



UNIVERSITE PARIS 13
« U.F.R. SMBH DE BOBIGNY »

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XIII

DISCIPLINE : CHIMIE

Présentée et soutenue publiquement

Par

Souad KACHBI

Le 05 Juillet 2013

**VECTORISATION D'ANTITUMORAUX PHOSPHORES GREFFES SUR
DIFFERENTES PLATEFORMES POLYMERES : CONCEPTION, SYNTHÈSE ET
EVALUATION BIOLOGIQUE**

Directeur de thèse : **Pr Marc LECOUEY**

Mme Delphine JOSEPH	Professeur Université Paris-Sud XI	Rapporteur
M. Jean-Luc PIRAT	Professeur ENSC Montpellier	Rapporteur
M. Frédéric CHAUBET	Professeur Université Paris XIII	Examineur
Mme Evelyne MIGIANU	MCF Université Paris XIII	Examineur
M. Marc LECOUEY	Professeur Université Paris XIII	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été effectué au sein du Laboratoire de Chimie, Structure et Propriétés des Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques (CSPBAT) dirigé par le Pr. Véronique Migonney. Je tiens bien évidemment à remercier le Professeur Marc Lecouvey de m'avoir accueillie au sein de son équipe de Chimie Bioorganique et Structurale (CBS) ainsi que pour sa présence, son encadrement et ses discussions scientifiques. Je le remercie également pour le temps qu'il a consacré à corriger mon manuscrit mais également pour tous les congrès et les stages qu'il m'a permis de faire.

J'aimerais remercier vivement, à présent tous les membres de mon jury (Pr.Delphine JOSEPH, Pr.Frédéric CHAUBET et Pr.Jean Luc PIRAT) qui me font le plaisir d'être présents à cette soutenance de thèse. Je les remercie également d'avoir porté un intérêt à mon travail et d'avoir pris de leur temps pour juger ce manuscrit.

Bien entendu, j'aimerais exprimer ma gratitude envers le Docteur Evelyne Migianu qui a co-dirigé cette thèse. Merci Evelyne pour m'avoir encadrée lors de mes premiers pas dans la synthèse organique. Merci pour ta patience, d'avoir corrigé tous mes rapports, posters et communications orales.

Un grand Merci au Docteur Maelle Monteil pour ses qualités humaines. Merci pour tes conseils, ta franchise, ton aide, tes discussions scientifiques et autres. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi, d'avoir été là pour moi du début à la fin et d'avoir toujours cru en moi.

Je remercie tous les membres de l'équipe de chimie organique qui m'ont accompagné durant ma thèse : Odile Sainte-Catherine pour sa bonne humeur et son aide constante, Nathalie Dupont d'avoir résolu mes problèmes informatiques, Julia Deschamp pour ses conseils et Carole Barbey.

Je souhaiterais remercier également tout particulièrement : Irena, Hicham, Julie, Caroline, Nicolas et Margery pour leur bonne humeur, Soucounda pour ses conseils et sa présence,

Catherine d'avoir été là dans les moments difficiles, Amélie et Pierre pour les mesures de masse et Céline pour son aide.

Je tiens à remercier de tout cœur ma famille et plus particulièrement mes parents pour leur soutien inconditionnel et permanent.

Enfin, un grand et tendre MERCI à mon sabri auprès de qui j'ai bénéficié du soutien moral en toutes circonstances tt au long de ces dernières années.

Merci de m'avoir tendu la main quand j'en avais besoin, d'avoir su me rassurer dans mes périodes de doutes.

Merci pour ta patience sans limites...

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : LES BISPHOSPHONATES	5
I.1.Introduction.....	5
I.2.Propriétés biologiques des bisphosphonates.....	8
I.2.1.Introduction	8
I.2.2.Utilisation des bisphosphonates en clinique	10
I.2.3.Propriétés antitumorales des bisphosphonates	13
I.2.3.1.Inhibition de la prolifération des cellules tumorales <i>in vitro</i>	13
I.2.3.3.Inhibition de la migration et de l'invasion des cellules tumorales <i>in vitro</i>	14
I.2.3.4.Inhibition de la croissance tumorale et de l'angiogenèse <i>in vivo</i>	15
I.3.Toxicité des bisphosphonates	16
I.4.Pharmacologie des bisphosphonates	17
I.5.Stratégies pour l'amélioration de la biodisponibilité des bisphosphonates	19
I.5.1.Utilisation d'un co-transporteur	19
I.5.2.Approche de type prodrogue.....	19
I.5.2.1.Prodrogues de type peptidique	20
I.5.2.2.Prodrogues lipophiles.....	21
I.5.3.Utilisation d'un vecteur pour le ciblage du tissu non osseux.....	23
I.6.Synthèse des bisphosphonates : état de l'art.....	23
I.6.1.Synthèse des bisphosphonates hydroxylés en une étape	23
I.6.2.Synthèse des bisphosphonates hydroxylés par une méthode indirecte.....	25
I.6.2.1.Première étape : Réaction d'Arbuzov	25
I.6.2.2.Deuxième étape : Réaction de déalkylation	28
I.6.2.3.Réactions de déalkylation sélective	31
I.6.3.Synthèse des bisphosphonates hydroxylés tétraacides via l'utilisation de phosphites silylés.	32
CHAPITRE II : VECTORISATION D'AGENTS THERAPEUTIQUES	34
II.1.Intérêt de la vectorisation	34
II.2.Evolution de la vectorisation	35
II.3.Avancées majeures de la vectorisation	36
II.3.1.L'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention)	36
II.3.2.La PEGylation.....	38
II.3.3.Le ciblage actif.....	41
II.4.Systèmes de vectorisation particuliers.....	43
II.4.1.Les liposomes.....	44

II.4.2.Les micelles	45
II.4.3.Les nanoparticules.....	46
II.5.Travaux du laboratoire sur la vectorisation des bisphosphonates.....	48
II.5.1.Vectorisation à l'aide de liposomes	49
II.5.2.Vectorisation à l'aide de nanoparticules d'oxyde de fer	49
II.6.Objectifs de notre étude.....	50
CHAPITRE III : VECTORISATION AVEC DES POLYSACCHARIDES	55
III.1.Introduction	55
III.2.Généralités sur les polysaccharides utilisés en vectorisation	55
III.2.1.Structure moléculaire	56
III.2.2.Importance des conditions du milieu	57
III.2.3.Biodégradabilité.....	58
III.2.4.Applications biomédicales.....	58
III.3.Quelques exemples de polysaccharides utilisés comme vecteurs	59
III.3.1.La cellulose.....	59
III.3.2.La chitine et le chitosane	60
III.3.3.L'amidon	61
III.3.4.Le pullulane	62
III.3.5.L'acide hyaluronique	63
III.4.Utilisation du dextrane comme vecteur d'agents thérapeutiques	63
III.4.1.Origine du dextrane et production	64
III.4.2.Propriétés physico-chimiques.....	64
III.4.3.Métabolisme	66
III.4.4.Utilisation du dextrane pour la vectorisation.....	66
III.4.4.1.Modifications chimiques du dextrane	67
III.4.4.2.Couplage covalent d'un agent thérapeutique et évaluation biologique des conjugués.....	68
III.5.Synthèse et caractérisation de nouveaux polymères saccharidiques de type carboxyméthyl-dextrane- bisphosphonate CMD-BP	73
III.5.1.Stratégie de synthèse	71
III.5.2.Synthèse du CMD	71
III.5.2.1.Synthèse du CarboxyMéthylDextrane (CMD)	71
III.5.2.2.Caractérisation du CMD par RMN ¹ H	72
III.5.2.3. Calcul du degré de substitution du polymère.....	73
III.5.2.4.Degré de substitution du polymère.....	75
III.5.2.5.Détermination du degré de substitution.....	76
III.5.3.Synthèse des aminoalkylbisphosphonates	76
III.5.4.Synthèse des conjugués CMD-BP	77
III.5.4.1. Influence de la température.....	79
III.5.4.2.Influence du pH.....	79
III.5.4.3.Caractérisation des conjugués CMD-BP	82
III.6.Evaluation biologique <i>in vitro</i> des nouveaux polymères saccharidiques CMD-BP.....	85

III.6.1. Etude de l'effet des aminoBPs et des conjugués CMD-BP sur la prolifération cellulaire.....	85
III.6.2. Etude de la cytotoxicité du CMD seul associés aux bisphosphonates sur des cellules de carcinomes épidermoïdes vulvaires A431	88
III.6.3. Etude de l'effet des aminoBPs et des conjugués CMD-BP sur la migration et l'invasion cellulaire	89
III.7. Evaluation biologique <i>in vivo</i> des nouveaux polymères saccharidiques de type CMD-BP	91

CHAPITRE IV : CONCEPTION DE MONOMERES METHACRYLIQUES

PORTANT UN HMBP	94
------------------------------	----

IV.1. Introduction	94
IV.2. Utilisation des polymères méthacryliques portant des groupements phosphorés en tant que vecteurs.....	94
IV.3. Etat de la littérature sur la synthèse des monomères méthacryliques et méthacrylamides bisphosphonates	97
IV.3.1. Synthèse des monomères méthacryliques	97
IV.3.2. Synthèse des monomères méthacrylamides	100
IV.4. Synthèse des différentes familles de monomères bifonctionnels méthacryliques portant un hydroxyméthylène bisphosphonate	105
IV.4.1. Synthèse des monomères méthacryliques portant un HMBP azoté (HMBPM-N) .	105
IV.4.1.1. Couplage entre un dérivé acrylique activé et un aminoalkyl bisphosphonate via une liaison amide (HMBPM1-N)	105
IV.4.1.1.1. Mise au point des conditions opératoires sur des substrats modèle : le néridronate et l'acide méthacrylique.....	104
IV.4.1.1.2. Application à la synthèse de monomères (méth) acryliques possédant des chaînes alkylées de longueur variable.....	112
IV.4.1.2. Couplage entre un dérivé acrylique pégylé et un aminoalkylbisphosphonate via une liaison amide (HMBPM2-N)	117
IV.4.1.3. Couplage entre un dérivé acrylique pégylé et un aminoalkylbisphosphonate via une liaison carbamate PEG (HMBPM3-N).....	122
IV.4.2. Synthèse de monomères méthacryliques portant un HMBP non azoté avec deux fonctions esters.....	124
IV.4.2.1. Couplage via des liaisons ester (HMBPM4)	124
IV.4.2.2. Couplage du méthacrylique au bisphosphonate via une liaison ester et une liaison éther (HMBPM5)	131
IV.4.2.3. Couplage via une liaison amide et une liaison éther (HMBPM6)	135

CHAPITRE V : CONCEPTION DE COPOLYMERES HPMA /HMBPM VIA LA RAFT

.....	139
-------	-----

V.1. Introduction	139
V.2. Copolymères HPMA utilisés comme vecteurs d'agents thérapeutiques	140

V.2.1.Origine.....	140
V.2.2.Utilisation clinique.....	140
V.2.3.Conception des copolymères HPMA comme vecteurs d'agents thérapeutiques.....	142
V.3.Polymérisation radicalaire par transfert de chaîne RAFT.....	143
V.3.1.Généralités.....	143
V.3.2.Polymérisation radicalaire par transfert de chaîne RAFT.....	144
V.3.2.1.Origine.....	144
V.3.2.2.Mécanisme de la RAFT.....	145
V.3.2.3.Polymérisation RAFT en milieu aqueux.....	146
V.3.3.Rôle des différents constituants.....	146
V.3.3.1.Choix de l'initiateur.....	146
V.3.3.2.Choix du solvant.....	146
V.3.3.3.Choix de l'agent de transfert.....	147
V.4.Etat de l'art sur la polymérisation RAFT des copolymères HPMA utilisés comme vecteurs.....	149
V.5.Résultats et discussion de la synthèse RAFT des copolymères HPMA/HMBPM.....	151
V.5.1.Synthèse du HPMA.....	151
V.5.2.Polymérisation radicalaire classique des HMBPM1-N et HMBPM5.....	152
V.5.3.Polymérisation ATRP du HMBPM1-N.....	154
V.5.4.Polymérisation RAFT.....	154
V.5.4.1.Synthèse des agents de transfert «CTA».....	155
V.5.4.1.1.Synthèse du S,S'-bis(acide α,α' -diméthylacétique) trithiocarbonate «CMP».....	156
V.5.4.1.2.Synthèse de l'acide dithiobenzoate 4-cyanopentanoïque «CTP».....	157
V.5.5.Méthode générale de Polymérisation RAFT.....	158
V.5.5.1.Synthèse des macro HPMA-CTA.....	158
V.5.5.2.Extension de la chaîne macro poly(HPMA)-CTP avec HMBPM : Synthèse de bloc copolymères HPMA-b-HMBPM5.....	164
V.5.5.3.Synthèse des copolymères statistiques HPMA-stat-HMBPM.....	168
CONCLUSION.....	174
CHAPITRE VI: EXPERIMENTAL PART.....	177
VI.1.Chemical characterization.....	177
VI.1.1.Reagents and Solvents.....	177
VI.1.2.Characterization.....	177
VI.1.2.1.Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR).....	177
VI.1.2.2.Infrared spectroscopy (IR).....	178
VI.1.2.3.Mass spectroscopy (MS).....	178
VI.1.2.4.Size-exclusion chromatography (SEC).....	178
VI.1.2.5.Melting point.....	178
VI.1.2.6.Column chromatography.....	178
VI.1.2.7.Dialysis.....	178
VI.2.Experimental part for the chapter III.....	179

VI.2.1.Procedures, NMR and IR characterization data	179
VI.2.1.1.Synthesis of carboxymethyl dextran 1a	179
VI.2.1.2.Determination of the Substitution Degree of the CMD	180
VI.2.1.3.General Procedure for the synthesis of aminoalkyl bisphosphonates Bps-N... 180	
VI.2.1.4.Coupling between the activated CMD and HMBPs 4	182
VI.3.Experimental part of the chapter IV	183
VI.3.1.Synthesis of aminoalkyl bisphosphonic acid with different chain carbon lengths . 183	
VI.3.2.General Procedure for the synthesis of (meth) acrylic aminobisphosphonic acid HMBPM1-N 6	186
VI.3.3.Synthesis of Methyl 6-aminohexanoate 8	190
VI.3.4.Synthesis of Methyl 6-methacrylamidohexanoate 9	192
VI.3.5.Synthesis of methacrylamidohexanoic acid 10	192
VI.3.6.Swern method for the synthesis of aldehydes from methacrylic PEG alcohol 14 ..193	
VI.3.7.General procedure for the synthesis of carboxylic acid from the corresponding aldehydes 15	195
VI.3.8.General Procedure for the preparation of methacrylic-PEG acid chlorides 16	196
VI.3.9.General Method for the synthesis of HMBPM2-N with PEG linker and amide function 17	199
VI.3.10.Synthesis of activated methacrylic PEG alcohol with carbonyldiimidazole 18	203
VI.3.11.Synthesis of HMBPM3-N with carbamate bound : Coupling of activated PEG alcohol with aminobisphosphonate 19	204
VI.3.12.Synthesis of 2-(methacryloyloxy)ethyl 4-chloro-4-oxobutanoate 20	206
VI.3.13.Synthesis of 5-oxotetrahydrofuran-2,2-diyl)diphosphonic acid 23	206
VI.3.14.Silylated method for the synthesis of bisphosphonates 24	207
VI.3.15.Synthesis of HMPBM4 from transesterification reaction 25	209
VI.3.16.Synthesis of HMBPM5 using tris(trimethyl silyl) phosphite 26	212
VI.3.17.Synthesis of monoprotected PEG compound 27	214
VI.3.18.Synthesis of aldehyde from Bn-PEG-OH 28	215
VI.3.19.Synthesis of 2-(2-(2-(2-(benzyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)acetic acid 29	216
VI.3.20.Synthesis of 1-phenyl-2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-oyl chloride 30	217
VI.3.21.Synthesis of HMBPM5 with 3 PEG units.	218
VI.3.22.Deprotection of hydroxyle group of Bn-PEG-BP 31	219
VI.3.23.Method for coupling of alcohol bisphosphonate 32 with methacryloyl chloride..	219
VI.3.24.General Procedure for the preparation of tosylates compounds 34	220
VI.3.25.Synthesis of azide-PEG-OH 35	222
VI.3.26.Synthesis of carboxylic ester derivatives 36	223
VI.3.27.Method of the saponification of carboxylic ester derivatives 37	224
VI.3.28.Preparation of azide-PEG-carboxylic acid chlorides 38	225
VI.3.29.Synthesis of the compounds N ₃ -PEG-BP 39 with the silylated method.....	226
VI.3.30.Reduction of azide group in the compounds 40	228
VI.4.Experimental part of the chapter V	229
VI.4.1.Synthesis of N-(2-Hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA) 41	229
VI.4.2.Synthesis of the CTAs	230
VI.4.2.1.Synthesis of S,S'-Bis(α,α' -dimethyl acide acétique)- trithiocarbonate 42	230

VI.4.2.2.Synthesis of 4-Cyanopentanoic Acid Dithiobenzoate 44	231
VI.4.3.Method of polymerization.....	233
VI.4.3.1.Synthesis of HPMA macro CTA 45 and 46	233
IV.4.3.2.Synthesis of HPMA-b-HMBPM5(n=5) 47	235
IV.4.3.3.General method for the synthesis of HPMA-st-HMBPM Copolymer 48-56 ...	236
VI.5.Biological Characterization.....	242
VI.5.1.Cell Lines and Cell Culture.....	242
VI.5.2.Cell Viability Experiments.....	242
VI.5.3.Cell Migration Assay.....	243
VI.5.4.Cell Invasion Assay.....	243
VI.5.5.Xenografts in nude mice.....	243
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	245

FIGURES

Figure 1 : Schéma du métabolisme de l'ATP.

Figure 2 : Schéma de la voie du mévalonate.

Figure 3 : Molécules ayant un groupement phosphonate.

Figure 4 : Phosphonates utilisés comme pharmacophores.

Figure 5 : Structure chimique des BPs.

Figure 6 : Structures chimiques des BPs de 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} générations.

Figure 7 : Structure chimique du BP 7033.

Figure 8 : Mécanisme de transport de prodrogues à travers la paroi intestinale.

Figure 9 : Différents types de vecteurs de médicaments.

Figure 10 : Structure du conjugué CPT-PEG.

Figure 11 : Comparaison entre le ciblage actif et passif.

Figure 12 : Liposomes A) première génération : vecteurs nus, B) deuxième génération : vecteurs furtifs, C) vecteurs avec ciblage.

Figure 13 : Structure des conjugués CMD-HMBP.

Figure 14 : Différentes familles de monomères méthacryliques porteurs de HMBP.

Figure 15 : Structures des copolymères HPMA/HMBPMs.

Figure 16 : Structure de la cellulose.

Figure 17 : Structures de la chitine et du chitosane.

Figure 18 : Structures de l'amylose et de l'amylopectine.

Figure 19 : Structure du pullulane.

Figure 20 : Structure de l'acide hyaluronique.

Figure 21 : Structure du Dextrane.

Figure 22 : Structure chimique du conjugué mitomycine-Dextrane.

Figure 23 : Courbes de dosage du CMD par la soude.

Figure 24 : Spectre RMN ¹H du CMD-alendronate.

Figure 25 : Spectre RMN ¹H du CMD-néridronate.

Figure 26 : Toxicité des BPs sur les 3 lignées cancéreuses après un traitement de 72 heures.

Figure 27 : Toxicité du CMD-alendronate et de l'alendronate sur les 3 lignées cancéreuses après traitement de 72 heures.

Figure 28 : Toxicité du CMD-néridronate et du néridronate sur les 3 lignées cancéreuses après traitement de 72 heures.

Figure 29 : Prolifération des cellules A431 en présence de CMD.

Figure 30: Etude de l'effet du CMD, du néridronate et du CMD-néridronate sur la migration et l'invasion cellulaire sur la lignée MDA-MB-231.

Figure 31: Etude de l'effet du CMD, de l'alendronate et du CMD-alendronate sur la migration et l'invasion cellulaire sur la lignée MDA-MB-231.

Figure 32: Taux de croissance des tumeurs issues de cellules MDA-MB-231 après traitement avec l'alendronate libre et le CMD-alendronate.

Figure 33: Conjugaison de l'alendronate au copolymère HPMA.

Figure 34: Copolymère HPMA conjugué à l'alendronate et au paclitaxel.

Figure 35 : Homopolymère et copolymère contenant du pamidronate.

Figure 36 : Structures du PK1 et PK2.

Figure 37: Structure d'un polymère conjugué à PA.

Figure 38 : Différentes familles d'agents de transfert.

Figure 39 : Structures des agents de transfert de chaîne.

Figure 40 : Structures des comonomères HPMA et HMBPMs.

Figure 41 : Structures de HMBPM1-N et HMBPM5.

Figure 42: Structure du a) poly (HMBPM1-N), (b) poly (HMBPM5).

Figure 43: Spectre RMN ^1H a) du HMBPM1-N b) du poly (HMBPM1).

Figure 44: Spectre RMN ^1H du macro HPMA-CTP.

Figure 45: Comparaison de chromatogrammes des macro HPMA-CTP

(**a**) : $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0 = 900/3/1$ et (**b**) : $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0 = 370/1/1$.

Figure 46: Spectre RMN ^1H du macro HPMA-CMP.

Figure 47: Comparaison des deux macro HPMA-CTA.

Figure 48 : Chromatogrammes du macro HPMA-CTP et du copoly (HPMA-b-HMBPM5).

Figure 49: Spectre RMN ^1H du bloc copolymère (HPMA-b-HMBPM5).

Figure 50: Structures des HMBPMs utilisés en copolymérisation.

Figure 51: Chromatogrammes HPMA-stat-HMBPM1-N (n=2) et HPMA-stat-HMBPM1-N (n=10).

Figure 52: Chromatogrammes HPMA-stat-HMBPM5 (n=5) et HPMA-stat-HMBPM5 (n=8).

Figure 53 : Différentes structures des copolymères statistiques synthétisés par la polymérisation RAFT.

SCHEMAS

Schéma 1 : Synthèse des hydroxyméthylène-BPs en une étape.

Schéma 2 : Synthèse de l'alendronate en une étape.

Schéma 3 : Synthèse des hydroxyméthylène-BPs tétraestérifiés par réaction d'Arbuzov.

Schéma 4 : Réarrangement des hydroxyméthylène-BPs tétraestérifiés.

Schéma 5 : Synthèse des hydroxyméthylène-BPs tétraestérifiés en une seule étape.

Schéma 6 : Synthèse des hydroxyméthylène-BPs tétraestérifiés utilisant un solvant protique.

Schéma 7 : Synthèse des hydroxyméthylène-BPs tétrabenzylés.

Schéma 8 : Déalkylation des hydroxyméthylène-BPs tétraestérifiés.

Schéma 9 : Déalkylation des hydroxyméthylène-BPs tétraestérifiés en milieu acide.

Schéma 10 : Déalkylation des dialkyl phosphonates en présence de Me_3SiCl .

Schéma 11 : Déalkylation des hydroxyméthylène-BPs tétraestérifiés en présence d'halogénure de triméthylsilane.

Schéma 12 : Déalkylation sélective des hydroxyméthylène-BPs tétraestérifiés par des sels de métaux alcalins.

Schéma 13 : Synthèse des hydroxyméthylène-BPs tétraacides *via* des phosphites silylés.

Schéma 14 : Synthèse du conjugué PEG- cytosine arabinoside.

Schéma 15 : Synthèse des conjugués Dextran-méthotrexate.

Schéma 16 : Synthèse du dextrane-dicarboxyméthyle-Cisplatine.

Schéma 17 : Synthèse du CMD.

Schéma 18 : Equation du dosage des solutions de phtalate de potassium par de la soude 0,1 N.

Schéma 19 : Equation du dosage des solutions de CMD par la soude.

Schéma 20 : Dextrane T40 sous la forme d'unités H-R-OH.

Schéma 21 : Synthèse de l'alendronate et du nérédronate en une étape.

Schéma 22 : Activation du CMD.

Schéma 23 : Synthèse des conjugués CMD-BP.

Schéma 24 : Synthèse d'un monomère méthacrylique portant un bisphosphonate azoté.

Schéma 25 : Synthèse de monomères méthacryliques bisphosphonates azotés contenant une fonction ester.

Schéma 26 : Synthèse de monomères méthacryliques bisphosphonates azotés contenant un cycle benzénique.

Schéma 27 : Synthèse d'un monomère acide méthacrylate bisphosphonique.

Schéma 28 : Synthèse d'un monomère méthacrylamide portant un bisphosphonate.

Schéma 29 : Synthèse de monomères acrylamides bisphosphoniques.

Schéma 30 : Synthèse d'un acrylique bisphosphonate fluoré.

Schéma 31 : Synthèse de l'acrylamide pamidronate.

Schéma 32 : Synthèse de méthacrylique PEG bisphosphonate.

Schéma 33 : Méthode de couplage dans l'eau de l'acide méthacrylique à l'aminoalkylbisphosphonate.

Schéma 34 : Première approche de rétrosynthèse des **HMBPM1-N**.

Schéma 35 : Synthèse du chlorure de l'acide méthacrylamide **11**.

Schéma 36 : Deuxième approche de rétrosynthèse des **HMBPM1-N**.

Schéma 37 : Réaction de silylation des bisphosphonates.

Schéma 38 : Réaction de couplage du bisphosphonate silylé et du chlorure d'acide méthacrylique.

Schéma 39 : Schéma de synthèse du premier **HMBPM1-N**.

Schéma 40 : Synthèse des aminoalkyl bisphosphonates.

Schéma 41 : Synthèse des **HMBPM1-N**.

Schéma 42 : Oxydation de l'alcool méthacrylique pegylé par des oxydants forts.

Schéma 43 : Synthèse de l'acide méthacrylique PEG.

Schéma 44 : Schéma de synthèse des **HMBPM2-N**.

Schéma 45 : Synthèse des monomères **HMBPM3-N**.

Schéma 46 : Première approche rétrosynthétique des **HMBPM4**.

Schéma 47 : Synthèse du chlorure d'acide méthacrylique **20**.

Schéma 48 : Synthèse du méthacrylique bisphosphonate silylé **21**.

Schéma 49 : Mécanisme de synthèse des bisphosphonates via un phosphite silylé.

Schéma 50 : Hydrolyse du méthacrylique bisphosphonate silylé **21** avec formation de l'alcool méthacrylique **22** et de la lactone **23**.

Schéma 51 : Schéma de synthèse des **HMBPM4**.

Schéma 52 : Synthèse des monomères **HMBPM5**.

Schéma 53 : Rétrosynthèse du **HMBPM5** comportant 3 motifs PEG.

Schéma 54 : Monoprotection du PEG avec le benzyle.

Schéma 55 : Synthèse du chlorure d'acide **30** à partir du PEG monobenzylé **27**

Schéma 56 : Schéma de synthèse du monomère **33** appartenant à la famille **HMBPM5**.

Schéma 57 : Schéma rétrosynthétique des monomères **HMBPM6**.

Schéma 58 : Schéma de synthèse des amines PEG-bisphosphonate **40**.

Schéma 59 : Schéma de synthèse des monomères **HMBPM6**.

Schéma 60 : Désactivation réversible des espèces radicalaires.

Schéma 61: Mécanisme général de la RAFT par les composés dithiocarbonés.

Schéma 62: Synthèse du N-(2-hydroxypropyl) méthacrylamide.

Schéma 63: Synthèse du S,S'-bis(acide α,α' -diméthylacétique) trithiocarbonate (CMP).

Schéma 64: Formation de l'espèce radicalaire active **h**.

Schéma 65 : Synthèse de l'acide dithiobenzoate 4-cyanopentanoïque (CTP).

Schéma 66: Synthèse des macros HPMA-CTP.

Schéma 67: Synthèse des macros HPMA-CMP.

Schéma 68 : Synthèse du bloc copoly (HPMA-b-HMBPM5).

Schéma 69: Synthèse de copolymères statistiques HPMA-stat-HMBPM.

TABLEAUX

Tableau 1 : Utilisation clinique des BPs.

Tableau 2 : Evaluation de l'avancement de la réaction de couplage d'un Bp au RMN.

Tableau 3 : Résultats permettant le calcul du nombre de molécules de BP greffé.

Tableau 4: Poids moléculaire moyen en nombre, poids moléculaire moyen en poids. et indice de polydispersité du dextrane, du CMD et des conjugués CMD-BP.

Tableau 5 : Toxicité des BPs et des conjugués CMD-BP sur les 3 lignées cancéreuses.

Tableau 6 : Temps de réaction, rendements et déplacements chimiques en RMN $\{^1\text{H}\} \text{}^{31}\text{P}$ des différents **HMBPM1-N** synthétisés.

Tableau 7: Temps de réaction, rendements et déplacements chimiques en RMN ^{31}P des monomères **HMBPM2-N**.

Tableau 8 : Temps de réaction, rendements et déplacements chimiques en RMN ^{31}P des monomères **HMBPM4**.

Tableau 9 : Concentrations des réactifs utilisés, taux de conversion, masses molaires théoriques et expérimentales et indices de polydispersité (PDI) des macros HPMA-CTA.

Tableau 10: Concentrations des réactifs utilisés, taux de conversion, masses molaires expérimentales et indices de polydispersité (PDI) des copolymères HPMA-stat-HMBPM.

ABREVIATIONS

ACN : Acétonitrile	DTBA : Acide dithiobenzoïque
AIBN : Azo-bis(isobutyronitrile)	EDC : 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide
ATP : Adénosine triphosphate	EPR : Enhanced Permeability and Retention
ATRP : Polymérisation radicalaire par transfert d'atome	Et₂O : Ether diéthylique
Boc₂O : Di- <i>tert</i> -butyl dicarbonate	EtOH : Ethanol
BPs : Bisphosphonates	FDA :
CCP : Chlorochromatopériodate	FOH : Farnésol
CDI : Carbonyle diimidazole	FPP : Farnésyl diphosphate
CMC : Concentration micellaire critique	GGOH : Géranylgéraniol
CMD : Carboxyméthyl-dextran	GGPP : Géranylgéranyl diphosphate
CMP : s,s'-bis(acide α,α' -diméthyl acétique) trithiocarbonate	HA : Acide hyaluronique
CPADB : 4-dithiobenzoate de l'acide 4-cyano-pentanoïque	HAP : Hydroxyapatite
CPT : Camptothécines	HCM : Hypercalcémie
CTA : Agent de transfert de chaîne	HEMA : 2-Hydroxyéthyl méthacrylate
D.S. : Degré de substitution	HMBPM : Monomère portant un Bp
Da : Daltons (unité)	HMBPM-N : monomère portant un N-Bp
DCCI : Dicyclohexyl carbodiimide	HMBPs : Hydroxyméthylène bisphosphonates
DCM : Dichlorométhane	HMDS : Hexaméthyl-disilazane
DMAP : 4-diméthylaminopyridine	HPMA : N-(2-hydroxypropyl) méthacrylamide
DEX : Dextran	IPP : Isopentényl pyrophosphate
DMAPP : Diméthylallyl pyrophosphate	IR : Infra-rouge
Dox : Doxorubicine	IV : Intraveineuse
DOPC : Dioleoylphosphatidylcholine	LCC : N-Lauryl-carboxyméthyl-chitosan
DOPG : Dioleoylphosphatidylglycerol	MCA : Acide monochloroacétique
DMF : Diméthylformamide	MCP : méthyl (2-méthylcinnolin-2-ium-4-yl)phosphonate
DMSO : Diméthylsulfoxyde	Me₂S : Sulfure de diméthyle
	MeOH : Méthanol

MMA : Acide méthacrylate de méthyle
Mn : Poids moléculaire moyen en nombre
MTX : Méthotrexate
M_w : Masse molaire moyenne en masse
N-BPs : Bisphosphonates azotés
NCS : Néocarzinostatine
NHS : N-Hydroxysuccinimide
PA : Principe actif
PCC : Chlorochromate de pyridinium
PDI : Indice de polydispersité
PGA : Polyglycolides
PLA : Poly (acide lactique)
PLGA : Poly(acide lactique co-glycolique)
PMMA : Poly méthacrylate de méthyle
POM : Pivaloyloxyméthyl
PPi : Pyrophosphate
ppm : Partie par million

PEG : Polyéthylène glycol
RAFT : Reversible addition fragmentation chain transfer
RMN (NMR) : Résonance magnétique nucléaire
SEC : Chromatographie d'exclusion stérique
SPIO : Small particule iron oxide
SFRP : Polymérisation radicalaire stable
SMA : Styrène Anhydride Maléique
SMANCS : Styrène-Maléique Anhydride Néocarzinostatine
TEA : Triéthyl amine
THF : Tétrahydrofurane
USPIO : Ultra small particule iron oxide
V_d : Volume de distribution
VEGF : Facteur endothélial de croissance vasculaire
VIP-R : Récepteur au peptide vasoactif intestinal

INTRODUCTION

Plusieurs dizaines de molécules possédant des propriétés pharmacologiques intéressantes *in vitro* sont abandonnées chaque année en raison des propriétés physico-chimiques (hydrophilie, poids moléculaire, etc...) défavorables à leur développement *in vivo*. En effet, aucun médicament ne peut exercer une activité thérapeutique si la molécule biologiquement active qu'il renferme n'est pas capable de franchir les barrières biologiques qui séparent son site d'administration de son site d'action. C'est pourquoi, le développement de vecteurs de médicaments a pris un essor considérable au cours des dernières années, et plus particulièrement la vectorisation à l'aide des polymères.¹

La conjugaison des agents thérapeutiques à des polymères permet d'obtenir une macromolécule thérapeutique ayant des propriétés structurales, physico-chimiques et biologiques uniques. Ces propriétés avantageuses par rapport aux médicaments de faible poids moléculaire sont : 1- une bonne solubilité dans l'eau pour les médicaments hydrophobes et une meilleure biodisponibilité ; 2- une protection des médicaments instables vis-à-vis d'une détérioration ; 3- une longue durée de circulation dans le sang; 4- une diminution de la toxicité non spécifique du médicament conjugué ; 5- une accumulation accrue active du médicament au site de la tumeur par ciblage et/ou augmentation de l'accumulation passive du médicament au niveau du site tumoral par l'effet de perméabilité et de rétention (EPR) ;² 6- une capacité à délivrer deux ou plusieurs médicaments ayant des propriétés différentes sur le même site, et l'amélioration de leur efficacité par des effets coopératifs.^{3,4}

Les bisphosphonates sont connus pour leurs propriétés anti-résorptives qui permettent leur utilisation notamment dans le traitement et la prévention des désordres osseux de l'ostéoporose, de la maladie de Paget résultant d'un métabolisme anormal du calcium ou encore de la dysplasie fibreuse des os. Plus récemment, en dehors de leur action directe sur les ostéoclastes, des études ont également montré que les bisphosphonates pourraient directement inhiber la prolifération cellulaire tumorale et induire l'apoptose.^{5,6} De ce fait, ils sont administrés dans le traitement des métastases osseuses de divers cancers,⁷ en particulier en cas de tumeurs du sein,⁸ et de la prostate,⁹ de carcinome épidermoïde,¹⁰ d'ostéosarcome¹¹ et de myélome.¹² Ils pourraient également inhiber l'angiogénèse tumorale.¹³

Malheureusement, les bisphosphonates ont une faible biodisponibilité et un tropisme osseux important. En effet, seulement 5 à 7 % de la quantité de bisphosphonate administrée par voie orale est métabolisée. Et lorsqu'ils sont administrés par injection intraveineuse, ils sont rapidement éliminés du plasma en raison de leur excrétion rénale et leur accumulation dans l'os.¹⁴ Cet inconvénient thérapeutique est dû à une faible lipophilie et un bon pouvoir de chélation des cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) dans le tractus gastro-intestinal.

Les bisphosphonates ont également montré des effets secondaires qui pourraient empêcher leur administration par voie orale comme l'inflammation de l'œsophage, l'irritation de l'estomac ou des douleurs abdominales dues à la toxicité gastro-intestinale. Leur utilisation par voie intraveineuse peut induire des myalgies et des fièvres, des effets secondaires ophtalmologiques rares,¹⁵ une toxicité rénale¹⁶ et une ostéonécrose de la mâchoire chez des patients traités au stade IV d'un cancer.¹⁷

Afin de changer la cible « naturelle » des bisphosphonates, nous avons alors envisagé la vectorisation de ces composés en les conjuguant à un support polymère inerte. Pour cela, un bon vecteur doit être biodégradable ou respectant la limite rénale, non toxique et biocompatible, et les produits de dégradation formés doivent être bioéliminables par les voies métaboliques normales. Les macromolécules utilisées doivent être également dépourvues d'antigénicité et d'immunogénicité, elles ne doivent pas être hémolytiques, ni procoagulantes ou avoir une activité cytotoxique. En outre, le médicament doit être délivré sur le site cible à partir de la prodrogue polymère sous sa forme active.

Un grand nombre de prodrogues macromoléculaires ont été développées en utilisant différents types de vecteurs polymères, principalement dans le domaine du cancer. Elles sont conçues pour contrôler la libération du médicament, modifier la biodistribution ou l'excrétion et réaliser le ciblage des médicaments. Les polymères synthétiques, tels que HPMA, et les macromolécules naturelles, telles que le dextrane, sont souvent utilisées comme vecteur de médicaments conjugués aux agents antitumoraux.¹⁸

Nous avons alors choisi deux polymères afin de synthétiser ces nouveaux conjugués. Le premier est naturel, notre choix s'est porté sur le dextrane car outre son affinité avec les cellules tumorales, ce transporteur présente notamment l'intérêt d'être biocompatible, biodégradable, non dégradé dans les lysosomes et bioéliminable. Ce polymère a été largement utilisé comme prodrogue pour plusieurs principes actifs anticancéreux.^{3,19}

Le deuxième polymère étudié est un polymère synthétique et non biodégradable. Notre choix s'est porté sur les copolymères HPMA car ils sont connus pour être des systèmes polymères utilisés avec succès pour le ciblage passif. Ils sont très hydrophiles, non immunogènes, non toxiques et ils ont une longue circulation dans le sang.^{4,20}

Afin de conjuguer des agents thérapeutiques avec ces macromolécules, différentes liaisons chimiques labiles peuvent être utilisées, parmi lesquelles on peut citer la liaison amide, ester ou carbamate.

Ce manuscrit se divise en cinq chapitres essentiels. Nous décrivons dans le premier les agents pharmacologiques synthétiques utilisés qui sont les bisphosphonates (BPs). Nous ferons un bref état de l'art sur l'historique, la synthèse ainsi que les propriétés biologiques antitumorales et les inconvénients marquants de ces molécules.

Nous présenterons par la suite l'une des solutions envisagées pour remédier aux inconvénients de ces agents thérapeutiques, à savoir la vectorisation. Le deuxième chapitre décrira donc l'intérêt de la vectorisation, les trois avancées majeures dans ce domaine, les différents systèmes de vectorisation particuliers et enfin les objectifs détaillés de notre travail.

Après avoir décrit l'agent thérapeutique étudié et la méthode de vectorisation utilisée, nous aborderons dans le troisième chapitre la vectorisation de ces agents thérapeutiques à l'aide de polysaccharides. Nous allons définir dans un premier temps les différents vecteurs polysaccharidiques utilisés dans la littérature et nous justifierons le choix du polymère naturel qu'est le dextrane pour la suite de notre travail. Nous rappellerons les propriétés du dextrane, ses applications biomédicales et ses avantages en vectorisation. Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous présenterons la stratégie utilisée pour la synthèse de deux conjugués CMD-BP, ainsi que leur caractérisation et leur évaluation biologique *in vitro* et *in vivo*.

Dans le chapitre suivant, nous réaliserons un bref état de l'art sur les polymères portant un groupement acide bisphosphonique utilisés en tant que vecteurs, ainsi qu'un résumé sur les synthèses développées dans la littérature de différents monomères (méth)acryliques phosphonates et bisphosphonates.

Nous détaillerons ensuite les différentes approches adoptées pour la synthèse de nouvelles familles de monomères (méth)acryliques portant un motif hydroxyméthylène bisphosphonate

HMBPMS. L'influence de la longueur de chaîne entre le (méth)acrylate et le bisphosphonate ainsi que la nature chimique de l'espaceur seront étudiées sur l'efficacité biologique de ces vecteurs de BPs. En effet, nous avons réalisé la synthèse de cinq nouvelles séries de monomères (méth)acryliques hydroxyméthylène bisphosphonates HMBPMS originaux. Ces monomères peuvent être porteurs d'un HMBP azoté (HMBPM-N : pamidronate, alendronate, nérédronate,...) lié soit directement par une liaison amide ou carbamate, soit par un espaceur PEG, mais également porteurs d'un HMBP non azoté (HMBPM) et lié directement par une liaison ester, ou indirectement avec un espaceur PEG.

Dans le dernier chapitre, Nous ferons un bref état de l'art sur l'origine et l'utilisation des copolymères d'hydroxypropyl méthacrylamide (HPMA) comme vecteur d'antitumoraux. Nous rappellerons par la suite le procédé de polymérisation radicalaire contrôlée, plus particulièrement la RAFT ; technique qui va être utilisée pour la synthèse des copolymères HPMA/HMBPM. Nous discuterons par la suite les premiers résultats obtenus sur les différentes synthèses de copolymères HPMA-HMBPM utilisant la polymérisation radicalaire RAFT.

CHAPITRE I : LES BISPHOSPHONATES

I.1.Introduction

Le phosphore est l'un des six éléments essentiels avec le carbone, l'hydrogène, l'azote, l'oxygène et le soufre nécessaires à toute vie connue sur terre. Ces six éléments ainsi que certains métaux sous la forme de traces se retrouvent dans tous les êtres vivants. Ils entrent dans la composition des acides nucléiques, des protéines, des lipides et jouent un rôle essentiel dans les structures et processus biologiques.

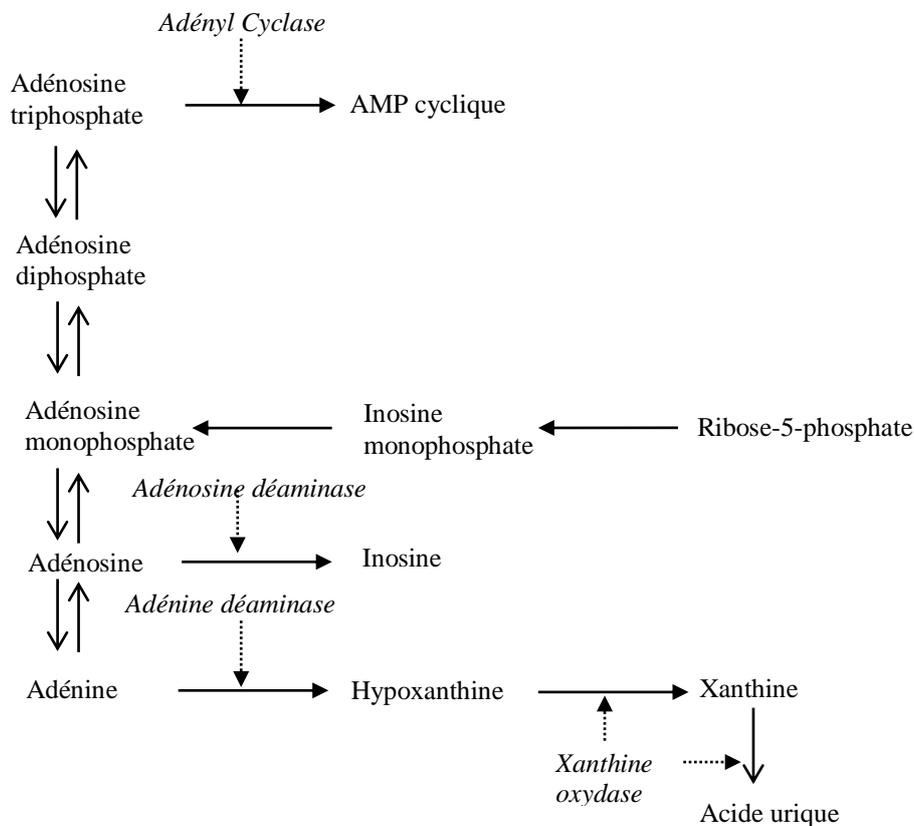


Figure 1 : Schéma du métabolisme de l'ATP

Le phosphore est souvent associé en biologie au groupement phosphate ou pyrophosphate. Le groupement phosphate entre dans la composition de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et de l'acide ribonucléique (ARN), ainsi que dans des phospholipides et dans l'adénosine triphosphate (ATP). Le phosphore, sous forme de pyrophosphate, joue un rôle essentiel en biochimie cellulaire. On peut citer par exemple la conversion réversible de l'ATP en adénosine diphosphate (ADP) ou en adénosine monophosphate (AMP). Ce processus

d'hydrolyse produit une grande quantité d'énergie qui peut être mise à profit pour conduire de nombreux processus enzymatiques nécessitant de l'énergie (*Figure 1*).

Les pyrophosphates jouent également un rôle important dans les transformations catalysées par des enzymes qui conduisent à la formation de biomolécules. Par exemple, la synthèse de terpènes d'ordre supérieur dans les plantes est réalisée grâce à la voie des isoprénoïdes (voie du mévalonate) (*Figure 2*). Au cours des différentes étapes, les étapes de phosphorylation et d'hydrolyse du pyrophosphate jouent un rôle essentiel dans la formation de ces biomolécules. Chez les mammifères, la voie du mévalonate est également responsable de la prénylation des petites protéines G (Rho, Ras, Rac, Rab), une modification post-traductionnelle qui consiste en l'ajout de groupements FPP (Farnésyl diphosphate) ou GGPP (Géranylgéranyl diphosphate).

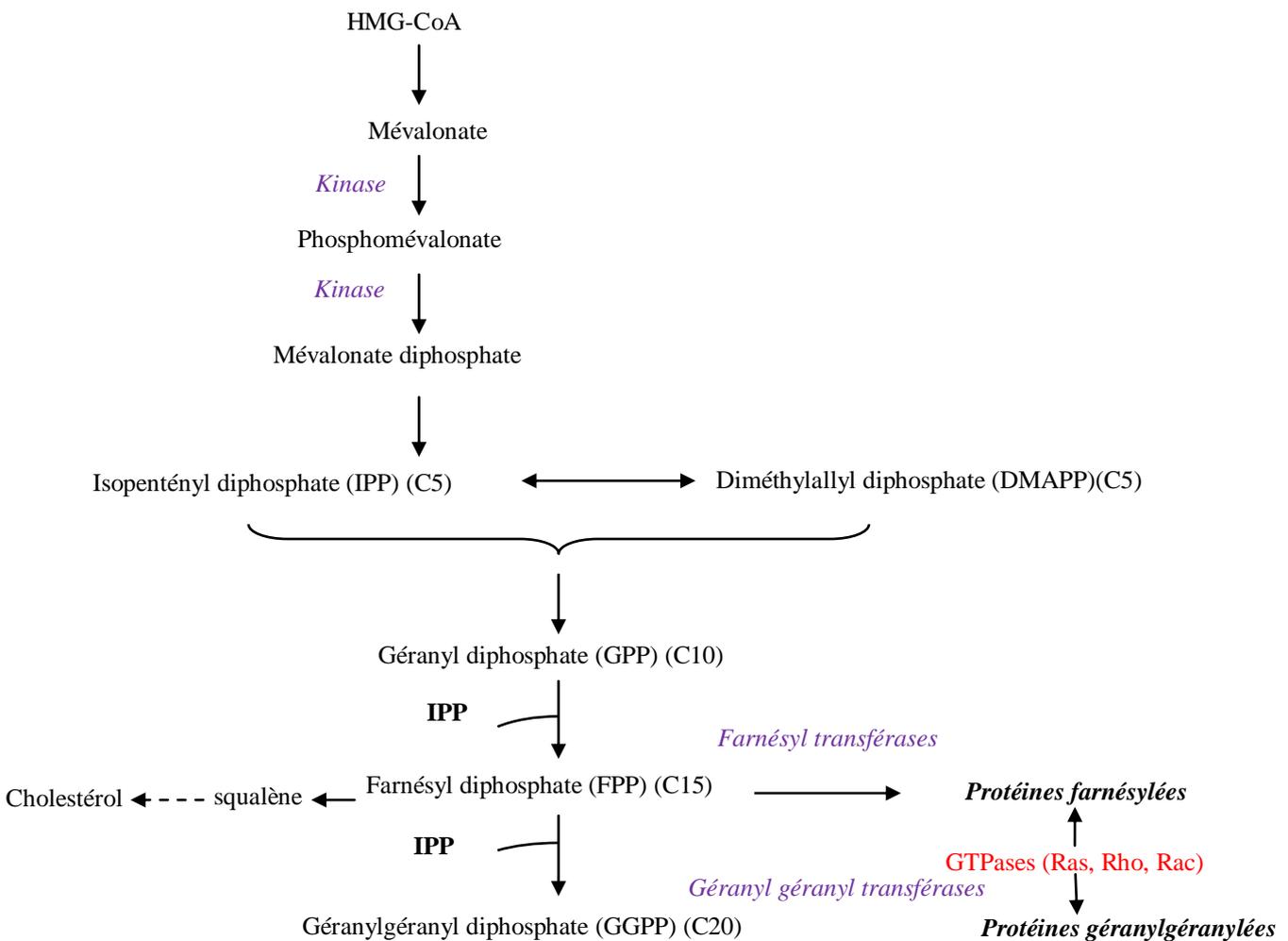


Figure 2 : Schéma de la voie du mévalonate.

Bien qu'ayant un profil pharmacologique intéressant, les phosphates ont tendance à s'hydrolyser notamment au contact des phosphatases digestives et par conséquent, ils sont de mauvais candidats en tant que médicaments.

Le potentiel des phosphonates comme mimes des phosphates a été identifié depuis de nombreuses années.^{21,22} En effet, ils ne sont pas hydrolysés aussi facilement dans un environnement biologique et la présence d'un atome de carbone à la place d'un atome d'oxygène permet d'accéder généralement à des composés aussi actifs, et possédant une stabilité et une lipophilie accrues. On retrouve la fonction phosphonate dans de nombreuses molécules ayant des activités biologiques assez variées. Les phosphonates sont très utilisés comme pesticides (MCP, **A**)²³ comme fongicides (méthylphosphonate de diphenyle, **B**), comme herbicides (glyphosate, **C**) (*Figure 3*).

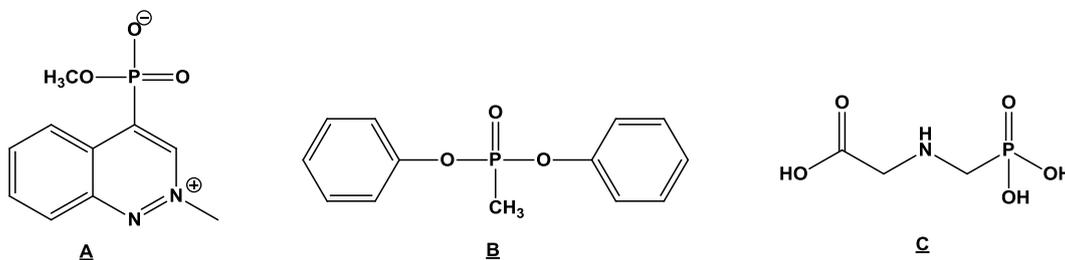


Figure 3 : Molécules ayant un groupement phosphonate.

Les phosphonates sont aussi largement représentés comme pharmacophores dans diverses classes d'agents thérapeutiques. Il s'agit notamment de nucléotides antiviraux et anticancéreux, des inhibiteurs de biosynthèse du cholestérol, des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. On peut citer par exemple Ténofovir **D**, un nucléoside acyclique phosphonylé (*Figure 4*). Ce médicament est utilisé pour ses propriétés antivirales car il inhibe la transcriptase inverse dans les rétrovirus. Il est utilisé dans le traitement de maladies virales telles que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et l'hépatite B.²⁴ L'Adéfovir **E**, un inhibiteur nucléotidique de la transcriptase inverse, a montré une activité contre les rétrovirus, y compris le virus de l'herpès, alors que le Cidofovir **F** a montré une efficacité dans le traitement des virus à ADN tels que HPV23²⁵ (*Figure 4*).

L'Alafosfaline **G** (*Figure 4*), un antibiotique à large spectre d'activité a démontré sa capacité à inhiber la biosynthèse de la paroi cellulaire.²⁶ Il s'est avéré être potentiellement utile dans le traitement de la gastro-entérite et d'infections bactériennes des voies urinaires.²⁷

Les α -fluoro- α -alkylphosphonates **H** sont une classe de phosphonates qui ont été développés pour mimer les phosphates biologiques.²⁸ Ils sont étudiés pour leur capacité à inhiber certaines enzymes utilisant les phosphates comme co substrat²⁹ (Figure 4).

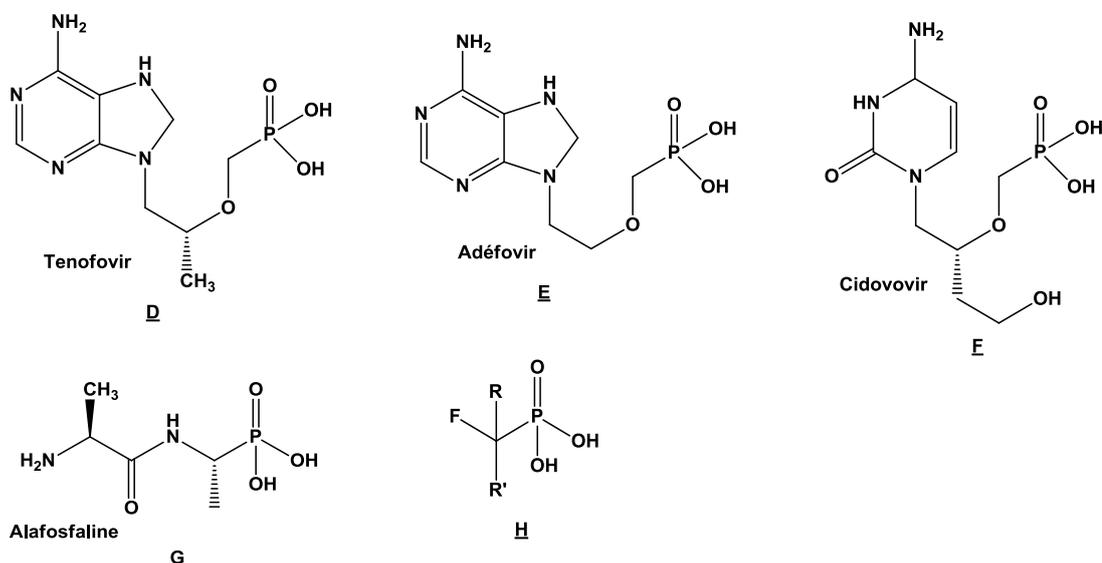


Figure 4 : Phosphonates utilisés comme pharmacophores

En plus des traitements antibiotiques et antiviraux utilisés en clinique, les phosphonates ont montré leur potentiel pour le traitement du cancer³⁰ et des maladies parasitaires.^{31,32} Leur capacité à inhiber la croissance de cellules malignes^{33,34} ainsi que leur capacité à activer les cellules T $\gamma\delta$ sont bien documentées.³⁵

Parmi ces agents thérapeutiques phosphorés, les bisphosphonates occupent une place très importante depuis maintenant une vingtaine d'années. Ces molécules ont trouvé des applications biologiques très variées allant du traitement des maladies osseuses jusqu'à plus récemment, le traitement des métastases osseuses et viscérales. Nous allons développer dans les prochains paragraphes les propriétés biologiques de ces composés.

I.2. Propriétés biologiques des bisphosphonates

I.2.1. Introduction

Les premiers bisphosphonates (BPs) ont été synthétisés au milieu du 19^{ème} siècle. Ces composés, appelés aussi diphosphonates, ont trouvé rapidement une application industrielle en raison de leur forte capacité de complexation des métaux³⁶ (Figure 5).

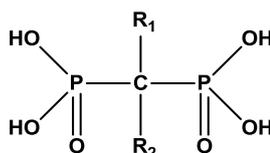


Figure 5 : Structure chimique des BPs

L'acide 1-hydroxyéthylène-1,1-bisphosphonique ou étidronate ($R_1=OH$; $R_2=CH_3$) a été utilisé comme détartrant et comme agent préventif de la corrosion des canalisations. Ce n'est que depuis les années 1960 que les BPs ont trouvé une application thérapeutique dans différentes pathologies osseuses. Fleisch et collaborateurs ont montré que ces composés sont les isostères stables des groupements pyrophosphates dans lesquels la liaison phosphoanhydride $(HO)_2P(O)-O-P(O)(OH)_2$ est remplacée par un méthylène plus stable $(HO)_2P(O)-CR_1R_2-P(O)(OH)_2$ et comme le pyrophosphate, ils inhibent la formation, l'agrégation, la croissance et la dissolution des cristaux d'apatite.^{37,38} Les BPs sont utilisés aujourd'hui chez l'homme pour traiter certains troubles du métabolisme ostéocalcique.

Le remplacement de l'atome d'oxygène entre les deux groupements acide phosphonique par un atome de carbone et donc de ses deux substituants (R_1 et R_2) a permis d'ouvrir de réelles possibilités dans la conception de nouveaux agents thérapeutiques.

Ces composés possèdent une structure tridimensionnelle leur permettant de se lier à des cations divalents, notamment le calcium. Ils peuvent ainsi cibler les sites ostéoclastiques du tissu minéralisé et par conséquent inhiber la résorption osseuse.³⁹

Depuis 35 ans, trois générations de BPs ont été développées. La première génération est représentée par l'étidronate et le clodronate. Ils constituaient des inhibiteurs peu puissants de la résorption osseuse. La seconde génération concernait uniquement les dérivés hydroxylés ($R_1=OH$) avec une chaîne latérale R_2 comportant une chaîne aminoalkylée simple. Le pouvoir thérapeutique de ces molécules avait alors été augmenté d'un facteur 1000. La substitution de la chaîne latérale R_2 par un hétérocycle azoté ou une amine tertiaire plus lipophile constitue la troisième génération et a permis d'augmenter encore sensiblement l'activité biologique (*Figure 6*) Par exemple, un atome d'azote dans un groupe pyridyl comme le risédronate ou bien deux atomes d'azote dans un groupe imidazol tel que le zolédronate, a donné naissance

aux BPs de troisième génération dont le pouvoir anti-résorptif est 10^6 fois plus important que celui présenté par les BPs de première génération.⁴⁰

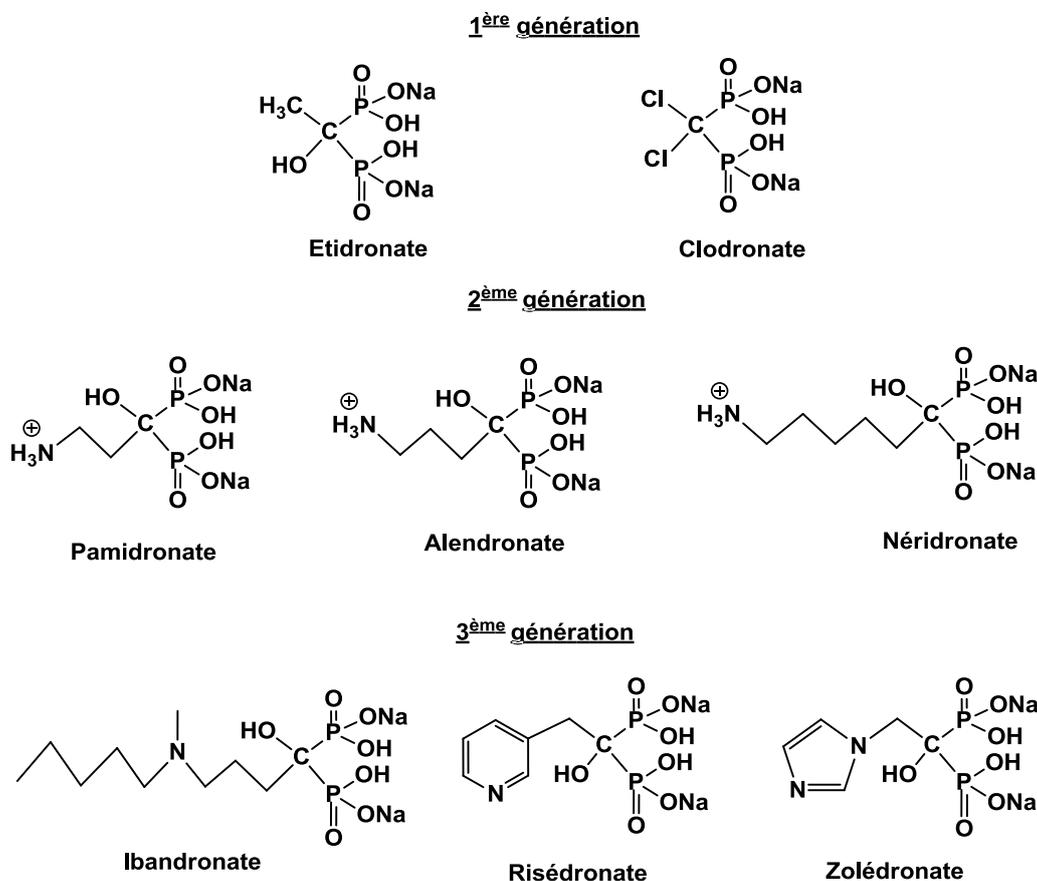


Figure 6 : Structures chimiques des BPs de 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} générations.

I.2.2. Utilisation des bisphosphonates en clinique

Les propriétés anti-résorptives des BPs permettent leur utilisation dans le traitement et/ou la prévention des désordres osseux de l'ostéoporose, de la maladie de Paget résultante d'un métabolisme anormal du calcium ou encore de la dysplasie fibreuse des os. Certains BPs (pamidronate et clodronate principalement) sont également utilisés en tant que palliatif dans le traitement des complications osseuses (ostéolyse, hypercalcémie, fractures, douleurs) associées aux métastases osseuses de certains cancers.⁴¹

En médecine nucléaire, les BPs sont utilisés de façon routinière en scintigraphie pour la détection des métastases osseuses car ils forment avec le technétium radioactif, ^{99m}Tc , un complexe stable qui s'accumule dans le tissu osseux.^{39,42,43}

Les bisphosphonates ont été peu évalués chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ou de spondylarthropathie. Leur seule utilisation reconnue est la prévention et la prise en charge de l'ostéoporose cortisonique notamment au cours de la polyarthrite rhumatoïde.⁴⁴

Enfin, ces molécules sont nouvellement entrées dans l'étude des traitements des maladies parasitaires, de l'athérosclérose, dans la prévention du déchaussement des prothèses et du dépôt calcaire sur les dents.^{31,41}

Ces dernières années, des observations cliniques ainsi que de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* suggèrent un bénéfice direct des BPs en thérapie anticancéreuse.⁴⁵ En effet, différentes études ont montré que parallèlement à leur activité anti-ostéoclastique, les BPs exercent également une activité antitumorale, interférant avec la prolifération, la survie, l'adhésion, l'invasion et la progression métastatique de divers types de cellules tumorales.^{46,47} Aussi, l'observation *in vitro* et *in vivo* de l'effet bénéfique de l'utilisation conjointe des BPs et de différents agents anticancéreux est à l'origine de plusieurs essais cliniques actuellement en cours, évaluant l'efficacité du clodronate, du pamidronate, du zolédronate et de l'ibandronate⁴⁸ en thérapie anticancéreuse adjuvante (en particulier pour les cancers du sein et de la prostate).^{45,49}

Le *Tableau 1* résume les activités des différents BPs commercialisés ou non ainsi que leurs utilisations en médecine.

Tableau 1 : Utilisation clinique des BPs

Bisphosphonates	Indications	Administration	Pouvoir relatif
Etidronate	-Traitement et prévention de l'ostéoporose (post-ménopausiques, endocriniennes) -Maladie osseuse de Paget -Scintigraphie osseuse	Oral et IV	1x

Clodronate	-Management des lésions ostéolytiques -Hypercalcémie et douleur osseuse associées aux métastases osseuses dans les cancers du sein et des myélomes multiples	Oral et IV	10x
Pamidronate	-Traitement de l'hypercalcémie induite par les tumeurs -Prévention des événements osseux chez les patients atteints de métastases osseuses -Maladie osseuse de Paget -Ostéoporose	IV	100x
Alendronate	-Traitement de l'ostéoporose post-ménopausique	Oral	100x à 1000x
Ibandronate	-Traitement de l'ostéoporose post-ménopausique avec risque élevé de fracture -Prévention des événements osseux chez les patients atteints de cancer et métastases osseuses -Traitement de l'hypercalcémie induite par les tumeurs	Oral et IV	1000x à 10000x
Risédrone	-Traitement de l'ostéoporose post-ménopausique -Traitement de l'ostéoporose masculine -Maladie osseuse de Paget	Oral	1000x à 10000x
Zolédronate	-Traitement de l'ostéoporose post-ménopausique et masculine -Traitement de l'ostéoporose associée à une corticothérapie au long cours par voie générale chez la femme post-ménopausée et chez l'homme -Maladie osseuse de Paget -Prévention des événements osseux chez les patients atteints de métastases osseuses -Traitement de l'hypercalcémie induite par les tumeurs	IV	>10000

I.2.3. Propriétés antitumorales des bisphosphonates

I.2.3.1. Inhibition de la prolifération des cellules tumorales *in vitro*

Différentes études *in vitro* ont montré que les BPs inhibent la prolifération de nombreux types cellulaires.^{47,50}

Ces composés exercent des effets cytostatiques et pro-apoptotiques directs sur des lignées tumorales humaines (myélomes, sein, prostate, pancréas) de manière dose et temps dépendant. Les concentrations de BPs utilisées pour produire ces effets cytostatiques et apoptotiques varient entre 5 et 2000 μM . Les résultats indiquent que les BPs inhibent, *in vitro*, la prolifération de cellules tumorales mammaires^{51,52} et prostatiques.⁹

L'augmentation de l'apoptose s'accompagne d'un changement de la morphologie du noyau de la cellule, d'une fragmentation de l'ADN, d'une réduction de l'expression du gène bcl-2 (gène anti-apoptotique),⁵³ d'un relargage de cytochrome C mitochondrial,⁸ et d'une activation de caspases⁵¹, en particulier de la caspase 3.⁵⁴

Les BPs inhibent également *in vitro* la prolifération de cellules de myélomes par induction de l'apoptose.^{12,33} Ils sont utilisés dans le traitement de leucémies lymphoblastiques.^{55,56} Les doses nécessaires permettant cet effet inhibiteur *in vitro* varient non seulement suivant le type de BPs utilisés mais également suivant le type de lignée cellulaire étudiée. Actuellement, le BP commercialisé le plus actif sur la prolifération de cellules tumorales *in vitro* est l'acide zolédronique qui par exemple, inhibe la prolifération de cellules tumorales mammaires (MDA-MB-231) pour des concentrations supérieures à 100 Mm .⁵⁷

Les modes d'action des BPs sont différents selon leurs structures :

- Les BPs possédant un groupement amine dans leur cycle (N-BPs), tels que le risédronate et l'alendronate, inhibent une enzyme clé de la voie du mévalonate, la farnésyldiphosphate synthétase, ce qui bloque la synthèse du farnésyldiphosphate et de ses dérivés dont le géranylgeranyldiphosphate. La conséquence de ce blocage est une inhibition de la farnésylation et de la géranylgeranylation de GTPases (Ras, Rac, Rab, Rho) nécessaires à la réorganisation du cytosquelette et à la formation de la bordure en brosse de l'ostéoclaste.⁵⁸

Dans les cellules tumorales, les BPs bloquent en particulier la prénylation de la protéine Ras, inhibant ainsi la prolifération de ces cellules.

- Les BPs ne possédant pas un groupement aminé dans leur cycle, après avoir été incorporés dans l'ostéoclaste sont métabolisés en analogues de l'ATP (AppCp-type) non hydrolysables, qui inhibent les enzymes ATP-dépendantes. Ces métabolites sont cytotoxiques et certains BPs (dont le clodronate) agissent comme prodrogues et sont convertis en métabolites toxiques.⁵⁹

I.2.3.2. Inhibition de l'adhésion des cellules tumorales *in vitro*

Les cellules tumorales mammaires et prostatiques adhèrent fortement à l'os *in vitro*.⁶⁰ L'inhibition de l'adhésion tumorale induite par les BPs^{60,61} est dose dépendante. L'ordre relatif du potentiel des BPs sur l'adhésion est : ibandronate > risédronate > pamidronate > clodronate, les maxima d'inhibition étant atteints pour des concentrations comprises entre 10^{-8} et 10^{-6} M.⁶²

Il existe une reconnaissance spécifique des BPs par les cellules de cancers du sein et de la prostate. La présence de l'intégrine $\gamma_v\gamma_3$ sur les cellules tumorales favorise l'adhésion de ces cellules à l'os. Les BPs diminueraient l'affinité de l'intégrine $\gamma_v\gamma_3$ à la matrice extracellulaire et/ou l'activation de quelques GTPases prénylées (Ras, Rho) nécessaires à l'activité des intégrines.⁶²

I.2.3.3. Inhibition de la migration et de l'invasion des cellules tumorales *in vitro*

L'effet des BPs a été testé sur la migration des cellules en chambre de Boyden. Ce modèle est constitué d'un filtre poreux comportant une couche mince de fibronectine sur laquelle sont déposées les cellules. Celles-ci sont susceptibles de traverser le filtre sous l'influence de chémoattractants. Après dix heures, les cellules ayant traversé le filtre sont dénombrées.

Nous avons, suivant cette technique, étudié la migration de cellules tumorales A431 (carcinomes épidermoïdes). Pour des doses de 50 μ M, l'inhibition était respectivement de 99% et 43% pour le pamidronate et l'alendronate, alors que le nérédronate n'avait pas d'effet. De manière comparable, les cellules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) sont inhibées à plus de 90% par le zolédronate à 100 μ M, alors que le clodronate n'a pas d'effet.⁶³ L'invasion tumorale est importante pour la formation des métastases. Elle nécessite à la fois la migration des cellules tumorales et l'activité protéolytique de métalloprotéases secrétées par les cellules tumorales afin de favoriser leur détachement de la matrice extracellulaire. Les

études menées sur les cellules de carcinomes mammaires (MDA-MB-231) et de prostate (PC 3 et DU 145) ont permis de classer les BPs en fonction de leur action anti-invasive : zolédronate > ibandronate > risédronate > clodronate,⁶⁴ les maxima d'inhibition étant atteints pour des concentrations comprises entre 10^{-8} et 10^{-6} M. Par ailleurs, plusieurs auteurs ont montré que les BPs inhibaient l'activité (mais pas la production) de métalloprotéases matricielles des cellules de carcinomes mammaires ou de prostate.^{64,65}

I.2.3.4. Inhibition de la croissance tumorale et de l'angiogenèse *in vivo*

L'angiogenèse est constituée de plusieurs étapes telles que la prolifération des cellules endothéliales et leur réarrangement dans l'espace pour former des tubes capillaires.

Des données récentes soulignent l'implication très probable de facteurs angiogéniques dans le développement des métastases osseuses.⁶⁶

Ainsi, Van der Pluijm et collaborateurs dans un travail utilisant un modèle murin *in vivo* de métastases expérimentales de cellules mammaires (MDA-MB-231), ont émis l'hypothèse que l'augmentation de l'expression de facteurs angiogéniques (VEGF) et ostéolytique (PTH) par les cellules tumorales serait impliquée dans l'ostéotropisme et l'ostéolyse des métastases osseuses.⁶¹

Peu d'études ont porté sur le potentiel anti-angiogénique des BPs, et la majorité d'entre elles ont été menées sur des modèles non tumoraux. Fournier et collaborateurs ont montré que l'ibandronate et le zolédronate réduisent la prolifération des cellules endothéliales et la formation de tubes capillaires *in vitro*, ainsi que la revascularisation de la prostate de rats castrés et traités à la testostérone.⁶⁷ Une autre étude démontre que le clodronate, le pamidronate et le zolédronate exercent une activité anti-angiogénique dans le modèle de membrane chorioallantoïdienne de poulet et que l'administration systémique de zolédronate inhibe, chez la souris, l'angiogenèse d'implants sous-cutanés imprégnés de FGF 2.⁶⁸ Une étude, chez des patients présentant des métastases osseuses et traités par le pamidronate, a démontré une baisse du VEGF circulant, connu pour être un facteur pro-angiogénique.⁶⁹

Notre laboratoire a démontré qu'un BP (BP 7033), dérivé du phényl acétate de sodium (*Figure 7*), inhibait la croissance de tumeurs mammaires MCF-7 ras xénogreffées chez la souris nude et présentait des effets anti-angiogéniques.⁷⁰

Le laboratoire a montré que ce BP 7033 présentait des activités antitumorales et était un inhibiteur de l'angiogénèse dans des modèles *in vitro* aussi bien que dans des modèles de tumeurs A431 xénogreffées chez la souris nude.¹³ Dans ce modèle *in vivo*, la croissance tumorale et l'angiogénèse intratumorale ont été inhibées de 65%, sans signe de toxicité pour l'animal.

