

Université de Montréal

**Conception, synthèse et caractérisation de nouvelles
macromolécules branchées biocompatibles pour
encapsuler des principes actifs hydrophobes**

par
Igor Elkin

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en Sciences Pharmaceutiques
option Chimie Médicinale

Août, 2013

© Igor Elkin, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

Conception, synthèse et caractérisation de nouvelles macromolécules branchées
biocompatibles pour encapsuler des principes actifs hydrophobes

Présentée par :

Igor Elkin

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jeanne Leblond Chain, président-rapporteur

Dr. Patrice Hildgen, directeur de recherche

Dr. Xavier Banquy, membre du jury

Dr. Mouad Alami, examinateur externe

Dr. Grégoire Leclair, représentant du doyen de la FESP

Résumé

La vectorisation des médicaments est une approche très prometteuse tant sur le plan médical qu'économique pour la livraison des substances actives ayant une faible biodisponibilité. Dans ce contexte, les polymères en étoile et les dendrimères, macromolécules symétriques et branchées, semblent être les solutions de vectorisation les plus attrayantes. En effet, ces structures peuvent combiner efficacement une stabilité élevée dans les milieux biologiques à une capacité d'encapsulation des principes actifs. Grâce à leur architecture bien définie, ils permettent d'atteindre un très haut niveau de reproductibilité de résultats, tout en évitant le problème de polydispersité. Bien que des nombreuses structures dendritiques aient été proposées ces dernières années, il est cependant à noter que la conception de nouveaux nanovecteurs dendritiques efficaces est toujours d'actualité. Ceci s'explique par des nombreuses raisons telles que celles liées à la biocompatibilité, l'efficacité d'encapsulation des agents thérapeutiques, ainsi que par des raisons économiques. Dans ce projet, de nouvelles macromolécules branchées biocompatibles ont été conçues, synthétisées et évaluées. Pour augmenter leur efficacité en tant qu'agents d'encapsulations des principes actifs hydrophobes, les structures de ces macromolécules incluent un cœur central hydrophobe à base de porphyrine, décanediol ou trioléine modifié et, également, une couche externe hydrophile à base d'acide succinique et de polyéthylène glycol. Le choix des éléments structuraux de futures dendrimères a été basé sur les données de biocompatibilité, les résultats de nos travaux de synthèse préliminaires, ainsi que les résultats de simulation *in silico* réalisée par une méthode de mécanique moléculaire. Ces travaux ont permis de choisir des composés les plus prometteurs pour former efficacement et d'une manière bien contrôlable des macromolécules polyesters. Ils ont aussi permis d'évaluer au préalable la capacité de futurs dendrimères de capter une molécule médicamenteuse (itraconazole). Durant cette étape, plusieurs nouveaux composés intermédiaires ont été obtenus. L'optimisation des conditions menant à des rendements réactionnels élevés a été réalisée. En se basant sur les travaux préliminaires, l'assemblage de nouveaux dendrimères de première et de deuxième génération a été effectué, en utilisant les approches de synthèse divergente et convergente. La structure de nouveaux composés a été prouvée par les techniques RMN du proton et du carbone ^{13}C , spectroscopie FTIR, UV-Vis, analyse élémentaire, spectrométrie de masse et GPC. La biocompatibilité de

produits a été évaluée par les tests de cytotoxicité avec le MTT sur les macrophages murins RAW-262.7. La capacité d'encapsuler les principes actifs hydrophobes a été étudiée par les tests avec l'itraconazole, un antifongique puissant mais peu biodisponible. La taille de nanoparticules formées dans les solutions aqueuses a été mesurée par la technique DLS. Ces mesures ont montré que toutes les structures dendritiques ont tendance à former des micelles, ce qui exclue leurs applications en tant que nanocapsules unimoléculaires. L'activité antifongique des formulations d'itraconazole encapsulé avec les dendrimères a été étudiée sur une espèce d'un champignon pathogène *Candida albicans*. Ces tests ont permis de conclure que pour assurer l'efficacité du traitement, un meilleur contrôle sur le relargage du principe actif était nécessaire.

Mots-clés : dendrimère, polyester, biocompatibilité, modélisation *in silico*, assemblage chimique, encapsulation, itraconazole, propriétés antifongiques

Abstract

The drug molecule vectorization is a very promising approach in terms of both medical and economical factors for the delivery of active substances with low bioavailability. In this context, the star polymers and dendrimers, symmetrical and branched macromolecules, seem to be more attractive solutions. Indeed, these structures can effectively combine a high stability in biological media and the ability to encapsulate active ingredients. Thanks to the well-defined architecture, they can achieve a high level of reproducibility of results, while avoiding the problem of polydispersity. In recent years, many dendritic structures have been proposed; however, the design of new effective dendritic nanocarriers is still relevant. This is due to many reasons such as related to biocompatibility, encapsulation efficiency of therapeutic agents, as well as economic reasons. In this project, new branched biocompatible macromolecules were designed, synthesized and evaluated. To increase their effectiveness as encapsulation agents for hydrophobic active principles, the structures of the proposed macromolecules include a hydrophobic central core on the basis of porphyrin, decanediol or modified triolein, and also a hydrophilic outer layer based on succinic acid and polyethylene glycol. The choice of structural elements of future dendrimers was based on the data on their biocompatibility and the results of our preliminary synthesis works, as well as the *in silico* simulations performed by using the method of molecular mechanics. The preliminary studies allowed for selecting the most promising compounds to effectively form polyesters macromolecules in well controlled manner, as well as to assess in advance the ability of future dendrimers to capture a drug molecule (itraconazole). During this phase, several new intermediates were obtained. The optimization of reaction conditions leading to high yields was performed. Based on the preliminary work, the assembly of new dendrimers of first and second generations was performed, by using the divergent and convergent synthesis approaches. The structures of new compounds were characterized by proton and ¹³C carbon NMR, FTIR, UV-Vis, elemental analysis, mass spectrometry, and GPC techniques. The biocompatibility of products was evaluated by cytotoxicity tests with MTT on murine RAW 262.7 macrophages. The ability to encapsulate hydrophobic active principles was studied by testing with itraconazole, an antifungal agent with low bioavailability. The size of nanoparticles formed in aqueous solutions was measured by the DLS technique. These

measurements showed that all dendritic structures tend to form micelles, which excludes their application as unimolecular nanocapsules. The antifungal activity of itraconazole formulations with dendrimers was studied in a kind of a pathogenic fungus *Candida albicans*. These tests lead to the conclusion that to ensure the effectiveness of treatment, more control over the release of the active ingredient has been needed.

Keywords : dendrimer, polyester, biocompatibility, *in silico* modelization, chemical assembly, encapsulation, active ingredient, itraconazole, anti-fungal properties

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xx
Chapitre 1. Analyse bibliographique : Problème de la biodisponibilité des principes actifs hydrophobes et leur encapsulation dans les dendrimères.....	2
1.1. Problème de la biodisponibilité des principes actifs hydrophobes et ses solutions possibles.....	3
1.2. Dendrimères et leur utilisation comme agents d'encapsulation de molécules actives	6
1.2.1. Nanotechnologies et dendrimères : Information générale.....	6
1.2.2. Principales méthodes de synthèse des dendrimères.....	13
1.2.3. Principaux types du nanotransport des molécules actives avec les dendrimères....	17
1.2.4. Dendrimères comme nanocapsules des molécules actives.....	26
1.2.5. Dendrimères et biocompatibilité.....	48
1.2.6. Encapsulation de principes actifs antifongiques dans les dendrimères.....	63
1.3. Conclusion de l'analyse bibliographique. Formulation de l'hypothèse et d'objectifs de la recherche.....	69
Chapitre 2. Choix des éléments structuraux et les travaux de synthèse préliminaires.....	72
2.1. Description générale du concept dendritique proposé.....	73
2.2. Choix des éléments structuraux de futurs dendrimères.....	75
2.2.1. Sélection des structures de cœurs et travaux de synthèse préliminaires.....	76
2.2.2. Choix des espaceurs.....	112
2.2.3. Choix des agents de branchement.....	115
2.2.4. Choix des groupements terminaux.....	122
2.2.5. Autres travaux de synthèse préliminaires.....	126
2.2.6. Conclusion du chapitre.....	131
2.3. Partie expérimentale.....	131

2.3.1. Synthèse et caractérisation des structures de cœur	131
2.3.2. Synthèse et caractérisation des produits intermédiaires à base des groupements espaceurs choisis.....	136
2.3.3. Synthèse et caractérisation des produits intermédiaires à base des agents de branchements choisis	137
2.3.4. Synthèse et caractérisation du monoallyle-tétraéthylène glycol.....	138
2.3.5. Synthèse et caractérisation d'autres produits intermédiaires	140
Chapitre 3. Modélisation d'encapsulation de l'itraconazole <i>in silico</i>	143
3.1. Introduction du chapitre.....	144
3.2. Méthode de calcul, critère d'évaluation et procédures utilisées	145
3.3 Simulation <i>in silico</i> réalisées	146
3.4. Conclusion du chapitre	156
Chapitre 4. Assemblage chimique des dendrons et dendrimères.....	157
4.1. Principaux types de dendrimères à synthétiser	158
4.2. Assemblage des dendrons	159
4.2.1. Synthèse des dendrons de première génération	159
4.2.2. Synthèse d'un dendron de deuxième génération	164
4.3. Assemblage des dendrimères.....	167
4.3.1. Synthèse de dendrimères de première génération.....	167
4.3.2. Synthèse de dendrimères de deuxième génération	180
4.4. Conclusion du chapitre	188
4.5. Partie expérimentale.....	189
4.5.1. Synthèse et caractérisation des dendrons.....	189
4.5.2. Synthèse et caractérisation des dendrimères.....	195
Chapitre 5. Tests d'encapsulation de l'itraconazole <i>in vitro</i>	208
5.1. Tests d'encapsulation de l'itraconazole	209
5.2. Mesure de la taille par la technique DLS.....	212
Chapitre 6. Tests biologiques.....	215
6.1. Tests de cytotoxicité de produits dendritiques obtenus	216
6.2. Étude des propriétés antifongiques de l'itraconazole encapsulé dans les dendrimères.....	218
Chapitre 7. Discussion générale.....	220

Annexe 1. Réactifs et solvants utilisés dans les études.....	i
Annexe 2. Méthodes analytiques et l'appareillage et conditions analytiques utilisés	iii
Annexe 3. Procédure détaillée de tests d'encapsulation de l'itraconazole	vi
Annexe 4. Procédure détaillée des tests de cytotoxicité sur les macrophages murins avec le MTT	viii
Annexe 5. Procédure détaillée de tests antifongiques sur <i>Candida albicans</i>	xii
Annexe 6. Liste des structures chimiques.....	xiv

Liste des tableaux

Tableau 1. Énergies stériques de dendrimères MD-I, de l'itraconazole et de systèmes « dendrimère-itraconazole » (1:1) calculées dans le vide.....	148
Tableau 2. Énergies stériques de structures modèles MD-II, C-VI, 13, ITZ et de systèmes "itraconazole-modèle" (1:1) dans le vide, calculées avec et sans les procédures de dynamique moléculaire.....	151
Tableau 3. Énergies stériques de structures modèles 32, 33, MD-II(C-V), 34, ITZ et de systèmes "itraconazole-modèle" (1:1) dans le vide, calculées avec et sans les procédures de dynamique moléculaire	152
Tableau 4. Énergies stériques de la structure modèle MD-II(C-I), de l'itraconazole et de systèmes "itraconazole-modèle" (1:1), (2:1), (3:1) et (4:1), calculées dans le vide, avec et sans les procédures de dynamique moléculaire.....	153
Tableau 5. Énergies stériques de structures modèles MD-II, C-VI, 13, ITZ et de systèmes "itraconazole-modèle" (1:1), calculées dans la boîte périodique d'eau, avec et sans les procédures de dynamique moléculaire.....	154
Tableau 6. Taux d'encapsulation de l'itraconazole en fonction de la structure dendritique.....	210
Tableau 7. Rayons hydrodynamiques, pourcentage du pic principal et indice de polydispersité moyen des micelles à base de dendrimères dans leurs solutions aqueuses avant et après l'encapsulation de l'itraconazole	212

Liste des figures

Figure 1. Répartition en% de l'impact économique global des nanotechnologies en 2010.....	7
Figure 2. Représentation schématique d'un dendrimère de quatrième génération	8
Figure 3. Taille et augmentation en progression géométrique du nombre de fonctions chimiques à la surface de dendrimères PAMAM, en fonction de la génération (G).....	9
Figure 4. Nombre de publications sur les polymères et dendrimères thérapeutiques en 1940-2009.....	10
Figure 5. Nombre de brevets et articles publiés par différentes équipes de recherche, selon Chemical Abstracts Citation Index (données de 2005)...	11
Figure 6. Structures de deux dendrimères les plus couramment utilisées, poly(amido amino) ou PAMAM G5 élaboré par l'équipe de D. Tomalia (à gauche) et poly(propylène imine), ou PPI, G 5 (à droite) issu indépendamment de laboratoires de E. W. Meijer et R. Mulhaupt.....	12
Figure 7. État attendu du développement de différentes applications des dendrimères en 2015 (a), et les risques liés à ces applications au bout de la période de 2005 à 2015 (b), selon le rapport de W&W.....	13
Figure 8. Représentation schématique de deux principales voies d'assemblage des dendrimères, divergente et convergente.....	14
Figure 9. Spectres de masse de dendrimères préparés par les voies convergente (a) et divergente (b).....	15
Figure 10. Représentation schématique de deux possibles voies pour changer la structure de dendrons durant l'assemblage des dendrimères « en couche » (a) et « en segment » (b).....	16
Figure 11. Deux principales stratégies d'utilisation de dendrimères en vectorisation des molécules actives (dans le cas présent, en thérapie antinéoplasique des tumeurs solides): encapsulation non chimique et conjugaison covalente.....	19
Figure 12. Schéma de l'alimentation sanguine et lymphatique de tissus normaux et tumeurs solides. Les vecteurs de taille nanométrique, chargés de	

molécules actives, peuvent pénétrer dans les tumeurs solides grâce à l'effet de perméabilité vasculaire accrue et une augmentation de rétention due à l'absence du drainage lymphatique. La vascularisation dans les tissus non cancéreux est généralement peu perméable pour des nanoparticules et des macromolécules, bien que des macromolécules telles que l'albumine puissent s'extravaser par les fenestrations capillaires ou par le mécanisme de transcytose actif. Une fois présent dans l'interstitium, ils sont livrés vers la circulation systémique par le système lymphatique..... 22

Figure 13. Mécanismes généraux de l'association non covalente des molécules actives faiblement acides et hydrophobes, ayant lieu dans le cas de dendrimères PPI et PAMAM avec différentes fonctions de surface..... 29

Figure 14. Libération du 5-flourouracile (dans l'eau), encapsulé préalablement dans les dendrimères PAMAM G4: non modifié (DF), modifié par le greffage directe de l'AF sur la surface (FA-DF), modifié par le greffage de l'AF par l'intermédiaire du PEG4000 (FA-PEG-DF)..... 32

Figure 15. Dendrimère PPI G4 avec la surface modifiée par le greffage de groupements phényles et *t*-BOC..... 33

Figure 16. Dendrimères PPI (a) et PAMAM (b) portant les unités azobenzènes à la périphérie, sensibles au pH, à la lumière et aux enzymes qui clivent la fonction azo, proposés pour la vectorisation des principes actifs..... 33

Figure 17. Principe de fonctionnement des dendrimères PPI (et PAMAM) portant les unités azobenzène à la périphérie, sensibles au pH et à la lumière..... 34

Figure 18. Différentes familles de dendrimères proposés pour l'encapsulation de PA : (a) indométacine, (b) paclitaxel et 5-flourouracile, (c) méthotrexate et 6-mercaptapurine, (d) 10-hydroxycamptothecin et 7-butyl-10-aminocamptothecin, (e) β -carotène et méthotrexate, (f) paclitaxel..... 37

Figure 19. Dendrimère portant les unités guanidines à la surface avec l'identification de sites des interactions physico-chimiques (a) et la

structure de gatifloxacin (b).....	40
Figure 20. Formation d'une nanocapsule à partir de deux dendrimères, portant chacun un hémisphère hydrophobe interne, autour d'une molécule hydrophobe (à pH neutre).....	41
Figure 21. Pseudodendrimères <i>Boltorn</i> ®: (a) structure idéalisée du Boltorn H40; (b) représentation schématique de Boltorn H2004, U3000 et W3000.....	42
Figure 22. Effet du pH et de la présence du NaCl sur les mécanismes d'encapsulation des molécules actives hydrophobes ou faiblement acides par les dendrimères PAMAM avec fonctions aminés à la périphérie.....	44
Figure 23. Corrélation entre la masse moléculaire et la proportion de la dose injectée de dendrimères polylysine PEGylés, marqués au tritium, excrétée dans l'urine chez le rat, après l'administration par voie intraveineuse de 5 mg/kg.....	54
Figure 24. Résultats de microscopie électronique par balayage obtenus dans le cas de globules rouges exposés aux dendrimères PAMAM pendant 1 h...	56
Figure 25. Illustration de l'interaction de dendrimères avec la membrane cellulaire dans le cas de dendrimères PPI aminés (a) et acylés (b).....	57
Figure 26. Structure de dendrimères polyesters PFD de G1 et G5 à cœur disulfure, produits de la compagnie Polymer Factory.....	62
Figure 27. Aperçu schématique de différents facteurs qui déterminent la résistance antifongique au sein d'un biofilm, y compris la densité, le stress, les persisters, la matrice extracellulaire (ECM), les pompes d'efflux, les cibles en excès et la physiologie générale de biofilm.....	63
Figure 28. Structure chimique de l'itraconazole.....	65
Figure 29. Voie de la biosynthèse d'ergostérol avec le point d'inhibition par les azoles.....	66
Figure 30. Concept général de nouveaux dendrimères, proposés pour encapsuler des molécules de principes actifs hydrophobes.....	73
Figure 31. Étapes de fonctionnement de nanotransporteurs dendritiques proposés: l'encapsulation du principe actif, en changeant le milieu	

faiblement polaire (a) par un solvant polaire (b), la libération du principe actif par diffusion ou dégradation du vecteur (c et d) et l'élimination des produits de biodégradation (e).....	74
Figure 32. Représentation schématique d'éléments structuraux de futurs dendrimères.....	75
Figure 33. Structures initialement choisies comme cœurs de dendrimères dans le cadre du présent projet de recherche.....	76
Figure 34. Synthèse du cœur C-I par l'interaction du pentaérythritol et l'anhydride succinique.....	79
Figure 35. Résultat de l'analyse LC-MS du cœur C-I: (a). chromatogramme du produit (aire normalisée du pic avec le temps de rétention de 10,34 min: 98,3%); (b). spectre MS-TOF en mode d'ionisation ESI négatif.....	80
Figure 36. Spectre ¹H RMN (DMSO-d₆, 300Hz) du produit C-I.....	80
Figure 37. Synthèse envisagée du cœur C-II à partir de l'adamantane.....	81
Figure 38. Spectre RMN du proton (CDCl₃, 300 MHz) de 1,3,5,7-tétrabromoadamantane (6) obtenu après les modifications apportées au protocole de Ch.-F. Huang et col.....	82
Figure 39. Schéma proposé pour obtenir 1,3,5,7-tétrahydroxyadamantane (4) à partir du 1,3,5,7-tétrabromoadamantane (6), en utilisant la subsitution préliminaire de bromes par les groupements acétate.....	84
Figure 40. Résultats de l'analyse LC-MS du produit de succination du dextrose : (a) chromatogramme ionique générale avec l'identification des signaux; (b) spectre ESI-TOF en mode négatif du pic correspondant au cœur C-VII.....	85
Figure 41. Esterification d'un alcool avec l'anhydride cyclique résultant en formation d'un monoester.....	87
Figure 42. Formation du dianhydride bicyclique de l'acide butane-1,2,3,4-	

tétracarboxylique par l'intermédiaire de son tétrachlorure.....	88
Figure 43. Les spectres FTIR de l'huile d'olive « Bertolli DAL 1865 Extra Vierge Originale » (Unilever) avant (rouge) et après (vert) la purification chromatographique.....	92
Figure 44. Les spectres RMN du proton (CDCl₃, 300 MHz) de l'huile d'olive « Bertolli DAL 1865 Extra Virgin Original » d'Unilever avant (a) et après (b) la purification chromatographique.....	94
Figure 45. Deux voies de synthèse testées pour obtenir le polyol C-VIII: (i) – Br₂ dans CHCl₃, 0°C; (ii) NaOC(O)CH₃ dans DMF, 130-135°C; (iii) – 25%aq. K₂CO₃ dans MeOH, t.p.; (iv) 23-25%aq. HCl, t.p.; (v) 2-méthoxyéthyl amine dans <i>iso</i>-PrOH, t.p.; (vi) 2-méthoxyéthyl amine in <i>iso</i>-PrOH, à reflux; (vii) HCl (<i>in situ</i>) dans MeOH, t.p.; (viii) HC(O)OOH (<i>in situ</i>) dans le mélange HCOOH - Et-O-Et (3:4), t.p.; (ix) HCOOH dans Et-O-Et, r.t.; (x) Cs₂CO₃ dans le mélange MeOH-CHCl₃ (5:1), t.p.; (xi) 35%aq. HCl dans MeOH-CHCl₃ (3:1), t.p.; (xii) 15-17%aq. HCl dans l'acetone, t.p.....	97
Figure 46. Spectres RMN du proton (CDCl₃, 300 MHz) de l'huile d'olive de départ (A), du produit bromé 12 (B) et du dérivé polyoxyacétate 13 (C)..	98
Figure 47. Spectre ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) du trioléine standard 11 de départ (A) et de dérivés hydroxy-oxyformyle 15 (B), and hexahydroxyle C-VIII (C).....	103
Figure 48. Spectre ¹³C NMR (CDCl₃, 100,61 MHz) du trioléine standard 11 de départ (A) et de dérivés hydroxy-oxyformyle 15 (B), and hexahydroxyle C-VIII (C).....	104
Figure 49. Spectre FTIR (ATR sur ZnSe) du trioléine standard 11 de départ (A) et de dérivés hydroxy-oxyformyle 15 (B), and hexahydroxyle C-VIII	

(C).....	105
Figure 50. Spectres de masse (ESI-TQ; par injection directe d'échantillons) du produit tri(hydroxy-oxyformylé) 15 obtenu à partir du trioléine standard après 30 min d'agitation avec un excès de l'acide performique dans l'éther: (a) en mode positif, (b) en mode négatif.....	106
Figure 51. Spectre $^1\text{H}/^1\text{H}$ RMN NOESY (CDCl_3 , 300 MHz) du dérivé hexahydroxyle C-VIII obtenu à partir du trioléine standard (dans les carrés: les signaux d'interaction entre les protons hydroxyméthines).....	109
Figure 52. Chromatogramme (a) et le spectre de masse du pic principal (b) en HPLC-ESI-TOF (mode négatif) et le spectre MALDI-TOF (mode positif) (c), du polyol final déformylé C-VIII obtenue à partir du trioléine standard après l'hydrolyse acide dans l'acétone pendant 5,5 h..	110
Figure 53. Structures du tétraéthylène glycol (ou TEG) (S-I) et du 1,10-décanediol (S-II) choisies comme groupements espaceurs.....	112
Figure 54. Monotrylation de diols S-I et S-II.....	114
Figure 55. Spectre RMN du proton (CDCl_3 , 300 MHz) du monotryldécanediol.	114
Figure 56. Structures envisagées en tant qu'agents de branchement : acide citrique (AB-I), pentaérythritol (AB-II), acides 2,2-bis(hydroxyméthyl)-butyrique (AB-III) et 2,2-bis(hydroxyméthyl)propionique (AB-IV).....	115
Figure 57. Synthèse du pentaérythritol monotrylé.....	117
Figure 58. Spectre LC-MS(ESI)-TOF du monotrylpentaérythritol.....	118
Figure 59. Spectre ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) du monotrylpentaérythritol.	119
Figure 60. Benzylolation selective de l'acide 2,2-bis(hydroxyméthyl)butyrique.....	119
Figure 61. Résultats de l'analyse LC-MS du produit obtenu par l'interaction de l'acide 2,2-bis(hydroxyméthyl)butyrique avec l'alcool benzylique en	

présence de l'acide <i>para</i> -toluènesulfonique : (a) chromatogramme; (b) spectre de masse (APCI) du pic contenant le signal de l'ion moléculaire visé.....	120
Figure 62. Réaction envisagée pour obtenir l'acide 2,2-bis(bromométhyl)- propionique.....	121
Figure 63. Deux approches proposées pour obtenir le monoallyleTEG.....	123
Figure 64. Spectres ¹ H RMN: (a). du monoallyleTEG tritylé (24) dans le DMSO- <i>d</i> 6 et (b). du monoallyleTEG (25) dans le CDCl ₃	124
Figure 65. Spectre de masse (MS-TOF, en mode positive) du TEG monotritylé (25) contenant des signaux principaux appartenant à ses ions moléculaires.....	125
Figure 66. Équation chimique générale de la succination du monoallyle- tétraéthylèneglycol.....	126
Figure 67. Spectre RMN du proton (CDCl ₃ , 300 MHz) du produit 27.....	128
Figure 68. Spectre LC-MS-TOF de masse du produit 27.....	128
Figure 69. Succination du mono- <i>O</i> -trityl-1,10-décanediol (18) avec l'anhydride succinique (2) en excès.....	129
Figure 70. Oxydation du monométhoxy-PEG-1000-OH (30) en son dérivé carboxylique (32) par la réaction de Jones.....	130
Figure 71. Structures dendritiques de deuxième génération (MD-I) choisies pour l'étude <i>in silico</i>	146
Figure 72. Clichés instantanés de molécules de l'itraconazole (a), du dendrimère MD-I (C-I, S1= S-II, S2=S3= S-I) (b) et du système « itraconazole- dendrimère » (1:1) (c) après les procédures d'optimisation géométrique dans le « vide ».....	147
Figure 73. Structures modèles réduits (MD-II) choisies pour effectuer les	

simulations avec les procédures de dynamique moléculaire.....	149
Figure 74. Clichés instantanés de résultats de calculs effectués dans le vide pour l'itraconazole (a), la structure de modèle MD-II avec le cœur C-I (b) et le système MD-ITZ (c).....	150
Figure 75. Structures modèles réduits pour étudier l'influence du nombre des dendrons.....	152
Figure 76. Clichés instantanés de résultats de calculs effectués dans la boîte périodique d'eau du système MD-II(C-I) - ITZ (1:1) avec les molécules du solvant montrées (a) et cachées (b).....	153
Figure 77. Orientation des cycles benzoïques due aux interactions π - π (montré avec flèches roses) dans les systèmes 1:1 après les procédures d'optimisation géométrique et de dynamique moléculaire dans la boîte périodique d'eau : (a) « ITZ (vert)-MD-II(C-V) » et (b) « ITZ – C-VI».....	155
Figure 78. Deux principaux types de dendrimères que nous planifions de synthétiser.....	158
Figure 79. Structures de dendrons de G1 choisies pour le présent projet de recherche.	160
Figure 80. Schéma de synthèse réalisé pour obtenir le dendron 36.....	160
Figure 81. Spectre de masse (ESI-TOF en mode positif) du dendron tritylé 39.....	161
Figure 82. Spectres ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) de dendrons tritylé, 39 (a), et détritylé, 36 (b).....	162
Figure 83. Spectre de masse (ESI-TOF en mode positif) du dendron détritylé 36..	163
Figure 84. Assemblage chimique de dendrons 37 et 38 à partir du dendron 36....	163
Figure 85. Résultats de l'analyse structurale du dendron 40 : (a) spectre RMN du proton (CDCl_3 , 300,0 MHz); (b) spectre de masse (ESI-TOF en mode positif).....	164
Figure 86. Assemblage chimique du dendron hydrophile 45 de 2ème génération..	165
Figure 87. Spectre de masse (MALDI-TOF, en mode positif) du dendron 44 contenant des signaux correspondant aux ions moléculaires	

multichargés.....	166
Figure. 88. Schéma de synthèse du dendrimère de première génération 46 portant un cœur hydrophobe rigide à base de porphyrine substituée C-VI.....	167
Figure. 89. Schéma de synthèse de dendrimères de première génération portant une partie centrale flexible hydrophile (47) ou hydrophobe (48).....	168
Figure 90. Spectres UV-Vis dans le chloroforme de dendrimères de G1 à cœur porphyrique polyallyle (a) et de son dérivé polyhydroxyle 46 (b).....	169
Figure 91. Spectres FTIR de dendrimères de G1 à cœur porphyrique polyallyle (rouge) et de son dérivé polyhydroxyle 46 (mauve).....	170
Figure 92. Spectres RMN du proton (CDCl ₃ , 300 MHz) de dendrimères de G1 à cœur porphyrique polyallyle (a) et de son dérivé polyhydroxyle 46 (b).....	170
Figure 93. Spectre MALDI-TOF (a) et chromatogramme GPC (b) du dendrimère 46.....	171
Figure 94. Spectres FTIR (a) et de ¹ H RMN (b) du dendrimère 48 portant le cœur C-I et les groupements espaceurs S-II.....	172
Figure 95. Schéma de synthèse de dendrimères de type IIa, 52-54, par l'esterification de Steglich (a) et la réaction entre l'alcool et les chlorures d'acides (b).....	175
Figure 96. Schéma de synthèse du dendrimère 53 par la réaction entre le dérivé polybromé 12 et le sel de césium à base de l'acide carboxylique 32.....	175
Figure 97. Synthèse du dérivé polysuccinyle 55 à partir du cœur C-VIII suivi du greffage d'alcools hydrophiles, afin d'obtenir les dendrimères de type IIa, 56-58.....	177
Figure 98. Spectres de masse (a), FTIR (b) et ¹ H RMN (c) du dérivé polysuccinique 55a obtenu à partir du trioléate standard.....	178

Figure 99. Spectres de ¹H RMN (a) et FTIR (b) et du dendrimère 57a de type Ib, portant les chaînes hydrophiles PEG550.....	179
Figure 100. Oxydation d'allyle dans la structure 56a afin d'obtenir le dérivé polyhydroxyle 59.....	180
Figure 101. Spectres FTIR de dendrimères polyallyle 56 (rouge) et de son dérivé polyhydroxyle 59 (bleu).....	180
Figure 102. Assemblage de dendrimères de type Ib par deux différentes voies de synthèse convergente (a) et divergente (b).....	182
Figure 103. Spectre UV-Vis (CHCl₃) du dendrimère 61 obtenu par voie convergente.....	183
Figure 104. Spectre MALDI-TOF (en mode positif) du produit oxydé 61, caractérisé par les signaux avec les valeurs m/z plus petites qu'attendues pour l'ion moléculaire monochargé.....	184
Figure 105. Schéma de synthèse du dendrimère 64 de G2 à cœur hydrophobe flexible.....	185
Figure 106. Schéma de greffage de l'acide oléique aux triglycérides substitués C-VIII et 12 par: a) l'esterification de Steglich, b) la réaction entre hydroxyle et le chlorure d'acide, c) la substitution de bromes en présence du sel de césium.....	186
Figure 107. Schéma de greffage de l'acide oléique au coeur C-VIII par une approche multiétape basée sur la réaction de Mitsunobu.....	187
Figure 108. Représentation schématique du mécanisme d'encapsulation d'une petite molécule hydrophobe par un dendrimère de type IIa, par le repliement efficace de chaînes hydrophobe libre autour du PA.....	210
Figure 109. Distribution de taille des micelles à base du dendrimère 48 dans l'eau déionisée avant (a) et après (b) l'encapsulation de l'itraconazole.....	213
Figure 110. Schéma de réduction du MTT en sa forme de formazan colorée.....	216
Figure 111. Prolifération des macrophages murins RAW 262.7 après une exposition de 24 h aux dendrimères dans la plage de concentration de	

0,01 à 250,00 µg/ml.....	217
Figure 112. Schéma de la réduction du résazurin en résorufin.....	218
Figure 113. Viabilité cellulaire de la souche LSPQ 5674 de <i>Candida albicans</i> après 72 h de traitement avec de l'ITZ libre, Sporanox [®] et les formulations d'ITZ à base de dendrimères 48, 58a, 59 et 64.....	219

Liste des abréviations

AB	Agent de branchement
ADME	Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion
ADN	Acide désoxyribonucléique
AF	Acide folique
AIST	Institut National de Science Industrielle et de Technologie Avancée
AOCS	<i>American Oil Chemist's Society</i>
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
ARN	Acide ribonucléique
ATR	<i>Attenuated Total Reflection</i> (Réflexion totale atténuée)
9-BBN	9-Borabicyclo[3.3.1]nonane
BMPA	Acide 2,2-bis(hydroxyméthyl)propionique
BVO	<i>Brominated Vegetable Oil</i>
C	Cœur (de dendrimère)
CCA	Concentration critique d'agrégation
CCM	Chromatographie en couche mince
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentration minimale inhibitrice
COI	Conseil Oléicole International
CTI	Calorimétrie de titration isothermale
CYP	<i>Cytochrome isoenzyme</i>
DD	Décanediol
DIAD	Diisopropyl azodicarboxylate
DL50	Dose létale à 50%
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DMA	N,N-Diméthylacétamide
DMAP	N,N-diméthylaminopyridine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique

DOX	Doxorubicine
DPMA	Poly(N,N-diméthylaminoethyl methacrylate)
DRO	Dérivés réactifs de l'oxygène
ECM	<i>Extracellular Matrix</i> (Matrice extracellulaire)
EDC	3-(3-Diméthylaminopropyl)-carbodiimide
EM	<i>Exact Mass</i> (Masse moléculaire exacte)
EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention (effect)</i> ou Effet de perméabilité et rétention accrues
ESI	<i>Electron Spray Ionisation</i>
FTIR	<i>Fourier transform infrared (spectroscopy)</i> ou Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
5-FU	5-Fluorouracile
G	Génération de dendrimère
GPC	<i>Gel Permeation Chromatography</i> (Chromatographie d'exclusion stérique)
GPT	<i>Glutamic Pyruvic Transaminase</i> (Transaminase glutamique pyruvique)
GT	Groupement terminal
GSH	Glutathion
HAIYPRH	<i>Bacterial Phage-displayed peptide of the T7 group</i>
HP- β -CyD	2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrine
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPMC	Hydroxypropylméthylcellulose
HSV	<i>Herpes simplex virus</i> (Virus de l'herpès)
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IND	<i>Investigational New Drug Application</i>
IP	Intrapéritonéale
IR	<i>Infrared (spectroscopy)</i> ou Spectroscopie infrarouge
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ITZ	Itraconazole

IV	Intraveineuse
LSPQ	Laboratoire de Santé Publique du Québec
LC-MS	Chromatographie liquide de haute performance couplée avec spectrométrie de masse
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i>
MD	Molécule dendritique
MMPs	Métalloprotéases matricielles
6-MP	6-Mercaptopurine
MS-TOF	<i>Mass Spectrometry – Time of Flight</i>
MTX	Méthotrexate
MTT	3-(4,5-Diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
NCE	<i>New Chemical Entity</i> (Nouvelle entité chimique)
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
OLED	<i>Organic light-emitting diode</i> (Diode électroluminescente organique)
OMS	Organisation mondiale de la santé
PA	Principe actif
PAMAM	Dendrimères poly(amidoamine)
PBS	Tampon phosphate salin
PEG	Poly(éthylène glycol)
PEI	Dendrimères polyéthylèneimines
PFD	<i>Polymer Factory dendrimers</i>
PIR	Protéines inactivant les ribosomes
PPI	Dendrimères poly(propylène imine)
PTX	Paclitaxel
RPE	<i>Retinal pigment epithelium</i>
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMS	<i>Root Mean Squar</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Dérivés réactifs de l'oxygène)
S	<i>Spacer</i> (Groupement espaceur)

SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
SRE	Système réticuloendothélial
<i>t</i> -BOC	<i>tert</i> -Butoxycarbonate
TAG	Triacylglycérol
TEG	Tétraéthylène glycol
THF	Tétrahydrofurane
TRIS	2-Amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol
UFC	Unité formant des colonies
US	<i>United States</i> (les États Unies d'Amérique)
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
US FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
UV	Rayonnement ultraviolet
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
YPD	Yeast Extract (Peptone) Dextrose

*À mon épouse Elena avec tout mon amour et
gratitude*

*« Il arrive qu'un individu devienne le centre de
votre vie... simplement parce qu'il vous aide à
marcher sur le fil de l'espoir. »*

Fatou Diome

Remerciements

Durant cette période de mes études en doctorat à l'Université de Montréal, de nombreuses personnes m'ont accompagné, écouté, soutenu, supporté et je souhaiterais les remercier. Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche Prof. Patrice Hildgen pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et de m'avoir fait confiance pour mener un tel projet de recherche. Merci infiniment à Prof. Grégoire Leclair pour son enthousiasme et ses conseils toujours bien utiles. J'éprouve aussi une gratitude ineffaçable à l'égard de ces deux remarquables personnes pour m'avoir confié le travail comme moniteur aux travaux pratiques étudiants de cours SBP1015 et SBP2040.

Je souhaite également remercier la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal de m'avoir financé avec la bourse de recrutement, le Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) et la Faculté des études supérieures et postdoctorales (FESP) de l'Université de Montréal de m'avoir accordé les bourses d'excellence.

Je suis infiniment redevable à mon collègue Jean-Michel Rabanel pour ses inestimables conseils concernant les tests de cytotoxicité, l'utilisation des appareils RMN et HPLC, ainsi que les particularités de la langue française. Deux personnes, Prof. Xavier Banquy et Prof. Jeanne Leblond Chain, méritent une mention spéciale pour leurs conseils experts en correction de mes manuscrits d'articles.

Un grand merci à Elena Nadezhina et Francine Bélanger pour les analyses élémentaires et également à Amandine Chefson, Marie-Christine Tang, Karine Venne, Alexandra Furtos pour les analyses de masse. Merci infiniment à Valéry Aoun pour les tests antifongiques. Merci énormément à Prof. Christian Pellerin et à Patricia Robert qui m'ont aidé à compléter les analyses FTIR dans leur laboratoire. Merci à Frantz Le Devedec pour les analyses GPC.

Merci beaucoup au personnel du laboratoire d'enseignement de la Faculté de pharmacie de l'UdeM, Lucie Racine, Josée Desrochers, Donato Inglesi et Alexandre Marcoux, pour leur disponibilité, leur aide et leur gentillesse.

Un grand merci à tous les collègues du quatrième étage: Nicolas Bertrand, Mohamed Mokhtar, Jean-Richard Bullet, Vanessa Mosqueira, Juliana Orto, Hamza Zouaoui, Sherief Abdel-Azeez, Kahina Daheb, Alexandre Melkoumov, Amandine Chefson, Martin Jutras,

Amina Soukrati, Mengqing Li, Sarra Zarra, Marie-Ève Leclaire, Warren Viricel, Mihaela Friciu, Amira Mbarek et Mirza Akram Hossain et autres.

En terminant, j'aimerais également remercier les membres du jury pour la lecture et la correction de cette thèse.

Chapitre 1. Analyse bibliographique : Problème de la biodisponibilité des principes actifs hydrophobes et leur encapsulation dans les dendrimères

1.1. Problème de la biodisponibilité des principes actifs hydrophobes et ses solutions possibles

Bien que des progrès significatifs dans la pharmacologie moderne aient été réalisés, il y a encore des domaines où des améliorations substantielles doivent être apportées, pour atteindre un niveau supérieur d'efficacité thérapeutique. En particulier, une faible biodisponibilité et de mauvaises caractéristiques pharmacocinétiques sont toujours au cœur des principales causes d'échec du développement de nouveaux médicaments. Au fil des ans, beaucoup de principes actifs (PA) prometteurs ont ainsi vu leur mise sur le marché compromise en raison de problèmes au niveau de la solubilité, la taille, la sélectivité d'action et de la sensibilité à la dégradation. Par exemple, le premier obstacle majeur à contourner – une solubilité faible dans l'eau, est une propriété distinctive de plus de 60% des PA issus des laboratoires de recherche [1, 2], et de plus de 40% de ceux qui sont sur le marché [3-6]. En fin de compte, cela limite l'efficacité de traitement de plusieurs maladies et pathologies incluant les troubles aussi graves que le cancer (p.ex. avec le paclitaxel [7], l'étoposide [8], la doxorubicine [9]), le SIDA (saquinavir [10]), des maladies provoquées par des bactéries et des champignons pathogènes (vancomycine [11], itraconazole [12], amphotéricine B [13] etc.), dans le cas de la suppression médicale du système immunitaire (cyclosporine [14], 6-mercaptopurine [15]) etc. De plus, ces facteurs rendent difficiles les études pharmacologiques de certains nouveaux composés prometteurs (resveratrol [16], ontazolast [17] etc.).

D'une manière générale, pour remédier au problème de solubilité dans les milieux aqueux de PA hydrophobes, il y a deux solutions possibles: (i) l'élaboration de nouvelles molécules actives, plus solubles, ou (ii) l'utilisation de systèmes de livraison (vecteurs) dans le cas de PA déjà approuvés et connus sur le marché.

La première solution amène généralement aux nouvelles entités chimiques (NCE, *New Chemical Entity*), ce qui nécessite de compléter le processus de développement, d'approbation et de la mise sur le marché. Ceci peut parfois prendre encore jusqu'à 10-15 ans supplémentaires de travail et 500-1000 millions de \$US de financement [18-20]. Généralement, l'approbation s'effectue par les organismes gouvernementaux de contrôle des

médicaments, par exemple, par l'Agence de la Santé Publique du Canada [21] ou par l'Agence Fédérale Américaine des Produits Alimentaires et Médicamenteux (*United States Food and Drug Administration*, US FDA) [22] aux États-Unis d'Amérique etc.

L'approche de vectorisation est donc potentiellement plus économique car l'élaboration d'un médicament à base d'une substance active déjà approuvée est généralement moins coûteuse et plus courte (approximativement 20-50 millions de \$US et 3-4 ans [20]). Dans ce cas, l'approbation de nouveaux médicaments est simplifiée et passe par l'*Investigational New Drug Application* (IND) basée sur les paramètres de biodistribution et pharmacocinétiques, touchant respectivement à l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion (ADME) [23].

En dehors de l'aspect économique, la vectorisation est intéressante également pour remédier aux autres facteurs menant à la diminution de l'efficacité de médicaments. Par exemple, dans la circulation systémique, la taille minimale de particules médicamenteuses est déterminée par la filtration rénale (particules moins de 5,5 nm sont éliminées très rapidement [24]), tandis que la taille maximale est limitée par la phagocytose importante des micro-particules dans la gamme de 1-6 μm et les propriétés emboliques des objets encore plus grands [6]. Un manque de sélectivité par rapport au site pathologique peut également présenter une difficulté d'atteindre un optimum thérapeutique, surtout quand il s'agit de PA hautement toxiques, p.ex. agents antinéoplasiques [25]. La sensibilité à la métabolisation est aussi un facteur à prendre très au sérieux car des métabolites perdent souvent l'efficacité comparativement aux molécules actives initiales [26, 27]. Les conséquences découlant des facteurs négatifs ci-mentionnés sont une augmentation des doses à administrer et de leur fréquence, ce qui provoque souvent les effets toxiques et indésirables [6]. Ainsi, afin de neutraliser ces effets néfastes, un vecteur idéal devrait normalement posséder une taille et les propriétés de surface appropriées, être capable d'encapsuler efficacement les molécules de PA hydrophobe, en les isolant de l'environnement biologique et, finalement, de les libérer dans un site pathologique en question. En outre, le vecteur doit être non toxique à court et long terme. Cela met en évidence la nécessité de s'assurer de la sécurité du vecteur non seulement au niveau de l'intégrité de sa structure, mais également au niveau des produits de sa possible biotransformation.

De nos jours, beaucoup d'espoirs ont été mis dans les systèmes de livraison de PA à l'échelle nanométrique (nanovecteurs). De nombreux types de systèmes ont été proposés pour la nanovectorisation : liposomes, micelles, nanocapsules polymériques et lipidiques solides, nanogels, dendrimères, ainsi que les nanotubes de carbone etc. [6, 28-32]). Parmi ceux-ci, les vecteurs les plus étudiés sont les liposomes et les nanocapsules polymériques [31, 33, 34]. Chacun de ces nanosystèmes a ses avantages et ses inconvénients. Par exemple, dans le cas de liposomes, plusieurs formulations sont déjà approuvées par US FDA et même produites à l'échelle industrielle [35-39], en raison de l'amélioration revendiquée par rapport à l'utilisation de PA non formulés. Néanmoins, les problèmes de stabilité dans les milieux biologiques [40], ainsi que de la préparation, nécessitant d'utiliser l'appareillage très sophistiqué et coûteux (pour assurer la reproductibilité au niveau de la taille et la composition) [36], restent toujours actuels. Les nanovecteurs à base de polymères sont généralement plus stables que les liposomes, cependant, la distribution de taille des nanoparticules résultantes constitue un obstacle très important à contourner [41-43]. Présentement, plusieurs systèmes de livraison polymériques biodégradables se retrouvent sur le marché [20]. L'absence de nanoformulations polymériques anticancéreuses, recevant l'approbation de la part de US FDA, est cependant surprenant, en raison de la vaste gamme d'architectures de polymères proposés à cette fin, ainsi que de la recherche en plein essor dans le domaine [44].

D'autres préoccupations qui entravent significativement le développement de différents systèmes de nanovectorisation sont des taux de livraison ciblée insuffisants et le contrôle faible de la libération du PA [45]. Encore de nos jours, il n'existe pas de vecteur idéal avec les propriétés du concept hypothétique de « *magic bullets* » de Paul Ehrlich, permettant de livrer la majorité, sinon la totalité, d'une charge thérapeutique sans avoir d'effets significatifs sur des tissus non ciblés. En outre, plusieurs scientifiques éminents nous avertissent clairement qu'aujourd'hui, la réalité de la nanovectorisation est « loin de ce scénario idéal ... Sans des changements dramatiques dans nos approches actuelles, la recherche en livraison ciblée de médicaments est susceptible de faire peu, le cas échéant, d'avancées significatives dans l'avenir » [45].

Dans ce contexte, les vecteurs présentant des systèmes unimoléculaires (p.ex., polymères en étoile [46], hydrogels [47-49] et dendrimères [50-52]) semblent être plus

prometteurs. Ces structures peuvent combiner efficacement une stabilité élevée dans les milieux biologiques et, en même temps, une capacité d'encapsuler les molécules de PA. Parmi ces systèmes, les dendrimères, macromolécules symétriques et hautement branchées, méritent à juste titre plus d'attention. En particulier, grâce à l'architecture bien définie, ils permettent d'atteindre un très haut niveau de reproductibilité de résultats, tout en évitant le problème de polydispersité. Il est cependant à noter que la conception de nouveaux nanovecteurs dendritiques est toujours d'actualité, en particulier, pour les raisons que nous allons développer dans les parties suivantes du manuscrit.

1.2. Dendrimères et leur utilisation comme agents d'encapsulation de molécules actives

1.2.1. Nanotechnologies et dendrimères : Information générale

1.2.1.1 Nanotechnologies

Depuis le fameux discours « *Plenty of Room at the Bottom* » (« Il y a beaucoup d'espace en bas ») de Richard P. Feynman à *California Institute of Technology*, en décembre 1959 [53], introduisant pour la première fois le concept de nanotechnologie, ce domaine n'a jamais cessé de progresser. En effet, de nouvelles technologies manipulant de structures à l'échelle nanométrique (normalement, de 1 à 100 nm, selon le site web de *National Nanotechnology Initiative*, <http://nano.gov/nanotech-101/what/definition>) et ainsi permettant de construire des matériaux avec précision au niveau moléculaire, amènent souvent à une série de phénomènes (dominés par les effets quantiques) et des propriétés uniques, non rencontrés chez les objets de plus grande taille. Une vraie « explosion » des nanotechnologies est à prévoir dans des secteurs d'activités très diversifiés allant du domaine biomédical à l'électronique, en passant par la métallurgie, l'agriculture, le textile, les revêtements, les cosmétiques, l'énergie, les catalyseurs, etc. (**Figure 1, page 7**). Par exemple, le premier article sur la livraison intracellulaire de composés chimiques avec les nanovecteurs date de 1977 [54].

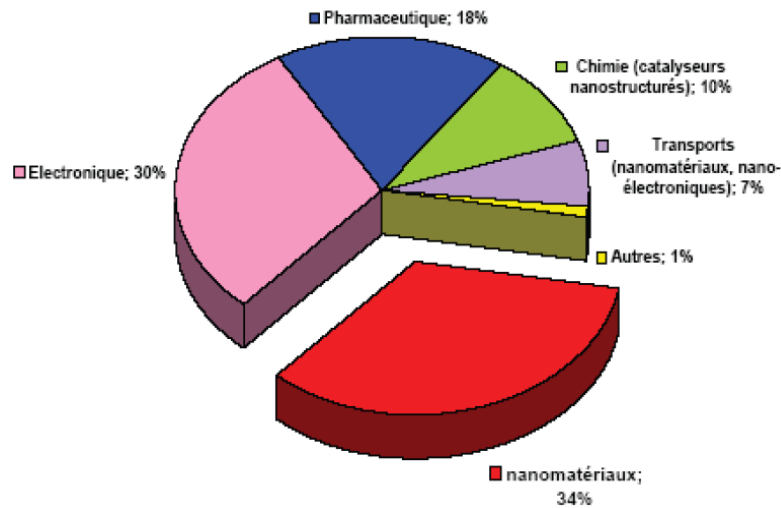


Figure 1. Répartition en% de l'impact économique global des nanotechnologies en 2010 [55].

Les nanotechnologies couvrent un large domaine multidisciplinaire où les activités de recherche et d'implantation industrielle se sont développées extrêmement rapidement au niveau mondial au cours de la dernière décennie. La recherche visant la production, la mise sur le marché et l'utilisation de nouveaux nanomatériaux est excessivement importante et représente des objectifs stratégiques de développement économique durable, notamment en Asie, en Europe, aux États-Unis, au Canada et au Québec (pour plus de détails <http://nanotechproject.org>). L'ère des nanosystèmes et des nanotechnologies nous promet des développements et des percées scientifiques majeures qui affecteront de façon permanente le quotidien de chacun dans un avenir proche. Plusieurs de ces nanoproducts sont déjà utilisés. Par exemple, dans son rapport annuel 2006-2007, NanoQuébec (www.nanoquebec.ca) rapporte des ventes annuelles de produits nanos par les entreprises québécoises de moins de 2 M\$ en 2005, d'environ 8 M\$ en 2006. La base de données NanoWerk (www.nanowerk.com) présentait en mars 2009 2225 nanoproducts disponibles en provenance de 142 fournisseurs. De nouveaux produits contenant des nanoparticules sont mis en marché chaque semaine, et de nombreux organismes estiment un marché mondial annuel de l'ordre de 1 000 milliards de dollars américains dès 2015 [55, 56].

1.2.1.2 Dendrimères

Dans le contexte des nanotechnologies, les dendrimères présentent un très grand potentiel pour l'avenir des nanosciences. En particulier, ils sont considérés de nos jours comme la réponse possible à de nombreux problèmes allant de la découverte de nouveaux catalyseurs ou médicaments, à la décontamination de l'eau ou encore à l'obtention de matériaux de moyens électroniques et de communication plus performants. De par leur architecture unique et hautement ramifiée, réalisée par la synthèse étape par étape, ils garantissent des nano-objets à la structure parfaitement définie et monodisperse. De plus, étant donné le grand nombre de groupes fonctionnels à leur surface, tout cela conduit finalement à l'apparition de propriétés exceptionnelles pouvant potentiellement trouver des applications dans de nombreux domaines [50, 57-60].

D'une manière générale, les dendrimères sont des macromolécules globulaires avec une structure régulière et hyper-ramifiée (**Figure 2, page 8**). Ils sont constitués de monomères associés selon un processus arborescent autour d'un cœur central plurifonctionnel. Le mot « dendrimère » provenant de la langue grecque est une combinaison de deux mots « *dendron* » (δενδρον qui signifie « arbre ») et *meros* (μέρος - « partie de »). Il a été introduit par Donald Tomalia dans son premier article sur les dendrimères poly(amidoamine) (ou PAMAM) publié en 1985 [61].

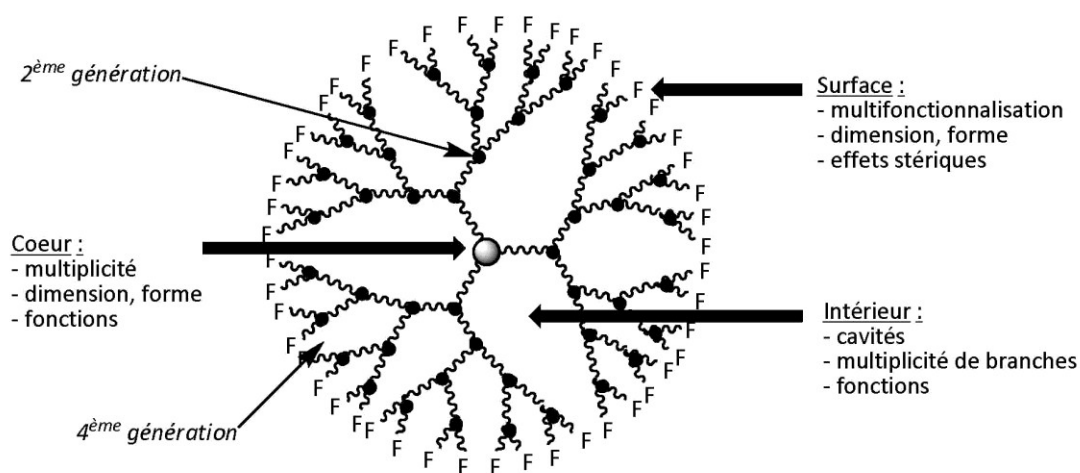


Figure 2. Représentation schématique d'un dendrimère de quatrième génération [62].

La structure dendritique est décrite par un vocabulaire très précis. Tout commence avec l'élément central du dendrimère, son cœur, qui définit l'architecture dendritique initiale et, en même temps, sert de site d'ancrage des branches (dendrons). Ainsi, le cœur dendritique confère au dendrimère une certaine géométrie, en fonction de sa structure moléculaire et le nombre des groupements fonctionnels à sa périphérie. De plus, dans certains cas, il peut être également un porteur d'une fonction spécifique qui va le rendre fluorescent [63], photo-isomérisable [58] ou le transformer en site catalytique [64]. Sur ce cœur vont donc venir s'accrocher des dendrons constitués de monomères, incluant les groupements intermédiaires (espaceurs) et les points de divergence, permettant ainsi d'augmenter le nombre de fonctions chimiques à la périphérie dendritique, dépendamment de la génération G (**Figure 3, page 9**). Finalement, ce sont les dendrons qui vont déterminer les propriétés principales du squelette dendritiques. Il est également à noter que dépendamment de leurs architectures, l'intérieur du dendrimère peut aussi renfermer des cavités qui pourront éventuellement accueillir des molécules de taille convenable, en présentant ainsi une «boîte moléculaire».

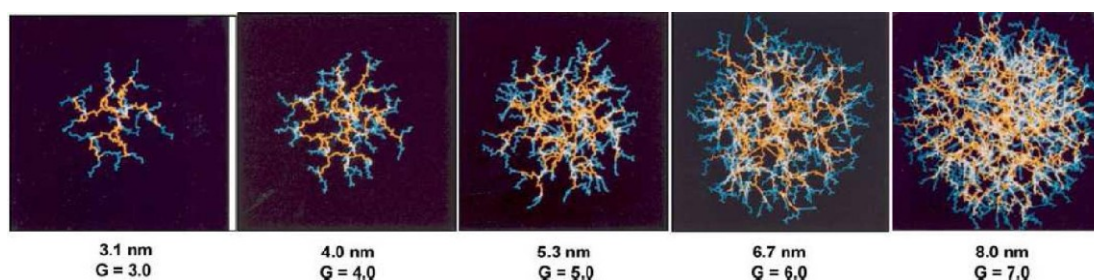


Figure 3. Taille et augmentation en progression géométrique du nombre de fonctions chimiques à la surface de dendrimères PAMAM, en fonction de la génération (G) [65].

Les premiers dendrimères ont été décrits en 1978 par le groupe de Fritz Vögtle lorsqu'il a rapporté la «synthèse en cascade» de polyamines de bas poids moléculaire [66]. Quelques années plus tard, Robert Denkwalter et col. ont déposé plusieurs brevets concernant la synthèse de dendrimères de L-lysine [67-69]. Cependant, ce n'est qu'en 1985, les structures dendritiques ont vraiment attiré l'attention du publique scientifique, grâce aux travaux de Donald Tomalia, concernant les dendrimères PAMAM [61], et de George Newkome, sur les «arborols» [70].

Dans la littérature scientifique, les macromolécules dendritiques sont également présentées sous les noms « molécules en cascade », « *cauliflowers* », « *starburst polymers* » [71], « *star shaped nanomolecules* » et même « astérisques moléculaires » [72, 73].

Présentement, des milliers de structures dendritiques différentes (plus de 50 familles [74]) sont décrites. Plusieurs dizaines de ces structures sont commercialisées et trouvent leurs applications dans différents domaines [57, 75]. Le nombre des articles sur les dendrimères ne cesse de progresser (**Figure 4, page 10**), ce qui confirme l'intérêt grandissant porté aux macromolécules de ce type.

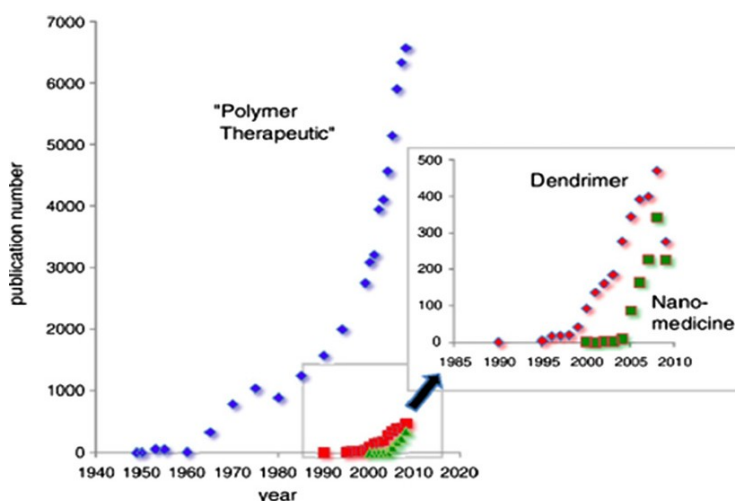


Figure 4. Nombre de publications sur les polymères et dendrimères thérapeutiques en 1940-2009 [76].

À ce jour, près de 1300 nouveaux articles scientifiques et 1200 brevets concernant différents aspects de la chimie et les applications de composés dendritiques ont été publiés [77]. Le plus grand nombre d'articles est présenté par les équipes de recherche de J. Fréchet et D. Tomalia (**Figure 5, page 11**).

Il est intéressant à noter qu'une de ces deux équipes (celle de D. Tomalia) a également élaboré un des deux types de dendrimères les plus connus et couramment utilisés, les PAMAM et les dendrimères poly(propylène imine) (ou PPI), qui sont présentement produits à l'échelle industrielle (**Figure 6, page 12**).

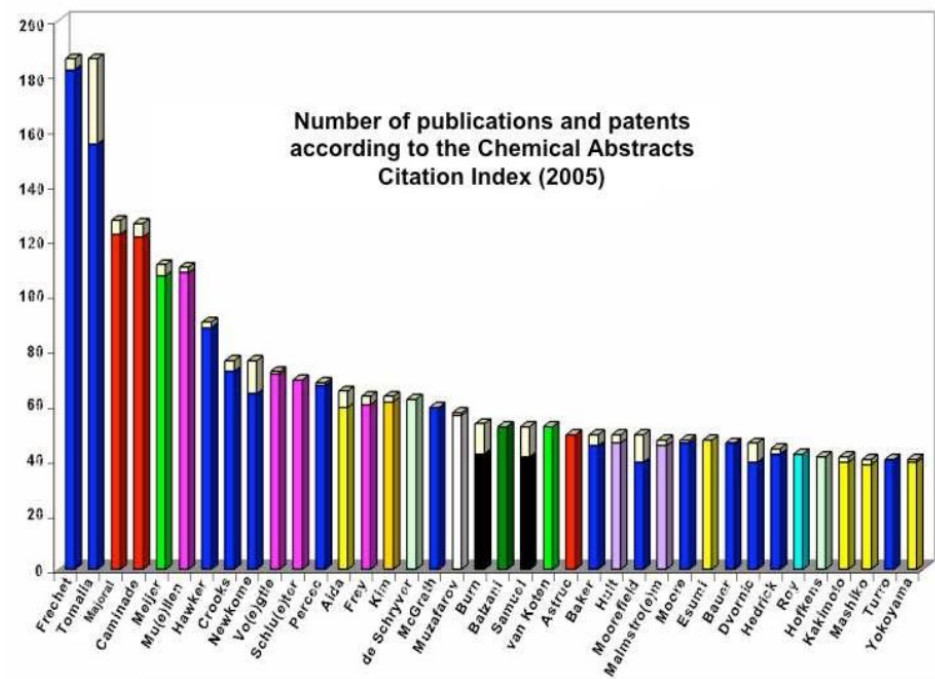


Figure 5. Nombre de brevets (barres blanches) et articles publiés (barres en couleurs) par différentes équipes de recherche, selon Chemical Abstracts Citation Index (données de 2005) [78].

L'estimation de futures applications de différents produits à base des dendrimères (pour la période de 2005 à 2015) a été effectuée par une compagnie de conseil Willems & van den Wildenberg (W&W) España s.l. Co. (www.wywes.com), dans le cadre du programme NanoRoadMap de la Commission Européenne. De nombreux experts, incluant J. Fréchet, G. Newkome, D. Tomalia etc., ont évalué les perspectives et les risques économiques potentiels, liés aux investissements dans les secteurs innovants, ainsi que R&D et les stratégies de création d'entreprises dans ce domaine. Selon le rapport, présentement, il y a certainement de nombreuses applications possibles pour les dendrimères. En dépit de cela, seulement près d'un tiers d'entre eux, peuvent finalement atteindre le marché car d'autres matériaux (p.ex. les polymères conjugués dans la production de diodes électroluminescentes organiques, OLED) présentent également des produits très compétitifs.

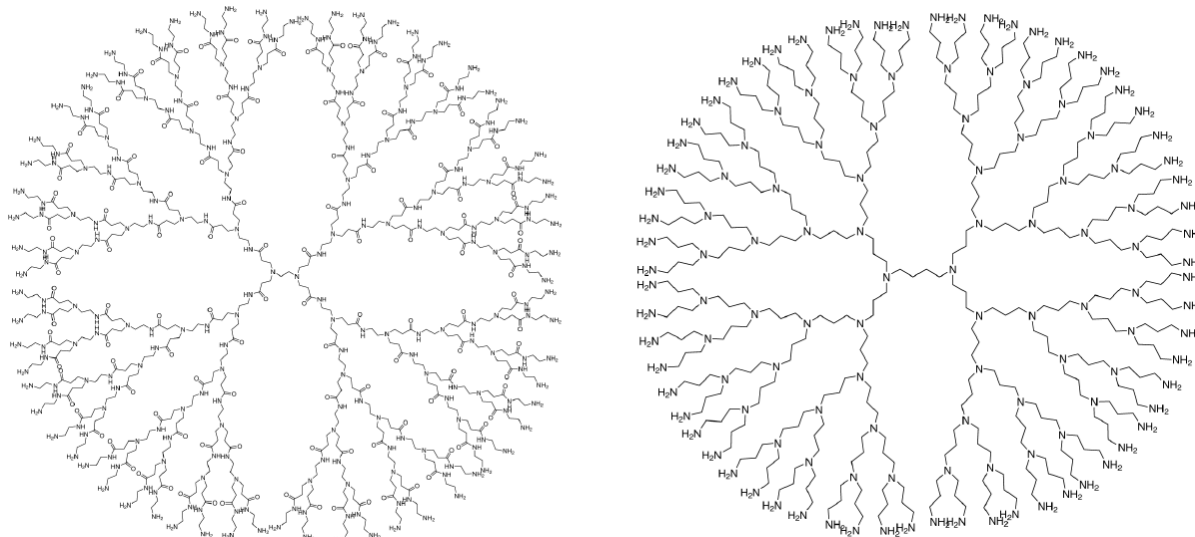


Figure 6. Structures de deux dendrimères les plus couramment utilisées, poly(amido amino) ou PAMAM G5 élaboré par l'équipe de D. Tomalia (à gauche) et poly(propylène imine), ou PPI, G 5 (à droite) issu indépendamment de laboratoires de E. W. Meijer et R. Mulhaupt [50].

On peut s'attendre qu'en 2015, plusieurs produits dendritiques (p.ex., matières colorantes et adhésives) puissent accéder au marché. Cependant, les applications des dendrimères en médecine et en électronique peuvent prendre encore plus du temps à se développer (**Figure 7a, page 13**). Dans le cas de produits médicaux, cela pourrait être dû à la nécessité d'effectuer de longs essais cliniques et le processus d'approbation par des organismes concernés. L'évaluation des risques liés aux perspectives d'utilisation des dendrimères à l'échelle industrielle pour la période 2005-2015 montre que les domaines les plus prometteurs sont ceux des matières colorantes et adhésives, ainsi que des agents de contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM). Les utilisations commerciales possibles de dendrimères comme anticorps artificiels, composés médicaux multifonctionnels, ainsi que composants de dispositifs nanoélectroniques ont été considérées les domaines les plus à risques. Les applications des dendrimères dans la livraison ciblée de PA ont été classées respectivement comme étant à risque moyen. (**Figure 7b, page 13**) [78].

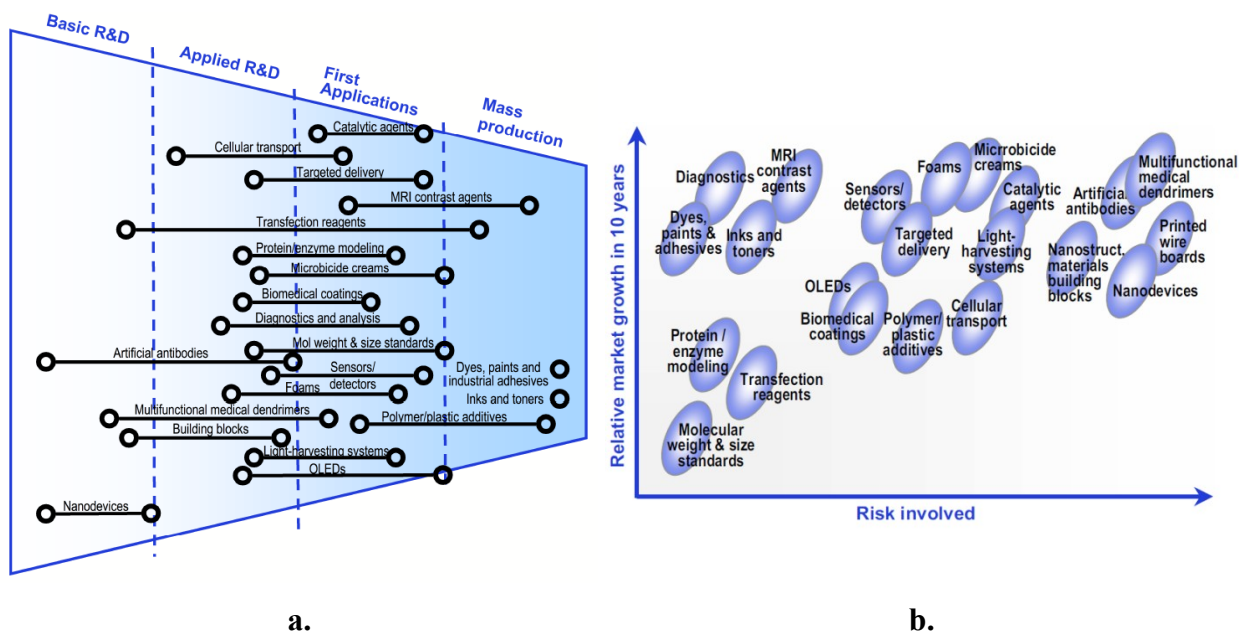


Figure 7. État attendu du développement de différentes applications des dendrimères en 2015 (a), et les risques liées à ces applications au bout de la période de 2005 à 2015 (b), selon le rapport de W&W [78].

Étant donné que les objectifs du présent projet de recherche sont la synthèse chimique et l'étude de propriétés de nouveaux dendrimères conçus pour la livraison ciblée de molécules de PA hydrophobes, les sections suivantes seront une occasion de présenter l'état actuel de ces domaines.

1.2.2. Principales méthodes de synthèse des dendrimères

L'assemblage chimique des dendrimères est généralement basé sur l'utilisation de deux approches principales, la voie divergente et la voie convergente (**Figure 8, page 14**). La voie divergente est normalement considérée comme approche classique car, historiquement, les premiers travaux concernant la synthèse des dendrimères empruntaient cette stratégie [61, 64, 66, 67, 79]. D'après cette méthode, la croissance a lieu de l'intérieur vers l'extérieur. C'est-à-dire que le dendrimère est préparé à partir d'un cœur plurifonctionnel par la répétition d'une séquence de réactions d'activation et de couplage avec les groupements réactifs complémentaires de monomères. Ainsi, à la fin de chaque cycle réactionnel, l'approche

divergente permet d'obtenir un dendrimère d'une nouvelle (plus grande) génération (G1, G2, G3 etc.).

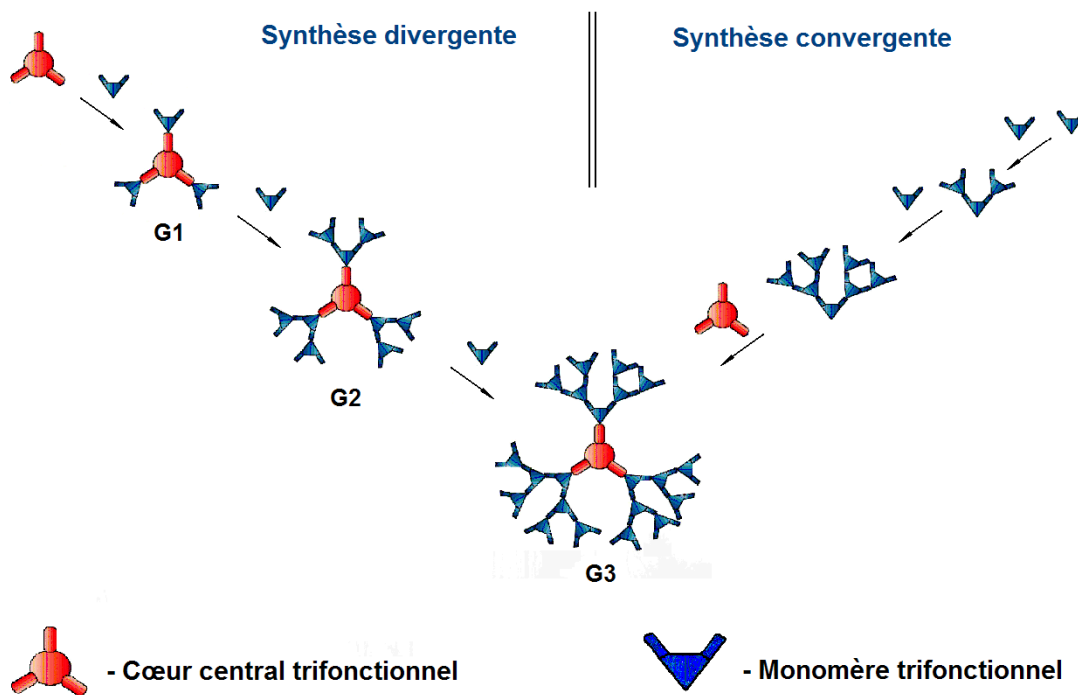


Figure 8. Représentation schématique de deux principales voies d'assemblage des dendrimères, divergente et convergente.

Avec la montée en génération, l'encombrement stérique entre les groupements à la périphérie du dendrimère augmente considérablement. Selon la théorie de « *dense packing state* » de P. De Gennes et H. Hervet, publiée en 1983 [80], il existe donc toujours une limite théorique à la croissance des dendrimères due à la congestion de sa surface. Par exemple, dans le cas de dendrimères PAMAM, la génération limite calculée était de 9-10 tandis qu'en pratique, les difficultés à synthétiser les produits purs ont été observées déjà à partir de 7-8èmes générations. Par conséquent, avec la hausse de la génération, la probabilité de la fonctionnalisation incomplète croît. De plus, si le monomère branché en excès n'a pas été complètement éliminé, de petites impuretés dendritiques peuvent également apparaître. Néanmoins, malgré les inconvénients ci-mentionnés, la méthode divergente demeure toujours une méthode de choix pour les synthèses d'un point de vue préparatif ainsi qu'à l'échelle industrielle [75].

Dans le cas de la voie de synthèse convergente, l'assemblage des dendrimères s'effectue par le greffage direct au cœur central plurifonctionnel des dendrons présynthétisés d'une génération appropriée (**Figure 8, page 14**). La méthode a été introduite initialement en 1990 par C. Hawker et J.M.J. Fréchet [81, 82]. Cette stratégie permet généralement d'obtenir les produits de plus grande pureté comparativement à l'approche classique divergente, ce qui a été illustré d'une manière bien éloquent par S. Grayson et J.M.J. Fréchet [64] avec les résultats de spectrométrie de masse (**Figure 9, page 15**).

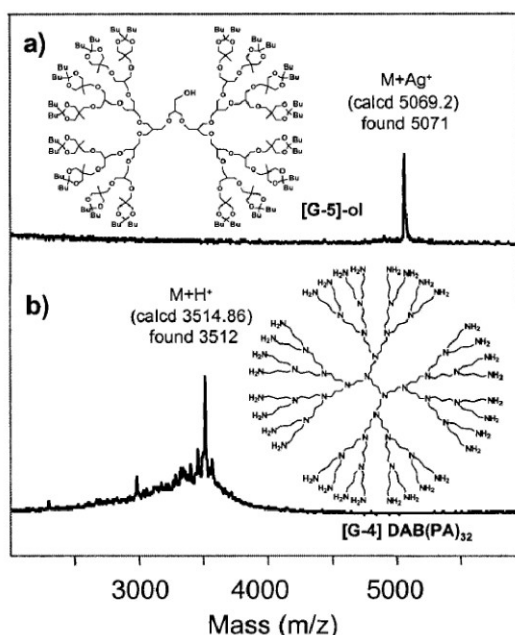


Figure 9. Spectres de masse de dendrimères préparés par les voies convergente (a) et divergente (b) [64].

De plus, la méthode convergente est considérée comme plus versatile car elle pourrait également être utile pour assembler les dendrimères d'une manière que la structure de dendrons change soit symétriquement « en couche » (uniquement possible dans le cas de la voie divergente), soit « en segment », par le greffage au cœur central des dendrons différents (**Figure 10, page 16**) [74]. Cela permet donc de mieux adapter l'architecture dendritique aux besoins pratiques.

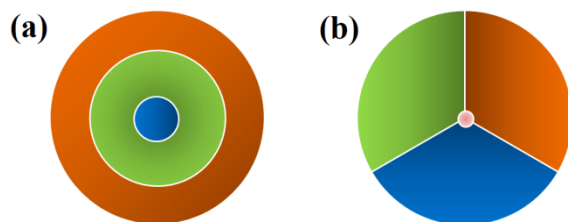


Figure 10. Représentation schématique de deux voies possibles pour changer la structure de dendrons durant l'assemblage des dendrimères « en couche » (a) et « en segment » (b).

Adapté de [74].

Cependant, il ne s'agit pas d'une stratégie idéale car la synthèse est généralement limitée à l'obtention des dendrimères de 2-3èmes générations. La gêne stérique (cas des dendrons volumineux) empêche significativement le couplage efficace avec le point focal du cœur dendritique, ce qui amène une diminution des rendements réactionnels [50, 64, 75]. Par conséquent, la méthode convergente est rarement utilisée dans l'industrie, en particulier, son application est présentement limitée à la production d'une famille de dendrons polyéther commercialisée par Tokyo Kasei Co. Ltd. (Japon) [64].

Une combinaison des deux approches divergente et convergente est également possible. En 1998, H. Ihre et col. ont proposé la synthèse d'un dendron de 4ème génération, en utilisant ces deux stratégies: divergente, pour obtenir un dendron de 2G, et, finalement, convergente, à partir de ce produit de G2, pour synthétiser le dendron de G4 [83]. Plus tard, en 2006, R. Singh Dhanikula et P. Hildgen ont rapporté une méthode d'assemblage de dendrimères entiers, d'abord, par voie divergente (en particulier, pour synthétiser un cœur dendritique polyfonctionnel), ensuite, par la voie convergente (pour greffer les dendrons présynthétisés de première génération), et, finalement, en revenant encore à la voie divergente, en greffant les dendrons de première génération, pour obtenir respectivement les structures de 2ème et 3ème générations [84]. Ainsi, ces assemblages en blocs présynthétisés ont permis de réduire considérablement le nombre des étapes de synthèse, comparativement à l'utilisation d'approches déjà bien connues. Cette stratégie pourrait être efficace dans l'obtention des structures dendritiques « en couche », composées des blocs de différente nature.

Il faut mentionner que présentement, il y a aussi beaucoup de publications concernant les architectures chimiques branchées qui ne présentent cependant pas des structures régulières

et symétriques. Par conséquent, elles ne peuvent pas être considérées comme dendrimères et sont exclues de ce manuscrit.

1.2.3. Principaux types du nanotransport des molécules actives avec les dendrimères

1.2.3.1 Greffage et encapsulation des principes actifs en chimiothérapie antinéoplasique : pro et contra

L'intérêt que la chimie pharmaceutique porte aux dendrimères, est expliqué, premièrement, par leur capacité d'accueillir des molécules de taille convenable dans les cavités internes et, deuxièmement, par la possibilité d'utiliser le potentiel des groupements périphériques, permettant le greffage de différentes molécules d'une manière covalente [85-92].

Dans ce contexte, la chimiothérapie anticancéreuse (ou antinéoplasique) est un exemple très intéressant à illustrer. Bien qu'il y ait beaucoup d'autres secteurs dans la médecine qui pourraient bénéficier de l'amélioration des paramètres pharmacologiques de médicaments, la chimiothérapie antinéoplasique attire traditionnellement beaucoup plus d'attention chez les chercheurs. Ceci est expliqué, premièrement, par la gravité de la maladie, caractérisée souvent par des traitements coûteux et, dans certains cas, des taux de survie toujours faibles, et, deuxièmement, par le nombre grandissant des patients atteints de cancer (la hausse est estimée à près de 9% annuellement [93]). Une fiche d'information récente de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) rapporte que le cancer est une cause majeure de décès dans le monde. En 2007, le nombre de décès a atteint 7,9 millions (environ 13% de tous les décès), ce qui est très alarmant. La mortalité due au cancer, estimée pour 2030, sera de 12 millions [94]. Par conséquent, la chimiothérapie antinéoplasique présente un des segments les plus dynamiques du marché pharmaceutique, et les organismes gouvernementaux, ainsi que les compagnies privées, sont intéressés à investir dans la recherche et le développement de ce type de traitements [95].

D'une manière générale, le cancer est un nom générique qui recouvre plusieurs maladies de nature similaire qui sont associées aux mutations de gènes impliqués dans le

contrôle de la croissance cellulaire, division, réparation de l'ADN et de l'apoptose cellulaire [96]. Des dizaines de milliers d'études réalisées sur la chimiothérapie anticancéreuse [38], incluant celles sur l'utilisation des dendrimères [97], ont permis d'élucider et de mieux comprendre l'influence de nombreux facteurs qui sont associés aux spécificités de l'organisme affecté, ainsi qu'aux propriétés du médicament. Dû à la diversité de types du cancer et la quantité énorme de données de recherche accumulées, les résultats de ces études peuvent être extrêmement utiles non seulement pour la thérapie antinéoplasique, mais également pour d'autres traitements médicamenteux liés au ciblage précis de sites pathologiques.

L'approche chimiothérapeutique dans l'oncologie consiste majoritairement à administrer par voie intraveineuse un médicament à base des petites (c'est-à-dire, avec $M_m < 1000$ Da [28]) molécules cytotoxiques. Ces molécules actives possèdent une faible sélectivité et s'attaquent à toutes les cellules en division rapide de l'organisme, cancéreuses et saines, en réduisant ainsi les effets bénéfiques. D'autres facteurs qui peuvent contribuer à la diminution de l'efficacité des agents antinéoplasiques sont une mauvaise solubilité dans l'eau, la liaison aux protéines plasmatiques, les interactions avec le système réticuloendothélial (SRE) menant à la réponse immunitaire, ainsi que la clairance rénale et hépatique, et une mauvaise internalisation cellulaire [97-101]. L'utilisation des excipients (cosolvants, surfactants etc.) qui sont mal adaptés ou toxiques (p.ex. cyclodextrines [102], huile de ricin modifiée [103] etc.) peut également causer des effets indésirables.

Pour éviter les problèmes ci-mentionnés, une vectorisation avec les dendrimères semble être une solution assez prometteuse. Ces nanotransporteurs unimoléculaires sont beaucoup plus stables que les vecteurs obtenus par l'autoassemblage physico-chimique de plusieurs molécules tels que les liposomes, nanosomes et micelles. De plus, ils présentent des structures bien contrôlables, permettant une meilleure reproductibilité au niveau de la taille, de l'architecture interne et les propriétés de surface [97, 104]. La présence d'éléments structuraux convenables pourrait également augmenter la stabilité de systèmes «dendrimère-principe actif» dans la circulation systémique, assurer un meilleur ciblage et une libération de PA dans le site pathologique visé. Finalement, l'absence des effets toxiques et la biodégradabilité suffisante de ces macromolécules, ainsi que l'élimination facile de produits de la biodégradation (voir plus de détails plus bas et dans la section 1.2.5) pourraient garantir la sécurité biologique de ces systèmes.

Le choix initial de la structure d'un vecteur dendritique est déterminé grandement par la façon avec laquelle le PA est supposé être associé à son nanotransporteur. Dû aux particularités de la structure dendritique, les molécules de principes actifs antinéoplasiques peuvent être soit encapsulées dans les cavités internes au moyen d'interactions physico-chimiques, soit associées par la conjugaison covalente avec les groupements fonctionnels à la périphérie ou dans les couches proches de la surface (**Figure 11, page 19**). Les deux stratégies ont déjà montré certains avantages comparativement à l'administration de PA non formulés (« libres ») comme cela a été rapporté dans les cas de composées organiques hydrophobes, méthotrexate (MTX) [105-116], doxorubicine (DOX) [117-133], paclitaxel (PTX) [134-136] [111, 137-140], 5-fluorouracile (5-FU) [141-145], camptothécines [146-151], saporines (ou les protéines inactivant les ribosomes, PIR) [152], chlorambucil [153], 6-mercaptopurine (6-MP) [154], ainsi qu'une substance active non organique, cisplatine [155-157], et l'isotope de bore ^{10}B [158-160].

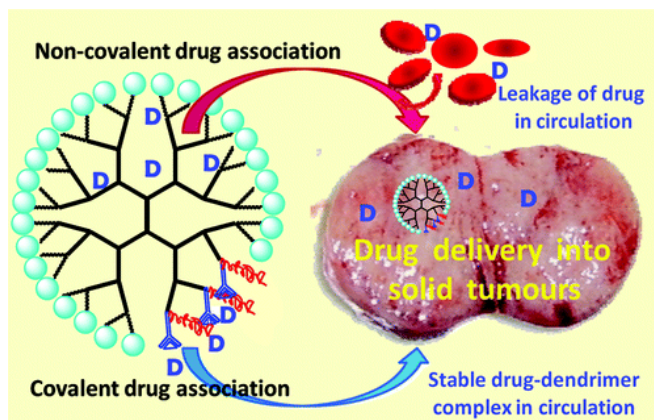


Figure 11. Deux principales stratégies d'utilisation de dendrimères en vectorisation des molécules actives (dans le cas présent, en thérapie antinéoplasique des tumeurs solides): encapsulation non chimique et conjugaison covalente [97].

La stratégie d'encapsulation proposée pour cibler les PA anticancéreux est généralement caractérisée par la simplicité de la procédure d'encapsulation des molécules actives, une solubilité accrue de complexes d'inclusion résultants [105-107, 117-119, 134, 135, 141-144, 153, 161, 162], une diminution du pic plasmatique du PA, lié à une cytotoxicité systémique [144], ainsi que par une distribution améliorée dans la tumeur [141]. Dans certains

cas, l'encapsulation amène également une augmentation de la biodisponibilité orale [117]. En outre, étant associée avec le dendrimère de façon non covalente, la molécule active demeure intacte. Elle ne se présente donc pas comme une nouvelle entité chimique, ce qui peut simplifier considérablement le développement pharmaceutique de nouvelles formulations, à moins que le dendrimère-même ne soit pas une NCE [97]. Néanmoins, un désavantage majeur de l'encapsulation de PA dans les dendrimères est une faible stabilité de complexes d'inclusion dans la circulation systémique, ce qui résulte en relargage trop rapide et incontrôlable de molécules actives («*burst release*»), et, par conséquent, en des taux de ciblage inappropriés [97, 108]. Les principaux mécanismes d'encapsulation et les possibilités d'augmenter le temps de rétention de la charge thérapeutique seront discutés en détails dans la section 1.2.4.

Comparativement à la stratégie d'encapsulation physico-chimique, le greffage covalent d'une entité médicamenteuse sur le dendrimère permet de réduire significativement les pertes spontanées du principe actif, tout en bénéficiant de l'augmentation de taux de solubilisation [97]. Cette approche permet l'utilisation des agents thérapeutiques volumineux, comme p.ex. les protéines inactivant les ribosomes (PIR) [152], ainsi que les combinaisons de PA antinéoplasiques avec les ligands spécifiques aux cellules tumorales [109, 163-167]. Le choix d'un segment de liaison (ou «*linker*») sensible au microenvironnement tumoral (hydrazone [123, 125-127, 133], carboxylate [155], cis-aconityle [122, 128, 129], dérivé thiolé du maléimide [132], bisulfures [138], peptides sensibles aux métalloprotéases matricielles (MMPs) 2 et 9 [113, 168, 169]) peut également rendre le relargage mieux ciblé. Il est cependant à signaler que cette stratégie de conjugaison covalente a également des limitations importantes. En particulier, le fait qu'il est très difficile de trouver un signal biologique spécifique (pH, température, composé chimique particulier etc.) caractérisant la tumeur et pouvant ainsi servir un déclencheur universel du relargage du PA, peut amener à une libération non ciblée ou trop lente pour être efficace *in vivo* [6, 28, 97, 170]. Pour augmenter le contrôle de la vectorisation au moyen d'un déclencheur externe, un *linker* sensible à l'UV a été récemment proposé [171]. Les résultats intéressants ont été également obtenus dans le cas de la génération de particules alpha dans les tumeurs, sous l'effet de neutrons sur les isotopes de bore ^{10}B attachés à la surface dendritique [158-160]. Parmi les inconvénients, il faut également noter que l'utilisation de certains *linkers* peut causer une libération des formes

moins actives que la molécule médicamenteuse libre, comme p.ex. dans le cas de MTX lié au dendrimère par un espaceur peptidique [113] ou les dérivés cycliques de DOX associé avec le carboxylate d'hydrazone [124]. Étant donné que le principe actif reste à la surface du dendrimère, il existe le risque de modification de sa structure dans l'organisme bien avant d'atteindre le site d'action [113]. Le facteur économique est aussi à ne pas négliger car la conjugaison covalente nécessite des étapes supplémentaires de transformation chimique et de purification, ce qui augmente le coût du produit final [97]. En outre, une fois modifiée chimiquement, la molécule active devient une NCU, ce qui nécessite un processus supplémentaire d'approbation tel que mentionné plutôt.

Ainsi, de très nombreux facteurs vont déterminer le choix final de la stratégie du nano-transport liée à l'utilisation des nanovecteurs dendritiques pour traiter les tumeurs solides. Malgré tous les désavantages ci-haut mentionnés, présentement, la stratégie de conjugaison covalente est habituellement considérée comme ayant plus d'avenir, dû, principalement, à la stabilité plus grande dans la circulation systémique par rapport à l'encapsulation [97, 108].

Il est cependant à noter qu'en dépit des centaines d'articles exposant les avantages potentiels de dendrimères en thérapie antinéoplasique, aucune formulation de ce type n'est encore présente dans le marché pharmaceutique. Parmi les obstacles majeurs, à la commercialisation de dendrimères en tant que nanovecteurs médicaux, on peut trouver la durée des essais cliniques et du processus d'approbation par FDA, ainsi que le coût très élevé de la production compte tenu de la synthèse chimique multiétape [78]. En particulier, la durée du stade incluant les essais cliniques et du processus d'approbation par FDA prend en moyenne 6-8 ans [38]. Le grand coût de la production industrielle de dendrimères peut finalement résulter en une non-compétitivité avec les nanosystèmes déjà approuvés et moins chers (liposomes [35, 38]) ou d'autres systèmes en plein développement (polymères [78], p.ex. Transdrug®, présentant la DOX encapsulée dans les nanoparticules polyalkylcyanoacrylates, est en phase 3 des essais cliniques [172]). Néanmoins, il y a aussi d'autres phénomènes plus fondamentaux qui pourraient expliquer la situation actuelle avec les dendrimères dans les traitements de tumeurs solides. Dans ce contexte, une attention particulière devrait être accordée au rôle de l'effet de perméabilité et rétention accrues (ou l'effet EPR, *Enhanced Permeability and Retention effect*) dans le ciblage de tissus tumoraux avec les nano-objets.

1.2.3.2 Chimiothérapie antinéoplasique et l'effet EPR

Présentement, la majorité des équipes de recherche indiquent qu'une sélectivité de dendrimères [46, 97, 108, 118, 154, 173-175] (d'ailleurs aussi comme des autres nanovecteurs [28, 30, 33, 45, 175-178]) par rapport aux néoplasies cancéreuses est déterminée grandement par l'effet de perméabilité et rétention accrues. En particulier, les vaisseaux sanguins tumoraux possèdent des lacunes importantes comparativement à la majorité des tissus sains. Cette particularité, ainsi que la fonction très affaiblie du drainage lymphatique, résulte en l'accumulation passive de nano-objets dans la tumeur avec le temps (**Figure 12, page 22**).

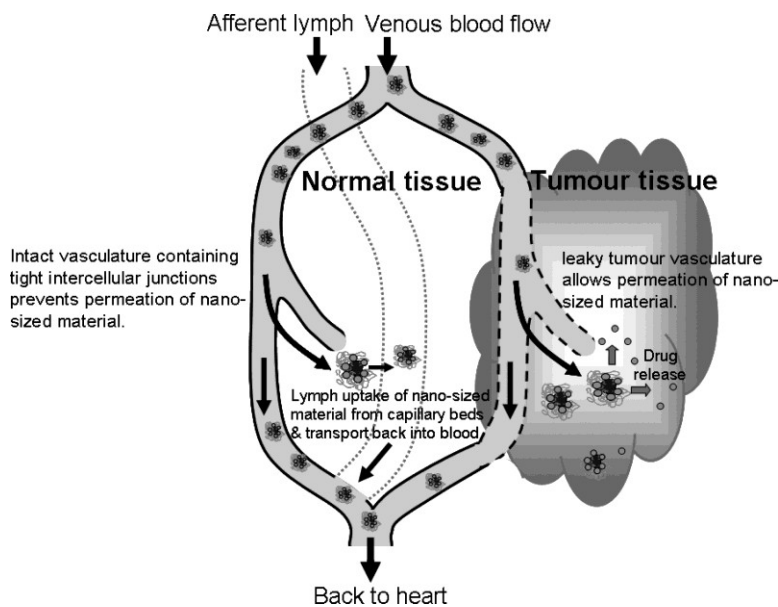


Figure 12. Schéma de l'alimentation sanguine et lymphatique de tissus normaux et tumeurs solides. Les vecteurs de taille nanométrique, chargés de molécules actives, peuvent pénétrer dans les tumeurs solides grâce à l'effet de perméabilité vasculaire accrue et une augmentation de rétention due à l'absence du drainage lymphatique. La vascularisation dans les tissus non cancéreux est généralement peu perméable pour des nanoparticules et des macromolécules, bien que des macromolécules telles que l'albumine puissent s'extravaser par les fenestrations capillaires ou par le mécanisme de transcytose actif. Une fois présent dans l'interstitium, ils sont livrés vers la circulation systémique par le système lymphatique [97].

Par conséquent, on pourrait raisonnablement s'attendre que l'augmentation de la stabilité des nanovecteurs chargés de PA dans la circulation systémique soit bénéfique au ciblage tumoral. En particulier, ces conditions préalables sont à la base d'allégations selon lesquelles la conjugaison covalente des molécules actives avec les dendrimères serait plus efficace dans les traitements de tumeurs solides [97, 108] (voir aussi la section précédente).

Malgré tout cela, depuis la première publication du groupe de Prof. Hiroshi Maeda en 1985 [179, 180], les recherches liées au rôle exceptionnel de l'effet EPR en nano-vectorisation cancéreuse, ne montrent que des résultats très modestes pendant les essais cliniques chez l'humain. Dans la majorité des cas, l'amélioration de l'efficacité du ciblage par rapport au PA libre ne constituait que quelques pourcents de la dose injectée. Ainsi, plus de 90% (très souvent >95%) du médicament administré sous forme de nanovecteurs « bénéficiant de l'effet EPR » se retrouvent toujours dans des parties non ciblées de l'organisme, en causant des effets toxiques importants [6, 45, 175]. Par conséquent, bien que depuis plus que 25 ans, le nombre d'article concernant la nano-vectorisation ne cesse de progresser, la mise sur le marché de nano-systèmes, incluant les dendrimères, soit toujours très problématique. Les grandes compagnies pharmaceutiques trouvent que le passage aux nanoformulations n'est pas encore économiquement justifié, étant donné la très faible augmentation en efficacité thérapeutique attendue [38].

Une des raisons expliquant cette situation avec les nanovecteurs ciblant les tumeurs solides est une interprétation inadéquate du rôle de l'effet EPR sur laquelle se base la plupart des travaux de recherche dans ce domaine (incluant ceux sur les dendrimères). En effet, bien que bel et bien présent chez les tissus tumoraux, le phénomène EPR nécessite de respecter également d'autres paramètres biologiques afin d'en obtenir les meilleurs résultats possibles. En particulier, pour les nano-objets qui pourront éviter des interactions rapides avec les constituants de la circulation systémique (l'opsonisation par les protéines plasmatiques et la séquestration par les macrophages, l'adsorption par l'endothélium des vaisseaux sanguins etc. [6, 181]), leur bio-distribution sera déterminée grandement par leurs diamètres hydrodynamiques. Par exemple, les pores des glomérules rénaux de 6 nm favorisent l'élimination du sang de particules de moins 5,5 nm [24]. Les fenestrations dans l'endothélium des vaisseaux sanguins d'autres tissus sains, généralement, de 4,5 à 25 nm [182], allant jusqu'à 100-175 nm dans le cas des vaisseaux sanguins hépatiques [183], permettent ainsi

l'extravasation de particules encore plus grandes. Finalement, les lacunes dans l'endothélium des tumeurs solides peuvent atteindre 380-780 nm [184], résultant respectivement en l'extravasation d'objets de tailles similaires. Par conséquent, pour bénéficier efficacement de l'effet EPR (compte tenu du diamètre maximal de 500 nm, permettant la pénétration de particules à travers la membrane cellulaire), le vecteur devrait avoir le diamètre environ de 400 nm [45]. Une autre limitation à prendre très au sérieux est que dans les cas d'inflammations (p.ex. la polyarthrite rhumatoïde) et l'ischémie cardiaque et intestinale, les vaisseaux sanguins ont également des lacunes semblables à celles de tissus cancéreux, ce qui peut aussi se répercuter sur l'efficacité du ciblage [6]. Il est donc très important de s'assurer de l'absence de tels processus internes avant de procéder à un traitement antinéoplasique de ce type.

Dans ce contexte, il est intéressant à noter que la taille d'environ 400 nm, suggérée pour le ciblage basé sur l'effet de perméabilité et rétention accrues, ne correspond pas à la majorité des nanovecteurs proposés à cette fin. En outre, les particules de 400 nm ne pourraient même pas être classées comme nano-objets classiques qui ne doivent pas être supérieure à 100 nm. Pour les dendrimères (présentés souvent comme nanocapsules unimoléculaires), ces données peuvent signifier des conséquences encore plus dramatiques car aucune des structures dendritiques jamais synthétisée n'a atteint cette taille. Par exemple, le dendrimère PAMAM avec un cœur à base d'éthylène diamine de 10^{ème} génération (la génération limite à cause des effets stériques empêchant la transformation complète ultérieure de tous les groupements aminés sur la surface) a le diamètre de seulement 13 nm [50]. Ainsi, l'assemblage chimique de molécules dendritiques de plusieurs centaines nanomètres présenterait donc un énorme défi non seulement au niveau technique, mais aussi au niveau économique. Même en absence des gênes stériques, une synthèse de structures pareilles à partir de petites molécules nécessiterait plusieurs centaines d'étapes chimiques et de purification. Par conséquent, le cout d'une production à grande échelle, basée sur cette approche deviendrait trop élevé.

Pour contourner ce problème de taille insuffisante, une des solutions possibles serait d'élaborer des vecteurs dendritiques supramoléculaires. En particulier, certaines études indiquent que la taille de particules dendritiques observée expérimentalement était supérieure à celle attendue pour les systèmes présentant des macromolécules distinctes, p.ex. [75, 84,

143, 173, 185-187] ce qui suggère la formation spontanée de structures multimoléculaires. De plus, les données récentes montrent la possibilité d'obtenir des agrégats sphériques à deux couches (semblables aux liposomes), composés de molécules dendritiques (dendrimérosomes) de 2 à 50 μm [188]. Beaucoup plus prometteuses ici pourraient être les architectures ramifiées non symétriques, ayant les propriétés amphiphiles, comme montré dans le cas de copolymères branchés en bloc, pouvant former des micelles de 150-190 nm [189-191]. Ceci pourrait ainsi ouvrir d'autres perspectives pour élaborer de nouveaux vecteurs dendritiques de PA, bénéficiant de l'effet EPR. Cependant, dans ce cas, il faudrait réviser le concept de la « boîte moléculaire » dendritique et effectuer les études supplémentaires pour clarifier le comportement de structures ramifiées de différentes familles au niveau de la stabilité et du contrôle de la taille de leurs agrégats supramoléculaires.

Comme conclusion, il y a présentement un besoin pour élaborer des approches alternatives afin d'augmenter le taux de ciblage des tumeurs solides avec les vecteurs dendritiques. Néanmoins, sans changements importants, on ne peut pas espérer de grands développements dans un futur proche de l'utilisation de dendrimères en tant que nanotransporteurs unimoléculaires.

1.2.3.3 Perspectives liées à l'utilisation des nanovecteurs dendritiques médicamenteux

L'exemple de la section précédente, présentant les perspectives de l'utilisation des dendrimères dans les traitements des tumeurs solides, met en évidence l'importance de prendre en compte tous les facteurs impliqués dans l'efficacité de futurs nanovecteurs de PA (physicochimiques, biologiques, économiques). Ce n'est donc qu'avec cette approche globale du problème de vectorisation qu'on puisse espérer trouver de meilleures solutions, permettant de tirer le maximum d'avantages de chaque type des nano-transporteurs, dépendamment des objectifs pharmacologiques visés [20, 76, 172, 181, 192-194]. Dans ce contexte, les agents d'encapsulation à base de dendrimères pourraient être prometteurs dans les traitements médicaux où la taille n'excédant pas quelques dizaines nanomètres et la stabilité modérée du système « vecteur-PA » constituent plutôt des avantages. Par exemple, ils peuvent se retrouver utiles pour encapsuler les PA hydrophobes anti-inflammatoires et analgésiques (comme rapporté, p.ex., pour le piroxicam [195], l'indométacine [196-198], cortisol [71], ibuprofen [104], flurbiprofen [199], ketoprofen [200, 201], et diflunisal [201], aspirine [202]), ainsi que

dans le cas de certains immunosuppresseurs (acide mycophénolique [203]), inhibiteurs de la transcriptase inverse (lamivudine [204], utilisé dans les traitements antiviraux du VIH et de l'hépatite B), agents anti-thrombotiques (enoxaparin [205]), myotique et mydriatique (nitrate de pilocarpine et tropicamide [206]) et antipaludique (phosphate de chloroquine [207], utilisé contre *Plasmodium*, protozoaire parasite). Les dendrimères ont été également proposés pour encapsuler les PA antibactériens (sulfaméthoxazole [208, 209], gatifloxacin [210]), anti-ulcéreux (famotidine [198]), anti-hypertensifs (nifédipine [211]), sédatifs (phénobarbital [208]), antiseptiques à l'usage topique (acides benzoïque et salicylique [212]), ainsi que des vitamines (acide nicotinique [213], acide tout-*trans*-rétinoïque [162] et β -carotène [84]) et antifongiques (amphotéricine B [198], acides benzoïque et salicylique [212]; voir également la section 1.2.6) etc.

Comme déjà mentionné dans la section 1.1, l'encapsulation physicochimique de molécules actives est généralement plus économique que le greffage covalent. Afin de profiter efficacement de cette stratégie et, en même temps, de contourner les inconvénients liés au problème de relargage prématuré des PA encapsulés, plusieurs approches liées aux aspects structuraux sont présentement proposées (voir les détails dans la section suivante 1.2.4). De plus, la possibilité de former des structures supramoléculaires, composées de plusieurs dendrimères, pourrait également contribuer au ralentissement de la libération des molécules actives, ainsi que dans la diminution de la clairance rénale. À cet égard, une élaboration de nouveaux agents d'encapsulation dendritiques, plus performants et adaptés pour la livraison de PA hydrophobes, nécessite d'abord la compréhension des mécanismes d'interactions de dendrimères avec les molécules actives et certains constituants de systèmes biologiques. Ainsi, les sections suivantes seront une occasion de présenter ces mécanisme plus en détails.

1.2.4. Dendrimères comme nanocapsules des molécules actives

1.2.4.1 Encapsulation par les dendrimères. Information générale

La présence des cavités internes dans l'architecture hautement branchée, ainsi qu'une possibilité de bien contrôler la taille et les propriétés de surface, font des dendrimères un objet très attrayant en tant que «boîte moléculaire» pour encapsuler des petites molécules. Comme

déjà mentionné précédemment (section 1.1), les avantages qu'on pourrait avoir avec l'encapsulation de PA hydrophobes dans les dendrimères, sont généralement des améliorations au niveau de la solubilisation et la biodistribution, ce qui finalement amène à sa meilleure biodisponibilité.

Historiquement, le concept théorique de captation des petites molécules par des macromolécules branchées a été suggéré pour la première fois en 1982 par M. Maciejewski [214]. La première publication concernant l'encapsulation des molécules actives par des structures dendritiques remonte à 1989, quand A. Naylor et col. du groupe de D. Tomalia ont étudié l'encapsulation de l'aspirine par les dendrimères PAMAM [202]. Au moment de la rédaction du présent manuscrit, l'encapsulation de plusieurs dizaines de PA par des dendrimères a été décrite.

D'une manière générale, le principe d'encapsulation est basé sur les interactions non covalentes (sans formation des nouvelles liaisons covalentes) entre la structure moléculaire du dendrimère et celle de l'agent thérapeutique, telles que des interactions électrostatiques, hydrophobiques, π - π , ponts hydrogènes, ainsi que les effets de l'immobilisation stérique [71, 192, 215]. Dans ce cas, il n'y a donc pas des changements au niveau de la structure chimique de la molécule active, et le dendrimère ne devrait normalement exercer que la fonction d'un excipient, permettant uniquement d'améliorer certaines caractéristiques du médicament, sans présenter aucune action pharmacologique propre.

Dépendamment de l'architecture du squelette dendritique et de la structure de la molécule active, différents mécanismes physicochimiques sont responsables de l'efficacité d'encapsulation.

1.2.4.2 Mécanismes d'encapsulation par les dendrimères PAMAM, PPI et leurs dérivés

Les structures dendritiques les plus étudiées comme agents de nanoencapsulation de PA sont majoritairement représentées par PAMAM, PPI (**Figure 6, page 12**) et leurs dérivés. Ceci est dû principalement à la disponibilité commerciale de longue date de ces composés. En outre, les groupements périphériques de ces dendrimères, présentés par les fonctions aminées, peuvent être facilement modifiés, permettant de changer au besoin les propriétés de surface. Ainsi, malgré les caractéristiques potentiellement peu prometteuses au niveau de la biocompatibilité (voir plus de détails dans la section 1.2.5), PAMAM et PPI sont présentement

considérés comme les structures dendritiques les plus utilisées dans les travaux de recherche en vectorisation de PA [97].

Généralement, l'efficacité d'encapsulation est définie par la nature des groupements chimiques qui se retrouvent dans les parties internes et à la périphérie des dendrimères. Ces groupements déterminent les types d'interactions avec les molécules de PA, en permettant d'abord de les accueillir, ensuite, de les retenir l'intérieur (voir, de former des complexes d'inclusion) et, finalement, de les relarguer (si possible, au moment opportun). Les squelettes de PAMAM et PPI (**Figure 6, page 12**) contiennent des fonctions aminées primaires et tertiaires, qui favorisent le piégeage des molécules actives par l'intermédiaire des liaisons électrostatiques (ou ioniques), des ponts hydrogènes et des interactions hydrophobes [71, 97, 104, 203].

Étant donné que l'impact énergétique des forces ioniques est le plus élevé dans les interactions physico-chimiques en question [208], la présence des groupements fonctionnels ionisés dans les structures dendritiques et celles de PA peut influencer grandement sur le processus d'encapsulation. En particulier, les possibilités d'interactions électrostatiques, présentées par les groupements aminés de dendrimères PAMAM et PPI, sont généralement réservées aux molécules actives portant les fonctions acides, p.ex. MTX [107], chlorambucil [153], l'indométacine [196, 197], ibuprofène [104], flurbiprofène [199], ketoprofène [200, 201], diflunisal [201], enoxaparin [205] et acides mycophénolique [203], acétylsalicylique [202], nicotinique [213], benzoïque, salicylique [212] etc. Dans ce cas, l'encapsulation s'effectue en deux principales étapes : d'abord, par les interactions électrostatiques avec des amines de surface et, ensuite, avec des azotes tertiaires de l'intérieur [71, 97, 104, 203, 216] (**Figure 13, page 29**). Les interactions électrostatiques, impliquées ainsi dans la captation de PA et la stabilité de complexes d'inclusion résultants, montrent une grande dépendance des valeurs pH du milieu (voir plus de détails dans la section 1.2.4.4.1).

