOTURYN DR CNRS, Grenoble	Rapporteur
Mr. Jean-Marie DEVOISSELLE Professeur, Université de Montpellier	Examinateur
Mr. Franck DENAT Professeur, Université de Bourgogne	Examinateur
Mr. Jean-Luc COLL DR INSERM, Grenoble	Examinateur
Mr. Jean MARTINEZ Professeur, Université de Montpellier	Examinateur
Mr. Benjamin NOTTELET Maitre de Conférences, Université de Montpellier	invité
Mr. Ahmad MEHDI Professeur, Université de Montpellier	Directeur de thèse
Mr. Gilles SUBRA Professeur, Université de Montpellier	Directeur de thèse

Remerciements

Cette thèse a été réalisée en collaboration entre l'IBMM et l'ICG au sein des équipes Aminoacides, Peptides et Protéines (LAPP) et Chimie Moléculaire et Organisation du Solide (CMOS). A ce titre, je souhaite remercier le professeur Jean Martinez, directeur du LAPP et le professeur Jean-Marie Devoisselle, directeur de l'ICG, d'avoir initié le projet sur les peptides hybrides mais également de m'avoir accueilli au sein de leurs laboratoires respectifs.

Je remercie également l'institut Carnot ICCB et le LabEx CheMiSyst d'avoir financé ce projet de recherche.

Je tiens à remercier aussi les rapporteurs et examinateurs d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie vivement Gilles Subra et Ahmad Mehdi de m'avoir recruté ainsi que de leurs aides précieuses tout au long de ma thèse. Said Jebors pour son imagination, son organisation et tous les bons moments passés ensembles. Baptiste Legrand et Vincent pour les sessions d'escalade à Altissimo mais également leurs esprits scientifiques. Cécile Echalier qui a contribué au travail sur l'étude des silicones peptidiques et les conseils ZOTERO et WORD ainsi que Benjamin Nottelet pour l'aide apportée sur les silicones peptidiques.

Un très grand remerciement à Jean-Luc Coll et Tao Jia pour leur efficacité dans la réalisation des études FACS sans lesquelles l'étude des nanoparticules n'aurait pas de sens.

Je voudrais également remercier Karine Parra et Aurélien Lebrun pour le temps passé sur les analyses RMN et Pierre Sanchez pour les analyses LCMS.

Je tiens également à remercier Mathieu Maingot et Dominique Arama pour les moments passés à la paillasse et à rédiger nos thèses respectives. Un grand merci à Guillaume Laconde de m'avoir accueilli dans son bureau et de sa bonne humeur.

Je remercie tous mes collègues et amis : Clément B, Clément S, Lubo, Léa, Marion, Camille, Loïc, Soultan, Elise, Laurent, Alexandre, Alexandra, Barbara pour les bons moments avec vous tous que ce soit au déjeuner, au café, aux soirées ou durant les barbecues, les soirées pétanques ou les soirées jeux. Un merci également à Ludo, Vincent, Pascal, Luc, May, Nicolas, JAF, Séverine que j'ai côtoyé pendant 3 ans.

J'aimerais remercier également les personnes de ma famille, Aurélie Biurrarena ainsi que ma sœur Fanny, mon frère Robinson, mon père Stéphane, ma mère Francine, Mamette et papy pour leurs encouragements et leur soutien constants pendant ces trois années.

Sommaire

Abréviations 9

Chapitre I. Peptides hybrides silylés : précurseurs de matériaux hybrides par procédé sol-gel . 13

I.1. Les matériaux hybrides 15
I.1.1. Hybride de classe I 15
I.1.2. Hybride de classe II 16
I.2. Le procédé sol-gel 18
I.2.1. Hydrolyse 20
I.2.2. La condensation 22
I.2.3. Application des matériaux hybrides bio-organiques obtenus par sol-gel 24
I.3. Synthèse de peptides hybrides silylés 25
I.3.1. Méthodes de silylation 25
I.3.1. Généralité sur la synthèse de peptides hybrides silylés 27

Chapitre II. Nanoparticules de silice pour l'imagerie et le traitement de cellules cancéreuses ... 31

II.1. Physico-chimie des nanoparticules 33
II.1.1. Définition des nanoparticules 33
II.1.2. Les différentes nanoparticules 34
II.1.2.1. Les micelles 34
II.1.2.2. Les liposomes 34
II.1.2.3. Les nanoparticules polymériques 35
II.1.2.4. Les nanoparticules inorganiques 36
II.1.2.5. Les nanoparticules d'or 37
II.1.2.6. Les nanoparticules d'argent 37
II.1.2.7. Les nanoparticules magnétiques 37
II.1.2.8. Les nanocristaux semi-conducteurs 37
II.1.2.9. Les nanoparticules de silice 37
II.2. Synthèse de nanoparticules de silice 38
II.2.1. Méthode Stöber 38
II.2.2. Synthèse de nanoparticules de silice par microémulsion 39

II.2.3. Système micellaire inverse H_2O/Triton X-100/hexanol/cyclohexane 40
II.2.4. Synthèse de nanoparticules poreuses 40
II.3. Méthodes de fonctionnalisation de nanoparticules de silice 42
II.3.1. Synthèse directe 44
II.3.2. Post Fonctionnalisation 44
II.4. Application des nanoparticules au traitement du cancer 45
II.4.1. Cancer, considérations générales 45
II.4.2. Ciblage 46
II.4.2.1. Ciblage passif 47
II.4.2.2. Ciblage actif 47
II.4.3. Intérêt des nanoparticules pour le traitement du cancer 48
II.4.4. Nanoparticule et traitement 49
II.4.5. Nanoparticules et imagerie médicale 49
II.4.5.1. Les différentes techniques d'imagerie 50
II.4.5.2. Imagerie moléculaire 51
II.4.5.3. Fluorescence 52
II.4.5.3.1. Principe de la fluorescence 52
II.4.5.3.2. Limitations optiques in vivo 53
II.4.5.3.3. Avantages de la fluorescence 54
II.4.5.3.4. Cytométrie de flux 55
II.4.5.3.5. Traceurs 56
II.4.5.3.6. Vers de nouvelles sondes nano-particulaires biocompatibles 57
II.4.6. Différentes générations de nanoparticules 57
II.4.6.1. Première génération 57
II.4.6.2. Seconde génération : particules furtives 58
II.4.6.3. Troisième génération : particules ciblantes 59
II.4.6.4. Quatrième génération : nano-valves 59
II.4.6.5. Nanoparticule idéale 60
II.5. Synthèse de nanoparticules de silice multifonctionnelles 61
II.5.1. Synthèse de nanoparticules fluorescentes 62
II.5.1.1. Synthèse de fluorophore silane 62
II.5.1.2. Synthèse directe de nanoparticules fluorescentes 64
II.5.2. Choix des ligands de ciblage 66
II.5.2.1. Ligand ciblant les récepteurs NRP-1 à la Neuropiline 66

II.5.2.2. Ligand ciblant les récepteurs aux intégrines, c[RGD] 69
II.5.3. Greffage 71
II.5.3.1. Méthodes de quantification : ERETIC 71
II.5.3.2. Synthèse des sondes fluorées 73
II.5.3.3. Choix de la catalyse 74
II.5.3.1. Influence de la charge du composé hybride sur l'efficacité de son greffage 78
II.5.3.2. Greffage en mélange 79
II.5.3.3. Saturation de la surface 81
II.5.4. Première génération de nanoparticules 81
II.5.4.1. Préparations des nanoparticules de type A pour les tests *in vitro* 82
II.5.4.2. Test in vitro de la famille A 83
II.5.4.3. Mise au point de particules furtives : type B 86
II.5.5. Deuxième génération de nanoparticules 89
II.5.5.1. Nanoparticules de type B 89
II.5.5.2. Nanoparticules de type C 92
II.5.6. Tests in vitro : Comparaison des types A, B et C 95
II.5.6.1. Evaluation du greffage avec des composés hybrides $SiMe_2Cl$ comme alternative aux trialcoxysilanes 99
II.6. Conclusions 101

Chapitre III. Synthèse de nanoparticules poreuses pour la libération contrôlée de principes actifs 103

III.1. Introduction 105
III.2. Synthèse des Np poreuses MCM-41 106
III.3. Chargement des nanoparticules poreuses MCM-41 106
III.4. Synthèse d'une coque sur les Np^{MCM}(Rh) 109
III.4.1. Méthode « LAYER » 109
III.4.1.1. Synthèse du peptide hybride pour la méthode « layer » 109
III.4.1.2. Greffage du peptide hybride pour la méthode « layer » 113
III.4.2. Méthode « SHELL » 115
III.4.2.1. Voie Stöber: 116
III.4.2.2. Voie « dip coating » 118
III.4.2.3. Voie « PBS » 121

III.5. Conclusion et Perspectives 123

Chapitre IV. Silicones hybrides peptidiques 125

IV.1. INTRODUCTION 127
IV.2. Présentation générale des silicones 127
IV.3. Synthèse de silicones hybrides 130
IV.3.1. Modification du squelette PDMS 130
IV.3.2. Copolymérisation avec d'autres polymères 131
IV.3.3. Utilisation de monomère hybride 132
IV.4. Synthèse de silicone peptidique 132
IV.4.1. Etude de la dimérisation de peptide hybrides monfonctionnels diméthylhydroxysilane 133
IV.4.1.1. Synthèse des monomères type a 136
IV.4.1.2. Synthèse de dimères d 138
IV.4.1.3. Effet des acides sur la stabilité du dimère 141
IV.4.1.4. Etude de la stabilité du dimère d4 141
IV.4.1.4.1. Choix du noyau 142
IV.4.1.4.2. Étude de stabilité de d4 par H1 RMN 143
IV.4.2. Polymérisation de peptides diméthyl hydroxysilane bifonctionels 145
IV.4.2.1. Synthèse des monomères de type b 145
IV.4.2.2. Synthèse des monomères de type c 148
IV.4.2.3. Polycondensation des monomères bifonctionnels b et c 151
IV.4.2.4. Stabilité en milieu biologique 155
IV.5. Conclusion et perspectives 156

Conclusion générale : 157
Bibliographie 159
Partie expérimentale 165

Abréviations

Code une et trois lettres des Acides aminés

A	Ala	Alanine
R	Arg	Arginine
N	Asn	Asparagine
D	Asp	Acide aspartique
C	Cys	Cysteine
K	Lys	Lysine
F	Phe	Phénylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
L	Leu	Leucine
M	Met	Methionine
P	Pro	Proline
S	Ser	Sérine
Q	Gln	Glutamine
V	Val	Valine
T	Thr	Thréonine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine
βA	βAla	Béta-Alanine

Groupement protecteurs

Fmoc	9-Fluorénylméthyloxycarbonyl
Alloc	Allyloxycarbonyl
tBu	Tert-butyl
Trt	trityl
Boc	Tert-butyloxycarbonyl

Bzl	benzyl

Produits chimiques et solvants

HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate
DIEA	N'N-Diisopropylethylamine
TFA	Trifluoroacétique
TFE	Trifluoroéthanol
TIS	Triisopropylsilane
DCM	Dichloromethane
THF	Tétrahydrofurane
Et_2O	Diéthyl éther
DMF	N,N-diméthylformamide
TNBS	2,4,6-trinitrobenzène sulfonique acide
ICPDMSC	(3-Isocyanatopropyl)diméthylchlorosilane
ICPTES	(3- Isocyanatopropyl)triéthoxysilane

Abréviations diverses

éq	Equivalents
LC-MS	Couplage Chromatographie liquide-Spectrométrie de masse
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
Rdt	Rendement
MM	Masse molaire
ESI	*electrospray ionisation/* ionisation par électronébuliseur
TEM	*Transmission electronic microscopy*/ Microscope électronique à transmission
ATG	Analyse thermogravimétrique
SEC	*Steric exclusion chromatographie*/Chromatographie d'exclusion stérique
DLS	*Dynamic light scattering* /Diffusion dynamique de la lumière

INTRODUCTION GENERALE

Nous distinguons traditionnellement deux types de « matières » : la « matière organique », composée essentiellement de carbone et d'autres atomes avec lesquels le carbone se lie facilement comme l'azote ou l'oxygène, et la « matière inorganique ». Cette dernière famille comporte les minéraux et les métaux comme le Fer, silicium, le Plomb, etc. Les matériaux composés de cette « matière » étaient dans un premiers temps utilisés pour leurs propriétés mécaniques. Les matériaux organiques (plastiques, papier etc.) sont relativement souples, déformables et légers alors que les matériaux inorganiques sont plutôt lourds, denses et cassants.

La mise au point de matériaux composites obtenus par l'association de plusieurs matériaux différents (organique-organique, inorganique-organique ou inorganique-inorganique) ont conduit à l'obtention de propriétés mécaniques intermédiaires et innovantes. La fibre de verre inorganique (SiO_2), par exemple, est utilisée avec des résines thermodurcissables polyester ou vinylester (partie organique) pour la fabrication de planches de surf. Ce matériau permet une bonne résistance en traction et compression, une faible densité, est facile à travailler et assure l'étanchéité. De nombreuses applications ont découlé de ces composites mais le besoin de propriétés nouvelles n'a cessé de croître dans différents domaines industriels, conduisant les scientifiques à proposer de nouveaux types de matériaux. La limitation des composites traditionnels réside dans leurs structurations. En effet, ils sont composés de plusieurs matériaux différents assemblés à l'échelle macroscopique. L'obtention de matériaux assemblés à une échelle plus petite, nanométrique ou moléculaire permettrait d'obtenir de nouvelles propriétés. Pour reprendre l'exemple précédent, la fibre de verre de quelques centaines de micromètres d'épaisseur est recouverte par la résine, à l'échelle nanométrique ce matériau n'a aucune organisation.

Des matériaux composites inorganiques/organiques dont les constituants sont intimement mélangés à l'échelle nanométrique sont appelés matériaux hybrides. Les matériaux de ce type existent déjà comme par exemple la silicone, un polymère d'unités diméthylsiloxane comprenant des atomes de silicium, de carbone et d'oxygène.

Mais certaines applications dans le domaine de la santé, de l'aéronautique ou du bâtiment requièrent des matériaux où les propriétés mécaniques ne suffisent plus. Le matériau doit être fonctionnel, c'est-à-dire posséder des propriétés spécifiques comme biologique ou physique (hydrophobicité, optique etc.). Pour obtenir de tels matériaux, il est possible de travailler sur la structuration du matériau et/ou sur sa composition.

Une structuration du matériau à l'échelle nanométrique, outre l'amélioration des propriétés mécaniques, permet d'apporter des propriétés physiques inédites (interactions lumière matière, effet quantique, effet lotus etc.). L'incorporation de molécules d'intérêt biologique au matériau permet d'apporter des propriétés de biocompatibilité, de reconnaissance, etc.

Ma thèse s'inscrit dans ce contexte et vise à obtenir des matériaux hybrides fonctionnels, grâce à l'utilisation de peptides bioactifs. Pour cela, mon travail se base sur une approche dite *« bottom-up »* ou une ou plusieurs briques élémentaire hybrides possédant les propriétés désirées sont assemblées pour obtenir un matériau nouveau. Ces briques élémentaires sont composées d'une partie organique : un peptide possédant une activité biologique, et d'une partie inorganique : un ou plusieurs groupes siloxanes qui permettent la liaison entre les différentes briques et donc la formation du matériau. Dans la suite de ce manuscrit, ces synthons hybrides sont appelés *« peptides hybrides silylés »,* et sont utilisés pour l'obtention de polymères ou de nanoparticules visant des applications dans le domaine de la santé principalement.

Ce manuscrit est composé de quatre chapitres. Le premier chapitre définit les différentes classes de matériaux hybrides et la stratégie d'obtention des peptides hybrides silylés. Le deuxième chapitre se concentre sur la mise au point de nanoparticules de silice fonctionnalisées par les peptides hybrides silylés pour des applications dans la détection de cellules cancéreuses. Le troisième chapitre décrit la mise au point de nanoparticules de silice poreuses pour l'encapsulation et la libération contrôlée de principes actifs pour le traitement du cancer. Le quatrième et dernier chapitre décrit une nouvelle méthode d'obtention de dimère et une nouvelle classe polymère « silicone peptidique ».

Chapitre I. *Peptides hybrides silylés : précurseurs de matériaux hybrides par procédé sol-gel*

I.1. Les matériaux hybrides

Un matériau hybride est un système dans lequel coexistent à la fois une partie organique et une partie inorganique. La nature hybride (organique/inorganique) de ces matériaux leur confèrent des propriétés intermédiaires entre le minéral (rigidité, mise en forme, stabilité thermique…) et l'organique (flexibilité, propriété chimique, physique et biologique…). De plus, ces matériaux disposent de nouvelles propriétés qui vont au-delà de la simple addition des propriétés des différents composants. Ces comportements originaux découlent des interactions des deux parties à plusieurs échelles. Les matériaux hybrides sont d'ailleurs classés en fonction de la nature de l'interface entre la phase organique et inorganique.[1] Si les interactions entre les deux phases sont faibles (e.g. Van Der Waals, liaisons hydrogènes, interactions ioniques) le matériau est un hybride de classe I. A contrario, si les interactions sont fortes (covalentes ou de coordination) le matériau est caractérisé comme hybride de classe II.

I.1.1. Hybride de classe I

Les hybrides de classe I sont des nanocomposites. Un nanocomposite est un matériau solide multiphasé dans lequel au moins une des phases possède une dimension inférieure à 100nm. A cette échelle, ils sont composés d'un mélange non covalent entre une phase organique et une phase minérale. La nacre est un exemple naturel d'hybride de classe I car elle est formée par une juxtaposition régulière de couches d'aragonite (phase minérale) soudées par un ciment organique nommée conchyoline composé de protéines et de polysaccharides.[2] Il existe de nombreux matériaux de classe I synthétiques comme les matrices lamellaires (double hydroxydes, phosphates).[3] Ces matrices présentent une structure lamellaire où l'espace inter lamellaire est maintenu par des interactions faibles. Ces matériaux ont la particularité de pouvoir intercaler différentes molécules ou ions entre les feuillets ce qui permet d'envisager des applications dans la catalyse ou l'adsorption. Les ionogels font également partie de cette famille de matériaux.[4] Ils sont composés de liquide ionique emprisonné dans une matrice, en général un oxyde inorganique. Les polymères interpénétrés organiques-inorganiques sont également considérés comme des hybrides de classe I. La méthode de synthèse est relativement semblable pour tous les matériaux de cette classe et repose sur la dispersion d'un réseau minéral dans un réseau organique.[5] Au moins un des deux réseaux (organique ou inorganique) doit polymériser pour emprisonner l'autre. Il convient de noter que si les deux réseaux sont polymérisables, leur formation doit se faire simultanément pour obtenir un matériau homogène.

De très nombreux matériaux hybrides sont obtenus en emprisonnant des molécules organiques (e.g. molécules amphiphiles, polymères organiques, principes actifs, protéines etc) dans le réseau inorganique formé par polymérisation inorganique d'un précurseur d'oxyde métallique ($M(OR)_4$ où M est un métal comme Si, Ti, etc).[6][7] La voie sol-gel (schéma

1) est fréquemment utilisée pour cette polymérisation inorganique. Elle fait l'objet du chapitre suivant.

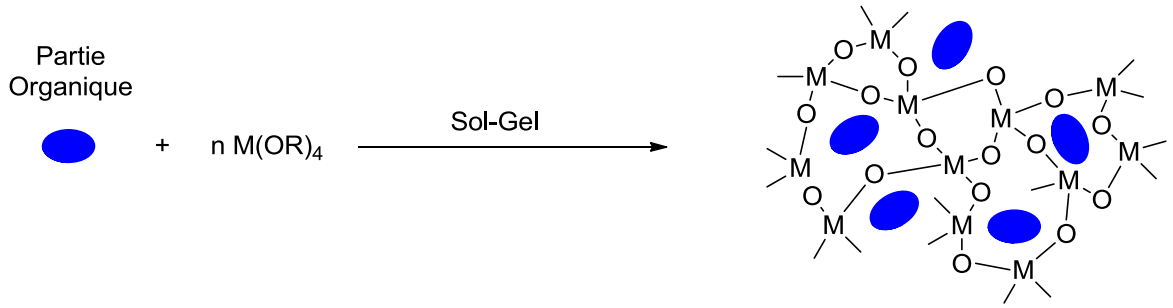


Schéma 1: Synthèse de matériau hybride de classe 1 par voie sol-gel

Cette famille de matériau présente certains inconvénients. D'abord on peut s'attendre à un certain degré d'hétérogénéité à l'échelle moléculaire entre les différentes phases entrainant des défauts et un comportement irrégulier. D'autre part, le taux de molécules organiques introduites ne peut pas être totalement contrôlé, en particulier en fonction du temps et des conditions environnementales de l'hybride. En effet, les molécules organiques emprisonnées peuvent être extraites de la phase inorganique si un solvant les solubilise.

Cette possibilité de « laver » la matrice inorganique peut être un avantage lorsqu'on utilise la partie organique comme « moule » ou comme agent de structuration. Cette méthode permet par exemple, d'obtenir des nanoparticules de silice poreuses (cf. page 40) lorsque des agents formant des micelles cylindriques sont retirés d'une matrice silicique qui les entoure.[8] Cela peut être utilisé si l'on désire également relarguer des molécules progressivement dans un milieu liquide.[9]

I.1.2. Hybride de classe II

Les hybrides de classe II possèdent des interactions fortes entre les deux phases. Ils peuvent être répartis en deux catégories différentes suivant que ces interactions soient covalentes ou de coordination. Nous nous focaliserons dans ce travail sur la première catégorie où les liaisons entre la partie organique et inorganique sont covalentes. Ces matériaux sont principalement préparés par le procédé sol-gel (cf. page 18). Ils sont composés principalement d'oxyde métallique où le métal, contrairement aux matériaux de classe I, est lié de manière covalente au groupement organique.

Les matériaux obtenus sont appelés ORMOCERS[10] (ORganically MOdified CERamicS) lorsque l'élément minéral est un métal quelconque (titane, zirconium, aluminium...) et plus spécifiquement des ORMOSILS[11] (ORganically MOdified SIloxaneS) si le métal est le silicium. Les précurseurs sont de la forme R-M(OR')$_3$ où R est la partie organique fonctionnelle et R' un groupement organique (Me, Et, … cf. Schéma 2).

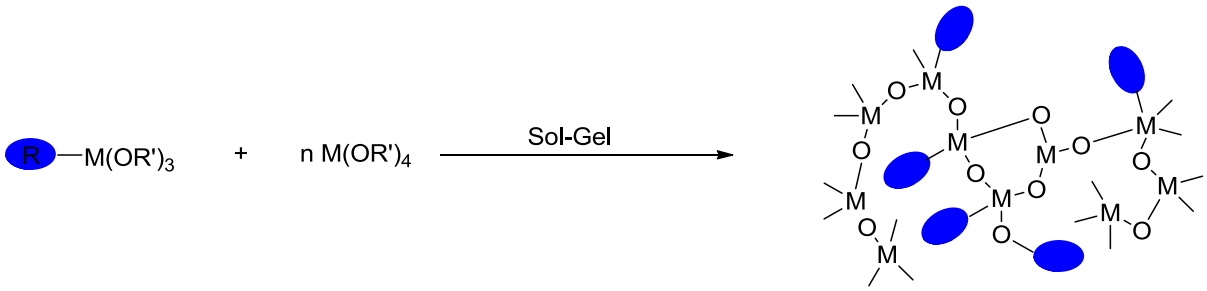


Schéma 2: Synthèse de matériaux hybrides de classe II par sol-gel en utilisant des hybrides mono fonctionnels

Si la partie organique R (ovale bleu) est capable d'auto assemblage via des interactions faibles (π-π, Van Der Waals, …), une organisation de ces matériaux de classe II peut être obtenue à l'échelle nanométrique. Par exemple des matériaux hybrides lamellaires ont été obtenus par auto-assemblage de précurseurs N-(6-aminohexyl)-3-aminopropyltrimethoxysilane via des interactions ioniques (Schéma 3).[12]

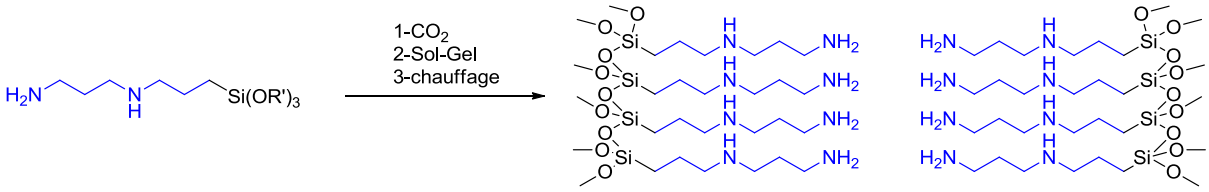


Schéma 3: préparation d'un matériau hybride lamellaire par auto-assemblage

On peut également utiliser des précurseurs bifonctionnels de forme $(OR')_3M\text{-}R\text{-}M(OR')_3$ (Schéma 4). Dans ce cas, on obtient des « ponts » formés par la partie organique au sein du matériau.[13]

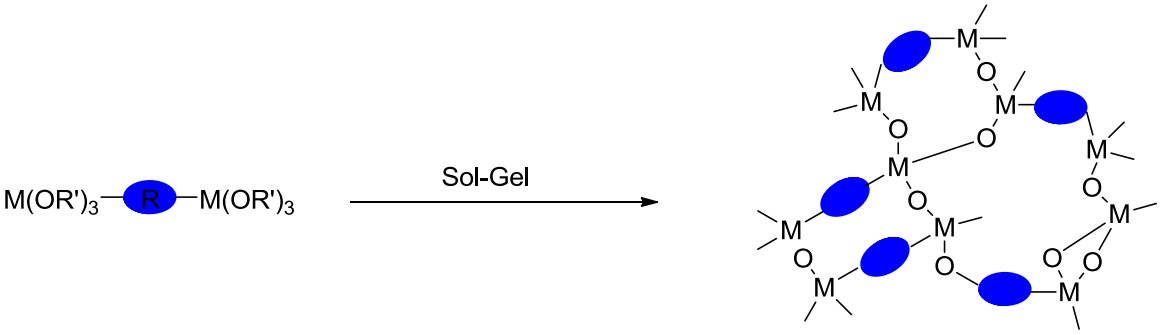


Schéma 4: Synthèse de matériaux hybrides de classe II par sol-gel en utilisant des hybrides di fonctionnels

Bien entendu, quelque soit le type de précurseurs utilisés pour ces matériaux de type II, il est également possible d'utiliser des agents structurants (surfactants, micelles) que l'on pourra ôter par lavage ou calcination. On obtiendra ainsi une structuration à l'échelle nanométrique, de la même manière que pour les matériaux de classe I.

Nous venons de détailler la synthèse des hybrides de classe II par synthèse directe mais il est également possible de les obtenir par greffage covalent d'un précurseur hybride

après la formation du matériau inorganique en utilisant des méthodes de greffage qui seront détaillées page 42 (Figure 1).

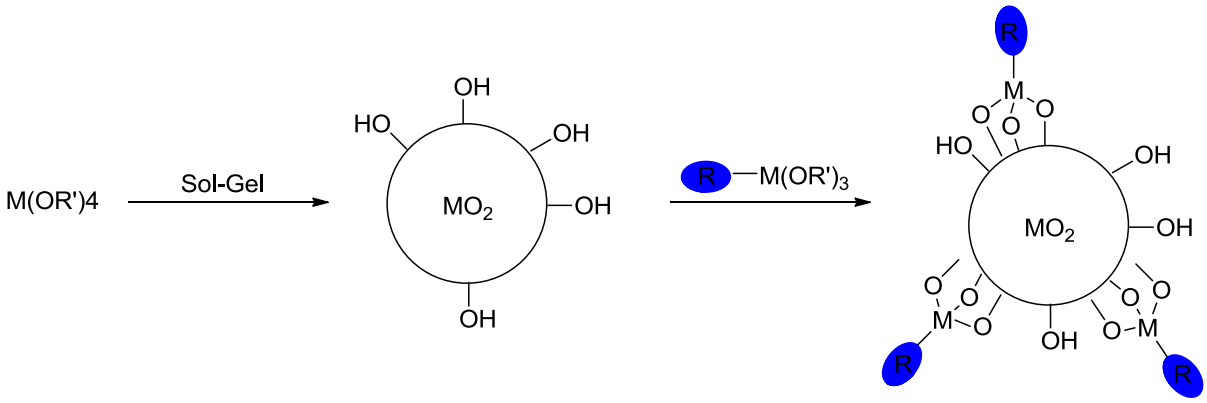


Figure 1: Obtention de matériau hybride de type II par greffage covalent d'un précurseur hybride

I.2. Le procédé sol-gel

Découvert durant le 19éme siècle par Ebelman et Graham lors de leurs études sur la conversion en verre solide de l'acide silicique exposé à l'air humide, ce procédé permet la synthèse de matériaux inorganiques par des réactions chimiques simples, dans des conditions douces, à des températures proches de la température ambiante, dans des solvants aqueux.[14] Ce procédé est basé sur l'utilisation de précurseurs inorganiques de type alcoxydes métalliques, de formule $M(OR')_n$ où M est un métal (Si, Al, Ti, Zr, V, Sn, Ge, Mo, etc.) et R' un groupement organique alkyle de formule C_mH_{2m+1}. Le métal le plus utilisé pour ce procédé reste le silicium. En effet, le silicium est le métal le plus abondant de la croute terrestre et les précurseurs $Si(OR')_4$ se conservent et se manipulent facilement contrairement aux autres précurseurs métalliques qui sont beaucoup plus sensibles.

L'eau est utilisée comme réactif dans ce procédé mais peut également servir de solvant si les précurseurs utilisés sont solubles en phase aqueuse. Dans la majorité des cas, les précurseurs sont insolubles et un mélange alcool/eau est utilisé pour des raisons de solubilité.

Entre la solution de départ et le solide final, on passe par des étapes intermédiaires où se forme une solution colloïdale appelée « le sol ». Ce sol va ensuite gélifier d'où le nom de procédé sol-gel. Nous nous focaliserons donc ici sur le procédé sol-gel hydrolytique mettant en jeu des précurseurs silylés que nous avons utilisé dans ce travail de thèse.

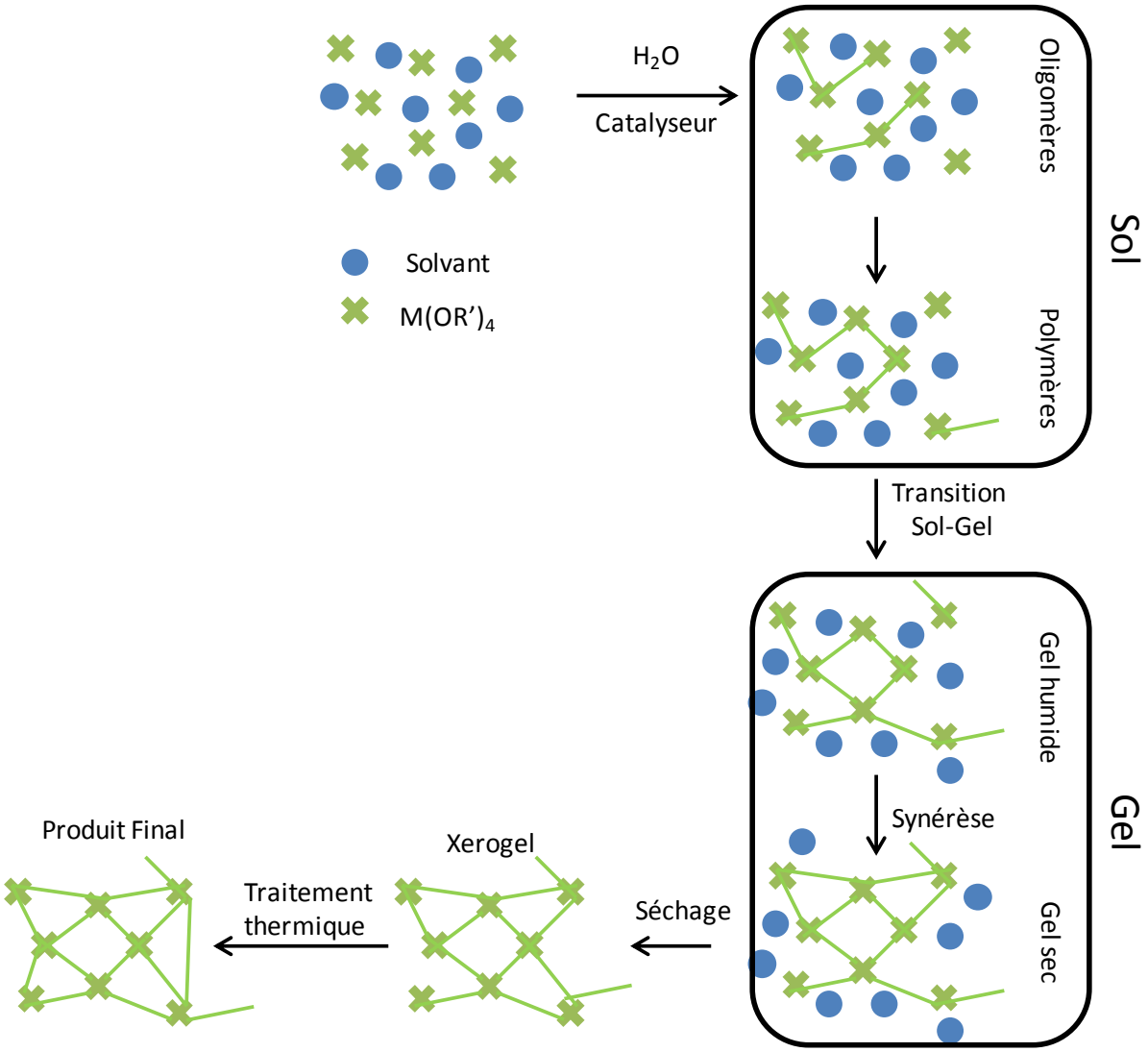


Schéma 5: Etapes élémentaires du procédé sol-gel

La définition d'un sol est une dispersion stable de particules colloïdales (oligomères ou polymères) au sein d'un liquide. Ces particules colloïdales sont généralement animées d'un mouvement brownien qui les maintient en suspension et sont principalement soumises aux forces d'interaction de Van der Waals et électrostatiques.

Un gel correspond à un réseau tridimensionnel interconnecté au sein duquel le solvant est piégé dans des pores. En fonction de la structure du réseau formé, le gel peut prendre différentes nominations. Si le réseau est constitué de particules colloïdales de taille importantes, on parle de «gel colloïdal» tandis que s'il est constitué de macromolécules, on parle de «gel polymérique» (Figure 2). La structure de ce gel peut être déterminée par les paramètres expérimentaux qui seront détaillés par la suite.

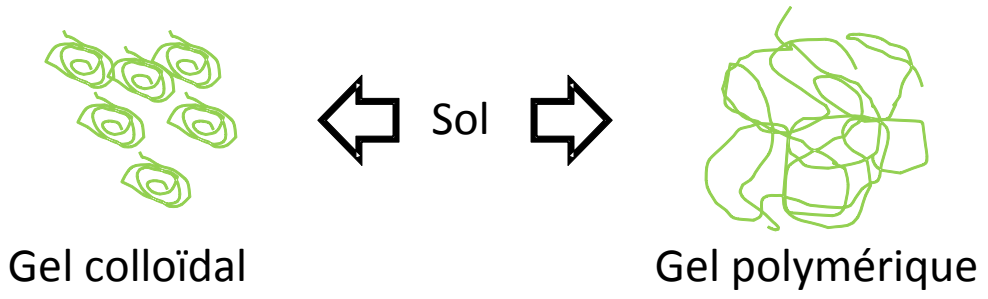


Figure 2: Structure d'un gel colloïdal ou polymérique.

Le procédé sol-gel passe donc par plusieurs étapes élémentaires qui font intervenir des réactions d'hydrolyse et de condensation de précurseur d'alcoxyde de silicium entrainant la formation d'un sol en présence d'un catalyseur (acide, base ou nucléophile) (Schéma 5). Ainsi des oligomères inorganiques de taille nanométriques sont obtenus puis s'assemblent pour former des polymères de taille supérieure (10-100nm). Ces derniers s'agrègent et forment des colloïdes de quelques micromètres. La solution passe ainsi d'un liquide à une solution visqueuse puis à un gel. La densification du gel induite par des réactions de réticulation conduit au rétrécissement de la porosité et à l'expulsion d'une partie du solvant, il s'agit de la synérèse. Le séchage permet ensuite d'éliminer le solvant en libérant ainsi la porosité pour obtenir un xérogel. Le séchage est un paramètre important à contrôler car il entraine un rétrécissement du volume du gel, dû aux forces capillaires et peut conduire à une fracturation. Le matériau obtenu peut subir un traitement thermique afin de consolider sa structure. Ce procédé est aussi appelé vieillissement. En effet, même en absence de solvant, le matériau peut continuer à évoluer via la formation de nouvelles liaisons dues à la présence de fonctions réactives résiduelles entrainant une densification du matériau.
Nous allons à présent détailler les deux principales étapes élémentaires qui sont l'hydrolyse et de la condensation au moment de la formation du sol de précurseurs silylés.

I.2.1. Hydrolyse

Cette réaction consiste en la formation de groupements silanols (Si-OH) par hydrolyse des groupements alcoxydes (Si-OR') (équation 1)

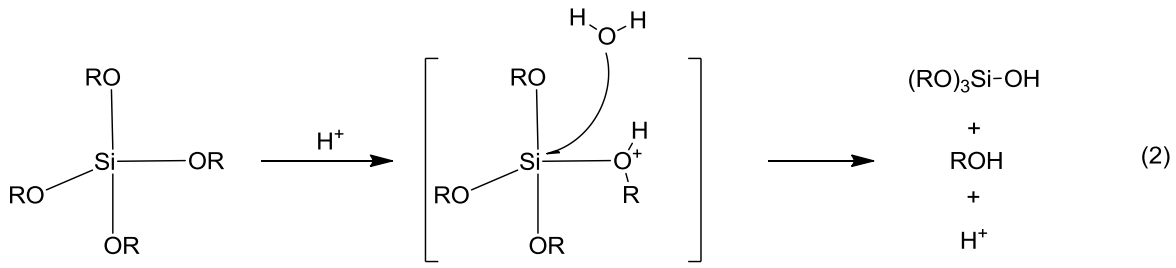
$$(OR')_3-Si-OR' + H_2O \longrightarrow (OR')_3-Si-OH + R'\text{-}OH \qquad (1)$$

Dans l'eau à pH 7, cette hydrolyse est lente voire nulle mais elle peut être catalysée. Selon les conditions de catalyse (acide, basique ou nucléophile), la vitesse d'hydrolyse est plus ou moins grande (Figure 3).

i. <u>Catalyse acide</u>

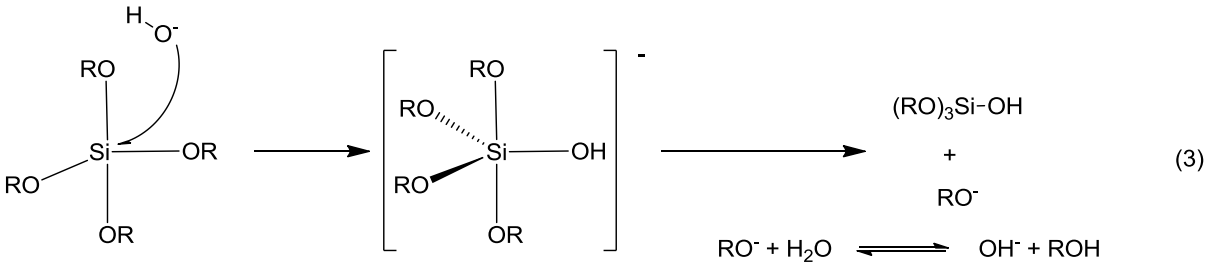
Dans le cas de la catalyse acide, un groupe alcoxyde, portant une charge partielle négative est facilement protoné. La densité électronique du centre métallique est alors diminuée ce qui le rend plus électrophile. De plus, la protonation augmente le caractère nucléofuge du

groupe partant alcool (ROH). Au niveau cinétique, le transfert de proton entre le groupe entrant et le groupe partant n'est plus nécessaire. Dans ces conditions la vitesse d'hydrolyse est élevée (Equation 2).



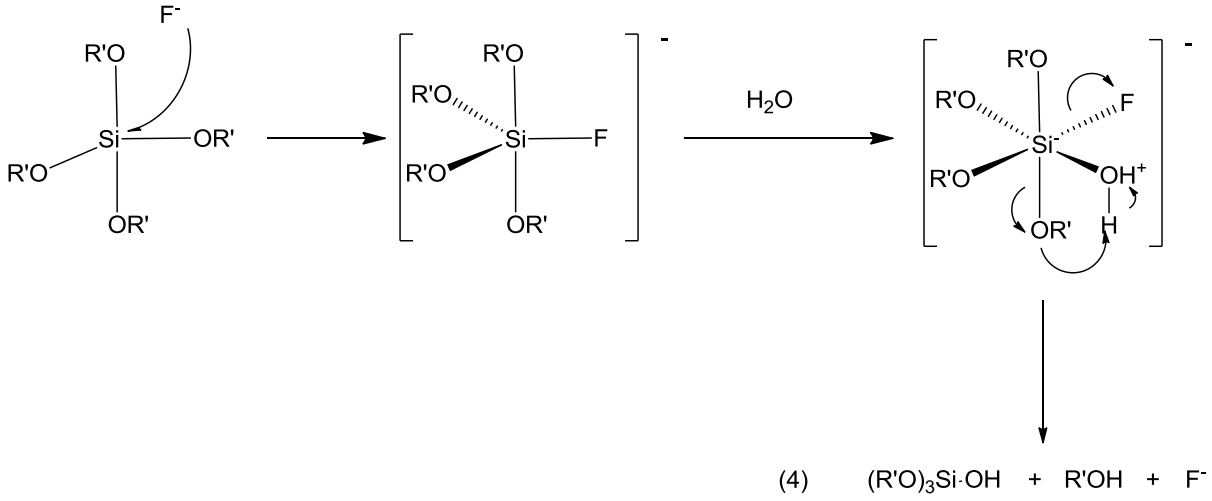
i. <u>Catalyse basique</u>

La vitesse d'hydrolyse est plus faible qu'en milieu acide. Elle procède d'un mécanisme biomoléculaire (S_N2-Si) via l'attaque nucléophile d'un ion hydroxyle OH^- sur l'atome de silicium amenant à la formation d'un intermédiaire penta-coordinné possédant une charge globale négative stable. Le départ de l'ion alcoolate permet ensuite de générer l'espèce $(R'O)_3SiOH$ (Equation 3).



i. Catalyse par les ions fluorures

Dans les sol-gel de silicium, les catalyseurs à bases de fluorures comme l'acide fluorhydrique (HF) ou les fluorures alcalins (KF, NaF,…) présentent de fortes similitudes avec les bases.



L'ion fluorure est de taille similaire à l'ion hydroxyde et possède lui aussi la capacité d'augmenter la coordination du silicium au delà de quatre, en passant par un état de transition hypervalent.

L'ion fluorure, attaque l'atome de silicium via un mécanisme de S_N2 pour former un intermédiaire pentavalent chargé négativement, qui devient hexavalent après addition d'une molécule d'eau. Le départ du groupement R'OH et de l'ion fluorure permet de générer l'espèce $(R'O)_3SiOH$.[15]

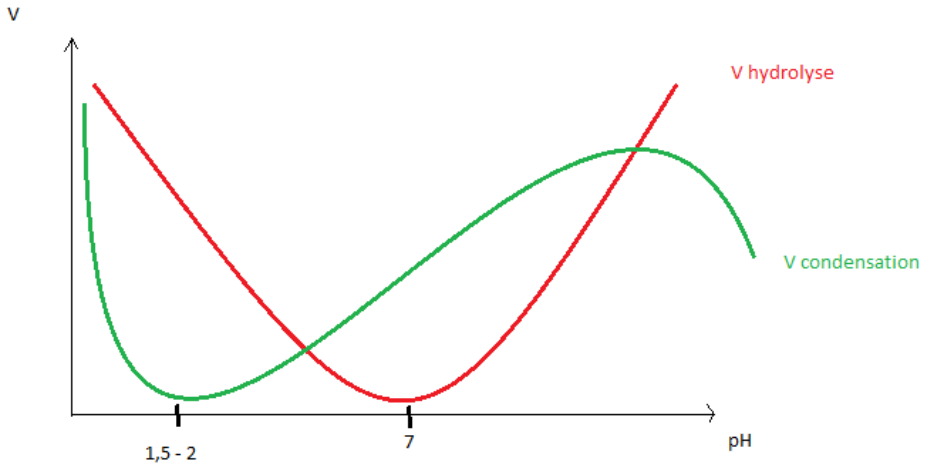
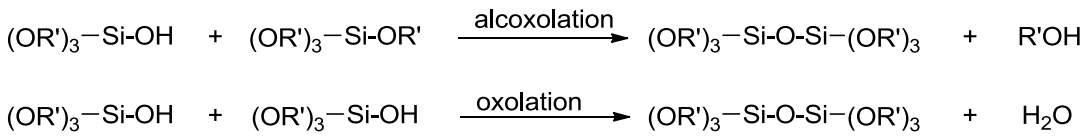


Figure 3: Vitesse d'hydrolyse (courbe rouge) et de condensation (courbe verte) du tetraethylorthosilicate (TEOS) en fonction du pH dans l'eau

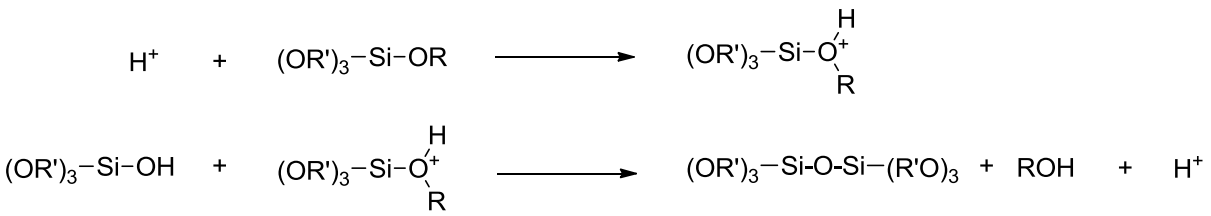
I.2.2. La condensation

Cette étape permet la formation des groupements siloxanes (Si-O-Si) par réaction de condensation qui peuvent avoir lieu soit entre les groupements hydroxyles et alcoxydes (on parle alors d'alcoxolation), soit entre groupements hydroxyles (on parle alors d'oxolation). Les sous produits de ces réactions sont respectivement l'alcool et l'eau.

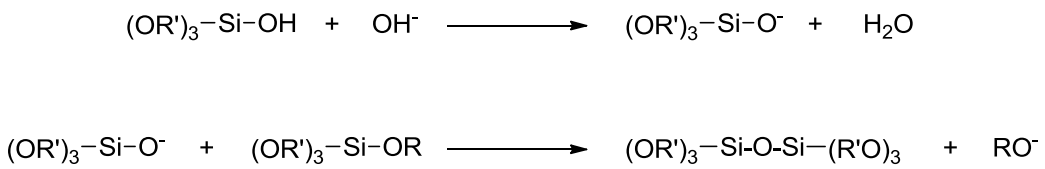


Comme pour l'hydrolyse, la nature de la catalyse joue un rôle très important.

i. <u>Catalyse acide</u>

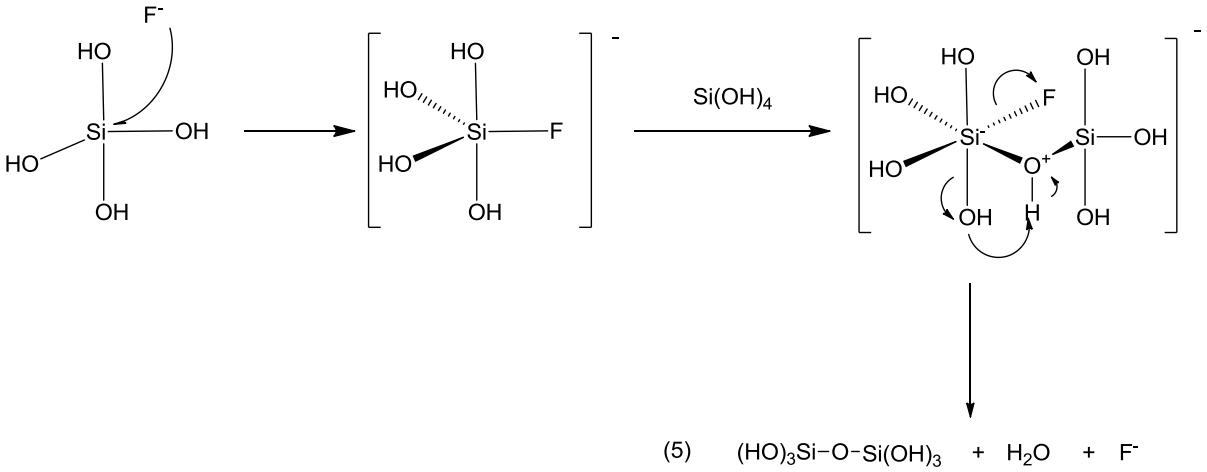


i. <u>Catalyse basique</u>



En milieu basique, on favorise la formation de silanolates (Si-O$^-$) qui présentent un caractère nucléophile plus important que les silanols. La condensation est donc favorisée en milieu basique.

La condensation peut également être catalysée par des nucléophiles comme les fluorures : l'ion F^- présente une forte affinité avec le silicium auquel il se coordonne facilement. En effet l'anion F^- a une taille proche de l'ion OH^- et une électronégativité plus grande que ce dernier, ce qui lui permet d'augmenter la coordinance du silicium de 4 à 5 (ou 6). Ceci a pour effet de former des espèces plus réactives vis-à-vis des groupements silanols (équation 5).



La catalyse joue un rôle prépondérant sur les réactions d'hydrolyse et condensation. Par exemple, un pH acide induit une vitesse d'hydrolyse rapide et une vitesse de condensation plus lente, contrairement à un pH basique. Ainsi, un fort taux d'hydrolyse (pH acide) favorise la croissance du réseau et conduit à un « gel polymérique » (Figure 2). Un taux d'hydrolyse faible (pH basique) favorise plutôt la nucléation et conduit à un « gel colloïdal ». Mais d'autres paramètres interviennent également : la nature du précurseur, sa concentration, la nature du solvant, le rapport d'hydrolyse ([H_2O]/[Si]) et la température. En contrôlant ces nombreux paramètres, il est possible d'obtenir de la silice dans des géométries complètements différentes. Des monolithes de silice sous forme de gel, des résines, des solutions colloïdales stables ou encore des nanoparticules peuvent être obtenus par sol-gel.

Se déroulant dans l'eau, à température ambiante et mettant en jeu des réactions chemosélectives, le procédé sol-gel est donc parfaitement adapté pour l'élaboration de matériaux hybrides contenant des biomolécules. Nous avons choisi de nous intéresser

particulièrement aux peptides qui possèdent de très nombreuses propriétés biologiques (ligands, substrats d'enzymes, etc.) en mettant au point des peptides hybrides silylés. Ces précurseurs hybrides seront utilisés pour concevoir des hybrides de classe II par le procédé sol-gel.

I.2.3. Application des matériaux hybrides bio-organiques obtenus par sol-gel

L'utilisation du procédé sol-gel (méthode douce), est donc une voie très prometteuse pour obtenir des matériaux hybrides possédant des propriétés et des formes nouvelles. Des matériaux obtenus par sol-gel sont déjà utilisés dans beaucoup de domaines comme le textile[16], la construction[17], la micro électronique[18] ou micro-optique, les revêtements anti salissures [19] ou hyperhydrophobe[20], mais également dans le domaine de l'énergie avec les cellules solaires flexibles[21] et les batteries[22]. Le domaine de la santé est une autre application d'avenir pour les matériaux hybrides, en particulier puisque la partie organique peut être modulée. Dans ce contexte, nous pouvons nous poser la question suivante : est-il possible d'utiliser une biomolécule comme partie organique et si oui, gardera-t-elle ses propriétés au sein du matériau? Cette question a fait l'objet de plusieurs études ces dernières années.[21] Nous allons détailler les principales applications de la littérature.

L'ingénierie tissulaire a pour but de stimuler la régénération de tissus déficients ou de créer des substituts de tissus fonctionnels qui pourront être implantés. Cela implique souvent l'ensemencement de cellules dans des matrices de soutien qui servent alors de support pour l'adhésion, la croissance et éventuellement la différenciation cellulaire. Des matrices hybrides polyvinyl-alcool/silice[23], silice/collagène/chitosane[24], hydroxy apatite/PLGA[25], sont en voie de développement pour ces applications.

Les nanoparticules obtenues par sol-gel constituent une classe très étudiée de nano objets pour le ciblage et la délivrance de principe actifs. Leur fonctionnalisation en surface par des biomolécules comme des peptides, des polysaccharides ou des anticorps devraient permettre d'améliorer de manière significative les traitements actuels. Cette partie importante fera l'objet d'un chapitre à part entière (chapitre II).

Les matériaux hybrides se développent aussi en tant que biosenseurs.[26] Il s'agit souvent de proposer des dispositifs pour détecter ou de mesurer un signal généré par un paramètre biologique. Nous pouvons citer par exemple la mesure de glucose sanguin témoignant de la glycémie. Un biosenseur permet de détecter l'interaction d'une biomolécule avec une surface ou la modification de cette surface sous l'effet d'un stimulus biologique. La surface du senseur peut être fonctionnalisée par des enzymes[27], des anticorps, des peptides, de l'ADN[28] ou autres micro organismes pour interagir et permettre la détection de très faibles doses de certaines molécules. L'immobilisation peut se faire par voie sol-gel avec des matrices inorganiques[29][30][31] qui présentent certains avantages comme une bonne stabilité

mécanique, thermique et chimique. Par exemple il a été montré qu'il est possible d'immobiliser la glucose oxydase dans une matrice de silice mésostructurée tout en conservant son activité biologique.[30] D'autres enzymes comme l'anhydrase carbonique ou encore la cholestérol oxydase ont été immobilisées avec succès par voie sol-gel.[32] Des métalloprotéines (myoglobine, cytochrome c) ont également été immobilisées par sol-gel pour obtenir des biosenseurs optiques sensibles à certaines molécules comme le monoxyde d'azote ou le monoxyde de carbone.[33] Dans ce cas, c'est la complexation avec le substrat qui induit une modification qui peut être suivie par des méthodes spectroscopiques.[34]

Comme nous venons de le voir, la chimie sol-gel permet la synthèse de nombreux matériaux hybrides car ce procédé met en jeux des conditions relativement douces (température, pression, pH) parfaitement compatibles avec l'incorporation d'une grande gamme de molécules organiques. Dans la suite de ce manuscrit nous nous intéresserons à la mise au point de matériaux hybride de type II par sol gel incorporant des peptides comme biomolécules. Nous allons maintenant détailler la synthèse de peptides hybrides silylés qui constitueront les briques de base pour la formation de matériaux hybrides.

I.3. Synthèse de peptides hybrides silylés

Un peptide contient de nombreuses fonctions chimiques portées notamment par les chaînes latérales et certaines d'entre elles sont absolument nécessaires pour conserver les propriétés biologiques. Pour obtenir des matériaux hybrides de classe II, nous devons ajouter un groupement silane au peptide. Nous nous sommes donc attachés à développer des méthodes de synthèse pour obtenir différents types de peptides hybrides (Figure 4).

Figure 4: Peptides silylés

I.3.1. Méthodes de silylation

Dans ce paragraphe nous allons détailler les principales méthodes connues pour fonctionnaliser une molécule par un groupement silane (SiX_3) tout en mettant l'accent sur celles qui sont le plus adaptées pour la mise au point de peptide silylé.

Une des méthodes pour obtenir un organo silane[35] met en réaction un chlorure trialcoxysilane de formule $ClSi(OR')_3$ (où R' = Me, Et, iPr) avec un composé bromé en présence d'un organolithien (*t-BuLi*) dans des conditions anhydres (Schéma 6).

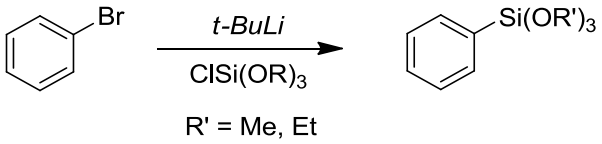


Schéma 6: réaction de lithiation

La réaction met en jeux un échange lithium-brome via la formation d'un organo-lithien suivi par une attaque nucléophile sur le chlorure de trialcoxysilane. Cette réaction peut également se faire avec des organomagnésiens.

Ce genre de réaction a déjà été utilisée sur des peptides protégés[36], mais l'utilisation de t-BuLi n'est pas compatible avec les nombreuses fonctions réactives présentes sur un peptide déprotégé.

La réaction d'hydrosilylation[37] est une méthode également couramment utilisée pour obtenir des organosilanes. Elle permet d'introduire un groupement SiX_3 sur un alcène par action d'un hydrosilane ($HSiX_3$) en présence d'un catalyseur métallique (Pd/C, Pt, $(Ph_3P)RhCl$ etc.)(Schéma 7).

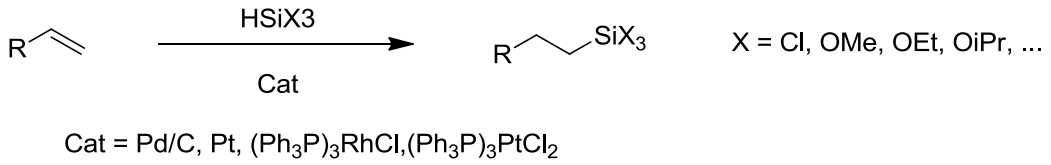


Schéma 7: réaction d'hydrosilylation

L'hydrosilylation est sélective et peut se dérouler en présence des chaines latérales des peptides qui ne possèdent pas naturellement d'insaturation. Pour appliquer cette méthode à la synthèse de peptides hybrides, un groupement alcène peut être rajouté. Il est possible d'introduire des acides aminés non naturels possédant une insaturation sur leur chaine latérale comme l'allyl glycine. Alternativement, nous pouvons mettre à profit un groupement protecteur insaturé comme l'allyle oxycarbonly (Alloc) ou le groupement allyl, tous deux classiquement utilisés en synthèse peptidique pour protéger les amines et les acides carboxyliques respectivement. Enfin, il est possible d'introduire une insaturation du coté N ou C terminal avec de l'acide allylique ou de l'allyl amine (Figure 5).

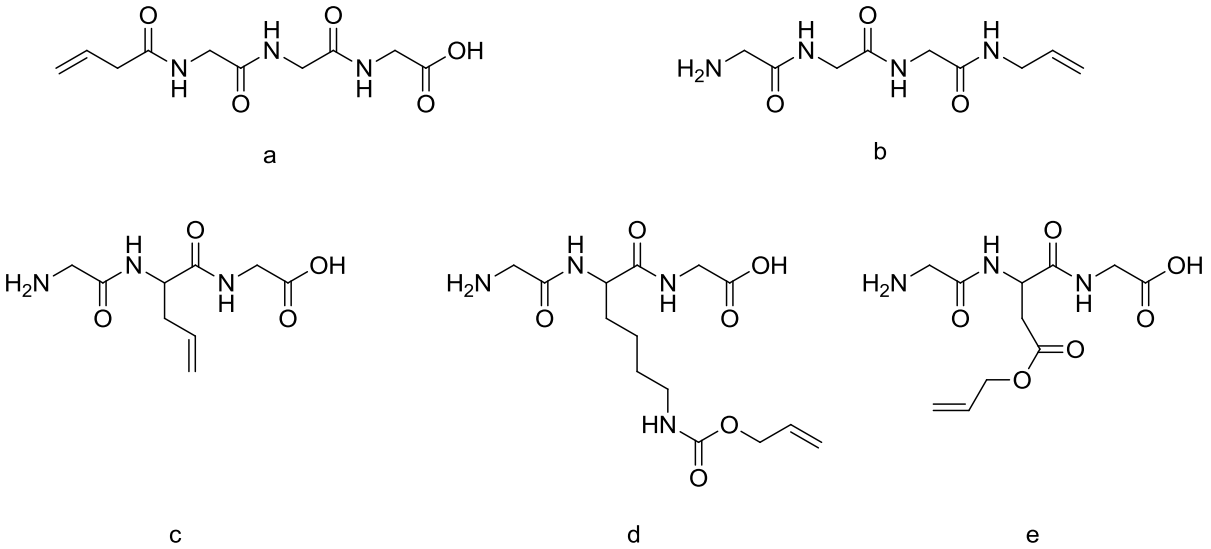


Figure 5: Peptides présentant une insaturation: a) via l'acide allylique, b) via l'allyl amine, c) via l'allyl glycine, d) via l'alloc, e) via l'ester allylique.

Il existe également de nombreux précurseurs silylés disponibles dans le commerce présentant une fonction réactive. Les deux exemples ci-dessous sont les plus intéressants en vue d'un couplage avec un peptide (Schéma 8).

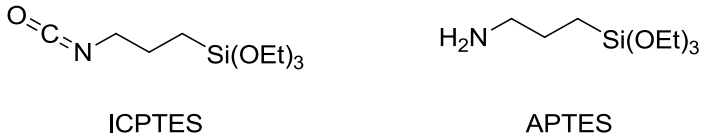


Schéma 8: Précurseurs silylés utilisés pour le couplage avec un peptide

L'APTES peut être utilisé pour la fonctionnalisation, cependant, il exige d'activer une fonction acide sur le peptide ce qui contraint les autres acides et les autres fonctions nucléophiles (amines primaires) à être protégés. Au contraire, l'isocyanatopropyl triethoxy silane (ICPTES) réagit sélectivement sur les fonctions amines et est donc plus direct d'utilisation que l'APTES. En effet, beaucoup de peptides présentent une fonction amine libre en N-terminal. Si cette fonction amine n'est pas présente sur le peptide ou si elle doit être conservée pour maintenir l'activité biologique, une fonction amine supplémentaire peut être facilement introduite par ajout d'une lysine ou de tout autre aminoacide non-protéinogénique possédant une amine sur sa chaine latérale.

I.3.1. Généralité sur la synthèse de peptides hybrides silylés

Trois applications principales des peptides hybrides sont décrites dans ce travail de thèse (Figure 6): la conception de nanoparticules de silices multifonctionnelles (Chapitre II), la synthèse de coques sur des nanoparticules poreuses pour la libération de principe actif (Chapitre III) et la synthèse de dimères et polymères hybrides peptidiques analogues de polydiméthylsiloxanes (Chapitre IV). En fonction de l'application visée, les précurseurs peptidiques posséderont une fonction $SiMe_2Cl$ ou $Si(OEt)_3$. Ainsi, les peptides hybrides triethoxysilanes ont été essentiellement utilisés pour la fonctionnalisation (en surface ou dans le cœur) des nanoparticules de silice. Les peptides hybrides chlorodiméthylsilanes ont été utilisés pour la mise au point de dimère et de polymère silicone peptidique mais ont été également évalués pour la fonctionnalisation de nanoparticules.

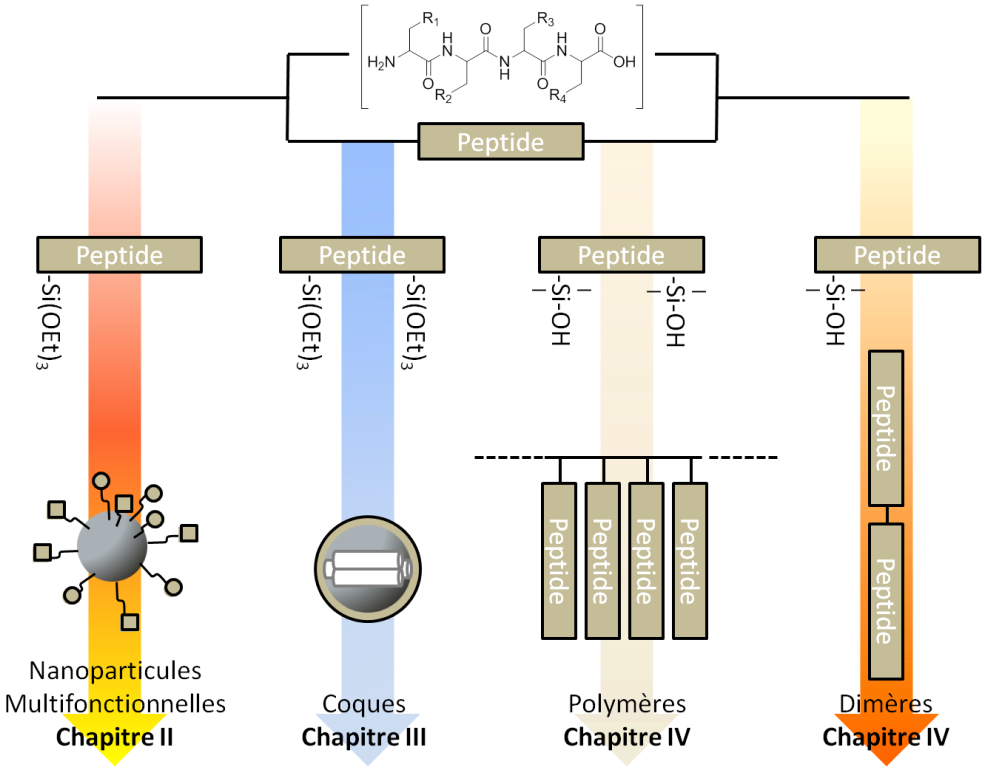


Figure 6: Applications des peptides hybrides silylés

La synthèse peptidique sur support a été utilisée pour préparer les précurseurs peptidiques. De manière générale, les peptides d'intérêt ont été synthétisés sur un linker 2-Chloro Chloro trityl ou Rink amide sur des billes polystyrène puis le groupement silylé a été introduit sur une amine primaire libre.

En ce qui concerne les peptides trialkoxysilanes, l'ICPTES a été utilisé pour fonctionnaliser le peptide en solution libéré après le clivage de la résine. La fonction isocyanate réagit sur la fonction amine du peptide pour générer un lien urée (Schéma 9). Cette réaction peut se faire dans de nombreux solvants mais le DMF a été choisi pour des raisons de solubilité des peptides. La présence d'un excès de base, en général la DIEA, est nécessaire pour s'assurer de la basicité du milieu afin que la fonction amine ne soit pas sous la forme protonée. En effet, les peptides utilisés ont été préalablement purifiés par HPLC préparative et isolés sous forme de sels de TFA.