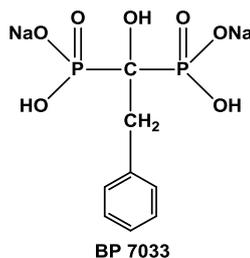


Figure 7 : Structure chimique du BP 7033

Si à l'heure actuelle l'activité anti-proliférative des BPs sur les cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* et les métastases osseuses est bien établie, l'activité des BPs sur les tumeurs et les métastases viscérales est encore débattue. Cependant, il existe de plus en plus de preuves cliniques et précliniques montrant que les bisphosphonates ont des effets antitumoraux directs en diminuant la croissance tumorale ou indirects par ces propriétés antiangiogéniques.⁷¹

I.3.Toxicité des bisphosphonates

Les bisphosphonates sont associés à différents effets indésirables.

A court terme, les bisphosphonates ingérés par voie orale sont associés à la survenue d'effets indésirables gastro-intestinaux, tandis que les bisphosphonates injectés par voie intraveineuse sont associés à la survenue de réactions de phase aiguë, de douleurs musculo-squelettiques, de réactions d'hypersensibilité cutanée et d'une dysfonction rénale. Les fractures sous-trochantériennes et l'ostéonécrose des maxillaires semblent davantage être associées à la prise à long terme ou à la prise de doses élevées de bisphosphonates.⁷²

La toxicité des BPs est très réduite lorsqu'ils sont administrés par petites doses car les tissus non osseux ne sont exposés que peu de temps et en quantités infimes. Cependant, leur biodisponibilité dans ce type de tissu dépend de plusieurs paramètres comme par exemple leur mode d'administration, leur nature différente ou bien encore leurs propriétés

biochimiques.^{73,74} En effet, la toxicité des BPs dépend de la dose ingérée et de leur mode d'administration. La concentration tissulaire en BPs semble plus élevée et leur élimination moins rapide lorsqu'ils sont administrés par voie orale plutôt que par voie intraveineuse.

Un des principaux effets secondaires du traitement lors d'une administration par voie orale avec la plupart des aminoBPs, est une intolérance gastro-intestinale.^{75,76} En effet, divers troubles tels que des nausées, vomissements, diarrhées et ulcères peuvent être associés à ce type de thérapie.^{77,78} Les aminoBPs agiraient alors en induisant l'apoptose ou en inhibant la croissance des cellules épithéliales de l'intestin. Les effets secondaires produits par l'absorption des BPs sont diminués lorsqu'ils sont ingérés avec de la nourriture, spécialement en présence de cations comme le calcium ou le fer. Des études précliniques montrent clairement que la prise de nourriture avec l'alendronate supprime l'effet de son absorption.⁷⁹ Lorsqu'ils sont injectés en grande quantité par voie intraveineuse, la toxicité des BPs est surtout rénale (une injection rapide par voie intraveineuse d'une quantité supérieure à 200 ou 300 mg peut causer d'importantes défaillances rénales). L'ostéonécrose de la mâchoire est une complication des traitements par les bisphosphonates à forte dose. Cet effet secondaire ne concerne principalement qu'une catégorie de malades. Il s'agit de patients oncologiques traités pour des métastases osseuses ayant subi des extractions dentaires. Les stratégies de prévention en oncologie incluent l'hygiène buccale, la finalisation des soins dentaires avant l'initiation du traitement et l'interruption du traitement pendant 3 mois en cas de chirurgie dentaire.⁸⁰

L'administration des BPs est parfois accompagnée de fièvre pendant une durée de 1 à 3 jours. Ce symptôme résulte en fait de l'activation du système immunitaire. Enfin, un long traitement aux BPs peut entraîner une fragilisation des os, due à une décalcification prolongée, augmentant ainsi le risque de fractures.⁴³

I.4. Pharmacologie des bisphosphonates

Les BPs sont des composés très stables biologiquement. L'enchaînement P-C-P, contrairement au squelette P-O-P du pyrophosphate, leur confère une stabilité thermique importante, une grande résistance aux réactions enzymatiques ainsi qu'aux hydrolyses acides et basiques.

Les BPs peuvent être administrés soit par voie orale soit par voie intraveineuse⁸¹. Cependant, ces composés très hydrophiles sont très peu biodisponibles par voie orale en raison de la présence des deux groupements phosphonates. En effet, seule une très faible quantité (5-7%) absorbée par le patient réussit à traverser la barrière intestinale. La principale cause de ce phénomène est la déprotonation des fonctions phosphonate à pH physiologique, la charge négative résultante ne leur permettant pas une pénétration aisée au niveau de la membrane plasmique lipophile. De plus, leur grande affinité pour les ions calcium les conduit préférentiellement vers l'os plutôt que vers d'autres tissus.

D'autre part, l'absorption, qui se fait par diffusion passive par voie paracellulaire, est limitée par les aliments notamment s'ils contiennent du calcium. De ce fait, les bisphosphonates oraux doivent être administrés à jeun, à distance des repas, avec de l'eau (pauvre en calcium) et sans ingérer de produits laitiers. L'administration par voie intraveineuse assure une meilleure biodisponibilité (40 à 61%).

Au niveau tissulaire, ces composés sont internalisés par les cellules par pinocytose. Différents auteurs ont également observé la présence des BPs dans le cytosol de macrophages et d'ostéoclastes.⁸²⁻⁸⁵

La demi-vie plasmatique est courte, de l'ordre de quelques heures. Par contre leur demi-vie osseuse dure plusieurs années. La molécule est éliminée du plasma en 6 heures.

Lin et collaborateurs montrent dans une étude pharmaco-cinétique des BPs que la majeure partie des doses administrées, est excrétée par les reins.⁷³ Cette observation est corroborée par l'équipe de Fleisch et collaborateurs.⁸⁶ En effet, seuls 30 à 80% de la dose administrée par voie intraveineuse est retrouvée dans les urines. L'élimination se fait par les urines, par un double mécanisme: filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire. Le temps de rétention de ces composés dans le tissu est fonction de leur nature, de l'espèce, du sexe et enfin de l'âge. Ingérés par voie orale, une très faible quantité de ces composés traverse la barrière gastro-intestinale. En effet, leur faible lipophilie empêche le transport transcellulaire et l'ionisation des fonctions phosphonate en milieu biologique diminue le transport paracellulaire.

Dans la plupart des cas, du fait de leur pouvoir complexant des cations divalents ainsi que de leur grande stabilité, les BPs sont excrétés sous leur forme originale et inaltérée. Ils forment des agrégats insolubles dans l'estomac, limitant aussi leur absorption.

La fraction de BPs non excrétée s'accumule en grande partie dans les os qui possèdent un taux de renouvellement élevé.^{42,43,82} La concentration de ces BPs dans l'os ne cesse d'augmenter jusqu'à atteindre un pic au bout d'une heure après administration. La forte et rapide fixation de ces composés par le tissu osseux est due à la formation de complexes bi ou tridentés avec l'hydroxyapatite *via* leurs groupements phosphonate^{73,87} et la nature de leurs chaînes latérales.⁴³ Dans l'os, ils s'accumulent principalement au niveau des ostéoclastes dans les zones de résorption active, où la concentration locale en BP peut atteindre jusqu'à 100 µM. Enfin, ils sont éliminés très lentement, généralement lors de phases de renouvellement osseux.^{82,84,88} En effet, le temps de demi-vie des BPs dans l'os peut atteindre dix ans chez l'homme.

I.5.Stratégies pour l'amélioration de la biodisponibilité des bisphosphonates

De nombreux systèmes de libération des bisphosphonates ont été étudiés avec pour objectif l'amélioration de leur biodisponibilité, la modification de leur biodistribution et un ciblage plus efficace vers des sites non osseux. Ces nouveaux systèmes d'administration ont été étudiés principalement sur des modèles animaux. Seules quelques exceptions sont en essais cliniques chez l'homme.

I.5.1.Utilisation d'un co-transporteur

Une des solutions les plus largement utilisées pour permettre aux agents thérapeutiques le passage de la barrière intestinale est l'utilisation de co-transporteurs.⁸⁹ Ces composés permettant une meilleure absorption intestinale sont de nature différente comme des surfactants, des extraits biliaires, des agents chélatants, des salicylates. Il a été montré que l'ajout d'EDTA augmentait l'absorption intestinale de l'alendronate d'un facteur 2 à faible dose et 10 à haute dose. Ces résultats très prometteurs ont trouvé une limitation *in vivo* en raison des effets secondaires de l'EDTA sur la muqueuse intestinale.⁹⁰

I.5.2.Approche de type prodrogue

Afin d'améliorer la biodisponibilité des BPs, une approche de type prodrogue peut être envisagée. Deux types d'approches sont décrits dans la littérature : l'utilisation de prodrogues peptidiques et de prodrogues lipophiles.

I.5.2.1. Prodrogues de type peptidique

Les membranes de la plupart des cellules intestinales contiennent des systèmes très efficaces pour absorber ou exclure les molécules hydrophiles. Un transporteur est capable de véhiculer un substrat de l'autre côté de la membrane beaucoup plus rapidement que par diffusion passive. Certains principes actifs (PA) sont reconnus comme substrats de systèmes assurant le transport à travers la membrane intestinale. A titre d'exemple, la fosfomycine et le foscarnet, deux agents thérapeutiques phosphorés, passent la barrière intestinale *via* un transporteur de phosphate.⁹¹ La L- α -méthyl Dopa et le baclofen dont la structure est proche des analogues structuraux des aminoacides sont reconnus par des systèmes transporteurs d'aminoacides⁹². La digestion intraluminaire des protéines se produit dans l'intestin grêle sous l'action séquentielle des endopeptidases et des exopeptidases pancréatiques. Les peptidases de la bordure en brosse hydrolysent ensuite les oligopeptides résiduels en dipeptides et en acides aminés qui sont transportés dans les entérocytes. Plusieurs mécanismes impliqués dans le transport des acides aminés ont été caractérisés en fonction du type d'ions dont ils sont dépendants (sodium ou chlore) et de la nature des acides aminés qu'ils transportent.^{93,94} Les di- et tripeptides sont transportés contre le gradient de concentration par un co-transporteur peptides/protons (PepT1), localisé dans les microvillosités des entérocytes.⁵⁶ Des auteurs ont par ailleurs suggéré l'existence d'un transporteur facilité de peptides situé au pôle baso-latéral des entérocytes qui, à l'inverse de PepT1 ne serait pas sensible au pH.^{95,96} Depuis qu'il a été clairement démontré que ces transporteurs peptidiques étaient impliqués dans l'absorption orale d'antibiotiques, d'inhibiteurs de la rénine, d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, ils sont largement étudiés comme système de délivrance de PAs. Hu et collaborateurs ont étudié la possibilité d'augmenter l'absorption de la L- α -méthyl Dopa en synthétisant un analogue peptidique qui cible un transporteur⁹⁷. La perméabilité de ces analogues a été augmentée de manière significative. Des résultats similaires ont été obtenus par le valcyclovir comparé à la molécule native, le cyclovir.⁹⁸ Ces résultats suggèrent que le système de transporteur peptidique pourrait servir de transporteur pour des analogues di- ou tripeptidiques de prodrogues polaires (*Figure 8*). Ainsi, un PA polaire avec une faible perméabilité membranaire est convertie en prodrogue qui est véhiculée *via* un transporteur peptidique dans les entérocytes. Cette prodrogue peut rester polaire car le facteur déterminant pour la reconnaissance vis à vis du transporteur est la partie peptidique.

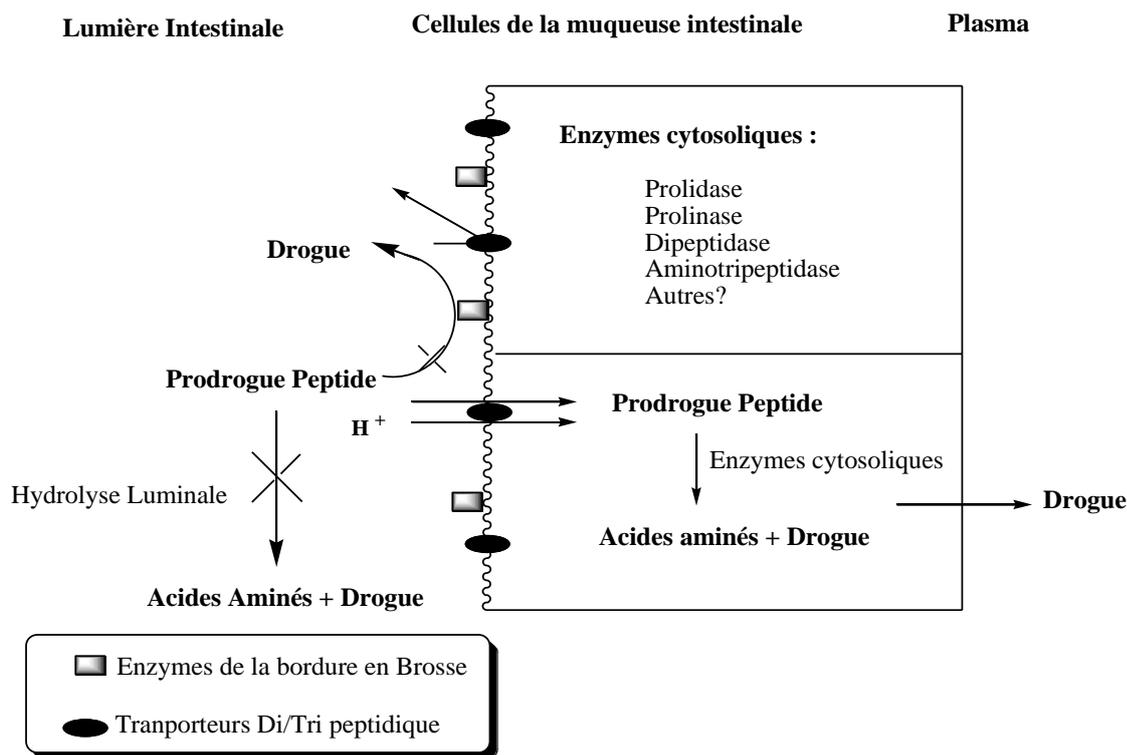


Figure 8 : Mécanisme de transport de prodrogues à travers la paroi intestinale

Récemment, cette approche a été appliquée aux BPs.⁸⁹ Des prodrogues dipeptidiques du pamidronate (Pro-Phe-Pamidronate) et de l'alendronate (Pro-Phe-Alendronate) ont été synthétisées en couplant la partie peptidique sur la chaîne latérale du BP. Les études de l'absorption de ces deux prodrogues par voie orale ont montré une augmentation significative de la biodisponibilité. Il a été observé que la concentration urinaire de la prodrogue est 3 fois plus élevée par rapport à l'alendronate. De plus, la concentration dans le tibia est 5 fois plus élevée dans le cas de la prodrogue. Cette augmentation de l'absorption orale a été attribuée à l'implication d'un transporteur peptidique.

Malgré ces résultats encourageants, la biodisponibilité des BPs reste faible. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à l'étude de prodrogues plus lipophiles.

I.5.2.2. Prodrogues lipophiles

La perméabilité intestinale des molécules très solubles dans l'eau peut être modifiée par la synthèse de prodrogues plus lipophiles. L'estérification des fonctions phosphonique présente plusieurs avantages. En effet, le fait de masquer de façon temporaire les charges négatives des BPs par un substituant adapté, permet d'une part d'augmenter la lipophilie du BP et d'autre

part de diminuer la formation de complexes avec les cations divalents. Les premières études ont été réalisées en série du clodronate en raison d'un accès plus aisé aux esters phosphoniques.⁹⁹ Raiman et Niemi ont étudié le transport de dérivés estérifiés du clodronate à travers les cellules Caco-2.¹⁰⁰ Après avoir étudié différents types d'esters phosphoniques, ils ont montré que les composés mono- et diestérifiés ne semblent pas augmenter de façon significative sa migration. En revanche, le composé triester de phényle l'augmente d'un facteur 17. Le mécanisme de transport a ensuite été étudié. Dans le cas de la molécule native, le transport est de nature paracellulaire comme pour beaucoup de molécules fortement hydrophiles. Dans le cas du triester de phényle, il s'agirait plutôt d'un transport transcellulaire. La suppression du calcium n'affecte pas le transport des composés di- ou triphényl esters, ce qui semble indiquer que l'estérification des groupements hydroxyle du clodronate diminue la formation du complexe avec le calcium. D'autres groupements protecteurs des phosphonates ont été étudiés comme le groupement acétyl ou pivaloyloxyméthyl.¹⁰¹ Les composés di- ou triestérifiés ont montré une meilleure efficacité. Ces derniers sont métabolisés et produisent un métabolite de l'adénosine triphosphate dans un modèle cellulaire de type Caco-2. Le remplacement d'une fonction ester phosphonique par un phosphoamide n'a pas permis la production de clodronate *in vitro*. Ainsi, l'utilisation en clinique de ces esters d'amide du clodronate comme prodrogue bioréversible est donc compromise.¹⁰²

En série hydroxyméthylènebisphosphonate, les travaux sont plus rares en raison de la difficulté d'accès à ces molécules estérifiées. En effet, l'utilisation de tétraesters n'est pas possible en milieu biologique car ils ne sont pas stables et subissent un réarrangement en phosphono-phosphate. De plus, l'accès aux composés partiellement estérifiés n'est pas non plus aisé en raison de la présence du groupement hydroxyle sur le carbone central.

La synthèse de prodrogues dérivées de l'etidronate a été particulièrement étudiée⁹⁹. Des analogues de l'etidronate possédant une à trois fonctions ester phosphonique ont été synthétisés et leur stabilité dans des milieux biologiques a été évaluée. Il apparaît que le triester de POM possède la meilleure absorption intestinale. L'etidronate protégé par les groupements POM est stable chimiquement dans un milieu tampon. Il est hydrolysé lentement dans le sérum et rapidement dans un extrait hépatique.¹⁰³

Pour notre part, nous avons montré que les bisphosphonates partiellement estérifiés possédaient une activité antitumorale *in vivo* corrélée à une diminution de l'angiogénèse tumorale.¹⁰⁴

I.5.3. Utilisation d'un vecteur pour le ciblage du tissu non osseux

Différents modes de vectorisation des bisphosphonates ont été proposés pour améliorer la biodisponibilité et changer la biodistribution. Ces transporteurs colloïdaux sont de différentes natures comme par exemple des liposomes, des nanoparticules ou des dendrimères.¹⁰⁵ Nous détaillerons les différents principes dans le chapitre II.

I.6. Synthèse des bisphosphonates : état de l'art

La synthèse des hydroxyméthylène bisphosphonates a fait l'objet de recherches continues. De ce fait, plusieurs voies de synthèse ont été rapportées dans la littérature¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

Parmi les différentes publications et brevets parus, deux méthodes principales permettent d'obtenir ce type de composés.

I.6.1. Synthèse des bisphosphonates hydroxylés en une étape

Le premier procédé, le plus utilisé dans l'industrie, permet d'accéder aux produits désirés en une seule étape. Les conditions de cette réaction ont été très étudiées. En effet, depuis 1970, plus de cinquante brevets et articles ont été publiés. Elle consiste à chauffer un mélange constitué d'un acide carboxylique et d'acide phosphoreux en présence d'un dérivé phosphoré déshydratant (PCl_3 , PCl_5 ou POCl_3) à 100°C pendant plusieurs heures puis à réaliser une hydrolyse par l'acide chlorhydrique (*Schéma 1*).

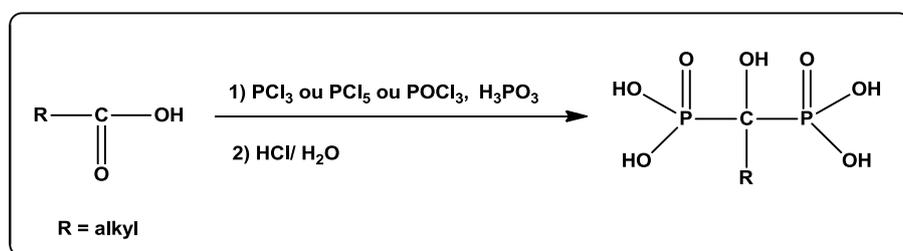


Schéma 1 : Synthèse des hydroxyméthylène-BPs en une étape

La première étape de cette synthèse est une réaction usuelle permettant d'obtenir le chlorure d'acide correspondant à partir du dérivé phosphoré préalablement choisi. Dès sa formation, le chlorure d'acide très réactif, est apte à participer à d'autres réactions, conduisant à la formation d'intermédiaires réactionnels de type anhydrides mixtes. En effet, la réaction débute par une hydroxylation du trichlorure de phosphore produisant les intermédiaires HPOCl_2 et $\text{HPO}(\text{OH})\text{Cl}$ ¹⁰⁹ pouvant réagir avec d'autres molécules d'acide carboxylique présentes dans le milieu réactionnel. Cinq intermédiaires ont ainsi pu être mis en évidence par Prentice et ses collaborateurs.¹¹⁰ Le trichlorure de phosphore a alors été utilisé sous différentes conditions et de bons résultats ont été obtenus lorsque le réactif de départ est mis en réaction avec un excès de PCl_3 de 25 à 100%.

Les inconvénients de cette méthode sont cependant nombreux. En effet, les conditions opératoires drastiques mises en œuvre ne sont pas adaptées à des substrats fragiles et la méthode est inefficace en série aromatique. De plus, cette voie de synthèse engendre de nombreuses réactions complexes qui se déroulent en plusieurs étapes et passent par la formation d'intermédiaires phosphono-anhydrides comme nous venons de le voir. Ainsi, l'extraction du BP du milieu réactionnel est souvent délicate à mettre en œuvre et nécessite l'utilisation de procédés de purification très onéreux.

Toutefois, l'amélioration de ce procédé, essentiellement par l'équipe de R. Kieczykowski¹¹¹ a permis l'accès à de nombreux composés. Parmi eux, nous pouvons citer l'alendronate synthétisé avec un très bon rendement en additionnant du trichlorure de phosphore et de l'acide phosphoreux sur l'acide 4-aminobutyrique (GABA) (*Schéma 2*).

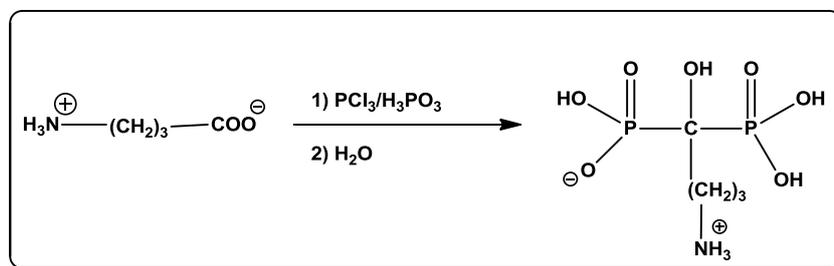


Schéma 2 : Synthèse de l'alendronate en une étape

Des améliorations de ce procédé ont été proposées ces dernières années. Une méthode utilisant le phénol comme solvant de la réaction a permis la préparation de grandes quantités de bisphosphonates.¹¹²

Plus récemment, un procédé extrêmement efficace décrit par l'équipe de McKenna a permis de diminuer les temps de réaction de façon spectaculaire en utilisant l'activation sous micro-ondes. Le bisphosphonate a été obtenu en 20 minutes alors que par la voie classique 20 heures de chauffage sont nécessaires.¹¹³

I.6.2.Synthèse des bisphosphonates hydroxylés par une méthode indirecte

La seconde procédure d'obtention des BPs hydroxylés est une synthèse multi-étapes qui passe par la préparation d'esters bisphosphoniques suivie d'une étape de déalkylation.

I.6.2.1.Première étape : Réaction d'Arbuzov

a) Réaction d'Arbuzov

Les premiers essais de synthèse de ces dérivés estérifiés en 1956 se sont révélés totalement infructueux. En effet, l'addition d'un dialkyl phosphite sur un α -cétophosphonate, catalysée par une base ne permettait pas d'accéder au composé désiré.¹⁰⁶

Par la suite, une méthode de synthèse des 1-hydroxyméthylène-1,1-BPs a été développée dans laquelle la première étape est la préparation d'intermédiaires de type α -cétophosphonate selon la réaction de Michaelis-Arbuzov, à partir d'un trialkyl phosphite $P(OR_1)_3$ et d'un chlorure d'acide (Schéma 3). L'ester bisphosphonique est ensuite obtenu par une réaction entre l' α -cétophosphonate formé et un dialkyl phosphite de type $HP(O)(OR_2)_2$ en milieu neutre. Cette méthode a montré qu'elle était applicable non seulement aux dérivés méthylés symétriques ($R_1=R_2=Me$) mais également aux esters assymétriques ($R_1=Me$; $R_2=Ph$).

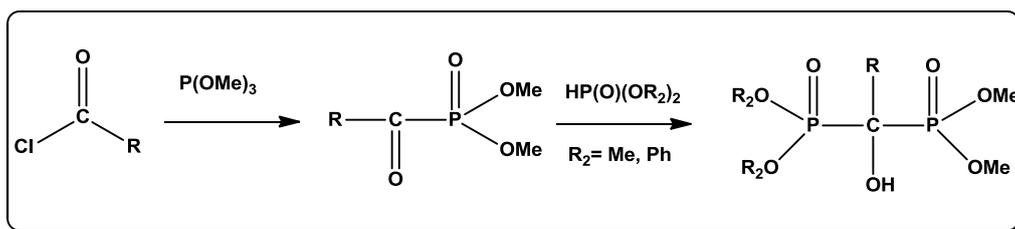


Schéma 3 : Synthèse des hydroxyméthylène-BPs tétraestérifiés par réaction d'Arbuzov

b) Réarrangement des hydroxyméthylène-bisphosphonates tétraestérifiés

Industriellement, ce procédé est peu utilisé en raison de la multiplication du nombre d'étapes et du coût engendré pour chaque étape de purification.

De plus, les esters bisphosphoniques formés sont peu stables et se réarrangent immédiatement en phosphono-phosphates à haute température ou en milieu basique (*Schéma 4*).¹⁰⁶ Deux facteurs physico-chimiques gouvernent cette transformation. La formation de l'isomère **II** est due à un facteur thermodynamique. En revanche, la formation de l'ester bisphosphonique **I** est gouvernée par un facteur cinétique.

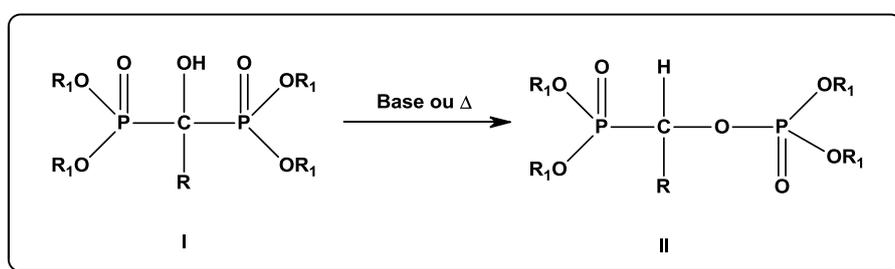


Schéma 4 : Réarrangement des hydroxyméthylène-BPs tétraestérifiés

Notons que la substitution du carbone central par un groupement électroattracteur tel qu'un groupe aromatique, tend à accélérer la formation du composé **II**.¹⁰⁶

c) Amélioration de la méthode de synthèse des bisphosphonates tétraestérifiés

Différentes variations ont été apportées aux conditions opératoires de synthèse des BPs tétraestérifiés décrites précédemment, afin d'éviter la formation du phosphono-phosphate correspondant.

Ainsi, il a été montré que l'utilisation de la di-*n*-butylamine comme base permettant de catalyser la réaction, dans des conditions de basse température (inférieure à 80°C) ne favorisait pas la formation de l'isomère non souhaité.¹⁰⁶

Il est également possible de réaliser cette réaction dans le toluène en présence de di-*n*-butylamine, ce solvant permettant alors la précipitation de l'acide bisphosphonique désiré.¹⁰⁶

Une nouvelle voie de synthèse originale développée au laboratoire a permis d'introduire des groupements ester à partir d'un chlorure d'acide et d'un mélange de dialkyl et de trialkyl

phosphites en une étape (*Schéma 5*). Cette méthode est applicable à la synthèse d'esters symétriques ou asymétriques, de méthyle ou de tétraméthyldioxaphospholane.¹⁰⁶

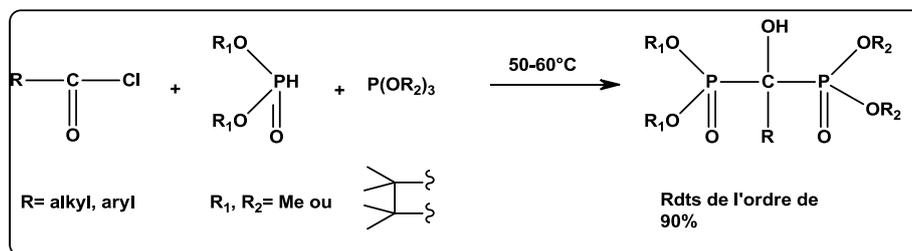


Schéma 5 : Synthèse des hydroxyméthylène-BPs tétraestérifiés en une seule étape.

Cette procédure est également applicable à la préparation des dihydroxy-tétraphosphonates.¹⁰⁶ Le laboratoire a également amélioré la préparation des tétraesters hydroxyméthylène-bisphosphoniques symétriques¹⁰⁶ en réalisant une synthèse en une étape par addition dans le milieu réactionnel d'un demi-équivalent d'un solvant protique comme le méthanol ou l'eau. Dans un premier temps, l'addition à froid du chlorure d'acide sur un trialkyl phosphite permet de générer rapidement l' α -cétophosphonate intermédiaire (*Schéma 6*). Cette méthode ne nécessite plus ici l'utilisation d'un dialcyl phosphite car il est généré *in situ* à l'aide du solvant protique introduit. En effet, cette solvolysse, à l'aide d'un demi-équivalent de méthanol par exemple, de la moitié de la quantité d' α -cétophosphonate formé conduit à un ester ainsi que le dialcyl phosphite correspondant. Celui-ci réagit alors avec l'autre moitié de l' α -cétophosphonate encore présent dans le milieu pour conduire au BP tétraestérifié désiré avec un rendement quantitatif.

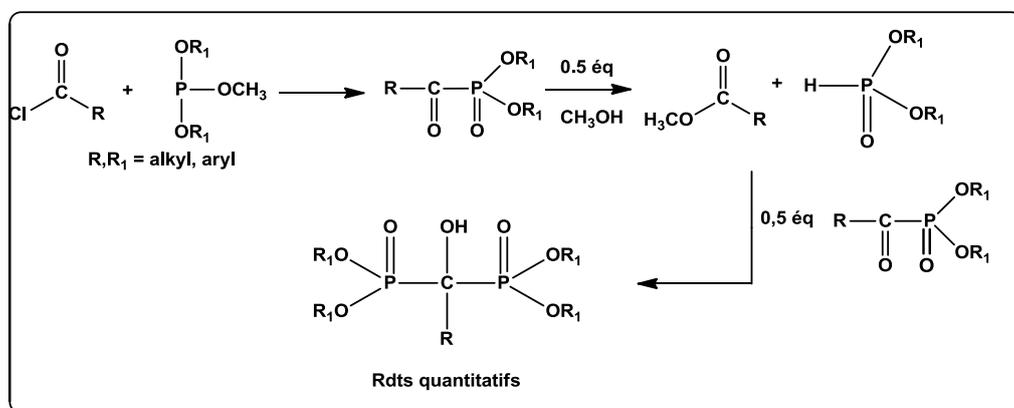


Schéma 6 : Synthèse des hydroxyméthylène-BPs tétraestérifiés utilisant un solvant protique

Cette méthode a également été appliquée avec succès à la synthèse d'esters symétriques de benzyle substitués en position para par un groupement méthyl, nitro ou méthoxy (Schéma 7)¹⁰⁶.

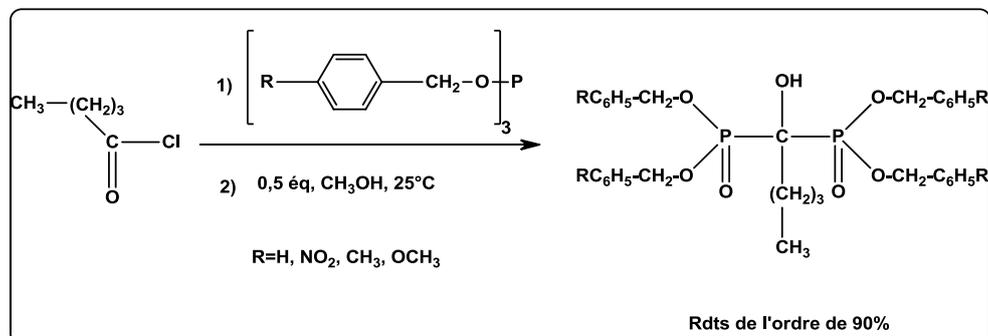


Schéma 7: Synthèse des hydroxyméthylène-BPs tétrabenzylés

Plus récemment, la synthèse des tétraesters a été améliorée par le laboratoire en utilisant l'activation sous micro-ondes. Les temps de réaction ont été largement diminués et aucune isomérisation n'a été observée.¹¹⁴

I.6.2.2. Deuxième étape : Réaction de déalkylation

Les méthodes de déalkylation des dérivés tétraestérifiés décrits précédemment qui permettent l'accès aux BPs tétraacides correspondants, ont également fait l'objet de nombreuses études. Nous verrons que celles-ci dépendent non seulement de la nature des groupements ester mais aussi de la chaîne latérale des BPs.

L'étape de déalkylation des composés tétraestérifiés est réalisée soit par hydrolyse en milieu acide chlorhydrique soit par un traitement à l'aide d'un halogénotriméthylsilane suivi d'une méthanolyse (Schéma 8).

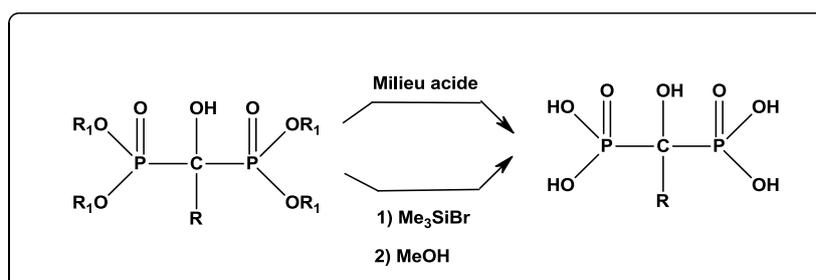


Schéma 8: Déalkylation des hydroxyméthylène-BPs tétraestérifiés

a) Déalkylation en milieu acide

L'utilisation des acides chlorhydrique ou bromhydrique comme agents déalkylants permet d'hydrolyser les quatre groupements ester simultanément (*Schéma 9*).¹⁰⁶

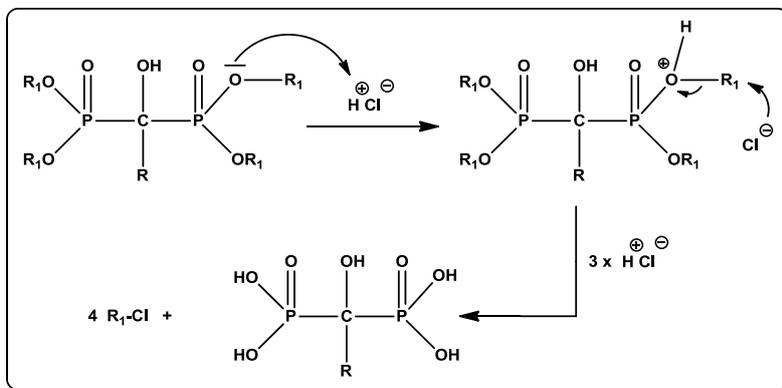


Schéma 9 : Déalkylation des hydroxyméthylène-BPs tétraestérifiés en milieu acide

Cependant, le chauffage au reflux d'une telle solution acide très concentrée, pendant plusieurs heures, constitue des conditions opératoires particulièrement drastiques et non adaptées à l'utilisation de groupements fonctionnels fragiles et labiles sur la chaîne latérale.

Toutefois, quelques améliorations ont été apportées à cette méthode, dans le cas de certains esters de benzyle substitués en position para par différents groupements ou encore dans le cas des esters de pinacol. Ces derniers sont ainsi hydrolysés dans une solution diluée d'acide chlorhydrique à température ambiante.

b) Déalkylation à l'aide d'halogénotriméthylsilanes

Par la suite, d'autres méthodes de déprotection que celle présentée ci-dessus, beaucoup plus douces, ont vu le jour grâce aux différents travaux de nombreuses équipes.¹⁰⁶ L'une d'entre elles consiste à convertir les 1-hydroxyméthylène-1,1-BPs tétraestérifiés en esters de triméthylsilyle par l'intermédiaire d'un halogénure de triméthylsilane. Une étape d'hydrolyse permet ensuite d'obtenir l'acide bisphosphonique correspondant.

Les premiers essais de déalkylation de ce type ont été réalisés sur des dialkyl phosphonates et des dialkyl acylphosphonates. Ces méthodes peuvent cependant être appliquées aux tétraalkyl BPs qui ont une réactivité identique vis-à-vis de ces agents silylants.¹⁰⁶ L'addition d'un

excès de chlorure de triméthylsilane sur un équivalent de dialkyl phosphonate conduit ainsi au bis(triméthylsilyl) phosphonate correspondant (*Schéma 10*). L'ajout de dérivés iodés (NaI ou KI) au chlorotriméthylsilane accélère de façon significative la réaction de silylation. L'hydrolyse de l'intermédiaire silylé formé conduit alors à l'acide phosphonique désiré.

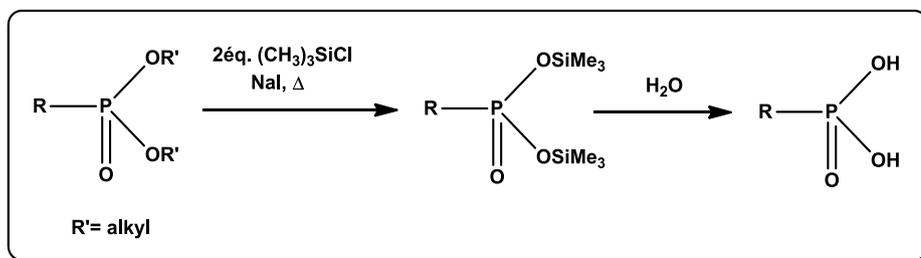


Schéma 10 : Déalkylation des dialkyl phosphonates en présence de Me_3SiCl .

L'iodure et le bromure de triméthylsilane ont une réactivité nettement supérieure à celle du chlorotriméthylsilane. Ainsi, ils sont utilisés couramment dans différentes réactions de déprotection avec des rendements quantitatifs.¹¹⁵

Comme nous l'avons dit, ces différentes méthodes sont transposables aux BPs tétraesters. Ainsi, de la même façon, les esters tétrasilylés sont préparés avec de bons rendements (*Schéma 11*). Ils sont ensuite hydrolysés en milieu aqueux ou en présence d'alcool afin d'obtenir les BPs tétraacides correspondants.¹⁰⁶

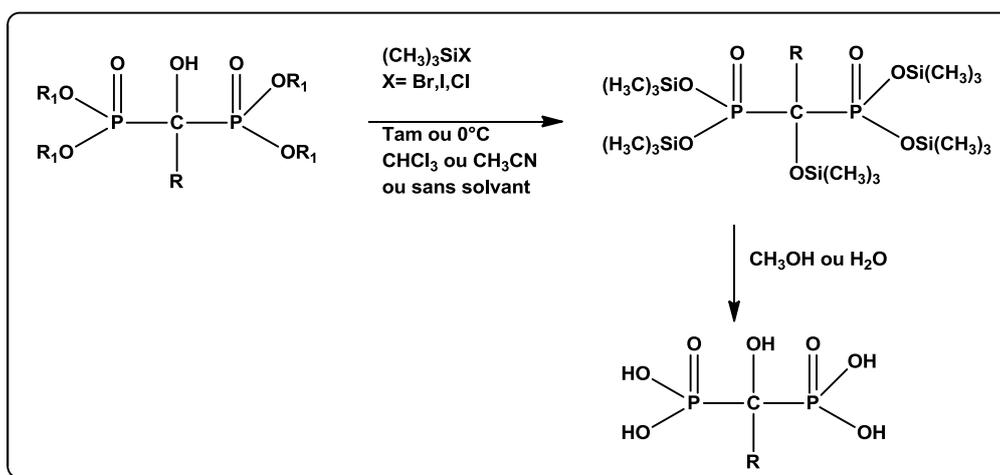


Schéma 11 : Déalkylation des hydroxyméthylène-BPs tétraestérifiés en présence d'halogénure de triméthylsilane

Bien que les conditions opératoires énoncées ci-dessus soient mieux adaptées à l'utilisation de substrats fragiles et fonctionnels que celles concernant l'hydrolyse acide, elles ne sont toutefois pas sélectives, d'où la nécessité de développer d'autres méthodes de déalkylation.

I.6.2.3. Réactions de déalkylation sélective

Des travaux rapportés par l'équipe de Turhanen^{103,116} concernent le développement d'une méthode de déalkylation régiosélective de certains dérivés tétraestérifiés de l'étidronate par différents sels de métaux alcalins afin d'obtenir les analogues di- ou tri-estérifiés correspondants (*Schéma 12*). Les résultats de cette étude montrent d'une part que la stabilité relative de ces sels semble meilleure que celle des dérivés tétraestérifiés correspondants. D'autre part, l'efficacité des sels de lithium, de potassium ou de sodium est variable et dépend de la nature de chaque groupement ester présent. Cette méthode ne semble ainsi pas généralisable, ni réellement sélective. Dans le cas de l'iodure de sodium notamment, son utilisation permet une mono- ou une di-déalkylation selon les groupements esters présents.

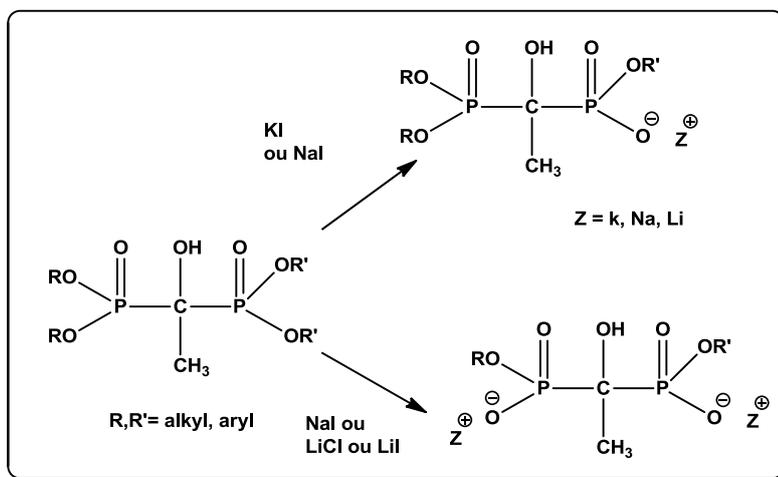


Schéma 12 : Déalkylation sélective des hydroxyméthylène-BPs tétraestérifiés par des sels de métaux alcalins

Une étude de l'action de certains dérivés silylés halogénés sur ces BPs a également été menée. Les résultats obtenus ont ainsi pu permettre de réaliser un classement de la réactivité des différents groupes partants utilisés.

Comme nous l'avons vu précédemment, la synthèse des acides 1-hydroxyméthylène-1,1-bisphosphoniques peut être réalisée de manière directe en une seule étape par réaction entre un acide carboxylique et le trichlorure de phosphore par exemple. Cependant, cette méthode utilise des conditions acides drastiques inadaptées aux substrats fragiles. Une seconde méthode a été développée afin d'obtenir des BPs tétraestérifiés par réaction entre un dialkyl phosphite et un α -cétophosphonate, suivie d'une étape de déalkylation. Cette méthode de synthèse permet certes d'accéder à des BPs tétraacides ou partiellement estérifiés, mais elle nécessite également plusieurs étapes et les tétraesters intermédiaires sont peu stables comparés aux acides ou aux sels correspondants et se réarrangent. C'est pourquoi le laboratoire s'est tourné vers d'autres méthodes de préparation de BPs tétraacides ou partiellement estérifiés, plus douces et applicables à tous types de substrats.

I.6.3.Synthèse des bisphosphonates hydroxylés tétraacides via l'utilisation de phosphites silylés.

Afin d'améliorer les procédés de synthèse déjà existants des acides 1-hydroxyméthylène-1,1-bisphosphoniques, le laboratoire a développé une nouvelle méthode de préparation efficace et en une seule étape de ces composés¹¹⁷. Pour cela, un chlorure d'acide est traité avec deux équivalents de tris(triméthylsilyl)phosphite à température ambiante pour conduire en une heure à l'ester tétrakis(triméthylsilyl) de l'acide 1-triméthylsilyloxyméthylène-1,1-bisphosphonique (*Schéma 13*). La synthèse de ce composé est basée sur une réaction d'Arbuzov qui fournit un premier intermédiaire, le bis(triméthylsilyl) α -cétophosphonate correspondant. Le deuxième équivalent de tris(triméthylsilyl)phosphite réagit immédiatement sur ce composé. L'hydrolyse du BP tétrasilylé obtenu dans le méthanol à 25°C pendant une heure conduit alors à l'acide bisphosphonique souhaité. Cette méthode a permis l'obtention de ces tétraacides purs avec de très bons rendements. En effet, la réaction immédiate de l'intermédiaire α -cétophosphonate non isolable avec le dérivé silylé présente un avantage certain. Cela permet ainsi d'éviter la formation de produits secondaires comme un énol¹⁰⁶ ou bien l'isomère phosphono-phosphate, caractéristique de ces composés phosphorés. De plus, l'avantage de cette méthode est qu'elle est efficace quelque soit le chlorure d'acide utilisé. En effet, les rendements obtenus sont excellents aussi bien en série aliphatique qu'en série aromatique. Ce procédé permet ainsi l'introduction de groupements fragiles et fonctionnels sur la chaîne latérale R des BPs. Ces résultats sont de ce fait très intéressants car jusque-là aucune méthode ne permettait d'accéder à des acides bisphosphoniques aromatiques.

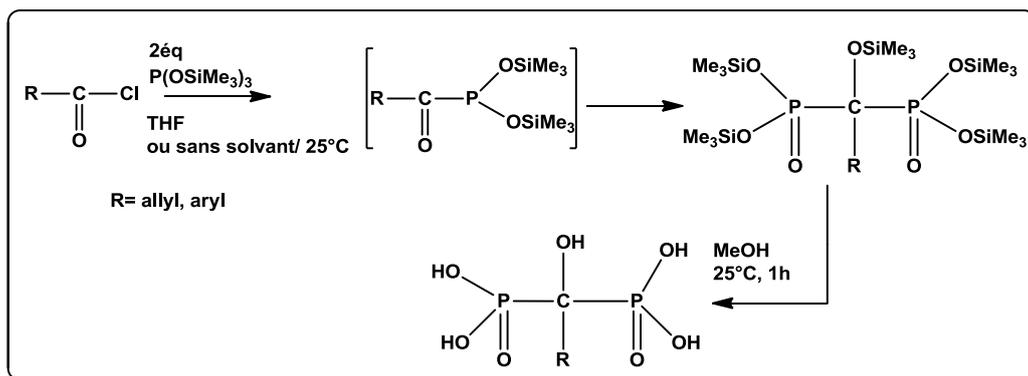


Schéma 13 : Synthèse des hydroxyméthylène-BPs tétraacides *via* des phosphites silylés.

Cette méthode a été appliquée avec succès sur de nombreux substrats^{101,118,119}.

Elle a été ensuite étendue à d'autres modes d'activation de la fonction acide carboxylique. Nous avons pu montrer l'efficacité de la méthode sur les anhydrides d'acide et sur les esters de N- hydroxysuccinimide.¹²⁰

Plus récemment, Lebreton et collaborateurs ont proposé l'activation de la fonction acide carboxylique *via* les esters boroniques.

Cette méthode permet d'introduire différentes fonctions chimiques sur la chaîne latérale sans protection préalable.¹²¹

CHAPITRE II : VECTORISATION D'AGENTS THERAPEUTIQUES

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre I, les plus grands inconvénients des bisphosphonates sont leur faible biodisponibilité par voie orale et leur tropisme osseux. Pour résoudre ces problèmes et cibler le tissu vascularisé, la vectorisation apparaît comme une solution de choix. Lors de ce chapitre, nous allons dresser un bref état de l'art sur les trois avancées majeures de la vectorisation et nous intéresser aux différents systèmes de vectorisation particuliers. Nous concluons ce chapitre en décrivant les différents systèmes de vectorisation utilisés dans notre laboratoire et bien évidemment, la méthodologie à suivre afin d'atteindre l'objectif de notre travail.

II.1.Intérêt de la vectorisation

Parmi l'ensemble des médicaments utilisés en clinique, de nombreux principes actifs présentent généralement des caractéristiques physico-chimiques peu favorables au passage des diverses barrières biologiques qui séparent le site d'administration du médicament de son site d'action. Ces difficultés à passer les barrières physiologiques impliquent l'utilisation de doses plus élevées et donc une augmentation du risque de toxicité. De plus, la pharmacocinétique et la formation de métabolites peuvent constituer des facteurs de risques.

En effet, une molécule active peut être captée par le foie et subir des transformations chimiques la rendant inactive ou toxique avant d'atteindre le site d'action. Ces limitations concernant l'adressage et la délivrance ont conduit au développement de vecteurs efficaces et non toxiques capables d'améliorer l'index thérapeutique des PAs tout en limitant leur toxicité. Parmi les différentes classes de médicaments, les agents anticancéreux sont de bons candidats à la vectorisation. Ce sont de petites molécules distribuées à la fois dans les cellules saines et les cellules tumorales, ce qui implique des toxicités accrues et entraîne un index thérapeutique étroit. L'incorporation de ces principes actifs dans des vecteurs permettrait donc d'envisager l'administration de doses moins élevées et de diminuer ainsi la toxicité de ces médicaments.

La conception d'un vecteur d'agents anticancéreux pour les tumeurs solides doit prendre en compte quatre notions : le « réservoir » du système, le transport de la molécule active, le ciblage des cellules cancéreuses et la libération du PA. Pour cela, des avancées remarquables

réalisées et une maîtrise des techniques utilisées dans le domaine de la vectorisation permettent une meilleure formulation plus sûre et efficace des vecteurs¹²². En effet, un bon vecteur doit être :

- atoxique ;
- biodégradable afin d'éviter l'accumulation toxique du vecteur dans l'organisme après administration répétée ;
- de taille convenable permettant : a) l'incorporation d'une gamme variée de principes actifs, b) l'internalisation de la molécule dans la cellule cible, c) une administration facile ;
- protecteur de la molécule active du site d'administration jusqu'à la cible visée.

II.2. Evolution de la vectorisation

L'origine de la vectorisation des principes actifs remonte au milieu des années 1960. En 1964, Judah Folkman (Université d'Harvard) a constaté l'endormissement d'un lapin dont le sang avait circulé à travers un tube préalablement exposé à un anesthésiant. Folkman¹²³ en a alors conclu que le tube pouvait jouer le rôle d'un « réservoir » permettant la libération du PA.

Le premier travail de vectorisation a été réalisé en 1975 par Helmut Ringsdorf¹²⁴ de l'université de Mainz. Ce dernier a schématisé un modèle de vectorisation « polymère-médicament ». Le modèle se compose d'un support polymère, d'un principe actif attaché via un espaceur hydrolysable ou clivable par voie enzymatique, et une molécule de ciblage. En effet, une fois que le PA conjugué, le vecteur doit alors le transporter à travers la circulation sanguine, atteindre la tumeur et dans les meilleurs des cas, pénétrer les cellules tumorales et libérer le PA dans la cellule.

Trois tailles de systèmes de transport ont été étudiées pour la vectorisation entre 1970 et 1980 : l'échelle macroscopique puis microscopique et enfin l'utilisation de nano-objets. Ces recherches ont donné naissance à différentes catégories de vecteurs de type particulaire (nanoparticules, liposomes...), moléculaire (polymères conjugués, complexes d'inclusion des cyclodextrines, anticorps conjugués...), ou vivants (virus, bactéries, hématies)² (Figure 9).

La vectorisation inclut également l'évaluation de nouvelles formes galéniques qui, en plus d'influer sur les propriétés pharmacodynamiques, peuvent aboutir à leur tour, à de nouvelles formes pharmaceutiques. De plus, la distribution dans l'organisme ne dépend plus des propriétés de la molécule vectorisée elle-même, mais elle est soumise à celles du vecteur

choisi en fonction de l'objectif envisagé.

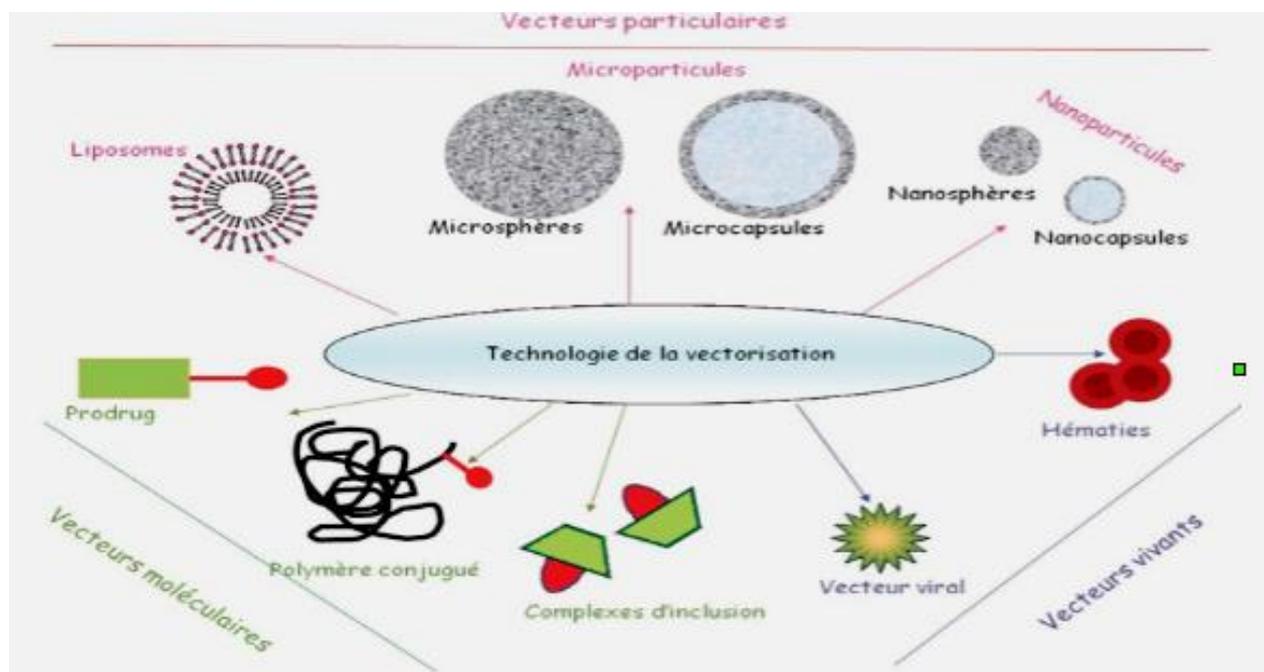


Figure 9 : Différents types de vecteurs de médicaments.

II.3. Avancées majeures de la vectorisation

Comme nous l'avons dit précédemment, différents vecteurs ont été développés, parmi lesquels des liposomes, des micelles, des polymérosomes, des nanocapsules, des nanoparticules, des dendrimères, des polymères conjugués, etc... Ces systèmes diffèrent entre eux sur plusieurs points : leur composition, leur mode de préparation, leur comportement vis-à-vis des cellules, leur taux de chargement en PA, etc... Néanmoins, trois découvertes majeures ont accéléré l'immense activité dans ce domaine : L'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention), la PEGylation, et le ciblage actif.

II.3.1. L'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention)

En 1984, Maeda et collaborateurs¹²⁵ ont rapporté la biodistribution chez l'animal d'un peptide antitumoral, la Néocarzinostatine, couplé à un polymère, le Styrène Anhydride Maléique (SMA). Cette étude a révélé une plus forte accumulation de ce complexe appelé SMANCS au niveau des tumeurs que la NCS libre.^{126,127} De plus, cette conjugaison du polymère

biocompatible à la protéine prolonge sa demi-vie plasmatique, jusqu'à 200 fois plus par rapport à la NCS libre.¹²⁸

Ce phénomène a été démontré avec d'autres protéines plasmatiques de différentes tailles moléculaires. Les protéines de plus de 40 kDa ont ainsi montré une accumulation sélective dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus normaux. De plus, ces protéines ont pu être retenues dans les tissus tumoraux pendant de longues périodes de 24 heures après administration par injection intraveineuse.

L'accumulation dans des tissus tumoraux de polymères macromoléculaires conjugués à des médicaments est de 10 à 200 fois plus élevée que dans les tissus et organes normaux, comme la peau, les muscles, le cœur et les reins.^{129,130} Ces constatations ont conduit à généraliser le concept de l'effet EPR. SMANCS, qui a montré l'avantage de l'effet EPR, est ainsi devenu le premier médicament macromoléculaire, agent thérapeutique anticancéreux approuvé pour une utilisation en clinique en 1993.

Une expérience typique illustrant l'effet EPR consiste à réaliser une injection IV du colorant bleu Evans lié à l'albumine plasmatique qui se comporte *in vivo* comme une véritable macromolécule, à savoir un médicament macromoléculaire putatif. Cette expérience montre 24 heures après l'injection une coloration bleue des sites tumoraux, mais aucune coloration des tissus normaux tels que la peau.

De plus, il a été observé que dans les tumeurs de taille supérieure à 3 cm de diamètre, les cellules tumorales colorées en bleu se trouvent en périphérie de la tumeur. Ce résultat suggère que l'effet EPR est un phénomène qui dépend des vaisseaux sanguins. Par conséquent, les facteurs facilitant l'effet EPR sont pour la plupart impliqués dans l'angiogénèse et dans la vascularisation normale. Dans le cas des tumeurs solides, les jonctions intercellulaires sont tellement serrées que les vecteurs de taille moléculaire importante ne pénètrent qu'en surface des tumeurs. La libération Du PA à leur périphérie est alors favorable pour une meilleure diffusion dans tout le volume tumoral.

D'autre part, afin que les vecteurs soient efficaces, ils doivent libérer PA au voisinage des tumeurs (ce qui est peu favorable à cause des résistances) ou entrer dans les cellules tumorales, augmentant ainsi la quantité du PA internalisée. Le ciblage actif peut alors être un

moyen d'atteindre ce dernier objectif.

En effet, en l'absence de molécules de ciblage et une fois la tumeur atteinte par les vecteurs (effet EPR), la PEGylation empêche leur internalisation. De ce fait, le PA est libérée dans l'espace extracellulaire tumoral. le PA libre peine à entrer dans les cellules, ce qui induit une activité modérée. Cela est d'autant plus important lors du développement de résistances par les cellules cancéreuses. Dans ces conditions, les vecteurs porteurs de molécules de ciblage sont alors plus avantageux.¹³¹

II.3.2.La PEGylation

La PEGylation dans les systèmes de vectorisation est la conjugaison d'un PA au polyéthylène glycol¹³². La PEGylation consiste à habiller la surface du PA avec du polyéthylène glycol par adsorption ou par liaisons covalentes.¹³³

Cette fonctionnalisation a conduit au premier succès de la conjugaison d'une PA avec un polymère. En effet, grâce à la bonne solubilité du PEG dans l'eau ainsi que sa biocompatibilité, il a été considéré comme un vecteur polyvalent dans les systèmes conjugués polymère-médicament.³

L'essor des technologies recombinantes a vu le développement de nombreux peptides et protéines pour des applications en tant qu'agents thérapeutiques. Cependant, leur instabilité intrinsèque, leur dégradabilité et leur immunogénicité font souvent obstacle à leur utilisation potentielle. Pour remédier à cela, la liaison de motifs PEG avec les protéines a été envisagé afin d'améliorer leur solubilité, leur immunogénicité, leur pharmacocinétique et leur pharmacodynamique.¹³⁴

Plusieurs études ont été réalisées sur la conjugaison de différents Pas anticancéreux avec le PEG. Par exemple, la camptothécine conjuguée au PEG (PEG-CPT) (*Figure 10*) a démontré une pharmacocinétique améliorée, une meilleure accumulation sur une tumeur solide, et une augmentation de l'activité anticancéreuse par rapport à la CPT libre, ces travaux ont été réalisés par Yu et collaborateurs 2005.¹³⁵

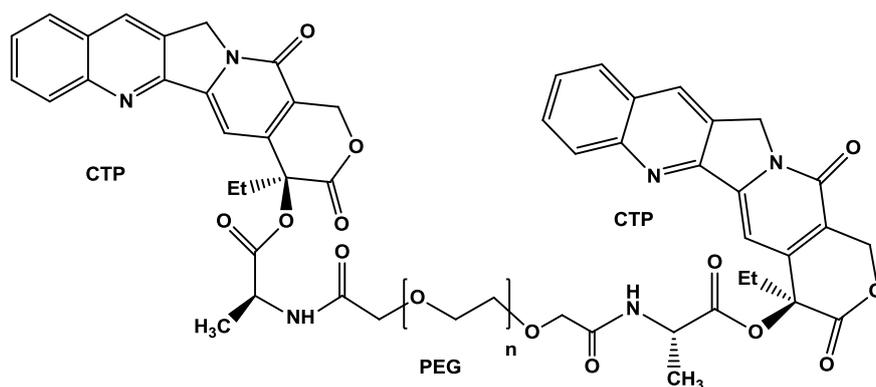


Figure 10 : Structure du conjugué CPT-PEG

D'autres travaux concernent la fixation de la doxorubicine (Dox) au support PEG par l'intermédiaire d'une liaison hydrazone sensible à l'hydrolyse acide à un pH de 5,0. Ces polymères conjugués ont montré des activités anti-prolifératives et anti-tumorales améliorées *in vitro* et *in vivo*.³

Le polymère PEG étant hydrophile, il augmente la solubilité des vecteurs, facilitant ainsi leur circulation dans le sang. Toutefois, la fonction principale des PEGs est de constituer une barrière stérique entre le vecteur et les opsonines du sang.¹³⁶ L'inhibition de ce contact réduit la phagocytose et par conséquent, l'élimination rapide des vecteurs par le système réticulo-endothélial, on parle alors de vecteurs "furtifs".

Cette augmentation du temps de circulation dans le sang passe de quelques minutes (objets non PEGylés) à quelques heures voire quelques jours (objets PEGylés), favorisant ainsi l'accumulation des vecteurs au niveau des tumeurs par l'effet EPR. Citons par exemple, les travaux de Hong et collaborateurs qui ont évalué l'impact de la PEGylation des liposomes sur leur temps de demi-vie *in vivo*.¹³⁷ Ils ont montré que plus le taux de PEGs à la surface des liposomes chargés en doxorubicine augmente (de 0% à 6%), plus leur temps de circulation dans le sang est prolongé, et ce, quelle que soit la dose injectée (6 ou 10 mg/kg). Cette PEGylation (6 %) des liposomes augmente de quasiment une fois et demie la quantité du PA accumulée au niveau des tumeurs après trois jours d'injection par rapport aux liposomes non PEGylés. Cette augmentation du temps de circulation dans le sang est observée également dans le cas des liposomes à base de la doxorubicine PEGylée. En effet, son temps de rétention dans le liposome présente jusqu'à 6 fois plus d'efficacité que la Dox libre sur différents cancers (ovaires, seins).¹³⁸

Concernant les nanovecteurs, leur PEGylation permet également d'augmenter leur temps de circulation dans le sang, favorisant leur accumulation au niveau du site tumoral. Cependant, dans le but d'accroître l'effet EPR, les vecteurs doivent échapper aux systèmes immunitaires (opsonines et macrophages). Ils doivent alors présenter une taille d'au max 100 nm afin de passer à travers les espaces des vaisseaux tumoraux.¹³⁹

Le manque de groupes fonctionnels sur les PEGs pouvant permettre leur couplage à des médicaments restreint leur capacité d'utilisation en tant que conjugué polymère-PA. Pour surmonter cette limitation, les PEGs peuvent être fonctionnalisés par des composés porteurs de fonctions réactives. Ainsi, Greenwald et collaborateurs¹⁴⁰ ont couplé le PEG avec l'acide aspartique (Asp) pour y introduire des groupes COOH. Cette fonction acide carboxylique permet alors la conjugaison via une fonction amide avec un espaceur portant une fonction amine à une extrémité et la cytosine arabinoside (Ara-C, ou Cytarbel™ ou Aracytine™) à l'autre (*Schéma 14*). Cette dernière s'incorpore à l'ADN et bloque sa synthèse.¹⁴¹ Les prodrogues tétramériques et octamériques ainsi obtenues se sont avérées beaucoup plus efficaces dans le traitement du cancer du poumon, que le PA lui-même.

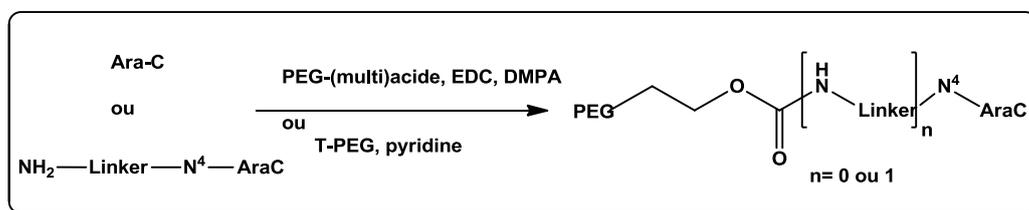


Schéma 14 : Synthèse du conjugué PEG- cytosine arabinoside

En 2004, Schiavon et collaborateurs¹⁴² ont rapporté une autre approche permettant d'augmenter la quantité de PA gréffé sur la chaîne PEG. En effet, les groupes hydroxyle du PEG ont été modifiés de façon répétée avec de l'acide adipique, produisant quatre ou huit dérivés fonctionnels capables de se lier à l'Ara-C. Les conjugués ainsi obtenus présentent une stabilité accrue, permettent une augmentation du temps de circulation du PA dans le sang chez la souris, et une diminution de la cytotoxicité par rapport à la cytosine arabinoside libre.

II.3.3. Le ciblage actif

La PEGylation et la découverte de l'effet EPR ont contribué à améliorer la vectorisation. Néanmoins, quelques freins persistent. D'une part, l'effet EPR dépend du degré de vascularisation des tumeurs. D'autre part, la taille et le nombre de porosités sont liés à la nature de la tumeur et à son stade d'évolution. Enfin, la PEGylation réduit l'interaction avec les opsonines sériques mais aussi l'interaction avec la surface des cellules diminuant ainsi leur internalisation.

D'après l'étude de Hoste et collaborateurs¹⁴³ en 1975, Ringsdorf a constaté que le couplage d'un ligand, le galactose, sur un polymère lui-même lié à un PA favorise l'accumulation du complexe galactose-polymère-PA dans le foie. Cela est dû à la présence des récepteurs glycoprotéiques du galactose à la surface des hépatocytes.

Concernant le ciblage des tumeurs, lors de la transformation d'une cellule saine en une cellule tumorale, l'expression de plusieurs protéines est modifiée. La modification la plus exploitée pour la vectorisation est la surexpression des récepteurs membranaires nécessaires à la croissance des tumeurs.

Parmi les récepteurs impliqués dans l'apport nutritionnel nécessaire à cette croissance anarchique, figurent le récepteur aux facteurs de croissance de type 2 (HER-2), le récepteur à l'acide folique, le récepteur à la transferrine, le récepteur au peptide vasoactif intestinal (VIP-R). Afin d'améliorer l'interaction des vecteurs avec les cellules tumorales, des ligands spécifiques aux récepteurs sont greffés sur leur surface.

Le ciblage actif peut être réalisé : i) en introduisant les molécules les plus affines pour les récepteurs (ex : aptamères), ii) en augmentant le nombre de molécules à la surface (ex : dendrimères) et iii) en modifiant la disposition des molécules (ex : plusieurs molécules de ciblage peuvent être liées avec des espaceurs).¹⁴⁴

Ces molécules de ciblage n'interviennent qu'à un stade tardif de la vectorisation. En effet, la comparaison de la quantité du PA accumulé dans les tumeurs montre qu'elle est identique entre les deux types de vecteurs c'est-à-dire avec ou sans molécules de ciblage. Cela paraît évident sachant que le mode d'accumulation des vecteurs dans les tumeurs se fait uniquement

par l'effet EPR. En revanche, l'activité anti-tumorale est meilleure lors d'un ciblage actif. En effet, l'amélioration de l'interaction entre les vecteurs et les cellules par le biais de récepteurs membranaires et donc grâce à ces molécules de ciblage, induit une bonne internalisation des vecteurs et ainsi une meilleure efficacité antitumorale.¹³⁸

Plusieurs travaux ont comparé les deux modes de ciblage (*Figure 11*) sur différents systèmes de vectorisation. Oyewumi et collaborateurs¹⁴⁵ ont réalisé cette étude sur des nanoparticules de gadolinium (agent de contraste pour l'IRM) présentant la même forme (sphérique), la même taille (100 nm) avec un indice de polydispersité de 1,2. Ces nanoparticules étaient fonctionnalisées ou non avec de l'acide folique qui était la molécule de ciblage. 8 et 24 heures après une injection d'une dose à 10 mg/kg dans les tumeurs (lignée cellulaire KB : carcinome naso-pharynx humain), les deux types de nanoparticules ont révélé une accumulation similaire du vecteur. Cependant, l'internalisation par les cellules de ce vecteur est 20 fois plus importante en présence de l'acide folique.

Suzuki et collaborateurs¹⁴⁶ ont comparé la vectorisation de liposomes chargés en oxaliplatine avec ou sans transferrine. 24 heures après leur injection par voie intraveineuse, ces deux types de liposomes ont montré une accumulation intratumorale similaire. Toutefois, en présence de la molécule de ciblage, la rétention (interaction entre les vecteurs et les cellules tumorales) après trois jours de suivi est meilleure. Une augmentation de l'activité anti-tumorale est observée par rapport aux liposomes sans ciblage actif et par rapport au PA libre.

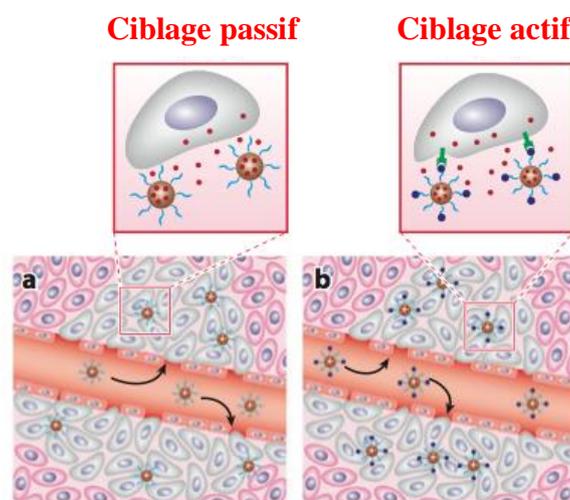


Figure 11 : Comparaison entre le ciblage actif et passif

Comme nous l'avons dit brièvement auparavant, la vectorisation met en jeu des vecteurs, de type particuliers, moléculaires ou encore vivants. En raison de leur grande diversité et complexité, seuls les principaux types de vecteurs particuliers (micelles et liposomes, nanoparticules) et moléculaires (polymères conjugués) seront présentés dans ce travail.