Il est aussi rapporté qu'un renforcement des interactions électrostatiques est lié avec la montée en génération, ce qui résulte en des taux d'encapsulation plus élevés [146, 216]. Néanmoins, ceci est également observé pour les PA non acides (comme rapporté, p.ex., pour camptothécines [146], piroxicam [195], nifédipine [211], sulfaméthoxazole [209], phénobarbital [208] etc.), dû au volume des cavités internes plus grand par rapport aux

dendrimères de petites générations et à la possibilité d'autres types d'interactions (ponts hydrogènes et hydrophobes).

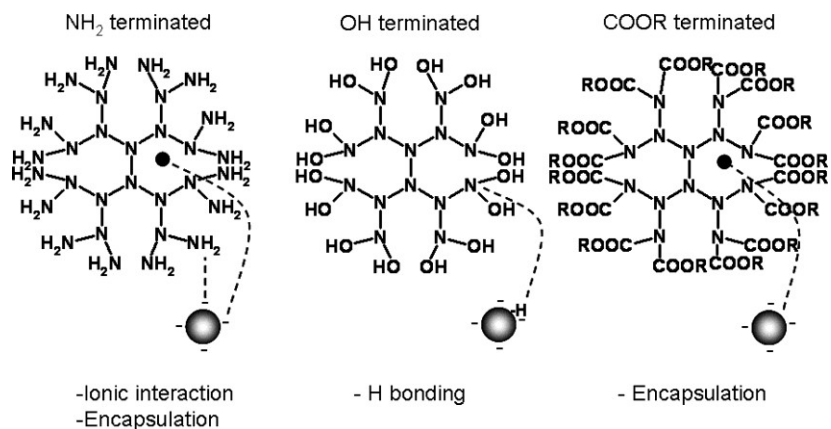


Figure 13. Mécanismes généraux de l'association non covalente des molécules actives faiblement acides et hydrophobes, ayant lieu dans le cas de dendrimères PPI et PAMAM avec différentes fonctions de surface [97].

Dans ce contexte, une approche hybride originale a été proposée par M. Kramer et col. du groupe de R. Haag [217]. Dans cette approche, un cœur dendritique polyéthylèneimine (PEI, analogue de PPI) de pseudo G3 a été d'abord synthétisé, et, ensuite, par les étapes répétitives de greffage, les dendrons de PPI et PAMAM ont été implantés. Les pseudodendrimères obtenus de 5 à 25 kDa ont été trouvés efficaces pour l'encapsulation et la transfection intracellulaire de macromolécules comme l'ADN.

Les modifications chimiques de la surface PAMAM et PPI peuvent également se répercuter sur les mécanismes d'encapsulation. Les groupements périphériques hydroxyles sont responsables de la formation de ponts hydrogènes faibles [97, 108, 142, 206, 212], tandis que les esters maintiennent les interactions hydrophobes [97, 211, 218] (**Figure 13, page 29**). La présence des carboxyles pourrait être bénéfique pour former les complexes d'inclusion plus stables avec les PA faiblement basiques (p.ex. avec le pilocarpine [206]).

Un rôle particulier est dévolu au greffage de chaînes PEG à la surface de PAMAM et PPI [97, 219]. Ce type de transformation est reconnu pour avoir des effets positifs au niveau de la solubilité dans les milieux aqueux, de la réduction des effets toxiques, ainsi que de l'apparition de propriétés de « furtivité » (ou « *stealth* ») par rapport au SRE de l'organisme.

De plus, la PEGylation peut aussi augmenter le taux d'encapsulation de médicaments, par rapport aux macromolécules non modifiées. Par exemple, la fixation de chaînes MeO-PEG à la périphérie de PAMAM a permis d'encapsuler plus de MTX et DOX, dans le cas de PAMAM G3 et G4 portant MeO-PEG550 et MeO-PEG2000 [220], et plus de 5-fluorouracile par PAMAM G5 avec les chaînes MeO-PEG5000 [144]. Il est également à noter que dans ce cas, la charge thérapeutique augmentait avec l'accroissement de la longueur de PEG greffé. Ceci peut être expliqué par la croissance du volume global des macromolécules, ainsi qu'aux liaisons hydrogènes faibles, pouvant être formées avec les atomes d'oxygènes des chaînes PEG. Néanmoins, H. Yang et col. ont rapporté que les chaînes PEG5000 greffées sur PAMAM G3 sont moins efficaces que les chaînes PEG2000 dans l'optimisation de taux d'encapsulation. Ceci a été expliqué par la formation d'agglomérats où les chaînes PEG5000 de surface pénétraient à l'intérieur des dendrimères voisins, en réduisant ainsi le volume global des cavités internes disponible pour l'encapsulation [221]. Plus tard, cette explication a été cependant mise en doute par H. Lee et R. G. Larson dont les résultats de simulation *in silico* ont indiqué qu'une telle diminution en capacité de charge serait plutôt due aux autorepliements de longues chaînes PEG5000 vers l'intérieur PAMAM G4, G5 et G7, comparativement aux chaînes plus courtes de PEG550. Ainsi, une structure dendritique portant les chaînes PEG égales ou supérieures à 5000 Da s'empêche elle-même d'atteindre le maximum de chargement possible [222]. Malgré cette importante conclusion, il reste à clarifier la longueur critique de PEG périphériques, menant à l'autorepliement. Les données rapportées ne sont définitivement pas suffisantes pour décrire le comportement de systèmes dans l'intervalle assez large de 2000 à 5000 Da. Néanmoins, ces résultats sont en concordance avec une autre étude très récente, réalisée avec les produits dendritiques BoltornTM (voir plus de détails sur ces produits dans la section 1.2.4.3). En particulier, il a été noté que l'efficacité d'encapsulation du DOX diminue de dendrimères portant les chaînes PEG5000 à ceux avec les PEG10000 [173].

D'autres types moins répandus de modification de surface PAMAM et PPI ont aussi montré des résultats très intéressants. Par exemple, le greffage de 33 molécules de mannose sur le dendrimère PPI G5 a permis d'atteindre un taux d'encapsulation du lamivudine plus élevé (avec l'accroissement jusqu'à 8%) et, également, la durée de relargage du PA plus prolongée (d'environ 6 fois) par rapport à la structure non modifiée. Ces effets bénéfiques ont

été expliqués par l'augmentation du nombre de groupements disponibles pour la complexation, ainsi que par l'apparition de gênes stériques empêchant la charge thérapeutique de sortir librement [204].

Dans le cas de greffage de polysaccharides, en particulier, du dextran de Mw 60 kDa, une libération prolongée de DOX a été aussi notée. Ceci a été interprété comme étant dû à l'influence favorable du volume accru de dendrimère résultant [118].

Parmi d'autres chaînes polymériques attachées aux dendrimères PAMAM, il faut mentionner le poly(N,N-diméthylaminoéthyl méthacrylate) (ou DPMA) et le peptide HAIYPRH (T7) conjugué avec PEG. Par exemple, les PAMAM G3 portant respectivement 2, 4 et 6 fragments DPMA ont montré une capacité à libérer le chlorambucil de façon beaucoup plus lente que le PAMAM G3 non substitué. De plus, la vitesse de libération observée *in vitro* variait dépendamment du pH (plus grande à pH 1,4 qu'à pH 10) [153]. Les résultats encore plus significatifs au niveau de relargage prolongé ont été obtenus après le greffage sur PAMAM G5 du peptide, un ligand spécifique du récepteur transferrine (T7), via l'espacer PEG3500. Dans ce cas, le taux de la prodrogue à base de DOX et un facteur de nécrose tumorale humain (pORF-hTRAIL), libéré dans le tampon phosphate salin (PBS) à pH 7,4 n'a pas dépassé 22% après 120 h du test [120].

La fixation de l'acide folique (AF) à la périphérie de PAMAM et PPI est considérée bénéfique pour améliorer non seulement l'internalisation intracellulaire du vecteur, mais aussi l'efficacité d'encapsulation. Par exemple, il a été rapporté que la présence de molécules de l'AF conjuguées à la surface de PAMAM G4 [141, 197], PAMAM G5 hydroxylé [108] et PPI G5 [119] amenaient à un relargage plus lent, respectivement, de l'indométacine, 5-FU, MTX et DOX, comparativement aux dendrimères non modifiés. Il a été rapporté que le greffage de l'AF peut être aussi effectué par l'intermédiaire de l'espacer volumineux PEG4000. Dans le cas du PAMAM G4, cette approche a permis d'atteindre les meilleurs résultats liés à la libération du 5-FU (**Figure 14, page 32**) [141].

L'efficacité de l'AF au niveau de rétention de PA à l'intérieur du dendrimère est généralement liée aux interactions à la fois hydrophobes et stériques accrues entre le dendrimère et les molécules encapsulés [197]. Néanmoins, l'impact d'interactions hydrophobes dans ce processus est controversé et a été remis en cause par l'étude sur l'encapsulation du cortisol par les dendrimères PPI G3 et G4, portant les groupements

méthoxy-tétraéthylène glycol (MeO-TEG) à la surface. Dans ce cas, l'insertion de chaînes lipophiles de n-hexane, entre le cœur PPI et la couche externe de MeO-TEG, n'a pas mené à des améliorations au niveau du taux de charge du PA [71]. Ceci pourrait être dû à l'impact très faible des forces de van der Waals, responsables pour l'attraction hydrophobe, sur la rétention du cortisol. En particulier, la présence de groupements polaires comme hydroxyles et carbonyle dans la molécule du cortisol favorise d'autres types d'interactions physicochimiques qui sont énergétiquement plus fortes. Ainsi, pour les PA hydrophobes, portant des groupements polaires ou facilement polarisables, une rétention par des effets stériques à la surface, pour empêcher de sortir de la « boîte dendritique », semble être plus prometteuse.

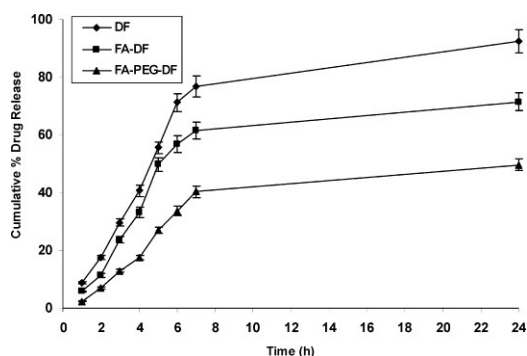
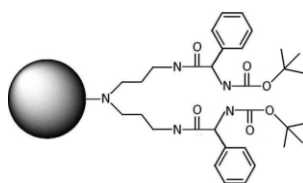


Figure 14. Libération du 5-fluorouracile (dans l'eau), encapsulé préalablement dans les dendrimères PAMAM G4: non modifié (DF), modifié par le greffage directe de l'AF sur la surface (FA-DF), modifié par le greffage de l'AF par l'intermédiaire du PEG4000 (FA-PEG-DF) [141].

Dans ce contexte, une stratégie qui consiste juste à créer un maximum d'effets stériques à la surface dendritique, devrait tout de même être considérée avec beaucoup de précautions. Par exemple, dans le cas du dendrimère PPI G4 dont la périphérie a été modifiée par le greffage de groupements phényles et *N-tert*-butoxycarbone (*t*-BOC) (**Figure 15, page 33**), le relargage du Rose Bengale encapsulé n'a été possible qu'après l'hydrolyse à reflux dans 12 N HCl [218]. De toute évidence, ces conditions ne sont pas réalistes pour des applications thérapeutiques.

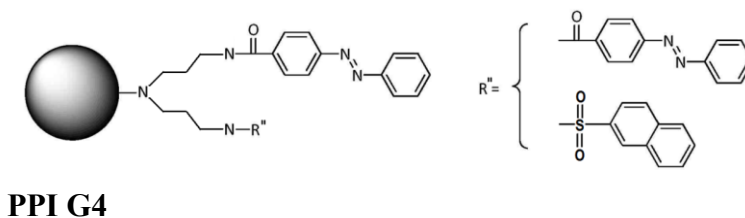
Il est également à noter que l'utilisation d'espaceurs qui sont mal adaptés pour diminuer les effets stériques de groupements terminaux, ne conduisent pas à des résultats

encourageants. Par exemple, une tentative d'attacher les t-BOC au moyen de l'espaceur PEG5000 sur le dendrimère PAMAM G4 avait un très faible impact sur les paramètres de relargage du PA. En outre, les résultats de libération du MTX (dans le tampon isotonique jusqu'à 75% après 2 h) étaient identiques même en faisant varier le nombre d'unités tBoc-NH-PEG5000-NHS greffées [107]. Par conséquent, une stratégie basée sur la rétention de PA par des effets stériques, créés à la surface du dendrimère, nécessite des approches plus élaborées. En particulier, de telles approches devraient tenir compte non seulement des dimensions des molécules encapsulées et des cavités disponibles dans l'architecture dendritique, mais aussi des possibilités de gérer efficacement les processus de captation et de libération.



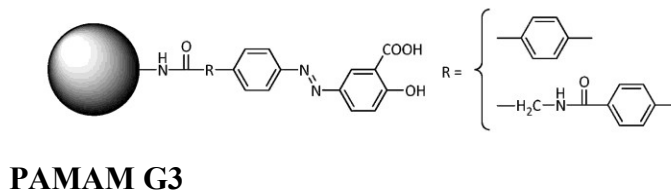
PPI G4

Figure 15. Dendrimère PPI G4 avec la surface modifiée par le greffage de groupements phényles et t-BOC.



PPI G4

a.



PAMAM G3

b.

Figure 16. Dendrimères PPI (a) et PAMAM (b) portant les unités azobenzènes à la périphérie, sensibles au pH, à la lumière et aux enzymes qui clivent la fonction azo, proposés pour la vectorisation des principes actifs.

Une solution très intéressante pour rendre les procédures d'encapsulation et de relargage plus contrôlables, consiste à utiliser les dendrimères PPI [223-226] et PAMAM [227] à extrémités azobenzènes (**Figure 16, page 33**).

Sensibles à la fois à la lumière UV, au pH et aux enzymes qui clivent la fonction azo, les dendrimères seraient ainsi capables de libérer les PA anioniques et hydrophobes dans les conditions convenables. Par exemple, l'action de l'irradiation UV peut causer des changements conformationnels chez les unités azobenzène, résultant en piégeage par effets stériques et hydrophobes. La possibilité de protonation du groupement azo dans les milieux acides amène à la dépendance du pH et, de ce fait, augmente l'impact des interactions électrostatiques (**Figure 17, page 34**). Il faut cependant noter que les études sur l'encapsulation avec les structures dendritiques de ce type sont majoritairement limitées aux petites molécules qui présentent des matières colorantes (p.ex., eosin [223-226]).

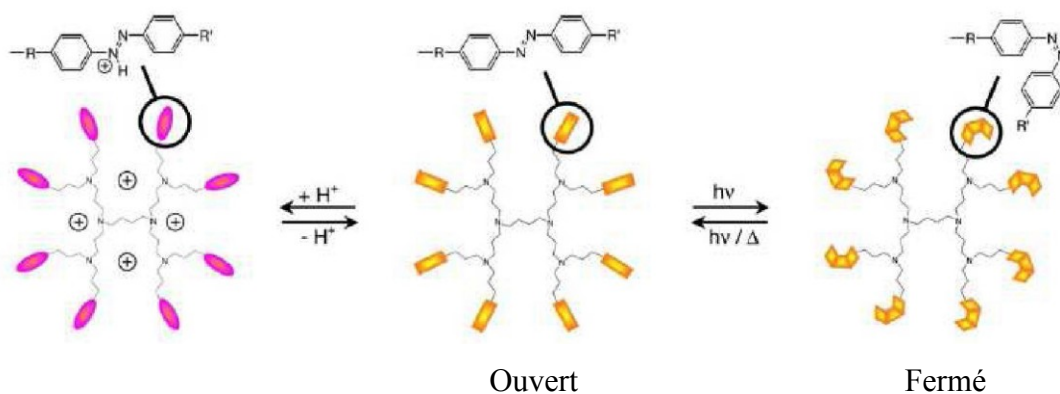


Figure 17. Principe de fonctionnement des dendrimères PPI (et PAMAM) portant les unités azobenzène à la périphérie, sensibles au pH et à la lumière [223].

Malgré la perspective d'améliorer les paramètres de rétention du PA au sein du dendrimer, le greffage de fragments hydrophobes (p.ex., azobenzènes, acide folique etc.) à la périphérie dendritique peut se répercuter négativement sur la solubilité des macromolécules résultantes. La surface hydrophobe du vecteur peut également avoir des conséquences indésirables au niveau de la biodistribution (voir plus de détails dans la section 1.2.5.1). Pour contourner ces problèmes, P. Tripathi et col. ont récemment proposé l'enrobage avec une couche phospholipidique des dendrimères PAMAM portant des acides gras sur leur surface

[186]. Cela a permis d'atteindre un taux de charge du 5-fluorouracile jusqu'à 53%, ainsi qu'un relargage prolongé du PA dans le PBS [186]. Une approche similaire consiste à encapsuler d'abord le principe actif dans le dendrimère et, ensuite, à emballer les complexes d'inclusion résultants dans les liposomes. Dans le cas de dendrimères PAMAM G2-4 placés dans une membrane liposomale, A. Khopade et col. ont trouvé que le taux d'encapsulation du MTX augmente avec la génération dendritique [228]. Néanmoins, ces systèmes phospholipidiques hybrides, bien qu'assez originaux, ne représentent pas des vecteurs dendritiques propres. Leur préparation nécessite des étapes supplémentaires, ce qui peut résulter non seulement en la perte des principaux avantages du concept de la « boîte dendritique », mais aussi en l'augmentation du coût de produit final.

1.2.4.3 Mécanismes d'encapsulation par les dendrimères d'autres types

Comme déjà mentionné dans les sections précédentes, les dendrimères d'autres types que PAMAM et PPI, proposés pour la nanovectorisation des molécules actives, sont beaucoup moins répandus. Malgré le fait que les composés de ce groupe très vaste soient décrits depuis plus longtemps (p.ex. dendrimères élaborés sous la direction de F. Vogtle, datant de 1978 [66], et ceux R. Denkewalter et col. élaborés en 1981-1983 [67-69]) et soient beaucoup plus nombreux (seulement le nombre de dendrimères polyesters connus dépasse plusieurs milliers [229]), leurs usage en nanovectorisation thérapeutique reste toujours assez limité. Il est également intéressant à noter que les articles publiés sur l'utilisation de ces macromolécules comme agents de l'encapsulation de PA sont assez récents et ne datent en grande partie que d'après 2000.

D'une manière générale, l'influence de la nature des groupements périphériques (p.ex. amines, hydroxyles, carboxyles, PEG etc.) sur l'efficacité d'encapsulation reste similaire pour toutes les familles dendritiques, y compris PAMAM et PPI. Les principales différences sont majoritairement dues aux distinctions au niveau de la structure chimique interne. En particulier, de telles distinctions peuvent imposer des types d'interactions physico-chimiques différentes et, en même temps, se répercuter sur la taille des cavités intérieures disponibles pour accueillir les molécules de PA.

Par exemple, en 2000, M. Liu et col. ont rapporté l'encapsulation de l'indométacine dans un dendrimère de 3^{ème} génération, dont l'intérieur est composé de cycles aromatique *p*-phénylènes, liés entre eux par les courtes chaînes aliphatiques (**Figure 18a, page 37**). Le taux de chargement du PA était de 11% par rapport à la masse dendritique. Le relargage dans le tampon PBS à 37°C était plus prolongé, comparativement à l'ingrédient actif non encapsulé [230].

En 2003, T. Ooya et col. ont proposé les dendrimères polyglycérols de G3, G4 et G5 (**Figure 18b, page 37**) pour encapsuler le paclitaxel. En présence de ces structures dendritiques, la solubilité aqueuse du PA a augmenté de 10 000 fois et était supérieure par rapport aux systèmes incluant le PEG400 et le PEG2000. L'efficacité d'encapsulation augmentait avec la montée en génération. L'ajout du sérum à la solution contenant les complexes d'inclusion avec les dendrimères a causé le relargage et la précipitation rapides du paclitaxel [135], due, probablement, à une plus grande affinité de certains constituant du sérum pour l'intérieur dendritique. Un an plus tard, les mêmes auteurs ont précisé qu'en se basant sur les données RMN, l'encapsulation du PTX dans les dendrimères polyglycérol s'explique par des interactions par l'intermédiaire de cycles aromatique du PA [134]. Récemment, en 2012, en utilisant la technique de fluorescence, H. Lee et T. Ooya ont également trouvé que la structure polyéther de ces macromolécules est capable non seulement d'encapsuler la 5-fluorouracile, mais aussi de changer sa forme lactame en lactime [231], sans cependant mentionner sur les conséquence au niveau de l'activité du PA.

En 2004, les chercheurs iraniens H. Namazi et M. Adeli ont décrit la synthèse et l'utilisation de nouveaux dendrimères polyesters de G1-3, à base de PEG et d'acide polycitrique, pour encapsuler les anti-inflammatoires non-stéroïdiens tels que le diclofenac et les acides 5-aminosalicylique et méfénamique [232]. Plus tard, ces structures ont été également proposées pour la vectorisation des cis-platines [233]. Malgré les données encourageantes (comme l'efficacité d'encapsulation élevée et une libération prolongée sans « *burst release* »), ces travaux devraient cependant être considérés avec beaucoup de prudence car les résultats de caractérisation structurale présentés ne prouvent pas la formation des liaisons esters attendues (l'absence de signaux intenses à 6,0-4,0 ppm dans le spectre ¹H RMN [232]). Il est donc fort possible qu'il s'agisse de produits ayant une autre architecture que celle décrite par les auteurs.

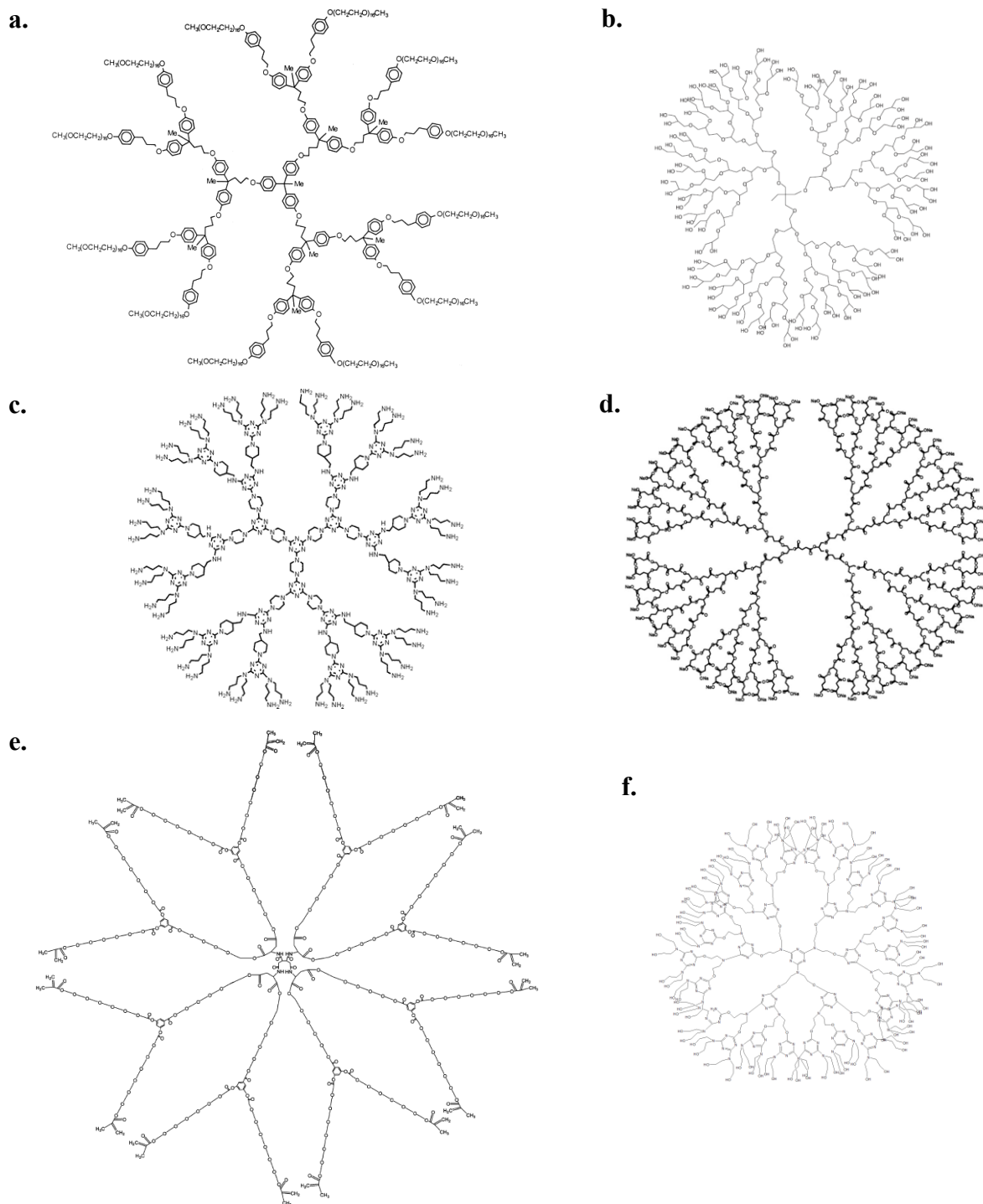


Figure 18. Différentes familles de dendrimères proposés pour l'encapsulation de PA :
(a) indométacine [230], (b) paclitaxel [135] et 5-fluorouracile [231], (c) méthotrexate et 6-
mercaptapurine [154], (d) 10-hydroxycamptothecin et 7-butyl-10-aminocamptothecin
[161], (e) β -carotène [84] et méthotrexate [105, 106], (f) paclitaxel [136].

Une autre famille de dendrimères proposée pour la vectorisation de PA est composée d'unités mélamines, pipérazines et pipéridines (**Figure 18c, page 37**). La présence de cycles aromatiques et de groupements polaires et ionisables était un facteur favorable pour encapsuler le methotrexate et le 6-mercaptopurine, et pour réduire leur toxicité hépatique [154]. Il est cependant à noter que les mécanismes de rétentions de PA par le dendrimère n'ont aucunement été discutés dans cet article.

Dans le groupe du Prof. M. Grinstaff les dendrimères assemblés à partir de métabolites naturels, de glycérol et de l'acide succinique, ont été élaborés (**Figure 18 d, page 37**). En 2006, M. Morgan et col. ont rapporté que les structures de G4.5 sont capables d'augmenter jusqu'à 10 fois la solubilité de camptothécines (10-hydroxycamptothécine et 7-butyl-10-aminocamptothécine) dans l'eau. Néanmoins, les tests de libération dans le tampon PBS à pH 7,4 ont montré un relargage de PA assez rapide (jusqu'à 80% après 2,0 h, et environ 100% après 3,5-4,0 h). Par conséquent, les dendrimères sont recommandés plutôt pour les injections intratumorales directes que pour la voie d'administration intraveineuse [161].

Dans la même année 2006, l'étude de D. Bhadra et col., portant sur l'encapsulation du phosphate de chloroquine avec les dendrimères composés du cœur PEG (PEG1500 et PEG4000) aminé et de dendrons à base de poly-L-lysine a été réalisée. Il a été noté que la charge thérapeutique augmentait avec la hausse en génération (de G4 à G5) et avec l'accroissement de la longueur du PEG. Ces résultats sont en concordance avec les tests de libération: le relargage du PA ralentissant avec l'augmentation de volumes du cœur ou de dendrons. Ceci est probablement dû aux gênes stériques et aux possibilités de complexation accrues. De plus, l'enrobage du dendrimère avec le sulfate de chondroïtine (un constituant naturel de la matrice du cartilage) a permis d'atteindre les taux de relargage prématuré encore plus petits, ce qui pourrait être intéressant pour élaborer les nanovecteurs à circulation systémique prolongée [207].

En 2006 également, R. Dhanikula et col. ont publié un article concernant la synthèse d'un nouveau type de dendrimère hydrophile. L'approche consistait à trouver un compromis entre à la fois la souplesse, la solidité et la non-toxicité de structures, atteintes par l'utilisation de constituant aliphatiques et aromatiques non toxiques, liés entre eux par les groupements amides, esters et polyéther (**Figure 18e, page 37**). Les structures ont été trouvées capables

d'encapsuler efficacement les substances hydrophobes, β -carotène (6,47%) et la rhodamine (15,80%). Les tests de libération dans le tampon phosphate à 37°C ont montré une libération prolongée de molécules encapsulées (90% après 120 h). Les résultats de spectrométrie UV avaient indiqué l'absence des interactions π - π , ce qui a suggéré que le principal mécanisme de rétention du PA était dû aux effets stériques [84]. Plus tard, en 2007, les structures dendritiques de ce type ont été proposées pour encapsuler le MTX. Il a été noté que l'efficacité d'encapsulation augmente (jusqu'à 24,5%) avec la croissance de la longueur des espaceurs PEG et, également, si les points de divergence contenaient des cycles benzoïques présentant des effets hydrophobes [105]. Le relargage du PA dans le tampon PBS se déroulait en deux étapes, d'abord, un « burst release » pendant les 6 premières heures et, ensuite, une libération prolongée pouvant atteindre jusqu'à 168 h. En 2008, ces dendrimères, ainsi que leurs dérivés obtenus par la glycosylation de surface, ont été étudiés en tant que candidats pour la vectorisation du MTX dans les traitements du gliome (néoplasie du système nerveux central) qui nécessite une livraison du PA à travers la barrière hémato-encéphalique [106, 234].

L'une des plus récentes familles dendritiques, datant de 2010, est constituée des cycles triazines et des unités diéthanolamines (**Figure 18f, page 37**). Durant les essais d'encapsulation du PTX, les structures ont été capables d'augmenter la solubilité du PA dans l'eau jusqu'à 0,562 mg/ml et de permettre son relargage prolongé [136]. Dans la même année, les dendrimères ayant un cœur à base de l'acide 1,3,5-tricarboxybenzoïque dont les dendrons sont constitués de TRIS, l'acide 3-hydroxypropionique, l'éthylène-diamine et la guanidine (**Figure 19a, page 40**), ont été proposés comme surfactants ophtalmiques pour augmenter la biodisponibilité du gatifloxacine à travers les cellules épithéliales cornéennes humaines et le scléra-choroïde-RPE bovin isolé. Les mécanismes d'interaction entre le PA et le dendrimère ont été étudiés avec les techniques de calorimétrie de titration isothermale (CTI), FTIR et ^1H RMN. En particulier, les valeurs trouvées de l'enthalpie ont été négatives (c'est-à-dire, favorables à l'encapsulation) pour un site d'interaction et positives (défavorables à l'encapsulation) pour deux autres, tandis que l'entropie restait positive dans tous les cas. L'analyse IR et ^1H NMR a montré des interactions entre les groupements carboxyles de PA et amines du dendrimère [210] (voir également **Figure 19, page 40**).

D'autres structures dendritiques ont été également proposées pour une livraison ciblée de PA, cependant, sans que ni les tests d'encapsulation, ni les molécules actives visées n'aient

été rapportés, p.ex., en 2002, dendrimères à base de l'acide 2,2-bis(hydroxyméthyl)propionique (BMPA) [235], ainsi que ceux composés de BMPA et PEG [236], en 2005, à base d'acrylate et acétoacétate [237] ou 3-hydroxyacétophénone [238], en 2009, structures polyesters-thioethers [239], en 2010, dendrimères poly(amino)esters [240].

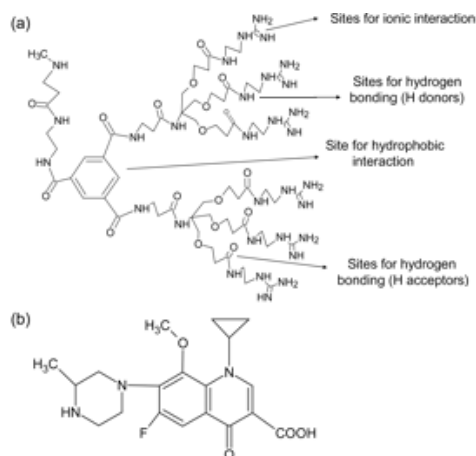


Figure 19. Dendrimère portant les unités guanidines à la surface avec l'identification de sites des interactions physico-chimiques (a) et la structure de gatifloxacine (b). Adapté de [210].

Il faut aussi noter que dans certains cas, plusieurs nouvelles familles de dendrimères ne présentent qu'une combinaison des éléments structuraux déjà bien connus. Par exemple, tout récemment, en 2013, les structures portant les fragments de pentaérythritol, 1-thioglycerol, ainsi que de BMPA et MeO-PEG2000, ont été proposées pour encapsuler la DOX hydrophobe [241]. Les structures finales PEGylées ont manifesté une libération de PA prolongée, cependant, les mécanismes d'encapsulation n'ont pas été discutés.

Durant ces dernières années, les chercheurs ont également mis au point de nouveaux systèmes, permettant l'autoassemblage de structures dendritiques en nanocapsules supramoléculaires. En particulier, en 2008, M. Giles et col. ont élaboré les dendrimères polyesters possédant à l'intérieur une hémisphère hydrophobe à base de polyethers aromatiques, pouvant ainsi non seulement capter une molécule hydrophobe, mais également interagir de la même façon avec un autre dendrimère, permettant finalement d'enfermer la molécule captée dans la « coquille » dendritique (**Figure 20, page 41**). À pH neutre, cette

approche s'est montrée efficace pour encapsuler toute une série de molécules hydrophobes y compris une substance active telle que l'estradiol [242].

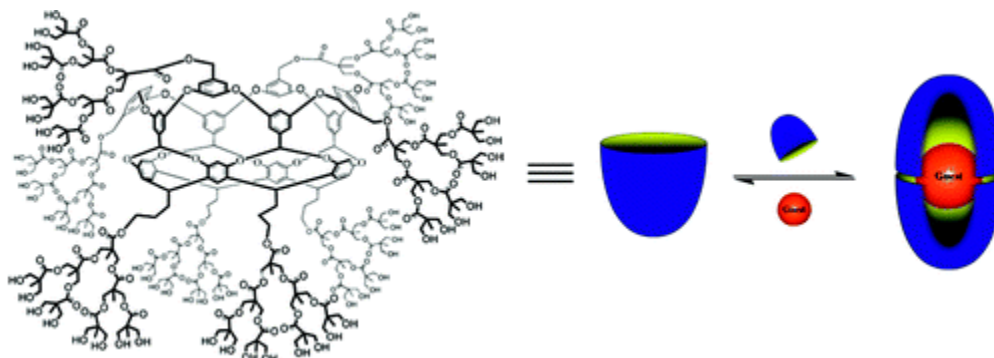


Figure 20. Formation d'une nanocapsule à partir de deux dendrimères, portant chacun un hémisphère hydrophobe interne, autour d'une molécule hydrophobe (à pH neutre) [242].

Malgré les résultats intéressants ci-mentionnés, aucune de ces structures n'a encore trouvé sa place sur le marché pharmaceutique. En plus des raisons évoquées dans les sections 1.2.3.1 et 1.2.3.2, concernant les aspects thérapeutiques, un autre obstacle majeur à contourner est d'assurer la qualité de produit au niveau de sa pureté chimique. En particulier, avec la montée en génération, il est de plus en plus difficile d'isoler les dendrimères purs des structures résultant de modifications incomplètes car la différence entre leurs masses moléculaires devient de plus en plus négligeable. L'un des compromis qui pourraient finalement amener à la commercialisation de nanovecteurs dendritiques, consiste à se limiter à l'utilisation de macromolécules irrégulières bien qu'hyperbranchées (*pseudo-dendrimères*). Dans ce cas, les produits sont donc utilisés sous forme des mélanges d'architectures homologues, tout en évitant des étapes de purification compliquées et coûteuses.

À cet égard, récemment, une compagnie suédoise *Polymer Factory* [243] a proposé deux séries de produits polyesters *Boltorn*® et polyamides *Hybrane*®, qui présentent des pseudo-dendrimères car leurs structures hautement ramifiées ne sont pas parfaitement définies. Sur le plan de l'encapsulation de PA, les produits plus intéressants sont ceux de la marque *Boltorn*®, à base de BMPA, dont les propriétés physico-chimiques ont été profondément

étudiés par E. Zagar et M. Zigon [244, 245] et U. Domanska et col. [246]. Ces pseudo-dendrimères diffèrent par leurs masses moléculaires et la nature de groupements greffés à la périphérie. Par exemple, Boltorn H40 (7323,3 Da) est un composé de pseudo 4ème génération, assemblé uniquement de fragments de BMPA (**Figure 21a, page 42**).

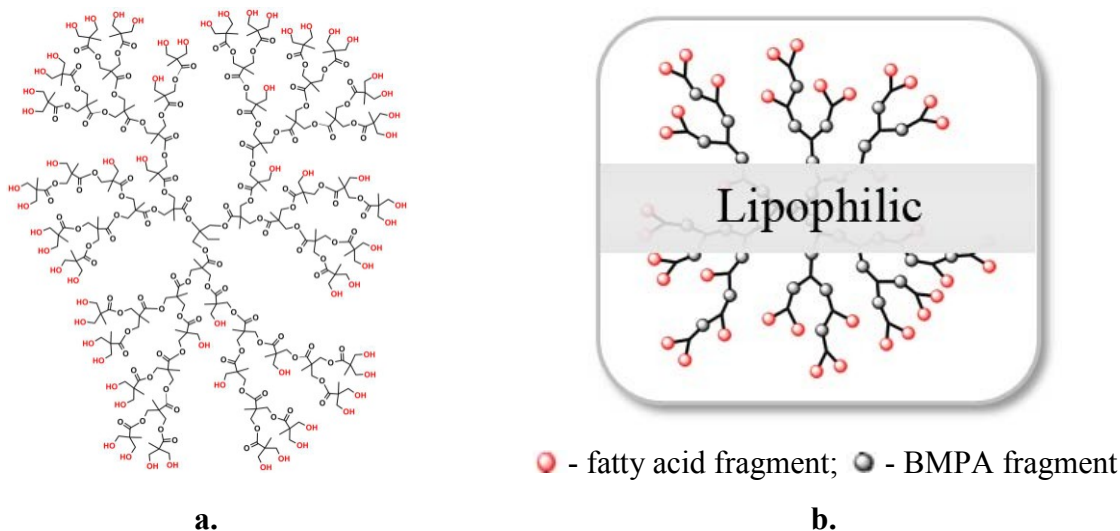


Figure 21. Pseudodendrimères Boltorn®: (a) structure idéalisée du Boltorn H40; (b) représentation schématique de Boltorn H2004, U3000 et W3000 [243].

Les produits obtenus par la modification de surface sont Boltorn H2004 (Mw 3200 Da) et Boltorn U3000 (Mw 6500 Da), portant respectivement 6 et 14 chaînes d'acides gras, ainsi que Boltorn W3000 (Mw 9000 Da) contenant les chaînes d'acides gras et de PEG (**Figure 21b, page 42**). R. Reul et col. ont rapporté que Boltorn H40, U3000 et W3000 peuvent être utilisés pour encapsuler le paclitaxel [185]. Dans ce cas, la présence des acides gras à la surface des macromolécules a permis d'atteindre les taux de charges thérapeutiques plus grandes. Ceci a été expliqué par une possibilité d'auto-arrangements au niveau des interactions hydrophobes. En effet, les dimensions observées pour les nanoparticules étaient de 70 à 170 nm, ce qui suggère la formation de systèmes supramoléculaires. Il est cependant à noter que les profils de relargage du PA, exprimés en %, n'ont montré aucune différence entre les échantillons testés.

Il faut mentionner qu'en dehors de l'utilisation directe, le produit commercial Boltorn H40 peut également servir de point de départ dans la synthèse d'autres nanovecteurs branchés, en particulier, par la modification de ces hydroxyles périphériques. Par exemple, en 2009, S.

Aryal et col. ont présenté les architectures obtenues en deux étapes. Ils ont d'abord utilisé Boltorn H40 comme initiateur multifonctionnel pour réaliser une polymérisation du ϵ -caprolactone par ouverture de cycle. Ensuite, le dérivé polymérique « multi-bras » a été modifié par le greffage de chaînes MeO-PEG2000 sur les hydroxyles terminaux. La spectrophotométrie de fluorescence a montré que le produit résultant possédait une concentration critique d'agrégation (CCA) de 3,8 mg/L. Étant plus dilué, une formation de micelles avec un diamètre de 18 nm (mesuré avec TEM) a été notée. Au dessus de la CCA, l'agglomération amène à des diamètres de particules de 98 nm. L'efficacité d'encapsulation du 5-FU était de 26%. Une étude de libération du PA dans le tampon PBS à 37°C a montré d'abord un « *burst release* » (jusqu'à 40% de la charge initiale après 8 h) suivie d'une libération prolongée durant une période de 9 à 140 h [46]. En 2012, X. Zeng et col. ont publié un article sur l'encapsulation du DOX avec Boltorn H30 et Boltorn H40 dont la surface a été modifiée par le greffage de chaînes PEG5000 et PEG10000. Il a été rapporté que l'efficacité d'encapsulation du PA va en diminuant de structures avec PEG5000 à celles portant PEG10000. Néanmoins, les testes de relargage dans le tampon PBS à 37°C ont montré qu'avec l'augmentation de la taille de chaînes PEG, le principe actif est plus retenu au sein de la structure dendritique [173].

Ainsi, avec la commercialisation de produits dendritiques polyesters, prometteurs au niveau de leur faible toxicité (voir les détails dans la section 1.2.5), on peut raisonnablement s'attendre à l'apparition dans le futur proche de nombreux autres travaux de recherche, concernant leurs utilisations en nanovectorisation de molécules actives.

1.2.4.4 L'influence du milieu sur les processus d'encapsulation et relargage des molécules actives par les structures dendritiques

Dans le contexte des interactions entre le dendrimère et le PA hydrophobe, la nature du milieu de dispersion peut également avoir un impact significatif sur l'encapsulation de molécules médicamenteuses et la stabilité des complexes d'inclusion résultants. Par exemple, P. Tripathi et col. ont rapporté que dans les systèmes biologiques (en particulier, après l'administration intraveineuse), les taux de libération du 5-FU de complexes d'inclusion avec les dendrimères étaient considérablement plus élevés que dans les cas de leurs solutions simples dans l'eau [247]. T. Ooya et col. ont observé une précipitation rapide du paclitaxel,

après avoir ajouté le sérum à la solution contenant le PA encapsulé préalablement dans les dendrimères polyglycérols [135]. En dehors de facteurs biologiques, d'autres paramètres de l'environnement peuvent également contribuer à la stabilité de ces systèmes de vectorisation. D'une manière générale, les facteurs externes les plus importants pour l'efficacité d'encapsulation sont le pH, la présence des électrolytes, l'influence des protéines du plasma et la température.

1.2.4.4.1 L'influence du pH

Comme déjà mentionné dans la section 1.2.4.2, la sensibilité de complexes d'inclusion « dendrimère-PA » par rapport au pH est généralement déterminée par la présence de groupements fonctionnels ionisables (p.ex., acides et basiques). Le pH peut ainsi favoriser soit les interactions entre les constituants de complexes d'inclusion (ce qui augmente l'efficacité d'encapsulation), soit les interactions de ces constituants avec le milieu de dispersion (ce qui amène au relargage).

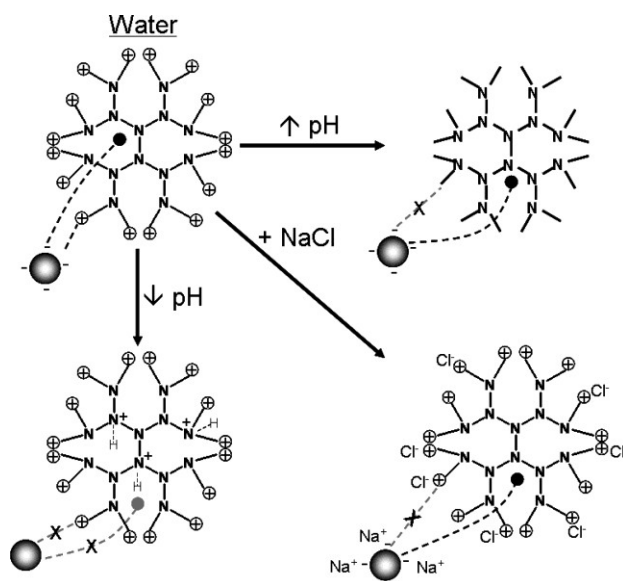


Figure 22. Effet du pH et de la présence du NaCl sur les mécanismes d'encapsulation des molécules actives hydrophobes ou faiblement acides par les dendrimères PAMAM avec fonctions aminés à la périphérie [97].

De toute évidence, l'influence du pH est prépondérante lorsque le dendrimère et le PA interagissent entre eux par les forces électrostatiques. Par exemple, de tels effets ont été observés avec les complexes d'inclusion formés de dendrimères polycationiques (PAMAM et PPI), et les molécules de principes actifs acides (MTX et acide tout-*trans*-rétinoïque [162], chlorambucile [153], nifédipine [211], flurbiprofen [199], indométacine [198] etc.). Dans ce cas, les études ont révélé que dans un milieu acide, la libération de PA était plus rapide que dans des milieux neutres ou basiques (voir également **Figure 22, page 44**).

La libération accélérée du PA dans le milieu acide a été également confirmée, en faisant varier la nature de molécules à encapsuler, ainsi que les propriétés de surface du dendrimère. En particulier, cet effet a été observé dans le cas de PA faiblement basiques (famotidine [198]) et amphotères (amphotéricine B [198]), ainsi que dans le cas de la modification de surface cationique de PAMAM et PPI par acétylation [211] ou par le greffage d'unités azobenzènes (**Figure 17, page 34**) [223] ou de l'acide folique [119]. Ces données suggèrent collectivement que le pH aura plus d'impact sur la structure dendritique (externe et interne), dû, probablement, au nombre de groupements ionisables (aminés) beaucoup plus important par rapport aux fonctions acides présentes dans les molécules actives à encapsuler. En effet, étant ionisé le dendrimère a plus d'affinité pour le milieu aqueux que pour les molécules organiques à encapsuler. En revanche, un tel comportement est à la base des hypothèses soutenant que les dendrimères polyaminés pourraient être prometteurs pour effectuer le relargage de charges thérapeutiques dans les sites pathologiques possédant des pH acides (p.ex. certaines tumeurs solides [97, 119, 146, 153]).

La structure chimique du PA peut être également affectée par le pH. Par exemple, il a été rapporté une libération accélérée dans le milieu acide du DOX encapsulé dans les structures dendritiques polyester-polythioéther PEGylées [241]. Cela pourrait être expliqué par la protonation du groupement aminé de DOX qui augmente ainsi son affinité pour le milieu aqueux de relargage. La protonation peut également être une cause de diminution de l'efficacité d'encapsulation tel que montré dans le cas du piroxycam solubilisé avec PAMAM [195].

1.2.4.4.2 La présence des électrolytes

L'importance de prendre en considération la présence d'un électrolyte est démontrée par le fait que de nombreux chercheurs ont observé une bonne stabilité des complexes d'inclusion dendrimère-PA dans l'eau et une libération très rapide dans une solution saline tamponnée [97] (voir aussi la **Figure 22, page 44**). Par exemple, les dendrimères PAMAM G3 et G4, portant les chaînes MeO-PEG550 et MeO-PEG2000 à la périphérie, ont montré un relargage rapide du MTX dans la solution isotonique (150 mM NaCl) comparativement à une solution tampon de 1 mM TRIS-HCl à pH 7,4. Les résultats ont été expliqués par l'affaiblissement des interactions ioniques entre le dendrimère et le PA avec l'augmentation de la concentration d'électrolyte [220].

1.2.4.4.3 La présence des protéines du plasma

L'influence des protéines du plasma peut aussi se répercuter sur l'efficacité de vectorisation avec les dendrimères. Étant donné la présence fréquente dans la structure protéique de groupements basiques (p.ex. aminés), acides (p.ex. carboxyliques), ainsi qu'aromatiques et aliphatiques, les interactions de protéines avec la surface et l'intérieur dendritique peut conduire à une libération non ciblée ou précoce des molécules actives encapsulées [97, 203]. Par exemple, l'étude de R. Prajapati et col., sur la stabilité *in vitro* de complexes d'inclusion formés de dendrimères PAMAM G3-4 et le piroxicam, a montré que la présence de 1% de l'albumine dans la solution tampon PBS à pH 7,4 et 35-39°C amenait au relargage de PA plus rapide comparativement au tampon sans protéines [195]. Afin de comprendre les mécanismes d'interaction entre les dendrimères PAMAM G3,5-4,0, portant comme groupements terminaux $-NH_2$, $-COOH$ et $-OH$ avec l'albumine, B. Klajnert et col. ont réalisé une série de travaux, en utilisant la technique de fluorescence. Les résultats obtenus indiquent que les dendrimères ayant les fonctions aminées primaires à la surface sont capables de provoquer les changements conformationnels dans la protéine portant une charge totale négative, ce qui est dû aux interactions électrostatique fortes. Dans le cas de dendrimères avec une périphérie non chargée (portant $-OH$), l'albumine restait intacte [248]. Plus tard, le même groupe a trouvé que le 1-anilinonaphtalène-8-sulfonate (substance colorante et fluorescente) a plus d'affinité pour l'albumine que pour les dendrimères ci-mentionnés, en particulier, grâce aux effets protéiques (électrostatiques et hydrophobes) plus forts [249]. Par conséquent, une

élaboration d'un nanovecteur dendritique devrait normalement tenir compte des interactions complexes entre tous les constituants de l'environnement biologique, incluant les interactions entre le PA et les protéines. Cependant, le nombre d'études approfondies à ce sujet est toujours très limité.

1.2.4.4.4 L'influence de la température

La température ambiante est aussi un facteur à ne pas négliger pour assurer la stabilité de formulations « dendrimère-PA ». Plusieurs études montrent que les pertes en charge thérapeutique, ainsi que l'apparition de précipitation et de produits de dégradation ont été beaucoup plus élevées avec la montée en température jusqu'à 50-60°C. Par exemple, cela a été observé pour les systèmes à base de PAMAM aminés et PEGylés, avec, respectivement, l'ibuprofène [104], le 5-FU [144] et le piroxicam [195] comme PA. En outre, ces effets indésirables étaient plus significatifs dans le cas de l'exposition à la lumière [144, 195].

Les résultats très encourageants sur le plan de thermostabilité ont été rapportés dans le cas de PAMAM portant les chaînes lipophiles périphériques, couverts par une couche de phospholipides. En particulier, les formulations avec 5-FU restaient relativement stables après 1 mois à 40°C [186].

En conclusion, les études de stabilité des complexes d'inclusion « dendrimère-PA » ne doivent normalement pas se limiter aux expériences sur les systèmes modèles car les propriétés des systèmes réels (tels que pH, tonicité, présence des protéines et membranes biologiques etc.) jouent également un rôle très important dans le processus de vectorisation. L'objectif ultime de ces tests sera donc de trouver un compromis entre la structure dendritique et les paramètres du milieu, afin de maximiser le chargement de PA et, en même temps, de réduire ses pertes incontrôlables. Par exemple, à ce jour, les résultats les plus intéressants sur le plan de la stabilité de formulations dendritiques (en présence de l'albumine et tonicité accrue du tampon) ont été rapportés pour la DOX encapsulée dans le PPI G5 avec les chaînes dextranses de 60 kDa conjuguées à sa périphérie [118].

1.2.5. Dendrimères et biocompatibilité

Comme mentionné précédemment, le fait que les dendrimères soient envisagés en tant qu'agents de nanoencapsulation, nécessite également de clarifier les aspects touchant à la *biocompatibilité* de ces macromolécules.

La notion de *biocompatibilité* a été proposée pour la première fois en 1970 indépendamment par C. Homsy et col. [250] et R. J. Hegyeli [251], pour désigner l'ensemble de propriétés caractérisant la sécurité (voir l'absence des éventuels effets toxiques) des matériaux utilisés pour la confection des bio-implants. En particulier, le terme a été nécessaire pour caractériser des dispositifs médicaux qui ne pouvaient pas être considérés comme de « nouveaux médicaments », tout en évitant ainsi une grande confusion quant aux types de tests précliniques, nécessaires pour assurer leur sécurité.

Présentement, une définition de la biocompatibilité se réfère à « la capacité d'un biomatériau à exercer sa fonction par rapport à un traitement médical, sans provoquer d'effets indésirables locaux ou systémiques chez le receveur ou le bénéficiaire de cette thérapie, en assurant la réponse la plus appropriée et bénéfique au niveau cellulaire et tissulaire, spécifique pour la situation donnée, et ainsi optimisant la performance clinique de cette thérapie » [252]. Dans ce contexte, en tant qu'agents de nanoencapsulation, les dendrimères devraient exercer le rôle d'excipients, dont la fonction est généralement limitée à l'amélioration des caractéristiques du PA (au niveau de l'efficacité thérapeutique, fabrication, stockage, etc. [253]), sans présenter aucune action pharmacologique propre. Ainsi, l'usage de dendrimères comme nanovecteurs doit tenir compte non seulement des effets bénéfiques par rapport à l'agent thérapeutique en question, mais également de tous les risques biologiques potentiels que pourrait courir le futur patient. Par exemple, en règle générale, pour tout vecteur polymérique, conçu pour une application parentérale, il est essentiel que le transporteur soit non toxique, non immunogène, et de préférence biodégradable [254].

Bien que la compréhension du terme « biocompatibilité » ait été précisée depuis sa première utilisation, ce paramètre n'a toujours pas de critères d'évaluation très bien déterminés car ils peuvent différer dépendamment des conditions choisies (type de thérapie, voie d'administration, modèle proposé pour étudier le phénomène etc.). Afin de simplifier la présentation des données, dans le cadre du présent projet de recherche, nous allons considérer

une substance chimique (y compris les macromolécules dendritiques) biocompatible si elle ne présente pas d'effets nocifs détectables au niveau cellulaire, tissulaire et d'organisme entier, à court et à long terme. Ainsi, les sections suivantes seront dédiées aux aspects toxicologiques de dendrimères.

1.2.5.1. Toxicité et biodistribution des dendrimères *in vivo*

D'une manière générale, notre savoir sur la toxicité de substances chimiques ne sera jamais complet sans tenir compte de l'ensemble des effets différents sur l'organisme tout entier. Autrement dit, idéalement, afin de conclure sur la toxicité de dendrimères, il faut effectuer toute une série de tests multiparamétriques *in vivo*. Néanmoins, compte tenu de la complexité et du coût très élevé de telles expériences, ainsi que de la très grande quantité de nouvelles structures dendritiques proposées chaque année, le nombre d'études approfondies *in vivo* demeure toujours très limité. Par conséquent, les travaux concernant la toxicité aiguë de dendrimères chez l'humain sont très peu documentés. Par exemple, T. Toyama et col. ont rapporté le cas grave de dermatite toxique, développé chez un étudiant japonais de 22 ans, comme réponse possibles de son système immunitaire au contact de ses mains avec les produits dendritiques [255]. Il est cependant à noter que la nature exacte de la substance ayant causée ces effets n'a pas été précisée avec certitude.

À cet égard, il faut noter que les tests de toxicité *in vivo* chez l'humain, réalisés avec les dendrimères proposés comme agents de nanoencapsulation de PA sont inexistantes. Ceci est probablement dû au faible niveau du développement général de ce domaine, ainsi qu'aux résultats insatisfaisants, obtenus durant les tests préliminaires *in vitro* (voir la section 1.2.5.2) ou *in vivo* chez les animaux.

L'activité biologique des structures dendritiques est principalement liée aux propriétés de l'ensemble de l'architecture macromoléculaire, ainsi qu'à la présence de groupements chimiques particuliers à la périphérie et à l'intérieur. Une fois dans l'organisme, le dendrimère commence à interagir avec son environnement biologique. Les interactions s'effectuent d'abord au niveau de la surface dendritique dont les propriétés sont déterminées par les fonctions périphériques (leurs charges, propriétés hydrophiles ou hydrophobes, ainsi que leurs sélectivité par rapport aux membranes cellulaires, tissulaires, certains récepteurs etc.). Déjà à cette première étape, il est donc important de prévoir des conséquences possibles pour la santé

de futurs patients. Il est intéressant de noter que bien que l'impact des produits de biotransformation de dendrimères sur la toxicité soit également possible (voir les détails dans la section 1.2.5.3), les effets observés *in vivo* avec ces macromolécules ne sont généralement expliqués dans la littérature que par les propriétés de surface dendritique, en mettant ainsi en exergue seulement l'étape initiale du processus global.

Dans ce contexte, la charge de surface des nanoparticules joue un rôle essentiel pour le temps de leurs demi-vies dans le sang. En particulier, les nano-objets chargés positivement ont une tendance à s'attacher aux cellules d'une manière non spécifique, tandis qu'une forte charge négative augmente l'absorption par le foie. Par conséquent, les nanoparticules possédant des surfaces neutres pourraient être plus attrayantes pour obtenir un séjour prolongé du médicament dans la circulation systémique [42]. Il faut cependant noter que la nature chimique de groupements périphériques neutres, elle aussi devrait être choisie avec beaucoup de précautions. En particulier, il est connu que les nanoparticules avec les surfaces hydrophobes sont rapidement couvertes par les protéines plasmatiques, tandis que les objets hydrophiles demeurent dans la circulation systémique plus longtemps [42, 256, 257].

Ces règles générales s'appliquent également aux dendrimères. Par exemple, les structures PAMAM et PPI non modifiées dont l'étude intense est encouragée principalement par leur disponibilité commerciale, suscitent bien des inquiétudes au niveau de leur toxicité. En particulier, la présence des groupements aminés primaires à la périphérie de ces dendrimères résulte en la formation des particules multichargées (polycations) qui peuvent interagir par les forces ioniques puissantes avec des fonctions anioniques des membranes cellulaires et tissulaires [97]. Dans les études avec les dendrimères PAMAM aminés (Starburst™), J. Roberts et col. ont administré à la souris par voie intrapéritonéale les structures de G3, G5 et G7, avec les doses, respectivement, de 2,6 10 et 45 mg/kg. Les injections ont été effectuées en doses uniques ou répétées (1 fois par semaine pendant 10 semaines), avec la durée des observations respectivement de 7 jours ou 6 mois. Aucun indice d'immunogénicité, ainsi qu'aucun changement au niveau du comportement ou de la perte de poids, n'ont été rapportés. Finalement, les auteurs ont conclu qu'en général, les PAMAM ne présentent pas de propriétés qui empêchent leurs applications biologiques [258]. Il est cependant à noter que l'analyse plus approfondie de ce travail, réalisée plus tard par R. Duncan et L. Izzo, a souligné quelques faits bien inquiétants tels que l'administration de

PAMAM G7 a causé la mort de 3 animaux et que, de plus, dans le test à doses multiples, le degré de vacuolisation des cellules hépatiques était assez élevé, ce qui aurait pu signifier un problème de surcharge lysosomale [254]. Il est intéressant de noter que la biodistribution et, par conséquent, les dommages locaux causés par les PAMAM aminés peuvent dépendre du modèle animal choisi et/ou la génération dendritique [50]. Par exemple, chez le rat Wistar, l'administration par voies iv ou ip a amené à l'accumulation de PAMAM marqués avec ¹²⁵I dans le foie (60-90%) [259], tandis que chez la souris Swiss-Webster les macromolécules de G3 ont été retrouvées majoritairement dans les reins et celles de G5 et G7 dans le pancréas [258]. T. Okuda et col. ont constaté que les dommages hépatiques (mesurés en contrôlant l'expression du transaminase glutamique pyruvique, GPT, de sérum) étaient non significatifs après l'administration intraveineuse à la souris de doses jusqu'à 10 mg/kg. Cependant, ils ont indiqué que l'effet GPT dépend de la dose et la génération de macromolécules [260].

La même tendance a été également observée chez d'autres types dendritiques polyaminés. En particulier, les dendrimères aminés à base de mélamine [261] et lysine [260] ont également manifesté une toxicité hépatique induite subchronique chez la souris, non significative jusqu'aux doses de 10 mg/kg par voie iv. Néanmoins, dans le cas de structures polymélatamines, l'augmentation de la quantité de substances injectées a conduit respectivement à la hausse d'activité enzymatique menant finalement à une nécrose hépatique importante à la dose de 40 mg/kg et à la dose létale de 160 mg/kg (100% après 6–12 h) [261]. Il a été également rapporté qu'après l'administration intraveineuse, les dendrimères PAMAM [258] et poly-lysines [262] cationiques étaient rapidement absorbés par la surface des vaisseaux sanguins, ce qui empêche leur biodistribution efficace à travers l'organisme. Collectivement, les données suggèrent donc que les dendrimères portant les groupements aminés terminaux ont une utilité très limitée en tant que vecteurs des principes actifs, administrés par voies intraveineuse (IV) et intrapéritonéale (IP) [259].

La solution la plus simple pour remédier aux problèmes ci-mentionnés est une modification chimique de la surface. En effet, plusieurs études comparatives sur la toxicité *in vivo* de dendrimères PAMAM ont montré que les macromolécules aminées causent beaucoup plus d'effets toxiques que leurs homologues portant sur la périphérie les groupements carboxyles, PEG ou les molécules de l'acide folique. Par exemple, R. Duncan et col. ont rapporté l'absence d'effets secondaires tels que la perte de poids, après l'administration

intrapéritonéale à la souris porteuse de tumeurs B16F10 d'une dose répétée journalière de 95 mg/kg de PAMAM G3,5 avec une surface de type polycarboxylate de sodium [155]. Des résultats similaires ont été obtenus lors d'expériences sur les embryons du poisson zèbre, réalisée par T. King Heiden et col. En utilisant le protocole de l'exposition statique par renouvellement quotidien, ils ont trouvé que les PAMAM G4 polyaminés sont toxiques et atténuent la croissance et le développement embryonnaires à des concentrations sublétales, tandis que les structures de G3,5 polycarboxylées étaient pratiquement inoffensives [263].

Avec la modification des surfaces dendritiques par des groupements acides, on peut également s'attendre à des séjours plus longs des vecteurs dans la circulation sanguine, comme rapporté pour PAMAM anioniques (polycarboxyles), injectés chez le rat Wistar [259]. Dans ce cas, il faut cependant tenir compte des interactions avec les constituants du sang. À cet égard, L. Kaminskas et col. ont montré que chez la souris, les dendrimères poly-lysines, portant les groupements anioniques sulfonates, ont été rapidement opsonisés et retenus principalement par des organes du SRE (le foie et la rate), tandis que les structures succinées ont été rapidement éliminées par la clairance rénale [264].

N. Bourne et col. ont constaté la biocompatibilité et à la fois l'effet antiviral (contre le virus des herpès de type HSV (*Herpes simplex virus*), HSV-1 et HSV-2) de dendrimères polylysines portant à la périphérie respectivement 32 groupements $-NHCSNH-Napht-SO_3Na$ ou 64 groupements de $-NHCSNH-Ph(COONa)_2$, dans le cas du traitement topique d'infections vaginales et rectales chez la souris [265]. L'action thérapeutique s'effectue à la fois à deux niveaux: l'inhibition de l'internalisation de virus dans les cellules susceptibles et par le mécanisme lié à la réplication virale aux stades tardifs [266, 267]. Les résultats encourageants avec ces dendrimères ont été par la suite confirmés durant les tests sur les primates [268]. Présentement, ces produits dendritiques, commercialisés sous nom de VivagelTM, par la société Starfarma (Melbourne, Australie), sont en phase des essais cliniques [41]. L'utilisation de dendrimères anioniques comme agents thérapeutiques (anti-inflammatoires) a été également suggérée dans le cas de polyglycérols branchés avec la périphérie sulfonée [34].

D'autres résultats concernant la diminution de la toxicité de structures dendritiques *in vivo* (chez la souris) ont été rapportés pour les dérivés PAMAM portant à la surface les molécules de l'acide folique [110], ainsi que pour les structures hyperbranchées polypeptides à

base de PHSCN-lysine [41]. Dans le cas de dendrimères trazines, les groupements terminaux éthanolamines ont permis d'atteindre une absence de tous les effets toxiques, rénaux et hépatiques, chez la souris [136].

L'une des solutions les plus efficaces pour réduire significativement la toxicité de dendrimères polycationiques et, en même temps, de les rendre plus hydrophiles est un greffage à leur périphérie de groupements PEG (typiquement de 0,2 à 40 kDa) [269, 270]. En particulier, l'évaluation de la toxicité aiguë de dendrimères polyméamines PEGylés chez la souris, réalisée par Chen H.-T. et col., n'a montré aucun effet indésirable (au niveau de la mortalité, la toxicité, ainsi que les paramètres biochimiques du sang tels que le contenu en transaminase ou le taux d'urée) à des doses élevées, allant jusqu'à 2,56 g/kg (ip) et 1,28 g/kg (iv) [271]. Cependant, une période d'observation plus longue que rapportée (48 h) serait définitivement nécessaire afin de donner un meilleur aperçu. Selon une étude réalisée par T. Okuda et col. sur la souris, la PEGylation de dendrimères polylysines augmente à la fois la taille (2,5 fois), ainsi que la durée de séjour dans la circulation sanguine (environ 20% de la dose injectée a été récupérée à partir du plasma 24 heures après l'injection intraveineuse). L'accumulation hépatique de structures PEGylées a grandement diminué par rapport aux dendrimères non modifiés. De plus, aucun changement négatif n'a été détecté dans l'anatomie des organes tels que le foie, les reins, la rate, le cœur et les poumons [260]. Les paramètres sanguins tels que les niveaux de l'hémoglobine, RBC, WBC, de monocytes différenciés, de lymphocytes et de neutrophiles, mesurés après 14 jours suivant l'administration de PAMAM PEGylés chez le rats Sprague–Dawley, n'ont pas montré de changements importants comparativement au groupe de contrôle [144].

Afin d'assurer les propriétés adéquates de nanovecteurs dendritiques, il faut également prévoir la durée de circulation de nanovéhicules dans le système sanguin, déterminée par la clairance rénale précoce. En particulier, dans le cas de dendrimères PEGylés, biologiquement assez inertes, la filtration par les glomérules rénaux dépend principalement du rayon hydrodynamique des macromolécules. Par exemple, les petits dendrimères polylysines PEGylés sont excrétés assez rapidement avec l'urine tandis que les grosses macromolécules montrent un temps de rétention dans le sang plus élevé (**Figure 23, page 54**), permettant aussi d'atteindre le système lymphatique [259, 260, 269, 272-274].

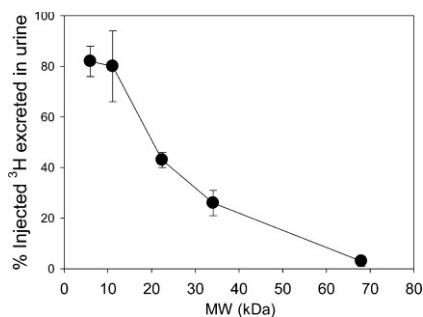


Figure 23. Corrélation entre la masse moléculaire et la proportion de la dose injectée de dendrimères polylysine PEGylés, marqués au tritium, excrétée dans l'urine chez le rat, après l'administration par voie intraveineuse de 5 mg/kg [269].

Il est intéressant de noter que la captation par le système lymphatique a été également montrée chez le rat, dans le cas d'administration orale de dendrimère PAMAM modifiés par le greffage de chaînes lipophiles et recouverts par la suite par une couche phospholipidique [186]. Il a été aussi rapporté que la présence de chaînes lipophiles, greffées à périphérie de dendrimères poly-lysines, augmente la biodisponibilité de macromolécules par la voie orale chez le rat Sprague–Dawley [275].

Parmi les structures les plus prometteuses sur le plan de biocompatibilité, les dendrimères polyesters sont présentement considérés comme ayant plus d'avenir. Les tests préliminaires de toxicité *in vivo*, menés par O. Padilla De Jesus et col. sur la souris, ont montré que la dose de 1,3 g/kg injecté pendant 10 s a été très bien tolérée durant la période d'observation de 24 h. Les dendrimères ont été assez rapidement excrétés dans l'urine (dans 4-5 h) suivi de l'accumulation allant jusqu'à 70% dans le foie. Malgré la mort d'un animal, d'autres animaux ont survécu et aucun changement pathologique dans les organes n'ont été observés après cette courte période [123]. E. Gilles et col. ont également rapporté que l'accumulation de dendrimères polyesters dans le foie de souris diminue avec l'augmentation du degré de ramification dans l'architecture macromoléculaire, permettant aussi de hausser la durée de circulation systémique [276].

1.2.5.2. Propriétés des dendrimères *ex vivo*

Dans le contexte de propriétés biologiques de dendrimères, il faut également mentionner quelques tests réalisés *ex vivo*. Leurs objectifs se limitaient principalement à

l'étude de la pénétration à travers des membranes biologiques. Par exemple, il a été rapporté que la durée de l'extravasation de PAMAM aminés marqués avec l'isothiocyanate de fluorescéine à travers l'endothélium microvasculaire dans les muscles crémaster de hamster augmente avec la montée en génération [277]. Cependant, un faible taux de transfert de PAMAM cationiques vers le côté du fœtus à travers le placenta humain *ex vivo*, par rapport aux petites molécules de médicaments, suggère qu'il serait possible de s'attendre à une sélectivité dans des traitements chez les femmes enceintes sans transfert significatif de PA au fœtus [278]. Une étude sur le sac intestinal éversé du rat adulte a montré que la pénétration de PAMAM anioniques, portant comme marqueur radioactif le ^{125}I , à travers la paroi intestinale, était plus significative comparativement aux autres structures testées, incluant les PAMAM aminés, ce qui ouvre des perspectives pour l'élaboration de vecteurs dendritiques, permettant l'administration orale [279]. Les tests de perméabilité cutanée de dendrimères PAMAM différemment fonctionnalisés (avec $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$), sur la peau d'oreilles de porc, ont permis de placer les structures, selon l'efficacité de transfert, dans l'ordre de décroissance suivant : $\text{G4-NH}_2 > \text{G4-OH} > \text{G3,5-COOH}$. Parmi les dendrimères aminés, G2-G6-NH_2 , une résistance de la peau était minimale avec la structure de G2 [142]. Il est intéressant à noter que ces résultats sont en accord avec les effets observés durant un autre travail, portant sur la perméabilité cornéenne *in vivo* de formulations ophtalmiques chez le lapin albinos de Nouvelle-Zélande [206]. Cela suggère que les mécanismes responsables pour l'absorption tissulaire de dendrimères sont de la même nature (voir plus de détails sur l'internalisation intracellulaire dans la section 1.2.5.2). D'autres composés dendritiques, constitués de fragments TRIS, éthylène-diamine guanidine, ainsi que d'acides 1,3,5-tricarboxybenzoïque et 3-hydroxypropionique (**Figure 19a, page 40**), ont été testés comme surfactant ophtalmiques pour augmenter les taux d'absorption du gatifloxacine par l'épithélium cornéen humain et le scléra-choroïde-RPE bovin isolé [210]. Dans le cas de dendrimères à base de glycérol et acide succinique, les études *ex vivo* ont été réalisées afin d'étudier leur capacité de fermer les lacérations sur la cornée humaine [59, 280, 281].

1.2.5.3. Cytotoxicité et internalisation intracellulaire des dendrimères *in vitro*

Dans le cas de tests de toxicité *in vitro* (sur les cellules ou tissus isolés), malgré le manque évident d'information liée aux conséquences globales pour la santé des organismes,

les résultats peuvent être également très utiles. Étant donné leur coût beaucoup plus bas par rapport aux tests *in vivo*, les analyses *in vitro* sont très demandées pour effectuer les tests de cytotoxicité préliminaires, ainsi que pour étudier les mécanismes d'interactions spécifiques entre une substance à l'étude et les cellules ou tissus d'intérêt. En général, avant de passer aux tests *in vivo*, les expériences *in vitro* sont d'abord effectuées. Il faut cependant noter que les résultats obtenus *in vitro* n'ont qu'un caractère indicatif et ne doivent aucunement être considérés comme prédictifs des effets *in vivo*.

Parmi les tests les plus répandus qui permettent d'évaluer la toxicité de dendrimères *in vitro*, il est à mentionner les tests de viabilité cellulaire (p.ex., sur macrophages, fibroblastes, cellules intestinales Caco-2 et autres), de l'activité hémolytique sur les globules rouges, ainsi que les tests étudiant la capacité des dendrimères à activer le système du complément [254].

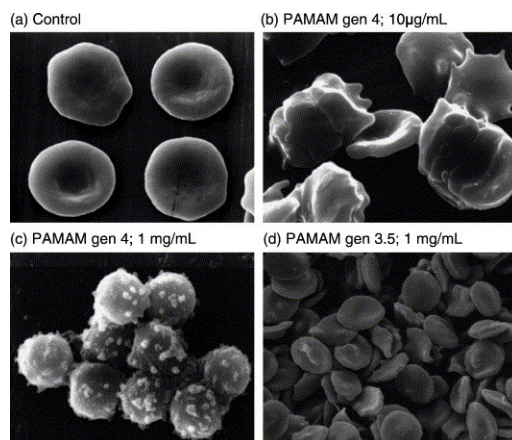


Figure 24. Résultats de microscopie électronique par balayage obtenus dans le cas de globules rouges exposés aux dendrimères PAMAM pendant 1 h [259].

D'une manière générale, les résultats de ces tests dépendent grandement de propriétés de surface de structures dendritiques, ce qui permet d'une certaine manière d'établir des parallèles avec les analyses *in vivo*. Par exemple, les dendrimères polycationiques sont considérés comme des structures présentant un certain niveau de toxicité, et de ce fait, ne sont pas très prometteuses en tant que nanovecteurs de PA. À cet égard, plusieurs études ont

montré que les PAMAM aminés possèdent des propriétés hémolytiques [144, 195, 199, 259] (voir aussi la **Figure 24, page 56**).

Dans le cas de macrophages humains U-937, l'exposition aux dendrimères PPI G2 et G3 aux concentrations permettant d'atteindre les taux de survie plus de 90% après 16 h de l'incubation, amène aux changements importants de plusieurs paramètres tels que la concentration de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO; en anglais: ROS, *Reactive Oxygen Species*), le potentiel de la membrane mitochondriale, ainsi que l'anatomie et la taille de cellules, ce qui indique un impact significatif sur le métabolisme des biosystèmes [282]. Les dendrimères polyaminés à base de mélamine provoquent une diminution substantielle (jusqu'à 80%) de survie cellulaire de Clone 9 même aux concentrations assez basses (0,1 mg/mL), ce qui suggère que ce type de dendrimères est encore plus toxique que d'autres structures polycationiques comme PPI et PAMAM [261].

Ces quelques exemples des effets cytotoxiques, causés par les dendrimères ayant les surfaces aminées (à date, plusieurs articles de revues à ce sujet, p.ex. [41, 254], ont été publiées), donnent des indications sur le mécanisme commun qui est à la base de ces phénomènes. En particulier, il s'agit de la capacité de dendrimères polycationiques de provoquer une perturbation de membranes cellulaires, en créant des pores (jusqu'à 15-40 nm dans le cas de PAMAM G7 [283]) par lesquelles les dendrimères sont absorbés par les cellules [284] et [285] (**Figure 25, page 58**). Ce mécanisme a été également confirmé dans le cas de liposomes de modèle différemment fonctionnalisées [286]. La technique de microscopie confocale a aussi permis de visualiser le processus de l'internalisation plus rapide de dendrimères PPI aminés dans les cellules endothéliales HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*), comparativement aux structures PPI portant des acétyles ou des chaînes de PEG [287].

Les tests sur les fibroblastes murins et les érythrocytes ont montré que la masse moléculaire, la densité de la charge positive, la concentration, ainsi que la durée de l'exposition aux dendrimères polyaminés, sont des paramètres clés dans les processus d'interaction avec les membranes cellulaires et, par conséquent, pour les propriétés cytotoxiques. Il est néanmoins intéressant de noter que dans ces expériences, les dendrimères PAMAM étaient moins toxiques que certains polymères aminés linéaires (dans l'ordre de décroissance : poly(éthylèneimine) = poly(L-lysine) > chlorure de poly(diallyl-diméthyle-

ammonium) > diéthylaminoéthyl-dextran > bromure de poly(vinyl-pyridinium) > PAMAM > albumine cationisée > albumine) [284]. Ce fait pourrait être expliqué par l'accessibilité plus facile de la totalité de surface polyaminée chez les structures linéaires dans les interactions avec les membranes cellulaires.

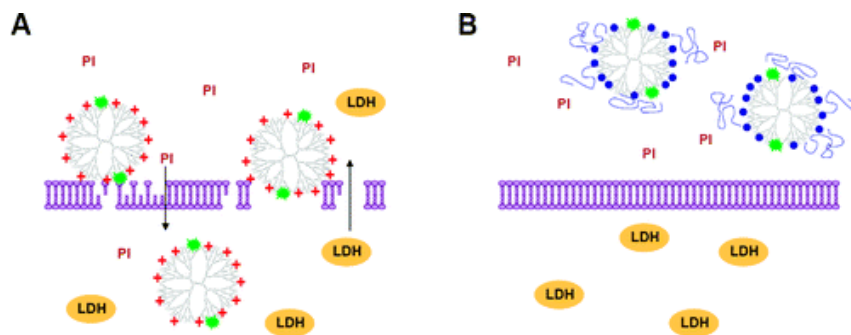


Figure 25. Illustration de l'interaction de dendrimères avec la membrane cellulaire dans le cas de dendrimères PPI aminés (a) et acylés (b) [287].

Dans certains cas, la pénétration facilitée de dendrimères cationiques dans les cellules permet de les utiliser comme agents de transfection efficaces, p.ex., en livraison d'ADN à l'intérieur des cellules mammifères [288], ou dans les traitements contre les bactéries pathogènes (p.ex., *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* [209, 289]), ainsi que pour réaliser des études de mécanismes ayant lieu pendant l'internalisation intracellulaire (comme montré avec les monocouches de cellules intestinales Caco-2 [290]). Néanmoins, étant donné que cette propriété est associée également à la toxicité non sélective par rapport aux cellules saines de l'organisme, des mesures supplémentaires seraient définitivement nécessaires avant de les proposer en tant qu'agents de nano-encapsulation de PA. Dans ce contexte, la modification chimique de groupements aminés périphériques est devenue une des solutions à la fois les plus répandues et efficaces.

Une étude réalisée par Chen H.-T. et col. sur la culture de Clone 9 a bien confirmé que la cytotoxicité de dendrimères triazines dépend principalement de la charge de surface. En particulier, parmi les différentes fonctions périphériques testées (amines, guanidines, carboxylates, sulfonates, phosphonates, et PEG), les groupements cationiques (aminés) présentaient plus d'effets toxiques au niveau de viabilité de Clone 9 et l'hémolyse. Les

structures les plus biocompatibles étaient celles portant les chaînes PEG [271]. Les résultats similaires ont été également obtenus avec les dendrimères PAMAM. Par exemple, dans le cas de PAMAM aminés, la viabilité de trois lignées cellulaires B16F10, CCRF or HepG2 a été grandement affectée aux concentrations de 10 mg/mL. La présence de ces molécules a également causé l'hémolyse accélérée. D'autre part, dans tous les tests *in vitro*, les dendrimères PAMAM carboxylés (COONa), ainsi que carbosilanes PEGylés étaient beaucoup mieux tolérés [167, 259]. Une autre étude, sur les fibroblastes murins, stipule que la cytotoxicité de PAMAM peut être même complètement supprimée dans le cas de structures avec la périphérie polycarboxylique. De plus, le greffage du ligand peptidique RGD (arginine-glycine-aspartate), pourrait résulter en sélectivité d'action par rapport aux cellules avec les récepteurs de type intégrine [291].

Les données très encourageantes ont été rapportées dans le cas de dendrimères poly(aryl propargyl éther), portant à la périphérie les groupements oxyméthyles et diméthylamine, durant les tests de cytotoxicité avec le MTT [130]. Il est cependant à noter qu'il s'agit de macromolécules non biodégradables, pouvant causer des effets indésirables à long terme (voir plus de détails dans la section suivante), ce qui prouve que les tests *in vitro* ont des limitations et devraient normalement être interprétés avec certaines précautions.

L'hydroxylation [136, 292], le greffage de l'acide folique [41, 199] ou du dextran [118] à la surface de dendrimères, respectivement, triazines, PAMAM et PPI, permet de réduire les effets indésirables dans les tests d'hémolyse. Plusieurs sources suggèrent aussi que l'acylation (p.ex., acétylation [111, 287] ou lauroylation [285]) des amines périphériques amène à l'augmentation significative de la viabilité cellulaire.

Dans le cas de dendrimères polyesters non chargés, les tests de viabilité de cellules cancéreuses murines de mélanome B16F10 ont montré des taux de survie assez élevés de 81-87% aux concentrations de macromolécules de 10 mg/mL, ce qui est plus grand comparativement aux dendrimères PAMAM, PPI et carbosilanes PEGylés [123]. Les résultats similaires ont été obtenus avec d'autres types de polyesters dendritiques, sur les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 (plus de 85% de survie à 10 mg/mL) [276]. Cependant, en présence de pseudo-dendrimères polyesters commercialisés Boltorn®, les taux de survie de cellules L929 étaient plus faibles, pouvant descendre jusqu'à 50-60% (dans certains cas, même jusqu'à 10%) à la concentration de 1 mg/mL, après 24 h de l'incubation [185]. Ce fait est très

inquiétant car il ne correspond pas à la majorité de données rapportées pour les dendrimères polyesters réguliers, considérés généralement comme des structures les plus prometteuses en livraison de PA. Par exemple, dans une étude très récente sur les cellules de cancer ovarien SKOV-3, les structures dendritiques analogues, portant de plus des groupements thioéthers, pouvant présenter une activité biologique, se sont révélés non toxiques même à des doses très élevées [241]. Il est donc possible que la sensibilité par rapport aux macromolécules branchées polyesters change aussi en fonction du type de cellules utilisées. Dans ce contexte, il est à mentionner que le problème de reproductibilité de tests de cytotoxicité de dendrimères, dépendamment de la culture cellulaire, a été déjà soulevé dans l'article de revue de R. Duncan et L. Izzo [254]. Ceci pourrait être également dû aux différents mécanismes d'endocytose, impliqués dans l'internalisation de macromolécules par différents types de cellules. Par exemple, certains données suggèrent que dans le cas de dendrimères polyesters, le principal type de transfert intracellulaire est l'endocytose en phase liquide [254]. Par conséquent, les cultures cellulaires les plus sensibles à ces macromolécules seront celles qui utilisent d'avantage ce mécanisme de transport transmembranaire.

1.2.5.4 Biodégradabilité de nanovecteurs dendritiques

Comme déjà indiqué précédemment, la majorité des études concernant l'activité biologique de dendrimères, y compris les effets toxiques observés *in vivo* et *in vitro*, se limite à étudier l'influence des propriétés de surface de ces macromolécules, sans mentionner l'influence de la nature des produits de biotransformation. Néanmoins, le comportement de structures dendritiques au niveau de leur biodégradabilité et les propriétés des produits résultant de cette biodégradation peut également influencer sur l'efficacité globale de ce type de nanovecteurs.

Les macromolécules non biodégradables qui ne peuvent être éliminées par clairance rénale, ont tendance à s'accumuler à l'intérieur de l'organisme, en causant des effets indésirables. Par exemple, il est connu qu'après l'administration IV chez la souris, les polymères hydrophiles linéaires (N-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide et N-[2-(4-hydroxyphényl)éthyl]acrylamide etc.) dont la masse moléculaire dépasse 18 kDa sont partiellement retenus à l'intérieur de l'organisme. Ils se retrouvent sous forme de dépôt dans différents organes, de préférence, dans la peau et les muscles. La vitesse de l'élimination des

macromolécules diminue avec l'augmentation de leur taille [293]. Il faut également mentionner que l'accumulation intracellulaire de polymères non biodégradables peut causer la maladie lysosomale [254, 294]. Dans le cas de dendrimères ayant les structures relativement stables (PPI, PAMAM, poly-lysines, polyéthers etc.), le stockage s'effectue principalement dans le foie [97].

Dans ce contexte, l'utilisation de macromolécules biodégradables présente plus d'avantages car elles pourraient être d'abord réduites en petits fragments métabolisés, lesquels seraient ensuite soit éliminés directement par clairance rénale, soit réutilisés utilement par l'organisme dans ces propres besoins biologiques. À cet égard, les dendrimères dont l'intégrité est maintenue par les liaisons esters, peuvent être dégradés en présence d'une carboxyesterase [97, 281, 295, 296]. Quelques recherches ont également montré une possibilité d'hydrolyser les esters dans les milieux faiblement acides, neutres ou basiques [276]. Par conséquent, les dendrimères polyesters comme biomatériaux artificiels et biodégradables représentent une classe de macromolécules très attrayante. Néanmoins, il a été rapporté que les taux d'hydrolyse de ces structures peuvent varier grandement, en fonction de particularités de leurs architectures telles que la présence des fragments hydrophobes, des gênes stériques etc. [281].

Parmi les groupements chimiques, assurant la biodégradabilité de macromolécules, il est aussi à mentionner les ponts disulfures, sensibles au glutathion. Le glutathion (GSH), un tripeptide est produit par la majorité de cellules des mammifères. Son rôle est essentiel dans les mécanismes cellulaires de protection chimique. Dans le cas de certaines maladies telles que cancers, inflammation etc., l'expression du GSH est plus élevée dans les sites pathologiques que dans les tissus et cellules sains. À cet égard, le groupement disulfure a été utilisé dans de nombreuses études pour effectuer le relargage ciblé de PA, en greffant les molécules actives à la périphérie de dendrimères [97, 138, 297]. Récemment H. Liu et col. ont également rapporté la synthèse de polymères réticulés, obtenus à partir de molécules PAMAM G2, liées par les ponts disulfures. Ces composés ont été proposés comme agent de transfection intracellulaire et ils sont caractérisés par une faible cytotoxicité [298].

Une solution très intéressante et pratique consiste à combiner les avantages de structures dendritiques polyesters avec les propriétés du groupement disulfure. En particulier, la compagnie Polymer Factory a commercialisé une série de produits dendritiques, PFD, à

cœur disulfure qui présentent les dendrimères polyesters de G1-5, portant des groupements périphériques hydroxyles (**Figure 26, page 62**) ou acétonides [243].

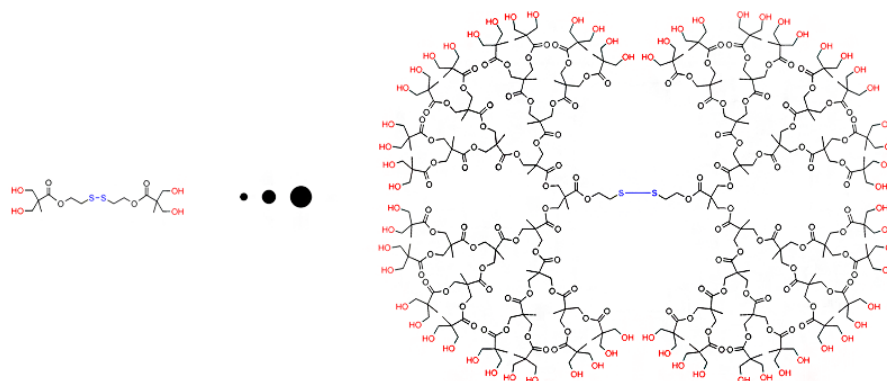


Figure 26. Structure de dendrimères polyesters PFD de G1 et G5 à cœur disulfure, produits de la compagnie Polymer Factory [243].

Des résultats intéressants sur l'autoclivage complet de dendrons, initié par le détachement d'une molécule chimiquement active, ont été récemment rapportés. Par exemple, la dégradation de dendrons assemblés par les groupements carbamates, liés avec les unités 2,6-bis(hydroxyméthyl)-*p*-cresol, a été déclenchée par une libération spontanée d'un dérivé aminé [299, 300]. « L'auto-immolation » de macromolécules portant les liaisons phénéthyl-carbonates a été effectuée en présence de zinc et d'acide acétique [301]. Une autre approche a été basée sur l'activité chimique du *p*-nitrophénol (libéré premièrement sous l'effet de l'irradiation UV), exercée sur les dérivés de 2,4-bis(hydroxyméthyl)phénol [302]. Il est cependant à noter que dans ces trois cas, les expériences se rapprochant de conditions *in vivo*, incluant l'étude sur des effets toxiques possibles liés à la présence du zinc ou du *p*-nitrophénol, n'ont pas été réalisées.

1.2.6. Encapsulation de principes actifs antifongiques dans les dendrimères

1.2.6.1. Dendrimères comme agents de nano-encapsulation des molécules antifongiques

Comme déjà mentionné (section 1.2.3.3), un des domaines médicaux, où les dendrimères pourraient être potentiellement très en demande, est la thérapie antifongique avec certaines substances actives hydrophobes qui sont déjà approuvées, mais qui présentent cependant des difficultés à atteindre une efficacité optimale. Étant encapsulé dans un nanovecteur dendritique à l'architecture convenable, le PA hydrophobe serait susceptible d'être plus soluble dans les milieux aqueux, ce qui faciliterait sa distribution dans la circulation sanguine, essentielle dans le cas d'infections systémiques. Par exemple, le PPI G5 a été proposé pour augmenter la solubilité de l'amphotéricine B [198]. Les PAMAM G2-3 avec une surface modifiée par le greffage de TRIS ont été utilisés pour encapsuler les acides benzoïque et salicylique [212].

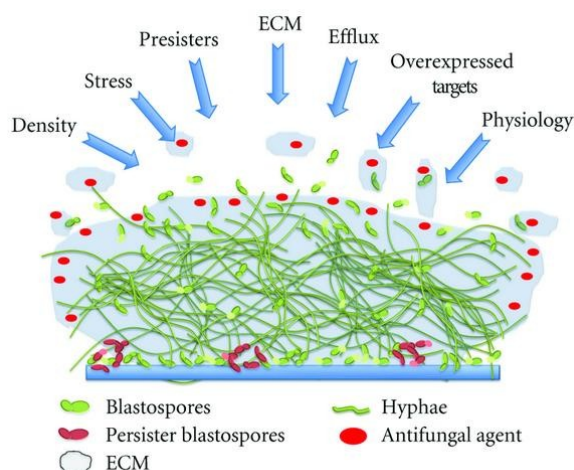


Figure 27. Aperçu schématique de différents facteurs qui déterminent la résistance antifongique au sein d'un biofilm, y compris la densité, le stress, les persistants, la matrice extracellulaire (ECM), les pompes d'efflux, les cibles en excès et la physiologie générale de biofilm [303].

En dehors d'améliorations au niveau de la solubilité, la taille nanométrique et uniforme des dendrimères pourrait être bénéfique pour pénétrer efficacement les biofilms* de

champignons, ce qui serait utile dans le cas des formulations antifongiques injectables et topiques [*Le biofilm est une matrice extracellulaire secrétée par les champignons, exerçant le rôle de biofiltre sélectif, permettant la meilleure protection de la population de cellules pathogènes contre les mécanismes de protection de l'organisme-porteur, ainsi que contre les PA antifongiques. Il est observé dans les cas de champignons pathogènes de familles *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Coccidioides* et *Pneumocystis* [303-306] (**Figure 27, page 63**)].

Les mécanismes de protection ci-mentionnés, ainsi que la nature eucaryote des champignons, possédant la machinerie cellulaire similaire aux organismes supérieurs tel qu'humain, nécessitent des approches très spécialisées dans les traitements médicamenteux. Depuis plusieurs décennies, malgré les avancées importantes en médecine, le nombre de patients atteints d'infections fongiques est en croissance. Ceci est généralement dû à l'augmentation des cas liés à la suppression du système immunitaire (cancer, transplantation d'organes, SIDA etc.), ce qui diminue la résistance antifongique naturelle de l'organisme [307].

Compte tenu de la diversité morphologique de différentes espèces de champignons pathogènes (plus de 600 en tout), l'application de PA possédant un large spectre d'activité antifongique est toujours une préférence. Actuellement, la classe d'agents antifongiques azolés est considérée comme l'une des plus vastes et efficaces. Les premiers PA de ce type ont été élaborés par le groupe Janssen à la fin des années 1960 [307]. L'efficacité de ces substances est expliquée par leur sélectivité élevée d'action contre les champignons (voir plus de détail dans la section 1.2.6.2). Néanmoins, malgré cet avantage au niveau cellulaire, les antifongiques azolés présentent souvent des problèmes de solubilité. Bien que de nombreuses solutions soient déjà proposées pour y remédier, l'élaboration de nouveaux systèmes d'encapsulation est toujours d'actualité. Par exemple, il a été récemment rapporté qu'en présence de dendrimères PAMAM G2 et G3, modifiés par greffage de TRIS, la solubilisation du tioconazole restait toujours très faible [212].

Étant donné que l'un des objectifs du présent projet de recherche consiste à élaborer de nouveaux systèmes dendritiques pour encapsuler l'itraconazole (un PA antifongique azolé), la section suivante sera consacrée aux propriétés de cette substance, ainsi qu'aux données bibliographiques concernant l'amélioration de sa solubilité.

1.2.6.2. Itraconazole

L'itraconazole (ou ITZ; **Figure 28, page 65**) est un agent antifongique de type triazole. Il a été inventé en 1980 et ensuite, commercialisé en 1986 sous le nom "SporanoxTM" par Janssen Pharmaceutica [308].

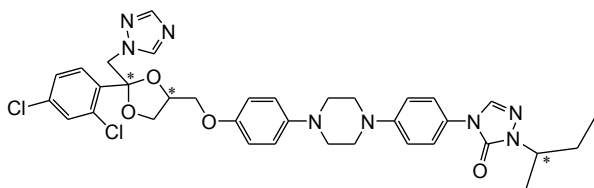


Figure 28. Structure chimique de l'itraconazole

Le nom chimique complet de l'ITZ, selon la nomenclature IUPAC, est (+)-1-[(RS)-sec-butyl]-4-[p-[4-[p-[[(2R,4S)-2-(2,4-dichlorophényl)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylméthyl)-1,3-dioxolan-4-yl]méthoxy]phényl]-1-piperaziny]phényl]- Δ^2 -1,2,4-triazolin-5-one. Le PA présente un mélange racémique (1:1:1:1) de quatre diastéréomères (deux paires énantiomériques) avec trois centres chiraux: (+)-1-[(R*)-sec-butyl]-4-[p-[4-[p-[[(2R*,4S*)-2-(2,4-dichlorophényl)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylméthyl)-1,3-dioxolan-4-yl]méthoxy]phényl]-1-piperaziny]phényl]- Δ^2 -1,2,4-triazolin-5-one et (+)-1-[(R*)-sec-butyl]-4-[p-[4-[p-[[(2S*,4R*)-2-(2,4-dichloro-phényl)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylméthyl)-1,3-dioxolan-4-yl]méthoxy]phényl]-1-piperaziny]phényl]- Δ^2 -1,2,4-triazolin-5-one qui possèdent une formule moléculaire brute $C_{35}H_{38}Cl_2N_8O_4$ et une masse molaire de 705,64 g/mol [309-311].

L'ITZ se présente sous forme d'une poudre cristalline blanche avec un point de fusion de 166,2°C [312], pratiquement insoluble dans l'eau (<1 µg/ml dans les solutions aqueuses aux pH 1,0–12,7 [313]), très peu soluble dans l'éthanol, aisément soluble dans le dichlorométhane, modérément soluble dans le tétrahydrofurane [314]. Il est une base faible avec un pKa de 3,7 (basé sur l'extrapolation des valeurs obtenues pour les solutions méthanoliques) et le log du coefficient de partage (n-octanol/eau) de 5,66 à pH 8,1, ce qui signifie que cette substance est très hydrophobe [310, 315]. L'ITZ a une stabilité limitée aux températures élevées et aux bas pH [316]. Il est entreposé dans des contenants hermétiques protégés de la lumière [317]. Présentement, les propriétés physiques et chimiques de ce PA

ainsi que ses caractérisations structurales par différentes méthodes sont déjà bien étudiées [317].

Faiblement toxique pour l'humain, l'ITZ est hautement actif contre plusieurs espèces de champignons pathogènes telles que *Aspergillus* spp., *Blastomyces dermatitidis*, *Candida* spp., *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Epidermophyton* spp., *Histoplasma capsulatum*, *Malassezia furfur*, *Microsporium* spp., *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*, *Trichophyton* spp. etc., en tout, contre 12 différentes familles. Ceci favorise son application surtout chez les patients immunodéprimés (les cas de cancer, SIDA, ou de transplantation d'organes) [307, 309, 314, 315, 318-328].

Le mécanisme de l'activité antifongique de l'ITZ est typique des PA azolés et consiste principalement à inhiber la synthèse de l'ergostérol (une substance nécessaire pour la formation de la membrane cellulaire des champignons). En particulier, il interagit avec le lanosterol-14 α -déméthylase (CYP51), une enzyme nécessaire pour transformer le lanostérol en son dérivé déméthylé (**Figure 29, page 66**) [307]. Par conséquent, les membranes fongiques privées de l'ergostérol deviennent trop perméables, ce qui cause la destruction de champignons par la fuite du contenu cellulaire.

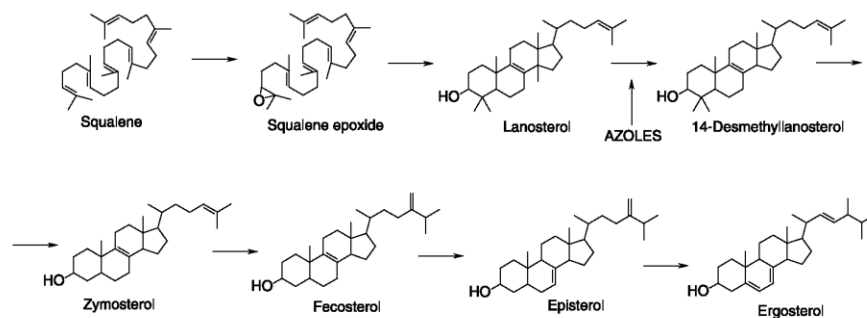


Figure 29. Voie de la biosynthèse d'ergostérol avec le point d'inhibition par les azoles [307].

L'efficacité antifongique de l'ITZ est également expliquée par l'inhibition de la respiration endogène, l'empêchement de la formation des formes micellaires par les levures (en réagissant avec les phospholipides membranaires), ainsi que par le blocage de l'absorption des purines et de la biosynthèse impaire de triglycérides et/ou phospholipides [310, 319].

Les doses thérapeutiques journalières de l'ITZ sont de l'ordre de 100 à 400 mg, dépendamment des indications. Les pics plasmatiques sont atteints entre 1,5 et 5 h. Ce principe actif est métabolisé dans le foie, majoritairement, par la voie oxydative avec le cytochrome P450 isoenzyme CYP3A4. Le métabolite majeur, hydroxyitraconazole, possède une activité antifongique comparable à celle de l'ITZ. Dans le sang, l'ITZ et l'hydroxyitraconazole sont principalement liés aux protéines avec les taux respectivement de 99,8 et 99,5%. Les deux inhibent le système CYP3A4. La demi-vie pour une dose de 100 mg du PA est de 20 h, cependant, elle peut augmenter jusqu'à 30-40 h, si le médicament est pris continuellement. La biodisponibilité absolue maximale de l'ITZ par voie orale est de 55% (uniquement dans les conditions favorables telles que la prise avec un jus d'agrumes) [310, 314]. Dans le cas de l'administration IV, le volume de distribution est de 796 ± 185 L et la clairance totale est de 381 ± 95 mL/min [310]. La concentration toxique dans le sérum pour la somme de l'ITZ et de son hydroxy-métabolite est de 6 mg/L [312].

Présentement, il existe 171 préparations d'ITZ mono-ingrédients, commercialisées dans 41 pays, et 3 préparations à plusieurs ingrédients dans 2 pays [314]. Cependant, malgré la haute activité antifongique, la biodisponibilité basse de ce PA (expliquée par sa faible solubilité dans les milieux aqueux [313]) demeure toujours un problème important dans le développement de ses formulations [12]. Pour contourner cet obstacle, différentes approches ont été proposées, en particulier, les solutions solides dans les PEGs [329], l'argile laponite soluble dans l'eau [313], l'acide phosphorique [330], les dispersions solides avec l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) hydrosoluble [331], les extrusions à température élevée avec HPMC et Eudragit E100 et avec le mélange Eudragit E100-PVPVA64 [332]. L'ITZ peut aussi être formulé sous forme de complexes avec le 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HP- β -CyD) [316, 333, 334] et de mélanges du HP- β -CyD avec le HPMC obtenus par extrusion à haute température [335]. La méthode de fusion à chaud a été également utilisée pour préparer les formulations semi-solides avec le Polysorbate80 et les acides oléique, laurique, maléique et citrique [12]. Certains travaux concernent l'encapsulation de l'ITZ dans les liposomes contenant les phospholipides et les additifs lipophiles tels que cholestérol, diméthylisorbide, tétraglycol etc. [336], ainsi que les liposomes basées sur les mélanges d'éosine, lécithine, cholestérol, déoxycholate de sodium, mannitol and lactose [337]. Un intérêt particulier a été porté sur l'application de microémulsions [315] et micelles [338]

contenant les huiles triglycérides et les surfactants non-ioniques. Récemment, l'encapsulation du PA dans les nano-particules polymériques à base de l'acide poly-lactique [339, 340] et dans les micelles formées par les star-polymères présentant les acides biliaires modifiés par le greffage de chaînes PEG [341] a été également décrite. Les résultats très encourageants ont été obtenus dans le cas de nanoparticules composées de lipides solides et liquides [342]. Néanmoins, dans la pratique pharmaceutique, le nombre d'excipients adoptés pour encapsuler l'itraconazole n'est pas si grand. Dans les médicaments commercialisés sous le nom Sporanox® de Janssen Pharmaceutica, conçus respectivement pour l'administration orale et iv, on utilise les complexes d'inclusion avec les cyclodextrines [316, 343]. Une autre forme orale, des capsules de Sporanox®, contient à l'intérieur de l'enveloppe externe dure les sphères à base de sucrose et HPMC, sur lesquelles un mélange de gélatine et ITZ a été pulvérisé [310, 329, 344]. Il est à noter que la biodisponibilité de l'itraconazole sous forme de capsules Sporanox® ne dépasse pas 37%, tandis que pour les solutions Sporanox® elle peut atteindre jusqu'à 55% [345]. Cependant, l'utilisation de solutions Sporanox® est limitée dû à la toxicité des cyclodextrines pouvant causer dans certains cas l'adénocarcinome pancréatique comme montré chez le rat [346].

En conclusion, on peut constater que malgré les avancées des traitements antifongiques avec l'itraconazole, la biodisponibilité de ce principe actif reste toujours faible. Par conséquent, des excipients efficaces, permettant d'améliorer la solubilisation de ce PA dans les milieux aqueux sont toujours en demande. Par exemple, notre analyse de brevets de la bibliothèque internationale de l'Office européen des brevets [347] sur des applications, la synthèse et les formulations de l'ITZ, montre que parmi 263 documents trouvés, plus de 87% sont sur les formulations permettant la solubilisation de ce principe actif dont plus de 94% sont publiés après 2000. À cet égard, il est également à mentionner qu'au moment de la mise en place du présent projet de recherche, aucun vecteur dendritique n'avait été encore proposé pour encapsuler ce principe actif.

1.3. Conclusion de l'analyse bibliographique. Formulation de l'hypothèse et d'objectifs de la recherche

Ainsi, l'analyse bibliographique présentée dans le chapitre 1 de ce manuscrit montre qu'en règle générale, l'application des systèmes de nanoencapsulation non covalente pour remédier au problème de mauvaise biodisponibilité de PA hydrophobes constitue une approche très prometteuse sur le plan à la fois médical et économique. Les recherches réalisées par de nombreuses équipes ont permis d'élucider les facteurs cruciaux pour ce type de vectorisation tels que la biocompatibilité et la biodégradabilité du vecteur, de différents types d'interactions physicochimiques avec le PA, l'influence de paramètres du milieu etc. Elles ont également permis d'élaborer de nouveaux agents de nanoencapsulation, en ouvrant ainsi de larges perspectives pour le développement futur de ce domaine. Dans ce contexte, l'utilisation de dendrimères, structures parfaitement définies, est considérée parmi les meilleures solutions. Une faible polydispersité de ces macromolécules, ainsi que leur intégrité structurale, amène respectivement une reproductibilité élevée de résultats et, également, une stabilité plus grande par rapport aux vecteurs multimoléculaires tels que micelles polymériques et liposomes.

Malgré les progrès significatifs, les systèmes de nanoencapsulation (y compris les dendrimères) possèdent également un certain nombre de désavantages qui empêchent grandement leurs applications à grande échelle. En particulier, les experts soulignent l'importance de résoudre les problèmes liés à: (i) une faible efficacité d'encapsulation, menant soit aux concentrations insuffisantes de PA pour atteindre des effets thérapeutiques voulus, soit à des quantités de vecteurs très élevées, pouvant provoquer des conséquences indésirables, et (ii) une libération trop rapide (phénomène de «*burst release*») de PA *in vivo*, ce qui cause un relargage non ciblé dans le corps, entraînant une baisse d'activité, ainsi que des effets secondaires [172, 192].

Dans le cas de dendrimères, bien que de nombreuses macromolécules polyesters soient reconnues biodégradables et non toxiques, leur potentiel reste encore loin d'être exploré tant au niveau de la variété structurale que des approches de synthèse [229]. Par exemple, il est évident que la conception de nouveaux agents dendritiques de nanoencapsulation nécessite tout d'abord une meilleure compréhension des mécanismes d'interaction physico-chimiques

entre le vecteur et le PA [41]. Cependant, l'impact exact de différents groupements chimiques internes sur le processus d'encapsulation restent toujours mal étudié. Les recherches concernant l'élaboration de vecteurs dendritiques, sélectifs par rapport à une molécule active connue et avec une grande pertinence en clinique, en se basant sur l'évaluation quantitative de facteurs structuraux, bien que représentent une étape logique du développement, sont plutôt très rares.