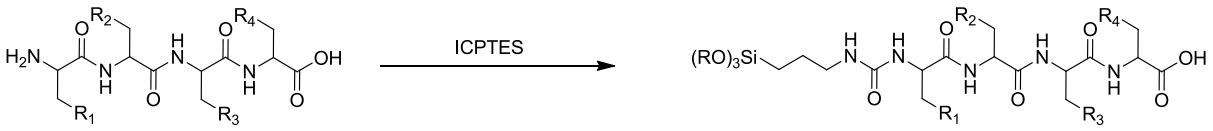


Schéma 9: Mono-fonctionnalisation d'un peptide par l'ICPTES.

La principale limitation de cette méthode réside dans le cas où le peptide d'intérêt possède plusieurs fonctions amines. Dans ce cas, il est nécessaire de conserver toutes les amines que nous ne désirons pas fonctionnaliser avec l'ICPTES sous forme protégée puis ôter

sélectivement ses protections après la formation du lien urée avec l'ICPTES. Malheureusement le groupement trialcoxysilane $Si(OR')_3$ s'est avéré particulièrement sensible à l'hydrolyse. Notamment, lors d'un traitement au TFE ou au TFA, réactifs couramment utilisés pour ôter les protections des chaines latérales ou cliver un peptide de la résine, ou lors de la déprotection d'un groupement Fmoc par une solution de pipéridine, le bloc hybride commence à s'hydrolyser et à condenser conduisant à des espèces multimériques et insolubles. Une solution possible est de conserver les groupements protecteurs, de conduire la synthèse du matériau hybride avec le peptide hybride protégé, puis d'ôter ces protections après la formation du matériau. Cette approche a été utilisée par notre équipe pour la préparation de lames de verre antibactériennes.[38]

Dans la suite de ce travail, il s'est avéré intéressant d'obtenir des composés bi-silylés de type $(OR')_3Si\text{-}R\text{-}Si(OR')_3$ pour l'obtention de matériaux hybrides d'ordre II en vue de certaines applications. Dans ce cas, deux (ou plusieurs) fonctions amine ont été modifiées en même temps par l'ICPTES (Schéma 10).

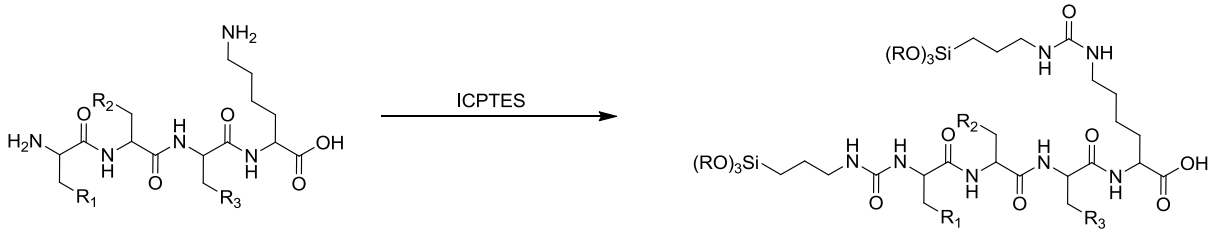


Schéma 10: Bi-fonctionnalisation d'un peptide par l'ICPTES en N-ter et sur le N-ε d'une chaîne latérale de lysine

Les peptides hybrides dimethyl chlorosilanes ont été obtenus avec l'isocyanatopropyldiméthylchlorosilane (ICPDCS). Ces peptides hybrides ont été utilisés durant cette thèse pour l'obtention de dimères et de polymères (voir chapitre IV). Au contraire des hybrides trialkoxy, les peptides hybrides fonctionnalisés avec l'ICPDCS ne possèdent qu'une seule fonction hydrolysable et ne peuvent former qu'une unique liaison siloxane. Les conditions de réaction de l'ICPDCS sont les mêmes que pour l'ICPTES. Une fois introduit sur le peptide, le groupe dimethylchlorosilane est plus facile à manipuler que le trialcoxy et ne conduit pas à la formation d'espèces multimériques complexes lors d'étapes de déprotection de chaine latérales ou même lors d'un clivage au TFA. L'ICPTES pourra donc être introduit sur support solide et sur un peptide protégé.

De manière générale, les peptides hybrides ont été conservés et stockés de la même manière que l'ATPES, c'est-à-dire sous atmosphère inerte, à 20°C et à l'abri de l'humidité. Il s'agit d'éviter toute réaction d'hydrolyse et de condensation qui conduiraient à des matériaux condensés inutilisables.

Chapitre II. *Nanoparticules de silice pour l'imagerie et le traitement de cellules cancéreuses*

II.1. Physico-chimie des nanoparticules

Les nanotechnologies appliquées aux sciences du vivant est un domaine de recherche particulièrement dynamique. [39] En effet, il se situe à l'interface de trois grandes disciplines : la biologie, la physique et la chimie. Le travail à la frontière de ces thématiques stimule de nombreuses innovations. La conception de nanoparticules illustre parfaitement ceci. Les nanoparticules incarnent la version moderne des « magic bullets » imaginées au début du XXème siècle par le médecin allemand Paul Ehrlich[40] et permettent à présent de véhiculer un agent de contraste ou de délivrer sélectivement un principe actif dans les cellules cibles.

Apres avoir donné une définition des nanoparticules, nous présenterons leurs avantages ainsi que les applications envisagées pour la médecine. Ce chapitre s'intéresse ensuite aux principaux types et aux différentes générations de nanoparticules. Enfin, il présente des exemples de nanoparticules approuvées pour un usage clinique thérapeutique ou diagnostique.

II.1.1. Définition des nanoparticules

Une nanoparticule est un assemblage de quelques centaines à quelques milliers d'atomes, formant un objet dont au moins une dimension est comprise entre 1 et 100 nm. Cette définition exclut donc les objets dont la plus petite dimension est comprise entre 100 et 1000 nm. Ces particules, bien que de taille nanométrique, sont désignées comme submicrométriques.[41]

A titre de comparaison avec les structures organiques naturelles, les nanoparticules se situent principalement dans la gamme de taille correspondant aux protéines (Figure 7).

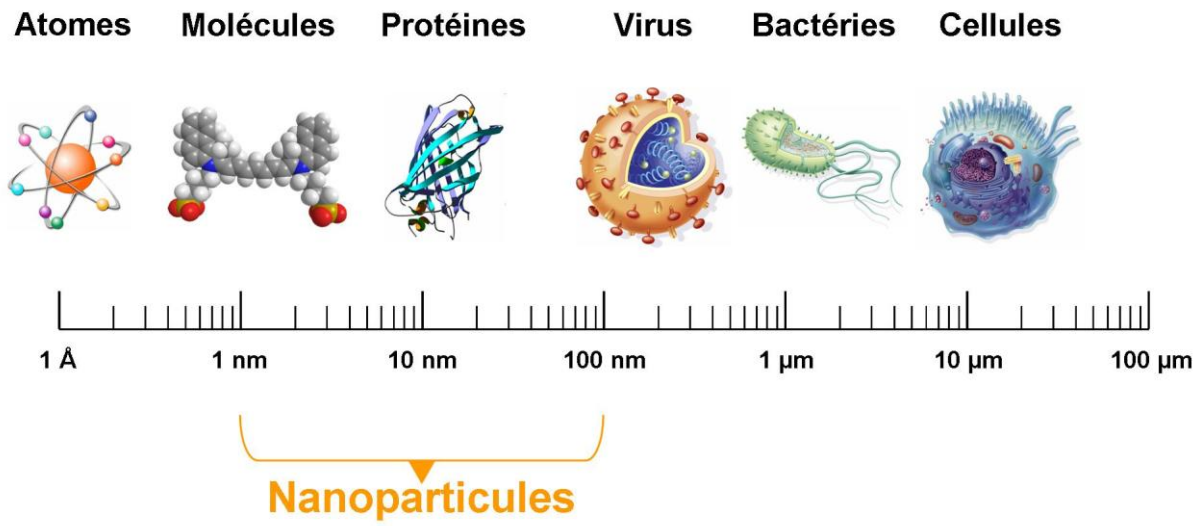


Figure 7 : Gamme de tailles des nanoparticules comparée à celles des principales structures chimiques et biologiques

II.1.2. Les différentes nanoparticules

Cette définition basée sur la taille n'est pas limitative vis-à-vis de la composition de ces particules. Il existe ainsi une grande variété de nanoparticules allant des particules métalliques[42] aux liposomes[43], en passant par les nanoparticules polymériques. Si le choix du cœur des particules est primordial, le contrôle de la surface l'est tout autant car il conditionne le ciblage, la protection et l'éventuel relargage des agents d'intérêt. La taille des nanoparticules est également un paramètre déterminant pour le traitement de certaines pathologies.

La composition du cœur des nanoparticules est très variée : il peut s'agir d'assemblages organiques ou inorganiques. Nous allons décrire ici les nanoparticules les plus courantes.[44]

II.1.2.1. Les micelles

Les micelles, formées par auto-assemblage de molécules amphiphiles, sont des structures de type cœur-coquille (« core-shell » en anglais) en milieu aqueux. En effet, leur formation a lieu lorsque la concentration en surfactants dans le milieu dépasse une valeur seuil nommée « concentration micellaire critique » (CMC). Dans ce cas, les molécules amphiphiles s'auto-assemblent pour regrouper leurs parties hydrophobes et exposer en surface uniquement leurs domaines hydrophiles (Figure 8). Les micelles sont donc des systèmes supramoléculaires en équilibre avec les molécules amphiphiles en solution.

Différents types de micelles ont ainsi été obtenues en fonction des surfactants utilisés. On peut ainsi citer les micelles à base de phospholipides ou de surfactants composé de polyéthylène glycol, mais ce sont celles utilisant des copolymères à blocs qui concentrent la plus grande partie de la recherche actuelle.[45][46][47] Les micelles peuvent encapsuler des molécules hydrophobes dans leur cœur et être utilisées pour administrer des médicaments peu solubles dans les solvants aqueux.

II.1.2.2. Les liposomes

Au contraire de la micelle, les liposomes sont des vésicules constituées d'une ou plusieurs doubles couches concentriques de lipides amphiphiles encapsulant un réservoir aqueux (Figure 8). Les lipides les plus couramment utilisés sont les phospholipides dont la tête polaire possède une charge négative. La taille des liposomes varie entre 30 nm et plusieurs micromètres.

Ces particules sont depuis de nombreuses années utilisées comme outils pour la biologie, la biochimie et la médecine en tant que transporteurs de principes actifs ou agents d'imagerie.[48] Leur caractère non toxique et biocompatible fait de ces nanoparticules des systèmes intéressants pour les applications *in vivo*. A la différence des micelles, les liposomes peuvent encapsuler des molécules hydrophiles en leur cœur. Cependant, les liposomes présentent également quelques limitations : ils ont effectivement montré une

faible capacité d'encapsulation (notamment pour les molécules lipophiles piégées dans la double couche de phospholipides), une stabilité modérée, une production délicate, et un relargage précoce des principes actifs hydrophiles dans le sang du fait de la pression osmotique.[49]

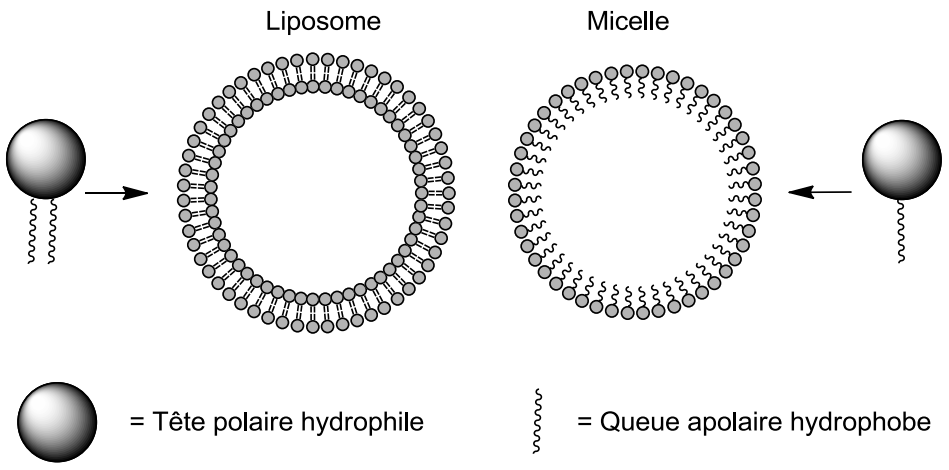


Figure 8:schéma d'auto-assemblage de molécules amphiphiles

Afin de pallier ces inconvénients, d'autres types de liposomes ont été proposés. Nous pouvons citer les niosomes qui sont des ensembles supramoléculaires similaires aux liposomes, à la différence que les molécules constituant la double couche ne sont pas des phospholipides mais des surfactants de synthèse (lipides non ioniques).[50] C'est également le cas des polymersomes, pour lesquels des copolymères bloc (comportant une partie hydrophile et une partie hydrophobe) forment la structure emprisonnant le réservoir aqueux.[51],[52]

II.1.2.3. Les nanoparticules polymériques

Différents polymères ont été utilisés avec succès pour former des nanoparticules, les plus couramment utilisés actuellement étant le poly acide lactique (PLA pour PolyLactic Acid),[53] le poly acide glycolique (PGA pour PolyGlycolide Acid)[54] et leur copolymère, le Poly(Lactide-co-Glycolide) Acid (PLGA).[55] Ces polymères ont l'avantage d'être biocompatibles et biodégradables par l'organisme. Ils sont ainsi utilisés depuis de nombreuses années pour fabriquer des dispositifs médicaux et des implants sous-cutanés.[56] Les nanoparticules polymériques, de part une structure fortement imbriquée des chaines de polymères, offrent une meilleure stabilité que les liposomes, que se soit *in vivo* ou durant le stockage.

Cependant, même si la biocompatibilité des polymères est bonne, ils ne sont pas dénués de toute cytotoxicité une fois structurés sous forme de nanoparticules.[57] De plus, la présence de solvants organiques toxiques résiduels est également problématique. D'autres alternatives ont été proposées pour obtenir des nanoparticules à partir de biopolymères naturels comme des polypeptides, oligonucléotides, ou de polysaccharides permettant d'obtenir directement certaines propriétés biologiques.[44]

D’autres types de structures polymériques alternatives aux polymères linéaires ont été imaginées avec des polymères en peigne ou ramifiés conduisant à des nanogels ou des dendrimères.

Les dendrimères sont des complexes polymériques qui, à partir d’un monomère s'associent selon un processus arborescent autour d'un cœur central plurifonctionnel.[58] La construction arborescente s'effectue par la répétition d'une même séquence de réactions jusqu'à l'obtention à la fin de chaque cycle réactionnel d'une nouvelle génération et d'un nombre croissant de branches identiques. Après quelques générations, le dendrimère prend généralement une forme sphérique, hautement ramifiée et plurifonctionnalisée grâce aux nombreuses fonctions terminales présentes.[59] On obtient généralement des tailles comprises entre 1 et 10 nm. Ces constructions polymériques fortement branchées ont une structure bien contrôlée. Les dendrimères peuvent être obtenus à partir d’acide aminé comme les dendrimères gréffés de lysine.[60] Malheureusement la synthèse des dendrimères reste délicate.

Les nanogels sont des gels constitués de nanoparticules d’hydrogel, elles-mêmes constituées de polymères branchés possédant un corps hydrophile et des bras hydrophobes encapsulant de l’eau entre les mailles du polymère (Figure 9). Ces nanoparticules d’hydrogel se forment par regroupement des parties hydrophobes et contrairement aux nanoparticules polymériques précédemment décrites, leurs chaînes ne sont pas fortement imbriquées les unes dans les autres, ce qui leur confère une flexibilité plus importante. La particule finale, gonflée d’eau, offre ainsi une grande surface spécifique et une importante capacité d’encapsulation.[61]

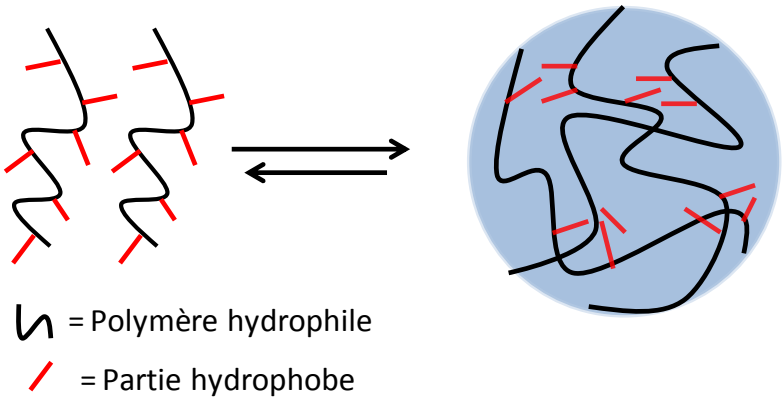


Figure 9: Formation d'une nanoparticule d'hydrogel

II.1.2.4. Les nanoparticules inorganiques

De nombreuses nanoparticules inorganiques ont été développées. Les plus courantes sont les nanoparticules métalliques d’or[62] ou d’argent[63], les nanoparticules magnétiques[64],[65], les nanoparticules de silice[66] et les nano-cristaux semi-conducteurs.[67],[68]

II.1.2.5. Les nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or sont généralement obtenues par réduction d'un précurseur de type $HAuCl_4$.[69] Elles possèdent une bonne biocompatibilité et une faible cytotoxicité grâce au caractère inerte de l'or.[70] De plus, les propriétés intrinsèques de l'or leur confèrent des caractéristiques physiques particulières comme la résonnance plasmonique de surface. La réactivité des thiols vis-à-vis de l'or permet de les fonctionnaliser simplement avec des molécules possédant un groupe sulfhydrile.

II.1.2.6. Les nanoparticules d'argent

Les nanoparticules d'argent peuvent être obtenues par des méthodes physiques ou chimiques. Les méthodes chimiques font intervenir la réduction de l'ion Ag^+ par des molécules comme le citrate de sodium, l'hydrogène ou encore le boro hydrure de sodium.[63] Ces nanoparticules sont utilisées pour leurs propriétés anti bactériennes,[71] catalytiques,[72] optiques[73] ou électrochimiques[74].

II.1.2.7. Les nanoparticules magnétiques

La majorité des nanoparticules magnétiques sont constituées d'oxydes de fer superparamagnétiques comme la maghémite (Fe_2O_3) ou la magnétite (Fe_3O_4). Ce cœur métallique de quelques nanomètres de diamètre peut être encapsulé dans une matrice de silice[75], de polymère ou de polysaccharide (dextran) pour améliorer leur biocompatibilité et faciliter leur fonctionnalisation. Ces particules magnétiques sont désignées par le terme SPIO[76] (SuperParamagnetic Iron Oxide) pour celles dont la taille est comprise entre 50 et 500 nm, et USPIO (Ultra small SuperParamagnetic Iron Oxide) si leur diamètre est inférieur à 50 nm. Il existe également des nanoparticules d'oxydes de fer monocristallins de moins de 3 nm de diamètre (MION ou « Monocristalline Iron Oxyde Nanoparticles ») encapsulées dans une coque de dextran pour aboutir à une taille d'environ 10 nm.

II.1.2.8. Les nanocristaux semi-conducteurs

Parmi les nanoparticules inorganiques largement étudiées, nous pouvons également citer le cas des nanocristaux semi-conducteurs fluorescents, plus connus sous le nom de « Quantum dots » (« boîtes quantiques » en français). Ces objets mesurent entre 2 et 10 nm de diamètre et sont composés d'un cœur cristallin semi-conducteur. Les couples d'éléments semi-conducteurs cadmium/sélénium, cadmium/tellure, indium/arsenic ou indium/phosphore sont les plus couramment utilisés. Ce cœur est généralement recouvert d'une coque de sulfure de zinc afin de passiver la surface tout en stabilisant les propriétés optiques de ces nanoparticules.[77]

II.1.2.9. Les nanoparticules de silice

Une autre grande famille de nanoparticules regroupe les nanoparticules de silice. Leurs morphologies et leurs tailles sont facilement modulables et se déclinent en beaucoup de

morphologies. Elles peuvent être pleines, poreuses comme les MSNs (Mesoporous Silica Nanoparticles).[78] ou encore hybrides comme les MONs pour Mesoporous Organosilica Nanoparticles.[79] Nous pouvons également citer les HMSNs pour Hollow Mesoporous silica Nanoparticles, qui possèdent un cœur creux et une coque en silice poreuse[80], ou encore les HMONs (Hollow Mesoporous Organosilica Nanoparticles) dont la coque poreuse[81] est hybride. L'introduction de groupement organique à la silice permet de modifier les propriétés de solubilité, d'encapsulation, de charge ou de fluorescence.

Le caractère bio compatible[82] de la silice ainsi que la fonctionnalisation de surface simple en font des candidats prometteurs pour des applications en médecine. C'est d'ailleurs ce type de particule qui a été choisi dans la suite de ce travail pour être fonctionnalisé par des peptides hybrides silylés. Nous allons donc détailler particulièrement leur synthèse.

II.2. Synthèse de nanoparticules de silice

II.2.1. Méthode Stöber

Dans les années 50, les travaux de Iler[83] ont permis à la société Du Pont de commercialiser des nanoparticules de silice en solution colloïdale, connues sous le nom commercial de Ludox. Cette solution contient entre 30 à 50% en masse de nanoparticules de silice de diamètre compris entre 2 et 100nm qui sont stabilisées dans une solution aqueuse à pH 9.8.

En s'appuyant sur les travaux de Iler, Stöber et Coll[84] ont été les premiers en 1968 à décrire une voie permettant de contrôler non seulement la morphologie mais aussi la taille des particules de silice. Cette méthode est basée sur l'hydrolyse et la condensation d'un tétraalcoxysilane ($Si(OR')_4$), le plus souvent le TEOS, dans une solution alcoolique en présence d'ammoniaque. Cela permet d'obtenir des nanoparticules mono disperses de taille comprise entre 50 nm et 2µm selon les conditions de synthèse.

Il a été montré que la taille des particules obtenues dépend, entre autre, du type d'alcoxysilane et de l'alcool utilisés lors de la synthèse.[15] Ainsi, la taille des particules croit avec la longueur de la chaine alkyle (R') de l'alcoxysilane mais également avec la taille de la chaine carbonée de l'alcool utilisée comme solvant lors de la synthèse. De même, la température à laquelle est conduite la réaction est un paramètre important pour le contrôle de la taille. La taille des particules diminue lorsque la température de réaction augmente. Depuis ces premiers travaux, de nombreuses équipes se sont attachées à comprendre le mécanisme de formation des particules de silice de manière à en améliorer la synthèse afin d'obtenir des tailles mieux définies et une distribution plus fine.[85] Certaines équipes ont ainsi étudié l'influence de la concentration, de la température ou du temps de réaction sur la taille et la polydispersité des particules synthétisées par sol-gel.[86] Il est néanmoins important de noter que le mécanisme de condensation reste complexe, tant la nature et le degré d'influence de tous les paramètres contrôlant chaque étape restent inconnus.

Une autre technique, l'utilisation de microémulsions, a permis également de contrôler de manière encore plus précise la fabrication de ces nanoparticules.

II.2.2. Synthèse de nanoparticules de silice par microémulsion

La préparation de nanoparticules de silice par microémulsion n'a été décrite que dans les années 1990 par Osseo-Asare et Arrigada.[87] Il s'agit de l'hydrolyse et la condensation du TEOS dans un système micellaire inverse en présence d'ammoniaque. Les micelles inverses sont des gouttelettes d'eau dans l'huile stabilisées par un tensioactif (Figure 10). Cette méthode s'est montrée particulièrement intéressante pour l'élaboration de nanoparticules de taille et de forme contrôlées car elle offre la possibilité d'agir sur deux paramètres simultanément: la formulation de la microémulsion et les quantités de réactifs. Cette voie de synthèse permet de combiner faible taille et monodispersité contrairement à la méthode Stöber classique.

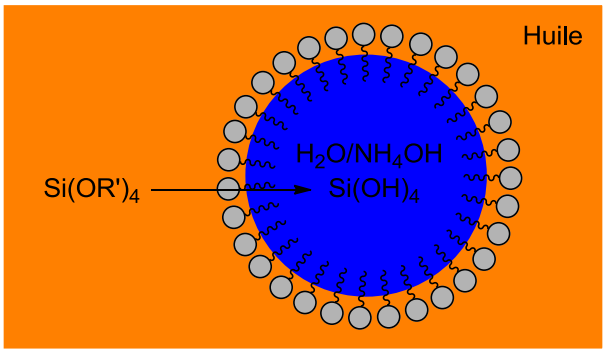


Figure 10: Vue transversale d'une micelle inverse

Le tensioactif se comporte comme un écran qui isole les nano-gouttelettes d'eau les unes des autres et empêche ainsi leur coalescence (la « fusion » entre deux gouttelettes). Ainsi dans la phase micellaire inverse, les nano-gouttelettes d'eau sont bien distinctes, leur dimension varie principalement selon la quantité d'eau dispersée dans la phase organique et peut être soigneusement contrôlée en ajustant le rapport entre la concentration molaire d'eau et celle du tensioactif.[88]

Les molécules de TEOS (hydrophobes) viennent d'abord s'hydrolyser à l'interface huile/eau des micelles inverses.[89] Les fonctions silanols ainsi formées ($(RO)_{4-n}Si(OH)_n$) deviennent alors plus hydrophiles et pénètrent dans la phase aqueuse dans laquelle elles amorcent, selon leur degré d'hydrolyse (n), l'une des deux réactions de condensation (alcoxolation ou oxolation). Il se forme à l'intérieur des micelles des nucléides, ou germes, qui vont ensuite croître pour donner au final les nanoparticules de silice. Nous allons maintenant détailler une des synthèses par micro émulsion les plus développées que nous avons utilisé dans ce travail de thèse.

II.2.3. Système micellaire inverse H_2O/Triton X-100/hexanol/cyclohexane

Les nanoparticules présentées dans ce manuscrit ont été élaborées en utilisant le système micellaire inverse H_2O/NH_4OH/Triton X-100/hexanol/cyclohexane.

Le Triton X-100 est un tensioactif non ionique : un éther de poly(éthylène glycol) et d'octylphénol (Figure 11).

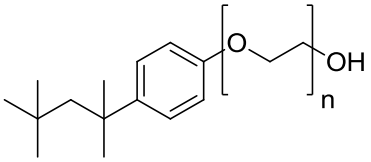


Figure 11: Structure chimique du Triton X-100 (n=9-10)

L'hexanol est un « co-tensioactif ». En solution micellaire, les co-tensioactifs, entraînent l'abaissement de la tension interfaciale ainsi que de la concentration micellaire critique.[90] Peu solubles dans l'eau et l'huile, ils s'incorporent dans la structure des micelles et ont des effets importants sur la stabilité et la perméabilité des agrégats formés. Leur présence conduit à l'augmentation du nombre de micelles et à une meilleure pénétration des additifs entre les chaînes aliphatiques du tensioactif.

Toutes les caractéristiques du mélange H_2O/NH_4OH/TritonX-100/hexanol/cyclohexane permettent d'obtenir un système micellaire inverse efficace et stable pour réaliser la réaction d'hydrolyse condensation de précurseur alkoxysilane.

II.2.4. Synthèse de nanoparticules poreuses

Les premières formes de silices poreuses découvertes durant la première moitié du 20^{éme} siècle sont les zéolites. Ils s'agit de cristaux d'aluminosilicate de composition $[(AlO_2)_x(SiO_2)_y]^{(x+y)-}$ $M^{(x+y)+}$, mH_2O présentant une structure poreuse et dont les applications sont maintenant très variées : tamis moléculaire, catalyseurs, matériaux, etc.

Dans les années 1990, une forme de nanoparticules composées uniquement de silice présentant une porosité plus fine a été découverte par l'équipe de Yanagisawa et a suscité l'intérêt d'un grand nombre de chercheurs.[91] Cet intérêt se justifie par les propriétés particulières ces particules : un arrangement régulier de canaux, une taille de pores modulable de 2 à 30 nm ainsi qu'une surface spécifique incroyablement élevée, parfois supérieure à 1000 m^2/g.

En 1991 une équipe de recherche de la société Mobil Oil dépose un brevet sur des solides mésoporeux organisés, obtenus en introduisant dans un milieu de synthèse de précurseur de zéolites des agents tensioactif de type tetraalkylammonium. Ces molécules organisées en micelles jouent le rôle d'agent structurant. Dès lors, une nouvelle famille de silicates et

aluminosilicates, appelé M41S, est découverte. Elle regroupe notamment les phases MCM-41 de structure hexagonale, MCM-48 de structure cubique et MCM-50 de structure lamellaire (MCM : Mobil Composition of Matter).

Quelques années plus tard, une nouvelle famille de matériaux mésoporeux organisés appelée famille des SBA-n (Santa Barbara Amorphous) est mise au point à partir de tensioactifs anioniques, cationiques ou non ioniques.[8] De nombreuses autres structures ont été découvertes au cours des dernières années, l'ensemble de ces solides mésostructurés est présenté par Zhao.[92]

Nous détaillerons plus particulièrement la synthèse des particules MCM-41 que nous avons utilisées et qui sont présentées au chapitre III. Leur synthèse se passe en milieu aqueux basique en présence de TEOS en utilisant comme tensioactif cationique le bromure de cetyltrimethylamonium (CTAB) qui joue aussi le rôle d'agent structurant. Les deux mécanismes qui sont à ce jour proposés pour la formation de ces objets dépendent principalement de la concentration en tensio-actif.

Quand la concentration en CTAB de la solution est élevée (supérieure à la CMC), celui ci s'auto-assemble sous forme de micelles tubulaires. Les micelles, dont la partie apolaire se trouve au centre et la tête polaire (ammonium) à l'extérieur, forment une phase cristal liquide. Les précurseurs de silice chargés négativement se rapprochent ensuite de la micelle par interactions électrostatiques et viennent se condenser à la surface du surfactant pour former une paroi de silice.

Si la concentration est plus faible que la CMC alors un mécanisme coopératif entre le TEOS et le CTAB permet la formation de phase cristal-liquide en même temps que la polycondensation du TEOS comme le montre la Figure 12.

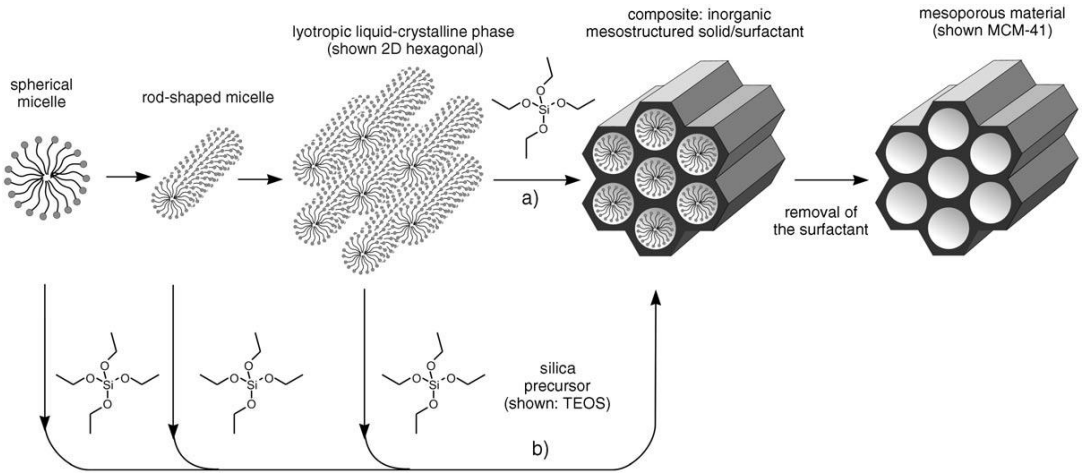


Figure 12: Processus de formation des MCM-41.a) par un mécanisme dit de « true liquid-crystal template », b) par un mécanisme dit de « cooperative liquid-crystal template »[93]

La taille et la morphologie des particules obtenues peuvent être contrôlées en jouant sur le ratio TEOS/surfactant, par ajout de co-solvant etc. Une fois le processus de condensation

terminé, le surfactant doit être retiré pour libérer la porosité. Les nanoparticules peuvent être calcinées à 500°C pour décomposer la matière organique ou alors lavées, généralement par des solutions alcooliques.

De nos jours, les applications des nanoparticules de silice sont très nombreuses. Dans le domaine de la médecine, les nanoparticules font notamment l'objet d'études intensives. De petite taille, elles peuvent interagir à l'échelle de la cellule, et permettent d'élaborer des stratégies pour soigner plus efficacement certaines maladies. Pour conférer des propriétés d'intérêt biologiques aux particules, des modifications chimiques sont nécessaires. De très nombreux travaux proposent des voies chimiques de fonctionnalisation. Le paragraphe suivant présente les principales avancées.

II.3. Méthodes de fonctionnalisation de nanoparticules de silice

Il est possible de modifier des nanoparticules de silice par des méthodes non covalentes comme la physisorption. Il s'agit d'adsorber par interactions électrostatiques une molécule à la surface de la nanoparticule. Cette méthode présente des nombreux inconvénients : la labilité de la molécule adsorbée, l'absence de contrôle de l'orientation de la molécule (ce qui signifie qu'elle peut avoir partiellement perdu son activité), et le manque de contrôle de son taux d'adsorption. Cette technique ne sera pas détaillée.

Il est également possible de modifier des nanoparticules de silice par des méthodes reposant sur un greffage covalent appelé « post fonctionnalisation ». Celles-ci utilisent habituellement une molécule silylée de type R-SiX_3 (X= OR', Cl et R= groupement organique). En général la partie organique R de cet hybride se résume à un groupement fonctionnel réactif (amine, acide, thiol, etc) qui servira de point d'ancrage à une molécule plus complexe. Le groupe fonctionnel introduit pourra réagir (préférentiellement de manière chimiosélective) avec une des fonctions de la molécule à greffer (biomolécule, agent d'imagerie, médicament…) (Figure 13).

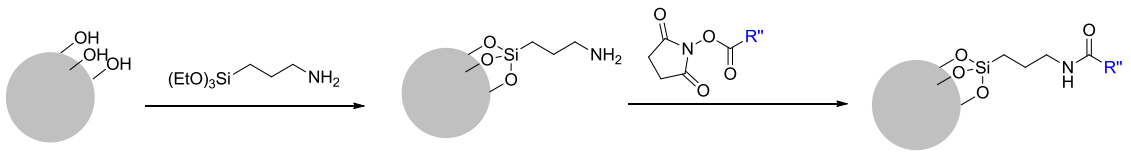


Figure 13: Greffage d'une molécule R'' par une réaction de bio-conjugaison sur une nanoparticule de silice préalablement fonctionnalisée par L'APTES par post fonctionnalisation

Les réactions classiques de bio conjugaison comme amine/ester de N-hydroxysuccinimide (NHS),[94] amine/isocyanate ou isothiocyanate, thiol/maleiimide, thiol/éne, réaction de ligation via la formation d'oxime,[95] cycloaddition de huisgen entre un azoture et un alcyne par catalyse au cuivre,[96] formation de disulfure[97], ont été utilisées pour décorer des nanoparticules de silice par des biomolécules. Il est également possible d'incorporer le

groupement fonctionnel qui servira à la bioconjugaison directement pendant la synthèse du matériau. On parle alors de « synthèse directe » ou méthode de co-condensation (Figure 14).

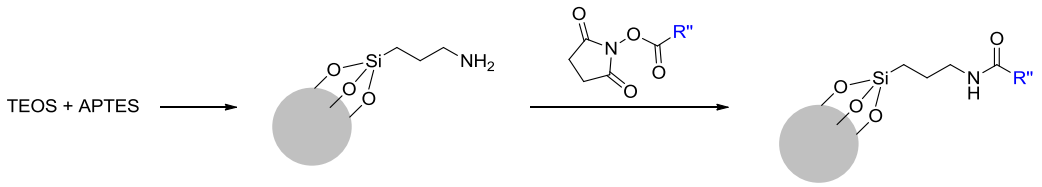


Figure 14: Greffage d'une biomolécule R'' par une réaction de bio-conjugaison sur une nanoparticule préalablement fonctionnalisée par de l'APTES par synthèse directe

Une autre approche consiste à obtenir le bloc hybride en une première étape puis de venir le greffer sur les nanoparticules (Figure 15). Cette méthode n'a cependant pas été utilisée pour introduire des molécules complexes comme des biomolécules. C'est par cette méthode que nous essayerons de greffer des biomolécules sur des nanoparticules dans le chapitre II. Contrairement à la précédente, cette méthode offre un plus grand choix de possibilités. En effet, l'hybride peut être introduit par synthèse directe avec le TEOS, ou alternativement, il peut être ajouté par « post fonctionnalisation ». La méthode de greffage utilisée aura un impact très important sur la localisation de la molécule au sein de la nanoparticule.

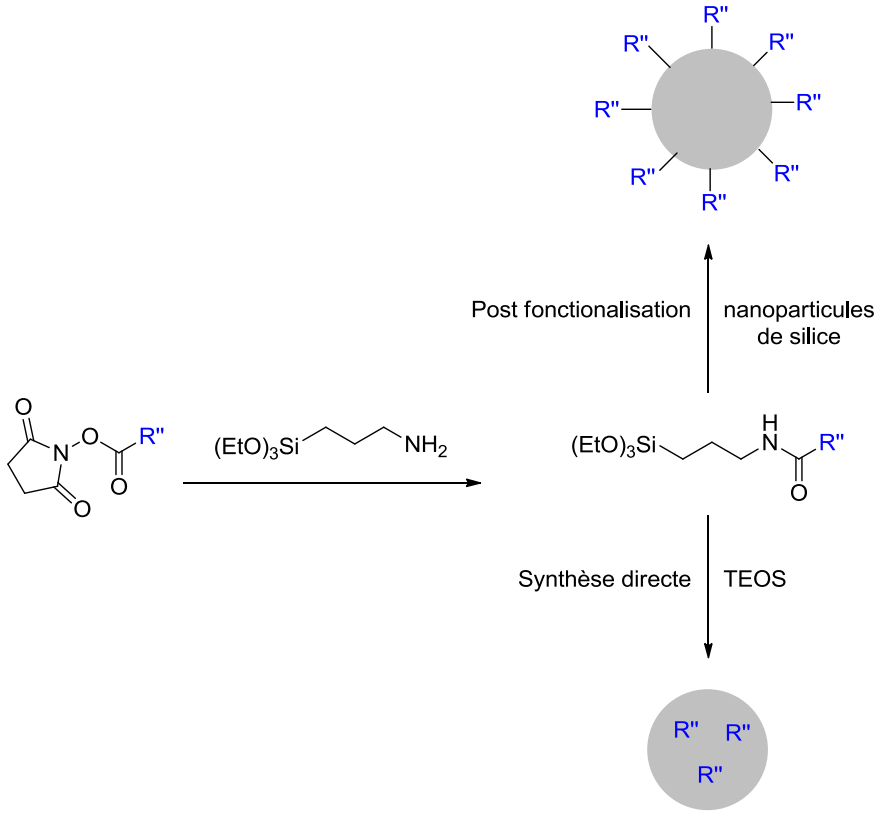


Figure 15: Utilisation d'une molécule silylée pour la synthèse de nanoparticules de silice par post-fonctionnalisation ou synthèse directe

II.3.1. Synthèse directe

La synthèse directe permet de greffer des groupements fonctionnels à l'intérieur de la nanoparticule. De manière générale, la synthèse directe permet une répartition homogène de la molécule organique dans la matrice de silice et permet également de laisser la surface « libre » pour pouvoir la modifier ultérieurement. Elle est particulièrement judicieuse pour l'incorporation d'un agent de contraste ou un fluorophore qui n'a pas besoin d'être présent à la surface de la particule. Le groupement est introduit dans le milieu réactionnel en même temps que le TEOS lors de la synthèse des nanoparticules (Stöber, micro-émulsion…). Cependant l'hybride peut être également rajouté quelques minutes après l'ajout de TEOS pour favoriser sa localisation en surface. Si le rapport molaire TEOS/hybride est élevé (> 99/1), la proportion de molécule organique ne perturbera pas ou peu la formation des particules. En revanche, si le rapport TEOS/hybride est plus faible. les nanoparticules posséderont une phase organique non négligeable, la structure et les propriétés physiques des particules seront très différentes. Il est possible d'utiliser des hybrides bi-fonctionnels en mélange avec très peu de TEOS (ou sans TEOS), jouant ici le rôle de « colle ».[98] A l'extrême, certaines synthèses utilisent uniquement des hybrides mono-fonctionnels pour obtenir des nanoparticules hybrides.[99]

II.3.2. Post Fonctionnalisation

Le greffage par post fonctionnalisation permet de greffer des hybrides silylés en surface des nanoparticules. Ce sont les groupements silanols présents à la surface de la nanoparticule qui vont réagir par substitution nucléophile sur l'organoalkoxysilane ou l'organotrichlorosilane pour former des liaisons siloxanes (Figure 16). Si de l'eau est présente dans le milieu, la fonction silane de l'hybride peut s'hydrolyser puis polycondenser sur un autre monomère et former des agrégats. Pour cette raison, nous utiliserons des solvants anhydres pour limiter les hydrolyses et les auto-condensations.

Les greffages par post fonctionnalisation s'effectuent en général dans le toluène[100],[101],[102] à reflux, ce qui conduit à des taux de greffage assez élevés. Cependant beaucoup d'hybrides ne sont pas solubles dans le toluène, et d'autres solvants comme l'éthanol[103], le méthanol, l'acétonitrile[104], en présence ou non d'un catalyseur acide (AcOH) ou basique (TEA), ont également été utilisés.

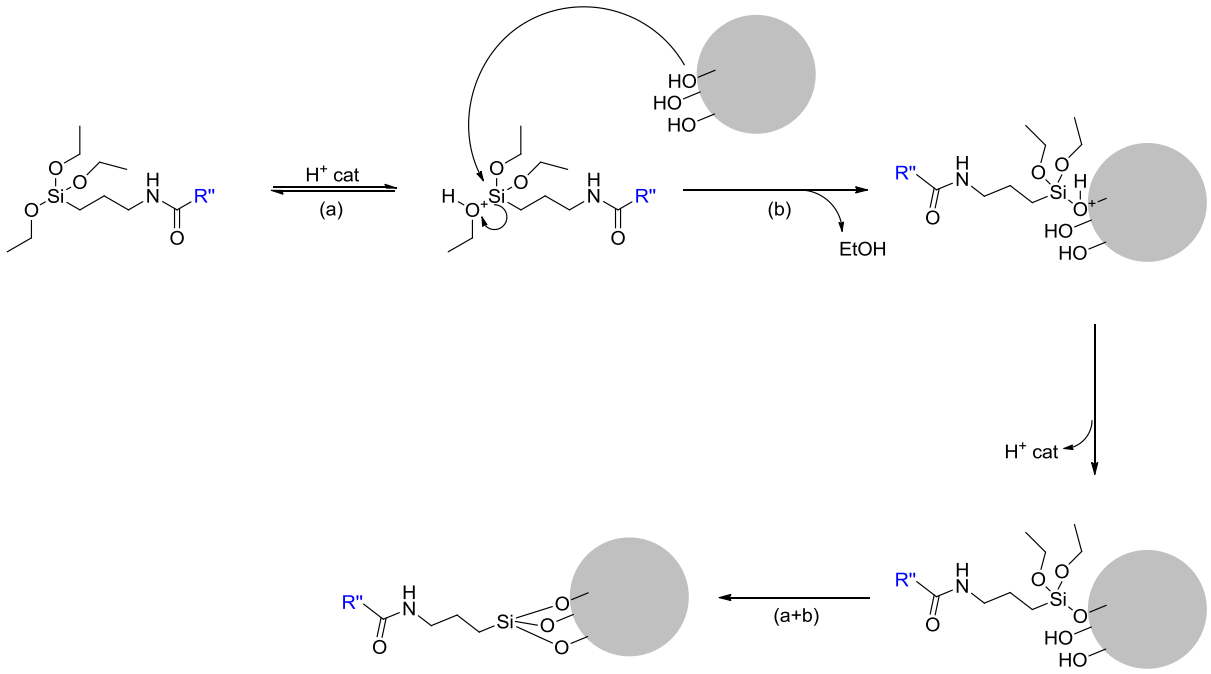


Figure 16: Schéma réactionnel de post fonctionnalisation d'une nanoparticule de silice par un hybride silylé

Il convient de souligner que cette méthode pourrait permettre de greffer plusieurs hybrides silylés en une seule étape. En effet, les groupements trialkoxysilanes ne pouvant pas réagir l'un sur l'autre en conditions anhydres, il semble envisageable de greffer plusieurs organosilanes sur une nanoparticule en une seule étape. A ce jour, aucune publication ne traite la multi fonctionnalisation en une étape. Cette approche constitue une des principales voies de recherche de ce travail.

II.4. Application des nanoparticules au traitement du cancer

Afin de comprendre l'intérêt des nanoparticules pour le trainement et le diagnostic du cancer, il est important de comprendre quelles caractéristiques des cellules cancéreuses vont être mises à profit pour améliorer les traitements ou le diagnostic. En effet, plus le diagnostic est précoce, moins les traitements sont lourds et meilleures sont les chances de guérison. Nous diminuerons ainsi les séquelles liées à certains traitements.

II.4.1. Cancer, considérations générales

Les cancers naissent de cellules au départ saines et fonctionnelles qui deviennent anormales suite à l'accumulation d'altérations dans leur patrimoine génétique. Ces altérations (ou mutations) vont conduire au dérèglement, voire à l'inactivation des systèmes qui permettent en temps normal le contrôle de la division cellulaire.[105] La cellule prolifère de manière anarchique. L'accumulation d'autres anomalies conduira ensuite cette cellule à perdre sa fonction initiale et à acquérir des propriétés lui permettant de donner naissance à une

tumeur maligne, capable de se développer au détriment des cellules saines environnantes. A un stade plus avancé, les cellules cancéreuses vont pouvoir se détacher du tissu hôte pour migrer via les vaisseaux sanguins et contaminer tout l'organisme en formant des métastases. Si toutes les cellules saines de l'organisme présentent à leur surface des récepteurs permettant de communiquer et d'interagir avec leur environnement, certains récepteurs présents dans les cellules cancéreuses sont souvent surexprimés ou différents des cellules saines. En effet, une des particularités d'une cellule cancéreuse est qu'elle présente un très grand nombre de certains récepteurs à sa surface, souvent liés à la réception de signaux biologiques de prolifération et de mobilité. La nature des récepteurs surexprimés dépendent des lignées cellulaires tumorales. Sans être exhaustif, nous pouvons établir une liste des récepteurs les plus couramment étudiés sur les tumeurs :

- Les intégrines[106], une classe de glycoprotéines composée de deux sous unités α et β dimérisées, impliquées dans l'adhésion et la reconnaissance cellulaire.
- Les récepteurs aux facteurs de croissance comme le VEGFR (récepteur au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire), ou l'EGFR (récepteur au facteur de croissance épidermique) impliqués dans l'angiogenèse.[107]
- La Neuropiline-1 (NRP-1), une protéine transmembranaire impliquée dans divers aspects du développement tumoral. Elle est également un co-recepteur du VEGFR.[108]
- Les récepteurs des folates (FR) qui permettent l'internalisation de l'acide folique indispensable pour la synthèse de l'ADN.[109]
- Les récepteurs aux facteurs de croissance épidermiques HER-2.
- Certaines lectines comme le récepteur du mannose-6-phosphate et les récepteurs du mannose.

La suractivité des cellules conduit également à la sur activation de certaines enzymes comme les MMPs pour « matrix metallo protéases » jouant un rôle dans la modification de la matrice extra cellulaire, mais également dans la formation rapide de nouveaux vaisseaux sanguins, phénomène appelé l'angiogenèse.

Les caractéristiques différentes des cellules cancéreuses peuvent être mises à profit pour accumuler un médicament ou des nanoparticules au voisinage de la tumeur.

II.4.2. Ciblage

Il est possible d'utiliser des caractéristiques anatomiques, physiologiques ou pharmacologiques pour favoriser l'accumulation (passive ou active) d'une molécule dans la zone tumorale.

II.4.2.1. Ciblage passif

La forte activité des cellules cancéreuses nécessite un apport en nutriment important, possible par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Ce phénomène d'angiogenèse est rapide dans le cas de cellules cancéreuses et conduit à un endothélium vasculaire irrégulier présentant de fortes irrégularités appelées fenestrations. Ces fenestrations facilitent la diffusion de macromolécule depuis la circulation sanguine jusque dans cette zone. Cette accumulation est renforcée par un drainage lymphatique plus faible que d'ordinaire qui va limiter l'élimination des macromolécules qui s'accumulent. Cet effet est connu sous le nom d'EPR pour « enhanced permeability and retention ». Il peut être mit à profit pour accumuler dans cette zone de manière passive des nanoparticules.[110] Des recherches sur les nanoparticules de silice ont montré que l'effet d'accumulation est plus important pour des nanoparticules d'environ 50 nm.[111]

La société Nanotech, par exemple, développe des nanoparticules de silice d'environ 5 nm greffées avec un agent de contraste la DOTA (Gd) pour le diagnostic. Cette nanoparticule s'accumule majoritairement dans la zone tumorale uniquement par effet EPR.[112]

Il est également possible d'accumuler une molécule par un ciblage actif.

II.4.2.2. Ciblage actif

Nous avons vu que certains récepteurs étaient surexprimés à la surface des cellules cancéreuses. Pour favoriser la liaison d'une molécule d'intérêt ou d'un nano-objet avec les cellules cancéreuses, il est possible de le coupler à un ligand spécifique des récepteurs surexprimés qui jouera le rôle d'élément de ciblage « actif ». Les ligands peuvent être des anticorps monoclonaux,[113] des peptides,[114] des saccharides, des oligonucléotides[115] ou d'autres molécules comme l'acide folique.[109]

Cette stratégie est déjà utilisée pour vectoriser des fluorophores. Un exemple particulièrement efficace de construction de ce type est l'AngioStamp™ de la société Fluoptics qui combine un fluorophore (de la famille des cyanines) avec une plateforme peptidique de type RAFT permettant une multi-présentation de ligands des intégrines. De la même manière, il est possible de fonctionnaliser des nanoparticules par des ligands pour favoriser leur accumulation sur les cellules cancéreuses. C'est cette approche que nous avons développé par la suite en greffant plusieurs ligands peptidiques sur des nanoparticules de silice pour évaluer le ciblage sur différentes lignées cellulaires.

II.4.3. Intérêt des nanoparticules pour le traitement du cancer

La faible taille des nanoparticules leur confère des propriétés intéressantes : elle offre en effet une importante surface spécifique et une grande stabilité. Cette taille particulière leur permet de circuler dans le sang, d'interagir à l'échelle de la cellule et d'éviter certains pièges anatomiques d'élimination (filtration glomérulaire). Mais c'est surtout notre capacité à les modifier pour améliorer leurs capacités à esquiver les défenses immunitaires, à cibler une population de cellules particulières, à encapsuler, protéger et libérer un principe actif qui font d'elles des vecteurs prometteurs. En effet, les nanoparticules peuvent être utilisées comme plateforme de présentation sur lesquelles plusieurs molécules peuvent être immobilisées, comme des agents thérapeutiques, des agents de contraste et des agents de ciblage.

Amener des concentrations suffisantes en principes actifs au niveau des cellules cancéreuses en évitant d'affecter les cellules saines est un défi délicat à relever. La toxicité des molécules anticancéreuses occasionne des effets indésirables conséquents qui peuvent entraîner l'abandon du traitement en dépit de son efficacité. Véhiculer les molécules anticancéreuses par des nanoparticules permet d'augmenter leur sélectivité pour les tumeurs, et ainsi de réduire les sévères effets secondaires accompagnant les chimiothérapies.

En outre, l'encapsulation d'un principe actif permet de résoudre certains problèmes de solubilité et de dégradation (métabolisation). En effet, de nombreux principes actifs présentent des caractéristiques physico-chimiques (hydrophilie, poids moléculaires, etc.) peu favorables au passage des nombreuses barrières biologiques qui séparent le site d'administration du médicament de son site d'action. Ces principes actifs sont donc mal absorbés (souvent très rapidement dégradés, métabolisés, ou éliminés) et donc incapables d'atteindre leur cible au niveau tissulaire ou cellulaire. On estime que 95 % des nouveaux principes actifs développés ont des propriétés pharmacocinétiques médiocres.[116]

Pour toutes ces raisons, les nanoparticules sont utilisées pour véhiculer les agents thérapeutiques (source radioactive, matériaux provoquant l'hyperthermie, photosensibilisateur, composé cytotoxique) dans la zone ciblée. En effet, il est toujours préférable que ces agents thérapeutiques s'accumulent de façon préférentielle au sein des tissus à traiter afin de minimiser leur impact sur les cellules saines.

II.4.4. Nanoparticule et traitement

Les nanoparticules peuvent être utilisées dans de nombreux types de traitements comme en radiothérapie, en thermothérapie, en thérapie photodynamique ou en chimiothérapie. Une grande partie des nanoparticules inorganiques possèdent des propriétés thérapeutiques ou diagnostiques intrinsèques. En revanche, les particules organiques sont dépourvues de telles propriétés. Nous allons détailler les différents traitements que permettent les nanoparticules.

- La radiothérapie consiste à détruire des cellules placées à proximité d'une source émettant des rayonnements radioactifs. L'intérêt des nanoparticules est alors de véhiculer la source radioactive directement au niveau de la zone à traiter.[117] La société Nanobiotix développe des nanoparticules d'oxyde d'hafnium pour la radiothérapie.
- La thermothérapie ou hyperthermie a la même finalité, mais utilise une élévation locale de la température pour y parvenir. Il s'agit alors de provoquer par un champ extérieur (champ magnétique ou irradiation laser) un échauffement local grâce à des nanoparticules situées dans la zone à traiter. L'énergie dissipée doit être suffisante pour élever la température de quelques degrés (autour de 45°C) induisant la mort des cellules.[65],[118] Les nanoparticules magnétiques sont connues pour cet effet.[119]
- La thérapie photodynamique[120] se base sur des molécules appelées photosensibilisateurs qui, suite à l'absorption d'un rayonnement lumineux, produisent de l'oxygène singulet ou des radicaux libres qui conduisent à la mort des cellules environnantes. Une fois de plus, la nanoparticule joue le rôle de transporteur pour le photosensibilisateur.[121],[122]
- La chimiothérapie est l'utilisation de molécules cytotoxiques pour les cellules tumorales. L'intérêt de la nanoparticule est de véhiculer cette molécule au niveau de la zone à traiter et assurer sa libération.

II.4.5. Nanoparticules et imagerie médicale

Nous avons déjà insisté sur l'importance d'un diagnostic précoce pour améliorer la prise en charge et augmenter les chances de succès d'un traitement. Dans ce contexte, la médecine moderne a régulièrement recours à des techniques d'imagerie médicale comme outil de diagnostic.

Il semble judicieux de pouvoir combiner les avantages des nanoparticules en matière de ciblage avec une technique d'imagerie pour améliorer encore l'acuité des diagnostics mais également de proposer des approches théragnostiques où la particule jouerait à la fois le rôle d'agent d'imagerie et de principe actif anticancéreux.

Dans le chapitre suivant, nous allons décrire les principales techniques d'imagerie utilisées en oncologie pour comprendre lesquelles peuvent être associées à l'utilisation de nanoparticules.

II.4.5.1. Les différentes techniques d'imagerie

L'imagerie médicale désigne un ensemble de techniques non invasives permettant d'obtenir des informations sur des aspects internes de l'organisme. Ces différentes techniques sont régulièrement utilisées afin d'établir un diagnostic précis, de préparer une opération chirurgicale ou de contrôler les effets d'un traitement ou d'un acte chirurgical. Elles sont également de plus en plus sollicitées au niveau de la recherche médicale dans le but d'approfondir nos connaissances de l'anatomie et de la physiologie des organismes vivants, et plus particulièrement de l'être humain.

On peut, en fonction des informations recherchées, classer les techniques d'imagerie en deux catégories :

- L'imagerie structurelle, qui renseigne sur l'anatomie des organes (volume, position, présence éventuelle de lésions…)
- L'imagerie fonctionnelle, qui permet d'obtenir des indications sur le fonctionnement de l'organisme (physiologie, métabolisme…)

Les techniques d'imagerie médicale et biomédicale sont dites non invasives et non traumatisantes. En effet, en dehors de l'injection de traceurs pour certaines modalités, aucun prélèvement (biopsie) ni aucune atteinte des barrières de l'organisme n'est nécessaire à leur mise en œuvre.

Les différentes modalités d'imagerie biomédicale sont toutes basées sur l'utilisation de rayonnements électromagnétiques pour obtenir les informations désirées. Ces rayonnements sont répartis sur l'ensemble du spectre électromagnétique : des rayons gamma dans le cas de l'imagerie nucléaire pour les rayonnements les plus énergétiques, aux ultrasons lors des échographies, en passant par les rayons X, les ondes radio dans le cas des IRM (en complément d'un champ magnétique constant), et enfin les rayonnements infrarouges dans le cas de l'imagerie de fluorescence *in vivo* (Figure 17).

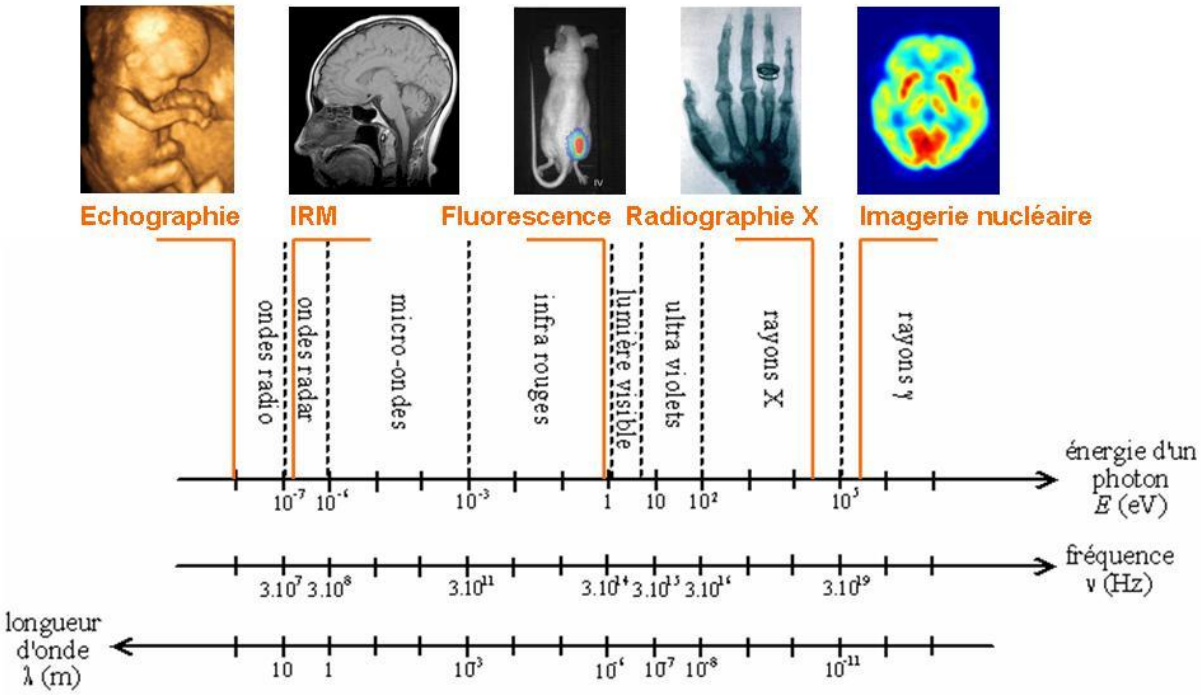


Figure 17: Représentation des différentes modalités d'imagerie en fonction des ondes électromagnétiques qu'elles utilisent

Si toutes les techniques citées ci-dessus permettent d'obtenir des images *in vivo*, elles sont souvent lourdes et onéreuses, et ne sont pas toutes adéquates pour effectuer de l'imagerie moléculaire.

Dans la suite de ce manuscrit nous introduirons un fluorophore dans les nanoparticules pour les détecter. Avant de présenter l'imagerie de fluorescence, nous allons rappeler l'intérêt de l'imagerie moléculaire.

II.4.5.2. **Imagerie moléculaire**

L'imagerie moléculaire est un nouveau domaine de recherche biomédical qui peut être défini comme la représentation visuelle, la caractérisation et la quantification de processus ou interactions biologiques à l'échelle cellulaire et également le suivi de processus moléculaires au sein d'organismes vivants de manière non invasive.[123],[124]

L'imagerie moléculaire se base sur l'utilisation d'agents de contraste ou traceurs. Chaque traceur est destiné à mettre en évidence un processus biologique ou une interaction donnée. Ils peuvent être classés en deux catégories : les traceurs ciblants et les traceurs activables (Figure 18). Les premiers vont se fixer préférentiellement au niveau de cibles biologiques via l'utilisation d'agent de ciblage, alors que les seconds ne sont détectables qu'après avoir « réagi » avec la cible (réaction enzymatique, etc.), ce qui permet de réduire le bruit de fond et améliorer le contraste.

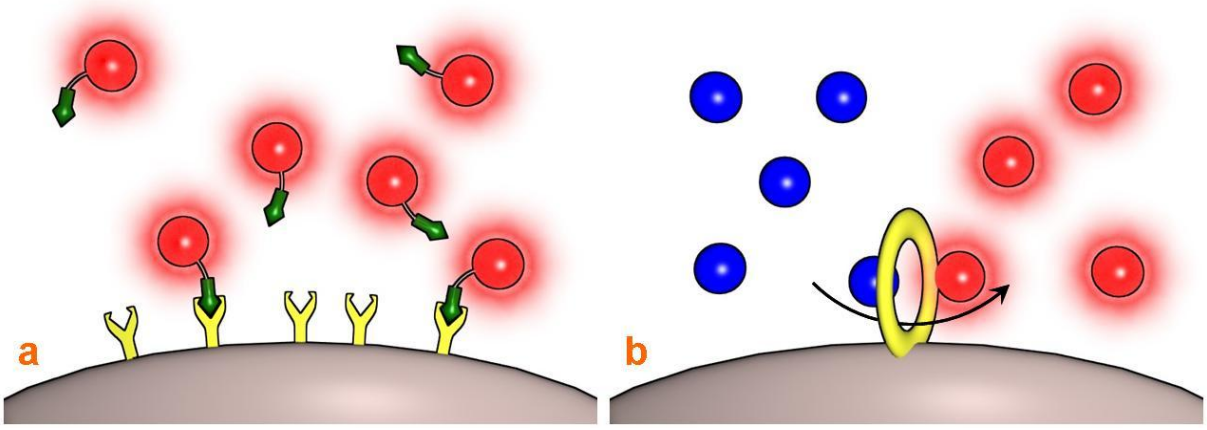


Figure 18 : Illustration des différents principes de traceurs. a) Traceur ciblant b) Traceur activable

L'imagerie moléculaire permet par exemple de détecter de manière précoce la présence de certains marqueurs tumoraux dans un organisme vivant, alors que la tumeur est indétectable avec les modalités d'imagerie structurelles classiques et ce, sans réaliser de prélèvement.

II.4.5.3. Fluorescence

Si la fluorescence est une technique fortement répandue en recherche, notamment à l'échelle moléculaire (ADN ou protéine) ou cellulaire (cytométrie en flux ou coloration histologique), elle est, malgré ses atouts, encore peu employée pour réaliser de l'imagerie *in vivo* chez l'homme.

L'imagerie de fluorescence est une méthode très sensible mais qui a l'inconvénient d'avoir une faible résolution spatiale et une profondeur de détection limitée.[125] Il s'agit malgré tout d'une des méthodes les plus rapides et les moins coûteuses. Elle constitue ainsi une méthode complémentaire de l'IRM ou de la médecine nucléaire.[126]

La section suivante rappelle le principe de la fluorescence, les avantages et les inconvénients liés à son utilisation en imagerie *in vivo*, et présentera également un dispositif d'imagerie de fluorescence *in vitro* à savoir la cytométrie en flux qui est utilisée par la suite.

II.4.5.3.1. Principe de la fluorescence

La fluorescence correspond à l'émission de lumière par un fluorophore depuis un état électronique excité.

Le fluorophore absorbe de l'énergie lumineuse apportée par un photon et permet de peupler ces états excités. Le retour à l'état fondamental a lieu par émission d'un photon, ce qui correspond à la fluorescence, ou par désexcitation non radiative (principalement par dégagement de chaleur lors des collisions avec les molécules environnantes).

Nous pouvons noter que le retour à l'état fondamental par émission d'un photon est concurrencé par d'autres phénomènes comme le transfert d'énergie vers un autre fluorophore ou vers un inhibiteur de fluorescence. Ces processus concurrents font que le nombre de photons émis est inférieur aux nombre de photons absorbés.

Les longueurs d'onde étant inversement proportionnelles à l'énergie du photon, la longueur d'onde d'émission est donc décalée vers le rouge (vers les plus grandes longueurs d'ondes) par rapport à la longueur d'onde d'excitation. La différence entre la longueur d'onde où l'absorption est maximale et celle où l'émission de fluorescence est la plus intense est appelée « déplacement de Stokes ».

Il est donc possible de suivre des traceurs fluorescents en observant leur émission de fluorescence après les avoir excités par une source lumineuse. Cependant, pour utiliser le plein potentiel de la fluorescence pour l'imagerie in vivo, il faut essayer de s'affranchir des limitations optiques inhérentes aux tissus organiques.

II.4.5.3.2. Limitations optiques in vivo

L'utilisation de fluorophores pour des expérimentations *in vivo* engendre des contraintes supplémentaires par rapport à une utilisation *in vitro* du fait de la présence de tissus organiques sur le trajet des rayonnements lumineux d'excitation et de fluorescence. Les principaux problèmes rencontrés sont les suivants :

- La diffusion du rayonnement lumineux (d'excitation et d'émission) lors de la traversée des tissus entraîne une importante perte d'intensité ainsi qu'une perte d'information, ce qui rend plus difficile la localisation exacte du fluorophore dans l'organisme.
- L'absorption par les tissus de la lumière d'excitation et de celle émise par le fluorophore conduit à une perte d'intensité du signal de fluorescence. Cet effet limite l'imagerie en profondeur.
- Les tissus biologiques émettent naturellement de la fluorescence (hémoglobine, etc.). Ce phénomène dit d'auto-fluorescence est à l'origine d'une diminution importante du contraste de l'image.