II.4.Systèmes de vectorisation particuliers

Trois générations de systèmes particuliers ont été décrites en fonction de leurs propriétés de surface.

a. Systèmes particuliers de première génération

La première génération correspond à l'encapsulation de principes actifs au sein de colloïdes stables en milieu aqueux, l'intérêt principal étant de ralentir leur élimination (notamment par voie rénale) et de prolonger leurs effets. Cependant, même si la faible taille des particules permet de ralentir l'élimination, elle n'est pas suffisante pour permettre une longue circulation dans le compartiment sanguin. En effet, ces nanobjets interagissent fortement avec les protéines plasmatiques appelées opsonines en raison de leur grande surface spécifique. Ils sont reconnus par le système immunitaire et plus particulièrement par le système réticulo-endothélial et sont rapidement pris en charge par les macrophages du système des phagocytes mononuclés (foie, rate, moelle). La prise en charge par les cellules de Kupffer et par les macrophages entraîne une accumulation du nano-objet dans le foie et la rate.

b. Systèmes particuliers de deuxième génération

Afin d'augmenter le temps de demi-vie plasmatique et de pouvoir atteindre la cible biologique, la surface des nanoparticules a été modifiée pour obtenir des nano-objets furtifs de seconde génération. La furtivité a été obtenue grâce à la présence de polymères, généralement du polyéthylène glycol qui est non toxique, soluble en milieu aqueux et faiblement immunogène. Ce biopolymère joue le rôle de couche protectrice et permet de limiter la fixation des protéines plasmatiques. Les nano-objets ainsi obtenus permettent une libération lente du principe actif dans le sang et une accumulation passive dans les tissus par effet EPR.

Toutefois, la présence des PEGs très hydrophile peut entraîner une diminution de l'internalisation des vecteurs par les cellules. C'est pour cette raison que la troisième

génération a été développée.

c. Systèmes particuliers de troisième génération

Afin de pouvoir améliorer la sélectivité des nano-objets, des vecteurs de troisième génération ont été développés. Les surfaces ont été fonctionnalisées par des ligands biologiques variés tel que des anticorps, des peptides ou d'autres molécules. Cette modification permet d'augmenter la sélectivité et améliorer l'internalisation dans la cellule.¹⁴⁷

Cette génération de vecteurs a permis de les séparer en deux familles : ceux agissant avec ciblage actif (troisième génération) et ceux agissant avec ciblage passif (première et deuxième générations). La *Figure 12* ci-dessous illustre ces trois générations de systèmes dans le cas de liposomes.

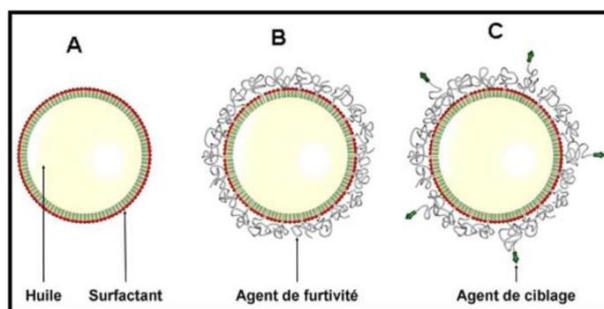


Figure 12 : Liposomes A) première génération : vecteurs nus, B) deuxième génération : vecteurs furtifs, C) vecteurs avec ciblage

II.4.1. Les liposomes

Les premières recherches sur l'utilisation des liposomes pour l'encapsulation de principes actifs datent de plus de trente ans.

Les liposomes sont des vésicules sphériques constituées de bicouches lipidiques et de taille allant de quelques dizaines à quelques milliers de nanomètres de diamètre. Ils présentent une grande capacité de stockage mais généralement insuffisante pour les molécules de grande taille comme les protéines.¹⁴⁸

Les liposomes diffèrent des autres systèmes de vectorisation tels que les nanoparticules sur plusieurs critères, parmi lesquels notamment : i) la taille (de quelques nanomètres à quelques microns), ii) la charge (positive ou négative), iii) le PA véhiculée (agents anticancéreux, agents d'imagerie...), iv) le taux de chargement, v) le mode de préparation. Plusieurs principes

actifs peuvent être incorporés dans des liposomes dans des sites d'incorporation dépendant essentiellement des propriétés physicochimiques des principes actifs. Ainsi, les molécules hydrosolubles seront localisées dans la phase interne aqueuse des liposomes.¹⁴⁹ Les molécules amphiphiles seront incorporées dans la bicouche phospholipidique; enfin, les molécules liposolubles seront encapsulées dans la matrice hydrophobe de la paroi liposomale.¹⁵⁰

Les liposomes sont des vecteurs biocompatibles et biodégradables. Ils sont administrés soit par voie orale ou par voie intraveineuse. Les liposomes PEGylés permettent de réaliser un ciblage d'organe,¹⁵¹ alors que les liposomes nus ont un tropisme hépatique marqué.¹⁵²

De nombreux agents anticancéreux comme le cisplatine, le paclitaxel, le docetaxel ont été véhiculés via les liposomes.¹⁵³ Ils sont soit sous forme PEGylée à la surface,¹⁵⁴ soit sensible au pH¹⁵⁵, soit sensible à la température. Dans tous les cas, une amélioration de l'efficacité de PA a été observée *in vivo* sur des modèles animaux. Malheureusement l'utilisation en clinique reste limitée. On peut citer des préparations liposomales de la daunorubicine, (Daunoxome®) ou de la doxorubicine (Caelyx®) qui a permis d'améliorer la sélectivité du PA vers la tumeur en réduisant les effets secondaires, notamment cardiaques, de ces molécules.¹⁵⁶

Cependant, leur manque de stabilité au cours de la conservation ou lors de l'administration, et leur coût élevé réduisent leur utilisation. Ceci a conduit au développement d'une grande variété de nanoparticules de compositions et de structures très diverses.

II.4.2. Les micelles

Les micelles sont des nano-agrégations de tensioactifs. Elles se forment en milieu aqueux à partir d'une certaine concentration appelée concentration micellaire critique (CMC). Cette dernière dépend du rapport entre la taille de la tête polaire et de la partie hydrophobe. La forme sphérique formée d'une seule couche est souvent de petite taille (autour de 5 nm à 100 nm).

Les avantages principaux mis en avant avec cet objet sont i) leur taille homogène et petite (20 à 100 nm), ii) leur grande stabilité au cours du temps (stockage), iii) une grande reproductibilité et iv) leur protocole de préparation facile.

De nombreux agents anticancéreux ont été véhiculés via des micelles.¹⁵⁷

Nishiyama et collaborateurs¹⁵⁸ ont développé des micelles de copolymère poly(éthylène glycol)-poly(acide glutamique), encapsulant dans leur coeur du cisplatine. La biodistribution réalisée chez les souris a révélé une amélioration de l'accumulation du PA dans les tumeurs. En effet, 24 heures après injection intraveineuse, la concentration du PA véhiculé est de vingt fois supérieure à celle observée avec le cisplatine libre.

Il existe plusieurs exemples de formulations micellaires en étude clinique tels que le Genexol-PM qui dérive du Paclitaxel.¹⁵⁹ Ce dernier a été évalué cliniquement comme co-agent thérapeutique avec le cisplatine. Les résultats cliniques montrent que 30% des patients sous ce traitement anticancéreux montrent un état stable de leur maladie et 60% des patients ont bénéficié d'une année supplémentaire de survie avec des doses administrées un peu plus faibles que celles utilisées avec le cisplatine seul.

II.4.3. Les nanoparticules

Le développement des nanoparticules à visée médicale permet d'envisager de nombreuses applications pour la détection et le traitement de diverses pathologies et en particulier le cancer. L'un des domaines d'application le plus prometteur de ces nano-objets est le développement de thérapies ciblées pour le traitement des cancers.

Les nanoparticules sont définies comme étant des particules ayant une taille comprise entre 1 et 100 nm. Du point de vue de la taille, les nanoparticules sont du même ordre de grandeur que les anticorps, les récepteurs membranaires, les acides nucléiques et les protéines. Différentes nanoparticules sont utilisées pour la vectorisation d'agents anticancéreux, parmi lesquelles figurent des nanoparticules polymères,¹⁶⁰ inorganiques,¹⁶¹ biologiques¹⁶² et hybrides.¹⁶³

La vectorisation à l'aide de tels systèmes connaît d'ailleurs un essor considérable depuis le début des années 1990. De nombreuses applications en thérapie anticancéreuse ont été décrites dans la littérature.¹⁴⁷

Les premières nanoparticules polymères développées par Couvreur et collaborateurs dans les années 1980 sont à base de polyalkylcyanoacrylates.¹⁶⁴

Différents polymères ont ensuite été utilisés avec succès pour former des nanoparticules, les plus couramment utilisés actuellement étant le poly(acide lactique) PLA, le poly(acide glycolique) PGA et leur copolymère le poly(lactide-coglycolide) PLGA. Ces polymères ont l'avantage d'avoir une grande biocompatibilité et d'être biodégradables par l'organisme. Ils sont ainsi utilisés depuis de nombreuses années pour fabriquer des dispositifs médicaux et des implants sous-cutanés.

Parallèlement au développement des nanoparticules organiques, les nanoparticules inorganiques ont également trouvé des applications de plus en plus importantes en nanomédecine. Les études ont porté essentiellement sur les nanoparticules d'or et les nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer.¹⁶⁵

De plus, plus récemment, les nanoparticules ont trouvé leur place en thérapie génique comme outil pour la délivrance intracellulaire d'acides nucléiques.¹⁶⁶

Les nanoparticules inorganiques peuvent être utilisées pour d'autres thérapies, comme la radiothérapie,¹⁶⁷ la thermothérapie¹⁶⁸ ou la thérapie photodynamique.¹⁶⁹

Le diagnostic, et plus particulièrement l'imagerie médicale, constitue également un domaine d'application pour lequel les nanoparticules, utilisées comme traceurs ou agents de contraste, peuvent apporter de réelles améliorations.

Ainsi, des nanoparticules d'oxyde de fer SPIO et USPIO sont déjà approuvées par la FDA comme agents de contraste pour l'IRM. L'Endorem[®], (SPIO) est composé de particules d'oxyde fer de 5 à 6 nm de diamètre, enrobées par une couche de dextrane (diamètre final de 100 nm). Après administration intra-veineuse, il est utilisé pour visualiser des lésions hépatiques (tumeurs et métastases hépatiques notamment).

Le Resovist[®] est également utilisé dans cette indication. Il est constitué de carboxyméthyl-dextrane encapsulant des nanoparticules d'oxyde de fer de 4 nm (diamètre final de 60 nm).

II.5. Travaux du laboratoire sur la vectorisation des bisphosphonates

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, il est désormais établi que les bisphosphonates trouvent une application thérapeutique dans le traitement du cancer. Cependant, leur forte affinité osseuse qui contraste avec leur pauvre absorption au niveau des tissus mous limite leur utilisation thérapeutique. En effet, l'un des inconvénients majeurs de ces composés reste leur faible biodisponibilité (moins de 10% de la dose orale administrée est absorbée) qui s'explique par leur pauvre lipophilie et la présence de charges négatives à pH physiologique. De plus, leur forte affinité pour les os peut être un effet secondaire grave dans des applications telles que l'utilisation en tant qu'agent antitumoral.¹²⁰

Différentes solutions ont alors été envisagées au sein de notre groupe pour rendre ces bisphosphonates plus lipophiles. Il est tout d'abord possible de les modifier chimiquement, soit en changeant la structure de leur chaîne latérale, soit en estérifiant partiellement les fonctions acide phosphonique. L'estérification de ces groupes permet non seulement d'augmenter la lipophilie mais également de masquer les charges négatives présentes à pH physiologique. Nous avons donc réalisé la synthèse de bisphosphonates partiellement mono-, di- et triestérifiés. Cette stratégie de type prodrogue a été réalisée grâce à une méthode de synthèse originale développée au laboratoire, utilisant des phosphites silylés, et réalisée dans des conditions douces (notamment pas d'utilisation d'acides forts, pas de chauffage). Différents groupements alkyl et aryl ont ainsi pu être introduits sur les fonctions acide phosphonique et sur la chaîne latérale des bisphosphonates.^{104,120} Cette méthode a permis d'obtenir des composés non accessibles jusque là, les conditions opératoires des synthèses décrites précédemment étant trop drastiques pour certains substrats tels que des composés aromatiques.^{120,170-172}

Une autre approche permettant l'amélioration de l'effet antitumoral des bisphosphonates consiste à utiliser des systèmes de délivrance élaborés grâce à des vecteurs particuliers décrits précédemment. Deux stratégies de vectorisation ont été étudiées au laboratoire : i) en encapsulant le bisphosphonate dans des liposomes, ii) en habillant la surface de nanoparticules d'oxyde de fer.

II.5.1. Vectorisation à l'aide de liposomes

En 2010, afin de permettre la vectorisation des bisphosphonates, la formulation de liposomes permettant d'encapsuler le nérédronate a été mise au point lors d'un travail de thèse réalisé en collaboration avec le Dr. Olivier Seksek de l'Université Paris 6.^{173,174} Le nérédronate a été choisi en raison de son activité quasiment nulle sur les cellules tumorales, et ce, afin de prouver l'efficacité de nos vecteurs. La composition de ces liposomes a été optimisée (composition lipidique : DOPC/DOPG/Cholestérol : 72/27/1% molaire ; taille : 163±15 nm). Les tests biologiques *in vitro* réalisés ont montré que le nérédronate encapsulé est un puissant inhibiteur de l'activité tumorale par rapport au bisphosphonate seul et en particulier sur la lignée cellulaire MDA-MB-231 (cellules cancéreuses mammaires humaines très invasives). Ces liposomes ont également montré un effet considérable à une concentration de 1 µM sur l'inhibition de la migration et de l'invasion de ces cellules tumorales vers les tissus environnants, processus conduisant à la formation des métastases. Enfin, une inhibition de l'activité de la pro-MMP-9 et de la MMP-2 ainsi que l'internalisation du nérédronate dans les cellules tumorales par endocytose (étudiée par cytométrie de flux et microscopie à fluorescence) ont pu être observées.¹⁷⁴

II.5.2. Vectorisation à l'aide de nanoparticules d'oxyde de fer

En 2009, notre laboratoire a élaboré une nanoplateforme superparamagnétique d'oxyde de fer $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ habillée de bisphosphonates. Le but était de lier le zolédronate à la surface de la nanoplateforme via les groupements phosphonate, afin de le vectoriser.

Le zolédronate est un bisphosphonate azoté présentant outre des propriétés anti-ostéoclastiques, la meilleure activité antitumorale, notamment dans le cas des cancers du sein et de la prostate. Cependant, ces propriétés ne peuvent pas être correctement exploitées en raison de sa très forte affinité pour les cations divalents et son accumulation préférentielle dans les os, comme expliqué précédemment.

Le couplage du zolédronate à la surface des nanoparticules par le biais des groupements phosphonate a permis d'augmenter sa lipophilie mais également de modifier sa cible thérapeutique, ce qui a permis d'augmenter son absorption intestinale. Le potentiel antitumoral de ces nanomatériaux hybrides $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ @zolédronate a été évalué *in vitro* sur la lignée cellulaire de cancer du sein MDA-MB-231. Ils présentent une activité anti-

proliférative spécifique des cellules cancéreuses légèrement moins importante que celle de la molécule libre. En revanche, l'application d'un champ magnétique fait diminuer la viabilité cellulaire qui passe de 40 à 70% d'inhibition.¹⁷⁵

De la même façon, de nouvelles nanoparticules magnétiques antitumorales ont également été conçues par fonctionnalisation avec un autre bisphosphonate aminé, l'alendronate.¹⁷⁶ Les nano-objets obtenus ont permis d'améliorer considérablement la pénétration cellulaire par l'alendronate et donc son effet antitumoral. En effet, l'IC₅₀ observé dans le cas de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ @alendronate sur les cellules du cancer du sein MDA-MB 231 est réduit de quatre fois par rapport à l'alendronate seul et il est diminué davantage en présence d'un champ magnétique. Une étude biologique *in vivo* chez des souris nude présentant une tumeur issue de la lignée cellulaire MDA-MB-231 a montré que l'injection de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ @alendronate en présence d'un champ magnétique réduit de façon significative le développement des tumeurs.

II.6.Objectifs de notre étude

Comme nous l'avons vu précédemment, les bisphosphonates actuellement utilisés dans le traitement des affections osseuses sont caractérisés, au plan pharmacocinétique, par une très mauvaise biodisponibilité orale liée à leur caractère ionique très fort et par une concentration élective dans l'os. Cette dernière caractéristique, avantageuse pour les indications actuelles, devient un handicap pour le développement de ces molécules comme le traitement des tumeurs solides non osseuses.

Un bisphosphonate à tropisme tumoral non osseux devra : i) avoir une bonne biodisponibilité orale ; ii) une bonne pénétration dans les cellules cibles ; iii) exhiber une accumulation élective dans les tumeurs ; iv) être atoxique, ce qui implique une faible accumulation dans les tissus normaux.

Un certain nombre de ces conditions sont, *à priori*, incompatibles entre elles. L'augmentation de la liposolubilité et la diminution des charges négatives portées par la molécule peuvent améliorer la biodisponibilité orale et diminuer la fixation osseuse mais risque d'augmenter la captation par les tissus mous normaux et donc le risque toxique. Pour répondre à ces différents critères, deux stratégies ont été adoptées comme la conception de prodrogues et la vectorisation à l'aide de liposomes ou nanoparticules. Nous avons pu montrer que ces

systèmes permettaient une amélioration de la distribution des bisphosphonates dans les tissus vascularisés. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les nanoparticules d'oxyde de fer. Cependant, ces systèmes peuvent présenter quelques inconvénients liés à des problèmes de coût, de stabilité au cours de leur conservation ou de leur administration, mais également un faible taux de chargement en PA et l'absence de propriétés de libération contrôlée. De plus, l'accumulation des nanoparticules inorganiques non biodégradables dans les cellules ou organes non ciblés demeure un mystère car on ne connaît toujours pas leur effet à long terme. Nous avons donc, souhaité adopter une approche de type polymère conjugué pour la vectorisation des bisphosphonates. La conception d'un vecteur polymère idéal doit répondre à un certain nombre de critères imposés par la biologie.

En effet, le vecteur doit être biocompatible et donc ne doit présenter aucune toxicité envers l'organisme. Il doit être furtif et par conséquent présenter une faible immunogénicité, c'est-à-dire avoir un temps de circulation dans le sang le plus long possible sans être reconnu par le système immunitaire tel que le système réticulo-endothélial. Il ne doit pas non plus être éliminé par les reins ou le foie avant d'avoir atteint sa cible. Il doit être spécifique de l'organe ou du tissu visé. Il doit être biodégradable ou de taille inférieure au filtre rénal et ne doit pas s'accumuler dans l'organisme. Enfin, l'utilisation d'un bon vecteur doit permettre un taux de libération maximal du PA.

Nous nous sommes donc intéressés à deux systèmes conjugués polymère-médicament, utilisant soit un polymère naturel (un polysaccharide) soit synthétique (un copolymère à base de HPMA). La conception de ces polymères conjugués nous laisse espérer une absorption active par pinocytose, une durée de circulation accrue dans le sang, une diminution de la toxicité non spécifique du médicament conjugué et une accumulation passive du médicament sur le site de la tumeur par l'augmentation de l'effet de perméabilité et de rétention.

Concernant le polymère naturel, notre choix s'est porté sur le dextrane. Outre son affinité avec les cellules tumorales, ce transporteur présente notamment l'intérêt d'être biocompatible, biodégradable, mais non dégradé dans les lysosomes³ et bioéliminable. Ce polymère a été largement utilisé comme prodrogue pour plusieurs principes actifs anticancéreux.^{3,16,177}

La vectorisation d'un HMBP greffé sur le dextrane (*Figure 13*) devrait ainsi permettre de prolonger le temps de circulation de ce principe actif dans le sang, tout en diminuant les doses administrées et donc les effets secondaires engendrés. L'originalité de ce travail repose sur la

régiosélectivité du couplage covalent entre le dextrane et le HMBP (néridronate, alendronate) qui ne nécessite aucune étape de protection/déprotection des autres fonctions réactives. Il sera d'autre part nécessaire d'établir des conditions opératoires reproductibles. L'évaluation biologique de ces différents conjugués dextrane-bisphosphonate sera par la suite réalisée *in vitro* et *in vivo* sur des souris athymiques xéno greffées.

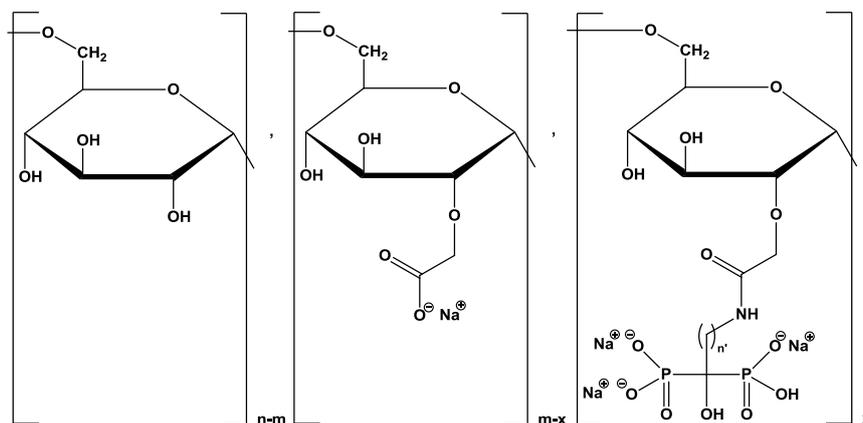


Figure 13 : Structure des conjugués CMD-HMBP

Nous avons ensuite souhaité comparer l'activité biologique observée à celle qui serait obtenue avec un système conjugué synthétique dérivé du HMPA. Ce polymère synthétique présente des avantages pour la vectorisation d'agents thérapeutiques. Il est soluble dans l'eau, il ne présente pas de charge neutre et il est non immunogène. L'utilisation de ce conjugué polymère-bisphosphonate permettrait d'augmenter le temps de circulation dans le compartiment sanguin. Il contribuerait à l'accumulation de l'entité biologiquement active dans la tumeur grâce à l'effet EPR. De plus, il a été montré que l'utilisation de ces polymères pour le transport du PA permet d'augmenter la solubilité, la biodisponibilité et la stabilité chimique en les protégeant de la dégradation par l'environnement biologique. Ces polymères permettent de minimiser la toxicité systémique.

La conception d'un tel copolymère de HPMA doit répondre à différents critères. Tout d'abord, la taille du copolymère doit être contrôlée et doit se situer autour de 45 kDa. D'autre part, le copolymère doit présenter un bras espaceur entre ce dernier et le PA afin d'éviter un encombrement stérique et permettre la libération du PA. Enfin, la nature de la liaison chimique entre le bras espaceur et le PA est un facteur prépondérant. En effet, le

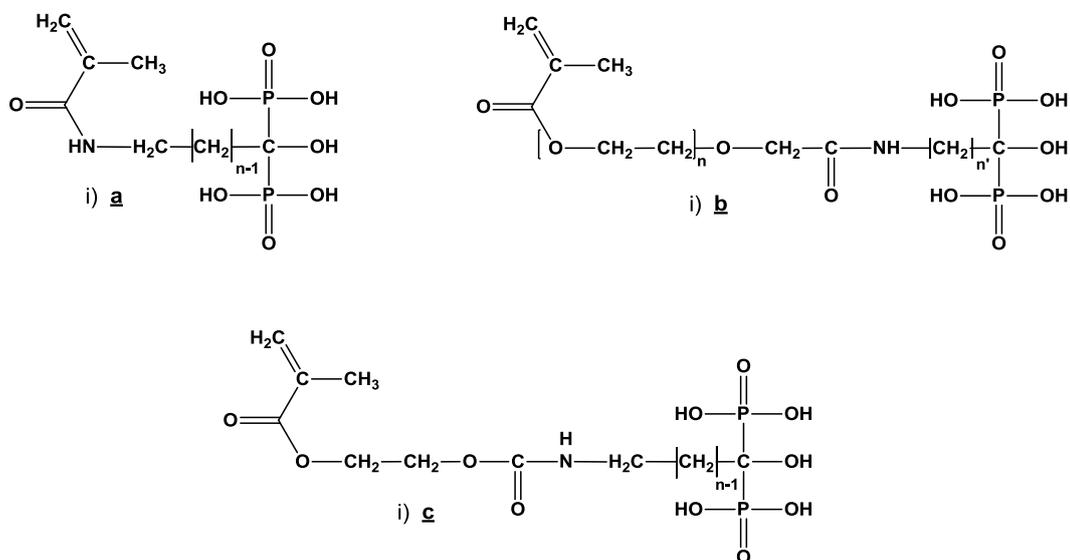
bisphosphonate doit être libéré soit par voie chimique soit par voie enzymatique au niveau de la cellule tumorale.

Nous avons choisi de développer une méthode de copolymérisation de HPMA avec des comonomères contenant le PA dans leur structure. Cette méthode a été également utilisée par Rathi et collaborateurs décrite dans la revue de Kopecek en 2008³.

Notre stratégie consiste donc à mettre au point de nouvelles synthèses de différentes familles de monomères originaux méthacryliques comportant un HMBP, en changeant la nature mais également la longueur de chaîne du bras espaceur. Nous développerons ainsi des monomères :

- (i) portant un HMBP azoté (pamidronate, alendronate, nérédronate) avec :
 - a** : une liaison amide ;
 - b** : une liaison amide et un bras espaceur contenant des PEGs ;
 - c** : une liaison carbamate et un bras espaceur comportant une chaîne carbonée ;
- (ii) portant un HMBP non azoté avec :
 - d** : une liaison éther et un bras espaceur contenant des PEGs ;
 - e** : une liaison ester et un bras espaceur contenant des motifs PEG.

La présence du polyéthylène glycol comme bras espaceur permettra d'augmenter la rémanence vasculaire. Les différentes structures chimiques ciblées dans ce travail sont présentées *Figure 14*.



CHAPITRE III : VECTORISATION AVEC DES POLYSACCHARIDES

III.1.Introduction

L'utilisation de systèmes polymères pour la vectorisation de principes actifs nécessite de travailler avec des polymères, biocompatibles, biodégradables et/ou bioéliminables pour éviter une accumulation dans l'organisme. L'avantage des vecteurs polymères hydrolysables destinés à une administration par voie intraveineuse est le non risque d'embolisation. Toutefois, leur devenir *in vivo* va dépendre en grande partie de leur composition, qui pourra améliorer le franchissement de certaines barrières biologiques, favoriser la pénétration dans des cellules spécifiques ou au contraire l'empêcher dans le cas des cellules du système immunitaire.

Les polymères naturels utilisés dans des applications médicales sont principalement de deux catégories : les protéines telles que l'albumine et la gélatine, et les polysaccharides comme le dextrane, l'alginate, le chitosan, ou encore certains dérivés de la cellulose¹³². Nous allons donc nous intéresser dans ce troisième chapitre à l'utilisation de vecteurs polysaccharidiques pour la délivrance d'agents thérapeutiques. Après une introduction des principaux polysaccharides utilisés en thérapie, nous nous intéresserons plus particulièrement au dextrane, en présentant un état de l'art sur les applications de ce polysaccharide en tant que vecteur d'antitumoraux. Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous allons décrire la stratégie adoptée pour concevoir de nouveaux matériaux conjugués CMD-HMBP ainsi que leur caractérisation. Enfin, nous discuterons des différents résultats obtenus quant à leurs propriétés biologiques antitumorales.

III.2.Généralités sur les polysaccharides utilisés en vectorisation

Les polysaccharides ont suscité un attrait chez les scientifiques depuis une soixantaine d'années. En effet, l'une des caractéristiques principales des polysaccharides est sans doute leur biodégradabilité qui s'effectue soit, par voie hydrolytique, enzymatique, ou par l'intermédiaire de microorganismes. Cette propriété présente un réel avantage dans certaines applications médicales.

Par ailleurs, dans le but de moduler ou d'enrichir leurs propriétés, les polysaccharides peuvent

subir diverses modifications chimiques les rendant biocompatibles. Ils génèrent donc un vif intérêt pour la fabrication de différents biomatériaux destinés à la réparation de lésions, à l'ingénierie tissulaire ou encore à la vectorisation de principes actifs.

Afin de préparer ces nouveaux matériaux polysaccharidiques capables de vectoriser les médicaments vers un endroit particulier du corps, par le biais d'une modification chimique ou enzymatique sélective, il est nécessaire de modifier l'équilibre hydrophile-hydrophobe. En effet, il faut pouvoir augmenter leur caractère hydrophobe pour favoriser le ciblage et la délivrance du médicament sur un site particulier.

III.2.1. Structure moléculaire

La présence de substituants sur le polysaccharide joue un rôle important sur ses propriétés physicochimiques. Les substituants peuvent modifier les interactions inter- ou intra-chaînes des polymères.

En effet, la présence de groupements hydroxyle dans la structure chimique des polysaccharides favorise leur solubilité dans les solvants polaires comme l'eau. Un des paramètres qui contrôlent les propriétés physiques en solution ou à l'état solide des polysaccharides est leur structure tridimensionnelle.¹⁷⁹

Les polysaccharides qui ont une structure stéréorégulière sont souvent capables de former des structures tertiaires et quaternaires (hélices, feuillettes, « boîtes à œufs », des alginates). Dans cette configuration, ils sont semi-rigides et leur stabilité dépend de la température et de la concentration ionique si la structure du polysaccharide contient des unités d'acide uronique ou des substituants ioniques.¹⁸⁰

C'est le cas par exemple de la chitine, le seul polysaccharide à charge cationique (ammonium). A haut degré d'acétylation, ce polymère est soluble dans très peu de solvants, ce qui limite ses applications. Mais, partiellement acétylé (moins de 50%), elle devient hydrosoluble en milieu acide, et c'est à l'issue de cette faible acétylation qu'est obtenu le chitosane, un polysaccharide dérivé.¹⁸¹

Dans le cas du gellane, les groupements L-glycéryl stabilisent la double hélice, alors que les groupements acétyl inhibent le processus de gélification. Pour ces polymères, le gel physique

thermosensible formé est stabilisé par les ponts hydrogène entre double hélice.¹⁸⁰

De plus, mis à part sa structure, la taille d'un polysaccharide est une caractéristique importante également, et plus particulièrement pour les applications médicales. Prenons l'exemple du dextrane (polysaccharide bactérien). Le dextrane 70 réduit d'une manière significative le risque de thrombose et d'embolie pulmonaire fatale post-chirurgicale. Par contre, le dextrane avec de plus faibles poids moléculaires confère une amélioration des propriétés d'écoulement du sang par activateurs du flux sanguin (réduction de l'agrégation des plaquettes et diminution de la viscosité du sang)¹⁸² et l'inhibition de l'agrégation des érythrocytes. Bien que l'effet optimal de désagrégation a été observé autour d'un poids moléculaire de 25 kDa, un dextrane 40 a finalement été choisi pour les applications *in vivo* en tenant compte de l'excrétion rénale.¹⁸³

III.2.2.Importance des conditions du milieu

Des conditions du milieu comme la température, la force ionique, la concentration, peuvent affecter les propriétés structurales des polysaccharides.

Par exemple, l'effet de la température peut varier suivant la structure des chaînes présentes sur le polysaccharide. En effet, les *i*-carraghénane et λ -carraghénane, deux polysaccharides anioniques ayant une composition chimique similaire, ont des conformations qui diffèrent selon la température. Alors que le *i*-carraghénane a une structure hélicoïdale à 25°C, le λ -carraghénane est en pelote statistique dans les mêmes conditions.¹⁸⁴ La température de transition est fonction de la concentration en polysaccharide et de la force ionique du milieu. Un autre exemple concerne le xanthane qui dans sa forme native a une conformation en hélice. Mais au-dessus de sa température de changement conformationnel, il forme des agrégats en milieu dilué ou semi- dilué.¹⁸⁰

De plus, la force ionique du milieu joue un rôle fondamental dans les propriétés conformationnelles des polysaccharides. Quand la concentration du sel augmente dans le milieu, la transition structurale hélice-pelote du κ -carraghénane est plus nette, et déplacée vers des températures plus élevées. La conformation hélicoïdale du *i*-carraghénane peut être obtenue en milieu dilué en présence de sel, ou en milieu concentré sans sel.

III.2.3. Biodégradabilité

La plupart des polysaccharides sont biodégradables et subissent une dégradation bactérienne et enzymatique, ce qui est un avantage pour les applications en ingénierie tissulaire et l'administration de médicaments, mais pourrait être un problème pour les applications nécessitant une longue durée de vie. Le défi est donc de contrôler le taux et le temps de dégradation des matériaux à base de polysaccharides pour chaque application spécifique. Par exemple, la cellulose est difficilement biodégradable dans le corps et n'est pas digestible, mais elle peut devenir hydrolysable en modifiant sa structure.

La compréhension de la relation entre la structure des matériaux polysaccharidiques utilisés dans une application spécifique et sa biodégradabilité ainsi que les modes / moyens de déclenchement de la biodégradabilité est indispensable. Cela se réalisera avec l'utilisation de modèles physiques et biochimiques de la dégradation *in vivo* des biopolymères.¹⁸⁵

III.2.4. Applications biomédicales

Les dérivés de polysaccharides naturels d'origine animale, végétale ou encore bactérienne, possèdent de nombreux groupements réactifs (hydroxyle, acide carboxylique, amine) qui peuvent servir de base à une fonctionnalisation dont le but est de conférer de nouvelles propriétés aux macromolécules elles-mêmes. Les applications visées pour ces polysaccharides fonctionnalisés concernent l'ingénierie tissulaire mais surtout la vectorisation de principes actifs.

Les polysaccharides sont non-toxiques, biocompatibles, biodégradables, solubles dans l'eau et ont la plupart du temps une haute capacité de gonflement. Ces propriétés les rendent parfaitement adaptés à des applications biomédicales et pharmaceutiques. Une large gamme de polysaccharides a déjà trouvé des applications médicales, à savoir le chitosane, la cellulose (origine végétale et bactérienne) et des dérivés de cellulose, le dextrane, l'amidon, l'acide hyaluronique, dans des applications telles que :

- ✓ la cicatrisation des plaies (chitosane, cellulose bactérienne, acide hyaluronique) ;
- ✓ des échafaudages en ingénierie tissulaire et implants (cellulose, acide hyaluronique, chitosane) ;
- ✓ des composés bioactifs comme anti-microbiens et anti-coagulants du sang (chitosane) ;
- ✓ des vaccins (polysaccharides bactériens) ;

- ✓ la délivrance de médicaments (amidon et ses dérivés, cellulose et ses dérivés, chitosane, dextrane, acide hyaluronique).¹⁸⁵

Cette dernière application, qui nous intéresse dans notre étude, a été réalisée sur différents polysaccharides. Quelques exemples sont cités dans le paragraphe suivant.

III.3. Quelques exemples de polysaccharides utilisés comme vecteurs

III.3.1. La cellulose

La cellulose est le polymère naturel composé d'unités glucopyranose liées en β -1 \rightarrow 4. La cellulose a à l'état native un haut degré de cristallinité, ce qui diminue sensiblement sa solubilité dans l'eau (*Figure 16*). Afin d'améliorer l'hydrosolubilité, des groupements fonctionnels hydrophiles tels que les ammoniums quaternaires par exemple ont été introduits. En effet, ces dérivés cellulosiques hydrosolubles ont été ensuite modifiés par de longues chaînes hydrocarbonées afin d'obtenir de nouveaux tensioactifs. Certains sont même disponibles commercialement et largement employés dans diverses applications.¹⁸⁶ Leurs propriétés tensioactives et émulsifiantes ont été mises en évidence pour des applications médicales.¹⁸⁷

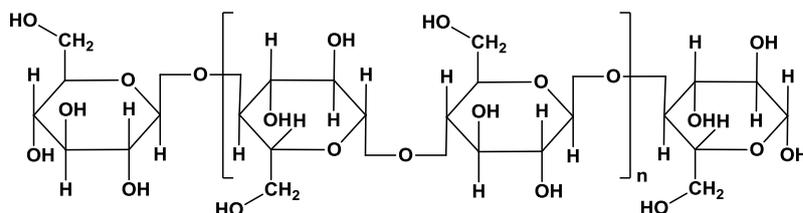


Figure 16: Structure de la cellulose.

En 2012, Mohd Cairul et collaborateurs¹⁸⁸ ont réalisé des études de libération contrôlée de médicament sur des tablettes de paracétamol utilisant des films de cellulose bactérienne. La cellulose bactérienne présente de bonnes propriétés filmogènes pour une application potentielle pour la libération prolongée de médicaments. Les résultats de cette étude montrent que la cellulose bactérienne peut être utilisée pour encapsuler ces comprimés de paracétamol, avec ajustement de la taille des particules et l'ajout d'autres polymères ou additifs.

III.3.2. La chitine et le chitosane

La chitine est un polysaccharide linéaire constitué d'un enchaînement β -1 \rightarrow 4 d'unités glucosamine présentant un degré élevé de *N*-acétylation. Le chitosane, principal dérivé de la chitine, est obtenu par saponification de celle-ci en milieu alcalin. C'est un polymère polycationique qui devient hydrosoluble à pH acide. Il est employé pour diverses applications dans les domaines biomédicaux et pharmaceutiques (*Figure 17*).

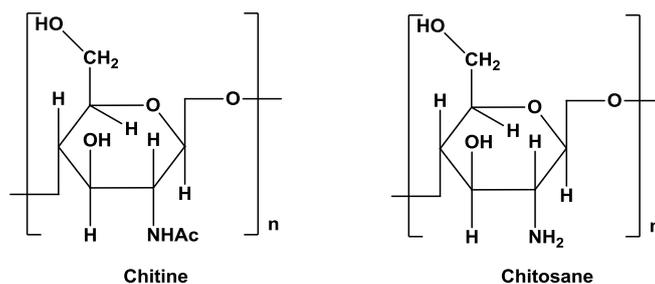


Figure 17: Structures de la chitine et du chitosane.

Le chitosane est non toxique et facilement bioabsorbable avec une capacité gélifiante à faible pH. Les chitosanes peuvent également gonfler en milieu acide. De plus, le chitosane possède des activités anti-acides et anti-ulcéreuses, qui empêchent l'irritation ou l'affaiblissement de l'estomac par les médicaments.

Toutes ces propriétés font du chitosane naturel un polymère idéal pour les formulations à libération contrôlée de médicaments.¹⁸⁹

Il a été démontré que la fixation de groupements hydrophobes engendrait la formation de micelles. Cette propriété a d'ailleurs permis d'utiliser ces polymères pour concevoir des vecteurs de médicaments anticancéreux. En effet, Akio Miwa et collaborateurs¹⁹⁰ ont développé un vecteur du taxol dérivé du chitosane injectable par voie intraveineuse. Ce dérivé, le *N*-lauryl-carboxyméthyl-chitosane (LCC), a été synthétisé et la solubilité du taxol dans des micelles de LCC a été grandement améliorée (1000 fois plus importante). Le taxol piégé dans les micelles de LCC a montré une activité cytostatique plus efficace que le taxol libre à de faibles concentrations. L'examen des résultats du degré de solubilisation, des tests d'hémolyse et de l'activité cytostatique suggèrent que le LCC est un bon vecteur du taxol. Ce dérivé du chitosane a également été utilisé comme vecteur de différents médicaments.¹⁹¹

Un autre exemple est la conjugaison du chitosane aux médicaments peptidiques comme la calcitonine, ce qui empêche la dégradation de ces médicaments en inhibant les enzymes telles que la trypsine et la chymotrypsine et par conséquent, conserve les propriétés mucoadhésives.¹⁹² Les conjugués 5-méthylpyrrolidinone chitosane et 4-thiobutylamidine chitosane ont montré une absorption accrue ainsi que des propriétés mucoadhésives.

III.3.3.L'amidon

L'amidon utilisé pour des applications médicales est également modifié chimiquement. Cela se fait par voie enzymatique ou par voie chimique en solution aqueuse basique ou encore en solution organique basique. La plupart des modifications chimiques effectuées sur l'amidon concernent l'amylose (une des deux structures de l'amidon) (*Figure 18*).

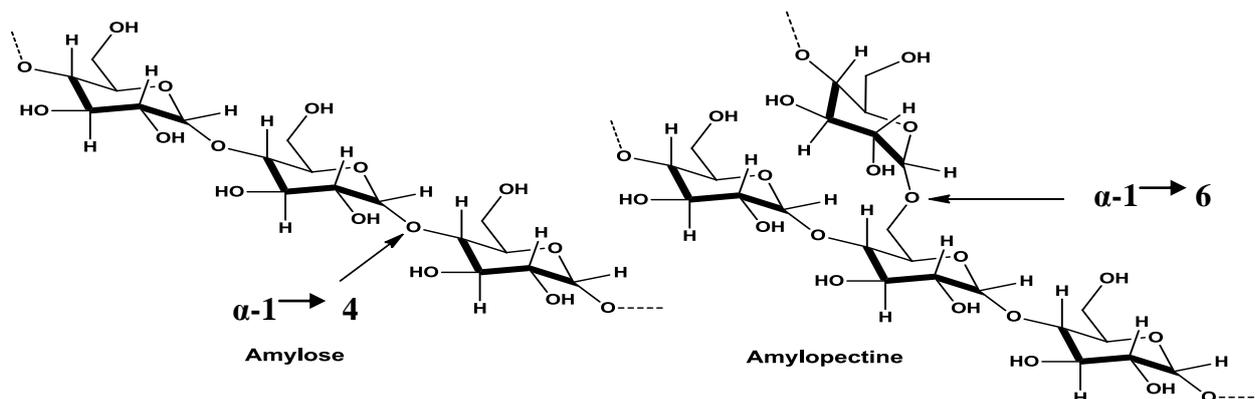


Figure 18 : Structure schématique de l'amylose et de l'amylopectine

Les dérivés de l'amidon ont été employés pour une application biomédicale, en particulier dans la vectorisation de médicaments. Par exemple, des microsphères à base d'amidon ont été employées pour la libération contrôlée d'insuline pour le traitement du diabète par voie orale ou pour la libération contrôlée d'ampicilline utilisée pour traiter les infections gastriques ou intestinales.

Des dérivés d'amidon peuvent également être utilisés pour la vectorisation de médicaments antiarthritiques mais également pour la délivrance de médicaments antiparasitaires.¹⁹¹

III.3.4. Le pullulane

Le pullulane (*Figure 19*) est un polysaccharide neutre et hydrosoluble. Il se compose d'une chaîne linéaire flexible formée d'unités glucopyranose liées en α -1 \rightarrow 4 qui sont incluses dans des unités maltotriose liées en α -1 \rightarrow 6.

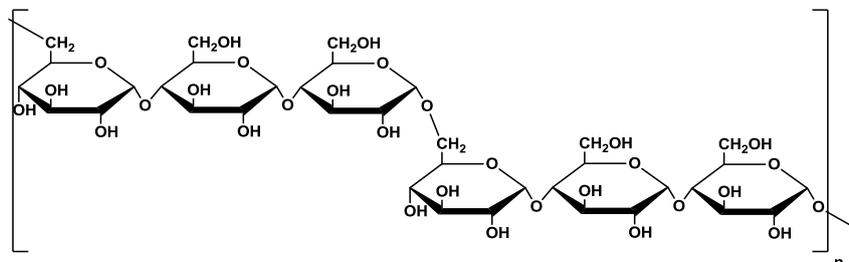


Figure 19 : Structure du pullulane.

Les modifications chimiques sur le pullulane peuvent être réalisées sur la fonction alcool primaire la plus réactive en position 6 de l'unité glucopyranose pour des réactions d'oxydation, de carbonylation¹⁹³ ou de succinylation.¹⁹⁴ Les produits dérivés du pullulane sont prometteurs pour le transport de principes actifs vers des organes cibles de l'organisme.¹⁹⁵

Par exemple, en 2008, Dian-xiang Lu et collaborateurs¹⁹⁶ ont conçu un nouveau système sensible au pH constitué de nanoparticules à base d'un dérivé de pullulane conjugué à 3,18% de doxorubicine. Ce PA a été greffé via une liaison hydrazone sensible au pH. L'auto-assemblage de ce conjugué a permis de former des nanoparticules sphériques de taille inférieure à 100 nm. Les résultats de cette étude montrent que l'effet de la cytotoxicité de la doxorubicine conjuguée est comparable à celle de la doxorubicine libre sur des cellules de souris 4T1 du cancer du sein. Une étude en fonction du pH a montré une cinétique de libération différente de la doxorubicine. A pH physiologique, il a été observé une libération lente alors qu'à pH acide, la libération est beaucoup plus rapide en raison d'une coupure plus aisée de l'hydrazone en milieu acide.

Cette différence de vitesse d'hydrolyse est un facteur déterminant pour l'utilisation de ce conjugué en tant qu'agent antitumoral. La libération du PA se fera après accumulation du conjugué dans la tumeur après hydrolyse dans les lysosomes des cellules tumorales.¹⁹⁶

III.3.5.L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique (HA) est un biopolymère naturel, utile à d'importantes fonctions biologiques. Depuis sa découverte dans les tissus humains, l'acide hyaluronique et ses dérivés ont été largement étudiés et appliqués dans le domaine biomédical. Sa biocompatibilité élevée a accentué l'attrait de ce polymère dans ce domaine.

L'acide hyaluronique ou hyaluronane est constitué d'une chaîne linéaire formée d'unités disaccharidiques répétitives d'acide D-glucuronique et de D-N-acétylglucosamines (*Figure 20*). Sa masse moléculaire peut atteindre 10^7 Da.

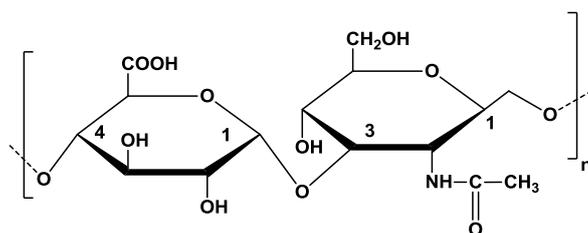


Figure 20 : Structure de l'acide hyaluronique

Les propriétés viscoélastiques et le caractère semi-rigide du hyaluronane en font un matériau d'usage de choix dans le domaine médical. Les complexes qu'il forme avec les polycations permettent de contrôler sa libération.

Un exemple de vectorisation avec l'acide hyaluronique est celui décrit par Dingcheng Xin et collaborateurs¹⁹⁷ qui ont conçu et synthétisé une nouvelle classe de systèmes de délivrance de médicaments en utilisant des acides aminés comme espaceur entre l'acide hyaluronique et le paclitaxel. Dans leurs travaux antérieurs, ils ont montré que la liaison ester entre le transporteur et le PA était difficile à hydrolyser. La conception moléculaire des acides aminés comme espaceur a facilité la libération du paclitaxel greffé sur l'acide hyaluronique.

La prodrogue préparée peut s'auto-assembler pour former des nanoparticules, ce qui permet d'augmenter la solubilité du PA et empêche sa dégradation. Les résultats des expériences *in vitro* montrent que les prodrogues nanométriques ont présenté une cytotoxicité augmentée par rapport au paclitaxel libre vis-à-vis de la lignée cellulaire MCF-7 du cancer du sein.¹⁹⁷

III.4.Utilisation du dextrane comme vecteur d'agents thérapeutiques

Depuis la fin de la seconde guerre mondiale, l'utilisation du dextrane dans le domaine biomédical a permis des développements importants dans le domaine pharmaceutique. Depuis 50 ans, le dextrane issu de la *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F est utilisé pour répondre à des besoins de substitution en plasma sanguin.¹⁹⁸ En France, ces substituts sont commercialisés sous les noms de Rhémacrodex et Macrodex dont les masses molaires moyennes en masse sont respectivement de 40 000 g/mol et 70 000 g/mol.

Depuis, d'autres applications pharmaceutiques ont été développées grâce à la présence de groupes hydroxyle réactifs pour la synthèse de dérivés du dextrane.

La présence de ces groupements fonctionnels a permis son utilisation dans le domaine des polymères polysaccharidiques conjugués aux médicaments.¹⁹⁹

III.4.1.Origine du dextrane et production

Les dextrans de compositions chimiques différentes sont synthétisés par différentes espèces bactériennes : *Streptococcus*, *Acetobacter* et *Leuconostoc*. La bactérie *Leuconostoc mesenteroides* est fréquemment utilisée pour la production commerciale des dextrans, notamment dans les secteurs pharmaceutique, cosmétique et alimentaire. Cette bactérie est le microorganisme le plus employé pour la production commerciale du dextrane. Elle possède une enzyme (dextrane-sucrase) qui convertit le saccharose en fructose et en un dextrane dit « natif ». Les masses molaires des chaînes de dextrane obtenues varient de quelques centaines à plusieurs dizaines de millions de daltons, ce qui implique une large distribution massique. La forme issue de la souche bactérienne *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F reste de loin, la plus répandue et la plus commercialisée.^{200,201}

III.4.2.Propriétés physico-chimiques

Les dextrans sont des polysaccharides bactériens majoritairement linéaires appartenant à la famille des α D-glucanes. Ils sont constitués par l'enchaînement d'unités glucopyranose liées en α -1 \rightarrow 6 à 95%. Néanmoins, ils peuvent présenter des greffons liés à la chaîne principale en α -1 \rightarrow 2, α -1 \rightarrow 3 et/ou α -1 \rightarrow 4.^{200,201} Le nombre, la longueur et la position de ces greffons sur l'unité glucopyranose dépendent des microorganismes qui produisent le dextrane (*Figure 21*).

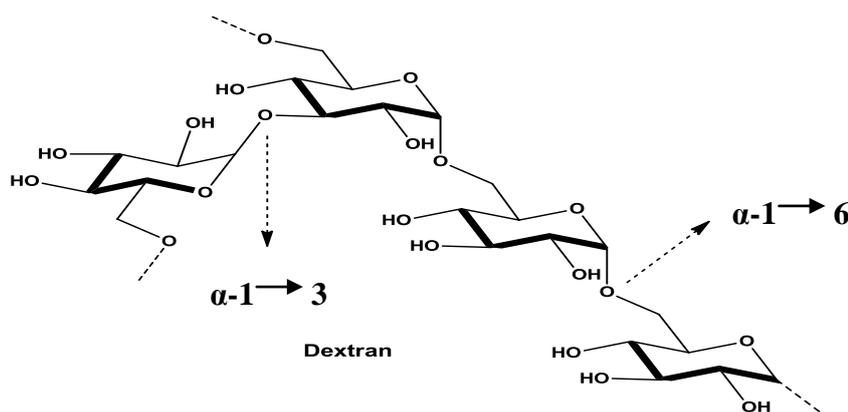


Figure 21 : Structure schématique du Dextrane.

Les dextrans commerciaux destinés aux applications pharmaceutiques sont obtenus après hydrolyse partielle des dextrans «natifs» en présence d'acide chlorhydrique. Le mélange de dextrans alors obtenus est fractionné à l'aide d'une solution eau/éthanol. Ces dextrans commerciaux sont généralement désignés par l'intermédiaire de leur masse molaire moyenne en masse (M_w) sous le nom générique TMw où la masse molaire est exprimée en kg/mol.

Les dextrans obtenus à partir de différentes sources diffèrent dans leur structure et leurs propriétés (poids moléculaire, degré de ramification, quantité relative d'un type particulier de liens glycosidiques, solubilité, activité optique et action physiologique). Le dextrane natif est un polymère de haut poids moléculaire compris entre 10^7 et 10^8 daltons. Il possède aussi un haut degré de polydispersité. La valeur de rotation optique pour des solutions aqueuses de différents dextrans varie de $+199^\circ$ à $+235^\circ$. La viscosité intrinsèque est affectée par la nature et le pH du solvant, le degré de ramification, le nombre de liaisons intermoléculaires et la température.

Le dextrane est un polysaccharide hygroscopique et hydrophile. Il est soluble dans l'eau et dans des solvants organiques polaires tels que le diméthylsulfoxyde, le formamide, l'éthylène glycol ou le glycérol et insoluble dans les alcools et l'acétone. Des études par diffusion de rayons X aux petits angles ont démontré que le dextrane adopte en solution aqueuse, à faible concentration et à $\text{pH} < 2$, une conformation de type pelote statique²⁰² et ne présente pas d'interaction intramoléculaire.²⁰³ En dehors de conditions extrêmes de pH ($\text{pH} < 2$), il est peu sensible à l'hydrolyse. Le dextrane est beaucoup plus stable dans des conditions basiques. La présence de groupements hydroxyle réactifs permet son utilisation comme vecteur de médicament.

III.4.3.Métabolisme

Les dextrans de masses molaires inférieures à 7000 g/mol sont éliminés de l'organisme par le système de filtration rénale.¹⁸²

Pour des dextrans ayant des masses molaires plus élevées, sa biodégradation se fait par scission enzymatique naturelle des liaisons saccharidiques par la dextrane-1,6-glucosidase dans la rate, le foie, les poumons, les reins, le cerveau et les tissus musculaires ainsi que par les dextranases révélées par les bactéries dans le côlon. Il a également été déterminé que le dextrane résiste à l'adsorption des protéines, ce qui a augmenté l'intérêt pour son utilisation comme biomatériau.²⁰⁴ En effet, le dextrane est biocompatible et non-toxique, non cancérigène, non immunogène, bio-éliminable de l'organisme, et devrait permettre d'augmenter la durée de vie des médicaments dans le sang.²⁰⁵

III.4.4.Utilisation du dextrane pour la vectorisation

Les dextrans appartiennent au groupe des transporteurs macromoléculaires les plus utilisés. Ils présentent l'un des candidats les plus prometteurs pour vectoriser une grande variété d'agents thérapeutiques en raison de leur coût relativement faible, leur disponibilité, les fonctions hydroxyle permettant d'augmenter la modification chimique ainsi que leurs excellentes propriétés physico-chimiques et leur compatibilité physiologique. Les caractéristiques importantes obtenues en couplant le PA au dextrane sont : 1) un ciblage des médicaments, 2) une amélioration des temps de circulation dans le sang, 3) une stabilité de l'agent thérapeutique, 4) une meilleure solubilisation du médicament, 5) une réduction des effets secondaires et 6) des propriétés de libération prolongée.¹⁹⁸

Ainsi, le couplage de l'insuline au dextrane a été l'une des premières prodrogues étudiées puis proposée pour une utilisation clinique. Depuis de nombreux principes actifs ont pu être vectorisés par le dextrane.^{206,207}

Par exemple, la tendance des enzymes à subir une dégradation autolytique et la labilité thermique peuvent être partiellement contournées en les couplant avec le dextran. La stabilité thermique des différentes enzymes telles que l'adénosine désaminase, l'alpha-amylase, une époxyde hydrolase et l'alpha-chymotrypsine a été augmentée par leur conjugaison avec les dextrans de poids moléculaire de 80000, 1000000, 70000 et 10000 daltons respectivement.¹⁹⁸ Éventuellement, d'autres agents bioactifs peptidiques peuvent être stabilisés de la même

façon. Plusieurs médicaments contenant des acides carboxyliques sont insolubles dans l'eau sous forme d'acides libres. Les prodrogues du dextrane de ces médicaments peuvent constituer une approche alternative pour fournir une biodisponibilité reproductible de médicaments insolubles dans l'eau, en libérant le principe actif à l'état soluble dans le tractus gastro-intestinal. En effet, la solubilité du naproxène dans l'eau est augmentée par un facteur 500 quand il est conjugué au dextrane.¹⁹⁸

La biodisponibilité du naproxène après administration orale de solutions aqueuses d'un dextrane T70-ester naproxène a été comparée à celle d'une solution orale d'une dose équivalente de naproxène chez le porc. La biodisponibilité est proche de 100% par rapport à la dose orale de la molécule mère.¹⁹¹

La plupart des systèmes de délivrance à base de dextrane protège le médicament des environnements hostiles.²⁰⁸ En raison de sa dégradabilité dans le côlon, le dextrane est un candidat idéal pour les systèmes d'administration de médicaments par voie orale. Toutefois, le dextrane lui-même ne peut pas être utilisé comme vecteur de médicament en raison de sa solubilité dans l'eau et donc la nécessité première est de le rendre plus hydrophobe.²⁰⁹

III.4.4.1. Modifications chimiques du dextrane

Le dextrane possède trois fonctions hydroxyle qui peuvent être modifiées chimiquement par divers groupements hydrophobes ou hydrophiles selon les propriétés souhaitées. Les premiers dérivés hydrophobes du dextrane ont été préparés par estérification partielle des groupements hydroxyle avec l'acide benzoïque et ont été utilisés pour des extractions par partage de phases impliquant des systèmes diphasiques aqueux.²¹⁰ D'autres groupements hydrophobes neutres ont pu être greffés sur le dextrane. Ces groupements hydrophobes sont des chaînes alkyle²¹¹, des groupements phénoxy, laurylester²¹², des groupements carbonate cyclique ou alkyle²¹³ ou encore des dérivés de l'acide biliaire²¹⁴ ou du cholestérol²¹⁵.

Plus récemment, Heinze et collaborateurs ont décrit la synthèse d'esters de dextrans substitués par des esters de propyle et de pyroglutamate après 2 estérifications successives. Les méthodes décrites permettent l'obtention des esters avec des degrés de substitution élevés variant entre 0,2 et 3,0 en fonction de la masse molaire des dextrans. Cette étude a permis d'obtenir des nanoparticules polymères de dextrane²¹⁶.

III.4.4.2. Couplage covalent d'un agent thérapeutique et évaluation biologique des conjugués

Le PA peut être couplée au dextrane pour former un vecteur de médicaments (prodrogue) par différentes techniques telles que : 1) la création d'une liaison directe. Dans ce cas, la libération du médicament se fait exclusivement par hydrolyse dépendant du pH, étant donné que le dextrane est volumineux et donc inaccessible vis-à-vis d'une attaque enzymatique ; 2) par introduction d'un espaceur intercalé entre le dextrane et le PA. Dans ce cas, l'encombrement stérique du dextrane peut être contourné en augmentant la distance entre le médicament et le support.

Le principe actif doit être ensuite libéré à partir de la prodrogue dextrane par coupure de la liaison covalente liant le médicament au transporteur. La coupure de la liaison peut être soit sensible au pH, soit enzymatique. Par ailleurs, si le médicament contient une liaison chimique hydrolysable, il risque de se détériorer tout en restant attaché au squelette du polymère. De plus, la dissociation enzymatique partielle des principales chaînes de la prodrogue va changer la distribution du poids moléculaire de la prodrogue administrée, la rendant ainsi vulnérable à l'attaque des différentes hydrolases.

Les polymères tels que le dextrane qui diffusent dans les compartiments endosomals ou lysosomals seront exposés à un milieu acide (pH 4,5 à 5,5). En utilisant un espaceur entre le médicament et le vecteur, clivable en milieu acide comme l'espaceur hydrazone et le N-cis-aconityl, la libération contrôlée du médicament par le pH intracellulaire peut être obtenue²¹⁷. C'est le cas par exemple de la délivrance intracellulaire de la streptomycine liée au dextran par liaison hydrazone²¹⁸.

Plusieurs antitumoraux ont été conjugués au dextrane. Dang et collaborateurs¹⁷⁷ ont proposé d'étudier la synthèse des conjugués dextrane-méthotrexate en introduisant un bras espaceur entre le PA et le polysaccharide. L'introduction de ce bras espaceur (chaîne carbonée) a été réalisée via une fonction imine. Le méthotrexate a été couplé via une fonction ester ou une fonction amide (*Schéma 15*).

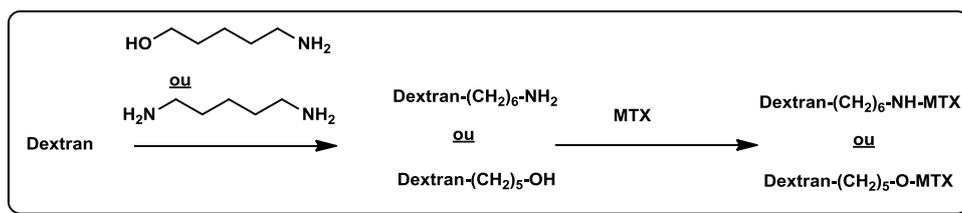


Schéma 15 : Synthèse des conjugués Dextrane- méthotrexate.

L'activité antitumorale des différents conjugués a été évaluée sur des cellules tumorales du cerveau humain H80, mais également sur des cellules 9L de gliosarcome dans le cerveau de souris. Les résultats obtenus montrent que la présence du polysaccharide permet de contrôler la libération du PA et donc d'améliorer sa rétention au sein de la tumeur. Les conjugués permettent d'utiliser une dose plus faible pour une même activité.

Le cisplatine a été également conjugué au dextrane-dicarboxyméthyle (*Schéma 16*). Cette synthèse se fait par immobilisation de cisplatine sur le dextrane par liaison de coordination de type chélate, qui montre nettement une plus longue demi-vie et une meilleure activité inhibitrice de la croissance tumorale de cellules de cancer du côlon que le cisplatine libre⁶⁵.

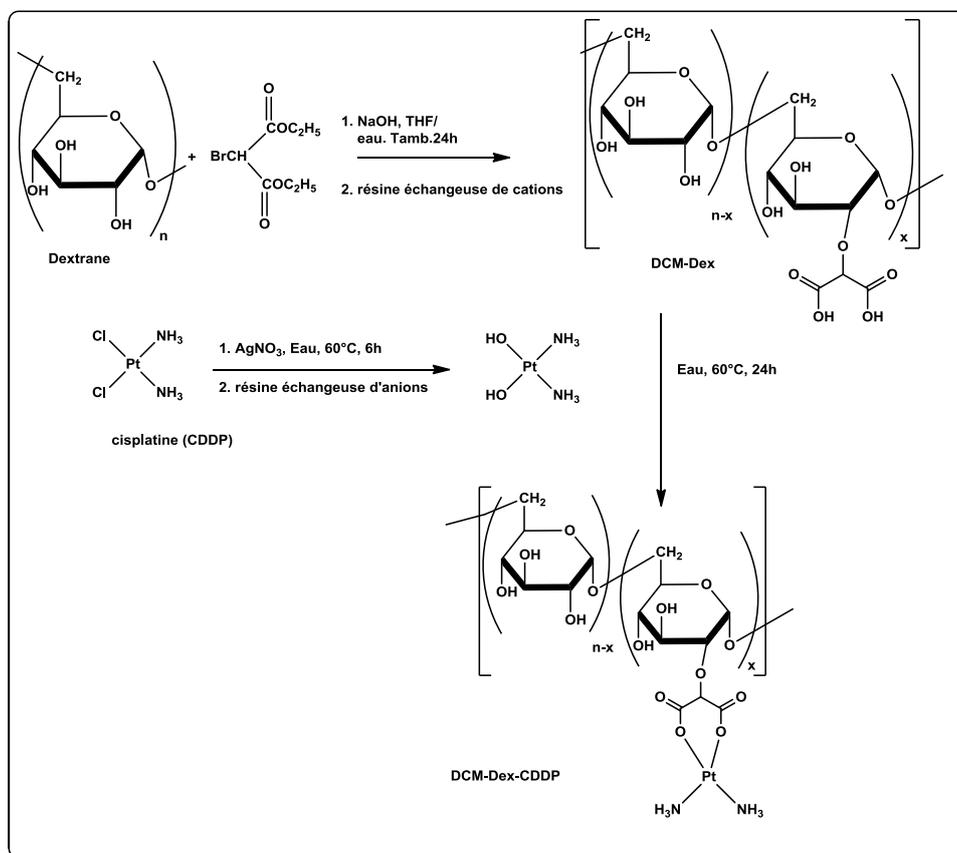


Schéma 16 : Synthèse du dextrane-dicarboxyméthyl-Cisplatine

Les études pharmacocinétiques et thérapeutiques du conjugué dextrane-mitomycine (cationique et anionique) dont les structures sont présentées ci-dessous (*Figure 22*), montrent une meilleure activité et une action prolongée que celles de la mitomycine vis-à-vis du carcinome transplantable de rat (carcinome walker 256)²¹⁹.

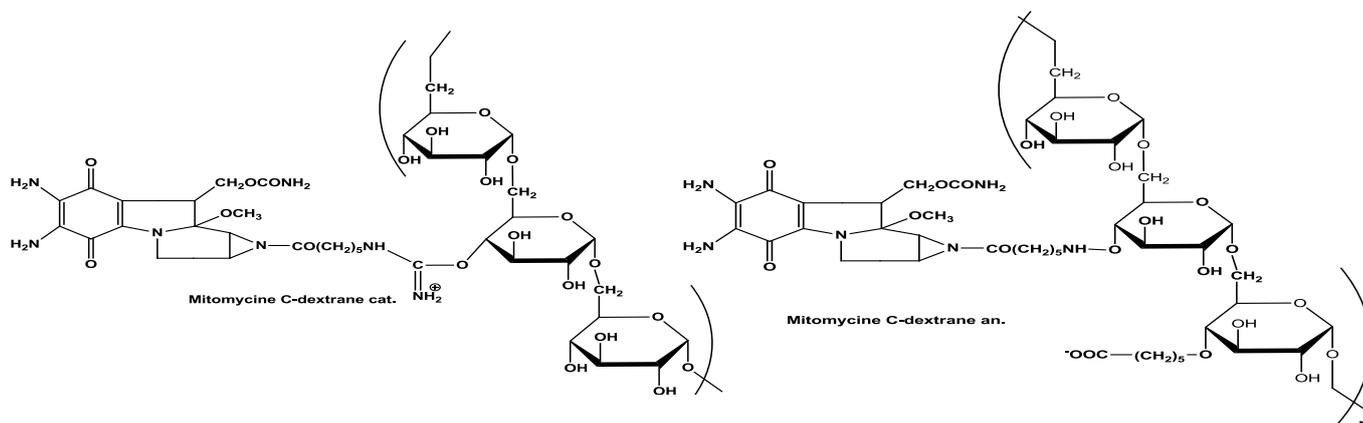


Figure 22 : Structure chimique du conjugué mitomycine-Dextrane.

Les camptothécines (CPT) cliniquement disponibles comme l'irinotécan (CPT-11) représentent l'une des catégories les plus prometteuses d'agents antitumoraux. Afin d'améliorer leur profil pharmacologique, une nouvelle prodrogue macromoléculaire nommée T-0128 a été synthétisée. Elle est composée d'une CPT analogique T-2513 conjuguée au carboxyméthyl-dextrane via un espaceur triglycine. Ce conjugué présente une meilleure spécificité et une activité dix fois meilleure que le T-2513¹⁹⁸.

Les dextrans sont donc parmi les candidats les plus prometteurs pour la vectorisation à ciblage passif des médicaments tels que les antitumoraux¹⁹⁸. Mais, ils ont été également conjugués aux PAs hydrophobes à faible poids moléculaire anti-inflammatoires comme l'indométacine et utilisés comme vecteurs du PA à libération contrôlée²⁰⁴.

Plusieurs études montrent également que le dextrane est un bon vecteur d'hormones telles que l'ocytocine et la vasopressine, des enzymes (α -amylase, arginase, asparaginase, carboxypeptidase, β -galactosidase, hyaluronidase ou α -chymotrypsine), des antibiotiques (la bléomycine et la gentamicine par exemple).

III.5.Synthèse et caractérisation de nouveaux polymères saccharidiques de type carboxyméthyl-dextrane- bisphosphonate CMD-BP

Le dextrane est utilisé comme vecteur d'antitumoraux dans le but d'augmenter leur durée de circulation dans le sang ainsi que d'améliorer leur accumulation dans les tissus tumoraux. La vectorisation d'un bisphosphonate greffé sur le dextrane devrait ainsi permettre de prolonger le temps de circulation de ce principe actif dans le sang, tout en diminuant les doses administrées et donc les effets secondaires engendrés. La présence du polysaccharide devrait permettre de changer la biodistribution et permettre le ciblage du tissu vascularisé.

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la synthèse de conjugués dextrane-bisphosphonate.

III.5.1.Stratégie de synthèse

Lors de ce travail, nous avons choisi de coupler deux bisphosphonates utilisés en clinique : l'alendronate et le nérédronate. Ces bisphosphonates de seconde génération présentent deux avantages. Leur activité biologique sur le tissu osseux est intermédiaire et ils possèdent une fonction amine sur leur chaîne latérale permettant la conjugaison avec le polysaccharide. Cependant, il est nécessaire de modifier le dextrane pour introduire une fonction nécessaire à la conjugaison.

Nous avons élaboré une stratégie de couplage des bisphosphonates avec un dérivé du dextrane, le carboxyméthyl-dextrane (CMD). L'introduction de fonctions acide carboxylique sur le biopolymère permet d'envisager un couplage peptidique ultérieur avec l'aminobisphosphonate.

III.5.2.Synthèse du CMD

III.5.2.1.Synthèse du CarboxyMéthylDextrane (CMD)

La synthèse du carboxyméthyl-dextrane a été réalisée selon la procédure décrite par Chaubet et collaborateurs²²⁰ (*Schéma 17*).

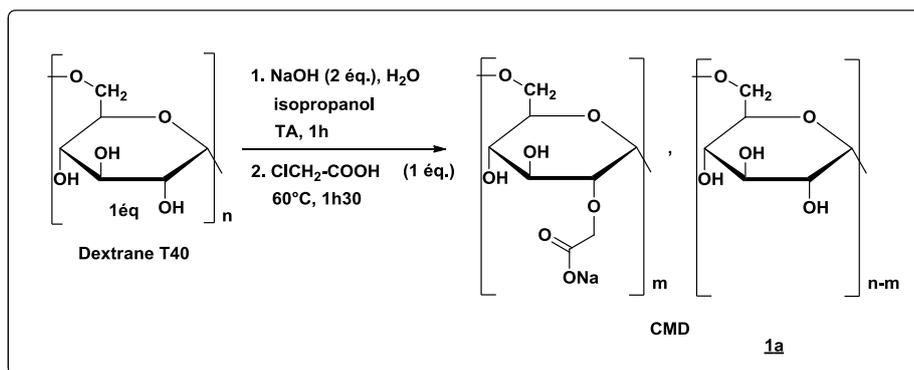


Schéma 17 : Synthèse du CMD

Cette réaction est une réaction de substitution nucléophile entre la fonction hydroxyle en position 2 des motifs glucose et l'acide chloroacétique. Afin de rendre la fonction alcool plus réactive vis-à-vis de la réaction de substitution nucléophile, la déprotonation est nécessaire. Elle est réalisée par de la soude dans l'isopropanol à chaud. Après une heure à température ambiante, un équivalent d'acide monochloroacétique (MCA) dans de l'isopropanol a été ajouté et le mélange réactionnel a été chauffé à 60°C pendant 1h30. Les alcools activés réagissent alors avec l'acide monochloroacétique pour former des fonctions carboxyméthyle par substitution nucléophile. La réaction est régiosélective en position 2 des motifs glucosidiques et les conditions opératoires utilisées doivent permettre d'obtenir un degré de substitution du CMD de l'ordre de 1.

La purification a été longue et a nécessité sept précipitations au méthanol à froid. Un précipité blanc est alors obtenu contenant 50% de CMD et 50 % de chlorure de sodium après un test au nitrate d'argent.

La purification du CMD a été réalisée par ultrafiltration. Cette méthode consiste à séparer les petites molécules du polymère à l'aide de membranes (seuil de coupure 5000 Da) et d'un écoulement tangentiel. L'élimination du chlorure de sodium est ici suivie par le test "au miroir d'argent". Ainsi, sur un gramme de CMD brut, nous avons obtenu 617 mg de CMD pur (après vérification en RMN ^1H et test "au miroir d'argent"). Cette dialyse a duré une journée et demi, ce qui permet un gain de temps considérable. Nous avons ainsi purifié 10 grammes de CMD.