La plupart des études consistent premièrement à proposer de nouvelles structures dendritiques ou à modifier chimiquement celles qui sont déjà connues, et, ensuite, à réaliser les tests de captation/libération d'une série de PA de modèles qui possèdent généralement une mauvaise biodisponibilité. Cette stratégie assez simpliste sur le plan de la sélectivité du vecteur par rapport à la structure de PA, résulte souvent en des taux de charge et une vitesse de relargage inappropriés pour les utilisations cliniques. En particulier, la majorité des dendrimères polyesters, proposés à cette fin, possèdent souvent les cavités lipophiles internes trop petites ou mal adaptées pour pouvoir retenir efficacement des molécules actives hydrophobes dont la masse moléculaire dépasse quelques centaines Daltons (ce qui est typique pour les PA modernes). Par conséquent, le besoin de nanovecteurs dendritiques plus sélectifs reste toujours d'actualité.

Une solution possible à ce problème de sélectivité insuffisante, proposée dans le cadre du présent projet de recherche, repose sur l'élaboration de nouveaux systèmes d'encapsulation dendritiques, en utilisant l'approche alternative combinatoire, incluant les stades, respectivement, (i) de la présélection des éléments structuraux de futurs dendrimères polyesters, (ii) de simulations du processus d'encapsulation *in silico* d'une molécule active d'intérêt par les dendrimères constitués d'éléments structuraux présélectionnés, (iii) de l'assemblage chimique de structures dendritiques les plus prometteuses selon les calculs préliminaires, (iv) de tests préliminaires pour élucider des effets toxiques possibles, (v) de la vérification de l'efficacité d'encapsulation d'un principe actif hydrophobe, et, finalement, (vi) de l'étude d'efficacité des formulations élaborées contre une espèce de cellules pathogène *in vitro*. Ainsi, l'hypothèse du présent projet de recherche est que *la réalisation de cette approche alternative combinatoire va permettre la création de nouveaux agents d'encapsulation dendritiques qui seront plus efficaces par rapport aux systèmes connus.*

Afin de tester cette hypothèse, l'objectif de la première partie du travail sera de choisir les éléments structuraux de futurs dendrimères (cœurs, groupements espaceurs, points de divergence et groupements terminaux), présentant des substances non toxiques et à la fois permettant l'assemblage efficace de nouvelles macromolécules au moyen de liaisons esters. La deuxième étape consistera à effectuer les procédures de simulation computationnelle pour évaluer au préalable l'affinité de vecteurs dendritiques à base d'éléments structuraux présélectionnés pour une molécule active hydrophobe (dans le cadre du présent travail, l'itraconazole), en utilisant une méthode de mécanique moléculaire (Amber3). Les buts des troisième et quatrième étapes seront respectivement de réaliser la synthèse chimique de dendrimères, dont les structures seront choisies en se basant sur les calculs *in silico*, et de faire les études d'encapsulation du PA dans les systèmes réels. Ces étapes serviront donc à vérifier l'exactitude de résultats de calculs obtenus à la deuxième étape. Les objectifs des deux dernières parties du travail seront d'effectuer les tests de cytotoxicité sur les macrophages murins (RAW-262.7), selon une méthode standard de viabilité cellulaire, et, finalement, de vérifier l'efficacité de systèmes dendrimère-itraconazole sur une espèce de champignon pathogène appropriée (*Candida albicans*) *in vitro*. Les résultats de tests antifongiques seront comparés avec les résultats obtenus dans les cas du principe actif non formulé et, également, d'une formulation présentée actuellement sur le marché.

Chapitre 2. Choix des éléments structuraux et les travaux de synthèse préliminaires

2.1. Description générale du concept dendritique proposé

L'analyse bibliographique présentée dans le chapitre précédent montre que malgré de nombreux avantages potentiels par rapport aux autres types de nanovecteurs, les dendrimères ne sont toujours pas considérés comme étant compétitifs sur le marché. Les raisons possibles expliquant cette situation sont suivantes:

- toxicité des structures dendritiques disponibles à grande échelle que se soit au niveau du dendrimère lui-même, soit au niveau des produits de biodégradation;
- faible taux d'encapsulation des principes actifs dû principalement à la taille des cavités internes hydrophobes insuffisamment grande ou mal adaptée pour retenir efficacement des PA dont la masse dépasse quelques centaines Daltons;
- libération trop rapide et incontrôlable de la charge thérapeutique.

Ainsi, notre objectif global est donc d'élaborer de nouvelles structures dendritiques permettant de remédier aux problèmes ci-mentionnés. En particulier, une solution possible à la toxicité des dendrimères repose sur l'utilisation de structures polyesters, composées respectivement de fragments d'alcools et d'acides carboxyliques choisis en raison de leur biocompatibilité. De plus, nous pouvons raisonnablement nous attendre à ce que les dendrimères soient plus efficaces comme agents d'encapsulation des PA hydrophobes s'ils sont constitués d'une partie centrale (interne) hydrophobe et une partie externe hydrophile (Figure 30, page 73).

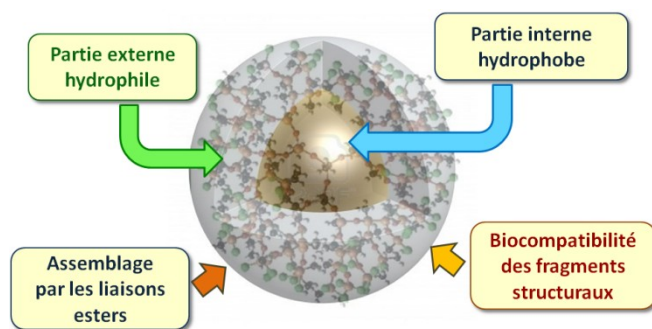


Figure 30. Concept général de nouveaux dendrimères, proposés pour encapsuler des molécules de principes actifs hydrophobes.

La présence d'un élément central hydrophobe devrait favoriser l'affinité pour les molécules actives hydrophobes, résultant en l'augmentation du taux d'encapsulation. La couche externe hydrophile pourrait rendre ces structures solubles dans l'eau.

D'une manière générale, le principe de fonctionnement de nanotransporteurs de ce type se réalise en plusieurs étapes. D'abord, pour effectuer l'encapsulation d'un PA hydrophobe, il faut s'assurer que les deux constituants du système, dendrimère et PA, sont suffisamment solubles dans un solvant approprié. Dans ce cas, les molécules de PA devraient avoir un accès libre à l'intérieur apolaire de dendrimère (**Figure 31a, page 74**). Ensuite, en changeant le milieu par un solvant plus polaire, les molécules de PA se déplacent vers la partie centrale du vecteur où elles restent retenues sous l'effet de l'attraction hydrophobe (**Figure 31b, page 74**).

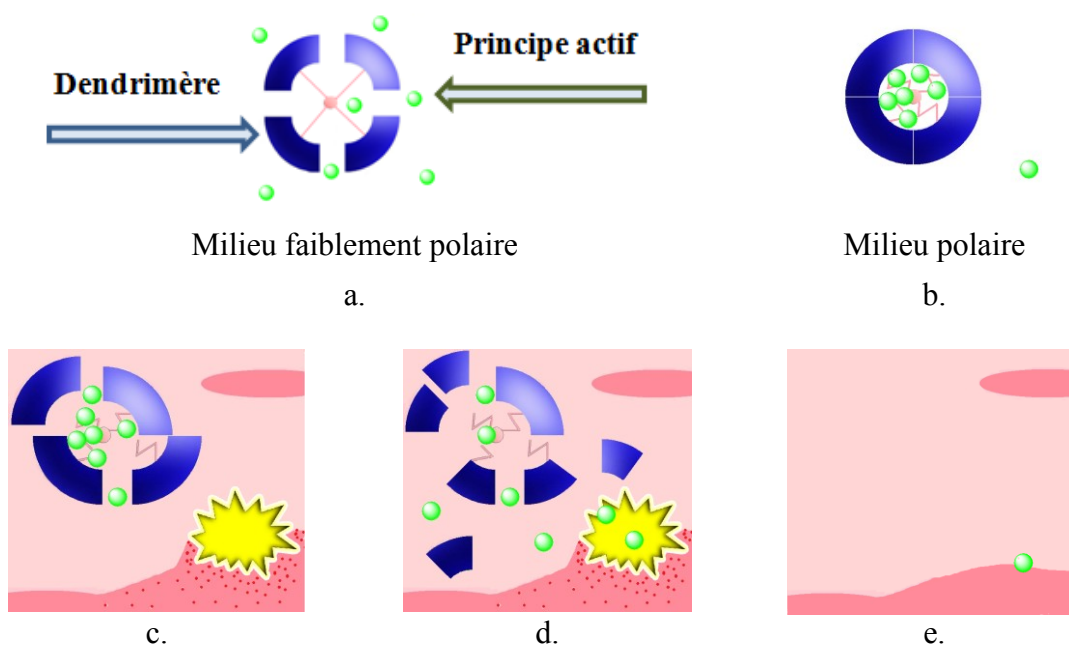


Figure 31. Étapes de fonctionnement de nanotransporteurs dendritiques proposés: l'encapsulation du principe actif, en changeant le milieu faiblement polaire (a) par un solvant polaire (b), la libération du principe actif par diffusion ou dégradation du vecteur (c et d) et l'élimination des produits de biodégradation (e).

Pour l'obtention de formes galéniques sèches, l'étape suivante sera l'enlèvement des solvants. Cependant, il existe également une possibilité d'administrer les complexes d'inclusion résultants sous forme de solution. Après l'administration, le vecteur commence son parcours à l'intérieur de l'organisme du patient. À cette étape, il est important que le complexe d'inclusion demeure stable jusqu'à son arrivée au site de traitement thérapeutique, où il doit normalement libérer le PA encapsulé soit par diffusion, soit par dégradation du vecteur (**Figure 31c-d, page 74**). L'étape finale est l'élimination facilitée des produits résultant de la dégradation de dendrimère (**Figure 31e, page 74**).

2.2. Choix des éléments structuraux de futurs dendrimères

Afin de réaliser le concept général présenté dans la section précédente, l'étape initiale de notre travail consiste à choisir les éléments structuraux de nos futurs dendrimères : cœur, groupements-espaceurs, agent de branchement et groupements terminaux (**Figure 32, page 75**).

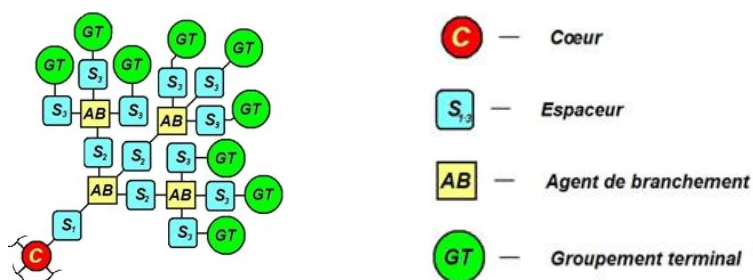


Figure 32. Représentation schématique d'éléments structuraux de futurs dendrimères

Plus précisément, il s'agit de choisir les structures des petites molécules organiques à partir desquelles les macromolécules finales seront assemblées. En particulier, on peut s'attendre à ce qu'en utilisant des éléments de base non ou faiblement toxiques, liés entre eux par des liaisons esters (alcools et acides carboxyliques), les dendrimères ainsi que les produits de leur biodégradation seront biocompatibles. De plus, l'utilisation des composés de départ qui sont nouveaux en assemblage dendritique, ainsi qu'à bas coût, fournira des données permettant par la suite d'évaluer les perspectives de leur application à grande échelle.

2.2.1. Sélection des structures de cœurs et travaux de synthèse préliminaires

2.2.1.1. Présélection des structures de cœurs

Un cœur de dendrimère représente l'élément qui détermine le nombre des dendrons ainsi que leur orientation (**Figure 32, page 75**). Des structures portant plusieurs (>2) fonctions chimiques de même nature et facilement modifiables sont généralement utilisées en tant que cœurs. Dans le contexte de vectorisation des PA, le cœur peut également jouer un rôle assez important, dépendamment de son affinité pour des molécules à encapsuler. De plus, compte tenu de la biodégradabilité de dendrimères polyesters dont la synthèse est prévue pour ce projet de recherche, les molécules exerçant la fonction de cœur ne doivent pas présenter d'effets toxiques significatifs connus.

En se basant sur les critères ci-mentionnés, comme structures de cœurs de nos futurs dendrimères, nous avons initialement choisis différents composés représentant respectivement 7 acides polycarboxyliques (**C-I-VII**) et un polyalcool **C-VIII** (**Figure 33, page 76**): tétra-oxysuccinyl-pentaérythritol (**C-I**), tétra-oxysuccinyl-1,3,5,7-tétrahydroxy-adamantane (**C-II**),

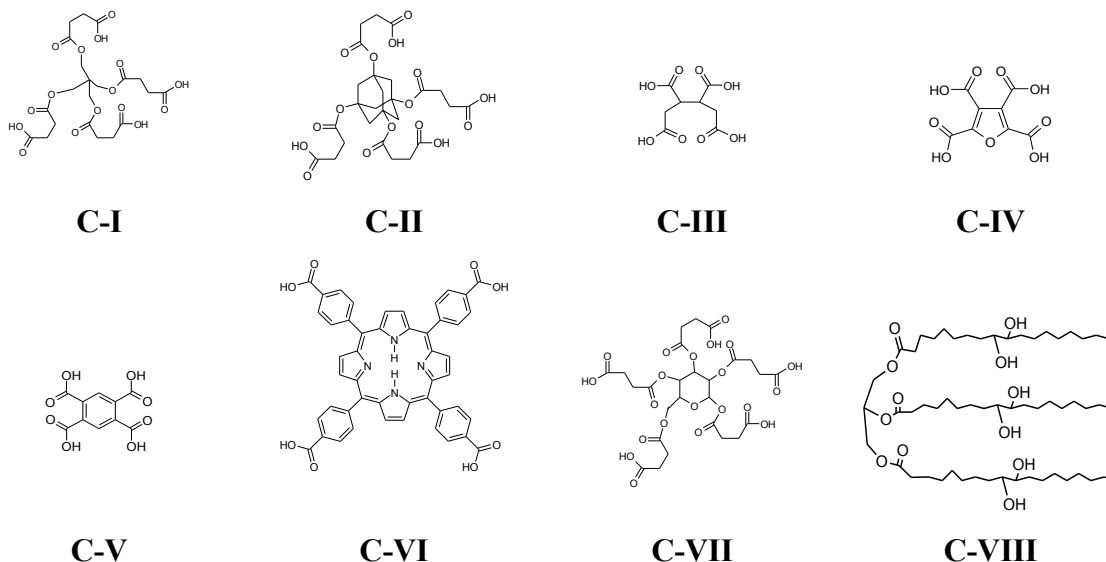


Figure 33. Structures initialement choisies comme cœurs de dendrimères dans le cadre du présent projet de recherche

acide butane-1,2,3,4-tétracarboxylique (**C-III**), acide furane-2,3,4,5-tétracarboxylique (**C-IV**), acide benzène-1,2,3,4-tétracarboxylique (**C-V**), acide 4,4',4'',4'''-(porphine-5,10,15,20-tétrayl)tétrakis-benzoïque (**C-VI**), penta-oxysuccinyl-dextrose (**C-VII**) et glycéryl tris[9,10-(*thréo*)-dihydroxyoctadécanoate] (**C-VIII**). Ils diffèrent par la taille, la rigidité et le nombre de groupements modifiables (carboxyliques ou hydroxyles). Il est également à noter que les structures **C-I**, **C-II**, **C-VII** et **C-VIII** sont des nouveaux composés dont les synthèses et caractérisations seront décrites dans la section suivante, tandis que les molécules **C-III-VI** sont des produits commerciaux. L'acide butane-1,2,3,4-tétracarboxylique (**C-III**) a été déjà proposé par R. Dhanikula et col. [84, 105, 106, 234] comme cœur des dendrimères.

Pour ce qui concerne des effets toxiques possibles des produits commerciaux **C-III-VI** (la toxicité des nouvelles structures de cœur sera discutée plus tard), notre analyse bibliographique montre que les données disponibles ne permettent pas de conclure, avec certitude. Par exemple, le composé **C-III** peut être considéré comme étant assez bien toléré. En effet, il appartient à la classe des substances *légèrement toxiques*, selon l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner [348], car la valeur de sa dose létale à 50% (DL50) dans le cas de l'administration orale chez le rat est de 1720 mg/kg [349]. Les études plus approfondies menées par C. J. Price [350] et de J. D. George [351] montrent également l'impact assez faible du **C-III** sur l'état de santé des rats. Les valeurs trouvées pour le composé **C-V** se limitent uniquement à la DL50 par administration IP chez la souris (300 mg/kg [349]). Par conséquent, sa classe de toxicité selon Hodge et Sterner reste non déterminée. Les résultats expérimentaux concernant la toxicité de tétraacides **C-IV** et **C-VI** sont absents. Ainsi, l'information disponible ne permet pas de conclure sur l'impact global de la présence de composés **C-III-VI** administrés chez l'humain, surtout, à long terme. Cependant, ceci n'est pas inusité car c'est le cas de la majorité des substances chimiques connues. Dans le cadre de la présente recherche, nous allons donc considérer une substance comme étant *biocompatible* si elle est caractérisée par les valeurs DL50, respectivement, orale de >1000 mg/kg et IV ou IP de >200 mg/kg, et est représentée par des petites (<1 kDa) molécules hydrosolubles.

2.2.1.2. Synthèse de nouvelles structures de cœur choisies et les modifications chimiques préliminaires

Après avoir présélectionné les composés pouvant être intéressants en tant que cœurs de nos futurs dendrimères, l'objectif de l'étape suivante était de synthétiser les nouvelles structures **C-I**, **C-II**, **C-VII** et **C-VIII**, ainsi que de réaliser les modifications préliminaires, permettant l'assemblage facilité de macromolécules finales. Il est à noter que durant cette étape, l'obtention de certains composés a été infructueuse, dû soit aux problèmes de réalisation des réactions chimiques proposées, soit aux difficultés de purifier les produits obtenus. Néanmoins, certains résultats se sont révélés très encourageants et ont permis non seulement d'obtenir de nouveaux composés, mais aussi d'élaborer de nouvelles procédures de synthèse efficaces.

2.2.1.2.1. Synthèse du cœur C-I à base de pentaérythritol et d'acide succinique

Notre choix de la structure **C-I** (**Figure 33**, page 76) comme cœur de dendrimère a été déterminé par sa symétrie, la présence de quatre groupements carboxyliques pouvant former des esters, ainsi que par la biocompatibilité des composés qui peuvent résulter de la biodégradation de ses groupements esters, pentaérythritol et acide succinique. En particulier, le pentaérythritol **1** (**Figure 34**, page 79) ne présente potentiellement aucun danger pour l'organisme car il appartient à la classe des substances *relativement inoffensives*, possédant DL50 orale très élevée : 18500 mg/kg chez le lapin, 25500 mg/kg chez la souris et 19500 chez le rat [349]. Comme élément central des dendrimères, ce tétraol **1** a été proposée pour la première fois en 1987 par A. Padias et col. [352]. Grâce à ses propriétés et son bas coût, ce composé est toujours utilisé à cette fin comme rapporté dans plusieurs sources, p. ex. [130, 229] etc.

L'acide succinique (**3**, voir l'annexe 6) possède également des propriétés très favorables à une utilisation dans l'assemblage des macromolécules dendritiques biocompatibles. Il est assez bien toléré par l'organisme, en présentant des valeurs DL50 chez le rat de 2260 mg/kg (orale) et chez la souris de 1400 mg/kg et 2702 mg/kg (respectivement, IV et IP) [349]. La chimie des dendrimères fait régulièrement appel à ce composé en tant que cœur bifonctionnel [353, 354], ou/et groupement espaceur [353-355].

La synthèse du cœur **C-I** a été réalisée par le chauffage à 60-65°C du **1** et de l'excès molaire de 20 fois de l'anhydride succinique (**2**) dans la pyridine pendant 48 h (**Figure 34**, **page 79**), en se basant sur la procédure de succination du 2-phényl-[1,3]dioxan-5-ol proposée par M. Carnahan et col. [355].

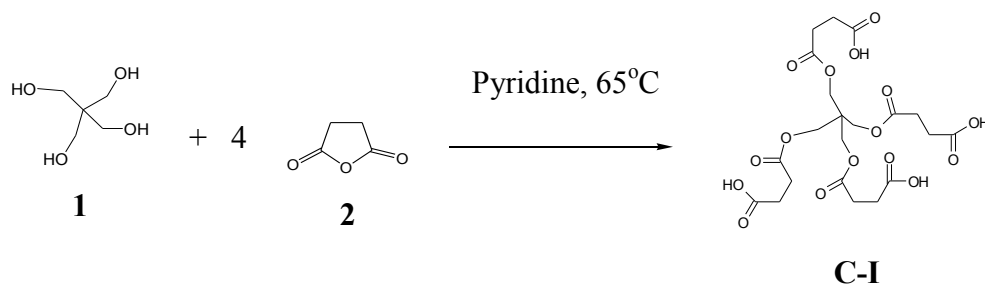
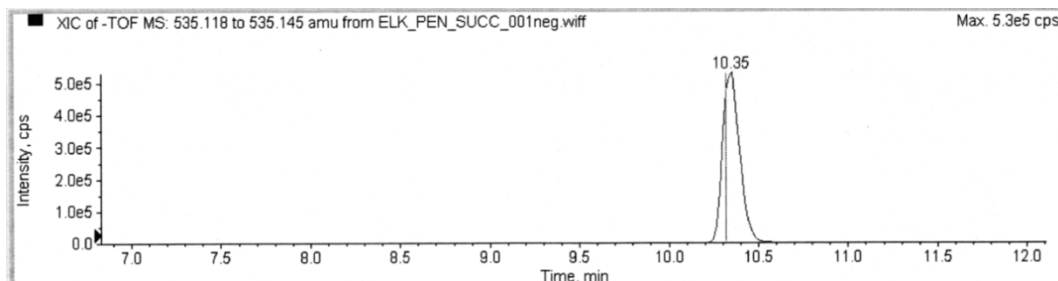


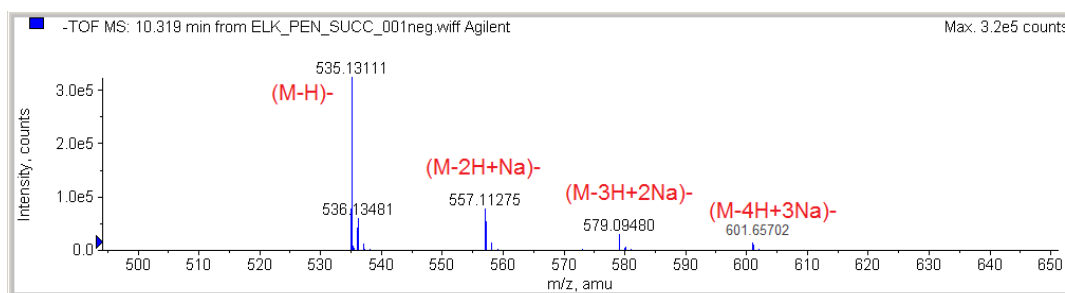
Figure 34. Synthèse du cœur C-I par l'interaction du pentaérythritol (1) et l'anhydride succinique (2).

Après la distillation de la pyridine sous vide, la purification du produit a été effectuée au moyen de l'extraction chaude avec l'éther méthyl-*tert*-butylique en présence du charbon actif. Il est à noter qu'en essayant d'extraire sélectivement le composé **C-I** en présence du **2**, nous avons également testé d'autres solvants tels que l'acétonitrile, le méthanol, l'éthanol, l'éther éthylique, l'acétone, le benzène, le chloroforme, le dichlorométhane. Néanmoins, seulement l'éther méthyl-*tert*-butylique a montré des résultats satisfaisants.

La structure du cœur **C-I** a été prouvée par la spectrométrie de masse (LC-MS), la spectroscopie RMN du proton et du carbone ^{13}C , l'analyse FTIR et élémentaire. En particulier, dans le chromatogramme LC-MS (**Figure 35a**, **page 80**), on ne retrouve qu'un seul pic, ce qui confirme la haute pureté du produit obtenu. Les signaux dans le spectre de masse en mode négatif (**Figure 35b**, **page 80**) correspondent à l'ion moléculaire du **C-I** et de quatre sels résultant de l'interaction du **C-I** avec les ions Na^+ durant la procédure d'analyse. Le spectre ^1H RMN du produit contient les pics de protons appartenant aux groupements succinyles et ceux de pentaérythritol, ainsi qu'aux liaisons esters (**Figure 36**, **page 80**). Les résultats d'analyses ^{13}C RMN et FTIR ont également confirmé la présence de signaux caractéristiques de **C-I** (voir les détails dans la section 2.3.3.1.1). L'analyse élémentaire montre que le **C-I** synthétisé est en bonne concordance avec les valeurs théoriques. Le rendement général d'obtention du produit **C-I** purifié est de 82%.



a.



b.

Figure 35. Résultat de l'analyse LC-MS du cœur C-I: (a). chromatogramme du produit (aire normalisée du pic avec le temps de rétention de 10,34 min: 98,3%); (b). spectre MS-TOF en mode d'ionisation ESI négatif.

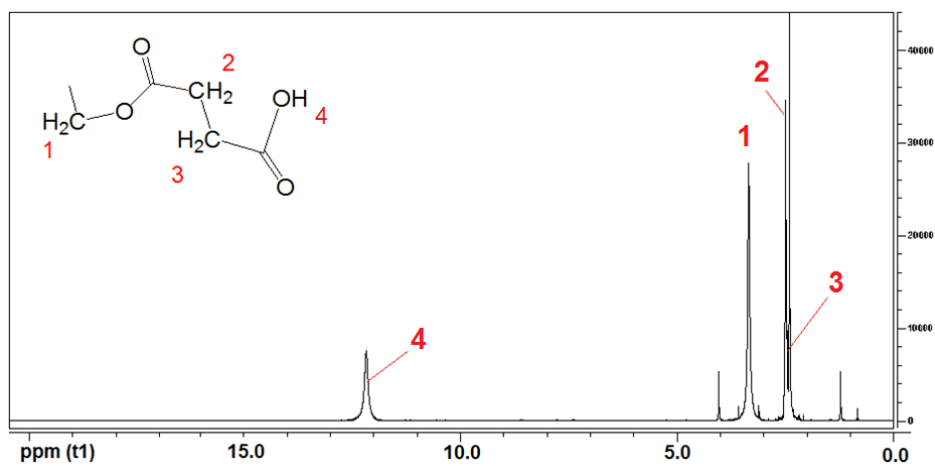


Figure 36. Spectre ^1H RMN (DMSO-d₆, 300Hz) du produit C-I.

2.2.1.2.2. Synthèse du cœur C-II à base de 1,3,5,7-tétrahydroxyadamantane et d'acide succinique

Notre choix du cœur **C-II** (**Figure 33, page 76**) a été justifié, premièrement, par son plus haut degré de symétrie, comparativement à la structure **C-I** (dû à la présence de l'unité adamantane) et, deuxièmement, par une très faible toxicité attendue du composé et également des produits de sa dégradation par rupture des liaisons esters. L'obtention du cœur **C-II** à base de 1,3,5,7-tétrahydroxyadamantane (**4**) et de l'acide succinique a été envisagée en plusieurs étapes, à partir de l'adamantane (**5**), comme présenté dans la **Figure 37, page 81**. En particulier, la synthèse du tétraol **4** a été planifiée, en se basant sur le protocole de Ch.-F. Huang et col. [356], incluant l'étape de bromation catalytique du **5** avec le rendement prévu de 63%, ensuite, la substitution d'halogènes du dérivé tétrabromo **6** avec Ag_2SO_4 dans H_2SO_4 et, enfin, l'hydrolyse du tétrasulfoester **7** avec l'hydroxyde de potassium (**Figure 37, page 81**).

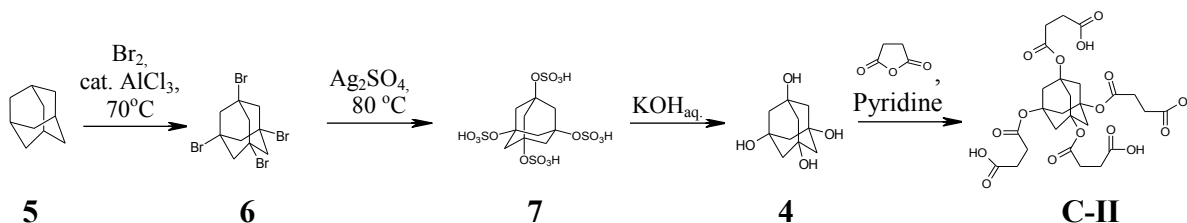


Figure 37. Synthèse envisagée du cœur C-II à partir de l'adamantane.

Selon le protocole ci-mentionné, le dérivé 1,3,5,7-tétrabromo **6** doit normalement résulter de l'interaction de **5** avec le brome moléculaire en présence du catalyseur, le chlorure d'aluminium (III), présentant un acide de Lewis, pendant 24 h à 70°C , suivi de la recristallisation dans l'acétonitrile. Cependant, après avoir reproduit cette procédure, nous n'avons récupéré qu'un dérivé tribromo d'adamantane, selon l'analyse élémentaire (calculé pour le dérivé tétrabromo **6** visé : C 26,58%; H 2,64%; calculé pour le dérivé tribromo: C 32,21%; H 3,51%; trouvé : C 31,35%; H 3,35%).

Afin d'élaborer un protocole plus fiable, permettant d'obtenir le composé **6**, nous avons réalisé deux synthèses supplémentaires: (i) à température de pièce, en augmentant la durée de la réaction jusqu'à 7 jours, (ii) à 70°C pendant 3 jours. Dans le premier cas, la réaction ne conduit également qu'au produit de transformation incomplète, dérivé tribromé (trouvé: C 32,52%; H 3,61%), tandis que dans le deuxième cas, le produit représente le 1,3,5,7-tétrabromoadamantane voulu. Des changements ont été également apportés à la procédure de purification. En particulier, après l'agitation et le refroidissement de la masse réactionnelle, les excès de brome et de chlorure d'aluminium ont été neutralisés avec le bisulfite de sodium aqueux, en présence du chloroforme utilisé comme agent d'extraction du **6**. Le produit extrait a été recristallisé dans l'acide acétique glacial et séché sous vide avec un rendement général de 71%. La structure **6** a été confirmée par l'analyse élémentaire (trouvé, %: C 26,93; H 2,63), la RMN du proton (**Figure 38, page 82**) et le FTIR (des signaux caractéristique du **6**, y compris ceux à 841 et 715 cm^{-1} appartenant aux vibrations du squelette carboné portant Br, par analogie avec les donnée publiées sur le 1,3-dibromoadamantane [357]).

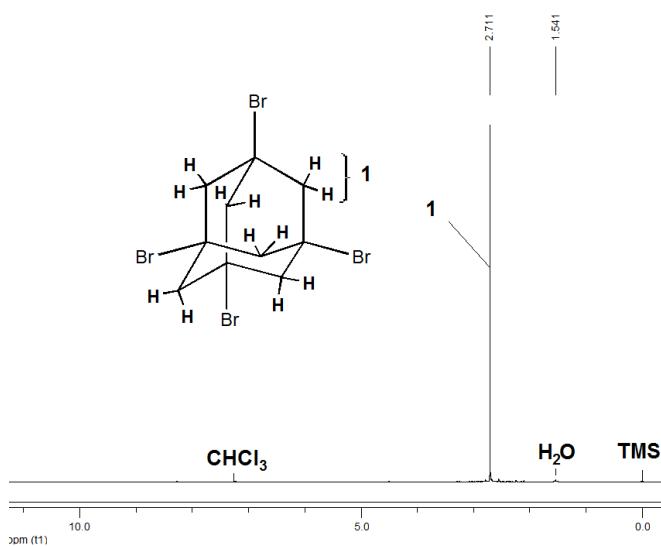


Figure 38. Spectre RMN du proton (CDCl_3 , 300 MHz) de 1,3,5,7-tétrabromoadamantane (**6**) obtenu après les modifications apportées au protocole de Ch.-F. Huang et col. [356].

Pour obtenir le tétrahydroxyadamantane **4**, à partir du dérivé tétrabromo **6**, par l'intermédiaire du tétrasulfoester **7** (**Figure 37, page 81**), nous avons d'abord testé la procédure rapporté par Ch.-F. Huang et col. [356]. La réaction a été effectuée par l'interaction du composé **6** avec Ag_2SO_4 dans l'acide sulfurique à 80°C sous agitation pendant 7 h. Ensuite, selon le même protocole bibliographique, la masse obtenue a été filtrée, pour éliminer le bromure d'argent (I), et la solution du sulfoester résultant a été diluée avec l'eau, neutralisée avec KOH (pour hydrolyser le sulfoester sans l'isoler et caractériser) et, finalement, évaporée. Comme suggéré, la purification du produit a été effectuée en deux étapes, par l'extraction avec l'éthanol dans l'appareil de Soxhlet et, ensuite, par la recristallisation du mélange méthanol/éthanol/acétone. Néanmoins, contrairement aux données bibliographiques, l'analyse du produit ne permet pas de l'identifier comme le tétraol **4** visé. Par exemple, l'analyse élémentaire montre les teneurs trouvées en carbone, en hydrogène et en soufre non concordantes avec le calcul théorique (calculé pour **4**, %: C 59,98; H 5,74; S 0,00; trouvé, %: C 41,91; H 8,05; S 0,24). Selon l'analyse LC-MS, ce produit représente un mélange complexe des dérivés d'adamantane différemment substitués. En particulier, dans le spectre ESI-TOF en mode négatif, le signal appartenant au **4** à 199,04 m/z (M^-) est très faible, tandis que le signal majeur à 243,03 z/m pourrait correspondre à une structure à base d'adamantane portant deux groupement hydroxyles, un atome de brome et une double liaison (compte tenu de résultats de l'analyse élémentaire).

Pour expliquer ce résultat négatif, nous avons considéré que dans notre cas, la concentration de l'acide sulfurique était insuffisante (95,52%, déterminée expérimentalement par la méthode de pycnométrie). Afin d'exclure ce facteur, nous avons répété la réaction, en augmentant la teneur en H_2SO_4 par l'addition de l'oléum. Néanmoins, le résultat de cette réaction a été également négatif.

Un autre facteur qui pourrait rendre la substitution inefficace est la durée excessive de la réaction, pouvant causer des réactions secondaires non voulues. Par exemple, la diminution considérable des quantités du produit organique récupéré par rapport au rendement théorique, ainsi que la présence d'un précipité marron foncé sous forme de pellicules non solubles dans l'eau, pourraient signifier la formation de produits de polymérisation. Pour éviter cette réaction indésirable, nous avons réduit le temps de réaction jusqu'à 2 h. Cependant, les

caractéristiques obtenues avec les méthodes de ^1H RMN, FTIR, analyse élémentaire et LC-MS ne correspondent pas au tétrahydroxyadamantane **4**. En particulier, l'analyse LC-MS indique que le produit représente un mélange complexe de plusieurs composés dont les valeurs m/z diffèrent significativement des valeurs attendues pour **4**.

Comme solution alternative du problème lié à la synthèse du **4** à partir du dérivé **6**, par l'intermédiaire de sulfoesterification, nous avons aussi proposé la substitution préliminaire d'atomes de brome dans **6** par les groupements acétate. En cas de succès, le dérivé tétraoxyacétylé **8** pourrait être facilement hydrolysé en **4** comme présenté dans la **Figure 39**, **page 84**.

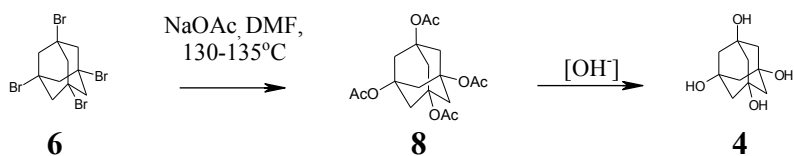


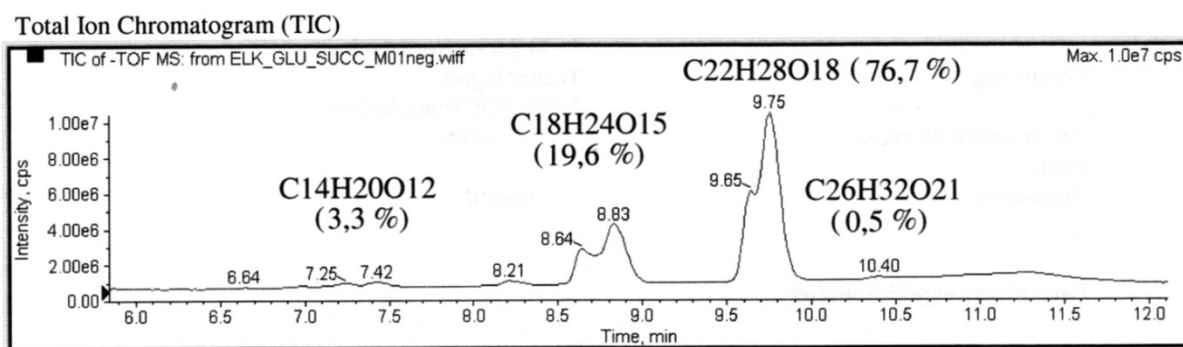
Figure 39. Schéma proposé pour obtenir 1,3,5,7-tétrahydroxyadamantane (4) à partir du 1,3,5,7-tétrabromoadamantane (6), en utilisant la substitution préliminaire de bromes par les groupements acétate

Afin de réaliser la synthèse du composé **8**, nous avons testé la réaction entre le produit **6** et l'acétate de sodium, par analogie avec différents protocoles permettant l'obtention des esters acétyles à partir des dérivés bromés correspondants [358-362]. D'une manière générale la réaction s'effectue par le mécanisme $\text{S}_{\text{N}}2$ [363] (pp. 398-399), ce qui empêche la formation des oléfines par l'élimination. Comme milieu réactionnel des solvants polaires aprotiques sont utilisés. Dans notre cas, le DMF a été choisi à cette fin, par analogie avec une procédure décrite par C. Agami et col. [364]. Cependant, la réalisation de cette approche n'était pas efficace. Après l'agitation du **6** avec l'acétate de sodium dans le DMF à 130-135°C pendant 72 h, uniquement le produit de départ, 1,3,5,7-tétrabromoadamantane, a été récupéré.

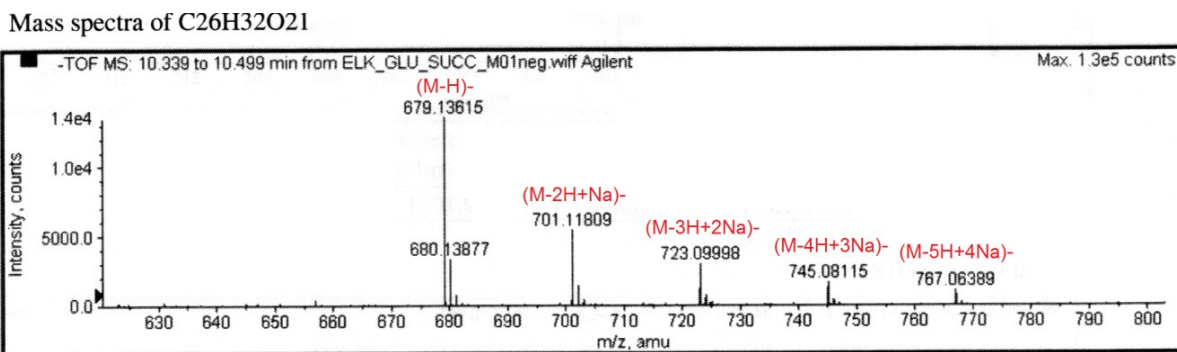
Devant plusieurs échecs avec la synthèse du produit intermédiaire, 1,3,5,7-tétrahydroxyadamantane, par différents approches, l'obtention du cœur **C-II** a été finalement abandonnée.

2.2.1.2.3. Synthèse du cœur C-VII à base de dextrose et d'acide succinique

Notre proposition d'utiliser le *D*-(+)-dextrose en tant qu'un élément central de futures macromolécules représente une nouvelle approche pour la chimie des dendrimères. De plus, ce composé possède potentiellement toutes les propriétés essentielles d'un constituant de dendrimères polyesters à l'usage thérapeutique. Il est biocompatible (DL50 orale très élevée : 25800 mg/kg chez le rat [365]), très peu couteux et contient cinq groupements hydroxyles pouvant former des liaisons esters.



a.



b.

Figure 40. Résultats de l'analyse LC-MS du produit de succination du dextrose :

- (a) chromatogramme ionique générale avec l'identification des signaux;**
- (b) spectre ESI-TOF en mode négatif du pic correspondant au cœur C-VII.**

Pour synthétiser et purifier le cœur **C-VII**, nous nous sommes basés sur la procédure générale élaborée préalablement pour obtenir le composé **C-I** (voir la section 2.2.1.2.1). Le

produit obtenu a été caractérisé par la RMN du proton, FTIR, l'analyse élémentaire (calculé : C 45,89%; H 4,74%; trouvé C 43,74%; H 5,32%) et LC-MS. L'analyse LC-MS a montré que le produit représente un mélange de dextroses qui diffèrent par le nombre de groupements succinyles greffés, avec les teneurs de dérivés respectivement de 76,7% (tétra-, C₂₂H₂₈O₁₈) 19,6% (tri-, C₁₈H₂₄O₁₅) 3,3% (di-, C₁₄H₂₀O₁₂) et 0,5% (penta-, C₂₆H₃₂O₂₁) (**Figure 40, page 85**).

Le rendement très faible du **C-VII** pourrait être expliqué par les effets stériques provoqués par la proximité des groupements hydroxyles dans la molécule de *D*-(+)-dextrose et ses dérivés succinyles. Puisque nous n'avons pas réussi à séparer les constituants du mélange obtenu par la chromatographie sur colonne (contrôle avec la méthode CCM, chromatographie en couche mince), l'utilisation de ce produit comme cœur de futurs dendrimère a été rendue impossible.

2.2.1.2.4. *Obtention du chlorure de l'acide butane-1,2,3,4-tétracarboxylique*

La possibilité d'exploiter les avantages des dendrimères polyesters biodégradables comme agents d'encapsulation des PA, nécessite d'utiliser des méthodes d'esterification très sélectives. Présentement, il existe à peu près une cinquantaine de méthodes permettant la synthèse des esters qui diffèrent par les produits de départ et les conditions réactionnelles [363]. Néanmoins, très peu de ces méthodes pourraient être proposées pour obtenir des dendrimères polyesters car les rendements sont généralement assez bas ou les conditions de synthèse peuvent résulter en des réactions secondaires indésirables telles que la *trans*-esterification ou la dégradation de macromolécules polyesters. Dans ce contexte, les méthodes basées sur l'interaction des alcools avec des halogénures ou des anhydrides d'acides carboxyliques sont considérées comme étant des procédures les plus fiables et les plus répandues ([363], pp. 392-393).

Dans la chimie des dendrimères, l'utilisation d'anhydrides pour effectuer ce type de transformation dépendent grandement de l'élément structural à modifier. Par exemple, l'estérification complète des polyacides carboxyliques à partir de leurs anhydrides cycliques est impossible (en une seule étape). L'ouverture d'un cycle d'anhydride n'aboutit qu'à un seul groupement ester sur deux groupements carboxyliques disponibles (**Figure 41, page 87**). Par

conséquent, si un cœur dendritique est représenté par un polyacide carboxylique, sa modification par cette approche sera incomplète.

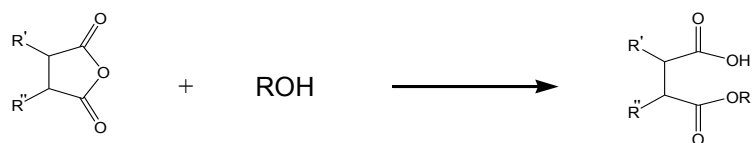


Figure 41. Esterification d'un alcool avec l'anhydride cyclique résultant en la formation d'un monoester.

À cet égard, la voie de synthèse de structures polyesters par l'intermédiaire de chlorures des polyacides carboxyliques est plus avantageuse. Dans ce cas, les réactions sont généralement rapides et permettent l'estérification complète de tous les groupements carboxyliques en une seule étape. Afin de réaliser l'assemblage de nos dendrimères, il était donc très important de trouver des conditions fiables pour effectuer la synthèse d'halogénures.

À l'étape préliminaire de notre projet de recherche, nous avons mené une étude permettant d'élaborer un protocole fiable de transformation des groupements -COOH en -COCl. En tant que composé modèle, nous avons choisi l'acide butane-1,2,3,4-tétracarboxylique (le cœur **C-III**). Sa molécule contient quatre groupements carboxyliques sur des atomes de carbone voisins. Les résultats de cette étude pourraient donc être aussi étendus aux structures **C-IV** et **C-V**, car elles portent également quatre carboxyles voisins.

Pour obtenir le tétra-chlorure de l'acide butane-1,2,3,4-tétracarboxylique (**9**), nous avons premièrement testé le protocole proposé par R. Dhanikula et col. [84] qui consiste en l'interaction entre **C-III** et un excès du chlorure de thionyle (SOCl₂) dans la pyridine à 50°C pendant 6 h. Contrairement aux résultats présentés dans l'article ci-mentionné, l'analyse du produit effectuée a montré que les caractéristiques obtenues ne correspondaient pas à la structure attendue. Par exemple, l'analyse élémentaire diffère significativement des valeurs théoriques (calculé, % : C 31,20; H 1,95; trouvé, % : C 47,22; H 3,81) et la couleur rouge de la flamme lors du test qualitatif de Beilstein [366] signifie l'absence des halogènes.

Une explication possible de ces résultats négatifs pourrait être une formation du dianhydride cyclique (**10**) (**Figure 42, page 88**). Des réactions similaires, résultant en la formation d'anhydride, ont été observées dans le cas de l'acide succinique [367, 368], dû à une plus grande stabilité thermodynamique de l'anhydride succinique cyclique comparativement à la structure de son dichlorure.

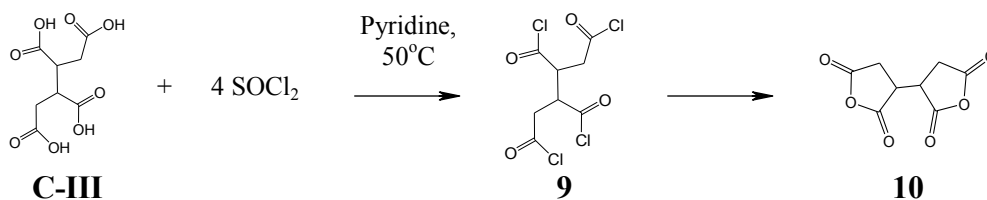


Figure 42. Formation du dianhydride bicyclique de l'acide butane-1,2,3,4-tétracarboxylique par l'intermédiaire de son tétrachlorure.

Dans notre cas, la bicyclisation est confirmée par l'analyse élémentaire (calculé, % : C 48,50; H 3,05) et par l'absence du chlore dans le produit comme mentionné ci-haut. Le déplacement des signaux appartenant aux protons méthylènes vers le champ magnétique plus faible dans le spectre ¹H RMN (de 2,6-2,3 ppm pour **C-III** à 3,2-3,0 ppm pour **10**) peut aussi représenter une preuve de la formation de la structure **10**. Par exemple, un déplacement de ce type est également observé dans les spectres de l'acide succinique et de son anhydride (respectivement, de 2,4 à 2,9 ppm) [369]. Finalement, la réaction du produit obtenu avec l'acide aspartique (HOOC-CH(NH₂)-CH₂-COOH), réalisée dans notre laboratoire selon le protocole rapporté par R. Dhanikula et col. [84], a résulté en l'obtention d'une structure portant seulement deux fragments aspartiques (selon la teneur trouvée en azote), ce qui est typique pour le dianhydride **10**.

Afin de synthétiser le tétra-chlorure **9**, tout en évitant la formation indésirable du **10**, d'autres approches ont été également testées. En particulier, nous avons essayé de réaliser la synthèse par l'interaction du **C-III** avec SOCl₂, sans solvant et dans le milieu de trichloroéthane (CHCl₂-CH₂Cl), à température de pièce, ainsi qu'avec le chlorure de l'acide oxalique, par analogie avec les protocoles généraux rapportés par G. Anner et col. [370]. Cependant, le produit de toutes ces réactions était toujours le dianhydride **10**, selon l'analyse

élémentaire et le test de Beilstein. Une autre approche était la réaction avec SOCl_2 en présence du ZnCl_2 à température élevée, en se basant sur les méthodes proposées pour obtenir les chlorures de l'acide *o*-phtalique [371] et succinique [372]. Dans ce cas, nous n'avons pas réussi à atteindre le point de fusion de la masse réactionnelle (une condition obligatoire) jusqu'à 280°C car celle-ci correspond au début de la décomposition du produit de départ.

Parmi les autres méthodes permettant la synthèse de chlorures d'acides carboxyliques, il est également à mentionner l'interaction directe d'acides avec PCl_3 et PCl_5 ([363], p. 437) ou leurs sels avec POCl_3 ([373], p. 232), SOCl_2 [372], ou le chlorure oxalique [374]. Cependant, avec les chlorures de phosphore, le problème est la dégradation possible de liaisons esters [375], ce qui est un facteur crucial pour nos composés **C-I** et **C-II** et d'autres structures à synthétiser. Dans le cas de sels des acides carboxyliques, un obstacle majeur à contourner serait une solubilité très faible des sels de polyacides dans POCl_3 et SOCl_2 . De plus, les réactions avec PCl_3 , POCl_3 , SOCl_2 et HCl peuvent résulter en l'ouverture du cycle tétrahydrofurannique [367, 376, 377], ce qui est critique dans le cas du cœur **C-IV**.

Ainsi, les difficultés à synthétiser le composé **9** à partir du tétraacide **C-III** au moyen des procédures de chloration testées, ainsi que des limitations possibles des autres protocoles bibliographiques, suggèrent collectivement que l'assemblage de nos futurs dendrimères polyesters devrait être effectué par une autre méthode. En particulier, notre choix s'est fixé sur les approches réactionnelles faisant appel à l'obtention des esters actifs intermédiaires résultant des interactions des acides carboxyliques avec des carbodiimides (voir plus de détails dans le chapitre 4).

2.2.1.2.5. Obtention du cœur **C-VIII** à base de glycérol et d'acide 9,10-dihydroxystéarique

L'utilisation de la structure **C-VIII** (**Figure 33, page 76**) en tant qu'un cœur de nos futures macromolécules représente une approche inédite pour la chimie des dendrimères. C'est une molécule triester, composée des éléments biocompatibles, glycérol (DL50 orale : 12600 mg/kg chez le rat et 4090 mg/kg chez la souris ; DL50 *iv* : 5566 mg/kg chez le rat et 4250 mg/kg chez la souris [378] et l'acide 9,10-(*thréo*)-dihydroxystéarique (DL50 orale : 3200 mg/kg chez le lapin, 980 mg/kg chez le rat [379]). La présence de six groupes hydroxyles secondaires rend possible la formation de liaisons esters. L'orientation *thréo* (ou *anti*, *trans*)

de groupements OH permet de diminuer les gênes stériques lors de la substitution d'atomes hydrogènes. Le principe de fonctionnement de nouveaux dendrimères à base de glycéryl tris[9,10-(*thréo*)-dihydroxyoctadécanoate] au niveau d'encapsulation des PA hydrophobes sera décrit plus en détail dans le chapitre 5.

2.2.1.2.5.1. Glycéryl trioléate et huile d'olive comme produits de départ

Afin d'obtenir le composé C-VIII dont la synthèse et les propriétés ne sont pas encore décrites dans la littérature, le glycéryl trioléate (**11**) (**Figure 45, page 97**) a été proposé comme une structure de départ. En particulier, nous espérons modifier sélectivement les liaisons doubles présentes dans sa structure, en utilisant des approches réactionnelles connues.

D'une manière générale, le trioléate **11** est disponible à partir de plusieurs sources, dépendamment du degré de sa pureté. Il est évident que pour une meilleure reproductibilité de résultats, l'utilisation des produits de départ standards de haute pureté est toujours préférée. Néanmoins, compte tenu du prix assez élevé des réactifs standards, leur utilisation dans des productions à grande échelle ne serait pas toujours économiquement justifiée. Par conséquent, des produits de départ moins purs et à bas coût peuvent se retrouver beaucoup plus avantageux.

Dans ce contexte, le composé **11** représente un constituant majeur de certaines huiles végétales triglycérides dont la production globale a atteint 133,49 millions de tonnes par année, selon le rapport de *United States Department of Agriculture* (USDA) fait en 2008-2009 [380]. Il est à noter que cette valeur constitue plus de 70% de la quantité totale de matières grasses produites dans le monde [381]. Près de 80% de corps gras sont consommés dans l'alimentation humaine, 6% dans l'alimentation animale et 14% dans la production oléochimique [382].

Parmi des nombreuses huiles triglycérides disponibles sur le marché, comme une source naturelle du composé **11**, nous avons envisagé l'huile d'olive, dû à une teneur élevée en acide oléique, confirmée par plusieurs données bibliographiques [383-385]. Cette huile représente le jus d'olive (fruits de l'olivier). Elle est produite et consommée essentiellement dans le bassin méditerranéen. L'Espagne, l'Italie et la Grèce représentent 82% de la production mondiale [381] qui atteint environ 3 millions de tonnes par année [380]. Il est intéressant à noter que l'huile d'olive fait l'objet de «traitements» particuliers de la part

d'organismes divers actifs au niveau international, européen et national tels que le Conseil Oléicole International (COI) [386], l'Association de l'huile d'olive de l'Amérique du Nord [387] etc., ce qui sert à assurer sa haute qualité. L'huile d'olive est presque totalement consommée à l'état vierge étant pratiquement la seule aujourd'hui à avoir cette particularité. Une partie, faible, va à l'industrie de la pharmacie et de la cosmétique, et enfin, pour ce qui est des qualités non alimentaires, à la lipochimie de l'acide oléique dont l'huile d'olive est la plus riche [384, 385]. Il existe deux types principaux de cette huile : celui à relativement forte teneur en acide oléique monoinsaturé ou C18:1 (61-80%) et relativement faible teneur en acide linoléique ou C18:2 (3-14%), et celui à valeur plus petite pour C18:1 (53-75%) et plus grande pour C18:2 (9-24%). Le premier correspond aux huiles européennes, le second aux huiles d'Afrique du Nord ([384], p. 224). Dans le cadre de notre projet de recherche, nous étions donc particulièrement intéressés à utiliser une huile d'olive provenant de l'Europe, en particulier de l'Italie où la teneur en C18:1 peut atteindre jusqu'à 83%, selon E. Fedeli [388]. Finalement, notre choix s'est fixé sur l'huile d'olive de la marque « *Bertolli Extra Virgin Original DAL 1865* » d'Unilever laquelle a montré une grande reproductibilité des analyses [389]. Afin de réaliser des études comparatives, l'utilisation du glycéryl trioléate standard a été également planifiée.

2.2.1.2.5.2. Purification chromatographique et caractérisation comparative de l'huile d'olive

Puisque plusieurs constituants mineurs peuvent se trouver dans l'huile d'olive vierge (tels que glycolipides, phospholipides, vitamines A et D, tocophérols, cires, caroténoïdes, chlorophylles, stérols etc. [385, 390]), nous avons premièrement effectué une purification de l'huile sélectionnée, selon une procédure déjà publiée [391]. En particulier, la procédure consiste à utiliser une colonne chromatographique remplie de gel de silice et deux solvants purs, hexane et chloroforme, en tant qu'éluants. L'élution par l'hexane comme premier éluant permet d'enlever des impuretés légères hydrophobes, petite zone au début. L'élution par le chloroforme rend possible d'isoler des triglycérides neutres. Des impuretés plus polaires sont retenues fortement sur la silice.

Dans notre cas, l'huile triglycéride purifiée (contrôle par CCM) représente un liquide incolore tandis que l'huile initiale avait une nuance jaune clair. Pour évaluer l'efficacité de la purification, nous avons également utilisé les techniques FTIR, RMN du proton, HPLC et

l'analyse élémentaire. En particulier, les spectres FTIR de pellicules de l'huile avant et après la purification sont identiques (**Figure 43, page 92**). Tous les deux spectres sont typiques pour les triglycérides portant des fragments aliphatiques insaturés. Par exemple, ils contiennent les bandes d'absorption appartenant aux vibrations de valences de liaisons =C-H (ou $\nu_{\text{sym}}(\text{=C-H})$) à 3006 cm^{-1} , aux vibration $\nu_{\text{asym}}(\text{-C-H})$ à 2922 cm^{-1} , $\nu_{\text{sym}}(\text{-C-H})$ à 2853 cm^{-1} , $\nu(\text{C=O})$ à 1744 cm^{-1} , $\nu(\text{C=C})$ à 1660 cm^{-1} et aussi aux vibrations de déformation de liaisons -CH_3 et celles par cisaillement de liaisons >CH_2 (ou $\delta(\text{-CH}_3 \text{ et } \text{>CH}_2)$) à 1459 cm^{-1} , $\delta(\text{CH}_3)$ à 1378 cm^{-1} , aux déformations de torsion $\delta(\text{-CH}_2\text{-})$ à 1300 cm^{-1} , aux agitations hors du plan de liaisons nonconjuguées =C-H à 1272 cm^{-1} , aux vibrations de valences $\nu(\text{C-O})$ à 1159 cm^{-1} , aux déformations hors du plan de $\text{-CH}_2\text{-}$ et $\text{-C=C}_{\text{cis-}}$ à 722 cm^{-1} etc. Dans tous les cas, l'identification de bandes d'absorption a été faite selon les données bibliographiques [392, 393]. L'absence d'une bande distincte avec le minimum à 970 cm^{-1} prouve l'absence ou la teneur très faible en liaisons doubles -C=C- trans non conjuguées, selon P. Hendrikse et col. [394].

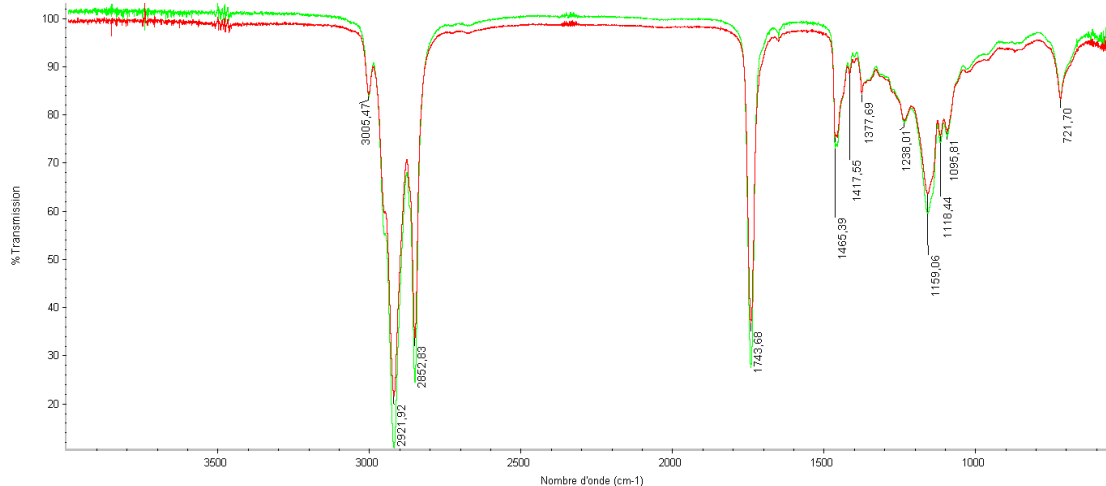


Figure 43. Les spectres FTIR de l'huile d'olive « Bertolli DAL 1865 Extra Vierge Originale » (Unilever) avant (rouge) et après (vert) la purification chromatographique.

Les spectres RMN du proton des deux produits sont également identiques et comportent les pics appartenant aux protons qui sont normalement présents dans les

triglycérides aliphatiques nonsaturés d'huiles végétales (**Figure 44, page 94**). Les signaux ont été identifiés selon les articles de M. Diaz et col. [395], de G. Vlahov [396] et la base de données de l'AIST (Japon) [369].

Les résultats de l'analyse HPLC n'étaient pas concluants dû aux difficultés de détection de ces analytes dans l'intervalle UV-Vis disponible.

Les données comparatives de l'analyse élémentaire ont montré que les teneurs en carbone et hydrogène d'huiles avant et après la procédure chromatographique sont assez proches (calculé pour le triglycéride pur, %: C 77,32; H 11,84; trouvée avant la purification, %: C 77,67; H 12,71; trouvée après la purification, %: C 77,73; H 12,64).

Ainsi, malgré la différence de couleur, les caractéristiques spectrales telles que FTIR et ¹H RMN, ainsi que les résultats de l'analyse élémentaire, des deux produits ont été pratiquement identiques. Ceci indique que les impuretés que nous avons séparées, ne présentent qu'une partie non significative de l'huile d'olive initiale. Par conséquent, dans nos travaux de synthèse ultérieurs, nous avons décidé d'utiliser l'huile initiale sans purification chromatographique préalable.

Afin d'étudier la teneur en acide oléique de l'huile d'olive sélectionnée pour la présente étude, nous avons effectué sa quantification avec la technique LC-MS. D'une manière générale, la méthode LC-MS présente beaucoup d'avantages dans l'analyse des lipides, permettant de les séparer, identifier et quantifier [397-399]. Cependant, étant donnée la fragilité des groupements esters des triglycérides, les spectres résultants contiennent souvent de nombreux signaux provenant de différents produits de fragmentation qui sont très difficiles à identifier sans l'appareil computationnel spécialisé [400]. Dans notre cas, nous avons donc décidé de nous limiter à la composition générale en acides gras dans l'huile de départ. À cette fin, un échantillon d'huile a été d'abord hydrolysé avec l'hydroxyde de potassium dans l'éthanol à température d'ébullition pendant 1 h, selon une méthode connue [394], ensuite, neutralisé avec l'acide chlorhydrique, extrait par l'hexane et, finalement, séché sous vide. L'analyse ¹H RMN du mélange obtenu a confirmé la dégradation complète de triglycérides : la disparition de signaux appartenant au fragment de glycérol dans l'intervalle 4,4-4,0 ppm. Les résultats LC-MS du produit de dégradation ont montré que la teneur en acide oléique était de 67%.

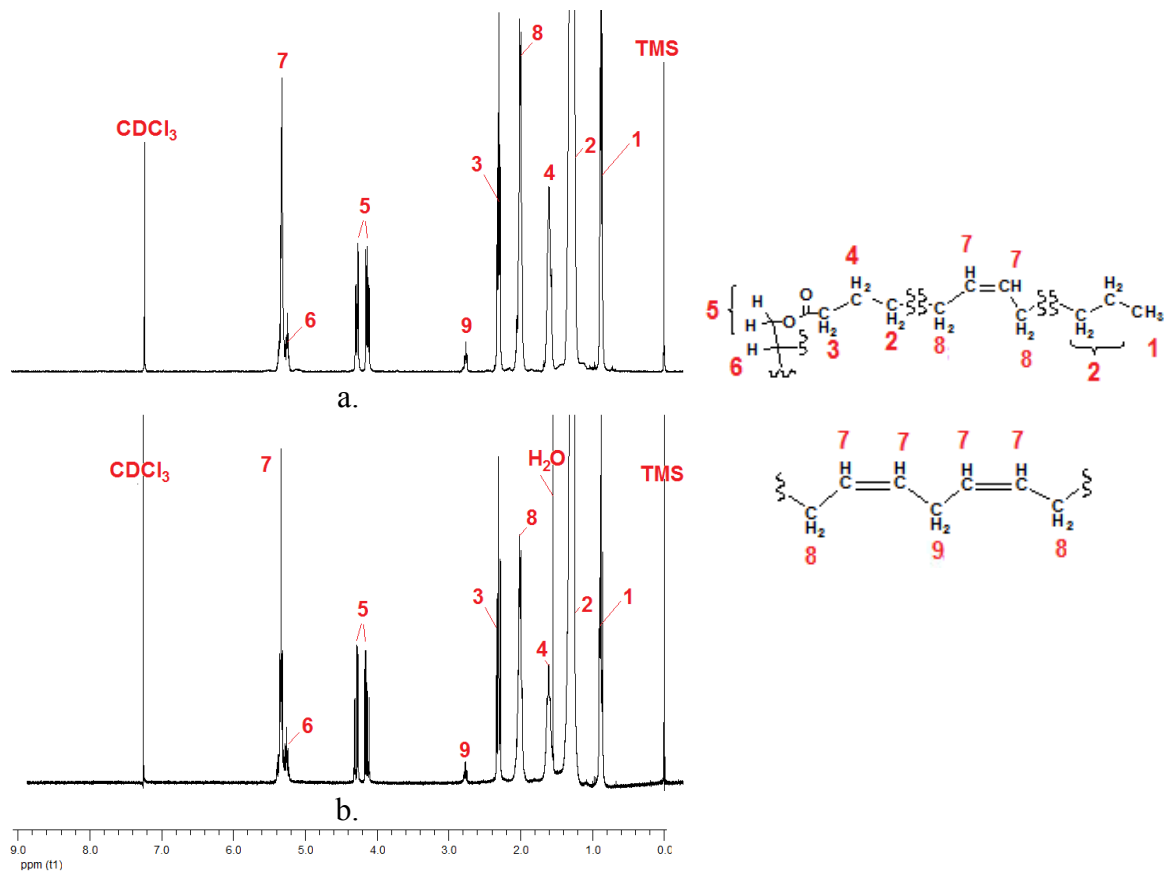


Figure 44. Les spectres RMN du proton (CDCl₃, 300 Hz) de l'huile d'olive « Bertolli DAL 1865 Extra Virgin Original » d'Unilever avant (a) et après (b) la purification chromatographique.

En conclusion, on peut constater que l'huile d'olive de la marque commerciale « Bertolli Extra Virgin Original DAL 1865 » d'Unilever est composée majoritairement de triglycérides portant des fragments de l'acide oléique et contient très peu d'impuretés. Ceci permet donc de la considérer comme un produit de départ assez prometteur pour la synthèse de nos futurs dendrimères à grande échelle.

2.2.1.2.5.3. Description générale des approches réactionnelles choisies

D'une manière générale, il faut noter que de nos jours, l'utilisation efficace des matières premières végétales renouvelables devient l'un des domaines prioritaires des sciences chimiques. Les progrès en oléochimie ont ouvert le champ des possibles en industries des

polymères, des aliments, des biodiesels, des surfactants, cosmétiques, ainsi que des produits pharmaceutiques [401]. Dans ce contexte, les réactions d'intérêt particulier sont liées à la transformation de liaisons doubles. De nombreux travaux sont consacrés à la modification chimique des acides gras insaturés et de leurs dérivés les plus simples, et au cours des dernières décennies, les synthèses des différents α -glycols à partir d'oléfines correspondantes ont été largement étudiées [402]. Néanmoins, malgré des avancées significatives réalisées en chimie des matières grasses, il reste encore des domaines où des améliorations substantielles doivent être apportées. Un de ces domaines de préoccupation est une modification sélective de doubles liaisons dans les triacylglycérols (ou TAG) insaturés pour obtenir leurs dérivés polyhydroxylés purs avec des rendements élevés. De nombreuses réactions ne peuvent pas être directement étendues d'acides gras et leurs esters simples aux TAG, en raison de la faible résistance chimique des groupements esters des triglycérides à des acides et des bases forts, ainsi qu'à des températures élevées. En outre, certaines réactions d'oxydation prometteuses caractérisées par des conditions relativement douces telle que l'époxydation, ne sont pas appropriées pour la synthèse des produits de haute pureté. L'activité chimique élevée des époxydes conduit souvent à des produits de polymérisation, même dans des conditions catalytiques favorables [403]. D'autre part, une bromation avec le dibrome [404] et une hydroxy-oxyformylation avec l'acide peroxyformique dans un excès d'acide formique [405] permettent d'atteindre une excellente sélectivité et des rendements quantitatifs. L'application de ces deux réactions comme des étapes intermédiaires dans le cas de TAG pourrait donc se retrouver utile pour obtenir des produits *thréo*-polyhydroxylés correspondants de haute pureté.

Ainsi, l'objectif de cette partie de notre projet de recherche était d'élaborer un protocole expérimental fiable pour obtenir le polyalcool C-VIII, en utilisant et en comparant deux nouvelles approches : (a) par l'intermédiaire de bromation et de substitution nucléophile de fonctions halogènes secondaires par des groupements oxyacétyles suivie d'une hydrolyse d'acétyles, et (b) par la transformation directe des doubles liaisons dans le TAG **11** insaturé avec l'acide peroxyformique en excès d'acide formique et, ensuite, par élimination de la protection formyle (**Figure 45, page 97**).

2.2.1.2.5.4. Voie de synthèse par l'intermédiaire de bromation et acétylation

2.2.1.2.5.4.1. Étape de bromation

Pour effectuer une transformation sélective des liaisons double de TAG insaturés des huiles végétales, la bromation a été proposée pour la première fois par O. Hehner et C. Mitchell en 1898 [406]. Grâce à sa fiabilité, cette réaction a été ensuite largement utilisée pour déterminer quantitativement la présence des liaisons doubles. Les dérivés bromés d'huiles végétales, également connus sous le nom BVO (« *Brominated Vegetable Oil* »), sont utilisés, depuis 1931, par certains producteurs des boissons gazeuses, p. ex. par Pepsi [407], pour stabiliser les émulsions des huiles aromatiques d'agrumes [229]. Cependant, ils ne sont plus autorisés dans de nombreux pays.

En règle générale, l'addition d'halogènes conduit respectivement aux dérivés *thréo* à partir d'oléfines de configuration *Z* et à ceux *érythro* des oléfines *E* [363, 404]. En raison de l'absence d'oléfines *E* (*trans*) dans les huiles végétales, on peut s'attendre à ce que les dérivés bromés ne présenteront que les produits *thréo*.

Il est également à noter que parmi d'autres réactions d'halogénéation bien connues telles que chloration et iodation, notre choix s'est fixé sur la bromation, puisque, premièrement, les dérivés bromés sont moins chers et plus stables que les dérivés iodés ([363], p. 813), et, deuxièmement, les atomes de brome peuvent être substitués dans les conditions beaucoup plus douces que les atomes de chlore [408].

La bromation de l'huile d'olive (**11**) a été réalisée par l'interaction classique avec le dibrome dans le chloroforme à 0°C (étape *i* dans la **Figure 45, page 97**), en se basant sur les recommandations générales de H. Becker [409]. Dans notre cas, l'addition de brome a été arrêtée dès que la masse réactionnelle ne se décolorait plus après 5 min d'agitation. Après la neutralisation de l'halogène en excès avec le bisulfite de sodium aqueux, le chloroforme a été évaporé sous vide, en permettant d'atteindre un rendement du produit **12** presque quantitatif.

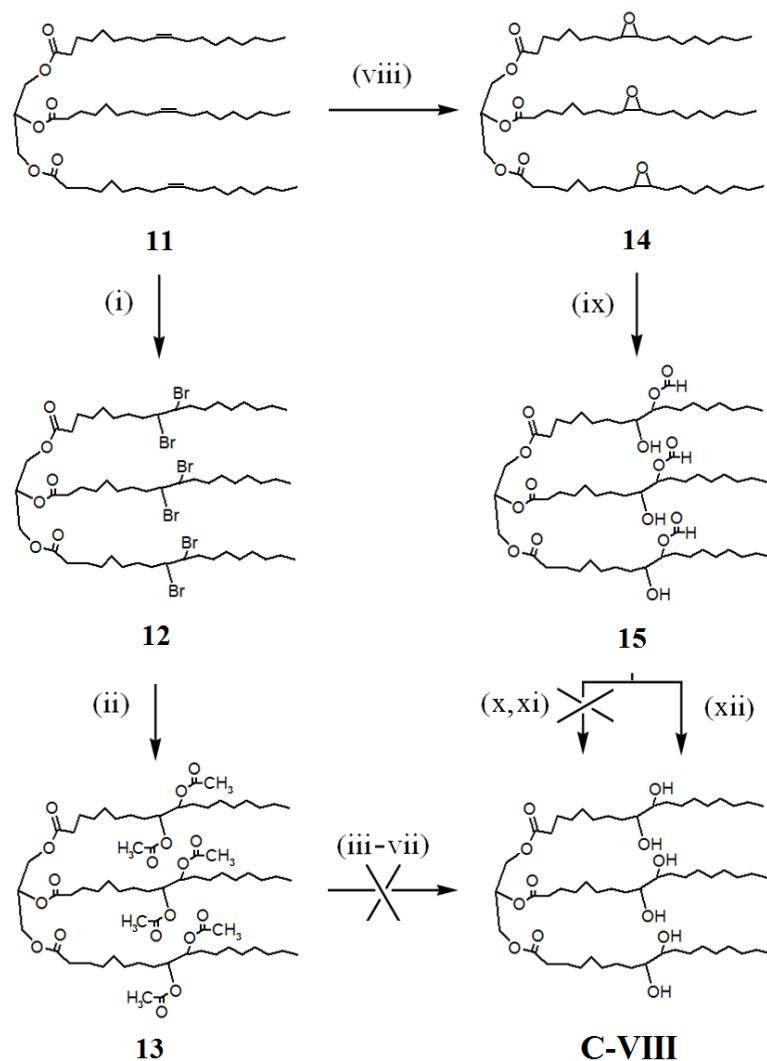


Figure 45. Deux voies de synthèse testées pour obtenir le polyol C-VIII: (i) – Br₂ dans CHCl₃, 0°C; (ii) NaOC(O)CH₃ dans DMF, 130-135°C; (iii) – 25%_{aq.} K₂CO₃ dans MeOH, t.p.; (iv) 23-25%_{aq.} HCl, t.p.; (v) 2-méthoxyéthyl amine dans *iso*-PrOH, t.p.; (vi) 2-méthoxyéthyl amine *in situ* dans *iso*-PrOH, à reflux; (vii) HCl (*in situ*) dans MeOH, t.p.; (viii) HC(O)OOH (*in situ*) dans le mélange HCOOH - Et-O-Et (3:4), t.p.; (ix) HCOOH dans Et-O-Et, r.t.; (x) Cs₂CO₃ dans le mélange MeOH-CHCl₃ (5:1), t.p.; (xi) 35%_{aq.} HCl dans MeOH-CHCl₃ (3:1), t.p.; (xii) 15-17%_{aq.} HCl dans l'acétone, t.p.

Dans le spectre ¹H NMR du produit résultant (**Figure 46B, page 98**), une disparition du signal à 5,33 ppm a confirmé la transformation complète de liaisons doubles. De nouveaux pics à 4,17 et 1,81 ppm soutiennent la formation de liaisons C-Br, comme cela est rapporté

dans la littérature [410]. La même tendance a été observée dans l'analyse FTIR. La disparition du signal à 3006 cm^{-1} et la diminution du pic à 723 cm^{-1} démontrent l'absence de doubles liaisons, et une nouvelle bande d'absorption à 548 cm^{-1} confirme les vibrations de groupements C-Br aliphatiques. Les résultats de l'analyse élémentaire (trouvé: C 51,78%; H 7,85%) sont relativement proches des valeurs calculées pour le dérivé du triglycéride pur **12** (C 50,16%; H 7,68%). La différence peut être expliquée par l'irrégularité de la structure de l'huile naturelle, en particulier, en raison de la présence de fragments d'acides gras saturés.

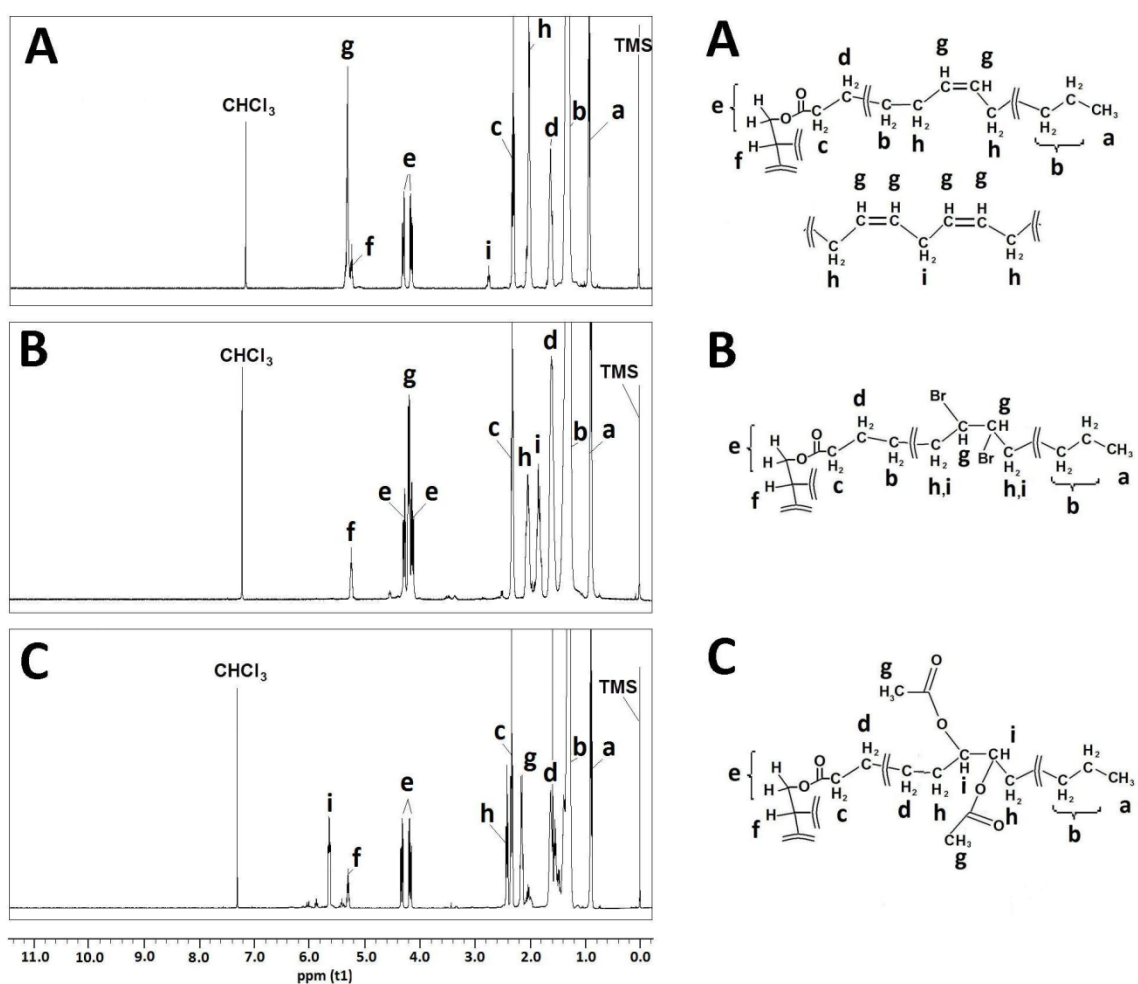


Figure 46. Spectres RMN du proton (CDCl₃, 300 Hz) de l'huile d'olive de départ (A), du produit bromé **12** (B) et du dérivé polyoxacétate **13** (C).

2.2.1.2.5.4.2. Étape d'oxyacétylation

Une substitution nucléophile directe des groupements halogènes secondaires par les hydroxyles avec des agents basiques forts conduit généralement à l'apparition de produits d'élimination indésirables (oléfines) [404]. De plus, dans notre cas, cette approche est également limitée par la fragilité des groupements esters des triglycérides. Une solution possible pour éviter ces problèmes repose sur une substitution nucléophile préliminaire d'halogènes avec les sels formés de métaux alcalins et d'acides carboxyliques, dans un milieu polaire aprotique, comme rapporté par plusieurs équipes de recherche [358-362, 364], suivie de la réaction de déacylation. La réaction d'oxyacylation se déroule par l'intermédiaire du mécanisme S_N2 , ce qui empêche l'élimination ([363], pp. 398-399) et, de plus, dans un milieu neutre, ce qui permettrait d'éviter la dégradation des triglycérides.

Dans la présente étude, la synthèse a été réalisée par l'interaction entre le produit **12** et l'acétate de sodium dans le DMF à 130-135°C pendant 48 h (étape *ii* dans la **Figure 45, page 97**). Le contrôle réactionnel a été effectué avec la RMN du proton (disparition du pic appartenant au $H-C(Br)<$ à 4,17 ppm). Après purification incluant les étapes d'extraction des impuretés hydrosolubles, ainsi que de la chromatographie sur colonne, le rendement du produit est de 45%. Dans le spectre 1H RMN (**Figure 46C, page 98**), le pic à 5,62 ppm appartenant au proton du groupement $H-C(OAc)<$ prouve la formation des esters d'acétyle. L'analyse FTIR montre la disparition de la bande d'absorption à 548 cm^{-1} , appartenant à la liaison C-Br, ce qui confirme l'absence du brome dans le produit d'acétylation obtenu. L'absence des halogènes dans le produit a été également prouvée par le test de Beilstein. Les résultats de l'analyse élémentaire observés sont en bon accord avec les résultats attendus, compte tenu des valeurs obtenues dans le cas du polyhalogénure **12** de départ.

2.2.1.2.5.4.3. Désacétylation

Afin de supprimer la protection acétyle dans **13**, cinq procédés différents connus [411-417] ont été testés (étapes *iii-vii* dans la **Figure 45, page 97**): les réactions avec le carbonate de potassium aqueux à 25% dans le méthanol pendant 6 h et avec l'acide chlorhydrique à 23-25% pendant 24 h, les interactions avec la 2-méthoxyéthyl amine équimolaire dans la 2-propanol pendant 49 h à température ambiante et au reflux pendant 3 h, ainsi qu'avec HCl formé *in situ* à partir du chlorure d'oxalyle et du méthanol. Cependant, aucune de ces réactions

n'a permis d'effectuer une désacétylation sélective de **13**. Selon les analyses élémentaires, FTIR et RMN du proton, seul le produit de départ a été récupéré. Une séparation des couches réactionnelles dans le cas de systèmes contenant de l'eau, et des effets stériques dans le cas de systèmes homogènes peuvent représenter des explications aux résultats observés. Devant cet échec de la déprotection, nous nous sommes tournés vers une autre approche pour obtenir **C-VIII**, basée sur la réaction de Prilezhaev (section suivante).

2.2.1.2.5.5. Voie de synthèse par l'intermédiaire d'hydroxy-oxyformylation

2.2.1.2.5.5.1. Hydroxy-oxyformylation des liaisons doubles

Afin de trouver une alternative à la désacétylation, nous avons proposé la voie de synthèse incluant la réaction avec l'acide peroxyformique (ou performique). Cette réaction représente un cas particulier de l'oxydation des oléfines avec des peroxyacides carboxyliques (réaction de Prilezhaev). D'une manière générale, la réaction de Prilezhaev se caractérise par des conditions réactionnelles douces et des rendements élevés ([363], p. 826). Le pouvoir oxydant des peroxyacides augmente en présence des groupements électroattracteurs. Les doubles liaisons monosubstituées (terminales) réagissent moins vite que les disubstituées (internes) [404]. Selon le mécanisme de Bartlett [418], l'oxygène est transféré du peracide à l'oléfine par une addition électrophile avec la formation d'un composé intermédiaire « peroxyacide-oléfine » (réaction de seconde ordre). Les transformations de ce type conduisent normalement à des époxydes comme il a été montré par exemple pour les acides peroxyacétique, perbenzoïques, monoperphthalique etc. Dans le cas de l'acide performique, en fonction des conditions, les produits d'oxydation peuvent représenter des structures différentes: époxydes, dérivés hydroxy-formoxyles ($R-HC(OC(O)H)-C(OH)H-R'$) résultant de l'ouverture de cycles oxirane ou, dans certains cas (par exemple, avec diisobutylènes), aldéhydes, cétones, et diéthers cycliques [405]. Généralement, la réaction avec des acides gras insaturés et leurs dérivés (esters méthyliques et octyle, triglycérides etc.) résulte en la formation d'époxydes [22, 419] ou de hydroxy-oxyformates [405, 420]. L'approche de synthèse pour obtenir des époxydes consiste à n'utiliser que de petites quantités d'acide formique comme solvant et transporteur d'oxygène [405]. Récemment, Z. Petrovic et col. ont également proposé d'ajouter des résines échangeuses d'ions acides comme catalyseur de formation des époxydes [403], en raison, probablement, de l'échange d'oxygène efficace entre

l'acide performique et les groupements acides du catalyseur. L'utilisation d'un excès d'acide formique entraîne l'ouverture rapide des cycles oxiraniques, en donnant les hydroxy-oxyformates correspondants. Dans ce cas, une procédure typique consiste à préparer d'abord l'acide peroxyformique *in situ*, en utilisant un excès molaire de l'acide formique (par exemple, de 20-26 fois) par rapport au peroxyde d'hydrogène, ensuite à ajouter lentement un substrat insaturé, en refroidissant la masse réactionnelle à température ambiante, et enfin, à agiter le mélange obtenu à 25-40°C pendant 2-4 h, comme il a été rapporté par D. Swern et col. pour les acides oléique [405], linoléique [421], élaïdique, undécylénique, et le ricinoléate de méthyle [420]. Cependant, les quelques travaux récents ont montré que dans un excès d'acide formique, la préservation des groupes époxydes est également possible. Par exemple, J. Salimon et col. ont obtenu les dérivés époxydes à partir de l'acide oléique (avec le ratio molaire HCOOH:H₂O₂ de 2,5:1) [422] et de l'oléine de palme (avec les ratios molaires HCOOH:H₂O₂ de 1,25:1, 2,25:1 et 2,50:1) [423] après une agitation respectivement à la température ambiante pendant 5 h, et à 44-65°C pendant 1-3 h. Il est intéressant de noter que les signaux à 8,25 ppm dans les spectres ¹H NMR et à 165,6 ppm dans les spectres ¹³C NMR (dans DMSO-d₆) ont été attribuées respectivement à des α-glycols et des cycles époxydes [422], même si selon l'interprétation classique, les deux devraient normalement confirmer la formation des esters formyles. Il est également à mentionner que dans le cas des dérivés hydroxy-oxyformyles (et même des époxydes obtenus avec l'acide performique, par exemple [403, 422-424]), il est très difficile de trouver des données spectrales (RMN et IR) fiables, confirmant d'une manière probante les structures moléculaires complètes des produits obtenus. Notre analyse bibliographique montre que la plupart des sources ne présente généralement que soit des descriptions textuelles incomplètes, soit des intervalles spectraux très étroits, ne prouvant que des hypothèses proposées par les auteurs.

Dans le contexte du présent travail, nous étions particulièrement intéressés à élaborer un protocole fiable pour synthétiser le dérivé hydroxy-formoxyle **15** au moyen de l'ouverture complète de cycles époxydes dans le composé intermédiaire **14** (étapes *viii-ix* dans la **Figure 45, page 97**), puisque nous avons besoin du produit final **C-VIII** de haute pureté. Au cours de nos expériences avec le trioléine standard et l'huile d'olive, les mélanges de HCOOH à 98% et de H₂O₂ aqueux à 50% avec un rapport molaire de 10:1 ont été utilisés comme source d'acide peroxyformique (HC(O)OOH) et solvant. L'influence de différents paramètres réactionnels

tels que la température, la durée et la composition du milieu a été étudiée. Étant donné que les produits de départ insaturés sont peu miscibles avec l'agent d'hydroxy-oxyformylation proposé, une agitation intense a été requise pour compléter la réaction. Dans le cas de mélanges hétérogènes, les réactions ont été effectuées respectivement à 22-25°C pendant 15-18 h, et à 70-75°C pendant 5-8 h. D'autre part, nous avons constaté que la présence de l'éther diéthylique rend le milieu réactionnel homogène; toute opacité due à la séparation des constituants disparaît après 8-12 min d'agitation normale. Dans le cas de systèmes homogènes, toutes les synthèses ont été réalisées uniquement à la température ambiante avec des durées variables de 30 min, et 3, 4 et 6 heures. L'isolement de produits obtenus a été réalisé par l'extraction avec l'éther diéthylique en présence d'une solution aqueuse de chlorure de sodium de 10-15%. Après le lavage à l'eau et le séchage sous vide, les produits se présentent comme des liquides incolores visqueux.

L'analyse structurale des dérivés synthétisés **15** à partir du trioléine standard et de l'huile d'olive a montré la disparition de certains signaux caractéristiques tels que le multiplet à 5,34 ppm dans le spectre ^1H NMR (**Figure 47B, page 103**), le doublet intense à 130,4-130,9 ppm et le singlet à 30,2 ppm en ^{13}C NMR (**Figure 48B, page 104**), et le pic à 3004 cm^{-1} en FTIR (**Figure 49B, page 105**), ce qui confirme la transformation complète de doubles liaisons. Il convient de souligner que toutes les données spectrales ne contiennent pas de signaux indiquant la préservation des dérivés époxydes intermédiaires **14**. En particulier, il n'y a ni bandes d'absorption caractéristiques à $860\text{-}810\text{ cm}^{-1}$ dans l'infrarouge, ni pics spécifiques à 3,2-2,7 ppm et 60-50 ppm détectables respectivement avec les techniques de RMN ^1H et ^{13}C , selon plusieurs sources sur les époxydes des acides gras, p. ex. [380, 425, 426] etc. D'autre part, la formation de dérivés hydroxy-formoxyles **15** visés a été confirmée par les signaux typiques de protons formyles à 8,23-8,05 ppm et d'esters formyles à 5,10-4,85 ppm dans spectres ^1H RMN (**Figure 47B, page 103**) et les pics de carbone appartenant aux esters formyles à 160,0-162,0 ppm en ^{13}C NMR (**Figure 48B, page 104**).

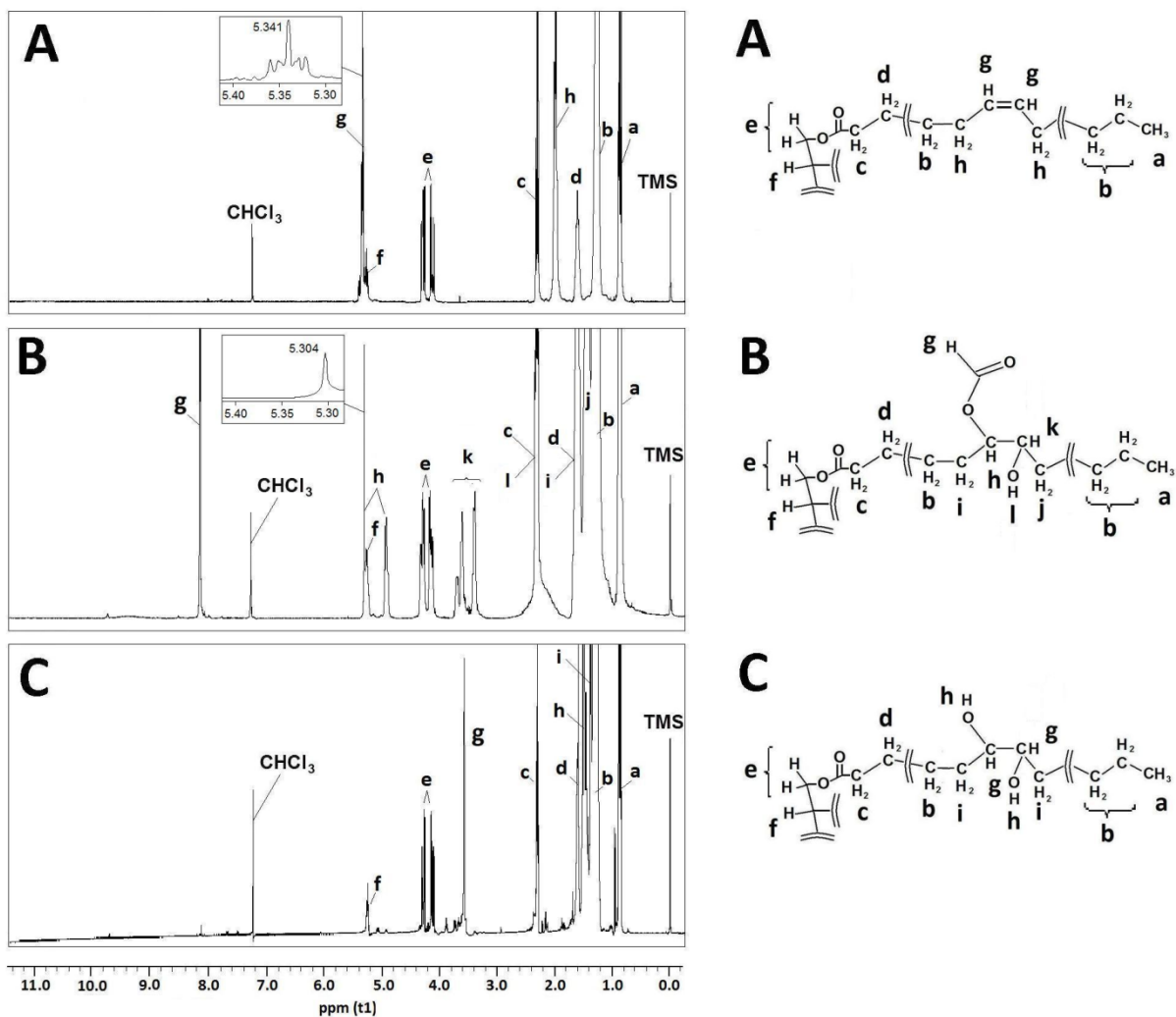


Figure 47. Spectre ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) du trioléine standard 11 de départ (A) et de dérivés hydroxy-oxyformyle 15 (B), and hexahydroxyle C-VIII (C).

La présence de nouvelles liaisons esters a également été confirmée par la méthode FTIR, en particulier, par une nouvelle bande intense à $1725\text{-}1723\text{ cm}^{-1}$. La formation de fonctions hydroxyles est supportée par les signaux correspondants en ^1H RMN (3,80-3,20 ppm; **Figure 47B, page 103**), ^{13}C RMN (75-71 ppm; **Figure 48B, page 104**), et FTIR ($3550\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, **Figure 49B, page 105**). Le nouveau pic à $1172\text{-}1171\text{ cm}^{-1}$ en IR signifie l'apparition de nouvelles liaisons C-O.

En général, les caractéristiques analytiques des produits obtenus à partir du trioléine standard et l'huile d'olive naturelle étaient très similaires, ce qui suggère que d'autres doubles

liaisons des fragments d'acides gras polyinsaturés réagissent de la même manière. L'intensité de signaux spectraux attribués à de nouveaux groupes fonctionnels est plus élevée pour les dérivés du trioléine pur. Ce fait s'explique par la présence des quantités importantes de chaînes aliphatiques saturées dans le produit naturel et, ainsi, les fragments d'acides polyinsaturés ne peuvent pas compenser cet effet.

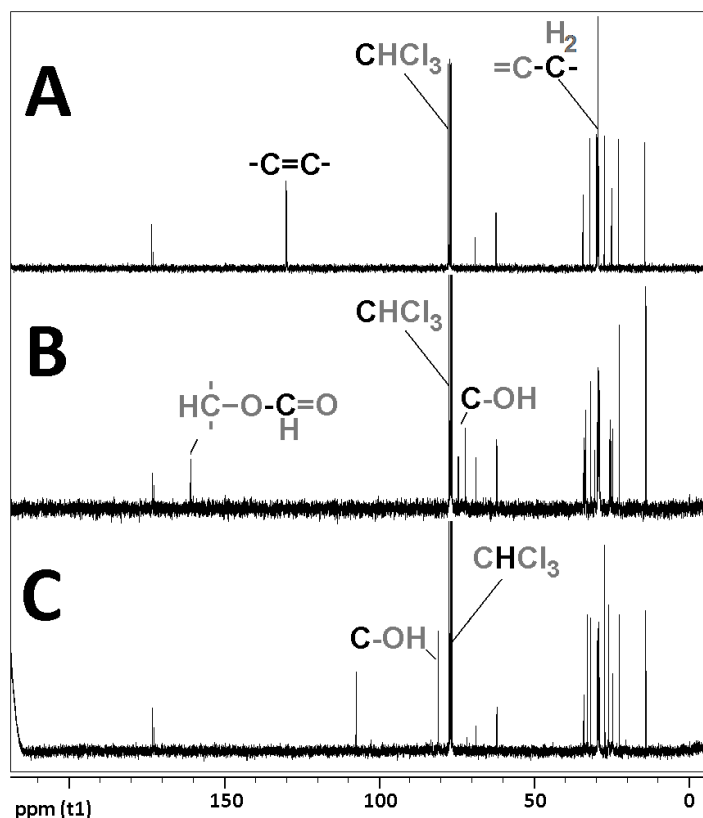


Figure 48. Spectre ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100,61 MHz) du trioléine standard **11** de départ (A) et de dérivés hydroxy-oxoformyle **15** (B), and hexahydroxyle C-VIII (C).

Malgré la formation de dérivés hydroxy-formoxyles **15** voulus dans les conditions utilisées, une attention particulière devrait être accordée à la prévention des processus de dégradation de groupements esters triglycéryles. Par exemple, dans le cas des systèmes hétérogènes, l'augmentation de la durée réactionnelle à 15-18 h ou de la température à 70-75°C, pour compléter la transformation de doubles liaisons, résulte en l'obtention des produits

de décomposition partielle de triglycéyles. Le chauffage doit être considéré comme un facteur plus important de la dégradation car une diminution plus forte de l'intensité des signaux appartenant aux esters triglycéyles dans spectres ^1H RMN a été observée. L'utilisation de l'éther diéthylique comme co-solvant à température ambiante a permis non seulement d'obtenir des mélanges de réaction homogènes, mais aussi d'éviter les processus de décomposition indésirables. Ceci a été démontré pour les produits isolés après 30 min, et 3, 4 et 6 heure d'agitation.

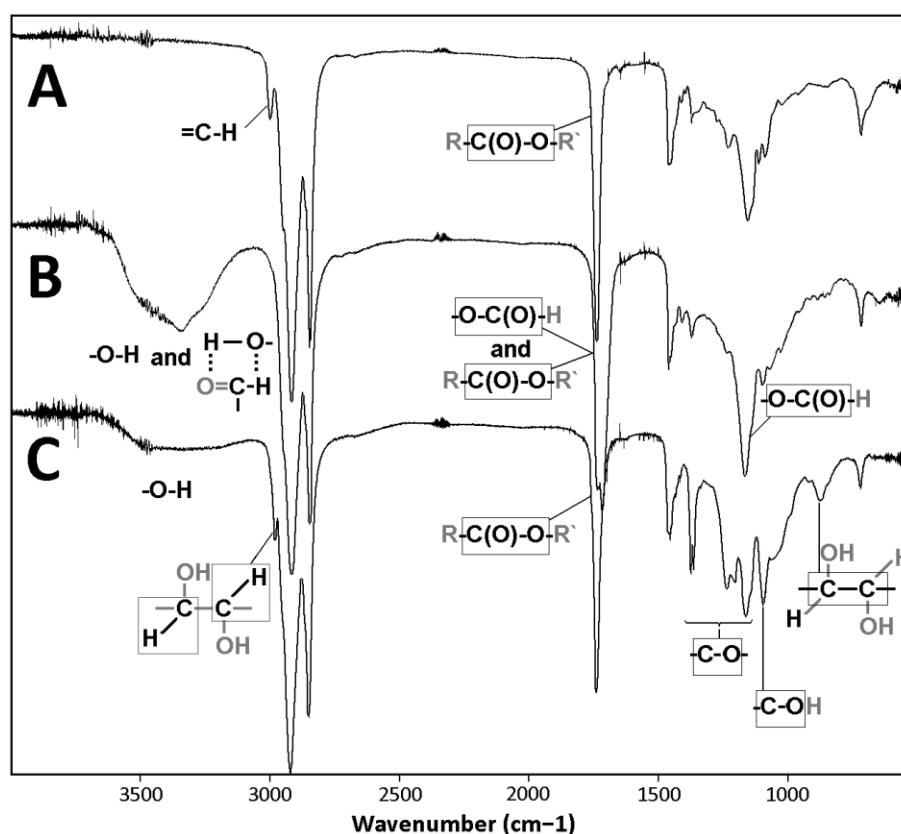


Figure 49. Spectre FTIR (ATR sur ZnSe) du trioléine standard **11** de départ (A) et des dérivés hydroxy-oxoformyle **15** (B) et hexahydroxyle C-VIII (C).

Mises ensemble, les données obtenues suggèrent que la présence de l'éther diéthylique en tant que co-solvant, et l'agitation pendant 30 min à température ambiante doivent être considérées comme des conditions optimales. Dans ce cas, la structure des produits **15** a été

également caractérisée par l'analyse élémentaire et de masse. Le signal de l'ion moléculaire dans les spectres de masse ESI-TQ était plus évident lorsque le mode négatif a été utilisé (Figure 50, page 106).

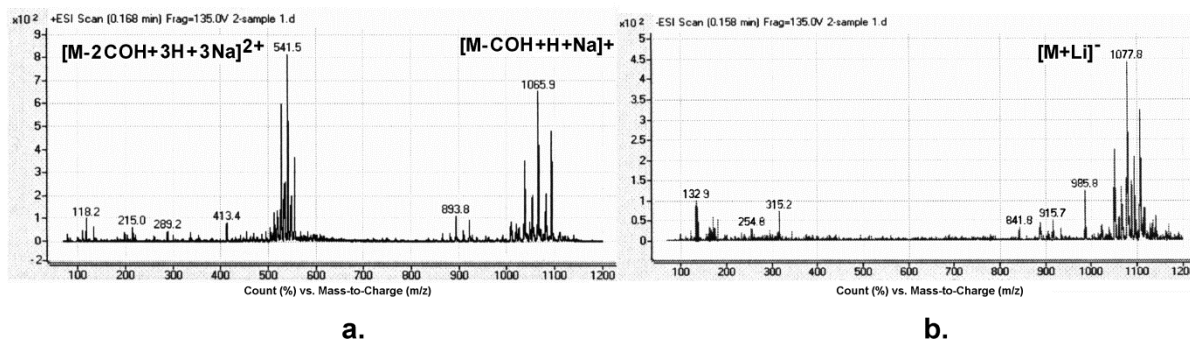


Figure 50. Spectres de masse (ESI-TQ; par injection directe d'échantillon) du produit tri(hydroxy-oxyformylé) 15 obtenu à partir du trioléine standard après 30 min d'agitation avec un excès d'acide performique dans l'éther: (a) en mode positif, (b) en mode négatif.

Les rendements obtenus de dérivés hydroxy-formoxyles **15** à partir de l'huile d'olive et le trioléine standard étaient respectivement de 97% et 96%.

2.2.1.2.5.5.2. Étape de déformylation

Étant donné que la protection formyle des groupements hydroxyles est cent fois moins stable que la protection acétyle, selon C. Reese and J. Stewart [427] et P. Wuts et T. Greene ([428], p. 222), nous avons cherché des conditions douces, bien que fiables, pour effectuer la déformylation de **15**. Les agents de déformylation les mieux connus sont majoritairement des solutions aqueuses fortement basiques tels que l'hydroxyde de sodium [429, 430] et les hydrocarbonates de potassium ou d'ammonium ([428], p. 222), ce qui pourrait causer dans notre cas une dégradation des esters de triglycérol fragiles. Pour contourner ce problème, dans le présent travail, nous avons proposé et testé trois nouvelles procédures de déformylation pour mener à bien cette transformation en milieu organique homogène et à la température

ambiante, en particulier, l'une avec le carbonate de césium et deux avec de l'acide chlorhydrique dilué.

2.2.1.2.5.5.2.1. Déformylation avec le carbonate de césium

La déformylation du **15** a été d'abord effectuée avec le carbonate de césium, une base faible, présentant une solubilité élevée dans certains solvants organiques (méthanol, éthanol, etc. [431]). La réaction a été réalisée dans le mélange méthanol-chloroforme (5:1), où les deux composés sont solubles (étape *x* dans la **Figure 45, page 97**). Après l'agitation à température ambiante pendant 15 heures, le produit a été isolé par extraction (H₂O-CHCl₃, 10:1) et séché sous vide. Une poudre blanche résultante a été caractérisée par l'analyse élémentaire et les spectroscopies ¹H RMN et FTIR. Les données analytiques ont confirmé la déformylation complète (absence de signaux des formyles dans les spectres). Néanmoins, la disparition du pic avec le maximum à 5,26 ppm dans le spectre ¹H RMN, appartenant au proton méthine du glycéryle, indique que la dégradation de l'ester glycéryle secondaire s'est produite. Ainsi, malgré l'efficacité du Cs₂CO₃ comme agent de déformylation en général, cette substance a induit la décomposition de TAG.

2.2.1.2.5.5.2.2. Déformylation avec l'acide chlorhydrique

Devant l'échec avec le carbonate de césium faiblement basique, nous avons également étudié la déformylation avec un agent acide, en particulier, avec l'acide chlorhydrique, largement disponible et à bas coût. Deux procédures proposées différaient par leur milieu réactionnel et la concentration de l'acide. Le premier mélange réactionnel proposé était composé de méthanol, chloroforme et HCl aqueux de 35% avec le rapport en volume respectivement de 30:10:1 (étape *xi* dans la **Figure 45, page 97**). Après avoir ajouté le dérivé hydroxy-oxyformylé **15**, la solution obtenue a été agitée pendant 15 h à température ambiante. La purification a été effectuée par l'extraction avec le chloroforme en présence d'une solution aqueuse du NaCl de 5%. Après un lavage à l'eau, la couche organique a été évaporée sous vide. Le produit a été étudié avec la RMN ¹H et ¹³C, FTIR, analyse élémentaire et de masse (MALDI TOF et HPLC-ESI-TOF). Les données spectrales ont confirmé la déformylation complète des groupements hydroxyles. Cependant, ils ont également montré une dégradation partielle du produit par l'hydrolyse d'esters triglycéryles. Ainsi, ces résultats ne sont pas concordants avec les données de certaines sources telles que [422, 423, 432], suggérant que

des acides forts et concentrés, y compris HCl_{aq} , peuvent être applicables dans le cas des TAG, sans aucune dégradation, même à des températures élevées. Il est intéressant de noter que l'un des produits de dégradation de **15** peut être identifié comme ester méthylique de l'acide 9,10-dihydroxyoctadécanoïque, dû aux signaux spécifiques dans les spectres de masse ainsi qu'au nouveau pic intense à 3,66 ppm dans les spectres de ^1H RMN, appartenant à des esters méthylés des acides gras, selon la bibliothèque en ligne de l'AOCS (*American Oil Chemist's Society*) [433]. Pour éviter la formation indésirable des produits secondaires, on a diminué la concentration de l'acide chlorhydrique aqueux à 15-17%, et l'acétone a été utilisée comme solvant aprotique polaire (étape *xii* dans la **Figure 45, page 97**). Le mélange acétone-acide (20:1) dissout efficacement le produit hydroxy-oxyformylé **15** initial, ainsi que le polyol **C-VIII** final. De plus, pour élucider l'influence de la durée réactionnelle, la déformylation a été réalisée par agitation des composants pendant 2,0 5,5 et 15,0 h. Après une neutralisation avec du carbonate de calcium, une base très faible insoluble dans l'acétone, les solutions organiques ont été isolées par décantation, et les produits cibles ont été ensuite extraits avec l'hexane, en présence d'eau, pour donner finalement des liquides visqueux incolores.