Pour limiter ces inconvénients, il est nécessaire d'augmenter la sensibilité de détection et de filtrer le rayonnement d'excitation diffusé. Pour cela, il faut choisir un traceur avec un rendement quantique de fluorescence et un déplacement de Stokes les plus élevés possible mais également avec une longueur d'onde d'absorption adéquate afin d'exciter majoritairement le fluorophore et non les tissus biologiques. Quand au phénomène d'absorption du rayonnement par les tissus, il peut être fortement diminué si l'on utilise des longueurs d'onde d'excitation et d'émission comprises entre 650 et 900 nm.

La Figure 19 représente la variation des coefficients d'absorption de différents tissus organiques en fonction de la longueur d'onde. Il apparaît nettement sur ce schéma que la fenêtre optimale se situe dans le proche infrarouge, entre l'absorption de l'hémoglobine et celle de l'eau.[127]

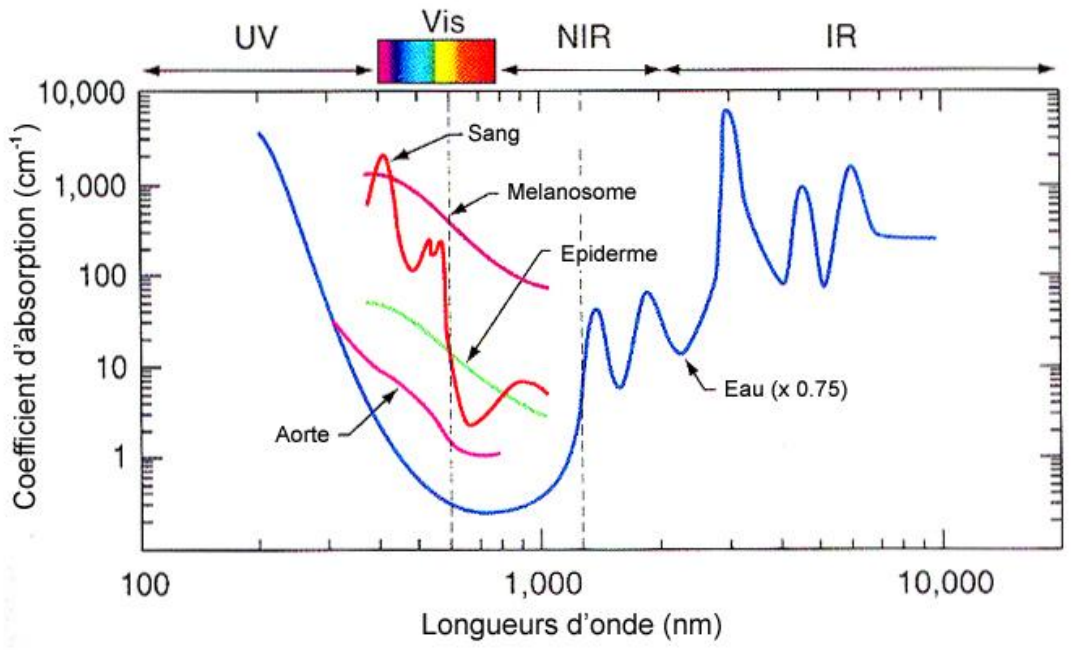


Figure 19 : Coefficients d'absorption de différents tissus organiques en fonction de la longueur d'onde (d'après Mobley, J. et T. Vo-Dinh)[127]

II.4.5.3.3. Avantages de la fluorescence

En dépit des limitations liées aux propriétés optiques des tissus, il existe donc un domaine de longueurs d'onde (650 – 900 nm) pour lequel l'imagerie de fluorescence est avantageuse. Cette technique présente en effet de nombreux intérêts : elle allie une bonne sensibilité, un faible encombrement, des agents de contraste stables et n'utilise pas de radiations ionisantes. Cette technique est relativement peu onéreuse en terme d'équipement et de coût de fonctionnement ce qui en fait une technique de choix pour la recherche. De plus, en utilisant des modèles animaux (souris, rats) suffisamment petits, il est possible d'imager l'animal dans sa totalité car la diffusion est l'absorption du rayonnement par les tissus est faible.

L'imagerie du petit animal est particulièrement adaptée à la découverte de nouveaux biomarqueurs des tumeurs ou de la plaque d'athérome, et surtout l'évaluation de nouvelles approches thérapeutiques. A moyen terme, des applications de l'imagerie de fluorescence sont envisagées pour l'homme pour des applications « peu profondes ». Cela pourrait être appliqué en dermatologie, comme outil de diagnostic du cancer du sein, comme aide à la chirurgie en détectant les métastases pendant l'opération, ou à la détection de polypes précancéreux par endoscopie du colon.

Bien entendu, la fluorescence reste la technique de choix pour les expériences *in vitro*. La cytométrie de flux[128] en est une parfaite illustration. Cette technique a d'ailleurs été utilisée dans ce travail de thèse pour évaluer l'affinité des nanoparticules de silice vis-à-vis de lignées cellulaires.

II.4.5.3.4. Cytométrie de flux

La cytométrie en flux (CMF) ou *Fluorescent-activated cell sorting* (FACS) est une technique permettant de faire défiler des particules ou cellules à grande vitesse dans le faisceau d'un laser, en les comptants et en les caractérisant. C'est la lumière réémise (par diffusion ou fluorescence) qui permet de classer la population suivant plusieurs critères relatifs :

- aux propriétés optiques intrinsèques des particules. ils correspondent aux phénomènes de diffusion liés aux dimensions de la particule, à leur structure interne ou à l'auto-fluorescence de certaines cellules (végétaux, phytoplancton, etc.).
- aux propriétés de fluorescence induites obtenues par des marquages spécifiques de structures ou d'événements cellulaires.

Ces signaux sont séparés par des filtres optiques (miroir dichroïque et filtre optique) et sont collectés par des photomultiplicateurs (PMT), amplifiés, numérisés sur un ordinateur (Figure 20).

Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) est multiparamétrique (taille, fluorescence, facteur de forme) et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'histogrammes (un paramètre) ou de cytogrammes (deux paramètres).

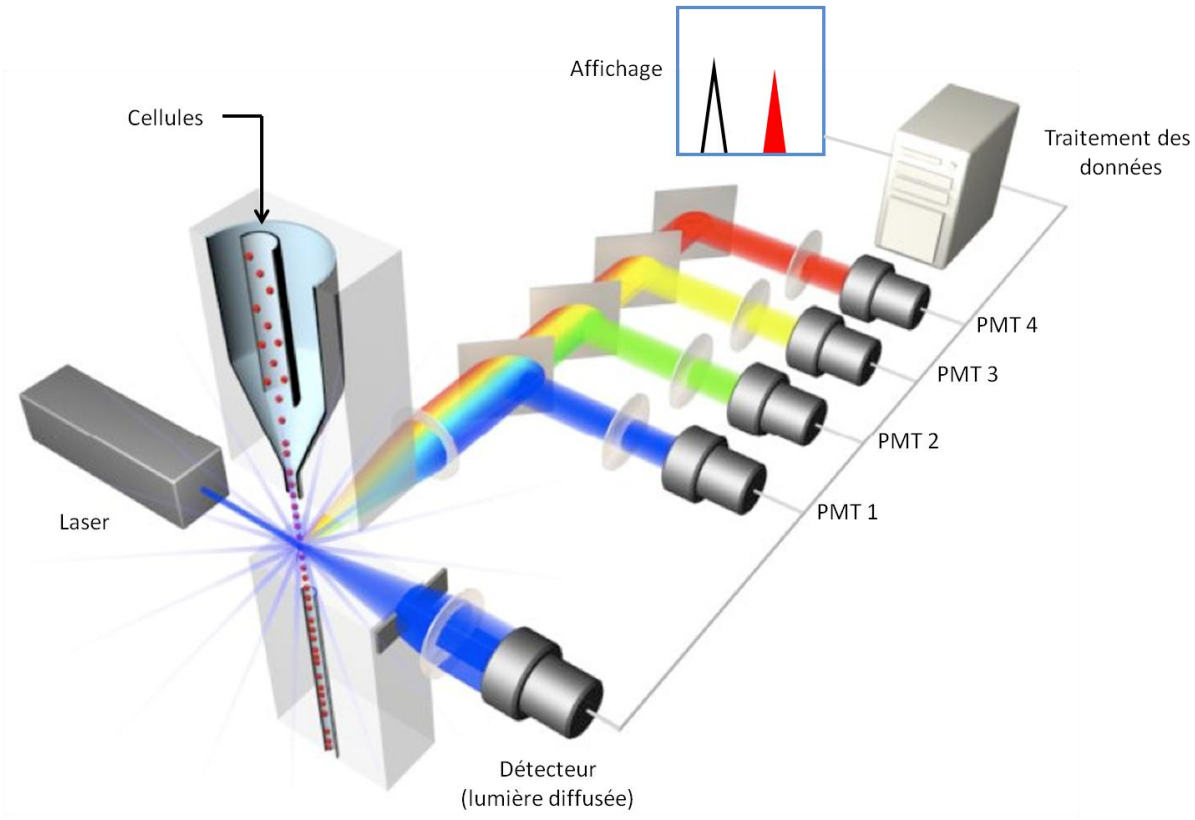


Figure 20: Composition d'un cytomètre de flux

II.4.5.3.5. Traceurs

Parmi les molécules et matériaux fluorescents couramment utilisés en imagerie de fluorescence, nous distinguons les protéines fluorescentes, les nanocristaux semi-conducteurs et les fluorophores organiques (Figure 21). Dans le cade de cette thèse, seuls des fluorophores organiques ont été utilisés.

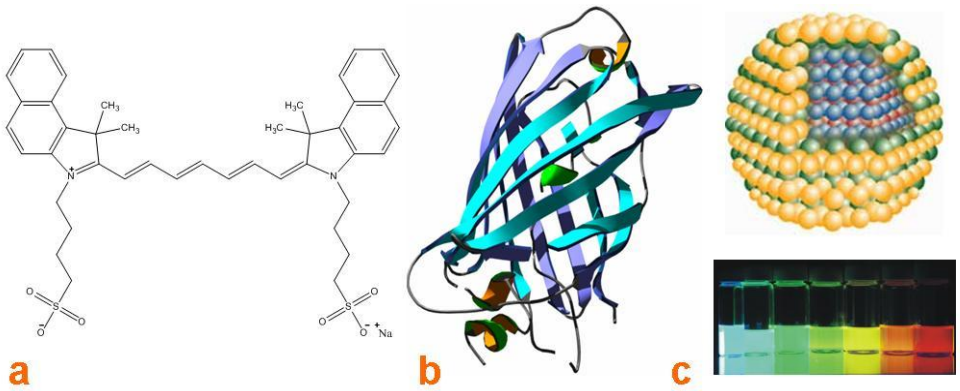


Figure 21:a) Fluorophore organique (vert d'indocyanine) ; b) Protéine fluorescente (« Green Fluorescent Protein » ou GFP) ; c) Nanocristaux semi-conducteurs

Les fluorophores organiques possèdent de nombreuses insaturations conjuguées. A titre d'exemple, nous pouvons citer le cas du vert d'indocyanine (ou ICG pour « IndoCyanine Green »). Ce fluorophore est largement utilisé depuis de nombreuses années pour des

expérimentations chez la souris, mais aussi sur l'homme puisqu'il fait partie des rares molécules fluorescentes autorisées par la FDA (« Food and Drug Administration » : organisme autorisant la commercialisation des médicaments sur le territoire des États-Unis d'Amérique).[129] L'ICG est utilisé dans le cadre d'études vasculaires, que ce soit dans l'œil, le cerveau, ou le cœur.[126] Il existe de nombreuses autres molécules fluorescentes caractérisées par leur longueur d'émission comme la fluoresceine, la rhodamine, les cyanines, etc. Certaines comme la fluorescéine et la rhodamine ne permettent pas de faire de l'imagerie *in vivo* car leurs longueurs d'émission sont masquées par l'auto fluorescence des tissus vivants et sont donc réservées à l'étude *in vitro*. D'autres comme les cyanines sont particulièrement adaptées à l'étude *in vivo* mais restent des composés très onéreux.

II.4.5.3.6. Vers de nouvelles sondes nano-particulaires biocompatibles

Il existe des traceurs optiques nano-particulaires parmi lesquels nous trouvons les boîtes quantiques, les nanoparticules de silice et les polymères encapsulants (ou liés à) plusieurs molécules de fluorophores. Cependant, leur métabolisation une fois injecté dans un organisme vivant soulèvent des interrogations quant à leur biocompatibilité et à leur élimination. Les avantages découlant de l'utilisation des nanoparticules, détaillés en page 47, incitent malgré tout au développement de nouvelles nano-structures pour l'imagerie de fluorescence. En effet, l'utilisation de telles sondes permet d'augmenter fortement la sensibilité de l'imagerie optique puisque chaque particule véhicule de nombreuses molécules fluorescentes. De plus, les fluorophores encapsulés au sein de ces particules présentent généralement une meilleure photostabilité. Enfin, leur structure nanoparticulaire facilite la mise au point d'approches de fonctionnalisation qui permettent de combiner des fluorophores à des agents thérapeutiques.

II.4.6. Différentes générations de nanoparticules

En vue d'améliorer le comportement biologique des nanoparticules, des modifications de leurs propriétés de surface ont été réalisées. Nous pouvons distinguer trois générations successives de nanoparticules.

II.4.6.1. Première génération

La première génération est constituée des nanoparticules non fonctionnalisées, stables en milieu aqueux. Leur intérêt réside principalement dans leur capacité à éviter l'élimination et l'excrétion par le système rénal.

En effet, le principal organe d'élimination de l'organisme est le rein, dont le fonctionnement repose sur un principe de filtration à travers des pores d'une dizaine nanomètres seulement.[130] Ainsi, l'encapsulation d'agents d'intérêt de faible poids moléculaire au sein de

nanoparticules de taille légèrement supérieure à la dizaine de nanomètres permet d'éviter leur élimination rénale et de prolonger leur effet. La taille des nanoparticules doit toutefois être suffisamment petite pour qu'elles ne restent pas bloquées dans les plus petits vaisseaux sanguins. Cependant, si la taille des nanoparticules leur permet d'éviter de nombreux pièges « géométriques » de l'organisme, ce seul paramètre ne permet pas une longue circulation dans le compartiment sanguin. Les nanoparticules sont en effet considérées comme des corps étrangers par les défenses immunitaires de l'organisme. A ce titre, elles sont rapidement prises en charge par les macrophages. Afin de pouvoir atteindre la zone d'intérêt, il convient donc d'éviter la phagocytose en leurrant les défenses immunitaires ; Nous parlons alors de furtivité.

II.4.6.2. Seconde génération : particules furtives

Comme le souligne Torchilin,[131] l'objectif principal des nanoparticules ou nano-transporteurs une fois administrés dans le compartiment sanguin est d'augmenter la durée de vie de l'agent à véhiculer dans la circulation sanguine.

Les mécanismes naturels de métabolisation et d'élimination diminuent la dose de principe actif ou de marqueur qui va finalement atteindre les tissus ciblés, mais entrainent aussi une accumulation de ces mêmes substances dans les organes d'élimination ou de séquestration (rein, foie, rate). Cela peut entraîner une certaine toxicité. Dans le cas de l'utilisation d'agent de contraste, ces accumulations peuvent masquer la zone d'intérêt en produisant un signal trop intense dans ces organes, et donc perturber la détection.

De nouvelles stratégies ont été développées afin d'augmenter la durée de vie des nanoparticules dans le compartiment sanguin. Ces techniques se basent sur la modification chimique de la surface des nano-transporteurs.

Le principal mécanisme d'élimination de l'organisme est le système réticuloendothélial. Les particules « étrangères » sont rapidement marquées au cours de leur circulation dans le sang par des protéines désignées par le terme d'opsonines. Les objets « opsonisés » sont ensuite phagocytés par les cellules de Kupffer (macrophages du foie), les macrophages de la rate ou des poumons, ou encore par les macrophages circulants.

Afin de limiter ce processus, les particules sont recouvertes d'un « agent de furtivité » qui leur permet d'échapper à la capture par les cellules du système immunitaire en esquivant la fixation des opsonines.[132],[133],[134] La grande majorité des agents de furtivité utilisés pour former une couche protectrice autour des transporteurs, sont les polymères. Le PEG[135] (polyéthylène glycol) est le plus couramment utilisé car il a l'avantage d'être biocompatible, soluble en milieu aqueux, non toxique, et a en outre une faible immunogénicité. Il est autorisé à l'injection chez l'homme par la FDA.

La seconde génération de nanoparticules dites « furtives » permet d'avoir un temps de séjour dans la circulation sanguine suffisamment important pour relarguer lentement un agent thérapeutique, ou pour entraîner une accumulation passive par effet EPR.

II.4.6.3. Troisième génération : particules ciblantes

Les nanoparticules furtives restent dans la circulation sanguine plus longuement que les autres nanoparticules mais finissent cependant par être extravasées hors du compartiment sanguin, notamment dans les zones où la vascularisation présente d'importantes fenestrations comme le foie ou les zones d'angiogénèse comme les tumeurs. Afin de favoriser l'accumulation des nanoparticules dans un tissu donné, il est possible de fonctionnaliser leur surface avec des ligands biologiques. Comme nous l'avons déjà dit, les cellules cancéreuses présentent à leur surface des récepteurs spécifiques ou sur-exprimés.[136] Si les nano-vecteurs sont munis de ligands capables de reconnaître ces récepteurs, ils se fixeront alors préférentiellement sur les cellules malades et diminueront leur sensibilité à l'extravasation.

Cependant, l'ajout de ces ligands à la surface des nanoparticules favorise généralement leur capture par les macrophages.[36] C'est pourquoi il est important d'associer les agents de ciblage aux agents de furtivité afin de contrebalancer cet effet. Mais la formation d'une barrière stérique risque toutefois de masquer les ligands et donc de rendre caduque le ciblage actif. Par conséquent, il est judicieux d'éloigner les agents de ciblage du cœur de la nanoparticule par un bras espaceur de manière à ce qu'ils évoluent à la surface de la couche de furtivité. L'utilisation des bras espaceurs est également avantageuse dans la mesure où elle permet une plus grande liberté de mouvement au ligand, favorisant ainsi son interaction avec la cible.[137]

II.4.6.4. Quatrième génération : nano-valves

Nous venons de voir qu'il est possible d'encapsuler une molécule d'intérêt biologique dans une nanoparticule et de l'amener à un endroit désiré. Le challenge actuel est de pouvoir libérer ce médicament une fois arrivé à destination. Pour cela, de nombreuses solutions ont été proposées et sont regroupées sous le terme de « nano-valves ».

Une nano-valve est un « bouchon » qui peut s'ouvrir en fonction d'un stimulus (biologique, physique ou chimique) et libérer le principe actif emprisonné dans la nanoparticule. Certains de ces stimuli peuvent provenir des cellules cancéreuses et de leur environnement particulier (pH, environnement réducteur, activité enzymatique), d'autres doivent être apportés par une intervention extérieure (rayonnement, chaleur). Les principaux stimuli sont :

- La température. Une nanoparticule de silice recouverte d'un polymère thermo-sensible comme le PNIPAAm (poly(N-isopropyl acryl amide) peut libérer son contenu

par une augmentation de température en permettant le dépliement des chaines de polymères.[138]

- Un rayonnement électromagnétique. Une équipe a développé des nano valves basées sur l'isomérisation cis/trans de l'azo benzéne.[139],[102] Le changement de conformation permet une diminution de l'encombrement stérique des pores.
- Le pH. Le pH des tissus cancéreux est légèrement plus faible que celui des cellules saines. Des nanoparticules de silice poreuses modifiées par de l'APTES peuvent libérer une molécule en fonction du pH par répulsion électrostatique.[140] Des nanoparticules de silice poreuses recouvertes d'une couche de poly(acide glutamic) peuvent libérer un principe actif, la doxorubicine, par augmentation du pH (neutralisation des charges).[141]
- L'environnement redox. Les cellules cancéreuses possèdent un pouvoir réducteur proportionnellement plus importante qu'une cellule saine. Cette défaillance peut être mise à profit dans des systèmes sensibles à ce potentiel. Une équipe de recherche a développé des nanoparticules polymériques qui se dégradent par une réaction de réduction induisant la libération de principe actif.[142],[143]
- L'activité enzymatique. Les cellules cancéreuses sur-expriment certaines enzymes. Une équipe a déjà montré qu'il était possible d'encapsuler une molécule par une « barrière peptidique », substrat d'une protéase. En présence de cette enzyme, la « barrière » de peptide est dégradée et le principe actif libéré.[144],[145]
- L'affinité compétitive : Par exemple, il a été montré que la rhodamine peut être emprisonnée dans des nanoparticules de silice poreuses par adsorption d'un brin d'ADN qui forme une couche imperméable. En présence du brin complémentaire, l'appariement des chaines permet de désorber l'ADN de la nanoparticule et libérer son contenu.[146]

II.4.6.5. Nanoparticule idéale

Une nanoparticule « idéale » regrouperait toutes les caractéristiques évoquées précédemment (i.e. agent de ciblage, de furtivité, agent d'imagerie fixé, nano-valve…) (Figure 22). A partir d'une même plateforme de base, un grand nombre de nanoparticules aux propriétés différentes pourraient être imaginées pour relever les défis de la médecine personnalisée.

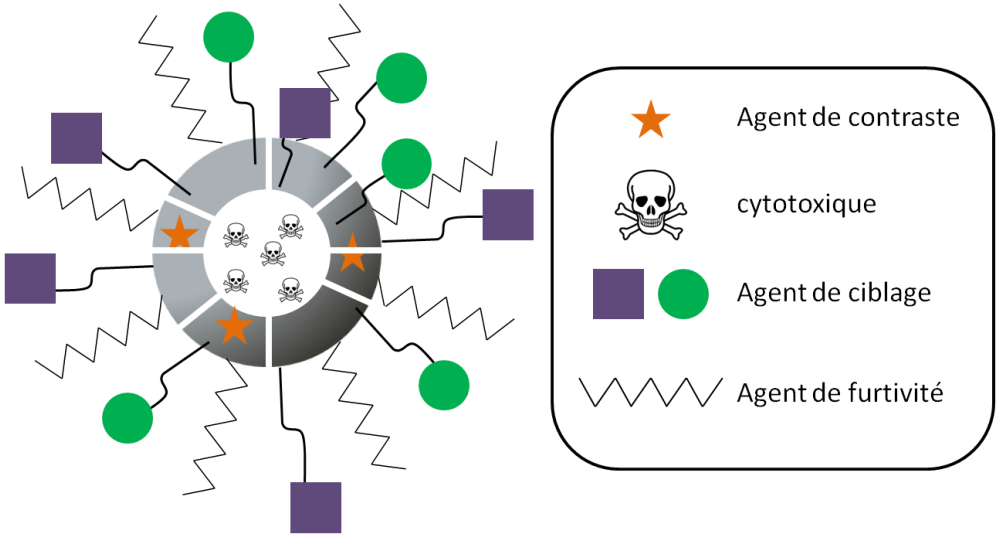


Figure 22: Schéma d'une nanoparticule « idéale » multifonctionnelle

La conception d'une telle nano-plateforme multifonctionnelle nécessite des stratégies de synthèse robustes et versatiles qui permettent un bon contrôle de la position de chaque molécule ou polymère, mais garantissent aussi leur orientation et la maitrise de leur quantité respective au sein de la particule.

C'est dans ce cadre que s'inscrivent mes travaux de thèse. Nous avons cherché à développer de nouvelles nanoparticules de silices fluorescentes, furtives et ciblantes en utilisant des molécules hybrides silylées : peptides, fluorophores et polymères.

II.5. Synthèse de nanoparticules de silice multifonctionnelles

La synthèse de nanoparticules de silice fonctionnalisées utilise habituellement une approche multi étapes où la particule est d'abord synthétisée avant d'être décorée par des méthodes de greffage chimique (II.3). La stratégie que nous avons choisie est basée sur l'utilisation de molécules hybrides (peptides ligands et fluorophores) possédant une fonction silane. Ces blocs hybrides nous permettent une très grande flexibilité dans la conception des particules qui peuvent être réalisées pas à pas dans des conditions sol-gel chemoselectives et compatibles avec les nombreuses fonctions présentes sur les biomolécules. Ainsi, le fluorophore sera introduit dans la matrice de silice au moment de la formation de la particule de manière covalente. Le mécanisme de cette synthèse directe a été décrit au paragraphe II.2.2.

Les peptides ligands, les agents de ciblage et de furtivité sont ensuite greffés seulement à la surface des NPs préparées (Figure 23). L'optimisation et le contrôle de ce post-greffage fera l'objet du paragraphe II.5.3.

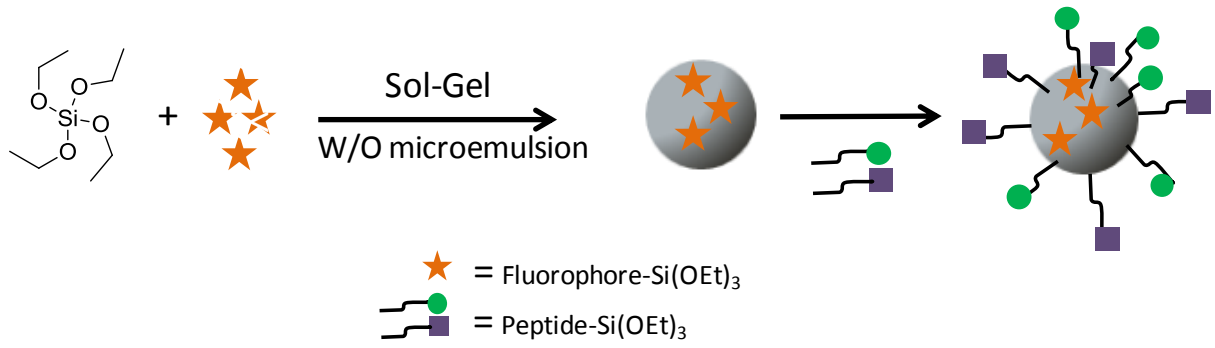


Figure 23: Stratégie de synthèse des nanoparticules de silice multi fonctionnelles

La plupart des nanoparticules que nous avons synthétisées sont non poreuses et ne peuvent donc pas encapsuler de principe actif en vue d'un relargage. Notre objectif est de montrer qu'il est possible de les détecter et des les vectoriser correctement.

Les premières mises au point de particules poreuses utilisant des molécules hybrides sont détaillées au chapitre III.

II.5.1. Synthèse de nanoparticules fluorescentes

II.5.1.1. Synthèse de fluorophore silane

Le fluorophore doit être accroché de manière durable sur la nanoparticule et il est essentiel d'éviter tout relargage dans le temps. La fonctionnalisation du fluorophore par un groupement triethoxy-silane permet d'assurer une liaison covalente avec la silice de la nanoparticule.

Le choix du fluorophore va dépendre de l'application visée. En effet pour des études *in vitro* la fluorescéine est adaptée (maximum d'absorption à 494 nm et d'émission à 520 nm).

En revanche, la cyanine 5.5 a été sélectionnée pour les études *in vivo.* En effet, son maximum d'absorption à 675 nm et d'émission à 694 nm permettent de s'affranchir en grande partie des phénomènes d'auto-fluorescence des tissus qui apparaissent entre 650 et 900 nm.

La silylation de la fluorescéine a été réalisée en suivant une méthode décrite dans la littérature.[147] L'isothiocyanate de fluoresceine commercial commerciale (FITC) **1** est mis en présence de l'aminopropyltriethoxysilane (APTES) dans des proportions stœchiométriques dans le DMSO pendant une heure. La réaction est suivie par LC/MS et la fluorescéine hybride silylée **2** est obtenue de manière quantitative (Figure 24).

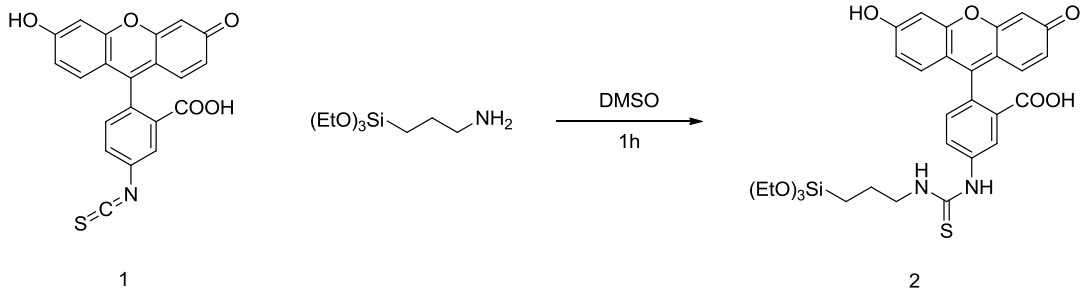


Figure 24: Synthèse de la fluorescéine hybride 2

L'obtention de la cyanine silane **4** a été réalisée par réaction entre l'ester de N-hydroxysuccinimide de la cyanine 5.5 (Cyan 5.5 NHS commercial) **3** en présence de 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) dans les mêmes conditions que pour l'obtention de **2** (Figure 25).

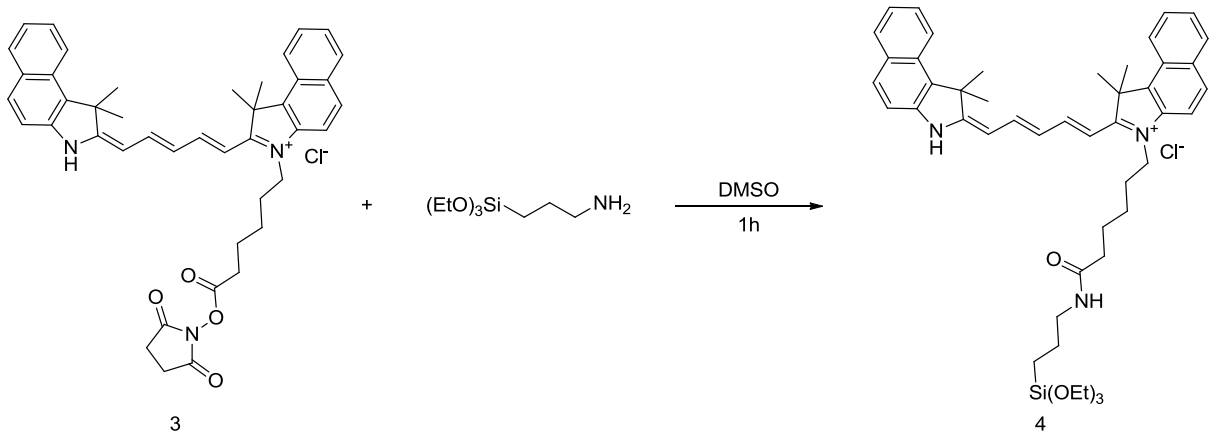


Figure 25: Synthèse de la cyanine hybride 4

Les solutions de DMSO des fluorophores hybrides **2** et **4** à 0.175 mol/L sont utilisées directement pour la synthèse de nanoparticules fluorescentes sans précipitation et purification.

composé	MW $(OH)_3$ / $[M+H]^+$ m/z
2	526.1 / 527.1
4	702.3 / 702.1

Tableau 1: Caractérisation des composés 2 et 4

La quantité de fluorophore incorporée dans les nanoparticules est un paramètre important. Une trop faible quantité de fluorophore ne suffirait pas pour la détection alors qu'une quantité trop importante pourrait perturber la synthèse des nanoparticules et induire des phénomènes de « quenching ». Un rapport molaire fluorophore/TEOS de 0.52% est utilisé par la suite, il a été déterminé par rapport à la littérature.

II.5.1.2. Synthèse directe de nanoparticules fluorescentes

Les nanoparticules de silice ont été réalisées en utilisant la méthode de microémulsion décrite au paragraphe II.2.3. Cette technique permet d'obtenir une taille relativement monodisperse proche de 50 nm, taille qui semble être optimale pour bénéficier de l'effet EPR.[148] Le procédé de microémulsion permet d'incorporer le fluorophore hybride pendant la formation des NPs. En effet, il est important que le fluorophore soit «enfoui» dans le cœur de la nanoparticule plutôt que greffé à la surface pour deux raisons. Le fluorophore n'ayant aucune fonction de reconnaissance ou de furtivité, il est préférable de réserver la surface à des molécules qui nécessitent d'interagir avec le milieu environnant la particule. Deuxièmement, l'enfouissement du fluorophore le protège des éventuelles dégradations ; les nanoparticules peuvent être conservées plusieurs mois sans diminution de la fluorescence.

L'obtention des nanoparticules se fait en mélangeant le triton X-100, le cyclohexane et une solution d'ammoniaque avec de l'hexanol pour obtenir une microémulsion. 200 µL de la solution de fluorophore hybride dans le DMSO est ensuite ajoutée, suivi directement par un ajout de TEOS pour obtenir un rapport molaire Fluorophore hybride/TEOS de 0.52%. Le milieu est laissé sous agitation une nuit puis les nanoparticules sont isolées par précipitation dans l'éther, filtrées sur fritté de porosité 4 avant d'être lavées par soxhlet à l'éthanol pendant 24h pour extraire l'excès de surfactant et de fluorophore qui n'a pas réagi.

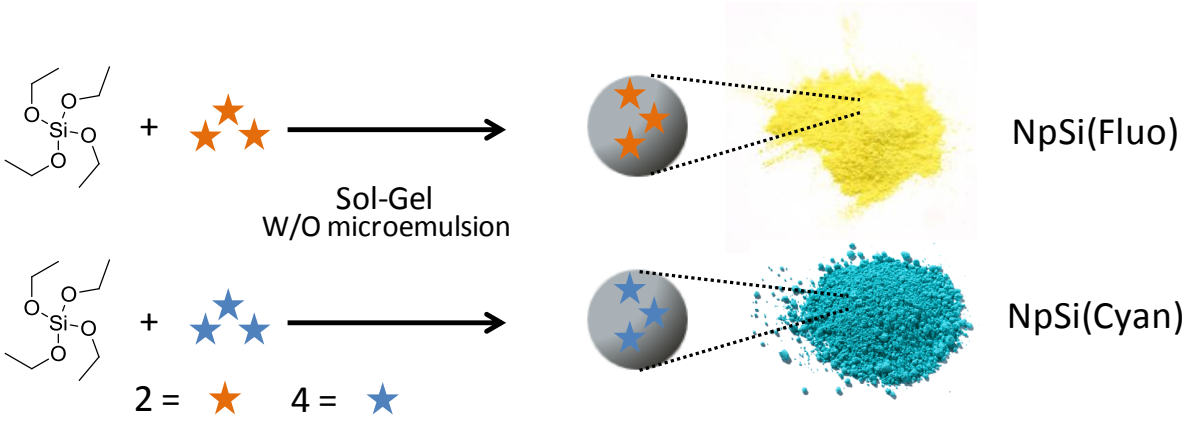


Figure 26: Synthèse des nanoparticules de silice fluorescentes NpSi(Fluo) et NpSi(Cyan)

En début de traitement par le soxhlet, le filtrat est coloré, signe de l'élimination de la partie du fluorophore qui n'est pas immobilisée de manière covalente sur les nanoparticules. En fin de soxhlet, le filtrat est complètement incolore alors que les nanoparticules gardent leur couleur. Les nanoparticules obtenues sont jaunes dans le cas des Np(Fluo) et bleu pour les Np(Cyan) (Figure 26). Les poudres sont caractérisées par microscope electronique à transmission (MET) et Diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering*, DLS) (Figure 27). Les images MET montrent une population de nanoparticules monodisperse d'environ 40 nm ce qui est confirmé par les analyses DLS réalisées dans un tampon PBS. Le

diamètre hydrodynamique obtenu par DLS est de 79 nm avec un indice de polydispersité[a] de 0.124 pour les Np(Fluo) et de 81 nm avec un indice de polydispersité de 0.122 pour les nanoparticules incorporant la cyanine.

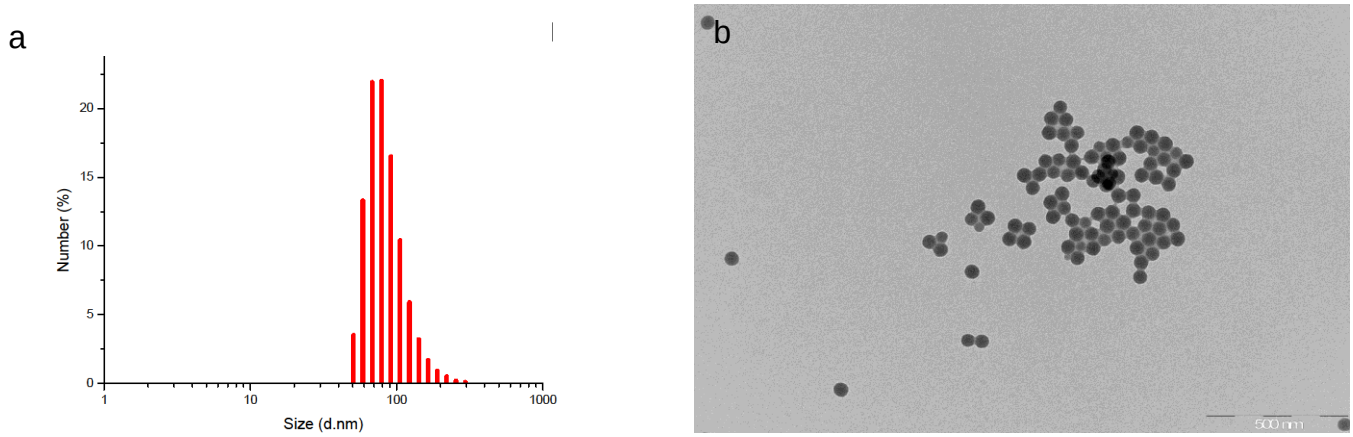


Figure 27: a) Analyse DLS, b) Image MET des nanoparticules Np(Fluo)

L'analyse élémentaire est une méthode classiquement utilisée pour la caractérisation des nanoparticules hybrides organique/inorganiques. Elle permet de déterminer le pourcentage d'organique dans les nanoparticules. Tous les éléments dosés (N, C, O, S et H) correspondent à la dégradation de la matière organique (la silice SiO_2 ne se dégrade pas). Le Tableau 2 représente les analyses élémentaires des deux lots de nanoparticules obtenues.

lot	%N	%C	%O	%H
NpSi(Fluo)	0.28(0.51)	4.26(3.75)	6.17(1.17)	1.65(0.28)
NpSi(Cyan)	0.30(0.47)	4.17(5.65)	6.24(0.17)	1.67(0.46)

Tableau 2: analyses élémentaires des nanoparticules Np(Fluo) et Np(cyan), le chiffre entre parenthèses est le pourcentage théorique

L'analyse élémentaire montre que les deux lots de nanoparticules sont composés de 12% de matière organique (%N+%C+%O+%H = % d'organique) et de 88 % de SiO_2 (%inorganique = 100 - % d'organique), ce qui est également confirmé par les analyses thermogravimétriques réalisées entre 30 et 800 °C à une vitesse de 10 °C/min (Figure 28). Toutefois, les pourcentages massiques d'organique théoriques si la totalité du fluorophore était greffé sont de 5.71 % et 6.75 % pour les nanoparticules Np(Fluo) et Np(Cyan) respectivement.

Cette plus forte quantité de matière organique que prévu s'explique par la présence du fluorophore au sein des nanoparticules mais également par la présence d'autres solvants, de surfactant et de SiOH résiduels (les SiOH peuvent polycondenser par échauffement du matériau lors des analyses).

[a] L'indice de polydispersité correspond à la distribution de taille des nanoparticules. Cette valeur est proportionnelle à l'écart type et au diamètre moyen des nanoparticules. Plus il est proche de 0 plus la population est monodisperse.

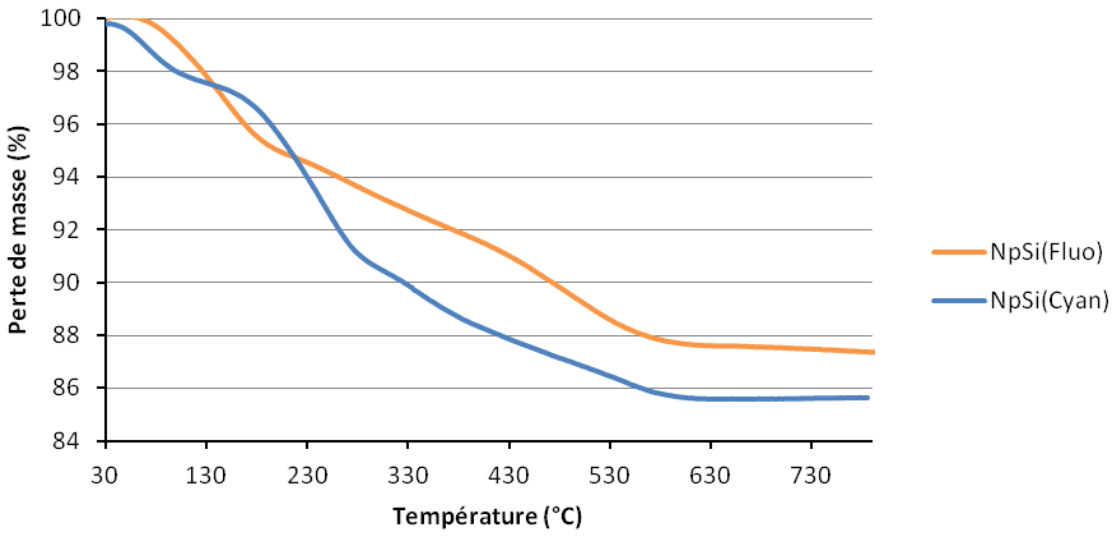


Figure 28: Analyses thermogravimétriques des nanoparticules Np(Fluo) et Np(Cyan)

II.5.2. Choix des ligands de ciblage

En plus de l'effet EPR dont nous espérons bénéficier compte tenu de la taille de nos nanoparticules (40 nm), nous visons un ciblage actif (Voir paragraphe II.4.2.2). Nous avons décidé d'utiliser comme agents de ciblage des ligands peptidiques présentant une bonne affinité pour deux types de récepteurs surexprimés à la surface des cellules cancéreuses : les récepteurs à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ caractéristiques des processus d'angiogenèse et les récepteurs NRP-1.

En synthétisant des nanoparticules présentant deux types de ligands de ces deux récepteurs de façon concomitante, nous cherchons à savoir s'il est possible d'augmenter l'affinité mais aussi la sélectivité des nanoparticules pour des lignées cancéreuses présentant ces deux types de récepteurs.

II.5.2.1. Ligand ciblant les récepteurs NRP-1 à la Neuropiline

Les agonistes naturels du récepteur NRP-1 sont Sema3A et VEGF. Récemment, le groupe de G. Perret a identifié l'heptapeptide H-ATWLPPR-OH comme un antagoniste de NRP-1[149] inhibant la liaison de VEGF (IC_{50} 19 µM). De plus, ce peptide est très sélectif pour ce récepteur. Des études *in vivo* ont montré qu'un traitement via ce peptide entraine une décroissance notable de l'angiogenèse et de la croissance cellulaire dans le cas du cancer du sein.[150] Lors d'expériences *in vitro* et *in vivo,* il a été également été montré que ce peptide couplé à un photosensibilisateur du coté N terminal, avait une action cytotoxique sur les cellules surexprimant NRP-1.[151] De plus il convient de noter que la modification du coté N-ter n'a pas montré de diminution de l'affinité.
Nous avons donc choisi le ligand H-ATWLPPR-OH que nous allons modifier du coté N-ter par un bras espaceur contenant le groupement silane. Le coté C-ter est laissé libre.

Afin de valider la spécificité des ligands peptidiques utilisés, des ligands contrôles doivent être sélectionnés. La séquence LWRPTPA contient les mêmes acides aminés et donc une même charge nette que la séquence ATWLPPR mais dans un enchainement différent. Il s'agit d'un peptide dit « scrambled ». Ce peptide scrambled a été décrit pour n'avoir qu'une faible affinité pour NRP-1.[152]

Comme nous l'avons décrit au paragraphe II.4.6.3, il est nécessaire d'introduire un bras espaceur entre la surface de la nanoparticule et le ligand afin de réduire l'encombrement stérique et de lui donner la mobilité requise pour les interactions avec le récepteur. Nous avons choisi d'utiliser quatre résidus beta alanine comme bras espaceur. Celui-ci est synthétisé indépendamment du ligand, sur support solide pour obtenir le composé Boc-βA_4-OH **5** puis couplé sur le coté N-ter du peptide H-AT(tBu)W(Boc)LPPR(Pbf)-OH **6**.

Le composé **6** est synthétisé sur support solide en stratégie Fmoc/tBu puis est décroché de la résine trityl par clivage ménagé (TFE/AcOH/DCM 20/10/70) afin de conserver les groupements protecteurs acido labiles. Le bras espaceur **5** est couplé sur le N-ter du peptide **6** avant de procéder aux étapes de déprotection et de purification par HPLC préparative. Enfin le composé est modifié par un groupement triéthoxy silane pour obtenir le peptide hybride **7** (

Schéma 11). Le composé contrôle $Si(OEt)_3$-βA_4-LWRPTPA-OH **8** est préparé de la même manière que le composé **7**.

Le rendement final déterminé à partie de la masse de peptide **6** récupéré après clivage de la résine est de 52% pour le composé **7**. Il est de 45% pour le composé **8**.

composé	Séquence	MW / $[M+H]^+$ m/z	Rdt
7	$Si(OH)_3$-βA_4-ATWLPPR-OH	1286.6 / 1287.4	52%
8	$Si(OH)_3$-βA_4-LWRPTPA-OH	1286.6 / 1287.4	45%

Tableau 3: Caractérisation des composés 7 et 8

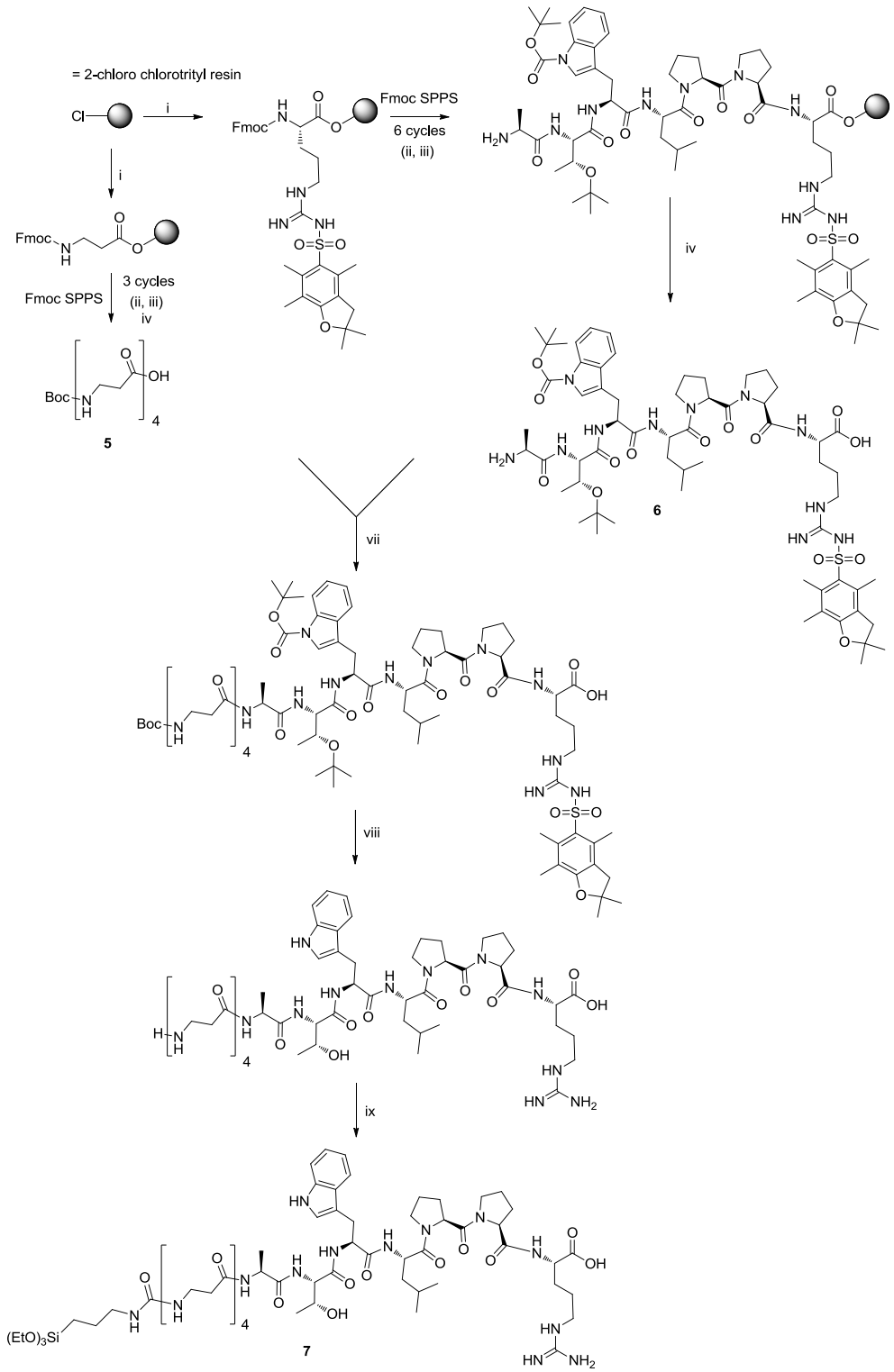


Schéma 11: Synthèse du composé 7 ; i AA (3eq), DIEA (6eq) ; ii DMF/pip, iii AA(3eq), DIEA (6eq), HBTU (3eq), iv TFE/AcOH/DCM, vii HBTU(1.2eq), DIEA (6eq) ; viii TFA/TIS/H_2O ; ix ICPTES (1.2eq), DIEA(6eq)

II.5.2.2. **Ligand ciblant les récepteurs aux intégrines, c[RGD]**

Le motif tripeptidique RGD est présent sur de nombreuses protéines extracellulaires comme la fibronectine, la vitronectine, ou la thrombine qui se lient aux récepteurs à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Ces protéines extra-cellulaires interviennent dans l'adhésion et la migration cellulaire. Le ciblage utilisant le motif RGD a été utilisé avec succès pour la délivrance de médicament, d'agent d'imagerie,[153] de virus,[154] et de nanoparticules[155],[156] jusqu'à la tumeur. La spécificité et le caractère agoniste ou antagoniste du ligand dépendent de la façon dont est présentée la séquence tripeptidique. Différentes analogues ont été synthétisés pour favoriser un des deux caractères, augmenter l'affinité mais aussi accroitre la spécificité vis-à-vis des différentes intégrines. Nous pouvons citer la synthèse de peptides linéaires, cycliques, sous forme de systèmes monomériques ou multimériques.[157] Les formes cycliques du RGD ont permis de rigidifier la structure, induisant une meilleure présentation du ligand et par ce biais améliorer significativement les propriétés de reconnaissance tout en diminuant la dégradation protéolytique du peptide. Le développement par Merck du Cilengitide c[RGDf(N-Me)Val] comme inhibiteur de l'angiogenèse tumorale est basé sur ces recherches (Figure 29). Le c[RGDfK] est un analogue très proche du Cilengitide où la N-méthyl valine a été substituée par une lysine ce qui permet une fonctionnalisation ultérieure facile. Dans notre cas, l'amine ε de la chaine latérale de la lysine nous sert de siège pour la fonctionnalisation par les silanes.

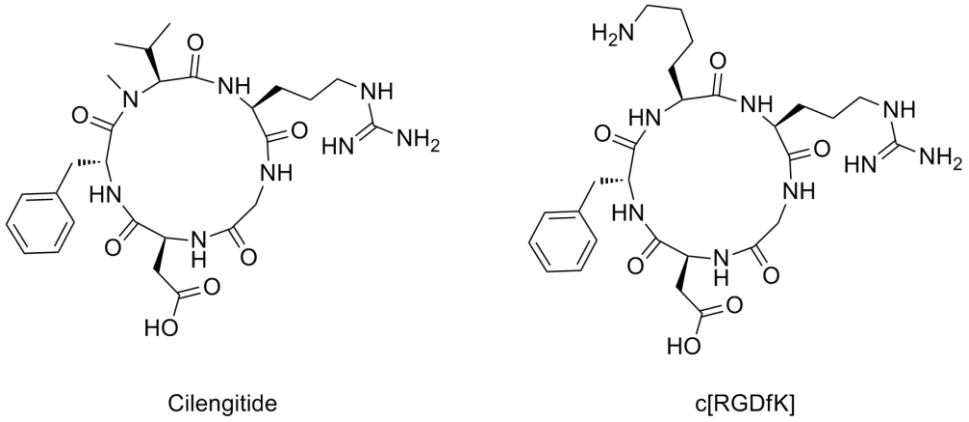


Figure 29: Structure du composé Cilengitide développé par Merck et de l'analogue c[RGDfK]

L'analogue c[RβADfK] dans lequel la glycine a été remplacée par une béta alanine[156] perd de manière significative son affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ en augmentant la taille du cycle. Nous l'avons choisi comme ligand contrôle. Le bras composé de 4 beta-alanine (**5**) a été utilisé comme espaceur également.

Le composé c[R(Pbf)GD(OtBu)fK(Cbz)] est synthétisé par synthèse peptidique sur support solide SPPS en utilisant la résine chloro Trityl et la stratégie Fmoc/tBu.[158] Une fois le peptide linéaire obtenu, le groupement protecteur Fmoc est ôté par action de la pipéridine, puis le peptide est décroché du support solide par clivage ménagé afin de conserver les

groupements protecteurs acido labiles. Après cyclisation intramoléculaire, le groupement protecteur Cbz de la chaine latérale de la lysine est enlevé par hydrogénolyse libérant ainsi la fonction amine pour obtenir le composé **9**. Celui-ci est purifié sur HPLC préparative. La chaine latérale de la lysine est ensuite utilisée pour coupler le bras espaceur **5**. Après la déprotection des différents groupements protecteurs, le composé est purifié de nouveau par HPLC préparative puis couplé avec le silane pour obtenir le composé **10** avec 32 % de rendement (Figure 30).

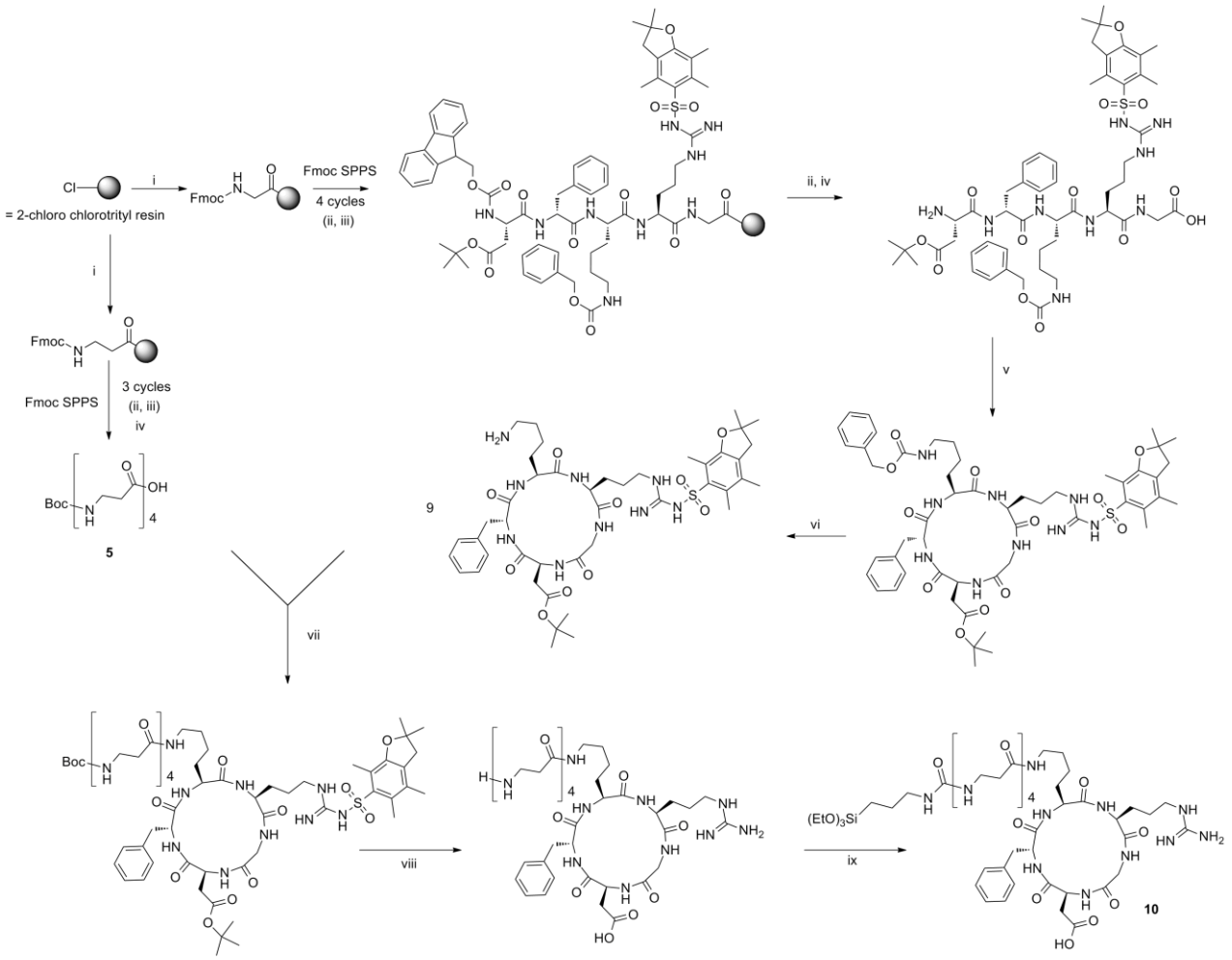


Figure 30: Synthèse du composé 10. i AA (3eq), DIEA (6eq) ; ii DMF/pip, iii AA(3eq), DIEA (6eq), HBTU (3eq), iv TFE/AcOH/DCM ; v HBTU(1.1eq), DIEA (3eq) ; vi Pd/C H_2 ; vii HBTU(1.2eq), DIEA (6eq) ; viii TFA/TIS/H2O ; ix ICPTES (1.2eq), DIEA(6eq).

Le composé c[RβADfK(Si(OEt)$_3$-(CH$_2$)$_3$NHCO-βA$_4$-)] **11** est préparé de la même manière que le composé **10** avec un rendement de 38 % (Tableau 4).

composé	Séquence	MW / $[M+H]^+$ m/z	Rdt
10	c[RβADfK(H-(CH$_2$)$_3$NHCO-βA$_4$-)]	1050.5 / 1051.6	32%
11	c[RβADfK(Si(OEt)$_3$-(CH$_2$)$_3$NHCO-βA$_4$-)]	1064.5 / 1065.7	38%

Tableau 4: Caractérisation des composés 10 et 11

II.5.3. Greffage

Comme nous l'avons mentionné auparavant, notre objectif est de greffer plusieurs peptides silylés simultanément sur les nanoparticules. La fonction silane étant placée à l'extrémité d'un bras espaceur qui le sépare de la séquence peptidique, nous avons émis l'hypothèse qu'elle devrait avoir une réactivité quasi identique pour les deux peptides hybrides. Il semble donc concevable que le rapport des concentrations de peptides hybrides dans la solution de greffage soit identique au ratio des peptides greffés sur la nanoparticule.

Quoi qu'il en soit, il est important de déterminer le nombre de peptides greffés sur les nanoparticules. En effet, la densité de greffage va avoir un impact sur l'affinité avec les cellules.[159] Une quantité trop importante va nuire à la reconnaissance cellulaire en causant une gène stérique alors qu'une quantité trop faible ne permettra pas une reconnaissance optimale. Dans notre cas de multi-fonctionnalisations, il est même important de quantifier le rapport des deux peptides immobilisés.

II.5.3.1. Méthodes de quantification : ERETIC

Les méthodes de caractérisations classiques des nanoparticules que sont l'analyse élémentaire, l'ATG, le potentiel zêta ou la DLS ne permettent pas de quantifier précisément des peptides sur une nanoparticule et à fortiori, de différencier deux peptides. L'analyse élémentaire, par exemple, donne des informations très globales et peu précises. En effet si un solvant ou d'autres molécules organiques ou composés inorganiques sont présents, il est impossible d'obtenir une information fiable. Afin de connaître précisément la nature et le nombre de peptides greffés sur les NPs et ainsi valider notre hypothèse de greffage, nous avons dû imaginer une méthode de caractérisation permettant de fournir une quantification absolue avec une sensibilité suffisamment importante pour détecter des concentrations de l'ordre de 0.16 mM dans le tube RMN (ce qui correspond à une charge en peptide de 2µmol/g pour 50mg de nanoparticule dissout dans 600µL).

La méthode de spectroscopie RMN ERETIC (*Electronic REference To acces In vivo Concentrations*) permet d'accéder à la concentration d'un échantillon en utilisant une référence externe. Pour ce faire il nécessaire que l'échantillon à doser et l'échantillon servant de référence:

- soient préparés dans le même solvant et placés dans des tubes strictement identiques.
- possèdent une concentration à peu près équivalente (du même ordre de grandeur). Pour ce faire plusieurs tubes de référence sont préparés par dilution de la solution mère.

Cette méthode fourni un signal de référence, synthétisé par le spectromètre qui est calibré avec le tube de référence. Ce signal de référence fourni une pseudo–FID qui possède toutes

les caractéristiques d'un vrai signal RMN dont les paramètres : fréquence, amplitude, phase, etc. sont contrôlés par la console du spectromètre. Puis le tube à quantifier est passé dans l'appareil en utilisant exactement les mêmes paramètres. Il est possible de déterminer la concentration molaire par une méthode d'intégration complexe. La concentration permet par la suite de remonter à la densité de greffage des nanoparticules en mmol/g par la formule suivante :

$$D= \frac{[F]*V*1000}{m}$$

D= densité de greffage (µmol/g)
[F]= concentration du noyau étudié déterminé par la méthode ERETIC (mmol/L)
V=volume du tube RMN (mL)
m= masse des nanoparticules dans l'échantillon (mg)

Pour une bonne précision de la mesure, la largeur de la fenêtre spectrale est fixée à 10 ppm et centrée sur le pic à quantifier.

Il est cependant difficile de discriminer deux peptides de cette taille par RMN H^1 ou C^{13} étant donné la multitude de signaux et leurs superpositions. Nous avons donc envisagé d'utiliser un noyau différent pour l'utiliser comme une sonde spécifique sur les peptides, nous permettant de les différencier et les quantifier.

Parmi les sondes possédant un spin nucléaire de ½, nécessaire pour une bonne sensibilité à la résonnance magnétique nucléaire, nous avons choisi le fluor 19 (^{19}F). Il possède une abondance isotopique naturelle élevée et de nombreux aminoacides fluorés sont disponibles commercialement.

Cependant il n'est pas possible de faire de la RMN liquide de nanoparticules de silice étant donné la mauvaise homogénéité de l'échantillon.

Nous avons donc choisi de dissoudre les nanoparticules avant de les analyser par RMN pour libérer ce qu'elles contiennent en solution. La silice se dissout facilement dans une solution aqueuse concentrée en hydroxyde de sodium (Schéma 12) ou encore une solution d'acide fluorhydrique aqueux. Pour des raisons pratiques (dangerosité de l'acide fluorhydrique et signal d'HF supplémentaire) c'est la solution aqueuse concentrée en hydroxyde de sodium qui est utilisée.

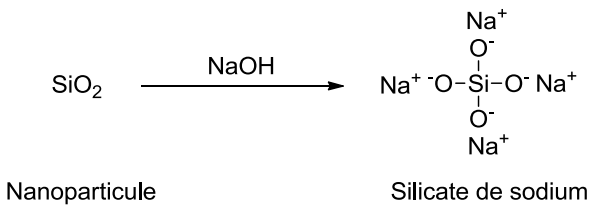


Schéma 12: Dissolution de nanoparticule de silice par une solution d'hydroxyde de sodium

II.5.3.2. Synthèse des sondes fluorées

Lors de la synthèse des peptides, un aminoacide fluoré est introduit et peut être détecté par RMN. L'insertion de cet aminoacide non naturel est effectuée sur le bras espaceur pour ne pas perturber l'affinité des ligands. Parmi les acides aminés fluorés existants, deux ont été sélectionnés: l'acide (R,S)-Fmoc-2-amino-4,4,4-trifluoro-butyrique (noté « Ala(CF_3) » pour trifluromethyl alanine) et la (S)-Fmoc-4-fluoro-L-phenylalanine noté « PheF »(Figure 31) dont les déplacements des signaux RMN F^{19} sont respectivement à -64 ppm et -117 ppm dans une solution d'hydroxyde de sodium 1.5 N. Ils sont protégés par des groupements Fmoc ce qui permet de les introduire dans le bras espaceur comme un acide aminé classique sans modifier la stratégie de synthèse.

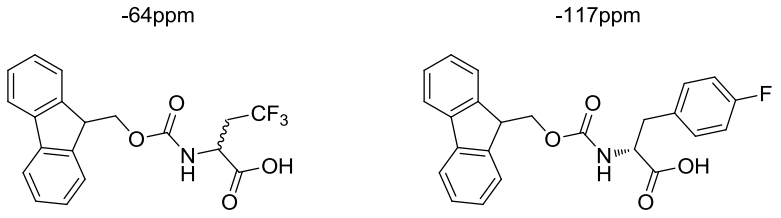


Figure 31: Aminoacides fluorés choisis pour la quantification par RMN du fluor des ligands

Les aminoacides fluorés sont introduits à la place de la 3éme béta alanine du bras espaceur pour obtenir les bras espaceurs **12** et **13** protégés par un groupement Fmoc (Schéma 13). Les espaceurs sont couplés sur les peptides **6** et **9**, et le bras silylé est enfin couplé sur l'amine terminale du bras espaceur après déprotection des groupements Fmoc pour obtenir les peptides hybrides **14** et **15** avec un rendement de 46% et 37% respectivement (Tableau 5).