III.5.2.2. Caractérisation du CMD par RMN ^1H

Le composé pur obtenu sous la forme d'une poudre blanche est caractérisé par RMN ^1H . Le proton anomérique (H du C1) apparaît vers 5,1 ppm. Le signal caractéristique des protons du

CH₂ de la fonction CM greffée en position 2 apparaît vers 5,3 ppm. Si la fonction CM était greffée sur les OH en positions 3 et 4, le proton anomérique apparaîtrait alors à 5,3 ppm et le CH₂ de la fonction CM apparaîtrait alors vers 4,8 ppm. Aucun signal n'est présent à ce dernier déplacement chimique, l'intégration de ces différents signaux permet alors de montrer la prépondérance de la fonctionnalisation en position 2

III.5.2.3. Calcul du degré de substitution du polymère

Pour déterminer le degré de substitution du CMD, il a été nécessaire de le doser par une solution de soude titrée au préalable par une solution de phtalate de potassium de concentration connue. Nous avons effectué ces dosages au laboratoire INSERM U698 dans l'équipe dirigée par D. Letourneur à l'hôpital Bichat.

Une solution de soude est tout d'abord préparée pour être dosée, à partir d'une ampoule de soude Titrisol prédosée permettant d'obtenir un litre de solution à 0,1 mol/L. Pour réaliser ce dosage, nous avons utilisé des solutions de phtalate de potassium de concentrations connues (*Schéma 18*). Nous avons effectué dix dosages avec 60 mg de phtalate de potassium ($M_w = 204,22$ g/mol) dans 50 mL d'eau distillée. Le phtalate de potassium a été séché au préalable pendant deux heures à l'étuve à vide à 60°C, afin de connaître sa concentration précise. Le dosage a été effectué par pH-métrie à l'aide d'un Titrimètre automatique (DL 53 Mettler Toledo) qui a été programmé à l'aide du logiciel Lab X.

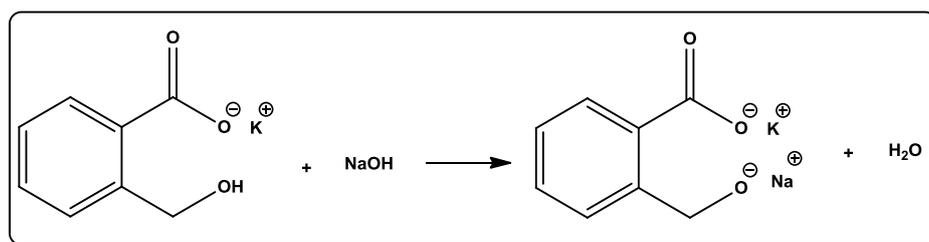


Schéma 18: Equation du dosage des solutions de phtalate de potassium par de la soude 0,1 N

La concentration moyenne de la solution de soude est égale à 0,1012 mol/L avec un écart type inférieur à 10^{-4} mol/L.

Le dosage du CMD est ensuite effectué deux fois pour calculer une valeur moyenne de son degré de substitution (*Schéma 19*). Deux masses de CMD ont été pesées et séchées au dessiccateur, pour connaître très précisément les masses dosées. Ces quantités ont été par la

suite dissoutes dans un mélange eau/acétone servant à séparer les deux sauts de pH : le premier correspondant au CMD et le second à l'acide nitrique (10% ajouté au départ pour ajuster le pH à 2,7). Le dosage a à nouveau été effectué par pH-métrie à l'aide d'un Titrimètre automatique (DL 53 Mettler Toledo) qui a été programmé à l'aide du logiciel Lab X.

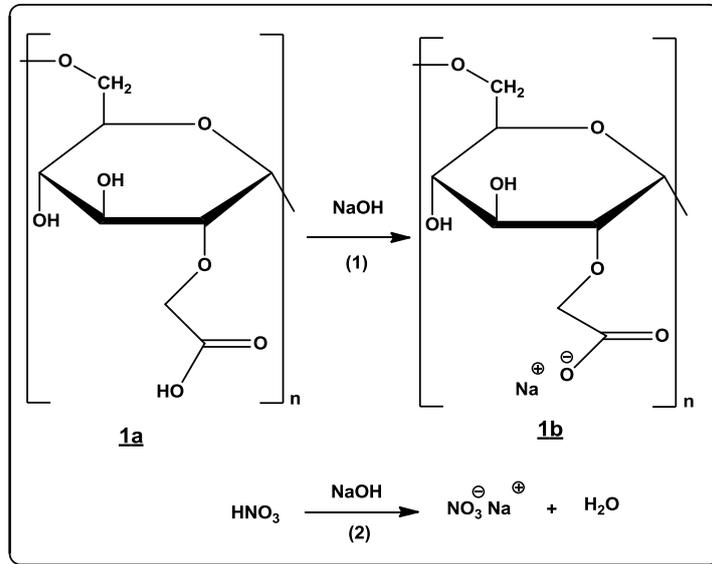


Schéma 19: Equation du dosage des solutions de CMD par la soude

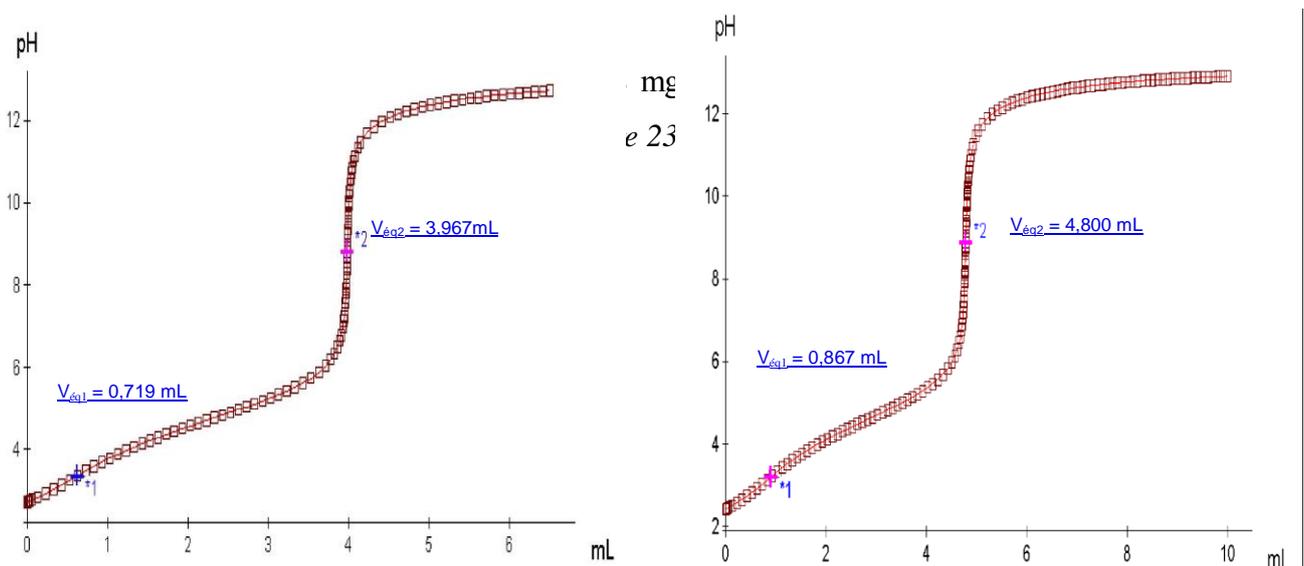


Figure 23 : Courbes de dosage du CMD par la soude.

Nous avons déterminé les volumes à l'équivalence en traçant le pH en fonction du volume de soude ajouté. Ces courbes présentent deux points distincts : celui correspondant à l'équivalence de l'acide fort (acide nitrique) et celui correspondant à celle de l'acide faible (acide carboxylique du CMD). Ainsi, la différence de volume entre $V_{\text{éq1}}$ et $V_{\text{éq2}}$ peut être calculée. Ce volume est alors rapporté à la concentration de la soude utilisée pour le dosage et à la masse du produit dosé. La valeur du taux de carboxyméthyl du CMD (noté CM, voir équation ci-dessous), est alors obtenue en milliéquivalents par gramme de CMD.

$$\text{CM} = \frac{\Delta V_{\text{NaOH}} \times C_{\text{NaOH}}}{m_{\text{CMD}}}$$

$$\text{CM}_1 = 3,743 \text{ mmol/g}$$

$$\text{CM}_2 = 3,989 \text{ mmol/g.}$$

Le dextrane est composé d'unités glucosidiques de masse molaire 162,16 Da. Le polymère utilisé est le dextrane T40 (soit 40 000 Da, soit environ 246 unités glucosidiques). Ce polymère peut être considéré sous la forme d'unités H-R-OH (*Schéma 20*).

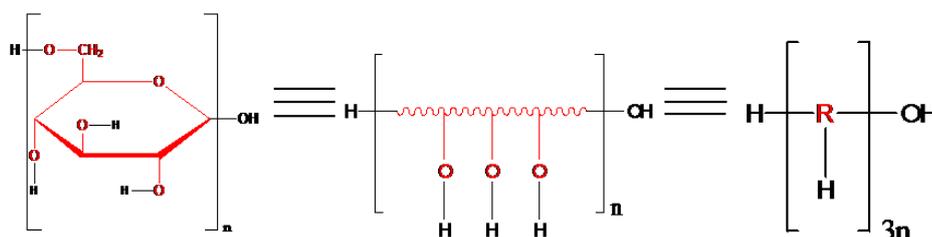


Schéma 20 : Dextrane T40 sous la forme d'unités H-R-OH

Si certains protons attachés à R sont remplacés par des fonctions carboxyméthyl, un copolymère de type R-O-H et R-O-CM est alors obtenu.

III.5.2.4. Degré de substitution du polymère

Dans un premier temps, nous devons calculer la masse du radical élémentaire R.

Il s'agit de la masse de l'unité glucosidique (162,16 Da) à laquelle on soustrait la masse des trois protons (3,03 Da) des trois fonctions hydroxyle, le tout étant divisé par 3. La masse R est donc de 53,04 Da.

Le dextrane T40 est substitué par des groupements carboxyméthyl CM. Ainsi, le dextrane T40 peut être assimilé à une chaîne dont les maillons pourront être R-H (54,05 Da) et R-CH₂-COONa (134,07 Da). Nous arrivons alors à l'équation suivante, pour un gramme de dextrane T40 :

$$(d \times M_{R-O-H}) + (CM \times M_{R-O-CM}) = 1$$

Sachant que d correspond au nombre d'unités OH libres et CM au nombre d'unités de carboxyméthyl.

En utilisant d et CM en millimoles, l'équation devient :

$$(d \times 5,4 \times 10^{-2}) + (CM \times 1,34 \times 10^{-1}) = 1$$

Or, la valeur de CM est donnée par le dosage titrimétrique des fonctions carboxyméthyl. On peut alors déterminer d . Pour l'échantillon 1 de CMD, d est égale à 9 quant à l'échantillon 2, il a une valeur de 8,6.

III.5.2.5. Détermination du degré de substitution

Il s'agit du nombre de protons qui sont remplacés par une autre fonction par unité glucosidique. Si aucun proton n'est substitué, alors $D.S. = 0$.

$$DS = \frac{3 \times CM}{CM + d}$$

Pour l'échantillon 1 de CMD, le $D.S.$ est égal à 0,87. Quant à l'échantillon 2, il a une valeur de 0,95, avec un écart type de 0,06. Le degré de substitution moyen du CMD est donc de 0,91.

III.5.3. Synthèse des aminoalkylbisphosphonates

La synthèse de l'alendronate et du neridronate a été réalisée selon la méthode décrite par l'équipe de R. Kieczkowski. Ce procédé a permis la synthèse de l'alendronate en utilisant la méthode industrielle avec de bons rendements.¹¹¹

L'efficacité de ce procédé repose sur l'utilisation de l'acide méthanesulfonique comme solvant qui permet la solubilisation et l'agitation du milieu qui est visqueux. Le

bisphosphonate obtenu précipite dans le milieu après hydrolyse permettant une purification aisée. Cette étape est essentielle pour obtenir des produits purs avec de bons rendements.

Nous avons utilisé ce procédé pour la synthèse de l'alendronate mais aussi le nérédronate (*Schéma 21*).

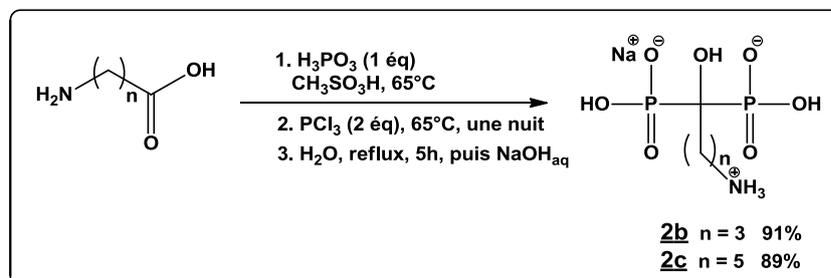


Schéma 21 : Synthèse de l'alendronate et du nérédronate en une étape

Le procédé commence par le chauffage de l'acide aminocarboxylique en présence d'acide phosphoreux, de trichlorure de phosphore et d'acide méthanesulfonique à 65°C pendant une nuit. Après hydrolyse et chauffage à reflux pendant cinq heures, l'acide 1-hydroxyméthylène-1,1-bisphosphonique adéquat est obtenu sous forme cristalline après refroidissement, ajustement du pH à 4,3 et filtration sous vide. Les produits ont été obtenus purs après plusieurs lavages avec du méthanol froid, séchés au dessiccateur à 80°C pendant 48 heures et caractérisés par RMN ^1H , ^{13}C et ^{31}P . L'alendronate et le nérédronate sont obtenus avec des rendements respectifs de 91 et 89%.

Les courbes de titrages acido-basiques montrent que les deux aminobisphosphonates (alendronate et nérédronate) cristallisent avec quatre molécules d'eau.

III.5.4.Synthèse des conjugués CMD-BP

Dans la littérature, les réactions de couplage peptidique (formant une liaison amide) utilisent le 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide (EDC) et l'acide 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoéthyl)-carbodiimide (CMC) à différents pH²²¹.

L'utilisation de ces carbodiimides hydrosolubles permet d'activer la fonction acide carboxylique du polymère avant de la faire réagir avec une fonction amine. Cependant, l'ester activé avec de tels réactifs n'est pas stable. Ainsi, l'utilisation du N-hydroxysuccinimide (NHS), permet d'obtenir un ester actif stable à pH acide. Cet ester actif (*Schéma 22*) porte alors un meilleur groupe partant lors de la formation de la liaison amide.

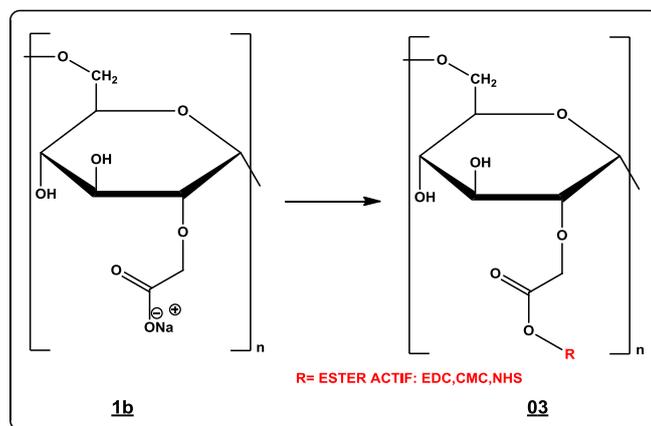


Schéma 22 : Activation du CMD

Le couplage du CMD à un aminobisphosphonate avait déjà été étudié dans notre laboratoire. L'objectif de notre étude est de confirmer dans un premier temps la reproductibilité de ce couplage mais également d'améliorer et de contrôler le degré de substitution du CMD (greffage de 20 à 30 molécules) permettant d'obtenir les meilleurs résultats biologiques *in vitro* et *in vivo*.

Des premiers essais de couplage ont été réalisés et diverses conditions opératoires avaient été étudiées. Deux réactions d'activation de la fonction acide carboxylique ont été testées (utilisation du CMC et de l'EDC), en solution aqueuse ou organique. Diverses conditions ont été modifiées à savoir la température, le temps de réaction, le nombre d'équivalents en réactifs. Les réactions ont été réalisées plusieurs fois afin de vérifier la reproductibilité du couplage de l'alendronate et du nérédronate au CMD.

Le *Tableau 2* récapitule les observations faites au cours des deux séries de manipulations.

Tableau 2 : Evaluation de l'avancement de la réaction de couplage d'un BP au CMD par RMN

Température	Agent de couplage	Intégrale du pic du BP couplé	Intégrale du pic du BP libre
20°C	EDC	20%	80%
	CMC	10%	90%
40°C	EDC	47%	53%
	CMC	17%	83%
60°C	EDC	65%	35%
	CMC	23%	77%

Les résultats obtenus montrent que quelque soit l'agent de couplage utilisé, la réaction de couplage peptidique est possible. Nous avons en effet pu obtenir le polymère conjugué au bisphosphonate. Cependant, l'activation réalisée avec le mélange EDC/NHS est plus efficace que celle réalisée avec le mélange CMC/NHS. Il semble donc que l'encombrement stérique soit le facteur prédominant. En effet, la taille du groupement CMC empêche l'activation du groupement carboxylate le plus proche, ce qui diminue la probabilité de couplage. Il est également possible que le site électrophile de l'acide carboxylique activé soit peu accessible en raison de la présence des deux cycles gênant l'attaque nucléophile du groupement amine du bisphosphonate.

III.5.4.1. Influence de la température

Le tableau 2 montre que la température influence le rendement de la réaction. En effet, l'augmentation de la température permet d'atteindre plus rapidement l'énergie d'activation nécessaire à la réaction de substitution, ce qui permet d'en accroître l'efficacité et par conséquent augmenter le nombre de molécules BP greffées.

On constate également qu'à haute température, les résultats obtenus en RMN ^1H montrent que nous n'avons pas observé de réaction de dégradation du polymère.

III.5.4.2. Influence du pH

Au cours de la phase d'activation, la formation de l'ester activé est assez délicate car elle

nécessite un contrôle précis du pH. En effet, l'introduction de l'agent de couplage CMC ou EDC doit se faire progressivement car elle fait fortement augmenter le pH. De plus, le premier produit couplé CMD-CMC ou CMD-EDC formé est peu stable. Ainsi après avoir ramené le pH à 4,5, l'ajout du NHS doit se faire peu à peu car il fait varier également le pH.

Au cours de l'étape de couplage, la formation de la fonction amide nécessite que le pH soit fixé à 11,5 car il faut que la fonction amine de l'acide aminobisphosphonique soit sous la forme NH_2 .

Les conditions de réaction suivantes :

- activation de l'acide carboxylique du CMD à pH=4,5 avec deux équivalents d'EDC, et deux équivalents de NHS ;
- couplage du BP à pH=11,5 ;
- température= 40°C ;
- temps de réaction=4h.

Avaient permis de coupler 10 à 20 molécules de BP sur le dextrane mais les résultats ne sont pas toujours reproductibles. Les premiers tests biologiques de ces produits sur la lignée A 431 (lignée de cellules de carcinomes épidermoïdes vulvaires) avaient démontré que l' IC_{50} du nérédronate couplé était de l'ordre de 10 μM (en BP) à 72 heures.

A partir de ces travaux précédemment réalisés et des essais effectués au cours de ce travail pour améliorer le degré de substitution D.S., il s'est avéré que les conditions de couplage suivantes permettent l'obtention reproductible de composés présentant les meilleurs résultats biologiques *in vitro* :

- ✓ Activation du CMD à pH = 4,5 (2 équivalents d'EDC, puis 2 équivalents de NHS) ;
- ✓ Couplage du bisphosphonate à pH = 11,5 (2 équivalents de BP) ;
- ✓ Température = 60 °C (au lieu de 40°C) ;
- ✓ Temps de réaction = 1 à 4 heures (selon le BP utilisé)

Nous avons donc adopté les conditions suivantes pour former les conjugués CMD-BP :

L'activation de la fonction carboxyméthyl du polymère a été réalisée par la méthode au carbodiimide soluble à pH=4,5. L'ester d'EDC instable est ensuite transformé en ester de NHS, par addition de deux équivalents de NHS (*Schéma 23*). L'ester ainsi obtenu est alors

beaucoup plus stable dans les conditions de pH utilisées. L'addition du bisphosphonate conduit à la formation d'une liaison amide entre la fonction ester actif portée par le dextrane et la fonction amine portée par le bisphosphonate ($n' = 3$ pour l'alendronate et $n' = 5$ pour le néridronate).

La principale difficulté et l'originalité de cette réaction reposent sur le fait qu'aucune des fonctions hydroxyle du dextrane et du bisphosphonate ne seront protégées. En effet, le principe du mécanisme réactionnel repose sur la différence de nucléophilie entre les groupements alcool et amine. Ces derniers sont plus réactifs et la réaction majoritaire se fera donc préférentiellement entre l'amine primaire du bisphosphonate et le groupement acide carboxylique du polymère

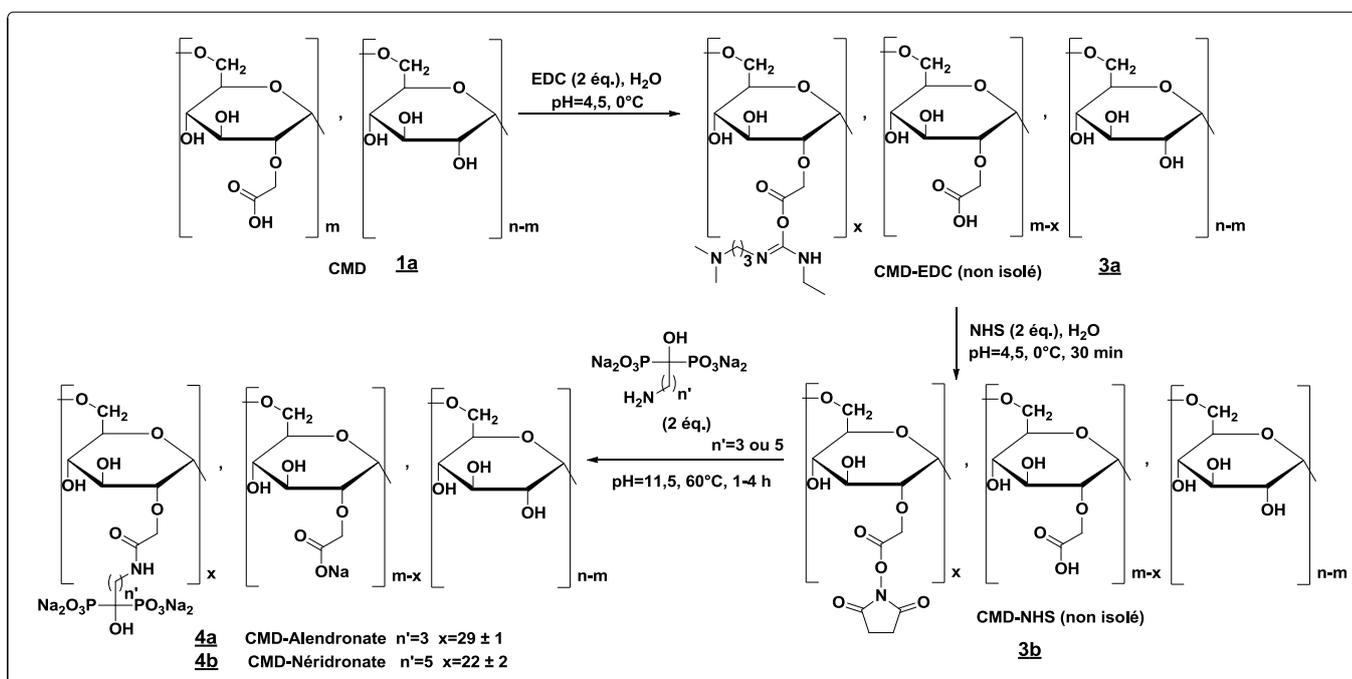


Schéma 23: Synthèse des conjugués CMD-BP

Lors de l'utilisation de cette méthode de couplage pour l'obtention du CMD couplé au néridronate, nous avons dû améliorer la technique de purification de ce composé car dans les études précédentes il restait des traces de NHS et d'urée. Les premiers conjugués CMD-BP ont été purifiés par ultrafiltration mais l'élimination du NHS et de l'urée n'a pas été totale.

La purification suivante a été réalisée. Après concentration du milieu réactionnel, le produit brut a été précipité plusieurs fois dans le méthanol. Après une dialyse de 72 heures, l'analyse

RMN ^1H montre encore la présence de NHS et d'urée.

Le précipité blanc est alors solubilisé dans un minimum d'eau bidistillée. La solution a été basifiée jusqu'à pH= 11,5 puis a été mise en présence d'une résine échangeuse d'ions (DOWEX 50X2-100, résine Na^+) sous agitation pendant 24 heures. Une deuxième dialyse de 3 jours est alors effectuée avec une membrane ayant un seuil de coupure de 8000 Daltons. Le spectre de RMN ^1H indique qu'il reste des traces de NHS (l'intensité du pic à 2,75 ppm est identique à l'intensité du pic des CH_2 du néridronate (1,78-1,91 ppm). Une seconde étape de purification a permis d'éliminer totalement le NHS présent.

Afin de diminuer les temps de purification du CMD couplé au bisphosphonate, nous avons optimisé sa méthode de purification.

Après ajout d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1N jusqu'à pH = 6 pour arrêter la réaction, le milieu réactionnel a été concentré sous pression réduite. Le résidu obtenu a alors été précipité à 0°C dans du méthanol. Le précipité blanc filtré a été à nouveau précipité dans de l'éthanol à 0°C. Le produit obtenu a été dialysé (14 changements d'eau toutes les 2 heures). Après lyophilisation, le CMD-alendronate et le CMD-néridronate ont été obtenus purs sous la forme d'un solide blanc.

III.5.4.3. Caractérisation des conjugués CMD-BP

➤ par RMN

Les nouveaux biopolymères synthétisés ont été caractérisés en RMN ^{31}P avec un déplacement chimique autour de 19 ppm. L'analyse en RMN ^1H confirme l'élimination de l'EDU (1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylurée) produit au cours de la réaction ainsi que le NHS (quels sont les 1H caractéristiques de l'EDU et du NHS). Le produit de couplage entre le CMD et le BP montre un signal vers 3,0 ppm correspondant au $\text{CH}_2\text{-NH}$ du CMD-BP tandis que le même CH_2 au niveau du bisphosphonate libre donne un signal autour de 2,8 ppm. Le degré de substitution en molécules de BP des dérivés CMD-BP a été calculé par RMN ^1H par comparaison des pics d'intégration du $\text{CH}_2\text{-NH}$ du BP couplé et du CH_2 des fonctions CM (vers 5,3 ppm). Ainsi, 29 ± 1 molécules d'alendronate (*Figure 24*) et 22 ± 2 molécules de

néridronate (*Figure 25*) ont été couplées sur les 224 unités glucosidiques carboxyméthylées du dextrane (91% des 246 unités glucosidiques du dextrane).

Le *Tableau 3* regroupe les résultats obtenus pour les différents produits de couplage synthétisés.

Tableau 3 : Résultats permettant le calcul du nombre de molécules de BP greffées

Molécule greffée au CMD	Nombre d'échantillons (nombre de molécules greffées)	Moyenne	Ecart type
Alendronate	5 (30 ; 30 ; 28 ; 27 ; 29)	29	1,30
Néridronate	5 (22 ; 25 ; 19 ; 23 ; 22)	22	2,16

➤ par distribution massique

La distribution de masse moléculaire du dextrane utilisé, du CMD préparé et des deux conjugués CMD-BP synthétisés a été réalisée. Le poids moléculaire moyen en nombre \overline{M}_n , le poids moléculaire moyen en poids \overline{M}_w , et l'index de polydispersité $\frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n}$ de ces molécules ont été mesurés. Les résultats obtenus figurent dans le *Tableau 4* et montrent une augmentation de \overline{M}_n et \overline{M}_w après carboxyméthylation et couplage avec les aminobisphosphonates. La polymolécularité de tous les polymères est constante autour de 1,2.

Tableau 4: Poids moléculaire moyen en nombre \overline{M}_n , poids moléculaire moyen en poids \overline{M}_w et index de polydispersité $\frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n}$ du dextrane, du CMD et des conjugués CMD-BP

	Dextrane ^a	CMD ^a	CMD-alendronate ^a	CMD-néridronate ^a
\overline{M}_n	35000	43000	49000	44000
\overline{M}_w	41000	48000	58000	51000
$\frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n}$	1,17	1,11	1,18	1,16

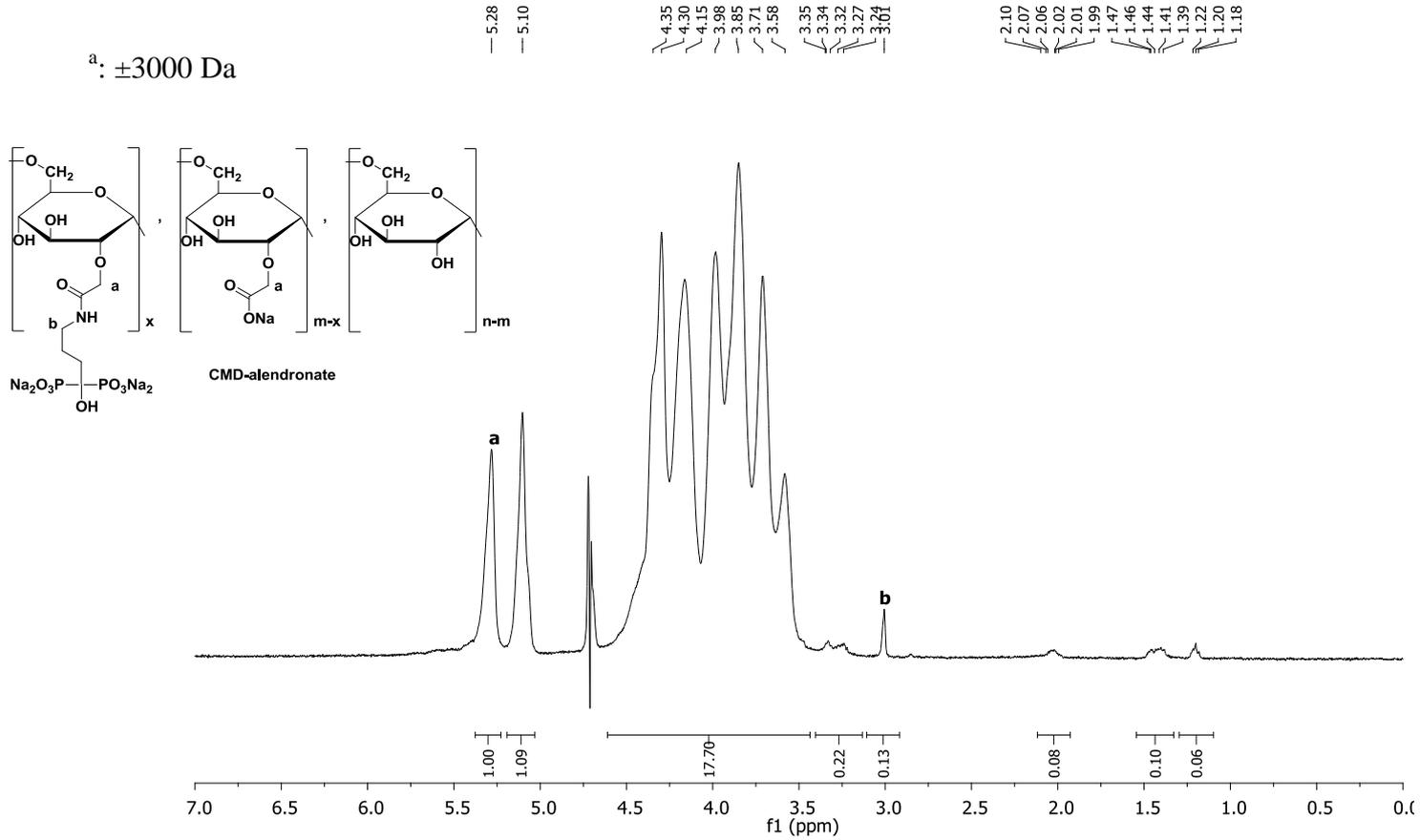


Figure 24 : Spectre RMN ^1H du CMD-alendronate

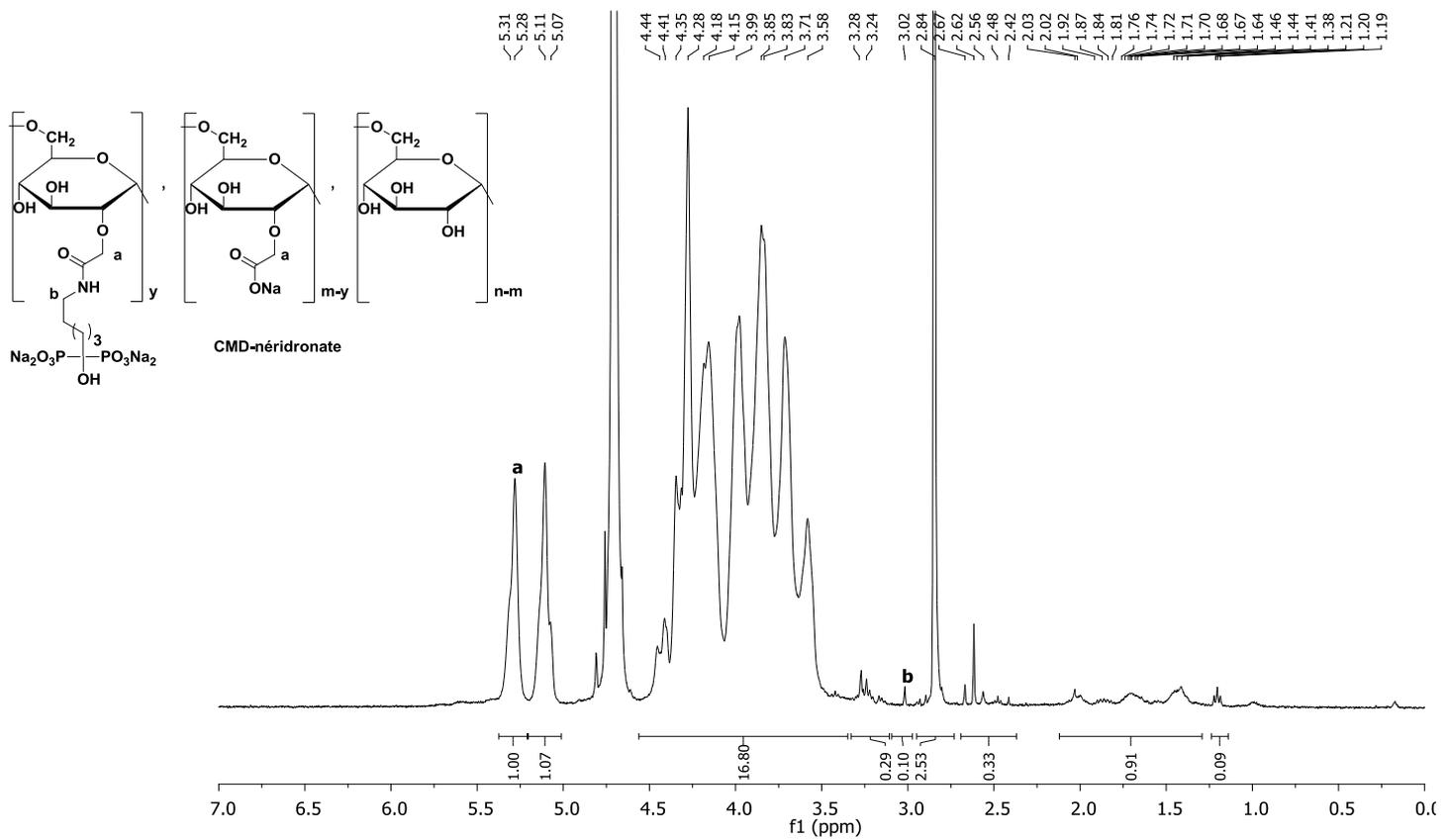


Figure 25 : Spectre RMN ^1H du CMD-néridronate

III.6. Evaluation biologique *in vitro* des nouveaux polymères saccharidiques CMD-BP

Afin d'évaluer l'efficacité du couplage CMD-BP et de déterminer la lignée la plus adéquate pour les tests *in vivo*, des tests de cytotoxicité ont été réalisés sur trois lignées cellulaires cancéreuses humaines : le cancer du sein (MDA-MB-231), le cancer épidermoïde (A431) et le cancer de la peau (B16F10). Chacune de ces lignées de cellules adhérentes a été traitée, soit avec du BP seul ou avec du CMD-BP. Les concentrations en CMD-BP ont été exprimées par rapport à la quantité de bisphosphonate greffée sur le polysaccharide. La toxicité, exprimée en termes de pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire, a été évaluée à l'aide du test MTT (voir *Experimental part*). Les BPs sont ici notés respectivement BPA2 et BPA3 pour l'alendronate et le nérédronate.

III.6.1. Etude de l'effet des aminoBPs et des conjugués CMD-BP sur la prolifération cellulaire

La *Figure 26* présente le pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire en fonction de la concentration de BPA2 ou BPA3 pour les trois lignées cellulaires choisies ("courbe dose-réponse"). Les BPs seuls ne permettent pas l'obtention de 100% d'inhibition pour chacune des lignées. Concernant l'alendronate (BPA2), les EC_{50} sont égales à 36,5 μ M, 32,9 μ M et 38,8 μ M respectivement pour les lignées A431 (cancer épidermoïde), MDA-MB-231 (cancer du sein) et B16F10 (cancer de la peau) après un temps d'incubation de 72 heures (temps d'incubation maximal). Pour le nérédronate (BPA3), les maxima d'inhibition de la croissance cellulaire pour les cellules A431, MDA-MB-231 et B16F10 sont respectivement de 78%, 15% et 20%, tandis que l'alendronate présente un maximum d'inhibition de l'ordre de 80% pour les trois lignées cancéreuses.

Nous avons confirmé les résultats décrits dans la littérature concernant les effets antiprolifératifs de l'alendronate sur différentes cellules cancéreuses.²²² Afin d'augmenter l'effet connu de l'alendronate sur les cellules cancéreuses, nous avons étudié son effet lorsqu'il est couplé à un transporteur. Nous avons démontré que le CMD-alendronate inhibe la prolifération des cellules A431, MDA-MB-231 et B16F10, dépendant de la dose et du temps. En effet, l'utilisation du CMD sur lequel est couplé un BP, dans les mêmes conditions que le BP seul, a conduit aux résultats présentés aux *Figures 27* et *28*. L'inhibition de la prolifération a été fortement améliorée, car elle atteint ici 70 % à des concentrations trois fois plus faibles

dans le cas du BPA3 (pour les 3 lignées) tandis que pour le BPA2, elle est de 98%.

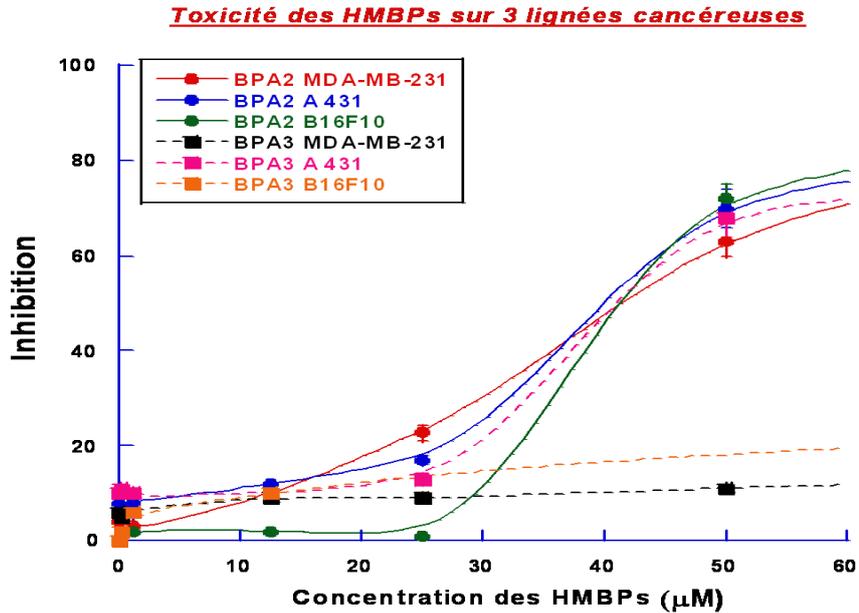


Figure 26 : Toxicité des BPs sur les 3 lignées cancéreuses après un traitement de 72 heures

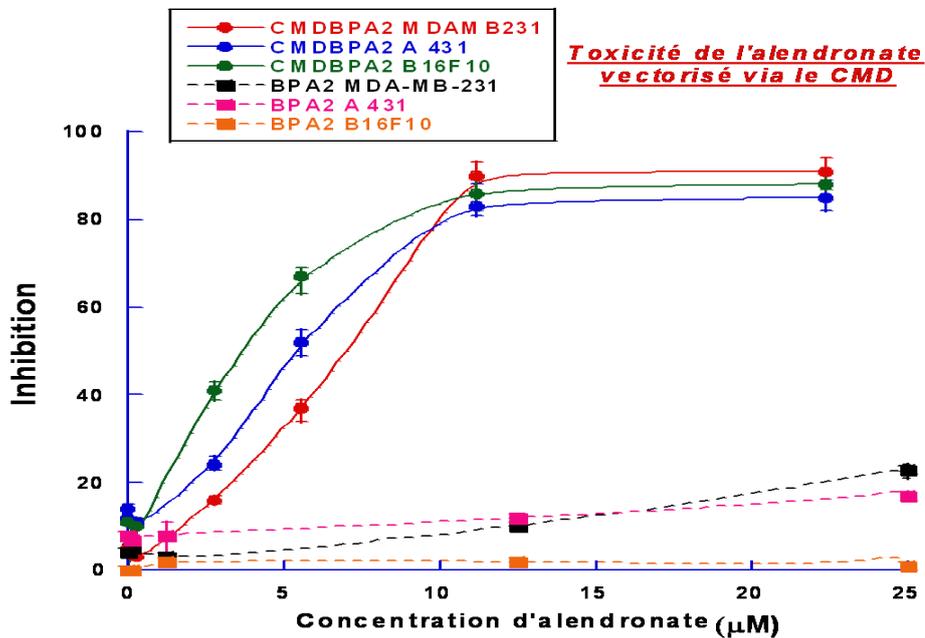


Figure 27 : Toxicité du CMD-alendronate et de l'alendronate sur les 3 lignées cancéreuses après traitement de 72 heures

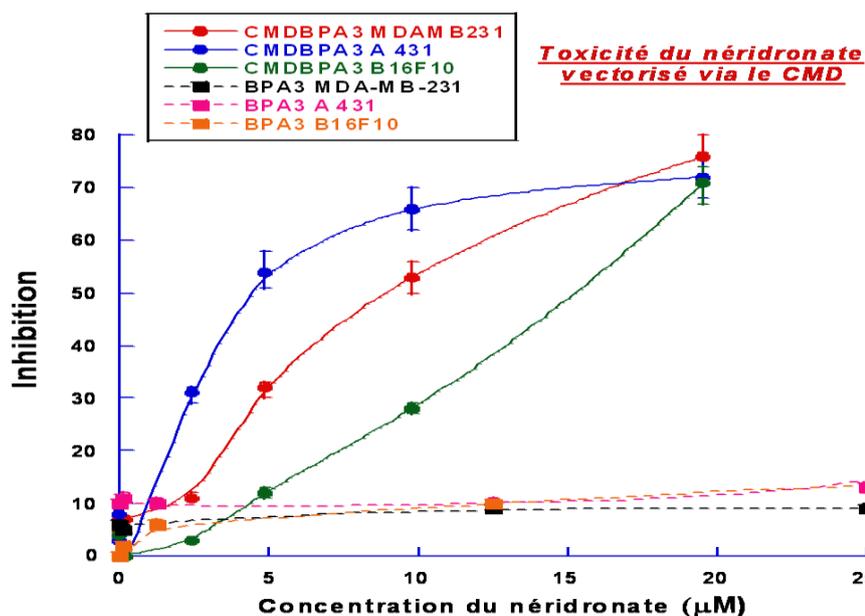


Figure 28 : Toxicité du CMD-néridronate et du neridronate sur les 3 lignées cancéreuses après traitement de 72 heures

Les EC₅₀ présentées dans le *Tableau 5* montrent que le CMD permet d'améliorer considérablement l'efficacité des BPs. En effet, le polysaccharide rend l'alendronate 11 fois, 7 fois et 5 fois plus efficace que lorsqu'il est utilisé seul sur les lignées B16F10, A431 et MDA-MB-231 respectivement. L'EC₅₀ du néridronate sur les cellules A431 est améliorée d'un facteur 11 lorsqu'il est couplé au CMD.

Tableau 5 : Toxicité des BPs et des conjugués CMD-BP sur les 3 lignées cancéreuses

	EC ₅₀ B16F10	EC ₅₀ A431	EC ₅₀ MDA-MB-231
Alendronate	38,8 µM	36,5 µM	32,9 µM
Néridronate	-	35,3 µM	-
CMD-Alendronate	3,6 µM	5 µM	6,7 µM
CMD-Néridronate	11,2 µM	3,1 µM	5,9 µM

III.6.2. Etude de la cytotoxicité du CMD seul associés aux bisphosphonates sur des cellules de carcinomes épidermoïdes vulvaires A431

Afin de montrer l'importance du couplage covalent entre le bisphosphonate et le polysaccharide, nous avons entrepris d'étudier la cytotoxicité du CMD seul dans un premier temps, puis du CMD associé au bisphosphonate ensuite.

La *Figure 29* présente l'effet du CMD à différentes concentrations sur la prolifération des cellules A431.

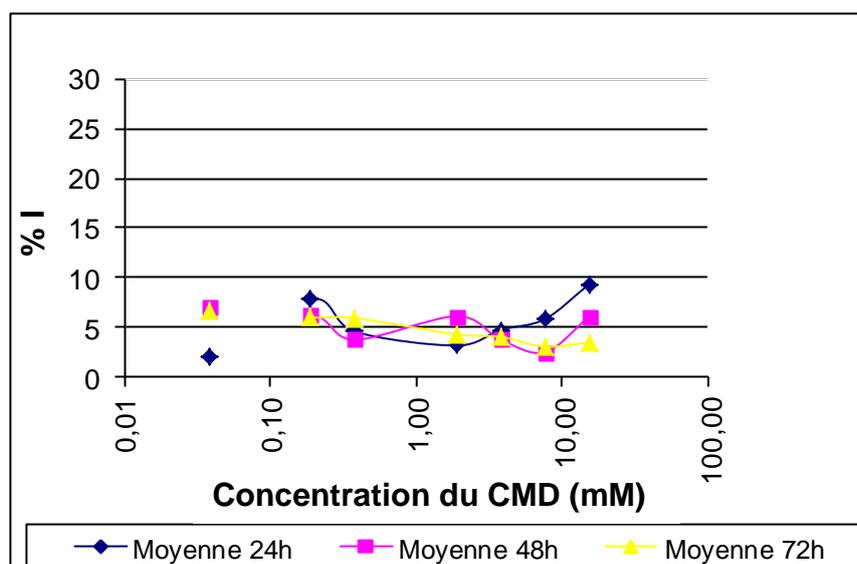


Figure 29 : Prolifération des cellules A431 en présence de CMD

Les résultats obtenus montrent que le CMD n'influence donc pas la prolifération cellulaire des cellules A431 quelque soit les conditions.

Dans un second temps, nous avons testé l'effet de l'association du CMD avec les deux bisphosphonates. Différents rapports entre le CMD et le bisphosphonate ont été étudiés. Quelque soient les rapports des concentrations utilisées, nous n'avons observé aucune amélioration de la cytotoxicité. A chaque fois, la valeur obtenue pour les bisphosphonates seuls est retrouvée. Ces résultats montrent qu'il n'y a pas d'effet synergique du CMD et du BP sur l'activité cytotoxique lorsque l'on associe ces deux PAs.

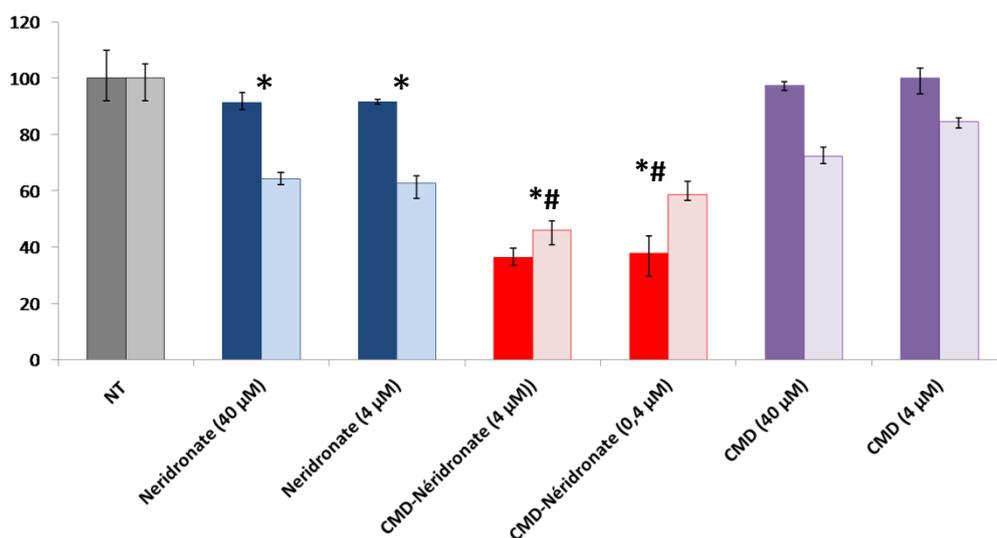
III.6.3. Etude de l'effet des aminoBPs et des conjugués CMD-BP sur la migration et l'invasion cellulaire

La migration et l'invasion sont des étapes déterminantes durant la progression tumorale et la dissémination métastatique. Aussi, certains BPs sont capables d'inhiber la migration et l'invasion de différents types de cellules tumorales *in vivo*.²²³ C'est pourquoi l'effet anti-invasif du CMD-BP a également été envisagé.

Pour réaliser cette étude, notre choix s'est porté sur des cellules MDA-MB-231 pour deux raisons. Tout d'abord l'injection des cellules tumorales proche de la glande mammaire conduit à un modèle plus réaliste de cancer du sein *in vivo*. En effet, il n'est pas possible de réaliser la même expérience avec les cellules A431 et B16F10 sur des souris.

La seconde raison concerne leur propension à faire des métastases. Les cellules MDA-MB-231 sont connues pour diffuser très rapidement vers d'autres organes en particulier les os.

La migration et l'invasion cellulaire, deux processus différents qui sont engagés dans la croissance tumorale et la formation de métastases, ne sont donc rapportées ici uniquement que sur cette lignée. La *Figure 30* présente les tests de migration (histogrammes foncés) et d'invasion (histogrammes clairs) réalisés sur le nérédronate, le CMD et le conjugué CMD-nérédronate.



*Statistiquement différent du contrôle

Statistiquement différent du nérédronate non lié

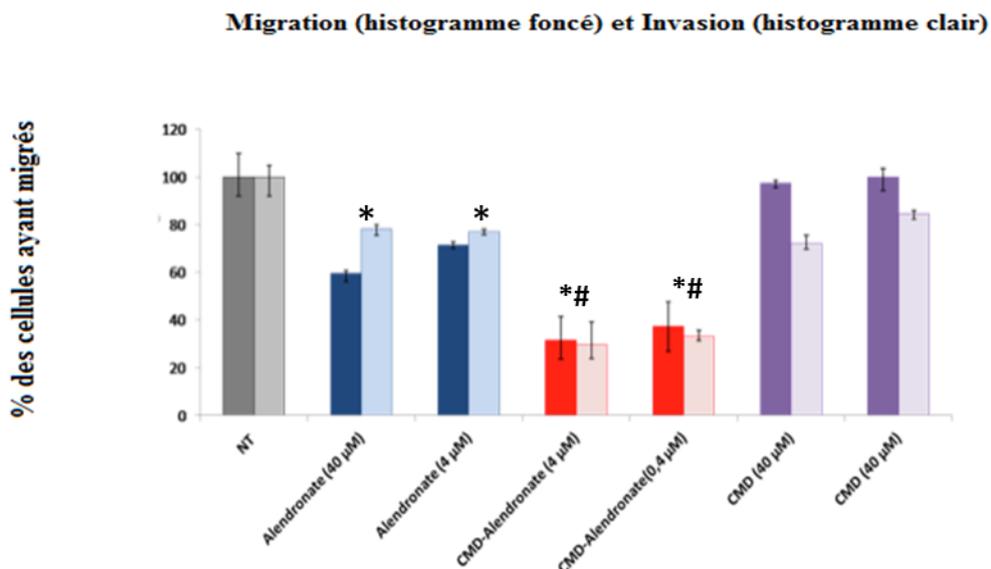
Figure 30: Etude de l'effet du CMD, du nérédronate et du CMD-nérédronate sur la migration et l'invasion cellulaire sur la lignée MDA-MB-231

Nous avons montré que le nérédronate inhibait très faiblement la migration des cellules MDA-MB-231. L'inhibition de l'invasion est plus marquée (de l'ordre de 30% d'inhibition). Le couplage avec le CMD apporte un réel bénéfice. En effet, l'activité anti-migratoire est fortement améliorée (de l'ordre de 60 % à 0,4 et 4 μ M). L'activité anti-invasive du CMD-nérédronate est augmentée mais de façon moins spectaculaire (de l'ordre de 40 % à 50 % à 0,4 et 4 μ M). Le CMD ne montre aucune activité ni sur la migration ni sur l'invasion tumorale.

La *Figure 31* présente les tests de migration (histogrammes foncés) et d'invasion (histogrammes clairs) réalisés sur l'alendronate, le CMD et le conjugué CMD-alendronate.

Les résultats obtenus sont en accord avec les études précédentes réalisées au laboratoire sur l'inhibition de la migration et de l'invasion tumorale par les BPs¹⁰.

Nous avons montré que le CMD-alendronate présente un effet anti-migratoire et anti-invasif significatif sur les cellules MDA-MB-231 (de l'ordre de 60 à 70% à 0,4 et 4 μ M), deux fois plus important que l'effet observé avec l'alendronate seul, et à des concentrations dix fois plus faibles. Une concentration dix fois plus faible en BPA2 (0,4 μ M par rapport à 4 μ M) pour le conjugué présente un effet quasiment similaire sur les processus de migration et d'invasion. Enfin comme précédemment décrit, le CMD ne montre aucune activité ni sur la migration ni sur l'invasion tumorale.



*Statistiquement différent du contrôle , # Statistiquement différent de l'alendronate non lié

Figure 31: Etude de l'effet du CMD, de l'alendronate, et du CMD-alendronate sur la migration et l'invasion cellulaire sur la lignée MDA-MB-231

III.7. Evaluation biologique *in vivo* des nouveaux polymères saccharidiques de type CMD-BP

Les études pharmacologiques ont montrés qu'*in vivo*, les cellules cancéreuses sont exposées à des concentrations micromolaires de BP pour quelques heures seulement. En effet, les BPs sont rapidement éliminés dans les urines et très vite, ils s'accumulent dans les os en raison de leur affinité pour le calcium. La présence du polysaccharide devrait augmenter sa rémanence et permettre d'augmenter le temps de contact avec les cellules tumorales à des concentrations efficaces. Ce polysaccharide devrait aussi améliorer la biodisponibilité pour le tissu tumoral vascularisé grâce à l'effet EPR.

Comme nous l'avons montré précédemment, le CMD-alendronate est capable d'affecter *in vitro* la viabilité de différentes cellules tumorales. Aussi, nous avons étudié *in vivo* les effets de ce BP sur la croissance de tumeurs MDA-MB-231 xénogreffées à des souris athymiques. Toutes les souris ayant reçu une injection de cellules MDA-MB-231 en sous-cutané près de la glande mammaire ont développé des tumeurs visibles au bout d'une semaine. Au 21^{ème} jour, elles sont réparties de manière aléatoire en cinq groupes de 8 souris.

Chaque groupe reçoit alors deux fois par semaine pendant 4 semaines des injections intraveineuses dans la queue de la souris :

- 1) du chlorure de sodium (souris témoins, groupe 1)
- 2) de l'alendronate (groupe 2) à raison de 6mg/kg,
- 3) de l'alendronate (groupe 3) à raison de 0,6 mg/kg,
- 4) du CMD-alendronate (groupe 4) à raison de 6 mg/kg,
- 5) du CMD-alendronate (groupe5) à raison de ou 0,6 mg/kg.

Avant chaque injection, les tumeurs sont mesurées. L'effet de l'alendronate et du CMD-alendronate sur la croissance tumorale est évalué en comparant tout au long du traitement le volume moyen des tumeurs des souris traitées à celui des souris témoins.

Au cours de cette expérience, aucune toxicité n'a été observée quelque soit la concentration d'alendronate ou de CMD-alendronate.

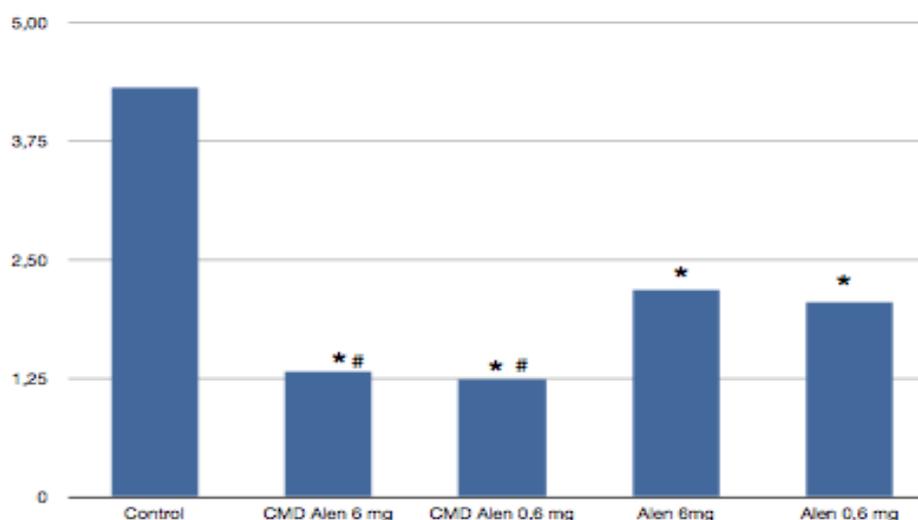
Après quatre semaines de traitement, les tailles des tumeurs des animaux témoins augmentent d'environ 4,31 fois alors que les tailles des tumeurs des animaux traités ont augmenté de respectivement 1,32 et 1,24 fois (CMD-alendronate à des doses de 6 mg/kg et 0,6 mg/kg,

Figure 32). La diminution du taux de croissance de la tumeur était deux fois plus importante avec le CMD-alendronate qu'avec l'alendronate libre (2,18 et 2,05). Ce résultat obtenu avec l'alendronate seul est en accord avec d'autres études antérieures.

Nous avons donc montré que l'alendronate couplé au CMD était un inhibiteur bien plus puissant de la croissance tumorale que l'alendronate seul.

La présence du polysaccharide a permis d'augmenter la concentration du bisphosphonate au niveau de la tumeur et par conséquent son efficacité. La libération du PA suppose une hydrolyse préalable de la plateforme carboxyméthyl-dextrane par un processus enzymatique.

Ces résultats montrent que le carboxyméthyl-dextrane est un bon vecteur des bisphosphonates



*Statistiquement différent du contrôle

Statistiquement différent de l'alendronate non lié

Figure 32: Taux de croissance des tumeurs issues de cellules MDA-MB-231 après traitement avec l'alendronate libre et le CMD-alendronate

Conclusion

Lors de cette étude, nous avons montré que le couplage de l'alendronate sur le carboxyméthyl-dextrane est efficace. La conjugaison a été possible sans utilisation de groupement protecteur aussi bien sur le précurseur phosphoré que sur le vecteur polysaccharidique. Les conditions opératoires mises au point ont permis de contrôler le nombre de bisphosphonates sur le CMD de manière reproductible.

La maîtrise du nombre de bisphosphonates à coupler est un facteur important. Nous avons montré qu'un nombre trop important de bisphosphonates couplés entraînait une baisse de l'efficacité biologique. Une trentaine de bisphosphonates greffées améliorent sensiblement l'activité pharmacologique *in vitro* par rapport à la molécule de bisphosphonate seule.

L'étude *in vivo* confirme ce résultat. Le CMD-alendronate injecté par voie intraveineuse ralentit fortement la croissance tumorale alors que l'action antitumorale de l'alendronate est moins significative. Il apparaît donc que le carboxyméthyl-dextrane améliore la biodistribution des bisphosphonates vers le tissu vascularisé.

CHAPITRE IV : CONCEPTION DE MONOMERES METHACRYLIQUES PORTANT UN HMBP

IV.1.Introduction

Dans ce chapitre, nous réaliserons tout d'abord un bref état de l'art sur les polymères portant un groupement acide bisphosphonique utilisés en tant que vecteurs, ainsi qu'un résumé des synthèses développées dans la littérature de différents monomères méthacryliques phosphonates et bisphosphonates.

En deuxième lieu, nous détaillerons les différentes approches adoptées pour la synthèse de nouvelles familles de monomères méthacryliques portant un motif hydroxyméthylène bisphosphonate. Comme nous l'avons déjà cité dans le chapitre II, la variation de la longueur de la chaîne ainsi que la nature chimique de l'espaceur entre le méthacrylique et le bisphosphonate permettra de réaliser une étude structure-activité biologique des vecteurs bisphosphonates.

Ainsi, la synthèse de cinq nouvelles séries de monomères méthacryliques hydroxyméthylène bisphosphonates que nous appellerons HMBPMs a été mise au point. Ces monomères peuvent être porteurs i) d'un HMBP azoté (pamidronate, alendronate, nérédronate, etc...) lié directement au méthacrylique par une liaison amide ou carbamate, ou indirectement par un espaceur PEG ; ii) d'un HMBP non azoté lié directement par une liaison ester ou indirectement par un espaceur PEG.

IV.2.Utilisation des polymères méthacryliques portant des groupements phosphorés en tant que vecteurs

La recherche de nouveaux polymères synthétiques biocompatibles pour l'amélioration de l'index thérapeutique de différents PAs est un domaine extrêmement actif de la vectorisation.^{224,225}

En effet, les polymères constituent une plateforme intéressante pour l'administration de médicaments car ils permettent la fixation éventuelle de plusieurs agents thérapeutiques, le contrôle de la libération des PAs, et une meilleure efficacité de ces agents grâce à une sélectivité pour les cellules tumorales accrues et par conséquent des effets secondaires diminués.

Depuis maintenant 30 ans, différentes règles ont pu être établies pour concevoir des conjugués polymères-PAs de façon plus rationnelle.²²⁶

Ces nouveaux conjugués ont trouvé des applications dans tous les domaines de la thérapeutique et plus particulièrement dans le domaine de la vectorisation des antitumoraux.

Différents agents antitumoraux couplés à des polymères synthétiques de type PEG ou HMPA sont en développement clinique ou sur le marché.²²⁷

Dans le cas des bisphosphonates, leur utilisation est associée au ciblage de l'os. En effet, il existe peu de molécules spécifiques du tissu osseux. L'étude décrite dans la littérature propose un couplage covalent entre le bisphosphonate et le polymère permettant d'augmenter l'affinité pour l'os. L'encapsulation d'un agent antitumoral.^{228,229} ou le couplage covalent d'un agent antitumoral avec le polymère permet de prolonger l'effet dans l'os tout en réduisant les effets secondaires.

En 2003, un copolymère N-(2-hydroxypropyl) méthacrylamide (HPMA) contenant l'alendronate comme agent de ciblage anti-résorptif de l'os (*Figure 33*) a été synthétisé. Il a montré une efficacité grâce à son affinité pour l'hydroxyapatite *in vitro* et son accumulation dans l'os *in vivo*.²³⁰

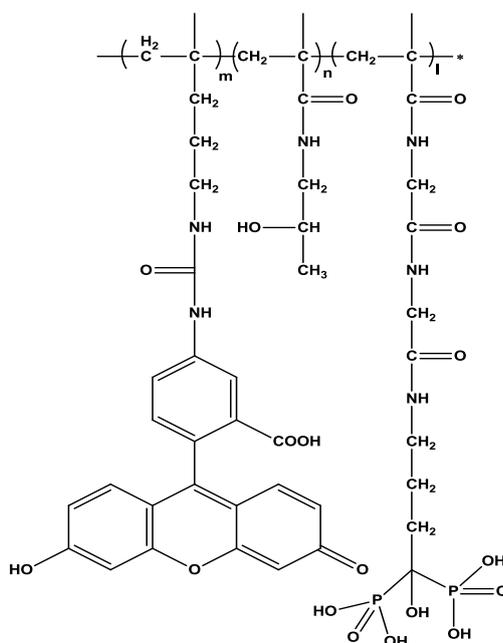


Figure 33: Conjugaison de l'alendronate au copolymère HPMA

Par ailleurs, un aminoalkylbisphosphonate, l'alendronate, et le paclitaxel, agent utilisé en chimiothérapie, ont été récemment couplés à un copolymère à base de HPMA (*Figure 34*). Il a montré d'intéressants résultats *in vitro* en tant qu'agent anti-angiogénique²³¹.

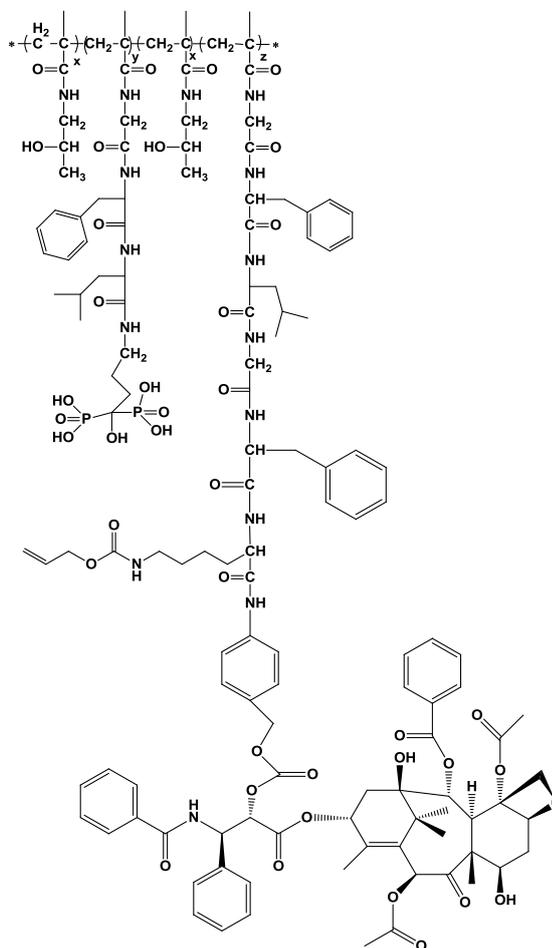


Figure 34 : Copolymère HPMA conjugué à l'alendronate et au paclitaxel

Si les bisphosphonates sont utilisés comme agent de ciblage, très peu d'études dans la littérature utilisent les propriétés antitumorales propres de ces molécules. Pour notre étude, nous souhaitons changer la biodistribution du conjugué et cibler spécifiquement la tumeur vascularisée. Pour répondre à cet objectif, il est nécessaire de contrôler le nombre de bisphosphonates sur le polymère afin que l'effet EPR soit plus important que l'affinité des bisphosphonates vis-à-vis de l'hydroxyapatite.

L'introduction des bisphosphonates sur la chaîne latérale des polymères a été peu étudiée.²³²⁻

²³⁴ Les résultats ont montré que les couplages covalents sont peu efficaces, difficilement contrôlables et peu reproductibles. C'est pourquoi, il a été préféré l'élaboration de monomères

à base de bisphosphonates.²³⁵ La conception de monomères vinyliques portant un groupement bisphosphonate a permis la polymérisation ainsi que la copolymérisation aisée de ces derniers. Un exemple de copolymère utilisant un bisphosphonate polymérisable est présenté ci-dessous (Figure 35).

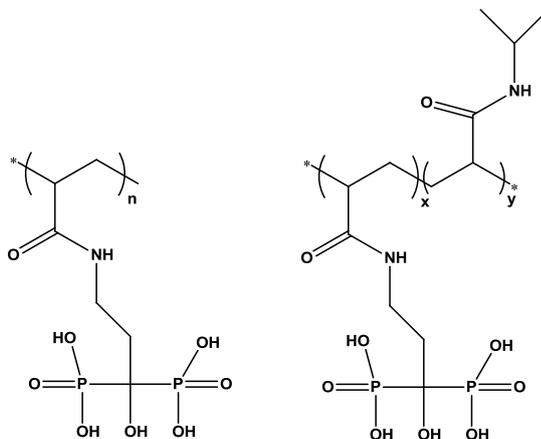


Figure 35 : Homopolymère et copolymère contenant du pamidronate

Lors de notre étude, le choix s'est porté sur des monomères méthacryliques présentant un groupement phosphoré dont la réactivité est similaire à celle de l'acide méthacrylique (MMA) dans la polymérisation radicalaire.²³⁶ Le groupement méthacrylique a été préféré aux monomères allyliques et vinyliques porteurs d'un groupement phosphoré, ces derniers ne montrant qu'une très faible réactivité à la copolymérisation radicalaire.

IV.3. Etat de la littérature sur la synthèse des monomères méthacryliques et méthacrylamides bisphosphonates

IV.3.1. Synthèse des monomères méthacryliques

L'introduction du motif bisphosphonique sur des monomères méthacrylates a été réalisée de différentes manières. La première méthode est basée sur la réaction de Kabachniks-Field. Chougrani et collaborateurs²³⁷ ont réalisé une série de monomères de méthacrylate bisphosphonates azotés. Ces monomères peuvent être obtenus par une réaction en deux étapes (Schéma 24). Dans un premier temps, l'aminoalkylbisphosphonate hydroxylé **n=0** sous sa forme ester est obtenu par réaction entre le 3-aminopropanol, le paraformaldéhyde et le diméthyl phosphonate.