L'efficacité de déformylation a été suivie par la diminution ou la disparition des signaux de protons formyles à 8,16 ppm dans les spectres ^1H RMN. Étant donné que l'agitation pendant 5,5 et 15,0 h, comparativement à 2,0 h, a mené à la déformylation complète, la durée de 5,5 h devrait être considérée comme étant optimale pour effectuer la réaction. La déprotection complète a été également confirmée par l'absence d'autres signaux de ^1H RMN attribués aux esters formyles, par exemple, à 4,92 ppm, et par l'apparition d'un nouveau signal intense à 3,58 ppm appartenant aux protons hydroxyméthines de α -glycol (**Figure 47C, page 103**) dont la valeur est proche de valeurs bibliographiques rapportées pour les autres dérivés *thréo*-dihydroxyles [386, 434, 435].

La formation de l'isomères *thréo* peut être également démontrée par l'interaction entre les protons hydroxyméthines ($>\text{C}(\text{OH})\text{-H}$) et hydroxyles ($>\text{C}(\text{OH})\text{-H}$), élucidés par l'analyse NOESY (**Figure 51, page 109**). Dans notre cas, il n'était cependant pas possible de comparer efficacement ces résultats avec les résultats NOESY obtenus avec les dérivés correspondants *érythro*, en raison des problèmes rencontrés lors de l'*érythro*-oxydation du trioléine **11** avec la quantité équimolaire de OsO_4 , ainsi qu'avec l'excès de KMnO_4 . Ces procédures, basées sur des protocoles généraux [436-440], ont mené soit à la polymérisation et l'oxydation

incomplète avec OsO_4 , à l'absence de réaction avec KMnO_4 sans catalyseur, et à l'oxydation incomplète avec KMnO_4 en présence de 15-couronne-5, selon les analyses RMN et FTIR (non présentées). Dans le dernier cas, une augmentation significative du pic à 4,1 ppm dans le spectre RMN du proton, ainsi qu'une absence des signaux supplémentaires en NOESY, pourraient être attribuée à la formation partielle d'*érythro*-glycols, selon [386]. Le point de fusion de 92-94°C (lit. : 94-95°C [401] pour l'isomère (\pm)-*thréo* de l'acide (9RS, 10RS)-dihydroxyoctadécanoïque acide) de l'acide dihydroxystéarique, résultant de l'hydrolyse basique du produit **C-VIII**, peut être considéré comme une preuve supplémentaire de l'orientation *thréo* des groupements hydroxyles dans des glycols obtenus à partir de hydroxy-oxyformiates correspondants.

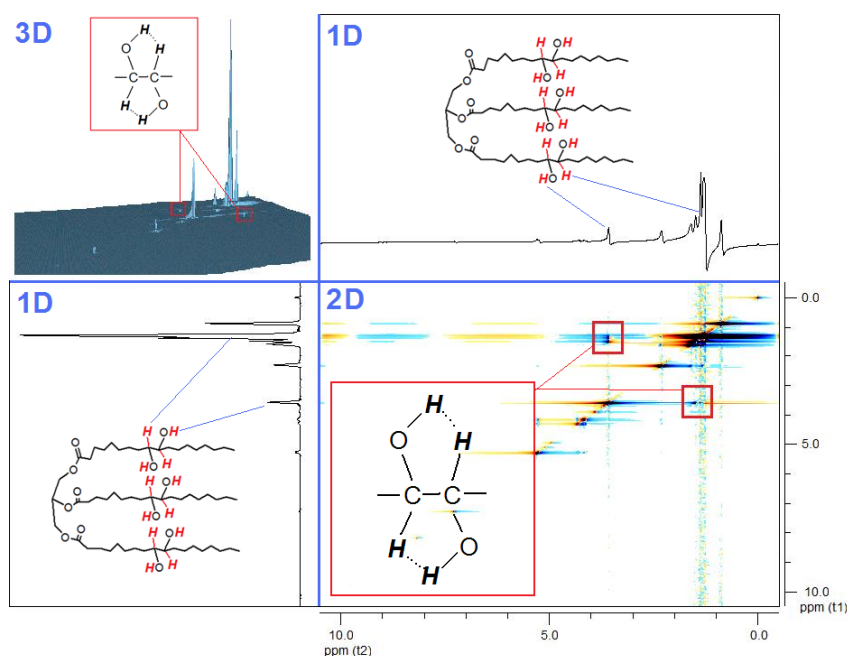


Figure 51. Spectre $^1\text{H}/^1\text{H}$ RMN NOESY (CDCl_3 , 300 MHz) du dérivé hexahydroxyle C-VIII obtenu à partir du trioléine standard (selectionné dans les carrés: les signaux d'interaction entre les protons hydroxyméthines).

La structure de polyols **C-VIII** obtenus a également été confirmée par les données de RMN ^{13}C avec la disparition des signaux d'esters formyles à 161,0 ppm, et de nouveaux pics de carbone liés à des groupements hydroxyles libres à 81,0 ppm (**Figure 48C, page 104**).

Dans les spectres FTIR, l'absence de bandes d'absorption intenses à 1723 et 1172 cm^{-1} , prouve que la déformylation a été efficace. De nouveaux pics à $3478-3468$, $2984-2982$, $1377-1375$ et $1368-1366$, 1239 , 1070 et $874-872\text{ cm}^{-1}$ sont attribués aux vibrations des liaisons chimiques résultant de la formation du dérivé polyhydroxylé **C-VIII** (Figure 49C, page 105).

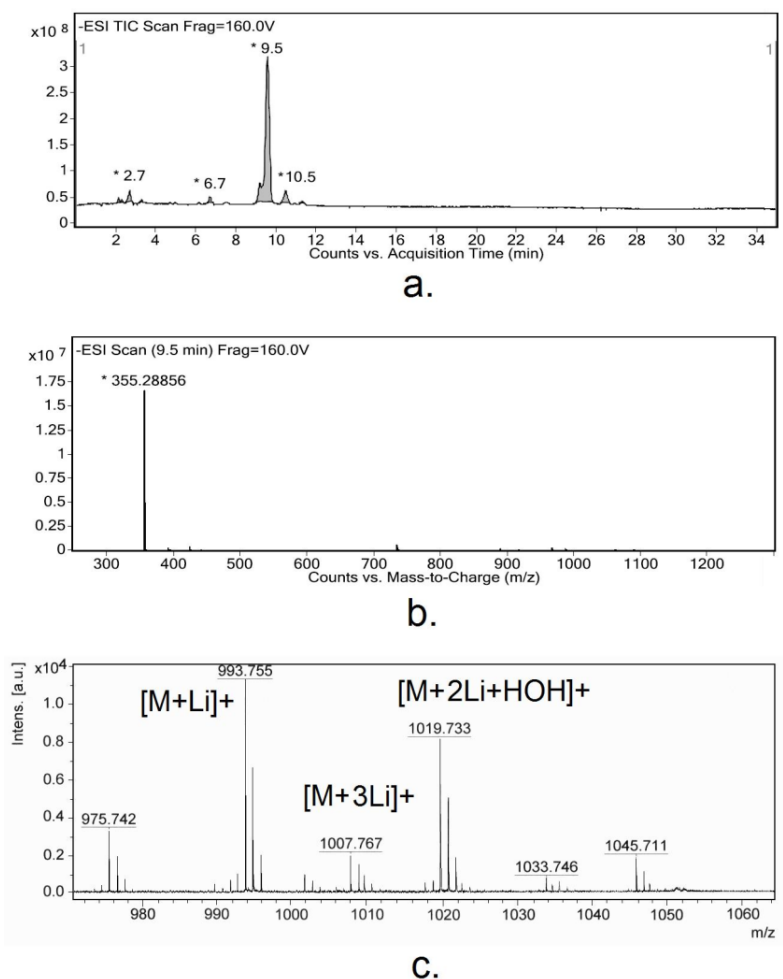


Figure 52. Chromatogramme (a) et le spectre de masse du pic principal (b) en HPLC-ESI-TOF (mode négatif) et le spectre MALDI-TOF (mode positif) (c), du polyol final déformylé C-VIII obtenue à partir du trioléine standard après l'hydrolyse acide dans l'acétone pendant 5,5 h.

La haute pureté de polyols obtenus a été confirmée par les techniques HPLC-ESI-TOF, CCM et l'analyse élémentaire. Dans le chromatogramme HPLC-ESI-TOF, un seul signal

principal est observé (**Figure 52a, page 110**). Le pic de masse à 355,29 m/z (en mode négatif, **Figure 52b, page 110**) peut être attribué respectivement soit à un produit de dégradation complète des esters ($[\text{acide dihydroxystéarique-H+NaOH}]^-$: 355,25 m/z), soit à un ion moléculaire multichargé ($[\text{M}+3\text{N}_2-3\text{H}]^{3-}$: 355,66 m/z). La première supposition semble être plus probable, en raison des difficultés à ioniser la molécule **C-VIII**, tout en gardant l'intégrité de la structure. Dans ce contexte, l'analyse de masse effectuée avec la technique MALDI-TOF facilite visiblement l'identification du produit (**Figure 52c, page 110**). Dans ce cas, le pic principal à 993,76 m/z observée en mode positif correspond à l'ion moléculaire $[\text{M}+\text{Li}]^+$. Le contrôle de pureté par la méthode CCM a donné une seule tache distincte ronde sur les plaques de gel de silice, en utilisant un mélange chloroforme-méthanol 20:1 comme éluant, et la visualisation dans les vapeurs d'iode. Les résultats de l'analyse élémentaire sont en bon accord avec les valeurs théoriques calculées pour **C-VIII**.

En conclusion, nous avons étudié deux nouvelles voies de synthèse pour obtenir dérivés *thréo*- α -glycol purs à partir de TAG correspondant insaturés: (i) par l'intermédiaire de la bromation et la substitution oxyacétyle nucléophile de la fonction halogénure secondaire, et (ii) par l'hydroxy-oxyformylation de doubles liaisons et, ensuite, l'hydrolyse oxyformyle douce. L'utilisation de la première méthode est limitée à l'étape finale de désacétylation qu'il reste encore à optimiser. Dans le second cas, l'utilisation de l'éther diéthylique comme co-solvant au cours de l'hydroxy-oxyformylation, et de l'acide chlorhydrique dilué pour supprimer la protection formyle, a permis d'atteindre des rendements généraux élevés de l'ensemble (96% et 95% respectivement pour les produits de départ standard et naturel). Ce fait, ainsi que les procédures de purification faciles à réaliser, permet de considérer la seconde approche élaborée comme une méthode très prometteuse de transformation sélective de TAG insaturés en *thréo*- α -glycols correspondants. En particulier, cela représente bien des perspectives pour le transférer de ces résultats à une échelle industrielle.

2.2.2 Choix des espaceurs

2.2.2.1. Sélection des structures de groupements espaceurs

D'une manière générale, le rôle des groupements espaceurs dans les structures dendritiques consiste à ajuster la taille des cavités intérieures, ainsi qu'à définir la nature physico-chimique de ces cavités (p.ex., propriétés hydrophobes ou hydrophiles). Dans le contexte du présent projet de recherche, en tant que groupements espaceurs, nous envisageons des structures flexibles, portant aux extrémités opposées des groupements fonctionnels permettant la formation des liaisons esters. Étant donné la biodégradabilité des macromolécules polyesters, les composés choisis comme espaceurs ne doivent pas présenter des effets toxiques. De plus, ces composés doivent être assez volumineux pour former des cavités internes suffisamment spacieuses pour des PA de quelques centaines Daltons. En se basant sur ces critères, notre choix s'est fixé sur deux diols à taille comparable, le tétraéthylène glycol (ou TEG) (S-I) sélectionné comme espaceur hydrophile et le 1,10-décane-1,10-diol (ou DD) (S-II) (Figure 53, page 112).

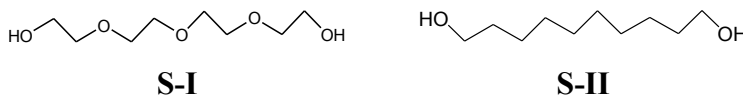


Figure 53. Structures du tétraéthylène glycol (ou TEG) (S-I) et du 1,10-décane-1,10-diol (S-II) choisies comme groupements espaceurs.

Le TEG appartient aux poly(éthylèneglycols), PEG, un vaste groupe de polymères homologues à base d'éthylèneglycol. Biocompatibles, hydrophiles et peu couteuses, ces structures trouvent présentement beaucoup d'application en formulations pharmaceutiques sous forme d'additifs libres ou de groupements inclus dans d'autres structures moléculaires [441, 442]. Il faut cependant noter que les chaînes PEG trop courtes possèdent une toxicité au niveau des métabolites résultant de l'interaction avec les déshydrogénases [443], tandis que les PEG de plus de 20000 Da ne peuvent pas être excrétés par les reins et sont accumulés dans le foie [441, 444]. En outre, les PEG commerciaux, de grade technique, représentent majoritairement des mélanges d'homologues de différentes longueurs. Dans le cas de

l'obtention des structures dendritiques, ceci peut compliquer non seulement la caractérisation structurale de leurs dérivés chimiques (surtout dans le cas des synthèses multiétapes), mais aussi l'étude des mécanismes d'encapsulation de PA par des macromolécules finales. Par exemple, lors d'une étape préliminaire de ce travail, nous avons essayé d'effectuer une monoacétylation sélective du PEG-600 (produit d'Aldrich, Cat. 202401), en utilisant le ratio équimolaire entre le diol et l'anhydride acétique. Dans le spectre MALDI-TOF du produit de départ, il y a eu plus de dix sept signaux dans l'intervalle de 300 à 1000 Da avec le maximum à 610 Da. Après la réaction, le pic maximal s'est déplacé vers 696 Da, ce qui correspond cependant à un dérivé diacétylé non visé. Ainsi, le composé **S-I** a été choisi principalement afin d'éviter le problème avec l'incertitude structurale. De plus c'est une substance relativement inoffensive (DL50 oral chez le rat de 28900 ml/kg [349]), et peu coûteuse comparativement aux homologues PEG purs de plus grande longueur.

Comme déjà mentionné, le 1,10-décane-1,10-diol (**S-II**) a été sélectionné comme analogue hydrophobe de TEG (**S-I**). Très peu dispendieux et biocompatible (DL50 intrapéritonéale chez la souris : 500 mg/kg [349]), ce composé représente un candidat très prometteur pour former des cavités à parois hydrophobes à l'intérieur des structures dendritiques. La taille comparable des espaces **S-I** et **S-II** permettra finalement de tirer une conclusion sur l'influence de la nature physicochimique de la paroi des cavités sur l'efficacité d'encapsulation de PA hydrophobes.

2.2.2.2. Modifications chimiques préliminaires de structures choisies comme espaces

Afin de rendre l'assemblage chimique de nos futures macromolécules bien contrôlable, la monoprotection sélective d'un des hydroxyles dans les structures **S-I** et **S-II** était nécessaire. Comme groupement protecteur le triphénylméthyle (ou trityle, Tr) a été choisi. Cette protection est stable dans les milieux alcalins et neutres, et s'enlève facilement en présence des acides [445]. La monotritylation (**Figure 54, page 114**) a été réalisée, en se basant sur le protocole de V. Kaats-Richters et col. [446], en particulier, pour obtenir le mono-Tr-TEG (**17**) par l'interaction entre le chlorure de trityle (**16**) et l'excès molaire de 10 fois du diol, en présence de la pyridine à 50°C pendant 5 h. Dans le cas de **S-II**, nous avons augmenté l'excès du diol de départ à 18 fois, la température de réaction à 95-100°C et la durée de réaction jusqu'à 8 h.

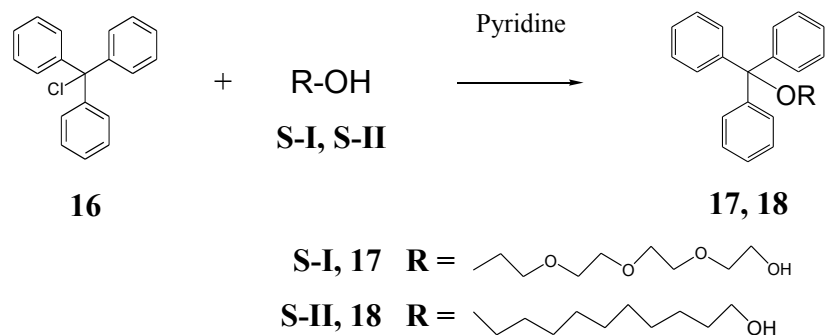


Figure 54. Monotritylation de diols S-I et S-II.

Les masses réactionnelles ont été ensuite diluées par le toluène et les solutions obtenues ont été lavées plusieurs fois pour éliminer les impuretés hydrosolubles telles que le TEG en excès, la pyridine et son hydrochlorure. Durant le lavage, le DD en excès a été éliminé par précipitation. Le rendement du produit **17**, liquide incolore, a été de 93% (lit. : 89% [446]), tandis que le rendement du nouveau composé **18**, solide blanc, a été de 74%. Les structures de diols monotritylés a été confirmées, en utilisant les techniques de la RMN du proton, FTIR, et de l'analyse élémentaire (voir les détails dans la section 2.3.2).

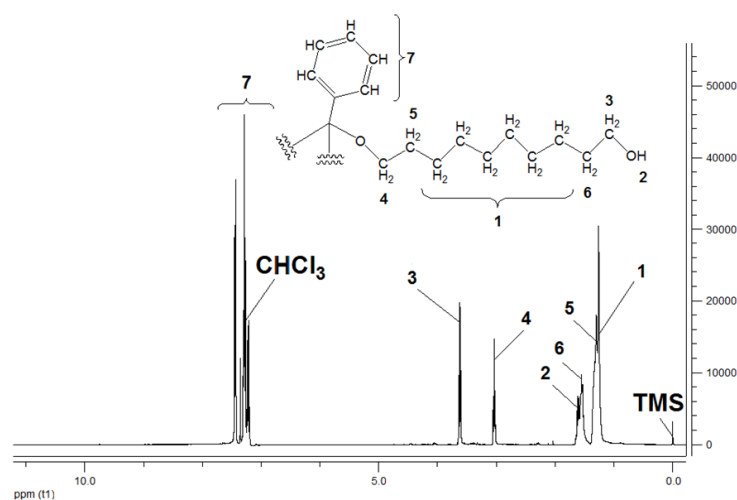


Figure 55. Spectre RMN du proton (CDCl_3 , 300Hz) du monotrityldécane-1,10-diol.

Par exemple, dans le cas du DD monotritylé **18**, le spectre ^1H RMN contient des signaux caractéristiques pour le groupement trityle et la chaîne DD (**Figure 55**, page 114). Les

résultats de la RMN sont en accord avec les données de l'analyse FTIR. En particulier, le spectre confirme la présence dans les molécules des liaisons C-H appartenant aux groupements aromatiques ($3090-3010\text{ cm}^{-1}$), aliphatiques ($2950-2800\text{ cm}^{-1}$), et hydroxyles libres (3328 cm^{-1}). L'analyse élémentaire a montré une bonne concordance entre les valeurs calculées et observées.

2.2.3 Choix des agents de branchement

2.2.3.1. Présélection des structures des agents de branchement

Dans des structures dendritiques hyperbranchées, la présence des agents de branchement (AB, ou points de divergence) permet d'assurer la ramification en progression géométrique avec la montée en génération. À cet égard, les molécules envisagées comme futurs AB doivent porter plusieurs (>2) fonctions chimiques modifiables. Dans le cadre du présent projet, nous avons présélectionné 4 structures potentiellement intéressantes (**Figure 56, page 115**).

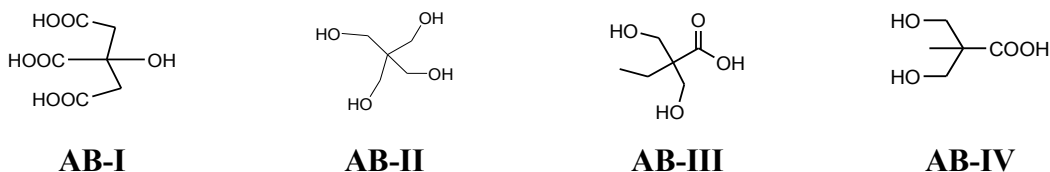


Figure 56. Structures envisagées en tant qu'agents de branchement : acide citrique (AB-I), pentaérythritol (AB-II), acides 2,2-bis(hydroxyméthyl)butyrique (AB-III) et 2,2-bis(hydroxyméthyl)propionique (AB-IV).

Ces composés sont à bas coût. De plus, ils représentent des substances biocompatibles, ce qui garantit leur sécurité biologique en tant que produits possibles de la biodégradation de futurs macromolécules polyesters: **AB-I** (DL50 orale : 6730 mg/kg chez le rat, 5040 mg/kg chez la souris; IP : 975 mg/kg chez le rat, 903 mg/kg chez la souris [447]), **AB-II** (DL50 orale: 18500 mg/kg chez le lapin, 25500 mg/kg chez la souris et 19500 chez le rat [349]), **AB-III** (DL50 orale: 2000 mg/kg chez le rat [448]), **AB-IV** (DL50 orale: 2000 mg/kg chez le rat [449]).

Il faut également mentionner que l'utilisation d'**AB-II** en tant qu'agent de branchement représente une approche inédite en chimie de dendrimère. La structure **AB-I**, bien que proposée à cette fin par H. Namazi et I. Haririanet col. [157, 232], présente néanmoins un certain problème dans la synthèse des macromolécules polyesters. Malgré une interprétation de résultats comme étant positifs, les auteurs n'ont aucunement mentionné l'absence totale des signaux dans l'intervalle 6,0-4,0 ppm dans les spectres RMN du proton, caractéristique pour les groupements esters aliphatiques. Ainsi, l'esterification de l'hydroxyle dans la molécule **AB-II** reste toujours un sujet à étudier plus profondément. Dans le cas de composés **AB-III** et **AB-IV**, leur usage comme points de divergence des dendrimères est déjà bien connu ([130, 240, 242, 450-452], voir aussi la section 1.2.3.4).

2.2.3.2. Modifications chimiques préliminaires de structures choisies comme agents de branchement

Le contrôle de l'activité chimique de groupements fonctionnels dans les structures de futurs agents de branchement est essentiel pour effectuer l'assemblage des dendrimères. Dans notre cas, la stratégie d'assemblage consiste à réaliser les synthèses de polyesters, en se basant sur les interactions directes entre des acides carboxylique et des alcools (par l'intermédiaire des esters actifs; voir plus de détails dans le chapitre 4). Par conséquent, une protection ou modification sélective préliminaire de groupements hydroxyles et/ou carboxyles était nécessaire afin d'éviter des réactions secondaires indésirables. Il est à noter qu'à cette étape du travail, nous étions particulièrement intéressés à trouver de nouvelles approches de protection/modification de **AB-I-IV** présélectionnés.

2.2.3.2.1 Monotrylation de l'acide citrique et du pentaérythritol

Par analogie avec la monotrylation de TEG et DD présentée dans la section 2.2.2.2, nous avons proposé la monotrylation comme protection sélective des hydroxyles dans les structures **AB-I** et **AB-II**.

Dans le cas de l'acide citrique, nous n'avons pas réussi à obtenir son dérivé oxy-monotrylé. Après l'évaporation de la pyridine de la masse réactionnelle, le reste a été extrait par le benzène. Deux fractions récupérées, soluble et non soluble dans le solvant, ont été analysées, en utilisant les techniques de RMN, analyse élémentaire et LC-MS. Le produit

soluble dans le benzène a été identifié comme le tritylcarbinol (TrOH), tandis que la fraction insoluble comme un mélange de l'acide citrique de départ et de l'acide aconitique (structure non saturé résultant de la déshydratation du **AB-I**). Une des raisons possibles de l'échec est une présence de groupements acides dans la structure de l'acide citrique, étant donné que la protection trityle n'est pas stable dans les milieux acides. Cette supposition a été également confirmée durant une autre synthèse (section 2.2.5.1.1). En particulier, la détritylation a eu lieu après l'insertion d'une fonction carboxylique dans la structure tritylée **18**. Une recherche bibliographique supplémentaire, afin de trouver des méthodes fiables d'esterification de **AB-I** par le groupement hydroxyle, n'a pas donné de résultats. Ceci est probablement dû à une capacité de l'acide citrique à perdre facilement ce groupement [453], ce qui finalement rend ce composé peu prometteur dans la synthèse de dendrimères polyesters.

Dans le cas de monotritylation du pentaérythritol, l'absence de carboxyles dans sa structure a permis d'éviter le problème d'hydrolyse. Cependant, une étude supplémentaire a été d'abord nécessaire, étant donné la solubilité très faible de **AB-II** dans la plupart des solvants organiques non ou faiblement polaires (pour éviter des réactions secondaires indésirables, des alcools et des acides ont été exclus).

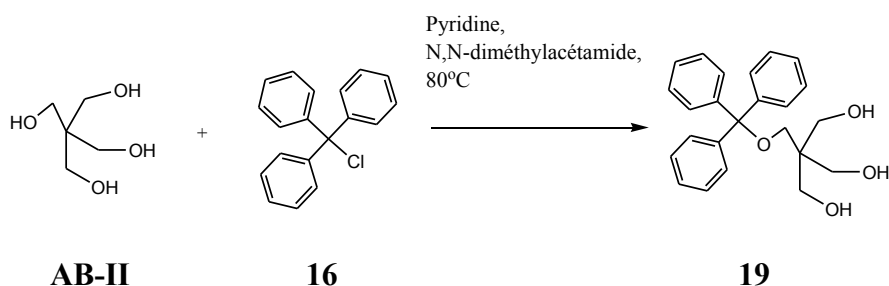


Figure 57. Synthèse du pentaérythritol monotritylé (19).

Parmi les solvants testés tels que toluène, benzène, éther diéthylique, éther méthyl-*tert*-butylique, acétonitrile, CHCl₃, CH₂Cl₂, acétone, pyridine, DMF, dioxane, THF et DMA, le résultat satisfaisant n'a été obtenu qu'avec le DMA. Ainsi, la réaction a été effectuée dans le mélange DMA–pyridine (10:1), en utilisant l'excès molaire de **AB-II** de 40 fois par rapport à TrCl, à 80°C pendant 12 h (**Figure 57, page 117**). Le produit monotritylé **19** a été isolé avec le

rendement général de 86% après deux étapes d'extraction : la première, par le chloroforme en présence de l'eau et, la deuxième, par le toluène, permettant d'éliminer des impuretés « surtritylées ». Les résultats de l'analyse élémentaire de ce nouveau composé sont en excellente concordance avec les valeurs théoriques (calculé: C 76,17%; H 6,92%; trouvé : C 76,11%; H 6,95%). Le spectre de masse contient des signaux appartenant à l'ion moléculaire du **19** et aux produits de sa fragmentation durant la procédure analytique (**Figure 58, page 118**). La surface du pic dans le chromatogramme LC-MS constitue 97,4%, ce qui démontre un haut degré de pureté du produit obtenu.

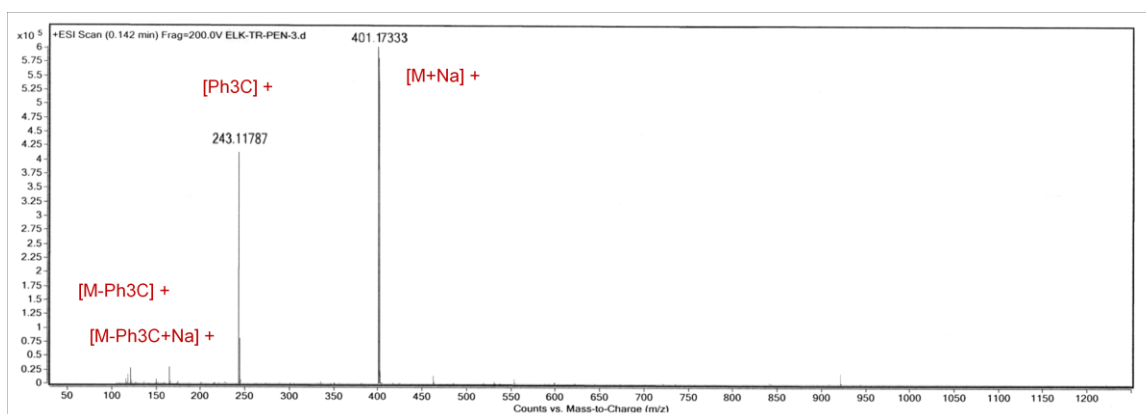


Figure 58. Spectre LC-MS(ESI)-TOF du monotritylpentaérythritol (19).

Dans le spectre RMN du proton (**Figure 59, page 119**), il y a des pics correspondants aux signaux typiques pour la structure **19**. Le spectre FTIR (non présenté) contient les bandes appartenant aux liaisons C-H des cycles aromatiques à 3090-3010 cm^{-1} et aliphatiques à 2950-2800 cm^{-1} etc.

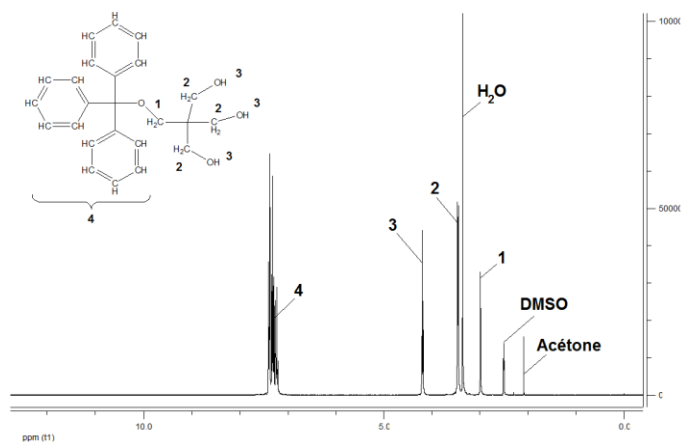


Figure 59. Spectre ^1H RMN (DMSO- d_6 , 300Hz) du monotritylpentaérythritol (19).

2.2.3.2.2. Benzylation sélective du carboxyle dans l'acide 2,2-bis(hydroxyméthyl)butyrique

Étant fragile dans des milieux fortement acides ou basiques ([363], pp. 378-383), les structures polyesters nécessitent une utilisation des protecteurs temporaires permettant d'éviter ces conditions. À cet égard, le groupement benzyle qui s'élimine par l'hydrogénation catalytique sans dégrader les structures polyesters [454, 455], pourrait présenter une solution efficace. Dans ce contexte, une approche innovante consiste à utiliser avec la structure **AB-III** le protocole de K. Furuta et col. [455], proposé pour protéger sélectivement deux carboxyles de l'acide tartrique en présence de ses deux groupements hydroxyles libres. La benzylation a été réalisée par l'interaction du **AB-III** avec l'alcool benzylique en présence du catalyseur, acide *para*-toluènesulfonique, dans le toluène à 130-140°C pendant 40 h (**Figure 60, page 119**). Le contrôle de la réaction a été effectué par la mesure de la quantité d'eau accumulée dans la trappe de Dean-Stark durant la réaction.

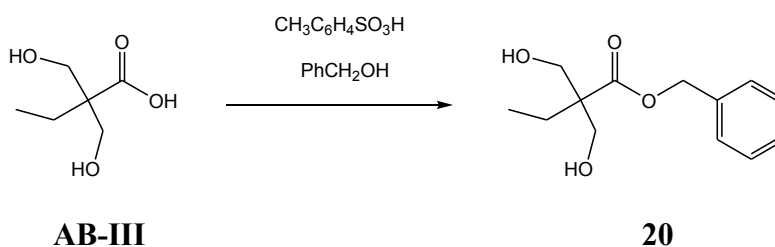


Figure 60. Benzylation sélective de l'acide 2,2-bis(hydroxyméthyl)butyrique.

Malgré la présence du composé visé **20** dans le mélange de produits résultant de cette réaction, nous n'avons pas réussi à l'isoler, en utilisant plusieurs procédures d'extraction, recristallisation, ainsi qu'une séparation sur colonne. En particulier, après la purification chromatographique, l'analyse LC-MS a montré que le diol protégé **20** constituait moins de 40% par rapport aux autres dérivés secondaires de la zone récupérée (**Figure 61, page 120**). Ainsi, une élaboration d'une procédure de purification plus efficace reste nécessaire avant d'utiliser le produit dans des synthèses ultérieures.

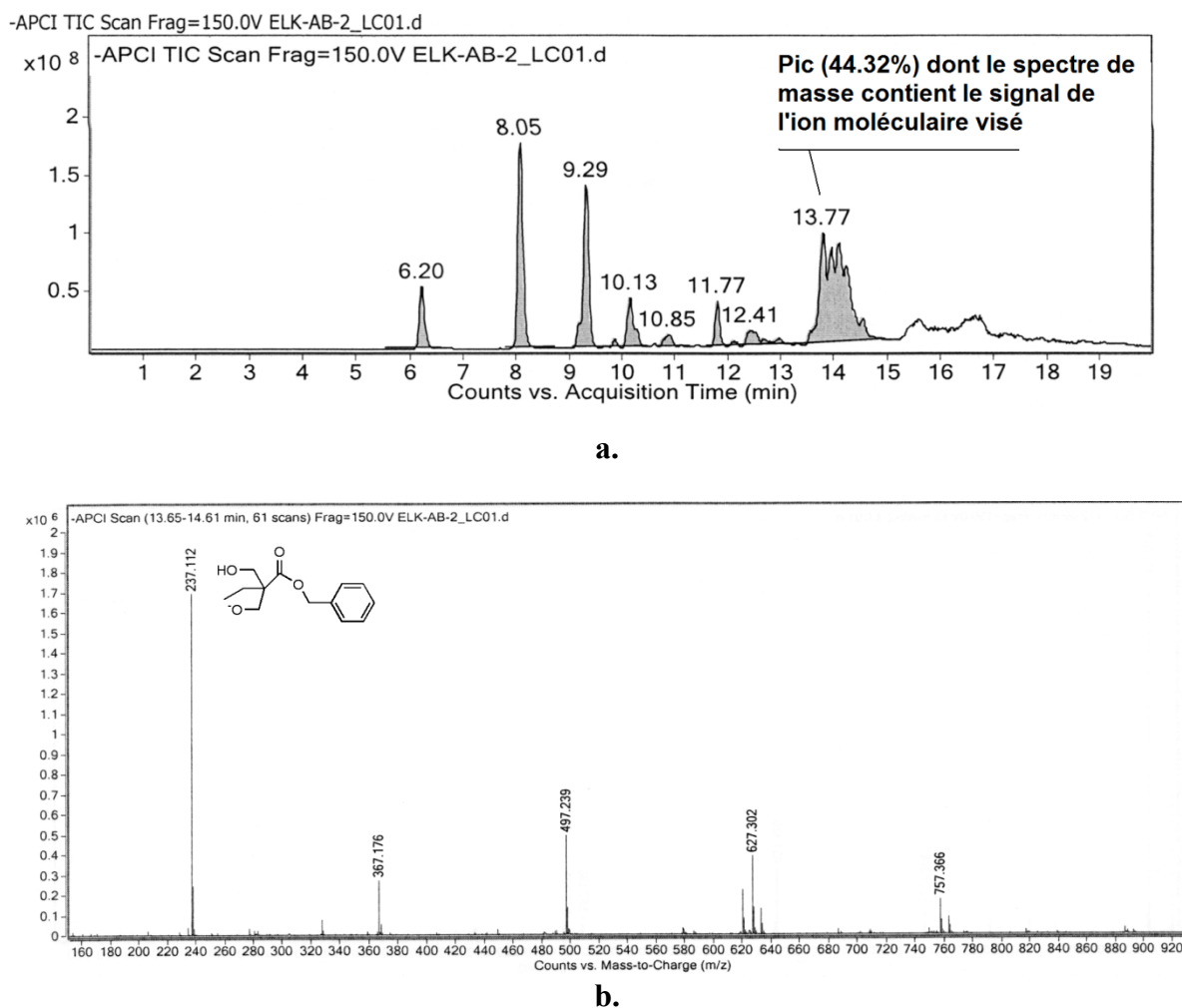


Figure 61. Résultats de l'analyse LC-MS du produit obtenu par l'interaction de l'acide 2,2-bis(hydroxyméthyl)butyrique avec l'alcool benzylique en présence de l'acide *para*-toluènesulfonique : (a) chromatogramme; (b) spectre de masse (APCI) du pic contenant le signal de l'ion moléculaire visé.

2.2.3.2.3. Substitution d'hydroxyles par bromes dans l'acide 2,2-bis(hydroxyméthyl)propionique

Afin d'assembler des dendrimères polyesters, la protection temporaire d'hydroxyles dans la structure **AB-IV** se base majoritairement sur l'utilisation de dérivés *tert*-butyl-diméthylsilyles [451] et benzylidènes [452, 456], produits relativement chers pour la synthèse à grande échelle. Dans ce contexte, la substitution d'hydroxyles par des atomes de brome présente potentiellement plus d'avantages. Le dérivé dibromo correspondant pourrait être utilisé dans des réactions d'éthérisation et/ou d'estérification sans toucher au groupement carboxylique, p.ex., avec les alcoolates de métaux alcalins, les sels d'acides carboxyliques etc. De plus, l'utilisation de protocoles généraux qui font appel à la synthèse de dérivés bromés à partir des alcools primaires et l'acide bromhydrique (un déchet de nombreux procédés chimiques industriels [457]) pourrait rendre la transformation **AB-IV** à la fois efficace et économique.

Pour réaliser cette approche, une procédure de L. Tietze et T. Eicher ([367], p. 43), pour obtenir le 1-bromo-*n*-heptane à partir du *n*-heptan-1-ol, a été utilisée. En particulier, le diol **AB-IV** a été traité par l'acide bromhydrique à 48% en présence de l'acide sulfurique comme catalyseur à 150°C pendant 7 h (**Figure 62, page 121**).

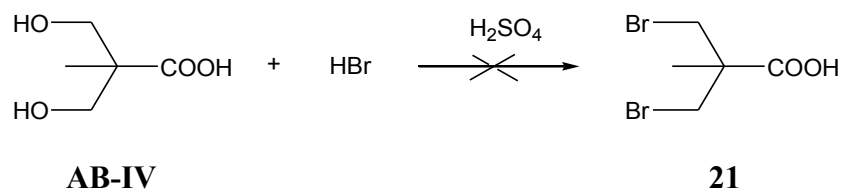


Figure 62. Réaction envisagée pour obtenir l'acide 2,2-bis(bromométhyl)propionique.

Cependant, le produit isolé par l'extraction avec le chloroforme en présence de NaCl et caractérisé au moyen de l'analyse élémentaire (calculé, % : C 23,10; H 3,10; S 0,0; trouvé, % : C 30,62; H 4,63; S 0,0) et LC-MS (m/z attendu : 259 ; observé : 399), a montré des caractéristiques qui ne correspondent pas à la structure visée **21**. Ainsi, bien que

potentiellement assez prometteuse, l'approche de transformation directe de **AB-IV** en son dérivé dibromé **21** nécessite d'élaborer une procédure réactionnelle plus fiable.

2.2.4 Choix des groupements terminaux

2.2.4.1. Présélection des groupements terminaux

Dans le cadre du présent projet de recherche, les groupements terminaux (**Figure 32, page 75**) déterminent les propriétés de surface de la couche externe hydrophile des futurs dendrimères, formée par les chaînes PEG. À cet égard, les groupements oxyméthyle et hydroxyle sont les plus prometteurs. En particulier, l'oxyméthyle diminue des effets d'hypersensibilité de chaînes PEG [441], tandis que l'hydroxyle permet une modification ultérieure de la surface, p.ex., par le greffage des ligands favorisant le meilleur ciblage et/ou de molécules-marqueurs (fluorescents, radioactifs etc.) pour étudier la distribution de dendrimères à l'intérieur de l'organisme. Les PEG monométhoxy-substitués constituent un groupe de composés bien connus et disponibles à grande échelle. Un assemblage de dendrimères polyesters à partir des chaînes PEG hydroxyterminées nécessite des étapes de modification non symétriques supplémentaires.

Dans le contexte du présent travail, comme groupement terminal temporaire de futurs dendrimères nous avons proposé d'utiliser le groupement allyle ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$). Ce groupement doit être stable dans les conditions envisagées pour assembler nos macromolécules polyesters et, de plus, permet à l'étape finale sa transformation en groupement hydroxypropyle ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$). Ainsi, la section suivante sera une occasion de présenter nos travaux de synthèse concernant le greffage non symétrique du groupement allyle au TEG.

2.2.4.2. Greffage du groupement allyle au tétraéthylèneglycol

Afin d'effectuer la monosubstitution avec l'allyle dans la structure **S-I**, deux nouvelles approches ont été proposées et testées. Les deux approches sont basées sur l'utilisation de la réaction de Williamson ([363], pp. 386-387) menant à la synthèse des éthers à partir d'un dérivé halogéné aliphatique primaire et d'un alcoolate d'alcool organique. La première, multiétape, consiste à utiliser comme produit de départ le dérivé monotritylé **17** dont la

synthèse a été décrite dans la section 2.2.2.2 (**Figure 63a, page 123**). La deuxième approche se base sur l'interaction directe entre l'alcoolate de **S-I** et le bromure d'allyle (**22**) sans procédures supplémentaires de protection et déprotection (**Figure 63b, page 123**).

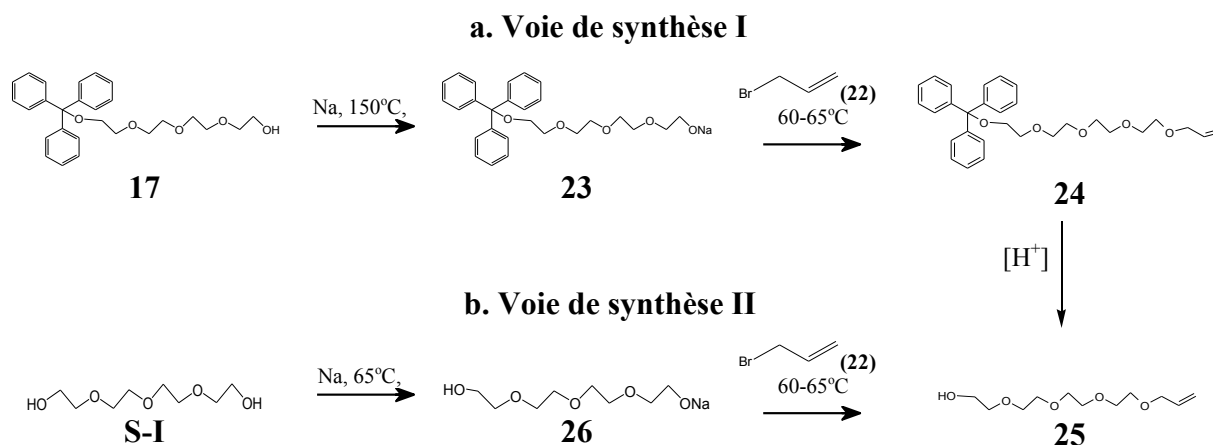


Figure 63. Deux approches proposées pour obtenir le monoallyl-TEG (25).

L'obtention d'alcoolates intermédiaires **23** et **26** a été effectuée par l'interaction d'alcools de départ avec le sodium métallique. Étant donné une réactivité très faible du monotriyl-TEG, une augmentation de température était nécessaire pour compléter la réaction : d'abord 24 h à 22°C, ensuite, chaque 24 h une augmentation de 20°C de 70 à 150°C, finalement 24 h à 150°C. Dans le cas du **S-I**, une agitation à 60-65°C avec l'excès molaire d'alcool initial de 9 fois par rapport au métal était suffisante pour constater la disparition complète de morceaux de sodium dans la masse réactionnelle après 15 h. Dans une expérience supplémentaire, cette réaction a été également complétée après 3 jours d'agitation à température de la pièce.

L'éthérisation de produits **23** et **26** avec le bromure **22** a été ensuite réalisée à 60-65°C pendant 72 h (**Figure 63, page 123**).

Le produit tritylé **24** a été purifié en plusieurs étapes : d'abord par l'extraction avec le chloroforme et, finalement, par la chromatographie sur colonne de silice, en utilisant le mélange CHCl₃:acétone (10:1) comme éluant. Le rendement d'obtention de **24** est de 43%. La structure du produit a été confirmée par l'analyse élémentaire, FTIR et la RMN du proton (**Figure 64a, page 124**).

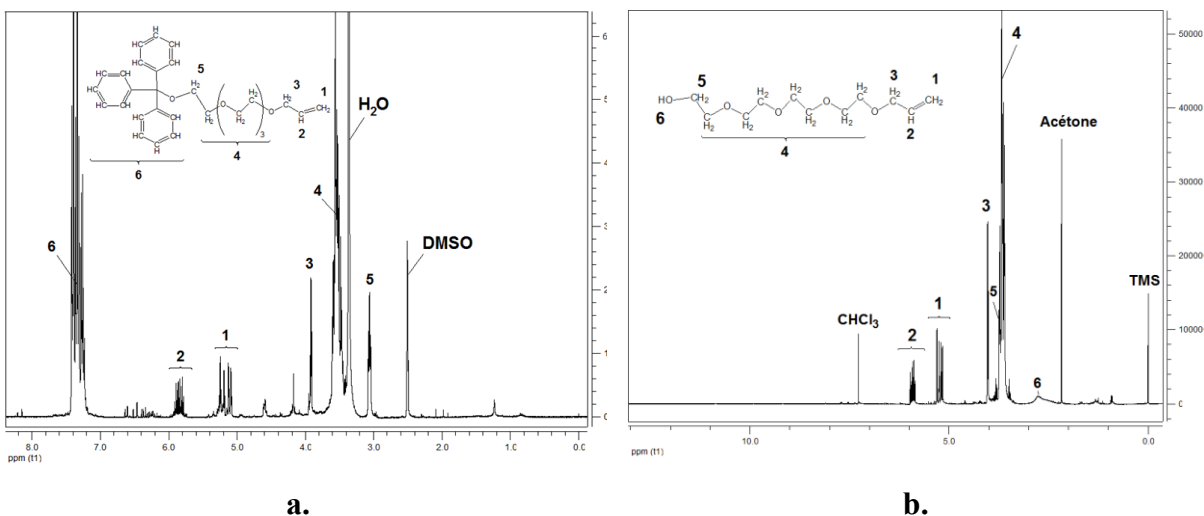


Figure 64. Spectres ^1H RMN: (a). du monoallyl-TEG tritylé (24**) dans le $\text{DMSO}-d_6$ et (b). du monoallyl-TEG (**25**) dans le CDCl_3 .**

Pour effectuer l'étape finale de la voie réactionnelle I, soit la détritylation du dérivé **24**, deux procédures ont été testées. La première, l'interaction avec l'acide acétique aqueux à 80%, basée sur le protocole de M. Lewdorowicz, élaboré pour déprotéger la fonction hydroxyle dans l'ARN [458], n'était pas efficace, dû à une solubilité très faible du **24** dans ce milieu. La deuxième procédure consistait à utiliser le mélange acide acétique–eau–acétone (4:1:3), en se basant sur l'étude fondamentale sur la détritylation de B. Helferich [445]. Après la neutralisation de l'acide acétique avec le carbonate de sodium, le tétraéthylèneglycol monoallylé (**25**) a été isolé d'abord par l'extraction avec le toluène et, finalement, par la chromatographie sur colonne (silice, CHCl_3 :acétone (10:1)). Le rendement atteint à cette étape est de 78%; le rendement général du **25**, incluant l'étape de tritylation du **S-I** (section 2.2.2.2), est ainsi de 32%.

Dans le cas de la voie réactionnelle II, le problème principal était d'élaborer une procédure fiable de séparation du dérivé monoallylé **25** de son précurseur **S-I**. À cette fin, plusieurs méthodes ont été testées. En particulier, les procédures d'extraction simple (en présence d'eau, par l'éther diéthylique, l'éther *tert*-butyl-méthylique, le toluène, le benzène ou l'hexane), l'extraction chaude continue (avec le montage identique à ce qui est proposé par L. Tietze et Th. Eicher pour les liquides organiques plus légers que l'eau ([367], p.16)), ainsi que

la chromatographie sur colonne (SiO_2 , CHCl_3 :MeOH (5:1)), étaient soit inefficaces, soit amenaient à des rendements très bas du produit voulu. Finalement, la meilleure variante que nous avons pu mettre au point, était une extraction à deux étapes. La première est une extraction de dérivés mono- et diallylés par le chloroforme en présence de l'eau et, ensuite, la deuxième, une extraction du dérivé diallyle symétrique par l'hexane. Le rendement général atteint avec cette procédure est de 75%.

Ainsi la synthèse du composé **25** par la voie II (**Figure 63b, page 123**), sans procédures supplémentaires de protection et déprotection, est rendu plus efficace non seulement au niveau du nombre d'étapes réactionnelles et de purification, mais également au niveau du rendement. Malgré la possibilité d'obtenir exclusivement le dérivé mono **25**, la première approche était cependant considérablement moins efficace. Ceci pourrait être expliqué, premièrement, par une réactivité très faible de **17** dans la réaction avec le sodium métallique, ce qui nécessitait l'utilisation de températures élevées menant à la formation de produits de dégradation (des impuretés non identifiées de couleur marron foncé ont été isolées lors de la purification par chromatographie). Deuxième facteur qui a contribué à la réduction du rendement final, est un nombre élevé d'étape de purification, y compris deux étapes distinctes de chromatographie sur colonne.

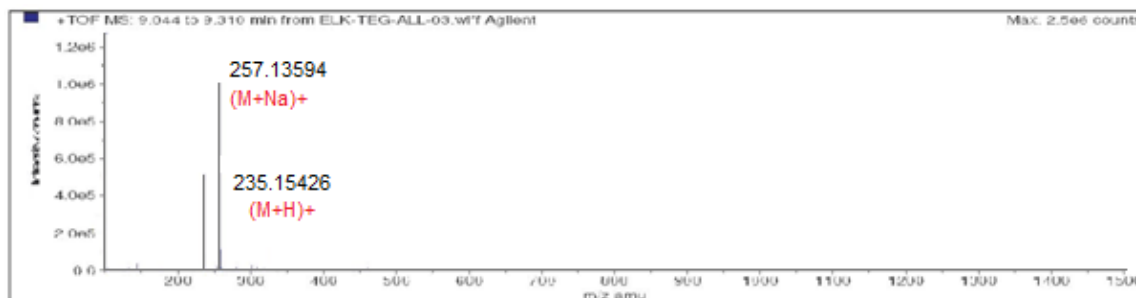


Figure 65. Spectre de masse (MS-TOF, en mode positive) du TEG monotritylé (25**) contenant des signaux principaux appartenant à ses ions moléculaires.**

La structure du produit **25** a été confirmée par l'analyse RMN (**Figure 64b, page 124**), la spectrométrie de masse (**Figure 65, page 125**), FTIR et l'analyse élémentaire (voir plus de

détails dans la section 2.3.4). Les paramètres structuraux du produit étaient identiques pour les deux approches réactionnelles testées.

2.2.5 Autres travaux de synthèse préliminaires

2.2.5.1. Obtention des acides carboxyliques à partir des alcools primaires

Une des étapes des travaux de synthèses préliminaires consistait également à obtenir des structures portant des groupements carboxyliques à partir des alcools primaires. Ceci pourrait donc faciliter par la suite la synthèse des structures polyesters complexes nécessaires pour assembler nos futurs dendrimères. À cet égard, deux différentes approches de carboxylation ont été testées, le greffage du groupement succinyle et la réaction d'oxydation de Jones.

2.2.5.1.1. Greffage du groupement succinyle

2.2.5.1.1.1. Succination du monoallyl-tétraéthylèneglycol

La réaction de succination d'alcools primaires a été d'abord testée sur le monoallyl-tétraéthylèneglycol, **25** (Figure 63, page 123), en particulier, pour avoir une possibilité de réaliser ensuite le greffage par esterification de la structure résultante à l'agent de branchement hydroxylé **19** (Figure 57, page 117). La réaction a été effectuée par l'interaction du **25** avec l'anhydride succinique **2** (Figure 66, page 126).

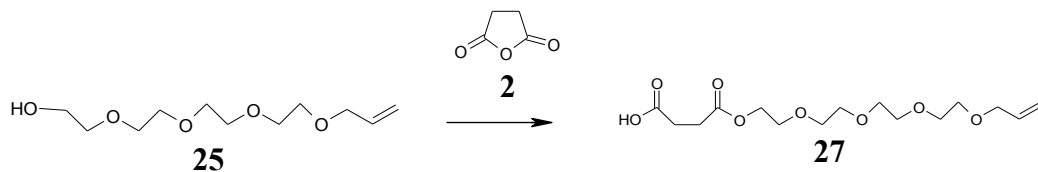


Figure 66. Équation chimique générale de la succination du monoallyl-tétraéthylèneglycol.

Afin d'optimiser les conditions réactionnelles de la succination, trois approches différents ont été essayées:

- i) interaction de **25** avec **2** dans la pyridine en présence de DMAP comme catalyseur à température ambiante pendant 72 h, en se basant sur le protocole de l'obtention des acétoesters de T. Back et J. Wulff [459];
- ii) interaction directe entre **25** et **2** dans la pyridine à température ambiante pendant 72 h comme rapporté dans le cas de la synthèse de monomères aliphatiques hydroxylés par A. Carnahan et col. [355];
- iii) interaction directe entre **25** et **2** sans solvant à 150-155°C pendant 8 h, par analogie avec les protocoles de M. Hassan et de H. Korhonen élaborés pour la succination respectivement de la bagasse [460] et d'oligomères polylactides et polycaprolactones [461].

Dans les trois cas (i-iii), la purification a été d'abord réalisée par l'hydrolyse de l'excès du **2** en présence de l'eau pendant 15 min (la durée est déterminée par un test préliminaire avec le **2** pur). Cette procédure a été proposée suite à plusieurs tests infructueux menés pour isoler sélectivement le composé **2** du produit **27** par extraction, en utilisant différents solvants organiques. L'acide succinique résultant de l'hydrolyse du **2** est une substance pratiquement insoluble dans des solvants organiques apolaires, ce qui le rend facilement éliminable dans notre cas. L'étape finale de purification était la chromatographie sur colonne (élution par le mélange CHCl₃-MeOH (5:1)). Dans le cas des approches (i) et (ii), l'évaporation préliminaire de la pyridine a été également nécessaire.

La structure visée **27** a été prouvée pour toutes les trois approches testées par les résultats d'analyse RMN (**Figure 67, page 128**), FTIR et l'analyse élémentaire (voir les détails dans la section expérimentale 2.3.5). La pureté du produit a été également prouvée avec l'analyse LC-MS-TOF (**Figure 68, page 128**) dont la surface du pic chromatographique appartenant au **27** atteint 100%.

Parmi les trois méthodes, le rendement maximal de 75% a été atteint dans le cas de l'interaction directe entre **25** et **2** sans solvant (approche iii), comparativement aux rendements

de 20% et 22% obtenus respectivement avec les approches (i) et (ii). Ceci suggère que la méthode (iii) présente plus d'avantages sur le plan de synthèse et de purification.

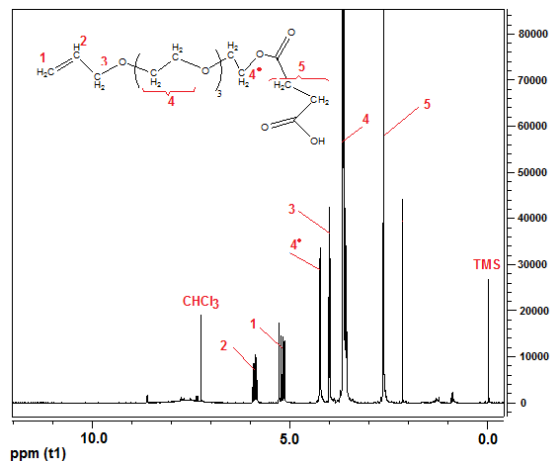


Figure 67. Spectre RMN du proton (CDCl_3 , 300 MHz) du produit 27.

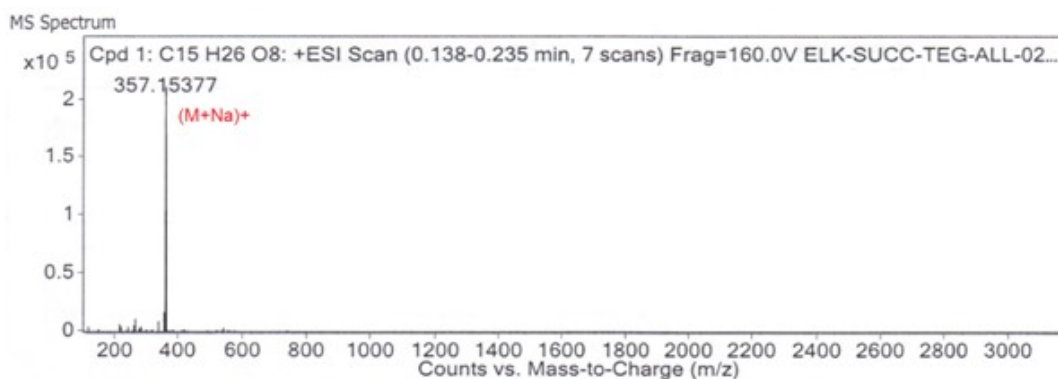


Figure 68. Spectre LC-MS-TOF de masse du produit 27.

2.2.5.1.1.2. Succination du monotrityl-décane-1,2-diol

La réaction du greffage du groupement succinyle a été également testée sur la structure monotritylée **18**. L'objectif de cette expérience était de vérifier non seulement une possibilité d'obtenir l'acide **28**, mais également d'étudier la stabilité du groupement trityle en présence du carboxyle intramoléculaire. La réaction a été réalisée par analogie avec la méthode de succination du monoallyl-TEG présentée dans la section précédente. En particulier,

l'interaction de l'alcool **18** avec un excès de l'anhydride succinique (**2**) a été effectuée à 150°C pendant 24 h (**Figure 69, page 129**) Après le refroidissement de la masse réactionnelle, le solide résultant a été dissous dans l'acétone. Une partie de cette solution a été ensuite traitée par l'eau distillée pendant 15 min, afin de transformer l'anhydride succinique en acide succinique qui est soluble dans l'eau. Ensuite, les produits hydrophobes ont été extraits par le chloroforme. Après l'évaporation du solvant, une deuxième extraction par le toluène a été effectuée. L'analyse (RMN, FTIR et analyse élémentaire) montre que le produit tritylé **28** est absent parmi les produits récupérés. La partie du produit soluble dans le toluène représente le TrOH (**29**), tandis que le reste insoluble est identifié comme 1,10-dioxysuccinyl-décane (**30**). Ainsi, la formation du dérivé **30** signifie que la réaction de détritylation a eu lieu durant la réaction. Ceci suggère que le groupement carboxyle n'est pas compatible avec l'oxytrityle se trouvant dans la même structure moléculaire.

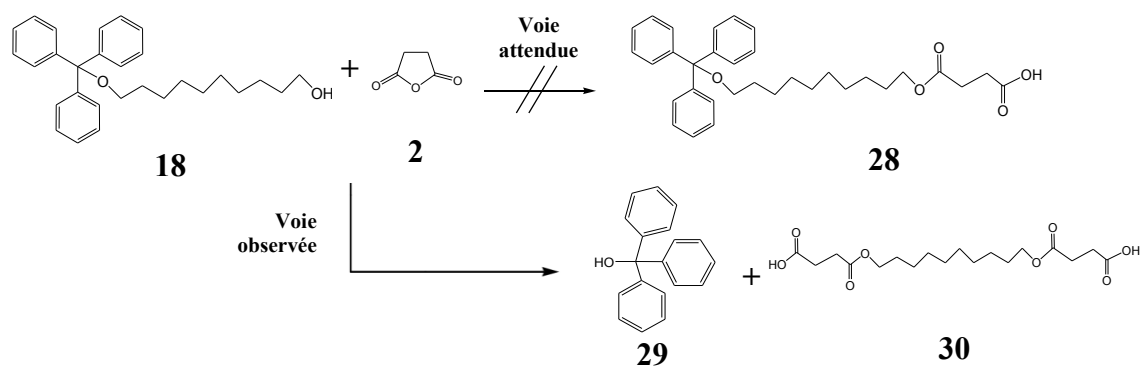


Figure 69. Succination du mono-O-trityl-1,10-décanediol (18**) avec l'anhydride succinique (**2**) en excès.**

2.2.5.1.2. Oxydation d'hydroxyle par la réaction de Jones.

Afin de réaliser la réaction d'oxydation de Jones, le MeO-PEG-1000 (**31**) a été utilisé comme produit de départ. Étant donné une polydispersité des produits techniques PEG, le rôle du dérivé oxydé (**32**), se limitera à la formation de la partie extérieure hydrophile de nos futurs dendrimères, tout en évitant une incertitude structurale de la partie centrale de macromolécules.

D'une manière générale, la réaction de Jones consiste à faire réagir des alcools dissous dans l'acétone avec l'excès du réactif de Jones (H_2CrO_4) obtenu par la solubilisation de trioxyde de chrome (VI) dans l'acide sulfurique aqueux [462, 463]. L'oxydation de Jones a été utilisée pour oxyder plusieurs types d'alcools y compris des PEG [464-470] et des dérivés esters [84, 471]. Dans le cas de transformation des alcools primaires en ces dérivés carboxyliques, un excès double du réactif de Jones est nécessaire pour compléter la réaction qui se déroule en deux étapes, l'oxydation d'alcool en aldéhyde et la transformation de l'aldéhyde résultant en acide carboxylique. Plusieurs possibilités concernant des améliorations au niveau de rendement sont également rapportées [472, 473]. Parmi les protocoles publiés, celui de R. Dhanikula et col. [84] qui fait appel à l'utilisation du réactif de Jones en manque par rapport à l'alcool à oxyder, n'a pas été confirmé par nos expériences.

L'oxydation du **31** (**Figure 70, page 130**) a été finalement effectuée, en utilisant une procédure de chargement inverse, proposée pour la première fois par B. Holland et N. Gilman [472]. En particulier, contrairement à la méthode classique, la solution d'alcool dans l'acétone a été ajoutée lentement vers le réactif de Jones, ce qui permet généralement d'augmenter le rendement du produit principal et de réduire le taux des esters, produits secondaires.

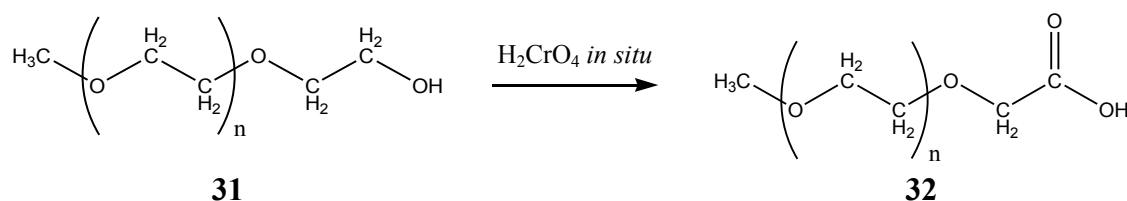


Figure 70. Oxydation du monométhoxy-PEG-1000-OH (30) en son dérivé carboxylique (32) par la réaction de Jones.

La structure de l'acide **32** résultant a été confirmée par les techniques de RMN et FTIR (voir les détails dans la section 2.3.5).

2.2.6. Conclusion du chapitre

En se basant sur les résultats obtenus à l'étape concernant le choix des éléments structuraux de nos futurs dendrimères, ainsi que des travaux de synthèse préliminaires, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- les structures **C-I**, **C-III-VI** et **C-VIII** sont considérées comme étant les plus prometteuses en tant que cœurs de nos futurs dendrimères. Cependant, dans le cas de **C-III-V**, les réactions pouvant mener à la synthèse des anhydrides cycliques telle qu'une interaction avec le chlorure de thionyle, doivent être exclues;
- les diols **S-I** et **S-II** permettant les réactions de leur monotritylation représentent des composés intéressants comme futurs groupements espaceurs;
- parmi plusieurs composés envisagés comme agents de branchement, seulement la structure **AB-II** permettant sa monotritylation a été choisie à cette fin;
- le groupement allyle dont une procédure de greffage au TEG, simple et efficace a été élaborée, permet de le considérer comme étant prometteur en tant qu'un groupement terminal temporaire;
- étant donné que le groupement carboxyle n'est pas compatible avec l'oxytrityle se trouvant dans la même structure moléculaire, des synthèses de telles structures doivent être exclues des travaux futurs.

2.3. Partie expérimentale

Les détails sur les réactifs chimiques, ainsi que sur l'appareillage et les conditions des procédures des caractérisations structurales sont présentés respectivement dans les annexes 1 et 2 du présent manuscrit. Les structures chimiques sont également présentées dans l'annexe 6.

2.3.1. Synthèse et caractérisation des structures de cœur

2.3.1.1. Cœur C-I à base de pentaérythritol et d'acide succinique

Pentaérythritol tétrasuccinate (C-I). Un mélange de 1,00 g ($7,34 \times 10^{-3}$ mol) de pentaérythritol, 3,67 g ($3,67 \times 10^{-2}$ mol) d'anhydride succinique et de 50 ml de pyridine est

laissé sous agitation à 60-65°C pendant 48 h. La pyridine est ensuite évaporée sous pression réduite. La purification du produit brut est effectuée par extraction à l'éther méthyl-*tert*-butylique (100 ml) à 45-50°C à reflux, en présence de 2-3 g de charbon actif broyé. Après filtration, la solution résultante est évaporée sous pression réduite pour donner 3,23 g de produit sous forme d'une poudre cristalline blanche. Rendement : 82%. ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; DMSO-d₆): 12,17 (s, 4H, -COOH); 3,35 (s, 8H, -CH₂-); 2,49 (m, 8H, -O-C(O)-CH₂-); 2,41 (s, 8H, -CH₂-COOH). ¹³C RMN (δ, ppm; 75 MHz; DMSO-d₆): 173,55; 173,33; 171,64; 62,09; 41,88; 39,66; 39,38; 39,10; 28,71. FTIR (ν_{min}, cm⁻¹): 3050 (C(O)O-H), 2957, 2928, 2856, 2739, 2628, 2534 (C-H), 1723, 1689 (-O-C(O)-), 1411 (>CH₂), 1307, 1262, 1197, 1176 (C-O), 1028, 908, 892 (>CH₂), 801, 703, 637, 605, 582, 568 (C-H). Analyse élémentaire (%): calculé C 47,02; H 5,26; trouvé C 46,90; H 5,22. MS (m/z): EM calculé pour C₂₁H₂₈O₁₆: 536,14 [M]⁰; trouvé en HPLC-ESI-TOF (-) pour le pic principal (98,3%) à 10,35 min: 535,13 [M-H]⁻; 557,11 [M-2H+Na]⁻; 579,09 [M-3H+2Na]⁻; 601,66 [M-4H+3Na]⁻.

2.3.1.2. Cœur C-VIII à base de glycérol et d'acide 9,10-dihydroxystéarique

Glycéryl tris[9,10-(thréo)-dibromoostadécanoate] (12). 5,57 g d'huile d'olive est dissous dans 50 ml de chloroforme. Après avoir amené la solution à 0°C, une solution de 1,1 ml (3,43 g) de brome moléculaire dans 20 ml de chloroforme est ajoutée goutte à goutte sous agitation. Le dosage de l'halogène est arrêté lorsque la masse réactionnelle reste légèrement colorée après plus de 5 min d'agitation. Après un lavage d'abord avec une solution aqueuse à 5% de Na₂SO₃ et, ensuite, avec l'eau, la phase organique est recueillie et évaporée sous pression réduite. Après le séchage, le produit représente un liquide visqueux incolore (8,62 g; rendement: 97%). ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 5,25 (s, 1H, RO-CH₂-C(OR)H-CH₂-OR); 4,29-4,25 (m, 4H, RO-CH₂-C(OR)H-CH₂-OR); 4,19-4,17 (m, 2H, H-C-Br); 4,14-4,09 (m, 4H, RO-CH₂-C(OR)H-CH₂-OR); 2,29 (m, 6H, ROC(O)-CH₂-R); 2,02 (m, 12H, -CH₂-CH(Br)-); 1,81 (m, 12H, -CH₂-CH(Br)-); 1,58 (s, 6H, ROC(O)-CH₂-CH₂-R); 1,30-1,22 (m, nH, -CH₂-); 0,87 (m, 9H, -CH₃). ¹³C RMN (δ, ppm; 100 MHz; CDCl₃): 174,01; 173,60; 69,74; 69,74; 62,93; 60,52; 35,66; 34,81; 32,71; 30,53; 30,19; 29,79; 29,66; 28,59; 25,63; 23,48. FTIR (ν_{min}, cm⁻¹): 2923, 2853 (C-H), 1741 (-O-C(O)-), 1459 (-CH₃ et >CH₂), 1377 (-CH₃), 1239, 1160 (C-O), 1119, 1097, 723(>CH₂), 548 (C-Br). Analyse élémentaire (%): calculé pour le dérivé **12** à base de trioléine **11** pur (C₅₇H₁₀₄O₆Br₆) : C 50,16; H 7,68; trouvé : C 51,73; H 7,88.

Glycéryl tris[9,10-(thréo)-diacétyloxyoctadécanoate] (13). Un mélange de 40 ml de DMF et de 4,00 g d'acétate de sodium est séché par méthode azéotropique de Dean-Stark avec 100 ml de toluène. Le toluène est ensuite évaporé sous vide et 0,96 g de produit polybromés **12** est ajouté. Le mélange résultant est laissé à 130-135°C pendant 48 h sous agitation, en utilisant un tube rempli de granules de CaCl₂ pour empêcher l'humidité de l'air ambiant de pénétrer dans la masse réactionnelle. Après avoir refroidi la masse jusqu'à la température ambiante, le produit brut est extrait avec 70 ml d'hexane et ensuite lavé avec 50 ml d'eau. Après évaporation sous pression réduite, le mélange résultant est purifié par chromatographie sur gel de silice, en utilisant le chloroforme comme éluant (contrôle par CCM, éluant CHCl₃-méthanol 20:1). La solution recueillie est évaporée sous pression réduite pour donner 0,39 g d'huile visqueuse incolore. Rendement : 45%. ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 5,65-5,58 (m, 6H, -HC(OAc)-HC(OAc)-); 5,28 (s, 1H, RO-CH₂-C(OR)H-CH₂-OR); 4,23-4,09 (m, 4H, RO-CH₂-C(OR)H-CH₂-OR); 2,42 (m, 6H, -CH₂-HC(OAc)-); 2,36 (m, 18 H, -O-C(O)-CH₃); 2,33 (m, 6H, ROC(O)-CH₂-R); 2,16 (m, 6H, -CH₂-HC(OAc)-); 2,04 (m, 12H, -CH₂-CH₂-HC(OAc)-); 1,63 (s, 6H, ROC(O)-CH₂-CH₂-R); 1,56 (m, 6H, ROC(O)-CH₂-CH₂-R); 1,32-1,25 (m, nH, -CH₂-); 0,90 (m, 9H, -CH₃). ¹³C RMN (δ, ppm; 100 MHz; CDCl₃): 174,01; 62,94; 42,04; 34,88; 32,75; 30,52; 30,06; 25,69; 23,52; 14,93. FTIR (ν_{min}, cm⁻¹): 2923, 2854 (C-H), 1743 (-O-C(O)-), 1459 (-CH₃ et >CH₂), 1378 (-CH₃), 1238, 1159 (C-O), 1119, 1097, 987, 723 (>CH₂). Analyse élémentaire (%): calculé pour le dérivé **13** à base de trioléine pur (C₆₉H₁₂₂O₁₈): C 66,85; H 9,92; trouvé C 65,69; H 10,13.

Glycéryl tris[9-hydroxy-10-oxyformyl-octadécanoate] (15). 1,4 ml de H₂O₂ (50% dans l'eau) est ajouté à 7 ml d'acide formique (98% dans l'eau) sous agitation à température ambiante. Le mélange est laissé sous agitation pendant 25 min pour compléter la formation de l'acide peroxyformique *in situ*. Ensuite, 8 ml d'éther éthylique est ajouté. Lorsque le mélange devient homogène, 1,0 g (~0,0011 mol) d'huile insaturée **11** est chargé. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 30 min à température ambiante. Après l'achèvement, une solution aqueuse de NaCl à 10% est ajoutée sous agitation pour déclencher la séparation de couches réactionnelles (Attention à la formation intense des vapeurs d'oxygène et d'éther!). La phase organique supérieure est ensuite isolée avec une ampoule à décanter, lavée à l'eau (2 x 50 ml) et, finalement, évaporée sous vide pour donner un liquide visqueux incolore.

Dérivé 15 à base de trioléine 11 standard. 1,17 g (rendement: 97%). ^1H RMN (δ , ppm; 300 MHz; CDCl_3): 8,20-8,05 (m, 3H, $H\text{-C(O)-O-}$); 5,35-5,20 (m, 1H, $\text{RO-CH}_2\text{-C(OR)H-CH}_2\text{-OR}$); 5,30 (s) et 5,00-4,85 (s) (3H, -HC(OC(O)H)-); 4,30-4,00 (m, 4H, $\text{RO-CH}_2\text{-C(OR)H-CH}_2\text{-OR}$); 3,75-3,20 (m, 3H, -HC(OH)-); 2,50-2,00 (m, 6H, $\text{R''OC(O)-CH}_2\text{-R'}$, and 3H, -HC(OH)-); 1,75-1,52 (m, 6H de $\text{R''OC(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-R'}$ et 6H de $\text{-CH}_2\text{-HC(OC(O)H)-}$); 1,52-1,38 (m, 6H, $\text{-CH}_2\text{-HC(OH)-}$); 1,38-1,10 (m, 60H, $\text{-CH}_2\text{-}$); 0,95-0,75 (m, 9H, -CH_3). ^{13}C RMN (δ , ppm; 75 MHz; CDCl_3): 173,29; 160,99; 74,51; 72,21; 68,88; 62,10; 34,18; 34,00; 33,55; 31,86; 30,56; 30,00-28,70; 25,69; 25,59; 25,33; 24,78; 22,65; 14,09. FTIR (ν_{min} , cm^{-1}): 3350 (-O-H and $\text{-C(O)-H}\cdots\text{O(H)-}$), 2921, 2853 (C-H), 1741 (>CH-O-C(O)-H), 1723 (-O-C(O)-), 1466 (-CH_3 and >CH_2), 1415, 1377 (-CH_3), 1172 (-O-C(O)-H), 1104 (C-OH), 722 (>CH_2). Analyse élémentaire (%): calculé C 67,26; H 10,35; trouvé C 66,41; H 10,59. MS (m/z): EM calculé pour $\text{C}_{60}\text{H}_{110}\text{O}_{15}$: 1070,78 $[\text{M}]^0$; trouvé en ESI-TQ (-): 1077,8 $[\text{M+Li}]^-$; 1049,8 $[\text{M-COH+H+Li}]^-$; 1093,8 $[\text{M+Na}]^-$; 1087,9 $[\text{M+OH}]^-$; 1065,8 $[\text{M-CHO+H+Na}]^-$; 985,8 $[\text{M-3CHO+2H}]^-$; 1105,9 $[\text{M+2N}]^-$; en ESI-TQ (+): 527,5 $[\text{M-2COH-H+2Li}]^{2+}$; 541,6 $[\text{M+N}_2]^{2+}$ ou $[\text{M-2COH+3Na+3H}]^{2+}$; 555,6 $[\text{M+Na+O+H}]^{2+}$; 1037,8 $[\text{M-2COH+2H+Na}]^+$; 1053,8 $[\text{M-2COH+Na+OH}]^+$; 1065,9 $[\text{M-COH+Na+H}]^+$; 1081,9 $[\text{M-COH+Na+OH}]^+$; 1093,8 $[\text{M+Na}]^+$.

Dérivé 15 à base d'huile d'olive. Le produit a été obtenu en utilisant les quantités doubles de tous les réactifs mentionnés ci-dessus. 2,32 g (rendement: 96%). ^1H RMN (δ , ppm): 8,20-8,05 (m, 3H, $H\text{-C(O)-O-}$); 5,32-5,23 (m, 1H, $\text{RO-CH}_2\text{-C(OR)H-CH}_2\text{-OR}$); 5,30 (s) et 5,00-4,85 (s) (3H, -HC(OC(O)H)-); 4,35-4,07 (m, 4H, $\text{RO-CH}_2\text{-C(OR)H-CH}_2\text{-OR}$); 3,75-3,25 (m, 3H, -HC(OH)-); 2,60-2,00 (s, $\text{-HC(OH)-CH}_2\text{-CH(OC(O)H)-}$); m, 6H, $\text{R''OC(O)-CH}_2\text{-R'}$; et 3H, -HC(OH)-); 1,75-1,52 (m, 6H de $\text{R''OC(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-R'}$ et 6H of $\text{-CH}_2\text{-HC(OC(O)H)-}$); 1,52-1,38 (m, 6H, $\text{-CH}_2\text{-HC(OH)-}$); 1,38-1,10 (m, $\text{-CH}_2\text{-}$); 0,95-0,75 (m, 9H, -CH_3). ^{13}C RMN (δ , ppm; 75 MHz; CDCl_3): 173,29; 160,99; 74,52; 72,22; 68,88; 62,09; 34,18; 34,00; 33,55; 31,86; 30,57; 29,80-28,70; 25,69; 25,59; 25,33; 24,84; 24,78; 22,65; 14,09. FTIR (ν_{min} , cm^{-1}): 3346 (-O-H et $\text{-C(O)-H}\cdots\text{O(H)-}$), 2922, 2853 (C-H), 1741 (>CH-O-C(O)-H), 1725 (-O-C(O)-), 1465 (-CH_3 et >CH_2), 1415, 1377 (-CH_3), 1171 (-O-C(O)-H), 1104 (C-OH), 723 (>CH_2). Analyse élémentaire (%): calculé pour $\text{C}_{60}\text{H}_{110}\text{O}_{15}$: C 67,26; H 10,35; trouvé C 67,70; H 10,51. MS (m/z): EM calculé pour $\text{C}_{60}\text{H}_{110}\text{O}_{15}$: 1070,78 $[\text{M}]^0$; trouvé en ESI-TQ (-): 1087,8 $[\text{M+HO}]^-$; 1059,8 $[\text{M-CHO+H+OH}]^-$; en ESI-TQ (+): 1079,8 $[\text{M+2H+Li}]^+$; 1051,8 $[\text{M-CHO+2H+Li}]^+$.

Glycéryl tris[9,10-(thréo)-dihydroxyoctadécanoate] (C-VIII). 1,00 g (~0,0009 mol) de produit hydroxy-oxyformylé **15** est ajouté à un mélange homogène de 40 ml d'acétone et 2,0 ml (~0,031 mol) d'acide chlorhydrique à 15-17%. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 5,5 heures, après quoi, 3,33 g (0,1005 mol) de CaCO₃ sont progressivement ajoutés pour neutraliser HCl et HCOOH (Attention à la formation intense de CO₂!). Après la sédimentation du précipité minéral, la phase liquide est isolée par décantation et ensuite extraite à l'hexane (2 x 20 ml). Le mélange hexane-acétone récupéré à l'aide d'une ampoule à décanter est lavé à l'eau (2 x 50 ml) et évaporé sous vide pour donner le produit **C-VIII** sous forme d'un liquide incolore.

Dérivé C-VIII à base de trioléine 11 standard. 0,91 g (rendement: 99%). ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 5,32-5,22 (m, 1H, RO-CH₂-C(OR)H-CH₂-OR); 4,33-4,08 (m, 4H, RO-CH₂-C(OR)H-CH₂-OR); 3,65-3,50 (s, 6H, -HC(OH)-); 2,41-2,33 (m, 6H, R''OC(O)-CH₂-R'); 1,72-1,55 (m, 6H, R''OC(O)-CH₂-CH₂-R); 1,55-1,42 (s, 6H, -HC(OH)-); 1,42-1,35 (s, 12H, -CH₂-HC(OH)-); 1,35-1,20 (m, 60H, -CH₂-); 0,95-0,80 (m, 9H, -CH₃). ¹³C RMN (δ, ppm; 75 MHz; CDCl₃): 173,23; 107,71; 80,99; 71,74; 68,87; 62,08; 34,15; 33,99; 33,01; 31,86; 29,79; 29,59; 29,48; 29,25; 27,32; 26,17; 24,79; 22,65; 20,47; 14,10. FTIR (ν_{min}, cm⁻¹): 3478 (-O-H et -O-H...O(H)-), 2983 (-CH₂-CH(OH)-), 2926, 2854 (C-H), 1743 (-O-C(O)-), 1457 (-CH₃ et >CH₂), 1377 et 1367 (-CH₃ et >CH₂), 1239, 1210 et 1166 (C-O), 1100 (C-OH), 874 (-CH(OH)-CH(OH)-), 722 (>CH₂). Analyse élémentaire (%): calculé C 69,33; H 11,23; trouvé C 69,42; H 11,39. MS (m/z): EM calculé pour C₅₇H₁₁₀O₁₂ : 986,8 [M]⁰; trouvé en MALDI-TOF: 993,8 [M+Li]⁺; 1001,7 [M+2Li]⁺; 1007,8 [M+3Li]⁺; 1019,7 [M+2Li+HOH]⁺. HPLC-ESI-TOF (-): le pic principal à 9,5 min contient un signal avec la valeur m/z de 355,3 [acide dihydroxystéarique-H+NaOH]⁻ ou [M+3N₂-3H]³⁻; HPLC-ESI-TOF (+): le pic principal à 9,5 min contient 3 signaux avec les valeurs m/z de 280,0 [acide dihydroxystéarique-2OH+H]⁺; 301,0 [acide dihydroxystéarique-OH+2H]⁺; 379,3 [acide dihydroxystéarique +2Na+OH]⁺.

Dérivé C-VIII à base d'huile d'olive. 0,914 g (rendement: 99%). ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 5,32-5,22 (m, 1H, RO-CH₂-C(OR)H-CH₂-OR); 4,33-4,08 (m, 4H, RO-CH₂-C(OR)H-CH₂-OR); 3,65-3,50 (s, 6H, -HC(OH)-); 2,41-2,33 (m, 6H, R''OC(O)-CH₂-R'); 1,70-1,55 (m, 6H, R''OC(O)-CH₂-CH₂-R); 1,55-1,45 (s, 6H, -HC(OH)-); 1,40-1,35 (s, 12H, -CH₂-HC(OH)-); 1,35-1,20 (m, 60H, -CH₂-); 0,95-0,80 (m, 9H, -CH₃). ¹³C RMN (δ, ppm; 75 MHz; CDCl₃): 173,21; 107,70; 102,69; 83,42; 81,01; 71,73; 68,87; 62,07; 34,13; 34,03; 33,01; 31,91; 30,94;

29,60-28,60; 27,31; 26,16; 24,78; 22,64; 20,46; 14,09. FTIR (ν_{\min} , cm^{-1}): 3468 (-O-H et -O-H...O(H)-), 2984 (-CH₂-CH(OH)-), 2924, 2854 (C-H), 1743 (-O-C(O)-), 1459 (-CH₃ et >CH₂), 1377 et 1368 (-CH₃ et >CH₂), 1239, 1210 et 1166 (C-O), 1100 (C-OH), 872 (-CH(OH)-CH(OH)-), 723 (>CH₂). Analyse élémentaire (%): calculé pour C₅₇H₁₁₀O₁₂: C 69,33; H 11,23; trouvé C 70,08; H 10,97. MS (m/z): EM calculé pour C₅₇H₁₁₀O₁₂ : 986,8 [M]⁰; trouvé en MALDI-TOF: 949,47; 963,47; 975,43; 991,47; 1009,46 [M+Na]⁺; 1023,46 [M+2Na+H]⁺; 1035,44; en HPLC-ESI-TOF (-): le pic principal à 9,5 min contient un signal avec la valeur m/z de 355,3 [acide dihydroxystéarique -H+NaOH]⁻ ou [M+3N₂-3H]³⁻; en HPLC-ESI-TOF (+): le pic principal à 10,4 min contient des signaux avec les valeurs m/z de 280,0 [acide dihydroxystéarique-2OH+H]⁺; 301,0 [acide dihydroxystéarique -OH+2H]⁺; 379,3 [acide dihydroxystéarique +2Na+OH]⁺.

2.3.2. Synthèse et caractérisation des produits intermédiaires à base des groupements espaceurs choisis

Monooxytrityl-tétraéthylène glycol (17). Un mélange de 100,00 g (0,5149 mol) de tétraéthylène glycol et 7,0 ml de pyridine est séché par méthode azéotropique de Dean-Stark avec 150 ml de benzène. Le benzène est ensuite évaporé sous vide et 12,50 g (0,0450 mol) de chlorure de trityle sont ajoutés à 50°C par petites portions (une nouvelle portion s'ajoute quand une portion précédente est complètement dissoute). Le mélange résultant est laissé à 50°C pendant 5 h sous agitation, en utilisant un tube rempli de granules de CaCl₂ pour empêcher l'humidité de l'air ambiant de pénétrer dans la masse réactionnelle. Après avoir refroidi la masse jusqu'à la température ambiante, le produit est extrait à toluène (2 × 100 ml) en présence de 300 ml d'eau. La phase organique recueillie est évaporée sous pression réduite pour donner 18,20 g d'huile visqueuse incolore. Rendement: 93%. ¹H RMN (δ , ppm; 300 MHz; DMSO-d₆): 7,45-7,20 (m, 15 H, phényles); 3,60-3,30 (m, 15 H, -CH₂-CH₂-O- et -O-H); 3,05-3,00 (m, 2H, -CH₂-O-Tr). ¹³C RMN (δ , ppm; 75 MHz; CDCl₃): 144,17; 144,14; 128,75; 128,00; 127,89; 127,87; 127,80; 126,98; 126,95; 86,61; 86,56; 77,61; 77,18; 76,76; 72,93; 72,58; 70,86; 70,83; 70,80; 70,74; 70,73; 70,70; 70,55; 70,40; 70,01; 63,36; 61,71; 61,57. FTIR (ν_{\min} , cm^{-1}): 3443 (O-H), 3085, 3057, 3031 (C-H_{Ar}), 2913, 2870 (C-H_{Alk}), 2162, 1596 (C=C_{Ar}), 1490, 1448, 1399, 1350, 1322 (=C(H)-_{Ar} et >CH₂_{Alk}), 1294, 1218, 1184, 1125, 1077,

1033, 1010 (C-O), 953, 934, 910, 900, 866, 844, 774, 762, 747, 705, 698 (-CH₂-CH₂- et -C(H)=C(H)-Ar), 649, 632, 584, 568, 554 (C-H). Analyse élémentaire (%): calculé C 74,29; H 7,39; trouvé C 74,25; H 7,45.

Monooxytrityl-1,10-décanediol (18). 181,75 g (1,0421 mol) de 1,10-décanediol sont dissous dans 400 ml de pyridine. Ensuite, l'ajout d'une solution de 16,10 g (0,0579 mol) de chlorure de trityle dans 100 ml de pyridine est effectué goutte à goutte et l'agitation est maintenue 8 h à 95-100°C. Après avoir refroidi la masse jusqu'à la température ambiante, 250 ml de toluène sont ajoutés sous agitation et la masse réactionnelle résultante est versée dans 4 l d'eau. La phase organique est d'abord filtrée, ensuite lavée à l'eau (10×200 ml) et finalement évaporée sous vide pour donner 17,75 g d'huile visqueuse jaunâtre. Rendement: 74%. ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 7,50-7,20 (m, 15 H, phényles); 3,65-3,55 (m, 2 H, -CH₂-OH); 3,05-3,00 (m, 2H, -CH₂-O-Tr); 1,60-1,40 (m, -O-H); 1,40-1,15 (m, 20 H, -CH₂-). ¹³C RMN (δ, ppm; 75 MHz; CDCl₃): 144,55; 128,71; 128,34; 127,94; 127,92; 127,68; 126,79; 106,04; 106,03; 86,28; 77,47; 77,05; 76,63; 63,68; 63,07; 32,79; 30,05; 29,55; 29,51; 29,41; 29,40; 26,27; 25,74. FTIR (ν_{min}, cm⁻¹): 3328 (OH), 3086, 3057, 3032 (CH_{Ar}), 2925, 2853 (C-H_{Alk}), 1597 (-C=C-), 1489, 1448, 1386 (>CH₂ et >C-H), 1218, 1182, 1153, 1067, 1032, 1002 (C-O), 897, 761, 745, 704, 696, 648, 632 (C-C). Analyse élémentaire (%): calculé C 83,61; H 8,71; trouvé C 81,45; H 9,27.

2.3.3. Synthèse et caractérisation des produits intermédiaires à base des agents de branchements choisis

Monooxytrityl-pentaérythritol (19). Un mélange de 300,00 g (2,2035 mol) de pentaérythritol et de 500 ml de DMA est séché par méthode azéotropique de Dean-Stark avec 250 ml de toluène. Après avoir amené la solution à 80°C, le dosage d'une solution de 15,00 g (0,0538 mol) de chlorure de trityle dans 200 ml de pyridine est effectué goutte à goutte et l'agitation est maintenue 12 h à 80°C. Après avoir refroidi la masse jusqu'à la température ambiante, 400 ml de chloroforme sont ajoutés sous agitation et la masse résultante est versée dans 4 l d'eau. La phase organique est lavée à l'eau (10×200 ml) et ensuite évaporée sous vide. L'étape finale de purification est une extraction des impuretés avec 200 ml de toluène. Le produit résultant est séché sous pression réduite pour donner 17,49 g de poudre blanche. Rendement: 86%. ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; DMSO-d₆): 7,50-7,20 (m, 15 H, phényles); 4,20-4,10 (m, 3H,

-O-H); 3,48-3,35 (m, 6H, $-CH_2-OH$); 3,00-2,80 (s, 2H, $-CH_2-OTr$). ^{13}C RMN (δ , ppm; 75 MHz; $CDCl_3$): 144,16; 128,33; 127,68; 126,78; 85,41; 62,12; 61,30; 45,63; 40,30; 40,02; 39,75; 39,47; 39,19; 38,91; 38,63. FTIR (ν_{min} , cm^{-1}): 3381, 3248 (OH), 3091, 3059, 3022 ($C-H_{Ar}$), 2963, 2936, 2880 ($C-H_{Alk}$), 1594 ($C=C_{Ar}$), 1491, 1475, 1446, 1421, 1302 ($=C(H)_{-Ar}$ et $>CH_2_{Alk}$), 1248, 1207, 1182, 1173, 1151 (C-O), 1088, 1074, 1060, 1046, 1021, 1000 (C-O), 979, 951, 925, 911, 898, 883, 856, 840, 780, 760, 748, 711, 695 ($>CH_2$), 669, 643, 632, 598, 569, 554 (C-H). Analyse élémentaire (%): calculé C 76,17; H 6,92; trouvé C 76,11; H 6,95. MS (m/z): EM calculé pour $C_{24}H_{26}O_4$: 378,1 $[M]^0$; trouvé en HPLC-ESI-TOF (+): le pic principal à 10,8 min (97,4%) contient des signaux avec les valeurs m/z de 135,1 $[M-Ph_3C]^+$; 158,2 $[M-Ph_3C+Na]^+$; 243,1 $[Ph_3C]^+$; 401,2 $[M+Na]^+$.

2.3.4. Synthèse et caractérisation du monoallyle-tétraéthylène glycol

Oxyallyl-oxytrityl-tétraéthylène glycol (24). 19,50 g (0,0447 mol) de TEG monotritylé **17** est séché par méthode azeotropique de Dean-Stark avec 50 ml de toluène et ensuite 1,03 g (0,0447 mol) de sodium métallique en petits morceaux sont ajoutés. L'agitation de la masse réactionnelle est maintenue environ 24 h à 150°C jusqu'à disparition complète de morceaux de sodium. Après avoir amené la solution à la température ambiante, l'ajout de 7,00 g (0,0579 mol) de bromure d'allyle est effectué et le mélange est ensuite agité à 60-65°C pendant 72 h. Le produit brut est purifié d'abord par extraction à chloroforme suivi de la chromatographie sur colonne (silice, éluant : $CHCl_3$ -acétone (10 :1)) pour donner 9,15 g d'huile visqueuse jaunâtre. Rendement: 43%. 1H RMN (δ , ppm; 300 MHz; $DMSO-d_6$): 7,50-7,20 (m, 15 H, phényles); 5,90-5,70 (m, 1 H, $CH_2=CH-CH_2-$); 5,30-5,05 (m, 2 H, $CH_2=CH-CH_2-$); 3,90-3,80 (m, 2 H, $CH_2=CH-CH_2-$); 3,60-3,40 (m, 14 H, $-CH_2-CH_2-O-$); 3,10-3,03 (s, 2H, $-CH_2-OTr$). ^{13}C RMN (δ , ppm; 75 MHz; $CDCl_3$): 146,93; 127,95; 127,90; 127,22; 110,02; 106,16; 81,98; 77,58; 77,15; 76,55; 72,79; 70,37; 69,86; 63,56; 61,33. FTIR (ν_{min} , cm^{-1}): 3085, 3058, 3031 ($H-C=C_{Alk}$ et $C-H_{Ar}$), 2916, 2871 ($C-H_{Alk}$), 1962 ($C=C_{Ar}$), 1724, 1637, 1597 ($-C=C_{Alk}$), 1490, 1448, 1406, 1351 ($=C(H)_{-Ar}$ et $>CH_2_{Alk}$), 1278, 1185, 1132, 1090, 1033, 1010 (C-O), 953, 934, 901, 881, 849, 774, 763, 748, 706, 698 ($-CH_2-CH_2-$ et $-C(H)=C(H)_{-Ar}$), 649, 632, 584, 568, 554 (C-H). Analyse élémentaire (%): calculé C 75,60; H 7,61; trouvé C 74,79; H 7,86. MS (m/z): EM calculé pour $C_{30}H_{36}O_5$: 476,3 $[M]^0$; trouvé en HPLC-ESI-TOF (+): le pic principal

contient des signaux avec les valeurs m/z de 235,1 [M-Ph₃C+H]⁺; 243,1 [Ph₃C]⁺; 261,1 [Ph₃C-OH+H]⁺.

Monoxyallyl-tétraéthylène glycol (25). *Voie de synthèse 1 (section 2.2.4.2).* Un mélange de 5,00 g (0,0105 mol) de produit tritylé **24**, 20,0 ml d'acide acétique, 5,0 ml d'eau et de 15,0 ml d'acétone est agité pendant 24 h. Ensuite, la masse réactionnelle a été diluée avec 50 ml d'eau et la précipitation du trityle carbinol est isolée par filtration. Le filtrat résultant est neutralisé avec le carbonate de sodium est le produit est extrait au chloroforme pour donner 1,19 g d'huile jaunâtre. Rendement: 78%. ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; DMSO-d₆): 5,95-5,71 (m, 1 H, CH₂=CH-CH₂-); 5,30-5,05 (m, 2 H, CH₂=CH-CH₂-); 4,00-3,85 (m, 2 H, CH₂=CH-CH₂-); 3,66-3,40 (m, 14 H, -CH₂-CH₂-O-). ¹³C RMN (δ, ppm; 75 MHz; CDCl₃): 134,71; 134,57; 117,25; 77,50; 77,07; 76,65; 72,66; 72,02; 70,56; 70,50; 70,49; 70,19; 69,33; 61,62. FTIR (ν_{min}, cm⁻¹): 3433 (O-H), 3081, 3017, (=C-H_{Alk}), 2868 (C-H_{Alk}), 1646 (-C=C_{Alk}), 1453, 1423, 1349, 1326 (>CH_{2Alk}), 1292, 1247, 1095 (C-O), 996, 930, 884, 840 (-CH₂-CH₂-), 637, 555 (C-H). Analyse élémentaire (%): calculé C 56,39; H 9,46; trouvé C 55,29; H 9,50. MS (m/z): EM calculé pour C₁₁H₂₂O₅: 234,1 [M]⁰; trouvé en HPLC-ESI-TOF (+): le pic principal contient des signaux avec les valeurs m/z de 235,1 [M+H]⁺; 257,1 [M+Na]⁺.

Monoxyallyl-tétraéthylène glycol (25). *Voie de synthèse 2 (section 2.2.4.2).* Un mélange composé de 1 l (4,5765 mol) de tétraéthylène glycol et de 11,84 g (0,5150 mol) de sodium métallique en petits morceaux est maintenu sous agitation à température de la pièce pendant 3 jours, jusqu'à la disparition complète de morceaux du métal. Ensuite, 62,63 g (0,5221 mol) de bromure d'allyle sont ajoutés et la masse réactionnelle est agitée à 60-65°C pendant 72 h. Le produit brut est isolé de l'excès du tétraéthylène glycol par extraction à chloroforme en présence d'eau. Le dérivé diallyles sont éliminés par extraction à l'hexane pour donner 90,59 g de liquide visqueux incolore. Rendement: 75%. ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 5,99-5,70 (m, 1 H, CH₂=CH-CH₂-); 5,30-5,10 (m, 2 H, CH₂=CH-CH₂-); 4,05-3,90 (m, 2 H, CH₂=CH-CH₂-); 3,60-3,40 (m, 14 H, -CH₂-CH₂-O-). ¹³C RMN (δ, ppm; 75 MHz; CDCl₃): 134,53; 134,42; 117,23; 117,08; 110,02; 105,14; 103,66; 77,50; 77,07; 76,49; 72,63; 72,00; 70,61; 70,50; 70,47; 70,20; 69,31; 61,60. FTIR (ν_{min}, cm⁻¹): 3328 (O-H), 3084, 3020 (=C-H_{Alk}), 2870 (C-H_{Alk}), 1724, 1648 (-C=C_{Alk}), 1455, 1424, 1349, 1327 (>CH_{2Alk}), 1293, 1248, 1096 (C-O), 998, 934, 886, 841 (-CH₂-CH₂-), 639, 557 (C-H). Analyse élémentaire (%): calculé C 56,39; H 9,46; trouvé C 56,01; H 9,65. MS (m/z): EM calculé pour C₁₁H₂₂O₅: 234,1

[M]⁰; trouvé en HPLC-ESI-TOF (+): le pic principal contient des signaux avec les valeurs m/z de 235,1 [M+H]⁺ et 257,1 [M+Na]⁺.

2.3.5. Synthèse et caractérisation d'autres produits intermédiaires

Oxyallyl-oxysuccinyl-tétraéthylène glycol (27). Approche de synthèse (i) (section 2.2.5.1.1.1).

Un mélange de 23,02 g (0,0983 mol) de monoallyl-TEG **25**, 30,53 g (0,3051 mol) d'anhydride succinique, 3,00 g (0,0246 mol) de DMAP et 30 ml de pyridine est maintenu sous agitation à la température ambiante pendant 72 h. Ensuite, la pyridine est évaporée sous vide et 100 ml d'eau sont ajoutés. Le mélange résultant est agité pendant 15 min. Le produit brut est extrait avec le toluène (2 × 100 ml) et, après l'évaporation, est purifié par chromatographie sur colonne (silice; éluant : CHCl₃-MeOH (5:1)) pour donner 6,60 g d'huile visqueuse jaunâtre. Rendement: 20%. ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 5,96-5,72 (m, 1 H, CH₂=CH-CH₂-); 5,30-5,11 (m, 2 H, CH₂=CH-CH₂-); 4,30-4,20 (m, 2 H, -O-CH₂-CH₂-O-C(O)-); 4,05-3,97 (m, 2 H, CH₂=CH-CH₂-); 3,75-3,40 (m, 14 H, -CH₂-CH₂-O-); 2,69-2,55 (s, 4 H, -C(O)-CH₂-CH₂-C(O)-). ¹³C RMN (δ, ppm; 75 MHz; CDCl₃): 175,93; 172,19; 172,13; 134,57; 117,25; 110,02; 108,43; 103,66; 77,49; 77,06; 76,39; 72,18; 70,58; 70,55; 70,53; 70,48; 70,42; 69,29; 68,98; 63,85; 29,19; 28,98. FTIR (ν_{min}, cm⁻¹): 3700-3100 (C(O)O-H), 3081 (=C-H), 2871 (C-H_{Alk}), 1732 (-C(O)-O-), 1647 (-C=C_{Alk}), 1408, 1385, 1348 (>CH₂_{Alk}), 1245, 1210, 1133, 1097 (C-O), 994, 932, 859, 833 (-CH₂-CH₂-), 630, 567, 554 (C-H). Analyse élémentaire (%): calculé C 53,88; H 7,84; trouvé C 51,84; H 7,48. MS (m/z): EM calculé pour C₁₁H₂₂O₅: 334,2 [M]⁰; trouvé en HPLC-ESI-TOF (+), m/z: 335,2 [M+H]⁺; 352,2 [M+NH₃]⁺; 353,2 [M+H+NH₃]⁺; 357,2 [M-H+Na]⁺; 358,2 [M+H+Na]⁺.

Oxyallyl-oxysuccinyl-tétraéthylène glycol (27). Approche de synthèse (ii) (section 2.2.5.1.1.1).

Un mélange de 16,50 g (0,0705 mol) de monoallyl-TEG **25**, 20,64 g (0,2063 mol) d'anhydride succinique et 30 ml de pyridine est maintenu sous agitation à la température ambiante pendant 72 h. Ensuite, la pyridine est évaporée sous vide et 100 ml d'eau sont ajoutés. Le mélange résultant est agité pendant 15 min. Le produit brut est extrait avec l'éther méthyl-*tert*-butylique (2 × 100 ml) et, après l'évaporation, est purifié par chromatographie sur colonne (silice; éluant : CHCl₃-MeOH (5:1)) pour donner 5,28 g d'huile visqueuse jaunâtre. Rendement: 22%. ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 5,93-5,71 (m, 1 H, CH₂=CH-CH₂-);

5,34-5,12 (m, 2 H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$); 4,35-4,22 (m, 2 H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$); 4,07-3,94 (m, 2 H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$); 3,76-3,41 (m, 14 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$); 2,72-2,56 (s, 4 H, $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$). ^{13}C RMN (δ , ppm; 75 MHz; CDCl_3): 175,90; 172,16; 134,54; 117,22; 77,46; 77,02; 76,37; 72,15; 70,56; 70,53; 70,50; 70,46; 69,27; 68,95; 63,82; 29,17. FTIR (ν_{min} , cm^{-1}): 3700-3100 (C(O)O-H), 3083 (=C-H), 2872 (C-H_{Alk}), 1734 (-C(O)-O-), 1648 (-C=C_{Alk}), 1410, 1386, 1349 (>CH_{2Alk}), 1247, 1212, 1134, 1100 (C-O), 996, 933, 861, 834 (-CH₂-CH₂-), 632, 569, 555 (C-H). Analyse élémentaire (%): calculé C 53,88; H 7,84; trouvé C 50,73; H 7,53. MS (m/z): EM calculé pour C₁₁H₂₂O₅: 334,2 [M]⁰; trouvé en HPLC-ESI-TOF (+), m/z: 335,2 [M+H]⁺; 352,2 [M+NH₃]⁺; 357,2 [M-H+Na]⁺; 358,2 [M+H+Na]⁺.

Oxyallyl-oxysuccinyl-tétraéthylène glycol (27). Approche de synthèse (iii) (section 2.2.5.1.1.1). Un mélange de 40,01 g (0,1708 mol) de monoallyl-TEG **25**, 86,04 g (0,8598 mol) d'anhydride succinique est maintenu sous agitation à 150-155°C pendant 8 h. Après avoir amené la masse réactionnelle à la température ambiante, 300 ml d'eau sont ajoutés. Le mélange est agité jusqu'à la disparition des cristaux de l'anhydride succinique. Le produit brut est extrait avec le chloroforme (2 × 100 ml) et, après l'évaporation, est purifié par chromatographie sur colonne (silice; éluant : CHCl₃-MeOH (5:1)) pour donner 42,87 g d'huile visqueuse jaunâtre. Rendement: 75%. ^1H RMN (δ , ppm; 300 MHz; CDCl_3): 5,92-5,70 (m, 1 H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$); 5,34-5,13 (m, 2 H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$); 4,35-4,21 (m, 2 H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$); 4,08-3,94 (m, 2 H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$); 3,75-3,40 (m, 14 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$); 2,73-2,56 (s, 4 H, $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$). ^{13}C RMN (δ , ppm; 75 MHz; CDCl_3): 175,92; 172,18; 134,56; 117,24; 117,16; 110,01; 103,64; 101,82; 77,48; 77,06; 76,38; 72,17; 70,58; 70,55; 70,53; 70,48; 70,41; 69,28; 68,97; 65,03; 63,84; 29,18; 28,97. FTIR (ν_{min} , cm^{-1}): 3700-3100 (C(O)O-H), 3081 (=C-H), 2872 (C-H_{Alk}), 1733 (-C(O)-O-), 1646 (-C=C_{Alk}), 1409, 1384, 1348 (>CH_{2Alk}), 1246, 1209, 1133, 1099 (C-O), 995, 932, 860, 834 (-CH₂-CH₂-), 631, 567, 555 (C-H). Analyse élémentaire (%): calculé C 53,88; H 7,84; trouvé C 53,53; H 7,93. MS (m/z): EM calculé pour C₁₁H₂₂O₅: 334,2 [M]⁰; trouvé en HPLC-ESI-TOF (+), m/z: 335,2 [M+H]⁺; 357,2 [M-H+Na]⁺; 358,2 [M+H+Na]⁺.