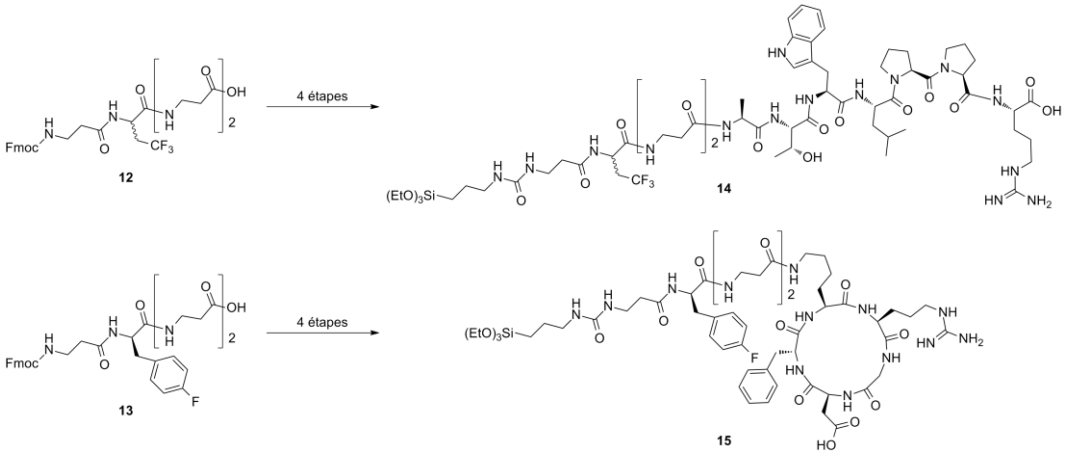


Schéma 13: Synthèse des composés 14 et 15

composé	Séquence	MW / M+H$^+$ m/z	Rdt
12	Fmoc-βA-A(CF_3)βA_2-OH	592.2 / 593.3	78%
13	Fmoc-βAF(PhF)βA2-OH	618.2 / 619.2	82%
14	Si(OH)$_3$-(CH_2)$_3$NHCO-βA-A(CF_3)-βA_2-ATWLPPR-OH	1380.6 / 1381.6	46%
15	c[RβADfK(Si(OH)$_3$-(CH_2)$_3$NHCO-βA-PheF-βA_2)]	1132.5 / 1133.7	37%

Tableau 5: Caractérisation des composés Fluorés

Avant de procéder au greffage des peptides **14** et **15**, il est nécessaire de mettre au point les conditions opératoires et valider la méthode de quantification : solvant, pH, température, concentration en peptide hybride et temps. Beaucoup de solvants ont été utilisés pour greffer les organosilanes sur une nanoparticule. Toutefois, le DMF a été choisi car il permet de solubiliser la plupart des peptides hybrides.

Il est admis dans la littérature qu'une température élevée permet de favoriser les réactions de condensations de siloxane. Des modes opératoires préconisent même d'aller jusqu'au reflux du solvant. Cependant, les nanoparticules que nous avons synthétisées incorporant un fluorophore, nous n'avons pas souhaité chauffer trop fortement pour éviter la dégradation des espèces organiques. Ainsi une température de 60°C a été choisie pour les greffages.

Les temps de réaction sont généralement de plusieurs heures pour obtenir des taux de greffage importants. Nous avons donc fixé la durée de réaction à 12h. Enfin, des catalyseurs acides ou basiques sont généralement utilisés pour la condensation (Voir paragraphe I.2). Des tests de greffages préliminaires ont été réalisés sur un autre hybride fluoré simple.

II.5.3.3. Choix de la catalyse

Afin d'optimiser le greffage et de choisir la catalyse, le composé **16** a été utilisé comme modèle. Il a été obtenu de manière quantitative par réaction entre la 4-fluorobenzylamine et l'ICPTES (Schéma 14).

Schéma 14: Synthèse du composé 16

Composé	MW / $[M+H]^+$ m/z	Rdt
16	288.1 /289.3	100%

Tableau 6. Caractérisation du composé 16

Le composé **16** est dissout dans 10 mL de DMF pour obtenir une solution « stock » à concentration de 1.25 mM puis la solution est séparée en trois parties dans lesquelles différents catalyseurs sont ajoutés :

- DMF/1% v/v TFA pour un pH très acide (pH< 1)
- DMF/1% v/v AcOH pour un pH intermédiaire (4<pH<5)
- DMF/1% v/v DIEA pour un pH basique (9<pH<10)

Des aliquots de 100 mg de nanoparticules sont mis en réaction dans 2 mL de chaque solution, sous agitation pendant 12h à 60 °C. Après réaction, les nanoparticules sont lavées au DMF, à l'EtOH puis lyophilisées dans l'eau avant d'être pesées pour obtenir 3 lots de nanoparticules nommées **Np(fluo)1 Np(fluo)2** et **Np(fluo)3** (Tableau 7).

Composé greffé	**Conditions de greffage**		
	DMF TFA 1%v/v	**DMF AcOH 1%v/v**	**DMF DIEA 1%v/v**
16	**Np(fluo)2**	**Np(fluo)1**	**Np(fluo)3**
14	**Np(fluo)4**	**Np(fluo)5**	**Np(fluo)6**
15	**Np(fluo)7**	**Np(fluo)8**	**Np(fluo)9**

Tableau 7: Greffage des composés 14, 15 et 16 avec différentes catalyses

La quantité de nanoparticules récupérée après greffage est généralement inférieure (-20% en masse) à la quantité de nanoparticules utilisée pour la réaction. En effet, une partie des nanoparticules restent toujours dispersées dans la solution lors des étapes de centrifugation.

Pour procéder à l'analyse, les nanoparticules sont dissoutes (50 mg dans 0.6 mL d'une solution à 1.5 N NaOD/D_2O comprenant 10 mM de TFA) puis quantifiées par la méthode ERETIC. Quelque soit la catalyse utilisée, les spectres RMN obtenus indiquent tous un pic à -116.5 ppm, correspondant à une concentration d'environ 1.67 mmol/L. Cela correspond à des charges en peptide de l'ordre de 20 µmol/g sachant que la charge théorique maximale, si l'on incorporait tout le composé **16**, serait de 25 µmol/g (Figure 32). Cette charge de 20 µmol/g correspond à une densité de greffage de 906 peptides/Np et 0.18 peptides/nm^2 (voir partie expérimentale pour le calcul du nombre de peptides par nanoparticule).

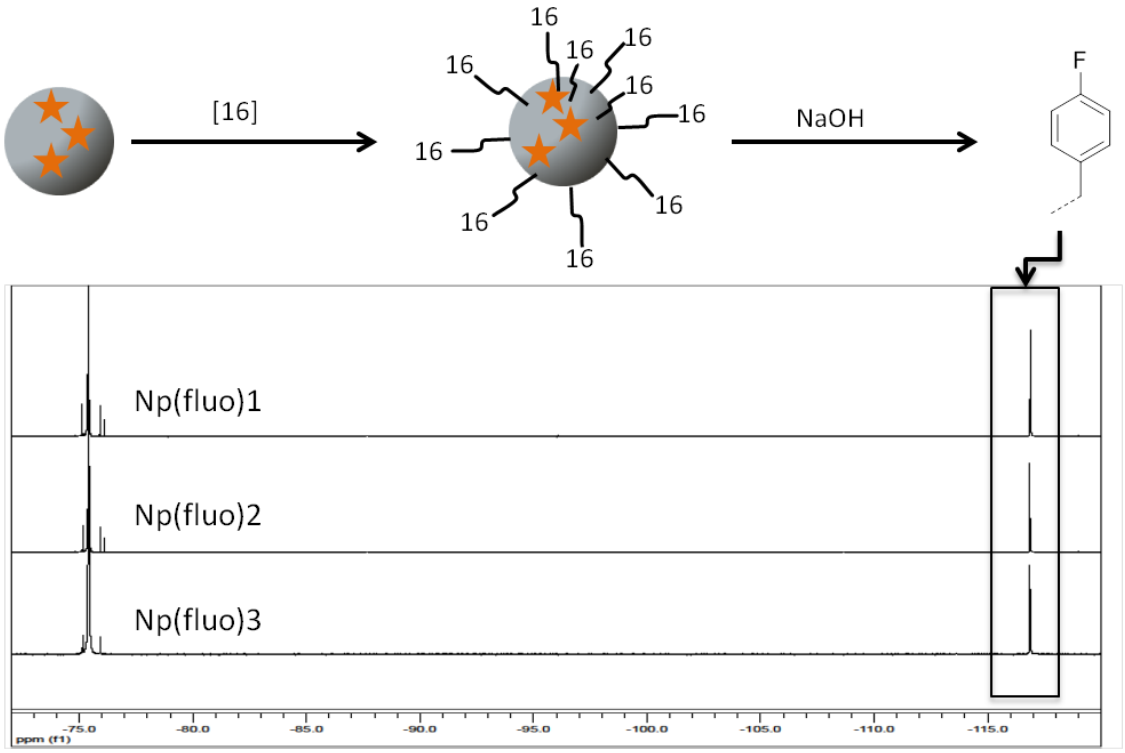


Figure 32: Spectre RMN ^{19}F après dissolution des nanoparticules Np(fluo)1, Np(fluo)2 et Np(fluo)3 dans une solution aqueuse à 1.5N en NaOH

Nous avons ensuite vérifié que les peptides hybrides se comportaient de la même manière que le composé modèle **16**. Les peptides hybrides fluorés **14** et **15** sont alors greffés séparément sur les nanoparticules de silice dans les trois conditions citées précédemment pendant 12 h à 60 °C (Tableau 7).

Le temps de réaction écoulé, les nanoparticules sont lavées, lyophilisées et pesées avant d'être dissoutes pour procéder à l'analyse par RMN du ^{19}F.

Ci-dessous sont représentés les spectres du fluor obtenus lors de l'analyse de 50 mg de nanoparticules **Np(fluo)4**, **Np(fluo)5** et **Np(fluo)6** greffées par le composé **14** (Figure 33) et des nanoparticules **Np(fluo)7**, **Np(fluo)8**, **Np(fluo)9**, greffées par le composé **15** (Figure 34) dans les différentes conditions de pH. Les pics à -64 ppm, -75.4 ppm et -117 ppm correspondent respectivement au groupement CF_3 du composé **14**, au TFA, et au groupement phényl fluor du composé **15**.

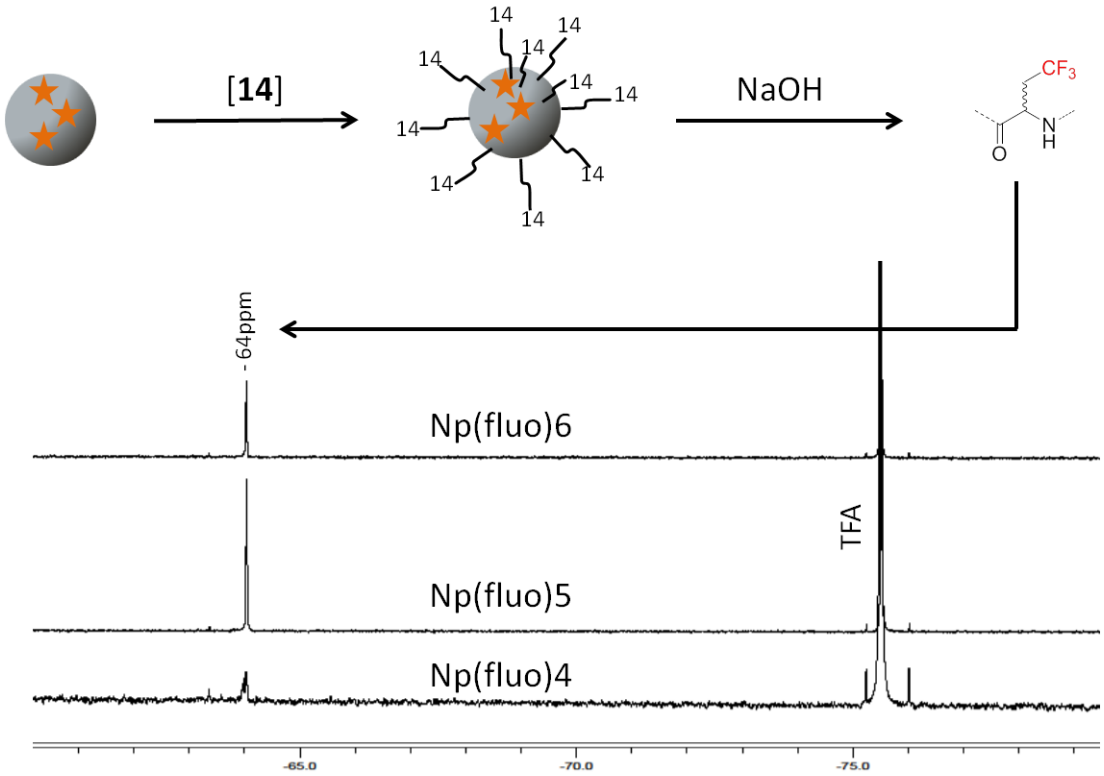


Figure 33: Spectres RMN ^{19}F obtenus après dissolution dans une solution aqueuse à 1.5N en NaOH des nanoparticules Np(fluo)4, Np(fluo)5 et Np(fluo)6 greffées avec le composé 14 en présence de différents catalyseurs

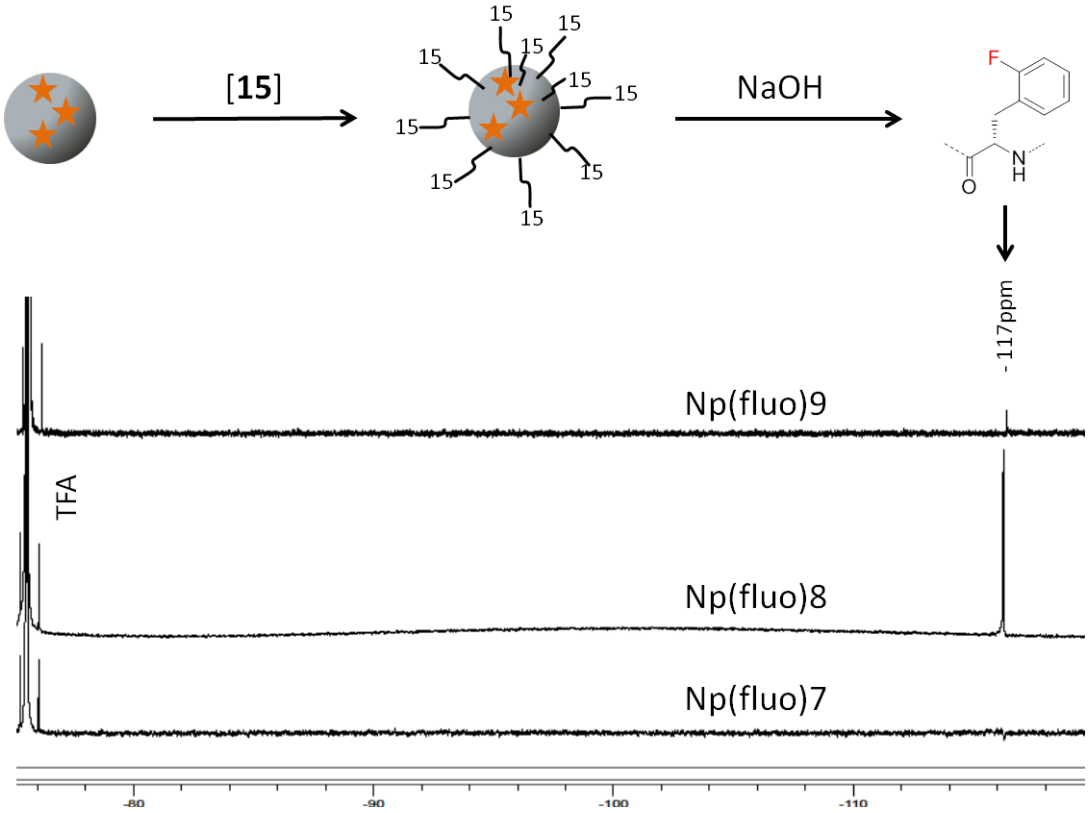


Figure 34: Spectres RMN ^{19}F obtenus après dissolution dans une solution aqueuse à 1.5N en NaOH des nanoparticules Np(fluo)7, Np(fluo)8 et Np(fluo)9 greffées avec le composé 15 en présence de différents catalyseurs

Contrairement au greffage du composé **16**, nous remarquons que l'efficacité du greffage dépend fortement du catalyseur utilisé. En milieu TFA, aucun greffage n'est détecté alors que la catalyse à l'AcOH aboutit à de très bons résultats avec des charges en peptide de 15 µmol/g et 13 µmol/g pour les composés **14** et **15** respectivement. La catalyse basique, quant à elle, permet également le greffage mais avec des charges relativement moins importantes que celles obtenues lors de la catalyse à l'AcOH, de l'ordre de 1 µmol/g pour le composé **15** et 5 µmol/g pour le composé **14**.

Cette différence de réactivité entre le composé **16** et les composés **14** et **15** peut s'expliquer par les phénomènes de répulsions électrostatiques entre la nanoparticule et les hybrides. Des explications sur l'influence du catalyseur sur le greffage des peptides hybrides sont données au paragraphe II.5.3.3. Le choix de la catalyse se portera donc sur l'AcOH lors des prochains greffages.

II.5.3.1. Influence de la charge du composé hybride sur l'efficacité de son greffage

Nous avons utilisé comme modèle de greffage l'APTES, chargé positivement à pH acide. Celui-ci a été greffé sur les nanoparticules en présence de différents catalyseurs à une concentration de 5 mmol/L dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les nanoparticules Np(fluo)1, Np(fluo)2 et Np(fluo)3. La réussite du greffage de l'APTES sur les nanoparticules a pu être vérifiée par l'utilisation du test colorimétrique qualitatif au TNBS (acide trinitrobenzène sulfonique). La réaction entre le TNBS et une amine conduit à un produit de couleur rouge, ce test de routine est utilisé en SPPS pour vérifier qualitativement la réussite d'une réaction de couplage. Les résultats sont consignés dans le

Tableau 8.

Composé greffé	**Conditions de greffage**		
	DMF TFA 1%v/v	**DMF AcOH 1%v/v**	**DMF DIEA 1%v/v**
	pH<1	**4<pH<5**	**pH>9**
APTES	**Np(fluo)11**	**Np(fluo)12**	**Np(fluo)13**
Test TNBS	**negatif**	**positif**	**positif**

Tableau 8: Etude du greffage de l'APTS sur les nanoparticules de silice en présence de différents catalyseurs

Ce résultat est en accord avec les études de greffage des composés **14** et **15** puisque l'APTES ne se greffe qu'en présence de DIEA ou d'acide acétique mais pas en présence de TFA.

Cette expérience montre l'importance de l'état de charge de la molécule à greffer et par conséquent des points isoélectriques (PI). Le PI de la silice se situe entre 2 et 3.[b] Elle est donc chargée positivement en présence de TFA alors qu'en présence d'AcOH ou de DIEA elle est chargée négativement. En revanche, l'APTES est chargé positivement en présence d'acides et proche de la neutralité en présence de DIEA (pka=10). Le composé **16** est neutre dans tous les cas.

En milieu TFA, la charge positive de la silice et de l'APTES engendre des répulsions et le greffage ne peut donc pas se faire, ou difficilement. En présence d'acide acétique, la silice est chargée négativement alors que l'APTES est chargé positivement, ce qui favorise le greffage. En milieu DIEA, la silice est chargée négativement et l'APTES est proche de la neutralité, le greffage est également possible. Dans le cas d'une molécule non chargée comme le composé **16**, le greffage est possible quelque soit le pH. Les peptides NRP et RGD se comportent globalement de la même manière que l'APTES et se greffent dans les mêmes conditions.

II.5.3.2. Greffage en mélange

Maintenant que les conditions de réactions on été optimisées, nous allons procéder au greffage en mélange de deux peptides.

Les nanoparticules greffées avec les peptides d'intérêt sont désignées par une nomenclature spécifique pour faciliter leur identification et la lecture de ce document. (Figure 35).

$$A_F^{x}{}_{\mathbf{14/15}}$$

Figure 35: Nomenclature de nanoparticules fonctionnalisées. La lettre majuscule identifie la famille (A, B ou C), le nombre x en exposant identifie la charge en peptide théorique (µmol/g), les nombres en indice 14 et 15 se rapportent au ratio théorique des peptides hybride 14 et 15. La lettre F en indice indique la présence de sonde fluorée

Cinq ratios **14/15** ont été sélectionnés : 0/100, 25/75, 50/50, 75/25, 100/0.

Les deux peptides hybrides **14** et **15** sont mis séparément en solution dans DMF/AcOH (1% ; v/v) à une concentration finale de 1.25 mmol/L. Ces deux solutions 'stock' permettent de prélever les volumes correspondants au ratio désiré pour chaque mélange. Les nanoparticules sont ajoutées à chaque mélange et laissées sous agitation dans les mêmes conditions que précédemment. Par exemple, pour le ratio 50/50, 1 mL de la solution de peptide hybride **14** (RGD) et 1 mL de la solution de peptide hybride **15** (NRP) sont mélangés pour obtenir 2 mL de solution dans laquelle sont ajoutées les nanoparticules.

Après traitement et isolement, nous obtenons cinq lots de nanoparticules : $\mathbf{A_F^{25}{}_{0/100}}$, $\mathbf{A_F^{25}{}_{25/75}}$, $\mathbf{A_F^{25}{}_{50/50}}$, $\mathbf{A_F^{25}{}_{75/25}}$, $\mathbf{A_F^{25}{}_{100/0}}$

[b] Notre réaction se déroulant dans le DMF (solvant aprotique polaire), aucun point isoélectrique n'a été déterminé et nous nous sommes basés sur les points isoélectriques dans l'eau.

Enfin environ 50mg de chaque lot de nanoparticules sont dissouts dans 600 µL puis analysés par RMN du fluor. Les spectres correspondant aux rapports peptidiques 25/75, 50/50 et 75/25 indiquent bien la présence de deux pics à -64 et -117 ppm (Figure 36); les quantifications sont reportées dans le Tableau 9.

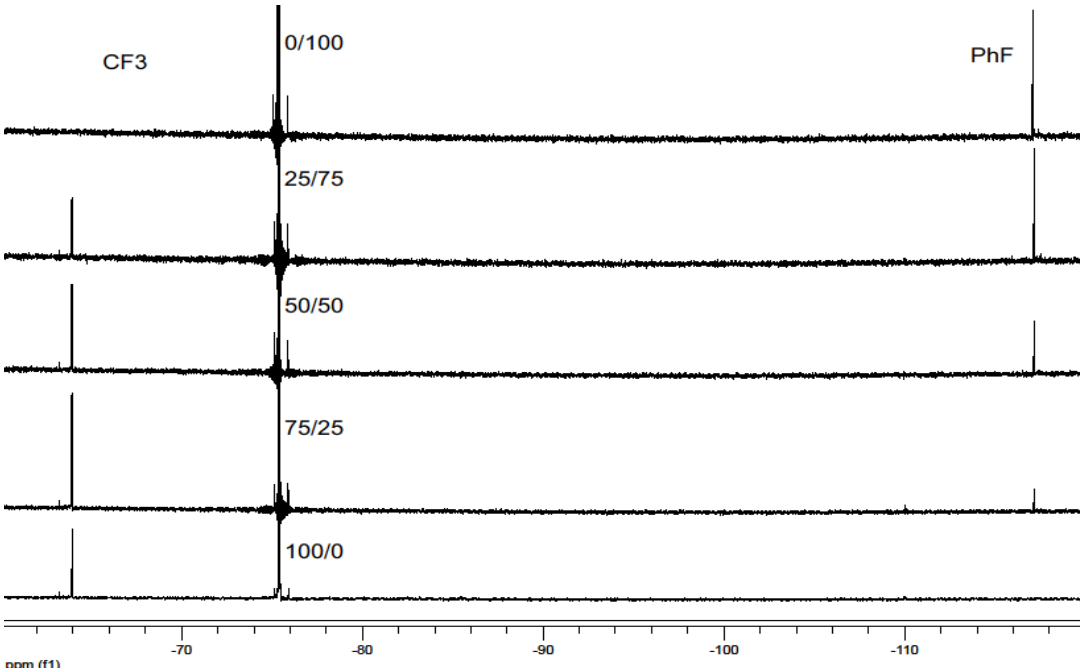


Figure 36: Spectres RMN ^{19}F des nanoparticules greffées avec différents ratios 14/15

Ref	Ratios théoriques 14/15	Ratios déterminés[a]	Densité de greffage théorique (µmol/g)	Densité de greffage déterminé[a] (µmol/g)	Nbre de peptide/Np[b]
$A_F^{25}{}_{0/100}$	0/100	0/100		8.6	389
$A_F^{25}{}_{25/75}$	25/75	25/75		11.4	516
$A_F^{25}{}_{50/50}$	50/50	42/58	25	10	452
$A_F^{25}{}_{75/25}$	75/25	65/35		9.9	448
$A_F^{25}{}_{100/0}$	100/0	100/0		8.9	403

Tableau 9: [a] par la méthode ERETIC; [b] le calcul est détaillé en partie expérimentale

Les ratios **14/15** obtenus par RMN du fluor sont très proches de ceux théoriquement attendus. Cette expérience valide donc l'hypothèse proposée précédemment, à savoir, le rapport des concentrations de peptides hybrides dans la solution de greffage est quasiment identique au ratio des peptides greffés sur les nanoparticules.

Les charges en peptide sont environ 2.5 fois inférieures à la charge théorique calculée (entre 8.6 et 11.4 µmol/g vs 25 µmol/g théoriquement). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat :

- le temps de greffage n'est pas suffisant pour un rendement maximal.
- la quantité de peptide dans la poudre a été sur estimée (présence de sels).

- une partie des peptides hybrides ont polycondensé de façon intermoléculaire pour aboutir à des agrégats solubles qui restent en solution lors des étapes de centrifugation.
- la surface de la nanoparticule est saturée.

Cette série d'expériences confirme que la réactivité des deux peptides est relativement semblable, et surtout que les ratios des peptides sur les nanoparticules peuvent être parfaitement contrôlés en utilisant un mélange de peptides silylés dont le rapport des concentrations en solution est le même que le ratio désiré sur les nanoparticules. Le rendement de greffage que nous pouvons espérer est de l'ordre de 40 % en 12h. Des études complémentaires ont été réalisées en étudiant la fluorescence de nanoparticules greffées à différents temps par un fluorophore et ont montré que le greffage sur nanoparticules est maximal après 8h de réaction (résultats non présentés dans ce manuscrit).

II.5.3.3. Saturation de la surface

Afin de déterminer si la surface de la nanoparticule est saturée, nous réalisons une expérience où le composé **16** est greffé sur les nanoparticules à une concentration beaucoup plus élevée par une catalyse à l'AcOH. Ainsi le composé **16** est dissout à une concentration de 30 mmol/L dans une solution de DMF 1 % AcOH, puis 2 mL de cette solution est ajoutée à 100 mg de nanoparticule. Après réaction, les nanoparticules **Np(fluo)10** sont lavées, pesées et analysées par RMN. La concentration en composé **16** calculée dans le tube RMN est de 7.5 mmol/L correspondant à une densité en peptide de 64 µmol/g (2898 molécules/Np, 0.6 molécule/nm^2). Si la réaction avait été totale, la charge en composé **16** aurait été de 600 µmol/g. La saturation de la surface des nanoparticules semble être environ 65 µmol/g pour le composé **16** sachant que sa taille est beaucoup plus faible que les composés peptidiques utilisés.

II.5.4. Première génération de nanoparticules

Plusieurs lots de nanoparticules fluorescentes ont été synthétisés par cette méthode pour la réalisation de tests *in vitro*. Des nanoparticules avec différentes charges en peptide: 25, 2.5, 0.25 µmol/g (charge théorique) et différents rapports **7**/**10** (les 5 ratios présentés précédemment) ont été préparées. Après incubation avec diverses lignées cellulaires (cancéreuses ou non cancéreuses), ces nanoparticules ont été étudiées par cytométrie de flux (voir paragraphe II.4.5.3.4) afin de sélectionner les plus efficaces et sélectives qui sont finalement utilisées pour des tests *in vivo* sur la souris. Cette génération de nanoparticules est désignée par la nomenclature suivante (Figure 37).

$$A^{x}_{7/10}$$

Figure 37: Nomenclature de nanoparticules fonctionnalisées. La lettre majuscule identifie la famille (A, B, C), le nombre en x exposant la charge en peptide théorique (µmol/g), les nombres en indice désignent le ratio théorique des peptides

II.5.4.1. Préparations des nanoparticules de type A pour les tests *in vitro*

Les peptides hybrides **7** et **10** sont dissouts séparément à 3 concentrations différentes (1.25, 0.125 et 0.0125 mmol/L) dans une solution de DMF/AcOH 1 %. Les six solutions sont utilisées comme décrit au chapitre II.5.3.4 pour obtenir les rapports **7**/**10** désirés pour chaque concentration. Après réaction les nanoparticules sont récupérées par filtration, lavées et lyophilisées avant de procéder aux tests in vitro.

On obtient donc 15 types de nanoparticules différentes répertoriées dans le Tableau 10**.**

ref	ratio	Loading(µmol/g)
$A^{0,25}_{100/0}$	100/0	
$A^{0,25}_{75/25}$	75/25	
$A^{0,25}_{50/50}$	50/50	2.5
$A^{0,25}_{25/75}$	25/75	
$A^{0,25}_{0/100}$	0/100	
$A^{2,5}_{100/0}$	100/0	
$A^{2,5}_{75/25}$	75/25	
$A^{2,5}_{50/50}$	50/50	2.5
$A^{2,5}_{25/75}$	25/75	
$A^{2,5}_{0/100}$	0/100	
$A^{25}_{100/0}$	100/0	
$A^{25}_{75/25}$	75/25	
$A^{25}_{50/50}$	50/50	25
$A^{25}_{25/75}$	25/75	
$A^{25}_{0/100}$	0/100	

Tableau 10: Nanoparticules de la famille A greffées par les composés 7 et 10

II.5.4.2. Test in vitro de la famille A

Les tests in vitro ont été réalisés à l'institut Albert Bonniot, dans l'équipe du Dr. Jean Luc Coll. Tao Jia, étudiant en thèse de doctorat au sein du groupe du Dr. Coll, a réalisé une étude de cytométrie de flux portant sur neuf lignées cellulaires cancéreuses ou non.

La cytométrie de flux permet de quantifier la fluorescence présente sur chaque cellule et ainsi estimer l'efficacité de ciblage d'un composé ou d'un objet fluorescent, dans notre cas des nanoparticules de silice. Cette méthode ne permet pas de donner des constantes d'affinité mais permet de comparer les nanoparticules entre elles. Elle est en ce sens, semi-quantitative.

Afin d'utiliser la même quantité de nanoparticules pour chaque expérience, la concentration des différents lots de nanoparticules a été normalisée par mesure de fluorescence. Les nanoparticules sont mises en solution à une concentration de 1 nM en nanoparticules dans un tampon PBS. Un cycle de sonication de 3x2 min est nécessaire pour obtenir une solution homogène. Puis 1 mL de solution est ajouté à une lignée cellulaire (environ 200 000 cellules) et incubé pendant 30 min à 37 °C sous atmosphère contrôlée. La solution est alors centrifugée dans un tube falcon équipé d'un filtre permettant de séparer la solution des cellules. Les cellules sont lavées trois fois par du PBS, puis dispersées dans 1 mL de tampon PBS et laissées au repos pendant 1h30 avant de procéder aux analyses FACS.

Les données FACS peuvent être présentées sous forme d'un histogramme. Sur l'axe des abscisses, nous reportons l'intensité de fluorescence donnée en échelle logarithmique. Sur l'axe des ordonnés, est reporté le nombre de cellules détectées par l'appareil (Figure 38).

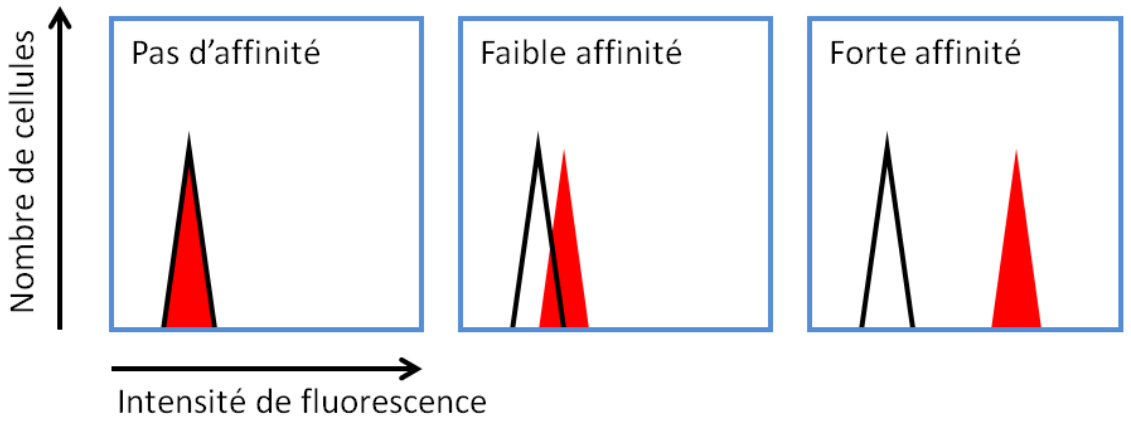
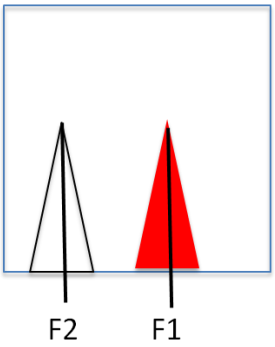


Figure 38: Représentation schématique d'histogrammes issus d'analyses FACS

La courbe noire correspond à la détection de cellules non traitées (auto-fluorescence). La courbe rouge correspond à la détection de cellules après incubation avec les nanoparticules. Leur fluorescence augmente par liaison avec les NPs fluorescentes. Ainsi plus l'écart entre la courbe noire et la courbe rouge est grand, plus l'affinité des nanoparticules vis-à-vis des cellules est forte.

Il est également possible à partir des histogrammes de déterminer une valeur, sans dimension, représentative de l'augmentation de fluorescence des cellules et donc de leur affinité pour les nanoparticules. Cette valeur est appelée MFI pour *Mediam Fluorescence Intensity*. La MFI permet de comparer les différents lots de nanoparticules plus facilement. Elle est obtenue par la formule présentée sur la Figure 39.



$$MFI = \frac{F1}{F2}$$

Figure 39: Calcul de la MFI à partir d'un histogramme. F1 correspond à la fluorescence des cellules après incubation avec les nanoparticules F2 correspond à l'auto-fluorescence des cellules

Les neuf lignées cellulaires étudiées sont reportées dans le Tableau 11. Elles expriment à différents niveaux les récepteurs NRP-1 et $\alpha_v\beta_3$.

Nom	Tissu d'origine	NRP-1	$\alpha_v\beta_3$
3T3	cellule fibroblaste de souris	non	non
HUVEC	cellule humaine endothéliale	oui	oui
EA.hy924	cellule endothéliale modifiée	oui	oui
M21	cellule humaine de mélanome	faible	oui
M21L	cellule humaine de mélanome	non	non
MDA-MB-231	cellule humaine de cancer du sein	oui	faible
SKBR3	cellule humaine de cancer du sein	oui	non
PANC-1	cellule épithéliale de carcinome pancréatique humain	oui	faible
H358	cellule humaine de cancer du poumon	oui	non

Tableau 11 : Caractéristiques des lignées cellulaires utilisées pour les tests *in vitro*

Dans ce manuscrit, seuls les résultats obtenus avec la lignée cellulaire HUVEC exprimant les récepteurs NRP-1 et $\alpha_v\beta_3$ sont présentés.

La Figure 40 présente les histogrammes FACS obtenus après incubation des nanoparticules $\mathbf{A^{25}}_{100/0}$, $\mathbf{A^{2.5}}_{100/0}$ et $\mathbf{A^{0.25}}_{100/0}$ présentant uniquement le composé **7** sur leur surface avec les cellules HUVEC.

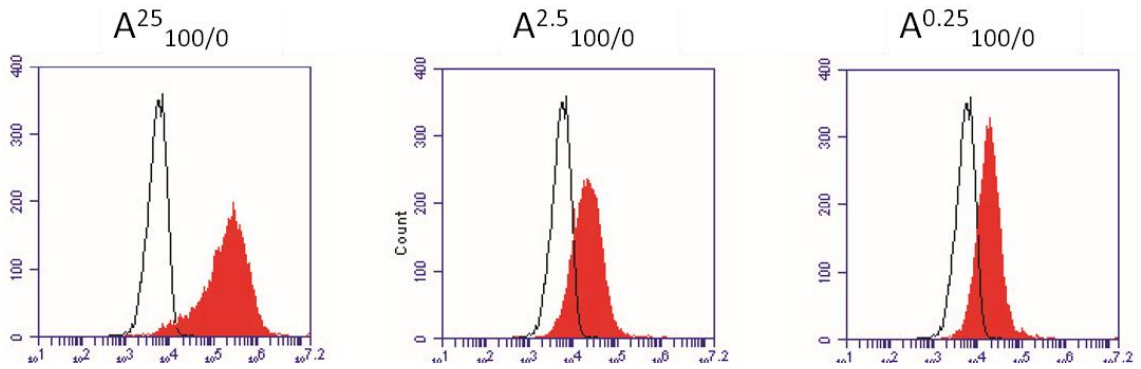


Figure 40: Comparaison des analyses FACS des nanoparticules de la famille A à charge variable et ratio 7/10 constant= 100/0 avec les cellules HUVEC

Dans cette série d'expérience, seule la densité de peptide varie. On constate que l'affinité pour cette lignée cellulaire augmente avec la densité en peptide.

Cependant, lorsque nous réalisons la même expérience de cytométrie de flux avec une nanoparticule non greffée **A^0**, nous remarquons une augmentation de la fluorescence des cellules, signe que les NPs s'accrochent sur les cellules (Figure 41).

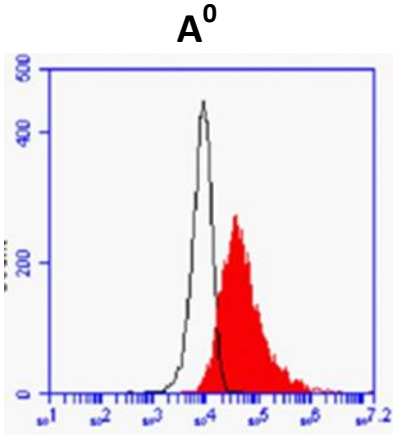


Figure 41: Analyse FACS des nanoparticules A^0 avec les cellules HUVEC

Cette réponse non spécifique est due à des interactions électrostatiques entre la surface de la nanoparticule et la membrane cellulaire. Cette adsorption non spécifique a déjà été observée dans différentes études.[159] A pH physiologique, il devrait y avoir très peu d'interactions voire des répulsions entre la membrane et la particule car la silice et la membrane cellulaire sont chargées négativement. Ce phénomène peut toutefois s'expliquer par la présence de protéines et glyco protéines à la surface de la cellule présentant des charges locales positives qui peuvent interagir avec la nanoparticule chargée négativement. La charge négative de la nanoparticule **A^0** est confirmée par son potentiel zêta dans du tampon PBS avec une valeur de -26 mV.

Pour remédier à cette adsorption non spécifique, nous nous sommes proposés de « neutraliser » la charge de la nanoparticule avant de l'utiliser pour des études biologiques

en greffant des molécules qui améliorent son caractère furtif tout en y associant des ligands pour conserver une bonne affinité et spécificité vis-à-vis des cellules cancéreuses.

La NP $\mathbf{A^{0.25}_{100/0}}$ porte très peu de peptides à sa surface (5 peptides). Or, elle présente une liaison plus faible que la nanoparticule $\mathbf{A^0}$, mais nous pouvons espérer que cette liaison soit spécifique. Ce résultat est encourageant et montre que le fait de greffer une molécule, même en faible quantité, à la surface de la Np de silice permet d'éliminer sa non-spécificité.

II.5.4.3. Mise au point de particules furtives : type B

Nous avons choisi de fonctionnaliser la surface de la silice avec des chaines de polyethylène glycol (PEG) connu pour ses propriétés d'anti adhésion (voir paragraphe II.4.6.2). Du PEG de masse moléculaire de 2000 Da a été sélectionné. Celui-ci est disponible commercialement sous la forme de PEG_{2000}-$Si(OEt)_3$ qui pourra être greffé dans les mêmes conditions que les peptides hybrides.

Au préalable, nous avons voulu déterminer la quantité précise de PEG que nous pouvons greffer sur les nanoparticules. A cette fin, nous avons utilisé la même stratégie reposant sur la méthode RMN du fluor ERETIC en utilisant un analogue fluoré du PEG. Le composé **17** a été obtenu en 3 étapes à partir d'un PEG aminoacide de masse moléculaire de 1800 g/mol protégé par un groupement Fmoc. Après couplage avec la 3-fluoro propylamine, la fonction amine est libérée par un traitement à la pipéridine puis l'ICPTES est ajouté pour obtenir le composé **17** avec 53 % de rendement global (Schéma 15).

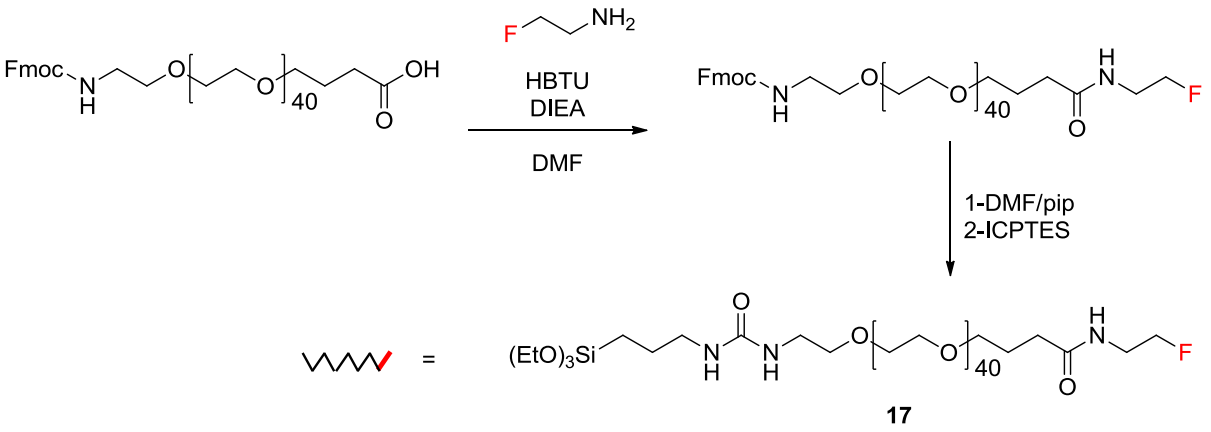


Schéma 15: Synthèse du composé 17

Le composé **17** est mis en solution dans DMF/AcOH 1 % à 5 mmol/L et greffé sur les nanoparticules dans les mêmes conditions que précédemment pour obtenir après lavage, centrifugation et lyophilysation les nanoparticules pegylées $\mathbf{B_F^0}$.

Les nanoparticules $\mathbf{B_F^0}$ sont caractérisées par analyse élémentaire et DLS, les résultats sont comparés au lot de nanoparticule $\mathbf{A^0}$ dans le Tableau 12.

ref	%N	%C	%O	%H	DLS taille (pdi)	Potentiel zêta (mV)	Densité de greffage[a] (µmol/g)	Densité de greffage[b] (µmol/g)
A^0	0.28	4.26	6.17	1.65	79 (.0124)	-28	0	0
B_F^0	0.50	8.20	8.64	2.31	83 (0.110)	-20	35	5

Tableau 12: Caractérisation des nanoparticules A^0 et B_F^0. [a] densité de greffage déterminé à partir du %C, [b] densité de greffage déterminé par RMN

Nous remarquons une augmentation importante des %C, %O et %H des nanoparticules **B_F^0** par rapport aux nanoparticules **A^0.** Cependant en se basant sur le %C, nous trouvons une densité de greffage du composé **17** de 35 µmol/g (la densité de greffage est sur évaluée par cette méthode). L'analyse DLS ne montre pas de différence de taille significative entre les nanoparticules **A^0** et **B_F^0** laissant supposer que le PEG ne forme pas une couronne déployée (« *mushroom like* ») autour de la particule mais se présente plutôt sous une géométrie aplatie et collée à la surface de la nanoparticule (« *brush like* »). Comme attendu, le potentiel zêta des particules pegylées montre une charge négative moins prononcée des nanoparticules **B_F^0** de part la couche de PEG qui masque la charge négative de la silice.

Pour vérifier ces analyses, une quantification RMN est réalisée. Les nanoparticules **B_F^0** sont dissoutes dans une solution aqueuse à 1.5N en NaOH avant d'être analysées par RMN du fluor (Figure 42). Le pic à -121 ppm correspond au composé **17** présent à une concentration de 0.42 mmol/L et permet de remonter à une densité de greffage de 5 µmol/g, ce qui correspondant à 226 molécules de PEG par nanoparticule (soit 0.05 molécules par nm^2), sachant que la densité de greffage théorique maximale était de 100 µmol/g.

Cette valeur est cependant très différente de la valeur déterminée par analyse élémentaire et est beaucoup plus proche de la réalité.

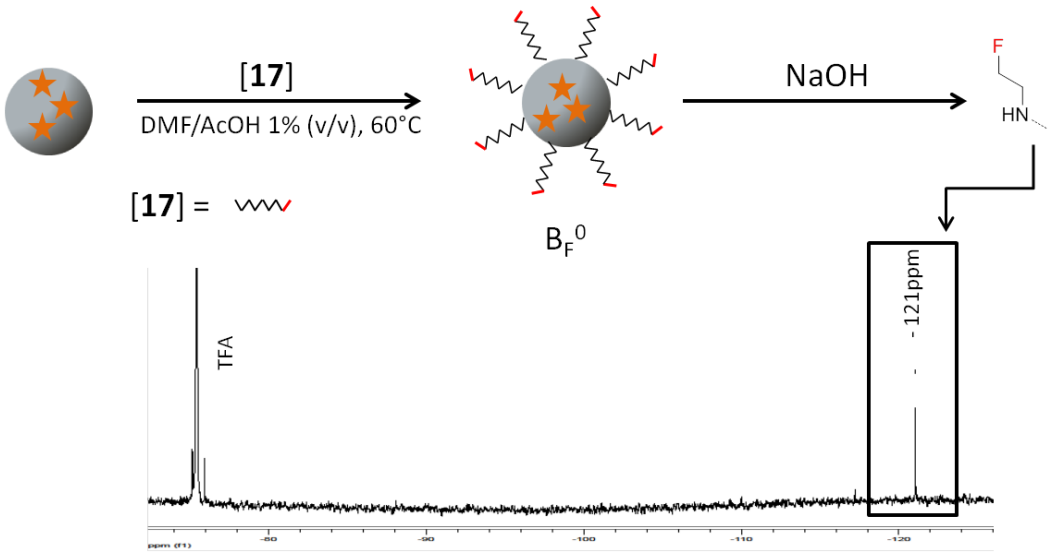


Figure 42:Spectre RMN ^{19}F de la nanoparticule B_F^0

Pour les tests *in vitro*, le composé **18** PEG_{2000}-$Si(OEt)_3$ est dissout à une concentration de 5 mmol/L et greffé sur les nanoparticules de silice dans les mêmes conditions que précédemment pour obtenir le lot de nanoparticules $\mathbf{B^0}$ (Figure 43). La réussite de la réaction est confirmée par les analyses élémentaires.

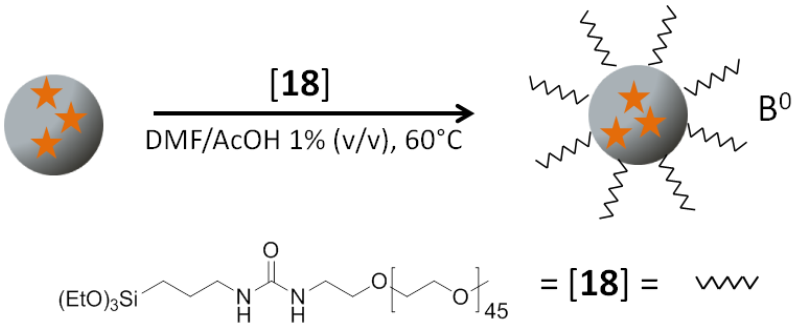


Figure 43: Synthèse des nanoparticules B^0

Les études FACS des nanoparticules $\mathbf{B^0}$ vis-à-vis des cellules MDA-MB-231 montrent qu'il n'y a aucune liaison des particules sur les cellules (Figure 44). L'interaction non spécifique des nanoparticules $\mathbf{A^0}$ a pu être supprimée par un « masque » de PEG.

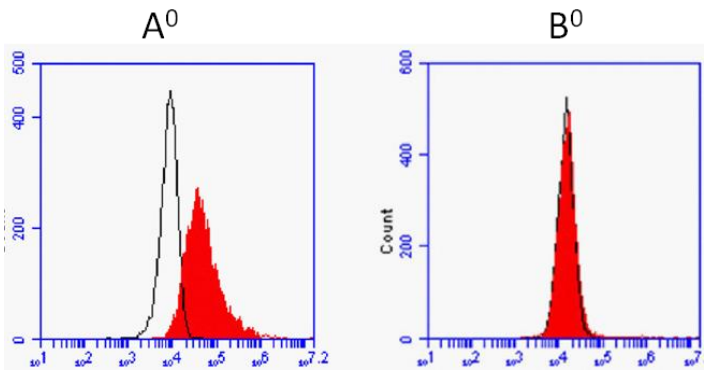


Figure 44: Analyses FACS des nanoparticules A^0 et B^0 sur MDA-MB-231

II.5.5. Deuxième génération de nanoparticules

L'étude précédente nous a montré qu'il est possible d'utiliser un agent de furtivité pour remédier à l'adsorption non spécifique des nanoparticules sur les cellules, ce qui est tout à fait en accord avec la littérature (voir paragraphe II.4.6.2). Ainsi deux nouvelles familles de nanoparticules B et C, incluant des ligands peptidiques et une couche de PEG ont été préparées.

II.5.5.1. Nanoparticules de type B

La famille B est obtenue à partir de la famille A qui présente déjà les peptides à sa surface. Des chaines de PEG_{2000} silylées sont greffées et peuvent « combler » les espaces vides entre les peptides (Figure 45).

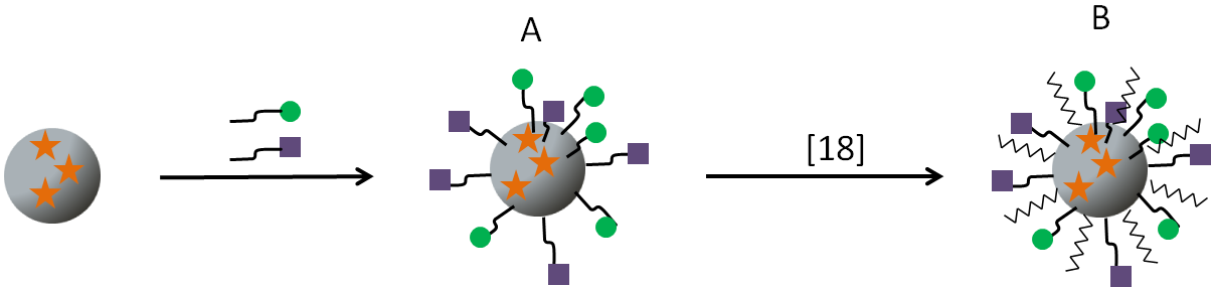


Figure 45: Synthèse des nanoparticules de la famille B

Afin de montrer que la surface de la nanoparticule n'est pas totalement saturée après le greffage des peptides, des analyses de RMN du fluor ont été réalisées sur des nanoparticules de type B greffées avec du PEG hybride fluoré. Pour cela, deux lots de nanoparticules fonctionnalisées par les peptides **14** et **15** dans un ratio 50/50 à deux concentrations différentes théoriques ($\mathbf{A_F}^{25}{}_{50/50}$ et $\mathbf{A_F}^{2.5}{}_{50/50}$) ont été greffées avec le composé **17** pour obtenir les nanoparticules $\mathbf{B_F}^{25}{}_{50/50}$ et $\mathbf{B_F}^{2.5}{}_{50/50}$ respectivement. Après dissolution dans une solution aqueuse à 1.5N en NaOH, elles sont analysées par RMN ^{19}F. La Figure 46 présente le spectre RMN ^{19}F obtenu pour la nanoparticule $\mathbf{B_F}^{25}{}_{50/50}$.

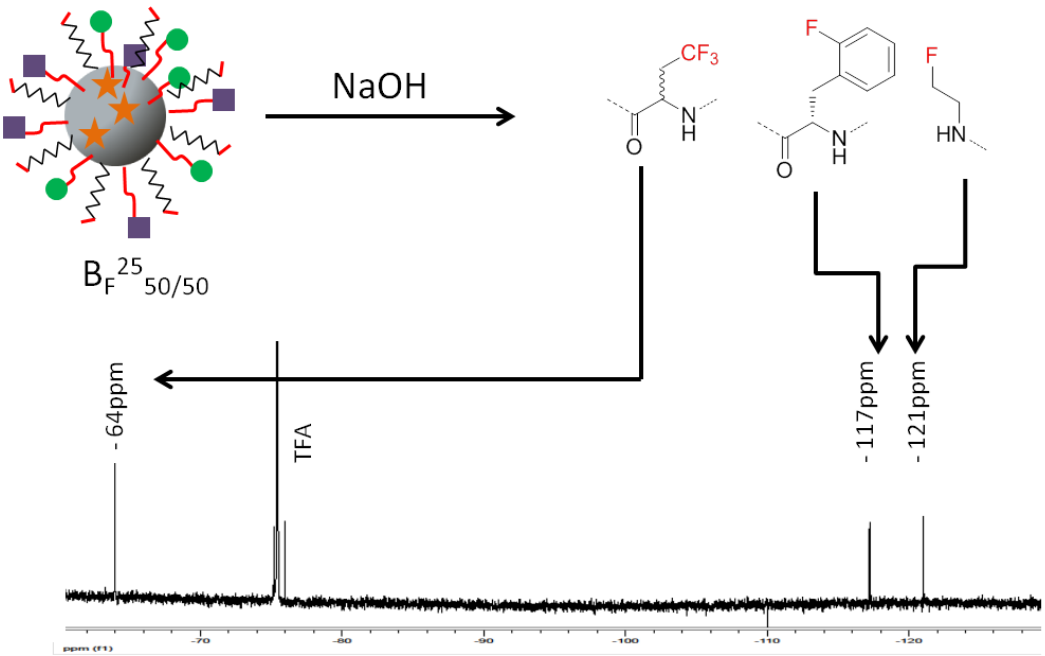


Figure 46: Spectre RMN ^{19}F de la nanoparticule $B_F^{25}{}_{50/50}$ après dissolution dans une solution à 1.5N de NaOH

Comme attendu, on trouve trois pics correspondants aux groupements fluor des composés **14**, **15** et **17.** En revanche, le spectre obtenu pour la particule $\mathbf{B_F^{2.5}{}_{50/50}}$ où la quantité de peptide greffé est dix fois plus faible, comporte un pic majoritaire correspondant au PEG **17** mais la résolution du spectre ne permet que de quantifier le peptide hybride **15** détecté en faible quantité. On arrive ici aux limites de quantification de la méthode ERETIC. Les densités de greffage déterminées par RMN sont récapitulées dans le Tableau 13.

	Densité de greffage déterminée (µmol/g)			**Nbre de peptide/NP (14+15)**	**Nbre de PEG par NP**
ref	**14**	**15**	**17 (PEG)**		
$\mathbf{B_F^0}$	0	0	5.0	0	226
$\mathbf{B_F^{25}{}_{50/50}}$	2.13	3.23	3.15	96 + 146	142
$\mathbf{B_F^{2,5}{}_{50/50}}$	n.d.	0.8	4.9	n.d. + 36	221

Tableau 13: Densité de greffage (µmol/g) des composés 14, 15 et 17 sur les nanoparticules B_F^0, $B_F^{25}{}_{50/50}$ et $B_F^{2.5}{}_{50/50}$; n.d.= non détecté

Sur la nanoparticule $\mathbf{B_F^{2.5}{}_{50/50}}$, le composé PEG **17** est quantifié à 4.9 µmol/g, ce qui est quasiment équivalent à la quantité de PEG présente sur la nanoparticule $\mathbf{B_F^0}$ (5.0 µmol/g). Cela semble logique compte tenu de la faible densité de greffage des peptides (théorique 2.5 µmol/g, expérimentale 0.8 µmol/g). En revanche, moins de PEG hybride a pu se greffer sur la nanoparticule $\mathbf{B_F^{25}{}_{50/50}}$ (3.15 µmol/g). La quantité de PEG pouvant être greffée est d'autant plus importante que la densité de greffage en peptide est faible.

Il faut souligner que l'utilisation de trialcoxysilanes permet théoriquement d'obtenir plusieurs couches successives de greffage. En effet, une fois les liaisons siloxanes formées, une autre molécule peut réagir avec la première sans pour autant entrainer une

augmentation de taille. On peut commencer à s'interroger sur la possibilité de former des couches successives si la densité de greffage est élevée (>65µmol/g), mais dans notre cas les densités de greffage sont bien inférieures.

Ayant montré la faisabilité de la synthèse en deux temps de particules pegylées et présentant des ligands peptidiques, nous avons synthétisé 15 lots de nanoparticules de type B, à partir de la famille A et du PEG hybride **18**. Différents ratios de peptide hybrides **7/10** (0/100 25/75, 50/50 ,75/25, 100/0) et différentes charges théoriques (0.25, 2.5 et 25 µmol/g) on été utilisées. Ces nanoparticules sont récapitulées dans le Tableau 14.

ref	ratio	Loading(µmol/g)
$\mathbf{B^{0,25}_{100/0}}$	100/0	
$\mathbf{B^{0,25}_{75/25}}$	75/25	
$\mathbf{B^{0,25}_{50/50}}$	50/50	2.5
$\mathbf{B^{0,25}_{25/75}}$	25/75	
$\mathbf{B^{0,25}_{0/100}}$	0/100	
$\mathbf{B^{2,5}_{100/0}}$	100/0	
$\mathbf{B^{2,5}_{75/25}}$	75/25	
$\mathbf{B^{2,5}_{50/50}}$	50/50	2.5
$\mathbf{B^{2,5}_{25/75}}$	25/75	
$\mathbf{B^{2,5}_{0/100}}$	0/100	
$\mathbf{B^{25}_{100/0}}$	100/0	
$\mathbf{B^{25}_{75/25}}$	75/25	
$\mathbf{B^{25}_{50/50}}$	50/50	25
$\mathbf{B^{25}_{25/75}}$	25/75	
$\mathbf{B^{25}_{0/100}}$	0/100	

Tableau 14: Nanoparticules de la famille B greffées par les composés 7 et 10

L'ensemble de ces lots de NPs a été évalué *in vitro*. Les résultats sont présentés en partie II.5.6.

La longueur des peptides hybrides **7** et **10** est de 3 à 4 nm maximum. Ces peptides sont donc bien plus courts que le PEG 2000 hybride **18** qui peut mesurer 13 nm sous forme dépliée. Les ligands risquent donc d'être enfouis et masqués par la couche de PEG. D'un autre coté, les

analyses de DLS effectuées sur la famille B semblent montrer que le PEG n'est pas déplié mais plutôt aplati à la surface (cf partie II.5.6). Pour analyser l'impact éventuel de ce phénomène, la famille C a été imaginée.

II.5.5.2. Nanoparticules de type C

La famille C est analogue à la famille B mais les peptides hybrides ont un bras espaceur PEG_{3000} à la place de l'espaceur βAla_4 (Figure 47). Cela permet d'allonger la distance entre la nanoparticule et les ligands (environ 19 nm au maximum) pour mieux présenter les ligands qui pourraient donc se placer « au dessus » de la couche de PEG.

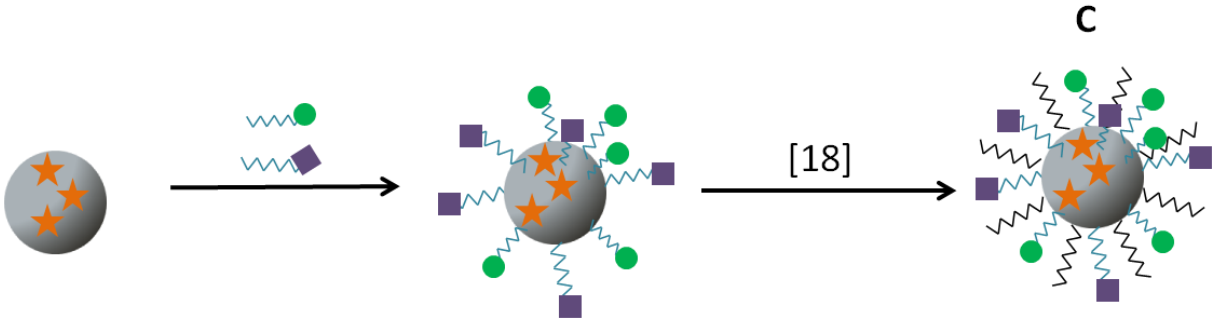


Figure 47: Synthèse des nanoparticules de la famille C

La synthèse de cette dernière famille a nécessité la préparation de nouveaux précurseurs peptides hybrides pegylés **20** et **22**. Le Schéma 16 présente la synthèse du composé **20**, le composé **22** ayant été obtenu de manière analogue. Brièvement, un espaceur Fmoc-PEG_{3000} aminoacide a été couplé en solution sur le coté N-terminal des peptides protégés **6** et **9**. Après déprotection du Fmoc et déprotection des groupements protecteurs des chaînes latérales acido labiles par le TFA, peptides pegylés **19** (NRP) et **21** (RGD) sont obtenus puis purifiés par HPLC préparative. Enfin l'introduction du groupement silane sur la fonction amine terminale du bras PEG a été réalisée dans les mêmes conditions que pour les composés hybrides précédents. Les deux peptides hybrides pegylés **20** et **22** sont obtenus avec un rendement final de 61 % et 52 % respectivement (Tableau 15). Il faut noter que le PEG_{3000} utilisé étant polydisperse, les analyses LC/MS ont été plus délicates à interpréter.

composé	Séquence	Rdt
20	$Si(OEt)_3$-$(CH_2)_3$-NHCONH-PEG_{3000}-CO-ATWLPPR-OH	61%
22	c[RGDfK($Si(OEt)_3$-$(CH_2)_3$-NHCONH-PEG_{3000}-CO-)]	52%

Tableau 15:Rendement et structure des composés 20 et 22

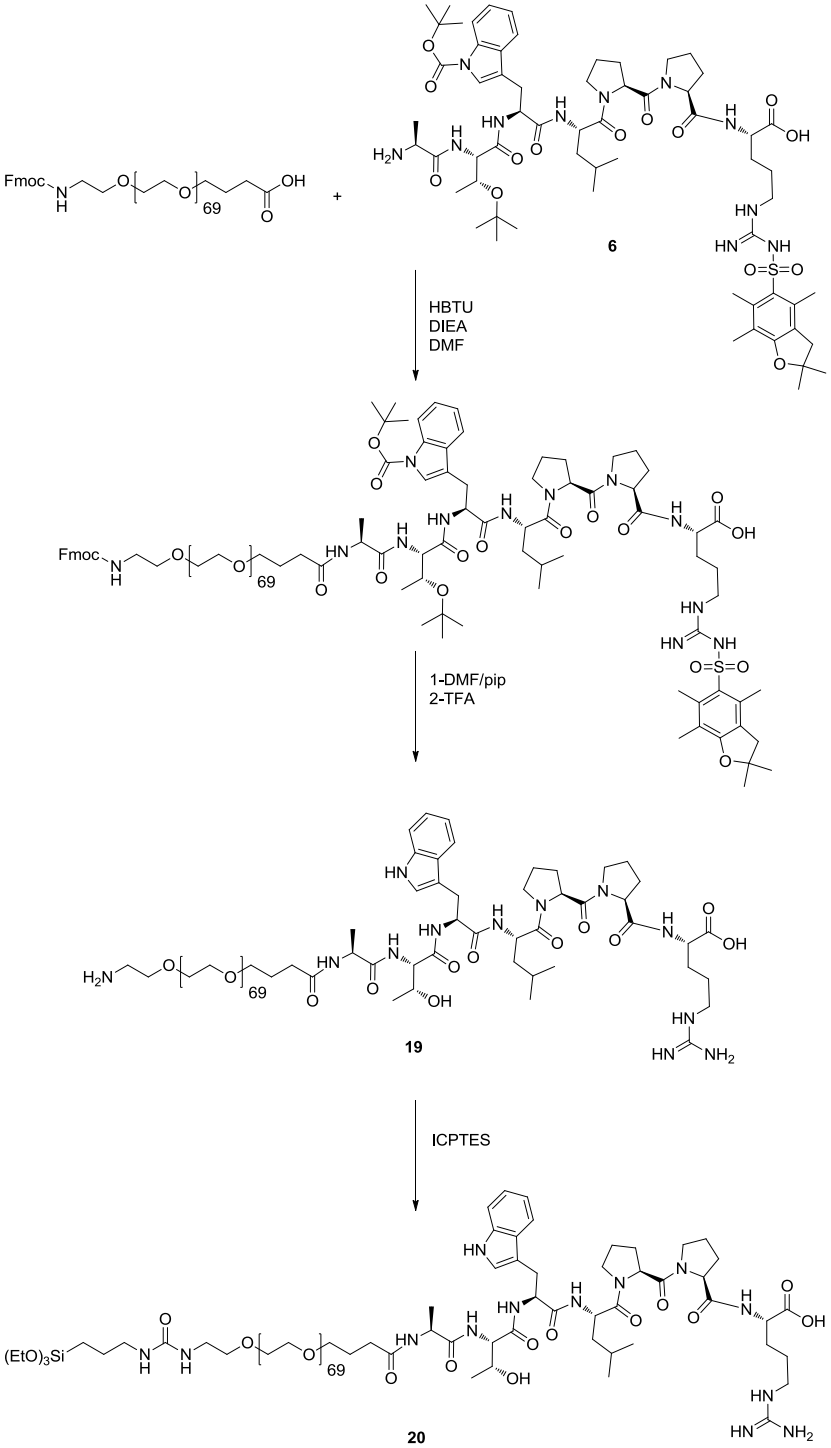


Schéma 16: Synthèse du composé 20

Les composés **19** et **21** ont été caractérisés par LC/MS et MALDI. Seules les caractérisations des composés **19** et **20** sont présentées à titre d'exemple, des résultats comparables ayant été obtenus avec les composés **21** et **22**.