Le motif méthacrylique est ensuite introduit classiquement par réaction d'estérification avec le chlorure de l'acide méthacrylique en milieu basique (présence de TEA). La déalkylation de ces composés tétraestérifiés est réalisée avec un traitement à l'aide du bromure de triméthylsilane suivi d'une méthanolyse pour obtenir la cible sous sa forme acide. Différentes longueurs de chaîne carbonée entre l'amine primaire et la fonction alcool sont disponibles commercialement, ce qui a permis la synthèse de différents méthacrylate bisphosphonates azotés contenant des longueurs variables d'espaces (*Schéma 24*).²³⁶

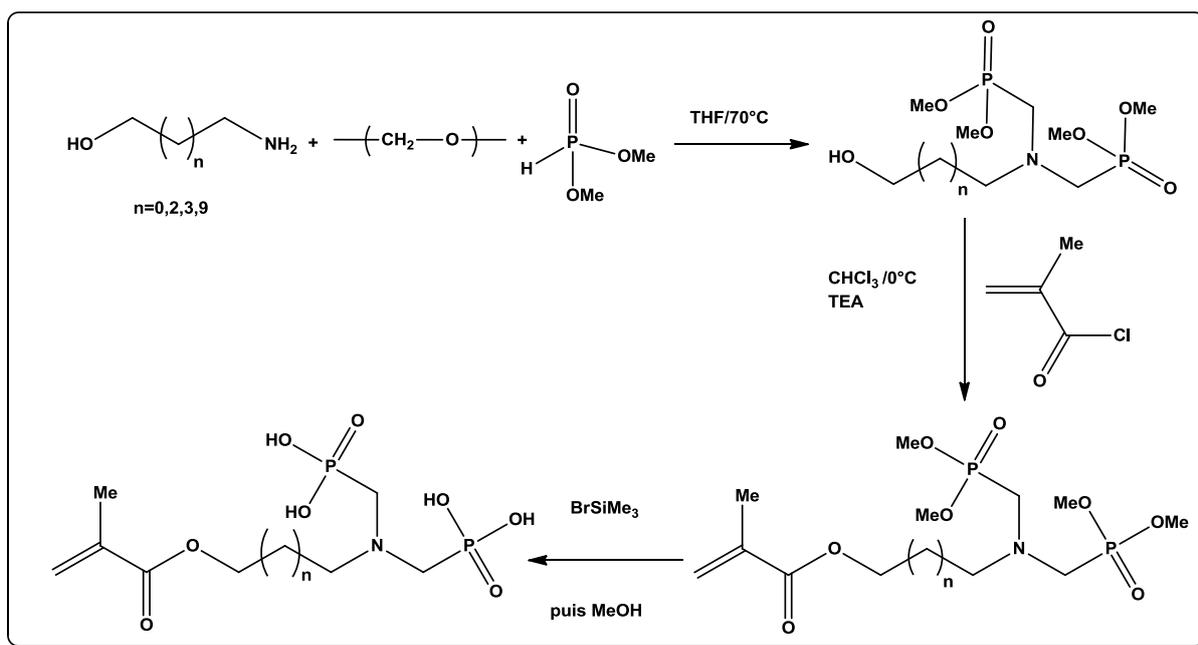


Schéma 24 : Synthèse d'un monomère méthacrylique portant un bisphosphonate azoté.

Plus récemment, ce travail a été poursuivi en introduisant des bras espaceurs comportant une fonction ester.²³⁸ Ces monomères ont été préparés pour leur incorporation dans des copolymères ayant des propriétés adhésives ou anti-corrosives (*Schéma 25*).

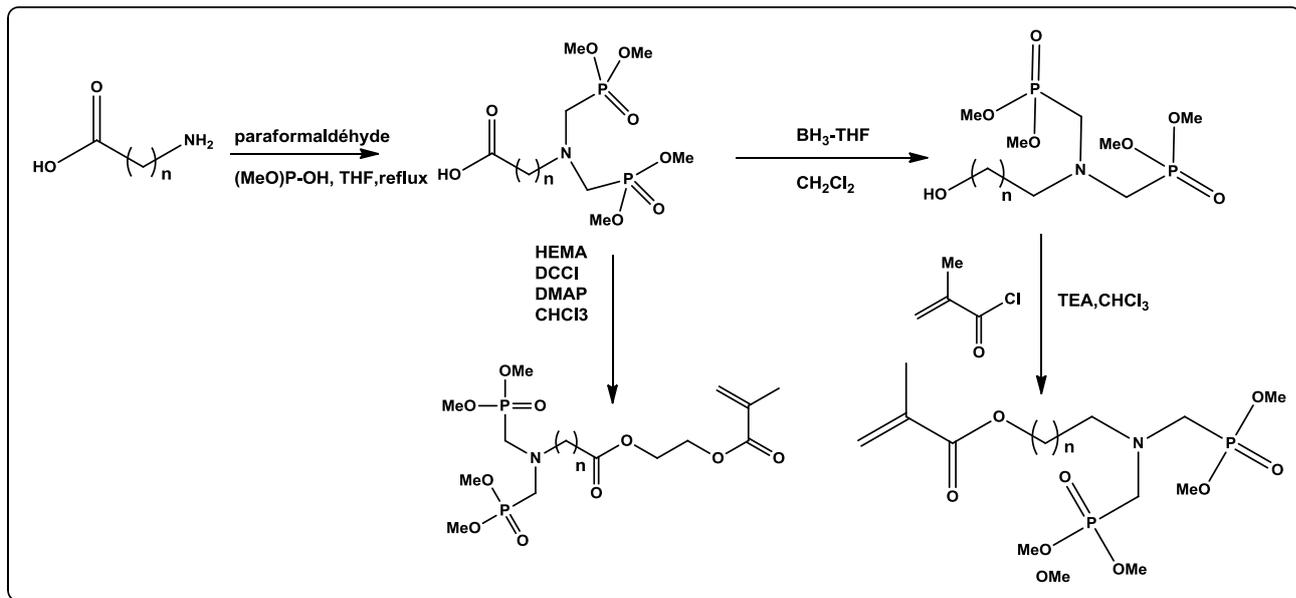


Schéma 25 : Synthèse de monomères méthacryliques bisphosphonates azotés contenant une fonction ester.

Par ailleurs, deux monomères méthacrylique bisphosphonates comportant un cycle benzénique et contenant une ou deux fonctions ester ont été décrits par la même équipe (*Schéma 26*).

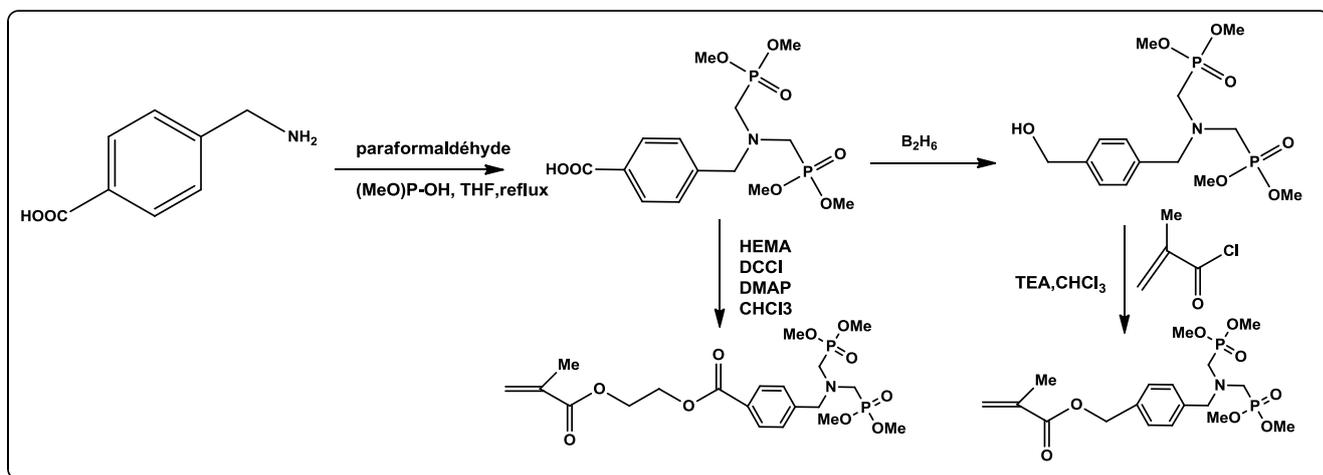


Schéma 26 : Synthèse de monomères méthacryliques bisphosphonates azotés contenant un cycle benzénique

La seconde série de monomères contient un espaceur PEG entre le bisphosphonate et le méthacrylate (*Schéma 27*). Ici, la stratégie de synthèse est similaire à celle des méthacrylates bisphosphonates azotés vus précédemment, où un ester bisphosphonate hydroxylé est d'abord

synthétisé. L'obtention de ce bisphosphonate hydroxylé est l'étape la plus difficile. Cette réaction basée selon les conditions de Degenhardt²³⁹ consiste à faire réagir l'éthylène glycol avec le tétraisopropyl méthylène bisphosphonate. Le produit ainsi formé est mis en réaction avec le chlorure de l'acide méthacrylique. La déalkylation de ces composés tétraestérifiés est réalisée avec un traitement à l'aide de bromure de triméthylsilane suivi d'une méthanolyse, afin d'obtenir l'acide méthacrylate bisphosphonique.²³⁷

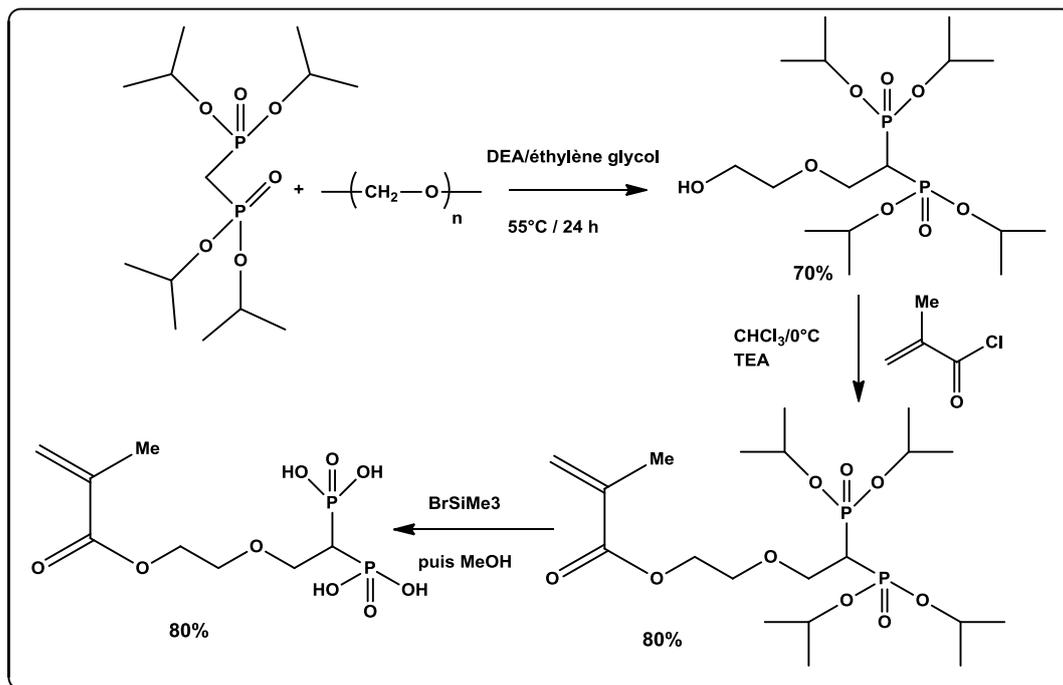


Schéma 27 : Synthèse d'un monomère acide méthacrylate bisphosphonique.

IV.3.2.Synthèse des monomères méthacrylamides

Le monomère d'acide méthacrylamide bisphosphonique a été préparé via une liaison directe amide entre le chlorure de l'acide méthacrylique et le tétra-éthyl-aminométhyl-bisphosphonate (sans espaceur) (*Schéma 28*). Comme décrit précédemment, l'hydrolyse des fonctions ester pour obtenir les acides bisphosphoniques correspondants, a été effectuée avec du bromure de triméthylsilane, suivi d'une méthanolyse.

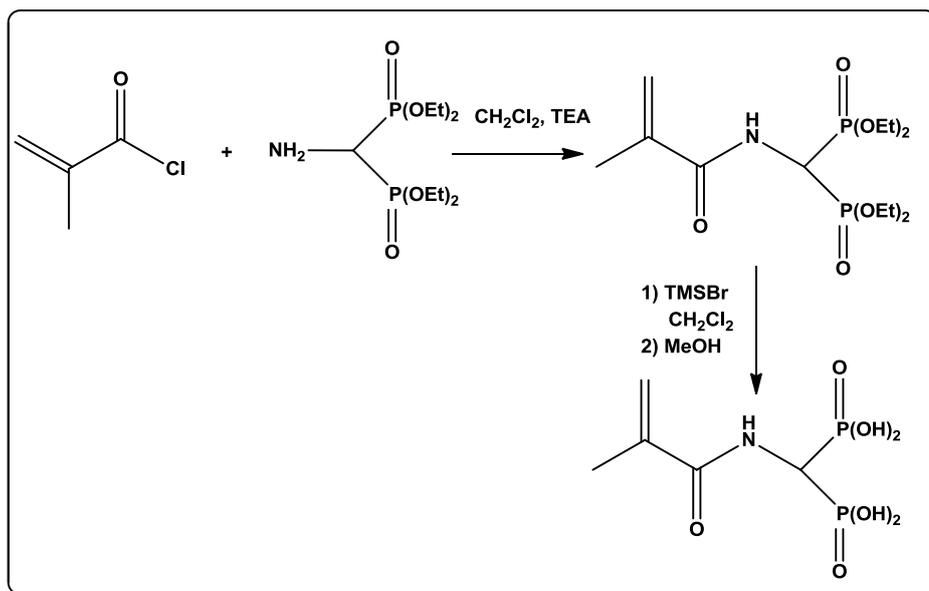


Schéma 28 : Synthèse d'un monomère méthacrylamide portant un bisphosphonate.

Akgun et collaborateurs²⁴⁰ ont synthétisé un nouveau monomère méthacrylamide pour des applications dentaires, qui a montré de bons résultats en terme de solubilité, d'acidité ainsi qu'une bonne capacité de copolymérisation avec HEMA.

En 2009, Catel et collaborateurs²⁴¹ ont synthétisé quatre monomères acides acrylamides bisphosphoniques. Il s'agit d'acides 3-(N-alkylacrylamido)-propylidène bisphosphoniques (alkyl= méthyl, propyl, hexyl, octyl), synthétisés en six étapes à partir du 1,1-diéthoxy-3-chloropropane (*Schéma 29*), avec des rendements globaux variant entre 26 et 37%. La première étape est une réaction de Michaelis-Arbusov conduisant au phosphonate de diéthyle. Celui-ci est ensuite traité avec du diisopropylamide de lithium puis du chlorophosphate de diéthyle, conduisant au bisphosphonate de diéthyle. La déprotection de l'acétal conduit à l'aldéhyde bisphosphonate.

Le bisphosphonate azoté a ensuite été obtenu par amination réductrice à l'aide de borohydrure de sodium. L'acylation de la fonction aminée fournit le dérivé acrylamide bisphosphonate par utilisation du chlorure de l'acide acrylique. En dernier lieu, la déalkylation des fonctions ester est réalisée avec le bromure de triméthylsilane afin d'obtenir les acides acryliques bisphosphoniques ciblés.

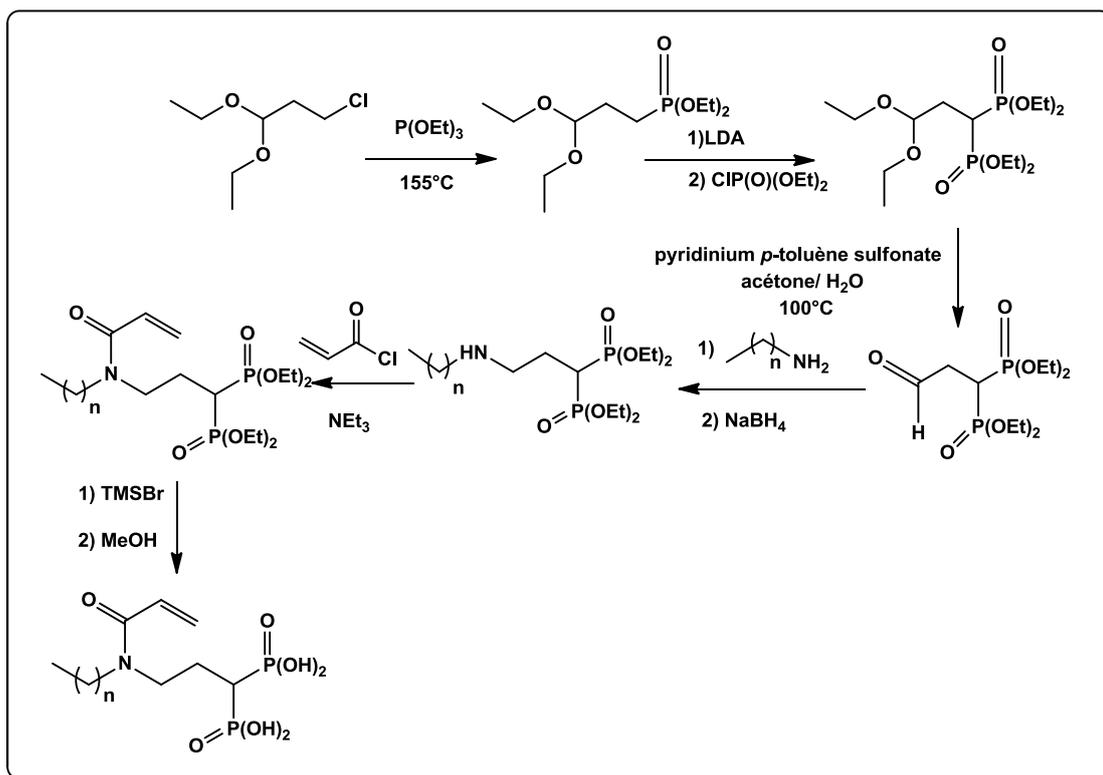


Schéma 29 : Synthèse de monomères acrylamides bisphosponiques

La synthèse d'une nouvelle molécule acrylique portant un bisphosphonate fluoré a été développée par Bala et collaborateurs en 2010.²⁴² Cette molécule a été obtenue en six étapes utilisant le tétra-isopropyl méthylène bisphosphonate comme produit de départ (*Schéma 30*). Comme indiqué, le carbanion sodique du tétraisopropyl méthylène bisphosphonate est monoalkylé, en utilisant un large excès de 1,6-dibromohexane. Le produit bromé est ensuite traité avec de l'hydruure de sodium et fluoré afin d'obtenir le bisphosphonate fluoré tétraisopropyl.

La substitution du brome par une fonction NH_2 est obtenue grâce au phthalimide de potassium, suivi d'une déprotection de l'amine avec de l'hydrazine en milieu acide selon une réaction de Gabriel. La dernière étape consiste à coupler la partie acrylique sur l'amine, conduisant ainsi à un acrylamide bisphosphonate fluoré.

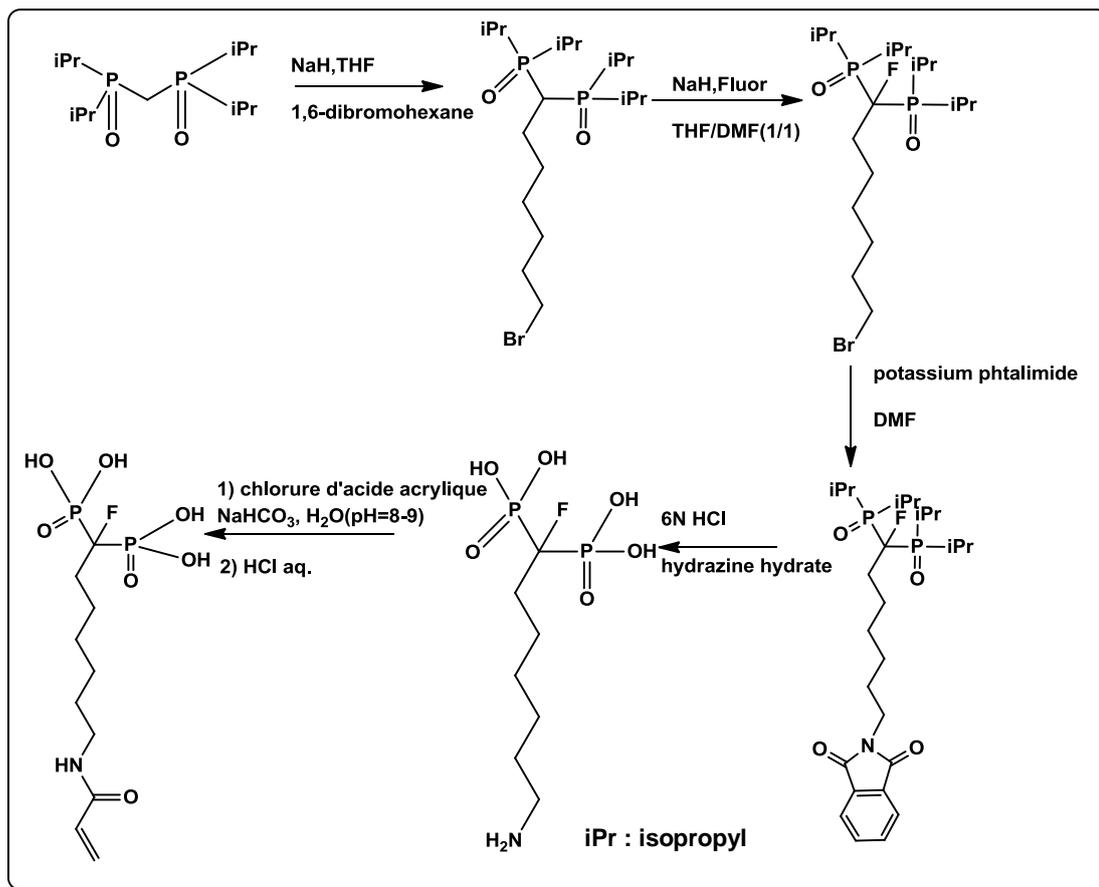


Schéma 30 : Synthèse d'un acrylique bisphosphonate fluoré.

Concernant les dérivés acryliques portant un hydroxyméthylène bisphosphonate, deux monomères seulement ont été rapportés dans la littérature à notre connaissance.

Le premier, contenant le pamidronate, a été préparé selon les conditions réactionnelles décrites dans le *Schéma 31*.²⁴³ Le N-acryloxysuccinimide et le pamidronate ont été couplés en quantités équimolaires dans l'eau, le pH ayant été ajusté à 8 avec de la soude. Après agitation du milieu réactionnel à température ambiante pendant une nuit, l'acrylamide bisphosphonate ciblé a été précipité dans de l'éthanol. Ce monomère a également été copolymérisé afin d'obtenir un hydrogel utilisé comme substrat dans la biominéralisation telle que la formation de l'hydroxyapatite.

Toutefois, cette méthode de synthèse présente des inconvénients :

- Le pH diminue au cours de la réaction, la protonation de l'amine primaire du pamidronate ralentit ainsi l'avancement de la réaction souhaitée. L'ajout de soude au cours de la réaction conduit à la présence de sels qu'il faut éliminer.

- Le N-hydroxysuccinimide (NHS) qui est un sous-produit de cette réaction est difficile à éliminer.

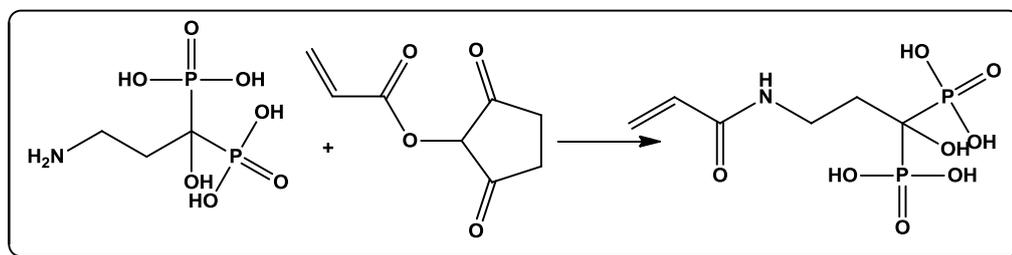


Schéma 31: Synthèse de l'acrylamide pamidronate

Le deuxième composé méthacrylique bisphosphonate, contenant un espaceur PEG, a été synthétisé par l'équipe de Gluz et collaborateurs en 2013.²⁴⁴ Il a été préparé en utilisant un dérivé méthacrylique PEG commercial avec n=6. La méthode décrite utilise la méthode développée au laboratoire via les phosphites silylés (*Schéma 32*).

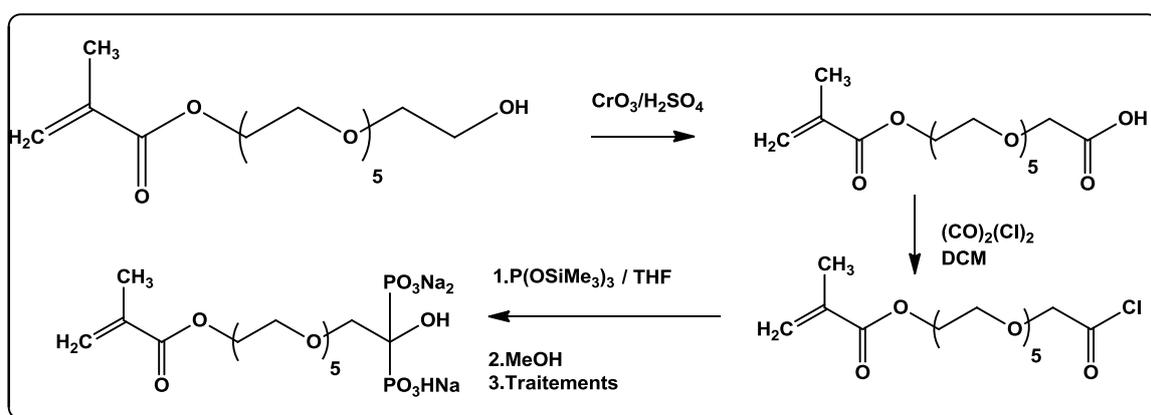


Schéma 32: Synthèse de méthacrylate-PEG-bisphosphonate.

L'hydroxyle de l'alcool méthacrylique est oxydé en acide carboxylique grâce au réactif de Jones (CrO₃ dans l'acide sulfurique) dans l'acétone. Le chlorure d'acide correspondant est synthétisé en faisant réagir l'acide carboxylique avec un excès de chlorure d'oxalyle. Il est ensuite engagé en réaction avec deux équivalents de tris(triméthylsilyl) phosphite à température ambiante dans du THF, suivie d'une méthanolyse. Le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne en phase inverse, en utilisant l'eau comme éluant.

IV.4.Synthèse des différentes familles de monomères bifonctionnels méthacryliques portant un hydroxyméthylène bisphosphonate

Nous avons réalisé ici la synthèse de dérivés méthacryliques HMBPs (HMBPMs) très peu étudiés jusque-là. Deux grandes classes de monomères bisphosphonates ont été préparées, les HMBPM-azotés (**HMBPM-N**) et les HMBPM-non azotés (**HMBPM**).

IV.4.1.Synthèse des monomères méthacryliques portant un HMBP azoté (HMBPM-N)

Trois séries de monomères HMBPM-N ont été synthétisées. Un aminoalkylbisphosphonate possédant différentes longueurs de chaîne carbonée a été greffé soit directement via une liaison amide ou carbamate, soit par liaison indirecte en introduisant un espaceur PEG.

Nous allons donc détailler dans cette partie les différentes approches adoptées afin d'obtenir les monomères HMBPM-azotés.

IV.4.1.1.Couplage entre un dérivé acrylique activé et un aminoalkyl bisphosphonate via une liaison amide (HMBPM1-N)

IV.4.1.1.1.Mise au point des conditions opératoires sur des substrats modèle : le néridronate et l'acide méthacrylique

a. Approche du couplage dans l'eau

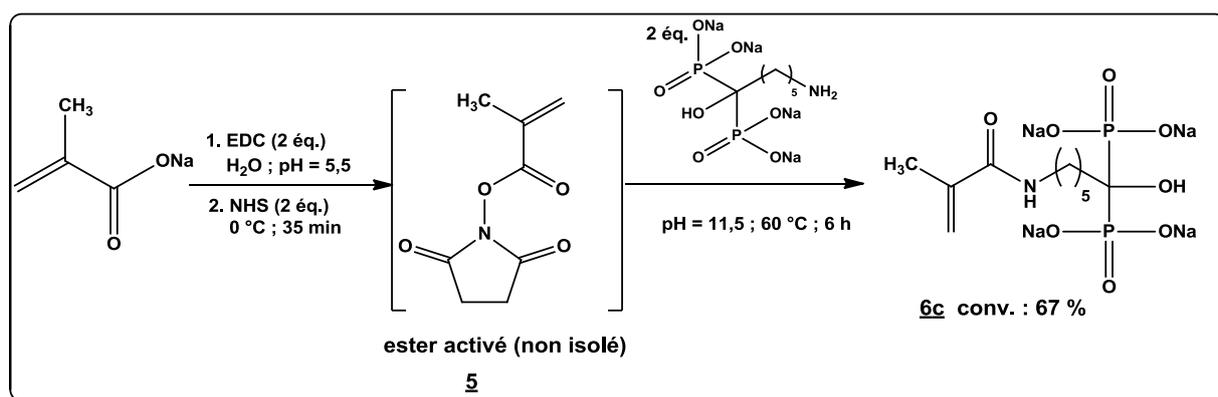


Schéma 33: Méthode de couplage dans l'eau de l'acide méthacrylique à l'aminoalkylbisphosphonate.

L'approche adoptée pour la synthèse de ces monomères méthacryliques portant un HMBP azoté consiste à coupler par une liaison amide, un acide méthacrylique (commercial) préalablement activé et un aminoalkylbisphosphonate synthétisé (**2c**, néridronate), décrit dans le chapitre III (*Schéma 21*).

La formation de cette liaison peptidique nécessite d'abord l'activation de la fonction carboxyle de l'acide. Nous avons donc modifié l'acide méthacrylique par réaction avec le 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide (EDC) à pH=4,5.

Cet ester activé n'est pas très stable et s'hydrolyse facilement en milieu aqueux. Une réaction de transestérification entre l'O-acylurée et le NHS permet alors d'obtenir un ester plus stable **5**. Ce groupement ester formé est alors un bon groupe partant vis-à-vis de l'attaque d'une amine. Du NHS est donc introduit progressivement tout en maintenant le pH à 4,5. Une addition nucléophile de l'oxygène de l'hydroxyle du NHS sur le carbonyle de l'acide activé par l'EDC a lieu, conduisant ainsi à la formation de l'urée correspondante. L'activation est réalisée dans les mêmes conditions que celles du CMD, c'est à dire à 0°C pendant 35 minutes.

L'acide ainsi activé par le NHS n'est pas purifié mais directement utilisé dans les réactions de couplage avec l'aminoalkylbisphosphonate (ici le néridronate). La fonction amine s'additionne sur le groupement ester activé, formant une fonction amide. Pour permettre la formation de cette nouvelle liaison, il est nécessaire que la fonction amine de l'aminoalkylbisphosphonate soit sous sa forme NH₂. C'est pourquoi dès l'ajout d'aminoalkylbisphosphonate à la solution d'acide méthacrylique activé, le pH est ajusté à 11,5. Le couplage est réalisé par la suite à 60°C. La réaction est suivie à la fois par mesure du pH et par RMN du phosphore. Les contrôles du pH montrent une baisse de pH dès la première heure de réaction. Cette baisse est due à la formation de la fonction amide et à la diminution rapide de la concentration en aminoalkylbisphosphonate.

En RMN du phosphore, l'apparition du produit couplé ($\delta=18,9$ ppm) conduit à un signal distinct de l'aminoalkylbisphosphonate de départ ($\delta=18,5$ ppm). L'évolution de la réaction est suivie toutes les heures. Nous avons constaté qu'au bout de 6 heures, la réaction n'évolue plus. Elle a donc été arrêtée et le produit obtenu a été analysé en RMN ³¹P et ¹H. Les spectres obtenus ont montré la formation de 67% de produit couplé **6c** ainsi que la présence de l'urée formée et des produits de départ n'ayant pas réagi. Beaucoup de sels sont également présents d'où la mauvaise résolution du spectre RMN ¹H obtenu.

Des premiers essais de purification du produit obtenu ont d'abord été réalisés par précipitations dans le méthanol et l'éthanol afin d'éliminer le NHS et l'urée formés, l'ainoalkylbisphosphonate de départ et les sels formés. Les résultats obtenus n'ont pas permis d'obtenir une purification satisfaisante.

Nous avons alors essayé de séparer le produit couplé par chromatographie sur colonne en phase inverse, en utilisant un mélange eau /méthanol (90/10) sans succès. En effet, la polarité du produit de départ et la polarité du produit couplé sont proches et il est ainsi impossible de les séparer. La purification de ce produit n'a pas été poursuivie.

Par conséquent, des tests de couplage en milieu organique ont été effectués, utilisant plusieurs méthodes.

b. Approche du couplage dans un solvant organique

Plusieurs méthodes de couplage ont été testées afin d'optimiser la meilleure méthode et la plus simple à mettre en œuvre.

➤ Première approche :

La méthode utilisée dans ce cas consiste à synthétiser tout d'abord le motif acide méthacrylamide avant d'y construire le groupement bisphosphonate pour obtenir le monomère bifonctionnel méthacrylique portant le HMBP **6c**. L'acide méthacrylamide sera lui-même préparé à partir du couplage de l'ester 6-aminohexanoïque et le chlorure d'acide méthacrylique commercial, suivant le schéma rétrosynthétique décrit ci-dessous (*Schéma 34*).

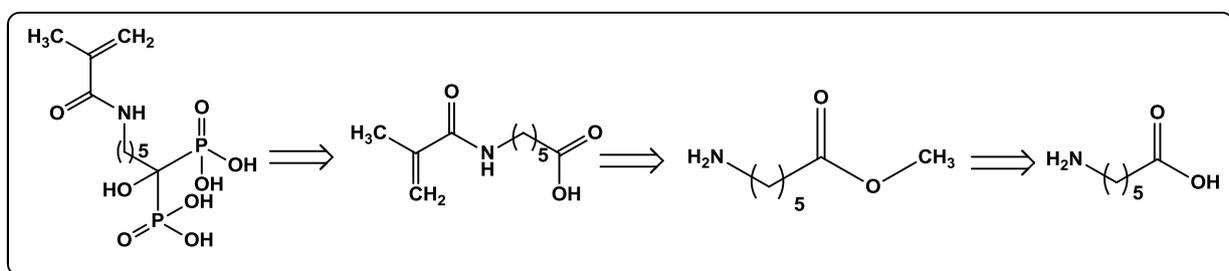


Schéma 34: Première approche de rétrosynthèse des HMBPM1-N

La synthèse de l'intermédiaire clé « acide méthacrylamide » se fait en quatre étapes (*Schéma 35*). Le composé comportant une chaîne de cinq atomes de carbone entre le méthacrylamide et la fonction acide carboxylique a tout d'abord été envisagé. Un premier essai d'estérification utilisant le trifluorure de bore comme acide de Lewis en présence de méthanol a été réalisé mais n'a conduit qu'à un très faible rendement en ester (24%). Le changement des conditions réactionnelles a permis d'améliorer l'efficacité de la réaction.

Le chlorure de l'aminohexanoate de méthyle **7** est obtenu en milieu organique en utilisant le chlorure de thionyle et le méthanol à 40°C pendant 3 heures 30. Le chlorhydrate de l'aminooester est obtenu sans purification avec un rendement quasiment quantitatif (98%).

Le produit a été caractérisé en RMN du proton et du carbone 13 ainsi qu'en infrarouge.

Le spectre infrarouge montre la disparition de la bande caractéristique des acides carboxyliques à 1689 cm⁻¹ de l'acide de départ au profit d'une bande à 1729 cm⁻¹ caractéristique de la fonction ester. En RMN ¹H, un nouveau pic à 3,72 ppm correspondant au groupement méthyl est apparu. Le spectre RMN ¹³C vient confirmer la structure du composé. En effet, on observe le signal du méthyl à 54,1 ppm.

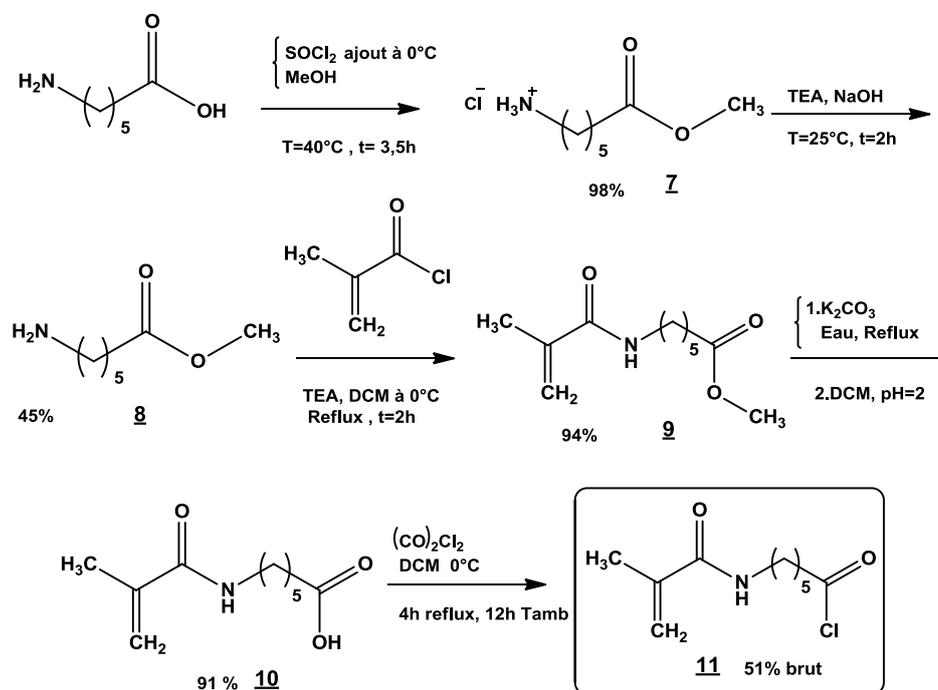


Schéma 35: Synthèse du chlorure de l'acide méthacrylamide **11**

Le déplacement du sel d'ammonium **7** en son amine correspondante **8** s'est avéré plus délicat que prévu. C'est pourquoi plusieurs bases ont été testées. Nous avons dans un premier temps testé une solution de soude concentrée (50%) en contrôlant le pH. Ces conditions opératoires ont conduit à la saponification partielle de l'ester. Nous avons changé la nature de la base en utilisant une base forte non nucléophile, la DBU (diazabicycloundec-7-ène).

Nous observons une saponification partielle de la fonction ester. Nous avons ensuite essayé une base minérale faible, diluée et non nucléophile NaHCO₃ 10%. L'amine estérifiée est obtenue sans réaction secondaire avec cependant un très faible rendement (8%). Finalement, l'utilisation de la triéthylamine en fort excès en mélange avec une solution de soude 1M (2 mL) a conduit au meilleur résultat. Nous avons observé une saponification partielle mais le rendement reste convenable avec un rendement de (45%). Le produit **8** a été analysé en RMN du proton. Le déplacement du signal correspondant au CH₂ lié au sel d'ammonium est constaté de 3,02 ppm à 2,71 ppm dans le cas de l'amine.

L'étape suivante est le couplage de l'ainoester **8** avec le chlorure de l'acide méthacrylique préalablement distillé, en présence d'une base organique, la triéthylamine, dans le dichlorométhane à 0°C. La méthode suivie est une méthacrylation conventionnelle car les amines primaires peuvent facilement être acylées par un chlorure d'acide pour donner des amides. Le milieu réactionnel est porté au reflux et l'évolution de la réaction est suivie par CCM. L'absence de fonction amine primaire libre est contrôlée par réaction de Kaiser (test à la ninhydrine). La réaction est terminée après 2 heures. L'ester méthacrylamide **9** est obtenu avec un excellent rendement de 94% et caractérisé par RMN et IR. En IR, on constate la présence de deux bandes carbonyles à 1751 et 1680 cm⁻¹ correspondant au C=O de l'ester et au C=O de l'amide respectivement. En RMN ¹H, on trouve les signaux du motif méthacrylique : la double liaison sous la forme de multiplets à 5,57-5,70 ppm et 5,15-5,37 ppm et le groupe méthyl sous la forme d'un singulet à 1,92 ppm. En RMN ¹³C, on observe la présence de deux pics à 174,0 et 168,6 ppm correspondant aux carbonyles de l'ester et de l'amide respectivement, ainsi que les carbonyles éthyléniques qui résonnent à 140,1 et 119,1 ppm et le méthyl à 18,6 ppm.

L'étape suivante est la saponification de la fonction ester en utilisant le carbonate de potassium au reflux de l'eau. L'acide méthacrylamide **10** est extrait à pH=2 dans du dichlorométhane et obtenu pur avec 91% de rendement. L'acide méthacrylamide **10** est caractérisé en RMN ¹H et ¹³C. Sa structure est confirmée par la disparition du pic

correspondant au groupement méthyl et le déplacement du signal correspondant au C=O de l'ester de 174 ppm à 172,9 ppm dans le cas de l'acide.

Une fois cet intermédiaire synthétisé, les deux étapes permettant la construction du motif bisphosphonate ont été alors envisagées. La première consiste à préparer le chlorure d'acide correspondant du composé **10**, suivie de sa réaction avec un phosphite silylé pour obtenir le monomère HMBPM1-N.

La synthèse du chlorure d'acide **11** se fait en utilisant le chlorure d'oxalyle dans le dichlorométhane, dans des conditions classiques (4 heures à reflux puis 12 heures à température ambiante) (*schéma 35*). Nous avons obtenu un produit contenant beaucoup d'impuretés (50%) dont la nature n'est pas identifiée. La présence du pic C=O à 1798 cm⁻¹ confirme l'obtention du chlorure d'acide correspondant. Le traitement du produit brut par évaporation sous pression réduite et plusieurs lavages à l'éther et au dichlorométhane n'ont pas permis d'améliorer la pureté. Le chlorure d'acide **11** ainsi obtenu a tout de même été engagé dans la réaction suivante avec le tris(triméthylsilyl) phosphite afin de vérifier sa faisabilité. Le produit final obtenu contient plusieurs produits secondaires en RMN ³¹P ; le composé attendu autour de 19,0 ppm n'est présent qu'à 16% seulement, et les produits secondaires ont été observés à 7,3 ; 3,5 et 0 ppm. Ce faible taux de conversion nous a amené à abandonner cette méthode de synthèse car la séparation de différents produits phosphorés en mélange est très difficile à réaliser, que ce soit par précipitation ou chromatographie en phase inverse.

➤ Deuxième approche

Nous avons alors envisagé de coupler le synthon méthacrylique sur le bisphosphonate. La difficulté dans cette stratégie est la solubilité des réactifs. En effet, le bisphosphonate n'est soluble que dans l'eau alors que le dérivé acrylique est soluble dans les solvants organiques et possède une faible stabilité en milieu aqueux. Nous avons donc décidé de rendre soluble l'ainoalkylbisphosphonate en silylant les fonctions acide phosphonique et alcool (*Schéma 36*).

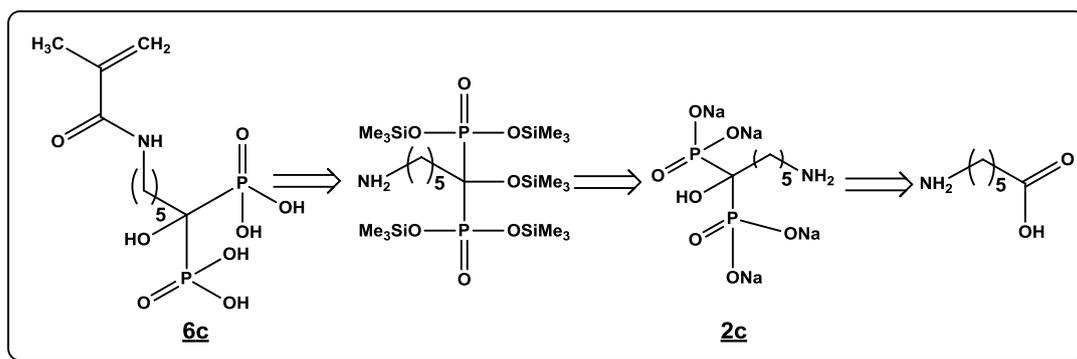


Schéma 36: Deuxième approche de rétrosynthèse des **HMBPM1-N**

Comme présenté au *Schéma 37*, la méthode consiste à silyler les groupements hydroxyles de l'aminoalkylbisphosphonate synthétisé auparavant. Le choix de l'agent de silylation est déterminant. En effet, nous avons dû choisir un agent de silylation suffisamment réactif pour réagir chimiosélectivement avec les fonctions hydroxyles des acides phosphoniques et alcool. Parmi les agents de silylation décrits dans la littérature, l'hexaméthylidisilazane (HMDS) est le moins réactif et permet de respecter les fonctions amines.

L'aminoalkylbisphosphonate est chauffé au reflux en présence d'un large excès d'hexaméthylidisilazane et en présence d'une base, la triéthylamine. L'évolution de la réaction est suivie par RMN ^{31}P .

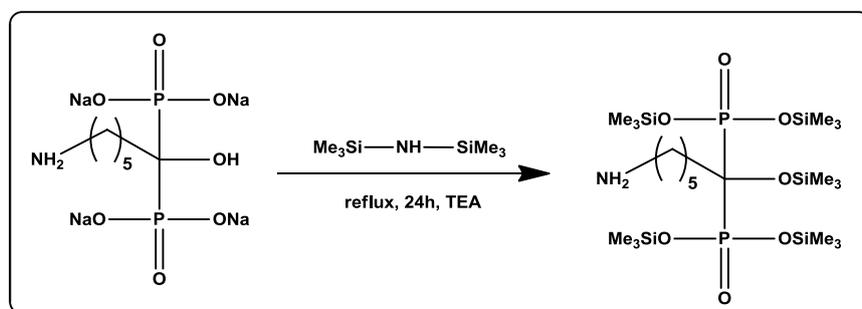


Schéma 37: Réaction de silylation des bisphosphonates

Cette étape de synthèse est délicate car elle doit s'effectuer dans des conditions totalement anhydres, ces composés s'hydrolysant très rapidement en présence d'un solvant protique. La réaction est alors conduite sous atmosphère inerte, au reflux pendant une nuit. En fin de réaction, le déplacement chimique du signal observé vers 18,5 ppm et correspondant au bisphosphonate de départ a disparu au profit d'un pic autour de 3,3 ppm. L'hexaméthylidisilazane en excès est alors évaporé sous pression réduite.

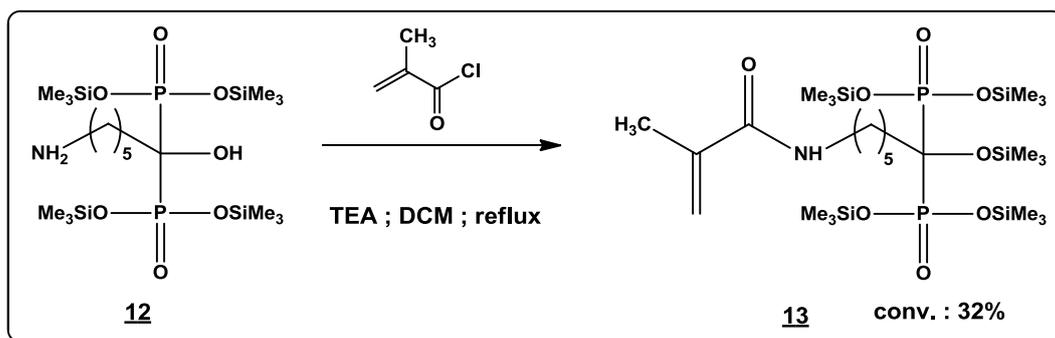


Schéma 38 : Réaction de couplage du bisphosphonate silylé et du chlorure d'acide méthacrylique.

L'aminoalkylbisphosphonate silylé **12** est ensuite utilisé brut. Il est mis en réaction avec le chlorure de l'acide méthacrylique au reflux du dichlorométhane en présence de triéthylamine. Le pic du produit couplé silylé **13** apparaît aux alentours de 2,8 ppm et le suivi de l'évolution de cette réaction en RMN ^{31}P montre que cette méthode a permis de former le produit couplé **13** avec un taux de conversion de seulement 32% déterminé par intégration.

L'hydrolyse du milieu confirme ce taux de conversion par la présence dans le produit obtenu du pic correspondant au néridronate à 18,5 ppm et du produit final **6c** à 19,0 ppm.

➤ Troisième approche :

Les méthodes décrites dans la littérature utilisant un bisphosphonate déprotégé et un acide méthacrylique activé ont été réalisées dans l'eau. Cependant des difficultés de purification limitent l'utilisation de cette technique.

Nous avons tenté de coupler l'acide méthacrylique au bisphosphonate déprotégé dans un solvant organique. Nous espérons qu'une augmentation de la température devait permettre d'améliorer la solubilité des aminoalkylbisphosphonates et permettre le couplage avec l'acide méthacrylique activé. D'autre part, cette solubilité devrait être augmentée en allongeant la chaîne carbonée entre l'amine de la chaîne latérale et le groupement hydroxyméthylène bisphosphonate.

Le greffage du néridronate sur le chlorure de l'acide méthacrylique a tout d'abord été étudié. L'aminoalkylbisphosphonate est préalablement amené à pH = 12 et lyophilisé. Il est ensuite mis en réaction dans le dichlorométhane sec avec le chlorure de l'acide méthacrylique fraîchement distillé, en présence de triéthylamine sous atmosphère inerte. Le mélange

réactionnel a tout d'abord été agité à température ambiante pendant quelques heures, l'avancement de la réaction étant suivi par RMN ^{31}P et par le test de Kaiser. Toutefois, elle a peu évolué à température ambiante et le milieu réactionnel est donc chauffé à reflux (*Schéma 39*)

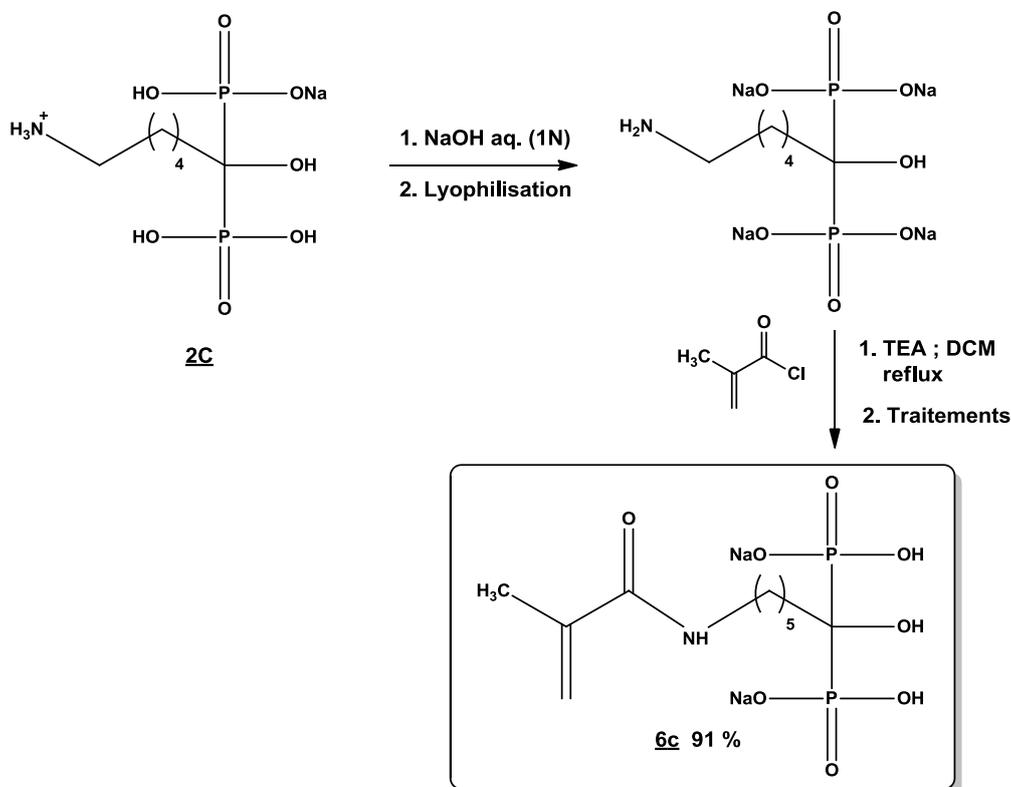


Schéma 39 : Synthèse du premier HMBPM1-N

La réaction de couplage est complète après 16 heures de chauffage à reflux. Le produit attendu solubilisé dans l'eau à pH = 12 est alors lavé au dichlorométhane puis à l'éther (3 x 20 mL). La phase aqueuse recueillie est alors amenée à pH = 1,5 et les mêmes lavages organiques sont effectués. Plusieurs échanges cationiques sur une résine H^+ sont ensuite nécessaires.

Le méthacrylamide bisphosphonate HMBPM1-N **6c** a pu être synthétisé et obtenu pur avec un excellent rendement de 91%. Cette méthodologie de synthèse a donc été adoptée et appliquée à différents amino-acides afin de vérifier sa faisabilité.

IV.4.1.1.2. Application à la synthèse de monomères (méth) acryliques possédant des chaînes alkylées de longueur variable

a. Synthèse des aminoalkylbisphosphonates

Les méthacrylates **6a-e** ont été obtenus à partir des aminoalkylbisphosphonates **2a-e** présentant différentes longueurs de chaîne carbonée ($n = 2, 3, 5, 7, 10$). Ces derniers sont préparés selon le procédé décrit par Kieczkowski¹¹¹ à partir des amino-acides adéquats, d'acide phosphoreux et de trichlorure de phosphore (*Schéma 40*). Les acrylates **6f** et **6g** ont été obtenus respectivement à partir des aminoalkylbisphosphonates **2b** et **2c**

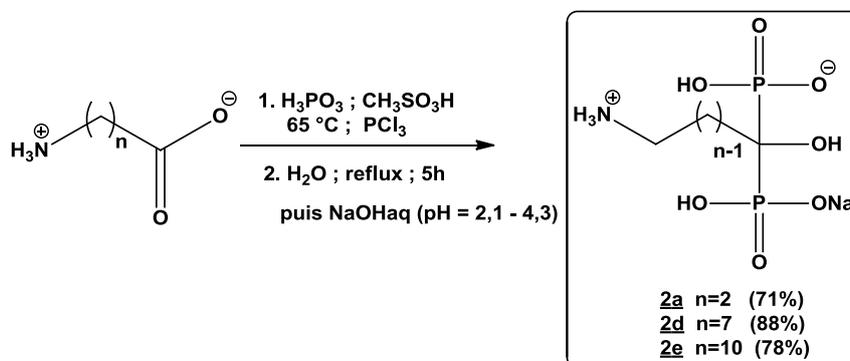


Schéma 40 : Synthèse des aminoalkylbisphosphonates

En effet, cette méthode est celle déjà utilisée pour la synthèse de l'alendronate **2b** et du nérédronate **2c** greffés sur le CMD (chapitre III). Elle présente l'avantage d'accéder aux produits désirés en une seule étape après hydrolyse. La difficulté de cette procédure est l'isolement de l' aminoalkylbisphosphonate. Le pH de la solution a été ajusté à 1,8 ou 4,3 afin d'obtenir la précipitation de l' aminoalkylbisphosphonate souhaité respectivement sous forme complètement acide ou sous forme monosodée. Par ailleurs, des dosages acido-basiques des aminoalkylbisphosphonates synthétisés ont montré qu'ils cristallisent avec quatre molécules d'eau.

b. Couplage avec les acides (méth) acryliques

Pour réaliser le couplage avec les acides acryliques, nous avons utilisé la procédure établie précédemment et décrite dans le *Schéma 41*.

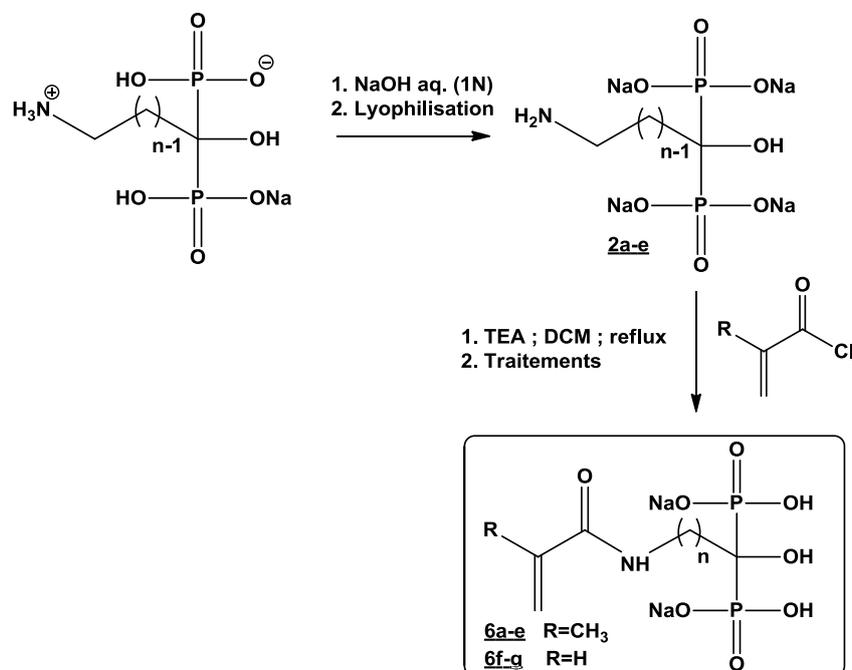


Schéma 41: Synthèse des **HMBPM1-N**

Le mélange réactionnel a tout d'abord été agité à température ambiante pendant quelques heures, l'avancement de la réaction étant suivi par RMN ³¹P et par le test de Kaiser. Toutefois, son évolution lente nous a conduit à chauffer au reflux. Les résultats sont présentés dans le *Tableau 6*.

Tableau 6: Temps de réaction, rendements et déplacements chimiques en RMN $\{^1\text{H}\} ^{31}\text{P}$ des différents HMBPM1-N synthétisés.

Produit	n	Temps de réaction (h)	Rendement (%)	$\delta\text{RMN}^{31}\text{P}$ (ppm)
<u>6a</u>	R = CH ₃	2	75	18,6
<u>6b</u>		3	86	18,4
<u>6c</u>		5	91	18,9
<u>6d</u>		7	78	19,9
<u>6e</u>		10	88	19,2
<u>6f</u>	R = H	3	86	18,3
<u>6g</u>		5	81	18,7

Les résultats montrent que notre méthode de synthèse a permis d'obtenir une première famille de monomères (méth)acryliques bisphosphonates **HMBPM1-N** avec d'excellents rendements. Les réactions de couplage sont efficaces quelque soit la longueur de chaîne pour l'aminoalkylbisphosphonate et quelque soit la nature du dérivé acrylique. Les (méth)acrylamides bisphosphonates présentant une courte chaîne (n=2,3,5) sont obtenus sous la forme d'huile alors que pour des longueurs de chaîne supérieure, ils sont obtenus sous la forme de solide.

Les temps de réaction dépendent aussi de la nature du bisphosphonate. Il faut entre 12 et 36 heures pour que la réaction soit complète. Les temps les plus longs sont observés pour les bisphosphonates à longue chaîne.

La structure de tous les composés synthétisés a été confirmée, par RMN ^{31}P , ^1H , ^{13}C , spectroscopie infrarouge et par spectrométrie de masse pour quelques uns. En effet, les produits obtenus présentent notamment un singulet en RMN ^{31}P , comme attendu pour des bisphosphonates symétriques, entre 18 et 20 ppm (*Tableau 6*). Le spectre RMN ^{13}C confirme la structure des composés. On observe notamment les signaux caractéristiques de la double liaison à 139,4 et 120,6 ppm. Un triplet très caractéristique des groupements acide hydroxyméthylène bisphosphonique est également visible à 74,3 ppm avec une constante de couplage $^1J_{\text{C-P}}$ de 133,9 Hz. Le carbone du groupe CH₂ lié au carbone central résonne à 23,4

ppm sous forme d'un triplet avec une constante de couplage $^2J_{C-P}=6,3$ Hz et le carbone méthylénique apparait à 17,8 ppm.

Le spectre infrarouge montre l'apparition d'une bande caractéristique de la double liaison de l'éthylénique à 1653 cm^{-1} , une bande à 1665 cm^{-1} pour le carbonyle de la fonction amide, une bande à 3374 cm^{-1} pour les liaisons O-H, une bande à 1172 cm^{-1} pour la liaison P=O et une bande à 1060 cm^{-1} pour la liaison P-O.

IV.4.1.2. Couplage entre un dérivé acrylique pégylé et un aminoalkylbisphosphonate via une liaison amide (HMBPM2-N)

Une deuxième classe de monomères appelée **HMBPM2-N** contenant un motif PEG a été synthétisée. L'introduction du motif PEG permet d'améliorer la furtivité et ainsi augmenter le temps de présence dans le système physiologique.

La synthèse des **HMBPM2-N** a été d'abord envisagée en 3 étapes en utilisant le PEG-méthacrylique commercial. L'introduction du motif aminoalkylbisphosphonate ne peut se faire qu'après oxydation de la fonction alcool primaire du PEG. Plusieurs essais d'oxydation directs ont été réalisés à l'aide de réactifs usuels tel que le réactif de Jones ($\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$) ou le permanganate de potassium. Le schéma général d'oxydation est indiqué *Schéma 42*.

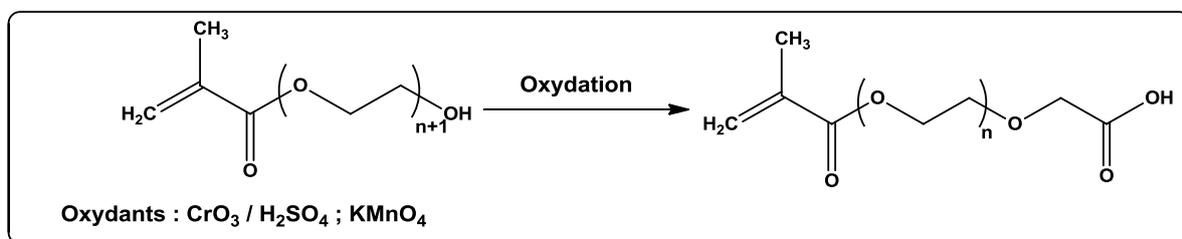


Schéma 42 : Oxydation de l'alcool méthacrylique pégylé par des oxydants forts.

Dans un premier essai, le PEG méthacrylique ($n=9$) a été solubilisé dans de l'acétone et ajouté goutte à goutte sur une période de deux heures à 0°C , au réactif de Jones préparé à partir d'oxyde de chrome et d'acide sulfurique. Le milieu réactionnel est ensuite agité à température ambiante et l'avancement de la réaction suivi par CCM. Après 48 heures, elle n'évolue plus. Le milieu réactionnel est donc évaporé et le composé attendu extrait à l'éther. Les analyses du produit brut obtenu montrent que le produit d'oxydation est présent en mélange à 67%. En effet, la formation de l'acide carboxylique est bien confirmée en spectroscopie infrarouge avec l'apparition d'une bande de vibration à 1714 cm^{-1} correspondant à la liaison carbonyle

de l'acide, tandis qu'une large bande correspondant à une liaison OH est toujours présente à 3500 cm^{-1} . De plus, le spectre RMN ^{13}C obtenu montre la présence du pic du carbone du carboxyle de l'acide à un déplacement chimique de 172 ppm. Cependant, nous constatons également la présence de l'alcool de départ avec notamment un signal à 61,4 ppm attribué au dernier CH_2 lié à la fonction alcool terminale du PEG-méthacrylique.

Les différents essais de purification par chromatographie ne nous ont pas permis de séparer l'alcool de l'acide carboxylique. C'est pourquoi, nous avons testé un autre oxydant, le permanganate de potassium. La réaction est réalisée dans l'eau à température ambiante pendant 24 heures. L'analyse en RMN ^{13}C montre la présence de plusieurs produits.

L'acide carboxylique est le produit majoritaire mais la présence de produits secondaires difficilement séparables rend ce procédé non approprié.

La formation de sous-produits dans ces réactions d'oxydation nous a alors conduit à envisager une autre stratégie. Nous avons donc procédé en deux étapes : une première oxydation de l'alcool primaire en aldéhyde *via* une réaction de Swern suivie par une oxydation douce par du chlorochromate de pyridinium et d'acide périodique (*Schéma 43*).

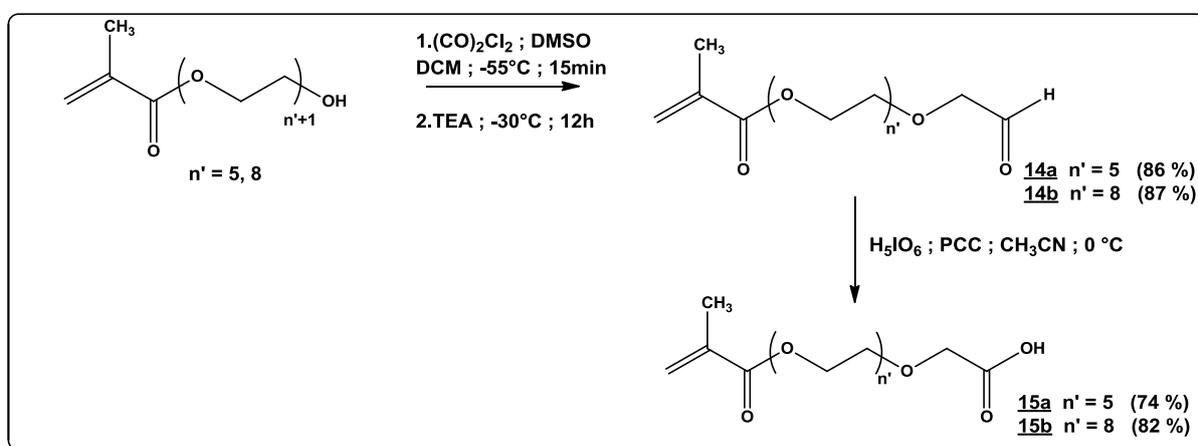


Schéma 43: Synthèse de l'acide méthacrylique PEG.

La synthèse de ces monomères débute avec une oxydation de Swern²⁴⁵ de la fonction alcool terminale du PEG méthacrylique ($n'=5$, $n'=8$). Cette réaction a lieu en présence de chlorure d'oxalyle et de DMSO dans du dichlorométhane, à basse température (-55°C). Le mélange réactionnel a été agité pendant une nuit à température ambiante, puis hydrolysé. La phase

aqueuse est alors extraite avec du dichlorométhane et les phases organiques lavées successivement par HCl (20%), NaHCO₃ (5%) puis séchées et évaporées sous vide. L'aldéhyde isolé est obtenu avec des rendements de 86 et 87% et caractérisé par RMN. Le spectre obtenu en RMN ¹³C notamment montre un déplacement du signal du CH₂ qui portait la fonction alcool de 61,4 ppm à 68,5 ppm après oxydation. De plus, la présence de la fonction aldéhyde est confirmée par un pic en RMN ¹³C aux alentours de 200,7 ppm, caractéristique des carbonyles d'aldéhydes, en RMN ¹H, on observe un singulet à 9,67 ppm correspondant au proton porté par l'aldéhyde. Le spectre IR de l'aldéhyde montre l'apparition d'une bande C=O aux alentours de 1726 cm⁻¹ et la bande à 2734 cm⁻¹ caractéristique du proton de la fonction aldéhyde.

La deuxième étape consiste à oxyder cet aldéhyde en acide carboxylique²⁴⁶. Une préparation facile et quantitative des acides carboxyliques par le chlorochromate de pyridinium (PCC) en quantité catalytique (2% molaire) en utilisant 2,2 équivalents d'aldéhyde et 1,1 équivalents d'acide périodique H₅IO₆ dans de l'acétonitrile est utilisée ici. En résumé, le chlorochromate de pyridinium s'est avéré être un catalyseur efficace et facile pour l'oxydation des aldéhydes, en utilisant l'acide périodique comme co-oxydant. Cette procédure donne des composés carboxylés avec des rendements élevés dans un temps court.

Dans notre cas, il a été constaté que le temps de réaction dépendait de la quantité d'aldéhyde utilisée. En effet, pour 32 mmoles d'aldéhyde, il a fallu 1h30 de temps de réaction, tandis qu'en doublant la quantité d'aldéhyde, le temps de réaction passe à 2h30. La réaction est suivie par CCM (éluant : 95% DCM/5% éthanol). Après des lavages successifs par des solutions de NaCl et de NaHSO₃, le produit brut est séché sous vide à 100°C afin d'éliminer toute trace d'eau. L'acide carboxylique est alors obtenu avec des rendements de 74 à 82%. L'obtention de l'acide pur sous forme d'huiles est confirmée en RMN et IR. Le spectre IR montre la disparition de la bande caractéristique du H de l'aldéhyde et l'apparition d'une large bande caractéristique des hydroxyles à 3105 cm⁻¹. En RMN ¹³C, le signal caractéristique du C=O de l'aldéhyde à 200,7 ppm se déplace aux alentours de 172 ppm dans le cas de l'acide. Le chlorure d'acide correspondant **16a-b** a ensuite été préparé selon une méthode classique utilisant le chlorure d'oxalyle dans du dichlorométhane à température ambiante.

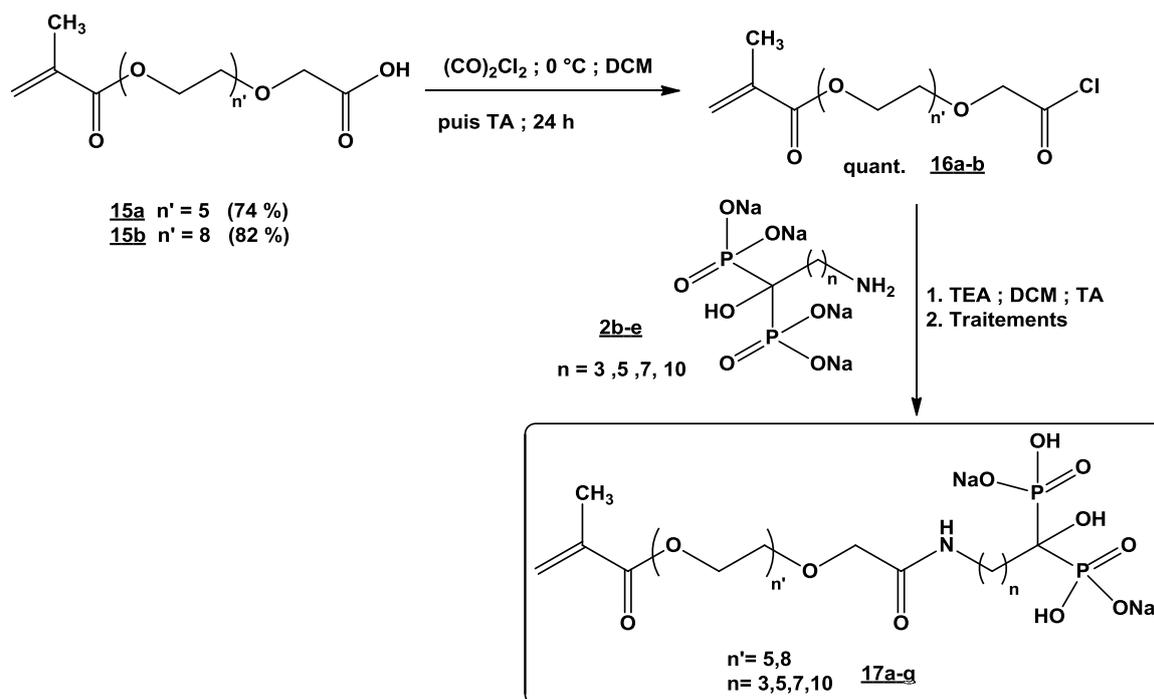


Schéma 44 : Schéma de synthèse des **HMBPM2-N**

Le mélange réactionnel a été agité une nuit, puis l'excès de chlorure d'oxalyle a été éliminé sous pression réduite à 40°C. Après plusieurs co-évaporations avec de l'éther et du dichlorométhane, le chlorure d'acide est obtenu avec un rendement quantitatif et est directement utilisé sans aucune autre forme de purification. Le chlorure d'acide est caractérisé en IR et RMN. Le spectre IR montre la formation de la bande du chlorure d'acide à 1804 cm^{-1} et la disparition de la large bande de la fonction OH. En RMN ^1H , on constate le déplacement du CH_2 en α du carbonyle de 4,54 ppm au profit d'une bande autour de 4 ppm dans le cas de l'acide.

Les conditions utilisées pour la réaction de couplage sont les mêmes que celles mises au point pour la synthèse des **HMBPM1-N** mais à température ambiante. Le chlorure d'acide est mis en réaction avec la triéthylamine dans du dichlorométhane sous argon. Puis, le bisphosphonate amené à $\text{pH} = 12$ au préalable et lyophilisé, est additionné par petites portions (*Schéma 44*).