Carboxyméthyl-PEG1000 méthyl éther (32). Une solution de 15,01 g (0,0150 mol) de PEG1000 monométhyl éther dans 280 ml d'acétone est ajoutée goutte à goutte sous agitation dans un mélange composé de 6,00 g (0,0600 mol) de CrO₃, 6 ml d'acide sulfurique et 18 ml d'eau, refroidi préalablement dans un bain de glace à 0-5°C. Ensuite, la suspension résultante

est maintenue sous agitation à la température ambiante pendant 18 h après quoi 50 ml d'isopropanol sont ajoutés. Après filtration, la phase liquide est diluée avec 500 ml d'eau et ensuite 100 g de NaCl sont ajoutés. Le produit est extrait au chloroforme (2×150 ml) et séché sous vide pour donner 3,80 g de substance cireuse blanchâtre. Rendement: 63%. ^1H RMN (δ , ppm; 300 MHz; CDCl_3): 4,16-4,10 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$); 3,75-3,45 (m, 14 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$); 3,45-3,29 (s, 3 H, $-\text{CH}_3$). ^{13}C RMN (δ , ppm; 75 MHz; CDCl_3): 179,32; 171,75; 132,80; 110,02; 109,22; 108,43; 106,18; 106,08; 106,05; 106,02; 105,98; 105,93; 103,66; 102,86; 102,07; 77,50; 77,08; 76,65; 76,58; 71,87; 70,81; 70,76; 70,62; 70,50; 70,38; 70,27; 68,98; 59,75; 58,98; 58,92; 58,88; 57,84. FTIR (ν_{min} , cm^{-1}): 3550 ($-\text{C}(\text{O})-\text{OH}$), 2875, 2741 (C-H), 1749 ($-\text{C}(\text{O})-$), 1466, 1359, 1342 ($>\text{CH}_2$), 1280, 1241, 1210, 1143, 1103, 1061 (C-O), 962, 841 (C-C_{Alk}).

Chapitre 3. Modélisation d'encapsulation de l'itraconazole *in silico*

3.1. Introduction du chapitre

En parallèle de nos travaux de synthèse concernant le choix des éléments structuraux de nos futurs dendrimères, nous avons également réalisé les modélisations au moyen de méthodes computationnelles (ou « *in silico* »). Plus précisément, il s'agit de procédures de simulation du processus d'interaction non chimique entre les macromolécules assemblées des éléments structuraux présélectionnés dans le Chapitre 2 et une molécule d'un PA hydrophobe, itraconazole (ou ITZ, **Figure 28, page 65**). Ces modélisations permettraient donc de faire une évaluation préliminaire de l'efficacité d'encapsulation de l'ITZ en fonction de l'architecture dendritique.

D'une manière générale, l'utilisation des calculs *in silico*, afin d'évaluer la capacité d'encapsulation des molécules de PA par des dendrimères, représente un domaine assez peu étudié. Bien que la première publication à ce sujet date de 1989 [202], les travaux touchant à cet aspect restent toujours peu nombreux. La majorité des autres études à ce sujet sont principalement limitées soit à l'organisation des structures dendritiques dans l'espace [222, 474-478], soit à l'encapsulation de molécules et d'ions n'ayant pas d'activité pharmacologique tels que Rose Bengale [479], anion de perchlorate [480], cation de cuivre Cu (II) [481] etc. Pourtant, une mise au point des techniques computationnelles fiables, confirmées par des résultats expérimentaux, pourrait permettre non seulement de trouver des nouveaux agents d'encapsulation plus efficaces, mais également d'étudier plus profondément les mécanismes impliqués dans le processus d'encapsulation. Par exemple, une étude *in silico* de H. Lee et G. Larson [222] a aidé à clarifier l'effet de diminution du taux d'encapsulation du pyrène dans les dendrimères PAMAM portant les chaînes PEG5000, comparativement aux structures avec les chaînes PEG2000, décrites par H. Yang et col. [221] (voir aussi la section 1.2.4.2). D'autres travaux ont permis de mieux comprendre les mécanismes d'interaction de PAMAM avec un constituant du sang tel que l'albumine [482].

Il convient également de mentionner que l'approche computationnelle pourrait rendre le processus d'élaboration des nouveaux nanovecteurs dendritiques plus économique. En effet, une application de procédures de simulation fiables, avant des travaux dans les systèmes réels, permettrait d'optimiser le processus du criblage des structures potentiellement intéressantes, en réduisant ainsi la bibliothèque des dendrimères à synthétiser.

3.2. Méthode de calcul, critère d'évaluation et procédures utilisées

Étant donné la nature non chimique des processus d'encapsulation dans notre cas, afin d'obtenir des résultats de simulation relativement fiables, il suffit de se limiter à des méthodes de mécanique moléculaire. Basées sur l'application des lois de la physique classique (newtonienne), ces méthodes sont généralement considérées comme étant simplifiées et rapides comparativement aux méthodes computationnelles classiques telles qu'empiriques et semi-empiriques, faisant appel à la théorie quantique relativiste [483].

En tant que critère d'évaluation de la capacité d'encapsuler l'ITZ par nos futurs dendrimères, nous avons choisi la différence entre les énergies potentielles (stériques) du système, E , composé d'une molécule dendritique (MD) et une molécule de l'itraconazole (ΔE_{MD-ITZ}) et celles-ci de molécules MD et ITZ isolées (respectivement, E_{MD} et E_{ITZ}) (**Équation 1, page 145**).

$$\Delta E_{MD-ITZ} = E_{ITZ} + E_{MD} - E_{MD-ITZ} \dots\dots\dots \text{Équation 1}$$

Afin de rendre le processus d'encapsulation spontané, il faut avoir un gain énergétique du système MD-ITZ par rapport à ces constituants isolés. Dans ce cas, les énergies stériques E_{MD-ITZ} devraient avoir tendance à prendre des valeurs plus petites que la somme d'énergies stériques E_{ITZ} et E_{MD} . Ainsi, plus la valeur du critère ΔE_{MD-ITZ} est élevée, plus l'encapsulation du principe actif est énergétiquement favorable.

Comme procédure de calcul nous avons utilisé une méthode de mécanique moléculaire Amber3 qui a été élaborée pour calculer des énergies stériques des macromolécules organiques telles que peptides, ARN et ADN [484]. D'une manière générale, dans cette méthode, la détermination de l'énergie stérique minimale du système est basée sur la mesure des valeurs du gradient RMS («*Root-mean-square gradient*»). Ce gradient est lié à une position de l'architecture moléculaire à la surface d'énergie stérique globale du système définie par les coordonnées des atomes. Ainsi, l'optimisation de l'architecture moléculaire s'arrête quand, durant quelques itérations consécutives, le gradient RMS atteint une valeur moindre que celle qu'on a choisie comme seuil d'acceptabilité. Physiquement, cela correspond à un minimum (local ou global) à la surface de l'énergie E du système à étudier. En se basant

sur les données bibliographiques [484, 485], la valeur du gradient RMS de $\leq 0,001$ kcal/(Å·mol) que nous avons choisie pour notre recherche, devrait nous permettre d'obtenir les résultats assez fiables. Dans le cadre de cette étude, toutes les simulations ont été réalisées avec le logiciel *HyperChem*TM Version 8-0-4 de la compagnie *Hypercube Inc.* (Gainesville, FL, É.-U.).

3.3 Simulation *in silico* réalisées

Les simulations ont été d'abord effectuées pour les structures dendritiques **MD-I** de deuxième génération (**Figure 71, page 146**), composées de cœurs **C-I-VI**, d'un point de divergence à base du pentaérythritol (**AB-II**) portant quatre groupements succinyles, de groupements espaceurs **S-I** et **S-II**, et de groupements terminaux hydroxypropyles, **GT**.

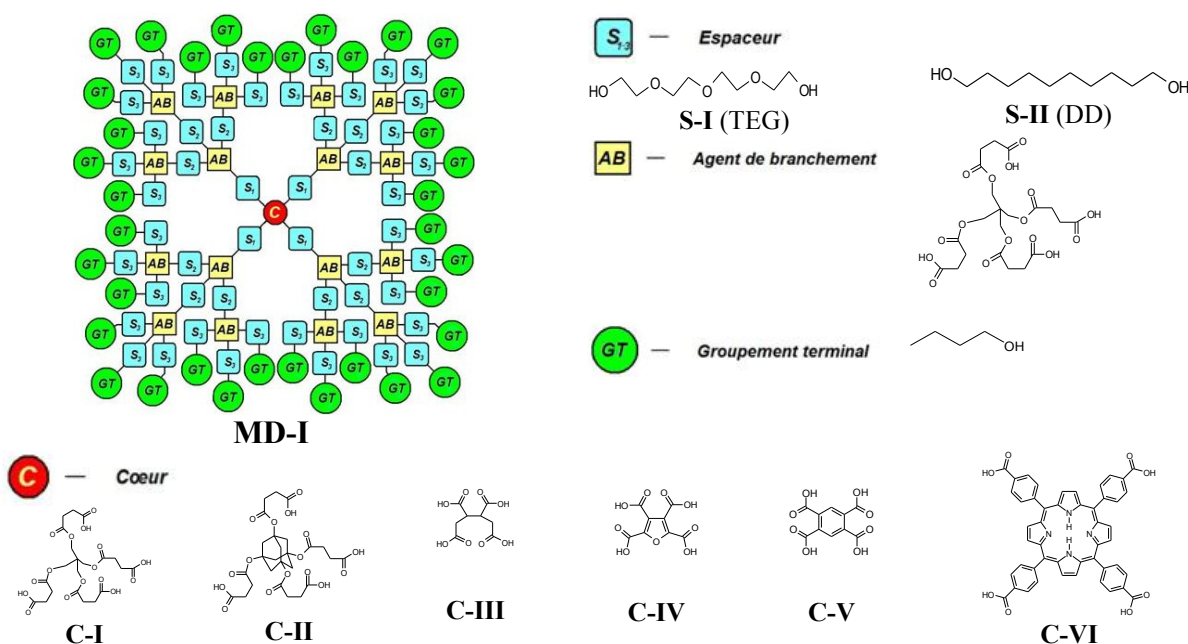


Figure 71. Structures dendritiques de deuxième génération (MD-I) choisies pour l'étude *in silico*.

Les calculs ont été menés respectivement pour les molécules **MD-I** et ITZ libres et pour les systèmes MD-ITZ (1:1) ayant au départ la distance arbitraire entre un cœur de dendrimère et la molécule de l'itraconazole d'environ 1,5 Å. À cette étape, les simulations ont été effectuées en option «dans le vide» (**Figure 72, page 147**).

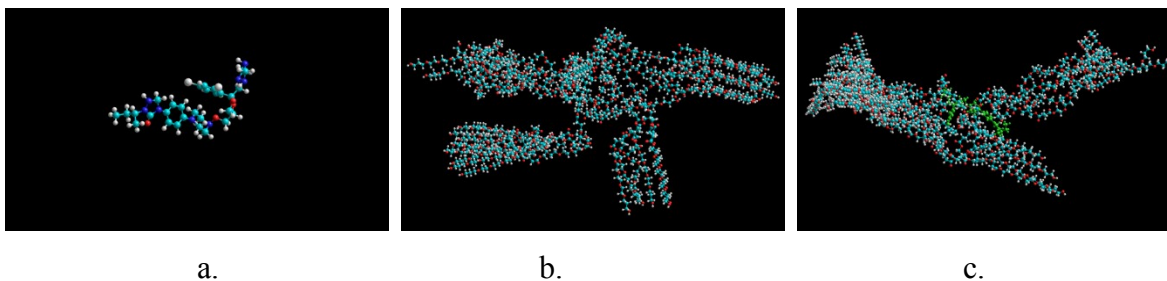


Figure 72. Clichés instantanés de molécules de l'itraconazole (a), du dendrimère MD-I (C-I, S₁= S-II, S₂=S₃= S-I) (b) et du système « itraconazole-dendrimer » (1:1) (c) après les procédures d'optimisation géométrique dans le « vide ».

Notre premier objectif était d'élucider l'influence de la nature des groupements espaceurs internes S₁₋₂ (**Figure 71, page 146**) sur l'interaction des structures MD-I avec l'ITZ. À cet égard, l'influence de plusieurs combinaisons possibles d'espaceurs S-I et S-II a été étudiée sur la structure MD-I avec un cœur C-III. Les résultats de ces calculs (**Tableau 1, page 148**) montrent que la valeur maximale du critère $\Delta E_{\text{MD-ITZ}}$ est observée dans le cas du dendrimer avec la combinaison d'espaceurs S₁=S₂= S-II, S₃= S-I (215,938 kcal/mol). Ceci peut être expliqué par la présence d'une plus grande surface apolaire interne créée par les chaînes de décanediol, par rapport aux structures portant plus d'espaceurs hydrophiles à base de TEG. Ainsi, avec l'augmentation de la surface apolaire, l'interaction du dendrimer avec les segments apolaires de l'ITZ s'accroît, ce qui devrait normalement résulter en augmentation de la stabilité du système dendrimères-ITZ. En se basant sur ces données, tous les autres calculs ont été effectués pour les structures MD-I ayant les chaînes DD.

L'étape suivante du travail consistait en une étude de l'influence de la structure du cœur C et de l'espaceur S₂. Les valeurs de gain énergétique $\Delta E_{\text{MD-ITZ}}$ les plus élevées ont été observées respectivement pour les cœurs C-IV, C-I et C-II (C-IV > C-I > C-II > C-III > C-V > C-VI), dans le cas de S₂ = S-I, et pour les cœurs C-II, C-III, C-I (C-II > C-III > C-I > C-IV > C-VI > C-V), dans le cas de S₂ = S-II (**Tableau 1, page 148**). Les résultats pourraient être expliqués par les arrangements spécifiques des constituants du système MD-ITZ, dépendamment de la rigidité de structure des cœurs et des interactions avec les chaînes d'espaceurs.

Tableau 1. Énergies stériques de dendrimères MD-I, de l'itraconazole et de systèmes « dendrimère-itraconazole » (1:1) calculées dans le vide.

Cœur	Espaceurs (TEG- tétraéthylèneglycol, DD-1,10-décanediol)			Énergie stérique, kcal/mol			Gain énergétique, ΔE_{MD-ITZ} , kcal/mol
	S ₁	S ₂	S ₃	Dendrimère E _{MD}	Itraconazole E _{ITZ}	Système 1:1 E _{MD-ITZ}	
C-III	TEG	TEG	TEG	-40,713	45,458	13,034	-8,289
	-	TEG	TEG	-87,758	45,458	-28,391	-13,909
	DD	TEG	TEG	15,836	45,458	14,933	46,361
	DD	DD	TEG	96,310	45,458	-74,170	215,938
	-	DD	TEG	-119,993	45,458	-154,060	79,525
C-I	DD	TEG	TEG	-36,932	45,458	-79,163	87,984
	DD	DD	TEG	29,256	45,458	17,924	56,790
C-II	DD	TEG	TEG	-1,645	45,458	-42,254	86,067
	DD	DD	TEG	193,446	45,458	-20,614	259,518
C-IV	DD	TEG	TEG	62,972	45,458	-5,874	114,304
	DD	DD	TEG	-102,930	45,458	31,401	-88,873
C-V	DD	TEG	TEG	41,882	45,458	51,818	35,522
	DD	DD	TEG	-139,903	45,458	32,752	-127,197
C-VI	DD	TEG	TEG	-24,469	45,458	52,092	-31,103
	DD	DD	TEG	-63,136	45,458	90,902	-108,580

Afin de réaliser une étude plus approfondie sur l'influence de la rigidité du cœur de dendrimères dans le processus de captation de l'ITZ, les simulations ont été également effectuées, en utilisant des procédures de dynamique moléculaire. D'une manière générale, l'optimisation géométrique simple dont les résultats sont présentés ci-dessus, ne reflète le comportement des systèmes qu'à des températures très basses (p. ex., T = 0 K, utilisé par défaut dans notre cas, ce qui constitue une procédure classique). Ainsi, pour avoir une image plus complète du processus, il est préférable de modéliser également le comportement des systèmes dans le gradient de températures comme montré dans le cas de différentes structures [484, 485], incluant des dendrimères [474, 479]. En particulier, l'application des protocoles de calcul incluant la simulation dans le gradient de température permet (habituellement) de retrouver les conformations qui sont plus favorables statistiquement.

Pour effectuer ce type de calcul, nous avons proposé d'utiliser les structures de modèles réduits **MD-II**, composées d'un cœur, quatre groupements DD en tant qu'espaceurs et de quatre succinyles terminaux (**Figure 73, page 149**).

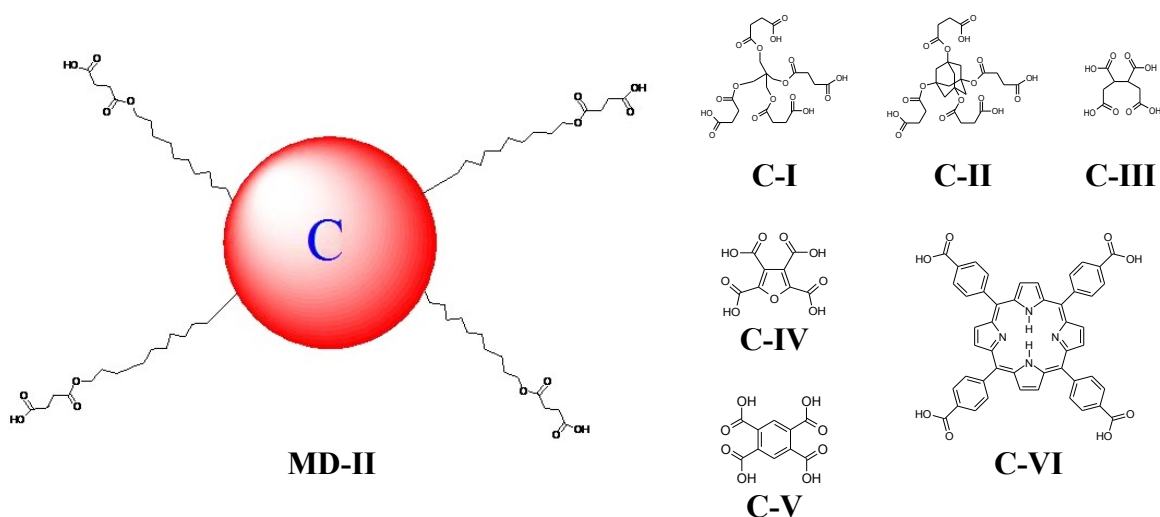


Figure 73. Structures modèles réduits (MD-II) choisies pour effectuer les simulations avec les procédures de dynamique moléculaire.

Les travaux avec les structures de modèle **MD-II** ont été réalisés en deux options: (i) dans le vide et (ii) dans la boîte périodique d'eau. Dans les deux cas, les procédures de simulation étaient les suivantes: (1) optimisation géométrique simple initiale (selon les conditions présentées ci-dessus pour les structures **MD-I**); (2) procédure de dynamique moléculaire (conditions: durée d'échauffement 0,5 ps, durée de refroidissement 0,5 ps, intervalle de calcul 0,001 ps, température de départ 0K, température maximale 300 K, température finale 0 K, intervalle de température 10 K); (3) optimisation géométrique simple finale.

Durant les simulations dans le vide, l'optimisation géométrique simple initiale (**Figure 74, page 150**) a permis d'obtenir les résultats semblables à ceux obtenus dans le cas de structures de 2ème génération **MD-I** portant comme espaceurs S_2 les chaînes TEG (**Tableau 2, page 151**). En particulier, dépendamment de l'efficacité de captation de l'ITZ, les cœurs sont placés dans l'ordre suivant : **C-II > C-I > C-IV** > **C-VI** > **C-III** > **C-V**, dont les trois meilleures structures restent ici les mêmes.

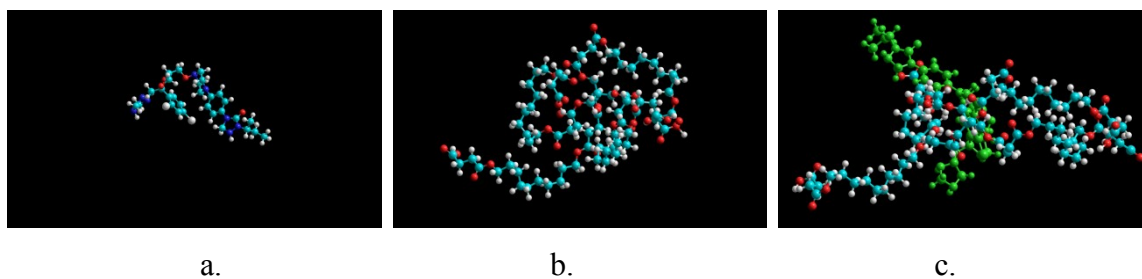


Figure 74. Clichés instantanés de résultats de calculs effectués dans le vide pour l'itraconazole (a), la structure de modèle MD-II avec le cœur C-I (b) et le système MD-ITZ (c).

L'application de procédures de dynamique moléculaire et d'optimisation géométrique simple finale a donné des résultats (**Tableau 2, page 151**) qui diffèrent de ceux-ci obtenus par l'optimisation géométrique initiale. L'ordre d'efficacité de cœurs résultant est le suivant : **C-V > C-VI > C-IV > C-II > C-I > C-III**. Ce fait pourrait être expliqué par une possibilité d'interactions π - π entre les cycles aromatiques de cœurs proposés et les cycles benzoïques de l'ITZ, plus efficace dans le cas des systèmes dynamiques (mobiles).

Dans le cas systèmes contenant **MD-II** avec **C-I-III**, **C-VI** ainsi que **13**, les valeurs $\Delta E_{\text{MD-ITZ}}$ plus petites que celles obtenues par l'optimisation géométrique simple, signifient que les systèmes résultant sont moins représentatives des conformations qui correspondent aux minimums énergétiques globaux. Ceci pourrait être expliqué par la flexibilité élevée de structures en empêchant ainsi de trouver une conformation la plus favorable avec les procédures de calcul réalisées.

Il est également à noter qu'en travaillant avec les structures de modèle réduits, le nombre de composés potentiellement intéressants pour représenter l'élément central de nos futurs dendrimères a été augmenté. En particulier, les calculs analogues, avec et sans la procédure de dynamique moléculaire, ont été réalisés pour le composé **C-VI** libre, comme modèle d'un cœur faiblement polaire rigide, et la structure flexible **13** (**Figure 45, page 97**). Dans le cas de la structure porphyrrique **C-VI**, les interactions avec une molécule d'ITZ étaient assez fortes, avec et sans la procédure de dynamique moléculaire, bien qu'elles n'aient pas dépassé les meilleures valeurs obtenues pour **MD-II** (**Tableau 2, page 151**). Les simulations avec la structure **13** ont montré le meilleur résultat après l'optimisation géométrique simple initiale (28,315 kcal/mol) et le moins bon résultat après la dynamique moléculaire et

l'optimisation géométrique simple finale (6,329 kcal/mol). Il est à noter que lors de la procédure de dynamique, les molécules du PA et du **13** ont eu tendance à s'éloigner considérablement, ce qui démontre une faible interaction entre elles au niveau des champs de force dans le vide.

Tableau 2. Énergies stériques de structures modèles MD-II, C-VI, 13, ITZ et de systèmes "itraconazole-modèle" (1:1) dans le vide, calculées avec et sans les procédures de dynamique moléculaire

Structure modèle	Dynamique moléculaire (oui+/non-)	Énergie stérique, kcal/mol			Gain énergétique, ΔE_{MD-ITZ} , kcal/mol
		Modèle E_{MD}	Itraconazole E_{ITZ}	Système 1:1 E_{MD-ITZ}	
MD-II (C-I)	-	29,178	45,458	54,733	19,903
	+	27,837	44,315	56,274	15,878
MD-II (C-II)	-	24,994	45,458	50,424	20,027
	+	16,898	44,315	44,179	17,034
MD-II (C-III)	-	71,228	45,458	101,912	14,774
	+	19,804	44,315	51,462	12,657
MD-II (C-IV)	-	79,367	45,458	107,648	17,177
	+	32,636	44,315	51,176	25,775
MD-II (C-V)	-	89,990	45,458	121,233	14,215
	+	34,972	44,315	44,807	34,480
MD-II (C-VI)	-	111,133	45,458	140,443	16,148
	+	113,280	44,315	131,287	26,308
C-VI	-	89,744	45,458	116,690	18,534
	+	89,378	44,315	111,185	22,508
13	-	40,961	45,458	58,104	28,315
	+	32,185	44,315	70,166	6,329

Une étude supplémentaire a été réalisée pour étudier l'efficacité de la captation de l'ITZ, en fonction de la quantité de groupements espaceurs DD dans les structures de type **MD-II**. Étant donné que les meilleurs résultats ont été observés dans le cas du cœur **C-V**, d'autres dérivés carboxyliques du benzène (**Figure 75, page 152**) tels que di (**33**), tri (**34**) et hexa (**35**), ont été également testés.

Les résultats de ces tests (**Tableau 3, page 152**) ont montré que le nombre optimal de substituants est de quatre, ce qui correspond bien aux structures **MD-I** proposées ci-dessus.

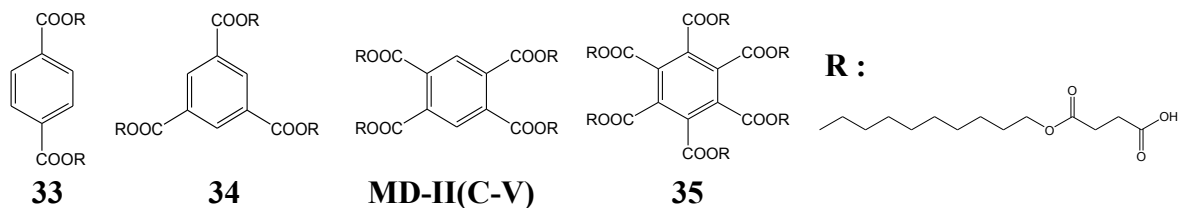


Figure 75. Structures modèles réduits pour étudier l'influence du nombre des dendrons.

Tableau 3. Énergies stériques de structures modèles 32, 33, MD-II(C-V), 34, ITZ et de systèmes "itraconazole-modèle" (1:1) dans le vide, calculées avec et sans les procédures de dynamique moléculaire

Structure modèle	Dynamique moléculaire (oui+/non-)	Énergie stérique, kcal/mol			Gain énergétique, ΔE_{MD-ITZ} , kcal/mol
		Modèle E_{MD}	Itraconazole E_{ITZ}	Système 1:1 E_{MD-ITZ}	
33	-	12,427	45,458	50,171	7,714
	+	17,998	44,315	49,977	12,336
34	-	73,489	45,458	109,635	9,321
	+	10,871	44,315	52,352	2,834
MD-II (C-V)	-	89,990	45,458	121,233	14,215
	+	34,972	44,315	44,807	34,480
35	-	175,506	45,458	208,885	12,079
	+	52,434	44,315	86,718	10,031

L'augmentation du nombre de molécules ITZ (jusqu'à quatre) dans le système MD-ITZ a été étudiée sur la structure modèle **MD-II** portant le cœur **C-I**. Durant les simulations, les valeurs du gain énergétique ΔE_{MD-ITZ} augmentaient avec la montée en concentration de l'ITZ (**Tableau 4, page 153**). De plus, les molécules du PA s'orientaient de préférence entre elles avec l'augmentation de leur quantité. Cela signifie que l'efficacité d'encapsulation peut se limiter à la croissance des cristaux de l'ITZ qui seront difficiles à retenir à l'intérieur de dendrimères.

La dernière partie de nos travaux *in silico* portait sur l'organisation de systèmes MD-ITZ dans le milieu aqueux. Cette étude avait pour but de fournir plus d'information sur le comportement possible dans des milieux aqueux réels, y compris des liquides biologiques. Dans ce cas, les simulations ont été effectuées dans une « boîte périodique d'eau » avec les

dimensions $56,1041 \text{ \AA} \times 56,1041 \text{ \AA} \times 56,1041 \text{ \AA}$, « remplie » de 5692 molécules H_2O , avec une distance minimale entre les molécules de solvant de 2.3 \AA (Figure 76, page 153). Les détails de calcul sont présentés dans la légende du tableau 5 (page 154).

Tableau 4. Énergies stériques de la structure modèle MD-II(C-I), de l'itraconazole et de systèmes "itraconazole-modèle" (1:1), (2:1), (3:1) et (4:1), calculées dans le vide, avec et sans les procédures de dynamique moléculaire

Nombre de molécules de l'itraconazole dans le système	Dynamique moléculaire (oui+/-non-)	Énergie stérique, kcal/mol			Gain énergétique, $\Delta E_{\text{MD-ITZ}}$, kcal/mol
		Modèle E_{MD}	Itraconazole E_{ITZ}	Système 1:1 $E_{\text{MD-ITZ}}$	
1	-	29,178	45,458	54,733	19,903
	+	27,837	44,315	56,274	15,878
2	-	29,178	71,958	72,368	28,768
	+	27,837	78,305	69,341	36,801
3	-	29,178	108,499	91,957	45,720
	+	27,837	105,977	104,681	29,133
4	-	29,178	135,987	116,738	48,427
	+	27,837	151,594	109,802	69,629

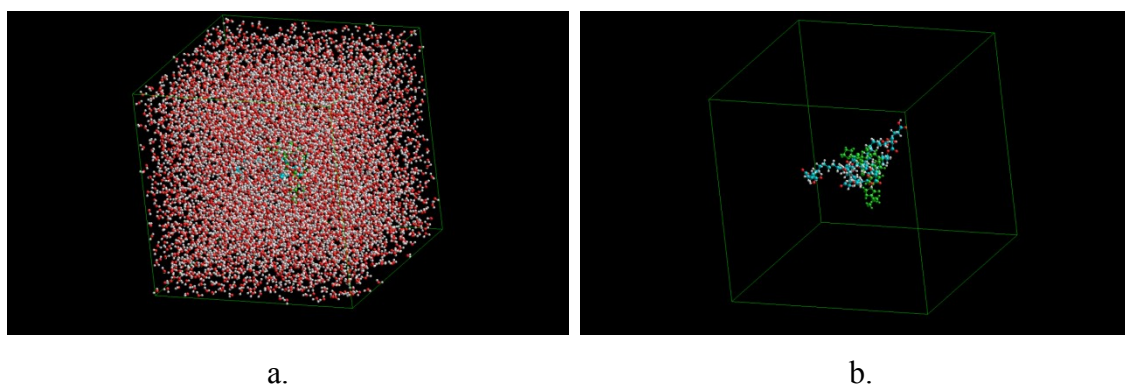


Figure 76. Clichés instantanés de résultats de calculs effectués dans la boîte périodique d'eau du système MD-II(C-I) - ITZ (1:1) avec les molécules du solvant montrées (a) et cachées (b).

Les valeurs obtenues pour le gain énergétique des interactions MD-ITZ, $\Delta E_{\text{MD-ITZ}}$ (Tableau 5, page 154), permettent de placer les structures étudiées, selon leur efficacité à encapsuler le PA, dans l'ordre de décroissance suivant :

- (i) Optimisation géométrique simple initiale: MD-II(C-I) > MD-II(C-II) > MD-II(C-IV) > MD-II(C-VI) > MD-II(C-III) > MD-II(C-V) > 13 > C-VI
- (ii) Optimisations géométriques avec la procédure de dynamique : MD-II(C-IV) > 13 > MD-II(C-I) > MD-II(C-VI) > MD-II(C-V) > MD-II(C-III) > C-VI > MD-II(C-II)

Tableau 5. Énergies stériques de structures modèles MD-II, C-VI, 13, ITZ et de systèmes "itraconazole-modèle" (1:1), calculées dans la boîte périodique d'eau, avec et sans les procédures de dynamique moléculaire

Structure modèle	Procédures de dynamique moléculaire (oui+/non-)	Énergie stérique, kcal/mol			Gain énergétique, ΔE_{D-I}^* , kcal/mol
		Structure modèle E_D	Itraconazole E_I	Système 1:1 E_{D-I}	
MD-II (C-I)	-	-83755,341	-83633,767	-83743,212	-7,841
	+	-86102,257	-87063,964	-86036,889	-54,329
MD-II (C-II)	-	-83806,737	-83633,767	-83771,506	-30,943
	+	-87072,615	-87063,964	-85819,974	-1241,602
MD-II (C-III)	-	-83563,234	-83633,767	-83498,904	-60,042
	+	-85963,759	-87063,964	-85699,248	-253,472
MD-II (C-IV)	-	-83506,124	-83633,767	-83460,949	-40,887
	+	-85941,501	-87063,964	-85930,792	0,330
MD-II (C-V)	-	-83700,649	-83633,767	-83601,409	-94,952
	+	-87096,362	-87063,964	-86960,866	-124,457
MD-II (C-VI)	-	-83418,613	-83633,767	-83368,750	-45,575
	+	-85745,518	-87063,964	-85665,144	-69,335
C-VI	-	-84239,610	-83633,767	-83729,459	-505,863
	+	-86242,413	-87063,964	-85766,636	-464,738
13	-	-83925,663	-83633,767	-83621,479	-299,896
	+	-85873,917	-87063,964	-85820,374	-42,504

* La double quantité de molécules d'eau dans le cas de molécules isolées est compensée en soustrayant la valeur de l'énergie stérique de la boîte portant uniquement 5692 molécules d'eau (optimisation simple : -83638,055 kcal/mol; optimisation incluant la dynamique moléculaire : -87075,003 kcal/mol) du résultat obtenu selon l'équation 1.

Dans le cas de l'optimisation géométrique simple, les résultats d'efficacité des cœurs sont relativement proches des résultats obtenus après les modélisations dans le vide (les trois meilleures structures restent les mêmes). Il faut cependant noter que les valeurs négatives du critère $\Delta E_{\text{MD-ITZ}}$ obtenues avec la majorité des structures de modèle montrent que les systèmes de modèle sont moins efficaces que les structures dendritiques entières. Ainsi, les données obtenues suggèrent que l'augmentation de la surface du vecteur dendritique a un impact favorable sur l'encapsulation du PA.

Les simulations incluant les procédures de dynamique moléculaire ont mené à des résultats non concordants avec le comportement des systèmes dans le vide. Ceci pourrait être expliqué par l'impact important des interactions de type « ponts hydrogènes » et « dipôle-dipôle » entre l'eau et l'ITZ. Par conséquent, la présence du milieu polaire peut influencer considérablement le processus d'encapsulation, et que les tests avec les systèmes réels sont manifestement nécessaires afin d'évaluer cet impact.

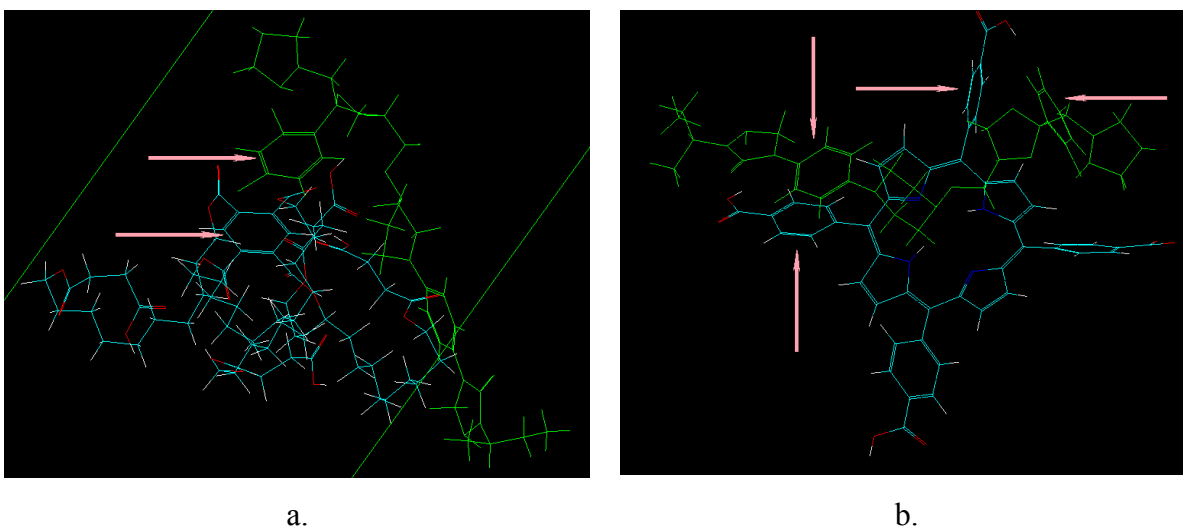


Figure 77. Orientation des cycles benzoïques due aux interactions π - π (montré avec flèches roses) dans les systèmes 1:1 après les procédures d'optimisation géométrique et de dynamique moléculaire dans la boîte périodique d'eau :
(a) « ITZ (vert)-MD-II(C-V) » et (b) « ITZ – C-VI ».

Il est intéressant de noter que l'efficacité d'une structure comme agent d'encapsulation est déterminée grandement par sa flexibilité, permettant de retenir un PA par les effets stériques. Par exemple, malgré la présence de plusieurs cycles aromatiques dans les structures C-V et C-VI, résultant en des interactions π - π avec les cycles aromatique de l'ITZ (**Figure 77, page 155**), une structure plus flexible **13** a montré les résultats plus encourageants, en utilisant d'une manière efficace les forces de van der Waals, énergétiquement les plus faibles.

3.4. Conclusion du chapitre

Les conclusions qui peuvent être tirées des données obtenues lors de modélisations *in silico* réalisées dans le cadre de la présente étude sont les suivantes :

- Afin d'encapsuler l'itraconazole, la présence d'espaces apolaires de DD près du cœur de dendrimère devrait être considérée comme étant plus favorable à la rétention du PA, comparativement aux chaînes hydrophiles TEG.
- Dans les cas incluant les procédures de dynamique moléculaire, la souplesse de la partie centrale apolaire est un des facteurs majeurs qui déterminent l'efficacité d'encapsulation du PA.
- Les résultats de modélisations effectués pour choisir une meilleure structure du cœur de futurs dendrimères, diffèrent en fonction du milieu simulé durant le calcul (vide ou eau). Ainsi, la fiabilité des simulations ne pourra être évaluée qu'en comparant avec des résultats obtenus dans le cas de systèmes réels.

Chapitre 4. Assemblage chimique des dendrons et dendrimères

4.1. Principaux types de dendrimères à synthétiser

Les dendrimères que nous planifions d'obtenir et étudier, peuvent être classifiés en deux principaux types (**Figure 78, page 158**). Le type **I** est représenté par les structures de 1ère et 2ème générations (respectivement, **Ia** et **Ib**) à base d'un cœur tétrafonctionnel (un des composés **C-I-VI, Figure 33, page 76**) et le pentaérythritol (**AB-II, Figure 56, page 115**) comme point de divergence. Le type **II** comprend les dendrimères de 1ère et 2ème générations (**IIa** et **IIb**) dont les parties centrales hydrophobes incluent la structure du glycéryl tris[9,10-(*thréo*)-dihydroxyoctadécanoate] (**C-VIII, Figure 33, page 76**).

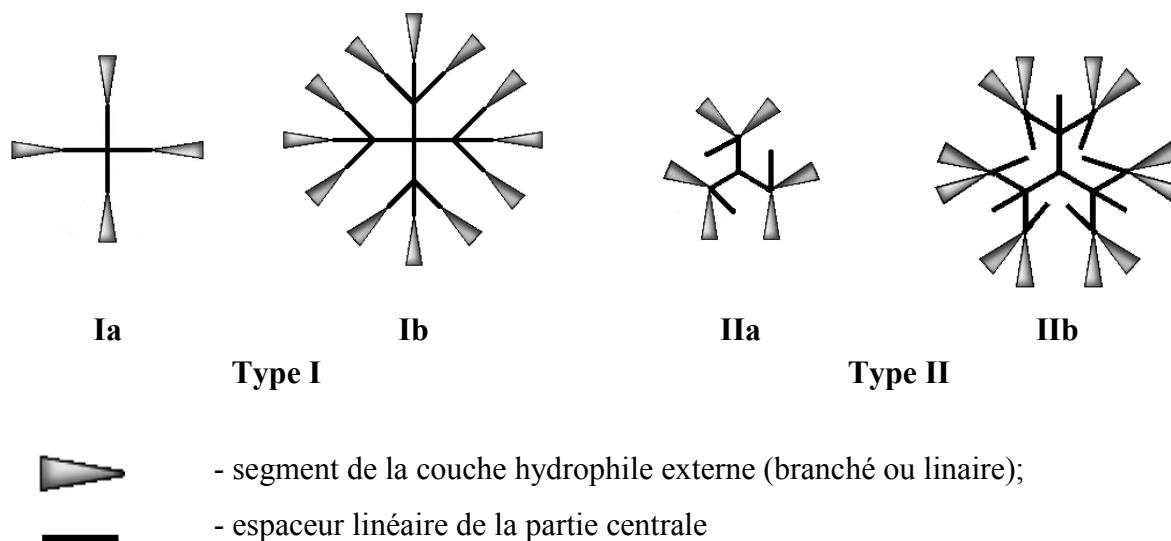


Figure 78. Deux principaux types de dendrimères que nous planifions de synthétiser.

Selon notre hypothèse, les structures de type **I** et **II** doivent se comporter différemment dans des milieux polaires, aqueux, dû aux différences dans la partie centrale hydrophobe. En particulier, les dendrimères de type **I** dont les espaceurs internes portent à leurs extrémités des segments hydrophiles, auront tendance à s'étirer plus facilement, en présentant des organisations relativement plus ouvertes. Dans le cas des dendrimères de type **II**, malgré la diminution du nombre de dendrons, les chaînes hydrophobes libres ont la possibilité de se replier, en augmentant ainsi l'efficacité d'encapsulation d'un PA hydrophobe. Il est également

à noter que les dendrimères **IIa** et **IIb** ont la même structure externe hydrophile. Ceci pourrait permettre d'élucider l'influence de l'architecture interne sur l'encapsulation/libération.

Les sections suivantes de ce chapitre présenteront les résultats de travaux d'assemblages de ces macromolécules, en se basant sur les résultats de nos travaux de synthèse préliminaires et de simulation *in silico* présentés dans les chapitres précédents.

4.2. Assemblage des dendrons

Comme déjà mentionné dans l'analyse bibliographique (section 1.2.2), l'approche d'assemblage des dendrimères par la voie convergente permet généralement d'obtenir les produits de plus grande pureté, surtout s'il s'agit de synthèse de structures de basse génération (jusqu'à G3). Par conséquent, l'utilisation de cette approche pour synthétiser les dendrimères **Ia,b** et **IIa,b** (**Figure 78, page 158**) pourrait être considérée comme la meilleure stratégie.

D'une manière générale, l'assemblage par la voie convergente nécessite d'effectuer d'abord la synthèse des dendrons qui seront par la suite greffés à une structure de cœur plurifonctionnelle. Dans le cadre du présent projet de recherche, les dendrons de G1 et G2 ont été obtenus.

4.2.1. Synthèse des dendrons de première génération

Dépendamment des structures de nos futurs dendrimères à synthétiser, en tant que dendrons de G1, nous envisageons trois alcools macromoléculaires branchés **36-38** (**Figure 79, page 160**). Les dendrons choisis diffèrent par la nature de leur groupement espaceur interne. En particulier, le dendron **36** sera greffé à un cœur directement, par l'hydroxyle de l'unité trisubstitué de pentaérythritol, tandis que les alcools **37** et **38** seront greffés au moyen d'espaceurs respectivement hydrophile, TEG, et hydrophobe, DD. L'utilisation de ces dendrons permettra ainsi de clarifier le rôle de la présence/absence des unités hydrophobes/hydrophiles dans les structures dendritiques sur le plan de l'efficacité de ces derniers dans les processus d'encapsulation/libération des PA hydrophobes.

Étant donné que les dendrons **37** et **38** représentent les dérivés de la structure **36**, la synthèse de cette dernière a été d'abord réalisée (**Figure 80, page 160**).

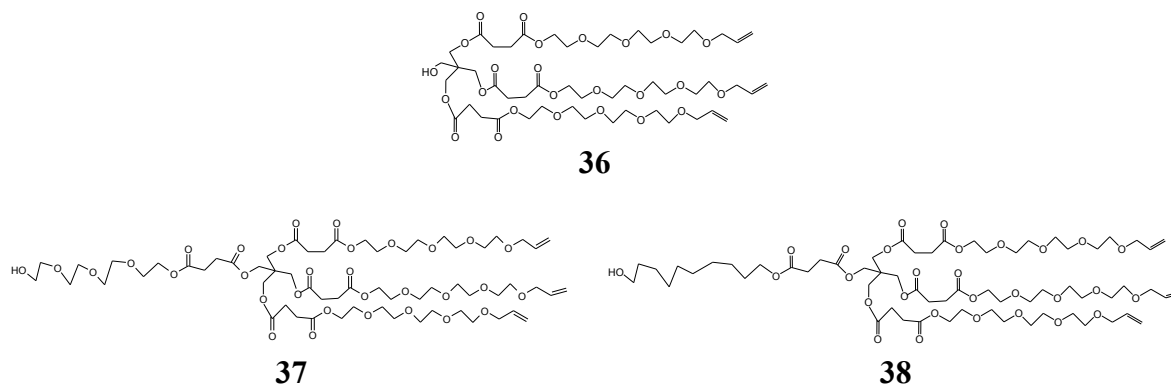


Figure 79. Structures de dendrons de G1 choisies.

L'assemblage a été effectué à partir du dérivé succinyle de monoallyleTEG **27** (**Figure 66, page 126**) dont l'obtention est décrite en détails dans les sections 2.2.5.1.1.1 et 2.3.5 du présent manuscrit.

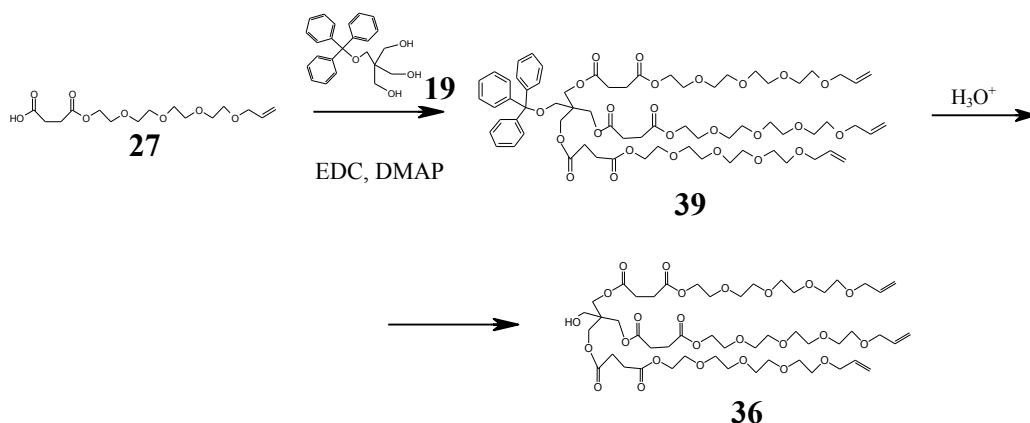


Figure 80. Schéma de synthèse réalisé pour obtenir le dendron 36.

La synthèse du dendron tritylé **39** a été réalisée par l'interaction d'un faible excès de l'acide **27** avec le monotritylpentaérythritol (**19**) en présence d'un carbodiimide, le chlorhydrate du 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide (EDC), et du catalyseur d'acylation de Steglich, la N,N-diméthylaminopyridine (DMAP), dans le chloroforme, en se basant sur le protocole de M. Dhaon et col. pour obtenir les esters d'acides aspartique et glutamique [486].

En utilisant cette approche, nous avons trouvé qu'une attention particulière devrait être accordée à la nature du stabilisateur du chloroforme utilisé comme milieu réactionnel. La majorité des protocoles faisant appel aux réactions de ce type ne mentionnent pas que l'utilisation du chloroforme stabilisé normalement par le méthanol ou l'éthanol (jusqu'à 1%) conduit à l'obtention d'esters méthyles ou éthyles contaminant les produits visés. En effet, dans notre cas, l'ester méthyle de l'acide **27** a été isolé après avoir utilisé le chloroforme commercial stabilisé par le méthanol. Pour contourner ce problème, le solvant stabilisé par des amylènes a été utilisé par la suite.

Le produit **39** a été purifié par chromatographie sur colonne (SiO₂, éluant : chloroforme-méthanol 20:1) avec un rendement final de 90%. La structure a été prouvée par l'analyse élémentaire, FTIR (voir les détails dans la section expérimentale 4.5.1.1), ainsi que la spectrométrie de masse (**Figure 81, page 161**) et la RMN du proton (**Figure 82a, page 162**).

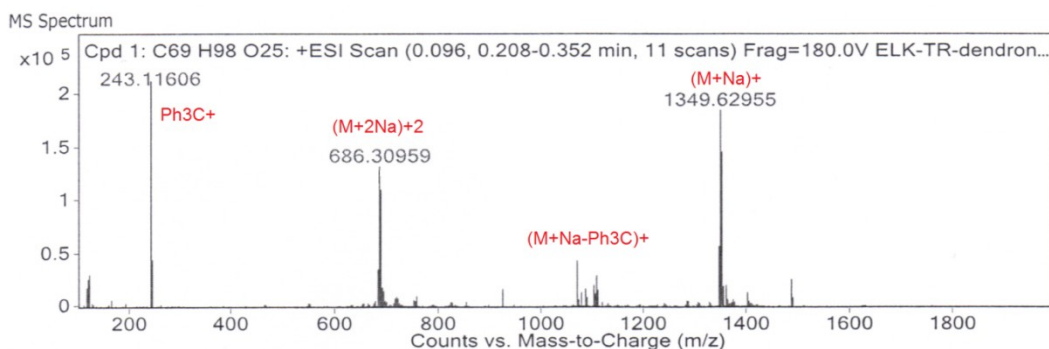


Figure 81. Spectre de masse (ESI-TOF en mode positif) du dendron tritylé 39.

Plusieurs méthodes essayées pour enlever la protection trityle dans la structure **39** n'étaient pas efficaces. La détritylation n'a pas eu lieu ni après l'interaction du **39** avec l'acide acétique concentré, comme suggéré par M. Lewdorowicz et col. dans le cas des bases nucléiques [458], ni avec la Montmorillonite K 10[®] recommandé pour des tritylnucléosides par J.-I. Asakura et col. [487], ni avec le mélange l'acide acétique-eau-acétone que nous avons proposé pour détrityler le composé **24** (section 2.2.4.2), ni par l'interaction avec l'acide chlorhydrique à 15% dans l'acétone. En effet, après 3 jours d'agitation et une purification sur colonne, nous n'avons observé aucun changement en CCM. De plus, les signaux du

groupement trityle dans les spectres ^1H RMN, correspondant au produit de départ **39**, étaient toujours présents. Ainsi, au niveau de la détritylation, la structure **39** doit être considérée comme étant un cas atypique car dans la littérature, le trityle est principalement présenté comme un groupement extrêmement instable dans des milieux acides.

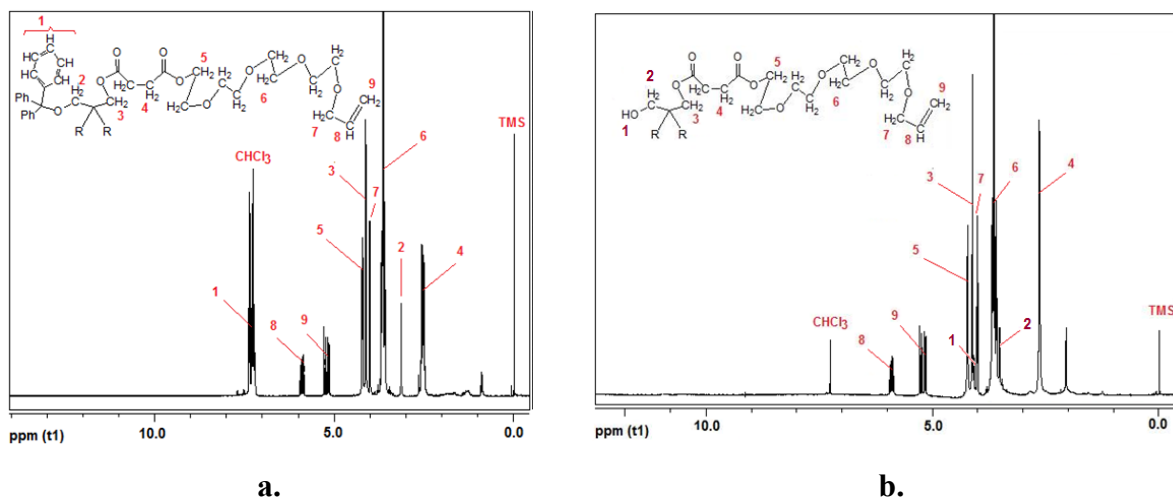


Figure 82. Spectres ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) de dendrons tritylé, **39** (a), et détritylé, **36** (b).

Une étude supplémentaire que nous avons menée pour élaborer une méthode de détritylation de **39** plus efficace, a finalement montré que la déprotection peut être réalisée avec succès au bout de 15 minutes (contrôle par CCM), en utilisant l'acide acétique glacial comme solvant et l'acide chlorhydrique à 35% comme catalyseur et source d'eau. Après une extraction du produit avec l'éther diéthylique en présence d'une solution saturée de NaCl, le produit détritylé a été purifié sur une colonne chromatographique remplie de silice, en utilisant respectivement le chloroforme pour enlever le tritylcarbinol (**29**, **Figure 69**, **page 129**), et le mélange chloroforme-méthanol 10:1 pour éluer le dendron **36**. Le rendement final de l'étape de détritylation est de 97%. La structure **36** a été confirmée par la RMN du proton (**Figure 82b**, **page 162**), l'analyse élémentaire (calculé, % : C 55,34; H 7,80; trouvé, % : C 55,50; H 7,75), la spectroscopie FTIR (voir les détails dans la section 4.5.1.1) et la spectrométrie de masse (**Figure 83**, **page 163**). Il est à noter que dans le spectre de masse, un des deux principaux signaux correspond à l'ion moléculaire doublement chargé. Ceci pourrait indiquer

que la structure **36** est capable d'interagir avec plusieurs particules ionisées, probablement, par l'effet de coordination.

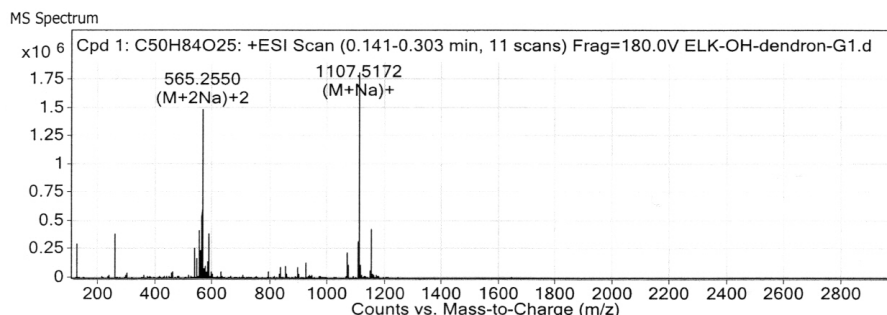


Figure 83. Spectre de masse (ESI-TOF en mode positif) du dendron détritylé **36**.

Afin d'obtenir les dendrons **37** et **38**, l'alcool **36** a été d'abord modifié par la succination de l'hydroxyle avec **2** sans solvant à 145-150°C, ensuite, par le greffage de TEG ou DD monotritylés, **17** et **18**, en présence de EDC et DMAP (estérification de Steglich), suivi de la détritulation de produits résultants, **41** et **42**, dans un milieu acide (**Figure 84**, page 163).

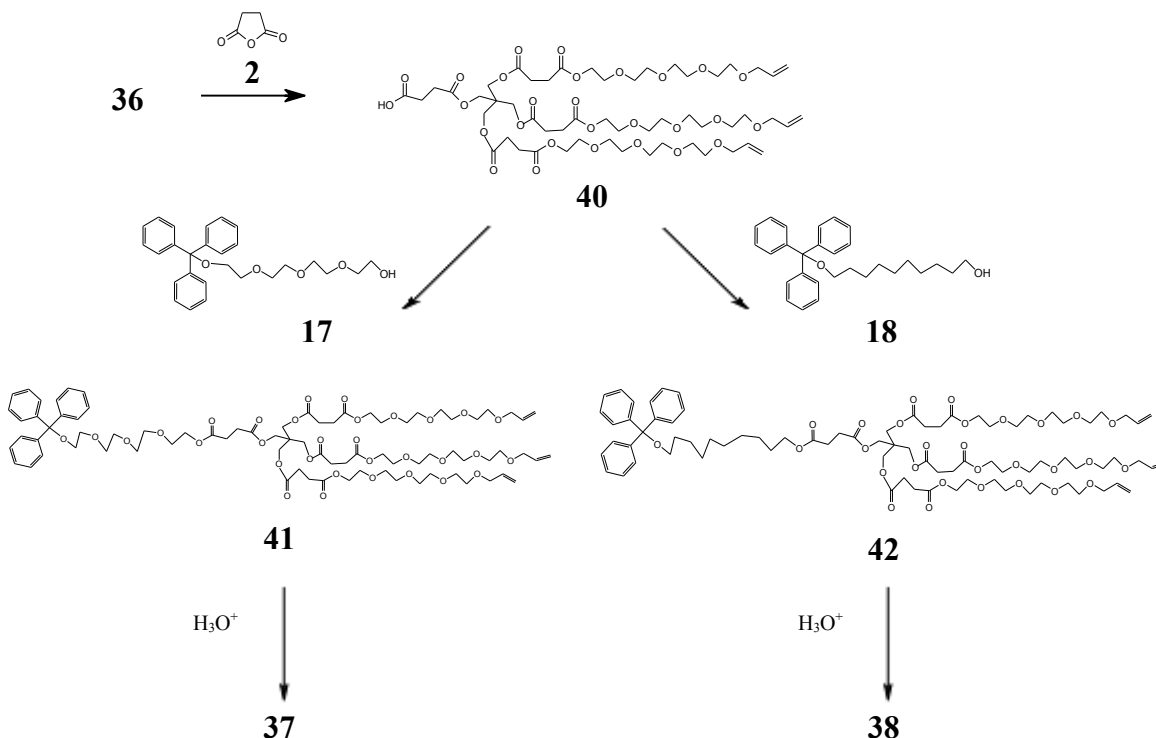


Figure 84. Assemblage chimique de dendrons **37** et **38** à partir du dendron **36**.

Nous avons également réussi à obtenir le dendron hydrophile **37** par l'interaction directe de l'acide **40** avec l'excès du TEG (**S-I**) en présence de l'EDC et la DMAP (voir les détails de toutes les synthèses ci-mentionnées dans la section 4.5.1.1).

La purification du produit **40** a été faite par analogie avec la méthode que nous avons élaborée pour isoler le dérivé succinyle **27**, comme présenté dans la section 2.2.5.1.1.1. Dans le cas de produits tritylés **41** et **42**, ainsi que détritylés, respectivement, **37** et **38**, la purification a été effectuée par chromatographie sur colonne (silice, éluant : chloroforme-méthanol 5:1).

Les structures chimiques de tous les produits obtenus ont été confirmées par les techniques FTIR, RMN ^1H et ^{13}C , l'analyse élémentaire et la spectrométrie de masse (voir les détails dans la section 4.5.1.1; voir aussi la **Figure 85, page 164**).

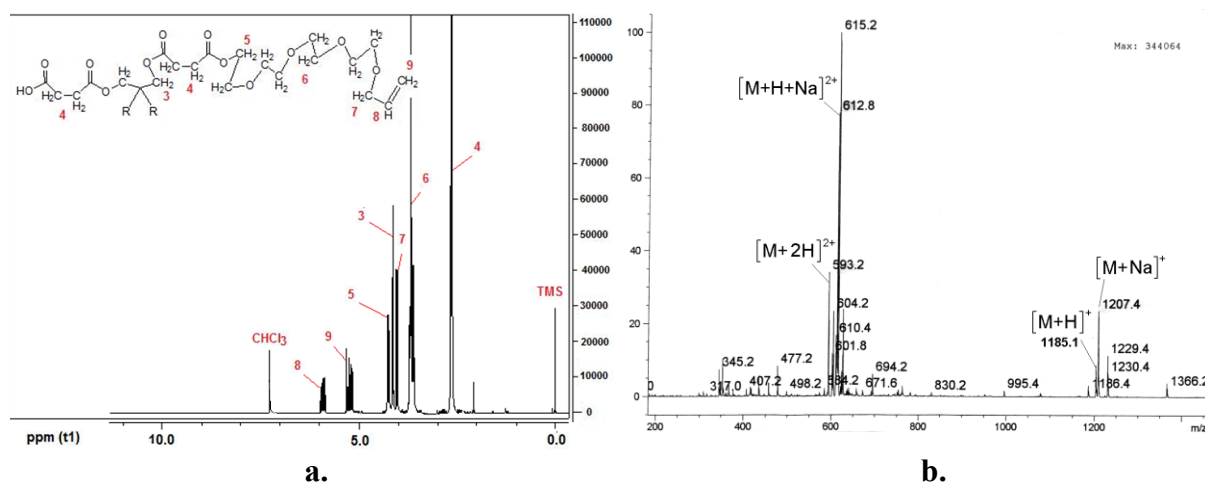


Figure 85. Résultats de l'analyse structurale du dendron 40 : (a) spectre RMN du proton (CDCl_3 , 300,0 MHz); (b) spectre de masse (ESI-TOF en mode positif).

4.2.2. Synthèse d'un dendron de deuxième génération

Durant cette étape, une méthode de synthèse d'un dendron hydrophile (portant les groupements espaceurs représentés par les chaînes TEG) de G2 a été élaborée (**Figure 86, page 165**). À cette fin, le composé **37** a été utilisé comme produit de départ. Il a été d'abord modifié par le greffage du groupement succinyle à l'hydroxyle libre par l'interaction directe avec **2** sans solvant à 140-145°C, par analogie avec la procédure élaborée pour synthétiser le composé **27** (section 2.2.5.1.1.1). À partir du produit résultant **43** et le monotritylcarbinol,

19, le dendron tritylé **44** a été ensuite assemblé en présence de l'EDC et la DMAP. L'étape finale, la détritylation du **44** pour obtenir l'alcool macromoléculaire **45** a été effectuée dans un milieu acide, par analogie avec la procédure élaborée pour détrityler le dendron **39** comme présenté dans la section précédente, 4.1.1.

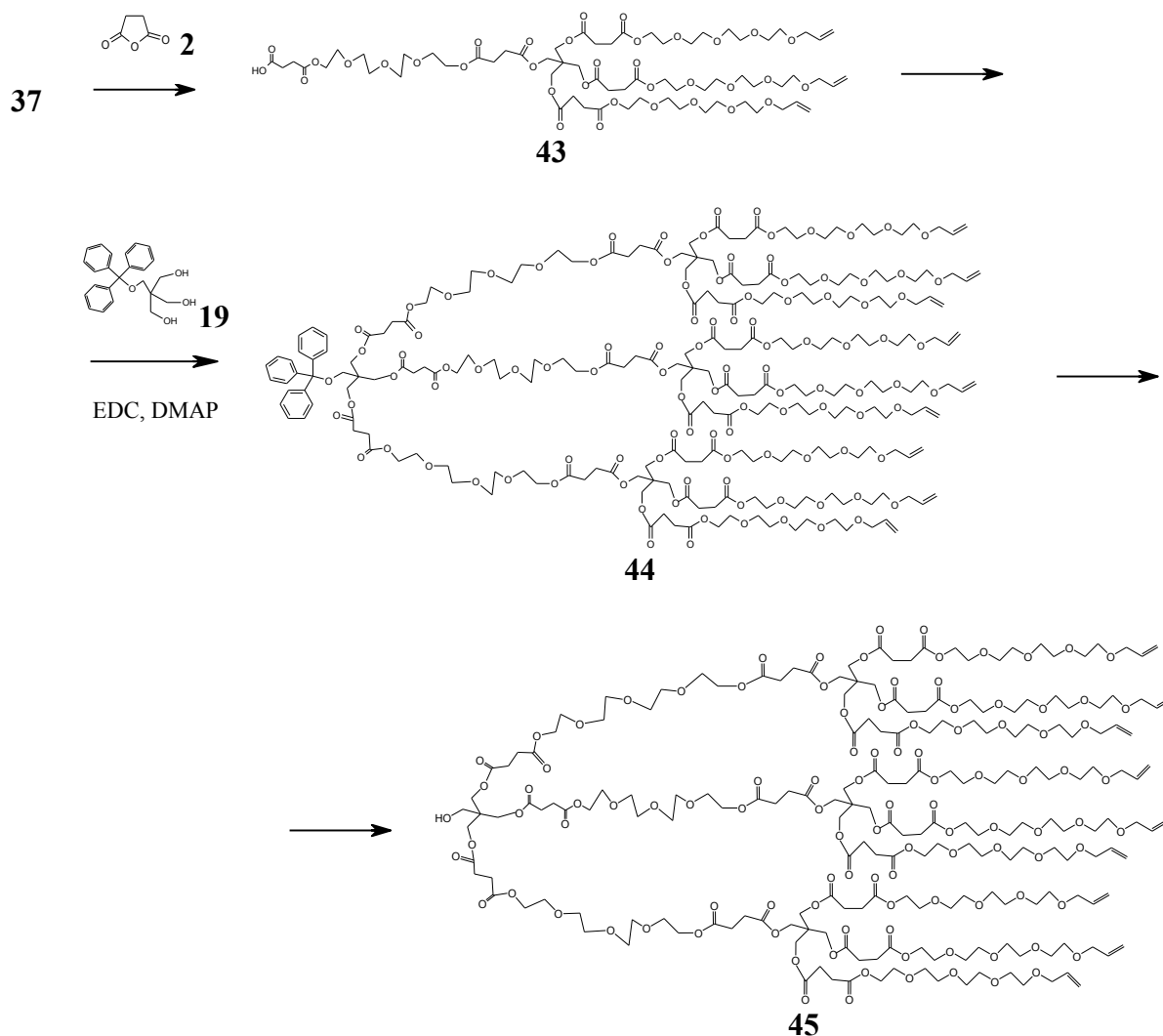


Figure 86. Assemblage chimique du dendron hydrophile 45 de 2ème génération.

La structure du dendron résultant **45** ainsi que de tous les produits intermédiaires, a été prouvée, en utilisant les méthodes FTIR, RMN ^1H et ^{13}C , l'analyse élémentaire et la spectrométrie de masse (voir les détails dans la section 4.5.1.2). Il est intéressant de noter

qu'avec la montée en génération des dendrons, les spectres de masse contiennent plus de signaux lesquels pourraient être attribués aux ions moléculaires multichargés (**Figure 87, page 166**). Ceci est en concordance avec les données présentées plus haut (section 4.1.1), concernant une possibilité de coordination de plusieurs particules chargées par les structures de ce type.

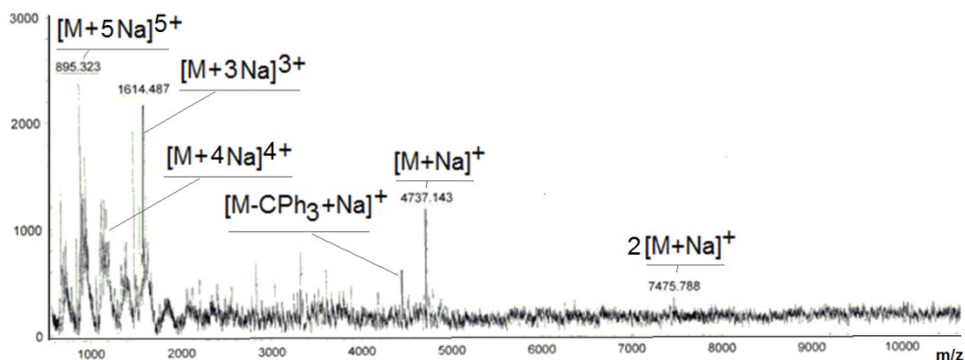


Figure 87. Spectre de masse (MALDI-TOF, en mode positif) du dendron 44 contenant des signaux correspondant aux ions moléculaires multichargés.

Il convient cependant de mentionner que les deux dendrons de G2, **44** et **45**, avaient une tendance à se polymériser spontanément, en réduisant considérablement les rendements à chaque étape de synthèse. Par exemple, dans le cas du produit détritylé **45**, même après une purification sur colonne, un précipité clair se formait dans le chloroforme. L'analyse RMN du proton du précipité a montré une diminution significative de l'intensité des signaux appartenant aux groupements allyles à 6,0-4,0 ppm. Ceci suggère que la polymérisation s'effectuait par des liaisons doubles d'allyles, étant donné leurs nombre et leur proximité dans la molécule.

Devant ce problème de polymérisation du dendron **45**, menant à la diminution considérable du rendement de produit, nous avons décidé de l'utiliser en tant que tel dans la synthèse ultérieure de dendrimères (voir la section 4.3.2.1).

4.3. Assemblage des dendrimères

4.3.1. Synthèse de dendrimères de première génération

Pour assembler les dendrimères de G1, les composés **C-I**, **C-III-VI** et **C-VIII** en tant que cœurs et les structures **36-38** et **40** comme dendrons ont été utilisés. D'une manière générale, les travaux de synthèse peuvent être divisés selon le type de macromolécules à obtenir, respectivement, **Ia** et **Ia** (**Figure 78, page 158**), dont les résultats seront présentés dans les sections suivantes.

4.3.1.1. Assemblage de dendrimères de type Ia

L'assemblage de dendrimères de type **Ia** avait pour but d'obtenir des structures qui diffèrent par la rigidité de la partie centrale de macromolécules. À cette fin, nous avons planifié de réaliser la synthèse du dendrimère **46** portant un cœur hydrophobe porphyrique rigide (**Figure 88, page 167**), ainsi que de 8 autres dendrimères ayant une partie centrale flexible, hydrophobe ou hydrophile, à base de cœurs **C-I**, **C-III-VI** et d'espaces, respectivement, DD ou TEG (**Figure 89, page 168**).

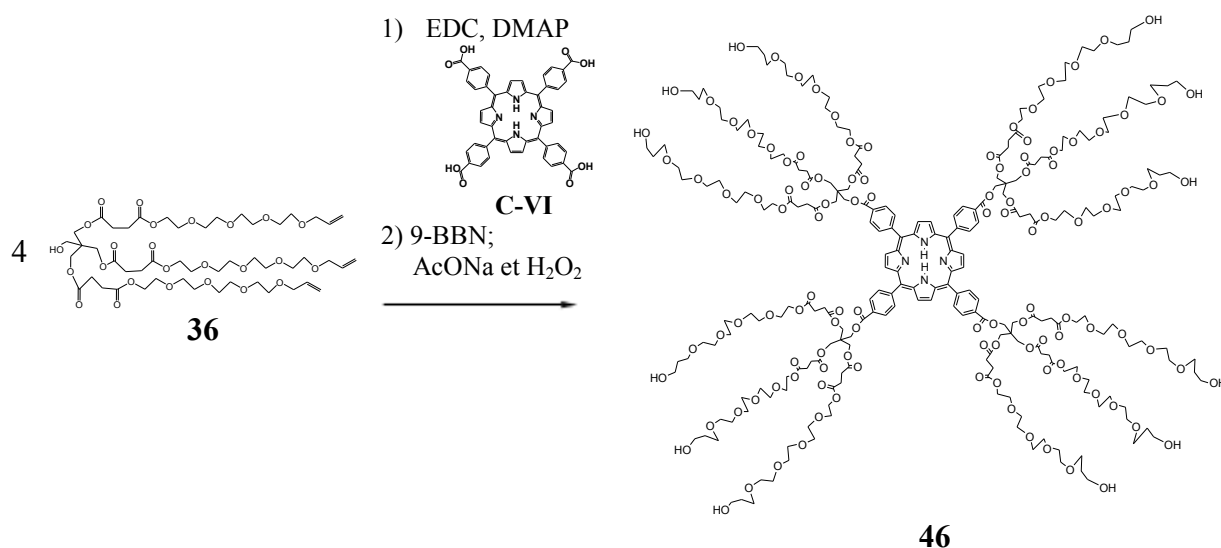


Figure. 88. Schéma de synthèse du dendrimère de première génération **46** portant un cœur hydrophobe rigide à base de porphyrine substituée **C-VI**.

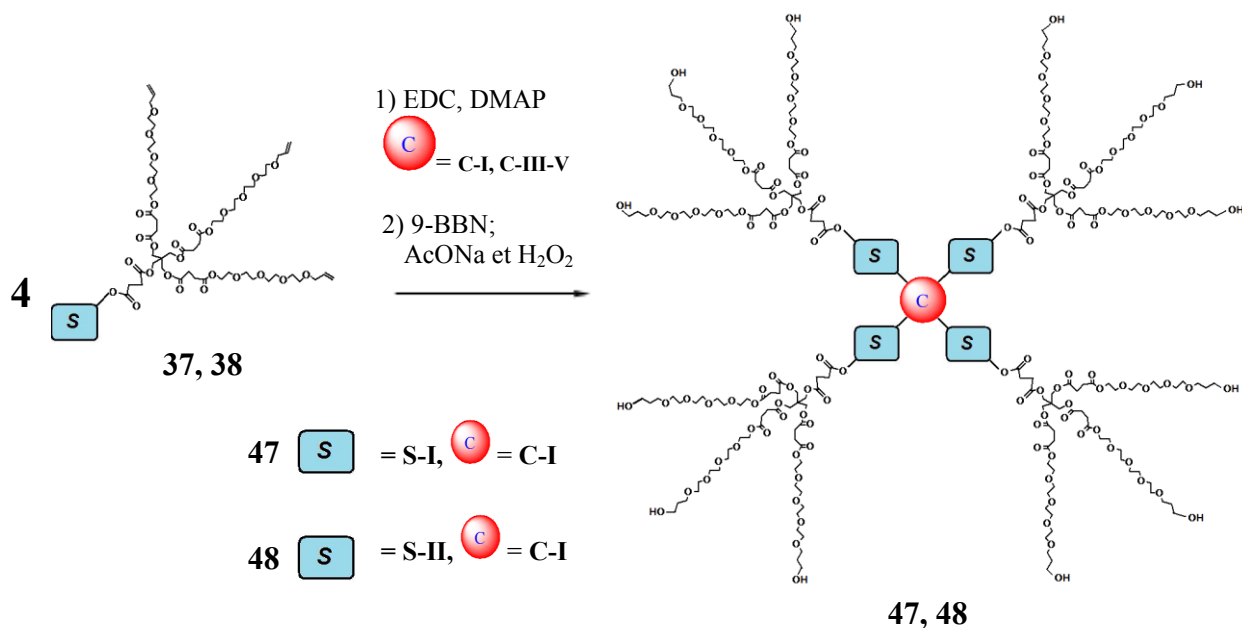


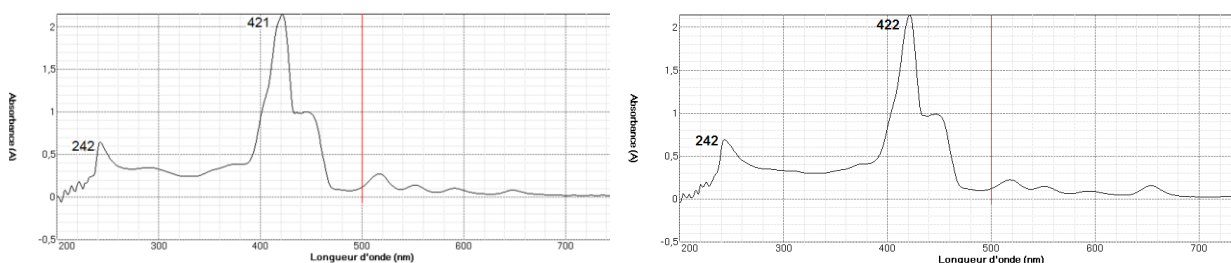
Figure. 89. Schéma de synthèse de dendrimères de première génération portant une partie centrale flexible hydrophile (47) ou hydrophobe (48).

L'obtention du dendrimère **46** à cœur porphyrrique a été effectuée en deux étapes : le greffage de dendrons **36** au cœur **C-VI** suivi de l'oxydation d'allyles terminaux. Le greffage de dendrons a été réalisé en présence de l'EDC et la DMAP dans le THF sec, étant donné que le composé **C-VI** était insoluble dans d'autres solvants aprotiques testés, acceptables pour la réaction, tels que chloroforme, éther diéthylique, acétonitrile, DMF, DMA et acétone. En effet, nous avons trouvé que la solubilité du **C-VI** dans le milieu réactionnel doit être considérée comme un facteur crucial car nos tentatives de réaliser la synthèse en suspension de **C-VI** dans le CHCl₃ et DMA n'ont pas mené à des résultats positifs. La purification du produit obtenu dans le THF a été faite sur colonne chromatographique remplie de silice, en utilisant le mélange chloroforme-méthanol (20:1) pour éliminer des impuretés légères (incluant le dendron **36** non réagi) et le mélange chloroforme-méthanol (5:1) afin d'isoler le dendrimère polyallyle visé avec le rendement de 45%. La procédure complète de synthèse et les résultats de caractérisation structurale du produit sont présentés dans la section 4.5.2.1.1.

La deuxième étape de synthèse du **46**, l'oxydation d'allyles terminaux (**Figure 88**, **page 167**), a été réalisée par la réaction avec le 9-borabicyclo[3.3.1]nonane (9-BBN) suivi de l'oxydation du produit de l'addition avec le peroxyde d'hydrogène en présence de l'acétate de

sodium, par analogie avec les protocoles bibliographiques [488, 489]. Les avantages principaux liés à l'utilisation du 9-BBN par rapport à d'autres types de boranes sont la possibilité de synthétiser un produit portant l'hydroxyle terminal avec un rendement plus de 98% [490], ainsi que la stabilité du réactif dans une atmosphère inerte [491]. En effet, dans le cas de l'utilisation du borane (BH₃), un composé très réactif, le taux des dérivés terminaux ne dépasse pas 70%. De plus, l'utilisation de l'acétate de sodium, au lieu de l'hydroxyde de sodium (méthode classique), à l'étape d'oxydation avec le H₂O₂, permet d'éviter la dégradation de groupements esters [490].

Après une purification chromatographique, le rendement final du dendrimère **46** était de 87%. La structure du produit a été caractérisée par les techniques UV-Vis, FTIR, RMN ¹H et ¹³C, l'analyse élémentaire, la spectrométrie de masse et GPC (voir les détails dans la section 4.5.2.1.1). Par exemple, l'analyse comparative de spectres UV-Vis du composé **46** et de son précurseur polyallyle montre que les deux structures sont caractérisées par un pic distinct avec le maximum à 241-242 nm dans le chloroforme, appartenant au système chromophore du cycle porphyrique (**Figure 90, page 169**). Ceci prouve que l'unité porphyrique, étant relativement fragile, reste intacte dans les conditions de synthèse et de purification utilisées.



a.

b.

Figure 90. Spectres UV-Vis dans le chloroforme de dendrimères de G1 à cœur porphyrique polyallyle (a) et de son dérivé polyhydroxyle 46 (b).

Dans le spectre FTIR du composé **46**, les signaux appartenant aux vibrations de liaisons doubles de groupements allyles sont absents, tandis qu'une nouvelle bande intense à 3600-3300 cm⁻¹ confirme la formation des groupements hydroxyles. De plus, après l'oxydation, la bande intense à 1731 cm⁻¹ prouve que les liaisons esters demeurent intactes (**Figure 91, page 170**).

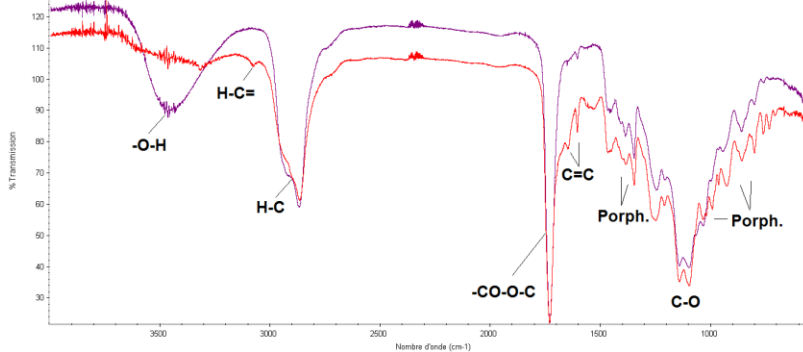


Figure 91. Spectres FTIR de dendrimères de G1 à cœur porphyrique polyallyle (rouge) et de son dérivé polyhydroxyle 46 (mauve).

Au niveau de l'analyse RMN, la même tendance a été observée : la conservation de signaux appartenant aux groupements polyesters, la disparition de signaux allyles et l'apparition de nouveaux pics appartenant aux alcools (**Figure 92, page 170**).

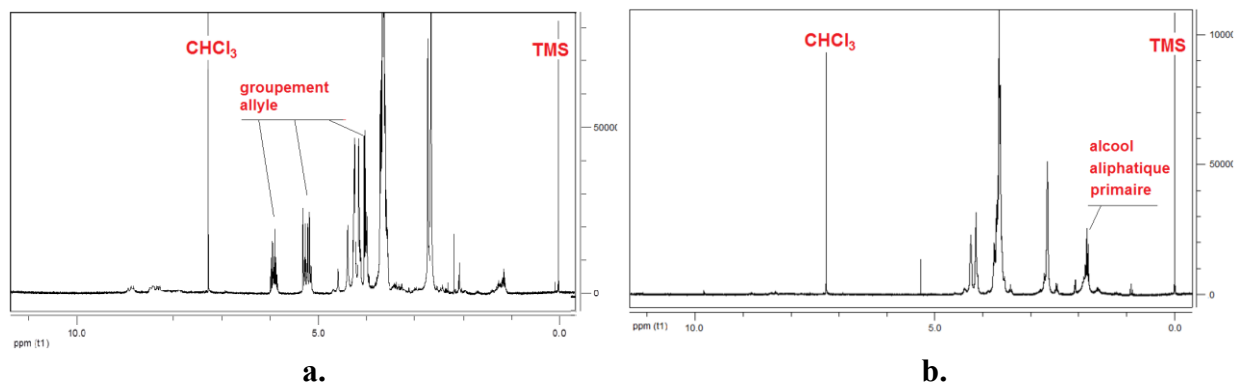


Figure 92. Spectres RMN du proton (CDCl_3 , 300 MHz) de dendrimères de G1 à cœur porphyrique polyallyle (a) et de son dérivé polyhydroxyle 46 (b).

Contrairement à la caractérisation structurale par RMN du proton, ainsi qu'aux résultats de l'analyse élémentaire qui ont confirmé la structure visée **46**, les données obtenues avec la méthode de spectrométrie de masse et la GPC n'étaient pas concluantes. En effet, dans le spectre MALDI-TOF, les signaux les plus intenses ont des valeurs m/z plus petites

qu'attendues (**Figure 93a, page 171**). Un seul pic observé dans le chromatogramme GPC a été identifié comme ayant une valeur de la masse moléculaire moyenne de 2711 Da, ce qui diffère non seulement de la valeur théorique de 5276,4 Da, mais aussi de toutes valeurs obtenues par l'analyse de masse (**Figure 93b, page 171**).

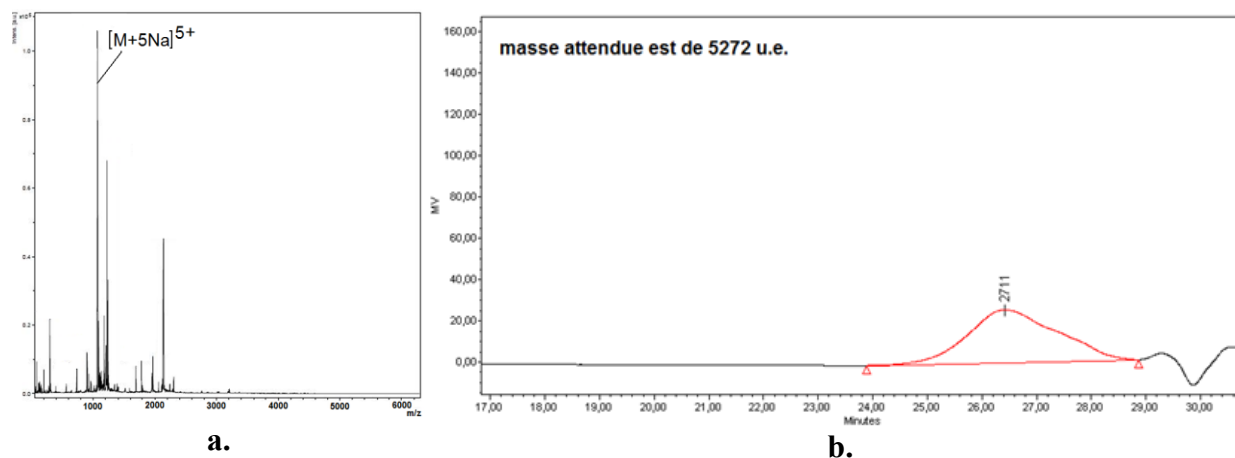


Figure 93. Spectre MALDI-TOF (a) et chromatogramme GPC (b) du dendrimère 46.

Les explications possibles de résultats de la spectrométrie de masse et GPC sont le comportement spécifique de l'échantillon durant la procédure analytique dans le premier cas, et l'utilisation du standard mal adapté aux analyses des dendrimères dans le deuxième. En particulier, comme déjà montré dans la section 4.2, les structures macromoléculaires proposées pour le présent projet de recherche ont tendance, durant l'analyse de masse, à former des particules multichargées. Ceci résulte en la diminution ou même en la disparition des signaux appartenant à des ions moléculaires monochargés. Par exemple, dans le cas de l'analyse du **46**, le signal maximal observé à 1074 Da (**Figure 93a, page 171**) pourrait être identifié comme appartenant au cation $[M+5Na]^{5+}$. La dégradation du dendrimère durant l'analyse est également possible.

La masse moléculaire plus petite qu'attendue, détectée par la technique GPC (**Figure 93b, page 171**), s'explique par le fait que les standards polystyrènes linéaires et hydrophobes, utilisés durant l'analyse, ne correspondent ni à la nature physico-chimique générale, ni à l'architecture de la structure analysée. Par exemple, l'effet semblable de non-concordance entre les valeurs théoriques et les résultats obtenus avec la GPC a été également observé dans le cas du dendron de départ **36** dont d'autres caractéristiques analytiques confirmaient

parfaitement la structure visée. Ainsi, avant de caractériser nos produits par la technique GPC, une sélection préliminaire des standards appropriés devrait être normalement effectuée. Il est cependant à noter que les standards ayant une structure proche des structures dendritiques choisies dans le cadre du présent projet sont inconnus.

La synthèse de dendrimères à partir de dendrons **37** et **38** et les structures de cœurs **C-I** et **C-III-V** ayant une partie centrale flexible (**Figure 89, page 168**) a été réalisée par analogie avec le processus d'assemblage du dendrimère **46** (**Figure 88, page 167**). La première étape était le greffage de dendrons aux cœurs correspondants dans le chloroforme en présence de l'EDC et la DMAP. Après une purification chromatographique, l'oxydation d'allyles terminaux par la boration avec le 9-BBN suivie de la réaction avec H₂O₂ en présence de l'acétate de sodium a été effectuée. Les produits résultants ont été purifiés par chromatographie sur colonne. L'analyse structurale des composés isolés a montré que la formation de dendrimères a eu lieu uniquement dans le cas du cœur **C-I** (voir les détails dans la section 4.5.2.1.1 et dans la **Figure 94, page 172**).

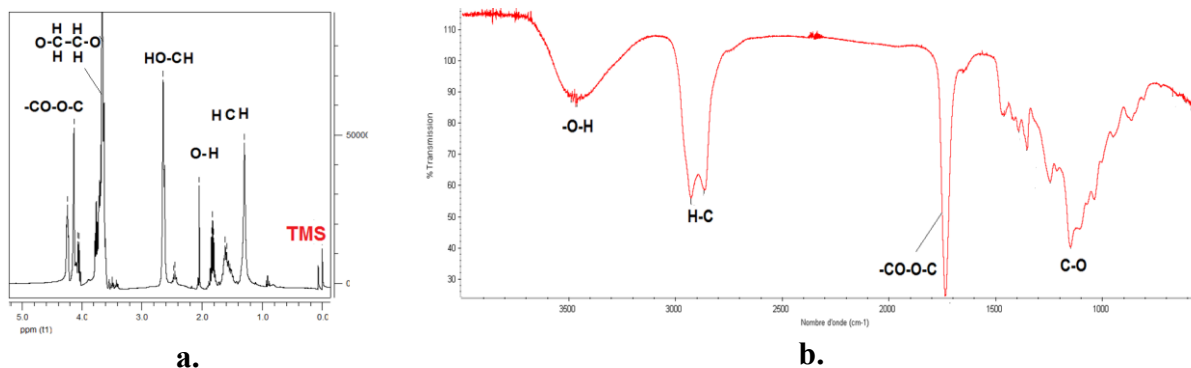


Figure 94. Spectres FTIR (a) et de ¹H RMN (b) du dendrimère 48 portant le cœur C-I et les groupements espaceurs S-II.

Dans le cas d'autres cœurs testés, **C-III-V**, les analyses indiquent qu'il s'agit plutôt des produits secondaires à base de dendrons. En effet, les produits récupérés après les réactions avec **C-III-V** ont montré une très petite différence en analyses élémentaires, CCM, GPC entre les valeurs observées et celles-ci obtenues pour les dendrons de départ **37** et **38**. Il est également à noter que les spectres de masse, ainsi que de RMN et FTIR, de ces produits

étaient pratiquement identiques. Ceci a finalement suggéré que les réactions n'avaient pas mené à des dendrimères voulus.

Parmi les raisons permettant d'expliquer l'échec avec les cœurs **C-III-V**, il est à mentionner, premièrement, des effets stériques importants dus à la proximité de groupements carboxyliques dans ces structures, ainsi qu'à la taille significative de dendrons **37** et **38** à greffer. De plus, il faut également indiquer la possibilité de former par les structures **C-III-V** les anhydrides cycliques en présence de l'EDC. En effet, le mécanisme de réactions entre des acides carboxyliques et les agents carbodiimides peut également conduire aux anhydrides [492]. Dans notre cas, les anhydrides cycliques de **C-III-V** sont non seulement moins actifs que les adduits à base de l'EDC, mais aussi ne peuvent pas mener aux produits de l'esterification complète (voir la section 2.2.1.2.4). Afin d'exclure la formation de produits du greffage incomplet à partir d'anhydrides, nous avons rajouté des portions supplémentaires de l'EDC dans les masses réactionnelles au bout de 2-3 jours après le début de la synthèse, cependant, sans succès. Ainsi, les données suggèrent collectivement que le facteur majeur qui contribue à l'échec de la synthèse de dendrimères à base de cœurs **C-III-V**, est bien la gêne stérique. En particulier, les adduits de l'EDC avec les groupements carboxyliques voisins peuvent représenter des obstacles très significatifs pour permettre aux alcools volumineux **37** et **38** d'accéder aux centres réactionnels. Par conséquent, l'assemblage ultérieur de dendrimères de type I portant comme cœurs les structures **C-III-V** a été abandonné, en se limitant uniquement aux dendrimères aux cœurs **C-I** et **C-VI**.

4.3.1.2. Assemblage de dendrimères de type **IIa**

Les travaux d'assemblage des dendrimères de type **IIa** ont été réalisés à partir de l'hexaol **C-VIII** (**Figure 33**, **page 76**) dont l'obtention a été présentée en détail dans la section 2.2.1.2.5. Afin de greffer des segments de la couche hydrophile externe (branchés ou linéaires) sur les hydroxyles secondaires du **C-VIII**, plusieurs approches ont été entreprises dont la plupart se sont cependant avérées inefficaces. La première approche consistait à greffer les acides **27**, **32** et **40** par l'esterification de Steglich (**Figure 95a**, **page 175**). Cependant, malgré les différences structurales d'acides utilisés, aucune de ces réactions n'a conduit au

greffage efficace. En particulier, après une purification chromatographique, l'hexaol **C-VIII** de départ a été toujours récupéré.

Devant cet échec, nous nous sommes tournés vers l'interaction de l'alcool avec les chlorures d'acides. En effet, selon de nombreuses données bibliographiques [363, 492] cette réaction est généralement considérée comme la méthode la plus fiable pour obtenir des esters à partir des alcools secondaires. Dans notre cas, les chlorures **49-51** ont été synthétisés par la réaction d'acides **27**, **32** et **40** avec le chlorure de thionyle en présence de la pyridine. Néanmoins, l'interaction de chlorures résultants avec le composé **C-VIII**, en présence de la pyridine, n'a pas non plus conduit à la synthèse de structures dendritiques attendues, **52-54**, (**Figure 95b**, **page 175**). En particulier, l'alcool **C-VIII** était toujours présent parmi les produits isolés par chromatographie sur colonne.

Une autre approche que nous avons entreprise, était basée sur la réaction des halogénures aliphatiques secondaires avec les sels métalliques d'acides carboxyliques, par analogie avec le protocole que nous avons élaboré pour synthétiser le composé polyacétylé **13** (section 2.2.1.2.5). En effet, certains protocoles suggèrent que l'utilisation des sels de césium conduit généralement aux rendements de produits esters plus élevés et dans les conditions plus douces pour ce type de substitution [493-495]. Dans notre cas, la neutralisation du groupement carboxylique a été effectuée par la réaction avec le carbonate de césium. Puisque ce dernier représente un composé fortement basique, pouvant ainsi causer la dégradation de groupements esters (section 2.2.1.2.5), nous avons choisi le produit **32** comme modèle de structure acide. La neutralisation du **32** par le Cs_2CO_3 a été effectuée en présence de l'eau à température ambiante. Le sel résultant a été séché par la méthode azéotropique de Dean-Stark avec le toluène. Afin de synthétiser le dendrimère **53** par cette approche, le dérivé polybromé **12** (voir la synthèse de ce produit dans la section 2.2.1.2.5) a été utilisé comme halogénure secondaire.

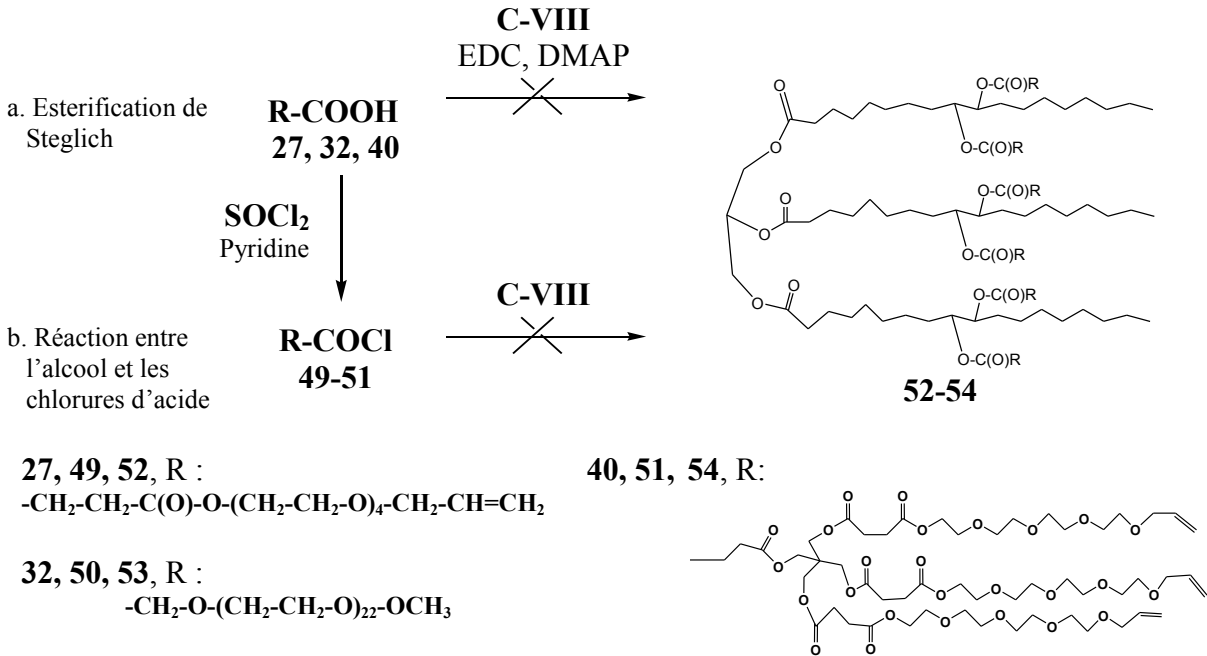


Figure 95. Schéma de synthèse de dendrimères de type IIa, 52-54, par l'esterification de Steglich (a) et la réaction entre l'alcool et les chlorures d'acides (b).

La réaction a été menée dans le milieu d'un des solvants aprotiques polaires, DMA ou MeO-PEG250-OMe (**Figure 96, page 175**). L'utilisation du MeO-PEG250-OMe a été suggérée par le protocole de Y.-Q. Cao et col. [496] faisant appel à l'utilisation du PEG400.

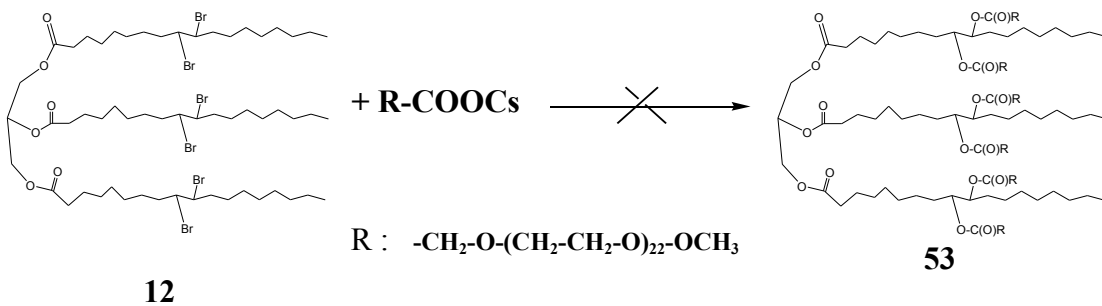


Figure 96. Schéma de synthèse du dendrimer 53 par la réaction entre le dérivé polybromé 12 et le sel de césium à base de l'acide carboxylique 32.

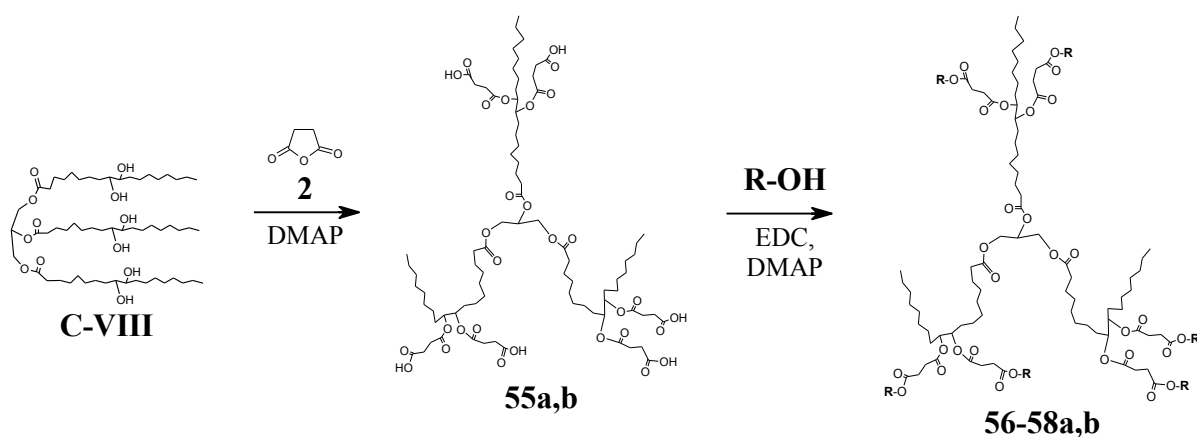
La température de masses réactionnelles a été maintenue d'abord, pendant 24 h, à 20-22°C et ensuite à 85-90°C, jusqu'à la disparition complète de signaux de protons H-C-Br dans les spectres ¹H RMN de la masse réactionnelle à 4,17 ppm. Après la purification par chromatographie sur colonne, aucune des zones récupérées ne correspondait à la structure **53** visée. L'analyse RMN suggère également que la réaction d'élimination pouvait avoir lieu car les nouveaux signaux des protons dans l'intervalle 6-5 ppm ont été observés.

Parmi les raisons possibles de résultats négatifs présentés ci-dessus, on retiendra :

- (i) la présence dans les acides hydrophiles **27**, **32**, **40**, ainsi que dans le sel de césium de l'acide **32**, d'eau résiduelle, difficile à enlever par les procédures de séchage utilisées et causant ainsi une hydrolyse non désirée;
- (ii) les gênes stériques importantes, présentes dans le cas d'hydroxyles et halogénures secondaires voisins, se trouvant au milieu de longues chaînes aliphatiques, ainsi que les gênes stériques causés par les structures volumineuses à greffer.

La deuxième raison semble être plus probable car la réaction de ces acides avec le chlorure de thionyle devrait normalement exclure l'influence de H₂O résiduelle. De plus, les résultats négatifs ont été par la suite observés dans le cas de greffage au C-VIII de l'acide oléique, composé très hydrophobe (section 4.3.2.2).

Devant ces nombreux échecs, nous avons finalement décidé de limiter la taille de molécules à greffer au cœur C-VIII. À cet égard, le dérivé polysuccinique **55** a été obtenu, en utilisant l'anhydride succinique (**2**) pour modifier les hydroxyles secondaires dans C-VIII (**Figure 97, page 177**). Le greffage a été réalisé à 80°C, dans la pyridine, en utilisant la DMAP comme catalyseur d'acylation. Les deux produits C-VIII obtenus à partir du trioléate standard et de l'huile d'olive naturelle ont été transformés respectivement en **55a** et **55b**. Ces produits ont été purifiés par extraction avec le chloroforme en présence de la solution saturée du chlorure de sodium. Après la séparation, la phase organique a été évaporée sous vide, ce qui a permis d'atteindre les rendements proches de valeurs théoriques. La structure de produits résultants a été prouvée avec les techniques FTIR, RMN du proton et de ¹³C, l'analyse élémentaire et la spectrométrie de masse (voir les détails dans la section 4.5.2.1.2 et dans la **Figure 98, page 178**). Une légère différence observée dans les paramètres analytiques entre les dérivés standard et naturel s'explique par la présence de chaînes aliphatiques nonsaturées dans le cas du produit naturel.



56 R = $-(\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_4\text{-CH}_2\text{-CH=CH}_2$

57 R = $-\text{PEG550-OMe}$

58 R = $-\text{PEG1000-OMe}$

Figure 97. Synthèse du dérivé polysuccinyle 55 à partir du cœur C-VIII suivi du greffage d'alcools hydrophiles, afin d'obtenir les dendrimères de type IIa, 56-58.

La synthèse réussie de structures **55a,b** a permis par la suite d'obtenir les dendrimères **56-58a,b** par le greffage d'alcools à base de PEG monosubstitués de différentes longueurs dans les conditions d'esterification de Steglich (**Figure 97, page 177**). La purification de produits a été effectuée par chromatographie sur colonne remplie de silice, en utilisant le gradient de solvants, chloroforme-méthanol. Afin de récupérer les dendrimères visés, toutes les zones ramassées ont été analysées par CCM, l'analyse FTIR et la RMN du proton. En se basant sur les résultats d'analyses, nous avons choisi les produits qui répondaient mieux aux caractéristiques attendues. Par la suite, l'analyse structurale a été également complétée par les techniques de la RMN du carbone et l'analyse élémentaire (voir les détails dans la section 4.5.2.1.2 et aussi dans la **Figure 99, page 179**).

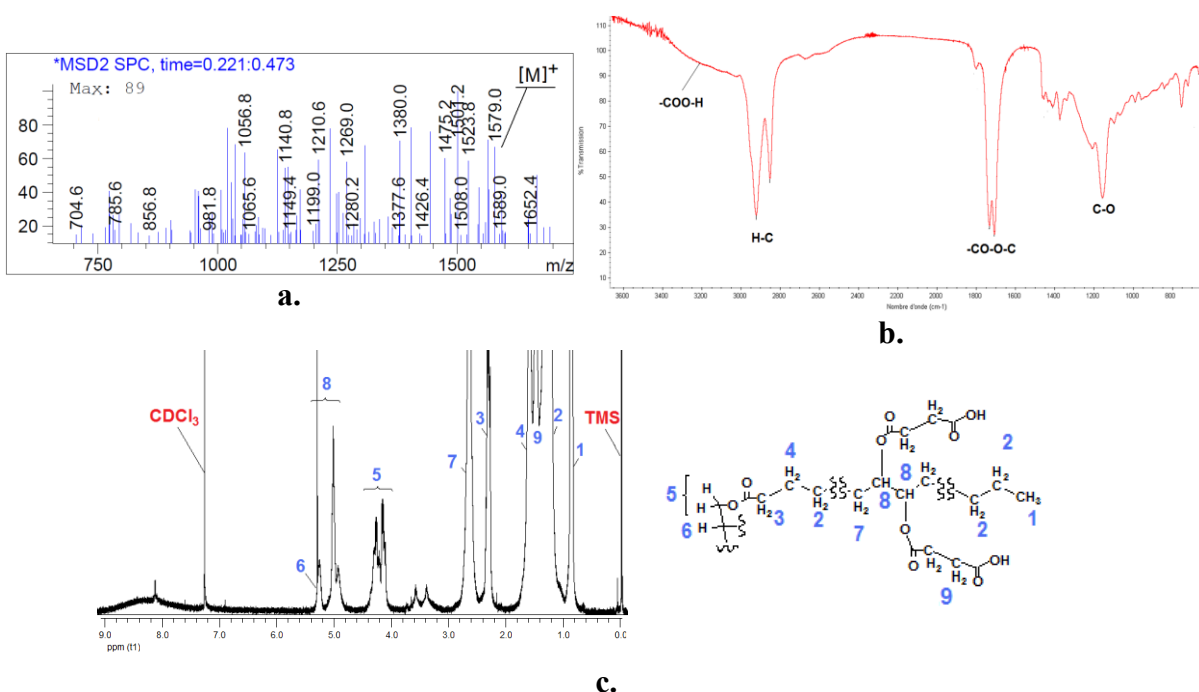


Figure 98. Spectres de masse (a), FTIR (b) et ^1H RMN (c) du dérivé polysuccinique 55a obtenu à partir du trioléate standard.

Afin de vérifier si le greffage de PEG était complet, les spectres RMN du proton de mélanges physiques de produits de départ ont été également obtenus, en respectant les ratios molaires correspondant aux dendrimères visés. Comme critère d'évaluation, nous avons choisi le ratio entre les aires des signaux appartenant aux groupements méthyles terminaux des chaînes PEG et de chaînes aliphatiques d'acides gras, respectivement à 3,45-3,20 ppm et 1,05-0,75 ppm. Dans le cas de mélanges physiques, la valeur du ratio était de 1,95-1,98. Les résultats obtenus pour les dendrimères **57** et **58** sont généralement proches de cette valeur, en particulier, 2,11-2,20 pour les dérivés de trioléate standard et 1,66-1,79 pour ceux de l'huile d'olive. La différence pourrait être expliquée par la présence de chaînes saturées dans le cas de triglycérides naturels, ce qui est également en concordance avec les données de l'analyse élémentaire.