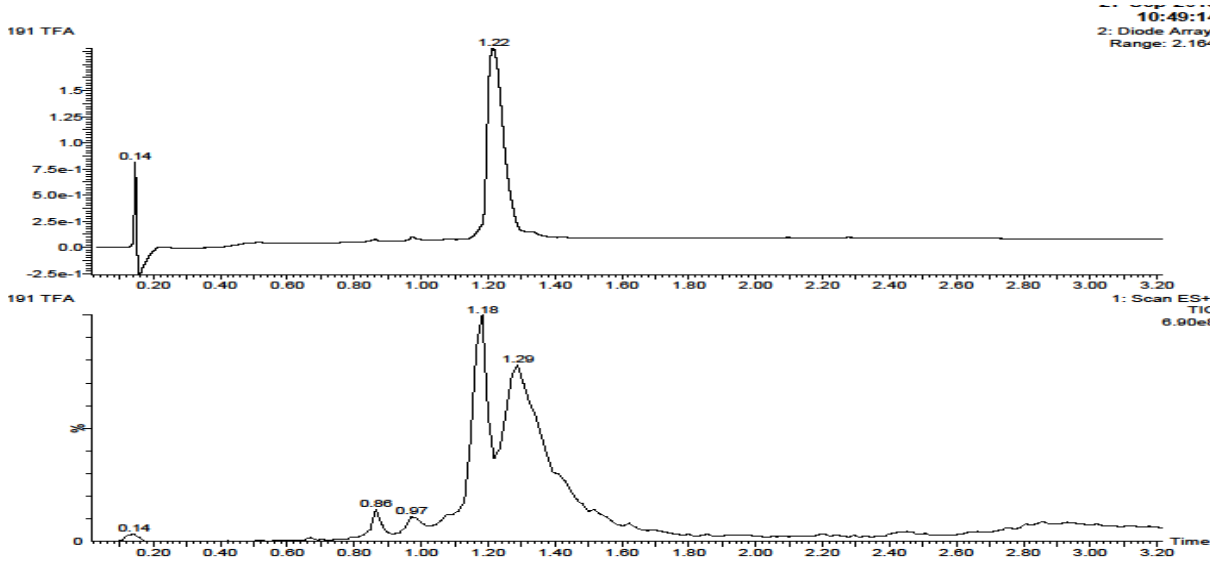


Figure 48 : Chromatogramme UV (λ=214nm) et TIC du composé 19

L'analyse LC/MS du composé 19 (Figure 48) montre un pic majoritaire en UV et en TIC à 1.22 min. Le spectre de masse correspondant présente de très nombreuses espèces multi chargées qui ne sont pas identifiables par spectroscopie de masse ESI. Nous avons donc choisi d'utiliser la spectrométrie de masse MALDI, bien plus adaptée pour la caractérisation de composés pegylés, comme il l'a été montré au sein de notre laboratoire.[161] L'analyse MALDI (Figure 49) de ce même composé montre une enveloppe représentative d'un composé couplé à un polymère PEG (incrément entre chaque ion de 44 Da correspondant à une unité PEG), de masse moléculaire moyenne MWm_{19} = 3950 g/mol. Cette masse est comparée au produit commercial Fmoc-PEG_{3000}-OH de masse moléculaire moyenne MWm = 3385 g/mol. Nous obtenons une différence ΔMWm = MWm_{19}-MWm-MW_{fmoc} = 788 g/mol, ce qui est très proche de la masse molaire du peptide NRP MW_{NRP} = 838 g/mol

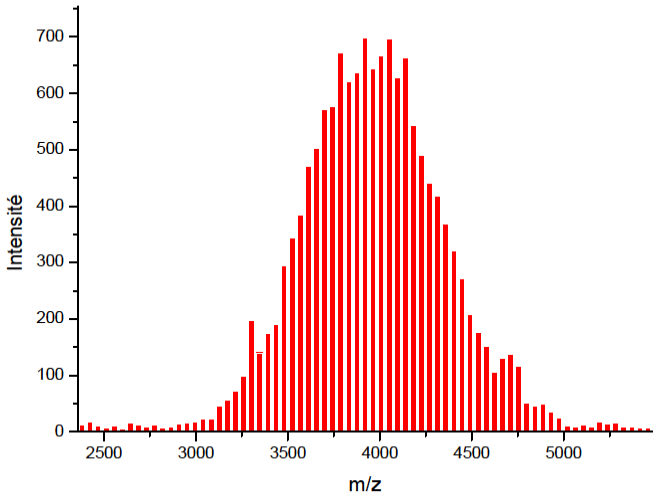


Figure 49: Spectre MALDI TOF du composé 19 analysé dans une matrice HCCA

Les peptides hybrides **20** et **22** ont été greffés sur les nanoparticules dans les mêmes conditions que les greffages précédents (deux densités de greffage 25 et 2.5) puis le PEG

hybride commercial **18** a été greffé dans les mêmes conditions que pour les nanoparticules $\mathbf{B^0}$. 10 lots de particules de type C ont été obtenus et sont résumés dans le Tableau 16. Les caractérisations de ces particules de type **C** sont présentées en partie expérimentale.

ref	ratio	Loading(µmol/g)
$\mathbf{C^{2,5}_{100/0}}$	100/0	
$\mathbf{C^{2,5}_{75/25}}$	75/25	
$\mathbf{C^{2,5}_{50/50}}$	50/50	2.5
$\mathbf{C^{2,5}_{25/75}}$	25/75	
$\mathbf{C^{2,5}_{0/100}}$	0/100	
$\mathbf{C^{25}_{100/0}}$	100/0	
$\mathbf{C^{25}_{75/25}}$	75/25	
$\mathbf{C^{25}_{50/50}}$	50/50	25
$\mathbf{C^{25}_{25/75}}$	25/75	
$\mathbf{C^{25}_{0/100}}$	0/100	

Tableau 16: Nanoparticules de la famille C greffées par les composés 20, 22 et 18

II.5.6. Tests in vitro : Comparaison des types A, B et C

Les nanoparticules des familles A, B et C ont été évaluées *in vitro* par cytométrie de flux. Au total, 40 lots de particules ont été testés (cf. tableaux 9, 13 et 15) sur 9 lignées cellulaires. Les tests ont été menés à l'IAB par T. Jao dans l'équipe du Dr. JL Coll. Par souci de clarté et de concision, seuls certains résultats sont présentés dans cette thèse. La première remarque que nous pouvons faire est que toutes les familles de nanoparticules greffées avec des peptides hybrides ont montré une affinité vis-à-vis des cellules présentant les récepteurs NRP et aux intégrines, supérieure à la nanoparticule non greffée $\mathbf{B^0}$.

Le Tableau 17 représente la MFI pour chaque nanoparticule de chaque famille sur la lignée cellulaire MDA-MB-231. La valeur MFI a été traduite en intensité de rouge pour une lecture plus intuitive et pour obtenir un aperçu global. La couleur blanche ne traduit pas une MFI nulle mais la valeur de MFI la plus faible dans le tableau, à l'opposé de la couleur rouge qui correspond à la valeur de MFI la plus forte.

ref	Ratio RGD/NRP				
	100/0	75/25	50/50	25/75	0/100
$A^{0,25}$					
$A^{2,5}$					
A^{25}					
$B^{2,5}$		△			
B^{25}	△	△	△	△	
$C^{2,5}$					
C^{25}					

Tableau 17: Comparaison de l'affinité des nanoparticules A, B et C sur la lignée cellulaires MDA-MB-231. La MFI est traduite en intensité de rouge. (△ le label est attribué aux lots les plus efficaces)

On remarque que les nanoparticules de type **B** ciblent mieux cette lignée cellulaire que celles de type **C**, elles-mêmes plus efficace que la famille **A**. Plusieurs hypothèses peuvent ainsi être déduites de ce tableau.

Tout d'abord, l'ajout de PEG améliore de manière importante l'efficacité de ciblage, ce qui peut être expliqué par une meilleure solubilité des nanoparticules possédant du PEG mais également par une meilleure présentation des différents ligands. En effet, nous pouvons émettre l'hypothèse que la géométrie adoptée par le ligand sur la nanoparticule est influencée par son environnement proche : la silice dans le cas de la famille **A** et le PEG pour les familles **B** et **C**. Dans le cas de la famille **A**, le peptide chargé positivement à pH physiologique, peut interagir avec la silice (chargée négativement). Cela a pour conséquence de le « coller » à la surface et de restreindre sa liberté de mouvement. Pour les familles **B** et **C** beaucoup moins d'interactions électrostatiques sont possibles grâce à la présence du PEG, et la liberté de mouvement est préservée.

La différence d'affinité observée entre les familles **B** et **C** peut s'expliquer par la structure que prend le PEG sur la nanoparticule. Est-il linéaire (« *brush like* ») ou au contraire collé sur la surface (« *mushroom like* »)? La conformation que prend le PEG sur une surface est fortement influencée par la taille du PEG et par la densité de greffage.[162] Elle peut être décrite à l'aide du rayon de Flory « F » par l'équation suivante :

$$F(nm) = a \times n^{0.6}$$

a = longueur maximale d'un monomère (a = 0.35 nm pour le PEG)
n = nombre de monomère par polymère

Nous considérons qu'une densité de greffage est « faible » si la distance D entre les points d'ancrage de deux polymères est supérieure à F. Les chaines de polymères prennent alors une conformation en champignon (« *mushroom like* »). Au contraire, si la densité de greffage est élevée (D < F) les chaines de polymères prennent une conformation en brosse (« brush like ») (Figure 50). La valeur de F pour un polymère PEG_{2000} est de $F(PEG_{2000})$=3.45nm. Or, la distance entre deux polymères PEG pour notre densité de greffage de 5 µmol/g est de D=18nm. D'après ce calcul et, dans nos conditions, le PEG adopterait une conformation « *mushroom like* ».

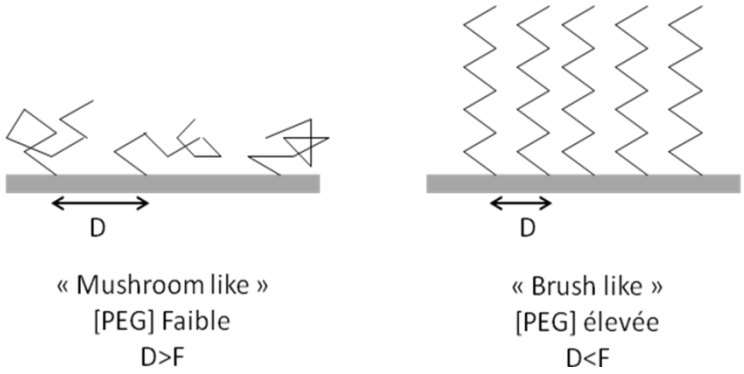


Figure 50:Conformation du PEG sur une surface en fonction de la densité de greffage

Les analyses DLS (voir partie expérimentale) semblent confirmer ces résultats car nous notons très peu de différence de rayon hydrodynamique entre les nanoparticules non greffées $\mathbf{B^0}$ et les $\mathbf{B^{25}}$.

Nous pouvons donc imaginer que le ligand possédant un bras espaceur peptidique peut émerger de cette couche de PEG aplati alors que celui possédant un bras PEG est « noyé » dans cette même couche de PEG, limitant sa liberté de mouvement.

Au terme de ce travail de thèse, le meilleur type de nanoparticules a été déterminé et nous avons convenu en accord avec le groupe de JL Coll, de nous focaliser sur les NPs de type B.

Les cinq lots de particules de la famille **B** ont été testées sur quatre lignées, certaines n'exprimant aucun des deux récepteurs (3T3), d'autres exprimant un des deux (M21 et MDA-MB-231) et d'autres exprimant les deux récepteurs (HUVEC). Les résultats sont présentés dans le Tableau 18.

lignées	Récepteurs exprimés		ref				
	NRP1	integrine	$B^{25}_{100/0}$	$B^{25}_{75/25}$	$B^{25}_{50/50}$	$B^{25}_{25/75}$	$B^{25}_{0/100}$
3T3	✗	✗	10	4	6	9	4
HUVEC	✓	✓	386	337	364	416	123
M21	✗	✓	75	43	76	63	28
MDA-MB-231	✓	✗	34	33	34	35	23

Tableau 18: Affinité des nanoparticules B^{25} pour différentes lignées cellulaires. Le MFI est exprimé en intensité de rouge, le chiffre est la valeur de la MFI

Comme nous pouvions nous y attendre, les particules ne se lient quasiment pas à la lignée 3T3 qui n'exprime aucun des récepteurs. De même, les nanoparticules **B** ont une forte affinité avec la lignée HUVEC qui exprime conjointement les deux récepteurs. Les deux dernières lignées cellulaires M21 et MDA-MB-231, qui n'expriment qu'un des récepteurs sont marquées beaucoup plus faiblement que HUVEC mais plus fortement que 3T3.

Ces résultats mettent en évidence que la fonctionnalisation de nanoparticules par des ligands permet d'améliorer le ciblage *in vitro* de cellules cancéreuses et que les cellules ne présentant pas les récepteurs de ces ligands sont beaucoup moins touchées. Le fait de présenter deux ligands conjointement sur une nanoparticule permet également d'améliorer le ciblage des cellules exprimant les deux récepteurs à la fois.

A ce stade, il reste encore à démontrer la spécificité des ligands utilisés. Pour cela, nous avons synthétisé une nouvelle famille de nanoparticules de type **B** pour laquelle les ligands NRP et RGD ont été remplacés par des ligands non spécifiques (ou *scramble*) **8** et **11**. Cette famille est notée **B'**.

Les peptides hybrides « scramble » **8** et **11** ont été greffés en mélange à la surface des nanoparticules. Le PEG hybride **18** a ensuite été greffé dans les conditions mises au point pour le type **B** (Figure 51). Comme pour les familles précédentes, les nanoparticules ont été caractérisées par analyse élémentaire, DLS et potentiel zêta (voir partie expérimentale).

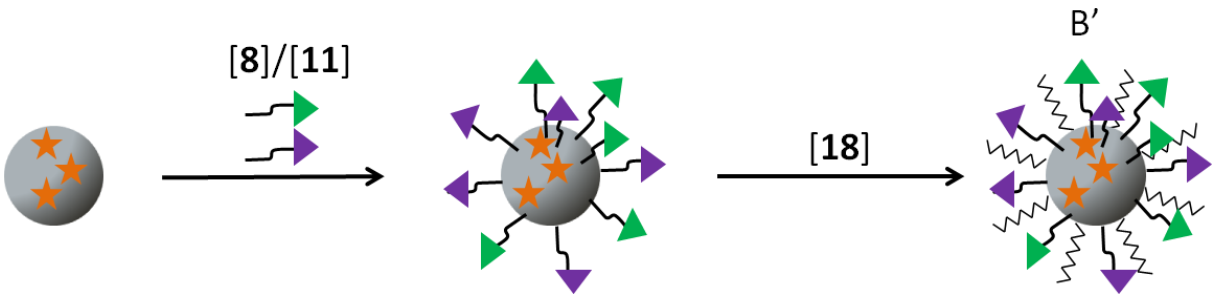


Figure 51: Synthèse des nanoparticules B'

Les particules **B'** ont été comparées avec leurs homologues de type **B** sur la lignée cellulaire HUVEC. Les résultats sont présentés dans le Tableau 19.

	HUVEC		
$B^{0}_{0/0}$	5	$B^{0}_{0/0}$	5
$B^{25}_{100/0}$	431	$B^{25}_{0/100}$	203
$B'^{25}_{100/0}$	89	$B'^{25}_{0/100}$	82

Tableau 19: Comparaison de l'affinité des nanoparticules B^{0}, B^{25} et B'^{25} sur la lignée cellulaire HUVEC

Comme attendu, nous remarquons une différence très nette sur l'efficacité de marquage entre les nanoparticules **B** et **B'**. En effet, les nanoparticules **B'** possédant les ligands « scramble » sont bien moins efficaces que leurs homologues spécifiques. Nous remarquons cependant une plus grande différence entre le composé « RGD » **7** et son peptide « scramble » **8** que pour le peptide « NRP » (**10** et **11**). Cette différence peut s'expliquer par la structure cyclique contrainte du ligand « RGD ». En effet, son homologue « scrambled » possède une béta Alanine à la place de la glycine conduisant à un cycle plus large. Comme nous l'avons déjà évoqué (cf partie II.5.2.2), la taille du cycle a un impact très fort sur l'interaction entre les ligands présentant la séquence RDG et les intégrines. Au contraire, la structure linéaire de la neuropiline est plus « permissive » et les interactions électrostatiques contribuent probablement de façon plus forte à la reconnaissance que pour le système RGD.

Toutes ces expériences nous ont permis de valider notre approche de synthèse, et de choisir une famille de nanoparticules (type **B**) pour procéder aux études *in vivo*. La cyanine 5,5 a été choisie comme fluorophore et différents lots de particules de type **B** (cyan) ont été synthétisés dans les mêmes conditions que précédemment (différents ratio, différentes charges). Les études *in vivo* sont en cours de réalisation et ne peuvent donc pas être présentées dans ce manuscrit.

II.5.6.1. Evaluation du greffage avec des composés hybrides $SiMe_2Cl$ comme alternative aux trialcoxysilanes

Le groupement $SiMe_2Cl$ présente certains avantages par rapport au groupement $Si(OEt)_3$. Comme cela est détaillé dans le chapitre IV, un peptide-$SiMe_2Cl$ peut être purifié plus

facilement qu'un peptide $Si(OEt)_3$. Il est donc intéressant de pouvoir utiliser des peptides hybrides $-SiMe_2Cl$ pour fonctionnaliser des surfaces. Cependant, la formation d'une seule liaison SiOSi au lieu de trois pour les composés $Si(OEt)_3$, laisse quelques interrogations sur la stabilité du greffage. Pour étudier la stabilité du greffage avec un hybride dimethylchloro silane, nous avons préparé le composé **23** en couplant la 4-Fluorobenzyl amine avec l'isocyanatopropyldiméthylchlorosilane (Schéma 17). Le greffage du composé **23** sur les **Np(fluo)** à une concentration de 30 mM dans le DMF en présence d'AcOH a été réalisé pour obtenir le lot de nanoparticule **Np(Fluo)14** qui a été analysé par RMN du fluor, comme précédemment.

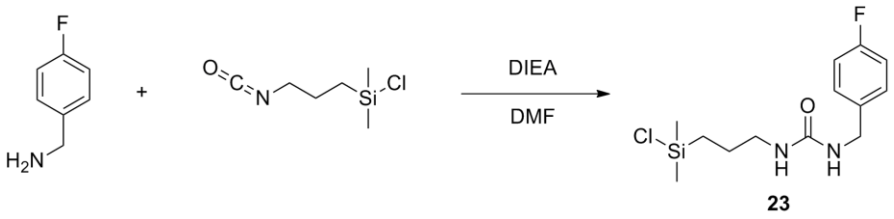


Schéma 17: Synthèse du composé 23

Le spectre RMN indique la réussite du greffage avec une charge en composé **23** de 52 µmol/g. Cette charge est légèrement inférieure à la charge de la nanoparticule **Np(Fluo)10** greffée avec le composé **16** comportant une fonction $Si(OEt)_3$ dans les mêmes conditions (65µmol/g).

Afin de comparer la stabilité des greffages via le dimethylchlorosilane et trialcoxysilane, des nanoparticules **Np(fluo)10** et **Np(fluo)14** ont été incubées dans du tampon PBS . Des nanoparticules ont été prélevées au bout de trois jours et sept jours. Après lavages, le ligand restant sur les nanoparticules a été quantifié par RMN du fluor. Les résultats sont reportés dans la Figure 52.

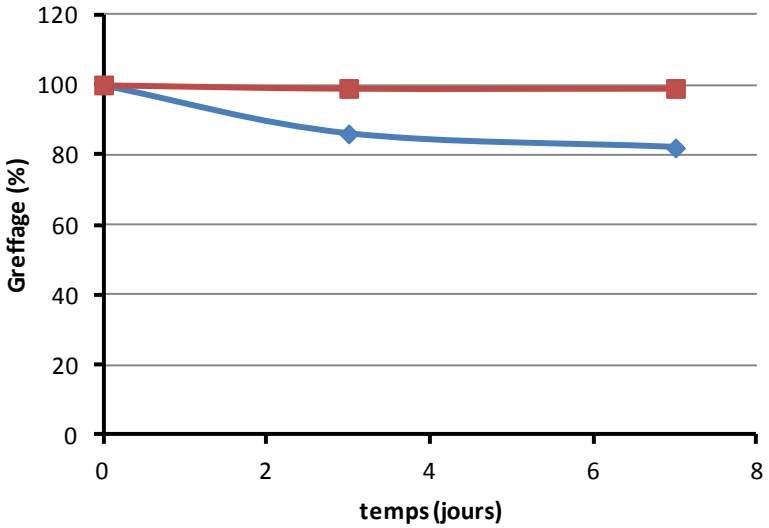


Figure 52: Quantité de composé fluoré restant sur les nanoparticules Np(Fluo)14 en bleu (précurseur dimethyl chlorosilane 23) et les nanoparticules Np(fluo)10 en rouge (précurseur triethoxysilane 16) au cours de l'incubation dans du tampon PBS pH 7.4

Nous remarquons que la quantité de composé **16** présent sur les nanoparticules reste constante pendant l'incubation dans la solution de PBS, signe de la stabilité du greffage (trois liaisons SiOSi). Nous remarquons une légère diminution de la quantité de composé **23** greffé au cours du temps, traduisant une hydrolyse de la liaison SiOSi et le relargage de la molécule avec une cinétique relativement lente (18 % d'hydrolyse en 7 jours). Cette observation est comparable à l'hydrolyse des dimères de silicone qui sont présentés au chapitre IV. Ce comportement pourrait être mis à profit pour obtenir un relargage lent de molécules au voisinage des tumeurs.

II.6. Conclusions

Afin de synthétiser des nanoparticules fluorescentes multifonctionnelles présentant plusieurs ligands en quantité bien déterminée, nous avons utilisé une stratégie basée sur l'utilisation de molécules silylées ($-Si(OEt)_3$). Cette stratégie a permis une immobilisation irréversible du fluorophore par synthèse directe pendant la préparation de la particule. Cette technologie nous a permis de greffer deux peptides, ligands de récepteurs surexprimés dans certains types de cancer, simultanément de manière simple et contrôlée. Pour mettre au point cette stratégie, il a également fallu développer une méthode de caractérisation performante des nanoparticules. Grâce à la RMN du fluor, il a été possible de déterminer précisément la quantité de peptide greffée sur les nanoparticules par la méthode ERETIC.

Avec cette méthode de caractérisation, des études sur la catalyse de greffage ont pu être réalisées et ont montré l'importance du pH et de l'état de charge des molécules à greffer. De même, la possibilité de greffer une molécule comportant un groupement $Si(Me)_2OH$ a également été démontrée, la liaison avec la surface de silice pouvant être lentement hydrolysée, au contraire du greffage d'un hybride trialcoxysilane qui conduit à une liaison stable en milieu physiologique.

Les études *in vitro* de cytométrie de flux réalisées à Grenoble à l'Institut Albert Bonniot sur neuf lignées cellulaires ont validé les propriétés de ciblage des nanoparticules mais ont également soulevé des problèmes de non spécificité. Le greffage d'un PEG silylé a permis de contourner ce problème d'adsorption non spécifique par écrantage de charge de la surface de la nanoparticule. Trois familles de nanoparticules ont été synthétisées et comparées par FACS, ce qui nous a permis de déterminer la famille présentant la meilleure affinité. La famille **B** porte à sa surface des peptides hybrides greffés dans une première étape et du PEG_{2000} greffé dans une seconde étape. Cette méthode de synthèse permet de contrôler précisément la quantité de peptide sur les nanoparticules.

Les résultats obtenus par ce type de nanoparticules sur les différentes lignées cellulaires *in vitro* ont montré qu'il est possible de cibler plus efficacement des cellules grâce aux récepteurs qu'elles expriment. La spécificité des ligands choisis (NRP et RGD) vis-à-vis de leurs récepteurs a été démontrée clairement par l'utilisation de peptides irrelevants. Enfin,

ces études ont montré que la présentation simultanée de deux ligands améliorait la sélectivité pour les cellules présentant les deux récepteurs.

Au-delà d'une utilité thérapeutique ou diagnostique, la méthode que nous avons développée permet d'accéder à des plates formes multi fonctionnalisées à la demande, outils intéressants pour la compréhension des mécanismes de signalisation cellulaires induits par l'activation de plusieurs récepteurs.

Chapitre III. *Synthèse de nanoparticules poreuses pour la libération contrôlée de principes actifs*

III.1. Introduction

Nous avons mis au point des nanoparticules multifonctionnelles incorporant un fluorophore pour l'imagerie dont l'objectif est de cibler les cellules cancéreuses. Cette approche s'inscrit dans l'optique de proposer des outils diagnostic pour détecter le cancer de manière précoce. En revanche, si nous voulons aussi traiter le cancer, il est nécessaire d'utiliser un principe actif, de l'amener jusqu'à la cellule en question et de le relarguer dans l'environnement proche de la tumeur. L'encapsulation du composé cytotoxique dans une nanoparticule ciblante est une voie prometteuse car elle permet à la fois de réduire les effets secondaires indésirables touchant les cellules saines, et d'assurer la protection du principe actif pendant la vectorisation. Plusieurs techniques utilisant l'environnement spécifique des cellules cancéreuses pour libérer un principe actif ont été décrites au paragraphe II.4.4.

Dans le cadre de ce travail, nous avons envisagé de charger un principe actif à l'intérieur des pores d'une nanoparticule de silice poreuse puis de boucher ces pores par la formation d'une « coque ». Idéalement, cette coque peut être composée de silice hybride à base de peptides ou des molécules pouvant se dégrader dans le milieu proche des cellules cancéreuses, libérant ainsi les pores de la particule et permettant la délivrance du composé cytotoxique (Figure 53).

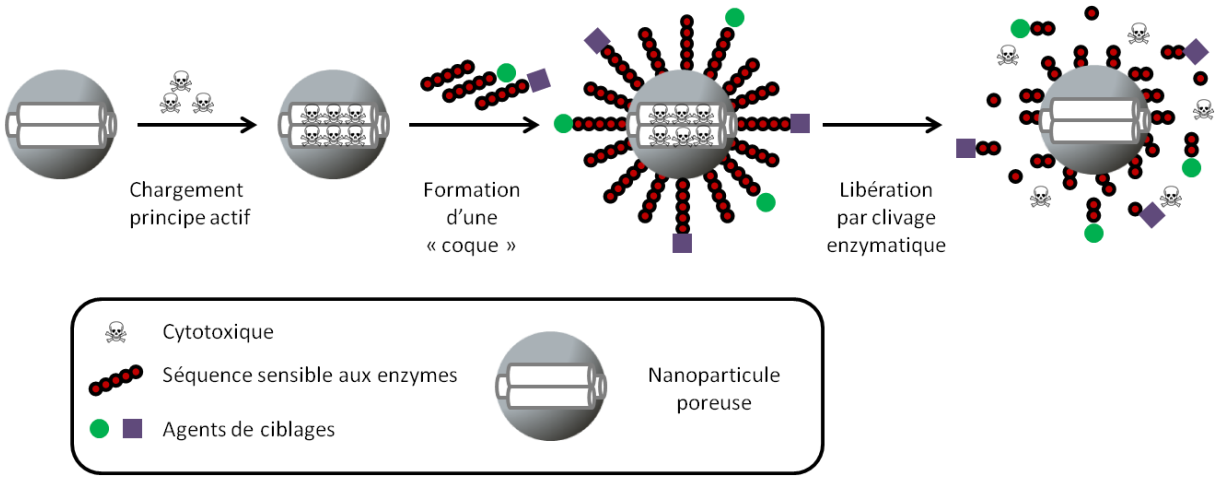


Figure 53: Principe d'encapsulation d'un composé cytotoxique dans une nanoparticule poreuse et de sa libération par clivage enzymatique

Nous avons choisi la rhodamine comme mime de médicament. En effet, la rhodamine est un fluorophore de couleur fushia couramment utilisé comme preuve de concept pour l'encapsulation et la libération de principe actif. Cette molécule se voit bien et est facile à détecter.

Plusieurs types de coques et plusieurs techniques ont été envisagés pour tenter de réaliser une couche permettant de boucher les nanoparticules de silice poreuses.

III.2. Synthèse des Np poreuses MCM-41

Il existe de nombreuses nanoparticules poreuses. Le type MCM-41 est sans doute le plus utilisé grâce à ses pores bien définis et homogènes, sa taille relativement bien contrôlée et sa forte capacité de chargement. Nous avons synthétisé des MCM-41 d'après une synthèse décrite dans la littérature (voir paragraphe II.2.4).

Pour cela, 2 g de CTAB (5.4 mmol, 1eq.) sont mélangés dans 960 mL d'eau distillée et 7 mL de soude à 1 N. La solution est ensuite chauffée à 95 °C avant d'ajouter goutte à goutte 10 mL de TEOS (44.6 mmol 8.3 eq.). La réaction est agitée pendant 3h avant qu'un trouble blanc ne se forme. Les nanoparticules sont récupérées par centrifugation, lavées à l'eau et à l'éthanol et séchées sous vide pour obtenir 3.74 g de poudre blanche. Le solide obtenu est calciné à 550 °C pour dégrader le tensio-actif et libérer la porosité. Au final, 1.99 g de nanoparticules **Np^{MCM}** sont obtenus (Schéma 18).

III.3. Chargement des nanoparticules poreuses MCM-41

Les nanoparticules sont ensuite chargées avec de la rhodamine en incubant pendant 24 h les nanoparticules **Np^{MCM}** avec 120 mL de solution d'éthanol contenant 3.5 mmol/L de rhodamine. Le solide est récupéré par centrifugation, rincé rapidement à l'éthanol pour enlever l'excès de rhodamine adsorbé à la surface puis séché sous vide pour obtenir 2.14 g de poudre fushia correspondant aux **Np^{MCM}(Rh)** chargées en rhodamine (Schéma 18).

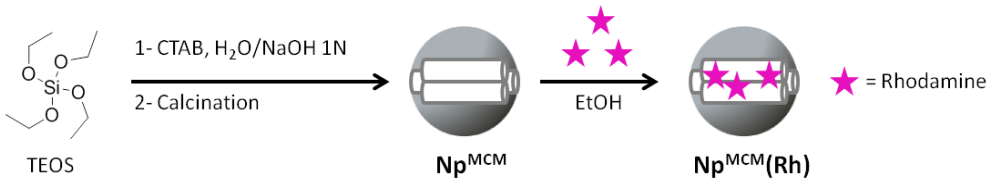


Schéma 18: Synthèse des MCM-41 et chargement avec la rhodamine

Les nanoparticules-**Np^{MCM}** et **Np^{MCM}(Rh)** ont été caractérisées par TEM, BET, ATG et analyse élémentaire. L'analyse TEM (Figure 54) permet de confirmer la présence de nanoparticules poreuses de type MCM-41 avec des tailles comprises entre 40 nm et 200 nm avec des géométries sphériques ou ovales. Nous remarquons également la présence de pores extrêmement bien définis d'une taille d'environ 3 nm, parallèles les uns aux autres sur toute la longueur des nanoparticules.

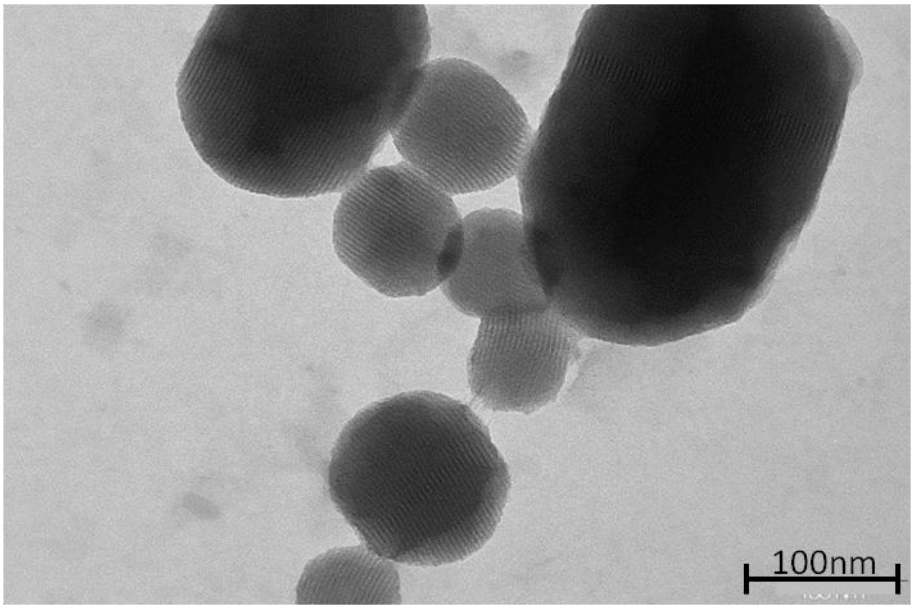


Figure 54: Image TEM des Np^{MCM}

La mesure des caractéristiques texturales des nanoparticules poreuses comme la surface spécifique, la taille et la distribution de taille des pores peut être réalisée en utilisant la méthode BET (Brunauer-Emmet-Teller) par adsorption-désorption d'azote (Figure 55). L'application de cette méthode sur les **Np^{MCM}** permet de déterminer une surface spécifique totale de 1130 m^2/g avec un volume poreux de 1,12 cm^3/g issu de la micro, méso et macroporosité. Pour les nanoparticules **Np^{MCM}(Rh),** nous remarquons une diminution importante du volume d'azote absorbé (0.63 cm^3/g) ainsi que de la surface spécifique (347 m^2/g). Ces diminutions entre les **Np^{MCM}** et les **Np^{MCM}(Rh)** sont associées au remplissage des pores de la nanoparticule par la rhodamine.

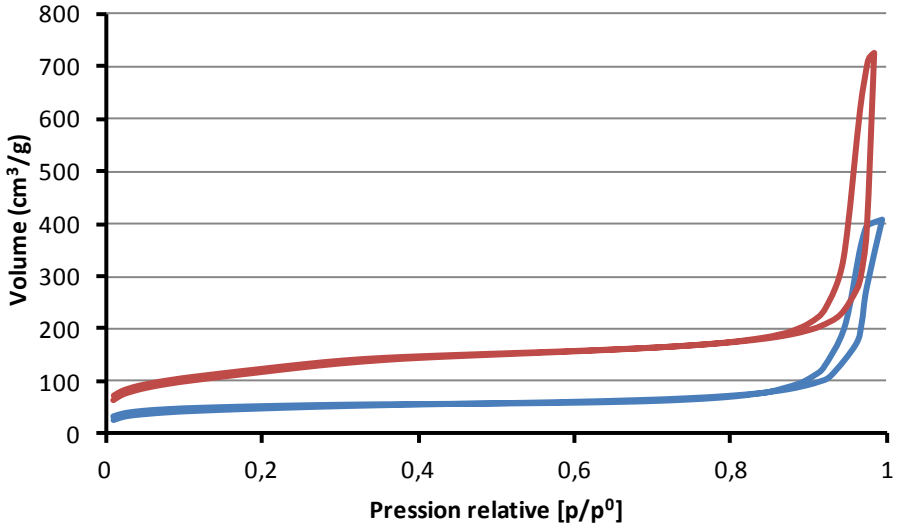


Figure 55: Isothermes d'absorption-désorption d'azote des nanoparticules Np^{MCM} (courbe rouge) et Np^{MCM}(Rh) (courbe bleue).

L'analyse thermo gravimétrique (ATG) (Figure 56) des nanoparticules **Np^{MCM}** et **Np^{MCM}(Rh)** réalisée entre 30 °C et 900 °C avec un gradient de 15 °C/min, indique une différence de perte

de masse de 8,5 %. Cela correspond à 85mg par gramme de particule soit, en considérant la masse molaire de la rhodamine de 479 g/mol à 85 / 479 = 177 µmol de rhodamine par gramme de nanoparticules.

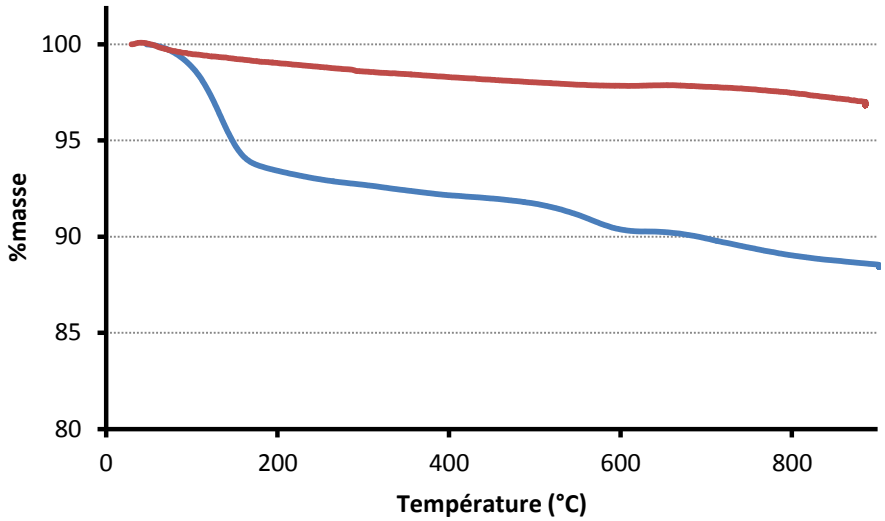


Figure 56: Analyses ATG des nanoparticules Np^{MCM} et Np^{MCM}(Rh) réalisées entre 30 °C et 900 °C avec un gradient de 15°C/min

Cette valeur corrèle avec l'analyse élémentaire (Tableau 20) ou nous remarquons une augmentation du %C de 7%, ce qui correspond à une charge en rhodamine de 192 µmol/g. L'incrément de masse entre les nanoparticules **Np^{MCM}** et **Np^{MCM}(Rh)** (2.145-1.990=0.115g) corrèle avec les valeurs précédentes.

ref	%N	%C	%O	%H	Surface spécifique (m^2/g)	ATG[a]
Np^{MCM}	0.01	0.3	2.12	0.03	1130	3.5%
Np^{MCM}(Rh)	0.65	7.30	5.14	0.18	347	12.4%

Tableau 20: Analyses élémentaires et BET des nanoparticules Np^{MCM}, Np^{MCM}(Rh) et Np^{MCM}(Rh)-1. [a] Pourcentages de perte de masse

III.4. Synthèse d'une coque sur les Np^{MCM}(Rh)

Une fois les nanoparticules **Np^{MCM}(Rh)** obtenues, différentes méthodes ont été envisagées pour emprisonner la rhodamine. La première méthode, que nous nommons méthode « LAYER », consiste à fonctionnaliser les nanoparticules par un peptide hybride comportant un groupement triéthoxysilane.

Alternativement, il est possible de former une coque (méthode « SHELL ») pour emprisonner la rhodamine. Nous avons envisagé d'utiliser un peptide ou une molécule bi-silylée avec du TEOS qui peut être considéré comme un « ciment » additionnel pour former une couche de silice.

III.4.1. Méthode « LAYER »

La méthode « LAYER » consiste en la fonctionnalisation des nanoparticules **Np^{MCM}(Rh)** par un peptide hybride triéthoxysilane monofonctionnel dans les mêmes conditions que celles utilisées au chapitre II (voir page 71). La présence du peptide à la surface des nanoparticules devrait permettre le blocage de la rhodamine par simple encombrement stérique. De plus la séquence peptidique sélectionnée peut être un substrat d'enzyme (Figure 57). En effet, en présence de cette enzyme, le peptide peut être clivé, ce qui provoque une diminution de l'encombrement stérique au dessus des pores et engendrer une libération du composé.

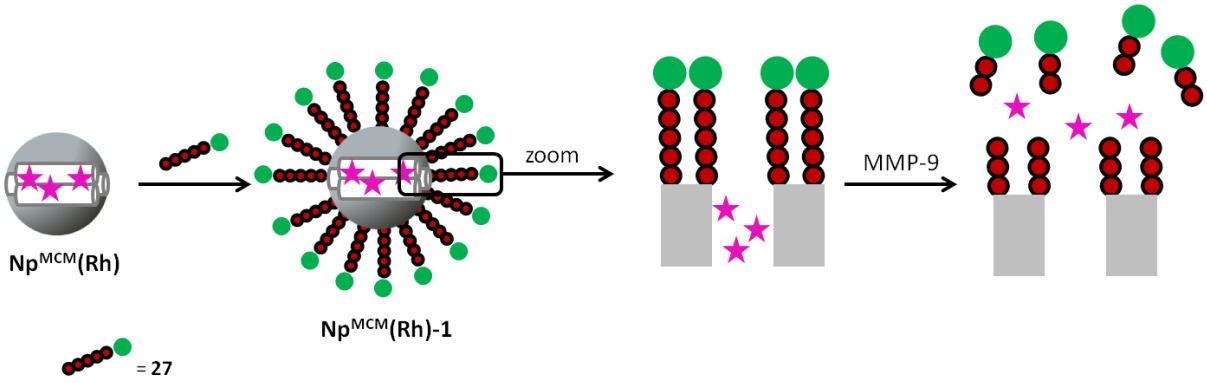


Figure 57: Principe de la méthode "LAYER"

III.4.1.1. Synthèse du peptide hybride pour la méthode « layer »

Pour cela, le peptide hybride **27** $Si(OEt)_3$-GPQGLAGQ-ATWLPPR-OH a été sélectionné car il possède de nombreuses propriétés intéressantes pour notre étude.

- La taille : Il possède 15 résidus. C'est une taille suffisamment importante pour bloquer de manière efficace de la rhodamine. En effet un peptide plus petit ne permet pas de bloquer les pores de manière efficace. [163]

- La partie GPQGLAGQ est une séquence substrat de certaines métalloprotéases (matrix métalloportease ou MMPs), enzymes protéolytiques intervenant dans la modification de la matrice extra cellulaire et connue pour être surexprimées dans une majorité de cancers.[164] Cette séquence est clivée sélectivement par la MMP-9 entre la glycine et la leucine (Schéma 19). Cela devrait permettre en présence de l'enzyme de couper la séquence peptidique et de libérer la rhodamine par la diminution de l'encombrement stérique.
- La partie ATWLPPR a été sélectionnée pour cibler le récepteur NRP-1.

Pour synthétiser le peptide hybride **27**, nous avons envisagé une stratégie de silylation en solution (Schéma 20). Le peptide non silylé **26** a, quant à lui, été synthétisé par fragments. Le couplage des fragments possédant des groupements protecteurs sur les chaines latérales est fait en solution entre le composé **24** et le composé **6** (décrit au paragraphe II.5.2.1, page 66).

Le fragment protégé **24** est synthétisé sur support solide de type 2 chloro chlorotrityl PS en stratégie Fmoc/tBu puis est décroché de la résine par clivage ménagé en utilisant une solution TFE/AcOH/DCM afin de conserver le groupement protecteur Boc du coté N-terminal. Il est à noter que les deux groupements trityl des glutamines ont été déprotégés par ce traitement. Cela ne pose aucun problème puisque les fonctions amides des chaînes latérales ne réagissent pas lors d'un couplage par fragments. Le fragment **24** N-Boc protégé est ensuite purifié par HPLC préparative et lyophilisé. Il est ensuite couplé au composé **6** pour obtenir le peptide protégé **25** avec 72 % de rendement.

Cependant, il est probable que la glutamine C-ter de la séquence **24** s'épimérise durant le couplage par formation d'oxazolone. Pour éviter cela, il serait possible d'ajouter une glycine en C-ter de la séquence. La synthèse de ce précurseur « Gly étendu » sera envisagée en cas de succès de la formation des coques.

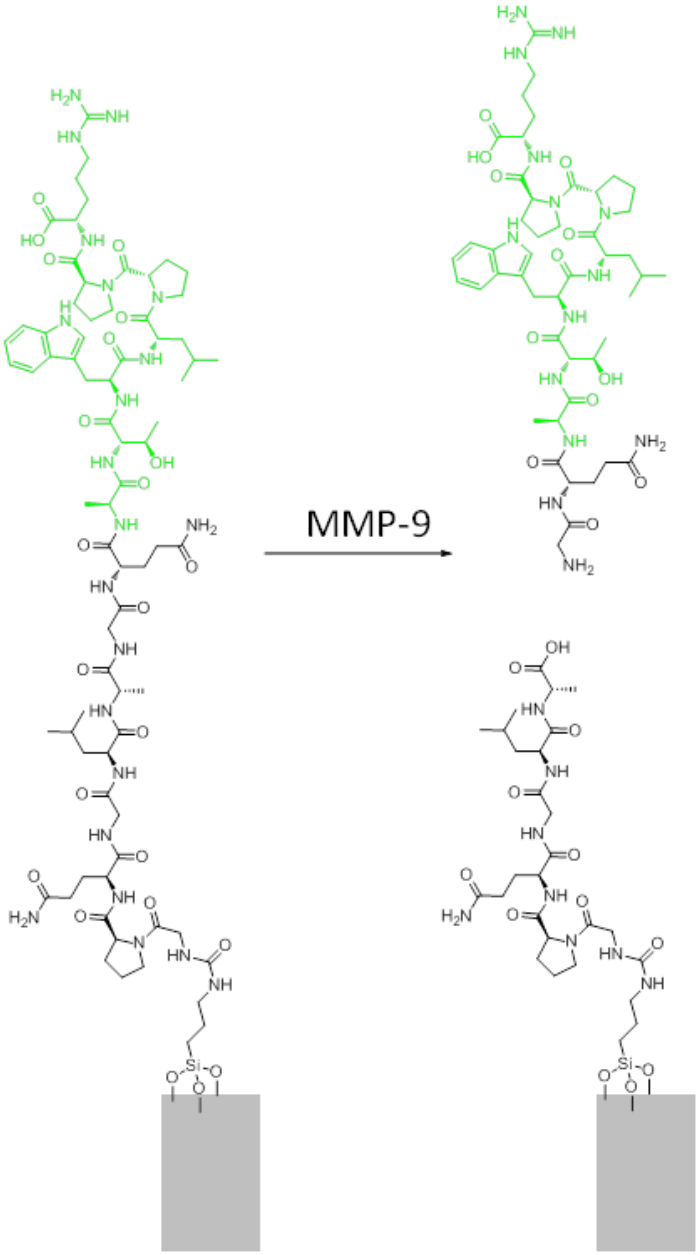


Schéma 19: Clivage sélectif du peptide 27 par la MMP-9

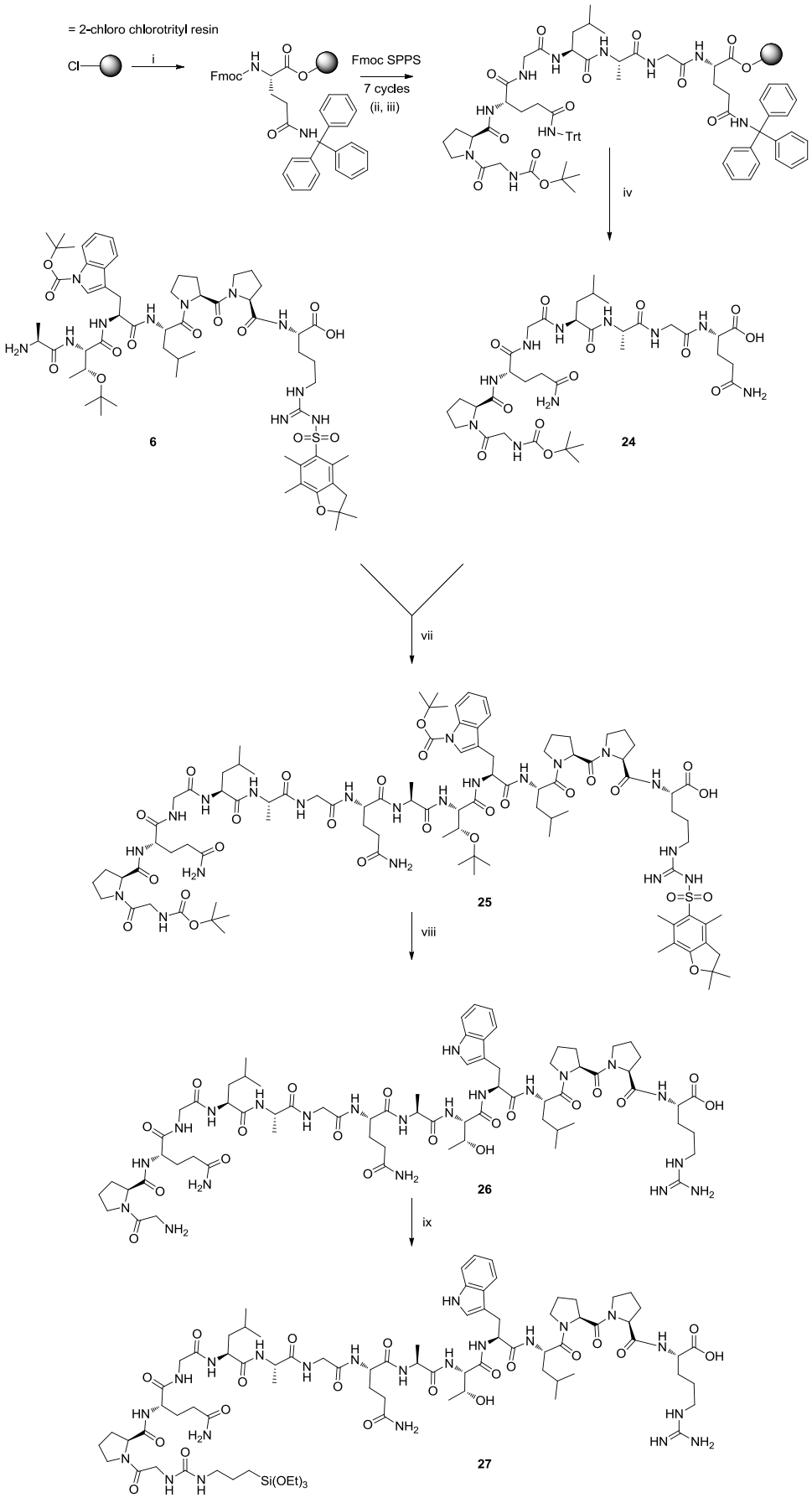


Schéma 20: Synthèse du composé 27

Après élimination des groupements protecteurs par une solution de TFA/TIS/H_2O, le peptide est purifié sur HPLC préparative et lyophilisé puis l'amine N-terminale du composé **26** est mise en réaction avec l'ICPTES pour obtenir quantitativement le composé **27** (Tableau 21).

ref	Séquence	MW / $[M+2H]^{2+}$ m/z
26	H-GPQGLAGQ-ATWLPPR-OH	1550.7 / 776.1
27	$Si(OH)_3$-$(CH_2)_3$NHCO-GPQGLAGQ-ATWLPPR-OH	1713.8 / 857.5

Tableau 21: Caractérisation des composés 26 et 27

III.4.1.2. Greffage du peptide hybride pour la méthode « layer »

Le peptide hybride **27** est dissout dans 2 mL d'une solution de DMF 1 % AcOH à une concentration de 15 mmol/L. 100 mg de **Np^{MCM}(Rh)** sont ajoutées à cette solution qui est mise sous agitation à 60 °C pendant 12 h. Les nanoparticules sont récupérées par centrifugation, lavées rapidement au DMF et à l'éthanol avant d'être séchées sous vide pour obtenir une poudre blanche **Np^{MCM}(Rh)-1**.

L'absence de coloration de la poudre obtenue nous indique visuellement que nous avons probablement conservé emprisonné très peu de rhodamine dans les pores des **Np^{MCM}(Rh)-1**. La rhodamine a été probablement libérée au cours de l'étape de greffage et de la centrifugation. En effet, la solution de greffage et le filtrat de centrifugation étaient fushia.

Nous avons tout de même essayé de mesurer la libération de la rhodamine. Pour cela le composé **Np^{MCM}(Rh)-1** est mis en solution à une concentration de 1 mg/mL dans une solution de PBS et l'absorbance de la solution à 560 nm est mesurée pendant plusieurs heures. Comme nous pouvions nous y attendre, les **Np^{MCM}(Rh)-1**, plongées dans une solution de PBS, ne libèrent pas de rhodamine. L'absence de rhodamine est confirmée par l'analyse élémentaire. L'analyse élémentaire des nanoparticules **Np^{MCM}(Rh)-1** montre une très forte diminution du %C par rapport au **Np^{MCM}(Rh)** (Tableau 22). Nous remarquons toutefois que le pourcentage d'organique dans les particules **Np^{MCM}(Rh)-1** est plus élevé que les nanoparticules « nues » **Np^{MCM}**. Cela montre que le composé **27** s'est probablement correctement greffé.

ref	%N	%C	%O	%H	Surface spécifique	ATG[a]
Np^{MCM}(Rh)	0.65	7.30	5.14	0.18	347	12.4%
Np^{MCM}(Rh)-1	0.16	1.12	2.08	0.08	1129	3.8%

Tableau 22 : Analyses élémentaires et BET des nanoparticules Np^{MCM}(Rh) et Np^{MCM}(Rh)-1. [a] Pourcentages de perte de masse

L'échec de cette synthèse est attribué à l'utilisation d'un trop 'bon' solvant (le DMF) pour la rhodamine qui « vide » les nanoparticules pendant le greffage. Le solvant est un des paramètres les plus importants pour emprisonner une molécule dans les pores d'une nanoparticule. Il doit correctement solubiliser le peptide hybride mais doit être un mauvais solvant pour la molécule à emprisonner. De manière générale, la vitesse de greffage doit être nettement supérieure à la vitesse de libération.

Afin de mieux approcher ces paramètres, nous avons donc étudié la libération de rhodamine des particules non coquées **Np^{MCM}(Rh)**. La cinétique UV (560 nm) de libération de la rhodamine chargée dans les pores des **Np^{MCM}(Rh)** a été réalisée dans trois solvants différents à une concentration de 1 mg/mL (Figure 58). Dans le DMF ou l'éthanol, nous observons le même résultat : la libération se fait quasiment instantanément (courbe orange). Au contraire, dans un tampon PBS, la rhodamine est libérée très lentement (courbe bleue). Les nanoparticules se vident complètement en 90 heures.

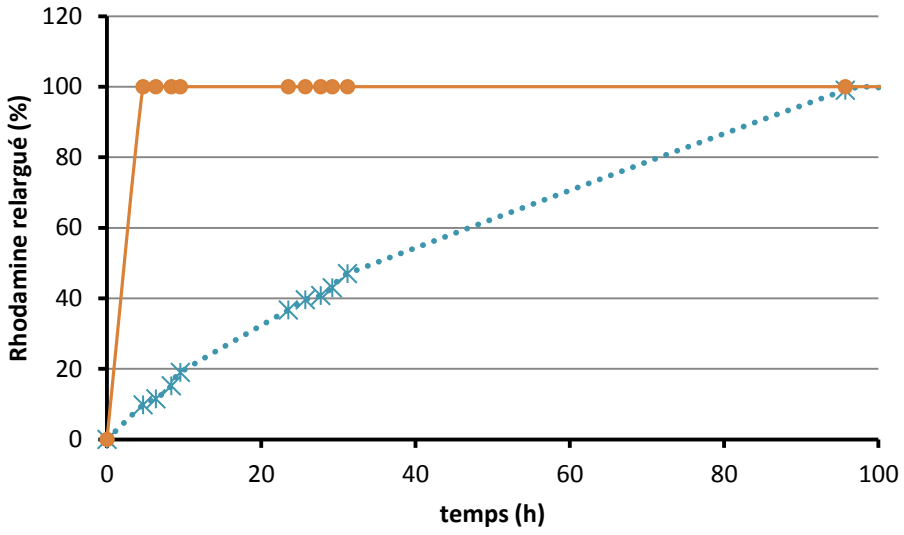


Figure 58: Cinétiques de libération UV de la rhodamine (560nm) chargée dans des Np^{MCM}(Rh) placées à une concentration de 1mg/mL, dans l'EtOH ou le DMF (courbe orange), dans du tampon PBS (courbe bleue en pointillés)

Le lent relargage mesuré dans le PBS pourrait être compatible avec la formation d'une coque à condition qu'on puisse la former dans l'eau. Malheureusement, le peptide hybride **27** n'est pas soluble dans l'eau. D'autres solvants dans lesquels le composé **27** est soluble ont été testés (AcN, MeOH, THF). Malheureusement, ces solvants solubilisent très bien la rhodamine et elle est relarguée immédiatement.

Il peut être envisagé de trouver des molécules qui soient faiblement solubles dans des solvants organiques pour réaliser le greffage. Alternativement, nous pourrons conserver l'eau comme solvant de greffage et augmenter la solubilité du peptide en ajoutant des arginines par exemple. Cette méthode a donc été abandonnée pour se tourner vers la méthode « SHELL ».

III.4.2. Méthode « SHELL »

La méthode « SHELL » consiste en la formation d'une coque de silice hybride contenant du TEOS et un peptide hybride bi-fonctionnel pouvant se dégrader. Si cette méthode fonctionne, il serait possible d'ajouter des éléments de ciblage par dessus la coque, en utilisant la même méthode et les mêmes composés que ceux optimisés pour les nanoparticules pleines décrites dans le chapitre II (Figure 59).

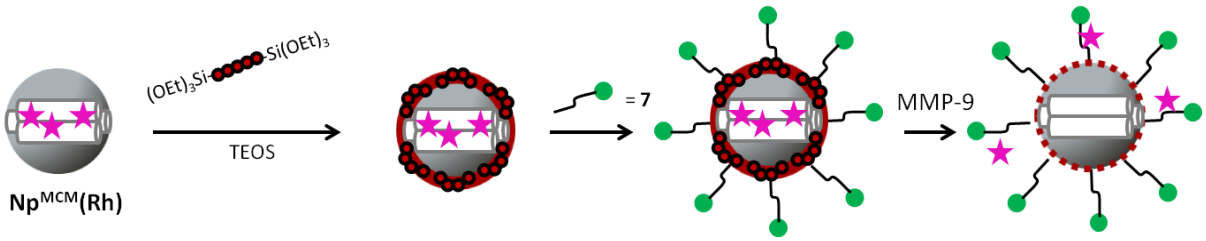


Figure 59: Principe de la méthode "SHELL"

Les blocs hybrides bi silylés présentés dans le Tableau 23 ont été imaginés pour être incorporés simultanément avec le TEOS, une fois que l'optimisation des conditions de coquage aura été réalisée avec du TEOS seul.

L'hybride **28** est un analogue du peptide **26** sensible à la MMP-9, fonctionnalisé par deux groupements triethoxysilane. Le bloc **29** est un disulfure commercial bi silylé dont le pont disulfure peut être clivé dans un environnement réducteur. Le bloc **30** a été imaginé comme peptide modèle hybride bi silylé simple, soluble, et visible en UV et dont les chaines latérales (guanidine) sont chargées positivement dans une grande gamme de pH pour faciliter le greffage.

ref	Séquence
28	$Si(OEt)_3$-$(CH_2)_3$NHCO-GPQGLAGQ-NH$(CH_2)_2$NHCO$(CH_2)_3$-$Si(OEt)_3$
29	$Si(OEt)_3$-$(CH_2)_3$-S-S-$(CH_2)_3$-$Si(OEt)_3$
30	$Si(OEt)_3$-$(CH_2)_3$NHCO-RFR-NH$(CH_2)_2$NHCO$(CH_2)_3$-$Si(OEt)_3$

Tableau 23: Présentation des trois blocs bi sylilés envisagés pour la méthode "SHELL"

Avant de synthétiser et d'utiliser les blocs hybrides bi silylés, nous avons travaillé sur l'optimisation de la coque en utilisant seulement du TEOS. Trois techniques ont été tentées pour préparer cette coque. Nous les nommons voie « Stöber », voie « Dip Coating » et voie « PBS ». La principale différence entre les stratégies est le contrôle de polycondensation du

TEOS en jouant sur le pH. Ainsi la polycondensation du TEOS dans des solutions aqueuses à pH 12, 7.4 et 1.5 sont essayées.

Il faut noter qu'il est assez difficile de visualiser une coque de silice sur une nanoparticule de silice étant donné qu'il n'y a pas de différence de contraste. Toutefois, les nanoparticules MCM-41 étant poreuses, il est théoriquement possible de voir la disparition de la porosité entre des nanoparticules possédant une coque et d'autre n'en possédant pas. Nous avons donc utilisé la MET pour confirmer la présence de cette « coque ».

III.4.2.1. **Voie Stöber:**

La voie Stöber utilise les conditions citées auparavant (voir paragraphe II.2.1) à savoir un mélange $NH_4OH/H_20/EtOH/TEOS$ pour synthétiser des nanoparticules ou réaliser des coques de silice.

Dans la littérature, cette technique est habituellement utilisée pour entourer d'une couche de TEOS des particules et des objets qui ne sont pas en silice. Nous pouvons par exemple citer l'enrobage de nanoparticules d'or[165] ou de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer[166] mais à notre connaissance, aucune publication ne traite de coque de silice autour de nanoparticules de silice.

Ainsi quatre expériences ont été réalisées pour tenter d'obtenir une coque de silice la plus homogène, en se basant sur les modes opératoires présentés dans les publications que nous venons de citer.

50 mg de **Np^{MCM}(Rh)** sont dispersés dans 3.5mL d'une solution $NH_4OH/H_2O/EtOH$ (0.5/2.5/10, v/v/v). Différentes quantités de TEOS (25-150 µL) sont rajoutées. La solution est agitée pendant trois heures puis les nanoparticules **Np^{MCM}(Rh)-2**, **Np^{MCM}(Rh)-3**, **Np^{MCM}(Rh)-4** et **Np^{MCM}(Rh)-5** sont récupérées par centrifugation, lavées à l'eau, séchées sous vide et caractérisées par TEM et analyse élémentaire. Les résultats sont présentés dans le Tableau 24.

Ref	TEOS (µL)	Masse initiale (mg)	Masse obtenue (mg)	Couleur	%N	%C	%O	%H
Np^{MCM}(Rh)	-	-	-		0.65	7.30	5.14	0.18
Np^{MCM}(Rh)-2	25	50	49		0,20	0,17	2.18	0.11
Np^{MCM}(Rh)-3	50	50	55	Rose pale	0,18	0,18	2.36	0.13
Np^{MCM}(Rh)-4	100	50	61		0,20	0,15	2.38	0.11
Np^{MCM}(Rh)-5	150	50	89		0,15	0,14	2.32	0.10

Tableau 24: Caractérisation des nanoparticules modifiées par la voie Stöber

L'augmentation de la masse de nanoparticules récupérées est proportionnelle à la quantité de TEOS ajoutée à la solution, signe de la polycondensation du TEOS. Malheureusement, quelque soit la quantité de TEOS ajoutée, nous n'avons pas observé la formation de coque sur les particules existantes. A la place, de nouveaux agrégats de silice amorphes se sont formés, comme le montre les images TEM (Figure 60).

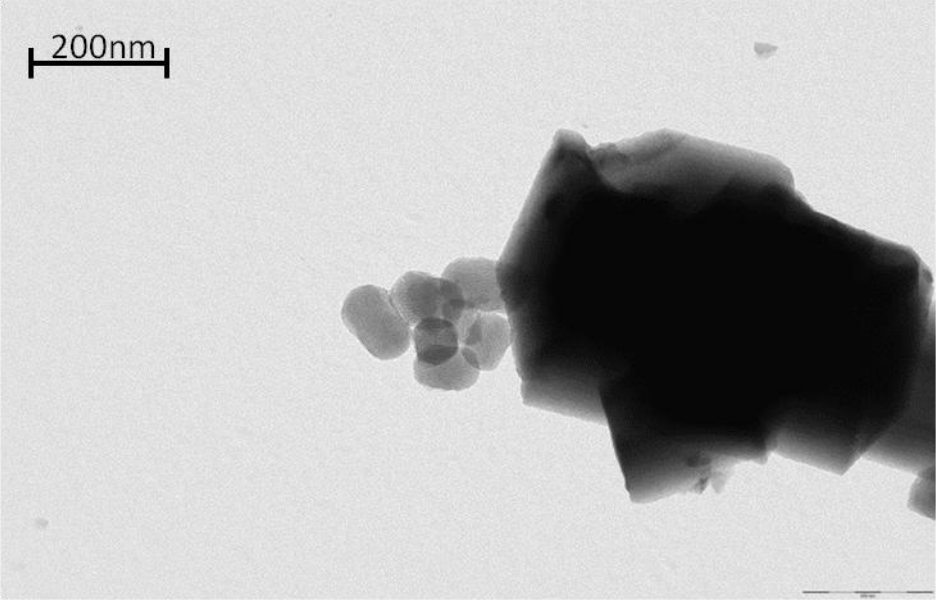


Figure 60: Image TEM des nanoparticules Np^{MCM}(Rh)-2

De plus, dans ces conditions, l'ammoniaque et l'éthanol ont tendance à éliminer la rhodamine des nanoparticules rapidement. Les nanoparticules obtenues sont rose pale et l'analyse élémentaire nous montre que nous n'avons pas encapsulé de rhodamine de façon significative : %C = 0.18 pour **Np^{MCM}(Rh)-2** comparé à 7.30 pour les **Np^{MCM}(Rh).** Le pourcentage d'organique de **Np^{MCM}(Rh)-2** aurait du être de l'ordre de 3,5% si toute la

rhodamine avait été emprisonnée. De même, les cinétiques de relargage UV réalisées dans le DMF ne présentent aucun signal à 560 nm.

Pour toutes ces raisons, cette technique a été abandonnée pour la synthèse de coque de silice et l'encapsulation de principe actif.