L'évolution de la réaction est suivie par RMN ^{31}P . Le temps de réaction est proportionnel à la longueur de la chaîne carbonée du bisphosphonate et au nombre d'unités PEG (*Tableau 7*). En fin de réaction, le milieu réactionnel est extrait à $4,5 \leq \text{pH} \leq 12$ avec du chloroforme et de

l'éther. La phase aqueuse est évaporée sous vide. Les résultats sont présentés dans le *Tableau 7*

Tableau 7: Temps de réaction, rendements et déplacements chimiques en RMN ^{31}P des monomères **HMBPM2-N**

Produit	n'	n	Temps de réaction (h)	Rendement (%)	δ RMN ^{31}P (ppm)
17a	5	3	36	91	18,2
17b		5	48	92	18,7
17c		7	48	84	18,3
17d		10	72	79	18,6
17e	8	3	48	87	18,9
17f		5	72	82	20,5
17g		7	72	74	18,9

Les monomères **HMBPM2-N** sont obtenus purs après échanges cationiques avec une résine Na^+ avec de bons rendements allant de 74 à 92 %. Les produits ciblés **HMBPM2-N** ont été caractérisés par RMN et IR. Le spectre IR montre la disparition de la bande C=O du chlorure d'acide à 1804 cm^{-1} au profit de l'apparition de la bande C=O des amides à 1722 cm^{-1} . La bande de l'ester méthacrylique apparaît également à 1646 cm^{-1} .

En RMN ^{13}C , deux signaux de C=O sont observés à 177,9 et 169,6 ppm correspondant aux deux fonctions carbonyles. On observe également le triplet très caractéristique des groupements acides hydroxyméthylène bisphosphoniques à 73,5 ppm avec une constante de couplage $^1J_{\text{P-C-P}} = 133,4\text{ Hz}$ correspondant au signal des carbones portant les motifs bisphosphonates. Le CH_2 en α du carbone central est présenté sous forme d'un triplet à 22,4 ppm avec une constante de couplage de $^2J_{\text{C-P}} = 7,0\text{ Hz}$. L'analyse en RMN ^{31}P montre la présence d'un pic unique aux alentours de 18 ppm.

Nous avons préféré effectuer cette réaction dans l'acétonitrile car ce solvant est bien adapté à cette synthèse, à température ambiante et sous atmosphère inerte pendant 24 heures. Dans ces conditions, la formation du dérivé imidazole **18a-b** est très rapide et efficace. Le produit est obtenu sous la forme d'une huile claire avec un très bon rendement (95 et 77% respectivement pour $n' = 1$ et 6). Les alcools activés ont été caractérisés en IR, RMN ^{31}P et ^1H .

Le spectre IR montre la disparition de la large bande des hydroxyles au profit de l'apparition des signaux caractéristiques de l'imidazole. On retrouve entre autre le signal $\nu_{\text{C=O}} = 1761\text{cm}^{-1}$. En RMN du proton, on observe les protons du groupement imidazole : un triplet à 8,10 ppm et deux multiplets à 7,33-7,44 ppm et 6,98-7,10 ppm. En RMN ^{13}C , le carbone du carbonyle donne un signal caractéristique de l'imidazole observé à 148,4 ppm.

La réaction de couplage des intermédiaires imidazoles **18a-b** ainsi préparés avec un aminobisphosphonate (alendronate et nérédronate) est ensuite réalisée sans protection préalable des groupes acides phosphoniques, de façon à limiter le nombre d'étapes de synthèse. Comme vu précédemment, l'aminobisphosphonate est utilisé à $\text{pH} = 12$ afin que l'amine soit sous sa forme basique. Dans plusieurs études, Bethel et collaborateurs ont montré que les groupements activés avec le CDI sont raisonnablement stables à l'hydrolyse aqueuse, mais sont extrêmement sensibles aux attaques de nucléophiles. En outre, ils ont constaté que le carbamate formé est stable à température ambiante sur une large gamme de pH (variant de 2,5 à 12). La réaction est donc menée à $\text{pH} = 12$ dans l'eau à température ambiante. Son évolution est alors suivie par RMN ^{31}P , les déplacements chimiques du produit de couplage et de l'aminobisphosphonate de départ étant très légèrement différents. Dans le cas du nérédronate par exemple, le signal observé à 18,5 ppm disparaît au profit d'un pic légèrement plus déblindé à 18,7 ppm. De plus, en RMN ^{13}C , on constate l'apparition du pic correspondant au carbone du carbonyle de la fonction carbamate à 156,5 ppm.

Comme vu ci-dessus dans le cas des PEG méthacrylates, nous avons d'abord effectué la réaction dans de l'eau. L'ajout de l'aminobisphosphonate dilué dans le minimum d'eau, à $\text{pH} = 12$, sur l'alcool activé a permis d'obtenir le produit couplé avec des rendements satisfaisants de l'ordre de 70%. La réaction est suivie à la fois par mesure du pH et par RMN du phosphore.

Les produits de couplage **19a-b** sont extraits à $\text{pH} = 4,5$ dans du chloroforme afin d'éliminer d'éventuelles traces d'alcool méthacrylique et d'imidazole qui n'auraient pas réagi. Les monomères **HMBPM3-N** sont précipités dans de l'éther et dans l'acétone.

Dans ce cas précis, l'aminobisphosphonate de départ peut être séparé par colonne de chromatographie sur silice en phase inverse (éluant : eau/méthanol 95/5). Nous avons pu constater qu'à des pH acides inférieurs à 2,5, les liaisons carbamate et ester peuvent être clivées.

Les produits ciblés sont obtenus sous la forme d'une gomme incolore et caractérisés en RMN et en IR. En RMN ^{31}P , le signal du produit couplé apparaît autour de 18,7 ppm, avec un déplacement chimique très proche de celui du bisphosphonate de départ. En RMN ^{13}C , on constate l'apparition du pic du carbonyle, caractéristique du carbamate, vers 156,5 ppm. La structure du composé est également confirmée en RMN ^1H avec la présence des signaux caractéristiques des protons éthyléniques du méthacrylate (deux singulets à 5,6 et 5,3 ppm), d'un pic à 2 ppm caractéristique du méthyl et des signaux des méthylènes de l'alendronate. Dans le cas du néridronate couplé au méthacrylate par exemple, le signal correspondant au CH_2 lié à la fonction amine primaire du bisphosphonate se déplace de 2,87 ppm à 3 ppm lorsqu'il est couplé au PEG méthacrylate.

IV.4.2.Synthèse de monomères méthacryliques portant un HMBP non azoté avec deux fonctions esters.

IV.4.2.1.Couplage via des liaisons ester (HMBPM4)

Nous nous sommes proposés de synthétiser une nouvelle famille de monomères bi-fonctionnalisés comportant un motif méthacrylique lié à un hydroxyméthylène bisphosphonate non azoté via deux liaisons ester.

➤ Première approche

La première molécule ciblée est le monomère HMBPM contenant deux fonctions esters. Son approche synthétique est envisagée en deux étapes. L'intermédiaire clé est le chlorure d'acide correspondant à l'acide 4-(2-(méthacryloyloxy)éthoxy)-4-oxobutanoïque commercial et comportant le groupement méthacrylate (*Schéma 46*). Celui-ci réagira avec du tris(triméthylsilyl) phosphite pour conduire au bisphosphonate désiré après méthanolyse, selon une méthode mise au point au laboratoire¹⁰⁶.

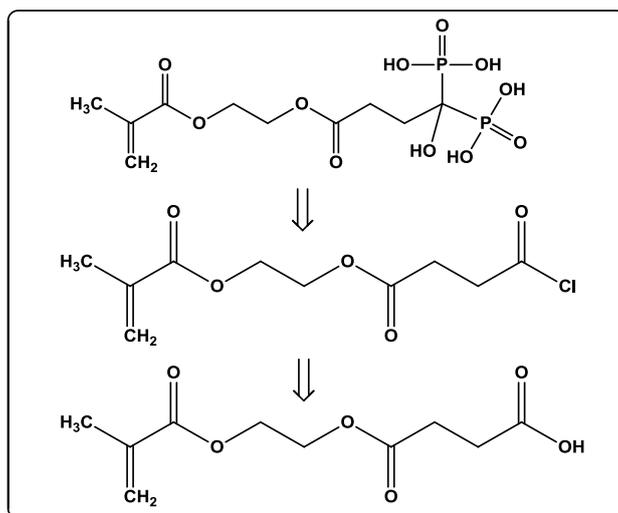


Schéma 46 : Première approche rétrosynthétique des **HMBPM4**

La synthèse du chlorure d'acide est réalisée dans des conditions classiques, utilisant le chlorure d'oxalyle dans du dichlorométhane fraîchement distillé. La réaction est menée sous atmosphère inerte, à reflux pendant 4 heures puis à température ambiante pendant 12h.

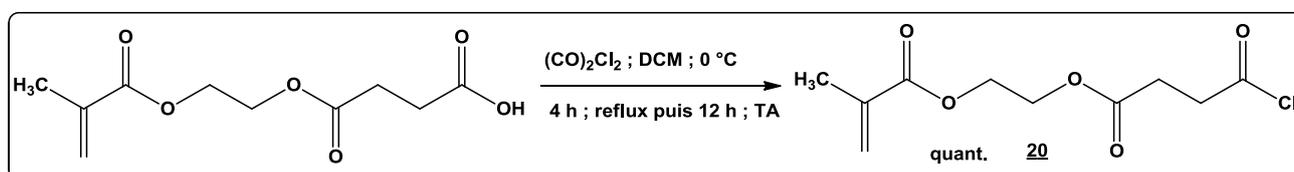


Schéma 47 : Synthèse du chlorure d'acide méthacrylique **20**

Le suivi de la réaction se fait par spectroscopie infrarouge. La disparition de la bande à 1713 cm^{-1} correspondant au C=O de l'acide carboxylique est constatée ainsi que celle de la bande large des hydroxyles, laissant apparaître une bande aux alentours de 1810 cm^{-1} attribuée au C=O du chlorure d'acide. En RMN ^1H , un déplacement de 2,65 à 3,05 ppm correspondant au signal des protons du CH_2 en position du carbonyle est observé, ainsi que la disparition du pic de l'hydroxyle à 11 ppm. Le chlorure d'acide ainsi obtenu est évaporé sous pression réduite. Trois co-évaporations avec du dichlorométhane sont réalisées afin d'éliminer tout l'acide chlorhydrique formé au cours de la réaction.

La méthode développée par le laboratoire¹⁰⁶ a été mise au point pour la synthèse des bisphosphonates. Cette réaction est généralement conduite à température ambiante, les rendements obtenus sont généralement bons et varient entre 80 et 97%.

Le chlorure d'acide ainsi préparé est ensuite mis en réaction avec deux équivalents de tris(triméthylsilyl) phosphite, ajouté goutte à goutte à 0°C sous atmosphère inerte.

Le milieu réactionnel est ensuite ramené à température ambiante et l'évolution de la réaction est suivie par RMN ^{31}P . Après 4h, le pic correspondant au tris(triméthylsilyl) phosphite à environ 140 ppm disparaît pour laisser place au signal du composé attendu autour de 0 ppm. Après évaporation des fractions volatiles sous pression réduite, le résidu brut obtenu (*Schéma 48*) est repris dans du méthanol en présence de la triéthyleamine et agité à température ambiante pendant 4 heures, afin d'hydrolyser les fonctions ester phosphonique silylées

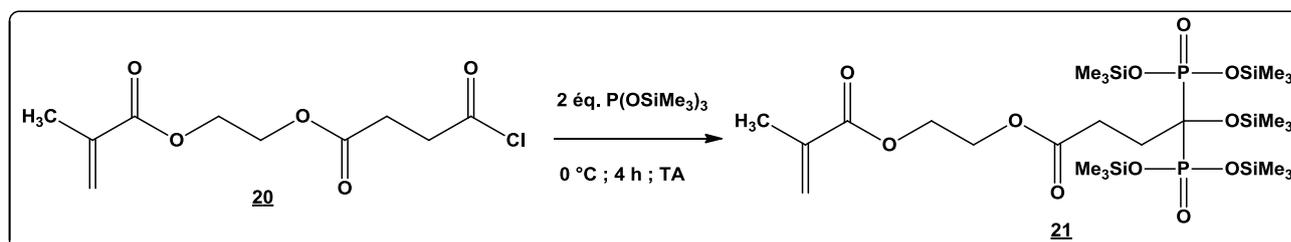


Schéma 48 : Synthèse du méthacrylique bisphosphonate silylé **21**

Concernant le mécanisme de formation du bisphosphonate, une première réaction d'addition-élimination du phosphite sur le carbonyle du chlorure d'acide conduit à la formation d'un sel de phosphonium après départ nucléofuge de l'ion chlorure (*Schéma 49*). Puis, l'attaque nucléophile de l'ion chlorure sur l'atome de silicium de l'un des groupements triméthylsilyl permet la régénération de la double liaison $\text{P}=\text{O}$, conduisant à l' α -cétophosphonate (et à la libération de chlorure de triméthylsilyle). Le deuxième équivalent de tris(triméthylsilyl) phosphite réagit immédiatement sur le carbonyle de ce composé, conduisant à nouveau à un sel de phosphonium. Celui-ci subit ensuite une réaction de transéthérification donnant lieu à un bisphosphonate silylé sur les fonctions ester phosphonique et protégé sous la forme d'éther de silyle au niveau du groupement hydroxyle central.

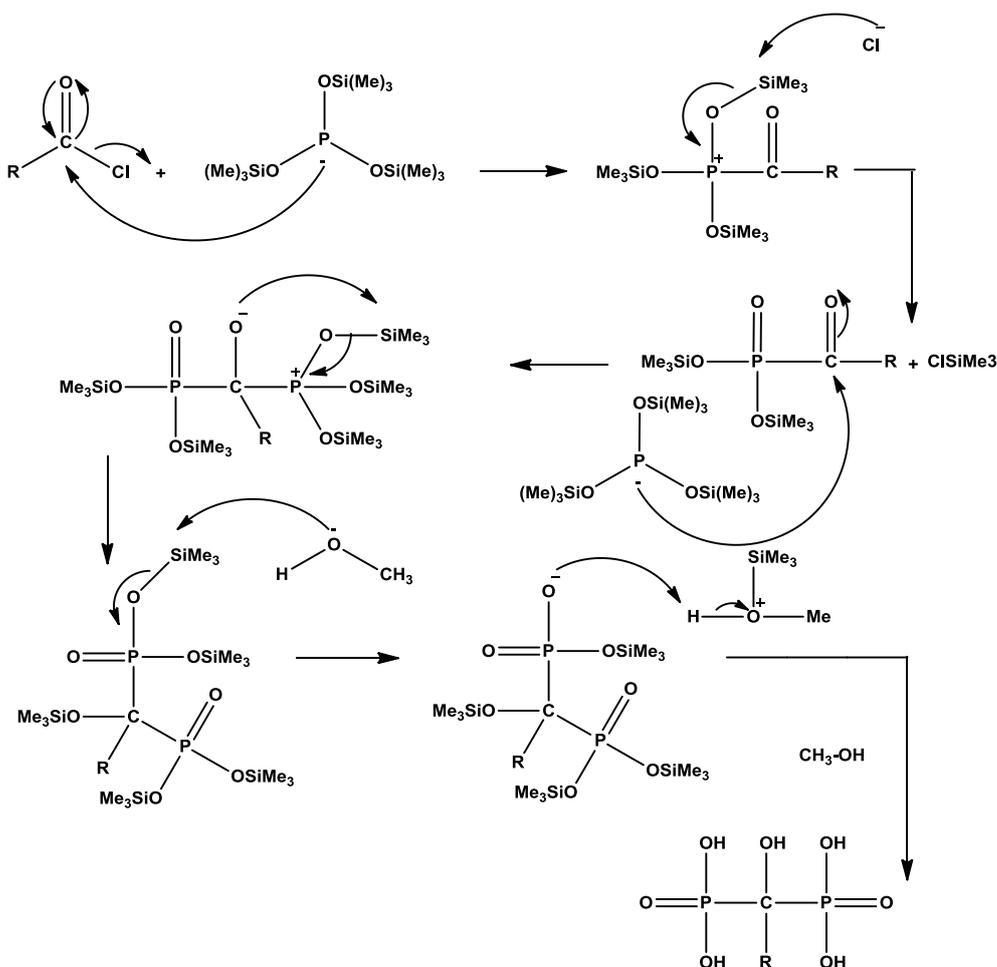


Schéma 49: Mécanisme de synthèse des bisphosphonates via un phosphite silylé

Au cours de la méthanolyse réalisée en présence d'une base telle que la triéthylamine du produit silylé **21**, afin de piéger les éventuelles traces d'acide chlorhydrique qui n'auraient pas été évaporées, un solide précipite. Il est séparé par filtration et la solution méthanolique est évaporée. Le résidu obtenu est caractérisé en RMN du proton. Le spectre réalisé ne présente que les signaux du CH_2 vinylique sous forme de deux doublets vers 5,60 et 6,0 ppm, les 2 CH_2 du motif PEG sous forme de deux multiplets entre 3,71 et 4,17 ppm et le méthyl du méthacrylate sous forme d'un singulet à 1,8 ppm. Ce spectre correspond à celui du HEMA commercial **22**, ce qui suggère une coupure au niveau de la fonction ester. Celle-ci est confirmée par l'analyse du solide séparé qui montre en RMN ^{13}C uniquement un triplet à 75,5 ppm avec une constante de couplage de 131,6 Hz, mais également des déplacements chimiques à 184,5 ppm correspondant au carbonyle et deux autres signaux entre 37,8 et 35,1 ppm attribués à des CH_2 . Le spectre ^{31}P montre un pic unique à 13,7 ppm tandis que la RMN du proton ne montre que la présence de deux CH_2 , confirmant l'obtention de la lactone phosphorée **23** (*Schéma 50*). La formation de ces deux produits peut être expliquée par

l'attaque du OH porté par le carbone central du bisphosphonate une fois la méthanolyse réalisée, sur la fonction ester. Cette attaque conduit alors à la rupture de la liaison ester et à la formation d'un cycle à cinq chaînons stable thermodynamiquement, comportant une lactone. Il est à remarquer que nous n'avons pas observé de produit d'addition de Michael sur le dérivé acrylique.

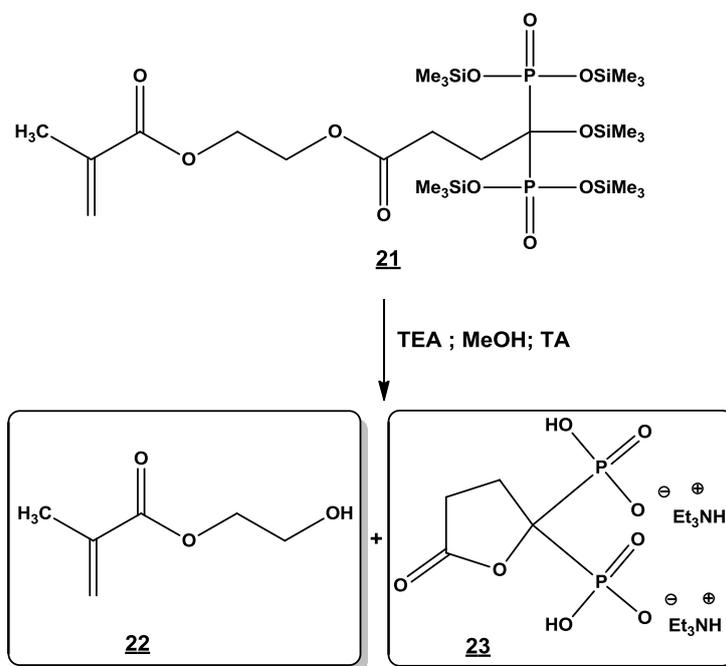


Schéma 50 : Hydrolyse du méthacrylique bisphosphonate silylé **21** avec formation de l'alcool méthacrylique **22** et de la lactone **23**

➤ Deuxième approche

La seconde approche que nous avons envisagé consiste à synthétiser le bisphosphonate à partir d'un diacide protégé sous forme ester de méthyle pour l'une des fonctions acides carboxyliques et activé sous la forme de chlorure d'acide pour l'autre fonction acide carboxylique via l'addition de 2 équivalents de tris(triméthylsilyl)phosphite.

La seconde étape est une réaction de transestérification à l'aide d'un ester acrylique substitué par un polyéthylène glycol de longueur variable en milieu basique (*Schéma 51*).

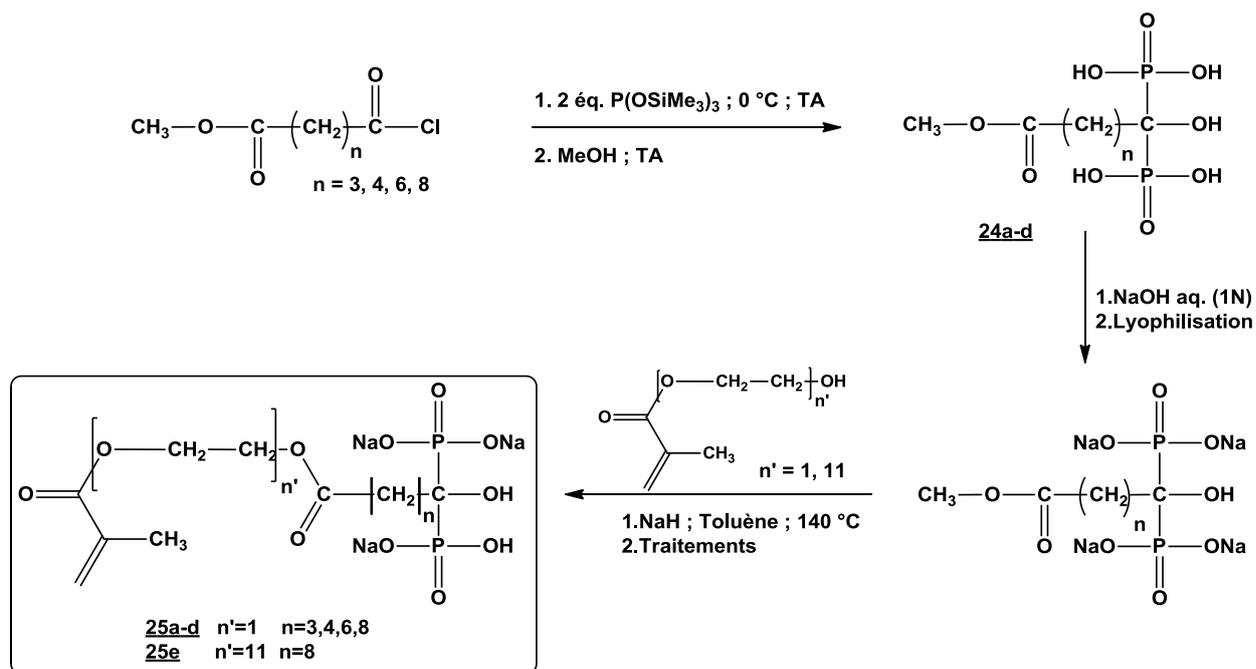


Schéma 51: Schéma de synthèse des **HMBPM4**

Les acides bisphosphoniques **24a-d** ont été synthétisés avec différentes longueurs de chaîne carbonée, selon la méthode des phosphites silylés décrite précédemment. Le produit a été obtenu sans aucune purification nécessaire sous forme d'huile visqueuse avec d'excellents rendements de l'ordre de 90%. Ils ont été caractérisés en RMN et en infra rouge. Par exemple, pour le composé **24a**, le spectre IR montre la disparition de la bande caractéristique des chlorures d'acides vers 1800 cm^{-1} au profit d'une bande large à 3240 cm^{-1} , caractéristique de la fonction alcool, d'une bande à 1180 cm^{-1} caractéristique de la liaison P=O et une bande à 982 cm^{-1} caractéristique de la liaison P-O.

Le spectre RMN ^{13}C vient confirmer la structure du composé. On observe les signaux caractéristiques des groupes méthylènes, ainsi qu'un triplet très caractéristique des groupements acide hydroxyméthylène bisphosphonate à 73,9 ppm avec une constante de couplage $^1J_{\text{P-C-P}} = 134,6 \text{ Hz}$ correspondant au signal des carbones portant les motifs bisphosphonates. De plus, le carbone porté par le CH_2 en α du carbone central est observé sous la forme d'un triplet à 21,5 ppm avec une constante de couplage $^2J_{\text{C-P}} = 5,4 \text{ Hz}$. On observe en RMN ^{31}P un pic unique à 19,4 ppm. En RMN ^1H , le signal des protons du CH_2 lié au carbone tertiaire est modifié d'un triplet à 2,95 ppm pour le chlorure d'acide à un multiplet entre 1,68 et 2,03 ppm dans le cas du bisphosphonate.

Tableau 8 : Temps de réaction, rendements et déplacements chimiques en RMN ^{31}P des monomères **HMBPM4**

Produit	n	Temps de réaction (h)	Rendement (%)	δ RMN ^{31}P (ppm)
<u>24a</u>	3	0h30	94	19,4
<u>24b</u>	4	0h30	90	19,6
<u>24c</u>	6	1	89	19,9
<u>24d</u>	8	1	91	19,8
<u>25a</u>	3	2	84	18,9
<u>25b</u>	4	2	82	19,2
<u>25c</u>	6	3	86	19,3
<u>25d</u>	8	3	92	19,4
<u>25e</u>	8	3	91	19,3

La deuxième étape consiste en une transestérification catalysée par du NaH, entre l'alcool méthacrylique et l'ester hydroxyméthylène bisphosphonique. L'addition de l'hydrure de sodium forme l'alcoolate qui réagit avec l'acide bisphosphonique. La réaction a été effectuée dans le toluène à 140°C à l'aide d'un Dean-Stark. Le produit de couplage a été contrôlé par RMN ^{31}P et un pic aux alentours de 19 ppm est observé. Les produits purs **25a-e** ont été obtenus sous forme de poudre blanche avec de bons rendements de l'ordre de 80-90%, après extraction à pH=7 dans du chloroforme, et sans purification nécessaire. Ils sont caractérisés en RMN et en IR. Le spectre IR montre deux bandes caractéristiques des deux fonctions ester à 1729 et 1731 cm^{-1} . En RMN ^{13}C , on constate la présence des deux pics caractéristiques des C=O à 184,2 et 177,4 ppm.

IV.4.2.2. Couplage du méthacrylique au bisphosphonate via une liaison ester et une liaison éther (HMBPM5)

Afin d'étudier la stabilité de la liaison entre le polymère acrylique et le bras espaceur PEG, nous avons greffé le groupement hydroxyméthylène bisphosphonate via une liaison non hydrolysable en milieu biologique, une liaison éther. L'incorporation du groupement hydroxyméthylène bisphosphonate peut se faire selon deux approches.

a. Première approche

Les **HMBPM5** sont préparés en utilisant le chlorure d'acide synthétisé précédemment **16a-b**, qui réagit avec le tris(triméthylsilyl) phosphite. Le temps de réaction pour la deuxième étape varie.

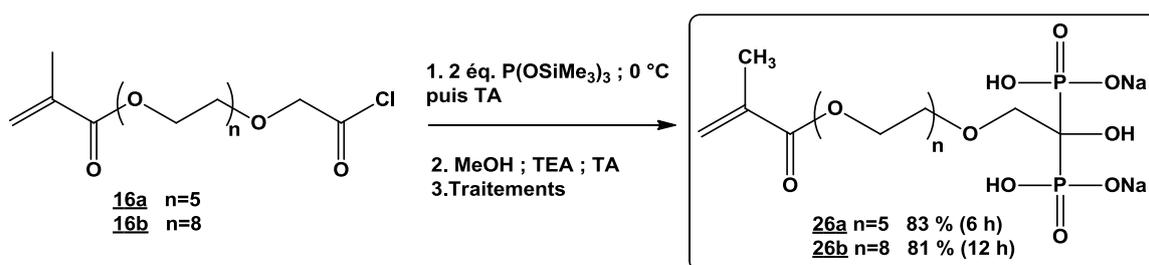


Schéma 52: Synthèse des monomères **HMBPM5**

Les produits sont obtenus sous forme de solides marrons à pH=4,5, après méthanolyse en milieu basique, séchage, précipitation dans l'éther et enfin échange cationique sur une résine Na⁺. Ils sont caractérisés en RMN et IR.

c. Seconde approche

Pour l'obtention de dérivés acryliques avec des bras plus courts, il était nécessaire de développer une stratégie différente. Elle implique la synthèse de dérivés pégylés dissymétriques possédant une fonction alcool primaire d'un côté et une fonction acide carboxylique de l'autre côté. Après activation sous la forme d'un chlorure d'acide, le bisphosphonate est synthétisé via la méthode aux phosphites silylés puis couplé à l'acide acrylique.

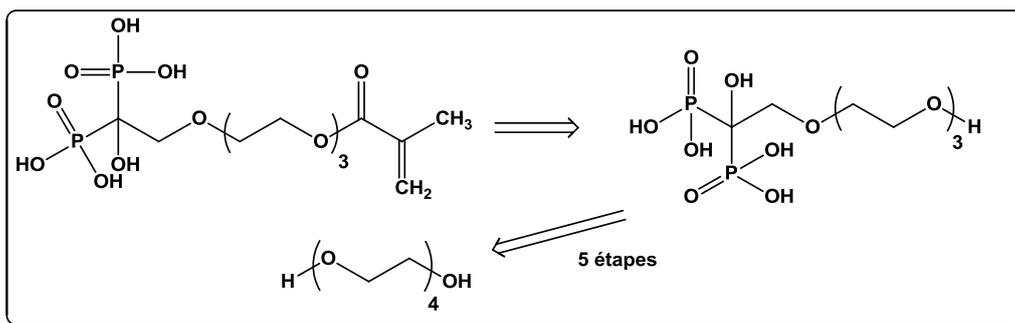


Schéma 53 : Rétrosynthèse du **HMBPM5** comportant 3 motifs PEG

La synthèse du PEG dissymétrique nécessite plusieurs étapes.

Nous avons envisagé sa synthèse en réalisant tout d'abord une monoprotection de l'un des deux alcools du PEG correspondant (*Schéma 54*).

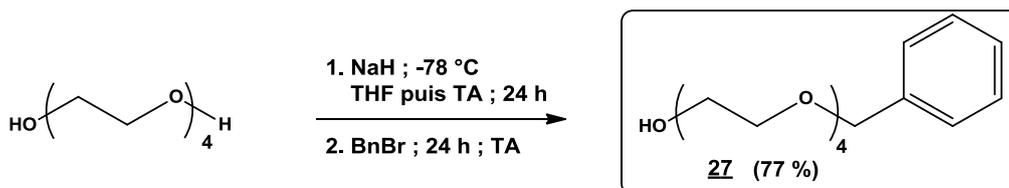


Schéma 54 : Monoprotection du PEG avec un benzyle

Il existe plusieurs groupements protecteurs de ces dérivés, parmi lesquels les éthers benzyliques qui sont aisés à synthétiser. Ils sont obtenus par réaction d'un alcool avec le bromure de benzyle dans des conditions basiques (synthèse de Williamson). Il s'agit de l'attaque d'un ion alcoolate sur un halogénure d'alkyle primaire qui passe par un mécanisme de type SN_2 . Ici, l'hydruide de sodium dans le THF a été utilisé à basse température afin de déprotoner seulement une des deux fonctions alcools du PEG. Après 24 heures d'agitation à température ambiante, le PEG monobenzylé **27** est isolé avec un rendement de 77%.

Les réactions qui suivent consistent à oxyder l'alcool **27** en acide carboxylique **29** via la réaction de Swern qui fournit l'aldéhyde **28** avec un rendement de 89%. Celui-ci est ensuite oxydé en acide carboxylique.

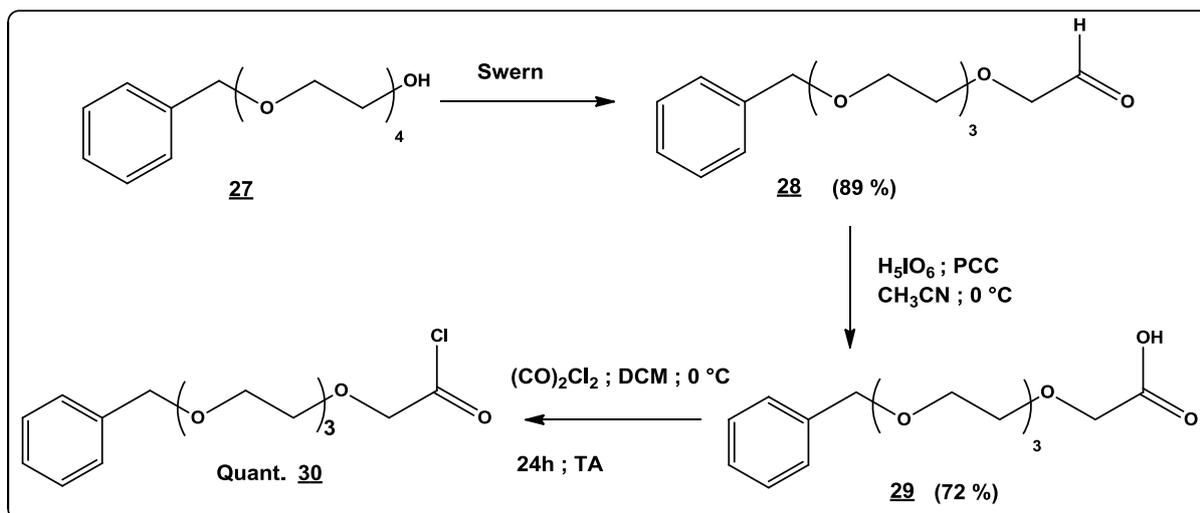


Schéma 55 : Synthèse du chlorure d'acide **30** à partir du PEG monobenzylé **27**.

L'obtention de l'acide carboxylique est confirmée par infrarouge avec l'apparition de la fonction carboxylique à 1757 cm^{-1} . En RMN ^{13}C , on observe le signal du C=O à $172,5\text{ ppm}$. Le produit est obtenu sous forme d'une huile foncée avec un bon rendement de 72%.

La préparation du chlorure d'acide est réalisée à température ambiante avec succès. Sa formation est confirmée par IR avec la disparition de la large bande des hydroxyles à 3062 cm^{-1} et l'apparition de la bande du carbonyle du chlorure d'acide à 1801 cm^{-1} .

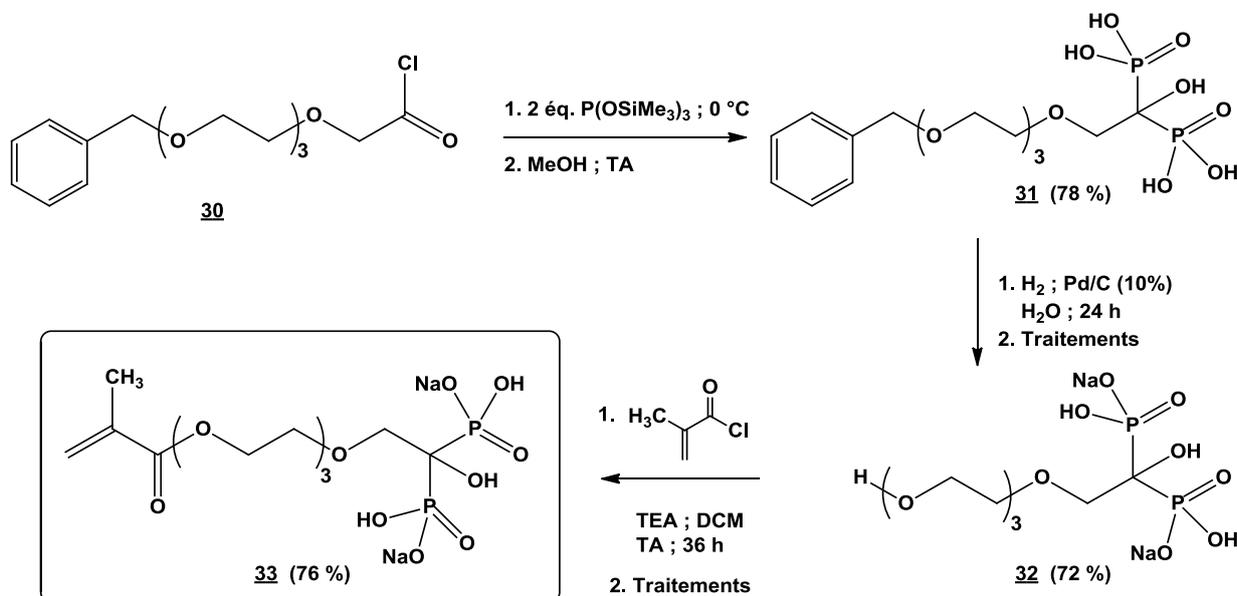


Schéma 56 : Schéma de synthèse du monomère **33** appartenant à la famille **HMBPM5**.

Le bisphosphonate correspondant **31** est obtenu après 24 heures de réaction avec le tris(triméthylsilyl) phosphite à température ambiante. Les fractions volatiles sont évaporées sous pression réduite et le produit est lavé à l'éther pour éliminer l'acide phosphoreux. Le produit pur est obtenu sous forme d'une huile marron avec un rendement de 78%.

Le composé est ensuite caractérisé en RMN du proton, phosphore et carbone.

L'analyse en RMN ^{31}P montre la présence d'un pic unique à 16,8 ppm. Le spectre RMN ^{13}C vient confirmer la structure du composé. En effet, on observe le triplet caractéristique des groupements acide hydroxyméthylène bisphosphonique à 73,4 ppm avec une constante de couplage $^1J_{\text{P-C-P}} = 117,8$ Hz correspondant au signal des carbones portant les motifs bisphosphonates.

L'étape de débenzylation est réalisée par une hydrogénéolyse catalysée par le palladium sur charbon²⁴⁷. La réaction se fait dans l'eau à température ambiante pendant 24 heures. Après filtration sur célite, le composé **32** a été caractérisé en IR et RMN. Le produit pur est obtenu avec un rendement de 72%.

On observe sur le spectre IR la disparition des bandes caractéristiques du groupement benzyl. En RMN du proton, on constate la disparition des protons du cycle aromatique ainsi que celle du pic du CH_2 du benzyle qui résonne à 4,54 ppm.

Une fois la fonction hydroxyle libérée, elle réagit avec le chlorure d'acide méthacrylique. La réaction est régiosélective. Seul l'alcool primaire réagit avec le chlorure d'acide. Le produit attendu est obtenu après 36h à température ambiante, il est solubilisé dans l'eau à pH = 12 est alors lavé au chloroforme (3 x 20 mL) puis à l'éther (3 x 20 mL). La phase aqueuse recueillie est alors amenée à pH = 4 et les mêmes lavages organiques sont effectués.

Le produit **33** est obtenu avec un rendement de 76% sous la forme d'une poudre marron. Il est caractérisé en RMN et IR. La bande $\text{C}=\text{O}$ de la fonction ester du méthacrylique apparaît à 1631 cm^{-1} . En RMN du phosphore, un singulet à 16,1 ppm est observé. Le couplage est confirmé également par la présence des signaux de la double liaison du méthacrylate à 136,2 et 125,7 ppm, ainsi que celle du pic du groupement HMBP à 72,4 ppm avec une constante de couplage de 125,6 Hz en RMN ^{13}C .

IV.4.2.3. Couplage via une liaison amide et une liaison éther (HMBPM6)

Afin de compléter nos séries de monomères, nous avons souhaité remplacer la fonction ester de notre dérivé acrylique PEG bisphosphonate par une liaison amide avec toujours pour objectif l'étude de la stabilité de l'édifice polymère *in vivo* (Schéma 57).

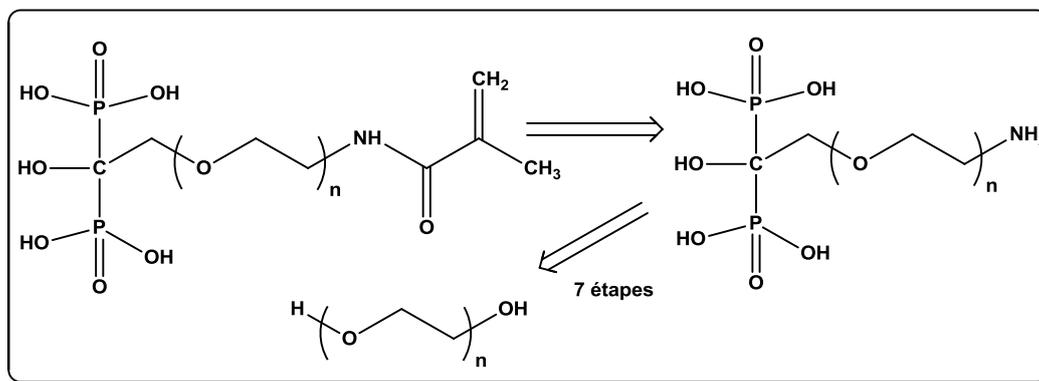


Schéma 57: Schéma rétrosynthétique des monomères **HMBPM6**

L'intermédiaire clé de cette synthèse est le PEG-bisphosphonate portant une fonction amine primaire. Celui-ci sera alors couplé avec un chlorure d'acide méthacrylique via une liaison amide.

La molécule NH₂-PEG-BP est synthétisée selon le *Schéma 58* ci-après. Nous avons utilisé un PEG présentant des longueurs de chaînes carbonées différentes (PEG 200, PEG 300). Comme indiqué, la première étape consiste à effectuer une mono-tosylation du PEG²⁴⁸, en utilisant le chlorure de tosylé en présence d'hydroxyde de sodium dans un mélange eau-THF. Le produit tosylé est obtenu avec un rendement de l'ordre de 95% sous la forme d'une huile, après 3 heures de réaction à 0°C.

La présence du groupement tosyl dans les composés **34a-b** a été vérifiée en RMN et spectroscopie infra-rouge avec la présence des bandes $\nu_{S-O} = 944 \text{ cm}^{-1}$ et $\nu_{S-O} = 1103, 1295 \text{ cm}^{-1}$ pour le composé **34a**. En RMN ¹³C, l'apparition du pic du carbone lié au SO₂ est observée à 144,3 ppm. Cette étape est suivie par un traitement avec de l'azoture de sodium dans le DMF, le mélange s'effectue à température ambiante et la réaction est laissée à agiter à 60°C pendant 5 heures²⁴⁹, afin d'obtenir l'azide **35a-b**.

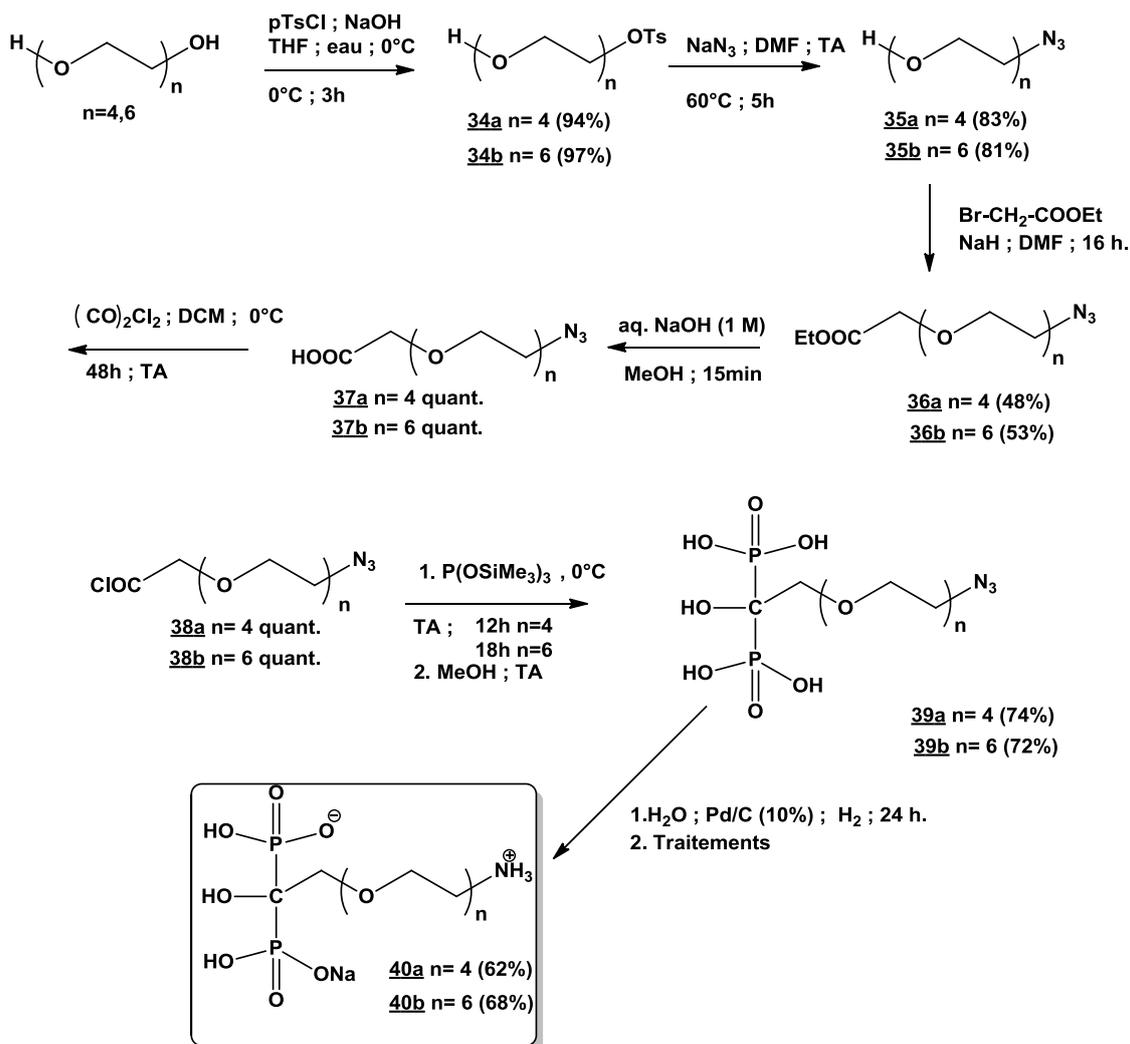


Schéma 58: Schéma de synthèse des amino PEG-bisphosphonate **40**

Ce produit a été confirmé en IR par la présence d'une bande à 2104 cm^{-1} , caractéristique de la fonction azide²⁴⁹. Ce dernier a été mis en réaction avec le bromoacétate d'éthyle, en utilisant l'hydruire de sodium dans du DMF sec dans des conditions inertes à température ambiante. Après agitation du milieu réactionnel pendant 16 heures, l'ester **36a-b** a été obtenu après purification sur colonne de chromatographie (éluant : chloroforme) avec des rendements autour de 50%.

Ces esters ont été par la suite saponifiés dans une solution d'hydroxyde de sodium 1M et du méthanol. L'évolution de la réaction est suivie par CCM. Elle est terminée après 15 minutes d'agitation. L'excès de soude est neutralisé par une résine échangeuse de cations H^+ . Le méthanol est ensuite évaporé, et les produits purs **37a-b** sont obtenus avec des rendements quantitatifs. En spectroscopie infra-rouge, le déplacement de la bande de vibration de la

fonction carbonyle de l'ester aux alentours de 1730 cm^{-1} confirme l'obtention de l'acide carboxylique et l'apparition de la bande OH aux alentours de 3500 cm^{-1} .

L'étape qui suit est la préparation du chlorure d'acide, utilisant les mêmes conditions que précédemment, mais avec un temps de réaction plus long (48 heures) à température ambiante. La formation du chlorure d'acide est vérifiée en spectroscopie infra-rouge par l'apparition d'une bande autour de 1800 cm^{-1} . Les produits sont également caractérisés en RMN ^1H avec le déplacement du signal de 4,16 ppm caractéristique du CH_2 en α du carbonyle de l'acide à 4,51 ppm pour le chlorure d'acide. Après évaporation sous pression réduite et co-évaporations avec du dichlorométhane et de l'éther, le produit est mis en réaction avec le tris(triméthylsilyl)phosphite, selon la méthode utilisée précédemment. Les temps de réaction varient en fonction de la longueur du PEG. En effet, le temps de réaction du composé silylé avec le chlorure d'acide pour le PEG 300 est un peu plus long que celui du PEG 200 : ils sont respectivement de 18 et 12 heures. Les bisphosphonates sont obtenus après méthanolyse à température ambiante pendant une nuit. Ils sont ensuite purifiés par plusieurs précipitations successives dans de l'éther pour éliminer les produits secondaires phosphorés comme l'acide phosphoreux. Les produits sont obtenus sous la forme d'une huile claire avec des rendements de 72 et 74 %. Les bisphosphonates sont caractérisés en IR et RMN.

Le spectre IR montre les bandes caractéristiques de l'hydroxyle à 3325 cm^{-1} , de la liaison $\text{P}=\text{O}$ à 1087 cm^{-1} , de la liaison $\text{P}-\text{O}$ à 947 cm^{-1} et de l'azide à 2132 cm^{-1} . En RMN ^{13}C , le spectre obtenu vient confirmer la structure du composé avec la présence d'un triplet caractéristique de l'acide hydroxyméthylène bisphosphonique à 71,2 ppm et une constante de couplage $^1J_{\text{P-C-P}} = 136,3\text{ Hz}$ correspondant au signal des carbones portant le motif bisphosphonate. Enfin, un signal à 52,5 ppm caractéristique du CH_2 lié à l'azide est également présent.

La dernière étape permettant d'obtenir la molécule **40a-b** consiste à réduire l'azide en son amine correspondante. Cette réduction s'effectue dans l'eau à pH acide, en utilisant le palladium activé sur charbon. La disparition de la fonction azide est contrôlée par spectroscopie infra-rouge par la disparition de la fonction azide à 2132 cm^{-1} au profit de l'apparition de la fonction amine à 3226 cm^{-1} . En RMN ^1H , on peut observer le déplacement des protons du méthylène lié à l'azide autour de 3,4 ppm à environ 3,7 - 3,8 ppm pour l'amine.

Une fois les molécules **40a** et **40b** synthétisées, nous avons tenté de les coupler au chlorure d'acide méthacrylique en adoptant le même protocole que pour les HMBPM1-N. L'essai de synthèse réalisé n'a pas été concluant car la réaction n'est pas achevée dans les mêmes conditions que précédemment.

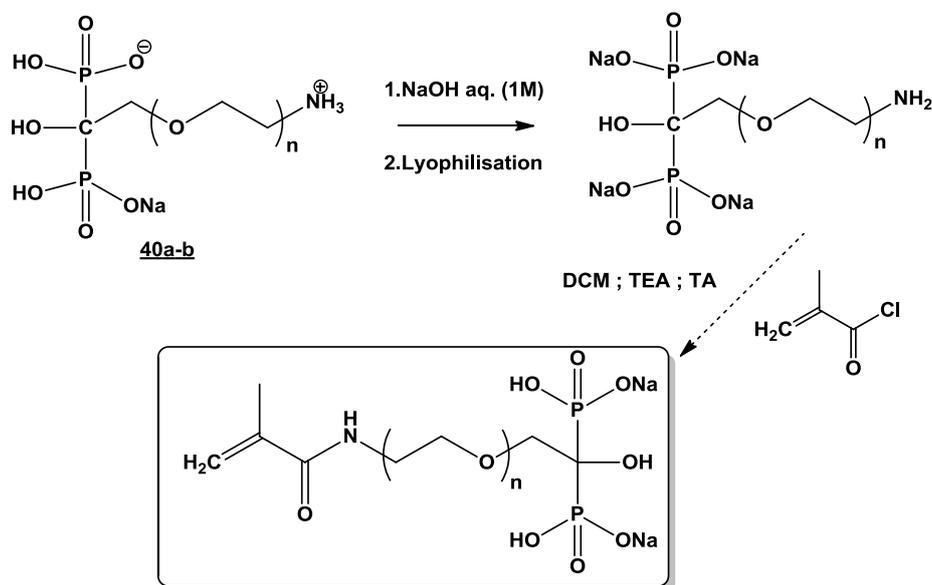


Schéma 59 : Synthèse des monomères **HMBPM6**.

D'autres essais devront être réalisés afin d'optimiser le taux de conversion des molécules **40a** et **40b**.

Nous avons préféré poursuivre ce travail par l'étude de la polymérisation des monomères obtenus.

Conclusion

L'ensemble des composés synthétisés, que ce soit les monomères HMBPMs ou les composés bisphosphoniques montrent que les temps de réaction dépendent de la nature et la longueur de l'espaceur. Ces derniers ont été obtenus après plusieurs étapes de synthèse allant de deux à sept étapes avec de très bons rendements (74 à 94%). Les produits sont obtenus purs après des purifications simples à mettre en œuvre.

CHAPITRE V : CONCEPTION DE COPOLYMERES HPMA /HMBPM VIA LA RAFT

V.1.Introduction

Les polymères conjugués aux médicaments connaissent de nombreuses applications pharmaceutiques depuis ces dernières années.^{250,251} En effet, le concept des polymères conjugués aux PAs a été développé dans le but d'améliorer le manque de spécificité des PAs de bas poids moléculaires vis-à-vis des cellules malignes.

Les PAs conjugués aux macromolécules s'accumulent 10 à 200 fois plus dans les tissus tumoraux que dans les tissus sains et les organes tels que la peau, les muscles, le cœur et les poumons. Ce phénomène est connu sous le nom d'effet de perméabilité et de rétention (EPR).¹²⁵(Chapitre II). La synthèse de polymères conjugués aux médicaments permet donc d'améliorer le ciblage tumoral grâce à l'effet de perméabilité et de rétention ainsi que l'internalisation par endocytose au niveau cellulaire, permettant la libération du PA.²⁵²

Les squelettes polymères les plus utilisés comme vecteurs de PA sont le polyéthylène glycol¹³², le copolymère N-(2-hydroxypropyl) méthacrylamide (HPMA), les polyglycolides (PGA) ainsi que les copolymères polylactides-co-glycolides (PLGA).

Nous avons choisi de préparer des copolymères N-(2-hydroxypropyl) méthacrylamides (HPMA). Ils constituent une plateforme très étudiée dans le domaine des polymères conjugués aux médicaments comme cités ci-dessus.²⁵³⁻²⁵⁵ En effet, des travaux antérieurs montrent que les copolymères HPMA conjugués aux PAs anticancéreuses ont des effets antiprolifératifs notables et inhibent la croissance tumorale chez des modèles d'animaux.²⁵⁴

En raison de la structure non dégradable du squelette polymère HPMA, les masses moléculaires utilisées doivent pouvoir franchir la barrière rénale ($M < 45$ kDa)³. Pour cela, le procédé de polymérisation utilisé pour la conception de ces conjugués doit permettre le contrôle des masses molaires et leur distribution.

Afin de synthétiser ces copolymères HPMA conjugués de structures bien définies, possédant un poids moléculaire avec une distribution étroite, nous nous sommes intéressés à la polymérisation RAFT.^{256,257}

Le choix du squelette polymère « copolymères HPMA » ainsi que l'utilisation de la méthode «RAFT» ont fait l'objet de plusieurs travaux décrits ci-dessous.

V.2.Copolymères HPMA utilisés comme vecteurs d'agents thérapeutiques

V.2.1.Origine

Dans les années 1970, deux brevets ont été déposés concernant la synthèse des N-méthacrylamides substitués contenant des séquences oligopeptidiques et leur application comme vecteurs de principe actif et autres composés biologiquement actifs.²⁵⁸

Les copolymères HPMA sont solubles dans l'eau, neutres et non-immunogènes. Ce sont des vecteurs de PA très prometteurs pour la thérapie anticancéreuse^{3,259,260} car ils présentent un effet de perméabilité et de rétention amélioré.^{128,261} Ainsi, ce type de polymères permet d'augmenter la concentration d'un médicament actif dans les cellules tumorales et de diminuer sa toxicité.²²⁵

Kopeček et collaborateurs ont développé une méthode de synthèse reproductible permettant d'obtenir le monomère HPMA cristallisé après une rapide purification. Ils ont choisi de travailler avec les méthacrylamides N-substitués afin d'éviter l'hydrolyse des chaînes latérales du polymère résultant.²⁶² Le premier essai de polymérisation du monomère HPMA par la méthode RAFT a été réalisé en 2005.²⁶³

V.2.2.Utilisation clinique

Actuellement, plusieurs copolymères HPMA conjugués aux agents chimiothérapeutiques sont utilisés en clinique.²⁵⁹ PK1, un copolymère HPMA dans lequel la doxorubicine est liée au squelette polymère par l'intermédiaire d'un lien tétrapeptidique clivable par voie enzymatique (GFLG) a été le premier polymère conjugué à être testé dans des essais cliniques de phase I. Suite aux résultats encourageants obtenus pour PK1, un deuxième polymère PK2 a été conçu pour cibler spécifiquement les hépatocytes.²⁶⁴ (*Figure 36*)

De nombreux copolymères HPMA liés à des agents anticancéreux ont été conçus, portant simultanément des agents chimiothérapeutiques classiques comme le cisplatine²⁶⁵, le paclitaxel²⁶⁰ et la camptothécine.²⁶⁶ De plus, des copolymères HPMA ont été utilisés pour la conception d'agents d'imagerie, technique dans laquelle les traceurs comme l'iode 131 et le technétium 99 sont utilisés pour visualiser les tumeurs, les métastases et le système vasculaire tumoral²⁶⁷.

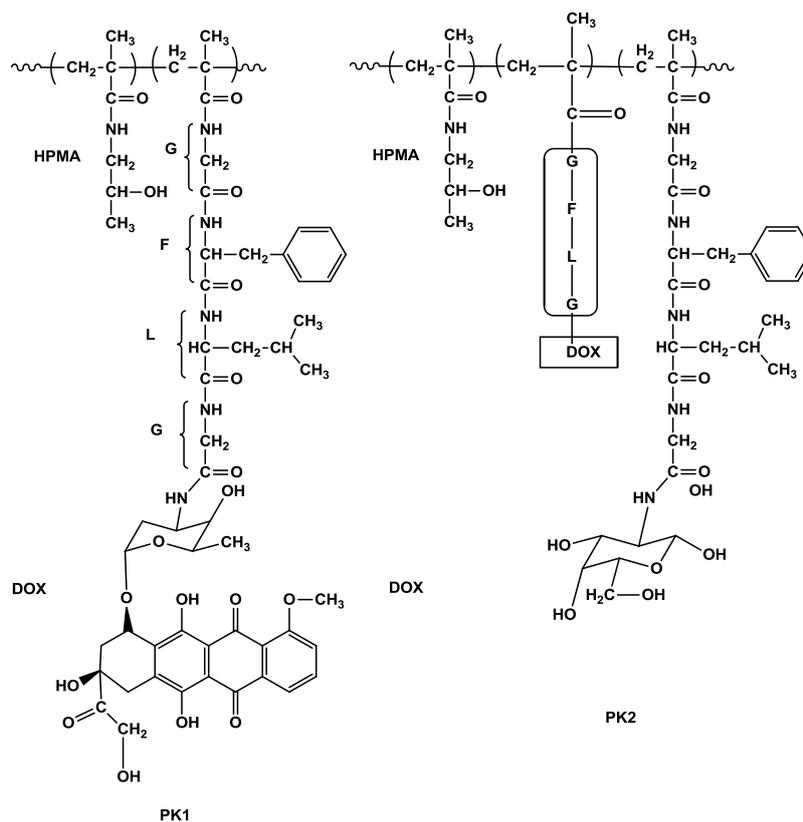


Figure 36 : Structures du PK1 et PK2²⁶⁴

V.2.3. Conception des copolymères HPMA comme vecteurs d'agents thérapeutiques

Il s'agit ici de concevoir un copolymère HPMA dont le squelette linéaire est non dégradable, et de le lier à un PA via un bras espaceur dégradable ou non, greffé par une liaison amide (Figure 37).

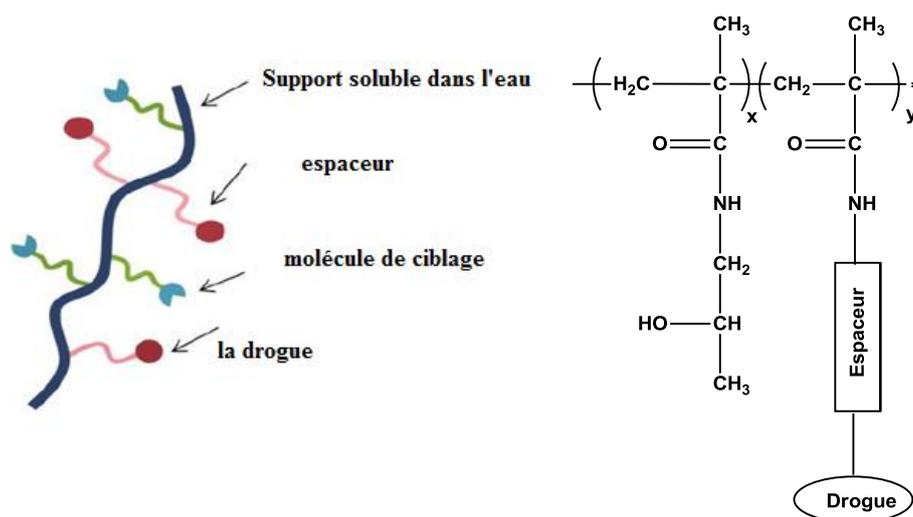


Figure 37: Structure d'un polymère conjugué au PA

Trois méthodes de synthèse de copolymères HPMA conjugués aux médicaments ont été développées :

- La synthèse d'un copolymère HPMA portant un groupement réactif (précurseur de polymérisation), permettant la fixation d'autres composants du système *via* une liaison covalente ;
- La copolymérisation du HPMA avec des comonomères possédant une molécule bioactive (PA et/ou molécule de ciblage) ;
- Une combinaison des deux méthodes : une copolymérisation entre le HPMA et des comonomères contenant des groupements bioactifs et réactifs.²⁶⁸

Il existe deux générations de copolymères HPMA. Les principaux inconvénients des copolymères HPMA de première génération sont leur non-biodégradabilité et leur taille. En effet, ils doivent pouvoir franchir la barrière rénale comme mentionné précédemment (PM<45 kDa). Le temps de circulation de ces copolymères est donc diminué et l'efficacité pharmaceutique décroît également.

La conception de vecteurs copolymères HPMA biodégradables a donc fait l'objet d'études plus approfondies^{269,270}, qui ont abouti à des copolymères de deuxième génération.

Yang et collaborateurs en 2011 ont synthétisé des multiblocs polyHPMA biodégradables.²⁶⁹ Le poly HPMA a été préparé par RAFT en utilisant un agent de transfert de chaîne⁷⁸ contenant un groupement fonctionnel, à savoir une fonction alcyne portant le peptide glycine-phénylalanine-leucine-glycine et l'azobisisobutyronitrile (AIBN) comme initiateur. Le multibloc poly HPMA est quant à lui préparé par « click chemistry ».²⁶⁹

V.3.Polymérisation radicalaire par transfert de chaîne RAFT

V.3.1.Généralités

Au cours de la dernière décennie, trois méthodes de polymérisation radicalaire contrôlée (PRC) se sont largement développées.¹⁷⁸

- Une polymérisation radicalaire stable (SFRP pour «Stable Free Radical Polymerization»);
- Une polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP pour «Atom Transfer Radical Polymerization»);²⁷¹
- Le transfert réversible par addition - fragmentation de la chaîne.²⁵⁶

Les techniques de polymérisation SFRP et ATRP contrôlent la croissance de la chaîne polymère par désactivation réversible (*Schéma 60*).

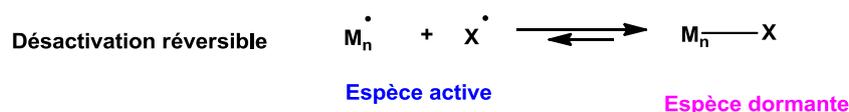


Schéma 60 : Désactivation réversible des espèces radicalaires

A tout instant, l'équilibre est fortement déplacé vers les espèces dormantes (10^{-3} - 10^{-1} mol.L⁻¹) et la concentration instantanée en radicaux propagateurs reste comparativement très faible (10^{-9} - 10^{-7} mol.L⁻¹).

Cette désactivation réversible peut provenir soit d'une réaction de terminaison réversible dans le cas de la polymérisation radicalaire contrôlée par les nitroxydes (SFRP), soit d'une polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome (ATRP). A la fin de la

polymérisation contrôlée, les polymères se retrouvent sous leur forme dormante Mn-X. Si un autre monomère M est ajouté dans le milieu et que l'espèce dormante est ré-activée, le polymère va reprendre sa croissance et un copolymère à blocs de type Mn-*b*-Mp-X sera finalement obtenu.

La méthode SFRP est principalement limitée à cause des hautes températures utilisées (125-140°C) et des temps de réaction longs (1-3 jours).

La principale limitation de l'ATRP provient de la stoechiométrie élevée du complexe de métal de transition qui doit être utilisée (0,1-1% dans le mélange réactionnel). Cette technique entraîne des problèmes de toxicité et de coloration des polymères, qui serait un frein au développement de ce système à l'échelle industrielle.

Enfin, la méthode RAFT (pour «Reversible Addition Fragmentation chain Transfer»), est une méthode développée récemment.²⁷² Son principe repose sur l'utilisation de composés porteurs de groupements thiocarbonylthio (S=C-S) comme agent de contrôle de la polymérisation.

V.3.2.Polymérisation radicalaire par transfert de chaîne RAFT

V.3.2.1.Origine

La polymérisation radicalaire par transfert de chaîne²⁷³ est une technique de polymérisation radicalaire contrôlée rapportée en 1998 par Ezio Rizzardo.²⁷² Elle est décrite comme une méthode de polymérisation radicalaire vivante.^{272,274}

La technique RAFT est une technique polyvalente. Elle permet de polymériser un grand nombre de monomères de type styrénique, acrylate, acrylonitrile, acétate de vinyle, de même que le formamide vinylique, les chlorures de vinyle, les acrylamides ainsi que certains monomères vinyliques.²⁷⁵ La RAFT peut permettre de contrôler le poids moléculaire et la distribution de poids moléculaire. Elle peut également fournir des indices de polydispersité (PDI) compris dans une gamme allant de 1,03 à 1,25.

La polymérisation RAFT met en jeu un système de polymérisation radicalaire classique, auquel un agent de transfert est ajouté. Celui-ci donne lieu durant la polymérisation à des réactions de transfert réversible par addition-fragmentation.

V.3.2.2. Mécanisme de la RAFT

Le mécanisme radicalaire fait intervenir des réactions d'addition-fragmentation réversibles par transfert de chaîne en introduisant une quantité connue d'un composé dithiocarboné à un mélange classique de polymérisation (*Schéma 61*).

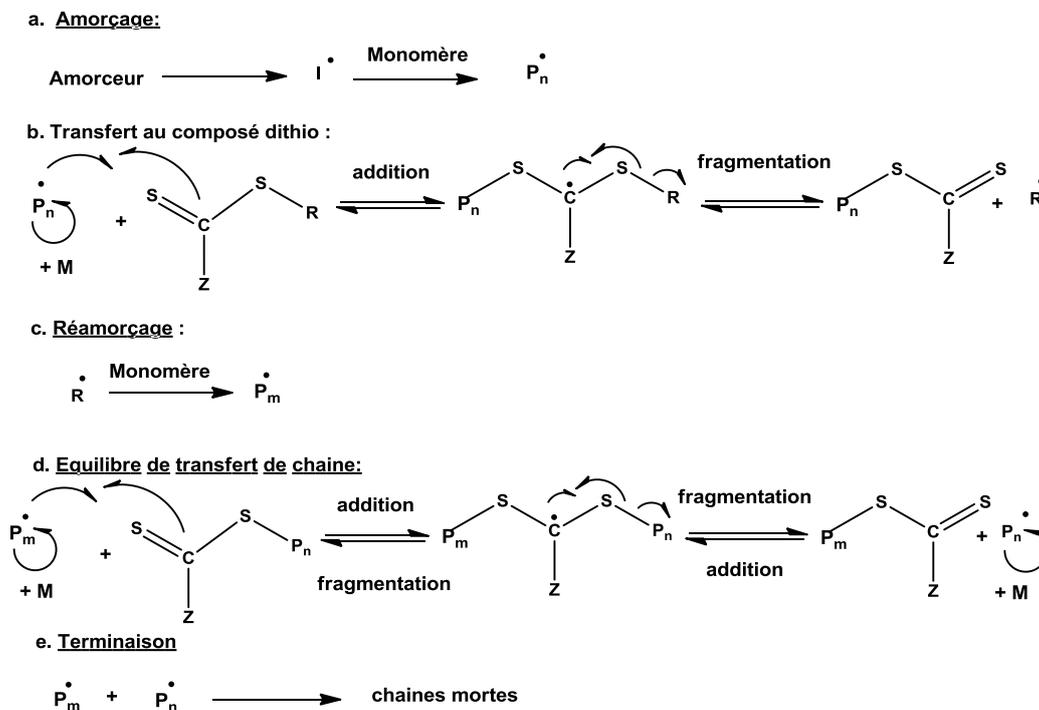


Schéma 61: Mécanisme général de la RAFT par les composés dithiocarbonés.

Dans un premier temps, l'amorçage et la propagation se déroulent pareillement à une polymérisation radicalaire conventionnelle.

L'oligoradical P_n^\bullet s'additionne alors sur la double liaison $\text{C}=\text{S}$ de l'agent de transfert pour générer un intermédiaire radicalaire qui, selon la nature chimique des substituants R et Z , va soit redonner l'oligoradical, soit se fragmenter par β -scission pour former un oligomère avec un groupe dithio²⁶⁶ terminal et un nouveau radical R^\bullet capable de réamorcer la polymérisation (formation de nouvelles chaînes P_m).

Lorsque la proportion en amorceur est suffisamment faible (concentration en agent de transfert \gg concentration en amorceur), la très grande majorité des chaînes portent le groupement dithiocarboné à l'une des extrémités et le polymère est réactivable en vue d'une extension de chaîne. Le nombre total de chaînes est égal à la somme des chaînes issues de la décomposition de l'amorceur et des chaînes formées à partir de l'agent de transfert.

V.3.2.3. Polymérisation RAFT en milieu aqueux

Au cours des dernières années, de nombreuses études ont porté sur des polymérisations RAFT en solution aqueuse homogène ainsi que sur la préparation de systèmes à doubles blocs hydrophiles ou amphiphiles.

Par exemple, l'équipe de McCormick²⁷⁶ a montré que la polymérisation du 4-styrène-sulfonate de sodium peut être contrôlée directement dans l'eau en utilisant l'acide dithiobenzoate cyanopentanoïque comme agent de transfert réversible.

Ces auteurs sont également parvenus à contrôler la polymérisation en milieu aqueux de monomères comme le N,N-diméthylacrylamide²⁷⁷ et les acrylamides anioniques²⁷⁸, en transposant les résultats obtenus par Ganachaud et collaborateurs²⁷⁹. Ces derniers avaient développé un système de polymérisation en solution dans le benzène ou le dioxane.

V.3.3. Rôle des différents constituants

V.3.3.1. Choix de l'initiateur

Le choix de l'amorceur thermique est également un facteur important dans le contrôle d'une polymérisation RAFT. Tous les amorceurs conventionnels peuvent être utilisés dans ces procédés. Les températures de réaction mises en jeu varient entre 60 et 110°C.

Le choix de l'initiateur est dépendant à la fois de son temps de demi-vie à la température de réaction désirée et de sa capacité à initier la polymérisation vis-à-vis du monomère utilisé. Plus le temps de demi-vie de l'initiateur est long, plus la durée de la production de radicaux est grande. De ce fait, la polymérisation RAFT est maintenue active pendant une période plus longue.²⁸⁰

V.3.3.2. Choix du solvant

Les polymérisations peuvent se dérouler en masse (sans solvant) ou en solution. Ainsi, des solvants comme l'eau, le benzène, le toluène, le DMF, le THF, le dioxane ou l'acétate d'éthyle sont utilisés comme solvant de polymérisation dans la méthodologie RAFT. Le choix du solvant dépend essentiellement de la solubilité du monomère et du polymère formé. Un milieu réactionnel homogène est favorable pour permettre les échanges interchaînes.