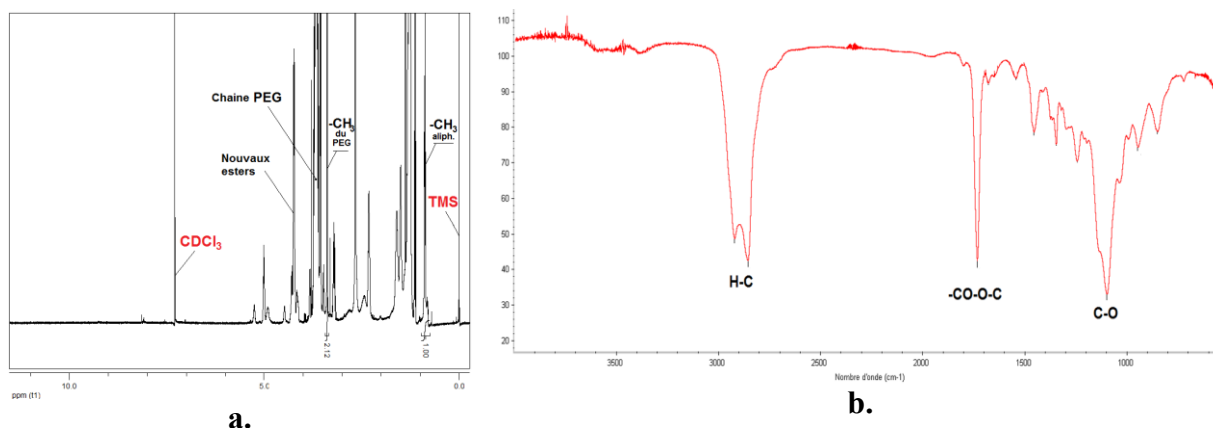


Figure 99. Spectres de ¹H RMN (a) et FTIR (b) et du dendrimère 57a de type Ib, portant les chaînes hydrophiles PEG550.

La caractérisation de produits **56-58a,b** par la technique GPC, en utilisant les standards polystyrènes linéaires, a donné les valeurs de masses moléculaires plus petites qu'attendues. Ce qui s'explique par le fait que les standards utilisés ne reflètent pas la nature chimique de composés analysés, comme déjà mentionné dans la section 4.3.1.1. Il est cependant à noter qu'on peut observer une augmentation de la masse moléculaire moyenne détectée avec la croissance de longueur de chaînes PEG greffées (p.ex., 1824 Da pour **56a**, 2630 Da pour **57a** et 4491 Da pour **58a**), ce qui pourrait représenter une preuve indirecte de la synthèse réussie de structures visées.

Dans le cas du dendrimère **56a** portant les chaînes du TEG monoallylé, une étape supplémentaire a été réalisée afin de transformer les groupements $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ en $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$. L'oxydation a été effectuée par la réaction avec 9-BBN suivi de H_2O_2 en présence de l'acétate de sodium (**Figure 100, page 180**), en suivant le protocole général de synthèse et de purification élaboré plutôt pour obtenir les structures de type **Ia** (section 4.3.1.1).

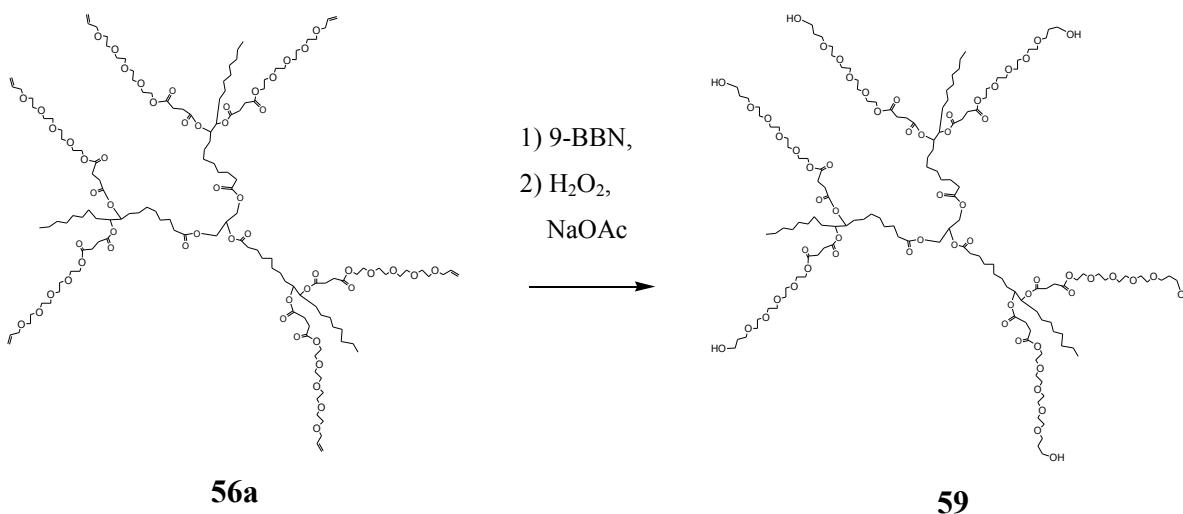


Figure 100. Oxydation d'allyle dans la structure 56a afin d'obtenir le dérivé polyhydroxylé 59.

La structure du dendrimère résultant **59** a été prouvée par les techniques FTIR, RMN, ainsi que l'analyse élémentaire (voir les détails dans la section 4.5.2.1.2 et aussi dans la **Figure 101, page 180**).

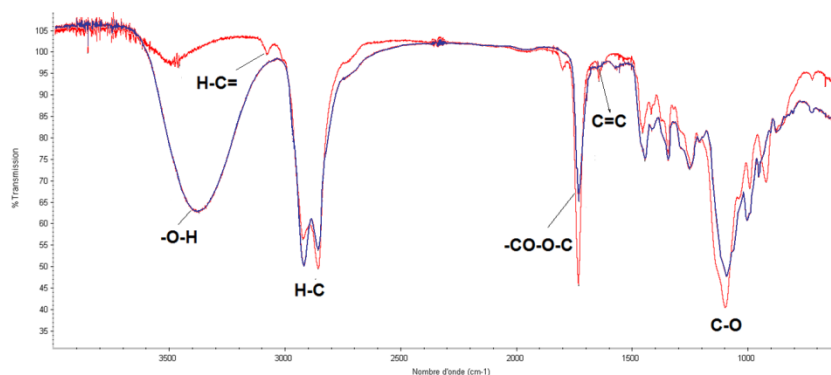


Figure 101. Spectres FTIR de dendrimères polyallyle 56 (rouge) et de son dérivé polyhydroxyle 59 (bleu).

4.3.2. Synthèse de dendrimères de deuxième génération

L'étape suivante de nos travaux de synthèse était l'assemblage de dendrimères de deuxième génération. Comme dans le cas de structures de première génération, les résultats de

ces expériences seront présentées selon le type de macromolécules à obtenir, respectivement, **Ib** et **IIb** (**Figure 78**, page 158).

4.3.2.1. Assemblage de dendrimères de type **Ib**

L'obtention de macromolécules de type **Ib** a été limitée à la synthèse de dendrimères portant comme cœurs les structures **C-I** et **C-VI**. Ceci est expliqué par les résultats observés dans le cas de dendrimère de type **Ia** (section 4.3.1.1), en particulier, seuls ces cœurs ont permis d'éviter les obstacles stériques lors du greffage de dendrons de première génération.

Dans le cas de la structure de cœur **C-VI**, les travaux d'assemblage ont été menés par deux voies différentes, convergente et divergente (**Figure 102**, page 182), afin de comparer ces approches sur le plan de l'efficacité réactionnelle. Les dendrimères visés **61** et **63** ont les structures presque identiques sauf les espaceurs propylènes ayant lieu dans la dendrimère **61**. Cette différence provient de particularités d'assemblage de dendrons, notamment, de la présence de propylènes supplémentaires résultant de l'oxydation de groupements allyles.

La synthèse du dendrimère polyallyle **60** par voie convergente a été réalisée par la réaction du dendron de G2 **45** avec le composé **C-VI** en présence de l'EDC et la DMAP dans le milieu de THF. L'obtention de son analogue **62** par voie divergente consistait à greffer le dendron de G1 **40** sur le dendrimère de G1 **46**, dans le chloroforme, en utilisant également les conditions d'esterification de Steglich.

La purification des produits **60** et **62** a été effectuée par chromatographie sur colonne remplie de silice (voir les détails dans la section 4.5.2.2). Il est cependant à noter qu'avec cette méthode, les dendrimères visés ont été récupérés en très petites quantités. En particulier, le rendement du produit **60** était de 6%, tandis que celui du **62** ne dépassait pas 14%. De plus, la nuance rougeâtre de la silice, présent après l'élution, indiquait que certains dérivés porphyriques restaient dans la phase stationnaire. Ainsi, les résultats observés pourraient être expliqués soit par des problèmes de polymérisation (comme décrit plus haut dans le cas du dendron **45**, section 4.2.2), soit par les conditions de purification qui étaient mal adaptées pour ce type de composés. Ajoutons que les procédures d'extraction que nous avons essayées à cette fin, n'étaient pas efficaces (établi par CCM).

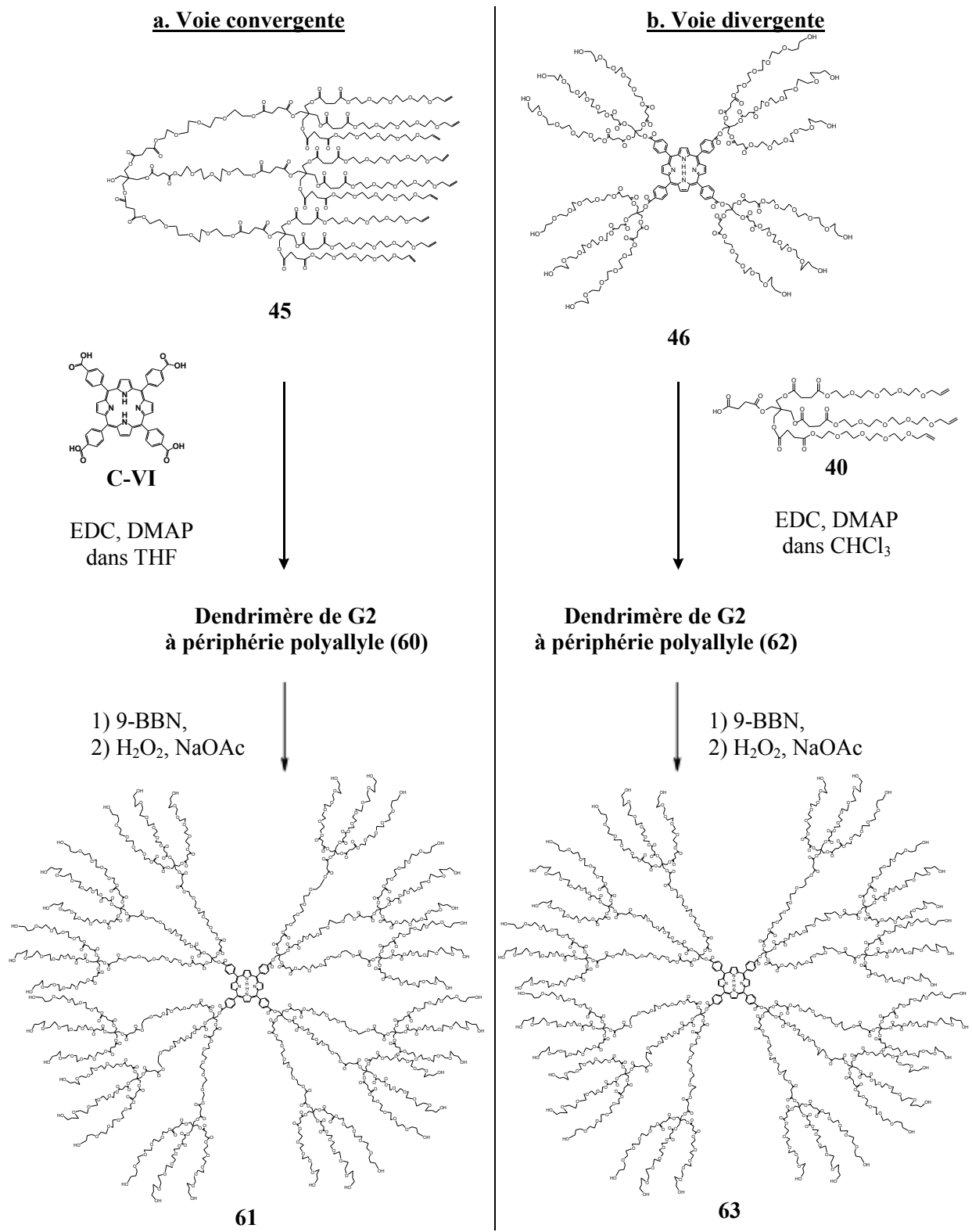


Figure 102. Assemblage de dendrimères de type Ib par deux différentes voies de synthèse convergente (a) et divergente (b).

Les structures de dendrimères **60** et **62** ont été confirmées par les techniques de spectroscopies UV-Vis, FTIR et RMN, ainsi que par l'analyse élémentaire (voir les détails dans la section 4.5.2.2).

Afin d'éviter le problème de polymérisation possible, les produits polyallyles **60** et **62** ont été stockés uniquement sous forme de solutions et, ensuite, rapidement transformés en dérivés polyhydroxyles par la réaction avec le 9-BBN dans le THF, suivi de l'oxydation par H₂O₂ en présence de NaOAc aqueux (**Figure 102, page 182**). Les structures de produits ont été caractérisées par les méthodes de spectroscopies UV-Vis, FTIR et RMN, l'analyse élémentaire et spectrométrie de masse (voir les détails dans la section 4.5.2.2). Par exemple, la présence du système chromophore porphyrinique dans les molécules a été prouvée par le pic caractéristique avec le maximum à 422 nm dans les spectres d'absorbance UV-Vis (**Figure 103, page 183**).

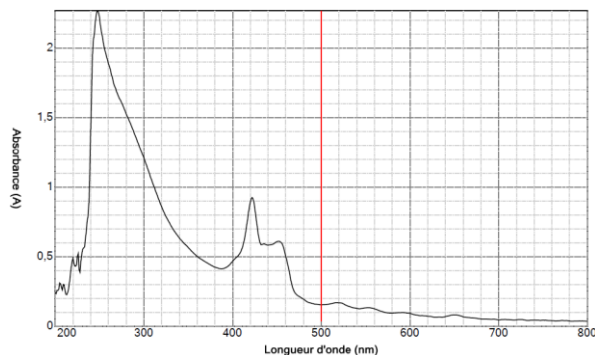


Figure 103. Spectre UV-Vis (CHCl₃) du dendrimère 61 obtenu par voie convergente.

L'analyse de masse, réalisée par la technique MALDI-TOF, s'est avérée peu informative, étant donné l'absence des signaux appartenant aux ions monochargés [M⁺] (**Figure 104, page 184**) qui devraient avoir les valeurs m/z 19561,4 et 19919,2, respectivement pour les polyalcools **61** et **63**. Ceci est probablement dû soit à la formation d'ions moléculaires multichargés (ce qui était déjà observé dans le cas de dendrimères portant ce type de dendrons, section 4.3.1.1), soit à la dégradation de macromolécules durant la procédure analytique.

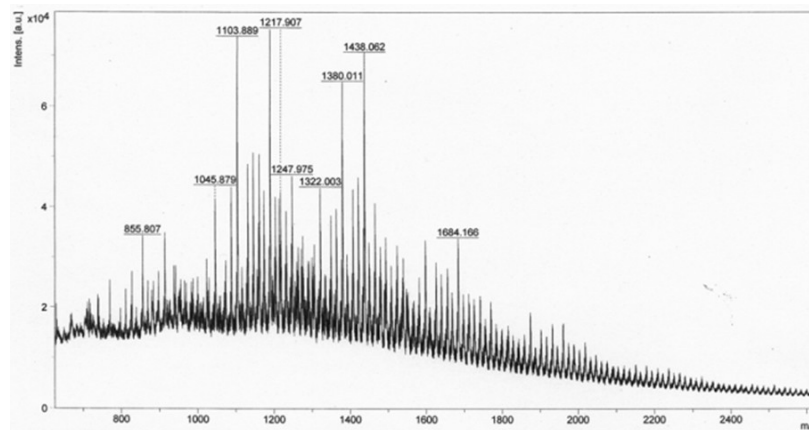


Figure 104. Spectre MALDI-TOF (en mode positif) du produit oxydé 61, caractérisé par les signaux avec les valeurs m/z plus petites qu'attendues pour l'ion moléculaire monochargé.

Les valeurs de rendements généraux de dendrimères **61** et **63**, respectivement de 6% et 13%, montrent que l'approche divergente doit être considérée comme étant plus efficace, malgré le nombre d'étapes de synthèse plus grand comparativement à l'approche convergente. Comme déjà mentionné, ceci pourrait être expliqué par l'augmentation de l'impact négatif des effets stériques avec la montée en génération des dendrons à greffer.

En se basant sur les résultats obtenus avec les dendrimères de G2 à cœur porphyrique, la synthèse du dendrimère **64** à cœur hydrophobe flexible a été effectuée en se limitant uniquement à l'approche d'assemblage divergente. À cette fin, le dendrimère de G1 à surface polyhydroxyle, **48**, et le dendron de G1 portant un groupement succinyle acide libre, **40**, ont été utilisés comme produits de départ (**Figure 105, page 185**).

La réaction a été réalisée dans les conditions d'estérification de Steglich. Le dendrimère polyallyle **65** résultant de cet assemblage a été par la suite purifié par chromatographie sur colonne, et, finalement, a été oxydé en son dérivé polyhydroxyle **64** par la réaction avec le 9-BBN dans le THF, suivi de l'oxydation par H₂O₂ en présence de NaOAc aqueux. Les détails de synthèse, purification et de caractérisation structurale de produits **64** et **65** sont présentés dans la section expérimentale 4.5.2.2.1. Les rendements réactionnels atteints par cette approche sont respectivement 42% pour **65** et 28% pour **64**.

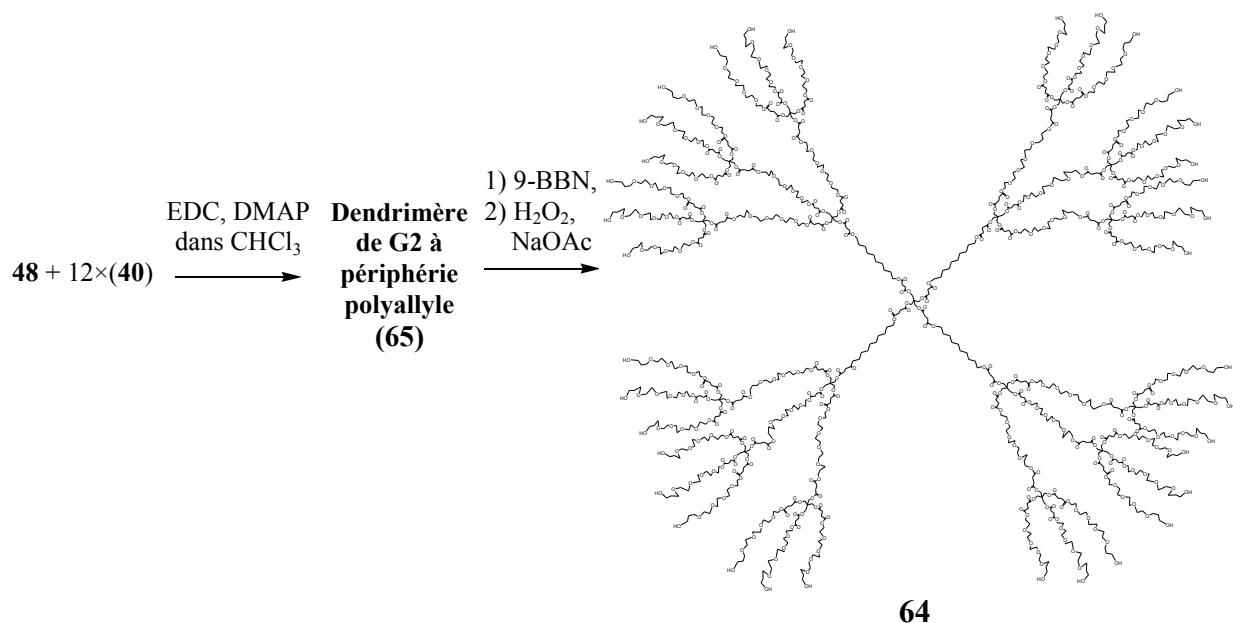


Figure 105. Schéma de synthèse du dendrimère 64 de G2 à cœur hydrophobe flexible.

Le rendement réactionnel de 42% atteint à l'étape d'assemblage de la macromolécule polyallyle **65** est plus élevé que les rendements observés dans le cas de structures polyallyles à cœur porphyrrique, **60** et **62** (respectivement, 6% et 14%). Ceci peut être expliqué par les interactions plus faibles du cœur portant les chaînes DD avec la silice, durant la procédure de purification chromatographique.

4.3.2.2. Assemblage de dendrimères de type IIb

4.3.2.2.1. Greffage de l'acide oléique à la structure de cœur C-VIII

Afin d'effectuer l'assemblage de dendrimères de type **IIb** (**Figure 78, page 158**), le greffage préliminaire de l'acide oléique (**66**) aux groupements hydroxyles du cœur **C-VIII** a été envisagé pour former une surface hydrophobe interne de futurs macromolécules. Plusieurs réactions ont été essayées à cette fin, par analogie avec le greffage de différents acides carboxyliques hydrophiles à base de PEG (voir la description détaillée dans la section 4.3.1.2). En particulier, nous avons essayé l'esterification de Steglich (**Figure 106a, page 186**), la réaction entre hydroxyles du **C-VIII** et le chlorure d'acide oléique (**67**) en présence de la

pyridine (**Figure 106b, page 186**), la substitution de brome dans le dérivé **12** en présence de l'oléate de césium (**68**) (**Figure 106c, page 186**), et une approche alternative multiétape basée sur la réaction de Mitsunobu (**Figure 107, page 187**).

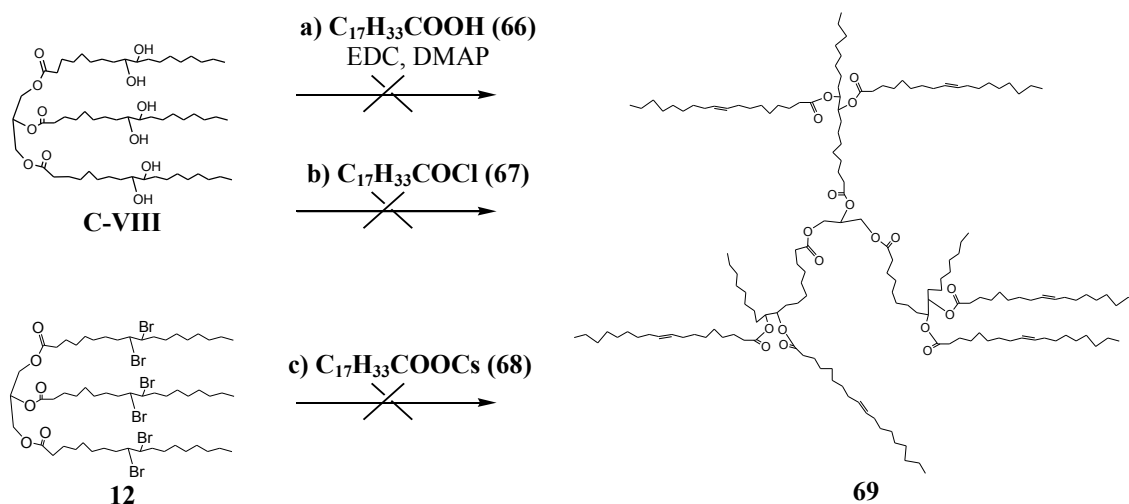


Figure 106. Schéma de greffage de l'acide oléique aux triglycérides substitués **C-VIII** et **12** par: a) l'esterification de Steglich, b) la réaction entre hydroxyle et le chlorure d'acide, c) la substitution de bromes en présence du sel de césium.

Cependant, aucune de ces réactions n'a conduit à la formation de polyester **69** visé. Après la purification chromatographique, aucun des produits isolés ne présentait les spectres RMN, FTIR et de masse, ainsi que caractéristiques de l'analyse élémentaire qui auraient pu être associés à la formation de nouveaux groupements esters secondaires à base de l'acide oléique. Par exemple, dans le cas de l'esterification de Steglich, le cœur de départ **C-VIII** a été récupéré. Dans le cas du chlorure d'acide oléique (**67**), en présence de la pyridine à la température de pièce, les produits azotés non identifiés (montré par l'analyse élémentaire) ont été obtenus. L'augmentation de la température jusqu'à 50°C a conduit à la dégradation d'esters triglycérides. L'interaction du dérivé polybromé **12** avec le sel de césium **68** a résulté en la formation de produits secondaires d'élimination (montré par l'apparition de nouvelles liaisons doubles dans les spectres FTIR et RMN). Dans le cas de l'approche basée sur la réaction de Mitsunobu, faisant appel à une utilisation de diisopropyl azodicarboxylate (DIAD)

et triphénylphosphine (PPh₃) dans l'éther éthylique, le greffage de l'acide oléique a été essayé sur le dérivé hydroxy-oxyformyle **15** (**Figure 107, page 187**). En effet, l'utilisation directe du polyol **C-VIII** comme produit de départ était impossible. Ceci est dû à une grande probabilité de la formation des époxydes indésirables dans le cas des composés portant les groupements hydroxyles secondaires voisins (-CH(OH)-CH(OH)-) [497, 498].

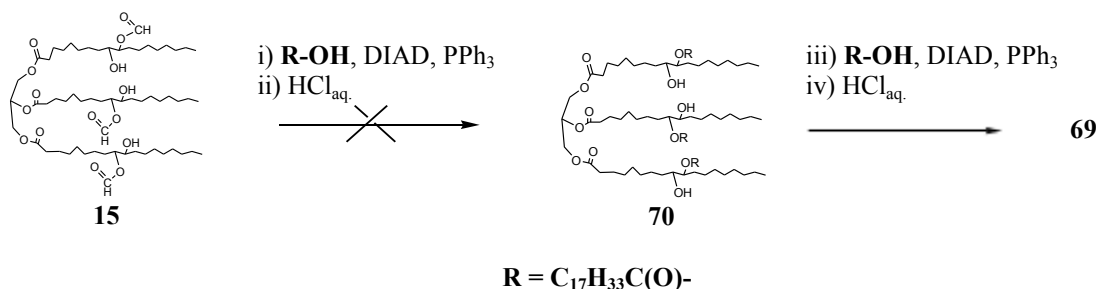


Figure 107. Schéma de greffage de l'acide oléique au cœur C-VIII par une approche multiétape basée sur la réaction de Mitsunobu.

Après déformylation avec l'acide chlorhydrique dilué (étape ii, **Figure 107, page 187**), selon le protocole général de déformylation présenté dans la section 2.2.1.2.5.3, le mélange résultant a été séparé par chromatographie sur colonne (silice, CHCl₃). La caractérisation par la RMN du proton des produits isolés a montré que la réaction d'esterification d'hydroxyles secondaires menant au dérivé **70** n'avait pas eu lieu. En particulier, aucun des spectres ne contenait à la fois les deux types des signaux caractéristiques attendus : un multiplet à 5,34 ppm appartenant aux liaisons doubles -CH=CH- et à 4,20-4,00 ppm appartenant aux esters triglycérides.

Ainsi, l'assemblage de dendrimères de type **Ib** nécessite toujours d'élaborer une méthode fiable pour greffer efficacement l'acide oléique aux hydroxyles secondaires voisins du cœur **C-VIII**. Comme raison majeure de nos nombreux échecs nous considérons les gênes stériques créés par les chaînes aliphatiques longues à la fois du substrat **C-VIII** et de l'acide oléique à greffer. Il est à noter à ce sujet qu'il existe présentement très peu de travaux sur les dendrimères faisant appel à l'estérification des alcools secondaires. De plus, dans ces travaux seuls des alcools beaucoup moins volumineux ont été utilisés, ainsi que le greffage de très petites molécules des dérivés d'acides carboxyliques a été effectué [229]. Ceci suggère que

pour réaliser efficacement la synthèse de macromolécules de type **IIb**, un greffage préliminaire de petits espaceurs hydrophobes au cœur **C-VIII** sera nécessaire.

4.4. Conclusion du chapitre

Les travaux de synthèse réalisés à l'étape de l'assemblage de macromolécules ont permis d'obtenir avec succès les dendrons de première et de deuxième génération portant les allyles comme groupements terminaux. Dans le cas du dendron de deuxième génération, la purification a été compliquée par la polymérisation spontanée du produit, ce qui est dû à la proximité de liaisons doubles et, possiblement, à la présence de certaines impuretés pouvant induire la polymérisation.

L'assemblage de dendrimères de première génération de type **Ia** par la réaction de l'esterification de Steglich était efficace seulement dans le cas de structures de cœurs **C-I** et **C-VI** présentant moins d'effets stériques. La synthèse de dendrimères de type **IIa** n'a été également possible qu'après le greffage préliminaire au cœur **C-VIII** d'un espaceur hydrophile moins volumineux, acide succinique, permettant par la suite d'éviter les problèmes de gênes stériques.

Les travaux concernant l'obtention de dendrimères de deuxième génération de type **Ib** ont montré qu'avec les structures de dendrons proposées, la stratégie divergente se caractérise par le rendement réactionnel plus grand, comparativement à la stratégie convergente. Ceci pourrait être également expliqué par l'impact important des effets stériques sur l'efficacité de l'assemblage de macromolécules.

L'assemblage de dendrimères de type **IIb** nécessite toujours d'élaborer une méthode fiable pour greffer efficacement l'acide oléique aux hydroxyles secondaires voisins du cœur **C-VIII**.

4.5. Partie expérimentale

Les détails sur les réactifs chimiques, ainsi que sur l'appareillage et les conditions des procédures des caractérisations structurales sont présentés respectivement dans les annexes 1 et 2 du présent manuscrit. Les structures chimiques sont également présentées dans l'annexe 6.

4.5.1. Synthèse et caractérisation des dendrons

4.5.1.1. Dendrons de première génération

Dendron G1 tritylé (39). Un mélange de 4,00 g (0,0106 mol) de pentaérythritol monotritylé **19**, 11,93 g (0,0357 mol) d'oxyallyl-oxysuccinyl-tétraéthylène glycol (**27**), 0,54 g ($4,42 \times 10^{-3}$ mol) de DMAP et 40 ml de chloroforme (stabilisé par amylènes) est refroidi dans un bain de glace à 0°C. Ensuite, 15,04 g (0,0784 mol) d'EDC sont ajoutés et la masse réactionnelle est maintenue sous agitation pendant 7 jours, en se réchauffant jusqu'à la température ambiante. La solution résultante est transférée sur une colonne chromatographique remplie de silice et l'élution du produit est effectuée par un mélange chloroforme-méthanol (20:1) pour donner 12,68 g d'huile claire jaunâtre. Rendement : 90%. ^1H RMN (δ , ppm; 300 MHz; CDCl_3): 7,40-7,21 (m, 15 H, C-H_{Ar}); 5,92-5,70 (m, 3 H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$); 5,34-5,13 (m, 6 H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$); 4,35-4,21 (m, 6 H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$); 4,20-4,08 (s, 6 H, $-\text{CH}_2-\text{C}(-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-)_3$); 4,08-3,91 (m, 6 H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$); 3,80-3,40 (m, 42 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$); 3,25-3,09 (s, 2 H, $\text{Ph}_3\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-$); 2,73-2,56 (m, 12 H, $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$). ^{13}C RMN (δ , ppm; 100 MHz; CDCl_3): 173,70; 172,97; 172,92; 172,63; 172,60; 172,55; 172,09; 135,60; 117,92; 73,05; 71,45; 71,39; 70,25; 65,46; 64,75; 63,86; 63,16; 63,11; 33,68; 30,23; 30,03; 29,66; 26,70; 26,53; 21,85. FTIR (ν_{min} , cm^{-1}): 3059 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{H}$ et $=\text{C}_{\text{Alk}}-\text{H}$), 2867 ($\text{C}-\text{H}_{\text{Alk}}$), 1733 ($-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$), 1646, 1597 ($-\text{C}=\text{C}-$), 1490, 1450, 1410, 1386, 1348 ($>\text{CH}_2$ et $>\text{C}_{\text{Ar}}-\text{H}$), 1248, 1210, 1145, 1103, 1033 ($\text{C}-\text{O}$), 997, 927, 859, 767, 749, 709, 702 ($\text{C}-\text{C}$), 632 ($\text{C}-\text{H}$). Analyse élémentaire (%): calculé C 62,43; H 7,44; trouvé C 61,26; H 7,37. MS (m/z): EM calculé pour $\text{C}_{69}\text{H}_{98}\text{O}_{25}$: 1327,6 $[\text{M}]^0$; trouvé en HPLC-ESI-TOF (+) : 686,3 $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$; 1106,5 $[\text{M}-\text{Ph}_3+\text{Na}]^+$; 1349,6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Dendron G1 à fonction hydroxyle (36). 8,96 g ($6,75 \times 10^{-3}$ mol) de dendron tritylé **39** sont dissous dans un mélange de 50 ml d'acide acétique et 2 ml d'acide chlorhydrique à 35%. La solution résultante est maintenue sous agitation à la température ambiante pendant 1 h.

Ensuite, le produit brut est extrait avec 50 ml d'éther diéthylique en présence de 100 ml d'une solution saturée de NaCl. Après l'évaporation de la phase organique, le produit est purifié par chromatographie sur colonne (silice; élution d'impuretés légères par chloroforme; élution du produit par CHCl₃-MeOH 5:1) pour donner 7,32 g d'huile claire jaunâtre. Rendement : 97%. ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 5,97-5,78 (m, 3 H, CH₂=CH-CH₂-); 5,35-5,11 (m, 6 H, CH₂=CH-CH₂-); 4,35-4,21 (m, 6 H, -O-CH₂-CH₂-O-C(O)-); 4,21-4,08 (s, 6 H, -CH₂-C(-CH₂-O-C(O)-)₃); 4,08-3,91 (m, 6 H, CH₂=CH-CH₂-); 4,11-4,09 (s, 1 H, -O-H); 3,80-3,56 (m, 42 H, -CH₂-CH₂-O-); 3,56-3,50 (s, 2 H, -CH₂-OH); 2,73-2,56 (m, 12 H, -C(O)-CH₂-CH₂-C(O)-). ¹³C RMN (δ, ppm; 100 MHz; CDCl₃): 172,24; 134,76; 117,1; 72,21; 70,61; 70,55; 63,96; 63,92; 62,45; 28,95; 28,83; 28,82. FTIR (ν_{min}, cm⁻¹): 3464 (O-H), 3080 (=C-H), 2868 (C-H_{Alk}), 1733 (-C(O)-O-), 1646 (-C=C-), 1455, 1411, 1387, 1348 (>CH₂), 1239, 1209, 1145, 1103, 1035 (C-O), 997, 929, 859, 755 (C-C), 640, 568, 555 (C-H). Analyse élémentaire (%): calculé C 55,34; H 7,80; trouvé C 55,50; H 7,75. MS (m/z): EM calculé pour C₅₀H₈₄O₂₅: 1084,5 [M]⁰; trouvé en HPLC-ESI-TOF (+) : 565,3 [M+2Na]²⁺; 1107,5 [M+Na]⁺.

Dendron G1 à fonction succinyle (40). Un mélange de 7,00 g (6,45×10⁻³ mol) de dendron à fonction hydroxyle **36** et de 3,23 g (32,25×10⁻³ mol) d'anhydride succinique est maintenu sous agitation à 145-150°C pendant 24 h. Après avoir amené la masse réactionnelle à la température ambiante, 50 ml d'eau sont ajoutés et le mélange est agité jusqu'à la disparition des cristaux de l'anhydride succinique. Le produit brut est extrait avec le chloroforme (2 × 50 ml) et, après l'évaporation, est purifié par chromatographie sur colonne (silice; éluant : CHCl₃-MeOH (5:1)) pour donner 6,08 g d'huile visqueuse brune. Rendement: 80%. ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 5,97-5,78 (m, 3 H, CH₂=CH-CH₂-); 5,35-5,11 (m, 6 H, CH₂=CH-CH₂-); 4,35-4,21 (m, 6 H, -O-CH₂-CH₂-O-C(O)-); 4,21-4,08 (s, 8 H, C(-CH₂-O-C(O)-)₄); 4,08-3,91 (m, 6 H, CH₂=CH-CH₂-); 3,80-3,56 (m, 42 H, -CH₂-CH₂-O-); 2,73-2,56 (m, 16 H, -C(O)-CH₂-CH₂-C(O)-). ¹³C RMN (δ, ppm; 75 MHz; CDCl₃): 173,82; 172,27; 172,10; 171,77; 171,73; 171,70; 134,71; 134,67; 117,16; 117,12; 106,07; 106,04; 77,49; 77,06; 76,64; 72,19; 70,58; 70,54; 70,51; 70,47; 69,35; 68,98; 63,90; 62,31; 41,98; 29,15; 29,13; 28,82; 28,72. FTIR (ν_{min}, cm⁻¹): 3700-3100 avec un minimum à 3472 (C(O)O-H), 3080 (=C-H), 2870 (C-H_{Alk}), 1732 (-C(O)-O-), 1646 (-C=C-), 1455, 1410, 1390, 1349 (>CH₂), 1243, 1208, 1146, 1102, 1034 (C-O), 998, 932, 859 (C-C), 638, 568, 554 (C-H). Analyse élémentaire (%): calculé C 54,72; H 7,48; trouvé C 53,95; H 7,85. MS (m/z): EM calculé pour

C₅₄H₈₈O₂₈: 1184,6 [M]⁰; trouvé en HPLC-ESI-TOF (+): 593,3 [M+2H]²⁺; 604,2 [M+Na+H]²⁺; 615,2 [M+2Na]²⁺; 1185,4 [M+H]⁺; 1207,4 [M+Na]⁺; 1230,4 [M+2Na]⁺.

Dendrons G1 à motif tétraéthylène glycol (37) et décanediol (38). Un mélange de 3,40×10⁻³ mol d'un alcool monotritylé, **17** ou **18**, 2,00 g (1,69×10⁻³ mol) de dendron à fonction succinyle **40**, 0,02 g (1,70×10⁻⁴ mol) de DMAP et 25 ml de chloroforme (stabilisé par amylènes) est refroidi dans un bain de glace à 0°C. Ensuite, 0,5 g (2,61×10⁻³ mol) d'EDC sont ajoutés et la masse réactionnelle est maintenue sous agitation pendant 7 jours, en se réchauffant jusqu'à la température ambiante. La solution résultante est évaporée sous pression réduite et ensuite dissoute dans un mélange de 30 ml d'acide acétique et 2 ml d'acide chlorhydrique à 15-17%. Après 1 h d'agitation, le produit détritylé est extrait avec 80 ml de chloroforme en présence de 100 ml de solution saturée de NaCl. Après lavage à la solution de NaCl à 5-8% (2×100 ml), la phase organique est évaporée sous vide et ensuite purifiée par chromatographie sur colonne (silice; élution d'impuretés légères par chloroforme; élution de dendrons par CHCl₃-MeOH 10:1).

Dendron 37. 1,64 g d'huile claire jaunâtre. Rendement : 72%. ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 5,92-5,70 (m, 3 H, CH₂=CH-CH₂-); 5,34-5,13 (m, 6 H, CH₂=CH-CH₂-); 4,35-4,21 (m, 8 H, -O-CH₂-CH₂-O-C(O)-); 4,20-4,08 (s, 8 H, C(-CH₂-O-C(O)-)₄); 4,08-3,91 (m, 6 H, CH₂=CH-CH₂-); 3,80-3,40 (m, 58 H, -CH₂-CH₂-O-); 2,73-2,56 (m, 16 H, -C(O)-CH₂-CH₂-C(O)-). ¹³C RMN (δ, ppm; 75 MHz; CDCl₃): 172,67; 172,42; 172,23; 172,12; 172,01; 134,60; 117,42; 73,02; 70,45; 70,39; 70,24; 69,46; 63,89; 63,36; 33,68; 30,23; 29,10; 28,96; 28,72. FTIR (ν_{min}, cm⁻¹): 3700-3000 avec un minimum à 3451 (O-H), 2873 (C-H_{Alk}), 1731 (-C(O)-O-), 1646 (-C=C-), 1454, 1389, 1349 (>CH₂), 1245, 1144, 1102, 1069, 1036 (C-O), 939, 884, 860 (C-C), 642, 577 (C-H). Analyse élémentaire (%): calculé C 54,70; H 7,70; trouvé C 53,86; H 7,39. MS (m/z): EM calculé pour C₆₂H₁₀₄O₃₂: 1360,7 [M]⁰; trouvé en HPLC-ESI-TOF (+): 681,3 [M+2H]²⁺; 692,4 [M+Na+H]²⁺; 703,5 [M+2Na]²⁺; 1361,6 [M+H]⁺; 1383,6 [M+Na]⁺.

Dendron 38. 1,91 g d'huile claire jaunâtre. Rendement : 84%. ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 5,97-5,70 (m, 3 H, CH₂=CH-CH₂-); 5,33-5,13 (m, 6 H, CH₂=CH-CH₂-); 4,35-4,21 (m, 6 H, -O-CH₂-CH₂-O-C(O)-); 4,20-4,08 (s, 8 H, C(-CH₂-O-C(O)-)₄); 4,08-3,90 (m, 6 H, CH₂=CH-CH₂-); 3,80-3,41 (m, 42 H, -CH₂-CH₂-O-); 2,73-2,56 (m, 16 H, -C(O)-CH₂-CH₂-C(O)-); 1,69-1,44 (m, 4 H, -(CH₂)_n-CH₂-O-); 1,23-1,08 (m, 16 H, -(CH₂)_n-). ¹³C RMN (δ,

ppm; 100 MHz; CDCl₃): 173,70; 172,97; 172,92; 172,63; 172,60; 172,55; 172,09; 135,60; 117,92; 73,05; 71,45; 71,39; 70,25; 65,46; 64,75; 63,88; 63,16; 63,12; 63,09; 33,60; 30,23; 30,03; 29,66; 26,70; 26,53; 21,85. FTIR (ν_{min} , cm⁻¹): 3472 (O-H), 3080 (=C-H), 2927, 2856 (C-H_{Alk}), 1734 (-C(O)-O-), 1647 (-C=C-), 1465, 1411, 1389, 1350 (>CH₂), 1237, 1208, 1147, 1036 (C-O), 999, 930, 859, 722 (C-C), 638, 606, 555 (C-H). Analyse élémentaire (%): calculé C 57,30; H 8,11; trouvé C 58,32; H 7,85. MS (m/z): EM calculé pour C₆₄H₁₀₈O₂₉: 1340,7 [M]⁰; trouvé en HPLC-ESI-TOF (+): 692,4 [M-2H+2Na]⁺; 1341,7 [M+H]⁺; 1358,7 [M-H+NH₃]⁺; 1364,7 [M-H+Na]⁺.

Dendrons G1 à motif tétraéthylène glycol (37). *Voie de synthèse 2 (section 4.2.1).* Un mélange de 2,00 g (1,69×10⁻³ mol) de dendron à fonction succinyle **40**, 8,20 g (0,042 mol) de tétraéthylène glycol, 0,02 g (1,70×10⁻⁴ mol) de DMAP et 35 ml de chloroforme (stabilisé par amylènes) est refroidi dans un bain de glace à 0°C. Ensuite, 0,5 g (2,61×10⁻³ mol) d'EDC sont ajoutés et la masse réactionnelle est maintenue sous agitation pendant 7 jours, en se réchauffant jusqu'à la température ambiante. La solution résultante est évaporée sous pression réduite et la purification finale est effectuée par chromatographie sur colonne (silice; élution d'impuretés légères par chloroforme; élution du dendron **37** par CHCl₃-MeOH 10:1) pour donner 1,91 g d'huile claire jaunâtre. Rendement : 83%. ¹H RMN (δ , ppm; 300 MHz; CDCl₃): 5,93-5,72 (m, 3 H, CH₂=CH-CH₂-); 5,35-5,14 (m, 6 H, CH₂=CH-CH₂-); 4,35-4,20 (m, 8 H, -O-CH₂-CH₂-O-C(O)-); 4,21-4,07 (s, 8 H, C(-CH₂-O-C(O)-)₄); 4,07-3,90 (m, 6 H, CH₂=CH-CH₂-); 3,81-3,39 (m, 58 H, -CH₂-CH₂-O-); 2,74-2,56 (m, 16 H, -C(O)-CH₂-CH₂-C(O)-). ¹³C RMN (δ , ppm; 75 MHz; CDCl₃): 173,61; 172,89; 172,63; 172,51; 134,60; 117,72; 73,05; 71,41; 70,45; 70,38; 70,25; 69,47; 63,86; 63,27; 63,11; 33,68; 30,22; 30,03; 28,70; 28,53; 28,35. FTIR (ν_{min} , cm⁻¹): 3700-3100 avec un minimum à 3454 (O-H), 3080 (=C-H), 2872 (C-H_{Alk}), 1733 (-C(O)-O-), 1647 (-C=C-), 1455, 1389, 1350 (>CH₂), 1246, 1145, 1103, 1071, 1038 (C-O), 939, 885, 862, 844 (C-C), 644, 580 (C-H). Analyse élémentaire (%): calculé C 54,70; H 7,70; trouvé C 54,26; H 7,89. MS (m/z): EM calculé pour C₆₂H₁₀₄O₃₂: 1360,7 [M]⁰; trouvé en HPLC-ESI-TOF (+): 681,3 [M+2H]²⁺; 692,4 [M+Na+H]²⁺; 703,5[M+2Na]²⁺; 1361,6 [M+H]⁺; 1383,6 [M+Na]⁺.

4.5.1.2. Dendron de deuxième génération

Dendrons G1 à motif disuccinyl(tétraéthylène glycol) (43). Un mélange de 2,00 g ($1,47 \times 10^{-3}$ mol) de dendron à motif tétraéthylène glycol **37** et 2,00 g (0,020 mol) d'anhydride succinique est maintenu sous agitation à 140-145°C pendant 24 h. Après avoir amené la masse réactionnelle à la température ambiante, 50 ml d'eau sont ajoutés et le mélange est agité jusqu'à la disparition des cristaux de l'anhydride succinique. Le produit brut est extrait avec le chloroforme (2 × 40 ml) et, après l'évaporation, est purifié par chromatographie sur colonne (silice; éluant : CHCl₃-MeOH (5:1)) pour donner 1,45 g d'huile visqueuse brune. Rendement: 67%. ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 5,96-5,77 (m, 3 H, CH₂=CH-CH₂-); 5,34-5,10 (m, 6 H, CH₂=CH-CH₂-); 4,36-4,20 (m, 10 H, -O-CH₂-CH₂-O-C(O)-); 4,22-4,07 (s, 8 H, C(-CH₂-O-C(O)-)₄); 4,08-3,90 (m, 6 H, CH₂=CH-CH₂-); 3,81-3,55 (m, 54 H, -CH₂-CH₂-O-); 2,74-2,55 (m, 20 H, -C(O)-CH₂-CH₂-C(O)-). ¹³C RMN (δ, ppm; 75 MHz; CDCl₃): 173,21; 172,76; 172,61; 172,11; 171,78; 171,70; 171,58; 134,72; 134,66; 134,58; 117,13; 106,06; 78,56; 77,48; 77,16; 76,69; 76,57; 70,59; 70,52; 70,47; 69,37; 69,02; 63,92; 62,37; 42,00; 29,00; 28,98; 28,81; 28,70. FTIR (ν_{min}, cm⁻¹): 3700-3300 avec un minimum à 3464 (O-H), 3080 (=C-H), 2872 (C-H_{Alk}), 1787, 1733 (-C(O)-O-), 1647 (-C=C-), 1450, 1415, 1389, 1349 (>CH₂), 1292, 1224, 1148, 1107, 1048 (C-O), 991, 931, 877, 844 (C-C), 701, 653 (C-H). Analyse élémentaire (%): calculé C 54,24; H 7,45; trouvé C 54,01; H 7,73. MS (m/z): EM calculé pour C₆₆H₁₀₈O₃₅: 1460,7 [M]⁰; trouvé en MALDI-TOF (+): 1467,6 [M+Li]⁺; 1473,7 [M+H+2Li]⁺.

Dendron G2 tritylé (44). Un mélange de 2,70 g ($1,84 \times 10^{-3}$ mol) de dendron à motif succinyl(tétraéthylène glycol) **43**, 0,208 g ($5,50 \times 10^{-4}$ mol) de pentaérythritol monotritylé **19**, 0,022 g ($1,84 \times 10^{-4}$ mol) de DMAP et 12 ml de chloroforme (stabilisé par amylènes) est refroidi dans un bain de glace à 0°C. Ensuite, 0,60 g ($3,12 \times 10^{-3}$ mol) d'EDC sont ajoutés et la masse réactionnelle est maintenue sous agitation pendant 10 jours, en se réchauffant jusqu'à la température ambiante. La solution résultante est transférée sur une colonne chromatographique remplie de silice et l'éluion du produit est effectuée par un mélange chloroforme-méthanol (4:1) pour donner 0,886 g d'huile visqueuse brune. Rendement : 34%. ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 7,38-7,17 (m, 15 H, C-H_{Ar}); 5,94-5,80 (m, 9 H, CH₂=CH-CH₂-); 5,31-5,09 (m, 18 H, CH₂=CH-CH₂-); 4,30-4,17 (m, 32 H, -O-CH₂-CH₂-O-C(O)-); 4,17-4,05 (s, 30 H, -CH₂-C(-CH₂-O-C(O)-)₃); 4,05-3,93 (m, 18 H, CH₂=CH-CH₂-);

3,74-3,42 (m, 162 H, $-CH_2-CH_2-O-$); 3,25-3,09 (s, 2 H, $Ph_3C-O-CH_2-$); 2,73-2,56 (m, 60 H, $-C(O)-CH_2-CH_2-C(O)-$). ^{13}C RMN (δ , ppm; 100 MHz; $CDCl_3$): 173,72; 172,93; 172,90; 172,65; 172,58; 172,52; 172,11; 135,61; 117,93; 73,04; 71,43; 71,37; 70,28; 65,44; 64,74; 63,85; 63,17; 63,10; 33,68; 30,23; 30,02; 29,67; 26,72; 26,54; 21,86. FTIR (ν_{min} , cm^{-1}): 3063 ($C_{Ar}-H$ et $=C_{Alk}-H$), 2867 ($C-H_{Alk}$), 1733 ($-C(O)-O-$), 1644, 1596 ($-C=C-$), 1490, 1450, 1411, 1386, 1349 ($>CH_2$ et $>C_{Ar}-H$), 1247, 1210, 1147, 1033 ($C-O$), 997, 926, 859, 766, 749, 711 ($C-C$), 635 ($C-H$). Analyse élémentaire (%): calculé C 56,62; H 7,36; trouvé C 57,26; H 7,67. MS (m/z): EM calculé pour $C_{222}H_{344}O_{106}$: 4706,2 $[M]^0$; trouvé en MALDI-TOF (+): 895,3 $[M+5Na]^{5+}$; 1199,6 $[M+4Na]^{4+}$; 1614,5 $[M+3Na]^{3+}$; 2376,0 $[M+2Na]^{2+}$; 4487,1 $[M-Ph_3+Na]^+$; 4737,1 $[M+Na]^+$; 7475,8 $[2M+2Na]^+$.

Dendron G2 à fonction hydroxyle (45). 0,400 g ($8,50 \times 10^{-5}$ mol) de dendron G2 tritylé **44** sont dissous dans un mélange de 6,0 ml d'acide acétique et 0,2 ml d'acide chlorhydrique à 35%. La solution résultante est maintenue sous agitation à la température ambiante pendant 1 h. Ensuite, le produit brut est extrait avec 30 ml d'éther diéthylique en présence de 50 ml d'une solution saturée de NaCl. Après l'évaporation de la phase organique, le produit est purifié par chromatographie sur colonne (silice; élution d'impuretés légères par chloroforme; élution du produit par $CHCl_3$ -MeOH 5:1) pour donner 0,278 g d'huile visqueuse brune. Rendement : 73%. 1H RMN (δ , ppm; 300 MHz; $CDCl_3$): 5,94-5,80 (m, 9 H, $CH_2=CH-CH_2-$); 5,31-5,09 (m, 18 H, $CH_2=CH-CH_2-$); 4,30-4,17 (m, 32 H, $-O-CH_2-CH_2-O-C(O)-$); 4,17-4,05 (s, 30 H, $-CH_2-C(-CH_2-O-C(O)-)_3$); 4,05-3,93 (m, 18 H, $CH_2=CH-CH_2-$); 3,74-3,42 (m, 162 H, $-CH_2-CH_2-O-$); 3,57-3,51 (s, 2 H, $-CH_2-OH$); 2,73-2,56 (m, 60 H, $-C(O)-CH_2-CH_2-C(O)-$). ^{13}C RMN (δ , ppm; 100 MHz; $CDCl_3$): 172,23; 134,75; 117,0; 72,19; 70,60; 70,56; 63,94; 63,91; 62,45; 28,94; 28,82; 28,81. FTIR (ν_{min} , cm^{-1}): 3460 (O-H), 3072 ($=C_{Alk}-H$), 2870 ($C-H_{Alk}$), 1731 ($-C(O)-O-$), 1643, 1596 ($-C=C-$), 1458, 1410, 1388, 1348 ($>CH_2$ et $>C_{Ar}-H$), 1245, 1209, 1144, 1103, 1033 ($C-O$), 999, 931, 859 ($C-C$), 646, 563 ($C-H$). Analyse élémentaire (%): calculé C 54,59; H 7,45; trouvé C 53,95; H 7,34. MS (m/z): EM calculé pour $C_{203}H_{330}O_{106}$: 4464,0 $[M]^0$; trouvé en MALDI-TOF: 1139,3 $[M+4Na]^{4+}$; 1511,1 $[M+3Na]^{3+}$; 2255,0 $[M+2Na]^{2+}$; 4487,1 $[M+Na]^+$.

4.5.2. Synthèse et caractérisation des dendrimères

4.5.2.1. Dendrimères de première génération

4.5.2.1.1. Dendrimères de type Ia

Dendrimère G1 polyallyle à cœur porphyrique. Un mélange de 0,100 g ($1,26 \times 10^{-4}$ mol) de dérivé tétra-mésop-carboxy-phényle de porphyrine (C-VI), 1,100 g ($1,014 \times 10^{-3}$ mol) de dendron G1 **36**, 0,020 g ($1,64 \times 10^{-4}$ mol) de DMAP et 8,0 ml de THF sec est refroidi dans un bain de glace à 0°C. Ensuite, 0,36 g ($1,88 \times 10^{-3}$ mol) d'EDC sont ajoutés et la masse réactionnelle est maintenue sous agitation pendant 12 jours, en se réchauffant jusqu'à la température ambiante. Le THF est ensuite évaporé sous pression réduite et le reste est séparé par chromatographie sur colonne (silice; élution des impuretés légères par CHCl₃-MeOH 20:1; élution du dendrimère par CHCl₃-MeOH 5:1) pour donner 0,289 g d'huile visqueuse bordeaux foncé. Rendement : 45%. ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 5,96-5,80 (m, 12 H, CH₂=CH-CH₂-); 5,34-5,12 (m, 24 H, CH₂=CH-CH₂-); 4,32-4,19 (m, 24 H, -O-CH₂-CH₂-O-C(O)-); 4,19-4,07 (s, 24 H, -CH₂-C(-CH₂-O-C(O)-)₃); 4,07-3,92 (m, 24 H, CH₂=CH-CH₂-); 3,84-3,50 (m, 168 H, -CH₂-CH₂-O- et m, 8 H, *p*-Ph-O-CH₂-); 2,93-2,51 (m, 48 H, -C(O)-CH₂-CH₂-C(O)-). ¹³C RMN (δ, ppm; 100 MHz; CDCl₃): 173,03; 172,15; 171,75; 171,74; 134,75; 134,73; 117,12; 117,09; 108,72; 106,04; 105,51; 97,88; 72,23; 72,19; 70,62; 70,58; 70,55; 69,41; 69,04; 63,93; 62,46; 28,92; 28,82. FTIR (ν_{min}, cm⁻¹): 3319 (N-H), 3072 (C_{Ar}-H et =C_{Alk}-H), 2867 (C-H_{Alk}), 1734 (-C(O)-O-), 1644, 1607 (-C=C-), 1534 (-C=N-), 1468, 1411, 1348 (>CH₂ et >C_{Ar}-H), 1252, 1210, 1144, 1099, 1036, 1009 (C-O), 994, 929, 859, 763, 736, 711 (C-C). Analyse élémentaire (%): calculé pour C₂₅₆H₃₅₄N₄O₁₀₆: C 58,35; H 7,05; N 1,11; trouvé C 57,86; H 7,37; N 0,89. UV-Vis (CHCl₃; λ_{max}, nm) : 242; 421.

Dendrimère G1 polyhydroxyle à cœur porphyrique (46). 0,200 g ($3,95 \times 10^{-5}$ mol) de dendrimère G1 polyallyle à cœur porphyrique sont solubilisés dans 2 ml de solution de 9-BBN dans le THF à 0,5 M ($1,00 \times 10^{-3}$ mol de 9-BBN) et la solution est maintenue sous agitation à la température ambiante pendant 24 h. La masse réactionnelle est par la suite refroidie dans un bain de glace à 0°C, après quoi 2,0 ml de solution de l'acétate de sodium à 3,0 M sont ajoutés goutte à goutte. Ensuite, 2,0 ml de solution de H₂O₂ à 30% sont ajoutés goutte par goutte et le mélange résultant est maintenu sous agitation pendant 24 h, en se réchauffant jusqu'à la

température ambiante. Le produit brut est extrait avec 25 ml de chloroforme en présence de 50 ml de solution saturée de NaCl. Après évaporation, le produit est purifié par chromatographie sur colonne (silice; élution des impuretés légères par acétonitrile; élution du dendrimère par CHCl₃-MeOH 5:1) pour donner 0,182 g d'huile visqueuse bordeaux foncé. Rendement : 87%. ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 4,46-4,19 (m, 24 H, -O-CH₂-CH₂-O-C(O)-); 4,19-4,07 (s, 24 H, -CH₂-C(-CH₂-O-C(O)-)₃); 3,84-3,50 (m, 216 H, -CH₂-CH₂-O- ; m, 8 H, *p*-Ph-O-CH₂- ; m, 12 H, -O-H); 2,90-2,53 (m, 48 H, -C(O)-CH₂-CH₂-C(O)-); 2,05-1,70 (m, 24 H, -CH₂-OH). ¹³C RMN (δ, ppm; 75 MHz; CDCl₃): 171,80; 164,32; 155,09; 145,74; 132,36; 131,81; 131,73; 129,71; 124,86; 118,01; 115,16; 111,61; 106,06-105,93; 103,65; 102,07; 100,47; 99,86; 99,17; 98,54; 98,44; 97,73; 95,98; 94,94; 94,59; 89,40; 77,56; 77,45; 77,35; 77,23; 77,15; 77,02; 76,89; 76,77; 76,72; 76,71; 76,60; 70,63; 70,55; 70,53; 70,48; 70,44; 70,20; 70,17; 69,01; 63,93; 63,91; 61,36; 53,43; 40,18; 31,99; 31,28; 31,01; 29,06-28,76; 24,86; 21,77. FTIR (ν_{min}, cm⁻¹): 3465 (-O-H), 2869 (C-H_{Alk}), 1731 (-C(O)-O-), 1457, 1388, 1349 (>CH₂ et >C_{Ar}-H), 1247, 1210, 1143, 1100, 1036 (C-O), 1009, 994, 929, 859, 802, (C-C). Analyse élémentaire (%): calculé C 55,96; H 7,22; N 1,06; trouvé C 55,66; H 7,64; N 0,87. UV-Vis (CHCl₃; λ_{max}, nm) : 242; 422. MS (m/z): EM calculé pour C₂₄₆H₃₇₈N₄O₁₁₈: 5276,4 [M]⁰; trouvé en MALDI-TOF (+) : 1070,1 [M+5Na]⁵⁺; 1238,1; 2136,2. GPC (standards polystyrenes; Da): 2711.

Dendrimères G1 polyallyles à cœur pentaérythritol tétrasuccinate. Un mélange de 0,020 g (3,73×10⁻⁵ mol) de pentaérythritol tétrasuccinate (C-I), de 0,300 g de dendron G1 soit **47** (2,20×10⁻⁴ mol), soit **48** (2,24 ×10⁻⁴ mol), de 0,001 g (8,20×10⁻⁶ mol) de DMAP et de 2,5 ml de chloroforme (stabilisé par amylènes) est refroidi dans un bain de glace à 0°C. Ensuite, 0,114 g (5,97×10⁻⁴ mol) d'EDC sont ajoutés et la masse réactionnelle est maintenue sous agitation pendant 12 jours, en se réchauffant jusqu'à la température ambiante. Les dendrimères sont isolés par chromatographie sur colonne (silice; élution des impuretés légères par CHCl₃-MeOH 20:1; élution du dendrimère par CHCl₃-MeOH 5:1) et séchés sous pression réduite pour donner des huiles visqueuses jaunâtres.

Dendrimère G1 polyallyle portant les espaceurs internes hydrophiles à base de tétraéthylène glycol. Rendement : 0,142 g (64%). ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 6,00-5,84 (m, 12 H, CH₂=CH-CH₂-); 5,35-5,12 (m, 24 H, CH₂=CH-CH₂-); 4,31-4,19 (m, 40 H, -O-CH₂-CH₂-O-

C(O)-); 4,21-4,09 (s, 40 H, C(-CH₂-O-C(O)-)₄); 4,11-4,00 (m, 24 H, CH₂=CH-CH₂-); 3,90-3,50 (m, 216 H, -CH₂-CH₂-O-); 2,77-2,50 (m, 80 H, -C(O)-CH₂-CH₂-C(O)-). ¹³C RMN (δ, ppm; 100 MHz; CDCl₃): 172,12; 171,75; 134,75; 117,11; 103,68; 91,10; 72,23; 70,61; 70,55; 69,41; 69,04; 63,92; 62,46; 28,82. FTIR (ν_{min}, cm⁻¹): 3074 (=C_{Alk}-H), 2869 (C-H_{Alk}), 1731 (-C(O)-O-), 1645 (-C=C-), 1454, 1411, 1388, 1348 (>CH₂), 1248, 1210, 1142, 1101, 1036 (C-O), 934, 860 (C-C). Analyse élémentaire (%): calculé pour C₂₆₉H₄₃₆O₁₄₀: C 54,67; H 7,44; trouvé : C 53,81; H 7,39.

Dendrimère G1 polyallyle portant les espaceurs internes hydrophobes à base de décanediol (64). Rendement : 0,156 g (72%). ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 5,99-5,82 (m, 12 H, CH₂=CH-CH₂-); 5,35-5,11 (m, 24 H, CH₂=CH-CH₂-); 4,31-4,20 (m, 24 H, -O-CH₂-CH₂-O-C(O)-); 4,20-4,10 (s, 40 H, C(-CH₂-O-C(O)-)₄); 4,10-4,00 (m, 24 H, CH₂=CH-CH₂-); 3,81-3,51 (m, 168 H, -CH₂-CH₂-O-); 2,78-2,52 (m, 80 H, -C(O)-CH₂-CH₂-C(O)-); 1,73-1,48 (m, 16 H, -(CH₂)₈-CH₂-O-); 1,44-1,17 (m, 64 H, -(CH₂)₈-). ¹³C RMN (δ, ppm; 100 MHz; CDCl₃): 173,72; 172,98; 172,94; 172,64; 172,61; 172,53; 172,08; 135,61; 117,93; 73,02; 71,46; 71,37; 70,26; 65,47; 64,75; 63,88; 63,18; 63,12; 63,08; 33,60; 30,24; 30,04; 29,67; 26,71; 26,54; 21,86. FTIR (ν_{min}, cm⁻¹): 3455 (eau résiduelle), 3079 (=C-H), 2927, 2866 (C-H_{Alk}), 1732 (-C(O)-O-), 1653 (-C=C-), 1456, 1411, 1389, 1350 (>CH₂), 1241, 1208, 1146, 1035 (C-O), 999, 935, 859 (C-C), 640, 568, 555 (C-H). Analyse élémentaire (%): calculé calculé pour C₂₇₇H₄₅₂O₁₂₈: C 57,06; H 7,81; trouvé C 57,86; H 7,37.

Dendrimères G1 polyhydroxyles à cœur pentaérythritol tétrasuccinate (47 et 48). 0,100 g de dendrimère polyallyle soit **47** (1,69×10⁻⁵ mol), soit **48** (1,72×10⁻⁵ mol), sont solubilisés dans 2 ml de solution de 9-BBN dans le THF à 0,5 M (1,00×10⁻³ mol de 9-BBN) et la solution est maintenue sous agitation à la température ambiante pendant 24 h. La masse réactionnelle est par la suite refroidie dans un bain de glace à 0°C, après quoi 2,0 ml de solution prérefroidie de l'acétate de sodium à 3,0 M sont ajoutés goutte à goutte. Ensuite, 2,0 ml de solution de H₂O₂ à 30% sont ajoutés goutte par goutte et le mélange résultant est maintenu sous agitation pendant 24 h, en se réchauffant jusqu'à la température ambiante. Le produit brut est extrait avec 25 ml de chloroforme en présence de 50 ml de solution saturée de NaCl. Après évaporation, le produit est purifié par chromatographie sur colonne (silice; élution des impuretés légères par

acétonitrile; élution du dendrimère par CHCl₃-MeOH 5:1) pour donner un produit sous forme d'huile visqueuse incolore.

Dendrimère G1 polyhydroxyle portant les espaceurs internes hydrophiles à base de tétraéthylène glycol (47). Rendement : 0,069 g (67%). ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 4,37-4,19 (m, 40 H, -O-CH₂-CH₂-O-C(O)-); 4,19-4,06 (s, 40 H, C(-CH₂-O-C(O)-)₄); 4,06-3,35 (m, 240 H, -CH₂-CH₂-O- et m, 12 H, -O-H); 2,82-2,51 (m, 80 H, -C(O)-CH₂-CH₂-C(O)-); 1,88-1,74 (m, 24 H, HO-CH₂-CH₂-CH₂-O-). ¹³C RMN (δ, ppm; 100 MHz; CDCl₃): 173,00; 172,75; 174,50; 172,29; 172,14; 70,52; 70,35; 70,24; 70,11; 69,40; 63,89; 63,35; 62,33; 61,42; 42,01; 36,17; 32,58; 29,38; 29,33; 29,18; 28,97; 28,91; 28,81; 28,59. FTIR (ν_{min}, cm⁻¹): 3464 (-O-H), 2920, 2868 (C-H_{Alk}), 1731 (-C(O)-O-), 1453, 1387, 1351 (>CH₂), 1242, 1212, 1144, 1101, 1034 (C-O), 1011, 996, 933, 862, 761 (C-C). Analyse élémentaire (%): calculé C 52,74; H 7,57; trouvé C 51,09; H 8,70. MS (m/z): EM calculé pour C₂₆₉H₄₆₀O₁₅₂: 6122,8 [M]⁰; trouvé en MALDI-TOF (+): 1043,5 [M+6Na]⁶⁺; 1247,6 [M+5Na]⁵⁺; 1553,7 [M+4Na]⁴⁺. GPC (standards polystyrènes; Da): 1930.

Dendrimère G1 polyhydroxyle portant les espaceurs internes hydrophobes à base de décanediol (48). Rendement : 0,089 g (85%). ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 4,36-4,20 (m, 24 H, -O-CH₂-CH₂-O-C(O)-); 4,20-4,05 (s, 40 H, C(-CH₂-O-C(O)-)₄); 4,05-3,35 (m, 216 H, -CH₂-CH₂-O- et m, 12 H, -O-H); 2,81-2,51 (m, 80 H, -C(O)-CH₂-CH₂-C(O)-); 1,87-1,75 (m, 24 H, HO-CH₂-CH₂-CH₂-O-); 1,75-1,48 (m, 16 H, -(CH₂)₈-CH₂-O-); 1,44-1,17 (m, 64 H, -(CH₂)₈-). ¹³C RMN (δ, ppm; 100 MHz; CDCl₃): 172,25; 172,16; 172,10; 70,58; 70,55; 70,47; 70,20; 70,00; 69,00; 63,92; 63,89; 62,30; 62,28; 61,40; 61,38; 42,04; 36,18; 32,74; 31,97; 29,39; 29,34; 29,19; 29,16; 29,13; 28,97; 28,96; 28,91; 28,89; 28,82; 28,56; 28,53; 28,28; 25,86; 25,83; 22,35; 21,00. FTIR (ν_{min}, cm⁻¹): 3466 (-O-H), 2924, 2861 (C-H_{Alk}), 1734 (-C(O)-O-), 1457, 1388, 1349 (>CH₂), 1241, 1210, 1145, 1099, 1036 (C-O), 1009, 994, 931, 861, 763 (C-C). Analyse élémentaire (%): calculé pour C₂₇₇H₄₇₆O₁₄₀: C 55,02; H 7,93; trouvé C 53,86; H 8,62. GPC (THF; standards polystyrènes; Da): 1726.

4.5.2.1.2. Dendrimères de type IIa

Glicéryl tris[9,10-dioxysuccinyle-octadécanoate] (55a,b). Un mélange de 0,85 g (8,61×10⁻⁴ mol) de glycéryl tris[9,10-(thréo)-dihydroxyoctadécanoate] (C-VIII), 4,00 g (4,00×10⁻² mol)

d'anhydride succinique, 0,07 g ($5,73 \times 10^{-4}$ mol) de DMAP et 10,0 ml de pyridine est maintenu sous agitation à 80°C pendant 24 h. Ensuite, la pyridine est évaporée sous vide et 20 ml d'eau sont ajoutés. Le mélange résultant est agité pendant 15 min. Le produit brut est extrait avec le chloroforme (2 × 35 ml) pour donner après séchage sous vide le produit sous forme d'huile visqueuse brunâtre.

Dérivé 55a à base de trioléine 11 standard. Rendement: 1,311 g (96%). ^1H RMN (δ , ppm; 300 MHz; CDCl_3): 5,35-5,20 (m, 1H, RO- CH_2 -C(OR)H- CH_2 -OR); 5,30 (s) et 5,20-4,82 (m) (6H, -HC(OC(O)- CH_2 - CH_2 -C(O)OH)-); 4,30-4,00 (m, 4H, RO- CH_2 -C(OR)H- CH_2 -OR); 3,05-2,50 (m, 24 H, -C(O)- CH_2 - CH_2 -C(O)-); 2,50-2,00 (m, 6H, R''OC(O)- CH_2 -R'); 1,90-1,00 (m, 6H de R''OC(O)- CH_2 - CH_2 -R', 6H de - CH_2 -HC(OC(O)- CH_2 - CH_2 -C(O)OH)- et 60H de - CH_2 -); 1,00-0,75 (m, 9H, - CH_3). ^{13}C RMN (δ , ppm; 100 MHz; CDCl_3): 173,37; 173,23; 81,02; 81,00; 68,90; 68,72; 62,13; 62,08; 60,87; 60,36; 30,00-27,80; 27,30; 26,16; 26,13; 26,00-24,83; 23,80; 22,69; 22,66; 14,11. FTIR (ν_{min} , cm^{-1}): 2924, 2854 (C-H), 1808, 1739, 1710 (-O-C(O)-), 1457, 1419, 1377, 1367 (- CH_3 et $>\text{CH}_2$), 1212 et 1159, 1098 (C-O), 732 ($>\text{CH}_2$). Analyse élémentaire (%): calculé C 61,27; H 8,51; trouvé C 60,72; H 9,01. MS (m/z): EM calculé pour $\text{C}_{81}\text{H}_{134}\text{O}_{30}$: 1586,9 $[\text{M}]^0$; trouvé en HPLC-ESI-TOF (+): 1588, 1589 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Dérivé 55b à base d'huile d'olive. Rendement: 1,213 g (89%). ^1H RMN (δ , ppm; 300 MHz; CDCl_3): 5,35-5,19 (m, 1H, RO- CH_2 -C(OR)H- CH_2 -OR); 5,30 (s) et 5,21-4,82 (m) (6H, -HC(OC(O)- CH_2 - CH_2 -C(O)OH)-); 4,31-4,00 (m, 4H, RO- CH_2 -C(OR)H- CH_2 -OR); 3,06-2,51 (m, 24 H, -C(O)- CH_2 - CH_2 -C(O)-); 2,50-2,00 (m, 6H, R''OC(O)- CH_2 -R'); 1,92-1,00 (m, 6H de R''OC(O)- CH_2 - CH_2 -R', 6H de - CH_2 -HC(OC(O)- CH_2 - CH_2 -C(O)OH)- et 60H de - CH_2 -); 1,00-0,76 (m, 9H, - CH_3). ^{13}C RMN (δ , ppm; 100 MHz; CDCl_3): 173,40; 81,00; 68,92; 68,74; 62,13; 60,87; 60,37; 30,00-27,80; 27,31; 26,16; 26,00-24,83; 23,80; 22,69; 14,12. FTIR (ν_{min} , cm^{-1}): 2923, 2854 (C-H), 1739, 1710 (-O-C(O)-), 1457, 1419, 1378, 1368 (- CH_3 et $>\text{CH}_2$), 1211 et 1157, 1098 (C-O), 732 ($>\text{CH}_2$). Analyse élémentaire (%): calculé C 61,27; H 8,51; trouvé C 64,17; H 10,35. MS (m/z): EM calculé pour $\text{C}_{81}\text{H}_{134}\text{O}_{30}$: 1586,9 $[\text{M}]^0$; trouvé en HPLC-ESI-TOF (+): 1588, 1589 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Dendrimères G1 de type IIa à motif polyéthylène glycol monosubstitué (56-58a,b). Un mélange de 0,25 g ($1,58 \times 10^{-4}$ mol) de glicéryl tris[9,10-dioxysuccinyle-octadécanoate] (**55a** ou **55b**), $1,05 \times 10^{-3}$ mol de polyéthylène glycol monosubstitué (**25**, MeO-PEG550 ou MeO-PEG1000), 0,01 g ($8,20 \times 10^{-5}$ mol) de DMAP et 7,5-8,0 ml de chloroforme (stabilisé par

amylènes) est refroidi dans un bain de glace à 0°C. Ensuite, 0,36 g ($1,88 \times 10^{-3}$ mol) d'EDC sont ajoutés et la masse réactionnelle est maintenue sous agitation pendant 10-12 jours, en se réchauffant jusqu'à la température ambiante. Les dendrimères sont isolés par chromatographie sur colonne (silice; élution des impuretés légères par CHCl₃-MeOH 20:1; élution du dendrimère par CHCl₃-MeOH 5:1) et séchés sous pression réduite pour donner des huiles visqueuses claires.

Dérivé hexa[allyl tétraéthylène glycol](56a). Rendement: 0,287 g (63%). ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 6,00-5,80 (m, 6 H, CH₂=CH-CH₂-); 5,34-5,13 (m, 12 H, CH₂=CH-CH₂-); 5,13-4,95 (m, 1 H, RO-CH₂-C(OR)H-CH₂-OR); 4,32-4,18 (m, 12 H, -O-CH₂-CH₂-O-C(O)-R' et m, 2 H de RO-CH₂-C(OR)H-CH₂-OR); 4,15-3,96 (m, 12 H de CH₂=CH-CH₂- et m, 2 H de RO-CH₂-C(OR)H-CH₂-OR); 3,82-3,49 (m, 84 H, -CH₂-CH₂-O-); 2,74-2,50 (m, 24 H, -C(O)-CH₂-CH₂-C(O)-); 2,36-2,15 (m, 6H, R''OC(O)-CH₂-R'); 1,78-1,00 (m, 6H de R''OC(O)-CH₂-CH₂-R', 6H de -CH₂-HC(OC(O)-CH₂-CH₂-C(O)O-R)- et 60H de -CH₂-); 1,00-0,77 (m, 9H, -CH₃). ¹³C RMN (δ, ppm; 100 MHz; CDCl₃): 172,17; 171,86; 136,71; 134,82; 134,76; 134,68; 117,05; 72,56; 72,21; 70,61; 70,58; 70,56; 70,30; 69,41; 69,05; 63,79; 61,72; 34,12; 32,99; 31,84; 31,80; 30,67; 29,76; 29,70-27,80; 27,31; 26,14; 25,06; 25,00-24,83; 22,62; 14,08. FTIR (ν_{min}, cm⁻¹): 3080 (=C_{Alk}-H), 2924, 2860 (C-H), 1803, 1735 (-O-C(O)-), 1646 (-C=C-), 1457, 1419, 1377 (-CH₃ et >CH₂), 1247, 1212 et 1159, 1100, 995 (C-O), 924, 879, 724 (>CH₂). Analyse élémentaire (%): calculé C 61,19; H 8,87; trouvé C 60,46; H 9,37. GPC (THF; standards polystyrènes; Da): calculé pour C₁₄₇H₂₅₄O₅₄: 2883,7; trouvé: 1824.

Dérivé hexa[méthoxy PEG550](57a). Rendement: 0,393 g (51%). ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 5,35-4,82 (m, 1H, RO-CH₂-C(OR)H-CH₂-OR et 6H, -HC(OC(O)-CH₂-CH₂-C(O)OH-); 4,40-4,00 (m, 4H, RO-CH₂-C(OR)H-CH₂-OR et m, 12 H, -O-CH₂-CH₂-O-C(O)-R'); 3,90-3,45 (m, n H, -O-CH₂-CH₂-O-); 3,45-3,30 (s, 18 H, -CH₂-O-CH₃); 2,77-2,50 (m, 24 H, -C(O)-CH₂-CH₂-C(O)-); 2,50-2,10 (m, 6H, R''OC(O)-CH₂-R'); 1,80-1,00 (m, 6H de R''OC(O)-CH₂-CH₂-R', 6H de -CH₂-HC(OC(O)-CH₂-CH₂-C(O)OR'')- et 60H de -CH₂-); 1,00-0,76 (m, 9H, -CH₃). ¹³C RMN (δ, ppm; 100 MHz; CDCl₃): 172,18; 127,08; 115,94; 72,56; 71,91; 70,04-69,06; 69,05; 63,78; 61,68; 58,01; 35,20; 31,79; 30,00-27,80; 25,03; 22,62; 15,52; 14,08. FTIR (ν_{min}, cm⁻¹): 2923, 2861 (C-H), 1735 (-O-C(O)-R), 1457, 1348 (-CH₃ et >CH₂), 1247, 1200, 1099 (C-O), 946, 851 (>CH₂). Analyse élémentaire (%): calculé

pour $C_{231}H_{434}O_{102}$ C 57,28; H 9,03; trouvé C 56,48; H 9,30. GPC (THF; standards polystyrènes; Da): calculé pour $C_{231}H_{434}O_{102}$: 4840,9; trouvé: 2630.

Dérivé hexa[méthoxy PEG550](57b). Rendement: 0,473 g (62%). 1H RMN (δ , ppm; 300 MHz; $CDCl_3$): 5,34-4,84 (m, 1H, RO- CH_2 -C(OR)H- CH_2 -OR et 6H, -HC(OC(O)- CH_2 - CH_2 -C(O)OH)-); 4,38-4,03 (m, 4H, RO- CH_2 -C(OR)H- CH_2 -OR et m, 12 H, -O- CH_2 - CH_2 -O-C(O)-R'); 3,86-3,45 (m, n H, -O- CH_2 - CH_2 -O-); 3,45-3,23 (s, 18 H, - CH_2 -O- CH_3); 2,77-2,53 (m, 24 H, -C(O)- CH_2 - CH_2 -C(O)-); 2,40-2,10 (m, 6H, R''OC(O)- CH_2 -R'); 1,80-1,00 (m, 6H de R''OC(O)- CH_2 - CH_2 -R', 6H de - CH_2 -HC(OC(O)- CH_2 - CH_2 -C(O)OR'')- et n H de - CH_2 -); 1,00-0,76 (m, 9H, - CH_3). ^{13}C RMN (δ , ppm; 100 MHz; $CDCl_3$): 173, 34, 172,10; 126,01; 113,74; 72,46; 71,40; 70,03-69,06; 69,15; 69,03; 63,78; 61,68; 60,48; 58,01; 37,59; 35,20; 31,79; 30,00-27,80; 27,30; 26,42; 25,94; 25,03; 22,70; 15,55; 14,11. FTIR (ν_{min} , cm^{-1}): 2924, 2861 (C-H), 1737 (-O-C(O)-R), 1457, 1368, 1349 (- CH_3 et $>CH_2$), 1244, 1102 (C-O), 949, 853, 724 ($>CH_2$). Analyse élémentaire (%): calculé pour $C_{231}H_{434}O_{102}$ C 57,28; H 9,03; trouvé C 58,18; H 9,63. GPC (THF; standards polystyrènes; Da): calculé pour $C_{231}H_{434}O_{102}$: 4840,9; trouvé: 2891.

Dérivé hexa[méthoxy PEG1000](58a). Rendement: 0,505 g (43%). 1H RMN (δ , ppm; 300 MHz; $CDCl_3$): 5,37-5,10 (s, 6H, -HC(OC(O)- CH_2 - CH_2 -C(O)OR)-); 5,05-4,92 (m, 1H, RO- CH_2 -C(OR)H- CH_2 -OR); 4,38-4,00 (m, 4H, RO- CH_2 -C(OR)H- CH_2 -OR et m, 12 H, -O- CH_2 - CH_2 -O-C(O)-R'); 3,84-3,45 (m, n H, -O- CH_2 - CH_2 -O-); 3,45-3,30 (s, 18 H, - CH_2 -O- CH_3); 2,75-2,59 (m, 24 H, -C(O)- CH_2 - CH_2 -C(O)-); 2,50-2,20 (m, 6 H, R''OC(O)- CH_2 -R'); 1,75-1,00 (m, 6 H de R''OC(O)- CH_2 - CH_2 -R', 6 H de - CH_2 -HC(OC(O)- CH_2 - CH_2 -C(O)OR'')- et n H de - CH_2 -); 1,00-0,76 (m, 9H, - CH_3). ^{13}C RMN (δ , ppm; 100 MHz; $CDCl_3$): 174,43; 172,87; 131,36; 120,51; 72,56; 71,91; 70,04-69,06; 69,05; 65,06; 61,72; 53,07; 35,41; 31,79; 30,00-27,80; 25,13; 23,01; 15,52. FTIR (ν_{min} , cm^{-1}): 2883, 2741 (C-H), 1735 (-O-C(O)-R), 1466, 1359, 1342 (- CH_3 et $>CH_2$), 1279, 1240, 1147, 1105, 1061 (C-O), 958, 841, 732 ($>CH_2$). Analyse élémentaire (%): calculé C 56,31; H 9,07; trouvé C 54,98; H 10,13. GPC (THF; standards polystyrènes; Da): calculé pour $C_{351}H_{674}O_{162}$: 7482,5; trouvé: 4491.

Dérivé hexa[méthoxy PEG1000](58b). Rendement: 0,569 g (48%). 1H RMN (δ , ppm; 300 MHz; $CDCl_3$): 5,37-5,20 (s, 6H, -HC(OC(O)- CH_2 - CH_2 -C(O)OR)-); 5,06-5,00 (m, 1H, RO- CH_2 -C(OR)H- CH_2 -OR); 4,40-4,00 (m, 4H, RO- CH_2 -C(OR)H- CH_2 -OR et m, 12 H, -O- CH_2 -

$\text{CH}_2\text{-O-C(O)-R}'$); 4,00-3,45 (m, n H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$); 3,45-3,30 (s, 18 H, $-\text{CH}_2\text{-O-CH}_3$); 2,91-2,62 (m, 24 H, $-\text{C(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-}$); 2,42-2,27 (m, 6 H, $\text{R}''\text{OC(O)-CH}_2\text{-R}'$); 1,80-1,00 (m, 6 H de $\text{R}''\text{OC(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-R}'$, 6 H de $-\text{CH}_2\text{-HC(OC(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)OR}''$)- et n H de $-\text{CH}_2\text{-}$); 1,00-0,75 (m, 9H, $-\text{CH}_3$). ^{13}C RMN (δ , ppm; 100 MHz; CDCl_3): 174,31; 129,15; 125,39; 120,50; 72,56; 71,93; 70,04-69,06; 65,61; 61,72; 59,03; 48,92; 48,20; 47,84; 30,00-27,80; 25,13; 15,41. FTIR (ν_{min} , cm^{-1}): 2884, 2741 (C-H), 1735 ($-\text{O-C(O)-R}$), 1466, 1359, 1342 ($-\text{CH}_3$ et $>\text{CH}_2$), 1279, 1241, 1144, 1107, 1061 (C-O), 960, 841, 731 ($>\text{CH}_2$). Analyse élémentaire (%): calculé C 56,31; H 9,07; trouvé C 57,04; H 9,43. GPC (THF; standards polystyrènes; Da): calculé pour $\text{C}_{351}\text{H}_{674}\text{O}_{162}$ 7482,5; trouvé 4593.

Dendrimère G1 de type IIa polyxydroxyle (59). 0,230 g ($7,98 \times 10^{-5}$ mol) de dendrimère G1 polyallyle **56a** solubilisés dans 2 ml de solution de 9-BBN dans le THF à 0,5 M ($1,00 \times 10^{-3}$ mol de 9-BBN) et la solution est maintenue sous agitation à la température ambiante pendant 24 h. La masse réactionnelle est par la suite refroidie dans un bain de glace à 0°C , après quoi 2,0 ml de solution de l'acétate de sodium à 3,0 M sont ajoutés goutte à goutte. Ensuite, 2,0 ml de solution de H_2O_2 à 30% sont ajoutés goutte par goutte et le mélange résultant est maintenu sous agitation pendant 24 h, en se réchauffant jusqu'à la température ambiante. Le produit brut est extrait avec 25 ml de chloroforme en présence de 50 ml de solution saturée de NaCl. Après évaporation, le produit est purifié par chromatographie sur colonne (silice; élution des impuretés légères par acétonitrile; élution du dendrimère par $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ 5:1) pour donner 0,161 g d'huile visqueuse jaunâtre. Rendement : 67%. ^1H RMN (δ , ppm; 300 MHz; CDCl_3): 5,13-4,90 (m, 1 H, $\text{RO-CH}_2\text{-C(OR)H-CH}_2\text{-OR}$); 4,37-4,06 (m, 12 H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-C(O)-}$ et m, 2 H de $\text{RO-CH}_2\text{-C(OR)H-CH}_2\text{-OR}$); 3,92-3,30 (m, 84 H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$ et m, 12 H, $-\text{O-H}$); 2,74-2,50 (m, 24 H, $-\text{C(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-}$); 2,38-2,14 (m, 6H, $\text{R}''\text{OC(O)-CH}_2\text{-R}'$); 2,05-1,70 (m, 12 H, $-\text{CH}_2\text{-OH}$); 1,70-1,00 (m, 6H de $\text{R}''\text{OC(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-R}'$, 6H de $-\text{CH}_2\text{-HC(OC(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)O-R}$)- et 60H de $-\text{CH}_2\text{-}$); 0,97-0,78 (m, 9H, $-\text{CH}_3$). ^{13}C RMN (δ , ppm; 100 MHz; CDCl_3): 172,28; 171,84; 115,75; 113,70; 72,67; 70,66; 70,60-69,05; 63,79; 61,41; 61,27; 60,92; 60,67; 36,29; 35,48; 31,97; 29,70-28,80; 27,28; 25,05; 22,62; 22,35; 20,07; 18,86; 14,09. FTIR (ν_{min} , cm^{-1}): 3371 ($-\text{O-H}$), 2922, 2860, (C-H_{Alk}), 1734 ($-\text{C(O)-O-}$), 1448, 1349 ($>\text{CH}_2$), 1256, 1096 (C-O), 1008, 958, 882, 802 (C-C). Analyse élémentaire (%): calculé C 58,98; H 8,96; trouvé C 59,87; H 10,35. GPC (THF; standards polystyrènes; Da): calculé pour $\text{C}_{147}\text{H}_{266}\text{O}_{60}$: 2991,8; trouvé: 994.

4.5.2.2. Dendrimères de deuxième génération

4.5.2.2.1. Dendrimères de type Ib

Dendrimère G2 polyallyle à cœur porphyrique (60). Un mélange de 0,410 g ($9,18 \times 10^{-5}$ mol) de dendron G2 **45**, 0,017 g ($2,19 \times 10^{-5}$ mol) de dérivé tétra-mésop-carboxy-phényle de porphyrine (**C-VI**), 0,005 g ($4,07 \times 10^{-5}$ mol) de DMAP et 4,5 ml de THF sec est refroidi dans un bain de glace à 0°C. Ensuite, 0,30 g ($1,56 \times 10^{-3}$ mol) d'EDC sont ajoutés et la masse réactionnelle est maintenue sous agitation pendant 15 jours, en se réchauffant jusqu'à la température ambiante. Le THF est ensuite évaporé sous pression réduite et le reste est séparé par chromatographie sur colonne (silice; élution des impuretés légères par CHCl₃-MeOH 20:1; élution du dendrimère par CHCl₃-MeOH 5:1) pour donner 0,026 g d'huile visqueuse bordeaux foncé. Rendement : 6%. ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 5,96-5,79 (m, 36 H, CH₂=CH-CH₂-); 5,32-5,10 (m, 72 H, CH₂=CH-CH₂-); 4,51-4,16 (m, 120 H, -O-CH₂-CH₂-O-C(O)-); 4,16-4,07 (m, 24 H, -CH₂-C(-CH₂-O-C(O)-)₃ et 96 H, C(-CH₂-O-C(O)-)₄); 4,07-3,92 (m, 72 H, CH₂=CH-CH₂-); 3,80-3,47 (m, 648 H, -CH₂-CH₂-O- et m, 8 H, *p*-Ph-O-CH₂-); 2,80-2,50 (m, 240 H, -C(O)-CH₂-CH₂-C(O)-). ¹³C RMN (δ, ppm; 100 MHz; CDCl₃): 173,01; 172,25; 172,11; 171,75; 134,75; 134,72; 117,11; 117,04; 108,60; 106,00; 98,01; 72,24; 72,21; 70,64; 70,60; 70,54; 69,37; 69,01; 63,91; 62,46; 28,93; 28,82; 28,79. FTIR (ν_{min}, cm⁻¹): 3073 (C_{Ar}-H et =C_{Alk}-H), 2866 (C-H_{Alk}), 1734 (-C(O)-O-), 1642, 1603 (-C=C-), 1532 (-C=N-), 1468, 1348 (>CH₂ et >C_{Ar}-H), 1252, 1210, 1102, 1033 (C-O), 1009, 996, 859, 764, 736, 711 (C-C). Analyse élémentaire (%): calculé pour C₈₈₄H₁₃₉₀N₄O₄₄₀: C 55,55; H 7,33; N 0,29; trouvé C 57,02; H 7,76; N 0,17. UV-Vis (CHCl₃; λ_{max}, nm) : 242; 422.

Dendrimère G2 polyhydroxyle à cœur porphyrique (61). 0,020 g ($1,05 \times 10^{-6}$ mol) de dendrimère G2 polyallyle à cœur porphyrique (**60**) sont solubilisés dans 1,0 ml de solution de 9-BBN dans le THF à 0,5 M ($0,50 \times 10^{-3}$ mol de 9-BBN) et le mélange est maintenu sous agitation à la température ambiante pendant 24 h. La masse réactionnelle est par la suite refroidie dans un bain de glace à 0°C, après quoi 1,0 ml de solution de l'acétate de sodium à 3,0 M est ajouté goutte à goutte. Ensuite, 1,0 ml de solution de H₂O₂ à 30% est ajouté goutte par goutte et le mélange résultant est maintenu sous agitation pendant 24 h, en se réchauffant jusqu'à la température ambiante. Le produit brut est extrait avec 10 ml de chloroforme en présence de 25 ml de solution saturée de NaCl. Après évaporation, le produit représente une

huile visqueuse bordeaux foncé. Rendement : 0,020 g (96%). ^1H RMN (δ , ppm; 300 MHz; CDCl_3): 4,46-4,19 (m, 120 H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$); 4,16-4,07 (m, 24 H, $-\text{CH}_2-\text{C}(-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-)_3$ et 96 H, $\text{C}(-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-)_4$); 3,91-3,46 (m, 720 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$; m, 8 H, p -Ph-O- CH_2- ; m, 36 H, $-\text{O}-\text{H}$); 2,90-2,53 (m, 240 H, $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$); 2,05-1,70 (m, 72 H, $-\text{CH}_2-\text{OH}$). ^{13}C RMN (δ , ppm; 75 MHz; CDCl_3): 173,00; 172,47; 171,83; 164,30; 132,38; 131,91; 124,42; 118,01; 111,61; 106,21-105,92; 103,64; 102,00; 100,44; 98,90; 98,81; 95,98; 94,79; 89,40; 77,60; 77,30; 77,01; 76,89; 76,56; 70,63; 70,55; 70,43; 70,20; 69,01; 63,92; 61,35; 53,42; 40,18; 32,01; 31,01; 29,06-28,76; 25,54; 24,84; 22,02. FTIR (ν_{min} , cm^{-1}): 3460 ($-\text{O}-\text{H}$), 2869 ($\text{C}-\text{H}_{\text{Alk}}$), 1733 ($-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$), 1454, 1392, 1351 ($>\text{CH}_2$ et $>\text{C}_{\text{Ar}}-\text{H}$), 1247, 1210, 1144, 1098, 1034 ($\text{C}-\text{O}$), 1009, 993, 930, 857 ($\text{C}-\text{C}$). Analyse élémentaire (%): calculé C 53,72; H 7,46; N 0,28; trouvé C 55,86; H 8,27; N 0,10. UV-Vis (CHCl_3 ; λ_{max} , nm) : 242; 422. MS (m/z): EM calculé pour $\text{C}_{884}\text{H}_{1462}\text{N}_4\text{O}_{476}$: 19751,0 [M] 0 ; trouvé en MALDI-TOF (+) : 1103,9; 1131,9; 1189,9; 1217,9; 1248,0; 1322,0; 1380,0; 1408,0; 1438,1; 1598,1; 1684,2; 1880,0; 1963,0.

Dendrimère G2 polyallyle à cœur porphyrrique (62). Un mélange de 0,110 g ($2,08 \times 10^{-5}$ mol) de dendrimère G1 polyhydroxyle **46**, 0,296 g ($2,50 \times 10^{-4}$ mol) de dendron G1 à fonction succinyle **40**, 0,005 g ($4,07 \times 10^{-5}$ mol) de DMAP et 3,5 ml de chloroforme stabilisé par amyloènes est refroidi dans un bain de glace à 0°C. Ensuite, 0,144 g ($7,49 \times 10^{-4}$ mol) d'EDC sont ajoutés et la masse réactionnelle est maintenue sous agitation pendant 11 jours, en se réchauffant jusqu'à la température ambiante. Le produit est isolé par chromatographie sur colonne (silice; élution des impuretés légères par CHCl_3 -MeOH 20:1; élution du dendrimère par CHCl_3 -MeOH 5:1) pour donner 0,057 g d'huile visqueuse bordeaux foncé. Rendement : 14%. ^1H RMN (δ , ppm; 300 MHz; CDCl_3): 5,93-5,80 (m, 36 H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$); 5,34-5,11 (m, 72 H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$); 4,53-4,14 (m, 120 H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$); 4,14-4,07 (m, 24 H, $-\text{CH}_2-\text{C}(-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-)_3$ et 96 H, $\text{C}(-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-)_4$); 4,07-3,95 (m, 72 H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$); 3,82-3,46 (m, 696 H, $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ et m, 8 H, p -Ph-O- CH_2-); 2,82-2,49 (m, 240 H, $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$); 2,00-1,60 (m, 24 H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$). ^{13}C RMN (δ , ppm; 100 MHz; CDCl_3): 172,95; 172,71; 134,74; 117,09; 108,60; 106,04; 98,00; 72,22; 70,62; 70,59; 70,54; 69,40; 69,02; 63,92; 62,46; 28,90; 28,81. FTIR (ν_{min} , cm^{-1}): 3067 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{H}$ et $=\text{C}_{\text{Alk}}-\text{H}$), 2865 ($\text{C}-\text{H}_{\text{Alk}}$), 1733 ($-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$), 1641, 1603 ($-\text{C}=\text{C}-$), 1533 ($-\text{C}=\text{N}-$), 1469, 1348 ($>\text{CH}_2$ et $>\text{C}_{\text{Ar}}-\text{H}$), 1250, 1211, 1099, 1035 ($\text{C}-\text{O}$), 1009, 996, 859, 765, 713 ($\text{C}-\text{C}$). Analyse élémentaire (%):

calculé pour C₈₉₆H₁₄₁₄N₄O₄₄₀: C 55,81; H 7,39; N 0,29; trouvé C 57,06; H 7,83; N 0,13. UV-Vis (CHCl₃; λ_{max}, nm) : 242; 421.

Dendrimère G2 polyhydroxyle à cœur porphyrrique (63). 0,040 g (2,08×10⁻⁶ mol) de dendrimère G2 polyallyle à cœur porphyrrique (61) sont solubilisés dans 2,0 ml de solution de 9-BBN dans le THF à 0,5 M (1,00×10⁻³ mol de 9-BBN) et le mélange est maintenu sous agitation à la température ambiante pendant 24 h. La masse réactionnelle est par la suite refroidie dans un bain de glace à 0°C, après quoi 2,0 ml de solution de l'acétate de sodium à 3,0 M est ajouté goutte à goutte. Ensuite, 2,0 ml de solution de H₂O₂ à 30% est ajouté goutte par goutte et le mélange résultant est maintenu sous agitation pendant 24 h, en se réchauffant jusqu'à la température ambiante. Le produit brut est extrait avec 20 ml de chloroforme en présence de 50 ml de solution saturée de NaCl. Après évaporation, le produit représente une huile visqueuse bordeaux foncé. Rendement : 0,038 g (92%). ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 4,51-4,15 (m, 120 H, -CH₂-CH₂-O-C(O)-); 4,15-4,06 (m, 24 H, -CH₂-C(-CH₂-O-C(O)-)₃ et 96 H, C(-CH₂-O-C(O)-)₄); 4,06-3,94 (m, 72 H, CH₂=CH-CH₂-); 3,81-3,47 (m, 720 H, -CH₂-O-CH₂- et m, 8 H, *p*-Ph-O-CH₂-); 2,81-2,47 (m, 240 H, -C(O)-CH₂-CH₂-C(O)-); 2,11-1,60 (m, 72 H, -CH₂-OH et m, 24 H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-O-). ¹³C RMN (δ, ppm; 100 MHz; CDCl₃): ¹³C RMN (δ, ppm; 75 MHz; CDCl₃): 172,73; 172,64; 171,73; 164,27; 132,27; 131,95; 124,13; 117,95; 111,56; 106,24-105,90; 103,56; 102,03; 101,04; 98,94; 95,01; 89,36; 77,59; 77,31; 77,03; 76,93; 76,85; 76,56; 70,61; 70,27; 68,81; 63,91; 61,34; 53,40; 40,15; 32,01; 31,56; 31,01; 29,00-28,74; 25,47; 24,81; 22,00; 21,68. FTIR (ν_{min}, cm⁻¹): 3465 (-O-H), 2870 (C-H_{Alk}), 1734 (-C(O)-O-), 1453, 1391, 1349 (>CH₂ et >C_{Ar}-H), 1248, 1210, 1143, 1100, 1033 (C-O), 1008, 996, 932, 882, 858 (C-C). Analyse élémentaire (%): calculé C 53,99; H 7,51; N 0,28; trouvé C 51,76; H 8,03; N 0,08. UV-Vis (CHCl₃; λ_{max}, nm) : 242; 421. MS (m/z): EM calculé pour C₈₉₆H₁₄₈₆N₄O₄₇₆: 19919,2 [M]⁰; trouvé en MALDI-TOF (+) : 1140,0; 1249,9; 1364,0; 1520,2; 1624,0; 1878,0; 1993,1.

Dendrimère G2 polyallyle à cœur pentaérythritol tétrasuccinate (65). Un mélange de 0,301 g (4,98×10⁻⁵ mol) de dendrimère G1 polyhydroxyle **48**, 0,813 g (6,86×10⁻⁴ mol) de dendron G1 à fonction succinyle **40**, 0,010 g (8,14×10⁻⁵ mol) de DMAP et 4,5 ml de chloroforme stabilisé par amylènes est refroidi dans un bain de glace à 0°C. Ensuite, 0,311 g (1,62×10⁻³ mol) d'EDC sont ajoutés et la masse réactionnelle est maintenue sous agitation pendant 9 jours, en se

réchauffant jusqu'à la température ambiante. Le produit est isolé par chromatographie sur colonne (silice; élution des impuretés légères par l'acétonitrile; élution du dendrimère par CHCl₃-MeOH 5:1) pour donner 0,421 g d'huile visqueuse brunâtre. Rendement : 42%. ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 6,00-5,83 (m, 36 H, CH₂=CH-CH₂-); 5,33-5,13 (m, 72 H, CH₂=CH-CH₂-); 4,36-4,20 (m, 136 H, -CH₂-CH₂-O-C(O)-); 4,20-4,10 (m, 136 H, C(-CH₂-O-C(O)-)₄); 4,10-4,00 (m, 72 H, CH₂=CH-CH₂-); 3,79-3,50 (m, 696 H, -CH₂-O-CH₂-); 2,76-2,51 (m, 272 H, -C(O)-CH₂-CH₂-C(O)-); 2,00-1,50 (m, 64 H, -CH₂-CH₂-O-C(O)-); 1,42-1,18 (s, 48 H, (-CH₂-)_n). ¹³C RMN (δ, ppm; 75 MHz; CDCl₃): 172,09; 172,06; 171,17; 134,72; 117,09; 77,49; 77,07; 76,64; 72,19; 70,58; 70,52; 70,46; 69,39; 69,00; 63,89; 62,26; 42,02; 28,80; 25,86; 25,83; 21,00. FTIR (ν_{min}, cm⁻¹): 3458 (eau résiduelle), 3081 (=C-H), 2926, 2866 (C-H_{Alk}), 1734 (-C(O)-O-), 1654 (-C=C-), 1457, 1411, 1391, 1349 (>CH₂), 1239, 1207, 1147, 1034 (C-O), 1001, 981, 936, 859 (C-C), 642, 569 (C-H). Analyse élémentaire (%): calculé pour C₉₂₅H₁₅₀₈O₄₆₃: C 55,45; H 7,59; trouvé C 53,01; H 8,63.

Dendrimère G2 polyhydroxyle à cœur pentaérythritol tétrasuccinate (64). 0,250 g (1,25×10⁻⁵ mol) de dendrimère G2 polyallyle **65** sont solubilisés dans 3,0 ml de solution de 9-BBN dans le THF à 0,5 M (1,50×10⁻³ mol de 9-BBN) et le mélange est maintenu sous agitation à la température ambiante pendant 24 h. La masse réactionnelle est par la suite refroidie dans un bain de glace à 0°C, après quoi 3,0 ml de solution de l'acétate de sodium à 3,0 M est ajouté goutte à goutte. Ensuite, 3,0 ml de solution de H₂O₂ à 30% est ajouté goutte par goutte et le mélange résultant est maintenu sous agitation pendant 24 h, en se réchauffant jusqu'à la température ambiante. Le produit brut est extrait avec 20 ml de chloroforme en présence de 50 ml de solution saturée de NaCl. Après évaporation, le produit est purifié par chromatographie sur colonne (silice; élution des impuretés légères par acétonitrile; élution du dendrimère par CHCl₃-MeOH 3:1) pour donner 0,072 g d'huile visqueuse incolore. Rendement : 28%. ¹H RMN (δ, ppm; 300 MHz; CDCl₃): 4,35-4,20 (m, 136 H, -O-CH₂-CH₂-O-C(O)-); 4,20-4,01 (m, 136 H, C(-CH₂-O-C(O)-)₄); 3,96-3,25 (m, 768 H, -CH₂-O-CH₂- et m, 36 H, -O-H); 2,74-2,51 (m, 272 H, -C(O)-CH₂-CH₂-C(O)-); 1,98-1,43 (m, 64 H, -CH₂-CH₂-O-C(O)-); 1,39-1,08 (s, 48 H, (-CH₂-)_n). ¹³C RMN (δ, ppm; 75 MHz; CDCl₃): 172,10; 171,76; 171,72; 144,14; 142,13; 110,01; 77,58; 77,08; 70,07-70,00; 69,01; 63,87; 62,25; 61,35; 42,02; 36,31; 36,17; 31,97; 29,45-28,20; 25,86; 25,82; 25,03; 23,51; 22,34; 21,00; 20,05. FTIR (ν_{min}, cm⁻¹): 3451 (O-H), 2923, 2866 (C-H_{Alk}), 1732 (-C(O)-O-), 1455, 1411, 1389, 1350 (>CH₂), 1242, 1209, 1146,

1035 (C-O), 1000, 935, 860 (C-C), 729, 645, 568, 555 (C-H). Analyse élémentaire (%):
calculé pour $C_{925}H_{1580}O_{499}$: C 53,71; H 7,70; trouvé C 50,11; H 8,35.

Chapitre 5. Tests d'encapsulation de l'itraconazole *in vitro*

Les produits dendritiques obtenus ont été étudiés sur le plan de l'efficacité d'encapsulation de l'ITZ. Cette étape du travail avait pour but principal d'élucider l'influence de la nature de la partie centrale de macromolécules sur le processus de captation de l'ITZ, en mettant ainsi en évidence la possible cohérence ou incohérence avec les résultats obtenus par simulation *in silico* (chapitre 3). D'une manière générale, les expériences réalisées peuvent être divisées en deux parties : (i) tests d'efficacité d'encapsulation de l'ITZ, (ii) la mesure de la taille de particules dans les solutions avant et après la procédure d'encapsulation du PA, dont les résultats et leur interprétation seront présentés dans les sections suivantes.