III.4.2.2. **Voie « dip coating »**

La voie « *dip coating* » utilise une solution aqueuse contenant du TEOS hydrolysé et stabilisé à pH 1,5 (point isoélectrique du TEOS). A ce pH, la polycondensation est très lente est la solution est stable plusieurs semaines. La polycondensation du TEOS sur les nanoparticules se fait par trempage et évaporation du solvant. C'est lors de l'évaporation que les liaisons siloxanes se forment. A la différence de la méthode précédente, l'absence d'éthanol et d'ammoniaque permet une meilleure tenue de la rhodamine et normalement une meilleure encapsulation. De plus, l'évaporation permet une augmentation de la concentration en TEOS hydrolysé à proximité des nanoparticules et doit favoriser la formation de coque au détriment de nouveaux agrégats. Ce dip coating peut être répété plusieurs fois pour obtenir une couche plus épaisse.

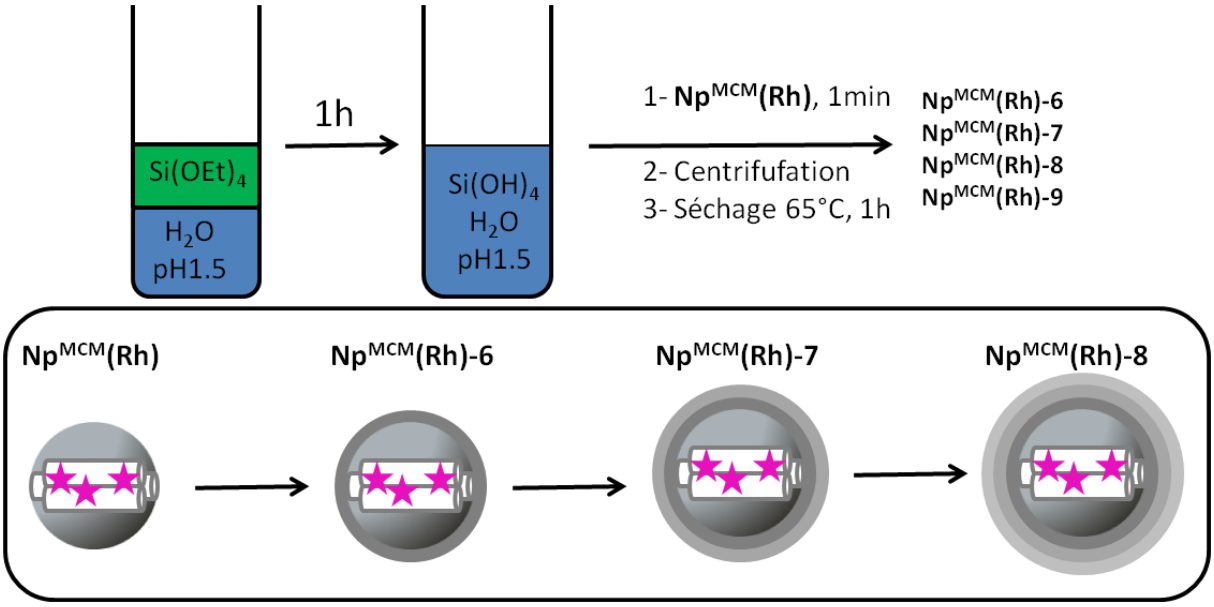


Figure 61: Voie « dip-coating » pour la préparation de coques de silice

Pour cela, 100 µL de TEOS sont ajoutés à 3.5 mL d'une solution de HCl aqueux à pH 1,5 (2.8 % v/v). Le TEOS n'étant pas miscible à l'eau, deux phases se forment. La solution est agitée jusqu'à la formation d'une phase homogène, signe de l'hydrolyse complète du TEOS (Figure 61). Une fois qu'une seule phase est observable (environ 1 h de réaction), les nanoparticules **Np^{MCM}(Rh)** sont mélangées à la solution de TEOS pendant 1 min, récupérées par centrifugation et séchées à l'étuve pendant 1 h à 65 °C (temps minimal pour obtenir une poudre sèche). Le surnageant est récupéré et l'opération de coating et répétée quatre fois. A chaque étape, une partie des nanoparticules est récupérée pour analyse et l'autre partie est

engagée dans un nouveau coating. Les quatre lots de nanoparticules obtenus sont notés **Np^{MCM}(Rh)-6, Np^{MCM}(Rh)-7, Np^{MCM}(Rh)-8, Np^{MCM}(Rh)-9**.

Toutes les nanoparticules après *dip coating* sont de couleur fushia témoignant la présence de la rhodamine. Mais cette couleur ne prouve pas la formation d'une couche de silice. En effet, la libération de la rhodamine dans l'eau est très lente. Or les nanoparticules ne sont restées en solution que quelques minutes et conservent encore la rhodamine dans les pores.

Chaque *dip coating* accroit la masse de l'échantillon de 25 %, conséquence de la polycondensation du TEOS (Tableau 25). L'analyse élémentaire confirme également la présence de la rhodamine. Le % C du lot **Np^{MCM}(Rh)-6** est élevé et proche du %C de **Np^{MCM}(Rh)**. Nous remarquons une diminution du % C, du % N, du % O et du % H avec le nombre de coating. Cet effet mathématique est du à l'augmentation de la masse inorganique de l'échantillon par la polycondensation du TEOS.

Ref	Masse initiale (mg)	Masse obtenue	Couleur	%N	%C	%O	%H
Np^{MCM}(Rh)-6	30	39		0,46	5,39	3.67	0.35
Np^{MCM}(Rh)-7	30	48	Fushia	0,41	4,98	3.52	0.26
Np^{MCM}(Rh)-8	30	57		0,31	4,02	3.18	0.22
Np^{MCM}(Rh)-9	30	69		0,24	2,57	3.04	0.18

Tableau 25: Caractérisation des nanoparticules obtenues par dip coating

Les images TEM des différents lots de nanoparticules semblent indiquer un enrobage variant entre 1 et 9 nm. En effet, nous remarquons une disparition de la porosité sur certaines faces des nanoparticules. Nous remarquons également des nanoparticules collées les unes aux autres et la présence d'autres agrégats signe d'une polycondensation mal contrôlée (Figure 62).

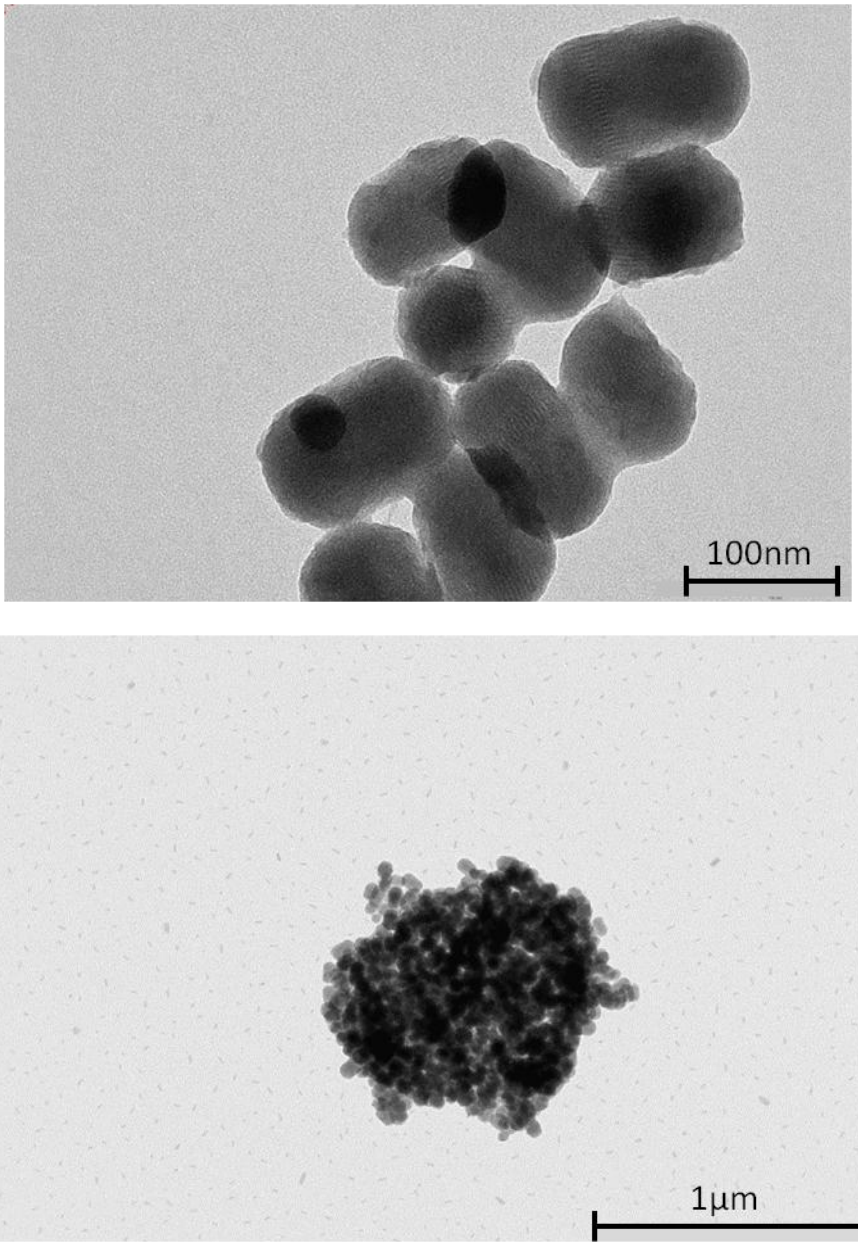


Figure 62: Image TEM du lot Np^{MCM}(Rh)-6

La présence de rhodamine à l'intérieur des nanoparticules a permis de réaliser des cinétiques de libération (Figure 63).

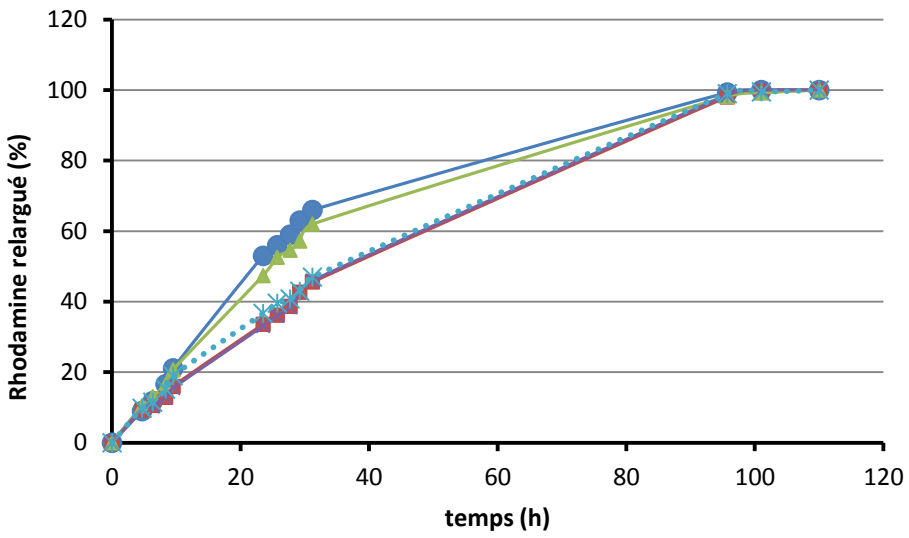


Figure 63: Cinétiques de libération UV de la rhodamine (560nm) dans un tampon PBS à une concentration de 1 mg/mL. Np^{MCM}(Rh)-6 (courbe bleue, •), Np^{MCM}(Rh)-7 (courbe rouge, ■), Np^{MCM}(Rh)-8 (courbe verte, Δ), Np^{MCM}(Rh)-9 (courbe violet) et Np^{MCM}(Rh) (courbe bleu pointillé x).

Malheureusement, la cinétique de libération est sensiblement équivalente pour les quatre lots de nanoparticules et suit le même profil que les nanoparticules non coquées **Np^{MCM}(Rh)**, preuve de l'inefficacité de cette méthode d'enrobage.

III.4.2.3. Voie « PBS »

La voie PBS tire son nom du tampon PBS utilisé pour l'enrobage. Cette méthode utilise une solution de TEOS hydrolysée dans une solution aqueuse à pH 1,5 puis le pH est remonté par l'ajout de PBS jusqu'à pH 7,4 (Figure 64). Différentes quantités de TEOS ont été utilisées. A ce pH, la polycondensation est favorisée contrairement à la méthode précédente où l'évaporation amorce la condensation. 30 mg de nanoparticules **Np^{MCM}(Rh)** sont ajoutées à des solutions contenant 1, 2, 4 et 8 % de TEOS en volume. Après une heure d'agitation, les nanoparticules **Np^{MCM}(Rh)-10**, **Np^{MCM}(Rh)-11**, **Np^{MCM}(Rh)-12**, **Np^{MCM}(Rh)-13** sont récupérées par centrifugation, lavées à l'eau distillée puis lyophilisées.

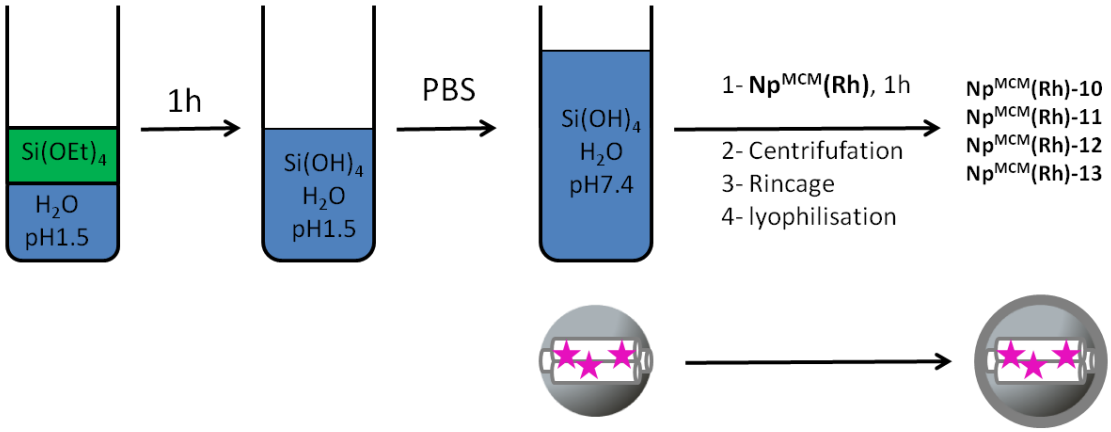


Figure 64: Synthèse de coque par voie « PBS »

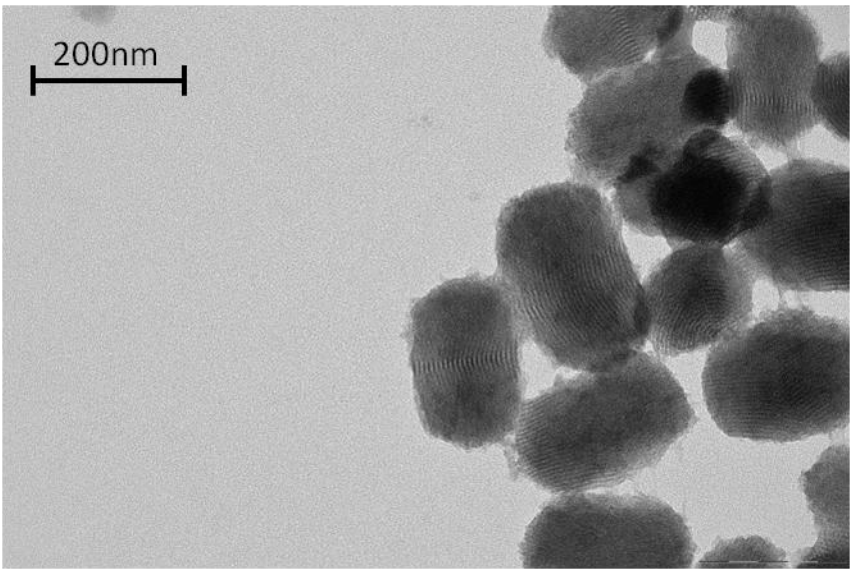
Les nanoparticules ont été analysées par TEM et analyse élémentaire. Les résultats sont présentés dans le Tableau 26.

La couleur fushia de nanoparticules obtenues atteste la présence de rhodamine et l'analyse élémentaire confirme cette observation. Nous remarquons que plus le pourcentage de TEOS dans la solution est important, plus la masse de solide récupérée est élevée et plus les pourcentages d'azote et de carbone diminuent. Cette diminution est, comme dans le cas précédent, due à l'augmentation de la masse inorganique (SiO_2) de l'échantillon.

Les images TEM des nanoparticules montrent la présence d'une couche de silice autour des nanoparticules (Figure 65). En revanche, lorsque le pourcentage de TEOS dans la solution augmente, de plus en plus d'agrégats de silice amorphes sont observés dans l'échantillon. Ainsi le lot de nanoparticule qui présente le meilleur « coating » tout en évitant la présence de particules silice amorphes est celui des nanoparticules **Np^{MCM}(Rh)-10**.

ref	Solution TEOS	Masse initial (mg)	Masse récupérée	Couleur	%N	%C	%O	%H
Np^{MCM}(Rh)-10	1%	30	34		0,45	5,41	3.52	0.33
Np^{MCM}(Rh)-11	2%	30	55	Fushia	0,40	4,81	3.02	0.20
Np^{MCM}(Rh)-12	4%	30	152		0,10	1,25	2.99	0.12
Np^{MCM}(Rh)-13	8%	30	816		0,05	0 ,58	2.56	0.08

Tableau 26: Caractérisation des nanoparticules obtenues par la méthode « PBS »



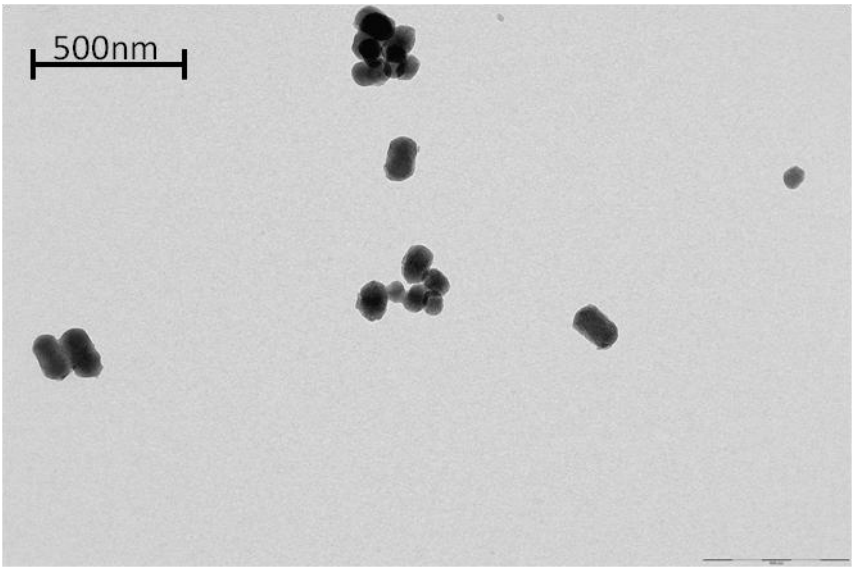


Figure 65 : Images TEM des nanoparticules Np^{MCM}(Rh)-10

Malheureusement, encore une fois, les cinétiques de libération réalisées dans le tampon PBS sont toutes équivalentes et suivent le même profil (cf. Figure 63) que les nanoparticules **Np^{MCM}(Rh)** non coquée et ne sont donc pas présentées.

III.5. Conclusion et Perspectives

Dans le but de mettre au point la formation d'une coque autour de nanoparticules de silice poreuse, nous avons chargé de la rhodamine dans des nanoparticules de type MCM-41 à hauteur de 8,5 % en masse. Puis nous avons essayé de développer différentes méthodes, basées sur l'utilisation de silane, pour réaliser une coque afin d'emprisonner de manière durable le fluorophore. La première série utilisant un peptide monofonctionel a montré l'importance du solvant pour réaliser ce genre d'opération. En effet, le solvant doit pouvoir solubiliser la molécule hybride en vue de son greffage à la surface de la particule mais être en même temps un mauvais solvant pour la molécule emprisonnée. Le solvant le plus adapté pour cette réaction semble être l'eau car la cinétique de libération de la rhodamine dans l'eau est lente. Malheureusement le peptide envisagé pour cette réaction s'est avérée insoluble dans l'eau. Une solution pourrait être l'utilisation d'un peptide hybride plus soluble.

En parallèle, différentes stratégies de polycondensation du TEOS dans l'eau ont été essayées en jouant principalement sur le pH. Ainsi des solutions de TEOS aqueux à pH 12, 7.4 et 1.5 ont été essayées. La méthode utilisant les conditions basiques de Stöber s'est avérée inefficace car la présence d'éthanol et d'ammoniaque entraine une libération prématurée de la rhodamine. La méthode utilisant la solution à pH 1.5 permet de polycondenser le TEOS sur les nanoparticules mais entraine également la formation d'agrégats. De plus, les coques formées présentent de grandes fenestrations observables en TEM. La méthode utilisant la

solution à pH 7.4 donne des résultats semblables que la méthode précédente mais avec moins de formation d'agrégats.

Aucune méthode n'ayant permis de former une coque imperméable avec du TEOS seul, nous n'avons donc pas encore essayé les molécules bi fonctionnelles.

Au vu des résultats, il semble assez difficile de polycondenser le TEOS uniquement sur les nanoparticules en milieu aqueux et la formation d'agrégats parait inévitable. En effet les charges des nanoparticules et du TEOS hydrolysé sont relativement semblables. En s'éloignant du point isoélectrique de la silice, les répulsions entre Si(OH) et nanoparticules augmentent. Pour éviter ce phénomène, il pourrait être judicieux d'introduire une force motrice supplémentaire pour diriger la polycondensation sur les nanoparticules. Par exemple, l'adsorption de polymère chargé positivement sur la nanoparticule poreuse ou le greffage préalable de l'APTES pourrait permettre une polycondensation plus ciblée du TEOS.

Chapitre IV. *Silicones hybrides peptidiques*

IV.1. INTRODUCTION

Les polysiloxanes, ou silicones, constituent une classe de polymères extrêmement étudiée. Leurs propriétés uniques, telles que leurs faibles tension de surface, leurs grande perméabilité aux gaz, leurs excellentes propriétés diélectriques, leurs inerties physiologiques, leurs résistances aux moisissures et leurs stabilités thermiques et à l'oxydation,[167] en font d'eux des matériaux particulièrement attractifs et utiles. Au vu de ces propriétés, de nombreuses applications ont été proposées notamment dans les domaines tels que l'automobile, l'aéronautique et la cosmétique. Les silicones sont largement utilisés dans le domaine de la santé, pour la fabrication de dispositifs médicaux comme par exemple, des cathéters, des implants ou des prothèses.[168] Les propriétés physico-chimiques des polysiloxanes sont inhérentes aux liaisons inorganiques du type Si-O-Si, qui assurent une stabilité thermique et chimique et permettent une bonne résistance à l'oxydation et à l'hydrolyse. Cependant, les propriétés intrinsèques des silicones ne suffisent pas pour les utiliser pour des applications où une activité biologique du matériau est recommandée, comme en ingénierie tissulaire.

Des modifications du squelette silicone avec des groupements pendants pourraient être réalisées pour conférer à ces polymères des propriétés spécifiques. L'introduction de molécules actives sur ou dans la structure du polymère pourrait ouvrir de nouvelles perspectives dans le domaine des biomatériaux. En effet, l'introduction de composés bioactifs pourrait améliorer certaines propriétés des silicones comme la biocompatibilité, mais également conférer des propriétés inédites de biodégradabilité et d'intégration cellulaire, élargissant son domaine d'application.

Notre étude vise à obtenir de nouveaux silicones hybrides possédant des propriétés biologiques. Pour cela, des précurseurs hybrides possédant une partie silane, permettant la polymérisation et une partie peptidique, pour l'activité biologique, sont synthétisés. Leur polymérisation est étudiée. Les structures obtenues ont des architectures différentes suivant la nature du peptide hybride. Ces nouveaux silicones hybrides peptidiques sont ensuite caractérisés par différentes méthodes.

IV.2. Présentation générale des silicones

Le nom silicone est utilisé pour décrire des composés constitués d'un enchaînement de motifs oxygène-silicium, ce dernier présentant deux groupes latéraux organiques (R) liés à l'atome de silicium (Figure 66).

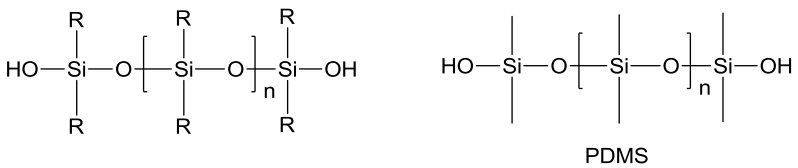


Figure 66: Formule générale des silicones à gauche et structure du polydiméthysiloxane (la silicone, PDMS) pour R= Me

Ce nom a été rapidement adopté par l'industrie et se rapporte généralement à des polymères où les substituants R sont des groupements alkyles. L'exemple le plus commun est le polydiméthylsiloxane (PDMS) si R = Me ou encore poly(diphénylsiloxane) si R = phényle. Ces polymères font parti de la famille des silicones linéaires, mais il existe également des silicones réticulés.

Le procédé de fabrication industriel du PDMS repose sur la silice et utilise du sable purifié comme produit de départ (Figure 67). Tout d'abord, le silicium est obtenu par réduction de la silice à haute température en présence de carbone, puis est transformé en dichlorodiméthylsilane par réaction avec du chlorure de méthyle (synthèse de Müller-Rochow). Le dichlorodiméthylsilane est ensuite hydrolysé en diméthylsilanol qui se condense spontanément pour former un mélange composé majoritairement d'oligomères linéaires et d'oligomères cycliques.[169]

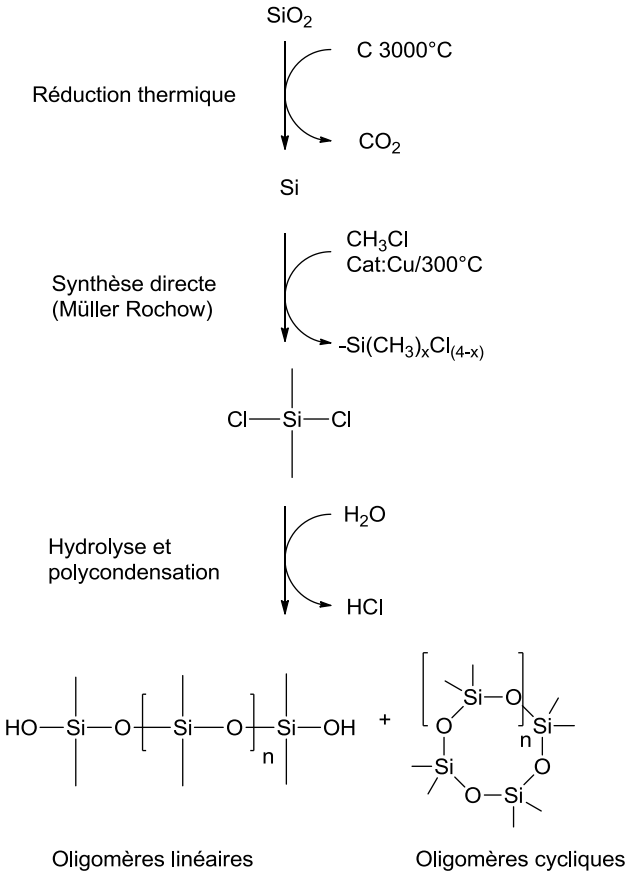


Figure 67: Formation d'oligosiloxanes linéaires et cycliques à partir de la silice

Les polymères sont ensuite obtenus soit par polycondensation des oligomères linéaires en présence de catalyseur acide ou basique (Figure 68), soit par ouverture de cycle, amorcée par voie anionique ou cationique (Figure 69).[170] Les silicones linéaires se présentent sous la forme d'huiles dont la viscosité augmente avec le degré de polymérisation.

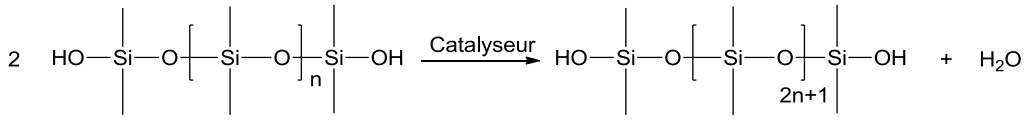


Figure 68: Polycondensation d'oligomères linéaires

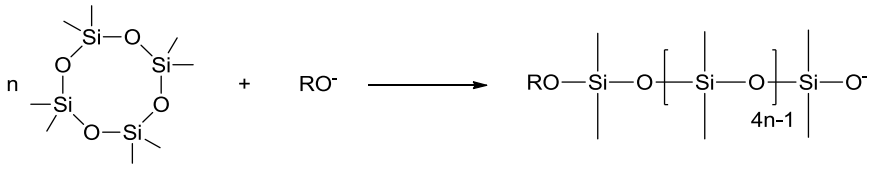


Figure 69: Ouverture de cycle par un amorceur anionique

Dans certain cas, l'utilisation de tensio-actifs peut également permettre d'augmenter la taille des chaines de polymères en les confinant dans des micelles. Le tensio-actif joue également le rôle de catalyseur pour la polycondensation grâce à la présence de fonctions spécifiques.[171]

Les silicones réticulés sont facilement obtenus par réaction entre des chaînes linéaires de silicones fonctionnalisées par des groupements R différents. Les trois principales voies de réticulation sont la polyaddition, la polymérisation par voie radicalaire et la polycondensation (Figure 70).[172],[173] La polyaddition est réalisée par réaction d'hydrosilylation entre des fonctions vinyles et des fonctions silanes présentent le long et/ou en fin de chaines, en présence de catalyseur généralement à base de platine. La voie radicalaire fait également intervenir les fonctions vinyles. Celles-ci, en présence d'un initiateur comme les peroxydes, conduisent à la formation de radicaux le long de la chaine qui peuvent réagir avec des méthyles d'une chaine voisine. Enfin, la polycondensation peut être réalisée à température ambiante par un procédé mono ou bi composants encore appelés RTV1 et RTV2 pour *Room Temperature Vulcanization*.

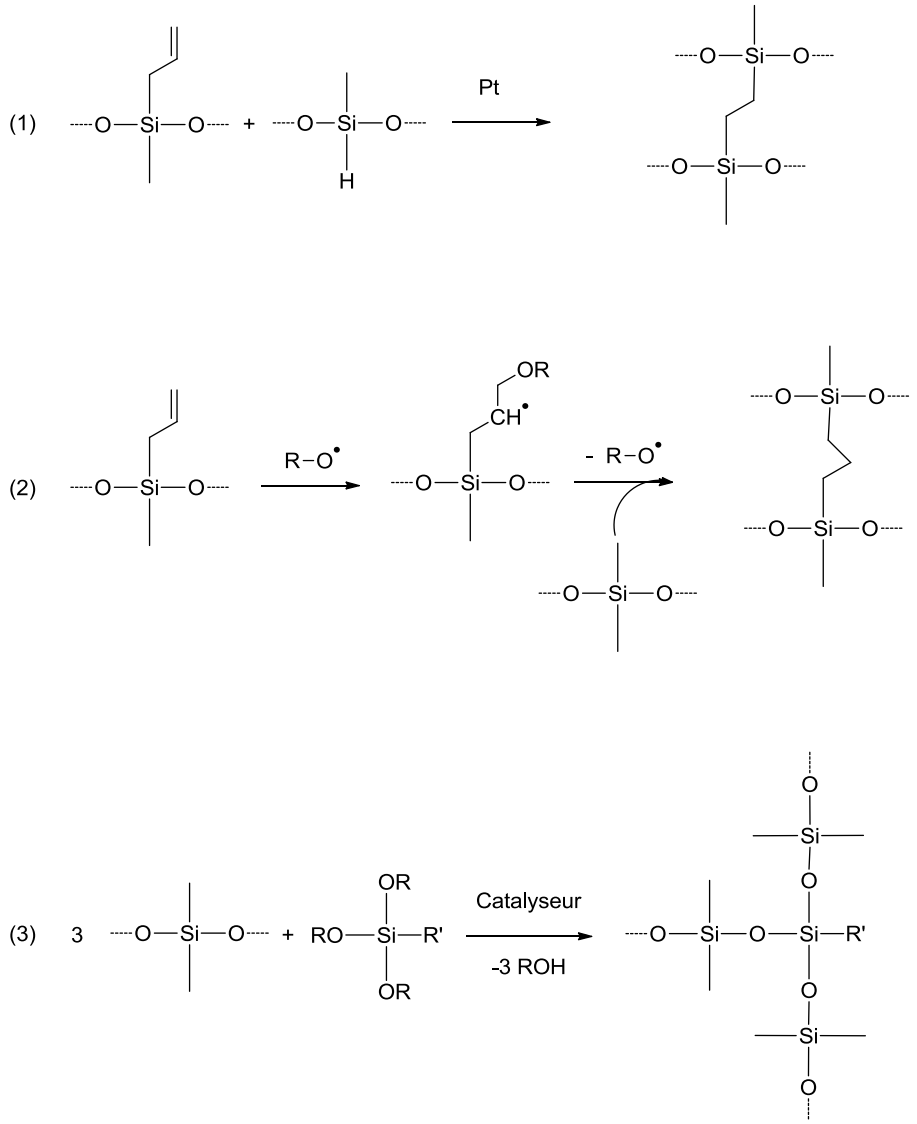


Figure 70: Réticulation par polyaddition (1), voie radicalaire (2) et polycondensation (3)

IV.3. Synthèse de silicones hybrides

Les silicones sont des polymères inertes chimiquement et biologiquement. Cependant, la demande croissante en matériaux fonctionnalisés à conduit à envisager des modifications de ces polysiloxanes.[174] Pour cela plusieurs approches peuvent être envisagées, uniquement les approches covalentes sont détaillées ici.

IV.3.1. Modification du squelette PDMS

Une des approches pour réaliser ces modifications consiste à conserver le squelette polysiloxane intact et d'introduire des fonctions réactives en surface qui sont ensuite utilisées pour réagir avec une molécule. C'est le cas de certains polysiloxanes utilisés dans le domaine de l'électro-optique et dans la préparation de colonnes chirales.[175] La fonctionnalisation (ou la modification) de surfaces siliconées est devenue l'une des stratégies les plus courantes pour la préparation de matériaux biocompatibles.[168] La

modification de surface peut être effectuée par voie physique (plasma chaud, plasma froid, UV, laser, rayons X, etc..) ou chimique (oxydation, acide).[176] Ce traitement permet de générer des fonctions réactives oxygénées ou des radicaux en surface qui peuvent ensuite réagir avec une molécule simple. Parmi les méthodes chimiques, le greffage sur surface est la technique la plus utilisée pour obtenir par exemple des surfaces antibactériennes.[177]

Des peptides ont déjà été greffés sur des surface de PDMS par cette méthode, comme la séquence RGD (Figure 71).[178]

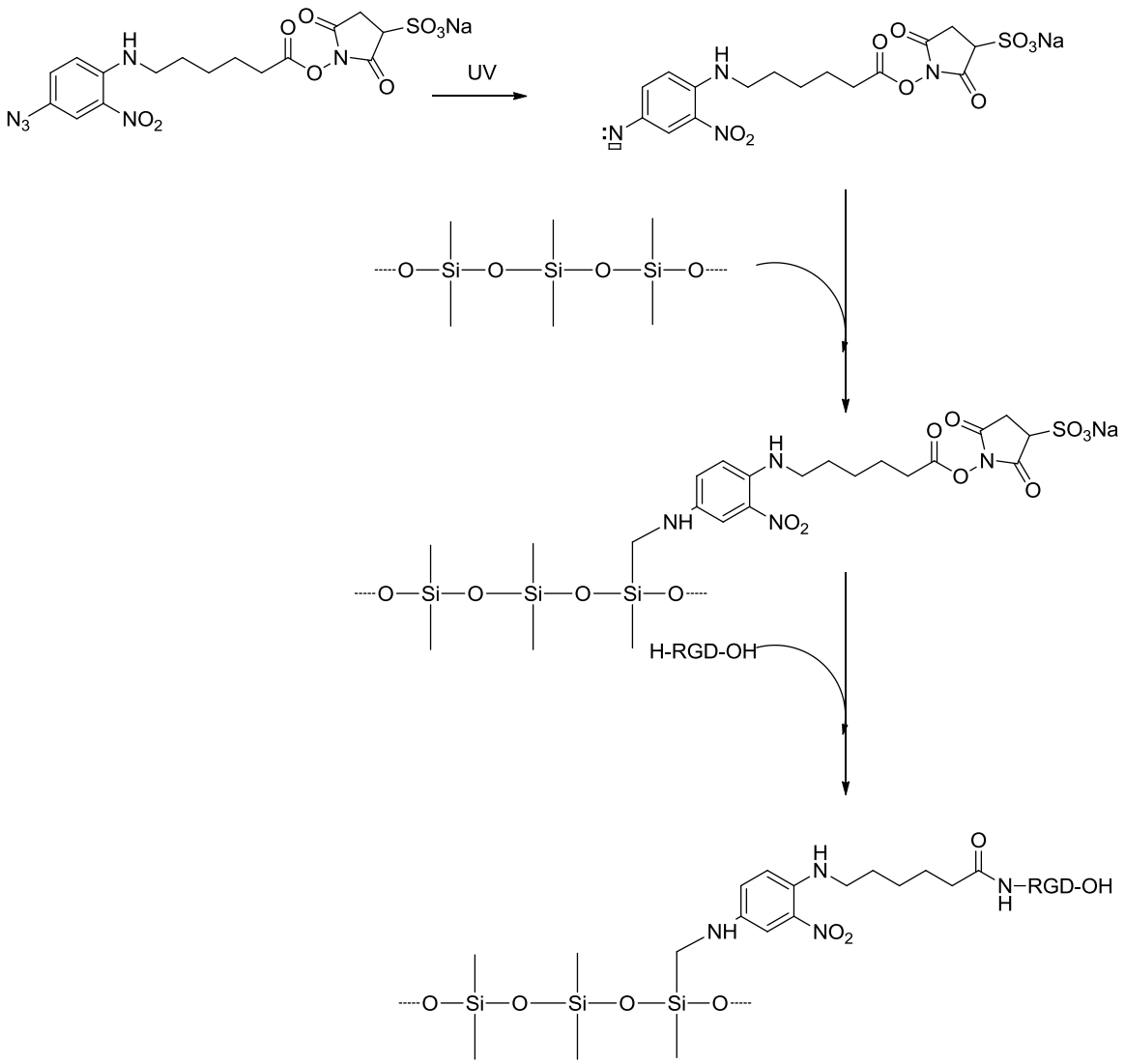


Figure 71: Modification d'un PDMS par réaction radicalaire en vue du greffage d'un peptide

IV.3.2. Copolymérisation avec d'autres polymères

Une autre approche consiste à coupler simplement par hydrosilylation le PDMS avec un autre polymère comme du PEG[179] (le PEG étant modifié par des fonctions vinyles et le PDMS par des fonctions silanes). Cela permet d'améliorer les propriétés diélectriques pour

des applications dans l'énergie (Figure 72). Deux polymères silicones peuvent également réagir par cette méthode s'ils possèdent les fonctions réactives adéquates.[180],[181]

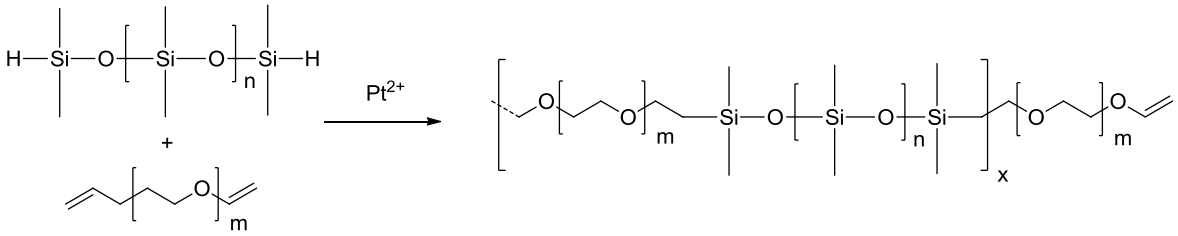


Figure 72: Réaction d'hydrosilylation utilisée pour préparer un copolymère PDMS-PEG.

Des copolymères silicones-PEG ou silicone-Xyloglucan (Le Xyloglucan est un polysaccharidique naturel), par exemple, permettent de diminuer l'hydrophobicité du matériau et d'améliorer leur biocompatibilité.[182],[183] Les modifications par des polysaccharides ou du poly-(L-acide-lactique) ont déjà été reportées pour des applications dans la reconnaissance cellulaire ou la régénération tissulaire.[184],[185],[186]

IV.3.3. Utilisation de monomère hybride

Il est également possible d'obtenir des silicones hybrides par polymérisation de précurseurs hybrides. Par exemple la polycondensation entre dichlorodimethylsilane et un Cl_2MeSiR' (R' = chaine fluorée, chaine alkyle, vinyle) a déjà été utilisée pour synthétiser des siloxanes hybrides.[187] Cependant, le nature de R' s'est cantonnée à des chaines carbonées ou fluorés mais n'a jamais été une molécule d'intérêt biologique.

Les méthodes précédentes permettent d'obtenir des silicones hybrides par modification d'un PDMS, par copolymérisation ou par polymérisation de monomère hybride simple. C'est cette dernière méthode qui nous intéresse et que nous souhaitons améliorer. Pour cela, nous proposons la synthèse de monomère hybride incorporant un peptide.

IV.4. Synthèse de silicone peptidique

Dans notre vision des silicones hybrides, le polymère incorpore directement la séquence peptidique au cœur du squelette polysiloxane. Cette stratégie est basée sur l'utilisation de monomères pseudo-peptidiques sélectivement fonctionnalisés ou multi-fonctionnalisés par des groupements chlorodiméthylsilane ($-SiMe_2Cl$).

La grande particularité de cette stratégie est que la polycondensation est réalisée dans l'eau à pH 7 sans avoir recours à des catalyseurs ni des réactifs chimiques. Des tampons biologiques à pH physiologique peuvent donc être utilisés pour la polymérisation, ce qui rend cette approche innovante pour le domaine biomédical.

Pour cette étude, trois types de monomères ont été préparés comportant une courte séquence peptidique (Figure 73).

- Des peptides hybrides monofonctionnels (type **a**) où le silane est introduit du coté N-ter
- Des peptides hybrides bifonctionnels (type **b**) où l'introduction du silane est réalisée en N- et C-ter. Ces blocs sont utilisés pour obtenir des polymères linéaires de type **B**.
- Des peptides hybrides bifonctionnels (type **c**) où l'introduction du silane est réalisée en N-ter et sur l'amine libre de la chaine latérale de la lysine. Ces blocs sont utilisés pour obtenir des polymères de type « peigne » **C**.

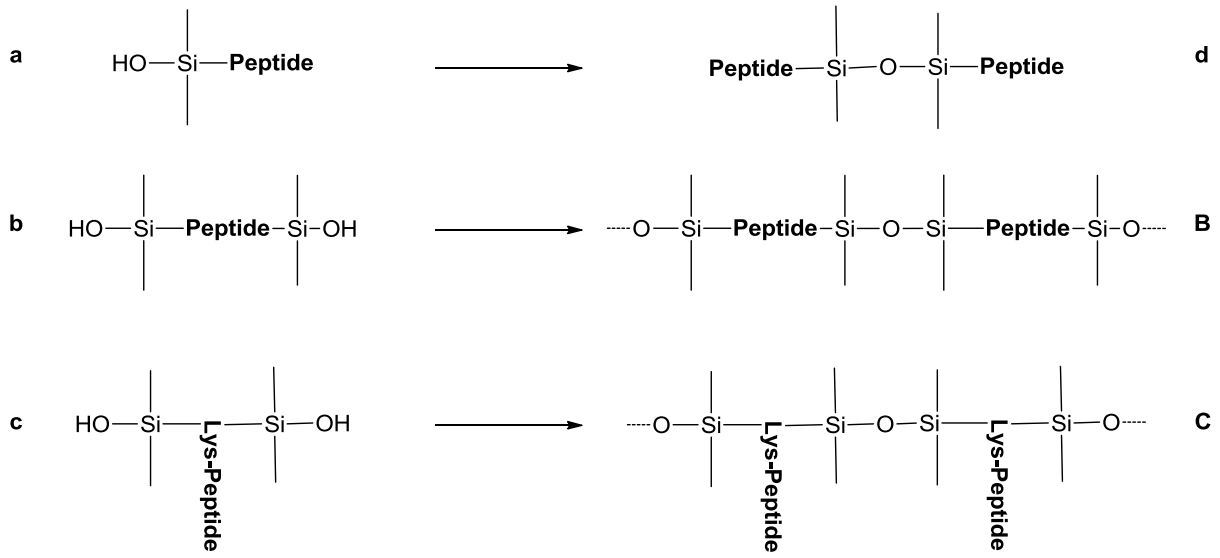


Figure 73: Présentation des différents types de monomères a, b et c permettant d'obtenir les dimères (d), des polymères linéaires (B) et en peigne (C)

Le groupement chlorodiméthylsilane peut être introduit pendant la synthèse du peptide, que ce soit en solution ou sur support solide. Cette stratégie est applicable à toutes les séquences peptidiques. Nous avons choisi le 3-isocyanatopropyldiméthylchlorosilane (ICPDMCS), réactif commercialement disponible, pour l'introduction du groupement $SiMe_2Cl$ sur une fonction amine libre du peptide. Si la séquence peptidique possède plusieurs fonctions réactives vis-à-vis du réactif de silylation, la fonctionnalisation intervient sur un peptide encore protégé par des groupements protecteurs acido labiles. Nous allons tout d'abord nous intéresser à l'étude des dimères.

IV.4.1. Etude de la dimérisation de peptide hybrides monfonctionnels diméthylhydroxysilane

L'homo-dimérisation de ligands est une stratégie connue pour augmenter l'affinité d'un ligand pour son récepteur par une augmentation locale la concentration de ligand à proximité du site de liaison.[188] Ainsi la potentialisation d'effets biologiques a pu être obtenue par la dimérisation de certaines hormones[189],[190] ou médicaments.[191] Des dimères

ont été récemment reportés pour inhiber des interactions protéine/protéine.[192] Les méthodes de dimérisation connues comme l'utilisation de ponts disulfures, le couplage amine/acide activé ou encore les méthodes de ligation, nécessitent soit des réactifs spécifiques (ex : oxydant) ou la fonctionnalisation préalable des monomères par deux groupements différents mutuellement réactifs (maléimide/thiol, aldéhyde/hydrazine). Grâce à la stratégie que nous souhaitons développer, il sera possible de former les dimères dans l'eau à pH physiologique sans ajout d'autres réactifs. De plus, ce modèle simple de dimère nous permet également d'étudier la stabilité de la liaison siloxane dans différentes conditions de pH avant de passer à des modèles plus complexes de polymères obtenus avec des monomères bi fonctionnels (**b**, **c**).

Pour l'étude de la dimérisation de peptide hybride monofonctionnel de type **a**, six séquences tri-peptidiques ont été sélectionnées. Elles comportent les groupements fonctionnels les plus courants des chaînes latérales afin de vérifier la chimio sélectivité du groupement $SiMe_2Cl$ vis-à-vis des différentes fonctions. Ainsi les acides aminés de nature aliphatique (Gly, Leu, Ahx, Nle), aromatique (Phe, Trp) ou présentant une fonction acide carboxylique (Glu, Asp), amine (Lys) et guanidine (Arg) ont été utilisés dans les séquences suivantes : H-GFE-NH_2, H-GFR-NH_2, H-KLA-NH_2, H-AhxRR-NH_2, H-βAWNleDF-NH_2 et H-(R(Pbf))$_2$-NH_2 puis fonctionnalisés pour obtenir les monomères **a1**, **a2**, **a3**, **a4, a5** et **a6** (Tableau 27).

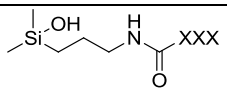
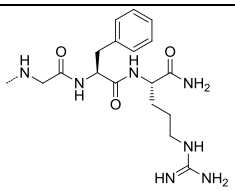
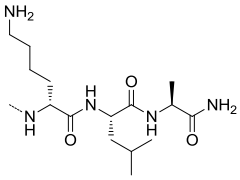
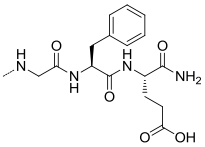
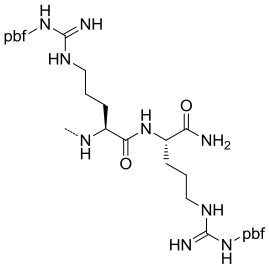
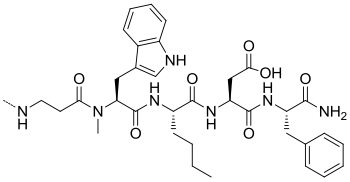
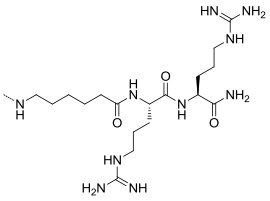
ref		Monomère MW / $[M+H]^+$ m/z	Dimère MW / $[M+H]^+$ m/z	Rdt(%)
a1		536.3 / 537.5	1055.38 / 1055.8	35
a2		488.3 / 489.3	959.4 / 960.3	42
a3		509.2 / 510.0	1001.2 / 1002.1	38
a4		993.3 / 994.6	1968.6 / 985.2	29
a5		809.0 / 809.5	1628.0/815.1	31
a6		601.3 /602.3	1185.6/1186.5	68

Tableau 27: Présentation des différents dimères peptidiques utilisés

IV.4.1.1. Synthèse des monomères type a

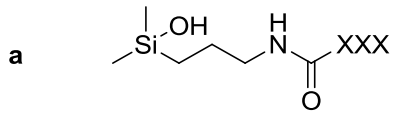


Figure 74: Structure des monomères de type a

Tous les monomères ont été synthétisés sur support solide en utilisant une résine Rink amide en stratégie Fmoc/^{t}Bu (Figure 74). La fonctionnalisation par le groupement silane a été réalisée après clivage et déprotection du peptide avec une solution TFA/TIS/H_2O pour les composés **a1, a3 a5** et **a6** (Figure 75). Pour la silylation, le peptide est dissout dans du DMF en présence de 1.2 eq de ICPDMSC et de 4 eq de DIEA. La solution est agitée une heure à température ambiante et l'avancement est contrôlé par HPLC. En fin de réaction la solution est concentrée puis le monomère est précipité par ajout d'éther. Les composés sont obtenus avec des rendements entre 30 et 42%.

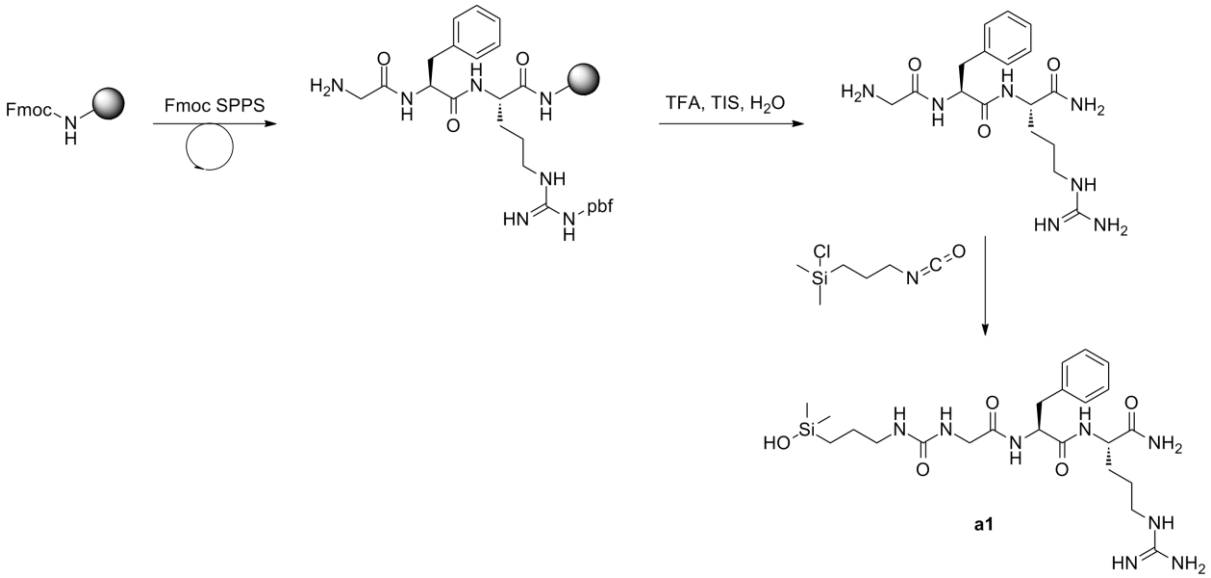


Figure 75: Synthèse du monomère a1

Pour les composés **a2** et **a4** (Figure 76), la fonctionnalisation par l'ICPDMCS a été réalisée sur support solide avant clivage. Dans le cas du composé **a2**, la chaine latérale de la lysine doit rester protégée pendant la réaction avec ICPDMS pour avoir sélectivement la fonction silane en N-ter. Dans ce cas, 3 eq d'ICPDMCS ont été utilisés en présence de 6 eq de DIEA. La réaction est agitée deux heures à température ambiante et sa complétion est contrôlée par test TNBS sur les billes de résine. Le peptide est décroché du support par une solution de TFA/TIS/H_2O puis précipité par ajout d'éther.

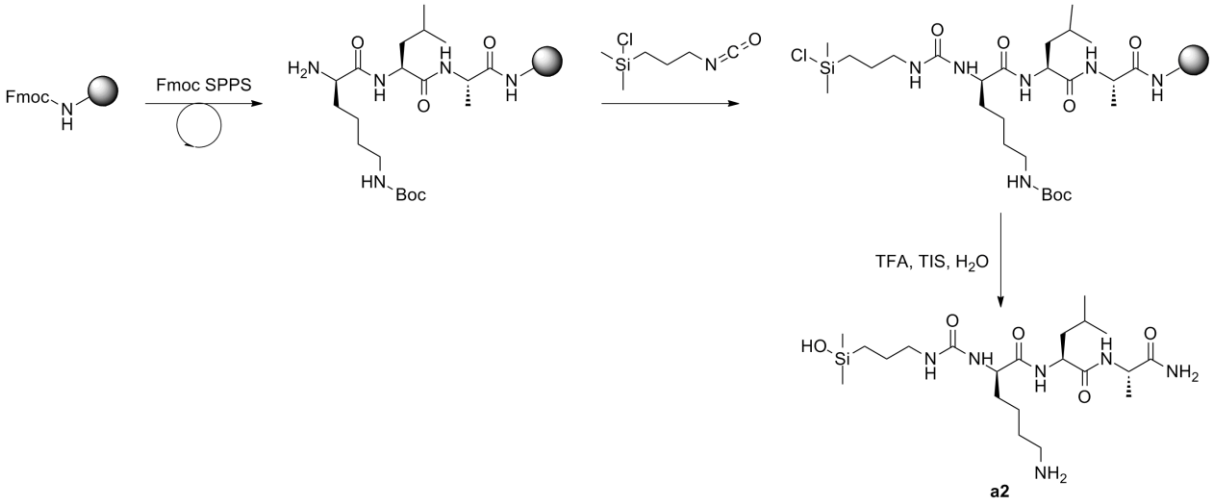


Figure 76: Synthèse supportée du monomère a2

Pour le composé **a4**, les groupements protecteurs Pbf ont été conservés pour des raisons de solubilité. Le peptide silylé a été décroché du support par clivage ménagé.

La silylation sur support permet de mono-fonctionnaliser des peptides qui possèdent plusieurs fonctions réactives. Que ce soit en solution ou sur résine, lors de l'ajout de l'ICPDMCS sur le peptide, la fonction chlorosilane s'hydrolyse spontanément (libération de HCl) pour donner la fonction silanol. Quelque soit la stratégie utilisée (support ou solution), les monomères ont été purifiés par HPLC préparative. Ceux-ci sont caractérisés par LC/MS avant lyophilisation.

La caractérisation du monomère **a1** sera détaillée ici à titre d'exemple. L'analyse LC/MS du monomère **a1** (Figure 77) confirme la présence du composé ($[M+H]^+$ m/z 537.5) sous forme silanol ($–SiMe_2OH$) avec une pureté (HPLC) de 98%.

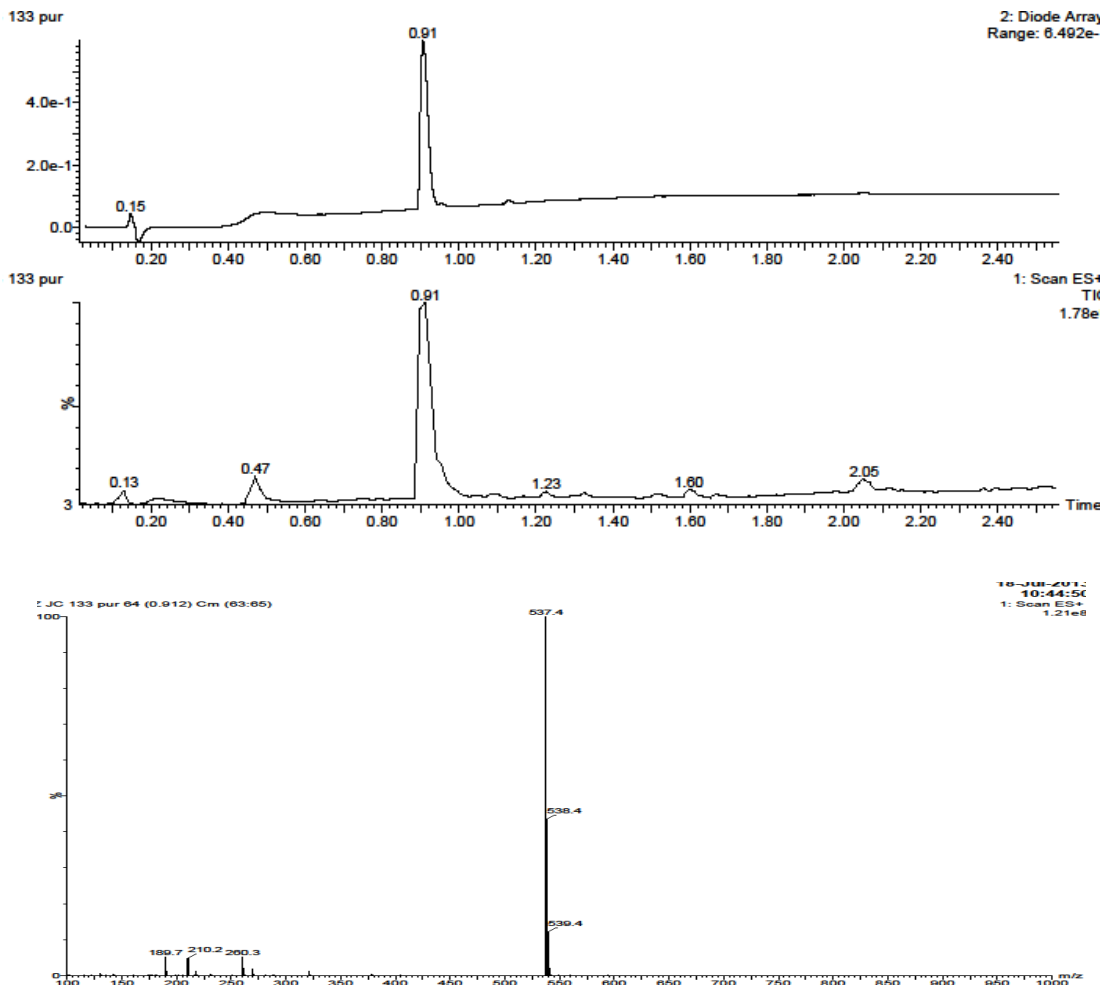


Figure 77: Analyses LCMS du monomère a1.

IV.4.1.2. Synthèse des dimères d

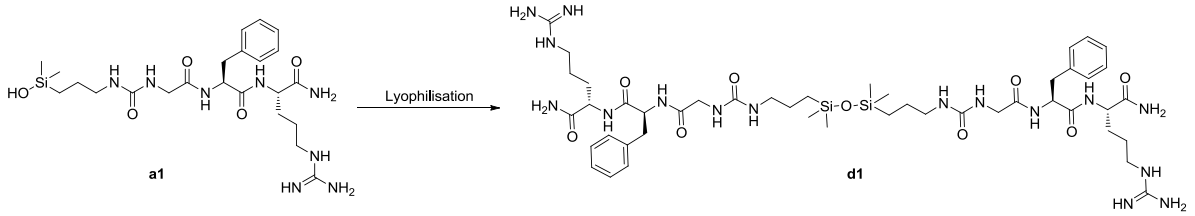


Figure 78: Formation du dimère d1 par lyophilisation

Les dimères sont ensuite obtenus par lyophilisation des monomères (Figure 78). Pour cela, les monomères sont lyophilisés après purification. La poudre obtenue est caractérisée par LC/MS dans une solution aqueuse et analysée rapidement. Le chromatogramme indique deux pics correspondant au monomère **a1** et au dimère **d1** (Figure 80). Nous remarquons que le pic à 1,27 min ($[M+H]^+$ m/z 739.5), attribué au dimère est présent en quantité importante. La présence du monomère est attribuée à l'hydrolyse du dimère dans la solution (Figure 79). En effet la poudre de dimère contient une quantité non négligeable de sels de TFA (présent dans les éluants de purification) qui catalyse l'hydrolyse de la liaison siloxane.

L'analyse du même mélange après 12 heures ne révèle que la présence du monomère **a1** à cause de l'hydrolyse.

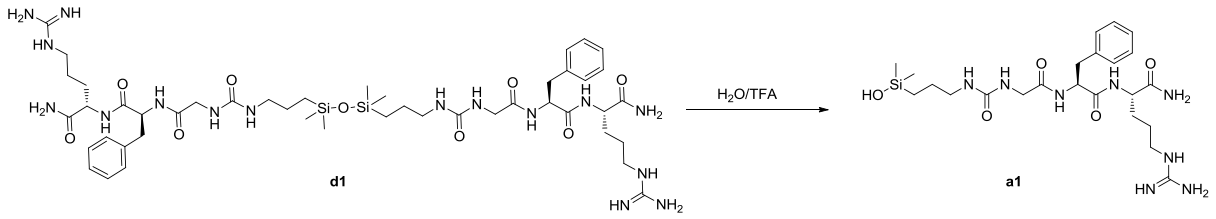


Figure 79: Hydrolyse du dimère d1 en condition aqueuse acide

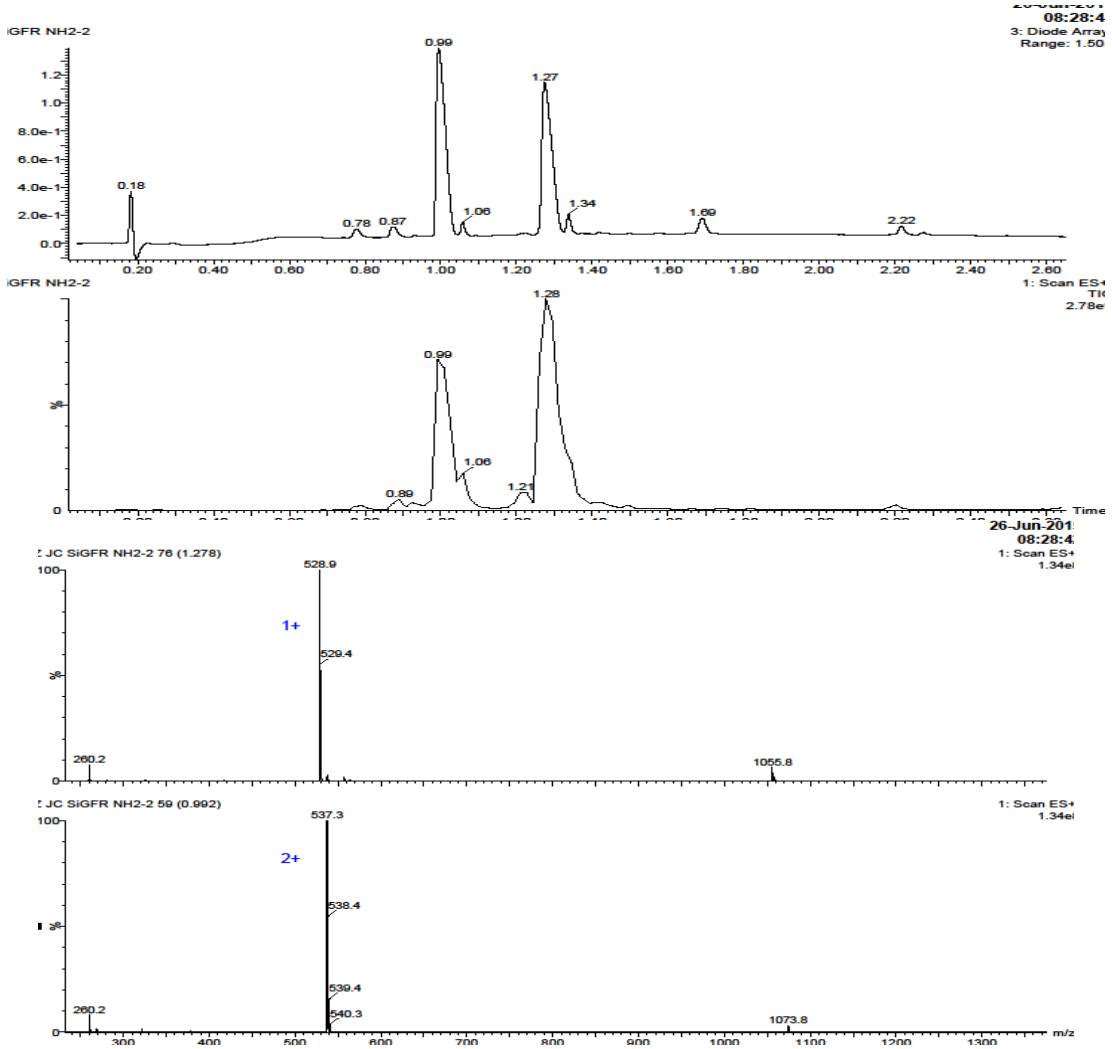


Figure 80: Analyses LC/MS du monomère a1 après lyophilisation

Pour vérifier la présence du dimère, nous avons réalisé la RMN ^{29}Si du composé **d1** (Figure 81) dans un solvant organique pour éviter la réaction d'hydrolyse.