V.3.3.3.Choix de l'agent de transfert

La méthodologie RAFT se caractérise par l'emploi d'un agent de transfert réversible porteur de groupements thiocarbonylthio (C(S)-S). Ces agents sont composés de groupements Z et R de structures variables (*Figure 38*). Cette variabilité influe sur l'efficacité de ces agents pour contrôler la polymérisation.

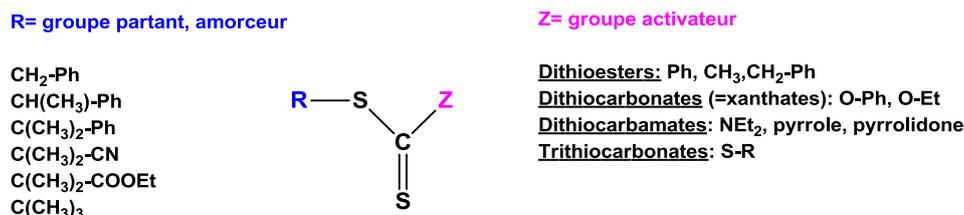


Figure 38 : Différentes familles d'agents de transfert

Comme indiqué à la *Figure 38*, selon la nature de R et Z, il existe une grande variété d'agents de transfert utilisés dans la polymérisation de type RAFT. Les composés thiocarbonylthio sont répertoriés par famille selon la nature chimique du groupement Z activant. Les dithioesters, les dithiocarbamates, les xanthates et enfin les trithiocarbonates sont les quatre grandes familles d'agents de transfert utilisés dans les procédés RAFT.

Des exemples de CTA portant un groupement acide carboxylique souvent utilisés sont présentés à la figure 39 tels que l'acide dithiobenzoate 4-cyanopentanoïque (CTP), le S,S'-bis(acide α,α' -diméthylacétique) trithiocarbonate (CMP), l'acide 2-[[[(éthylthio)carbonothioyl]thio]-2-méthylpropanoïque¹¹⁹, l'acide 2-[[[(dodécylthio)carbonothioyl]thio]-2-méthylpropanoïque (DMP), et enfin l'acide 2-cyano-2-[[[(dodécylthio)carbonothioyl]thio]propanoïque (CDMP).¹⁷⁸

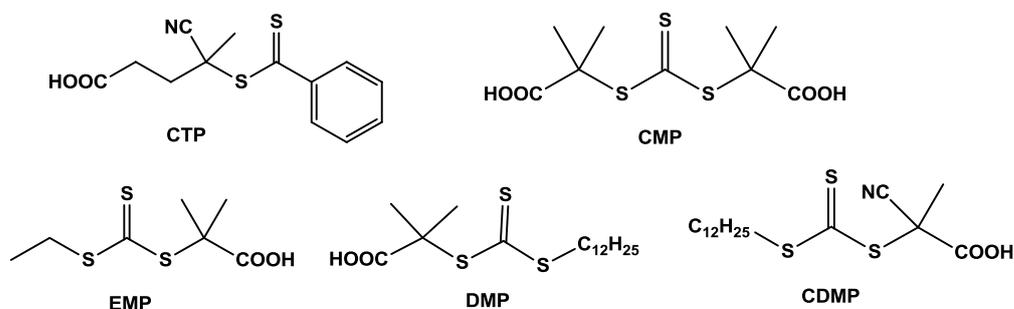


Figure 39 : Structures des agents de transfert de chaîne

Le choix de l'agent RAFT en fonction des conditions de synthèse et notamment en fonction du monomère se révèle crucial dans la qualité du contrôle de la polymérisation.

La nature des groupements R et Z joue un rôle très important. Afin de bien contrôler la polymérisation, il faut :

- que la liaison C=S soit réactive vis-à-vis de l'attaque radicalaire, c'est-à-dire que la constante de vitesse d'addition du radical en croissance sur la liaison C=S soit élevée ;
- que la fragmentation des radicaux intermédiaires soit rapide ;
- que la fragmentation soit favorisée du côté du groupe partant et non du côté de la chaîne qui vient de s'ajouter ;
- que le radical R[•] réamorçe la polymérisation de manière efficace.

Le groupement Z influe sur l'étape d'addition d'un radical sur la liaison C=S. La plupart des radicaux attaquant la liaison étant nucléophiles, l'addition est d'autant plus favorable que la liaison est « pauvre » en électrons. Les groupements électroattracteurs favorisent l'addition, alors que les groupements électrodonneurs la défavorisent.

L'efficacité des groupements Z pour l'activation de la liaison C=S dans l'étape d'addition décroît dans l'ordre suivant : dithiobenzoates > trithiocarbonates > dithiocarbonates > dithiocarbamates. Le groupement Z joue également un rôle dans la stabilisation du radical intermédiaire formé, suite à l'addition du radical propageant sur la liaison C=S. Cette stabilisation doit être minimisée afin de permettre la fragmentation ultérieure du radical intermédiaire.

Le groupement R quant à lui agit sur l'étape de fragmentation d'une part et sur l'étape de « réamorçage » d'autre part. Pour ce qui est de l'étape de fragmentation, R doit être un bon groupe partant par rapport à l'oligoradical propageant qui s'est additionné sur la liaison C=S. Dans ce contexte, il apparaît une fois encore que le choix du groupement R de l'agent RAFT dépend du monomère utilisé : les groupements R donnant lieu à des radicaux secondaires sont de bons groupes partants lorsque le monomère mis en jeu est un acrylate. En revanche, ils sont de mauvais groupes partants lorsque le monomère qui est en jeu est un méthacrylate.

En pratique, il s'avère que jusqu'alors ce sont les dithiobenzoates qui ont été les plus utilisés, du fait de leur forte activation. Ils sont notamment utilisés dans les systèmes mettant en jeu les espèces radicalaires les moins actives, comme par exemple les méthacrylates.²⁸¹

L'utilisation des trithiocarbonates comme agents de transfert réversibles pour la polymérisation radicalaire contrôlée du styrène et des (méth)acrylates d'alkyle a également été décrite par Rizzardo et collaborateurs.²⁸² Ces agents possèdent deux sites d'addition et de coupure car il s'agit d'une molécule symétrique. Les groupes R partants et Z activants ont la même structure. Le fait d'utiliser des agents de transfert de structure symétrique (R=Z) permet la croissance des chaînes polymères de part et d'autre des atomes de soufre ainsi que la préparation ultérieure de copolymères triblocs de type ABA en deux étapes.

Plusieurs modifications chimiques d'agents de transfert ont été réalisées afin de synthétiser de nouveaux agents RAFT utilisés pour cette polymérisation tels que le trithiocarbonate biotinylé.²⁸³ En effet, l'affinité entre la biotine et les protéines telles que l'avidine et la streptavidine est très forte. Ainsi, les polymères conjugués aux protéines peuvent être facilement synthétisés à partir de polymères ayant une extrémité contenant la biotine qui leur permettra la conjugaison aux protéines.

Malgré le succès du procédé de polymérisation RAFT, quelques inconvénients sont observés :

- il s'agit d'une polymérisation qui nécessite la synthèse des agents de transfert ;
- la fragmentation de l'espèce n'est pas toujours immédiate, ce qui entraîne un retard à la polymérisation ;
- les polymères obtenus sont généralement colorés et les polymères peuvent avec le temps dégager une odeur désagréable provenant de la décomposition de la fonction thiocarbonylthio. Ce problème peut être résolu en modifiant la structure chimique de cette fonction.
-

V.4. Etat de l'art sur la polymérisation RAFT des copolymères HPMA utilisés comme vecteurs

Actuellement, le facteur limitant pour la synthèse de conjugués copolymères HPMA-médicaments est la capacité de contrôler la polymérisation radicalaire du monomère et par conséquent, le poids moléculaire ainsi que la distribution du poids moléculaire du polymère résultant.

McCormick et collaborateurs sont les premiers à avoir utilisé le procédé RAFT sur le HPMA.²⁶³ Pour cela, l'acide dithiobenzoate 4-cyanopentanoïque est utilisé comme agent de transfert de chaîne et l'acide 4,4'-azobis(4-cyanopentanoïque) est utilisé comme initiateur, la

polymérisation s'effectuant à 70°C. En utilisant un tampon acide acétique/acétate de sodium, le polymère est obtenu avec des rendements élevés et un faible indice de polydispersité. La méthode RAFT se définit comme une polymérisation vivante car elle permet d'ajouter des quantités supplémentaires de monomères.²⁸⁴ Afin de lier le PA au copolymère HPMA, Yanjarappa et son équipe ont préparé des copolymères HPMA homogènes contenant des groupes ester fonctionnels actifs.

Afin d'améliorer la solubilité de la cyclophosphamide et diminuer sa toxicité systémique, il a été conjugué au copolymère HPMA. HPMA est d'abord copolymérisé avec la N-méthacryloyl-glycine-phénylalanine-leucine-glycine-thiazolidin-2-thione en utilisant la technique RAFT. La cyclophosphamide est ensuite greffée au copolymère à 50°C pendant 20 heures en présence de pyridine. La sélectivité du conjugué a été évaluée sur des cellules RC-92a/hTERT, cellules épithéliales prostatiques cancéreuses humaines. L'activité biologique de la cyclophosphamide a été conservée après conjugaison avec le polymère. En outre, le conjugué copolymère HPMA-cyclophosphamide a montré une efficacité anticancéreuse sur les cellules RC-92a/hTERT²⁵⁴.

Ulbrich et collaborateurs en 2013²⁸⁵ ont synthétisé des copolymères HPMA avec une terminaison de chaîne portant un groupement réactif (azide, propargyl, thiazolidin-2-thio, amino, hydrazide) destinés à être conjugués à des PAs. La conception de ces copolymères a été réalisée par la RAFT en une seule étape avec des taux de conversion élevés, le groupement réactif ayant été obtenu grâce à une modification de l'agent CTA ou de l'initiateur.

De nouvelles générations de copolymères multiblocs peptidiques (HPMA(MP-PTX))²⁸⁶ ont été synthétisés via la méthode RAFT. Des tests *in vitro* ont été réalisés sur des lignées cellulaires, comme les carcinomes ovariens. Les résultats montrent une augmentation du temps de circulation dans le sang de ces polymères conjugués, une efficacité antitumorale, ainsi qu'une faible toxicité.²⁸⁶

Pan et collaborateurs²⁸⁷ ont étudié l'activité antitumorale des copolymères multiblocs N-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide (HPMA)-doxorubicine (DOX) sur le cancer de l'ovaire humain A2780/AD chez la souris nude en fonction du poids moléculaire. Cette étude révèle une augmentation de l'activité du multibloc comparée au copolymère traditionnel HPMA conjugué à la doxorubicine (première génération). De plus, ces multiblocs ne montrent aucun effet secondaire.

Nous allons à présent discuter des résultats préliminaires obtenus lors de premiers essais concernant l'application de la technique RAFT aux copolymères HPMA/HMBPM.

V.5.Résultats et discussion de la synthèse RAFT des copolymères HPMA/HMBPM

L'objectif de notre travail est de synthétiser des copolymères statistiques biologiquement actifs via la polymérisation radicalaire contrôlée RAFT du monomère HPMA avec un comonomère fonctionnel phosphoré HMBPM (*Figure 40*). Ces copolymères doivent posséder des masses molaires moyennes ne dépassant pas 45 kDa et des faibles indices de polydispersité. Les différents monomères HMBPM ont été synthétisés et caractérisés précédemment (voir chapitre IV), tandis que la synthèse du N-(2-hydroxypropyl) méthacrylamide (HPMA) est décrite ci-dessous.

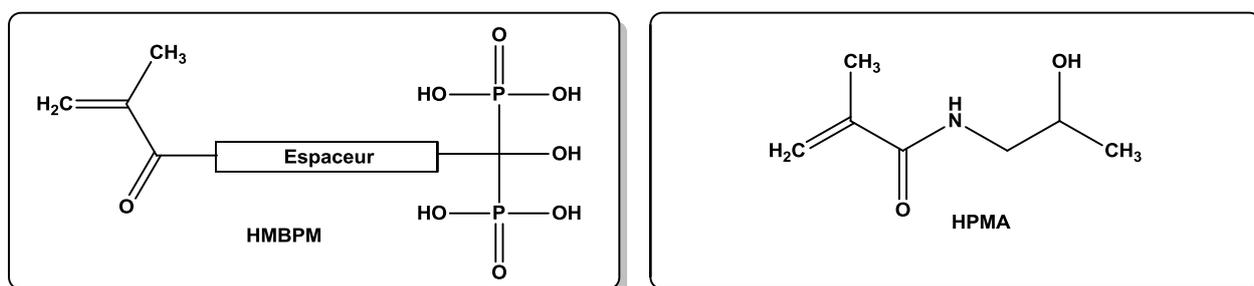


Figure 40 : Structures des comonomères HPMA et HMBPMs

V.5.1.Synthèse du HPMA

La synthèse du N-(2-hydroxypropyl) méthacrylamide est réalisée en une seule étape²⁶². Elle consiste à mettre en réaction un équivalent de 1-aminopropan-2-ol avec 1,1 équivalents de carbonate de sodium anhydre, avant de le faire réagir à 0°C pendant une heure avec le chlorure d'acide méthacrylique (*Schéma 62*). Le mélange final est séché sur sulfate de sodium et le résidu brut obtenu est recristallisé dans l'acétone. Le HPMA est obtenu avec un bon rendement de 87% et une excellente pureté (99%). Il est caractérisé par RMN ¹H et ¹³C.

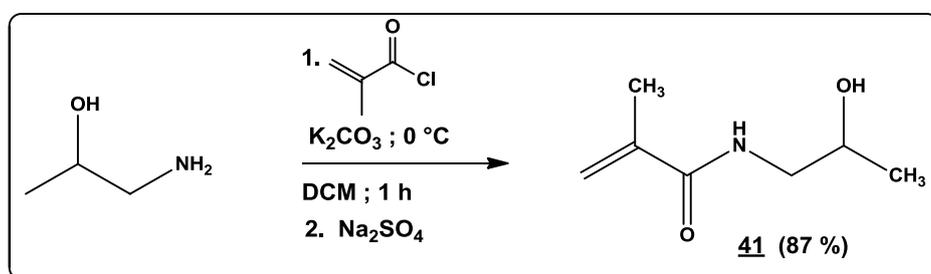


Schéma 62: Synthèse du N-(2-hydroxypropyl) méthacrylamide.

Avant tout essai de copolymérisation, nous avons voulu vérifier en premier lieu la faisabilité de la polymérisation radicalaire classique des comonomères HMBPM. Cela nous permettra d'établir les conditions opératoires à adopter par la suite. Pour cela, nous avons choisi deux monomères appartenant à deux familles différentes : **HMBPM1** comportant une chaîne de cinq atomes de carbone et **HMBPM5** contenant cinq motifs PEG, entre la partie méthacrylique et le bisphosphonate (*Figure 41*).

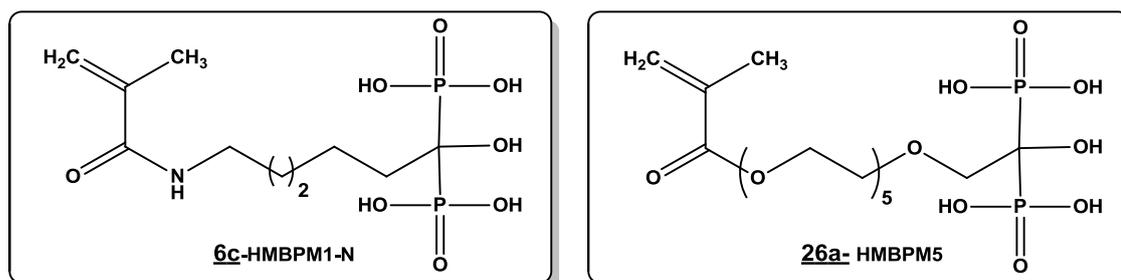


Figure 41 : Structures des HMBPM1-N et HMBPM5

V.5.2. Polymérisation radicalaire classique des HMBPM1-N et HMBPM5

L'essai de polymérisation du HMBPM1-N (pH=4,6, C=0,1 M) et HMBPM5 (pH=6, C=0,1 M) a été réalisé dans deux systèmes séparés scellés de type Schlenk utilisant l'eau bi-distillée comme solvant et le 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane]dichlorohydrate «AIPH» comme initiateur. Une étape de dégazage sous vide par congélation « freeze-pump-thaw cycling » a été répétée trois fois afin d'éliminer toutes traces d'oxygène pour mener à bien la polymérisation. Celle-ci est réalisée à 50°C durant 24 heures. Les poly(HMBPM1-N) et poly(HMBPM5) (*Figure 42*) sont obtenus après précipitation dans l'acétone et séchage au dessiccateur sous vide pendant 48 heures avec un rendement de 41% et 43% respectivement. Les polymères ont été purifiés par dialyse dans l'eau pendant une semaine. Les deux polymères ont été caractérisés en RMN du phosphore et du proton.

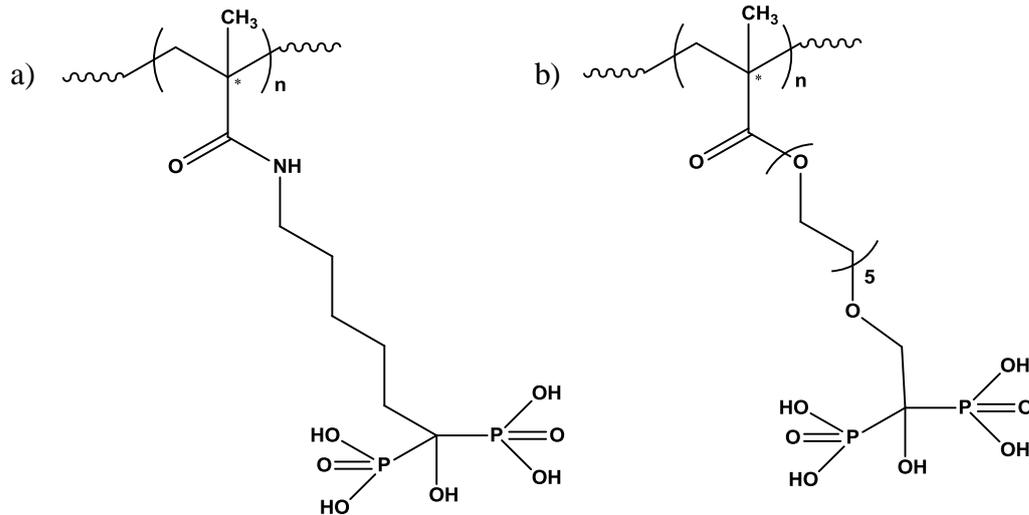


Figure 42: a) Structure du poly (HMBPM1-N), (b) Structure du poly (HMBPM5).

Un exemple de spectre RMN ^1H du poly(HMBPM1-N) est présenté à la Figure 43 (b). Le spectre effectué dans le D_2O , confirme l'obtention du polymère. En effet, on constate la disparition des signaux des protons du monomère correspondant à la double liaison situés à 5,58 et 5,35 ppm (Figure 43 (a)) et l'apparition des protons du groupe CH_2 formé situé à 1,16 ppm.

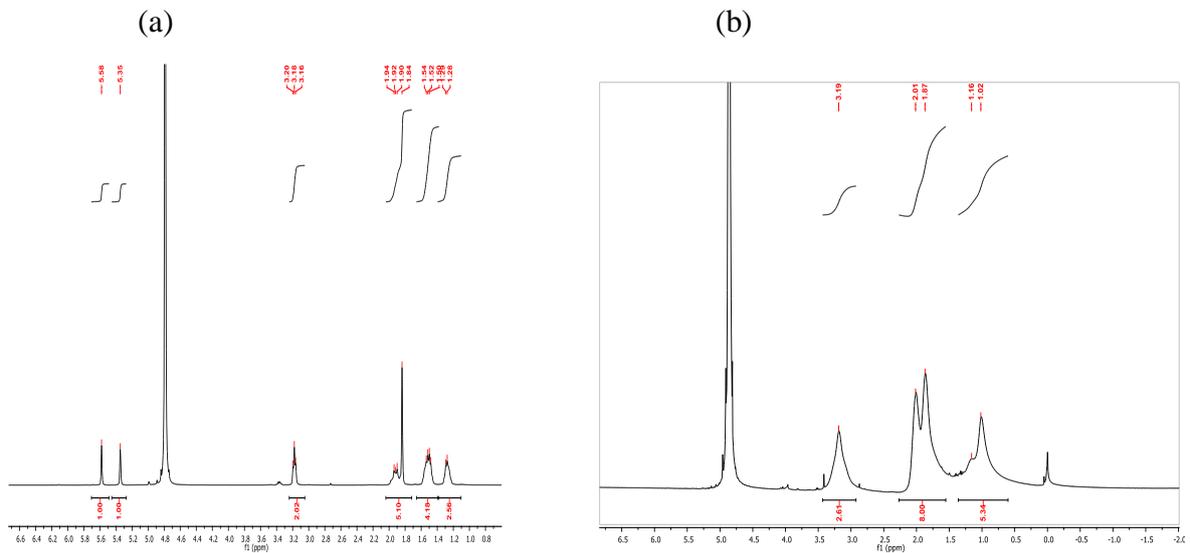


Figure 43: Spectre RMN ^1H a) du HMBPM1-N b) du poly (HMBPM1-N)

Après avoir confirmé la possibilité de polymérisation avec succès des monomères phosphorés en polymérisation radicalaire conventionnelle, nous nous sommes intéressés au comportement du monomère HMBPM1-N lors d'essais de polymérisation radicalaire contrôlée de type ATRP. Cette polymérisation contrôlée est utilisée en premier lieu car elle ne nécessite pas la synthèse de réactifs (ligand, catalyseur, initiateur), elle est donc plus facile à mettre en œuvre.

V.5.3. Polymérisation ATRP du HMBPM1-N

La polymérisation ATRP du HPMBM1-N a été effectuée en utilisant le bromure de cuivre I comme catalyseur, le méthyl 2-bromopropionate comme initiateur et la N,N,N',N'',N''-pentaméthyl-diéthylène-triamine (PMDETA) comme ligand²⁸⁸. Le HMBPM1-N possédant quatre fonctions acide phosphonique a été dans un premier temps complexé au cuivre en milieu aqueux pendant 30 minutes. Le HMBPM1-N complexé au cuivre, de couleur noire, est engagé dans le processus de polymérisation radicalaire en additionnant les réactifs cités ci-dessus. Un cycle de dégazage sous vide par congélation a été répété trois fois («freeze-pump-thaw cycling»). La solution est ensuite chauffée à 70°C pendant 48 heures. Après précipitation du polymère dans l'acétone, le taux de conversion obtenu est de 17%. Ce faible taux de conversion, le temps de réaction relativement long et l'aspect du polymère montrent que cette polymérisation n'est pas adaptée à nos monomères phosphorés.

Nous nous sommes donc tournés vers la polymérisation radicalaire de type RAFT qui est la méthode la plus efficace pour contrôler la polymérisation des monomères hydrophiles, en milieu homogène aqueux. Cette méthode ne nécessite pas de groupes protecteurs. De plus, les principaux avantages des agents de transfert utilisés en RAFT sont leur solubilité dans l'eau et leur capacité à contrôler la polymérisation du HPMA (masse, structure, indice de polydispersité). La polymérisation RAFT a donc été choisie pour synthétiser les différents copolymères HPMA/HMBPM.

V.5.4. Polymérisation RAFT

Les agents de transfert de chaînes ne sont pas commerciaux, à l'exception du carboxyméthyl dithiobenzoate, inefficace pour le contrôle de la polymérisation des HPMA. La copolymérisation du HPMA nécessite donc la synthèse de l'agent de transfert le plus adapté.

V.5.4.1. Synthèse des agents de transfert «CTA»

Nous avons choisi de synthétiser deux agents de transfert possédant une fonction acide carboxylique. Le premier appartenant à la famille des trithiocarbonates : le S,S'-bis(acide α,α' -diméthylacétique) trithiocarbonate (CMP). Il est choisi pour son efficacité élevée de transfert de chaîne. Le deuxième appartient à la famille des dithioesters : l'acide dithiobenzoate 4-cyanopentanoïque (CTP). Il est bien connu dans la littérature car il permet de contrôler le rendement grâce à un coefficient de transfert de chaîne élevé, en plus du fait que le groupement cyanoisopropyle est une bonne espèce d'initiateurs pour la polymérisation des méthacrylates²⁸¹. De plus, la présence de groupements acides carboxyliques dans le CTP et le CMP permet une meilleure solubilité dans l'eau et facilite donc la polymérisation RAFT en milieu aqueux²⁸⁹.

V.5.4.1.1. Synthèse du S,S'-bis(acide α,α' -diméthylacétique) trithiocarbonate «CMP»

La synthèse du CMP a lieu en une seule étape suivant le *Schéma 63* présenté ci-dessous :

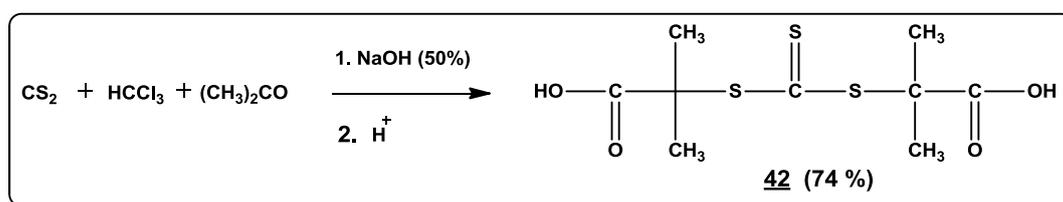


Schéma 63: Synthèse du S,S'-bis(acide α,α' -diméthylacétique) trithiocarbonate (CMP)

Le S,S'-bis(acide α,α' -diméthylacétique) trithiocarbonate est isolé avec un rendement satisfaisant de 74% après un lavage acide. La synthèse de cet agent se fait en une seule étape. En effet, un mélange de disulfure de carbone, de chloroforme et d'acétone est ajouté à de l'éther de pétrole sous un flux d'argon. La réaction est laissée sous agitation toute une nuit après ajout d'une solution de soude (50%). La solution est acidifiée et le produit final de couleur jaune est filtré. Le précipité recueilli est recristallisé dans de l'acétone. Le solide obtenu est caractérisé en RMN et IR.

Le spectre IR montre une bande à 1712 cm^{-1} caractéristique des C=O et une autre bande aux alentours de 1045 cm^{-1} caractéristique de la liaison C=S.

En RMN ^1H , la présence d'un singulet à 1,60 ppm est observée, correspondant aux protons des groupes méthyle (12 H). La RMN ^{13}C montre la présence de signaux qui confirme la

structure attendue, à savoir le signal du carbone lié au soufre qui est déblindé à 219,4 ppm, et un pic à 173,5 ppm correspondant aux C=O des acides.

L'efficacité de cet agent de transfert est principalement due à la présence des groupements acides carboxyliques qui stabilisent le radical formé **b** (Schéma 64) durant la polymérisation, après coupure de la liaison simple carbone-soufre²⁹⁰.

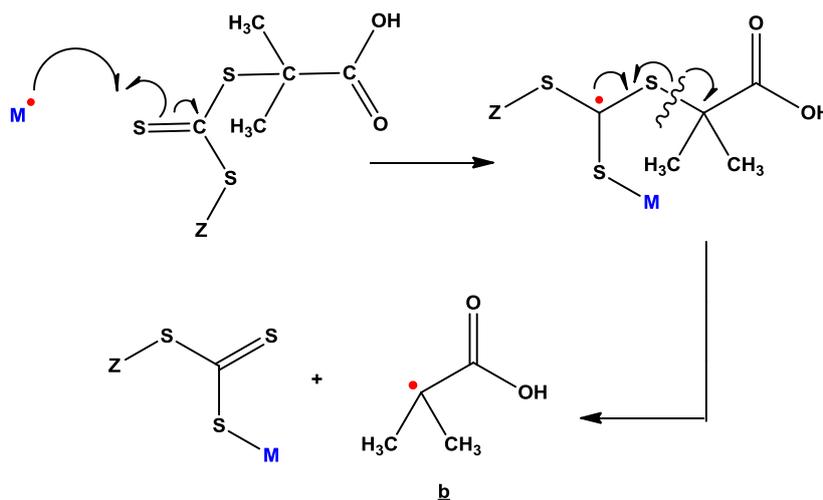


Schéma 64: Formation de l'espèce radicalaire active **b**

V.5.4.1.2.Synthèse de l'acide dithiobenzoate 4-cyanopentanoïque «CTP»

Plusieurs études de polymérisation RAFT du HPMA ont été effectuées en utilisant l'acide dithiobenzoate 4-cyanopentanoïque comme agent de transfert, dans une solution tampon acide acétique / acétate de sodium^{263,269,291}.

Le CTP est particulièrement utilisé en milieu aqueux mais il est nécessaire de travailler dans des conditions légèrement acides. En effet, Yulia et collaborateurs en 2004²⁸⁹ ont montré que la polymérisation des acrylamides utilisant cet agent de transfert est plus performante (excellent contrôle de la polymérisation avec un faible indice de polydispersité, taux de conversion élevé) par rapport à la polymérisation en milieu neutre. De plus, la polymérisation dans l'eau à pH neutre permet un faible contrôle de la polymérisation jusqu'à un taux de conversion de 50%. Dépassé ce taux, la polymérisation n'est plus contrôlée.

La préparation de l'acide dithiobenzoate 4-cyanopentanoïque (CTP) se fait en trois étapes, la première consistant à synthétiser l'acide dithiobenzoïque DTBA (Schéma 65). Plusieurs procédés de synthèse de ce dérivé soufré existent dans la littérature^{276,292}. Nous avons choisi

d'utiliser une stratégie²⁹³ qui consiste à faire réagir le chlorure de benzyle en milieu basique en présence de soufre dans du méthanol. Le milieu réactionnel est agité à 67°C pendant 10 heures. Le sel précipité est éliminé par filtration et la solution est évaporée sous vide. Le résidu obtenu est solubilisé, acidifié puis extrait dans la phase organique. La solution est engagée directement dans la deuxième étape sans caractérisation ni purification.

Le disulfure de dithiobenzoyle DTBDS **43** est obtenu par oxydation du DTBA dans l'eau à l'aide de ferricyanure de potassium ajouté sur une période d'une heure. La réaction se fait à température ambiante. Le précipité rouge formé est filtré et lavé avec de l'eau. Le solide est séché sous vide pendant une nuit et recristallisé dans de l'éthanol. Le produit est obtenu avec un rendement de 78%. Il est ensuite caractérisé en RMN. En RMN ¹³C plus particulièrement, on constate la présence d'un pic à 218,2 ppm, caractéristique du carbone du groupe C=S ainsi qu'un groupe de signaux situés entre 132,9 et 125,5 ppm, caractéristique du cycle aromatique. Le DTBDS réagit enfin avec l'acide 4,4'-azobis(4-cyanopentanoïque) au reflux de l'acétate d'éthyle pour former le CTP désiré. Il est obtenu pur avec 62 % de rendement après purification sur gel de silice, en utilisant l'acétate d'éthyle comme éluant.

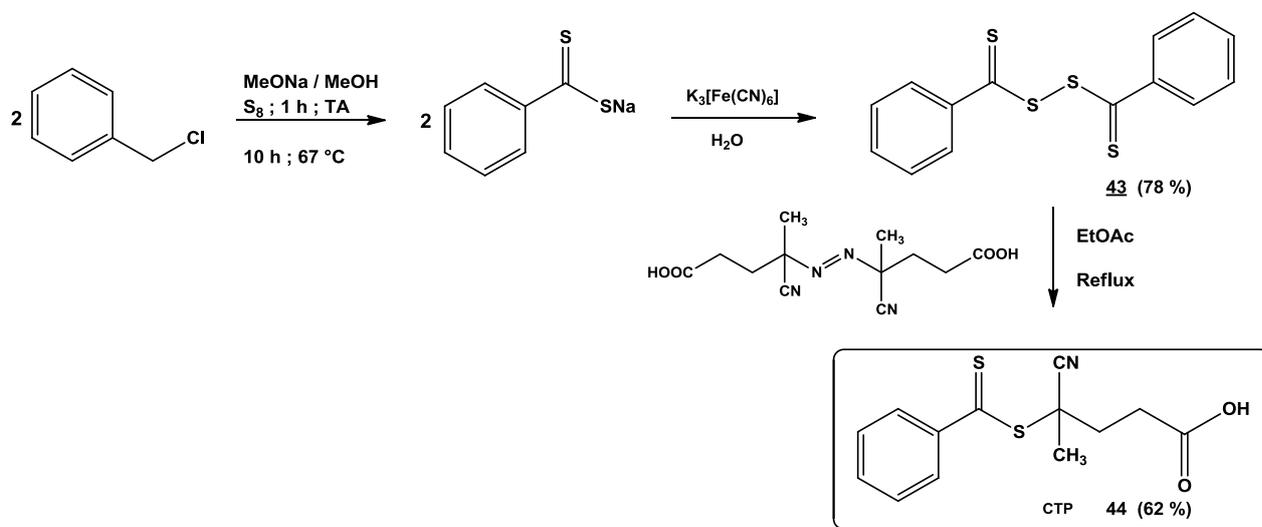


Schéma 65 : Synthèse de l'acide dithiobenzoate 4-cyanopentanoïque (CTP)

Les spectres RMN ¹H et ¹³C de l'acide dithiobenzoate 4-cyanopentanoïque ont été réalisés dans le CDCl_3 . La RMN ¹H présente les signaux correspondant au cycle aromatique, compris entre 7,4 et 8,0 ppm. Des signaux situés entre 2,5 et 3,0 ppm correspondent aux quatre protons de la chaîne carbonée. Enfin, le signal du groupe méthyl est caractérisé par un singulet à 2,0 ppm. La RMN ¹³C confirme également l'obtention du produit attendu, avec la présence d'un

signal centré sur 224,2 ppm correspondant au carbone lié au soufre, d'un signal à 176,5 ppm caractéristique du C=O de l'acide carboxylique et d'un pic à 118,4 ppm caractéristique du nitrile.

V.5.5.Méthode générale de Polymérisation RAFT

Toutes les polymérisations RAFT ont été réalisées en mélangeant les monomères, l'initiateur et le CTA, dans un milieu tampon acide acétique/acétate de sodium (0.27 mol/L acide acétique et 0.73 mol/L acétate de sodium). La solution est mise sous barbotage d'argon pendant 15 minutes. Le mélange réactionnel est maintenu à 70°C durant 12 heures afin d'optimiser le taux de conversion. Après précipitation dans un volume de 30 fois supérieur d'acétone et plusieurs lavages avec ce même solvant, les homo- et co-polymères sont séchés au dessiccateur sous vide pendant 24 heures et purifiés par dialyse durant 5 jours (membrane ayant un seuil de coupure de 3,5-5 kDa). Les polymères purs sont ensuite lyophilisés et analysés par RMN et SEC (SEC-MALLS-RI). Les masses expérimentales et théoriques sont regroupées dans les tableaux 9 et 10, pages 165 et 172 respectivement.

Comme nous allons le voir à présent, afin de mettre au point les conditions de synthèse des macro-HPMA en polymérisation RAFT, plusieurs essais ont été effectués. Une bonne sélection du CTA, de l'initiateur et un choix adéquat des rapports des concentrations $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ permettent d'obtenir un résultat idéal.

V.5.5.1.Synthèse des macro HPMA-CTA

V.5.5.1.1.Synthèse du macro HPMA-CTP

La plupart des polymérisations radicalaires contrôlées du HPMA décrites dans la littérature ont été effectuées en utilisant l'acide dithiobenzoate cyanopentanoïque comme agent de transfert. L'homopolymérisation du HPMA a été effectuée dans un milieu tampon acide acétique/acétate de sodium.

Des réactions secondaires d'aminolyse et d'hydrolyse du dithioester sont observées en milieu aqueux pendant la polymérisation de type RAFT d'acrylamide à pH= 7. En effet, les amines primaires et secondaires réagissent sur les dithioesters à pH >7, mais ne sont pas réactives pour des pH < 7. Ces réactions se traduisent par une perte de morceaux de chaînes actives, réduisant ainsi le contrôle de la polymérisation²⁸⁹.

Ainsi le taux d'hydrolyse et d'aminolyse augmentent avec l'augmentation du pH. Des temps de

réaction très longs et une polydispersité élevée sont observés

Les trois réactifs, le monomère (le HPMA), le CTA (l'acide dithiobenzoate 4-cyanopentanoïque, CTP) et l'initiateur (l'acide 4,4'-azobis-(4-cyanopentanoïque) ont été mis en mélange dans des rapports de concentration de réactifs $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0 = 900/3/1$ dans une solution tampon acide acétique/acétate de sodium à une concentration de 0,3 M (Schéma 66). Le polymère est dialysé puis lyophilisé, conduisant à une mousse blanche.

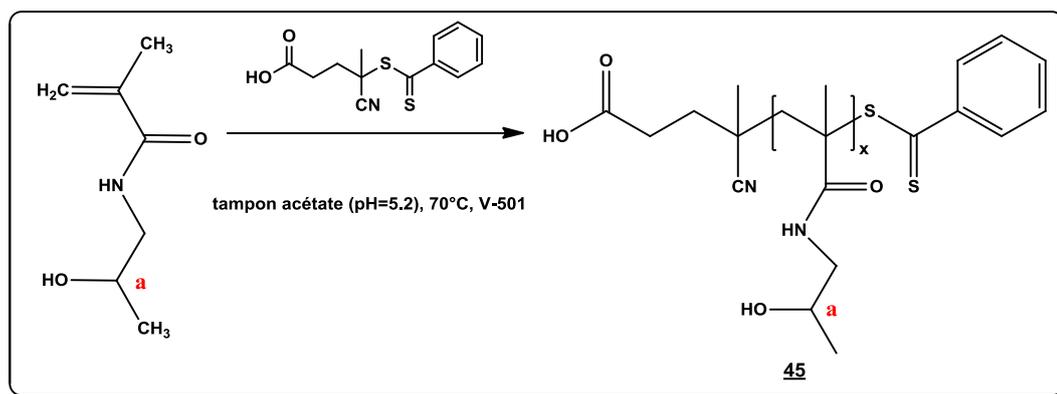


Schéma 66: Synthèse des macros HPMA-CTP

La caractérisation RMN ^1H de ce macro HPMA-CTP a été réalisée (Figure 44). Le spectre obtenu montre la présence après 12 heures de polymérisation, du monomère de départ, donnant un taux de conversion de 98 %. Ce taux est calculé à partir de l'intégration des protons éthyléniques du monomère, le signal à 3,94 ppm correspondant au proton porté par le carbone **a** étant intégré à 1.

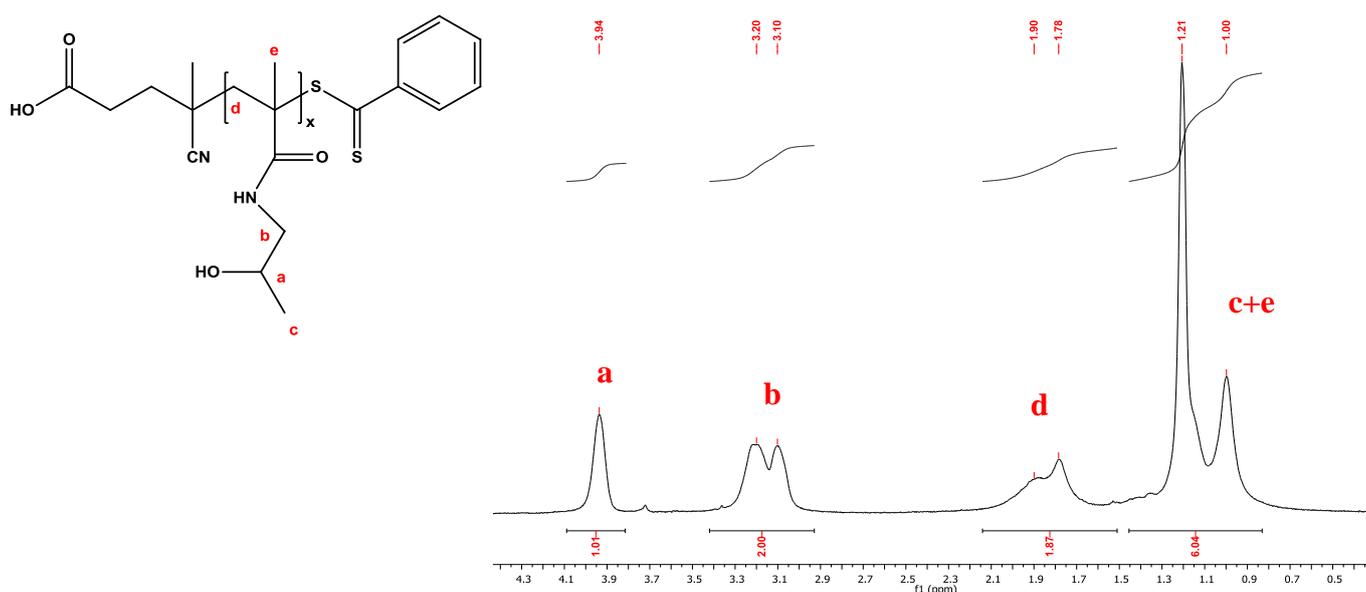


Figure 44: Spectre RMN ^1H du macro HPMA-CTP

De plus, le macro HPMA-CTP a été analysé par chromatographie d'exclusion stérique. Les masses molaires et indices de polydispersité des polymères ont été déterminés par détection de lumière diffusée et mesure d'indice de réfraction. Les résultats montrent l'obtention d'un macro HPMA-CTP de masse molaire 41690 g/mol présentant un indice de polydispersité $M_w/M_n=1,061$ (tableau 9, page 165).

Nous avons par la suite voulu étudier l'influence des rapports de concentration $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ sur le poids moléculaire et la distribution de celui-ci. Pour cela, nous avons choisi des valeurs différentes de rapports de concentration $[M]_0/[CTP]_0/[I]_0 = 370/1/1$ afin de le comparer au premier système.

La *Figure 45* montre les chromatogrammes obtenus dans les deux cas.

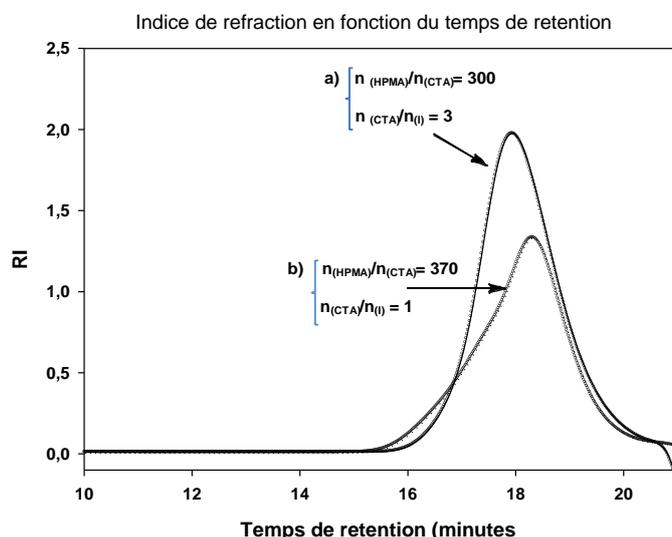


Figure 45: Comparaison de chromatogrammes des macro HPMA-CTP

(a) : $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0 = 900/3/1$ et (b) : $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0 = 370/1/1$

On constate que l'indice de polydispersité varie de 1,06 ($M_n = 41690$ g/mol) pour le système (a) à 1,25 ($M_n = 42800$ g/mol) pour le système (b). En effet, la vitesse de réaction dépend donc fortement du rapport des concentrations du CTA et de l'initiateur « V-501 » $[CTA]_0/[I]_0$. Une augmentation du rapport $[CTA]_0/[I]_0$ de 1,0 à 3,0 ralentit la vitesse de polymérisation et par conséquent améliore la distribution du poids moléculaire.

Dans une polymérisation RAFT, le rapport de $[CTA]_0/[I]_0$ est généralement supérieur à 1. Les molécules CTA en solution doivent être en plus grand nombre que les radicaux libres. La concentration de radicaux libres dans le système est imposée par le degré de dissociation de

l'initiateur, tandis que le nombre de chaînes est principalement contrôlé par la concentration dans une solution de CTA¹⁷⁸.

V.5.5.1.2.Synthèse du macro HPMA-CMP

Le HPMA a été polymérisé dans une solution tampon d'acide acétique/acétate de sodium, en utilisant l'acide 4,4'-azobis-4-cyanopentanoïque comme initiateur et le S,S'-bis(acide α,α' -diméthylacétique) trithiocarbonate (CMP) comme agent de transfert. Nous avons fait varier les rapports $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$, les résultats obtenus figurent dans le tableau 9 (page 165). Les polymérisations sont effectuées dans les mêmes conditions que dans le cas du macro HPMA-CTP. Le mélange est chauffé à 70°C pendant 12 heures à pH=5,2. Les polymères purs sont obtenus après dialyse (membrane ayant un seuil de coupure de 3,5-5 kDa) et lyophilisation. Tous les macro HPMA-CMP ont été caractérisés par RMN ¹H et les distributions de masse ont été déterminées par chromatographie d'exclusion stérique.

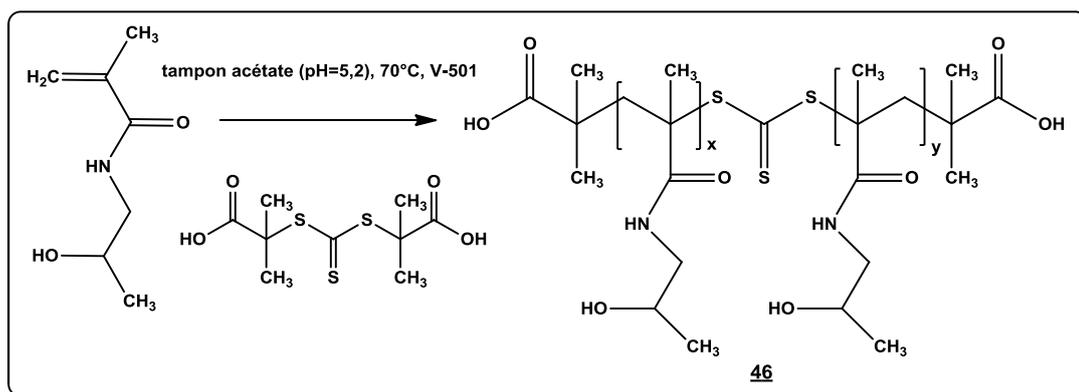


Schéma 67 : Synthèse des macros HPMA-CMP

Le spectre RMN ¹H présenté à la *Figure 46* montre la présence des groupements méthyl de l'agent de transfert du groupe acide diméthylacétique aux extrémités du polymère. Ces groupements permettent l'extension ultérieure de la chaîne polymère.

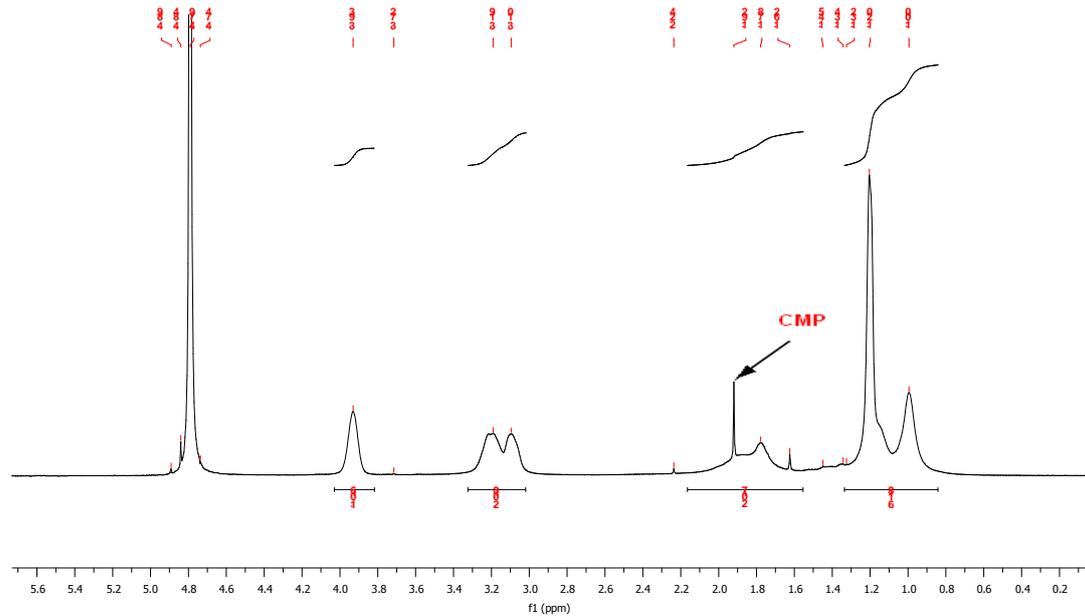


Figure 46: Spectre RMN ^1H du macro HPMA-CMP

Le tableau 9 résume les masses molaires, les indices de polydispersité ainsi que les taux de conversion obtenus lors des différents essais de polymérisation. Les homopolymères obtenus sont monodispersés comme l'indiquent les chromatogrammes obtenus en chromatographie d'exclusion stérique, avec des indices de polydispersité compris entre 1,06 et 1,38. Ces valeurs sont inférieures à la limite faible théorique qui est de 1,5 pour une polymérisation radicalaire libre.

Dans ces conditions, la masse moléculaire de la polymérisation est contrôlée par le rapport donné ci-dessous²⁹⁴ :

$$M_{n, \text{Théorique}} = \frac{[M]_0 \times M_w \text{ monomère} \times \rho}{[CTA]_0} + M_w \text{CTA}$$

Les poids moléculaires déterminés par chromatographie d'exclusion stérique correspondent aux poids moléculaires théoriques calculés en fonction du taux de conversion par spectroscopie RMN ^1H .

Tableau 9 : Concentrations des réactifs utilisés, taux de conversion, masses molaires théoriques et expérimentales et indices de polydispersité (PDI) des macros HPMA-CTA

Monomère	$[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$	rendement (%)	$M_{n\ th}$	$M_{w\ exp}$	$M_{n\ exp}$	PDI
HPMA-CMP	370/1/1	81	43 139	58 084	42 090	1,38
	900/3/1	94	40 608	49 423	38 020	1,30
HPMA-CTP	370/1/1	74	39 432	53 780	42 800	1,25
	900/3/1	96	41 464	44 250	41 690	1,061

Nous constatons que pour les deux agents de transfert, les meilleurs indices de polydispersité sont obtenus avec des rapports $[CTA]_0/[I]_0 > 1$. En effet, ce rapport contrôle l'indice de polydispersité ; les ratios élevés de l'agent RAFT par rapport à l'initiateur doivent être utilisés de façon à maintenir un faible flux radicalaire (quantité de radicaux formés en fonction du temps). De plus, la masse molaire des homopolymères est contrôlée par le rapport $[M]_0/[CTA]_0$.

V.5.5.1.3. Comparaison des deux macro HPMA-CTA

L'analyse des résultats du tableau 9 montre que l'agent CTP possède un meilleur contrôle de la polymérisation du HPMA. En effet, les indices de polydispersité sont respectivement pour le CMP et CTP de 1,3 et de 1,061.

Les chromatogrammes des deux macros HPMA-CTA obtenus dans les mêmes conditions sont présentés à la *Figure 47*. Nous pouvons observer l'élargissement du chromatogramme lorsque le CMP est utilisé, ce qui montre une polydispersité plus importante des masses moléculaires.

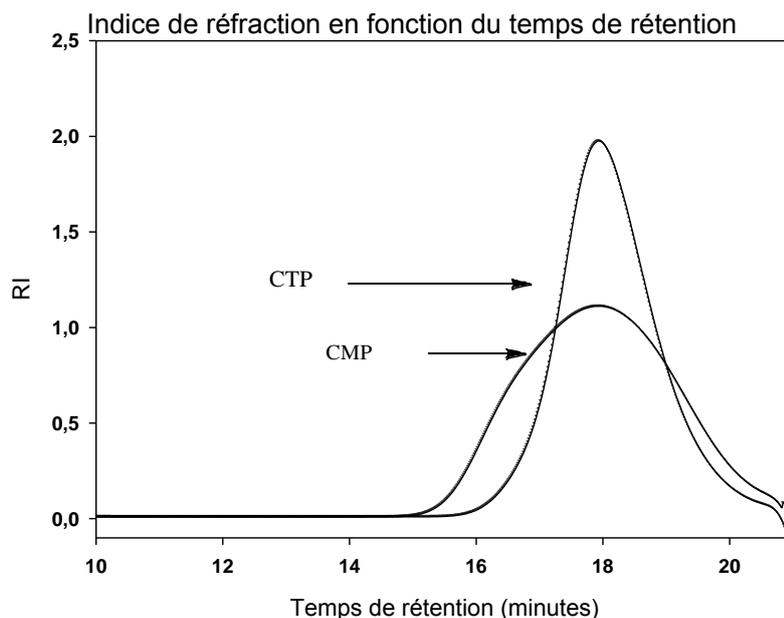


Figure 47: Comparaison des deux macro HPMA-CTA

Nous observons également que comparativement au CMP utilisé dans les mêmes conditions, l'utilisation du CTP donne de meilleurs indices de polydispersité et des masses expérimentales très proches des masses théoriques. Le CMP est bifonctionnel et beaucoup plus utilisé dans le cas de la synthèse des polymères triblocs. Notre choix s'est donc porté tout naturellement sur le CTP pour la suite de notre travail.

De plus, il peut être avantageux d'utiliser un initiateur qui a une fonctionnalité identique à celle du groupe partant R du CTA. La stratégie qui utilise l'initiateur (V-501) soluble dans l'eau et le CTP est fréquemment utilisée car elle permet d'introduire une fonctionnalité acide carboxylique en bout de chaîne des polymères résultants. Cela permet ainsi d'allonger encore la chaîne polymère²⁹⁴, comme nous allons le voir ci-dessous.

V.5.5.2. Extension de la chaîne macro poly(HPMA)-CTP avec HMBPM : Synthèse de bloc copolymères HPMA-b-HMBPM5

Le polymère issu d'une polymérisation RAFT contient du CTA en pourcentage très élevé dans sa structure. Par conséquent, il est aussi appelé macro-CTA et peut être activé à nouveau pour accroître sa taille dans un processus de polymérisation vivante. Cette propriété peut être exploitée pour étendre la chaîne avec un monomère différent pour la synthèse de copolymères à blocs.

Afin d'obtenir des groupements dithioester à l'extrémité des chaînes et de montrer la nature vivante et contrôlée de la polymérisation, le monomère macro HPMA-CTA synthétisé précédemment a été mis en réaction avec un comonomère fonctionnel, le HMBPM5.

Comme le montre le *Schéma 68*, les copolymères HPMA-b-HMBPM5 sont préparés directement dans un milieu tampon aqueux utilisant le macro HPMA-CTP et le monomère HMBPM5 comportant cinq motifs PEG.

La masse molaire du macro HPMA-CTA mesurée est de 41 690 g/mol, avec un indice de polydispersité de 1,061. Celui-ci réagit par la suite avec du HMBPM5 en présence du même initiateur, V-501, dans une solution tampon selon la réaction suivante :

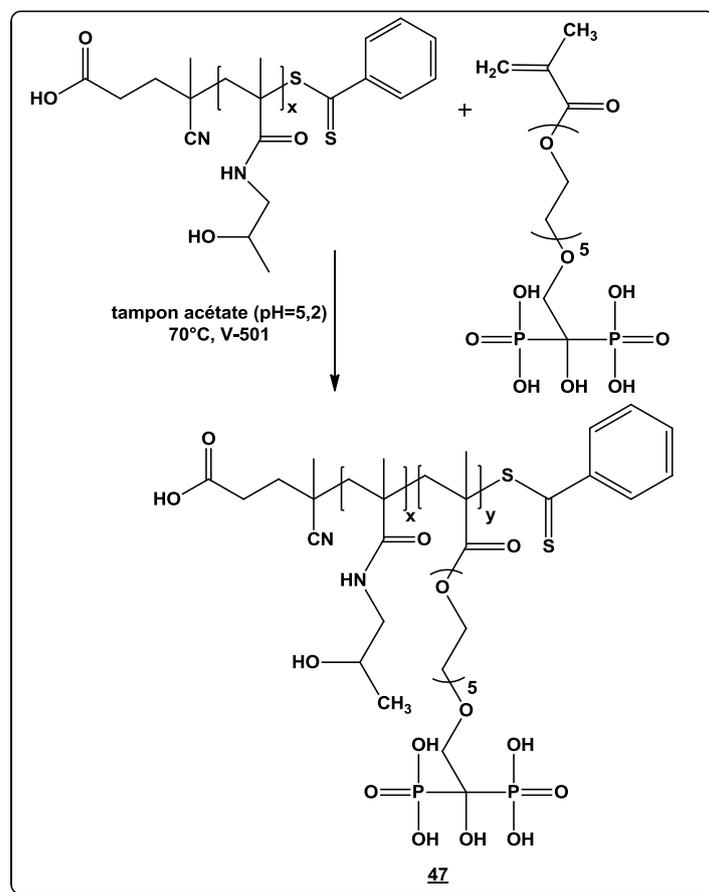


Schéma 68 : Synthèse du bloc copoly(HPMA-b-HMBPM5)

La caractérisation par chromatographie d'exclusion stérique du copolymère HPMA-b-HMBPM donne une masse de 83 650 g/mol avec un indice de polydispersité de 1,28. Les chromatogrammes présentés à la *Figure 48* montrent l'extension de la chaîne polymère.

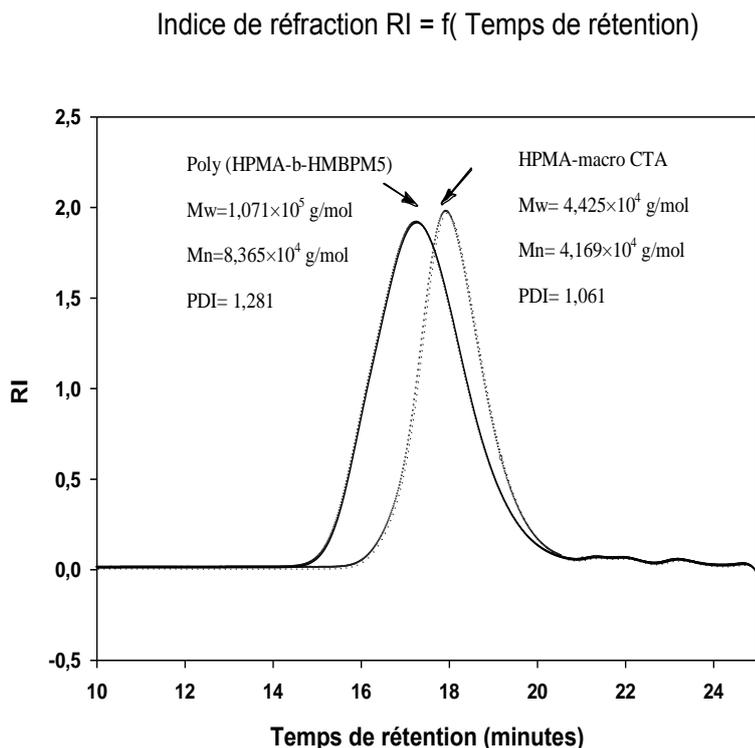


Figure 47 : Chromatogrammes du macro HPMA-CTP et du poly (HPMA-b-HMBPM5)

Les poids moléculaires théoriques du copolymère à blocs peuvent être calculés en utilisant l'équation idéalisée suivante²⁹⁴ :

$$M_n(\text{Bloc}) = \frac{[M]_0 \times M_{\text{mon}} \times \rho_{\text{mon}}}{[\text{macro-CTA}]_0} + M_n(\text{macro-CTA})$$

La *Figure 48* montre des chromatogrammes du macro HPMA-CTP et du bloc copolymère HPMA-b-HMBPM5. Après extension du polymère, on peut observer le déplacement du chromatogramme vers des temps de rétention plus faibles, confirmant ainsi l'augmentation du poids moléculaire et donc l'extension de la chaîne. Cependant, le déplacement de la courbe est faible car la différence de poids moléculaire n'est pas très élevée. Aucun épaulement ou pic supplémentaire n'apparaît sur le spectre, ce qui montre un bloc de copolymère pur.

La *Figure 49* montre le spectre RMN ^1H du bloc copolymère HPMA-b-HMBPM5. Les compositions de copolymères et par conséquent les poids moléculaires expérimentaux, sont déterminés par l'intégration normalisée relative au proton Ha situé à 3,85 ppm correspondant

à un proton et aux motifs PEG (protons Hg) situés à 3,63 ppm correspondant à vingt protons.

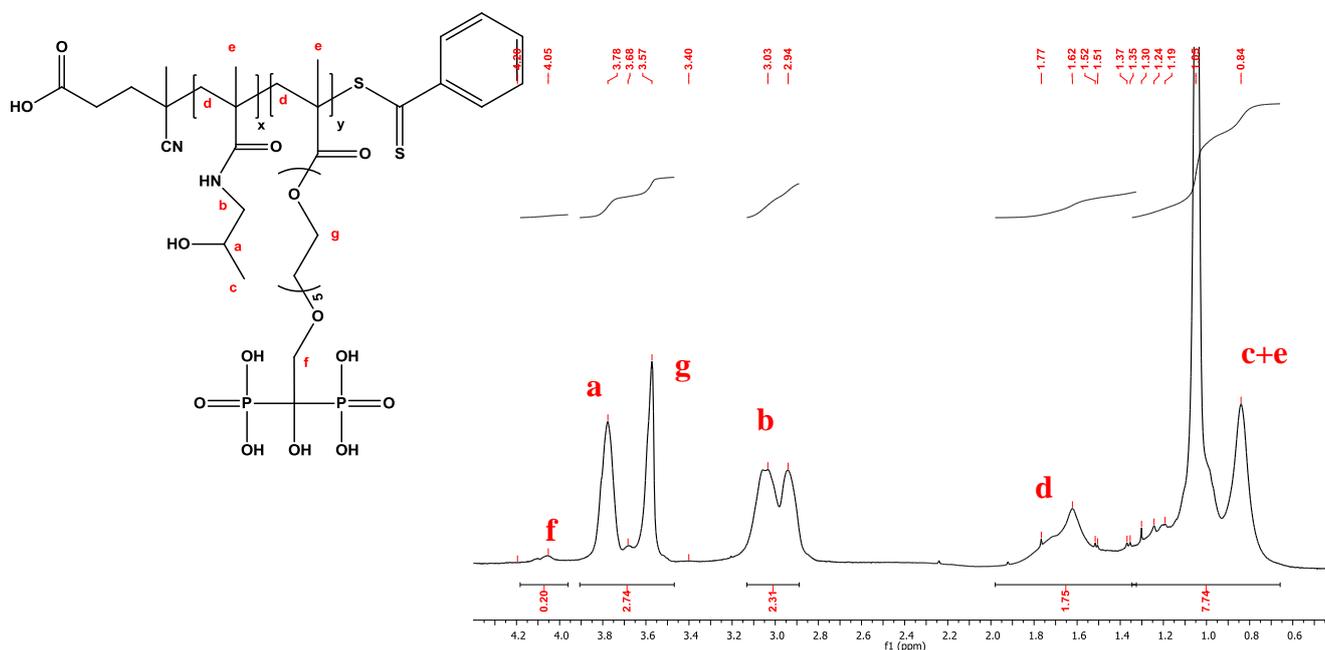


Figure 49: Spectre RMN ^1H du bloc copolymère HPMA-b-HMBPM5

La masse molaire expérimentale du bloc copolymère est de 83 650 g/mol. D'après le spectre RMN ^1H , le comonomère HMBPM5 correspond à 10% de la totalité du polymère. La masse molaire du bloc HMBPM5 correspondant à 8 337 g/mol représente 15 molécules et la masse molaire du bloc HPMA correspondant à 75 033 g/mol représente 524 molécules.

Le squelette d'un copolymère contenant un motif HPMA n'est pas biodégradable. Seuls les polymères de masses molaires inférieures à la limite de la filtration rénale ($M_w < 45\text{-}50$ kDa) sont utilisés comme systèmes permettant de délivrer des médicaments. Afin d'obtenir des blocs copolymères capables de traverser la barrière rénale, il est nécessaire d'optimiser les conditions opératoires de polymérisation. La synthèse de copolymères statistiques HPMA-stat-HMBPM plus facile à réaliser (une seule étape) va nous permettre de fixer les masses molaires, le taux de chargement ainsi que les molécules les plus actives vis-à-vis des tests biologiques.

V.5.5.3.Synthèse des copolymères statistiques HPMA-stat-HMBPM

La synthèse des copolymères statistiques HPMA-stat-HMBPM est réalisée en milieu aqueux, à 70°C pendant 24 heures utilisant un agent de transfert, le CTP et le V-501 comme initiateur. Comme pour les homopolymérisations, une solution tampon acétate à pH= 5,2 a été utilisée. Le Schéma 69 indique la méthode de synthèse de ces copolymères statistiques²⁵³.

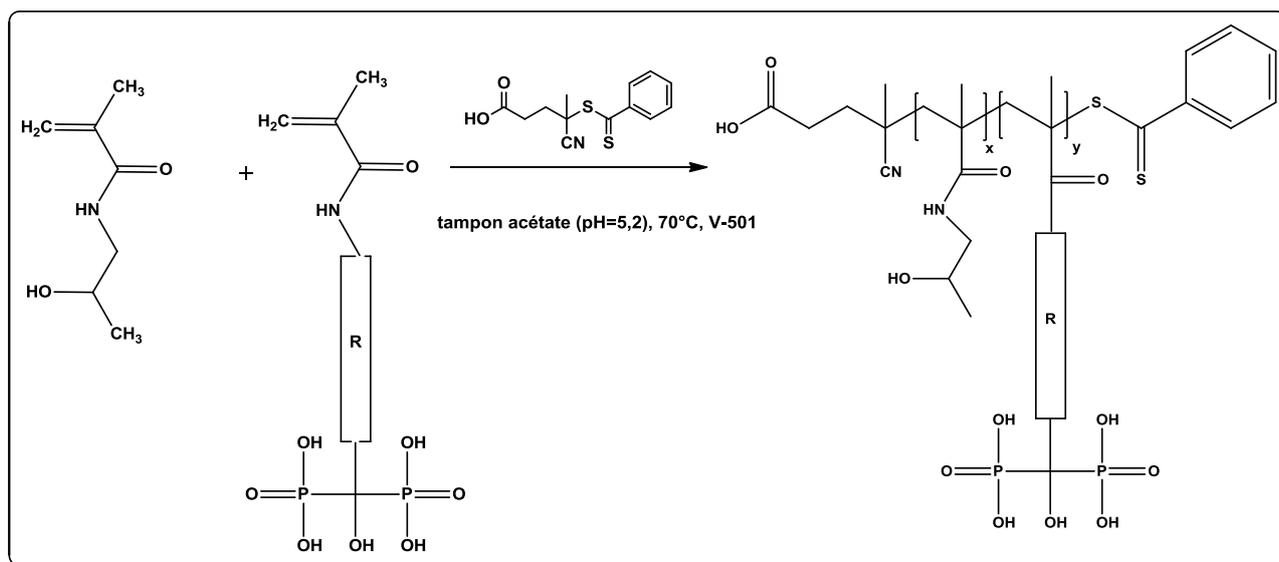


Schéma 69: Synthèse de copolymères HPMA-stat-HMBPM

Les copolymères ont été purifiés par dialyse pendant cinq jours dans l'eau (membrane ayant un seuil de coupure de 3,5-5 kDa), puis lyophilisés. Ces derniers sont caractérisés par RMN ¹H et RMN ³¹P et purifiés et analysés par chromatographie d'exclusion stérique.

Différents copolymères ont été préparés :

- 48)** HPMA-stat-HMBPM5 (n=8)
- 49)** HPMA-stat-HMBPM5 (n=5)
- 50)** HPMA-stat-HMBPM1-N (n=2)
- 51)** HPMA-stat-HMBPM1-N (n= 3)
- 52)** HPMA-stat-HMBPM1-N (n= 5)
- 53)** HPMA-stat-HMBPM1-N (n= 10)
- 54)** HPMA-stat-HMBPM2-N (n'=5, n=5)
- 55)** HPMA-stat-HMBPM2-N (n'=5, n=3)
- 56)** HPMA-stat-HMBPM4 (n=8)

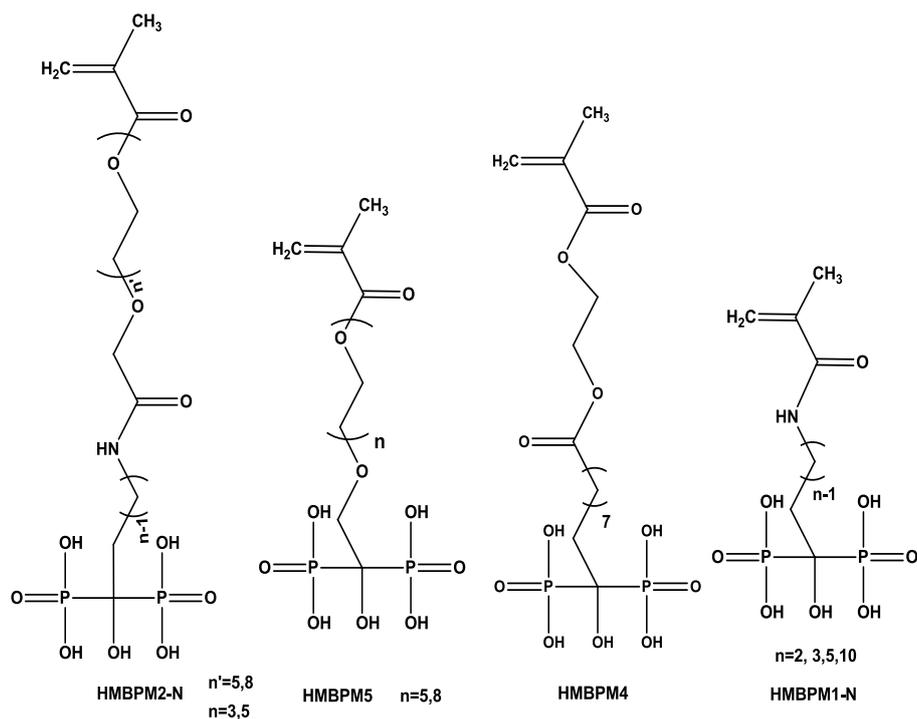


Figure 50: Structures des HMBPM utilisés en copolymérisation

Les poids moléculaires expérimentaux et théoriques des copolymères statistiques, les indices de polydispersité (PDI) ainsi que les taux de conversion sont rassemblés dans le tableau 10. La RMN ^1H permet de déterminer la composition du copolymère ainsi que les taux de conversion.

Tableau 10 : Concentrations des réactifs utilisés, taux de conversion, masses molaires expérimentales et indices de polydispersité (PDI) des copolymères HPMA-stat-HMBPM

Copolymère (%/%)	rendement %	M_nth	M_n exp	M_w exp	PDI
HPMA-stat-HMBPM5 (n=8) (90/10)	74	27 445	26 170	29 150	1,11
HPMA-stat-HMBPM5 (n=5) (89/11)	76	27 885	26 400	26 540	1,005
HPMA-stat-HMBPM1-N (n= 2) (90/10)	91	32 823	41 460	45 880	1,107
HPMA-stat-HMBPM1-N (n= 3) (91/9)	59	30 730	27 040	28 527	1,055
HPMA-stat-HMBPM1-N (n= 5) (89/11)	81	29 318	28 980	30 140	1,04
HPMA-stat-HMBPM1-N (n=10) (91/9)	85	30 945	25 560	25 610	1,04
HPMA-stat-HMBPM2-N (n'=5, n=5) (90/10)	61	22 418	20 300	23 310	1,15
HPMA-stat-HMBPM2-N (n'=5, n=3) (91.5/8.5)	53	19 433	15 480	15 980	1,032
HPMA-stat-HMBPM4 (n=8) (90/10)	95	34 777	40 860	49 590	1,21

L'analyse des résultats montre que la polymérisation statistique est contrôlée, des indices de polydispersité très satisfaisants ont été obtenus. Ces valeurs ont été déterminées par

chromatographie d'exclusion stérique en utilisant un éluant Na_2SO_4 (0.05M)/acétonitrile: 80/20). Pour les mêmes rapports $[\text{M}]_0/[\text{CTA}]_0/[\text{I}]_0$, des indices de polydispersité différents peuvent être obtenus, en fonction du monomère utilisé et de la réactivité de ces chaînes.