5.1. Tests d'encapsulation de l'itraconazole

La procédure générale (voir la description détaillée dans l'annexe 3) de tests d'encapsulation de l'ITZ consistait à préparer les échantillons et ensuite à effectuer la quantification du PA par la méthode de chromatographie liquide de haute performance (HPLC). À cette fin, l'ITZ en excès et un dendrimère à tester ont été d'abord solubilisés dans le dichlorométhane. Ensuite, le solvant a été évaporé sous vide et le résidu sec a été extrait par de l'eau. La suspension obtenue a été filtrée pour enlever le PA non solubilisé. Finalement, le filtrat a été analysé pour la teneur en ITZ par HPLC, en se basant sur les données de la courbe de calibration obtenue avec le PA pur. Les taux d'encapsulation du PA en fonction de la structure dendritique sont présentés dans le **tableau 6, page 210**.

Dans le cas de dendrimères de première génération, en particulier **46-48** et **59**, les résultats de tests d'encapsulation sont généralement en concordance avec les résultats de simulation présentés dans le chapitre 3. En effet, les taux d'encapsulation moyens augmentent avec la souplesse de la partie centrale hydrophobe de dendrimères, ce qui était également conclu, en se basant sur les valeurs de l'énergie stérique obtenues en option « boîte périodique d'eau » avec les procédures de dynamique moléculaire (**Tableau 5, page 154**). Ainsi, les données suggèrent collectivement que la présence dans les molécules de type **II** (structure **59**) des chaînes hydrophobes libres offre une possibilité au vecteur de s'organiser d'une manière plus efficace autour d'une molécule hydrophobe à encapsuler (**Figure 108, page 210**), car, dans ce cas, les taux d'encapsulation sont les plus grands.

Tableau 6. Taux d'encapsulation de l'itraconazole en fonction de la structure dendritique

Génération de dendrimère	Type de dendrimère	Produit dendritique*	Taux d'encapsulation du PA, % _{mol/mol}	Taux d'encapsulation du PA, % _{p/p}
G1	Ia	46	10,92 ± 1,79	1,46 ± 0,24
		47	1,79 ± 0,30	0,21 ± 0,04
		48	20,55 ± 3,34	2,40 ± 0,39
	IIa	57a	4,73 ± 1,58	0,69 ± 0,23
		57b	7,31 ± 1,96	1,07 ± 0,29
		58a	43,58 ± 7,42	4,11 ± 0,70
		58b	15,22 ± 0,27	1,44 ± 0,03
G2	Ib	59	27,45 ± 5,36	6,48 ± 1,27
		63	17,07 ± 4,76	0,61 ± 0,17
		64	65,77 ± 6,30	2,25 ± 0,22

* Voir les structures chimiques complètes dans l'annexe 6.

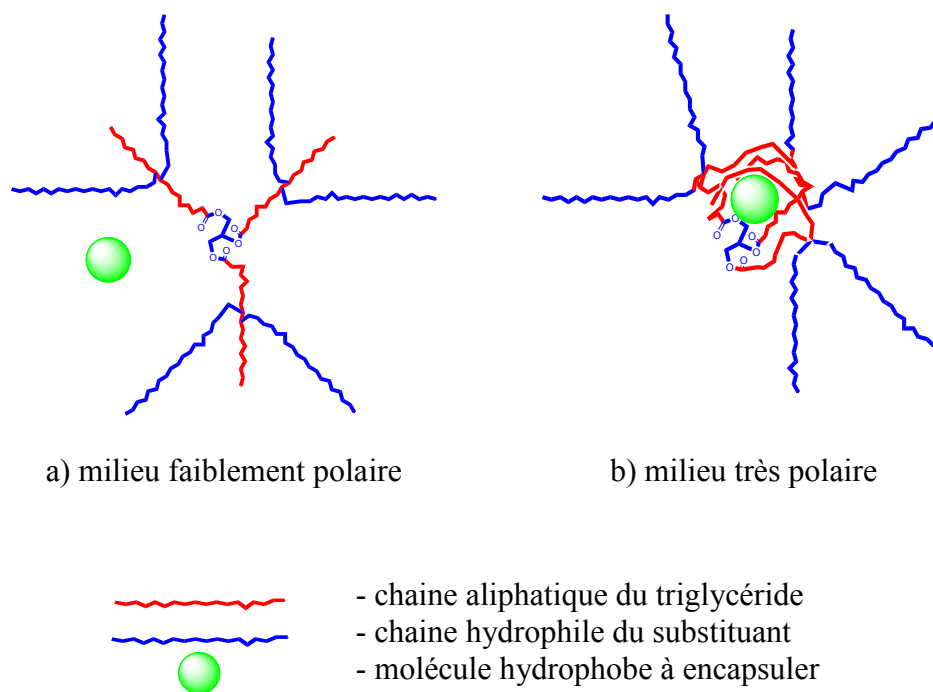


Figure 108. Représentation schématique du mécanisme d'encapsulation d'une petite molécule hydrophobe par un dendrimère de type IIa, par le repliement efficace de chaînes hydrophobe libre autour du PA.

L'influence de la longueur des chaînes PEG externes sur l'encapsulation de l'ITZ a été évaluée en se basant sur les résultats obtenus pour les structures **57-59** de type **IIa** (**Tableau 6, page 210**). Les données montrent que le taux d'encapsulation massique monte avec l'augmentation de la longueur PEG, tandis que le taux d'encapsulation molaire passe par le maximum à 43,6%_{mol/mol} dans le cas du PEG550. Étant donné que le taux d'encapsulation molaire permet d'évaluer le ratio « vecteur-PA » dans la formulation, on peut conclure qu'aucun des produits n'est capable à former des nanocapsules unimoléculaires, car les valeurs sont toujours < 100%_{mol(ITZ)/mol(Den)}. Ainsi, il s'agit plutôt de la formation des micelles multimoléculaires à base du vecteur, ce qui est également confirmé par les mesures DLS (voir la section 5.2). Dans ce contexte, la diminution de taux d'encapsulation molaire avec l'augmentation de la longueur de chaîne PEG de 550 à 1000 Da, pourrait être expliquée par l'organisation spécifique micellaire, dont l'architecture est probablement plus efficace au niveau de captation de l'ITZ dans le cas de chaînes PEG plus courtes.

La comparaison des résultats obtenus pour les structures de première génération, **46** et **48** de type **Ia**, et celles de deuxième génération, respectivement, **63** et **64** de type **Ib**, montre que les dendrimères de plus grande génération sont caractérisés par les taux d'encapsulation molaires de l'ITZ plus élevés. Ceci est probablement dû à des interactions plus fortes entre le vecteur et le PA avec l'augmentation de la surface moléculaire dendritique. Il est également à noter que dans le cas de ces dendrimères, la souplesse de la partie centrale de macromolécules représente un facteur favorisant l'encapsulation de l'ITZ. En effet, la présence des chaînes DD hydrophobes et flexibles dans les structures **48** et **64** amène à de meilleurs résultats comparativement aux dérivés porphyriques, **63** et **64**, et ce malgré l'impact croissant du volume de dendrons sur la rétention du PA par les effets stériques avec la montée en génération.

En conclusion, les taux d'encapsulation de l'ITZ pour les dendrimères étudiés sont relativement faibles. En effet, les valeurs moyennes observées ne dépassent pas 6,5%_{mass}, ce qui est inférieur aux valeurs rapportées pour d'autres nanoformulations du PA, p.ex. 12,7-14,2% [340]. Ceci suggère que l'efficacité d'encapsulation du PA, déterminée grandement par les interactions physico-chimiques entre les structures dendritiques proposées et l'ITZ, reste assez faible et nécessite une optimisation ultérieure au niveau structural de macromolécules.

5.2. Mesure de la taille par la technique DLS

En parallèle de nos tests de quantification de l'ITZ encapsulé dans les dendrimères, les mesures de la taille de micelles qui se formaient dans la solution aqueuse, avant et après l'encapsulation du PA, ont été également effectuées par la technique DLS. Dans la majorité des cas, il s'agit de plusieurs (généralement, deux) populations des particules détectées. Les rayons hydrodynamiques et les pourcentages des particules représentées par le pic principal, ainsi que l'indice de polydispersité moyen des micelles avant et après l'encapsulation de l'itraconazole sont présentés dans le **tableau 7 (page 212)**. Dans le cas des particules non chargées, le nombre de populations peut atteindre trois, avec l'aire totale des pics mineurs de 0 à 38,4%. Pour les structures de première génération de type **Ia** et **IIa** (**46-48** et **57-59**), la taille des particules dans les populations mineures varie entre 10 et 60 nm. Pour les structures de deuxième génération, les particules représentées par les pics mineurs sont plus grandes, de 4000-9000 nm. Dans le cas des particules avec l'ITZ, toutes les graphiques sont généralement limités à deux pics, avec une population mineure des particules de 2000 à 9000 nm dont le pourcentage est de 1,7 à 11,8%.

Tableau 7. Rayons hydrodynamiques, pourcentage du pic principal et indice de polydispersité moyen des micelles à base de dendrimères dans leurs solutions aqueuses avant et après l'encapsulation de l'itraconazole

Produit dendritique*	Rayon hydrodynamique des micelles, nm (Aire du pic principal, %)		Indice de polydispersité moyen	
	Avant l'encapsulation	Après l'encapsulation	Avant l'encapsulation	Après l'encapsulation
46	198,4 ± 26,1 (75,2 ± 17,4)	231,5 ± 18,2 (90,1 ± 8,3)	0,263	0,353
47	110,0 ± 17,2 (87,1 ± 11,4)	170,1 ± 10,9 (94,2 ± 4,4)	0,251	0,259
48	79,3 ± 12,0 (91,2 ± 6,9)	195,4 ± 4,5 (96,1 ± 2,0)	0,276	0,226
57a	162,1 ± 8,7 (61,6 ± 7,6)	205,9 ± 9,4 (97,1 ± 2,9)	0,161	0,330
57b	123,12 ± 20,7 (84,2 ± 11,1)	192,1 ± 7,8 (98,4 ± 1,6)	0,216	0,429
58a	132,9 ± 23,8 (69,7 ± 19,1)	175,4 ± 5,8 (91,3 ± 3,1)	0,405	0,272
58b	106,4 ± 4,6 (94,3 ± 2,8)	188,8 ± 4,4 (95,2 ± 1,9)	0,334	0,312
59	77,3 ± 8,1 (100,0 ± 0,00)	170,9 ± 3,4 (97,3 ± 0,7)	0,257	0,212
63	165,0 ± 11,3 (68,6 ± 9,2)	154,1 ± 12,6 (98,3 ± 1,2)	0,432	0,192
64	106,69 ± 14,3 (92,1 ± 7,9)	222,1 ± 6,7 (89,2 ± 10,1)	0,126	0,203

* Voir les structures chimiques complètes dans l'annexe 6.

D'une manière générale, ces résultats montrent que toutes les structures dendritiques présentées dans la cadre de ce projet ont tendance à former des agrégats. En effet, selon les calculs théorique réalisés avec le logiciel *HyperChemTM Version 8-0-4* de la compagnie *Hypercube Inc.* (Gainesville, FL, É.-U.), dans le cas des dendrimères de deuxième génération de type **Ib**, **63** et **64** (**Figure 78, Page 158**), la taille des molécules déployées au maximum ne dépasse pas 12 nm, tandis que pour la plus grande structure de type **IIa**, **58**, elle est limitée à 20 nm. De plus, dans la majorité des cas, la taille des agrégats augmente en présence de l'itraconazole (**Figure 109, page 213**).

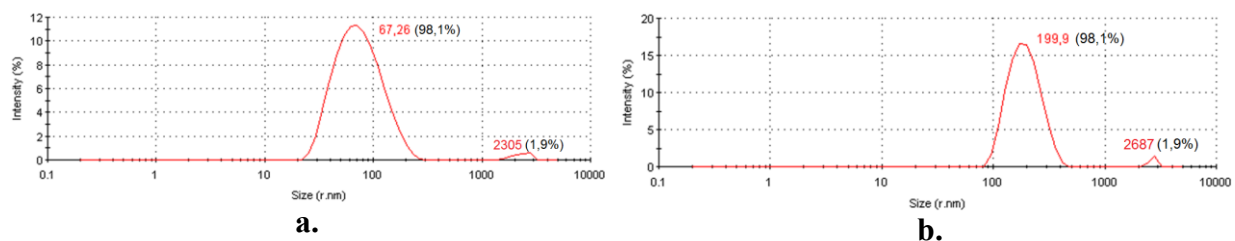


Figure 109. Distribution de taille des micelles à base du dendrimère 48 dans l'eau déionisée avant (a) et après (b) l'encapsulation de l'itraconazole.

Ainsi, les résultats d'encapsulation de l'ITZ (section 5.1) et de tests DLS suggèrent que dans le cas des structures étudiées, le concept fondamental des dendrimères comme des nanocapsules unimoléculaires n'est pas applicable. Ceci est d'ailleurs en concordance avec les données mentionnées dans la section 1.2.3.2, incluant également les glycérides portant les chaînes PEG [499], ainsi que les dendrimères polyesters Boltorn B-U3000 [185, 246]. Par conséquent, nos travaux de simulation présentés dans le chapitre 3 ne peuvent avoir qu'un caractère indicatif, car ils ne reflètent pas l'impact important du processus de formation des micelles à base des molécules d'agent d'encapsulation.

D'autres conclusions qui peuvent être tirées de tests DLS sont que pour les structures de première génération avec une partie centrale hydrophobe, **46**, **48** et **59**, le rayon hydrodynamique diminue avec l'augmentation de la flexibilité du cœur. Par exemple, le rayon maximal a été observé dans le cas du dendrimère **46** à cœur porphyrique, ce qui pourrait être expliqué, d'un côté, par les interactions π - π entre les cycles porphyriques des molécules

voisines et, de l'autre côté, par la nécessité d'impliquer plus de molécules pour former des micelles relativement stables.

Il est intéressant à noter que dans le cas du dendrimère hydrophile **47**, la taille des particules a été plus élevée par rapport à la taille de la structure **48** à cœur hydrophobe. Ceci pourrait être dû aux interactions plus fortes entre les chaînes TEG internes de molécules voisines, comparativement aux interactions hydrophobes très faibles entre les chaînes DD. De plus, l'effet d'hydratation dans le cas de la structure plus hydrophile, **47**, pourrait être également responsable pour l'augmentation de la taille des micelles.

Dans le cas de structures de type **IIa**, **57-59**, l'augmentation de la longueur de chaînes PEG, de TEG à PEG550 et PEG1000, amène généralement à l'augmentation de la taille de particules. Il est cependant à noter que la taille maximale a été observée dans le cas de structures **57a,b** avec les PEG550, comparativement aux chaînes plus longues PEG1000 de **58a,b**. Ce phénomène peut être expliqué par des arrangements intermoléculaires spécifiques ayant lieu à l'étape de formation des micelles. En particulier, les chaînes PEG1000 plus longues de **58a,b** sont capables de stabiliser les micelles avec le nombre de molécule plus petites par rapport aux micelles formées par **57a,b**.

Il faut également mentionner qu'avec la montée en génération, l'impacte de la partie centrale hydrophobe sur la taille de micelles diminue. Par exemple, pour les structures portant les chaînes DD internes, **48** et **64**, les changements ont été négligeables, tandis que pour les structures porphyriques, **46** et **63**, une diminution significative pour la structure **63** de G2 a été observée. Dans le dernier cas, la diminution en rayon hydrodynamique pourrait être expliquée par un affaiblissement des interactions π - π entre les cycles aromatiques des molécules voisines, dû à l'augmentation des gênes stériques, causés par les dendrons G2 plus volumineux.

La présence de l'ITZ dans les systèmes étudiés amène généralement à la diminution en variation de la taille des micelles. En effet, les valeurs du rayon hydrodynamique, ainsi que du taux de pic principal, restaient moins variables dans le cas des essais parallèles. Ceci pourrait être expliqué par l'effet « *template* » du PA, permettant d'organiser et retenir les molécules de dendrimères autour de lui d'une manière plus ordonnée.

Chapitre 6. Tests biologiques

Les tests biologiques réalisés sur les produits synthétisés dans le cadre du présent projet de recherche peuvent être divisés en deux parties : (i) tests de cytotoxicité et (ii) l'étude de propriétés antifongiques de l'ITZ encapsulé dans les dendrimères.

6.1. Tests de cytotoxicité de produits dendritiques obtenus

Afin d'étudier les effets cytotoxiques pouvant être causés par nos produits dendritiques, les tests avec le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT) sur les macrophages murins RAW 262.7 ont été effectués, selon le protocole de base de T. Mosmann [500]. D'une manière générale, le test consiste à quantifier le nombre de cellules vivantes, restant après l'exposition aux différentes concentrations d'un produit à étudier. La quantification est possible grâce à la réduction du MTT en son dérivé coloré de type formazan par les enzymes mitochondriales (réductases) des cellules vivantes (**Figure 110, page 216**). Le formazan qui représente normalement des cristaux insolubles dans le milieu de culture, est ensuite solubilisé dans un milieu de dissolution approprié et, finalement, quantifié par la mesure de l'intensité d'absorbance des solutions à 590 nm (voir la description détaillée de la procédure dans l'annexe 4). Les résultats sont généralement présentés sous forme du pourcentage de viabilité par rapport aux valeurs obtenues dans le cas de cellules témoins qui n'ont pas été exposées au produit à tester.

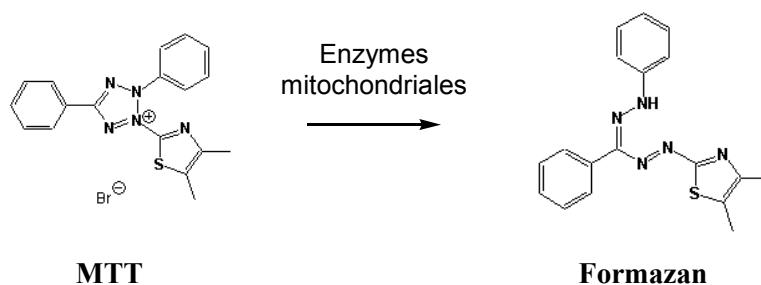


Figure 110. Schéma de la réduction du MTT en sa forme de formazan colorée.

Les tests réalisés (**Figure 111, page 217**, voir les structures chimiques complètes des produits dans l'annexe 6) montrent qu'aucun de nos dendrimères étudiés ne présentent d'effets toxiques pouvant affecter la survie de macrophages dans la plage de concentration allant de 0,01 à 250 µg/ml. Ces résultats sont en concordance avec notre hypothèse initiale, en

confirmant ainsi que les dendrimères assemblés à partir d'éléments structuraux biocompatibles, liés par les liaisons esters biodégradables, ne doivent pas être toxiques.

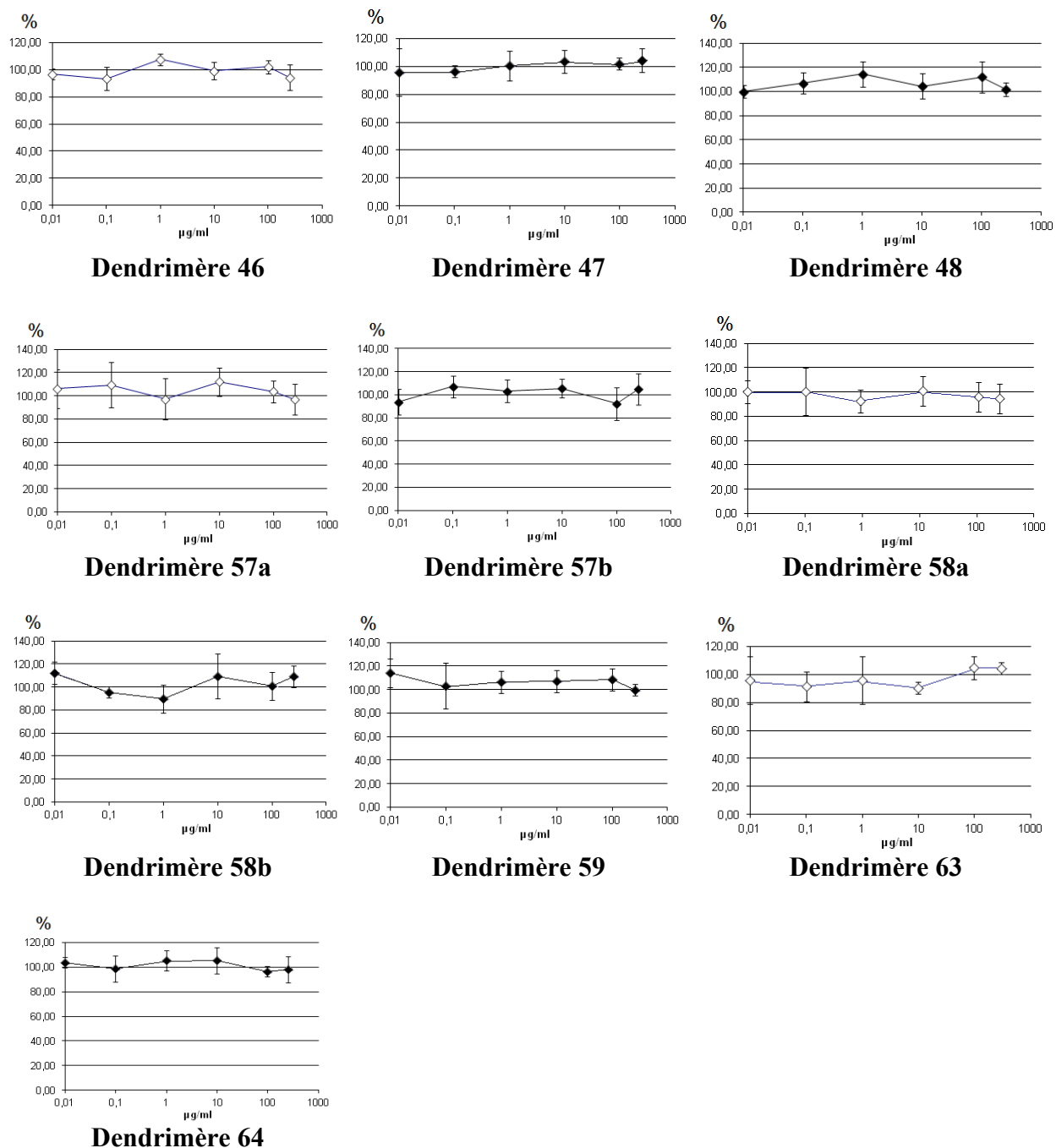


Figure 111. Prolifération des macrophages murins RAW 262.7 après une exposition de 24 h aux dendrimères dans la plage de concentration de 0,01 à 250,00 µg/ml.

6.2. Étude des propriétés antifongiques de l'itraconazole encapsulé dans les dendrimères

L'activité antifongique de l'itraconazole encapsulé dans les dendrimères synthétisés dans le cadre du présent projet de recherche a été étudiée sur une culture *Candida albicans*, la souche LSPQ 5674. L'évaluation a été effectuée en suivant une méthode de référence pour tester une sensibilité aux antifongiques des levures par dilution de « bouillon » [501], approuvée par CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), une organisation internationale produisant des normes et lignes directrices au sein de la communauté médicale [502]. La méthode est basée sur l'estimation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'un agent antifongique laquelle empêche visiblement (dans notre cas à 50%) la croissance d'un microorganisme dans un test de sensibilité par rapport au microorganisme non exposé.

Par analogie avec le test de viabilité cellulaire avec le MTT (section 6.1.), le test de sensibilité aux antifongiques des levures par dilution de « bouillon » consiste à quantifier le nombre de cellules de champignon survivantes après l'exposition aux différentes concentrations d'un antifongique. Dans ce cas, la quantification est possible grâce à la réduction du sel de sodium de 7-hydroxy-3H-phénoxazin-3-one-10-oxide (résazurin) en son dérivé fluorescent, résorufin. Le résazurin représente une matière colorante bleue tandis que le résorufin est de couleur rose. La transformation s'effectue également par les enzymes mitochondriales (réductases) des cellules vivantes (**Figure 112, page 218**). La densité optique du milieu de culture résultant se mesure à 560 nm par la technique de fluorométrie (voir la description détaillée de la procédure dans l'annexe 5). En se basant sur les valeurs de CMI trouvées, on tire une conclusion sur l'augmentation/diminution de sensibilité du champignon aux formulations antifongiques étudiées par rapport au PA non formulé.

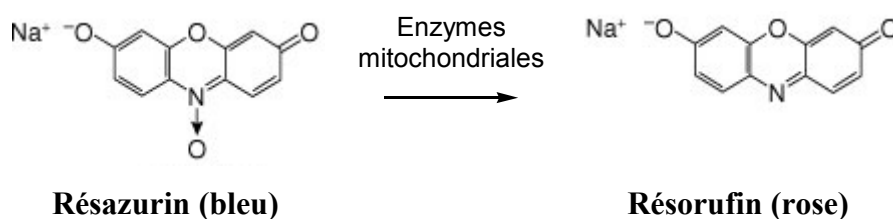


Figure 112. Schéma de la réduction du résazurin en résorufin.

Pour cette étude, les dendrimères **48**, **58a**, **59** et **64** qui ont présenté les taux de charge en PA les plus élevés, ont été sélectionnés. Les résultats ont montré qu'après une exposition de 72 h, les formulations à base de produits testés étaient moins efficaces que la solution Sporanox[®] commerciale et l'ITZ non encapsulé. En effet, les taux de survie des cellules fongiques étaient plus élevés dans les cas de dendrimères (**Figure 113**, **page 219**, voir les structures chimiques complètes des produits dans l'annexe 6).

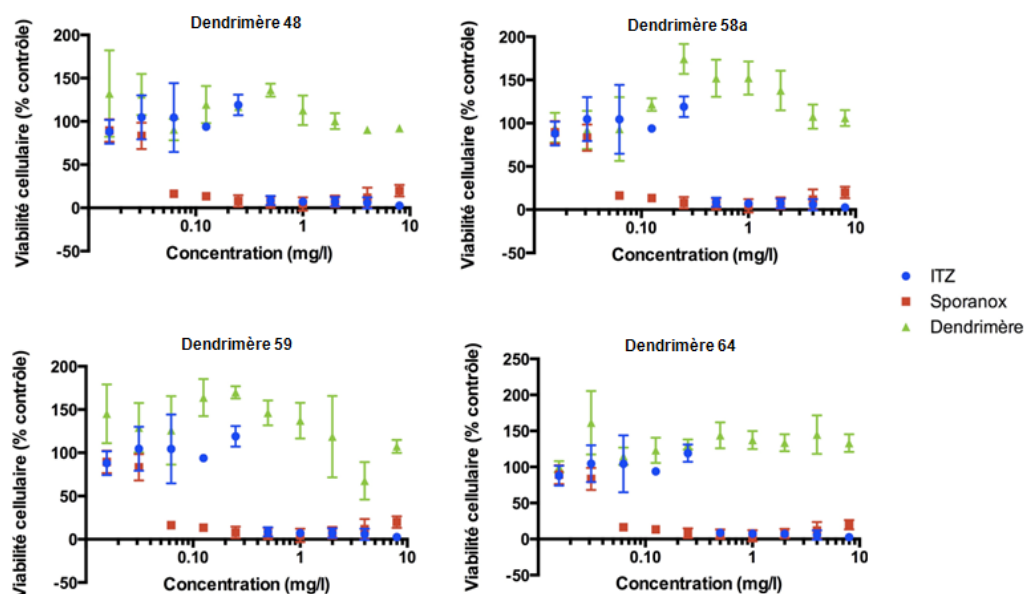


Figure 113. Viabilité cellulaire de la souche LSPQ 5674 de *Candida albicans* après 72 h de traitement avec de l'ITZ libre, Sporanox[®] et les formulations d'ITZ à base de dendrimères 48, 58a, 59 et 64.

Les explications possibles de ces résultats sont :

- (i) la vitesse de relargage du PA était insuffisante pour affecter la survie de cellules du champignon;
- (ii) la nature de la surface et la taille trop élevée des micelles empêche significativement l'internalisation du PA dans les cellules fongiques.

Ainsi, pour assurer l'efficacité de nouvelles formulations à base de micelles dendritiques proposées, un meilleur contrôle sur le processus de libération des molécules actives est nécessaire.

Chapitre 7. Discussion générale

Le travail réalisé dans le cadre du présent projet de recherche avait pour but d'élaborer de nouveaux systèmes d'encapsulation des PA hydrophobes à base des dendrimères. L'analyse bibliographique présentée dans le chapitre 1 de ce manuscrit a révélé que les structures dendritiques les plus prometteuses en tant que nanovecteurs sont des macromolécules polyesters. En effet, leur toxicité faible et la biodégradabilité, ainsi que la capacité d'encapsuler des petites molécules, constituent des propriétés essentielles pour leurs applications futures dans la nanovectorisation des médicaments. Néanmoins, pour tirer le maximum des avantages du concept des nanocapsules à base des dendrimères polyesters, il reste encore plusieurs problèmes à résoudre. En particulier, les obstacles majeurs qui empêchent grandement les applications de ces systèmes à grande échelle sont une faible efficacité d'encapsulation de PA et une libération trop rapide de PA *in vivo*. Très souvent, ces problèmes découlent de la mauvaise compréhension des facteurs qui sont impliqués dans le processus de rétention des molécules de PA au sein du vecteur. Par exemple, la majorité des dendrimères polyesters en vue d'être utilisés comme agents d'encapsulation des PA hydrophobes possèdent des cavités lipophiles internes trop petites ou mal adaptées pour pouvoir retenir efficacement des molécules actives de quelques centaines Daltons ou plus (ce qui est typique pour les PA modernes). Une autre préoccupation qui entrave le développement de ces systèmes est un coût très élevé par rapport aux nanovecteurs à base des lipides, des polymères linéaires etc. En effet, le processus d'assemblage des dendrimères reste toujours de très longue durée. Ceci est dû à la nécessité de réaliser la synthèse de macromolécules étape par étape, compte tenu des difficultés à purifier les produits obtenus qui diffèrent très peu par leurs structures. Une solution possible à ce dernier problème repose sur l'assemblage des dendrimères polyesters à partir des blocs polyesters présynthétisés. Cependant, très peu de travaux sont publiés à ce sujet.

L'approche combinatoire proposée dans le présent travail visait à élaborer de nouveaux nanovecteurs dendritiques, en faisant appel à une stratégie inédite, basée sur la réalisation successive de plusieurs étapes : (i) le choix des éléments structuraux et les travaux de synthèse préliminaires; (ii) la modélisation d'encapsulation de l'itraconazole *in silico*, (iii) l'assemblage chimique des dendrons et dendrimères, (iv) les tests d'encapsulation de l'itraconazole *in vitro*, (v) les tests de cytotoxicité de dendrimères synthétisés, (vi) les tests antifongiques de formulations de l'itraconazole à base de dendrimères obtenus. Selon notre hypothèse, la

réalisation de cette approche aurait du *à priori* nous amener à des résultats très encourageants, en permettant la création de nouveaux agents d'encapsulation dendritiques qui seront plus efficaces par rapport aux systèmes connus.

La première étape avait pour objectif de trouver parmi les composés connus les meilleurs candidats pour représenter les éléments structuraux de nos dendrimères, tels que cœur, groupements-espaceurs, agents de branchement et groupements terminaux. Notre choix s'est fixé sur les composés qui répondaient bien aux critères de disponibilité commerciale, biocompatibilité et possibilité de transformer d'une manière sélective les groupements fonctionnels présents (hydroxyles ou carboxyles) en liaisons esters. La réalisation de cette étape a permis de sélectionner les structures les plus prometteuses, ainsi que d'optimiser les conditions de certaines réactions connues, pour assembler des macromolécules polyesters à partir des alcools et des acides carboxyliques. Plusieurs nouveaux composés avec les rendements élevés ont été synthétisés, tels que le tétrasuccinyl-pentaérythritol (**C-I**) et le glycéryl tris[9,10-(*thréo*)-dihydroxyoctadéca-noate] (**C-VIII**), proposé respectivement comme cœur tétrafonctionnel et hexafunctionnel, le mono-O-trityl-1,10-décanediol (**18**), prometteur pour greffer les groupements-espaceurs hydrophobes à base du 1,10-decanediol, le mono-O-trityl-pentaérythritol (**19**) comme agent de branchement sélectif, mono-O-allyl-TEG (**25**) pour constituer les segments terminaux temporaires etc.

L'objectif de l'étape suivante était d'évaluer l'influence de la structure dendritique sur le processus d'encapsulation de l'itraconazole *in silico*, en utilisant une méthode de mécanique moléculaire, Amber3. D'une manière générale, l'approche computationnelle pourrait rendre le processus d'élaboration des nouveaux nanovecteurs dendritiques plus économique. En effet, une application de procédures de simulation fiables, avant des travaux dans les systèmes réels, permettrait d'optimiser le processus du triage des structures potentiellement intéressantes, en réduisant ainsi le nombre des dendrimères à synthétiser. Comme critère d'évaluation de l'efficacité de structures, la différence entre les énergies stériques avant et après l'encapsulation a été choisie. Les modélisations ont été menées dans les milieux simulant le vide et l'eau. Les résultats de ces travaux ont montré que la présence d'espaceurs hydrophobes à base de décanediol près du cœur de dendrimère devrait être considérée comme étant plus favorable à la rétention du PA, comparativement aux chaînes hydrophiles TEG. Il a été également trouvé que la souplesse de la partie centrale hydrophobe est un des facteurs majeurs

qui déterminent l'efficacité d'encapsulation du PA hydrophobe. Il faut aussi noter que l'efficacité de structures étudiées différerait dépendamment du milieu de modélisation, ce qui suggérerait une vérification de résultats de calculs dans les systèmes réels.

En se basant sur les résultats de deux premières étapes, les dendrimères de deux types (**I** et **II**) ont été choisis pour les travaux d'assemblage chimique. Le type **I** était représenté par les macromolécules portant un cœur central tétrafonctionnel et les points de divergence à base de pentaérythritol. Les dendrimères de type **II** étaient les dérivées du composé **C-VIII**. Les différences structurales choisies étaient nécessaires pour élucider par la suite l'influence de l'architecture interne sur le processus d'encapsulation du PA. Les travaux d'assemblage ont permis de réaliser d'abord la synthèse de nouveaux dendrons de première et de deuxième génération. Étant donné la grande sélectivité et le grand rendement du produit, le dendron de première génération **36** pourrait représenter dans le futur un bloc structural très prometteur pour assembler d'autres nouvelles structures polyesters hyperbranchées. Dans le cas du dendron de deuxième génération **45** assemblé par le greffage multiétape de petites molécules, la purification a été compliquée par la polymérisation spontanée du produit, ce qui est dû à la proximité de liaisons allyles doubles et, possiblement, à la présence de certaines impuretés pouvant induire la polymérisation. Une solution possible pour résoudre ce problème est d'obtenir les dendrons de deuxième génération, en faisant appel à une approche d'assemblage « en blocs », p.ex., en utilisant comme produits de départ les structures de première génération **36** et **39**. Durant la synthèse des dendrimères de première génération de type **I**, la réaction d'esterification de Steglich était efficace seulement dans le cas de structures de cœurs **C-I** et **C-VI** présentant moins de gênes stériques. La synthèse de dendrimères de type **II** n'était pas possible par le greffage direct de molécules volumineuses, en utilisant plusieurs réactions. Pour remédier à ce problème, la transformation préliminaire du composé **C-VIII** en son dérivé hexasuccinyle (**54**) a été réalisée. L'obtention de dendrimères de deuxième génération de type **I** a montré qu'avec les structures de dendrons proposées, la stratégie divergente se caractérise par le rendement réactionnel plus grand, comparativement à la stratégie convergente. Ceci pourrait être également expliqué par l'impact important des effets stériques sur l'assemblage de macromolécules. Afin de réaliser la synthèse de dendrimères de deuxième génération de type **II**, il est toujours nécessaire d'élaborer une méthode fiable pour greffer efficacement l'acide oléique aux hydroxyles secondaires voisins du cœur **C-VIII**.

L'étape suivante était une étude de l'efficacité d'encapsulation de l'itraconazole dans les dendrimères obtenus, accompagnée de mesures de la taille des nanoparticules formées dans l'eau avant et après l'encapsulation. Dans le cas de dendrimères de première génération, les résultats de tests sont en concordance avec les résultats de modélisations *in silico* réalisées dans le milieu simulant l'eau. En particulier, les taux d'encapsulation moyens augmentent avec la souplesse de la partie centrale hydrophobe de dendrimères, surtout quand il s'agit de la présence des chaînes hydrophobes libres. Néanmoins, il faut noter que les taux d'encapsulation observés ($\leq 6,5\%_{\text{mass}}$) représentent des valeurs assez faibles, ce qui nécessite une optimisation ultérieure au niveau structural de macromolécules.

Les mesures de la taille par la technique DLS ont révélé la formation des agrégats (généralement, les micelles de diamètre de 154,6 à 463,0 nm) dans le cas de tous les systèmes. De plus, la taille des agrégats a tendance d'augmenter en présence de l'itraconazole. Ainsi, les résultats d'encapsulation de l'ITZ et de tests DLS suggèrent que dans le cas des structures étudiées, le concept fondamental des dendrimères comme des nanocapsules unimoléculaires n'est pas applicable. Ceci est d'ailleurs en concordance avec certaines données bibliographiques récentes concernant d'autres macromolécules dendritiques proposés comme nanovecteurs des principes actifs. Par conséquent, nos travaux de simulation *in silico* ne peuvent avoir qu'un caractère indicatif, car ils ne reflètent pas l'impact important du processus de formation des micelles à base des molécules d'agent d'encapsulation. Il est cependant à mentionner que la formation des micelles permet d'expliquer le fait que le taux d'encapsulation n'augmentait pas avec l'augmentation de la longueur de chaînes PEG périphériques. En particulier, ceci est probablement dû à une organisation intermoléculaire plus efficace pour les dendrimères à chaînes PEG plus courtes. Finalement, malgré ces résultats peu attendus, comme perspective à long terme, on peut proposer les dendrimères de ce type pour former des systèmes d'encapsulation dont la taille de 200-450 nm est considérée comme étant favorable à la livraison efficace des PA (p.ex. anti-inflammatoires, antiarthritiques et anticancéreux).

Les dendrimères obtenus ont été également étudiés sur le plan de cytotoxicité, en utilisant le test classique de MTT sur les macrophages murins RAW-262.7. Les résultats ont montré qu'aucun de nos dendrimères ne présentent d'effets toxiques pouvant affecter la survie de macrophages dans la plage de concentration allant de 0,01 à 250 $\mu\text{g/ml}$ après 24 h

d'exposition. Ceci est en concordance avec beaucoup de sources bibliographiques, en confirmant ainsi que les dendrimères assemblés à partir d'éléments structuraux biocompatibles, liés par les liaisons esters biodégradables, ne doivent pas être toxiques.

L'activité antifongique de formulations de l'itraconazole avec les dendrimères obtenus a été étudiée sur une espèce d'un champignon pathogène *Candida albicans*. L'objectif de ces tests était de déterminer la concentration minimale inhibitrice présentée par les formulations à base de dendrimères, comparativement à l'itraconazole non formulé, ainsi qu'à la formulation commerciale Sporanox[®]. Les résultats ont montré qu'après une exposition de 72 h, les formulations à base de dendrimères étaient moins efficaces que le Sporanox[®] et le PA non formulé. Une explication possible de ces résultats est que la vitesse de relargage du PA était insuffisante pour affecter la survie de cellules du champignon. De plus, la nature de la surface et la taille assez élevée des micelles pourrait empêcher significativement l'internalisation du PA dans les cellules fongiques. Ainsi, pour assurer l'efficacité des nouvelles formulations, un meilleur contrôle sur le processus de libération des molécules actives est nécessaire. Dans ce contexte, une solution possible repose sur la fonctionnalisation de la périphérie des dendrimères par le greffage de l'acide folique ou des sucres simples tels que fructose, glucose, galactose, maltose, mannose etc. lesquels pourraient favoriser l'interaction avec la membrane plasmique et ainsi augmenter l'internalisation cellulaire de vecteur.

Ainsi, pour résumer l'ensemble de travaux réalisés dans le cadre du présent projet de recherche, on peut constater que notre hypothèse principale concernant une possibilité de créer de nouveaux systèmes d'encapsulation plus efficaces, en faisant appel à une approche combinatoire décrit ci-dessus, n'a pas été confirmée. En effet, malgré les résultats très encourageants liés à la synthèse sélective de nouvelles structures dendritiques, ainsi qu'à leur cytotoxicité très faible, finalement, ces travaux n'ont pas mené à la création de nouvelles formulations plus efficaces par rapport aux produits pharmaceutiques connus. Il est cependant à noter que d'une manière générale, les résultats obtenus doivent être considérés comme étant assez importants. En particulier, la synthèse et la caractérisation structurale de nouvelles macromolécules ont contribué à la chimie des dendrimères, tandis que les études d'encapsulation du PA et de propriétés biologiques peuvent présenter un intérêt pour le domaine de formulation pharmaceutique.

Conclusion

Ce travail de thèse était consacré à la conception, la synthèse et la caractérisation de nouvelles macromolécules polyesters branchées pour encapsuler des principes actifs hydrophobes. Cette étude s'inscrit dans la problématique générale liée à des particularités de la chimie des dendrimères et, en même temps, à l'élaboration de nouveaux agents d'encapsulation en vue d'améliorer la faible biodisponibilité de molécules actives hydrophobes.

Notre analyse bibliographique approfondie révèle que l'aspect prometteur de ces systèmes repose grandement sur l'absence de polydispersité (assurée par l'architecture bien définie), l'absence d'effets toxiques chez les dendrimères polyesters, la capacité d'encapsuler de petites molécules grâce à la présence de cavités internes et, finalement, sur le potentiel des groupements périphériques, permettant le greffage de différentes molécules d'une manière covalente. Il est cependant à noter qu'à cause de leurs cavités lipophiles internes trop petites, les dendrimères polyesters connus à ce jour sont majoritairement mal adaptés pour encapsuler efficacement des molécules actives hydrophobes dont la masse moléculaire dépasse quelques centaines de Daltons. Par conséquent, le besoin de nanovecteurs dendritiques plus sélectifs reste toujours d'actualité. Un autre aspect que nous avons essayé d'élaborer plus profondément, est lié aux perspectives d'utiliser les dendrimères dans des traitements médicamenteux particuliers, ce qui doit tenir compte notamment des barrières biologiques à traverser par le vecteur.

Une étude préliminaire réalisée dans le cadre de ce projet de recherche consistait à trouver des produits initiaux et intermédiaires pouvant être utilisés par la suite pour assembler efficacement nos futures macromolécules polyesters. La disponibilité commerciale, la biocompatibilité et la fiabilité des transformations chimiques étaient les critères principaux à cette étape du criblage. L'adaptation des conditions de synthèse et les procédures de purification proposées et testées durant cette étude ont permis d'obtenir 6 nouveaux produits intermédiaires de haute pureté.

En se basant sur les résultats de nos travaux de synthèse préliminaire, les simulations *in silico* ont été réalisées pour identifier les facteurs structuraux qui favorisent l'encapsulation de

l'itraconazole par les macromolécules composées des éléments choisis à l'étape précédente. Les résultats de calculs ont mis en évidence l'importance d'avoir dans une structure dendritique une partie centrale à la fois hydrophobe et flexible pour assurer une meilleure interaction non covalente avec le principe actif.

L'étape suivante consistait en l'assemblage chimique de dendrimères de deux types différant par la structure de la partie centrale hydrophobe. Ce travail a permis d'abord d'obtenir les dendrons de première et de deuxième génération et ensuite d'effectuer la synthèse de nouvelles structures dendritiques.

Les dendrimères obtenus ont été par la suite étudiés sur le plan de l'efficacité d'encapsulation de l'itraconazole. Ces tests ont montré que dans certains cas, le taux d'encapsulation du principe actif peut atteindre 6,5%_{mass}. Les mesures de la taille effectuées par la technique DLS permettent de constater la formation de micelles de diamètre de 154,6 à 463,0 nm, ce qui exclut les applications de ces produits en tant que nanocapsules unimoléculaires.

Les tests de cytotoxicité effectués sur les macrophages murins RAW-262.7 ont montré que les produits étudiés ne présentent pas d'effets toxiques pouvant affecter la survie de macrophages dans la plage de concentration de 0,01 à 250,00 µg/ml. Ceci est très encourageant pour le développement futur des nanovecteurs de ce type.

L'activité antifongique de formulations de l'itraconazole avec les dendrimères obtenus a été étudiée sur une espèce d'un champignon pathogène *Candida albicans*. Ces tests ont permis de conclure que pour assurer l'efficacité de la nouvelle formulation, un meilleur contrôle sur le relargage du principe actif était nécessaire.

Finalement, les résultats obtenus ont montré que les dendrimères polyesters peuvent être considérés comme une classe des agents d'encapsulation des principes actifs assez prometteuse sur le plan de la biocompatibilité et de l'efficacité d'encapsulation. Il est cependant à noter que notre travail suggère de réviser l'applicabilité du concept des dendrimères comme nanocapsules unimoléculaires, mettant aussi en évidence qu'avec ces structures, le contrôle sur le relargage du principe actif reste également à améliorer.

Bibliographie

1. Fahr, A. and X. Liu, *Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2007. **4**(4): p. 403-416.
2. Wenlock, M.C., et al., *A Comparison of Physicochemical Property Profiles of Development and Marketed Oral Drugs*. Journal of Medicinal Chemistry, 2003. **46**(7): p. 1250-1256.
3. Lipinski, C.A., et al., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1997. **23**(13): p. 3-25.
4. Giliyar, C., D.T. Fikstad, and S. Tyavanagimatt, *Challenges and opportunities in oral delivery of poorly water-soluble drugs*. Drug Delivery Technology, 2006. **6**: p. 57-63.
5. van Hoogevest, P., X. Liu, and A. Fahr, *Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs: the industrial perspective*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2011. **8**(11): p. 1481-1500.
6. Rabanel, J.-M., et al., *Drug-Loaded Nanocarriers: Passive Targeting and Crossing of Biological Barriers*. Current Medicinal Chemistry, 2012. **19**(19): p. 3070-3102.
7. Panchagnula, R., *Pharmaceutical aspects of paclitaxel*. International Journal of Pharmaceutics, 1998. **172**(1-2): p. 1-15.
8. Hande, K.R., *Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor*. European Journal of Cancer, 1998. **34**(10): p. 1514-1521.
9. Minotti, G., et al., *Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity*. Pharmacological Reviews, 2004. **56**(2): p. 185-229.
10. Nahar, M. and N.K. Jain, *Formulation and evaluation of saquinavir injection*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006. **68**(5): p. 608-614.
11. Pea, F., et al., *High vancomycin dosage regimens required by intensive care unit patients cotreated with drugs to improve haemodynamics following cardiac surgical procedures*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2000. **45**(3): p. 329-335.
12. Shim, S.Y., et al., *Characterization of itraconazole semisolid dosage forms prepared by hot melt technique*. Archives of Pharmacal Research, 2006. **29**(11): p. 1055-60.
13. Rajagopalan, N., et al., *A Study of the Solubility of Amphotericin B in Nonaqueous Solvent Systems*. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 1988. **42**(3): p. 97-102.
14. Muller, R.H., et al., *Oral bioavailability of cyclosporine: Solid lipid nanoparticles (SLN®) versus drug nanocrystals*. International Journal of Pharmaceutics, 2006. **317**(1): p. 82-89.
15. Waranis, R.P. and K.B. Sloan, *Effects of vehicles and prodrug properties and their interactions on the delivery of 6-mercaptopurine through skin: Bisacyloxymethyl-6-mercaptopurine prodrugs*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1987. **76**(8): p. 587-595.
16. Atanackovic, M., L. Gojkovic-Bukarica, and J. Cvejic, *Improving the low solubility of resveratrol*. BMC Pharmacology and Toxicology, 2012. **13**(Suppl 1): p. A25.

17. Hauss, D.J., et al., *Lipid-based delivery systems for improving the bioavailability and lymphatic transport of a poorly water-soluble LTB4 inhibitor*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1998. **87**(2): p. 164-169.
18. DiMasi, J.A., R.W. Hansen, and H.G. Grabowski, *The price of innovation: new estimates of drug development costs*. Journal of Health Economics, 2003. **22**(2): p. 151-85.
19. Bolten, B.M. and T. DeGregorio, *From the analyst's couch. Trends in development cycles*. Nature Reviews. Drug Discovery, 2002. **1**(5): p. 335-6.
20. Zhang, Y., H.F. Chan, and K.W. Leong, *Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2013. **65**(1): p. 104-120.
21. Agence de la Santé Publique du Canada, www.santepublique.gc.ca (consulté en décembre 2012).
22. Agence Fédérale Américaine des Produits Alimentaires et Médicamenteux (United States Food and Drug Administration, US FDA), www.fda.gov (consulté en décembre 2012).
23. Zolnik, B.S. and N. Sadrieh, *Regulatory perspective on the importance of ADME assessment of nanoscale material containing drugs*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2009. **61**(6): p. 422-427.
24. Soo Choi, H., et al., *Renal clearance of quantum dots*. Nature Biotechnology, 2007. **25**(10): p. 1165-1170.
25. Lenz, H.-J., ed. *Biomarkers in Oncology*. 2013, Springer New York Heidelberg Dordrecht London. 447 p.
26. Allen, T.M., C.B. Hansen, and D.E.L. de Menezes, *Pharmacokinetics of long-circulating liposomes*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1995. **16**(2-3): p. 267-284.
27. Kerns, E.H. and L. Di, *Drug-like properties: concepts, structure design and methods: from ADME to toxicity optimization*. 2008, Amsterdam; Boston: Academic Press. 526 p.
28. Loomis, K., K. McNeeley, and R.V. Bellamkonda, *Nanoparticles with targeting, triggered release, and imaging functionality for cancer applications*. Soft Matter, 2010. **7**(3): p. 839-856.
29. van Dongen, S.F.M., et al., *Biohybrid Polymer Capsules*. Chemical Reviews, 2009. **109**(11): p. 6212-6274.
30. Ganta, S., et al., *A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery*. Journal of Controlled Release, 2008. **126**(3): p. 187-204.
31. Soussan, E., et al., *Drug Delivery by Soft Matter: Matrix and Vesicular Carriers*. Angewandte Chemie International Edition, 2009. **48**(2): p. 274-288.
32. Kohli, K., et al., *Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability*. Drug Discovery Today, 2010. **15**(21-22): p. 958-965.
33. Davis, M.E., Z. Chen, and D.M. Shin, *Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer*. Nature Reviews. Drug Discovery, 2008. **7**(9): p. 771-782.
34. Haag, R. and F. Kratz, *Polymer Therapeutics: Concepts and Applications*. Angewandte Chemie International Edition, 2006. **45**(8): p. 1198-1215.
35. Allen, T.M. and P.R. Cullis, *Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2013. **65**(1): p. 36-48.

36. Reza Mozafari, M., et al., *Nanoliposomes and Their Applications in Food Nanotechnology*. Journal of Liposome Research, 2008. **18**(4): p. 309-327.
37. Zhang, L., et al., *Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments*. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2007. **83**(5): p. 761-769.
38. Venditto, V.J. and F.C. Szoka Jr., *Cancer nanomedicines: So many papers and so few drugs!* Advanced Drug Delivery Reviews, 2013. **65**(1): p. 80-88.
39. Torchilin, V.P., *Multifunctional nanocarriers*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012. **64**, **Supplement**(0): p. 302-315.
40. Immordino, M.L., F. Dosio, and L. Cattel, *Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential*. International Journal of Nanomedicine, 2006. **1**(3): p. 297-315.
41. Wijagkanalan, W., S. Kawakami, and M. Hashida, *Designing Dendrimers for Drug Delivery and Imaging: Pharmacokinetic Considerations*. Pharmaceutical Research, 2011. **28**(7): p. 1500-1519.
42. Banerjee, R., et al., *Nanomedicine: Magnetic Nanoparticles and their Biomedical Applications*. Current Medicinal Chemistry, 2010. **17**(27): p. 3120-3141.
43. Kim, S., et al., *Overcoming the barriers in micellar drug delivery: loading efficiency, in vivo stability, and micelle-cell interaction*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2010. **7**(1): p. 49-62.
44. Fox, M.E., F.C. Szoka, and J.M.J. Frechet, *Soluble Polymer Carriers for the Treatment of Cancer: The Importance of Molecular Architecture*. Accounts of Chemical Research, 2009. **42**(8): p. 1141-1151.
45. Bae, Y.H. and K. Park, *Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility*. Journal of Controlled Release, 2011. **153**(3): p. 198-205.
46. Aryal, S., et al., *Biodegradable and biocompatible multi-arm star amphiphilic block copolymer as a carrier for hydrophobic drug delivery*. International Journal of Biological Macromolecules, 2009. **44**(4): p. 346-352.
47. Oh, J.K., et al., *The development of microgels/nanogels for drug delivery applications*. Progress in Polymer Science, 2008. **33**(4): p. 448-477.
48. Dickerson, E., et al., *Chemosensitization of cancer cells by siRNA using targeted nanogel delivery*. BMC Cancer, 2010. **10**(1): p. 10.
49. Lee, E.S., et al., *A Virus-Mimetic Nanogel Vehicle*. Angewandte Chemie International Edition, 2008. **47**(13): p. 2418-2421.
50. Fréchet, J.M.J. and D.A. Tomalia, *Dendrimers and other dendritic polymers*. Wiley series in polymer science. 2001, Chichester ; New York: Wiley. xxxix, 647 p.
51. Cheng, Y., ed. *Dendrimer-Based Drug Delivery Systems: From Theory to Practice*. Wiley series in drug discovery and development. 2012, John Wiley & Sons. 152 p.
52. Campagna, S., P. Ceroni, and F. Puntoriero, *Designing dendrimers*. 2012: Hoboken, NJ : Wiley. 581 p.
53. Feynman, R.P. *Plenty of Room at the Bottom. December 1959. Version électronique sur <http://www.its.caltech.edu/~feynman/plenty.html> (consulté en Octobre 2012)*
54. Couvreur, P., et al., *Nanocapsules a new type of lysosomotropic carrier*. FEBS Lett., 1977. **84**: p. 323-326.
55. Ostiguy, C., et al., *Études et recherches de IRSST (Montréal, Québec). Rapport R-646. Les nanoparticules de synthèse: Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en SST. 2e édition*. 2010. 159 p.

56. Ostiguy, C., et al., *Études et recherches de IRSST (Montréal, Québec). Rapport R-455. Les nanoparticules: Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en santé et en sécurité du travail*. 2006. 90 p.
57. Tomalia, D.A., J.B. Christensen, and U. Boas, *Dendrimers, dendrons, and dendritic polymers : discovery, applications, and the future*. 2012, Cambridge: Cambridge University Press. 420 p.
58. Deloncle, R., *Dendrimères phosphorés à motifs azobenzène: vers des nanomatériaux photoadaptifs* in *UFR Physique Chimie Automatique*. 2007, Université Toulouse III - Paul Sabatier: Toulouse. 214 p.
59. Luman, N.R., T. Kim, and M.W. Grinstaff, *Dendritic polymers composed of glycerol and succinic acid: Synthetic methodologies and medical applications*. *Pure and Applied Chemistry*, 2004. **76**(7-8): p. 1375-1385.
60. Darbre, T. and J.-L. Reymond, *Glycopeptide Dendrimers for Biomedical Applications*. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2008. **8**(14): p. 1286-1293.
61. Tomalia, D.A., et al., *A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules*. *Polymer Journal*, 1985. **17**(1): p. 117-132.
62. Majoral, J.-P. and A.-M. Caminade, *Dendrimers Containing Heteroatoms (Si, P, B, Ge, or Bi)*. *Chemical Reviews*, 1999. **99**(3): p. 845-880.
63. Qin, T., et al., *Core, Shell, and Surface-Optimized Dendrimers for Blue Light-Emitting Diodes*. *Journal of the American Chemical Society*, 2011. **133**(5): p. 1301-1303.
64. Grayson, S.M. and J.M.J. Fréchet, *Convergent Dendrons and Dendrimers: from Synthesis to Applications*. *Chemical Reviews*, 2001. **101**(12): p. 3819-3868.
65. Tomalia, D.A., *Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic polymer chemistry*. *Progress in Polymer Science*, 2005. **30**(3-4): p. 294-324.
66. Buhleier, E., W. Wehner, and F. Vogtle, *Cascade and non-skid-chain-like synthesis of molecular cavity topologies*. *Synthesis*, 1978. **2**: p. 155-158.
67. Denkwalter, R., J. Kolc, and W.J. Lukasavage, *Macromolecular highly branched homogeneous compound based on lysine units*. 1981: Patent US19790027622.
68. Denkwalter, R., J. Kolc, and W.J. Lukasavage, *Preparation of lysine based macromolecular highly branched homogeneous compound*. 1982: Patent US4360646.
69. Denkwalter, R., J. Kolc, and W.J. Lukasavage, *Macromolecular highly branched homogeneous compound*. 1983: Patent US19810329780.
70. Newkome, G.R., et al., *Micelles. Part I. Cascade molecules: a new approach to micelles. A [27]-arborol*. *The Journal of Organic Chemistry*, 1985. **50**(11): p. 2003-2004.
71. Malda, H., *Designing dendrimers for use in biomedical applications*. 2006, Eindhoven University of Technology: Eindhoven. 148 p.
72. Gingras, M., et al., *Star-Shaped Nanomolecules Based on p-Phenylene Sulfide Asterisks with a Persulfurated Coronene Core*. *Chemistry – A European Journal*, 2004. **10**(12): p. 2895-2904.
73. Sleiman, M., et al., *Glycosylated asterisks are among the most potent low valency inducers of Concanavalin A aggregation*. *Chemical Communications*, 2008(48): p. 6507-6509.
74. Klajnert, B. and M. Bryszewska, *Dendrimers: properties and applications*. *Acta biochimica Polonica*, 2001. **48**(1): p. 199-208.

75. Moore, J.S., *Shape-Persistent Molecular Architectures of Nanoscale Dimension*. Accounts of Chemical Research, 1997. **30**(10): p. 402-413.
76. Duncan, R. and M.J. Vicent, *Polymer therapeutics-prospects for 21st century: The end of the beginning*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2013. **65**(1): 60-70.
77. Gingras, M., *Degradable Dendrimers. Synthesis and Usefulness in Drug Delivery*. November 15th 2012, Univesity of Montreal: Montréal, Qc, Canada.
78. Pérez, J., L. Bax, and C. Escolano, *Roadmap Report on Dendrimers. NanoRoadMap Project*. November 2005, Willems & van den Wildenberg (W&W): Barcelona, Spain (version électronique est présentée sur <http://www.phantomsnet.net/files/>; consultée en décembre 2012).
79. Hawker, C.J. and K.L. Wooley, *The Convergence of Synthetic Organic and Polymer Chemistries*. Science, 2005. **309**(5738): p. 1200-1205.
80. de Gennes, P.G. and H. Hervet, *Statistics of « starburst » polymers*. Journal de Physique. Letters, 1983. **44**(9): p. 351-360.
81. Hawker, C. and J.M.J. Frechet, *A new convergent approach to monodisperse dendritic macromolecules*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1990(15): p. 1010-1013.
82. Hawker, C.J. and J.M.J. Frechet, *Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules*. Journal of the American Chemical Society, 1990. **112**(21): p. 7638-7647.
83. Ihre, H., et al., *Double-Stage Convergent Approach for the Synthesis of Functionalized Dendritic Aliphatic Polyesters Based on 2,2-Bis(hydroxymethyl)propionic Acid*. Macromolecules, 1998. **31**(13): p. 4061-4068.
84. Dhanikula, R.S. and P. Hildgen, *Synthesis and evaluation of novel dendrimers with a hydrophilic interior as nanocarriers for drug delivery*. Bioconjugate Chemistry, 2006. **17**(1): p. 29-41.
85. Lin, Q., G. Jiang, and K. Tong, *Dendrimers in Drug-Delivery Applications*. Designed Monomers and Polymers, 2010. **13**(4): p. 301-324.
86. Soliman, G.M., et al., *Dendrimers and miktoarm polymers based multivalent nanocarriers for efficient and targeted drug delivery*. Chemical Communications, 2011. **47**(34): p. 9572-9587.
87. Nanjwade, B.K., et al., *Dendrimers: Emerging polymers for drug-delivery systems*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009. **38**(3): p. 185-196.
88. Gillies, E.R. and J.M.J. Frechet, *Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery*. Drug Discovery Today, 2005. **10**(1): p. 35-43.
89. Boas, U. and P.M.H. Heegaard, *Dendrimers in drug research*. Chemical Society Reviews, 2004. **33**(1): p. 43-63.
90. Menjoge, A.R., R.M. Kannan, and D.A. Tomalia, *Dendrimer-based drug and imaging conjugates: design considerations for nanomedical applications*. Drug Discovery Today, 2010. **15**(5-6): p. 171-185.
91. Lee, C.C., et al., *Designing dendrimers for biological applications*. Nature Biotechnology, 2005. **23**(12): p. 1517-1526.
92. Dykes, G.M., *Dendrimers: a review of their appeal and applications*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2001. **76**(9): p. 903-918.
93. Sahoo, S.K. and V. Labhasetwar, *Nanotech approaches to drug delivery and imaging*. Drug Discovery Today, 2003. **8**(24): p. 1112-1120.

94. World Health Organization, *fact sheet*. 2010. Available from the URL <http://www.who.int/cancer/en/>.
95. Portney, N. and M. Ozkan, *Nano-oncology: drug delivery, imaging, and sensing*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006. **384**(3): p. 620-630.
96. *Société canadienne du Cancer*, www.cancer.ca (consulté en décembre 2012)
97. Kaminskis, L.M., et al., *Association of Chemotherapeutic Drugs with Dendrimer Nanocarriers: An Assessment of the Merits of Covalent Conjugation Compared to Noncovalent Encapsulation*. Molecular Pharmaceutics, 2012. **9**(3): p. 355-373.
98. Moertel, C.G., et al., *Phase II study of camptothecin (NSC-100880) in the treatment of advanced gastrointestinal cancer*. Cancer Chemotherapy Reports, 1972. **56**(1): p. 95-101.
99. Muggia, F.M., et al., *Phase I clinical trial of weekly and daily treatment with camptothecin (NSC-100880): correlation with preclinical studies*. Cancer Chemother Rep. , 1972. **56**(4): p. 515-521.
100. Armstrong, D.K., *Topotecan Dosing Guidelines in Ovarian Cancer: Reduction and Management of Hematologic Toxicity*. The Oncologist, 2004. **9**(1): p. 33-42.
101. Hecht, J.R., *Gastrointestinal toxicity of irinotecan*. Oncology (Williston Park), 1998. **12**(8 Suppl 6): p. 72-78.
102. Arun, R., K.C.K. Ashok, and V.V.N.S.S. Sravanthi, *Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule: A Review*. Scientia Pharmaceutica, 2008. **76**: p. 567-598.
103. Gradishar, W.J., et al., *Phase III Trial of Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel Compared With Polyethylated Castor Oil-Based Paclitaxel in Women With Breast Cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2005. **23**(31): p. 7794-7803.
104. Milhem, O.M., et al., *Polyamidoamine Starburst dendrimers as solubility enhancers*. International Journal of Pharmaceutics, 2000. **197**(1-2): p. 239-41.
105. Dhanikula, R.S. and P. Hildgen, *Influence of molecular architecture of polyether-copolyester dendrimers on the encapsulation and release of methotrexate*. Biomaterials, 2007. **28**(20): p. 3140-52.
106. Dhanikula, R.S., et al., *Methotrexate loaded polyether-copolyester dendrimers for the treatment of gliomas: enhanced efficacy and intratumoral transport capability*. Molecular Pharmaceutics, 2008. **5**(1): p. 105-16.
107. Jiang, Y.-Y., et al., *PEGylated PAMAM dendrimers as a potential drug delivery carrier: in vitro and in vivo comparative evaluation of covalently conjugated drug and noncovalent drug inclusion complex*. Journal of Drug Targeting, 2010. **18**(5): p. 389-403.
108. Patri, A.K., J.F. Kukowska-Latallo, and J.R. Baker Jr, *Targeted drug delivery with dendrimers: Comparison of the release kinetics of covalently conjugated drug and non-covalent drug inclusion complex*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2005. **57**(15): p. 2203-2214.
109. Quintana, A., et al., *Design and Function of a Dendrimer-Based Therapeutic Nanodevice Targeted to Tumor Cells Through the Folate Receptor*. Pharmaceutical Research, 2002. **19**(9): p. 1310-1316.
110. Kukowska-Latallo, J.F., et al., *Nanoparticle Targeting of Anticancer Drug Improves Therapeutic Response in Animal Model of Human Epithelial Cancer*. Cancer Research, 2005. **65**(12): p. 5317-5324.

111. Majoros, I.J., et al., *PAMAM Dendrimer-Based Multifunctional Conjugate for Cancer Therapy: Synthesis, Characterization, and Functionality*. *Biomacromolecules*, 2006. **7**(2): p. 572-579.
112. Thomas, T.P., et al., *Targeting and Inhibition of Cell Growth by an Engineered Dendritic Nanodevice*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005. **48**(11): p. 3729-3735.
113. Kaminskas, L.M., et al., *Capping Methotrexate alpha-Carboxyl Groups Enhances Systemic Exposure and Retains the Cytotoxicity of Drug Conjugated PEGylated Polylysine Dendrimers*. *Molecular Pharmaceutics*, 2011. **8**(2): p. 338-349.
114. Myc, A., et al., *Preclinical antitumor efficacy evaluation of dendrimer-based methotrexate conjugates*. *Anti-Cancer Drugs*, 2008. **19**(2): p. 143-149.
115. Kaminskas, L.M., et al., *Pharmacokinetics and Tumor Disposition of PEGylated, Methotrexate Conjugated Poly-l-lysine Dendrimers*. *Molecular Pharmaceutics*, 2009. **6**(4): p. 1190-1204.
116. Gurdag, S., et al., *Activity of Dendrimer-Methotrexate Conjugates on Methotrexate-Sensitive and -Resistant Cell Lines*. *Bioconjugate Chemistry*, 2006. **17**(2): p. 275-283.
117. Ke, W., et al., *Enhanced oral bioavailability of doxorubicin in a dendrimer drug delivery system*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008. **97**(6): p. 2208-2216.
118. Agarwal, A., et al., *Dextran conjugated dendritic nanoconstructs as potential vectors for anti-cancer agent*. *Biomaterials*, 2009. **30**(21): p. 3588-3596.
119. Gupta, U., et al., *Ligand anchored dendrimers based nanoconstructs for effective targeting to cancer cells*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010. **393**(1-2): p. 186-197.
120. Han, L., et al., *Plasmid pORF-hTRAIL and doxorubicin co-delivery targeting to tumor using peptide-conjugated polyamidoamine dendrimer*. *Biomaterials*, 2011. **32**(4): p. 1242-1252.
121. Lai, P.-S., et al., *Doxorubicin delivery by polyamidoamine dendrimer conjugation and photochemical internalization for cancer therapy*. *Journal of Controlled Release*, 2007. **122**(1): p. 39-46.
122. Zhang, L., et al., *RGD-modified PEG-PAMAM-DOX conjugates: In vitro and in vivo studies for glioma*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2011. **79**(2): p. 232-240.
123. Padilla De Jesus, O.L., et al., *Polyester Dendritic Systems for Drug Delivery Applications: In Vitro and In Vivo Evaluation*. *Bioconjugate Chemistry*, 2002. **13**(3): p. 453-461.
124. Lee, C.C., et al., *An Intramolecular Cyclization Reaction Is Responsible for the in Vivo Inefficacy and Apparent pH Insensitive Hydrolysis Kinetics of Hydrazone Carboxylate Derivatives of Doxorubicin*. *Bioconjugate Chemistry*, 2006. **17**(5): p. 1364-1368.
125. Lee, C.C., et al., *A single dose of doxorubicin-functionalized bow-tie dendrimer cures mice bearing C-26 colon carcinomas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006. **103**(45): p. 16649-16654.
126. Yuan, H., et al., *A Novel Poly(l-glutamic acid) Dendrimer Based Drug Delivery System with Both pH-Sensitive and Targeting Functions*. *Molecular Pharmaceutics*, 2010. **7**(4): p. 953-962.
127. Kaminskas, L.M., et al., *Characterisation and tumour targeting of PEGylated polylysine dendrimers bearing doxorubicin via a pH labile linker*. *Journal of Controlled Release*, 2011. **152**(2): p. 241-248.

128. Zhu, S., et al., *Partly PEGylated polyamidoamine dendrimer for tumor-selective targeting of doxorubicin: The effects of PEGylation degree and drug conjugation style*. *Biomaterials*, 2010. **31**(6): p. 1360-1371.
129. Zhu, S., et al., *PEGylated PAMAM Dendrimer-Doxorubicin Conjugates: In Vitro Evaluation and In Vivo Tumor Accumulation*. *Pharmaceutical Research*, 2010. **27**(1): p. 161-174.
130. van der Poll, D.G., et al., *Design, Synthesis, and Biological Evaluation of a Robust, Biodegradable Dendrimer*. *Bioconjugate Chemistry*, 2010. **21**(4): p. 764-773.
131. Ihre, H.R., et al., *Polyester Dendritic Systems for Drug Delivery Applications: Design, Synthesis, and Characterization*. *Bioconjugate Chemistry*, 2002. **13**(3): p. 443-452.
132. Calderon, M., et al., *Development of enzymatically cleavable prodrugs derived from dendritic polyglycerol*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2009. **19**(14): p. 3725-3728.
133. Kono, K., et al., *Preparation and cytotoxic activity of poly(ethylene glycol)-modified poly(amidoamine) dendrimers bearing adriamycin*. *Biomaterials*, 2008. **29**(11): p. 1664-1675.
134. Ooya, T., J. Lee, and K. Park, *Hydrotropic Dendrimers of Generations 4 and 5: Synthesis, Characterization, and Hydrotropic Solubilization of Paclitaxel*. *Bioconjugate Chemistry*, 2004. **15**(6): p. 1221-1229.
135. Ooya, T., J. Lee, and K. Park, *Effects of ethylene glycol-based graft, star-shaped, and dendritic polymers on solubilization and controlled release of paclitaxel*. *Journal of Controlled Release*, 2003. **93**(2): p. 121-127.
136. Bansal, K.K., et al., *Development and Characterization of Triazine Based Dendrimers for Delivery of Antitumor Agent*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2010. **10**(12): p. 8395-8404.
137. Khandare, J.J., et al., *Dendrimer Versus Linear Conjugate: Influence of Polymeric Architecture on the Delivery and Anticancer Effect of Paclitaxel*. *Bioconjugate Chemistry*, 2006. **17**(6): p. 1464-1472.
138. Lim, J., et al., *Design, Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation of Triazine Dendrimers Bearing Paclitaxel Using Ester and Ester/Disulfide Linkages*. *Bioconjugate Chemistry*, 2009. **20**(11): p. 2154-2161.
139. Lo, S.-T., et al., *Biological Assessment of Triazine Dendrimer: Toxicological Profiles, Solution Behavior, Biodistribution, Drug Release and Efficacy in a PEGylated, Paclitaxel Construct*. *Molecular Pharmaceutics*, 2010. **7**(4): p. 993-1006.
140. Lim, J. and E.E. Simanek, *Synthesis of Water-Soluble Dendrimers Based on Melamine Bearing 16 Paclitaxel Groups*. *Organic Letters*, 2007. **10**(2): p. 201-204.
141. Singh, P., et al., *Folate and Folate-PEG-PAMAM Dendrimers: Synthesis, Characterization, and Targeted Anticancer Drug Delivery Potential in Tumor Bearing Mice*. *Bioconjugate Chemistry*, 2008. **19**(11): p. 2239-2252.
142. Venuganti, V.V.K. and O.P. Perumal, *Poly(amidoamine) dendrimers as skin penetration enhancers: Influence of charge, generation, and concentration*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009. **98**(7): p. 2345-2356.
143. Ren, Y., et al., *Co-delivery of as-miR-21 and 5-FU by Poly(amidoamine) Dendrimer Attenuates Human Glioma Cell Growth in Vitro*. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2010. **21**(3): p. 303-314.

144. Bhadra, D., et al., *A PEGylated dendritic nanoparticulate carrier of fluorouracil*. International Journal of Pharmaceutics, 2003. **257**(1-2): p. 111-124.
145. Zhuo, R.X., B. Du, and Z.R. Lu, *In vitro release of 5-fluorouracil with cyclic core dendritic polymer*. Journal of Controlled Release, 1999. **57**(3): p. 249-257.
146. Cheng, Y., M. Li, and T. Xu, *Potential of poly(amidoamine) dendrimers as drug carriers of camptothecin based on encapsulation studies*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2008. **43**(8): p. 1791-1795.
147. Fox, M.E., et al., *Synthesis and In Vivo Antitumor Efficacy of PEGylated Poly(l-lysine) Dendrimer-Camptothecin Conjugates*. Molecular Pharmaceutics, 2009. **6**(5): p. 1562-1572.
148. Gopin, A., et al., *Enzymatic Activation of Second-Generation Dendritic Prodrugs: Conjugation of Self-Immolative Dendrimers with Poly(ethylene glycol) via Click Chemistry*. Bioconjugate Chemistry, 2006. **17**(6): p. 1432-1440.
149. Shamis, M., H.N. Lode, and D. Shabat, *Bioactivation of Self-Immolative Dendritic Prodrugs by Catalytic Antibody 38C2*. Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(6): p. 1726-1731.
150. Vijayalakshmi, N., et al., *Carboxyl-Terminated PAMAM-SN38 Conjugates: Synthesis, Characterization, and in Vitro Evaluation*. Bioconjugate Chemistry, 2010. **21**(10): p. 1804-1810.
151. Thiagarajan, G., et al., *PAMAM-Camptothecin Conjugate Inhibits Proliferation and Induces Nuclear Fragmentation in Colorectal Carcinoma Cells*. Pharmaceutical Research, 2010. **27**(11): p. 2307-2316.
152. Lai, P.-S., et al., *Enhanced cytotoxicity of saporin by polyamidoamine dendrimer conjugation and photochemical internalization*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2008. **87A**(1): p. 147-155.
153. Hui, H., F. Xiao-dong, and C. Zhong-lin, *Thermo- and pH-sensitive dendrimer derivatives with a shell of poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate) and study of their controlled drug release behavior*. Polymer, 2005. **46**(22): p. 9514-9522.
154. Neerman, M.F., et al., *Reduction of Drug Toxicity Using Dendrimers Based on Melamine*. Molecular Pharmaceutics, 2004. **1**(5): p. 390-393.
155. Malik, N., E.G. Evagorou, and R. Duncan, *Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy. [Miscellaneous]*. Anti-Cancer Drugs, 1999. **10**(8): p. 767-776.
156. Bellis, E., et al., *Three generations of alpha, gamma-diaminobutyric acid modified poly(propyleneimine) dendrimers and their cisplatin-type platinum complexes*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2006. **69**(1-2): p. 151-161.
157. Haririan, I., et al., *Anionic linear-globular dendrimer-cis-platinum (II) conjugates promote cytotoxicity in vitro against different cancer cell lines*. International Journal of Nanomedicine 2010. **5** p. 63-75.
158. Barth, R.F., et al., *Boronated starburst dendrimer-monoclonal antibody immunoconjugates: Evaluation as a potential delivery system for neutron capture therapy*. Bioconjugate Chemistry, 1994. **5**(1): p. 58-66.
159. Capala, J., et al., *Boronated Epidermal Growth Factor as a Potential Targeting Agent for Boron Neutron Capture Therapy of Brain Tumors*. Bioconjugate Chemistry, 1996. **7**(1): p. 7-15.
160. Yang, W., et al., *Boron neutron capture therapy of EGFR or EGFRvIII positive gliomas using either boronated monoclonal antibodies or epidermal growth factor as*

- molecular targeting agents*. Applied Radiation and Isotopes, 2009. **67**(7-8Suppl): p. S328-331.
161. Morgan, M.T., et al., *Dendrimer-Encapsulated Camptothecins: Increased Solubility, Cellular Uptake, and Cellular Retention Affords Enhanced Anticancer Activity In vitro*. Cancer Research, 2006. **66**(24): p. 11913-11921.
 162. Tekade, R.K., et al., *Exploring dendrimer towards dual drug delivery: pH responsive simultaneous drug-release kinetics*. Journal of Microencapsulation, 2009. **26**(4): p. 287-296.
 163. Waite, C.L. and C.M. Roth, *PAMAM-RGD Conjugates Enhance siRNA Delivery Through a Multicellular Spheroid Model of Malignant Glioma*. Bioconjugate Chemistry, 2009. **20**(10): p. 1908-1916.
 164. Myc, A., et al., *Targeting the efficacy of a dendrimer-based nanotherapeutic in heterogeneous xenograft tumors in vivo*. Anti-Cancer Drugs Volume, 2010. **21**(2): p. 186-192.
 165. He, H., et al., *PEGylated Poly(amidoamine) dendrimer-based dual-targeting carrier for treating brain tumors*. Biomaterials, 2011. **32**(2): p. 478-487.
 166. Tekade, R.K., et al., *Surface-engineered dendrimers for dual drug delivery: A receptor up-regulation and enhanced cancer targeting strategy*. Journal of Drug Targeting, 2008. **16**(10): p. 758-772.
 167. Kim, Y., et al., *PEGylated Dendritic Unimolecular Micelles as Versatile Carriers for Ligands of G Protein-Coupled Receptors*. Bioconjugate Chemistry, 2009. **20**(10): p. 1888-1898.
 168. Chau, Y., et al., *Investigation of targeting mechanism of new dextran-peptide-methotrexate conjugates using biodistribution study in matrix-metalloproteinase-overexpressing tumor xenograft model*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006. **95**(3): p. 542-551.
 169. Chau, Y., et al., *Antitumor efficacy of a novel polymer-peptide-drug conjugate in human tumor xenograft models*. International Journal of Cancer, 2006. **118**(6): p. 1519-1526.
 170. Venditto, V.J. and F.C. Szoka Jr., *Cancer nanomedicines: So many papers and so few drugs!* Advanced Drug Delivery Reviews, 2013. **65**(1): p. 80-88.
 171. Ki Choi, S., et al., *Light-controlled release of caged doxorubicin from folate receptor-targeting PAMAM dendrimer nanoconjugate*. Chemical Communications, 2010. **46**(15): p. 2632-2634.
 172. Couvreur, P., *Nanoparticles in drug delivery: Past, present and future*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2013. **65**(1): p. 21-23.
 173. Zeng, X., et al., *Hyperbranched copolymer micelles as delivery vehicles of doxorubicin in breast cancer cells*. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2012. **50**(2): p. 280-288.
 174. Gingras, M., J.-M. Raimundo, and Y.M. Chabre, *Cleavable Dendrimers*. Angewandte Chemie International Edition, 2007. **46**(7): p. 1010-1017.
 175. Jain, R.K. and T. Stylianopoulos, *Delivering nanomedicine to solid tumors*. Nature Reviews. Clinical Oncology, 2010. **7**(11): p. 653-664.
 176. Peer, D., et al., *Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy*. Nature Nanotechnology, 2007. **2**(12): p. 751-760.

177. Maeda, H., et al., *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review*. Journal of Controlled Release, 2000. **65**(1-2): p. 271-284.
178. Brannon-Peppas, L. and J.O. Blanchette, *Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004. **56**(11): p. 1649-1659.
179. Maeda, H., et al., *Conjugation of poly(styrene-co-maleic acid) derivatives to the antitumor protein neocarzinostatin: pronounced improvements in pharmacological properties*. Journal of Medicinal Chemistry, 1985. **28**(4): p. 455-461.
180. Matsumura, Y. and H. Maeda, *A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs*. Cancer Research, 1986. **46**(12 Part 1): p. 6387-6392.
181. Yamashita, F. and M. Hashida, *Pharmacokinetic considerations for targeted drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2013. **65**(1): p. 139-147.
182. Rippe, B., et al., *Transendothelial Transport: The Vesicle Controversy*. Journal of Vascular Research, 2002. **39**(5): p. 375-390.
183. Ballet, F., *Hepatic circulation: Potential for therapeutic intervention*. Pharmacology & Therapeutics, 1990. **47**(2): p. 281-328.
184. Hobbs, S.K., et al., *Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(8): p. 4607-4612.
185. Reul, R., et al., *Nanoparticles for paclitaxel delivery: A comparative study of different types of dendritic polyesters and their degradation behavior*. International Journal of Pharmaceutics, 2011. **407**(1-2): p. 190-196.
186. Tripathi, P.K., et al., *Dendrimer grafts for delivery of 5-fluorouracil*. Die Pharmazie, 2002. **57**(4): p. 261-264.
187. Chooi, K.W., et al., *The Molecular Shape of Poly(propyleneimine) Dendrimer Amphiphiles Has a Profound Effect on Their Self Assembly*. Langmuir, 2009. **26**(4): p. 2301-2316.
188. Percec, V., et al., *Self-Assembly of Janus Dendrimers into Uniform Dendrimersomes and Other Complex Architectures*. Science, 2010. **328**(5981): p. 1009-1014.
189. Kim, T.-I., et al., *PAMAM-PEG-PAMAM: Novel Triblock Copolymer as a Biocompatible and Efficient Gene Delivery Carrier*. Biomacromolecules, 2004. **5**(6): p. 2487-2492.
190. Choi, J.S., et al., *Poly(ethylene glycol)-block-poly(L-lysine) Dendrimer: Novel Linear Polymer/Dendrimer Block Copolymer Forming a Spherical Water-Soluble Polyionic Complex with DNA*. Bioconjugate Chemistry, 1998. **10**(1): p. 62-65.
191. Fréchet, J.M.J., et al., *Modification of Surfaces and Interfaces by Non-covalent Assembly of Hybrid Linear-Dendritic Block Copolymers: Poly(benzyl ether) Dendrons as Anchors for Poly(ethylene glycol) Chains on Cellulose or Polyester*. Chemistry of Materials, 1999. **11**(5): p. 1267-1274.
192. Doane, T. and C. Burda, *Nanoparticle mediated non-covalent drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2013. **65**(5): p. 607-621.
193. Juliano, R., G. Poste, and E. Tomlinson, *Perspective from the founding editors*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2013. **65**(1): p. 3-4.
194. Crommelin, D.J.A. and A.T. Florence, *Towards more effective advanced drug delivery systems*. International Journal of Pharmaceutics, 2013. **454**(1): p. 496-511.

195. Prajapati, R.N., et al., *Dendrimer-Mediated Solubilization, Formulation Development and in Vitro-in Vivo Assessment of Piroxicam*. *Molecular Pharmaceutics*, 2009. **6**(3): p. 940-950.
196. Chauhan, A.S., et al., *Solubility Enhancement of Indomethacin with Poly(amidoamine) Dendrimers and Targeting to Inflammatory Regions of Arthritic Rats*. *Journal of Drug Targeting*, 2004. **12**(9-10): p. 575-583.
197. Chandrasekar, D., et al., *The development of folate-PAMAM dendrimer conjugates for targeted delivery of anti-arthritic drugs and their pharmacokinetics and biodistribution in arthritic rats*. *Biomaterials*, 2007. **28**(3): p. 504-512.
198. Gupta, U., H.B. Agashe, and N.K. Jain, *Polypropylene Imine Dendrimer Mediated Solubility Enhancement: Effect of pH and Functional Groups of Hydrophobes*. *J Pharm Pharmaceut Sci* (www.cspscanada.org) 2007. **10**(3): p. 358-367.
199. Asthana, A., et al., *Poly(amidoamine) (PAMAM) dendritic nanostructures for controlled sitespecific delivery of acidic anti-inflammatory active ingredient*. *AAPS PharmSciTech*, 2005. **6**(3): p. E536-E542.
200. Na, M., et al., *Dendrimers as potential drug carriers. Part II. Prolonged delivery of ketoprofen by in vitro and in vivo studies*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2006. **41**(5): p. 670-674.
201. Yiyun, C., et al., *Transdermal delivery of nonsteroidal anti-inflammatory drugs mediated by polyamidoamine (PAMAM) dendrimers*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007. **96**(3): p. 595-602.
202. Naylor, A.M., et al., *Starburst dendrimers. 5. Molecular shape control*. *Journal of the American Chemical Society*, 1989. **111**(6): p. 2339-2341.
203. Hu, J., et al., *Host-Guest Chemistry and Physicochemical Properties of the Dendrimer-Mycophenolic Acid Complex*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008. **113**(1): p. 64-74.
204. Dutta, T. and N.K. Jain, *Targeting potential and anti-HIV activity of lamivudine loaded mannosylated poly (propyleneimine) dendrimer*. *Biochim Biophys Acta* 2007. **1770**(4): p. 681-686.
205. Bai, S., C. Thomas, and F. Ahsan, *Dendrimers as a carrier for pulmonary delivery of enoxaparin, a low-molecular weight heparin*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007. **96**(8): p. 2090-2106.
206. Vandamme, T.F. and L. Brobeck, *Poly(amidoamine) dendrimers as ophthalmic vehicles for ocular delivery of pilocarpine nitrate and tropicamide*. *Journal of Controlled Release*, 2005. **102**(1): p. 23-38.
207. Bhadra, D., S. Bhadra, and N.K. Jain, *PEGylated Peptide Dendrimeric Carriers for the Delivery of Antimalarial Drug Chloroquine Phosphate*. *Pharmaceutical Research*, 2006. **23**(3): p. 623-633.
208. Cheng, Y., et al., *External Electrostatic Interaction versus Internal Encapsulation between Cationic Dendrimers and Negatively Charged Drugs: Which Contributes More to Solubility Enhancement of the Drugs?* *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008. **112**(30): p. 8884-8890.
209. Ma, M., et al., *Evaluation of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers as drug carriers of anti-bacterial drugs using sulfamethoxazole (SMZ) as a model drug*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2007. **42**(1): p. 93-98.

210. Durairaj, C., et al., *Nanosized Dendritic Polyguanidilyated Translocators for Enhanced Solubility, Permeability, and Delivery of Gatifloxacin*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2010. **51**(11): p. 5804-5816.
211. Devarakonda, B., R.A. Hill, and M.M. de Villiers, *The effect of PAMAM dendrimer generation size and surface functional group on the aqueous solubility of nifedipine*. International Journal of Pharmaceutics, 2004. **284**(1-2): p. 133-140.
212. Beezer, A.E., et al., *Dendrimers as potential drug carriers; encapsulation of acidic hydrophobes within water soluble PAMAM derivatives*. Tetrahedron, 2003. **59**(22): p. 3873-3880.
213. Yiyun, C. and X. Tongwen, *Solubility of nicotinic acid in polyamidoamine dendrimer solutions*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2005. **40**(12): p. 1384-1389.
214. Maciejewski, M., *Concepts of trapping topologically by shell molecules*. Journal of Macromolecular Science. Chemistry, 1982. **A17**: p. 689-703.
215. D'Emanuele, A. and D. Attwood, *Dendrimer-drug interactions*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2005. **57**(15): p. 2147-2162.
216. Cheng, Y. and T. Xu, *The effect of dendrimers on the pharmacodynamic and pharmacokinetic behaviors of non-covalently or covalently attached drugs*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2008. **43**(11): p. 2291-2297.
217. Krämer, M., et al., *Dendritic Polyamines: Simple Access to New Materials with Defined Treelike Structures for Application in Nonviral Gene Delivery*. ChemBioChem, 2004. **5**(8): p. 1081-1087.
218. Jansen, J.F.G.A., E.M.M. de Brabander-van den Berg, and E.W. Meijer, *Encapsulation of Guest Molecules into a Dendritic Box*. Science, 1994. **266**(5188): p. 1226-1229.
219. Pan, G., et al., *Studies on PEGylated and Drug-Loaded PAMAM Dendrimers*. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 2005. **20**(1): p. 113-128.
220. Kojima, C., et al., *Synthesis of Polyamidoamine Dendrimers Having Poly(ethylene glycol) Grafts and Their Ability To Encapsulate Anticancer Drugs*. Bioconjugate Chemistry, 2000. **11**(6): p. 910-917.
221. Yang, H., J.J. Morris, and S.T. Lopina, *Polyethylene glycol-polyamidoamine dendritic micelle as solubility enhancer and the effect of the length of polyethylene glycol arms on the solubility of pyrene in water*. Journal of Colloid and Interface Science, 2004. **273**(1): p. 148-154.
222. Lee, H. and R.G. Larson, *Effects of PEGylation on the Size and Internal Structure of Dendrimers: Self-Penetration of Long PEG Chains into the Dendrimer Core*. Macromolecules, 2011. **44**(7): p. 2291-2298.
223. Dirksen, A. and L. De Cola, *Photo-induced processes in dendrimers*. Comptes Rendus Chimie, 2003. **6**(8-10): p. 873-882.
224. Azzelini, G.C., *Supramolecular effects in dendritic systems containing photoactive groups*. Anais da Academia Brasileira de Ciencias, 2000. **72**(1): p. 33-38.
225. Archut, A., et al., *Toward Photoswitchable Dendritic Hosts. Interaction between Azobenzene-Functionalized Dendrimers and Eosin*. Journal of the American Chemical Society, 1998. **120**(47): p. 12187-12191.
226. Puntoriero, F., et al., *Photoswitchable Dendritic Hosts: A Dendrimer with Peripheral Azobenzene Groups*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(35): p. 10714-10719.

227. Wiwattanapatapee, R., L. Lomlim, and K. Saramunee, *Dendrimers conjugates for colonic delivery of 5-aminosalicylic acid*. Journal of Controlled Release, 2003. **88**(1): p. 1-9.
228. Khopade, A.J., et al., *Effect of dendrimer on entrapment and release of bioactive from liposomes*. International Journal of Pharmaceutics, 2002. **232**(1-2): p. 157-162.
229. Twibanire, J.-d.A. and T.B. Grindley, *Polyester Dendrimers*. Polymers, 2012. **4**(1): p. 794-879.
230. Liu, M., K. Kono, and J.M.J. Fréchet, *Water-soluble dendritic unimolecular micelles: Their potential as drug delivery agents*. Journal of Controlled Release, 2000. **65**(1-2): p. 121-131.
231. Lee, H. and T. Ooya, *¹⁹F-NMR, ¹H-NMR, and Fluorescence Studies of Interaction between 5-Fluorouracil and Polyglycerol Dendrimers*. The Journal of Physical Chemistry B, 2012. **116**(40): p. 12263-12267.
232. Namazi, H. and M. Adeli, *Dendrimers of citric acid and poly (ethylene glycol) as the new drug-delivery agents*. Biomaterials, 2005. **26**(10): p. 1175-1183.
233. Haririan, I., et al., *Anionic linear-globular dendrimer-cis-platinum (II) conjugates promote cytotoxicity in vitro against different cancer cell lines*. International Journal of Nanomedicine. , 2010. **5**: p. 63-75
234. Dhanikula, R.S., T. Hammady, and P. Hildgen, *On the mechanism and dynamics of uptake and permeation of polyether-copolyester dendrimers across an in vitro blood-brain barrier model*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009. **98**(10): p. 3748-60.
235. Malkoch, M., E. Malmström, and A. Hult, *Rapid and Efficient Synthesis of Aliphatic Ester Dendrons and Dendrimers*. Macromolecules, 2002. **35**(22): p. 8307-8314.
236. Gillies, E.R. and J.M.J. Fréchet, *Designing Macromolecules for Therapeutic Applications: Polyester Dendrimer-Poly(ethylene oxide) "Bow-Tie" Hybrids with Tunable Molecular Weight and Architecture*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(47): p. 14137-14146.
237. Hirayama, Y., et al., *Synthesis and Characterization of Polyester Dendrimers from Acetoacetate and Acrylate*. Organic Letters, 2005. **7**(4): p. 525-528.
238. Hirayama, Y., et al., *Synthesis of polyester dendrimers and dendrons starting from Michael reaction of acrylates with 3-hydroxyacetophenone*. Tetrahedron Letters, 2005. **46**(6): p. 1027-1030.
239. Chen, G., et al., *Efficient synthesis of dendrimers via a thiol-yne and esterification process and their potential application in the delivery of platinum anti-cancer drugs*. Chemical Communications, 2009. **0**(41): p. 6291-6293.
240. Bouillon, C., et al., *Synthesis of Poly(amino)ester Dendrimers via Active Cyanomethyl Ester Intermediates*. The Journal of Organic Chemistry, 2010. **75**(24): p. 8685-8688.
241. Ma, X., et al., *Facile Synthesis of Polyester Dendrimers as Drug Delivery Carriers*. Macromolecules, 2013. **46**(1): p. 37-42.
242. Giles, M.D., et al., *Dendronized Supramolecular Nanocapsules: pH Independent, Water-Soluble, Deep-Cavity Cavitands Assemble via the Hydrophobic Effect*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(44): p. 14430-14431.
243. www.polymerfactory.com (consulté en février 2013).
244. Zagar, E. and M. Zigon, *Characterization of a Commercial Hyperbranched Aliphatic Polyester Based on 2,2-Bis(methylol)propionic Acid*. Macromolecules, 2002. **35**(27): p. 9913-9925.

245. Zagar, E. and M. Zigon, *Aliphatic hyperbranched polyesters based on 2,2-bis(methylol)propionic acid: Determination of structure, solution and bulk properties*. Progress in Polymer Science, 2011. **36**(1): p. 53-88.
246. Domanska, U., K. Padiuszynski, and Z. Zolek-Tryznowska, *Liquid-Liquid Phase Equilibria of Binary Systems Containing Hyperbranched Polymer B-U3000: Experimental Study and Modeling in Terms of Lattice Cluster Theory*. Journal of Chemical & Engineering Data, 2010. **55**(9): p. 3842-3846.
247. Tripathi, P.K., et al., *Dendrimer grafts for delivery of 5-fluorouracil*. Pharmazie, 2002. **57**(4): p. 261-264.
248. Klajnert, B., et al., *Interactions between PAMAM dendrimers and bovine serum albumin*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2003. **1648**(1-2): p. 115-126.
249. Shcharbin, D., et al., *Dendrimer Interactions with Hydrophobic Fluorescent Probes and Human Serum Albumin*. Journal of Fluorescence, 2005. **15**(1): p. 21-28.
250. Homsy, C.A., et al., *Rapid In Vitro Screening of Polymers for Biocompatibility*. Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry, 1970. **4**(3): p. 615-634.
251. <http://en.wikipedia.org/wiki/Biocompatibility> (consulté en janvier 2013).
252. Williams, D.F., *On the mechanisms of biocompatibility*. Biomaterials, 2008. **29**(20): p. 2941-2953.
253. *Le Portail Terminologique de Santé (PTS) du Catalogue et Index des Sites Médicaux de langue Française (CISMeF), à base du CHU de Rouen (LITIS EA 4108, Université de Rouen, France; <http://www.chu-rouen.fr>): <http://www.pts.chu-rouen.fr> (consulté en février 2013)*.
254. Duncan, R. and L. Izzo, *Dendrimer biocompatibility and toxicity*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2005. **57**(15): p. 2215-2237.
255. Toyama, T., et al., *A case of toxic epidermal necrolysis-like dermatitis evolving from contact dermatitis of the hands associated with exposure to dendrimers*. Contact Dermatitis, 2008. **59**(2): p. 122-123.
256. Berry, C.C. and A.S.G. Curtis, *Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine*. Journal of Physics. D, Applied Physics, 2003. **36**: p. R198-R206.
257. Berry, C.C., *Progress in functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine*. Journal of Physics. D, Applied Physics, 2009. **42**(22): p. 221012-224003.
258. Roberts, J.C., M.K. Bhalgat, and R.T. Zera, *Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst™ dendrimers*. Journal of Biomedical Materials Research, 1996. **30**(1): p. 53-65.
259. Malik, N., et al., *Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo*. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society, 2000. **65**(1-2): p. 133-148.
260. Okuda, T., et al., *Biodistribution characteristics of amino acid dendrimers and their PEGylated derivatives after intravenous administration*. Journal of Controlled Release, 2006. **114**(1): p. 69-77.

261. Neerman, M.F., et al., *In vitro and in vivo evaluation of a melamine dendrimer as a vehicle for drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2004. **281**(1-2): p. 129-132.
262. Boyd, B.J., et al., *Cationic Poly-l-lysine Dendrimers: Pharmacokinetics, Biodistribution, and Evidence for Metabolism and Bioresorption after Intravenous Administration to Rats*. Molecular Pharmaceutics, 2006. **3**(5): p. 614-627.
263. King Heiden, T.C., et al., *Developmental toxicity of low generation PAMAM dendrimers in zebrafish*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2007. **225**(1): p. 70-79.
264. Kaminskas, L.M., et al., *Impact of Surface Derivatization of Poly-l-lysine Dendrimers with Anionic Arylsulfonate or Succinate Groups on Intravenous Pharmacokinetics and Disposition*. Molecular Pharmaceutics, 2007. **4**(6): p. 949-961.
265. Bourne, N., et al., *Dendrimers, a New Class of Candidate Topical Microbicides with Activity against Herpes Simplex Virus Infection*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000. **44**(9): p. 2471-2474.
266. Gong, Y., et al., *Evidence of dual sites of action of dendrimers: SPL-2999 inhibits both virus entry and late stages of herpes simplex virus replication*. Antiviral Research, 2002. **55**(2): p. 319-329.
267. Witvrouw, M., et al., *Polyanionic (i.e., polysulfonate) dendrimers can inhibit the replication of human immunodeficiency virus by interfering with both virus adsorption and later steps (reverse transcriptase/integrase) in the virus replicative cycle*. Mol Pharmacol., 2000. **58**(5): p. 1100-1108.
268. Patton, D.L., et al., *Preclinical Safety and Efficacy Assessments of Dendrimer-Based (SPL7013) Microbicide Gel Formulations in a Nonhuman Primate Model*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006. **50**(5): p. 1696-1700.
269. Kaminskas, L.M., et al., *The Impact of Molecular Weight and PEG Chain Length on the Systemic Pharmacokinetics of PEGylated Poly l-Lysine Dendrimers*. Molecular Pharmaceutics, 2008. **5**(3): p. 449-463.
270. Gajbhiye, V., et al., *Pharmaceutical and Biomedical Potential of PEGylated Dendrimers*. Current Pharmaceutical Design, 2007. **13**(4): p. 415-429.
271. Chen, H.-T., et al., *Cytotoxicity, Hemolysis, and Acute in Vivo Toxicity of Dendrimers Based on Melamine, Candidate Vehicles for Drug Delivery*. Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(32): p. 10044-10048.
272. Guillaudeu, S.J., et al., *PEGylated Dendrimers with Core Functionality for Biological Applications*. Bioconjugate Chemistry, 2008. **19**(2): p. 461-469.
273. Kaminskas, L.M., et al., *PEGylation of polylysine dendrimers improves absorption and lymphatic targeting following SC administration in rats*. Journal of Controlled Release, 2009. **140**(2): p. 108-116.
274. Kaminskas, L.M., et al., *Partly-PEGylated Poly-L-lysine dendrimers have reduced plasma stability and circulation times compared with fully PEGylated dendrimers*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009. **98**(10): p. 3871-3875.
275. Florence, A.T., T. Sakthivel, and I. Toth, *Oral uptake and translocation of a polylysine dendrimer with a lipid surface*. Journal of Controlled Release, 2000. **65**(1-2): p. 253-259.

276. Gillies, E.R., et al., *Biological Evaluation of Polyester Dendrimer: Poly(ethylene oxide) Bow-Tie Hybrids with Tunable Molecular Weight and Architecture*. *Molecular Pharmaceutics*, 2005. **2**(2): p. 129-138.
277. El-Sayed, M., et al., *Extravasation of Poly(amidoamine) (pamam) Dendrimers Across Microvascular Network Endothelium*. *Pharmaceutical Research*, 2001. **18**(1): p. 23-28.
278. Menjoge, A.R., et al., *Transfer of PAMAM dendrimers across human placenta: Prospects of its use as drug carrier during pregnancy*. *Journal of Controlled Release*, 2011. **150**(3): p. 326-338.
279. Wiwattanapatapee, R., et al., *Anionic PAMAM Dendrimers Rapidly Cross Adult Rat Intestine In Vitro: A Potential Oral Delivery System?* *Pharmaceutical Research*, 2000. **17**(8): p. 991-998.
280. Carnahan, M.A., et al., *Hybrid Dendritic-Linear Polyester-Ethers for in Situ Photopolymerization*. *Journal of the American Chemical Society*, 2002. **124**(19): p. 5291-5293.
281. Grinstaff, M.W., *Biodendrimers: New Polymeric Biomaterials for Tissue Engineering*. *Chemistry – A European Journal*, 2002. **8**(13): p. 2838-2846.
282. Kuo, J.-H.S., M.-S. Jan, and Y.-L. Lin, *Interactions between U-937 human macrophages and poly(propyleneimine) dendrimers*. *Journal of Controlled Release*, 2007. **120**(1-2): p. 51-59.
283. Hong, S., et al., *Interaction of Poly(amidoamine) Dendrimers with Supported Lipid Bilayers and Cells: Hole Formation and the Relation to Transport*. *Bioconjugate Chemistry*, 2004. **15**(4): p. 774-782.
284. Fischer, D., et al., *In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis*. *Biomaterials*, 2003. **24**(7): p. 1121-1131.
285. Jevprasesphant, R., et al., *The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2003. **252**(1-2): p. 263-266.
286. Purohit, G., T. Sakthivel, and A.T. Florence, *Interaction of cationic partial dendrimers with charged and neutral liposomes*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001. **214**(1-2): p. 71-76.
287. Stasko, N.A., et al., *Cytotoxicity of Polypropylenimine Dendrimer Conjugates on Cultured Endothelial Cells*. *Biomacromolecules*, 2007. **8**(12): p. 3853-3859.
288. Haensler, J. and F.C. Szoka, *Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture*. *Bioconjugate Chemistry*, 1993. **4**(5): p. 372-379.
289. Chen, C.Z. and S.L. Cooper, *Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes*. *Biomaterials*, 2002. **23**(16): p. 3359-3368.
290. El-Sayed, M., et al., *Transepithelial transport of poly(amidoamine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers*. *Journal of Controlled Release*, 2002. **81**(3): p. 355-365.
291. Yang, H. and W.J. Kao, *Synthesis and characterization of nanoscale dendritic RGD clusters for potential applications in tissue engineering and drug delivery*. *International journal of nanomedicine*, 2007. **2**(1): p. 89.
292. Lee, J.H., et al., *Polyplexes Assembled with Internally Quaternized PAMAM-OH Dendrimer and Plasmid DNA Have a Neutral Surface and Gene Delivery Potency*. *Bioconjugate Chemistry*, 2003. **14**(6): p. 1214-1221.
293. Goddard, P., et al., *Soluble Polymeric Carriers for Drug Delivery: Part 4. Tissue Autoradiography, and Whole-Body Tissue Distribution in Mice, of N-(2-*

- Hydroxypropyl)Methacrylamide Copolymers Following Intravenous Administration.* Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 1991. **6**(1): p. 4-24.
294. Lloyd, J.B., *Lysosome membrane permeability: implications for drug delivery.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2000. **41**(2): p. 189-200.
295. Seebach, D., et al., *Synthese und enzymatischer Abbau von Dendrimeren aus (R)-3-Hydroxybuttersäure und Trimesinsäure.* Angewandte Chemie, 1996. **108**(23-24): p. 2969-2972.
296. Gingras, M. and M. Roy, *Degradable dendrimers for drug delivery*, in *Dendrimer-based drug delivery systems: From theory to practice*, C. Yiyun, Editor. 2012, John Wiley&Sons Inc.: Hoboken, NJ. p. 239-252.
297. Kurtoglu, Y.E., et al., *Poly(amidoamine) dendrimer-drug conjugates with disulfide linkages for intracellular drug delivery.* Biomaterials, 2009. **30**(11): p. 2112-2121.
298. Liu, H., et al., *Disulfide Cross-Linked Low Generation Dendrimers with High Gene Transfection Efficacy, Low Cytotoxicity, and Low Cost.* Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(42): p. 17680-17687.
299. Amir, R.J., et al., *Self-Immolative Dendrimers.* Angewandte Chemie International Edition, 2003. **42**(37): p. 4494-4499.
300. Shabat, D., et al., *Chemical Adaptor Systems.* Chemistry – A European Journal, 2004. **10**(11): p. 2626-2634.
301. de Groot, F.M.H., et al., *“Cascade-Release Dendrimers” Liberate All End Groups upon a Single Triggering Event in the Dendritic Core.* Angewandte Chemie International Edition, 2003. **42**(37): p. 4490-4494.
302. Szalai, M.L., R.M. Kevitch, and D.V. McGrath, *Geometric Disassembly of Dendrimers: Dendritic Amplification.* Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(51): p. 15688-15689.
303. Ramage, G., et al., *Fungal Biofilm Resistance.* International Journal of Microbiology, 2012. **2012**(Article ID 528521).
304. Fanning, S. and A.P. Mitchell, *Fungal Biofilms.* PLoS Pathog 2012. **8**(4): p. e1002585.
305. Ramage, G., et al., *Our Current Understanding of Fungal Biofilms.* Critical Reviews in Microbiology, 2009. **35**(4): p. 340-355.
306. Chandra, J., et al., *Biofilm formation by the fungal pathogen Candida albicans: development, architecture, and drug resistance.* Journal of Bacteriology, 2001. **183**(18): p. 5385-94.
307. Bell, A.S., *Triazole antifungals: itraconazole (Sporanox), fluconazole (Diflucan), voriconazole (Vfend), and fosfluconazole (Prodif),* in *The art of drug synthesis*, D.S. Johnson and J.J. Li, Editors. 2007, Wiley-Interscience, A John Wiley & Sons Inc. p. 71-82.
308. www.janssenpharmaceutica.be, en.wikipedia.org/wiki/Janssen_Pharmaceutica (consulté en février 2013).
309. Grant, S.M. and S.P. Clissold, *Itraconazole. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in superficial and systemic mycoses.* Drugs, 1989. **37**(3): p. 310-44.
310. *Sporanox® (itraconazole) capsules: prescribing information.* PriCara, Division of Ortho-McNeil-Janssen Pharmaceuticals Inc., Raritan, NJ. 2009.
311. Jain, S. and V.N. Sehgal, *Itraconazole: an effective oral antifungal for onychomycosis.* International Journal of Dermatology, 2001. **40**(1): p. 1-5.