L'analyse réalisée dans le DMSO est calibrée par rapport au TMS (Tétraméthylsilane) et indique la présence de deux pics à 8,05 ppm et 11,52 ppm correspondant à une entité

dimérique Si-O-Si et monomérique Si-OH respectivement.[193] l'intégration des signaux RMN montre que le dimère s'est formé à 90%.

Il est important de noter que les premières analyses RMN du silicium 29 ne révélaient que la présence d'un pic à 8.05 ppm pouvant conclure à la présence exclusive de dimères. Afin d'approfondir notre étude, une séquence RMN ^{29}Si quantitative dept-silicium par transfert de polarisation a été optimisée récemment au sein du laboratoire de mesures physiques (LMP) de la faculté des sciences de Montpellier. La séquence se base sur un transfert d'énergie entre les protons des groupements méthyles du silicium et le silicium (paramètres importants : ($^{2}J^{Si-H}$) = 5 Hz, D1= 1.5s).

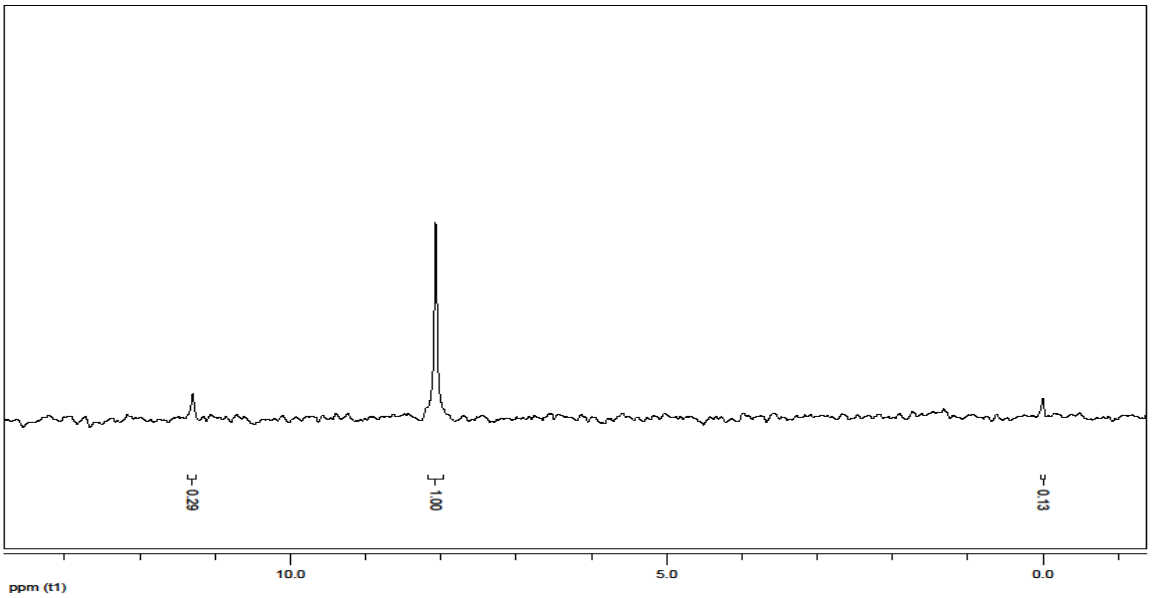


Figure 81: RMN ^{29}Si (DMSO-D_6) de la poudre d1 obtenue par lyophilisation

La lyophilisation permet d'obtenir les dimères avec une bonne efficacité mais du monomère est toujours détecté en faible quantité.

Dans le but d'obtenir uniquement du dimère, plusieurs méthodes ont été testées pour favoriser la condensation :

- Chauffer le composé à 60 °C dans le DMSO pendant 12h.
- Chauffer la poudre à 80 °C à l'étuve pendant 12h.
- Réaliser une HPLC préparative dans des conditions neutres de pH pour séparer les dimères des monomères.
- Faire varier la concentration du composé dans le DMSO pour l'analyse RMN entre 10 et 100 mM.

Cependant aucune de ces méthodes n'a permis d'obtenir exclusivement le dimère **d1,** le meilleur rapport **d1/a1** obtenu est 90/10 (déterminé par RMN).

IV.4.1.3. Effet des acides sur la stabilité du dimère

Pour montrer l'effet des acides sur les dimères, le dimère **d1** est solubilisé dans l'acide trifluoroacétique deutérée pur et passé en RMN du silicium (Figure 82). Le spectre indique la présence d'un pic à 33,31 ppm correspondant à un adduit TFA du monomère **a1**. Ce type d'adduit a déjà été décrit dans la littérature.[193]

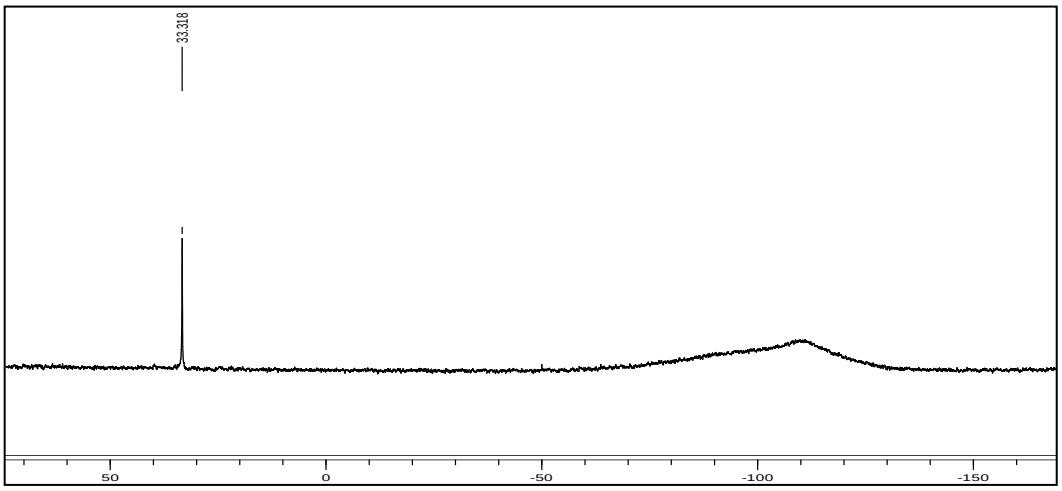


Figure 82: Spectre RMN silicium du dimère d1 dans une solution de TFA-D.

Tous les dimères ont été obtenus et caractérisés par LC/MS et RMN ^{29}Si. Suivant les séquences, il reste entre 10% et 25% de monomère après lyophilisation. En milieu organique le rapport dimère /monomère est stable et aucune hydrolyse ne se produit. Par contre, nous avons pu observer l'hydrolyse des dimères dans des conditions aqueuses acides, en particulier dans les échantillons pour l'analyse LC/MS ou lors des purifications par HPLC préparative. Nous avons donc voulu étudier en détail le comportement de la liaison SiOSi sur un peptide hybride dans différentes conditions aqueuses à différents pH, notamment à pH physiologique. Cette étude est importante pour évaluer l'utilisation de ces dimères pour des applications biologiques.

Pour ces études, nous avons choisi le dimère **d4** car c'est le seul dimère qui s'est avéré soluble dans les différentes solutions aqueuses.

IV.4.1.4. Etude de la stabilité du dimère d4

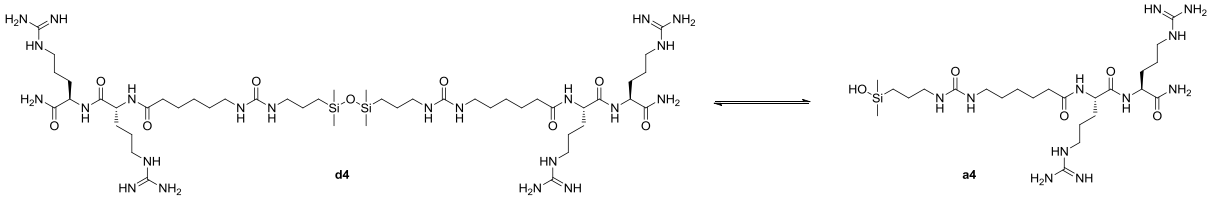


Figure 83: Hydrolyse du dimère d4

IV.4.1.4.1. Choix du noyau

La RMN apparaît comme la technique la plus performante pour étudier la stabilité du dimère **d4** dans l'eau à différents pH. Cependant les caractéristiques intrinsèques de l'atome de ^{29}Si (abondance isotopique, moment magnétique) font de lui un noyau très peu sensible ne permettant pas d'obtenir des spectres dans la fourchette de temps nécessaire à notre analyse, de l'ordre de la minute. Au contraire, la RMN ^{1}H et ^{13}C pourraient permettre d'étudier les formes silanol et siloxane de manière indirecte. Nous avons pensé que les méthyles présents sur l'atome de silicium peuvent montrer des variations de densité électronique entre la forme dimérique et monomérique relativement faibles mais suffisamment importantes pour être distinguées en RMN ^{1}H et ^{13}C (Tableau 28).

Noyau	^{29}Si		^{1}H		^{13}C	
δ=ppm solvant	SiOH	SiOSi	$Si(CH_3)_2OH$	$Si(CH_3)_2OSi(CH_3)_2$	$Si(CH_3)_2OH$	$Si(CH_3)_2OSi(CH_3)_2$
DMSO	11.52 (10%)	8.05 (90%)	0.012 (12)	0.044 (88)	0.00 (12)	0.25 (88)
D_2O	18.65 (11)	10.685 (89)	0.145 (14)	0.104 (86)	n.d.	n.d.

Tableau 28: Déplacements chimiques dans le DMSO-D et D_2O du composé d4 en RMN ^{1}H, ^{13}C et ^{29}Si. Entre parenthèses, sont données les valeurs représentant le pourcentage de dimère d4 et monomère a4

Pour montrer cela, les RMN quantitatives ^{1}H, ^{13}C et ^{29}Si du composé **d4** obtenu après lyophilisation ont d'abord été réalisées dans le DMSO avec le TMS comme référence interne (Figure 84).

Le spectre RMN ^{1}H montre deux pics à 0,044 ppm et 0,012 ppm intégrant pour 1 et 0,20 respectivement correspondant aux protons des méthyles des deux espèces Si-O-Si et SiOH.

La RMN ^{13}C quantitative indique à son tour deux pics à 0,25 ppm et 0,00 ppm intégrant pour 1 et 0,35 respectivement correspondant aux carbones des méthyles des deux espèces Si-O-Si et SiOH (SiOH superposé avec le TMS).

Nous remarquons alors la correspondance des intégrations entre les RMN ^{1}H et ^{13}C qui diffèrent sensiblement de la RMN ^{29}Si qui est beaucoup moins sensible. Nous remarquons également une inversion de la position relative des signaux entre la RMN du ^{29}Si et la RMN ^{1}H et ^{13}C.

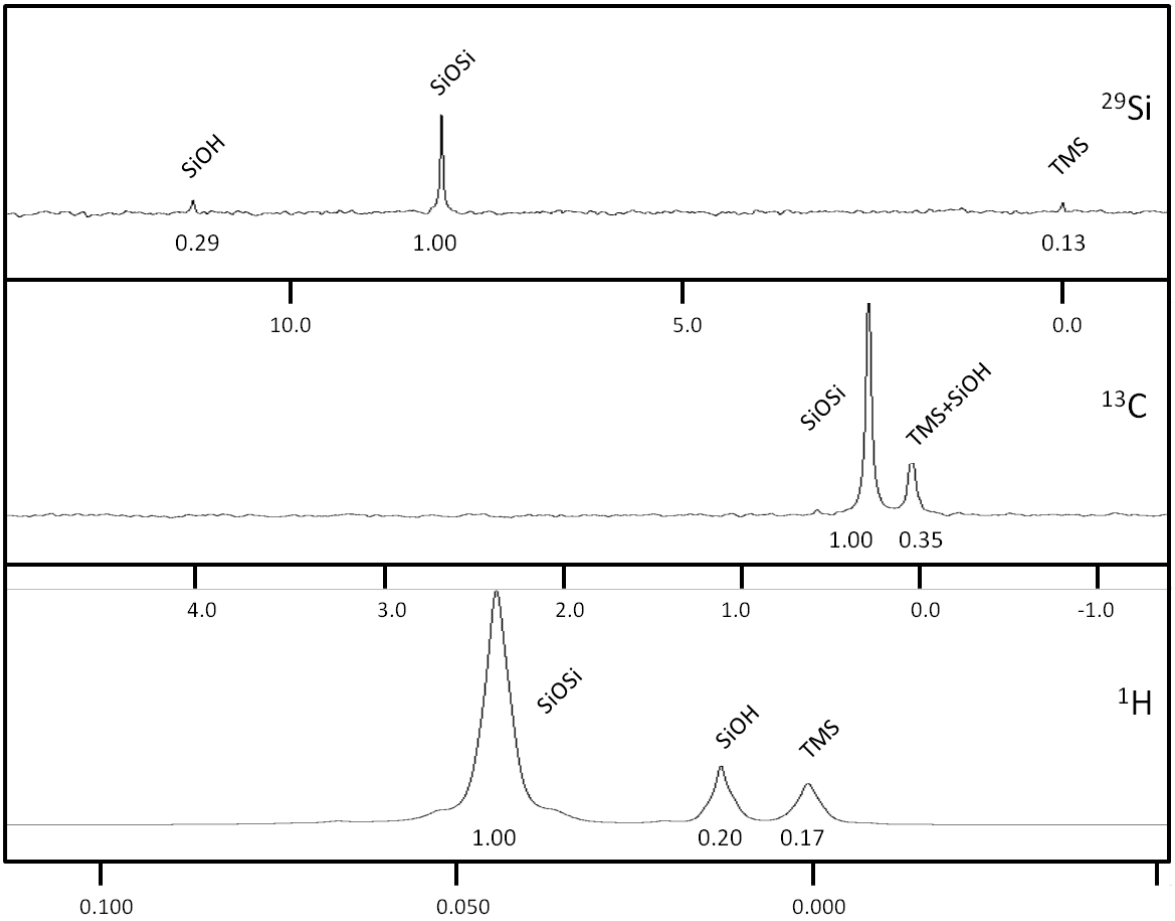


Figure 84: RMN ^{29}Si, ^{13}C et ^{1}H du composé d4 dans le DMSO en présence de TMS

La correspondance des signaux étant démontrée, nous nous sommes basés sur la RMN du proton, plus sensible et la plus rapide, pour réaliser des études cinétiques de stabilité de la liaison SiOSi.

IV.4.1.4.2. Étude de stabilité de d4 par H1 RMN

Pour préparer les solutions tampon/dimère, une précaution est nécessaire. En effet, les poudres en sortie de lyophilisation contiennent des sels de TFA. Or la concentration importante de la solution en composé **d4** fait chuter sensiblement le pH si uniquement une solution tampon est utilisée. Pour obtenir le pH désiré, le dimère **d4** est dissout juste avant l'analyse dans 70 µL de D_2O puis une solution à 0.5 N en NH_4OH est utilisée pour rapprocher le pH vers la valeur désirée. Enfin la solution tampon permet de stabiliser le pH en complétant le volume jusqu'à 700 µL. Le pH est contrôlé grâce à un pH mètre équipé d'une micro sonde. Le volume précis de NH_4OH et de la solution tampon sont calculés préalablement sur un échantillon témoin. Le composé **d4** est donc obtenu en solution à une concentration de 88 mM dans différentes solutions, pH 3, pH 7.4 (tampon PBS) et pH 12 contenant 10 % v/v de D_2O.

Les spectres ^{1}H sont enregistrés toutes les cinq minutes pendant une heure puis toutes les 1, 5 ou 10 heures en fonction de la vitesse d'hydrolyse. L'intégration des signaux des méthyles

liés au silicium à 0.104 ppm et 0.145 ppm (par rapport au signal du D_2O) permettent de déterminer le rapport des deux espèces (**d4** et **a4**) et de visualiser leurs évolutions en fonction du temps (Figure 85). Cette attribution des pics est confirmée également par RMN du silicium. Nous remarquons que dans l'eau, l'ordre des pics proton et silicium est le même, contrairement aux spectres obtenus dans le DMSO.

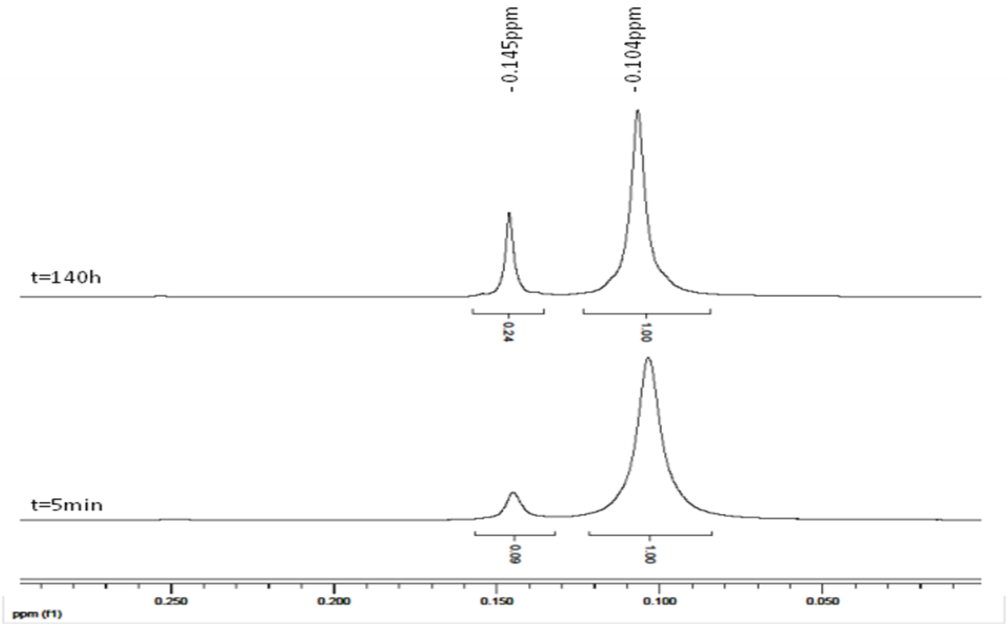


Figure 85: RMN ^{1}H du composé d4 dans une solution aqueuse à pH 7.4 après 5 min (spectre du bas) et 140 h (spectre du haut)

Les données des intégrations RMN ont été reportées dans le graphique ci-dessous (Figure 86) qui permet de tracer le pourcentage de dimère en fonction du temps à pH 3, pH 7 et pH 12. Nous constatons que le dimère est relativement stable à pH 7,4 avec une hydrolyse de 0,1% par heure. La stabilité du dimère diminue avec le pH avec une hydrolyse à pH 3 de l'ordre de 0,3 %/h. En conditions basiques, la vitesse d'hydrolyse est la plus forte avec à pH 12 une hydrolyse de 79 %/h. Les valeurs sont en adéquation avec la littérature (voir courbe de condensation du TEOS paragraphe I.2).

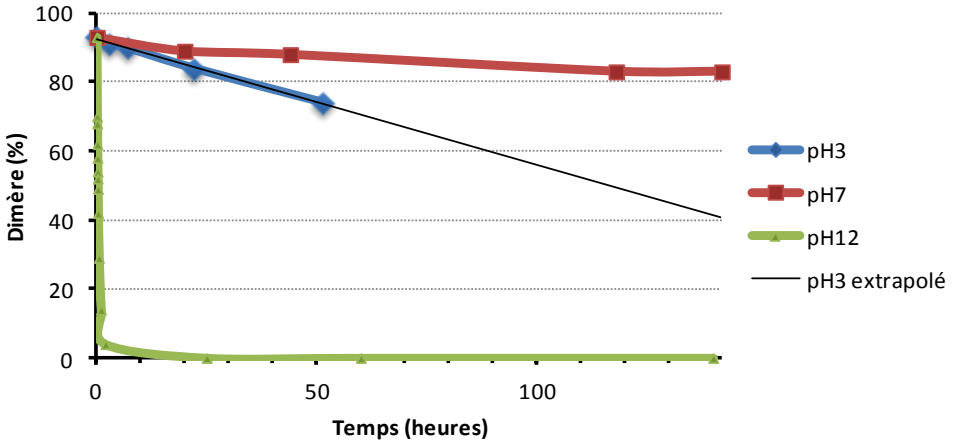


Figure 86 : Stabilité du dimère A4 déterminée par RMN ^{1}H dans différentes solution tamponnées

Ces expériences soulignent la très forte dépendance du pH sur la vitesse d'hydrolyse du dimère. Cette observation est en accord avec la littérature sur la vitesse d'hydrolyse du TEOS en fonction du pH.

La bonne stabilité des dimères à pH physiologique permet de les utiliser pour des tests biologiques. Nous allons maintenant montrer que les monomères bi-fonctionnels permettent d'obtenir des polymères.

IV.4.2. Polymérisation de peptides diméthyl hydroxysilane bifonctionels

IV.4.2.1. Synthèse des monomères de type b

Pour obtenir les polymères linéaires **B,** les monomères **b** ont été synthétisés. Les différentes structures et caractérisations LC/MS sont regroupées dans le Tableau 29.

Pour cela la N-Alloc éthylène diamine est d'abord immobilisée sur une résine BAL-PS possédant un linker de type Backbone Amine Linker (BAL), via une amination réductrice en présence de borohydrure de sodium ($NaBH_4$).[194] L'amine secondaire supportée peut ensuite être acylée par le premier aminoacide N-Fmoc-protégé. La synthèse peptidique se poursuit selon un protocole classique de synthèse sur support solide en stratégie Fmoc/^{t}Bu. A titre d'exemple, la synthèse du monomère **b1** est présentée en Figure 87.

ref		Monomère MW / $[M+H]^+$ m/z	Rdt(%)
b1		739.0 / 739.5	43
b2		691.0 / 691.5	55
b3		711.9 / 712.4	46
b4		1195.6 / 1196.0	52
b5		1011.3 / 1011.0	49

Tableau 29 : Présentation des différents monomères peptidiques b utilisés. XXX représente la séquence peptidique

Après déprotection du groupement Fmoc de la glycine N-terminale puis du groupement Alloc par réduction au palladium tétrakis en présence de phénylsilane, la fonctionnalité chlorodiméthylsilane est introduite sur les deux fonctions amines libres par réaction avec 6 eq d'ICPDMSC en présence de 8 eq de DIEA. Les peptides hybrides sont ensuite décrochés de la résine avec un mélange TFA/TIS/H_2O (95/2.5/2.5 v/v/v). Après purification par HPLC préparative et lyophilisation, les monomères **b** sont obtenus avec des rendements allant de 43 à 55 %.

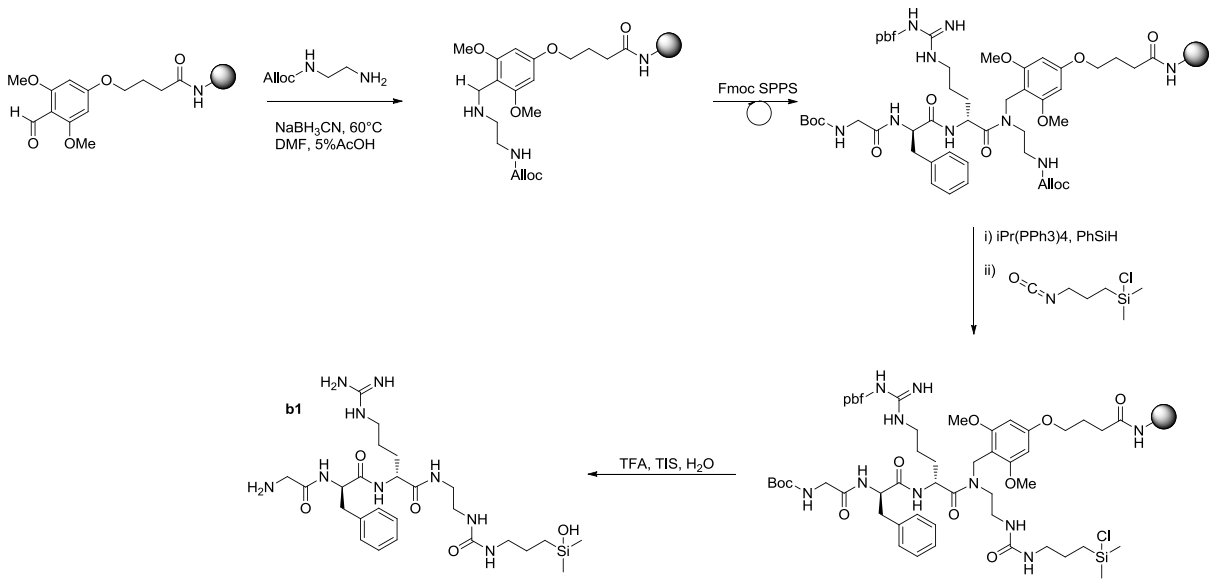


Figure 87: Synthèse du monomère b1

La caractérisation du monomère **b1** sera détaillée ici à titre d'exemple (Figure 88). Le chromatogramme LCMS du monomère **b1** obtenu par lyophilisation de la poudre indique la présence de deux espèces correspondant aux monomères sous deux formes distinctes.

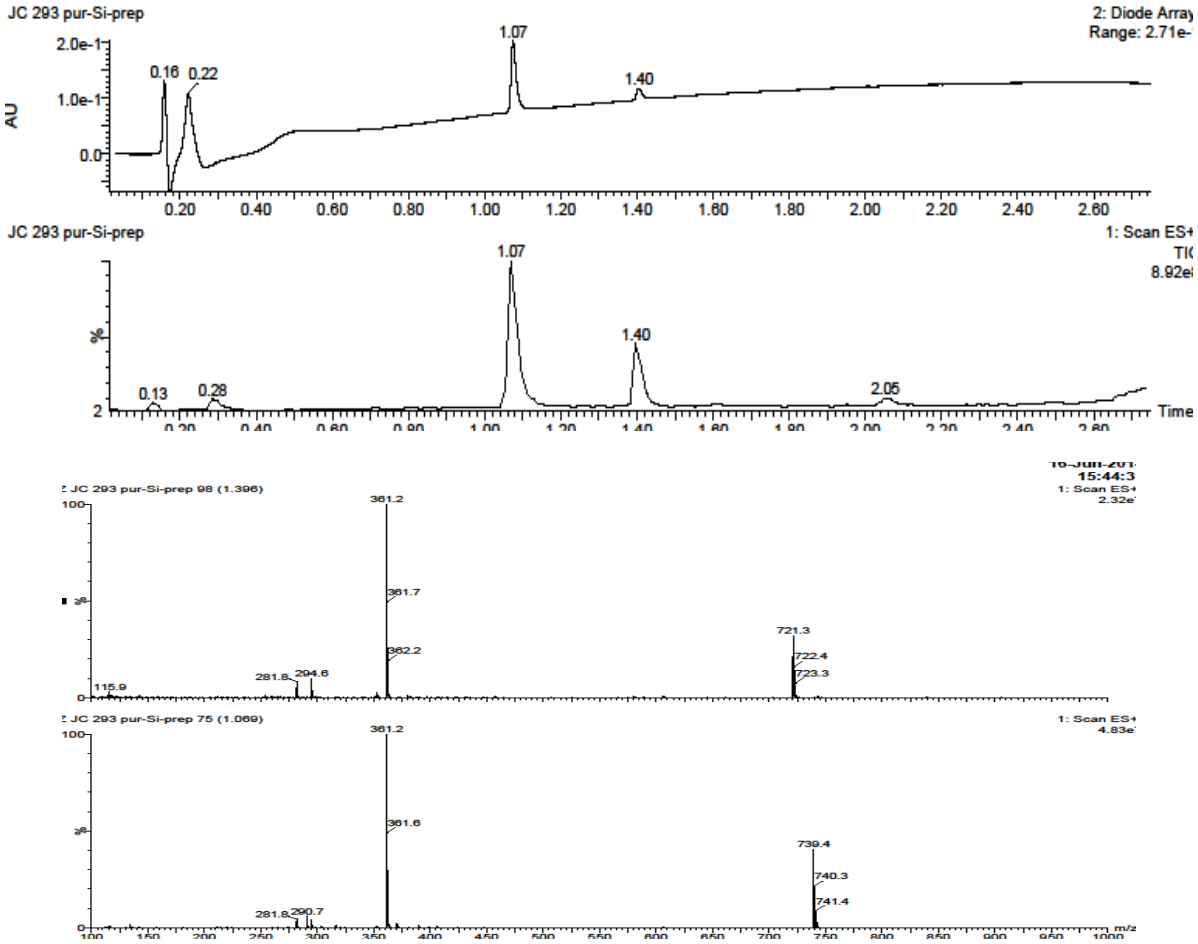


Figure 88: Analyses LC/MS du composé b1

En effet, le pic à 1,07 min correspondant au monomère (m/z 739.4) et celui à 1,38 min est attribué au produit de cyclisation par une condensation intramoléculaire du monomère (m/z 721.3) comme le montre la Figure 89.

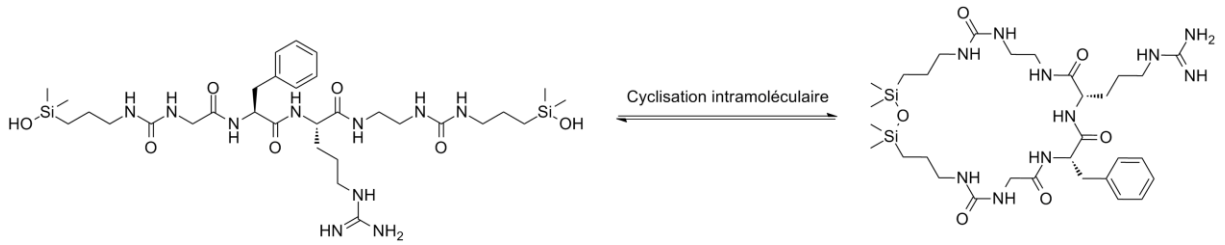


Figure 89: Cyclisation intramoléculaire du monomère b1

Il s'agit d'une cyclisation tête queue par condensation des 2 fonctions silanols du monomère **b1**. Cependant, cette réaction de cyclisation intramoléculaire est réversible en milieu acide de manière analogue aux dimères précédemment étudiés.

Le chrommatogramme ne montre que la présence de condensation intramoléculaire, aucune condensation intermoléculaire n'est observée ce qui peut sembler curieux compte tenu des observations faites sur les peptides hybrides monofonctionnels de type **a**. Nous pouvons avancer l'hypothèse suivante : lors de la lyophilisation, les monomères (sous formes ouverte ou cyclisée) sont figés dans la glace. Avec la sublimation du solvant, la condensation est favorisée mais la faible liberté de mouvement des molécules défavorise les condensations intermoléculaires. Ainsi les monomères de type **b** ne forment pas de polymères pendant la lyophilisation.

IV.4.2.2. Synthèse des monomères de type c

Pour obtenir les polymères en peigne de type **C,** les monomères **c** ont été synthétisés (Tableau 30). Pour cela, la partie peptidique a été synthétisée sur support solide (résine Rink amide) via une stratégie Fmoc/^{t}Bu (Figure 90).

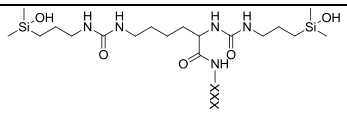
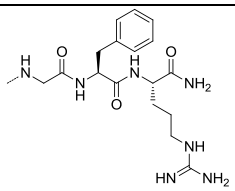
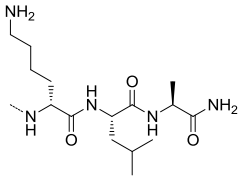
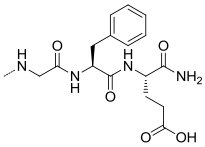
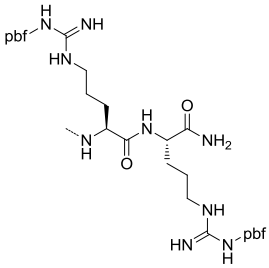
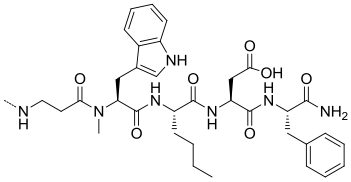
ref		Monomère MW / $[M+H]^+$ m/z	Rdt(%)
c1		824.1 / 824.6	47
c2		776.1 / 776.5	39
c3		797.0 / 797.5	46
c4		1280.7 / 1281.0	52
c5		1096.4 / 1096.7	35

Tableau 30: Présentation des différents monomères peptidiques c utilisés. XXX représente la séquence peptidique

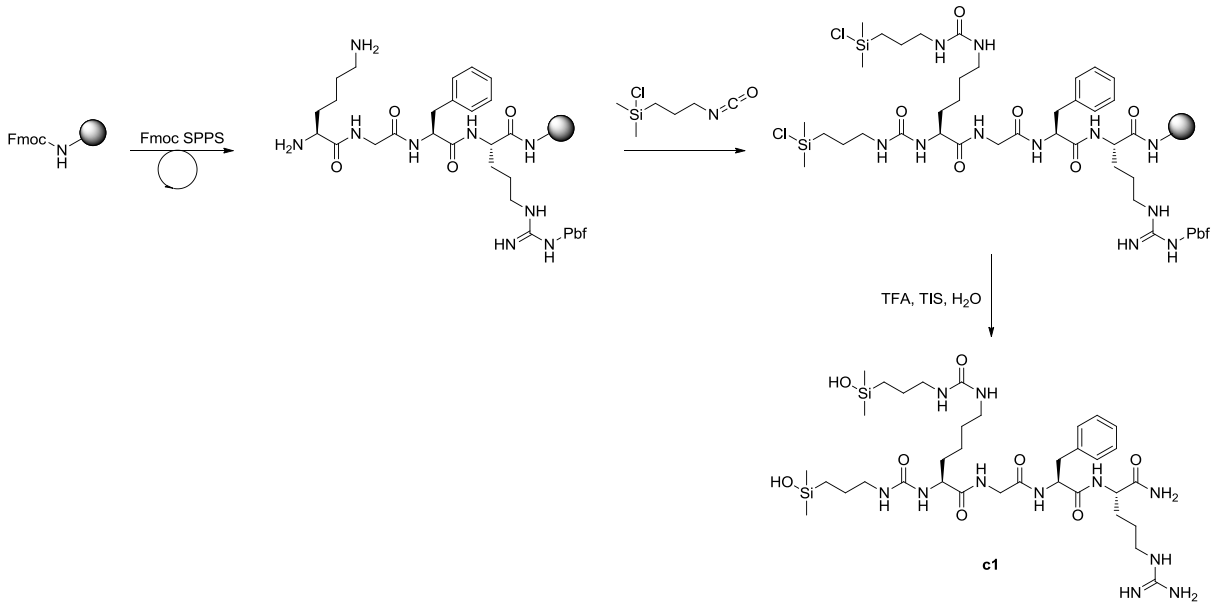


Figure 90: Synthèse du monomère c1

Une lysine a été couplée du coté N-terminal de la séquence peptidique sous la forme Fmoc-Lys(Fmoc)-OH. Après déprotection simultanée des deux groupements Fmoc, la fonctionnalité chlorodiméthylsilane est introduite sur les deux fonctions amines libres en utilisant l'ICPDMSC, dans les mêmes conditions que pour les monomères de type **b**. Les peptides hybrides **c** sont ensuite décrochés de la résine avec un mélange TFA/TIS/H_2O, purifiés par HPLC préparative en phase inverse et lyophilisés pour obtenir des rendements entre 35 et 52 %. Comme précédemment, l'analyse LC/MS des poudres lyophilisées indique la présence de deux espèces correspondant aux monomères sous une forme ouverte et fermée. L'exemple du monomère **c1** sera pris pour illustrer ce phénomène.

Le chromatogramme LC/MS du monomère **c1** (Figure 91) présente 2 pics : un pic à 1,12 min correspondant au monomère (m/z 824,6) et un autre à 1,45 min représentant le produit issu de la cyclisation intramoléculaire du monomère (m/z 806,6) comme le montre la Figure 92

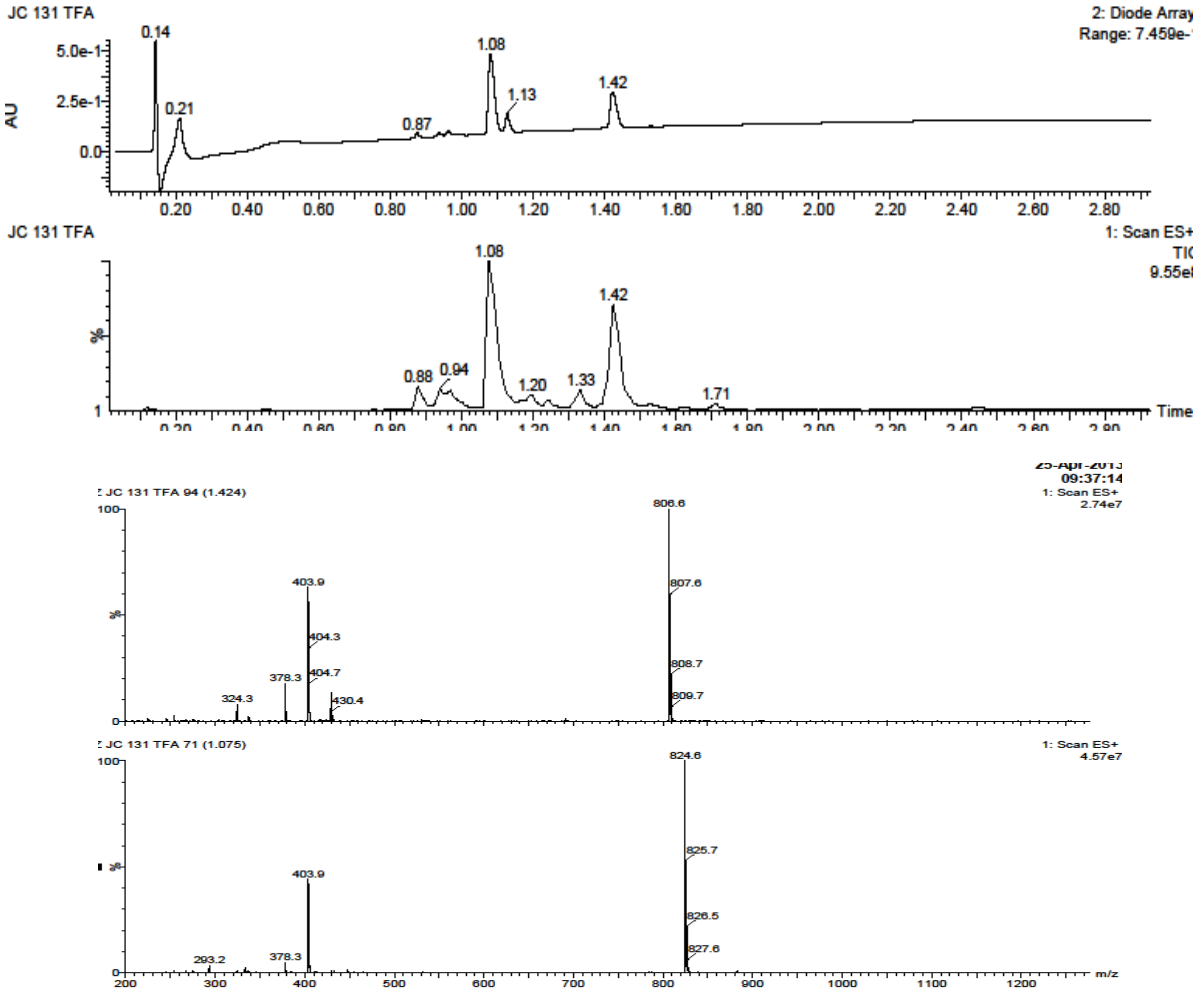


Figure 91: Analyses LC/MS du composé c1

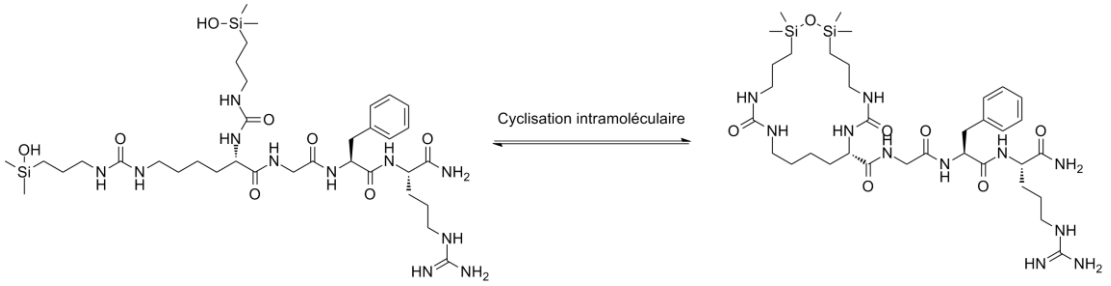


Figure 92: Cyclisation intramoléculaire du monomère c1

IV.4.2.3. Polycondensation des monomères bifonctionnels b et c

Pour synthétiser les polymères **B** et **C**, les monomères **b** et **c** sont solubilisés dans un minimum de DMF (0.5 g/mL) contenant 0.1 %TFA pour favoriser la forme «ouverte». L'ajout de PBS (pH 7,4) goutte à goutte à température ambiante permet de remonter le pH jusqu'à la neutralité pour favoriser la polycondensation. L'accroissement de la longueur des chaines de polymère entraine leur précipitation. Les polymères obtenus sous forme de pâte collante,

sont récupérés par centrifugation, rincés plusieurs fois avec du tampon PBS et de l'eau puis lyophilisés pour obtenir une poudre.

Les polymères séchés ont été caractérisés par ATG et DSC (pour *differential scanning calorimetry*). Les analyses thermogravimétriques des polymères et de leurs monomères correspondants ont été réalisées en utilisant une gamme de température de 30 °C à 800 °C avec un rampe de 5 °C/min sous air.

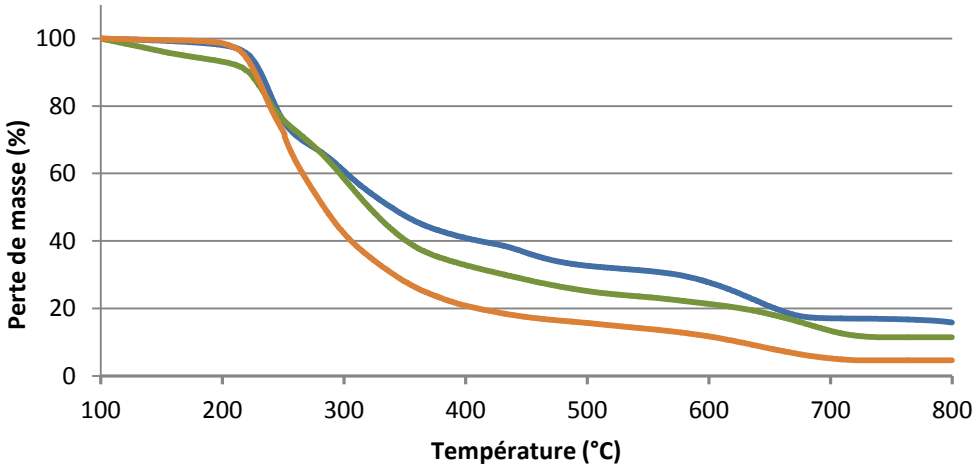


Figure 93: Analyses ATG des composés d1 (courbe orange), B1 (courbe verte) et C1 (courbe bleue)

La Figure 93 montre les analyses ATG obtenues avec la même séquence peptidique, pour le dimère **d1**, et les polymères **B1** et **C1.** La décomposition débute vers 200 °C et se termine à environ 700 °C où la totalité de la matière organique est dégradée. La masse résiduelle à 800 °C correspond à la phase inorganique (SiO_2) présente dans le polymère dont la quantité concorde globalement avec les valeurs théoriquement attendues. Par exemple la masse résiduelle théorique (m_{rth}) du dimère **d1** est de :

$$m_{rth}(\mathbf{d1}) = \frac{\quad}{\quad} = 11.6\%$$

Ce pourcentage est à comparer avec la valeur expérimentale qui est de 8.9 %. Pour les polymères, la masse résiduelle théorique est d'environ m_{rth}(**B1**) = 16.5 % pour le polymère **B1** et m_{rth}(**C1**)= 14.8 % pour le polymère **C1**. On remarque également une décomposition en deux temps où 60 à 70 % de la masse est perdue entre 200 et 500 °C, puis une perte de masse de 15 à 25 % est observée entre 500 et 800 °C. Au vu de ces courbes et comme nous pouvions l'attendre, nous remarquons une légère amélioration de la stabilité thermique entre les dimères et les polymères correspondant, les polymères se décomposant à des températures plus élevées. Cependant nous n'avons pas constaté de différence de stabilité entre les polymères linéaires **B** et leurs homologues **C**.

Les monomères **b** et **c** ainsi que des polymères **B** et **C** ont également été caractérisés par DSC et SEC (Tableau 31). L'analyse DSC entre -60 °C et 150 °C est réalisé en deux cycles, pour vérifier la réversibilité des phénomènes. Toutes les températures de transition vitreuses (T*g*)

qui ont été détectées se situent entre 25 et 50 °C, températures beaucoup plus élevées que la T*g* d'un PDMS conventionnels (-120 °C).[195] Cet effet est directement lié à la nature du groupement organique des polymères (peptide *vs* alkyle). De plus les polymères linéaires **B2** et **B3** présentent également une deuxième température de transition vitreuse vers -40 °C.

ref	T_g(°C)[a]	MM(g/mol)[b]	IPD_{SEC}[c]	DP_{RMN}[d]	DP_{SEC}[e]
B1	+30	insoluble	insoluble	insoluble	insoluble
B2	+24 ; -41	insoluble	insoluble	insoluble	insoluble
B3	+25 ; -39	insoluble	insoluble	insoluble	insoluble
B4	Pas de T_g	19100	3.9	30	19
B5	Pas de T_g	23300	1.27	18	20
C1	+49	16900	1,24	28	20
C2	+26	insoluble	insoluble	insoluble	insoluble
C3	Pas de T_g	insoluble	insoluble	insoluble	insoluble
C4	Pas de T_g	7050	1.44	6	6
C5	+24	16700	1.07	16	13

Tableau 31: Caractéristiques physico-chimiques des polymères. [a]Les T*g* sont déterminées par DSC entre -60 et +150 °C. [b] déterminée par SEC. [c] indice de polydispersité déterminé par SEC en utilisant le polystyrène comme standard. [d] et [e] degré de polymérisation déterminé par SEC et RMN ^{29}Si respectivement

En complément de ces analyses, des études de chromatographie d'exclusion stérique (SEC) et de RMN on été réalisées. Cependant, la majorité des polymères obtenus ne sont pas solubles dans les solvants organiques (DCM, DMF, MeOH, DMSO) et n'ont pas pu être caractérisés par des méthodes en solution. Par contre les analyses des polymères **B4**, **B5**, **C1, C4 et C5,** solubles dans le DMF ont pu être effectuées.

L'analyse SEC et RMN du polymère **C1** sont prises comme exemple. Réalisée dans le DMF, l'analyse SEC (Figure 94) montre clairement une évolution de la masse moléculaire entre la forme monomérique **c1** (en bleu) et celle du polymère **C1** (en rouge).

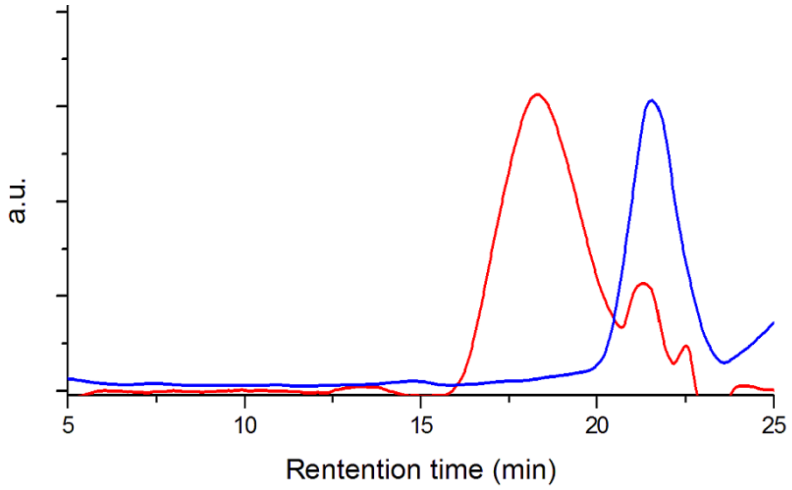


Figure 94 : Chromatogrammes SEC (DMF, LiBr 1 %) ; détection à 254 nm du polymère C1 (courbe rouge) et du monomère c1 (courbe bleue)

L'analyse SEC permet de déterminer une masse molaire du polymère de 16900 g/mol ce qui correspond à un degré de polymérisation de DP_{SEC} = 28, et un indice de polydispersité de 1,27 par rapport à un standard polystyrène. Le standard utilisé à un impact important sur la valeur du DP_{sec}. Il doit normalement avoir une structure chimique la plus proche possible du polymère étudié pour obtenir une masse moléculaire proche de la réalité. Plusieurs standards sont calibrés sur l'appareil (polystyrène, PEG, poly ester) mais aucun ne ressemble chimiquement à notre polymère. Le standard polystyrène a donc été choisi comme référence. Il faut juste garder à l'esprit que la masse calculée par SEC du polymère **C1** est simplement indicative.

L'analyse RMN ^{29}Si réalisée dans le DMSO du polymère **C1** permet de mettre en évidence les liaisons Si-O-Si et SiOH de l'oligomère (Figure 95). Aussi le rapport des deux pics Si-O-Si/SiOH permet de déterminer un degré de polymérisation de DP_{RMN} = 20 proche du degré de polymérisation déterminé par SEC.

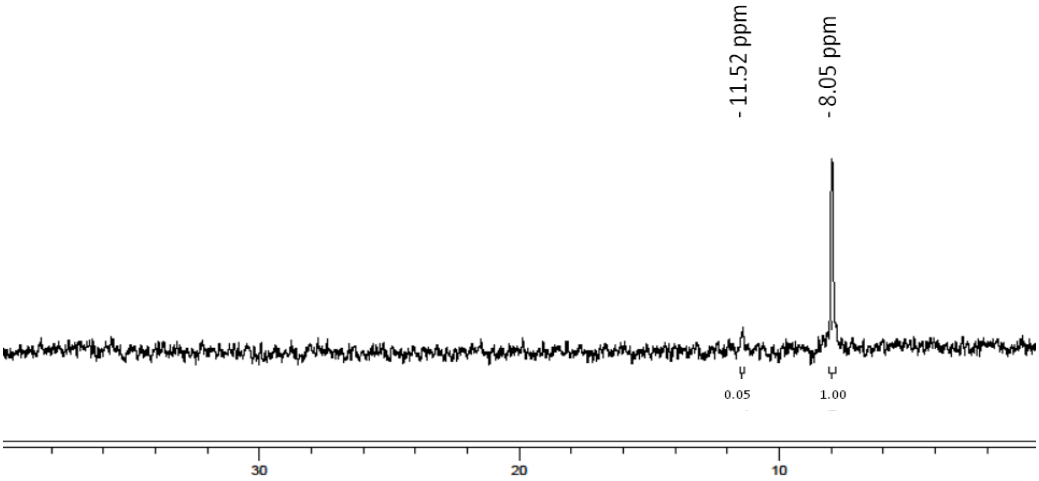


Figure 95: Spectre RMN ^{29}Si du polymère C1 dans le DMSO. Les pics à 8.05ppm et 11.52 correspondent au SiOH et SiOSi respectivement

Pour tous les polymères solubles, le degré de polymérisation déterminé par SEC est proche du degré de polymérisation déterminé par RMN. Pour le polymère **B4,** le degré de polymérisation déterminé par RMN (30) est beaucoup plus élevé que celui déterminé par SEC (19). Cela peut s'expliquer par la présence d'espèces cycliques contenant seulement des Si-O-Si, augmentant artificiellement le rapport Si-O-Si/Si-OH.

IV.4.2.4. Stabilité en milieu biologique

La nouvelle classe de polymères peptidiques que nous avons développés peut trouver de multiples applications en vectorisation, transfection, en « drug delivery » ou ingénierie tissulaire. Des études de toxicité et de biocompatibilité sont en cours au laboratoire. Dans le cadre de cette thèse, nous avons commencé à nous intéresser à leur stabilité dans un environnement biologique.

Des études de stabilité du polymère **C4** dans du plasma bovin ou de milieu de culture cellulaire ont été réalisées pendant 7 jours à 37 °C. Des échantillons du polymère ont été récupérés à 1, 3 et 7 jours et analysés par SEC pour mesurer la masse moléculaire (Figure 96).

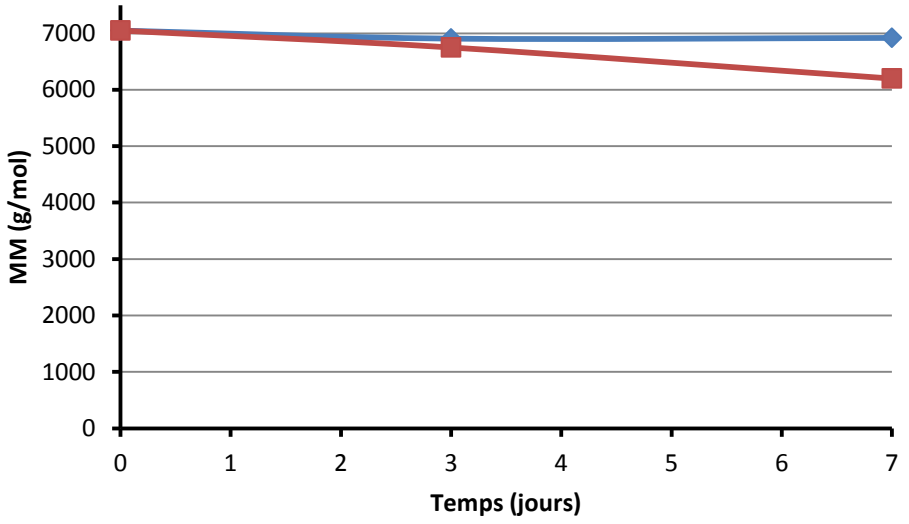


Figure 96: Evolution de la masse moléculaire déterminée par SEC du polymère C4 en fonction du temps dans du plasma bovin (courbe rouge) et dans un milieu de culture cellulaire (courbe bleue)

La **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** représente l'évolution de la masse moléculaire du polymère **C4** en fonction du temps. Nous remarquons une légère diminution de la masse moléculaire du polymère **C4** incubé dans du milieu de culture cellulaire au bout d'une semaine (6910 g/mol et 6890 g/mol après 3 et 7 jours respectivement). Cette diminution est plus marquée dans le cas du plasma (6679 et 6108 après 3 et 7 jours respectivement). En présence du milieu de culture cellulaire les liaisons SiOSi du polymère **C4** s'hydrolysent lentement, probablement de la même manière que ce que nous avons décrit pour les dimères (cf. paragraphe IV.4.1.4) et induisent une diminution de la masse moléculaire. En présence de plasma, cet effet s'additionne au clivage enzymatique des parties peptidiques. Cette hydrolyse reste cependant modeste et le polymère est relativement stable en milieu biologique sur une semaine.

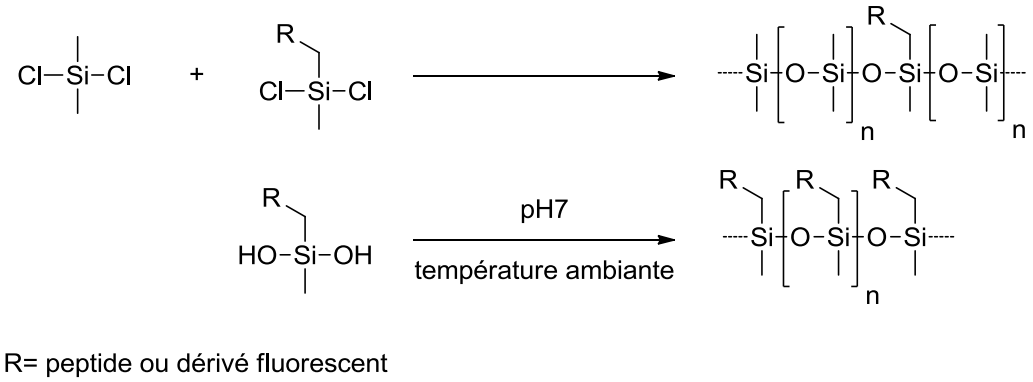
IV.5. Conclusion et perspectives

Nous avons développé une nouvelle stratégie permettant la synthèse de dimères ou de polymères hybrides polysiloxanes - peptides grâce à l'utilisation de monomères peptidiques possédant une ou deux fonctions diméthylhydroxysilane.

Il nous a été possible de réaliser des études RMN ^{1}H et ^{13}C qui ont permis d'étudier la stabilité de la liaison SiOSi de ces peptides hybrides, dans l'eau à différent pH. A pH physiologique, la liaison siloxane est relativement stable mais s'hydrolyse d'autant plus vite que nous nous éloignons de la neutralité.

La même stratégie a ensuite été appliquée sur des monomères bifonctionnels pour obtenir des polymères hybrides. Les polymères sont obtenus par polycondensation dans une solution aqueuse à pH 7. Ainsi nous avons préparé deux types de polymères : des polymères linéaires et des polymères en peigne. Les dix polymères ont été caractérisés par ATG et DSC. Certain de ces polymères se sont avérés solubles dans le DMF et le DMSO et ont pu être caractérisés par SEC et RMN ^{29}Si. Ces analyses ont montré que ces polymères peuvent contenir jusqu'à 30 unités monomèriques. L'incubation du polymère **C4** dans différents milieux biologiques a montré la stabilité du polymère même si une faible hydrolyse est observée après sept jours, ce qui laisse envisager des applications dans le domaine de la santé.

Les perspectives d'application pour ce travail sont nombreuses. Au niveau de la stratégie de synthèse, d'autres voies sont à l'étude au laboratoire (Figure 97). On peut citer la synthèse de blocs hybrides dichloromethylsilane-peptides,[196] ou l'utilisation des peptides hybrides conjointement avec des blocs dichlorodimethyl silane pour obtenir par synthèse directe, des silicones analogues du PDMS, modifiés par différents pourcentages de peptide.



R= peptide ou dérivé fluorescent

Figure 97: Autres voies d'obtention de silicones-peptidiques

Conclusion générale

Durant cette thèse nous avons synthétisé de nombreux peptides sur support solide et nous les avons fonctionnalisés par une ou plusieurs fonctions silanes. Les peptides hybrides silylés ainsi obtenus ont ensuite été utilisés pour différentes applications.

Dans un premier temps, nous avons synthétisé des nanoparticules fluorescentes multifonctionnelles présentant plusieurs ligands en quantité bien déterminée. Cette technologie basée sur l'utilisation de peptides fonctionnalisés par un groupement trietoxysilane nous a permis de greffer deux ligands de récepteurs surexprimés dans certains types de cancer, simultanément de manière simple et contrôlée. La caractérisation par RMN du fluor des nanoparticules nous a permis de déterminer précisément la quantité de peptide greffée. Nous avons également montré l'importance de la catalyse et de l'état de charge des molécules pour la réussite du greffage. Trois familles de nanoparticules ont été synthétisées et comparées par FACS sur neuf lignées cellulaires. Ces études ont permis de valider les propriétés de ciblage des nanoparticules mais également soulever des problèmes de non spécificité qui ont pu être contourné par le greffage d'un PEG silylé. La méthode que nous avons développée permet d'accéder à des plates formes multi fonctionnalisées à la demande, outils intéressants pour la compréhension des mécanismes de signalisation cellulaires induits par l'activation de plusieurs récepteurs.

Dans un second temps pour des applications dans la libération contrôlé de principe actif, des nanoparticules de silice poreuses ont été chargées avec de la rhodamine. Puis, nous avons testé différentes méthodes, basées sur l'utilisation de silane, pour réaliser une coque afin d'emprisonner de manière durable le fluorophore. Nous avons montré que l'eau semble être le solvant le plus adapté pour réaliser ce genre d'opération. Aucune méthode n'a permis pour le moment d'obtenir des coques mais des pistes prometteuses peuvent être encore explorées.

Dans un troisième temps, nous avons développé une nouvelle stratégie, simple et directe, permettant la synthèse de dimères et de polymères hybrides polysiloxanes - peptides grâce à l'utilisation de monomères peptidiques possédant une ou deux fonctions diméthylhydroxysilane. Les perspectives de ce travail visent à concevoir des polymères pouvant servir à la vectorisation d'actifs mais aussi à la mise au point de dispositifs médicaux implantables en silicone possédant par exemple des propriétés antibactériennes, une meilleure biocompatibilité ou encore des propriétés favorables à la prolifération des cellules

Toutes ces études ont montré l'intérêt et la simplicité d'utilisation des peptides hybrides silylés que se soit pour la fonctionnalisation de nanoparticules ou la synthèse de polymères mais beaucoup d'autres applications, au-delà du champ des matériaux pour la santé, peuvent être envisagées. De même, l'utilisation d'autres biomolécules et d'autres biopolymères silylés peuvent amplifier encore le champ possible des applications.

Bibliographie

[1] G. Drisko, C. Sanchez, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 5097.
[2] P. Stempflé, A multiscale tribological study of nacre : Evidence of wear nanomechanisms controlled by the frictional dissipated power, thèse, Université de Nancy.
[3] M. Darder, M. López-Blanco, P. Aranda, F. Leroux, E. Ruiz-Hitzky, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 1969.
[4] X. Liu, B. He, Z. Wang, H. Tang, T. Su, Q. Wang, *Sci. Rep.* **2014**, *4*.
[5] S. Mann, S. L. Burkett, S. A. Davis, C. E. Fowler, N. H. Mendelson, S. D. Sims, D. Walsh, N. T. Whilton, *Chem. Mater.* **1997**, *9*, 2300.
[6] C. Sébastien, T. Akim, D. Simon, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 2733.
[7] W. Jin, J. Brennan, *Anal. Chim. Acta* **2002**, *461*, 1.
[8] N. Rahmat, A. Z. Abdullah, A. R. Mohamed, *Am. J. Appl. Sci.* **2010**, *7*, 1579.
[9] P. DeMuth, M. Hurley, C. Wu, S. Galanie, M. R. Zachariah, P. DeShong, *Microporous Mesoporous Mater.* **2011**, *141*, 128.
[10] H. Schmidt, H. Wolter, *J. Non-Cryst. Solids* **1990**, *121*, 428.
[11] P. Lacan, C. Guizard, L. Cot, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **1995**, *4*, 151.
[12] *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 563.
[13] B. Boury, R. Corriu, *Chem. Commun.* **2002**, 795.
[14] L. L. Hench, J. K. West, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 33.
[15] J. Brinker, G. Scherer, *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*.
[16] S. Carosio, A. Monero, *Stud. Health Technol. Inform.* **2004**, *108*, 335.
[17] R. Baetens, A. Gustavsen, *Energy Build.* **2011**, *43*, 761.
[18] M. Popall, H. Meyer, J. Schulz, .
[19] M. Detty, R. Ciriminna, M. Pagliaro, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *42*, 678.
[20] P. Roach, N. J. Shirtcliffe, M. I. Newton, *Soft Matter* **2008**, *4*, 224.
[21] C. Sanchez, B. Julián, P. Belleville, M. Popall, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3559.
[22] M. Popall, B. Olsowski, *Electrochimica Acta* **1998**, *43*, 1155.
[23] V. C. Costa, H. S. Costa, W. L. Vasconcelos, M. de M. Pereira, R. L. Oréfice, H. S. Mansur, *Mater. Res.* **2007**, *10*, 21.
[24] J. Lewandowska-Łańcucka, S. Fiejdasz, Ł. Rodzik, M. Kozieł, M. Nowakowska, *Biomed. Mater. Bristol Engl.* **2015**, *10*, 015020.
[25] H. H. K. Xu, J. B. Quinn, S. Takagi, L. C. Chow, *Biomaterials* **2004**, *25*, 1029.
[26] A. Turner, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3184.
[27] J. Svorc, S. Miertus, A. Barlikova, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 1628.
[28] S. R. Corrie, G. A. Lawrie, M. Trau, *Langmuir* **2006**, *22*, 2731.
[29] J. Livage, C. Roux, J. M. Da Costa, J. F. Quinson, I. Desportes, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **1996**, *7*, 45.
[30] J. L. Blin, C. Gérardin, C. Carteret, L. Rodehüser, C. Selve, M. J. Stébé, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 1479.
[31] Z. Dai, X. Xu, H. Ju, *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 23.
[32] A. Kumar, R. Malhotra, B. D. Malhotra, S. K. Grover, *Anal. Chim. Acta* **2000**, *414*, 43.
[33] P. Jeronimo, B. Montenegro, *Talanta* **2007**, *72*, 13.
[34] D. Blyth, D. Richardson, D. Russell, *Analyst* **1995**, *120*, 2725.
[35] K. J. Shea, D. A. Loy, O. Webster, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6700.
[36] S. Deng, J. Taunton, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 299.
[37] A. M. Tondreau, C. C. H. Atienza, K. J. Weller, S. A. Nye, K. M. Lewis, J. G. P. Delis, P. J. Chirik, *Science* **2012**, *335*, 567.
[38] S. Jebors, S. Cecillon, C. Enjalbal, A. Mehdi, G. Subra, J. Martinez, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 6510.