312. Moffat, A.C., M.D. Osselton, and B. Widdop, eds. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. 3 ed., ed. L.Y. Galichet. 2003; Electronic version presented on the website www.medicinescomplete.com (consulté en février 2012).
313. Jung, H., et al., *Laponite-based nanohybrid for enhanced solubility and controlled release of itraconazole*. International Journal of Pharmaceutics, 2008. **349**(1-2): p. 283-90.
314. Sweetman, S.C., ed. *Martindale: The Complete Drug Reference*. 36 ed. 2009, London: Pharmaceutical Press. Electronic version presented on the website www.medicinescomplete.com (consulté en 2012).
315. Rhee, Y.S., et al., *Formulation of parenteral microemulsion containing itraconazole*. Archives of Pharmacal Research, 2007. **30**(1): p. 114-23.
316. Buchanan, C.M., et al., *Pharmacokinetics of itraconazole after intravenous and oral dosing of itraconazole-cyclodextrin formulations*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007. **96**(11): p. 3100-3116.
317. Al-Badr, A.A. and H.I. El-Subbagh, *Itraconazole: Comprehensive Profile in Profiles of drug substances, excipients and related methodology*, A.A. Al-Badr and A.K. Dash, Editors. 2009, Elsevier: Academic Press. p. 193-264.
318. Koks, C.H., et al., *Itraconazole solution: summary of pharmacokinetic features and review of activity in the treatment of fluconazole-resistant oral candidosis in HIV-infected persons*. Pharmacological Research, 2002. **46**(2): p. 195-201.
319. <http://www.mongabay.com/health/medications/Sporanox.html> (consulté en novembre 2010).
320. Cauwenbergh, G., et al., *Itraconazole in the treatment of human mycoses: review of three years of clinical experience*. Reviews of Infectious Diseases, 1987. **9 Suppl 1**: p. S146-52.
321. Denning, D.W., et al., *NIAID Mycoses Study Group Multicenter Trial of Oral Itraconazole Therapy for Invasive Aspergillosis*. The American Journal of Medicine, 1994. **97**(2): p. 135-44.
322. Glasmacher, A., et al., *Itraconazole prevents invasive fungal infections in neutropenic patients treated for hematologic malignancies: evidence from a meta-analysis of 3,597 patients*. Journal of Clinical Oncology, 2003. **21**(24): p. 4615-26.
323. Graybill, J.R., et al., *Randomized trial of itraconazole oral solution for oropharyngeal candidiasis in HIV/AIDS patients*. The American Journal of Medicine, 1998. **104**(1): p. 33-9.
324. Graybill, J.R., *Itraconazole: managing mycotic complications in immunocompromised patients*. Seminars in Oncology, 1998. **25**(3 Suppl 7): p. 58-63.
325. Mondal, R.K., et al., *Randomized comparison between fluconazole and itraconazole for the treatment of candidemia in a pediatric intensive care unit: a preliminary study*. Pediatric Critical Care Medicine, 2004. **5**(6): p. 561-5.
326. Van Cutsem, J., J. Fransen, and P.A. Janssen, *Therapeutic efficacy of itraconazole in systemic candidosis in guinea pigs*. Chemotherapy, 1987. **33**(1): p. 52-60.
327. Van Cutsem, J., F. Van Gerven, and P.A. Janssen, *Activity of orally, topically, and parenterally administered itraconazole in the treatment of superficial and deep mycoses: animal models*. Reviews of Infectious Diseases, 1987. **9 Suppl 1**: p. S15-32.

328. Wheat, J., et al., *Itraconazole treatment of disseminated histoplasmosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome*. AIDS Clinical Trial Group. The American Journal of Medicine, 1995. **98**(4): p. 336-42.
329. Kapsi, S.G. and J.W. Ayres, *Processing factors in development of solid solution formulation of itraconazole for enhancement of drug dissolution and bioavailability*. International Journal of Pharmaceutics, 2001. **229**(1-2): p. 193-203.
330. Woo, J. and H. Yi, *Antifungal oral composition containing itraconazole and process for preparing same*. 2000: Patent US006039981.
331. Verreck, G., et al., *Characterization of solid dispersions of itraconazole and hydroxypropylmethylcellulose prepared by melt extrusion. Part I*. International Journal of Pharmaceutics, 2003. **251**(1-2): p. 165-74.
332. Six, K., et al., *Clinical study of solid dispersions of itraconazole prepared by hot-stage extrusion*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005. **24**(2-3): p. 179-186.
333. Peeters, J., et al., *Characterization of the interaction of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin with itraconazole at pH 2, 4, and 7*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2002. **91**(6): p. 1414-1422.
334. Miyake, K., et al., *Characterization of itraconazole/2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex in aqueous propylene glycol solution*. International Journal of Pharmaceutics, 1999. **179**(2): p. 237-45.
335. Rambali, B., et al., *Itraconazole formulation studies of the melt-extrusion process with mixture design*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2003. **29**(6): p. 641-52.
336. Want, D., *Liposomal itraconazole formulations*. 1993: Patent WO1993015719
337. Dong, W.L., *Itraconazole liposome and preparation process thereof*. 2007: Patent CN1969830.
338. Rhee, Y.S., et al., *Behavior of itraconazole and benzyl alcohol in aqueous solution containing nonionic surfactants*. Archives of Pharmacal Research, 2007. **30**(2): p. 240-8.
339. Patel, N.R., et al., *Itraconazole-loaded poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles for improved antifungal activity*. Nanomedicine, 2010. **5**(7): p. 1037-1050.
340. Essa, S., et al., *Improved antifungal activity of itraconazole-loaded PEG/PLA nanoparticles*. Journal of Microencapsulation, 2013. **30**(3): p. 205-217.
341. Le Dévédec, F., et al., *PEGylated Bile Acids for Use in Drug Delivery Systems: Enhanced Solubility and Bioavailability of Itraconazole*. Molecular Pharmaceutics, 2013; doi:10.1021/mp400117m.
342. Kim, J.-K., J.-S. Park, and C.-K. Kim, *Development of a binary lipid nanoparticles formulation of itraconazole for parenteral administration and controlled release*. International Journal of Pharmaceutics, 2010. **383**(1-2): p. 209-215.
343. Perrett, S. and G. Venkatesh, *Enhancing the Bioavailability of Insoluble Drug Compounds*. Innovations in Pharmaceutical Technology, 2006(19): p. 80-85.
344. Gilis, P.M.V., V.F.V. De Conde, and R.P.G. Vandecruys, *Beads having a core coated with an antifungal and a polymer*. 1997: Patent US005633015.
345. De Beule, K., *Itraconazole: Pharmacology, clinical experience and future development* International Journal of Antimicrobial Agents, 1996. **6**: p. 175-181.
346. *Sporanox® (itraconazole). Oral solution: prescribing information*. Ortho-Biotech, Raritan, NJ. 2003.

347. Office Européen des brevets, <http://www.epo.org/searching/free/espacenet.html> (consulté en février 2013).
348. Centre canadien d'hygiène et de sécurité au travail, <http://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/ld50.html> (consulté en juin 2013).
349. United States National Library of Medicine. Toxicity: <http://chem.sis.nlm.nih.gov> (consulté en juin 2013).
350. Price, C.J., *Final study report on developmental toxicity evaluation for 1,2,3,4-butanetetracarboxylic acid (CAS. No. 1703-58-8) administered by gavage to Sprague-Dawley (CD \bar{N}) rats from gestational day 6 through 19*. NTIS Technical Report (NTIS/PB99-166712), 1999(Jul): p. 106 pp.
351. George, J.D., et al., *Developmental toxicity evaluation of 1,2,3,4-butanetetracarboxylic acid in Sprague Dawley (CD) rats*. Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.), 2001. **15**(4): p. 413-420.
352. Padias, A.B., et al., *Starburst polyether dendrimers*. The Journal of Organic Chemistry, 1987. **52**(24): p. 5305-5312.
353. Carnahan, M.A. and M.W. Grinstaff, *Synthesis and Characterization of Poly(glycerol \bar{a} 'succinic acid) Dendrimers*. Macromolecules, 2001. **34**(22): p. 7648-7655.
354. Luman, N., T. Kim, and M. Grinstaff, *Dendritic polymers composed of glycerol and succinic acid: Synthetic methodologies and medical applications*. Pure and Applied Chemistry, 2004. **76**(7): p. 1375-1386.
355. Carnahan, M.A., et al., *Hybrid dendritic-linear polyester-ethers for in situ photopolymerization*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(19): p. 5291-5293.
356. Huang, C.-F., et al., *Star polymers via atom transfer radical polymerization from adamantane-based cores*. Polymer, 2004. **45**(7): p. 2261-2269.
357. http://sdbs.riodb.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi (consulté en mars 2013).
358. Alvarez, F. and A.N. Watt, *Steroids. CCCXI. Degradation of stigmasterol to 3.beta.-5.alpha.,6.beta.-trihydroxy-23,24-bisnorcholan-22-oic acid*. The Journal of Organic Chemistry, 1968. **33**(5): p. 2143-2144.
359. Shaw, J.E. and D.C. Kunerth, *Quantitative conversion of carboxylic acids and phenols to esters and ethers by reaction of their salts with alkyl halides*. The Journal of Organic Chemistry, 1974. **39**(13): p. 1968-1970.
360. Larock, R.C., *Mercury in organic chemistry. V. Direct esterification of alkyl halides*. The Journal of Organic Chemistry, 1974. **39**(25): p. 3721-3727.
361. Pfeffer, P.E. and L.S. Silbert, *Esterification by alkylation of carboxylate salts. Influence of steric factors and other parameters on reaction rates*. The Journal of Organic Chemistry, 1976. **41**(8): p. 1373-1379.
362. Brinchi, L., R. Germani, and G. Savelli, *Ionic liquids as reaction media for esterification of carboxylate sodium salts with alkyl halides*. Tetrahedron Letters, 2003. **44**(10): p. 2027-2029.
363. March, J., *Advanced organic chemistry : reactions, mechanisms, and structure*. 4th ed. 1992, New York: Wiley. xv, 1495 p.
364. Agami, C. and F.o. Couty, *Enantioselective Synthesis of Pipecolic Acid Derivatives via an Ene-Iminium Cyclization*. Synlett, 1990. **1990**(12): p. 731,732.
365. <http://avogadro.chem.iastate.edu/MSDS/dextrose.htm> (consulté en mars 2013).

366. Beilstein, F., *Ueber den Nachweis von Chlor, Brom und Jod in organischen Substanzen*. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1872. **5**(2): p. 620-621.
367. Tietze, L.-F., *Reactions and syntheses in the organic chemistry laboratory*. 2007, Weinheim: Wiley-VCH. xvi, 582 p.
368. Volhard, J., *Ueber Darstellung α -bromirter Säuren*. Justus Liebigs Annalen der Chemie, 1887. **242**(1-2): p. 141-163.
369. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST, Japan). Spectral database for organic compounds SDBS. http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_search.cgi (consulté en décembre 2013).
370. Anner, G., J. Heer, and K. Miescher, *Über Steroide. 51. Mitteilung. Über weitere Derivate und Abkömmlinge der Bisdehydro-doisylnsäure und einige verwandte Verbindungen. Über oestrogene Carbonsäuren IX*. Helvetica Chimica Acta, 1946. **29**(5): p. 1071-1080.
371. Kyrides, L.P., *Phthalyl Chloride*. Journal of the American Chemical Society, 1937. **59**(1): p. 206-208.
372. Ruggli, P. and A. Maeder, *Die Reaktion von Succinylchlorid mit Natrium-malonester I. Über den sog. Succinyl-malonester (2-Butanoliden-malonester) und den Succinyl-dimalonester. (1. Mitteilung über Ketonsäuren, Enol-lactone und Ringketone)*. Helvetica Chimica Acta, 1943. **26**(5): p. 1476-1498.
373. von Hilgetag, G. and A. Martini, *Weygand-Hilgetag: Organisch-chemische Experimentierkunst. 3. Neubearbeitete Auflage* 1964: Johann Ambrosius Barth, Verlag, Leipzig; Khimia, Moscow, 1968.
374. Wilds, A.L. and C.H. Shunk, *The Preparation of Desoxycorticosterone Acetate from 3-Keto- α - μ 4-etiocholenic Acid*. Journal of the American Chemical Society, 1948. **70**(7): p. 2427-2428.
375. Meyer, H., *Über eine allgemein anwendbare Methode zur Darstellung von Chloriden der organischen Säuren*. Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly, 1901. **22**(5): p. 415-442.
376. van der Plas, H.C., *Ring transformations of heterocycles*. Organic chemistry a series of monographs. Vol. 27. 1973, London, New York: Academic Press.
377. Patai, S., *Chemistry of ethers, crown ethers, hydroxyl groups and their sulphur analogues*. The Chemistry of functional groups. Supplement E. 1980, Chichester [Eng.]; New York: J. Wiley.
378. <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/jsp/common/Toxicity.jsp?calledFrom=lite> (consulté en avril 2013).
379. <http://www.clearsynth.com/docs/MSD-CS-T-07396.pdf> (consulté en avril 2013).
380. Sharma, B., et al., *Chemical modification of vegetable oils for lubricant applications*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2006. **83**(2): p. 129-136.
381. Barsacq, J.-C., *Données économiques sur la production de matières grasses*, in *Manuel des corps gras*, A. Karleskind, Editor. 1992, Lavoisier: Paris. p. 8-25.
382. Gunstone, F.D., *Movements towards tailor-made fats*. Progress in Lipid Research, 1998. **37**(5): p. 277-305.
383. www.iterg.com (consulté en nov. 2010).
384. *Sources et monographies des principaux corps gras*, in *Manuel des corps gras*, A. Karleskind, Editor. 1992, Technique et Documentation - Lavoisier: Paris. p. 116-316.

385. Padley, F.B., F.D. Gunstone, and J.L. Harwood, *Occurrence and characteristics of oils and fats*, in *The Lipid handbook*, F.D. Gunstone, J.L. Harwood, and F.B. Padley, Editors. 1994, Chapman and Hall: London ; New York. p. 47-223.
386. <http://www.internationaloliveoil.org> (consulté en décembre 2010).
387. <http://naooa.mytradeassociation.org>. (consulté en décembre 2010).
388. Fedeli, E., *Miscellaneous exotic oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1983. **60**(2): p. 404-406.
389. Frankel, E.N., et al., *Tests indicate that imported "extra virgin" olive oil often fails international and USDA standards, Report of UC Davis Olive Center, July 2010, Robert Mondavi Institute for Wine and Food Science, University of California, UC Regents, Davis campus, CA, USA*.
390. Mordret, F., *Analyse des constituants mineurs*, in *Manuel des corps gras*, A. Karleskind, Editor. 1992, Lavoisier: Paris. p. 1171-1182.
391. Gunstone, F.D., M. Kates, and J.L. Harwood, *Separation and isolation procedures*, in *The lipid handbook*, F.D. Gunstone, J.L. Harwood, and F.B. Padley, Editors. 1994, Chapman and Hall: London; New York. p. 225-248.
392. Sadeghi-Jorabchi, H., et al., *Determination of the total unsaturation in oils and margarines by fourier transform raman spectroscopy*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1990. **67**(8): p. 483-486.
393. Lopez Téllez, G., S. Viguera-Santiago, and S. Hernandez-Lopez, *Characterization of linseed oil epoxidized at different percentages*. Superficies y Vacío, 2009. **22**(1): p. 5-10.
394. Hendrikse, P.W., J.L. Harwood, and M. Kates, *Analytical methods*, in *The lipid handbook*, F.D. Gunstone, J.L. Harwood, and F.B. Padley, Editors. 1994, Chapman and Hall: London; New York. p. 319-358.
395. Diaz, M.F., G. J.A., and d.A. J.B., *Structural characterization by nuclear magnetic resonance of ozonized triolein*. Grasas y aceites, 2008. **59**(3): p. 274-281.
396. Vlahov, G., *Application of NMR to the study of olive oils*. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 1999. **35**(4): p. 341-357.
397. Ruiz-Gutierrez, V. and L.J. Barron, *Methods for the analysis of triacylglycerols*. J Chromatogr B Biomed Appl, 1995. **671**(1-2): p. 133-68.
398. Laakso, P. and H. Kallio, *Optimization of the mass spectrometric analysis of triacylglycerols using negative-ion chemical ionization with ammonia*. Lipids, 1996. **31**(1): p. 33-42.
399. Byrdwell, W.C., et al., *Quantitative analysis of triglycerides using atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry*. Lipids, 1996. **31**(9): p. 919-35.
400. Byrdwell, W.C. and W.E. Neff, *Qualitative and quantitative analysis of triacylglycerols using atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry*, in *New techniques and applications in lipid analysis*, R.E. McDonald and M.M. Mossoba, Editors. 1997, AOCS Press: Champaign, Illinois. p. 45-80.
401. Gunstone, F.D., J.L. Harwood, and A.J. Dijkstra, *The lipid handbook with CD-ROM*. 3rd ed. 2007, Boca Raton: CRC Press. xiii, 656 p.
402. Daniel, L., et al., *Synthesis and properties of highly branched *Jatropha curcas* L. oil derivatives*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2011. **113**(1): p. 18-30.

403. Petrović, Z.S., et al., *Epoxidation of soybean oil in toluene with peroxyacetic and peroxyformic acids — kinetics and side reactions*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2002. **104**(5): p. 293-299.
404. Ucciani, E. and A. Debal, *Propriétés chimiques des corps gras*, in *Manuel des corps gras*, A. Karleskind, Editor. 1992, Lavoisier: Paris. p. 317-431.
405. Swern, D., *Epoxidation and Hydroxylation of Ethylenic Compounds with Organic Peracids*, in *Organic Reactions*. 2004, John Wiley & Sons, Inc.
406. Hehner, O. and C.A. Mitchell, *Contribution to the chemistry of drying oils; with a method for the examination of linseed oil*. Analyst, 1898. **23**(December): p. 310-318.
407. <http://www.pepsiproductfacts.com> (consulté en décembre 2010).
408. von Hilgetag, G. and A. Martini, *Weygand-Hilgetag: Organisch-chemische Experimentierkunst. 3. Neubearbeitete Auflage*. 1964: Johann Ambrosius Barth, Verlag, Leipzig.
409. Becker, H., *Organicum; practical handbook of organic chemistry*. 1st English ed. 1973, Reading, Mass.: Addison-Wesley Pub. Co. xx, 747 p.
410. Gordon, A.J. and R.A. Ford, *The chemist's companion: a handbook of practical data, techniques, and references*. 1972, New York,: Wiley. xii, 537 p.
411. Plattner, J.J., R.D. Gless, and H. Rapoport, *Synthesis of some DE and CDE ring analogs of camptothecin*. Journal of the American Chemical Society, 1972. **94**(24): p. 8613-8615.
412. Borén, L., K. Leijondahl, and J.-E. Bäckvall, *Dynamic kinetic asymmetric transformation of 1,4-diols and the preparation of trans-2,5-disubstituted pyrrolidines*. Tetrahedron Letters, 2009. **50**(26): p. 3237-3240.
413. Seo, S., A. Uomori, and K.i. Takeda, *Direct observation of the reverse 1,5-hydride shift: the mechanism of acid-catalyzed isomerization at C-25 of spirostanols*. The Journal of Organic Chemistry, 1986. **51**(20): p. 3823-3827.
414. D'Alelio, G.F. and E.E. Reid, *Three Series of N-Substituted Aliphatic Amides I*. Journal of the American Chemical Society, 1937. **59**(1): p. 111-112.
415. Yamamoto, N., T. Nishikawa, and M. Isobe, *Synthesis of Bicyclic Hydroxy Lactone Intermediates toward (-)-Tetrodotoxin*. Synlett, 1995. **1995**(Sup. I): p. 505,506.
416. Solomon, D., et al., *A Synthetic Pentasaccharide with GTPase Activity*. Organic Letters, 2001. **3**(26): p. 4311-4314.
417. Yeom, C.-E., et al., *Mild and Chemoselective Deacetylation Method Using a Catalytic Amount of Acetyl Chloride in Methanol*. Synlett, 2005. **2005**(10): p. 1527-1530.
418. Dryuk, V.G., *The mechanism of epoxidation of olefins by peracids*. Tetrahedron, 1976. **32**(23): p. 2855-2866.
419. Gan, L., S. Goh, and K. Ooi, *Kinetic studies of epoxidation and oxirane cleavage of palm olein methyl esters*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1992. **69**(4): p. 347-351.
420. Swern, D., et al., *Hydroxylation of Monounsaturated Fatty Materials with Hydrogen Peroxide*. Journal of the American Chemical Society, 1945. **67**(10): p. 1786-1789.
421. Swern, D. and G.B. Dickel, *Chemistry of Epoxy Compounds. XV.1 Oxidation of Linoleic Acid with Peracetic and Performic Acid 2*. Journal of the American Chemical Society, 1954. **76**(7): p. 1957-1959.
422. Salimon, J. and N. Salih, *Substituted esters of octadecanoic acid as potential biolubricants*. European Journal of Scientific Research, 2009. **31**: p. 273-279.

423. Derawi, D. and J. Salimon, *Optimization on Epoxydation of Palm Olein by Using Performic Acid*. E-Journal of Chemistry, 2010. **7**(4): p. 1440-1448.
424. Hang, X. and H. Yang, *Model for a cascade continuous epoxidation process*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1999. **76**(1): p. 89-92.
425. Pan, X., P. Sengupta, and D.C. Webster, *Novel biobased epoxy compounds: epoxidized sucrose esters of fatty acids*. Green Chemistry. **13**(4): p. 965-975.
426. Lopez Tellez, G., E. Viguera-Santiago, and S. Hernandez-Lopez, *Characterization of linseed oil epoxidized at different percentages*. Superficies y Vacío, 2009. **22**(1): p. 5-10.
427. Reese, C.B. and J.C.M. Stewart, *Methoxyacetyl as a protecting group in ribonucleoside chemistry*. Tetrahedron Letters, 1968. **9**(40): p. 4273-4276.
428. Wuts, P.G.M. and T.W. Greene, *Greene's protective groups in organic synthesis*. 4th ed. 2007, Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience. xxviii, 1082 p.
429. Brown, J.B., H.B. Henbest, and E.R.H. Jones, *718. Studies on compounds related to auxin-a and auxin-b. Part III. The preparation and properties of the cyclopentenyl analogue of auxin-b lactone*. Journal of the Chemical Society (Resumed), 1950: p. 3634-3641.
430. Swern, D., J.T. Scanlan, and G.B. Dickel, *9,10-Dihydroxystearic acid*. Organic Syntheses, 1959. **39**: p. 15-17.
431. *CRC handbook of chemistry and physics*. 1977, CRC Press: Cleveland, Ohio. p. v.
432. Harry-O'kuru, R.E., *Novel sunscreen reagents from unsaturated waxes and triglycerides*. Patent US2004258635 A1 (2004).
433. *NMR library of American Oil Chemist's Society*, <http://lipidlibrary.aocs.org/nmr/nmr.html> (consulté en 2012)
434. Rios, L., D. Echeverri, and F. Cardeno, *Hydroxylation of vegetable oils using acidic resins as catalysts*. Industrial Crops and Products. **43**(0): p. 183-187.
435. Piazza, G.J., A. Nunez, and T.A. Foglia, *Isolation of unsaturated diols after oxidation of conjugated linoleic acid with peroxygenase*. Lipids, 2003. **38**(3): p. 255-261.
436. Criegee, R., B. Marchand, and H. Wannowius, *Zur Kenntnis der organischen Osmium-Verbindungen. II. Mitteilung*. Justus Liebigs Annalen der Chemie, 1942. **550**(1): p. 99-133.
437. Isaac, M.F. and S.B. Kahl, *Synthesis of ether- and carbon-linked polycarboranyl porphyrin dimers for cancer therapies*. Journal of Organometallic Chemistry, 2003. **680**(1-2): p. 232-243.
438. Milas, N.A. and S. Sussman, *The Hydroxylation of the Double Bond I*. Journal of the American Chemical Society, 1936. **58**(7): p. 1302-1304.
439. Milas, N.A. and S. Sussman, *The Hydroxylation of Unsaturated Substances. IV. The Catalytic Hydroxylation of Unsaturated Hydrocarbons I*. Journal of the American Chemical Society, 1937. **59**(11): p. 2345-2347.
440. Holba, V. and J. Muchova, *Instability of potassium permanganate solubilized in organic solvents*. Reaction kinetics and catalysis letters, 1986. **32**(2): p. 365-369.
441. Knop, K., et al., *Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives*. Angewandte Chemie. International Edition in English. **49**(36): p. 6288-308.
442. Pasut, G., M. Sergi, and F.M. Veronese, *Anti-cancer PEG-enzymes: 30 years old, but still a current approach*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008. **60**(1): p. 69-78.

443. Herold, D.A., K. Keil, and D.E. Bruns, *Oxidation of polyethylene glycols by alcohol dehydrogenase*. *Biochemical Pharmacology*, 1989. **38**(1): p. 73-76.
444. Pasut, G. and F.M. Veronese, *Polymer-drug conjugation, recent achievements and general strategies*. *Progress in Polymer Science*. **32**(8-9): p. 933-961.
445. Helferich, B., *Triyl Ethers of Carbohydrates*. *Advances in carbohydrate chemistry*, 1948. **3**: p. 79-111.
446. Kaats-Richters, V.E.M., et al., *Large Scale Monotrylation of Water Soluble Compounds Containing Multiple Hydroxyl Groups*. *Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry*, 1994. **24**(17): p. 2399-2409.
447. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~wZhpfr:1> (consulté en avril 2013).
448. <http://www.ecem.com/sales/data/DMBA.HTM> (consulté en avril 2013).
449. http://www.merckmillipore.com/turkey/chemicals/2-2-bishydroxymethylpropionic-acid/MDA_CHEM-814996/p_YZSb.s1LNv0AAAEWioEfVhTI (consulté en avril 2013).
450. Altin, H., I. Kosif, and R. Sanyal, *Fabrication of Clickable Hydrogels via Dendron-Polymer Conjugates*. *Macromolecules*, 2010. **43**(8): p. 3801-3808.
451. Trollsas, M., et al., *Constitutional isomers of dendrimer-like star polymers: design, synthesis, and conformational and structural properties*. *Macromolecules*, 2000. **33**(17): p. 6423-6438.
452. Ihre, H., O.L. Padilla De Jesus, and J.M. Frechet, *Fast and convenient divergent synthesis of aliphatic ester dendrimers by anhydride coupling*. *Journal of the American Chemical Society*, 2001. **123**(25): p. 5908-17.
453. Bruce, W., *Aconitic Acid*. *Organic Syntheses*, 1937. **17**: p. 1.
454. Coleman, R.S. and J.A. Shah, *Chemoselective Cleavage of Benzyl Ethers, Esters, and Carbamates in the Presence of Other Easily Reducible Groups*. *Synthesis*, 1999. **1999**(Sup. 1): p. 1399-1400.
455. Furuta, K., et al., *Chiral (acyloxy)borane complex-catalyzed asymmetric Diels-Alder reaction: (1R)-1,3,4-trimethyl-3-cyclohexene-1-carboxaldehyde*. *Organic Syntheses*, 1995. **72**: p. 86-92.
456. van der Poll, D.G., et al., *Design, Synthesis, and Biological Evaluation of a Robust, Biodegradable Dendrimer*. *Bioconjugate Chemistry*. **21**(4): p. 764-773.
457. Ullmann, F., et al., *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. 5th, completely rev. ed. 1985, Weinheim, Federal Republic of Germany ; Deerfield Beach, FL, USA: VCH. v. <A1-A28, B1-B8 >.
458. Lewdorowicz, M., et al., *Chemical synthesis and binding activity of the trypanosomatid cap-4 structure*. *RNA*, 2004. **10**(9): p. 1469-1478.
459. Back, T.G. and J.E. Wulff, *A Stereodivergent Synthesis of Virantmycin by an Enzyme-Mediated Diester Desymmetrization and a Highly Hindered Aryl Amination*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2004. **43**(47): p. 6493-6496.
460. Hassan, M.L., et al., *Thermoplasticization of bagasse. I. preparation and characterization of esterified bagasse fibers*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2000. **76**(4): p. 561-574.

461. Korhonen, H., A.O. Helminen, and J.V. Seppälä, *Synthesis of Poly(ester-anhydrides) Based on Different Polyester Precursors*. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2004. **205**(7): p. 937-945.
462. Heilbron, I., E.R.H. Jones, and F. Sondheimer, 315. *Researches on acetylenic compounds. Part XIV. A study of the reactions of the readily available ethynyl-ethylenic alcohol, pent-2-en-4-yn-1-ol*. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1947: p. 1586-1590.
463. Heilbron, I., E.R.H. Jones, and F. Sondheimer, 129. *Researches on acetylenic compounds. Part XV. The oxidation of primary acetylenic carbinols and glycols*. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1949: p. 604-607.
464. Menger, F.M. and V.A. Azov, *Cytomimetic Modeling in Which One Phospholipid Liposome Chemically Attacks Another*. *Journal of the American Chemical Society*, 2000. **122**(27): p. 6492-6493.
465. Tomlinson, I., *The design and synthesis of novel derivatives of the dopamine uptake inhibitors GBR 12909 and GBR 12935. High-affinity dopaminergic ligands for conjugation with highly fluorescent cadmium selenide/zinc sulfide core/shell nanocrystals*. *Tetrahedron*, 2003. **59**(40): p. 8035.
466. Oikawa, M., M. Ikoma, and M. Sasaki, *Alkoxyacetyl (AAc) group as a useful linker for organic synthesis on poly(ethylene glycol) support*. *Tetrahedron Letters*, 2004. **45**(11): p. 2371-2375.
467. Frisch, B.t., et al., *A New Triantennary Galactose-Targeted PEGylated Gene Carrier, Characterization of Its Complex with DNA, and Transfection of Hepatoma Cells*. *Bioconjugate Chemistry*, 2004. **15**(4): p. 754-764.
468. Gillies, E., *Development and biological assessment of fully water-soluble helical aromatic amide foldamers*. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 2007. **46**(22): p. 4081.
469. Pilkington-Miksa, M., *Synthesis of bifunctional integrin-binding peptides containing PEG spacers of defined length for non-viral gene delivery*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2008. **2008**(17): p. 2900.
470. Chen, B., et al., *Carbohydrate Rod Conjugates: Ternary Rod-Coil Molecules Forming Complex Liquid Crystal Structures*. *Journal of the American Chemical Society*, 2005. **127**(47): p. 16578-16591.
471. Pajk, S., *Synthesis of novel amphiphilic spin probes with the paramagnetic doxyl group in the polar region*. *Tetrahedron*, 2009. **65**(3): p. 659.
472. Holland, B.C. and N.W. Gilman, *An Improved Procedure for the Oxidation of Alkynols to Alkynoic Acids*. *Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry*, 1974. **4**(4): p. 203 - 210.
473. Zhao, M., et al., *A novel chromium trioxide catalyzed oxidation of primary alcohols to the carboxylic acids*. *Tetrahedron Letters*, 1998. **39**(30): p. 5323-5326.
474. Maiti, P.K., et al., *Structure of PAMAM Dendrimers: Generations 1 through 11*. *Macromolecules*, 2004. **37**(16): p. 6236-6254.
475. Maiti, P.K., et al., *Effect of Solvent and pH on the Structure of PAMAM Dendrimers*. *Macromolecules*, 2005. **38**(3): p. 979-991.
476. Huibmann, S., C.N. Likos, and R. Blaak, *Explicit vs Implicit Water Simulations of Charged Dendrimers*. *Macromolecules*. **45**(5): p. 2562-2569.

477. Liu, Y., et al., *PAMAM Dendrimers Undergo pH Responsive Conformational Changes without Swelling*. Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(8): p. 2798-2799.
478. Jang, S.S. and W.A. Goddard, *Structures and Transport Properties of Hydrated Water-Soluble Dendrimer-Grafted Polymer Membranes for Application to Polymer Electrolyte Membrane Fuel Cells: Classical Molecular Dynamics Approach*. The Journal of Physical Chemistry C, 2007. **111**(6): p. 2759-2769.
479. Miklis, P., T. Çagin, and W.A. Goddard, *Dynamics of Bengal Rose Encapsulated in the Meijer Dendrimer Box*. Journal of the American Chemical Society, 1997. **119**(32): p. 7458-7462.
480. Diallo, M.S., K. Falconer, and J.H. Johnson, *Dendritic Anion Hosts: Perchlorate Uptake by G5-NH₂ Poly(propyleneimine) Dendrimer in Water and Model Electrolyte Solutions*. Environmental Science & Technology, 2007. **41**(18): p. 6521-6527.
481. Diallo, M.S., et al., *Poly(amidoamine) Dendrimers: A New Class of High Capacity Chelating Agents for Cu(II) Ions*. Environmental Science & Technology, 1999. **33**(5): p. 820-824.
482. Giri, J., et al., *Interactions of Poly(amidoamine) Dendrimers with Human Serum Albumin: Binding Constants and Mechanisms*. ACS Nano. **5**(5): p. 3456-3468.
483. Cramer, C.J., *Essentials of computational chemistry : theories and models*. 2nd ed. 2004, Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ: Wiley. xx, 596 p.
484. М.Е. Соловьев, М.М. Соловьев *Компьютерная химия, Москва, СОЛОН-Пресс, 2005. - 536 с. (M.E. Soloviev, M.M. Soloviev Computer chemistry, Moscow, SOLON-Press, 2005. - 536 p. (in russian))*.
485. *HyperChem 7. Release 7. Tools for molecular modeling. Hypercube Inc. Publication HC70-00-01-00. January 2002, USA, 2170 P.*
486. Dhaon, M.K., R.K. Olsen, and K. Ramasamy, *Esterification of N-protected .alpha.-amino acids with alcohol/carbodiimide/4-(dimethylamino)pyridine. Racemization of aspartic and glutamic acid derivatives*. The Journal of Organic Chemistry, 1982. **47**(10): p. 1962-1965.
487. Asakura, J.-I., et al., *Removal of Acetal, Silyl, and 4,4'-Dimethoxytrityl Protecting Groups from Hydroxyl Functions of Carbohydrates and Nucleosides with Clay in Aqueous Methanol*. The Journal of Organic Chemistry, 1996. **61**(25): p. 9026-9027.
488. Dubber, M. and J.M.J. Fréchet, *Solid-Phase Synthesis of Multivalent Glycoconjugates on a DNA Synthesizer*. Bioconjugate Chemistry, 2002. **14**(1): p. 239-246.
489. Deng, M., N. Li, and Y. Huang, *(E)-beta,gamma-Unsaturated esters from 9-alkenyl-9-BBN and ethyl (dimethylsulfuranylidene)acetate*. The Journal of Organic Chemistry, 1992. **57**(14): p. 4017-4019.
490. Brown, H.C. and J. Chen, *Hydroboration. 57. Hydroboration with 9-borabicyclo[3.3.1]nonane of alkenes containing representative functional groups*. The Journal of Organic Chemistry, 1981. **46**(20): p. 3978-3988.
491. Brown, H.C. and C.F. Lane, *9-Borabicyclo[3.3.1]nonane. A Most Unusual Heterocyclic Dialkylborane*. Heterocycles, 1977. **7**(1): p. 453-485.
492. Otera, J. and J. Nishikido, *Esterification : methods, reactions, and applications*. 2nd completely rev. and enl. ed. 2010, Weinheim: Wiley-VCH. xi, 374 p.

493. Wang, S.-S., et al., *Facile synthesis of amino acid and peptide esters under mild conditions via cesium salts*. The Journal of Organic Chemistry, 1977. **42**(8): p. 1286-1290.
494. Dijkstra, G., W.H. Kruizinga, and R.M. Kellogg, *An assessment of the causes of the "cesium effect"*. The Journal of Organic Chemistry, 1987. **52**(19): p. 4230-4234.
495. Kruizinga, W.H., B. Strijtveen, and R.M. Kellogg, *Cesium carboxylates in dimethyl formamide. Reagents for introduction of hydroxyl groups by nucleophilic substitution and for inversion of configuration of secondary alcohols*. The Journal of Organic Chemistry, 1981. **46**(21): p. 4321-4323.
496. Cao, Y.Q., et al., *Practical Preparation of Esters and Thioacetates from Alkyl Halides and Carboxylates or Thioacetate Catalyzed by PEG400 without Solvent*. Synthetic Communications, 2006. **36**(22): p. 3353-3358.
497. Mitsunobu, O., *The use of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine in synthesis and transformation of natural products*. Synthesis, 1981. **1**(1981): p. 1-28.
498. Mitsunobu, O., et al., *Stereoselective and Stereospecific Reactions. III. Benzoylation, Cyclization, and Epimerization of Diols*. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1976. **49**(2): p. 510-513.
499. Tang, J.-l., J. Sun, and Z.-G. He, *Self-Emulsifying Drug Delivery Systems: Strategy for Improving Oral Delivery of Poorly Soluble Drugs*. Current Drug Therapy, 2007. **2**(1): p. 85-93.
500. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. Journal of Immunological Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
501. *CLSI(2002a) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-second edition; CLSI document M27-A2*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2002.
502. Fothergill, A.W., *Antifungal Susceptibility Testing: Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) Methods*, in *Interactions of Yeasts, Moulds, and Antifungal Agents*, G.S. Hall, Editor. 2012, Humana Press. p. 65-74.

Annexe 1. Réactifs et solvants utilisés dans les études

Anhydride succinique (99%) a été fourni par Acros Organic (Fair Lawn, NJ, É.-U.). Chloroforme, toluène, benzène, dichlorométhane, éther éthylique, éther méthyle-*tert*-butylique, hexane, acétone, acétonitrile, méthanol, le N,N-diméthylformamide (DMF), acide chlorhydrique (réactif ACS, d 1,18), chlorure de thionyle et isopropanol ont été achetés auprès Laboratoire Mat (Montréal, QC, Canada). Alcool éthylique anhydre provient de Les Alcools de Commerce (Brampton, ON, Canada). Chlorure d'aluminium ($\geq 99\%$), chlorure de trityle ($\geq 97\%$), tétraéthylène glycol, bromure d'allyle ($> 99\%$), polyéthylène glycol 550 monométhyle éther et polyéthylène glycol 1000 monométhyle éther ont été fournis par Fluka (Buchs, Allemagne). Sulfite de sodium anhydre (qualité réactif), hydroxyde de potassium (qualité réactif), et hydroxyde de sodium (qualité réactif), chlorure de zinc (II) (qualité réactif), acide sulfurique (qualité réactif) proviennent de A&C American Chemicals Ltd. (Montréal, QC, Canada). Trioléate de glycéryle ($\geq 99\%$), brome moléculaire (qualité réactif), H₂O₂ (50%mass.), gel de silice pour chromatographie sur colonne (70-230 mesh, 60 Å), plaques de CCM (matrice de gel de silice sur support en aluminium), acide formique (98%), acétate de sodium ($\geq 99\%$), pyridine (anhydre, 99,8%), 2-méthyléthylamine (99%), carbonate de césium (99%), diméthylsulfoxyde-d₆ (100%, 99,96%atom. D), chloroforme-d (99,8%atom. D, 0,03%vol. TMS), tétroxyde d'osmium (réactif ACS, $> 98,0\%$), carbonate de potassium (réactif ACS), pentaérythritol (98%), 15-Crown-5 (98%), acide L-aspartique (98%+), sulfate d'argent ($\geq 99,99\%$), D-(+)-Dextrose (anhydre, qualité USP), acide butane-1,2,3,4-tétracarboxylique (99%), acide furane-2,3,4,5-tétracarboxylique (96%), acide benzène-1,2,3,4-tétracarboxylique (96%), acide 4,4',4'',4'''-(porphine-5,10,15,20-tetrayl)tetrakis-benzoïque, dichlorure oxalyque (98%, qualité réactif), 1,10-décane-1,10-diol (98%), N,N-diméthylacétamide (99%), acide 2,2-bis(hydroxyméthyl)butyrique (98%), acide 2,2-bis(hydroxyméthyl)propionique (98%), acide *para*-toluènesulfonique (98%), polyéthylène glycol 250 diméthyle éther, acide acétique glacial (99,85%), acide bromhydrique (47,0-49,0%, réactif ACS), sodium métallique (cubes, dans l'huile minérale, 99,9%), trioxyde de chrome (VI) (98+%, réactif ACS), 4-diméthylaminopyridine (99%), chloroforme ($\geq 99,8\%$, stabilisé par amylènes),

Montmorillonite K10, 9-borabicyclo[3.3.1]nonane (0,5M dans le THF), acide oléique (grade technique et $\geq 99\%$, GC), chlorure d'acide oléique (85%, grade technique), alcool oléyle (85%, grade technique, et $\geq 99\%$, GC), triphénylphosphine ($\geq 98,5\%$) et diisopropyl azodicarboxylate (98%) ont été fournis par Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). 1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide provient de Matrix Innovation (Québec, QC, Canada). Chlorure de sodium ($\geq 99,5\%$), hydroxyde de potassium (réactif ACS), alcool benzylique (99,8%), tétrahydrofurane (grade HPLC) ont été achetés chez FisherBiotech (Fair Lawn, NJ, É.-U.). Carbonate de calcium et acétone (distillée sur verre, A-0547) proviennent de l'ACP Chemicals Inc. (Montréal, QC, Canada). Acide citrique a été fourni par Giroux (St-Hyacinthe, QC, Canada). L'eau distillée a été préparée avec le système Barnstead International A1015-C (Dubuque, IA, É.-U.). L'huile d'olive «Bertolli DAL 1865 Extra Vierge d'origine» a été achetée chez Deoleo Canada Ltd. (Toronto, ON, Canada).

Annexe 2. Méthodes analytiques et l'appareillage et conditions analytiques utilisés

Résonance magnétique nucléaire (RMN). Les spectres RMN unidimensionnels du proton ^1H et du carbone ^{13}C ont été enregistrés sur l'appareil Bruker AMX-300 (Karlsruhe, Allemagne), avec une sonde double proton/carbone de 5 mm, à une fréquence respectivement de 300 MHz pour le ^1H , et 75 ou 100 MHz pour le ^{13}C , avec une induction du champ magnétique maximale de 7,01 T, en utilisant CDCl_3 et DMSO-d_6 comme solvants. L'acquisition des spectres bidimensionnels $^1\text{H}/^1\text{H}$ NOESY a été effectuée sur un Bruker Avance 300 (Karlsruhe, Allemagne) équipé d'une sonde INVERSE de 5 mm à 300 MHz. Toutes les analyses spectrales ont été réalisées avec le logiciel MestRec4.9.9.6 de Mestrelab Research (Escondido, CA, É.-U.).

Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). Toutes les mesures FTIR ont été réalisées sur un spectromètre iS10 Nicolet de ThermoScientific Co. (Madison, WI, É.-U.) avec la technique de réflexion totale atténuée (ATR) : matériel optique: ZnSe; nombre de scans: 64; intervalle d'acquisition: $0,482\text{ cm}^{-1}$; intervalle spectral : $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$. Pour analyser les spectres obtenus, le logiciel OMNIC 8.1.10 (ThermoScientific Co.) a été utilisé.

L'analyse élémentaire du N, C, H et S a été effectuée sur les analyseurs Fisons EA 1108 de Fisons Instruments (Rodano, Italie) et Costech 4010 de ISOMASS Co. (Valencia, CA, É.-U.) par la technique de combustion rapide dynamique. L'analyse des chromatogrammes obtenus pour les produits gazeux de la combustion des composés organiques analysés (N_2 , CO_2 , H_2O , and SO_2) a été réalisée en utilisant le logiciel Eager 300 de Thermo Electron Co. (Madison, WI, É.-U.).

Spectrométrie de masse par la désorption-ionisation laser assistée par matrice en temps de vol (MALDI-TOF). Les spectres MALDI-TOF ont été acquis avec le spectromètre de masse Ultraflex TOF/TOF de Bruker (Bremen, Allemagne), dans le mode de réflexion positive avec un laser Smartbeam2 337 nm à 200 Hz, en faisant la moyenne de 2 000 spectres MS acquis, en utilisant le dithranol (1,8-dihydroxy-9,10-dihydroanthracen-9-one) ou DHB

(acide 2,5-dihydroxybenzoïque) comme matrices et le LiCl comme agent d'ionisation. L'analyse spectrale a été réalisée avec le logiciel flexAnalysis de Bruker Daltonics.

Spectrométrie de masse par pulvérisation d'électrons en triple quadripôle (ESI-TQ)*.

Les analyses ont été réalisées par injection directe (sans colonne) des échantillons dans le passeur d'échantillons G1367E du système HPLC Agilent 1260 de l'Agilent Technologies (Santa Clara, CA, É.-U.), en utilisant la phase mobile (%vol) : eau (50)- acétonitrile (50) - acide formique (0,2), pompée avec le débit de 0,75 ml/min. La détection a été réalisée avec un spectromètre de triple quadripolaire G6410B équipé d'une source ESI. La source d'ionisation a été opérée à la tension capillaire de 3000 V, la pression de nébulisation de 45 psi, et la température de gaz sec de 350°C, avec le débit de gaz de 12 l/min. Le spectromètre de masse a été opéré dans les modes d'ions ESI positif ou négatif, en utilisant le mode de balayage MS2 dans l'intervalle de balayage de 70 à 1200 Da/z avec la durée d'un balayage de 500 ms et la tension de fragmenteur de 135 V. L'acquisition des données et la quantification ont été effectuées en utilisant le logiciel Agilent Mass-Hunter Quantitative Analyst version B.05.00 de Agilent Technologies. **Les conditions ont été utilisées pour analyser uniquement le produit 15 (sections 2.2.1.2.5.5 et 2.3.1.2).*

Chromatographie liquide de haute performance avec la détection par spectrométrie de masse (HPLC-ESI-TOF). Les spectres ont été obtenus avec un spectromètre LC-MSD-TOF d'Agilent Technologies (Santa Clara, CA, É.-U.) dans les modes ESI positifs et négatifs à 160,0 V. La séparation a été effectuée sur une colonne Zorbax XDB-C18 (100×2,1 mm; 1,8 µm), en utilisant la phase mobile, %vol. : acétonitrile (80) - eau (20) - acide formique (0,1), en mode d'élution isocratique, avec le débit de 0,50 ml/min, ou sur une colonne C18 Synergi RP-polar de Phenomenex (150×4,6 mm; 4 µm), en utilisant la phase mobile composée de MeOH-H₂O en mode d'élution de gradient, avec le débit de 0,5 ml/min. La détection a été effectuée sur un détecteur TOF 6210, en utilisant la source ESI en modes d'ions positif ou négatif, à la tension capillaire de 3500 V, la pression de nébulisation de 35 psi, la température de gaz sec de 350°C, et le débit de gaz de 10 l/min. Le balayage a été fait de 100 à 3000 Da/z (la durée d'un cycle: 500 ms, la tension de fragmenteur: 160 V). L'analyse spectrale a été faite avec un logiciel Agilent Mass-Hunter Quantitative Analyst version B.05.00 de Agilent Technologies.

Spectroscopie UV-Vis (UV-Vis). Toutes les mesures UV-Vis ont été réalisées sur un spectromètre LightWave II+ de Biochrom (Cambridge, Royaume-Uni): intervalle d'acquisition: 5 nm; intervalle spectral : 200-800 nm. Pour analyser les spectres obtenus, le logiciel PVC (Biochrom) a été utilisé.

Chromatographie d'exclusion stérique (GPC). Les analyses des échantillons ont été réalisées sur un système GPC Waters (Waters Corporation, Milford, MA, É.-U.) muni d'un chauffe-colonne et une pompe Waters 1525, un autoéchantillonneur Wisp 717Plus, un détecteur à indice de réfraction Waters 2414 et une colonne de garde de Waters. La séparation a été effectuée à 35°C et le débit de 1 ml/min sur trois colonnes GPC de marque Phenomenex Phenogel avec la taille de particules de la phase stationnaire de 5µm et la porosité respectivement de 500Å, 10e4Å et 10e5Å, en utilisant le THF comme phase mobile et les standards polystyrènes. L'analyse de chromatogrammes a été réalisée avec le logiciel Breeze 3.2 (Waters Corporation).

Diffusion dynamique de la lumière (DLS). Toutes les mesures ont été effectuées avec l'appareil Malvern Autosizer 4800 (Malvern Instruments, Worcestershire, GB) muni d'un laser He-Ne de 633 nm et un détecteur de type photodiode avalanche. 1-3 mg d'un produit à analyser a été dispersé dans 10 ml d'eau Milli-Q et les mesures de taille ont été enregistrées à l'angle de diffusion de 90°, à 25°C. Les données sur la distribution de taille ont été obtenues à partir des fonctions d'auto-corrélation, en utilisant le programme CONTIN. Les mesures pour chaque échantillon ont été répétées 3 fois.

Point de fusion. La détermination du point de fusion a été réalisée sur l'appareil IA9000 de la série *Digital melting point* de Electrothermal Engineering Ltd (Rochford, Essex, Royaume-Uni).

Annexe 3. Procédure détaillée de tests d'encapsulation de l'itraconazole

Environ 25 mg du dendrimère à étudier et environ 25 mg de l'ITZ (98%, fourni par AK Scientific Inc., Vriion City, CA, É.-U.) pesés préalablement avec une précision de 0,1 mg ont été solubilisés dans 5 ml de dichlorométhane, en faisant tourner le ballon avec les constituant sur un évaporateur rotatif (vitesse de rotation : 80-100 tours/min) sous pression atmosphérique et à température de la pièce. Après 15 min d'agitation, le vide (d'environ 20 *in* Hg vac.) a été créé pour évaporer le solvant, en faisant augmenter graduellement la température du mélange jusqu'à 40°C. L'évaporation finale du dichlorométhane a été effectuée sous vide profond d'environ 30 *in* Hg vac. à la température ambiante pendant 24 h. Ensuite, 5 ml de l'eau déionisée (MilliQ) ont été ajoutés au reste, et la suspension obtenue a été agitée sur l'agitateur magnétique à la vitesse de 1000 tours/min pendant 24 h. La suspension résultante a été d'abord filtrée à travers un filtre avec la porosité de 2 µm et ensuite diluée avec l'acétonitrile dans une fiole jaugée jusqu'au volume final de 100,0 ml. La procédure a été répétée 2 fois pour chaque composé dendritique à étudier.

Le taux de l'ITZ encapsulé a été déterminé par la technique de HPLC avec le système HPLC de Shimadzu muni d'un dégazeur Prominence DGV-20A3, un chromatographe liquide Prominence LC-20AT, un autoéchantillonneur Prominence SIL-20A, un four de colonne Prominence CTO-20, un détecteur UV/VIS Prominence SPD-20A. La colonne chromatographique utilisée était Phenomenex HyperClone 5µ BDS C18 130A (150x4.60 mm, 5 micron). Les conditions d'élution et de la détection étaient les suivantes :

- Phase mobile, (%vol.) :
acétonitrile (70) - eau MilliQ (30) – triéthylamine (0,05);
- Débit de la phase mobile : 1 ml/min;
- Température de la colonne : 40°C;
- Longueur d'onde de détection : 263 nm.

La quantification a été réalisée, en se basant sur l'équation de la courbe de calibration obtenue dans les mêmes conditions chromatographiques, à partir de solutions de l'ITZ pur dans l'acétonitrile. L'injection de chaque échantillon a été effectuée 3 fois. Dans notre cas, les concentrations de solutions standards étaient les suivantes, $\mu\text{g/ml}$: 267,00; 106,80; 53,40; 42,72; 21,36; 10,68; 4,27; 2,14. Le coefficient de détermination de l'équation de régression linéaire obtenue était proche de 1 ($R^2 = 0,9999$), ce qui confirme la fonction linéaire entre la concentration de l'ITZ et son absorbance sur la plage de concentration utilisée.

Annexe 4. Procédure détaillée des tests de cytotoxicité sur les macrophages murins avec le MTT

Jour 1

- a. **Passage de culture des macrophages.** 1,0 ml de culture cellulaire RAW-262.7 est placé dans 10,0 ml de milieu de culture composé de 445,0 ml de milieu DMEM (GIBCO, Invitrogen), 50,0 ml de FBS (Fetal Bovin Serum; GIBCO 12483 FBS Qualified, Invitrogen) et 5,0 ml de solution contenant les antibiotiques, pénicilline et streptomycine (GIBCO, Invitrogen). Le mélange est ensuite incubé à 37°C, 5% CO₂ dans l'atmosphère saturée d'eau (CO₂ Incubator, Sanyo).

Jours 2 et 4

- a. **Changement du milieu de culture.** Le milieu de culture est enlevé et remplacé par du milieu frais (10,0 ml). Après le changement de milieu, la fiole de culture cellulaire est retournée dans l'incubateur.
- b. **Vérification du nombre de cellules** sous microscope optique à transmission Axiovert S100 de Zeiss (Objectif 1006-591 LDA – Plan, 20x/0,30 Ph 1 ∞/1,0). La quantité de cellules est considérée comme étant suffisante si les cellules tapissent le fond de la fiole de culture à une fluence d'environ 90%. Si ce n'est pas le cas, l'incubation est maintenue, en remplaçant le milieu de culture par de nouvelles portions une fois par 2-3 jours. Si la quantité de cellules est suffisante, les procédures à suivre sont les suivantes :
- c. **Enlèvement de cellules attachées** avec un grattoir (Costar cellscraper 3010, Corning Inc.) et transfert des cellules détachées dans un tube stérile en plastique de 15 ml.
- d. **Comptage des cellules.** La concentration de cellules est calculée avec un hémacytomètre (Improved Neubauer Vitrapian, 1/400 SQMM, 1/10 MM deep, HS Levy chamber cat. No 500), en effectuant les procédures suivantes: (i) la coloration d'une portion de milieu de culture avec les cellules détachées de 0,5 ml par 0,5 ml de

solution de colorant Tryptan bleue à 0,4% dans le saline à 0,85% (Invitrogen Corporation, GIBCO) en effectuant une agitation douce dans un tube stérilisé en plastique; (ii) l'injection de 0,4 ml de la suspension obtenue sous la lamelle en verre couvrant l'hématocytomètre; (iii) le comptage de cellules sous microscope optique de transmission Zeiss (objectif Planapo 10/0.32, 160/-), avec un compteur manuel; (iv) le calcul de la concentration de cellules (nombre de cellules par ml : $N \times 2 \times 2500$, où N est une quantité de cellules trouvées dans l'hématocytomètre).

- e. **Détermination du taux de dilution** de la culture cellulaire pour avoir une concentration de 5×10^5 cellules par 1 ml du milieu de culture.
- f. **Dilution du milieu** cellulaire avec le milieu de culture selon les résultats de calcul de dilution.
- g. **Répartition du milieu de culture avec cellules** dilué dans des puits d'une plaque de titrage biologique à 96 puits (100 µl par puits), et ensuite, l'incubation de la plaque pendant 3 heures (attachement des cellules).
- h. **Préparation de séries de dilution** des échantillons à tester (µg/ml : 250; 100; 10; 1; 0,1; 0,01) dans le tampon PBS (DPBS 1X, 14190, GIBCO, Invitrogen).
- i. **Vérification d'attachement de cellules** au fond de puits par microscopie optique de transmission.
- j. **Distribution des solutions des produits à tester.** Dans le cas de bon attachement de cellules, les solutions contenant les produits à tester sont distribuées dans les puits de la plaque de titrage (10 µl par puit; 4 puits pour chaque concentration et également 4 puits sont laissés sans ajout de composés à tester (contrôle à 100% de viabilité cellulaire).
- k. **Incubation de la plaque de titrage** à 37°C, 5% du CO₂ dans l'atmosphère saturée d'eau (CO₂ Incubator, Sanyo) pendant 24 h.

Jour 5

- a. **Lavage de la monocouche de cellules.** Après l'incubation de 24 h, le milieu de culture est échangé par le milieu de culture sans sérum (100 µl par puits) pour éliminer les composés à tester. Ensuite, la plaque est retournée à nouveau dans l'incubateur.

- b. **Préparation du milieu de culture contenant du MTT.** 15 mg de MTT (approx. 98% TLC, Sigma-Aldrich) sont solubilisés dans 3 ml de tampon PBS (DPBS 1X, 14190, (-) Calcium Chloride, (-) Magnesium Chloride, GIBCO, Invitrogen). 0,7 ml de la solution de MTT est mélangé avec 7 ml du milieu de culture avec sérum dans un bain (Reagent Reservoir S255100, 25 ml, Sterile, AquaFill), et, ensuite, filtré (filtre de 0.2 µm, non pyrogénique, stérile R, Sarstedt).
- c. **Échange du milieu de culture de lavage** (sans sérum) par le milieu contenant le MTT (100 µl par puits). Le remplissage par ce dernier de 4 puits propres, dédiés aux essais blancs.
- d. **Incubation de cellules** pendant 3 heures (la durée typique de la réaction du MTT avec les enzymes mitochondriales des cellules vivantes).
- e. **Contrôle de la fin de réaction** par microscopie optique de transmission (normalement, une formation de cristaux du formazan qui font éclater les cellules, est observée).
- f. **Solubilisation du formazan** se fait par un ajout de la phase de dissolution (80%vol. de l'isopropanol, 10%vol. de HCl à 35%, 10%vol. du Triton (TRITON X-100, *for molecular biology*, Sigma)); 100 µl par puits. La plaque de titrage emballée dans le papier d'aluminium est ensuite maintenue sous agitation sur une plaque agitatrice pendant environ une nuit.

Jour 6

Mesure de l'absorbance de solutions dans les puits s'effectue à l'aide du lecteur des plaques SAFIR (TECAN, Austria) dans le mode d'absorption (température : 22°C, la longueur d'onde: 590 nm, le nombre de points analytiques par puits : 10). Le calcul de viabilité relative par comparaison de l'absorbance des échantillons à tester avec ceux de référence (sans ajout de substances à étudier), en tenant également compte de l'absorbance des blancs (sans macrophages), selon l'équation A4.1:

$$VR = ((AT-AM)/(AC-AM)) \times 100\% \dots \dots \dots \text{Équation A4.1}$$

AT – absorbance d'une solution avec le composé à tester à concentration donnée;

AM – absorbance de la solution contenant uniquement le milieu de culture et le
MTT (sans cellules, essais blanc, 0%);

AC - absorbance d'une solution avec les cellules sans le composé à tester (100%);

Annexe 5. Procédure détaillée de tests antifongiques sur *Candida albicans*

Jour 1

10 µl de culture de la souche LSPQ 5674 de *Candida albicans* présentée par un isolat clinique provenant de la collection du Laboratoire de Santé Publique du Québec (LSPQ) sont placés sur la gélose et laissés pousser pendant 24 h à 30°C dans un incubateur Forma 310 Direct Heat CO2 (Thermo Fisher, Waltham, MA, US).

Jour 2

La souche poussée est transférée dans un tube contenant 10 ml de milieu YPD (*Yeast Peptone Dextrose*, Invitrogen) composé de l'extrait de levure (1%), Bacto Peptone (2%) et glucose (2%) et est laissée sous agitation pendant une nuit pour obtenir le milieu de culture concentré (inoculum).

Jour 3

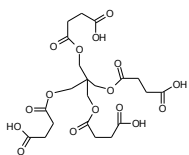
La quantité de cellules de champignons (ou *unités formant des colonies*, UFC) est évaluée par la mesure de la densité optique (DO) de la suspension obtenue par l'homogénéisation de 20 µl de l'inoculum avec 980 µl de milieu YPD. Une valeur typique de DO doit être d'environ 0,2 en utilisant le milieu YPD pur comme blanc. Si la valeur de DO est satisfaisante, on procède à une dilution de la partie principale de la souche avec le milieu YPD pour avoir une solution finale avec DO de 0,1, ce qui correspond à $(1 \div 5) \times 10^{-3}$ UFC/ml.

Après avoir bien homogénéisé le mélange sur un agitateur à vortex, on procède à sa distribution en aliquotes de 100 µl par puits dans une plaque de titrage biologique à 96 puits et fond en «U», en laissant une ligne comme témoin de stérilité du milieu. Ensuite, l'antifongique (ITZ nonformulé et ITZ encapsulé dans les dendrimères) est distribué dans les puits avec les champignons, sous forme de solutions dans le DMSO, en utilisant une gamme de concentration, mg/l : 0,01563; 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0, et en réservant également des puits pour le milieu de culture sans traitement par le PA (témoin de pousse), ainsi que pour le milieu de culture contenant les agents d'encapsulation à l'étude sans le PA (3 puits pour chaque concentration ou témoin). Les plaques sont ensuite incubées à 30°C pendant 72 h.

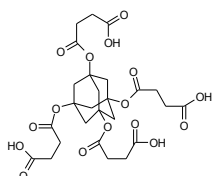
Après l'incubation, une solution aqueuse de résasurin (700 μM) de marque commercial Alamar Blue fournis par Trek Diagnostic Systems Inc. est ajoutée (10 μl /puits) et les plaques sont mises en attente de 3-4 h pour compléter la réaction. Après l'achèvement, les plaques sont lues sur un lecteur des plaques FlexStation 1 Benchtop Multi-Mode Microplate reader (Molecular devices, Sunnyvale, CA, É.-U.) en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et une longueur d'onde d'émission de 560 nm, en faisant une soustraction automatique de la DO du blanc. Dans notre cas, la CMI correspond aux puits où la DO constitue 50% de DO du témoin de pousse.

Annexe 6. Liste des structures chimiques

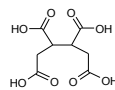
a. Cœurs



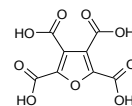
C-I



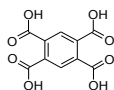
C-II



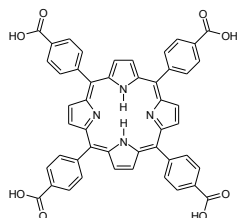
C-III



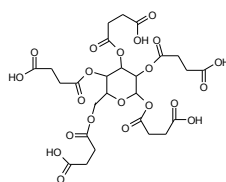
C-IV



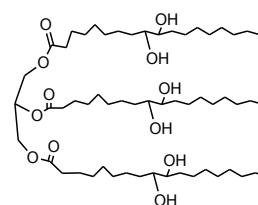
C-V



C-VI

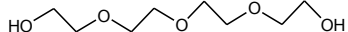


C-VII

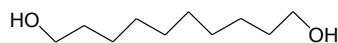


C-VIII

b. Espaceurs

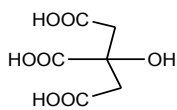


S-I

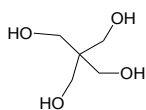


S-II

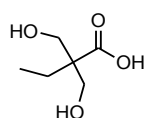
c. Agents de branchement



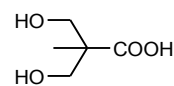
AB-I



AB-II

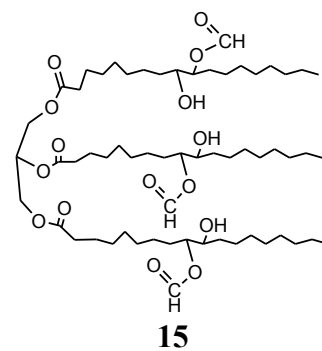
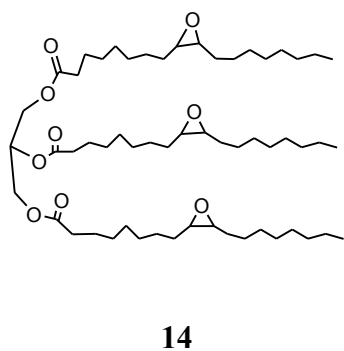
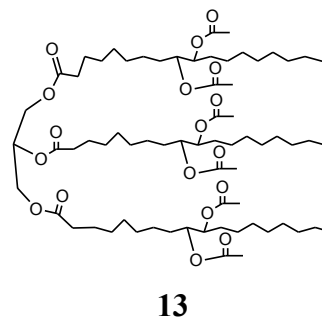
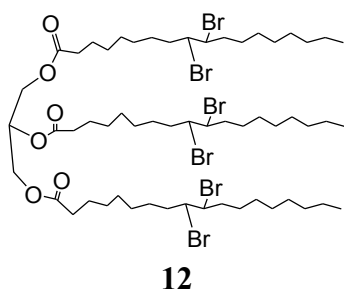
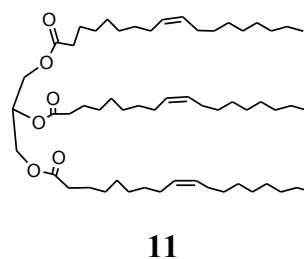
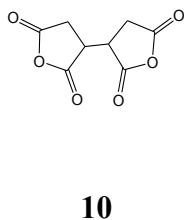
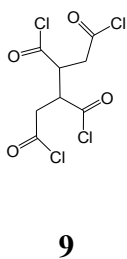
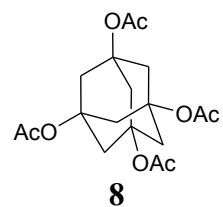
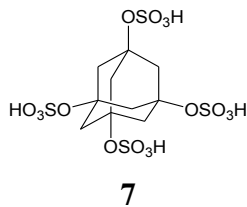
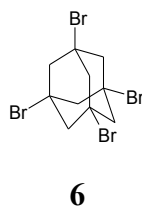
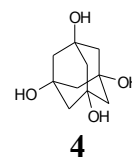
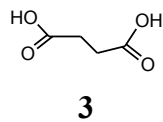
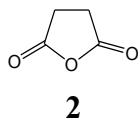
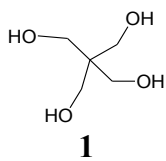


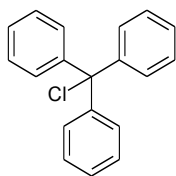
AB-III



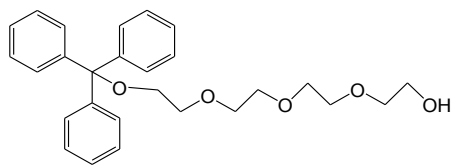
AB-IV

d. Structures numérotées

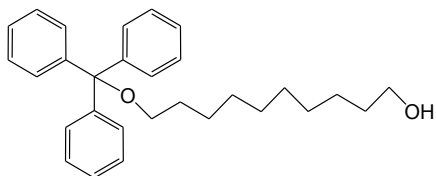




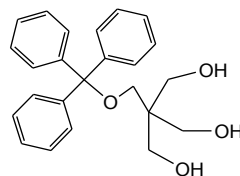
16



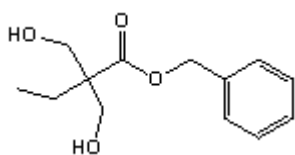
17



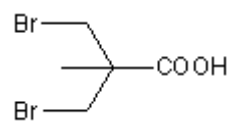
18



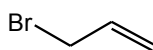
19



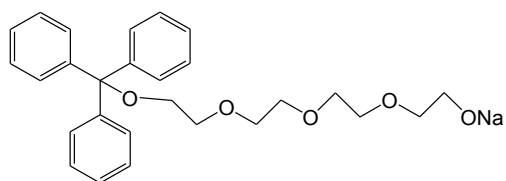
20



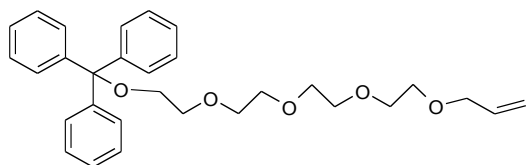
21



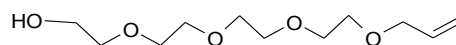
22



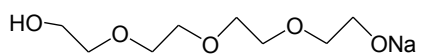
23



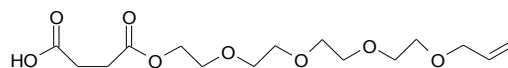
24



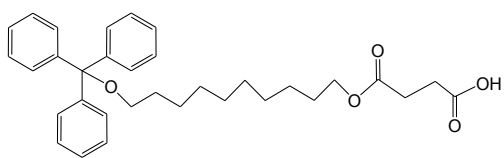
25



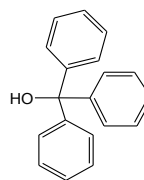
26



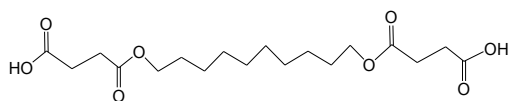
27



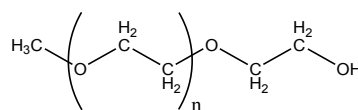
28



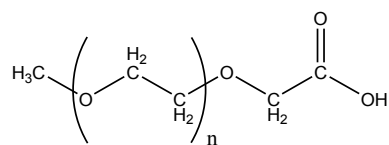
29



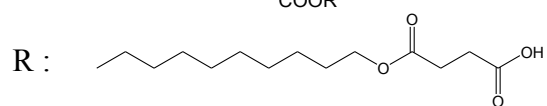
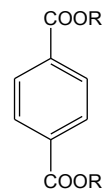
30



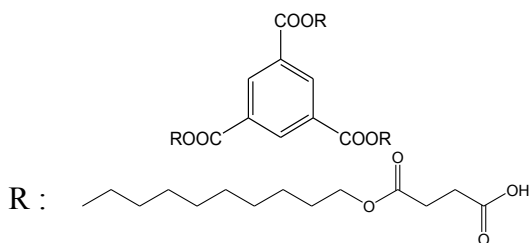
31



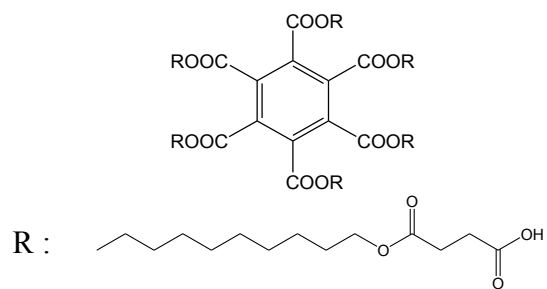
32



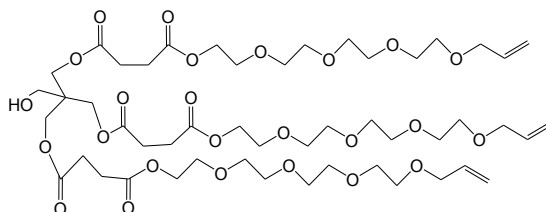
33



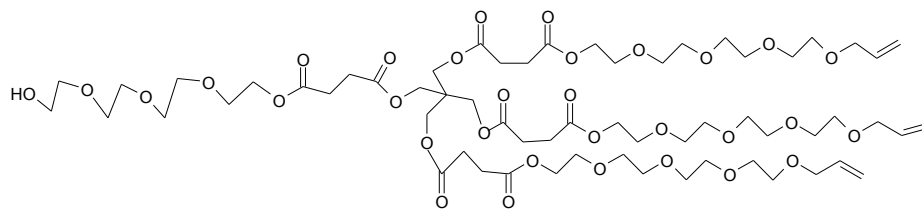
34



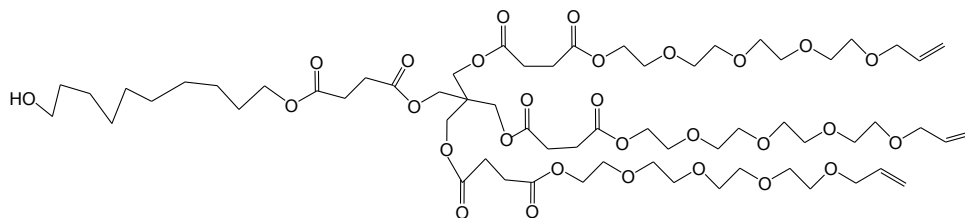
35



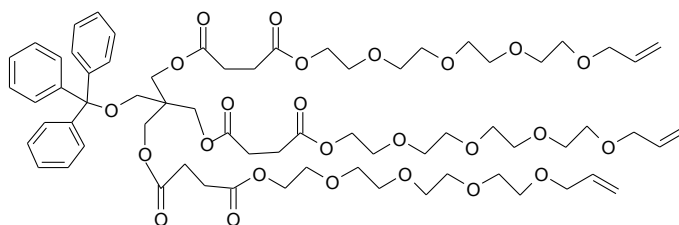
36



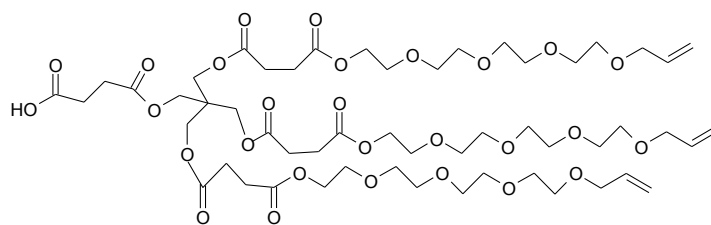
37



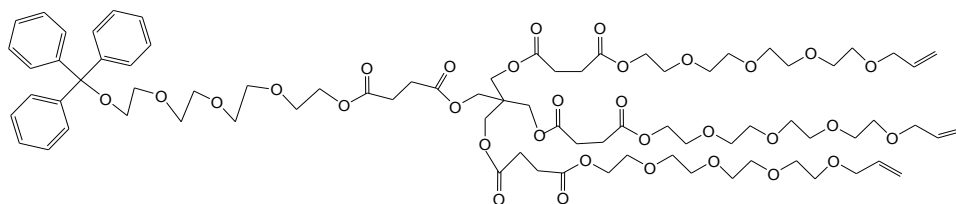
38



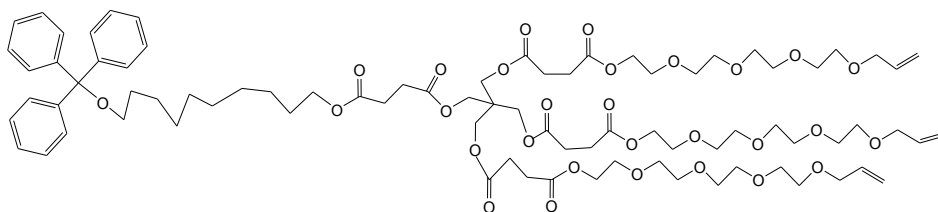
39



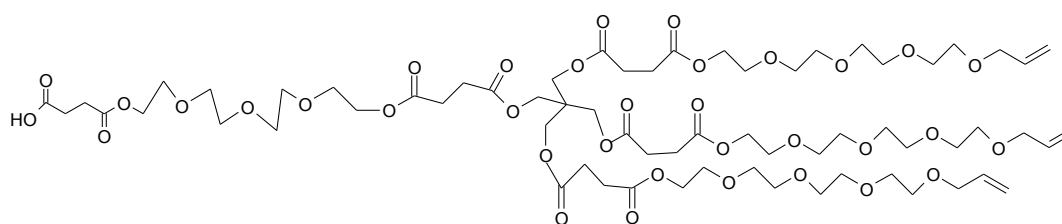
40



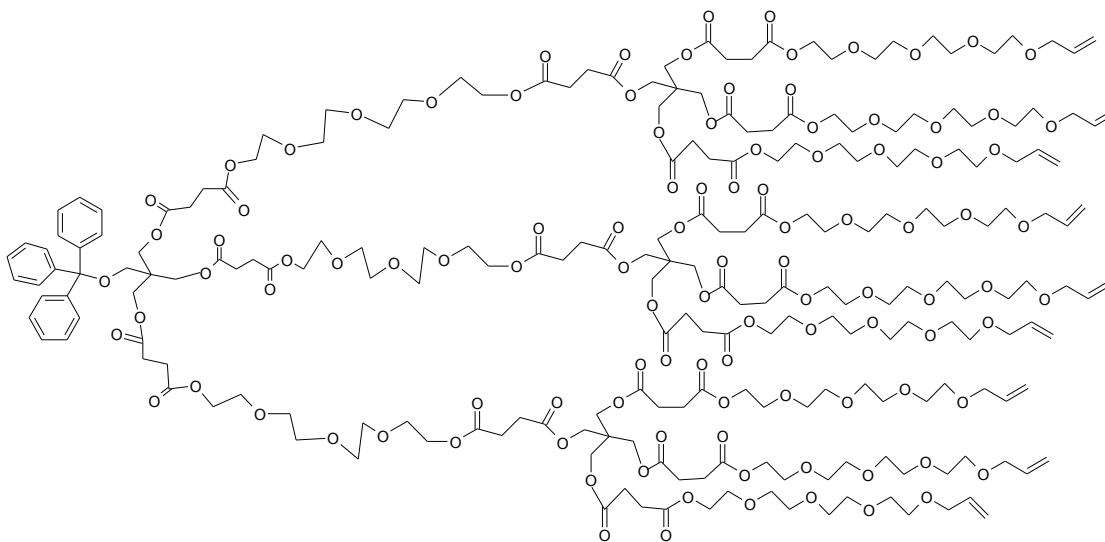
41



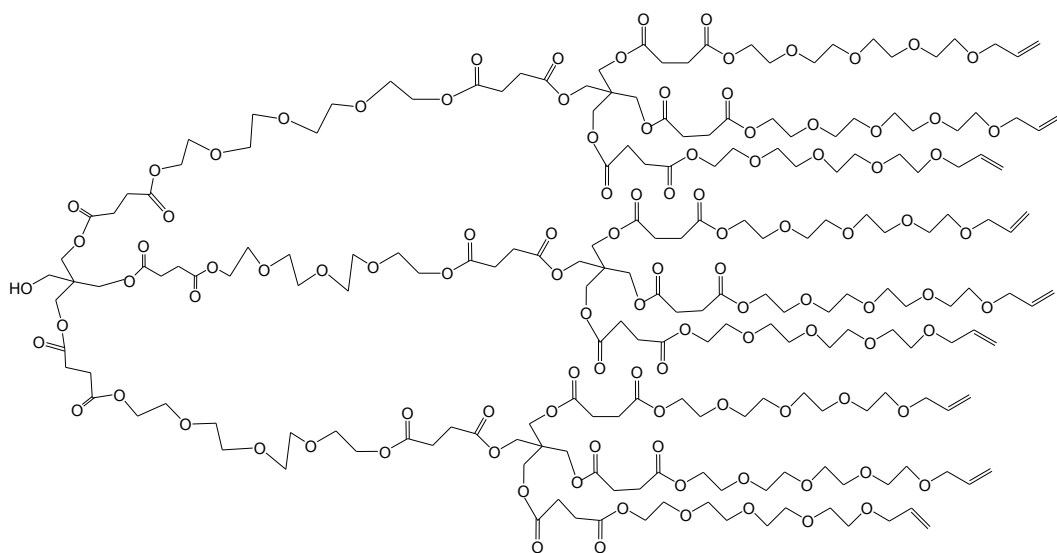
42



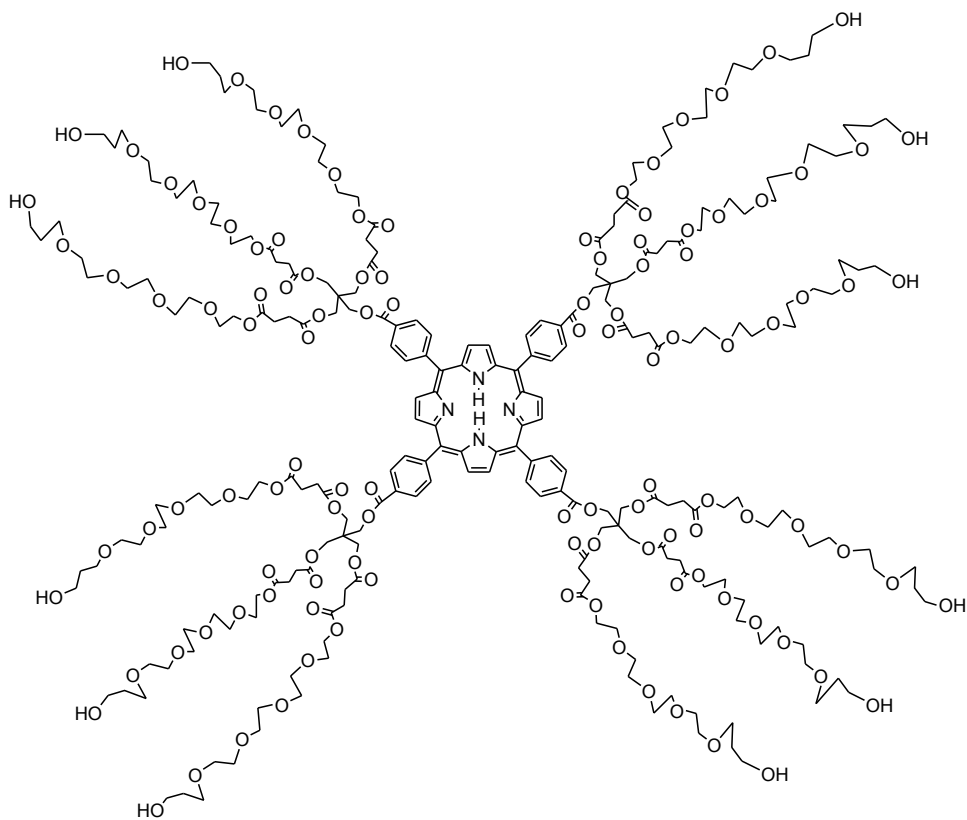
43



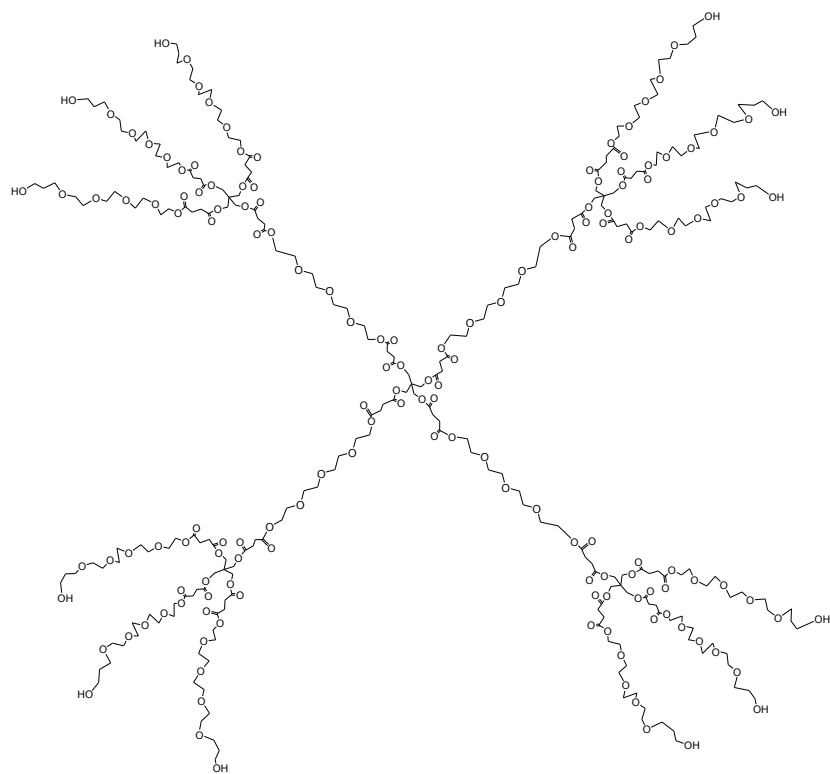
44



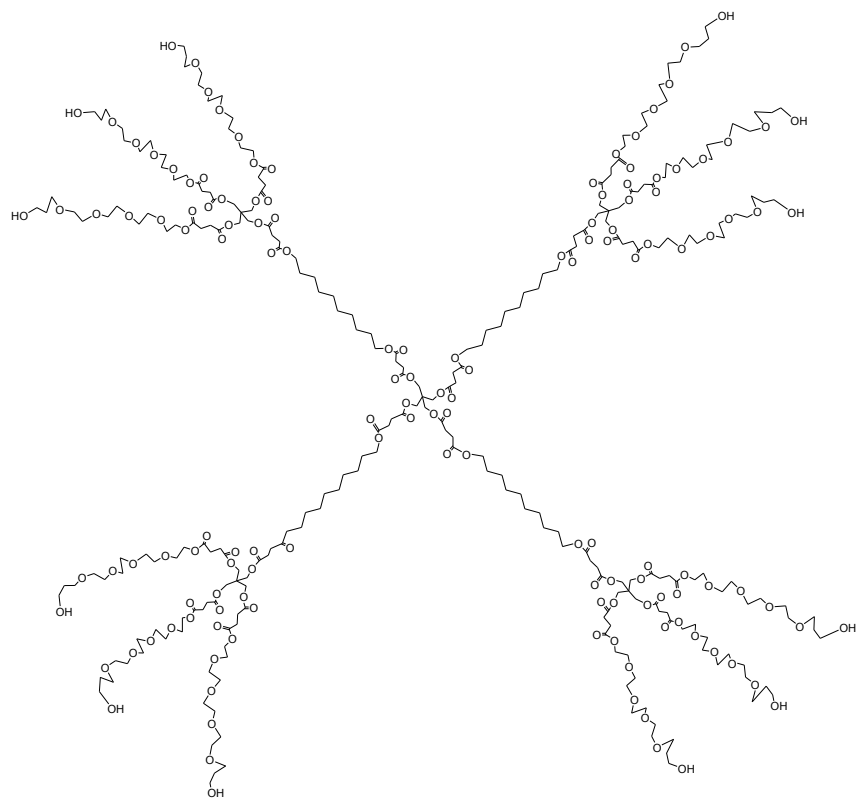
45



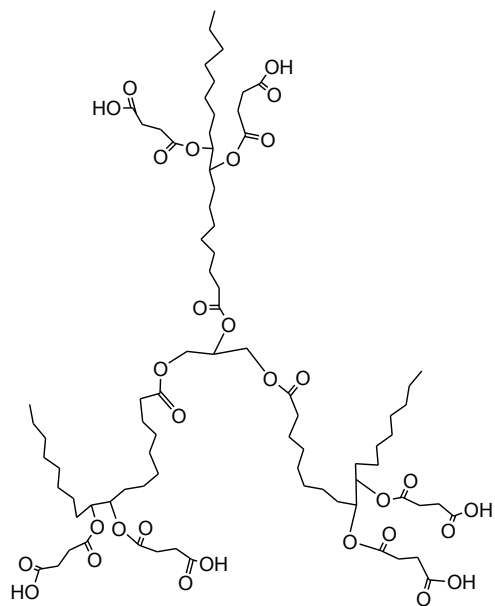
46



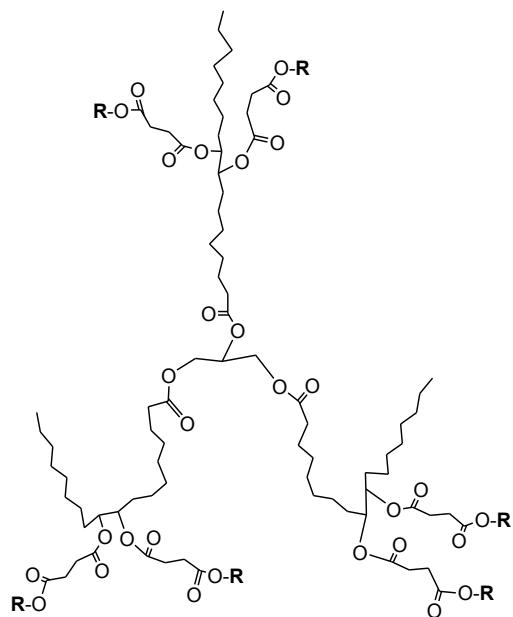
47



48

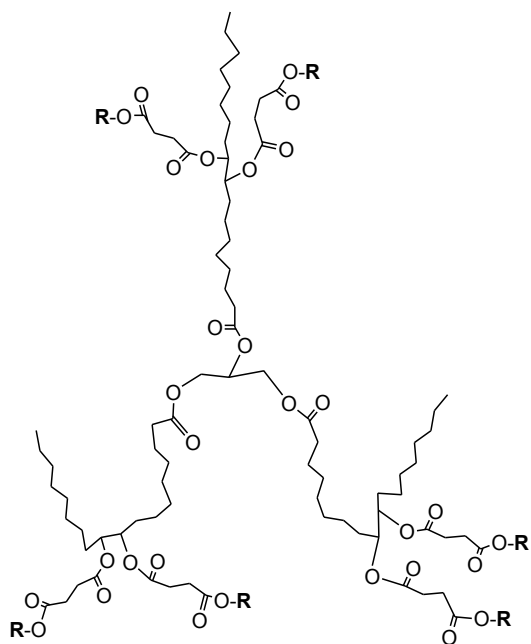


55a,b



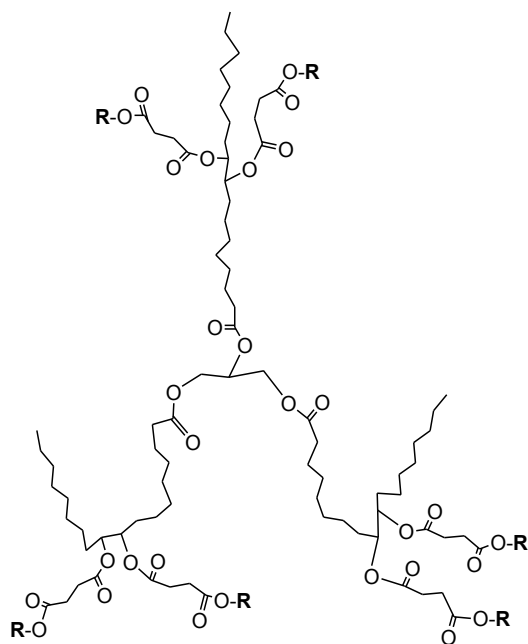
56a,b

R: $-(\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_4\text{-CH}_2\text{-CH=CH}_2$



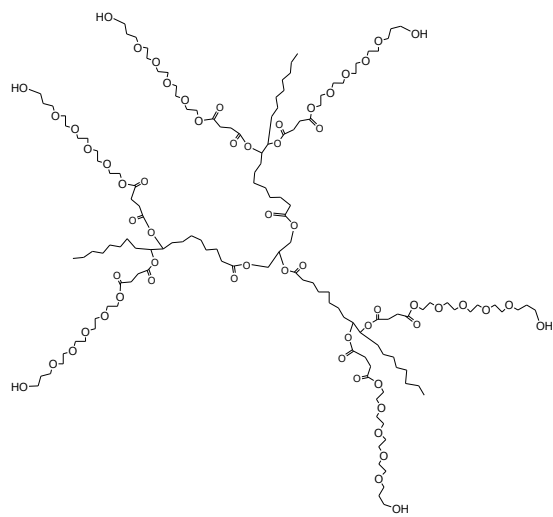
R: $-\text{PEG550-OMe}$

57a,b

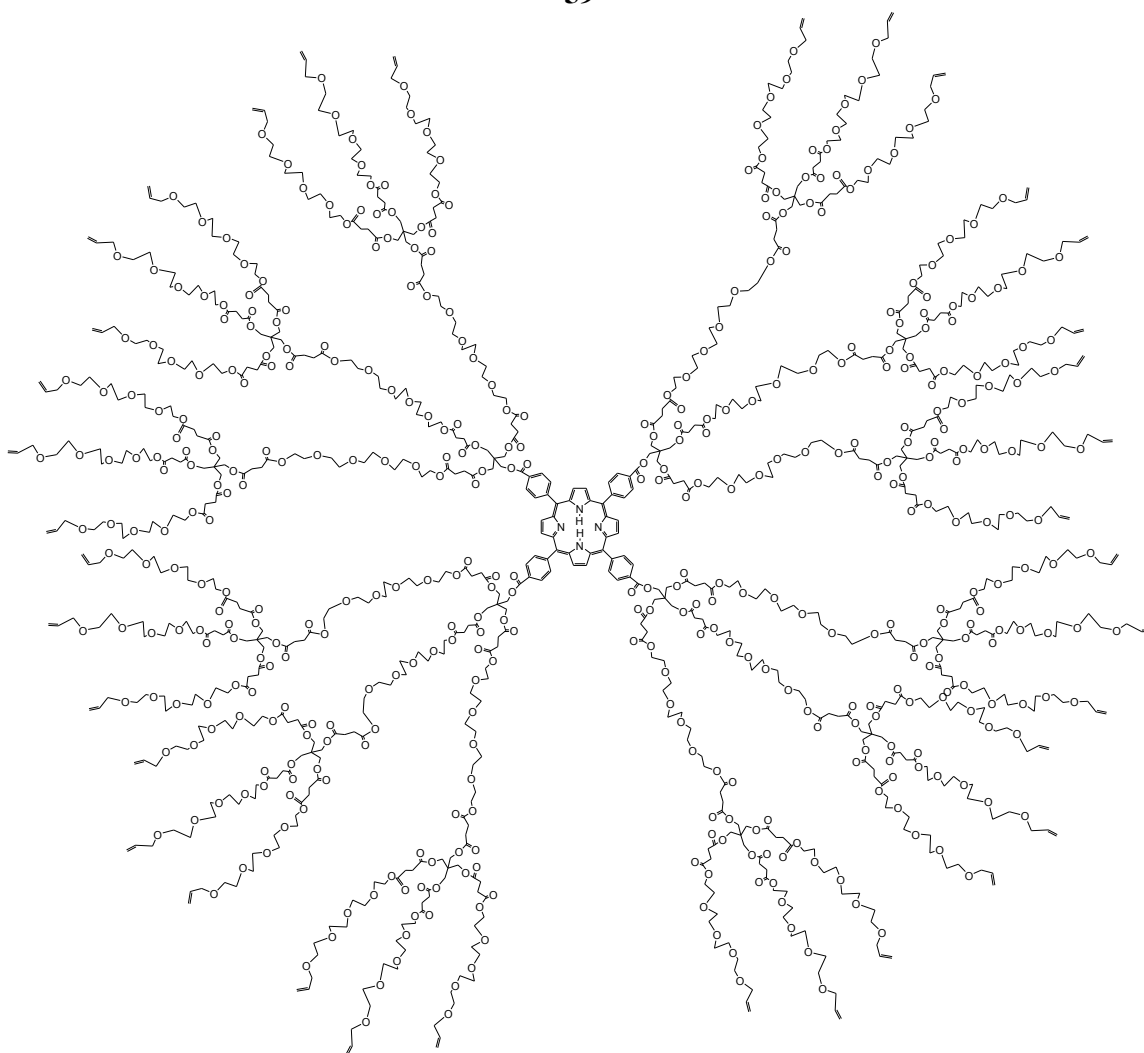


R: $-\text{PEG1000-OMe}$

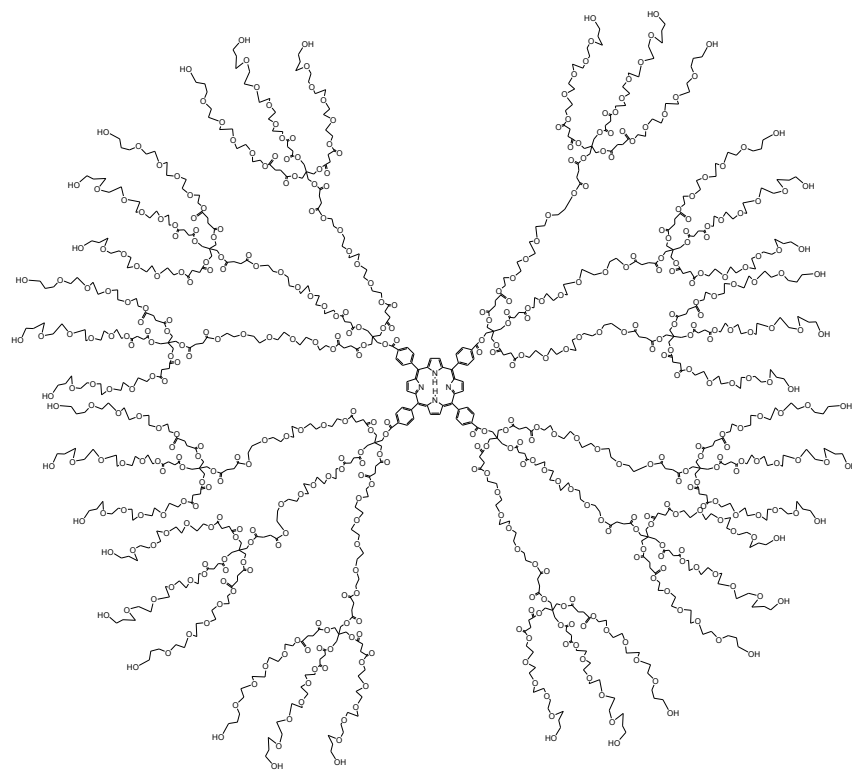
58a,b



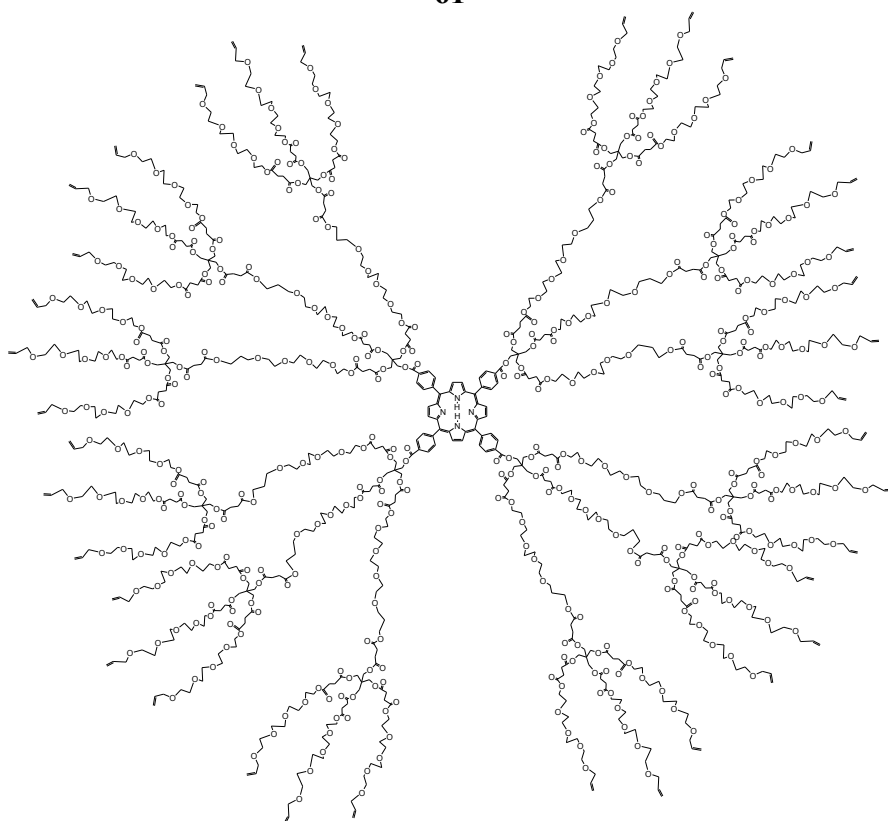
59



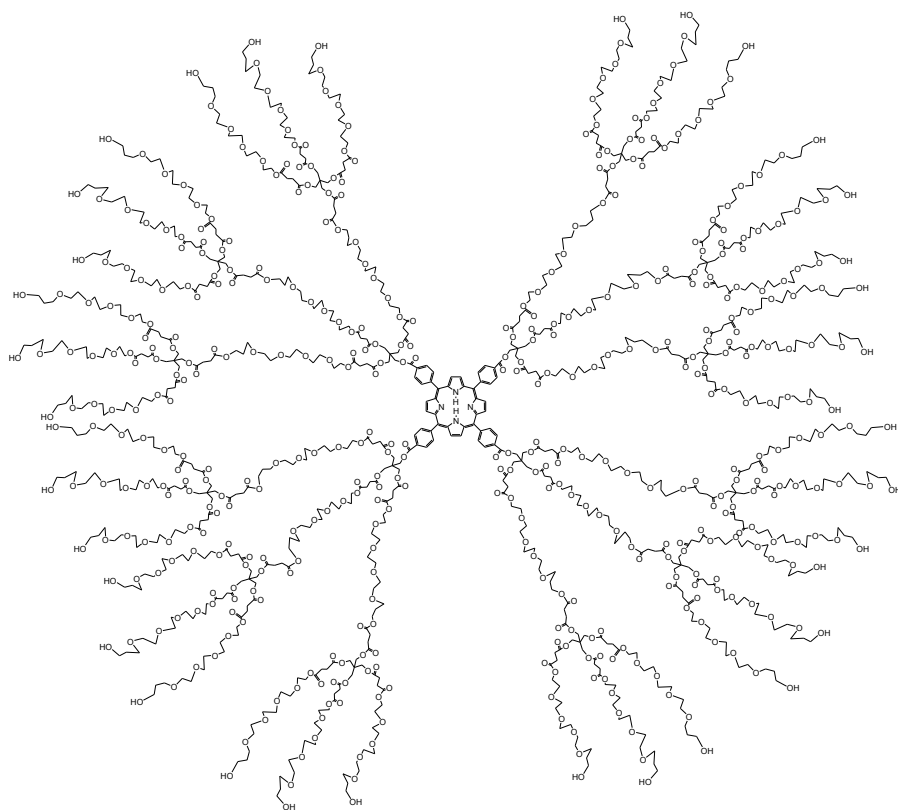
60



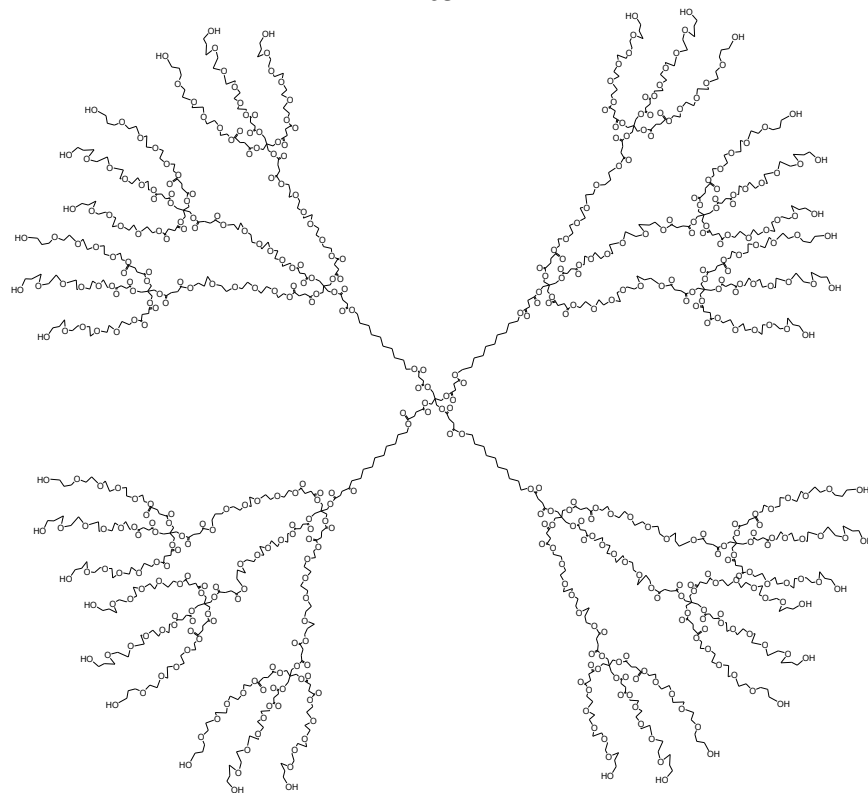
61



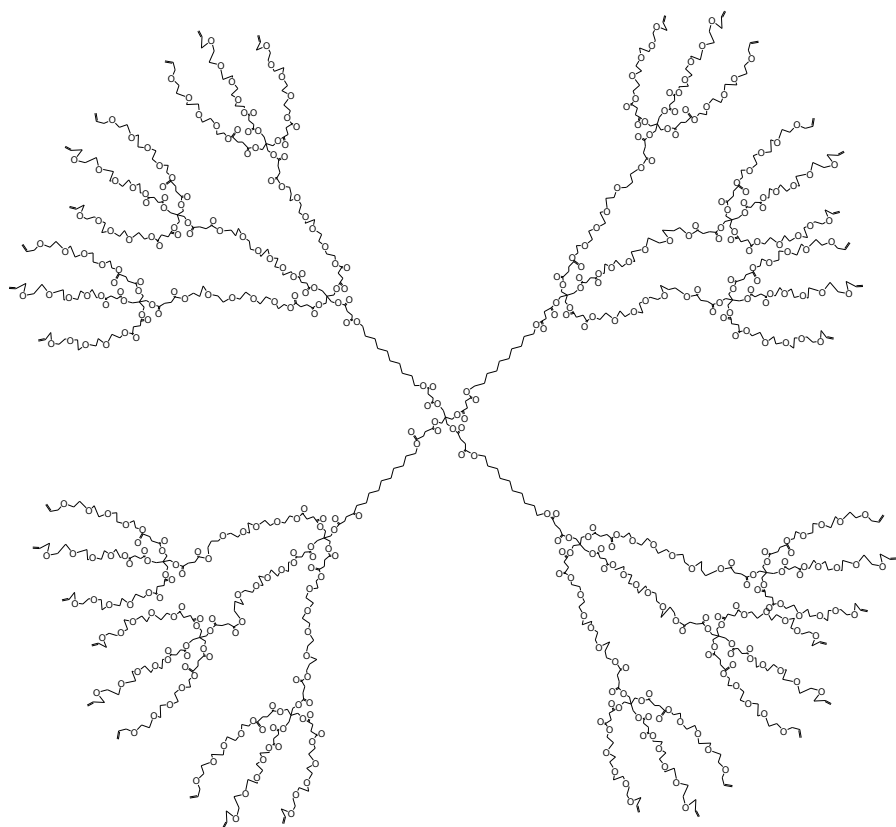
62



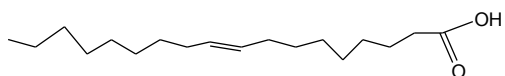
63



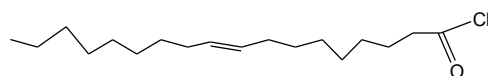
64



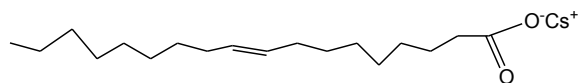
65



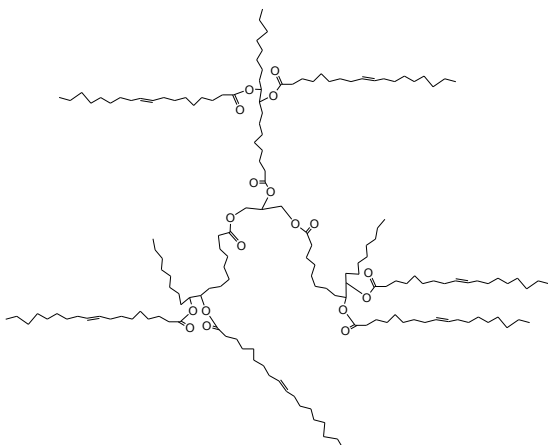
66



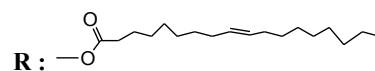
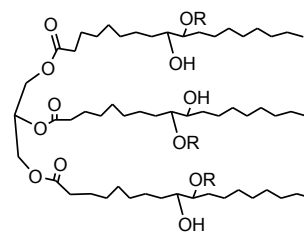
67



68



69



70