[39] W. J. Stark, P. R. Stoessel, W. Wohlleben, A. Hafner, *Chem. Soc. Rev.* **2015**.
[40] K. Strebhardt, A. Ullrich, *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 473.
[41] D. Kittelson, *J. Aerosol Sci.* **1998**, *29*, 575.
[42] V. Mody, R. Siwale, A. Singh, *J. Pharm.* **2010**, *2*, 282.
[43] Y. Malam, M. Loizidou, A. Seifalian, *Trends Pharmalogical Sci.* **2009**, *11*, 592.
[44] *Biological and pharmaceutical nanomaterials*; Kumar, C. S. S. R., Ed.; Nanotechnologies for the life sciences; 1st ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2006.
[45] N. Nasongkla, D. Boothman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6323.
[46] M. Oishi, K. Kataoka, Y. Nagasaki, *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 677.
[47] R. M. Sawant, J. P. Hurley, S. Salmaso, A. Kale, E. Tolcheva, T. S. Levchenko, V. P. Torchilin, *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 943.
[48] G. Gregoriadis, *N. Engl. J. Med.* **1976**, *295*, 765.
[49] H. Pinto-Alphandary, A. Andremont, P. Couvreur, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2000**, *13*, 155.
[50] B. Mukherjee, B. Patra, B. Layek, A. Mukherjee, *Int. J. Nanomedicine* **2007**, *2*, 213.
[51] K. Letchford, H. Burt, *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV* **2007**, *65*, 259.
[52] N. A. Christian, M. C. Milone, S. S. Ranka, G. Li, P. R. Frail, K. P. Davis, F. S. Bates, M. J. Therien, P. P. Ghoroghchian, C. H. June, D. A. Hammer, *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18*, 31.
[53] D. Bazilz, catherine Ropert, M. Mariard, *Biomaterials* **1992**, *13*, 1093.
[54] F. Mondalek, B. Lawrence, B. P. Grady, K. Fung, *Biomaterials* **2008**, *29*, 1159.
[55] R. Jain, *Biomaterials* **2000**, *21*, 2475.
[56] Z. Ghalanbor, M. Korber, R. Bodmeier, *Int. J. Pharm.* **2012**, *438*, 302.
[57] T. Chervenkov, D. Ivanova, B. Galunska, *Toxicity of Polymeric Nanoparticles with Respect to their Application as Drug Carriers - Springer*; 2007.
[58] J. P. Majoral, A.-M. Caminade, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 845.
[59] U. Boas, P. M. H. Heegaard, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 43.
[60] M. Ogawa, C. Regino, B. Marcelino, M. Williams, H. Kobayashi, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 955.
[61] S. V. Vinogradov, T. K. Bronich, A. V. Kabanov, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 135.
[62] Y. Liu, M. K. Shipton, J. Ryan, E. D. Kaufman, S. Franzen, D. L. Feldheim, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 2221.
[63] K. M. M. Abou El-Nour, A. Eftaiha, A. Al-Warthan, R. A. A. Ammar, *Arab. J. Chem.* **2010**, *3*, 135.
[64] L. H. Reddy, J. L. Arias, J. Nicolas, P. Couvreur, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 5818.
[65] A. Ito, M. Shinkai, H. Honda, T. Kobayashi, *J. Biosci. Bioeng.* **2005**, *100*, 1.
[66] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62.
[67] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, *Science* **2005**, *307*, 538.
[68] J. E. Schroeder, I. Shweky, H. Shmeeda, U. Banin, A. Gabizon, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2007**, *124*, 28.
[69] P. Ghosh, G. Han, M. De, C. Kim, V. Rotello, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1307.
[70] A. Tomar, G. Garg, *Glob. J. Pharmacol.* **2013**, *7*, 34.
[71] **2010**.
[72] G. Yuan, X. Chang, *Particuology* **2011**, *9*, 644.
[73] B. Wiley, Y. Chen, J. McLellan, Y. Xia, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1032.
[74] Y. Choi, T. Luo, *Int. J. Electrochem.* **2011**, *1*, 1.
[75] L. M. Liz-Marzán, M. Giersig, P. Mulvaney, *Langmuir* **1996**, *12*, 4329.
[76] M. Mahmoudi, S. Sant, B. Wang, S. Laurent, T. Sen, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 24.
[77] B. Bera, L. Qian, P. Holloway, *Materials* **2010**, *3*, 2260.
[78] F. Tang, L. Li, D. Chen, *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 1504.

[79] J. Matos, M. Kruk, L. Mercuri, O. Terasaki, *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 1903.
[80] F. Chen, H. Hong, S. Shi, S. Goel, H. F. Valdovinos, R. Hernandez, C. P. Theuer, T. E. Barnhart, W. Cai, *Sci. Rep.* **2014**, *4*.
[81] Y. Chen, Q. Meng, M. Wu, S. Wang, P. Xu, H. Chen, Y. Li, L. Zhang, L. Wang, J. Shi, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 16326.
[82] T. Asefa, Z. Tao, *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 2265.
[83] I. Ralph, Product comprising a skin of dense, hydrated amorphous silica bound upon a core of another solid material.
[84] W. Stöber, A. Fink, *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62.
[85] J. Guo, X. Liu, Y. Li, P. Cui, *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *326*, 138.
[86] J. Kim, L. Kim, C. Kim, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 215.
[87] K. Osseo-Asare, F. J. Arriagada, *Colloids Surf.* **1990**, *50*, 321.
[88] M.-P. Pileni, T. Zemb, C. Petit, *Chem. Phys. Lett.* **1985**, *118*, 414.
[89] R. P. Bagwe, C. Yang, L. R. Hilliard, W. Tan, *Langmuir* **2004**, *20*, 8336.
[90] *Handbook of Microemulsion Science and Technology*.
[91] Z. ALOthman, *Materials* **2012**, *5*, 2874.
[92] Y. Wan, Zhao, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2821.
[93] F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Fröba, *Angew. Chem.* **2006**, *45*, 3216.
[94] S. Sivakumar, P. R. Diamente, F. C. J. M. van Veggel, *Chem. – Eur. J.* **2006**, *12*, 5878.
[95] D. P. Ferris, P. R. McGonigal, L. S. Witus, T. Kawaji, M. M. Algaradah, A. R. Alnajadah, M. S. Nassar, J. F. Stoddart, *Org. Lett.* **2015**.
[96] C. Coll, L. Mondragón, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, M. D. Marcos, J. Soto, P. Amorós, E. Pérez-Payá, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2138.
[97] D. P. Ferris, J. Lu, C. Gothard, R. Yanes, C. R. Thomas, J.-C. Olsen, J. F. Stoddart, F. Tamanoi, J. I. Zink, *Small* **2011**, *7*, 1816.
[98] W. J. Rieter, J. S. Kim, K. M. L. Taylor, H. An, W. Lin, T. Tarrant, W. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3680.
[99] R. K. Sharma, S. Das, A. Maitra, *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *277*, 342.
[100] D. Ge, L. Yang, G. Wu, S. Yang, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 2469.
[101] H. Ogihara, J. Xie, J. Okagaki, T. Saji, *Langmuir* **2012**, *28*, 4605.
[102] J. Croissant, A. Chaix, O. Mongin, M. Wang, S. Clément, L. Raehm, J.-O. Durand, V. Hugues, M. Blanchard-Desce, M. Maynadier, A. Gallud, M. Gary-Bobo, M. Garcia, J. Lu, F. Tamanoi, D. P. Ferris, D. Tarn, J. I. Zink, *Small* **2014**, *10*, 1752.
[103] T. Wu, Y. Zhang, X. Wang, S. Liu, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 101.
[104] J. Malinge, C. Allain, L. Galmiche, F. Miomandre, P. Audebert, *Chem. Mater.* **2011**, *23*, 4599.
[105] L. A. Garraway, E. S. Lander, *Cell* **2013**, *153*, 17.
[106] Z. Liu, fan Wang, X. Chen, *Drug Dev. Res.* **2008**, *69*, 329.
[107] N. Ferrara, K. Hillan, W. Novotny, *Biochem. Biophys. Res.* **2005**, *333*, 328.
[108] B. Chaudhary, Y. Khaled, E. Elkord, *Cancer Immunol.* **2014**, *63*, 81.
[109] G. Zwicke, G. Mansoori, C. Jeffrey, *Nano Rev.* **2012**, *3*, 3402.
[110] H. Maeda, *Adv. Enzyme Regul.* **2001**, *41*, 189.
[111] L. Tang, X. Yang, Q. Yin, H. Wang, J. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, 15344.
[112] G. Le Duc, S. Roux, S. Dufort, A. Marais, O. Tillement, F. Lux, *Cancer Nanotechnol.* **2014**, *5*, 4.
[113] H. Tada, H. Higuchi, T. M. Wanatabe, N. Ohuchi, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 1138.
[114] W. Cai, D.-W. Shin, K. Chen, O. Gheysens, Q. Cao, S. X. Wang, S. S. Gambhir, X. Chen, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 669.
[115] O. C. Farokhzad, J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, S. Jon, P. W. Kantoff, J. P. Richie, R. Langer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 6315.

[116] O. M. Koo, I. Rubinstein, H. Onyuksel, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2005**, *1*, 193.
[117] L. Li, C. A. Wartchow, S. N. Danthi, Z. Shen, N. Dechene, J. Pease, H. S. Choi, T. Doede, P. Chu, S. Ning, D. Y. Lee, M. D. Bednarski, S. J. Knox, *Int. J. Radiat. Oncol.* **2004**, *58*, 1215.
[118] P. Wust, U. Gneveckow, M. Johannsen, D. Böhmer, T. Henkel, F. Kahmann, J. Sehouli, R. Felix, J. Ricke, A. Jordan, *Int. J. Hyperth. Off. J. Eur. Soc. Hyperthermic Oncol. North Am. Hyperth. Group* **2006**, *22*, 673.
[119] E. Duguet, S. Vasseur, S. Mornet, J.-M. Devoisselle, *Nanomed.* **2006**, *1*, 157.
[120] B. C. Wilson, M. S. Patterson, *Phys. Med. Biol.* **2008**, *53*, R61.
[121] R. Kopelman, Y.-E. Lee Koo, M. Philbert, B. A. Moffat, G. Ramachandra Reddy, P. McConville, D. E. Hall, T. L. Chenevert, M. S. Bhojani, S. M. Buck, A. Rehemtulla, B. D. Ross, *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, *293*, 404.
[122] A. Vargas, B. Pegaz, E. Debefve, Y. Konan-Kouakou, N. Lange, J.-P. Ballini, H. van den Bergh, R. Gurny, F. Delie, *Int. J. Pharm.* **2004**, *286*, 131.
[123] T. F. Massoud, S. S. Gambhir, *Genes Dev.* **2003**, *17*, 545.
[124] R. Weissleder, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 11.
[125] D. Evanko, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 901.
[126] J. V. Frangioni, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 626.
[127] *Biomedical Photonics Handbook, 3 Volume Set, Second Edition*.
[128] J. Steinkamp, *Rev. Sci. Instrum.* **1984**, *55*, 1375.
[129] Q. Chen, S. Mao, J. Bai, 2009; Vol. 7634, p. 76340C–76340C–6.
[130] H. Choi, W. Liu, J. Frangiono, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1165.
[131] V. P. Torchilin, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64, Supplement*, 302.
[132] S. M. Moghimi, A. C. Hunter, J. C. Murray, *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 283.
[133] S. M. Moghimi, J. Szebeni, *Prog. Lipid Res.* **2003**, *42*, 463.
[134] C. Monfardini, F. M. Veronese, *Bioconjug. Chem.* **1998**, *9*, 418.
[135] Q. He, J. Zhang, J. Shi, Z. Zhu, L. Zhang, W. Bu, L. Guo, Y. Chen, *Biomaterials* **2010**, *31*, 1085.
[136] Y. Zhong, F. Meng, C. Deng, Z. Zhong, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 1955.
[137] Template Assembled Cyclopeptides as Multimeric System for Integrin Targeting and Endocytosis - ja049926n.
[138] Q. Fu, G. v. r. Rao, L. k. Ista, Y. Wu, B. p. Andrzejewski, L. a. Sklar, T. l. Ward, G. p. López, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 1262.
[139] J. Lee, J. Park, K. Singha, W. J. Kim, *Chem. Commun. Camb. Engl.* **2013**, *49*, 1545.
[140] X. D. Jinshui Liu, *J. Mater. Chem. - J MATER CHEM* **2010**, *20*.
[141] J. Zheng, X. Tian, W. Yang, *Int. J. Pharm.* **2013**, *450*, 296.
[142] J. Zhang, Z.-F. Yuan, Y. Wang, W.-H. Chen, G.-F. Luo, S.-X. Cheng, R.-X. Zhuo, X.-Z. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5068.
[143] T. D. Nguyen, H.-R. Tseng, P. C. Celestre, A. H. Flood, Y. Liu, J. F. Stoddart, J. I. Zink, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 10029.
[144] A. Corma, U. Díaz, M. Arrica, E. Fernández, Í. Ortega, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6365.
[145] J. Andrieu, N. Kotman, M. Maier, V. Mailänder, W. S. L. Strauss, C. K. Weiss, K. Landfester, *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33*, 248.
[146] E. Climent, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, M. D. Marcos, J. Soto, A. Maquieira, P. Amorós, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 7439.
[147] A. C. P. Srivani Veeranarayanan, *J. Fluoresc.* **2011**, *22*, 537.
[148] L. Tang, X. Yang, J. Cheng, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, 15344.
[149] A. Starzec, R. Vassy, A. Martin, M. Lecouvey, M. Di Benedetto, M. Crépin, G. Y. Perret, *Life Sci.* **2006**, *79*, 2370.
[150] L. Tirand, C. Frochot, R. Vanderesse, N. Thomas, E. Trinquet, S. Pinel, M.-L. Viriot, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, *J. Controlled Release* **2006**, *111*, 153.

[151] A. Starzec, P. Ladam, R. Vassy, S. Badache, N. Bouchemal, A. Navaza, C. H. du Penhoat, G. Y. Perret, *Peptides* **2007**, *28*, 2397.
[152] S. Robinson, V. Kostourou, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 33966.
[153] W. Arap, R. Pasqualini, E. Ruoslahti, *Science* **1998**, *279*, 377.
[154] G. A. McDonald, G. Zhu, Y. Li, I. Kovesdi, T. J. Wickham, V. P. Sukhatme, *J. Gene Med.* **1999**, *1*, 103.
[155] D. Arosio, L. Manzoni, E. M. V. Araldi, C. Scolastico, *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 664.
[156] F. Danhier, A. Le Breton, V. Préat, *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 2961.
[157] L. Auzzas, F. Zanardi, L. Battistini, P. Burreddu, P. Carta, G. Rassu, C. Curti, G. Casiraghi, *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 1255.
[158] C. McCusker, P. Kocienski, A. Schatzlein, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 547.
[159] D. Elias, V. Popik, A. Tsourkas, *Nanomed.* **2014**, *9*, 194.
[160] A. Verma, F. Stellacci, *Small* **2010**, *6*, 12.
[161] C. Enjalbal, P. Ribière, F. Lamaty, J. Martineznez, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 670.
[162] J. Jokerst, S. Gambhir, *Nanomed.* **2011**, *6*, 715.
[163] C. Coll, L. Mondragón, R. Martinez-Manez, F. Sancenón, E. Pérez-Payá, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2138.
[164] J. Lauer-Frields, H. Nagase, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 18140.
[165] L. M. Liz-Marzán, M. Giersig, P. Mulvaney, *Langmuir* **1996**, *12*, 4329.
[166] W. Rho, H. Kim, B. Jun, *J. Ind. Eng. Chem.* **2014**, *20*, 2646.
[167] R. G. Jones, W. Ando, J. Chojnowski, *Silicon-Containing Polymers: The Science and Technology of Their Synthesis and Applications*; Springer Science & Business Media, 2013.
[168] F. Abbasi, H. Mirzadeh, A.-A. Katbab, *Polym. Int.* **2001**, *50*, 1279.
[169] *Lectures on topological fluid mechanics: lectures given at the C.I.M.E. Summer School held in Cetraro, Italy, July 2-10, 2001*; Berger, M. A.; Ricca, R. L.; Centro internazionale matematico estivo, Eds.; Lecture notes in mathematics; Springer: Berlin, 2009.
[170] F. de buyl, *Int. J. Adhes. Adhes.* **2001**, *21*.
[171] F. Ganachaud, G. Palaprat, *Comptes Rendus Chim.* **2003**, *6*, 1385.
[172] Silicones - Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology - Butts - Wiley Online Library.
[173] Silicones ou siloxanes - Structure et propriétés | Techniques de l'Ingénieur.
[174] Y. Kawakami, Y. Li, *Des. Monomers Polym.* **2000**, *3*, 399.
[175] *Silicon-Containing Polymers*; Jones, R. G.; Ando, W.; Chojnowski, J., Eds.; Springer: Dordrecht, 2000.
[176] V. Barbier, M. Tatoulian, H. Li, F. Arefi-Khonsari, A. Ajdari, P. Tabeling, *Langmuir* **2006**, *22*, 5230.
[177] S. Gonçalves, A. Leirós, T. van Kooten, F. Dourado, L. R. Rodrigues, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2013**, *109*, 228.
[178] B. Li, J. Chen, J. H.-C. Wang, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**, *79A*, 989.
[179] A. Hisyam A. Razak, P. Szabo, A. L. Skov, *RSC Adv* **2015**, *5*, 53054.
[180] F. B. Madsen, L. Yu, A. E. Daugaard, A. L. Skov, *Polymer* **2014**, *55*, 6212.
[181] F. B. Madsen, L. Yu, A. E. Daugaard, S. Hvilsted, A. L. Skov, *RSC Adv* **2015**, *5*, 10254.
[182] T. Rambarran, F. Gonzaga, M. A. Brook, *Macromolecules* **2012**, *45*, 2276.
[183] *Macromol. Chem. Phys.* **2008**, *209*, 1282.
[184] K. Beppu, Y. Kaneko, J. Kadokawa, H. Mori, T. Nishikawa, *Polym. J.* **2007**, *39*, 1065.
[185] M. Colilla, A. J. Salinas, M. Vallet-Regí, *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 5676.
[186] H. Maeda, T. Kasuga, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2008**, *85*, 742.
[187] Bridged Polysilsesquioxanes. Highly Porous Hybrid Organic-Inorganic Materials - cr00037a013.
[188] C. Giuseppe, J. Ananias, Y. Zilin, *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 2501.

[189] Y. Shimohigashi, T. Costa, H. C. Chen, D. Rodbard, *Nature* **1982**, *297*, 333.
[190] I. Daffix, M. Amblard, G. Bergé, P. Dodey, D. Pruneau, J.-L. Paquet, C. Fouchet, R.-M. Franck, E. Defrêne, J.-M. Luccarini, P. Bélichard, J. Martinez, *J. Pept. Res.* **1998**, *52*, 1.
[191] M. Perez, P. J. Pauwels, C. Fourrier, P. Chopin, J. P. Valentin, G. W. John, M. Marien, S. Halazy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 675.
[192] D. Lecis, E. Mastrangelo, L. Belvisi, M. Bolognesi, M. Civera, F. Cossu, M. De Cesare, D. Delia, C. Drago, G. Manenti, L. Manzoni, M. Milani, E. Moroni, P. Perego, D. Potenza, V. Rizzo, C. Scavullo, C. Scolastico, F. Servida, F. Vasile, P. Seneci, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 6709.
[193] F. Uhlig, H. C. Marsmann, *Gelest Inc* **2008**.
[194] P. Forns, S. Sevilla, M. Erra, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6907.
[195] A. G. Bejenariu, I. Javakhishvili, M. K. Jensen, A. L. Skov, O. Hassager, *8th Nord. Rheol. Confrence* 31.
[196] S. Jebors, C. Pinese, B. Nottelet, K. Parra, M. Amblard, A. Mehdi, J. Martinez, G. Subra, *J. Pept. Sci.* **2015**, *21*, 243.

Partie expérimentale

Origine des réactifs :

Le triton X-100, l'hexan-1-ol, le cyclohexane, l'ammoniaque NH_4OH 28%), le tétraéthoxysilane (TEOS, 99,9%), le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES, 99%), l'acide trifluoro acétique (TFA), le N,N dimethyl formamide (DMF), le dichloromethane (DCM), le dimethylsulfoxide (DMSO), le benzotrizol-1-yloxy) tris(dimethylamino) phosphoniumhexafluorophosphate (BOP), l'acide acétique (AcOH), l'acétonitrile (AcN), la fluoresceine isothiocyanate isomère I (FITC, 90%) ont été fournis par Aldrich. La diisopropyl ethylamine (DIEA), le 2,2,2-trifluoroethanol sont obtenus auprès d'Alfa Aesar. La cyanine5.5 N-hydroxysuccinimide (cyan5.5-NHS) est obtenu auprès de Lumiprobes. La résine 2-chlorotrityl (1.55mmol/g Cl/g de résine), les acides aminés protégés sont obtenus auprès d'Iris Biotech. La Fmoc-3,3,3 trifluoro (D/L) alanine, la Fmoc-3 fluoro (L) phenylalanine ont été fournis par Polypeptides.

Techniques et appareillage

Analyses LC/MS

Les analyses LC/MS ont été réalisées sur un système HPLC Waters alliance 2690, couplé à un spectrométre ZQ water-Micromass. Les séparations ont été réalisées sur une colonne onyx monolithic HD-C18 (50 x 4.6 mm ; phase inverse) avec un gradient (eau 0.1% acide formique – AcN 0.1% acide formique) allant de 0% à 100% d'AcN en 2.5 minutes à un débit de 3mL/min.

L'acquisition des spectres a été faite en mode électrospray positif (ES+) avec un débit de 100-500µL/min. La nébulisation et le séchage sont réalisés sous flux d'azote. Les données sont obtenues en mode scan avec un intervalle de 0.1s ; 10scans sont collectés pour obtenir le spectre final.

Analyses MALDI-TOF

Les spectres MALDI ont été enregistrés sur un appareil Ultraflex III TOF/TOF (Bruker Daltronics, Wissenenbourg, France) équipé d'une cellule LIFT. La source est équipée d'un laser pulsé Nd :YAG (λ=355nm) fonctionnant a une fréquence de 100Hz avec un délai d'extraction de 30ns. Les données sont enregistrées via la logiciel Flex Control et retraitées avec le logiciel Flex Analysis.

Analyses RMN

Les spectres RMN 1D ^{1}H, ^{13}C et ^{29}Si ont été enregistrées sur des spectromètres Bruker Avance III 600 et AVANCE I 400 équipés de sondes BBFO 5mm.

Les spectres de RMN ^{19}F ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance 400HD équipé d'une sonde BBFO à 25 °C. La détermination de la concentration en fluor a été déterminée à l'aide de la méthode ERETIC (*Electronic Reference to acess in vivo concentrations*). Cette méthode fournit un signal de référence synthétisé par un dispositif électronique préalablement calibré à l'aide d'étalon externe de TFA. Ce signal de référence sera enregistré avec les mêmes paramètres d'acquisition que les produits à quantifier (température, gain, ns...). Le programme d'impulsion utilisé est une séquence d'observation directe du fluor découplé proton *inverse gated* avec un angle d'impulsion de 90° et un délai de relaxation D1=6s. La largeur spectrale de 9000 Hz est centrée sur le pic à étudier et le nombre de scans est de 128.

Diffusion dynamique de la lumière et potentiel zêta

La taille, la distribution de tailles ainsi que le potentiel zêta des nanoparticules sont mesurés sur un système Nano ZS zetasizer de chez Malvern. La température est fixée à 25 °C.

Pour la taille, l'échantillon est dilué dans l'eau à une concentration de 1mg/mL, soniqué pendant 1min avant d'être filtré sur un filtre PVFD de 0.45 µm. La solution est ensuite ajoutée à une micro cuve en quartz et trois mesures sont réalisées. La longueur d'onde du laser est fixée à 633 nm avec un angle de diffusion de 173°. L'indice de réfraction de l'eau est fixé à 1.330 et l'indice de réfraction de la cuve à 0.200.

Pour le potentiel zêta, la même solution est disposée dans une cuve de mesure DTS1060C.

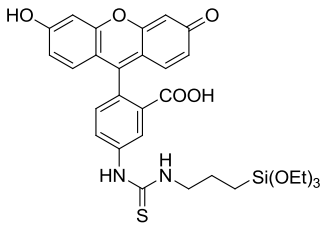
Analyse thermogravimétrique

L'analyse thermogravimétrique est réalisée sur un système Perkin Elmer TGA3 entre 30 et 900°C sous air. Entre 5 et 15 mg de produit sont analysés.

Synthèse

Synthèse de la fluoresceine hybride 2

Dans un tube à hémolyse dissoudre 20.2 mg (52 µmol, 1eq) de fluorescéine isothiocyanate dans 300µL de DMSO. Ajouter 1.1 eq d'APTES et agiter 1h à température ambiante pour obtenir la fluorescéine hybride **2**.

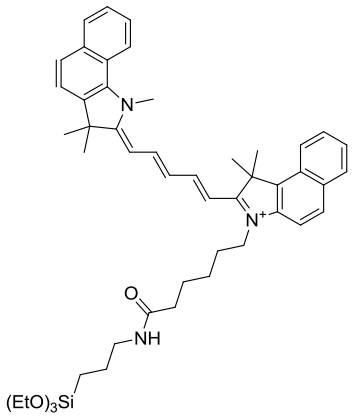


Rendement : 100%
Pureté : 98 %
MM : 610.18
LCMS tr : 1.10min
LCMS : m/z 527.1 $[M+H]^+$

Synthèse de la cyanine5.5 hybride 4

Dans un tube à hémolyse dissoudre 37mg (52µmol, 1eq) de N-hydroxysuccinimide cyanine 5.5 dans 300µL de DMSO. Ajouter 1.1 eq d'APTES et agiter 1h à température ambiante pour obtenir la cyanine hybride **4**.

Rendement : 100%
Pureté : 99 %
MM : 786.46
LCMS tr : 1.71min
LCMS : m/z 702.1 $[M+H]^+$



Synthèse des nanoparticules NpSi(Fluo) et NpSi(Cyan)

Dans un ballon de 500mL ajouter 40mL de triton X-100 avec 150mL de cyclohexane. Additionner goutte à goutte 20mL d'une solution d'ammoniaque à 4.6mol/L puis agiter 10min, la solution devient trouble. Ajouter 40mL d'hexanol pour obtenir une microémulsion limpide. 200µL de la solution de fluorophore hybride dans le DMSO est ensuite ajoutée suivi directement par 7.5mL TEOS pour obtenir un rapport molaire Fluorophore/TEOS de 0.52%. La réaction est agitée une nuit puis les nanoparticules sont isolées par précipitation avec une grande quantité d'éther, filtrées sur fritée de porosité 4 et lavées par soxhlet à l'éthanol pendant 24h avant d'être séchées sous vide pour obtenir 1.9g de nanoparticule.

Calcule du nombre de peptide par nm^2 sur les NpSi

Diamètre des nanoparticules ≈40nm;
Surface d'une nanoparticule S= 5000 nm^2;
Volume d'une nanoparticule v= 33500 nm^3
Densité des nanoparticules ρ =2.2 g/cm^3
Le nombre de nanoparticule par gramme est $1/(\rho \times v) = 1.36 \times 10^{16}$ NP/g.
Une charge de 0.010 mmol/g représente 10 µmol de peptide pour 1.36×10^{16} NP
Le nombre de peptide par particule est $= 1.0 \times 10^{-5} \times N_A / 1.36 \times 10^{16} = 443$ peptides/NP
Le nombre de peptide par nm^2 et de 443/S = 443/5000 ≈0.09 peptide/ nm^2

Caractérisation des nanoparticules

	%N	%C	%O	%H	DLS(PDI)	TGA	zeta
A^{0}	0.91	5.39	6.17	1.65	79(0.12)	12.5	-28
$A^{0.25}_{0/100}$	0.92	5.56	X	X	75(0.13)	12.8	-26
$A^{0.25}_{25/75}$	0.91	5.40	X	X	79(0.15)	12.3	-30
$A^{0.25}_{50/50}$	0.90	5.39	X	X	76(0.13)	12.4	-26
$A^{0.25}_{75/25}$	0.92	5.43	X	X	80(0.12)	12.5	-24
$A^{0.25}_{100/0}$	0.93	5.56	X	X	79(0.13)	12.8	-23
$A^{2.5}_{0/100}$	0.98	5.89	6.10	1.70	76(0.12)	12.5	-24
$A^{2.5}_{25/75}$	0.99	5.70	6.16	1.63	81(0.10)	12.6	-24
$A^{2.5}_{50/50}$	1.01	5.90	5.99	1.85	79(0.14)	12.4	-28
$A^{2.5}_{75/25}$	0.95	5.75	6.23	1.92	80(0.16)	12.7	-29
$A^{2.5}_{100/0}$	0.98	5.91	6.18	1.79	75(0.16)	12.5	-23
$A^{25}_{0/100}$	1.96	7.02	6.13	1.66	75(0.15)	15.7	-28
$A^{25}_{25/75}$	1.92	7.32	6.35	1.83	77(0.12)	16.5	-26
$A^{25}_{50/50}$	1.80	7.13	5.26	1.87	76(0.12)	14.3	-28
$A^{25}_{75/25}$	1.71	7.55	6.33	1.94	80(0.14)	15.6	-26
$A^{25}_{100/0}$	1.93	7.18	6.45	1.85	77(0.13)	17.8	-24
B^{0}	0.93	8.16	8.74	2.31	82(0.108)	18.3	-22
$B^{0.25}_{0/100}$	1	8.13	8.53	2.26	X	X	X
$B^{0.25}_{25/75}$	0.96	8.16	8.26	2.07	X	X	X
$B^{0.25}_{50/50}$	1.03	8.19	8.42	2.29	85(0.123)	X	-20
$B^{0.25}_{75/25}$	1.01	8.22	8.34	2.53	X	X	X
$B^{0.25}_{100/0}$	1.06	8.10	8.18	2.19	X	X	X
$B^{2.5}_{0/100}$	0.96	8.15	8.41	2.09	X	X	X
$B^{2.5}_{25/75}$	1.03	8.09	8.44	2.34	X	X	X

$B^{2.5}_{50/50}$	0.99	8.18	8.29	2.22	79(0.108)	X	-23
$B^{2.5}_{75/25}$	0.99	8.05	8.60	2.54	X	X	X
$B^{2.5}_{100/0}$	1.05	7.99	8.52	2.18	X	X	X
$B^{25}_{0/100}$	1.06	8.13	8.23	2.12	X	X	X
$B^{25}_{25/75}$	1.12	8.26	8.44	2.26	82(0.12)	X	-20
$B^{25}_{50/50}$	1.03	8.73	8.70	2.02	81(0.10)	X	-16
$B^{25}_{75/25}$	1.03	8.61	8.70	2.08	82(0.12)	X	-23
$B^{25}_{100/0}$	1	8.39	8.83	2.13	86(0.10)	X	-23
$C^{2.5}_{0/100}$	X	X	X	X	X	X	X
$C^{2.5}_{25/75}$	0.98	8.36	8.95	2.16	X	X	X
$C^{2.5}_{50/50}$	1.06	8.16	8.65	2.36	84(0.16)	19.6	-19
$C^{2.5}_{75/25}$	1.16	8.39	8.79	2.35	X	X	X
$C^{2.5}_{100/0}$	1.15	8.43	8.66	2.46	83(0.12)	19.4	-15
$C^{25}_{0/100}$	1.03	8.32	8.83	2.28	X	X	X
$C^{25}_{25/75}$	1.08	8.65	8.55	2.50	X	X	X
$C^{25}_{50/50}$	1.01	8.55	8.65	2.49	80(0.13)	18.7	-21
$C^{25}_{75/25}$	1.15	8.53	8.67	2.13	X	X	X
$C^{25}_{100/0}$	1.01	8.22	8.79	2.26	83(0.16)	19.1	-21

Synthèse peptidique

Protocole pour la synthèse peptidique sur support solide

La synthèse de peptides en phase solide a été réalisée selon une stratégie Fmoc/tBu dans des réacteurs en verre (ou des seringues pour de petites quantités) munis d'un fritté. Une quantité connue de résine est introduite dans un réacteur puis des cycles de couplage et de déprotection se succèdent jusqu'à l'obtention du peptide désirée. Le peptide est ensuite clivé de la résine puis isolé par précipitation et purifié si nécessaire.

Ancrage du premier aminoacide sur la résine Rink-amide (iii)

La résine Rink Amide est une résine permettant d'obtenir une fonction amide sur l'extrémité C-terminal d'un peptide après clivage. Cette résine, chargée à 0.45mmol/g, est fournie avec

un groupement protecteur Fmoc sur le linker (Fmoc-Rink-amide). Avant d'ancrer le premier amino acide, une étape de déprotection est effectué grâce à un mélange Pipéridine/DMF (20/80) pendant 1h (2×30min). La résine est ensuite lavée avec 2×DMF, MeOH, 2×DCM puis mise en suspension dans le DCM. Dans un Erlen, 3 équivalents d'aminoacide et 6 équivalents de DIEA sont solubilisés dans un minimum de DMF puis 3 équivalents de BOP sont ajoutés dans le milieu pour activer l'aminoacide. Le mélange est ensuite versé dans le réacteur préalablement vidangé. Le réacteur est alors agité grâce à un rotor pendant 3h puis la résine est lavée avec 2×DMF, 2×DCM, MeOH, 2×DMF, 2×DCM.

Ancrage du premier aminoacide sur la résine 2 Chloro-chlorotrityl (i)

La résine 2 Chloro-chlorotrityl est une résine permettant d'obtenir une fonction acide carboxylique sur l'extrémité C-terminal d'un peptide après clivage. Cette résine, chargée à 1.55mmol/g, est mise en suspension dans le DCM pendant 15min. Dans un Erlen, 3 éq d'aminoacide et 6 éq de DIEA sont solubilisés dans un minimum de DMF. Le mélange est ensuite versé dans le réacteur préalablement vidangé. Le réacteur est alors agité grâce à un rotor pendant 3h puis la résine est lavée avec 2×DMF, 2×DCM, MeOH, 2×DMF, 2×DCM.

Elongation du peptide

L'élongation du peptide se fait grâce à des réactions successives de déprotection (ii) et de couplage (iii).

Déprotection (ii)

Le réacteur est rempli au deux tiers avec une solution Pipéridine/DMF (20/80), agité pendant 20 minutes et vidangé. Cette opération est répétée. Puis la résine est lavée avec 2×DMF, 2×DCM, MeOH, 2×DMF, 2×DCM.

Couplage (iii)

3 éq d'aminoacide et 6 éq de DIEA sont solubilisés dans un minimum de DMF puis 3 équivalents de BOP sont ajoutés dans le milieu pour activer l'aminoacide. Le mélange est ensuite versé dans le réacteur préalablement vidangé. Le réacteur est alors agité grâce à un rotor pendant 3h puis la résine est lavée avec 2×DMF, 2×DCM, MeOH, 2×DMF, 2×DCM.

Clivage de la résine Rink-amide (viii)

Le clivage de la résine rink amide est réalisé avec du TFA/TIS /H_2O (95/2.5/2.5). Au bout d'une heure, la résine est filtrée puis rincée au DCM. Le filtrat est alors concentré sous vide et le peptide est isolé par précipitation dans l'éther puis filtré sur frité avant d'être séché sous vide.

Clivage de la résine 2 Chloro-chlorotrityl (iv ou viii)

Le clivage de la résine 2 Chloro-chlorotrityl est réalisé avec du TFA/TIS /H_2O (95/2.5/2.5) pendant 2X1h comme dans le cas de la Rink-amide. Il est aussi possible de garder les protections sur les chaines latérales en utilisant une solution TFE/AcOH/DCM (70/10/20) à la place de TFA/TIS /H_2O.

Cyclisation de peptide en solution (v)

Dans un ballon, le peptide à cycliser est dissous (1eq) avec 4eq de DIEA et 1.1eq de BOP dans du DMF. Le milieu est agité 1h à température ambiante, le DMF est concentré et le peptide cyclique est précipité à l'éther, filtré sur frité, lavé avec une solution saturée en bicarbonate de sodium puis avec une solution à 1N en $KHSO_4$ et enfin avec de l'eau. Enfin la poudre est séchée sous vide.

Couplage par fragments de peptides en solution (vii)

Dans un ballon, le peptide libre du coté N-terminal est dissous (1eq) avec 4eq de DIEA dans le DMF, puis le second peptide libre du coté C-terminal (1eq) préalablement dissout dans un minium de DMF avec 4eq de DIEA et 1.1 eq de BOP est ajouté goutte à goutte. Le milieu est agité 1h à température ambiante, le DMF est concentré et le peptide cyclique est précipité à l'éther, filtré sur frité et séché sous vide.

Hydrogénolyse du groupement benzyloxycarbonyl (Z) en solution (vi)

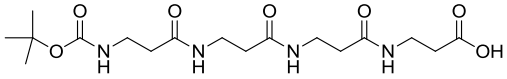
Dans un ballon muni d'un barreau magnétique, le peptide protégé (1eq) est dissous dans de l'EtOH avec 0.1eq de Pd/C 10%. Le milieu est et agité une nuit sous bullage de H_2. La solution est filtrée sur celite, concentrée au rotavapor, précipitée à l'éther, filtrée sur frité puis séchée sous vide.

Couplage de L'ICPTES sur un peptide (ix)

Dans un ballon, le peptide possédant une fonction amine (1eq) dissous dans le DMF. 4eq de DIEA sont ajoutés avec 1.2eq de ICPTES. Le milieu est agité 1h à température ambiante, puis le DMF est concentré et le peptide silylé est précipité par ajout d'éther, centrifugé, décanté et lavé deux fois à l'éther. Enfin, le culot est séché sous vide pendant 1h.

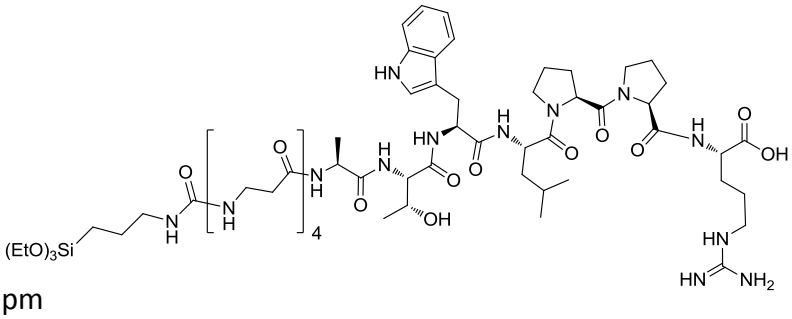
Caractérisation du composé 5

Rendement : 80%
Pureté : 94 %
MM : 402.21 g/mol
LCMS tr : 1.52min
LCMS : *m/z* 403.3 $[M+H]^+$



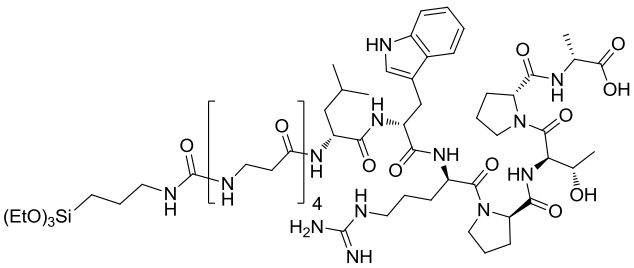
Caractérisation du composé 7

Rendement : 52%
Pureté : 98 %
MM : 1370.7 g/mol
LCMS tr : 0.95/1.04min
LCMS : *m/z* 1287.4 $[M+H]^+$
RMN ^{29}Si(400MHz, DMSO) δ -45 ppm



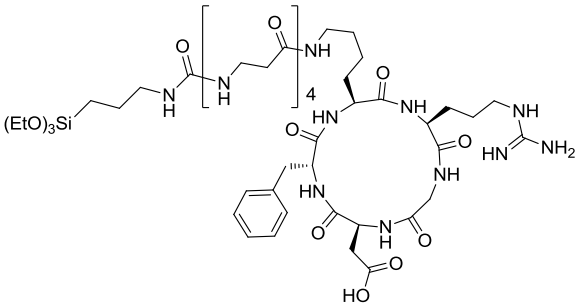
Caractérisation du composé 8

Rendement : 45%
Pureté : 99 %
MM : 1370.7
LCMS tr : 0.95/1.04min
LCMS : *m/z* 1287.4 $[M+H]^+$



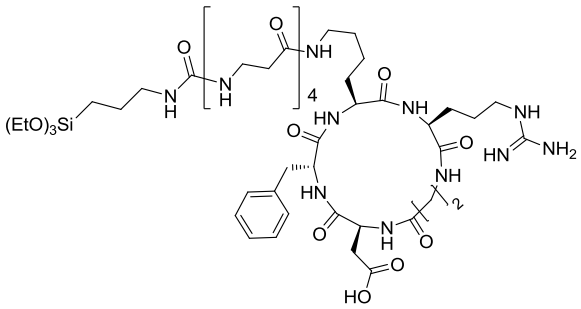
Caractérisation du composé 10

Rendement : 32%
Pureté : 96 %
MM : 1050.5 g/mol
LCMS tr : 0.81min
LCMS : *m/z* 1051.6 $[M+H]^+$
RMN ^{29}Si(400MHz, DMSO) δ -45 ppm



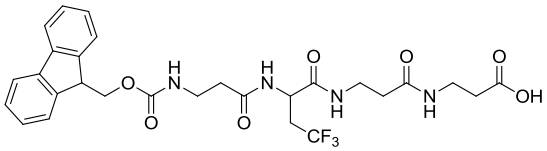
Caractérisation du composé 11

Rendement : 38%
Pureté : 98 %
MM : 1064.5 g/mol
LCMS tr : 0.83min
LCMS : *m/z* 1065.7 $[M+H]^+$



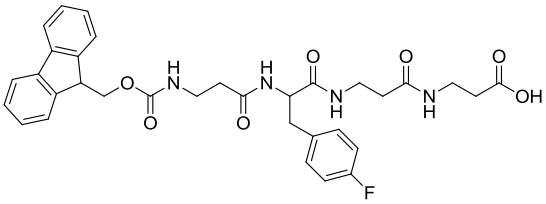
Caractérisation du composé 12

Rendement : 78%
Pureté : 95 %
MM : 592.2 g/mol
LCMS tr : 1.45min
LCMS : *m/z* 593.3 $[M+H]^+$



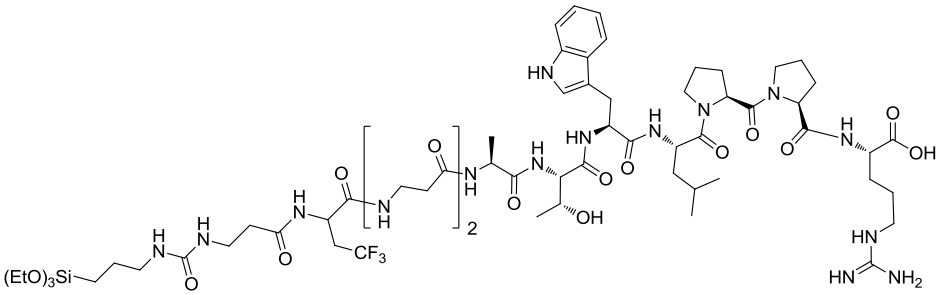
Caractérisation du composé13

Rendement : 82%
Pureté : 94 %
MM : 618.2 g/mol
LCMS tr : 1.52min
LCMS : *m/z* 619.2 $[M+H]^+$



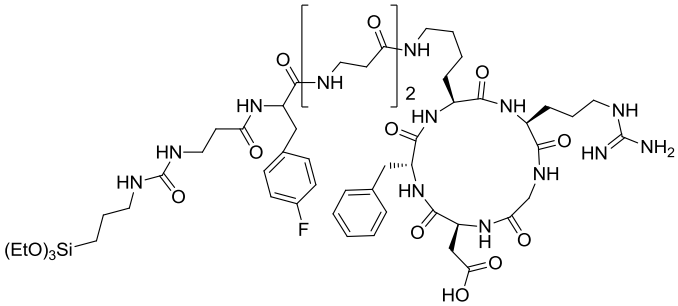
Caractérisation du composé 14

Rendement : 46%
Pureté : 98 %
MM : 1380.6 g/mol
LCMS tr : 0.96/1.04min
LCMS : *m/z* 1381.6 $[M+H]^+$
RMN ^{19}F (400MHz, D_2O/H_2O) : -64ppm



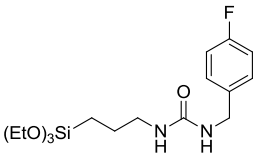
Caractérisation du composé 15

Rendement : 37%
Pureté : 96 %
MM : 1228.6 g/mol
LCMS tr : 0.86min
LCMS : *m/z* 1133.7 $[M+H]^+$
RMN ^{19}F (400MHz, D_2O/H_2O) : -117ppm



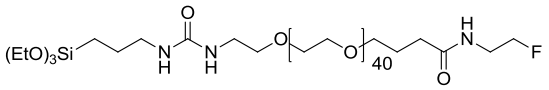
Caractérisation du composé 16

Rendement : 100%
Pureté : 97 %
MM : 372.18 g/mol
LCMS tr : 0.85min
LCMS : *m/z* 289.3 $[M+H]^+$



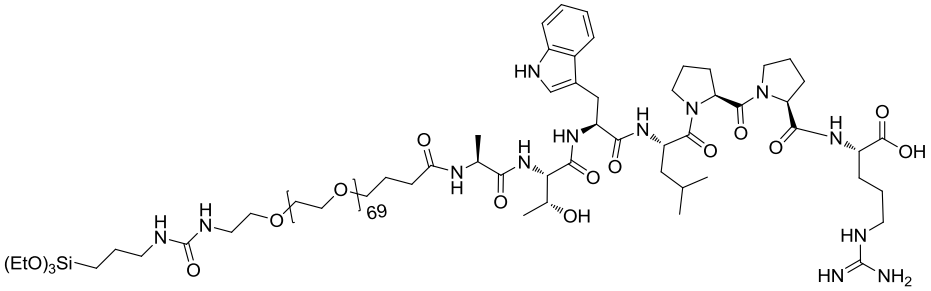
Caractérisation du composé 17

Rendement : 53%
Pureté : 96 %
MM : 1865 g/mol
LCMS tr : 1.23min
LCMS : *m/z* 933.2 $[M+2H]^{2+}$
RMN ^{19}F (400MHz, D_2O/H_2O) : -121ppm



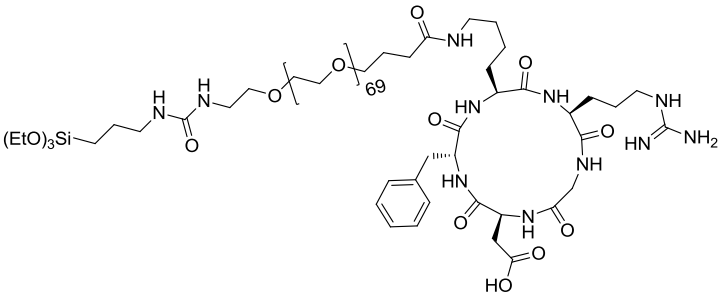
Caractérisation du composé 20

Rendement : 61%
Pureté : 89 %
LCMS tr : 1.21min



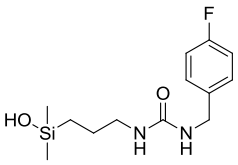
Caractérisation du composé 22

Rendement : 52%
Pureté : 92 %
LCMS tr : 1.24 min



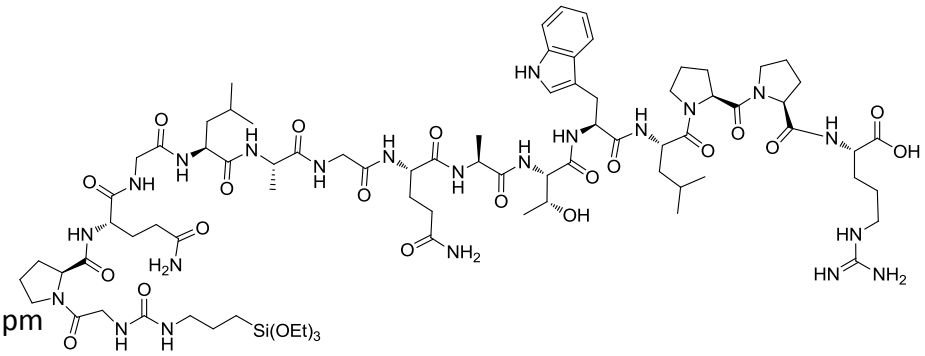
Caractérisation du composé 23

Rendement : 53%
Pureté : 96 %
MW : 284.1
LCMS tr : 1.31/2.02min
LCMS : *m/z* 285.1/551.1$[M+H]^{+}$
RMN ^{19}F (400MHz, D_2O/H_2O) : -121ppm



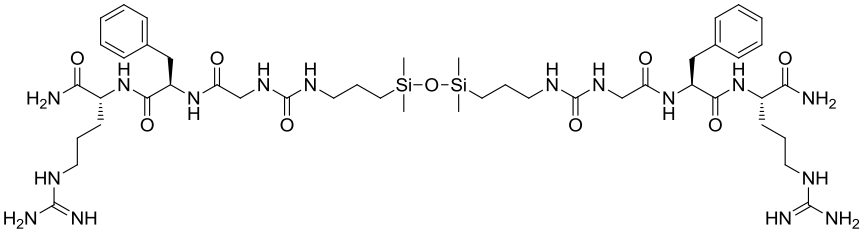
Caractérisation du composé 27

Rendement : 41%
Pureté : 94 %
MW : 1794.9
LCMS tr : 1.06/1.13min
LCMS : *m/z* 840.1 $[M+2H]^{2+}$
RMN ^{29}Si(400MHz, DMSO) δ -45 ppm



Caractérisation du dimère d1

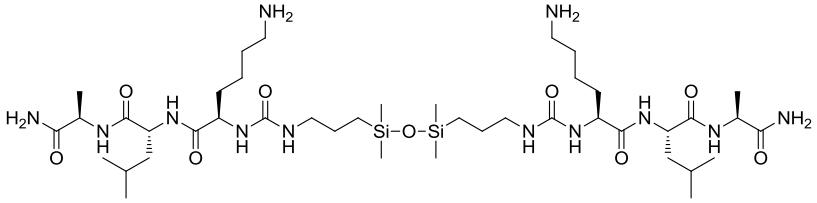
Rendement : 35%
Pureté : 99 %
MW : 536.3/1055.4 g/mol
LCMS tr : 0.99/1.27min
LCMS : *m/z* 537.5/1055.8 $[M+H]^+$



RMN ^{1}H (400MHz, AcN/D_2O) δ 0.065-0.090(2s, CH_3-Si), 0.532(m, CH_2-Si) 1.39-1.85 (br, 6H), 2.96-3.15 (br, 6H), 3.67(q, 2H), 4.2 (m, 1H), 4.51(m, 1H), 7.20-7.35(m, 5H), 7.09-7.28(m, 5H)
RMN ^{13}C(400MHz, AcN/D_2O) δ 0.98, 15.53, 24.75, 25.89, 29.47, 38.03, 41.93, 44.32, 44.76, 54.2, 56.20, 128.55, 130.19, 130.68, 137.76, 258.11, 161.08, 173.95, 176.75ppm
RMN ^{29}Si(400MHz, AcN/D_2O) δ 9.36, 17.09 ppm

Caractérisation du dimère d2

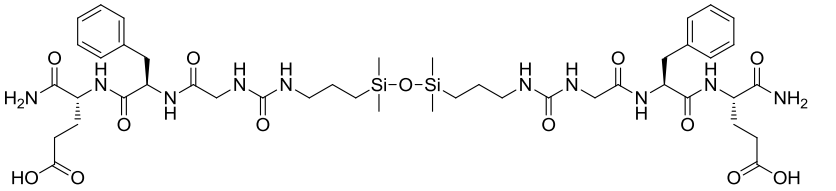
Rendement : 42%
Pureté : 95 %
MM : 488.3/959.4 g/mol
LCMS tr : 0.88/1.18min
LCMS : *m/z* 489.3/960.3 $[M+H]^+$



RMN ^{1}H (400MHz, DMSO) δ 0.018(s, CH_3-Si), 0.43(m, CH_2-Si), 0.83 (dd, 6H), 1.20 (d, 3H), 1.25-1.16 (m, 11H), 22.72 (t, 2H), 2.93 (m, 2H), 3.95, 4.23 (m, 4H),
RMN ^{13}C(400MHz, DMSO) δ 0.083, 0.312, 15.07, 18.06, 21.29, 22.08, 23.06, 23.89, 24.16, 26.58, 31.90, 42.37, 48.14, 51.30, 53.40, 158.07, 171.61, 173.13, 174.33.
RMN ^{29}Si (400MHz, DMSO) δ 8.05, 11.52 ppm

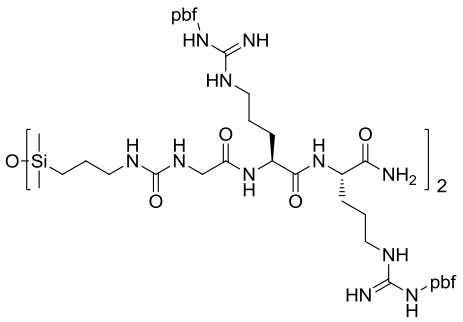
Caractérisation du dimère d3

Rendement : 38%
Pureté : 97 %
MM : 509.2/1001.2
LCMS tr : 1.01/1.32min
LCMS : *m/z* 510.0.5/1002.1 $[M+H]^+$



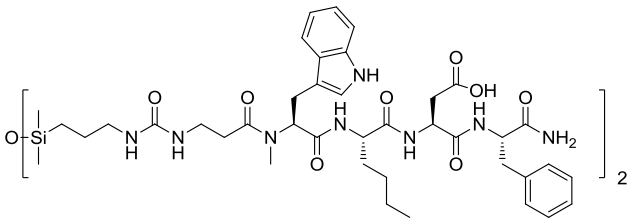
RMN ^{1}H (400MHz, DMSO) δ 0.018(s, CH_3-Si), 0.43 (m, CH_2-Si), 1.33 (m, 2H), 1.78-1.95(br, 2H), 2.22(m, 2H), 2.91(m, 4H), 3.29(m, 2H), 4.14(m, 1H), 4.45(m, 1H), 7.12-7.21(m, 5H).
RMN ^{13}C (400MHz, DMSO) δ 0.32, 0.73, 15.19, 24.15, 27.09, 30.53, 37.30, 42.8, 43.40, 52.45, 54.56, 126.93, 128.66, 129.53, 137.79, 158.80, 171.21, 171.58, 173, 84, 174.45

Caractérisation du dimère d4



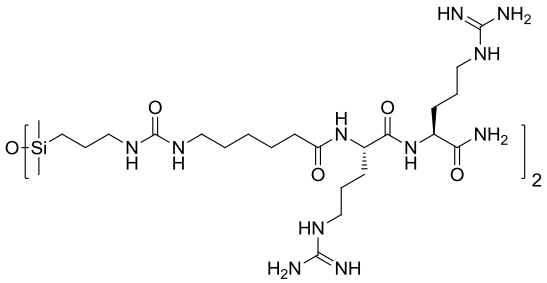
Rendement : 29%
Pureté : 90 %
MM : 993.3/1968.6
LCMS tr : 0.96/1.41min
LCMS : m/z 994.6$[M+H]^+$/985.2 $[M+2H]^{2+}$

Caractérisation du dimère d5



Rendement : 31%
Pureté : 90 %
MM : 823.0/1628.0
LCMS tr : 0.96/1.41min
LCMS : m/z 823.9 $[M+H]^+$/ 815.1 $[M+2H]^{2+}$

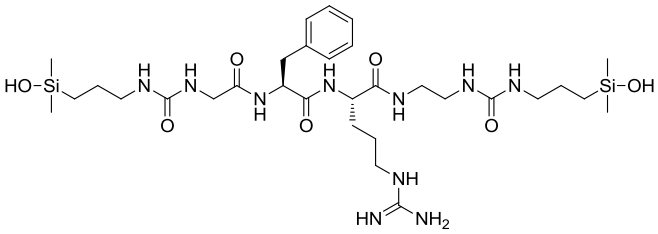
Caractérisation du dimère d6



Rendement : 68%
Pureté HPLC: 95 %
MM : 601.8/1185.6
LCMS tr : 0.71min
LCMS : m/z 602.3/1186.5 $[M+H]^+$

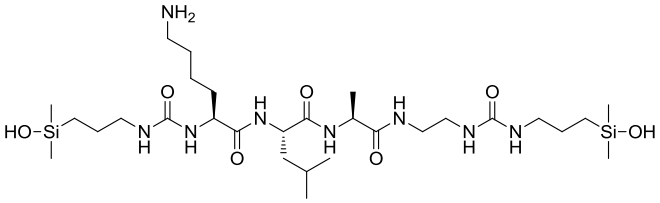
RMN ^{1}H (600MHz, D_2O) δ 0.104-0.145(2s, 6H), 0.551(m, 2H) 1.26-1.99 (broad, 16H), 2.32 (t, 2H), 3.10(br, 4H), 3.24 (t, 4H), 4.33(m, 2H), 5.98(br, 2H), 6.67(br, 2H)
RMN ^{29}Si (D_2O) δ 10.68 (s), 18.65 (s)

Caractérisation du monomère b1



Rendement : 43%
Pureté HPLC: 94 %
MM : 739.0
LCMS tr : 1.05/1.35min
LCMS : m/z 739.5/721.5 $[M+H]^+$

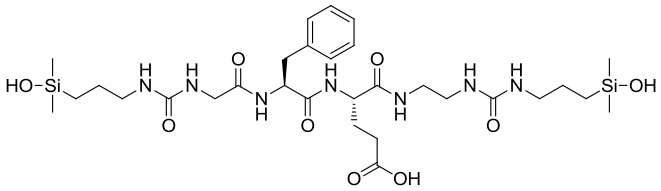
Caractérisation du monomère b2



Rendement : 55 %
Pureté HPLC: 92 %
MM : 739.0
LCMS tr : 0.84/1.11min
LCMS : m/z 691.5/673.4 $[M+H]^+$

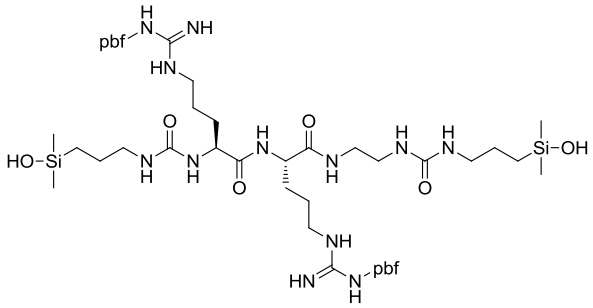
Caractérisation du monomère b3

Rendement : 46%
Pureté HPLC: 96 %
MM : 711.9
LCMS tr : 1.17/1.55min
LCMS : m/z 694.4/712.4 $[M+H]^+$



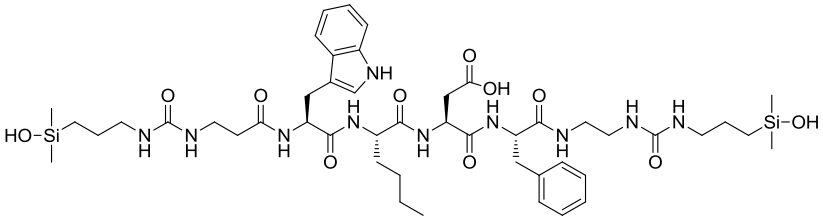
Caractérisation du monomère b4

Rendement : 52%
Pureté HPLC: 91%
MM : 1195.6
LCMS tr : 1.80/2.16min
LCMS : m/z 1196.0/1177.1 $[M+H]^+$



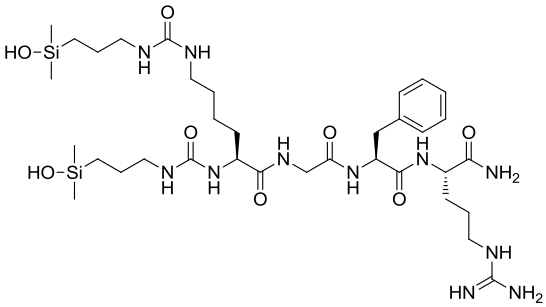
Caractérisation du monomère b5

Rendement : 49%
Pureté HPLC: 92%
MM : 1011.3
LCMS tr : 1.45 /1.75min
LCMS : m/z 1011/993.8 $[M+H]^+$



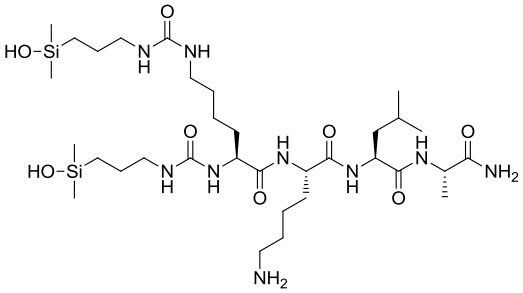
Caractérisation du monomère c1

Rendement : 47 %
Pureté HPLC: 90%
MM : 824.1
LCMS tr : 1.12/1.46min
LCMS : m/z 824.6/806.5 $[M+H]^+$

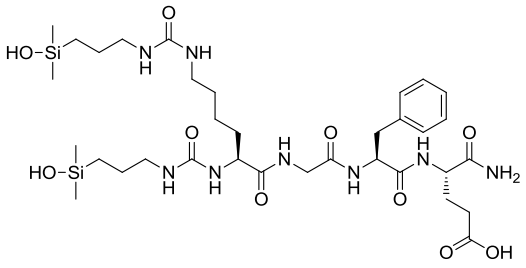


Caractérisation du monomère c2

Rendement : 39%
Pureté HPLC: 96%
MM : 776.1
LCMS tr : 1.13/1. 48min
LCMS : m/z 776.5/758.5 $[M+H]^+$

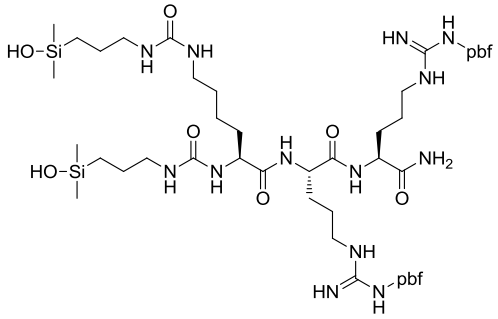


Caractérisation du monomère c3



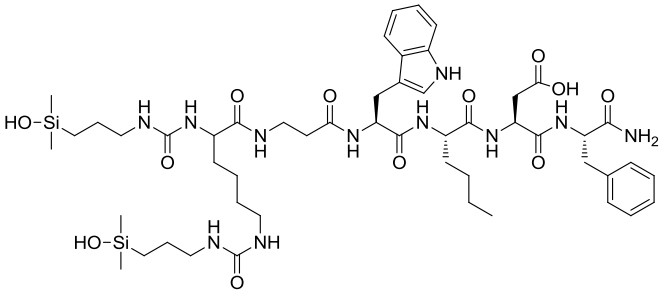
Rendement : 46%
Pureté HPLC: 93%
MM : 797.0
LCMS tr : 7.17/1.57min
LCMS : m/z 797.5/779.5 $[M+H]^+$

Caractérisation du monomère c4



Rendement : 52%
Pureté HPLC: 89%
MM : 1280.7
LCMS tr : 1.75min
LCMS : m/z 1281.0 $[M+H]^+$

Caractérisation du monomère c5



Rendement : 35%
Pureté HPLC: 93%
MM : 1096.4
LCMS tr : 1.45/1.79min
LCMS : m/z 1096.7/1078.8 $[M+H]^+$

Résumé :

Cette thèse est consacrée à la synthèse de peptides hybrides possédant un ou plusieurs groupements silanes et à leurs utilisations pour la conception de matériaux hybrides. Deux types de peptides hybrides silylés ont été mis au point : les peptides triethoxysilanes et chlorodiméthylsilanes.

La première partie de ce manuscrit présente la synthèse de peptides triethoxysilanes, ligands de récepteurs surexprimés dans certains types de cancer. Ils ont été utilisés pour la multi fonctionnalisation de nanoparticules de silice fluorescentes obtenues par voie sol-gel. Une méthode originale de caractérisation par RMN du fluor a permis de vérifier l'efficacité du greffage. L'évaluation des propriétés de ciblage des ces nanoparticules multifonctionelles sur différentes lignées cellulaires a été réalisée par cytométrie de flux. Enfin, dans le but de recouvrir d'une coque hybride des nanoparticules poreuses permettant la libération d'un principe actif, un peptide sensible aux protéases a été greffé en surface; la libération d'un fluorophore a été étudiée.

La seconde partie de ce manuscrit concerne les peptides hybrides fonctionnalisés par un ou deux groupements chlorodiméthylsilanes. Ces derniers ont été utilisés pour la synthèse de dimères et de polymères peptidiques de différentes architectures.

Au contraire des stratégies de post-fonctionnalisation reposant sur des synthèses multi étapes délicates et difficiles à contrôler, l'utilisation de ces peptides a permis l'obtention de nouveaux biomatériaux dans des conditions très douces avec une grande flexibilité.

Mots clés : Sol-gel, nanoparticules fluorescentes, ciblage, silicone, Neuropiline, RGD

Title: Synthesis of silylated peptides for conception of hybrid materials

Summary:

This thesis is dedicated to the synthesis of hybrid peptides functionalized with one or more silane groups and their use for the preparation of hybrid materials. Two precursors were developed: triethoxysilane and chlorodimethylsilane peptides.

The first part of the manuscript deals with the synthesis of triethoxysilylated peptides as ligands of receptors over-expressed in tumor cells. They were used for the multi-functionalization of fluorescent silica nanoparticles prepared by sol-gel process. An original fluorine-NMR method was developed to demonstrate and quantify the efficiency of the grafting. To investigate the tumor targeting ability, the nanoparticles were assayed against different cell lines by flow cytometry. At last, in order to use mesoporous silica nanoparticles as a delivery system, a shell of hybrid peptides, which sequence was chosen as substrate of peptidases, was anchored to the surface. The release of a fluorescent cargo was studied.

The second part of the manuscript describes a new class of silicone-containing peptide dimers or polymers obtained by a straightforward polymerization in water using tailored chlorodimethylsilyl peptide blocks as monomeric units. Different architectures were obtained including linear and comb-like polymers.

On the contrary of post-functionalization strategies relying on multi-step synthesis, the use of hybrid peptide and sol gel process allows an easy and controlled access to tunable new biomaterials, in soft conditions, with a high versatility.

Keywords: Sol-gel, fluorescent nanoparticles, targeting, silicone, Neuropilin, RGD

Intitulés et adresses des laboratoires :

Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM)
UMR5247-CNRS, ENSCM, Université de Montpellier
Faculté de pharmacie,
15 av Charles Flahault, BP 14491
34060 Montpellier CEDEX 5, France.

Institut Charles Gerhardt (ICG)
UMR 5253 –CNRS, ENSCM, Université de Montpellier
Faculté des Sciences et Techniques
Place Eugène Bataillon,
34095, Montpellier CEDEX 5, France.