La comparaison des chromatogrammes de copolymères statistiques obtenus en fonction de la longueur de la chaîne carbonée et/ou du nombre de motifs PEG du monomère fonctionnel a été réalisée (*Figures 51 et 52*). On peut observer sur la *Figure 51* ci-après que le chromatogramme du copolymère possédant une chaîne carbonée plus courte est décalé vers les temps de rétention plus faibles, confirmant une plus grande masse moléculaire avec un indice de polydispersité moins bon. Ce résultat implique probablement une copolymérisation plus rapide due à une réactivité des chaînes de monomères plus grande et donc une polydispersité moins contrôlée. Le même phénomène est observé lorsqu'on augmente le nombre de motifs PEG (*Figure 52*).

Indice de réfraction en fonction du temps de rétention

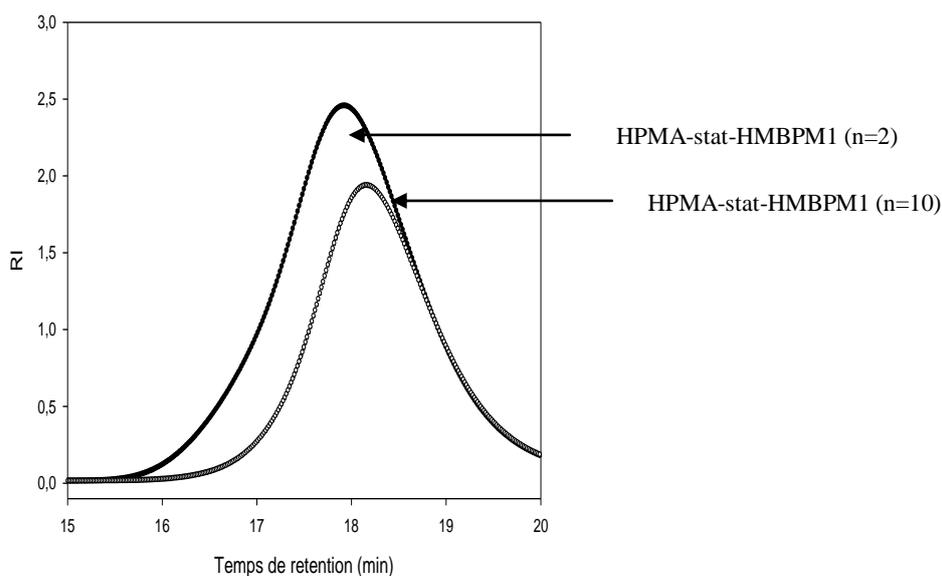


Figure 51: Chromatogrammes HPMA-stat-HMBPM1-N (n=2) et HPMA-stat-HMBPM1-N (n=10)

Indice de réfraction en fonction du temps de rétention

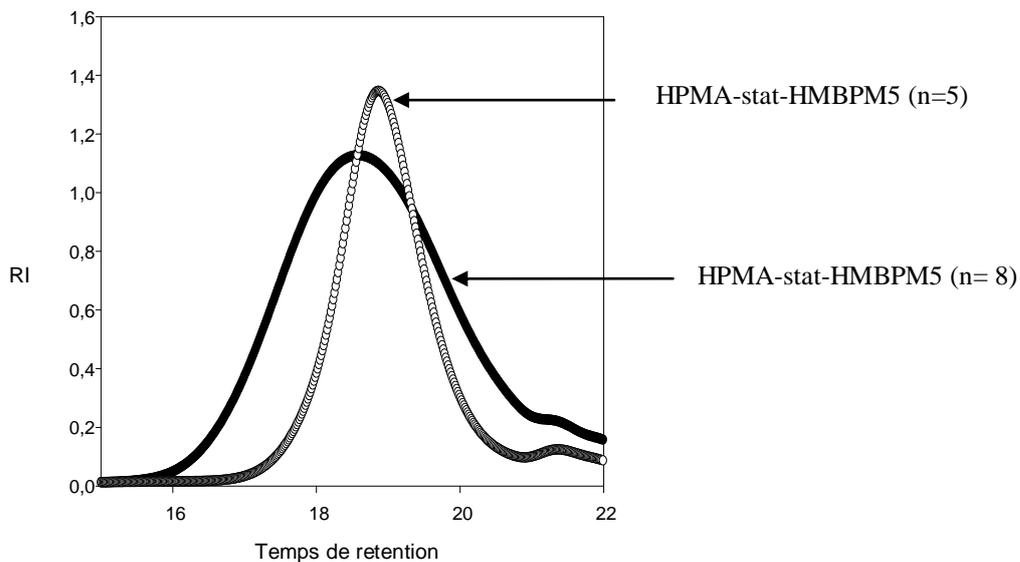


Figure 52: Chromatogrammes HPMA-stat-HMBPM5 (n=5) et HPMA-stat-HMBPM5 (n=8)

Notons enfin que le procédé de polymérisation de type RAFT ne met pas en jeu d'espèces potentiellement toxiques, de métaux de transition ou encore des ligands de coordination comme dans le procédé ATRP. Toutefois, il a été récemment montré que le groupement thiocarbonylthio S-C=S de l'agent de transfert de chaîne peut être toxique. D'autre part, ces groupements induisent une coloration des polymères dans le produit final obtenu.

Cependant, il est possible d'éliminer la fraction thiocarbonylthio par plusieurs modifications post-polymérisation décrites dans la littérature.^{178,295}

La Figure 53 regroupe les différents copolymères synthétisés par la RAFT.

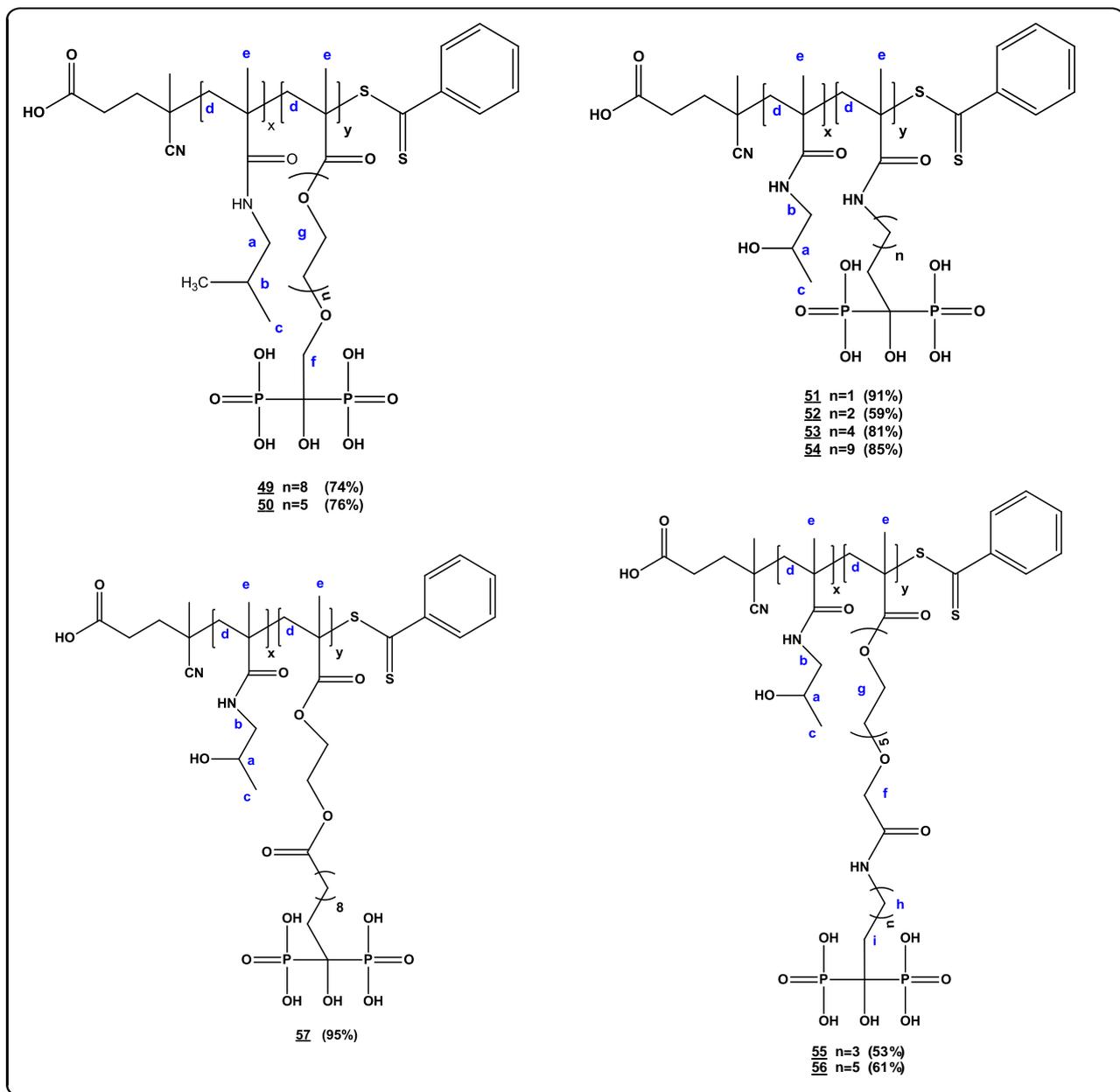


Figure 53: Différentes structures des copolymères statistiques synthétisés par la RAFT.

CONCLUSION

Dans le cadre de ce travail, notre objectif était de développer de nouveaux vecteurs polymères naturels ou synthétiques d'agents antitumoraux phosphorés (les bisphosphonates).

Nous nous sommes donc intéressés à la vectorisation des bisphosphonates par des systèmes conjugués de type polymère-PA, utilisant soit un polymère naturel polysaccharidique : le dextrane ou synthétique : à base de HPMA. L'objectif de notre étude était de comparer l'efficacité biologique de ces deux systèmes en tant que vecteurs de bisphosphonates.

Dans la première partie de ce travail, nous avons vectorisé les bisphosphonates de type HMBP-N (alendronate et nérédronate) avec le dextrane carboxyméthylé (CMD). L'originalité de ce travail repose sur la régiosélectivité du couplage covalent entre le dextrane et le bisphosphonate. Celui-ci ne nécessite aucune étape de protection/déprotection des autres fonctions réactives que ce soit au niveau du précurseur phosphoré ou du polysaccharide.

La synthèse des conjugués CMD-BP montre que le couplage de l'alendronate ainsi que le nérédronate sur le carboxyméthyl-dextrane est efficace. Les conditions opératoires mises au point ont permis de contrôler le nombre de bisphosphonates sur le CMD de manière reproductible.

Nous avons également montré qu'un nombre trop important de bisphosphonates couplés au CMD entraînait une baisse de l'efficacité biologique. Une trentaine de bisphosphonates greffés améliorent sensiblement l'activité pharmacologique *in vitro* par rapport à la molécule de bisphosphonate seule.

Une étude comparative de l'inhibition de la prolifération *in vitro* sur les trois lignées cellulaires A431, MDA-MB-231 et B16F10 a été réalisée pour les deux systèmes conjugués alendronate-CMD et nérédronate-CMD ainsi que sur les BPs seuls. Nous avons confirmé les résultats décrits dans la littérature concernant les effets antiprolifératifs de l'alendronate. Nous avons démontré que l'inhibition de la prolifération est fortement améliorée pour les deux conjugués.

L'étude *in vivo* confirme ce résultat pour l'alendronate. Le CMD-alendronate injecté par voie intraveineuse ralentit fortement la croissance tumorale alors que l'action antitumorale de

l'alendronate est moins significative. Il apparait donc que le carboxyméthyl-dextrane améliore la biodistribution des bisphosphonates vers le tissu vascularisé.

La seconde partie de ce travail était consacrée à la vectorisation des bisphosphonates à l'aide de polymères synthétiques : les copolymères HPMA. L'objectif était de synthétiser des copolymères de taille avoisinant 40 kDa, contenant un bras espaceur entre le squelette polymère et le principe actif avec différentes longueurs. De plus, différents types de liaisons chimiques entre le bras espaceur et le principe actif ont été introduits.

Nous avons donc développé en premier lieu des synthèses de différentes familles de nouveaux monomères méthacryliques en changeant la nature mais également la longueur du bras espaceur entre le méthacrylate et le bisphosphonate. Une vingtaine de monomères méthacryliques portant la fonction bisphosphonate ont été synthétisés avec un nombre d'étapes de synthèse allant de deux à huit.

Deux grandes familles ont été synthétisées :

Des monomères portant un HMBP azoté (pamidronate, alendronate, nérédronate) : **HMBPM-N** soit avec une liaison directe amide ou carbamate ou bien avec une liaison indirecte contenant un espaceur PEG.

Des monomères portant un HMBP non azoté : **HMBPM** avec une liaison éther ou ester contenant un espaceur PEG à différentes longueurs de chaîne carbonée. Les différents monomères sont obtenus sous forme solides, purs et avec de bons rendements.

En troisième partie, ces monomères méthacryliques portant un bisphosphonate ont été utilisés pour la synthèse de systèmes copolymères HPMA/HMBPM. Nous avons utilisé la méthode de polymérisation radicalaire contrôlée RAFT. En effet, nous avons obtenu des copolymères HPMA/HMBPM statistiques en une seule étape avec des masses molaires inférieures à 45 kDa et une polydispersité étroite. Les calculs montrent qu'environ une dizaine de molécules de bisphosphonates sont présentes dans le squelette polymère.

Les résultats de polymérisation obtenus sont préliminaires et feront l'objet d'un approfondissement dans le futur. En effet, l'introduction d'un nombre de molécules de bisphosphonates du même ordre de grandeur que dans les conjugués CMD-BP est tout à fait envisageable, étant donné le caractère vivant de la copolymérisation. Les conditions de synthèses des copolymères HPMA/HMBPM seront donc optimisées afin de permettre une meilleure conception de ces systèmes et de permettre leur comparaison aux CMD-BP.

En dernier lieu, comme dans le cas du dextrane, ces copolymères devront être testés biologiquement *in vitro* et *in vivo* afin d'évaluer leur efficacité en tant que vecteurs des bisphosphonates.

CHAPITRE VI: EXPERIMENTAL PART

VI.1. Chemical characterization

VI.1.1. Reagents and Solvents

Reagents were obtained from common commercial sources (Alfa Aesar, Fisher Organics, Aldrich...) and used without prior purification, unless otherwise stated.

Methacryloyl chloride was distilled before use.

Solvents were distilled over drying agents:

- **DCM** and **ACN** were distilled over P_2O_5 and stored over molecular sieves.
- **Toluene** was distilled from sodium and stored over molecular sieves.
- **DMF** was distilled from calcium hydride and stored over molecular sieves.
- **Et₂O** was dried over $MgSO_4$ then distilled over P_2O_5 and stored over sodium.
- **MeOH** and **EtOH** were distilled over sodium and stored over molecular sieves.
- **THF** was distilled over sodium / benzophenone and stored over sodium.
- **TEA** was dried, distilled and stored over potassium hydroxide.

VI.1.2. Characterization

VI.1.2.1. Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)

NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE III (1H : 400 MHz, ^{31}P : 162 MHz, ^{13}C : 101 MHz) in $CDCl_3$ or D_2O as an internal standard for 1H and external H_3PO_4 for ^{31}P . Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm), coupling constants J are given in Hertz.

The following abbreviations were used: s for singlet, bs broad singlet, d doublet, t triplet, q quadruplet, qt quintuplet, m multiplet.

When necessary, COSY and ^{13}C heteronuclear HMQC experiments were performed in order to unambiguously establish molecular structures.

VI.1.2.2. Infrared spectroscopy (IR)

Infrared spectra were recorded on a Thermo Electron Corporation Nicolet 380 FT-IR spectrometer between 4000 and 500 cm^{-1} (16 scans, resolution = 1 to 2 cm^{-1} , data spacing = 1, 929 cm^{-1}). The samples were studied as KBr pellets for powders and as films placed between two pieces of KBr for oils.

VI.1.2.3. Mass spectroscopy (MS)

Low resolution mass spectra was acquired using a WATERS micromass q-tof spectrometer with as internal reference H_3PO_4 (0, 1% in water/ acetonitrile 1/1) in positive mode.

VI.1.2.4. Size-exclusion chromatography (SEC-MALLS-RI)

Size exclusion chromatography analyses were performed with a Dionex Ultimate 3000 HPLC, (pre-column PWXL, column TSK Gel GMPWXL, flow rate = 0.5 mL/min, eluent = Na_2SO_4 (0.05M)/acetonitrile: 80/20).

VI.1.2.5. Melting point

Melting points were determined using a Stuart SMP3 version 5.0 and are given in ($^{\circ}\text{C}$).

VI.1.2.6. Column chromatography

Purifications using column chromatography were performed using silica 60 with thickness between 0.0063 and 0.2mm (merck, fontenay sous bois).

The purification using column chromatography in a reverse phase, were performed using silica C18 (Polygoprep 60-130, Macherey-Nagel).

VI.1.2.7. Dialysis

Purifications by dialysis were conducted using Dialysis tubing Spectra/Por CE (cellulose ester) with MWCO 2500 Da, 6000-8000 and 3500-5000 Da.

VI.2.Experimental part for the chapter III

VI.2.1.Procedures, NMR and IR characterization data

VI.2.1.1.Synthesis of carboxymethyl dextran 1a

A jacketed reactor connected to a thermostatic bath was charged with 30g of dextran T40 (MW = 40000 g/mol, 0.55 mol of hydroxyl functions) and 500 mL of isopropanol. A solution of NaOH (44g, 1.1 mol, 2 eq) dissolved in 113mL of distilled water was then added dropwise under strong mechanical stirring and the resulting reaction mixture was stirred for one hour at room temperature.

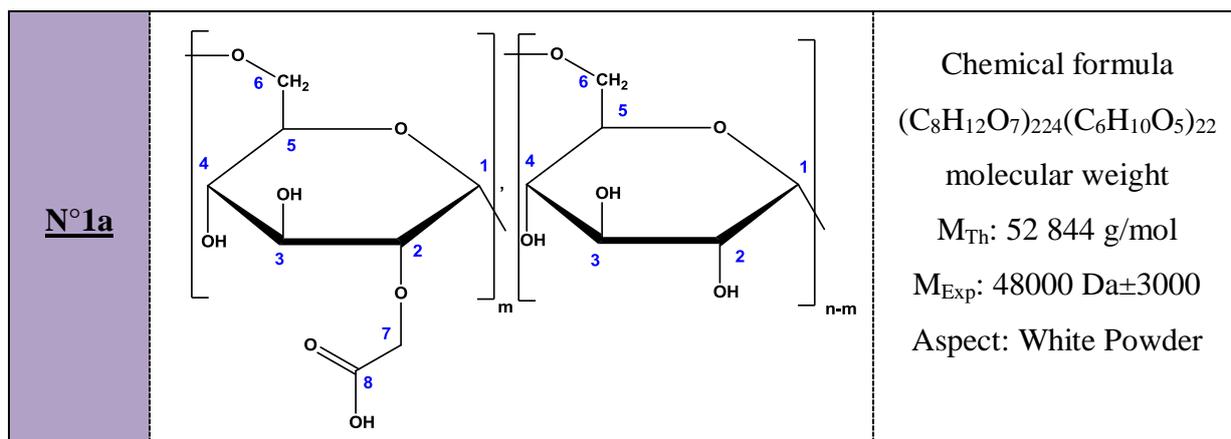
After heating to 60 °C, a solution of 51.97 g of mono chloroacetic (MCA) (1 eq, 0.55 mol) dissolved in 138 mL of isopropanol was added and the resulting mixture was stirred for 1.5 h²²⁰.

After cooling to room temperature and decantation, sufficient water is added to the aqueous phase until complete dissolution of the precipitate.

After neutralization of the pH with a few mL of acetic acid, the solution of CMD is added dropwise under vigorous stirring to an ice cold (4 °C) methanol solution (10 fold the volume of the aqueous solution of the CMD) contained in a large beaker in an ice/water bath. The polymer precipitates with a fluffy appearance (if it precipitates as a white cloud, it's too diluted; if it clumps, it is too concentrated). After filtration, the precipitate is washed with cold methanol and ether.

In order to recover all the CMD, five successive precipitations in cold methanol were performed.

After drying, the pure product was recovered as a white powder.

➤ Carboxymethyldextran **1a**

IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{O-H} = 3433$; $\nu_{C=O} = 1630$; $\nu_{C-O} = 1385$; $\nu_{O-H(alcohol)} = 1420$.

1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 5.27 (s, 2H, H7), 5.1 (s, 1H, H1), 4.28 - 3.58 (m, 13H, H1', H2 - H6).

VI.2.1.2. Determination of the Substitution Degree of the CMD

Measurement of the substitution degree of the CMD was performed by titration with a sodium hydroxide solution at INSERM 698 (Bichat Hospital). The titration was carried out by pH-metry using an automatic titrator (Mettler DL 53 Tledo) and the software Lab X.

The titration was performed twice for every average substitution degree of CMD on 100 mg of vacuum-dried CMD samples.

VI.2.1.3. General Procedure for the synthesis of aminoalkyl bisphosphonates BPs-N **2**

The aminobisphosphonic acids (alendronate, neridronate) were prepared from the corresponding carboxylic acid precursor with $n=3,5$ according to the procedure reported by Kieczkowski et collaborateurs¹¹¹ : a three-necked round-bottom flask under Argon was charged with the aminoacid derivative (150 mmol, 3.75 eq), H_3PO_3 (12.4 g, 150 mmol, 3.75eq) and 30 mL of methanesulfonic acid. After heating at 65 °C for 1 hour, PCl_3 (3.5 mL, 40 mmol, 1eq) was slowly added and the reaction was stirred overnight at 65 °C.

The resulting yellow viscous reaction mixture was then cooled to room temperature, quenched with 500 mL of ice/cold water and refluxed during 5 hours.

After subsequent cooling of the solution in an ice bath and adjustment of the pH at 4.3 using a 0.5M aqueous NaOH solution, the resulting white precipitate was collected by filtration and washed five times with methanol/water (95:5). The product is obtained as a tetrahydrate bisphosphonic disodium salt.

➤ (4-Ammonio-1-hydroxybutylidene)bisphosphonic acid disodium salt **2b**

N°2b		Chemical formula : $(C_4H_{11}NO_7P_2Na_2)$ Molecular weight : 293.07 g/mol Aspect : White powder Yield : 91% M.P : 237-227 °C
-------------	--	--

IR (KBr, cm^{-1}): ν_{N-H} = 3197 ; ν_{C-P} = 1451 ; $\nu_{P=O}$ = 1391 ; ν_{P-O} = 1072.

^{31}P {H} NMR (162 MHz, D_2O) δ : 18.58 (t, $^3J_{P-H}$ = 13.34 Hz).

1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 2.58 (t, $^3J_{H-H}$ = 6.9 Hz, 2H, H4), 1.89 - 1.61 (m, 4H, H3, H2).

^{13}C {H} NMR (101 MHz, D_2O) δ : 74.12 (t, $^1J_{P-C-P}$ = 133.0 Hz, C1), 40.1 (C4), 29.8 (C3), 23.7 (t, $^2J_{C-P}$ = 5.5 Hz, C2).

➤ (6-Amino-1-hydroxyhexylidene)bisphosphonic acid disodium salt **2c**

N°2c		Chemical formula: $(C_6H_{15}NO_7P_2Na_2)$ Molecular weight : 321.07 g/mol Aspect : White Powder Yield : 89 % M.P : 253-269 °C
-------------	--	---

IR (KBr, cm^{-1}): ν_{N-H} = 3166; ν_{C-P} = 1472 ; $\nu_{P=O}$ = 1221 ; ν_{P-O} = 1049.

^{31}P {H} NMR (162 MHz, D_2O) δ : 19.18 (t, $^3J_{P-H}$ = 13.2 Hz).

1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 3.04 (t, $^3J_{H-H}$ = 7.1 Hz, 2H, H6), 2.04 - 1.87 (m, 2H, H2), 1.75 - 1.65 (m, 4H, H3, H4), 1.53 - 1.34 (m, 2H, H5).

^{13}C {H} NMR (101 MHz, D_2O) δ : 73.9 (t, $^1J_{P-C-P}$ = 135.6 Hz, C1), 39.2 (C6), 33.2 (C5), 26.2 (C4), 26.1 (C3), 22.8 (t, $^2J_{C-P}$ = 6.1 Hz, C2).

VI.2.1.4. Coupling between the activated CMD and HMBPs **4**

Activation Step: CMD (200 mg; 0.004 mmol, 1 eq) was dissolved in 20 mL of distilled water and the pH was adjusted to 4.5 using a 1M solution of hydrochloric acid.

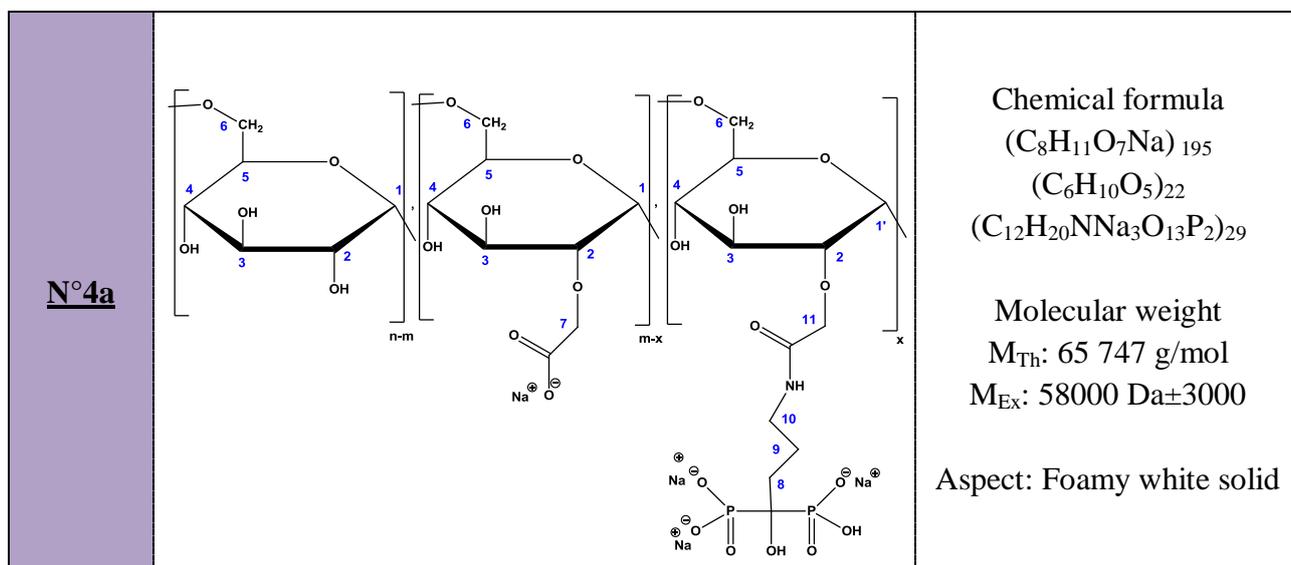
While continuously maintaining the pH at 4.5, 1-Ethyl-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) (1.24 mg, 0.008 mmol, 2 eq) was added gradually, then N-hydroxysuccinimide (NHS) (0.92 mg, 0.008 mmol, 2 eq) and the reaction mixture is then stirred for 30 minutes in an ice bath.

Coupling Step: a solution of the bisphosphonate derivative (alendronate or neridronate, 1 mmol, 1 eq) at pH 12 in aqueous sodium hydroxide solution (1M) is added to the previously obtained “activated” CMD solution (1.1 eq, 1.1 mmol) and the pH is adjusted to 11.5. After connecting the reaction flask to a condenser and heating to 40 °C, the reaction is monitored every hour by pH and ³¹P NMR check. After 1-4 hours, the end of the reaction is confirmed with a Ninhydrin test.

The coupling product is then purified by dialysis and then lyophilized

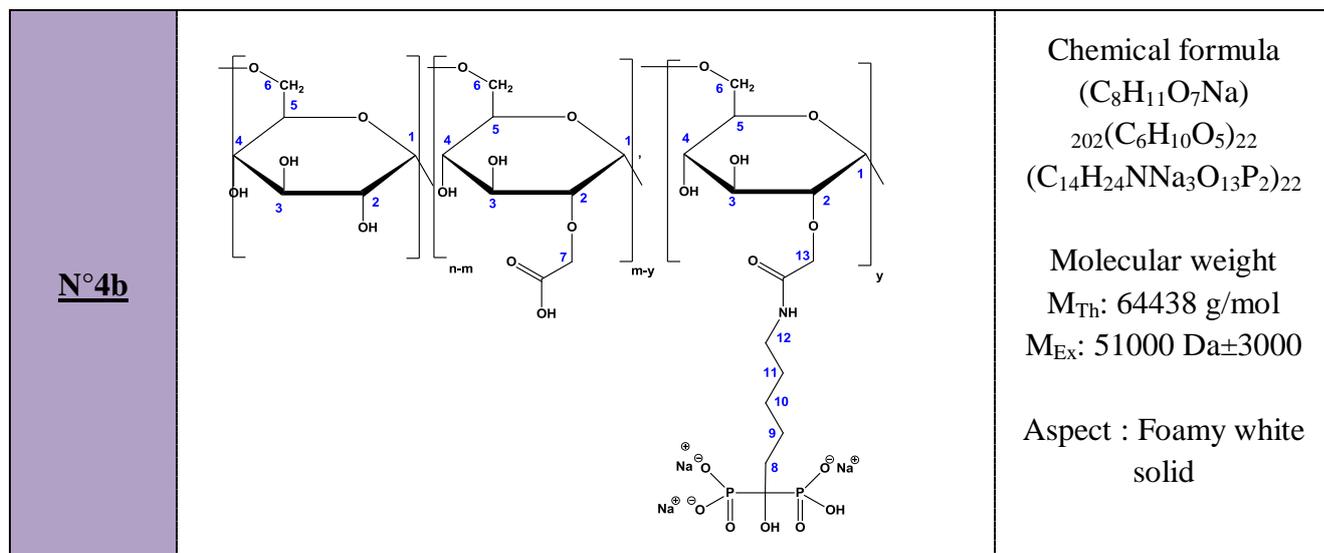
The ¹H RMN characterization showed that we coupled 29 molecules of alendronate and 22 molecules of neridronate.

➤ Carboxymethyl alendronate Dextran **4a**



IR (KBr, cm⁻¹): $\nu_{N-C=O} = 1708$; $\nu_{C-P} = 1484$; $\nu_{P=O} = 1230$; $\nu_{P-O} = 1051$.

³¹P NMR (200 MHz, D₂O) δ : 18.7 (s)

➤ Carboxymethyl neridronate Dextran **4b**


IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{N-C=O}$ = 1704 ; $\nu_{C=O}$ = 1486 ; $\nu_{P=O}$ = 1226 ; ν_{P-O} = 1054.

^{31}P { 1H } (200 MHz, D_2O) δ : 18.9 (s)

VI.3.Experimental part of the chapter IV

VI.3.1.Synthesis of aminoalkyl bisphosphonic acid with different chain carbon lengths **2**

The aminobisphosphonic acids with different chain length ($n= 2, 7, 10$) were prepared from the corresponding carboxylic acid precursor according to the procedure described in the case of neridronate and alendronate ($n=3,5$).

The three-necked round-bottom flask under Argon with a dropping funnel and a thermometer was charged with the aminoacid derivative $n=2,7,10$ (150 mmol, 3.75 eq), H_3PO_3 (12.4 g, 150 mmol, 3.75eq) and 30 mL of methanesulfonic acid. After heating at 65 °C for 1 hour, PCl_3 (3.5 mL, 40 mmol, 1eq) was slowly added and the reaction was stirred overnight at 65 °C.

The resulting yellow viscous reaction mixture was then cooled to room temperature, quenched with 500 mL of ice/cold water and refluxed during 5 hours.

After subsequent cooling of the solution in an ice bath and adjustment of the pH between 2.1 and 4.3 using a 0.5M aqueous NaOH solution, the resulting white precipitate was collected by filtration and washed five times with methanol/water (95:5). The product is obtained as a tetrahydrate bisphosphonic disodium salt.

It should be underlined that, to the best of our knowledge, the products **2d-e** are reported for

the first time.

- Disodium mono(3-ammonio-1-hydroxypropane-1,1-diylbis(hydrogenphosphonate)) **2a**

N°2a		<p>Chemical formula $C_3H_9NO_7P_2Na_2$ Molecular weight : 279 g/mol Aspect : White powder Yield: 71% M.P : 278 °C</p>
-------------	--	--

IR (KBr, cm^{-1}): ν_{N-H} = 3294 ; ν_{P-C} = 1548 ; $\nu_{P=O}$ = 1458 ; ν_{P-O} = 1077.

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 17.65 (t, $^3J_{P-H}$ = 13.5 Hz).

1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 3.01 (t, $^3J_{H-H}$ = 6.9 Hz, 2H, H2), 2.25 - 2.19 (m, 2H, H3)

^{13}C {H} NMR (101 MHz, D_2O) δ : 74.2 (t, $^1J_{P-C-P}$ = 136.3 Hz, C1), 35.9 (C2), 32.1 (C3).

- (4-Ammonio-1-hydroxybutylidene)bisphosphonic acid disodium salt **2b**

N°2b		<p>Chemical formula : ($C_4H_{11}NO_7P_2Na_2$) Molecular weight : 293.07 g/mol Aspect : White powder Yield : 91% M.P : 237-227 °C</p>
-------------	--	--

IR (KBr, cm^{-1}): ν_{N-H} = 3197 ; ν_{C-P} = 1451 ; $\nu_{P=O}$ = 1391 ; ν_{P-O} = 1072.

^{31}P {H} NMR (162 MHz, D_2O) δ : 18.58 (t, $^3J_{P-H}$ = 13.34 Hz).

1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 2.58 (t, $^3J_{H-H}$ = 6.9 Hz, 2H, H4), 1.89 - 1.61 (m, 4H, H3, H2).

^{13}C {H} NMR (101 MHz, D_2O) δ : 74.12 (t, $^1J_{P-C-P}$ = 133.0 Hz, C1), 40.1 (C4), 29.8 (C3), 23.7 (t, $^2J_{C-P}$ = 5.5 Hz, C2).

➤ (6-Amino-1-hydroxyhexylidene)bisphosphonic acid disodium salt **2c**

N°2c		Chemical formula: (C ₆ H ₁₅ NO ₇ P ₂ Na ₂) Molecular weight : 321.07 g/mol Aspect : White Powder Yield : 89 % M.P : 253-269 °C
-------------	--	--

IR (KBr, cm⁻¹): ν_{N-H} = 3166; ν_{C-P} = 1472 ; $\nu_{P=O}$ = 1221 ; ν_{P-O} = 1049.

³¹P {H} NMR (162 MHz, D₂O) δ : 19.18 (t, ³J_{P-H} = 13.2 Hz).

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ : 3.04 (t, ³J_{H-H} = 7.1 Hz, 2H, H6), 2.04 - 1.87 (m, 2H, H2), 1.75 - 1.65 (m, 4H, H3, H4), 1.53 - 1.34 (m, 2H, H5).

¹³C {H} NMR (101 MHz, D₂O) δ : 73.9 (t, ¹J_{P-C-P} = 135.6 Hz, C1), 39.2 (C6), 33.2 (C5), 26.2 (C4), 26.1 (C3), 22.8 (t, ²J_{C-P} = 6.1 Hz, C2).

➤ Disodium mono(8-ammonio-1-hydroxyoctane-1,1-diylbis(hydrogenphosphonate)) **2d**

N°2d		Chemical formula : C ₈ H ₁₉ NO ₇ P ₂ Na ₂ Molecular weight : 349.17 g/mol Aspect : Beige Powder Yield : 88% M.P : 248 °C
-------------	--	--

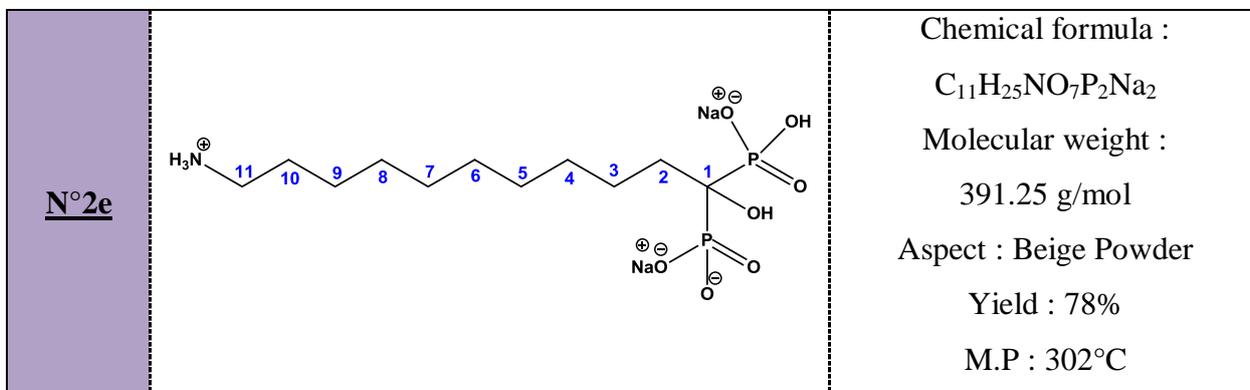
IR (KBr, cm⁻¹): ν_{N-H} = 3393 ; ν_{C-P} = 1437 ; $\nu_{P=O}$ = 1310 ; ν_{P-O} = 1099.

³¹P {H} NMR (162 MHz, D₂O) δ : 19.25 (t, ³J_{P-H} = 13.16 Hz).

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ : 2.89 (t, ³J_{H-H} = 7.16 Hz, 2H, H8), 1.80 - 1.85 (m, 2H, H2), 1.46 - 1.58 (m, 2H, H7), 1.29 - 1.16 (m, 8H, H3 - H6)

¹³C {H} NMR (101 MHz, D₂O) δ : 74.8 (t, ¹J_{P-C-P} = 134.8 Hz, C1), 40.5 (C8), 34.2 (C7), 31.8 (C4), 30.4 (C5), 28.8 (C6), 26.3 (C3), 24.3 (t, ²J_{C-P} = 5.1 Hz, C2).

- Disodium mono(11-ammonio-1-hydroxyundecane-1,1-diylbis(hydrogenphosphonate))
(2e)



IR (KBr, cm⁻¹): ν_{N-H} = 3286 ; ν_{C-P} = 1467 ; $\nu_{P=O}$ = 1320 ; ν_{P-O} = 1110.

³¹P {H} NMR (162 MHz, D₂O) δ : 19.23 (t, ³J_{P-H} = 13.41 Hz).

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ : 2.54 (t, ³J_{H-H} = 7.0 Hz, 2H, H11), 1.87 - 1.76 (m, 2H, H2), 1.54 - 1.41 (m, 2H, H10), 1.39 - 1.25 (m, 14H, H3 - H9).

¹³C {H} NMR (101 MHz, D₂O) δ : 74.5 (t, ¹J_{P-C-P} = 133.7 Hz, C1), 41.4 (C11), 40.5 (C10), 35.9 (C4), 31.4 (C5), 30.5 (C6), 29.2 (C7), 28.7 (C8), 28.5 (C9), 26.0 (C3), 24.3 (t, ²J_{C-P} = 5.1 Hz, C2).

VI.3.2. General Procedure for the synthesis of (meth) acrylic aminobisphosphonic acid HMBPM1-N 6

A three-necked flask equipped with an argon inlet, a thermometer and a condenser was charged with the methacryloyl chloride freshly distilled (0.93g, 9 mmol, 2 eq) and dry dichloromethane (25mL). After addition of freshly distilled triethylamine (0.9 g, 9 mmol, 2 eq), the reaction mixture is stirred for a few minutes at room temperature.

Then, the aminobisphosphonate derivative (4.5 mmol, 1 eq.) was added per portion and the reaction mixture was stirred at first at room temperature for a few minutes and then refluxed (the reaction time depends on the length of the carbon chain). The end of the reaction is confirmed with ninhydrin test and ³¹P NMR.

After the reaction was complete, it was quenched with water and concentrated in vacuo.

Excess of acid chloride and triethylamine were removed by successive washing with dichloromethane (3 x 20 mL) and diethyl ether (3 x 20mL) and extractions of the products in aqueous solution at pH=12 and pH=1.5.

The products are obtained as a disodium salt after multiple flushing through a cation exchange resin DOWEX ® H⁺.

➤ Sodium 1-hydroxy-3-methacrylamidopropane-1,1-diylbis(hydrogenphosphonate) **6a**

N°6a		Chemical formula : $C_7H_{13}NNa_2O_8P_2$ Molecular weight : 347.11 g/mol Aspect : Yellow oil Yield : 75 %
-------------	--	--

IR (KBr, cm⁻¹): ν_{N-H} = 3361 ; $\nu_{C=O}$ = 1654 ; $\nu_{C=C}$ = 1619 ; $\nu_{P=O}$ = 1226 ; 1145 ; ν_{P-O} = 1100 , 1002.

³¹P {H} NMR (162 MHz, D₂O) δ : 18.6 (t, $^3J_{P-H}$ = 13.4 Hz).

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ : 5.63 (s, 1H, H₆), 5.37 (s, 1H, H_{6'}), 3.51 (t, $^3J_{H-H}$ = 7.5 Hz, 2H, H₃), 2.25 - 2.08 (m, 2H, H₂), 1.85 (s, 3H, H₇).

¹³C {H} NMR (101 MHz, D₂O) δ : 171.4 (C₄), 139.0 (C₅), 121.2 (C₆), 73.1 (t, $^1J_{P-C-P}$ = 136.1 Hz, C₁), 35.6 (t, $^2J_{C-P}$ = 7.8 Hz, C₂), 32.8 (C₃), 17.7 (C₇).

MS (C₇H₁₃NNa₂O₈P₂, pH= 7.8): [M+1]⁺= 303.8; [M+1+Na]⁺= 325.9; [M+1+2Na]⁺= 347.9.

➤ Sodium 1-hydroxy-4-methacrylamidobutane-1,1-diylbis(hydrogenphosphonate)

6b

N°6b		Chemical formula : $C_8H_{15}NO_8P_2Na_2$ Molecular weight: 375.16 g/mol Aspect : Yellow oil Yield : 86 %
-------------	--	---

IR (KBr, cm⁻¹): ν_{N-H} = 3359 ; $\nu_{C=O}$ = 1657 ; $\nu_{C=C}$ = 1623 ; $\nu_{P=O}$ = 1173 ; ν_{P-O} = 1059.

³¹P {H} NMR (162 MHz, D₂O) δ : 18.4 (t, $^3J_{P-H}$ = 12.39 Hz).

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 5.64 (s, 1H, H7), 5.39 (s, 1H, H7'), 3.25 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6.6$ Hz, 2H, H4), 2.09 - 1.73 (m, 7H, H2, H3, H8).

^{13}C {H} NMR (101 MHz, D_2O) δ : 171.9 (C5), 139.2 (C6), 120.9 (C7), 73.8 (t, $^1J_{\text{P-C-P}} = 135.4$ Hz, C1), 40.2 (C4), 31.1 (C3), 23.5 (t, $^2J_{\text{C-P}} = 6.3$ Hz, C2), 17.8 (C8).

➤ Sodium 1-hydroxy-6-methacrylamidohexane-1,1-diylbis(hydrogenphosphonate) **6c**

N°6c		Chemical formula
		$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{NO}_8\text{P}_2\text{Na}_2$
		Molecular weight : 389.2 g/mol
		Aspect : Yellow oil
		Yield : 91 %

IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{\text{N-H}} = 3374$; $\nu_{\text{C=O}} = 1655$; $\nu_{\text{C=C}} = 1627$; $\nu_{\text{P=O}} = 1172$; $\nu_{\text{P-O}} = 1060$.

^{31}P {H} NMR (162 MHz, D_2O) δ : 18.9 (t, $^3J_{\text{P-H}} = 15.39$ Hz).

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 5.50 (s, 1H, H9), 5.27 (s, 1H, H9'), 3.10 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6.9$ Hz, 2H, H6), 1.96 - 1.70 (m, 5H, H2, H10), 1.52 - 1.36 (m, 4H, H3, H5), 1.27 - 1.10 (m, 2H, H4).

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ : 172.0 (C7), 139.4 (C8), 120.6 (C9), 74.3 (t, $^1J_{\text{P-C-P}} = 133.9$ Hz, C1), 39.7 (C6), 33.7 (C5), 30.4 (C4), 27.0 (C3), 23.4 (t, $^2J_{\text{C-P}} = 6.3$ Hz, C2), 17.8 (C10).

MS ($\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{NO}_8\text{P}_2\text{Na}_2$, pH= 7.11): $[\text{M}+1]^+ = 345.9$; $[\text{M}+1+\text{Na}]^+ = 367.9$; $[\text{M}+1+2\text{Na}]^+ = 389.9$.

Sodium 1-hydroxy-8-methacrylamidooctane-1,1-diylbis(hydrogenphosphonate) **6d**

N°6d		Chemical formula
		$\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{NO}_8\text{P}_2\text{Na}_2$
		Molecular weight
		417.24 g/mol
		Aspect yellow powder
		Yield: 78%
		M.P: 312 (dec)

IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{\text{N-H}} = 3273$; $\nu_{\text{C=O}} = 1652$; $\nu_{\text{C=C}} = 1617$; $\nu_{\text{P=O}} = 1116$; $\nu_{\text{P-O}} = 966$.

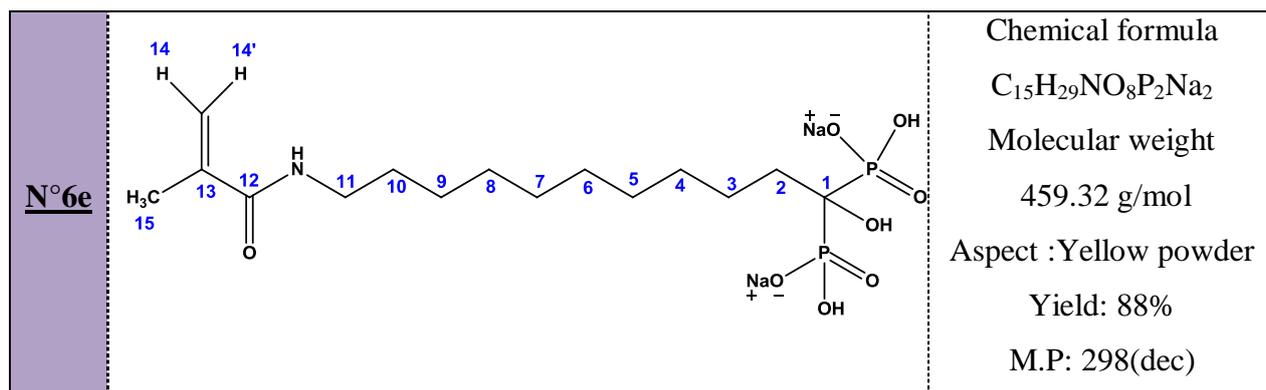
^{31}P {H} NMR (162 MHz, D_2O) δ : 19.9 (t, $^3J_{\text{P-H}} = 13.95$ Hz).

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 5.58 (s, 1H, H11), 5.36 (s, 1H, H11'), 3.18 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6.9$ Hz, 2H, H8), 2.10 - 1.76 (m, 5H, H2, H12), 1.52 - 1.47 (m, 4H, H7, H3), 1.28 (m, 6H, H4 - H6).

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ : 171.9 (C9), 139.3 (C10), 120.5 (C11), 73.8 (t, $^1J_{\text{P-C-P}} = 135.4$ Hz, C1), 39.5 (C8), 33.5 (C7), 29.4 (C6), 28.2 (C5), 28.1 (C4), 25.9 (C3), 23.1 (t, $^2J_{\text{C-P}} = 6.1$ Hz, C2), 17.7 (C12).

MS ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{NO}_8\text{P}_2\text{Na}_2$, pH=4.23) : $[\text{M}+1]^+ = 374$; $[\text{M}+1+\text{Na}]^+ = 396$; $[\text{M}+1+2\text{Na}]^+ = 417.9$

➤ Sodium 1-hydroxy-11-methacrylamidoundecane-1,1-diylbis(hydrogenphosphonate) **6e**



IR (KBr, cm^{-1}) : $\nu_{\text{N-H}} = 3393$; $\nu_{\text{C=O}} = 1654$; $\nu_{\text{C=C}} = 1621$; $\nu_{\text{P=O}} = 1222$; 1176 ; $\nu_{\text{P-O}} = 1061$.

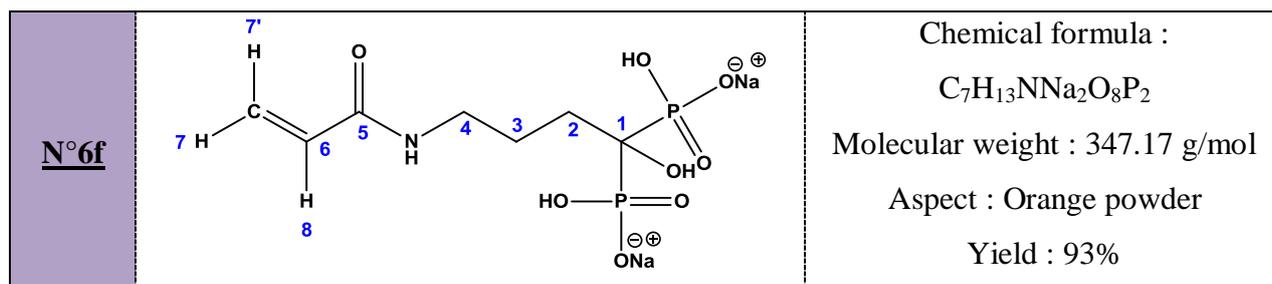
^{31}P {H} NMR (162 MHz, D_2O) δ : 19.2 (t, $^3J_{\text{P-H}} = 14.32$ Hz).

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 5.60 (s, 1H, H14), 5.37 (s, 1H, H14'), 3.20 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6.8$ Hz, 2H, H11), 2.03 - 1.76 (m, 5H, H2, H15), 1.52 - 1.49 (m, 4H, H10), 1.26 - 1.14 (m, 12H, H3 - H9).

^{13}C {H} NMR (101 MHz, D_2O) δ : 171.9 (C12), 139.4 (C13), 120.6 (C14), 74.1 (t, $^1J_{\text{P-C-P}} = 134.4$ Hz, C1), 42.3 (C11), 40.7 (C10), 35.2 (C9), 31.6 (C8), 30.7 (C7), 29.8 (C6), 28.9 (C5), 27.1 (C4), 24.1 (C3), 23.9 (t, $^2J_{\text{C-P}} = 6.2$ Hz, C2), 17.8 (C15).

MS ($\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{NO}_8\text{P}_2\text{Na}_2$, pH=4.54) : $[\text{M}+1]^+ = 416$; $[\text{M}+1+\text{Na}]^+ = 438$; $[\text{M}+1+2\text{Na}]^+ = 460$.

➤ Sodium (4-acrylamido-1-hydroxybutane-1,1-diyl)bis(hydrogenphospho-nate) **6f**



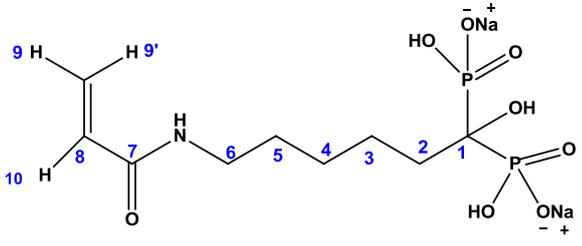
IR (KBr, cm^{-1}) : $\nu_{\text{N-H}}$ = 3379 ; $\nu_{\text{C=O}}$ = 1664 ; $\nu_{\text{C=C}}$ = 1627 ; $\nu_{\text{P=O}}$ = 1242; $\nu_{\text{P-O}}$ = 1119.

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 18.3.

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 5.99 (dd, $^3J_{\text{H-H}}$ = 16.7, 9.9 Hz, 1H, H8), 5.87 (dd, $^3J_{\text{H-H}}$ = 16.7, 2.2 Hz, 1H, H7), 5.51 (dd, $^3J_{\text{H-H}}$ = 10.0, 2.3 Hz, 1H, H7'), 3.12 (t, $^3J_{\text{H-H}}$ = 7.5 Hz, 2H, H4), 1.98 - 1.79 (m, 2H, H2, H3)

^{13}C {H} NMR (101 MHz, D_2O) δ : 171.48 (C5), 139.18 (C6), 120.74 (C7), 75.2 (t, $^1J_{\text{P-C-P}}$ = 137.2 Hz, C1), 42.2 (C4), 31.6 (C3), 23.8 (t, $^2J_{\text{C-P}}$ = 9.1 Hz, C2).

➤ sodium (6-acrylamido-1-hydroxyhexane-1,1-diyl)bis(hydrogenphosphonate) **6g**

N°6g		<p>Chemical formula: $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NNa}_2\text{O}_8\text{P}_2$ Molecular weight : 375.16 g/mol Aspect : Orange powder Yield : 89%</p>
-------------	---	--

IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{\text{N-H}}$ = 3388 ; $\nu_{\text{C=O}}$ = 1658 ; $\nu_{\text{C=C}}$ = 1619 ; $\nu_{\text{P=O}}$ = 1235 ; 1169 ; $\nu_{\text{P-O}}$ = 1056.

^{31}P {H} NMR (162 MHz, D_2O) δ : 18.7.

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 5.99 (dd, $^3J_{\text{H-H}}$ = 17.4, 10.1 Hz, 1H, H10), 5.87 (dd, $^3J_{\text{H-H}}$ = 17.4, 1.7 Hz, 1H, H9), 5.51 (dd, $^3J_{\text{H-H}}$ = 10.1, 1.7 Hz, 1H, H9'), 2.89 (t, $^3J_{\text{H-H}}$ = 7.3 Hz, 2H, H6), 1.88 - 1.67 (m, 2H, H2), 1.64-1.37 (m, 4H, H3, H5), 1.29 (dd, J = 14.8, 7.5 Hz, 2H, H4).

^{13}C {H} NMR (101 MHz, D_2O) δ : 173.6 (C7), 140.1 (C8), 119.7 (C9), 75.6 (t, $^1J_{\text{P-C-P}}$ = 136.8 Hz, C1), 41.3 (C6), 40.5 (C5), 35.1 (C4), 32.7 (C3), 24.5 (t, $^2J_{\text{C-P}}$ = 9.1 Hz, C2).

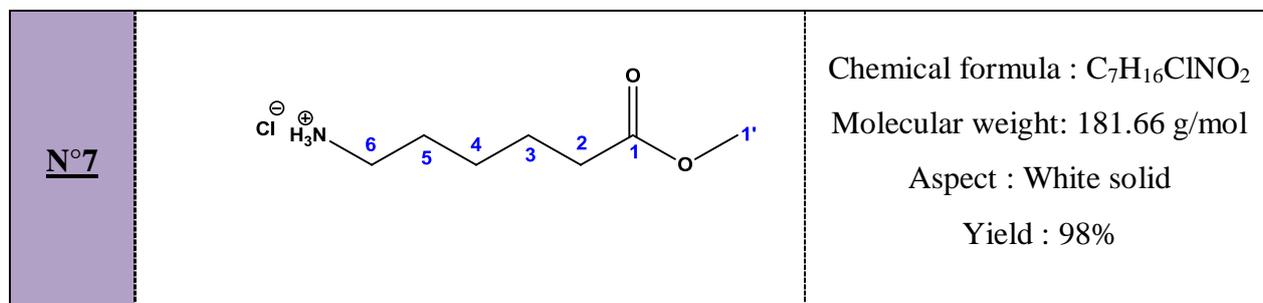
VI.3.3.Synthesis of Methyl 6-aminohexanoate **8**

A 150 mL flask was charged with the amino acid derivative (1.48 g, 0.0113 mol, 1 eq.) and 25 mL of methanol. The resulting mixture was stirred at 0°C and thionyl chloride (1.8 mL, 0.0024 mol, 2 eq.) was added. After heating to 40°C for 3.5 h, the reaction mixture is cooled to room temperature and concentrated under reduce pressure and the product is obtained as white solid in aqueous layer.

In order to convert the ammonium salt derivative into the free amine derivative, the ammonium salt derivative is dissolved in ether and 20 mL of dry triethylamine and a few drops (2mL) of an aqueous NaOH (1N) solution were added. The combined organics extracts

were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated in vacuo. The solvent was evaporated under reduce pressure and the aminoester was dried in the vacuum desiccator. The corresponding amine was obtained as solid powder.

➤ 6-methoxy-6-oxohexan-1-aminium 7

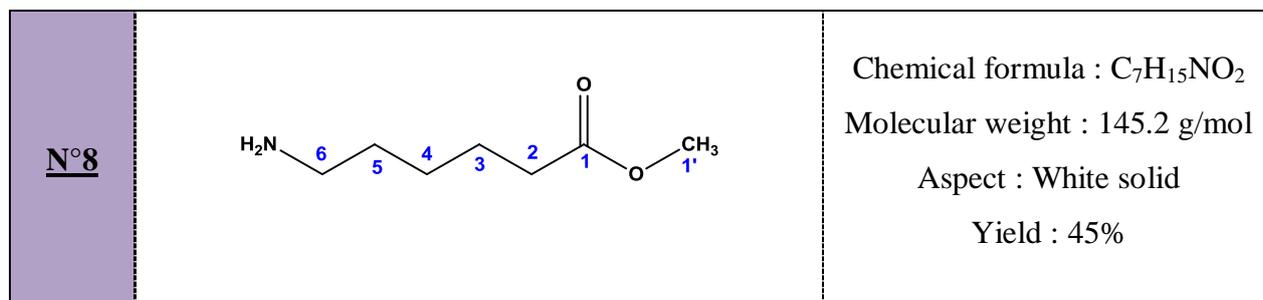


IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{\text{N-H}}$ = 3350; $\nu_{\text{C=O}}$ = 1729; $\nu_{\text{C-O}}$ = 1186.

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 3.72 (s, 3H, H1'), 3.02 (t, $^3J_{\text{H-H}}$ = 7.4 Hz, 2H, H6), 2.44 (t, $^3J_{\text{H-H}}$ = 7.4 Hz, 2H, H2), 1.77 - 1.57 (m, 4H, H3, H5), 1.4 (qt, $^3J_{\text{H-H}}$ = 8.1 Hz, 2H, H4).

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ : 174.1 (C1), 51.4 (C1'), 41.7 (C6), 33.9 (C2), 33.1 (C5), 26.3 (C4), 24.6 (C3).

➤ Methyl 6-aminohexanoate 8



IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{\text{N-H}}$ = 3322; $\nu_{\text{C=O}}$ = 1727; $\nu_{\text{C-O}}$ = 1182 .

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 3.67 (s, 3H, H1'), 2.71 (t, $^3J_{\text{H-H}}$ = 7.2 Hz, 2H, H6), 2.36 (t, $^3J_{\text{H-H}}$ = 7.4 Hz, 2H, H2), 1.66 - 1.47 (m, 4H, H5, H3), 1.36 - 1.23 (m, 2H, H4).

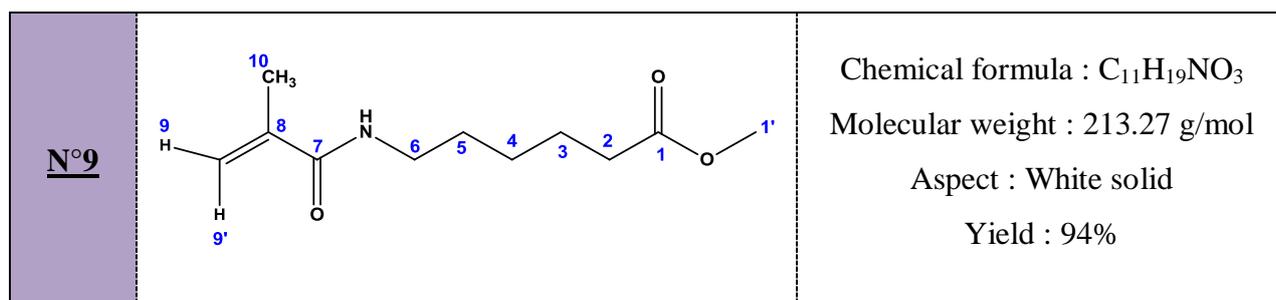
^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ : 174.2 (C1), 51.3 (C1'), 42.9 (C6), 34.2(C5), 33.8(C2), 26.4 (C4), 24.6 (C3)

VI.3.4.Synthesis of Methyl 6-methacrylamidohexanoate 9

A three-necked flask equipped with an argon inlet, a thermometer and a condenser was charged with the aminoester (0.73 g, 5 mmol, 1 eq) solubilized in dry dichloromethane 10mL. After the addition of freshly distilled triethylamine (1.77 g, 17.5 mmol, 3.5 eq) at 0°C, the reaction mixture is stirred for a few minutes at room temperature.

Then, the methacryloyl chloride freshly distilled (0.52 g, 5mmol, 1 eq) in dry dichloromethane (10mL) was added dropwise during 25min. The reaction mixture was stirred at first at room temperature for few minutes and then refluxed. The reaction was monitored with Kaiser test. The reaction was completed after 2h at reflux.

After this, it was quenched with 20mL of HCl solution (1N), the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 20 mL) and the organic layer was washed with 30mL of saturated NaHCO₃ and 30mL of saturated NaCl and dried with MgSO₄, filtered and evaporated in vacuo.



IR (KBr, cm⁻¹): ν_{N-H} = 3480; $\nu_{C=O}$ = 1721, 1660; $\nu_{C=C}$ = 1617; ν_{C-O} = 1195.

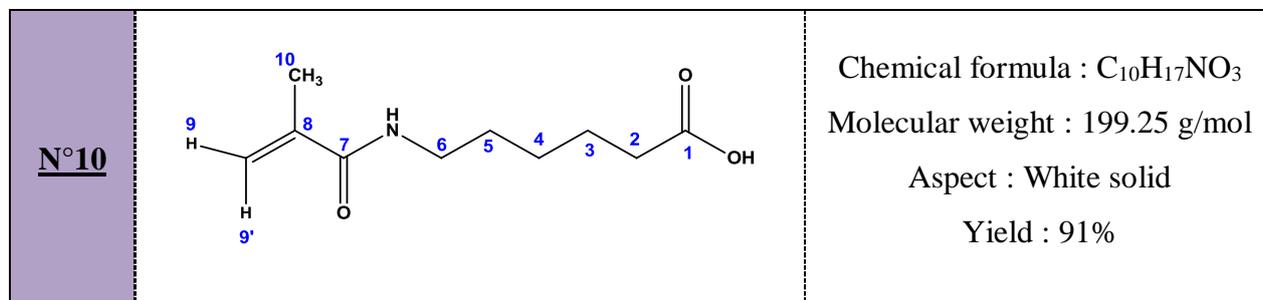
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 6.09 (s, 1H, H₉), 5.70 - 5.57 (m, 1H, H_{9'}), 5.37 - 5.13 (m, 1H, NH), 3.63 (s, 3H, H_{1'}), 3.27 (td, ³ J_{H-H} = 7.1, ³ J_{H-H} = 5.9 Hz, 2H, H₆), 2.29 (t, ³ J_{H-H} = 7.4 Hz, 2H, H₂), 1.92 (dd, ⁴ J_{H-H} = 1.5, 1.0 Hz, 3H, H₁₀), 1.73 - 1.44 (m, 4H, H₃, H₅), 1.34 (qt, ³ J_{H-H} = 7.3 Hz, 2H, H₄).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 174.0 (C₁), 168.6 (C₇), 140.1 (C₈), 119.1 (C₉), 51.4 (C_{1'}), 39.3 (C₆), 33.7 (C₂), 29.0 (C₅), 26.3 (C₄), 24.4 (C₃), 18.6 (C₁₀).

VI.3.5.Synthesis of methacrylamidohexanoic acid 10

A 50mL flask is charged with K₂CO₃ (20 mmol, 1.3 eq.) and 15 mL of water (C = 1.33 mol/L). Then, the amino ester 9 (3.19g, 15 mmol) was added and the mixture is stirred for 10 mn under reflux.

The resulting solution is washed with diethylether (2 x 10 mL) and then acidified with HCl 6M to pH = 2. The aqueous layer is then extracted with dichloromethane (4 x 25 mL) and the combined organic layers are dried with MgSO₄ and concentrated under reduce pressure.



IR (KBr, cm⁻¹): ν_{N-H} = 3368 ; $\nu_{C=O}$ = 1706, 1658; $\nu_{C=C}$ =1623; ν_{C-O} = 1280.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 6.09 (s, 1H, H9), 5.70 - 5.55 (m, 1H, H9), 5.32 (1H, NH), 3.27 (td, ³J_{H-H}= 7.1, ³J_{H-H}= 5.9 Hz, 2H, H6), 2.29 (t, ³J_{H-H}= 7.4 Hz, 2H, H2), 1.92 (dd, ⁴J_{H-H}= 1.5, 1.0 Hz, 3H, H10), 1.70 - 1.46 (m, 4H, H3, H5), 1.40 - 1.27 (m, 2H, H4).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 173.9 (C1), 168.5 (C7), 140.1 (C8), 119.0 (C9), 51.3 (C6), 39.3 (C2), 33.7 (C5), 29.0 (C4), 26.2 (C3), 18.5 (C10).

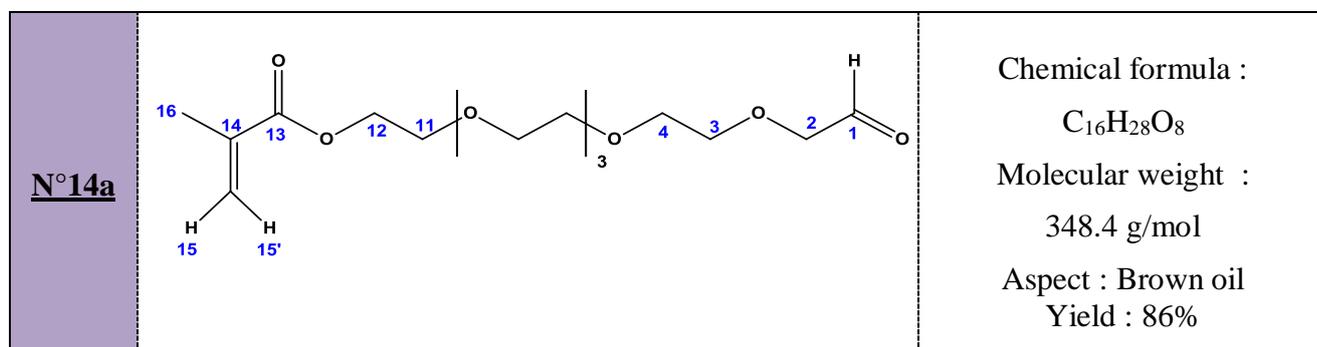
VI.3.6. Swern method for the synthesis of aldehydes from methacrylic PEG alcohol 14

In a dry and argon flushed 100mL three-necked flask, equipped with a mechanical stirrer, a thermometer, an argon inlet and a septum, a solution of DMSO (1.7 g, 21.8 mmol) in 4.4 mL of dichloromethane is added dropwise at -55 °C to a solution of oxalyl chloride (2.16 g, 17.2 mmol) in 22.6 mL of dichloromethane.

After two minutes, a solution of methacrylic alcohol (10 mmol) in 9 mL of dichloromethane is added dropwise.

After stirring for 15 min, the mixture was allowed to warm to -30°C. Then, freshly distilled triethylamine was added dropwise (5.1 g, 50.4 mmol).

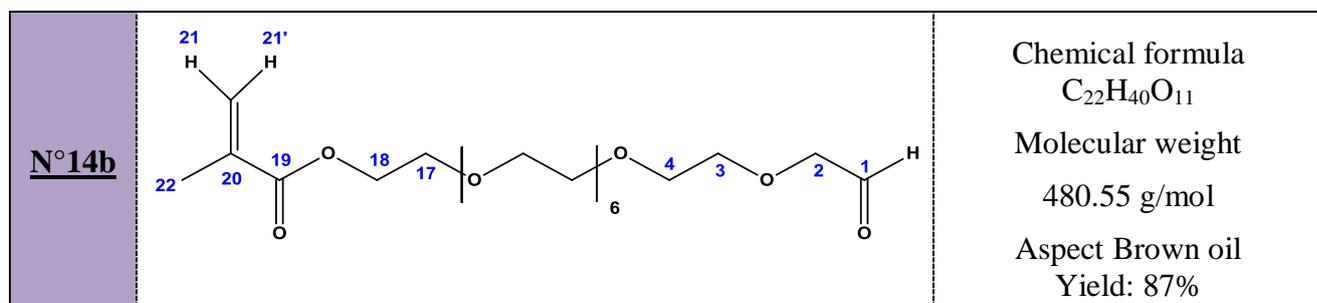
After 12 h at room temperature, the mixture is quenched with 20 mL of water. The aqueous phase was extracted twice with 20mL of dichloromethane and the combined organic phases were washed successively with HCl (20%) and NaHCO₃ (5%), dried over MgSO₄ and concentrated in vacuo.

➤ 2-(2-(2-(2-(2-(2-oxoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl methacrylate **14a**


IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{C-H(Ald)} = 2878$; $\nu_{C=O(Ald)} = 1718$; $\nu_{C=C} = 1651$; $\nu_{C-O} = 1170$.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.67 (s, 1H, H1), 6.00 (s, 1H, H15), 5.45 (s, 1H, H15'), 4.36 (s, 2H, H2), 4.12-4.06 (m, 2H, H12), 3.79 - 3.16 (m, 18H, H3 - H11), 1.81 (s, 3H, H16).

^{13}C {H} NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 201.1 (C1), 167.5 (C13), 136.2 (C14), 125.9 (C15), 71.3 - 69.2 (m, C2 - C11), 63.9 (C12), 18.4 (C16).

 ➤ 2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-oxoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl methacrylate **14b**


IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{C-H(Ald)} = 2875$; $\nu_{C=O(Ald)} = 1728$; $\nu_{C=C} = 1647$; $\nu_{C-O} = 1114$.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.56 (s, 1H, H1), 6.10 (s, 1H, H21), 5.54 (s, 1H, H21'), 4.28 (s, 2H, H2), 4.14-4.08 (m, 2H, H18), 3.76 - 3.55 (m, 30H, H3 - H17), 1.91 (s, 3H, H22).

^{13}C {H} NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 201.1 (C1), 167.4 (C19), 136.2 (C20), 125.8 (C21), 71.2 (C2), 70.8 - 69.2 (C3 - C17), 63.9 (C18), 18.4 (C22).

VI.3.7. General procedure for the synthesis of carboxylic acid from the corresponding aldehydes 15

A three necked 500 mL flask equipped with a dropping funnel is charged with 257.5 mL of dry acetonitrile and periodic acid H_5IO_6 (8.07 g, 35.4 mmol, 1.1 eq.) and the resulting mixture was stirred at room temperature for 15 min.

Then, a solution of the aldehyde derivative **14a-b** (32.2 mmol, 1 eq.) in 31.9 mL of dried acetonitrile is added dropwise at 0 °C, followed by dropwise addition of a solution of pyridinium chlorochromate PCC (0.14 g, 0.65 mmol) in 31.9 mL of acetonitrile. The reaction was monitored by TLC (eluent : DCM / EtOH = 95/5)²⁴⁶.

When the reaction was complete, 70mL of ethyl acetate were added to the mixture and the resulting solution was washed with saturated NaCl, saturated NaHSO_3 , saturated NaCl and dried with MgSO_4 . Endly, the volatile fractions were evaporated under reduced pressure.

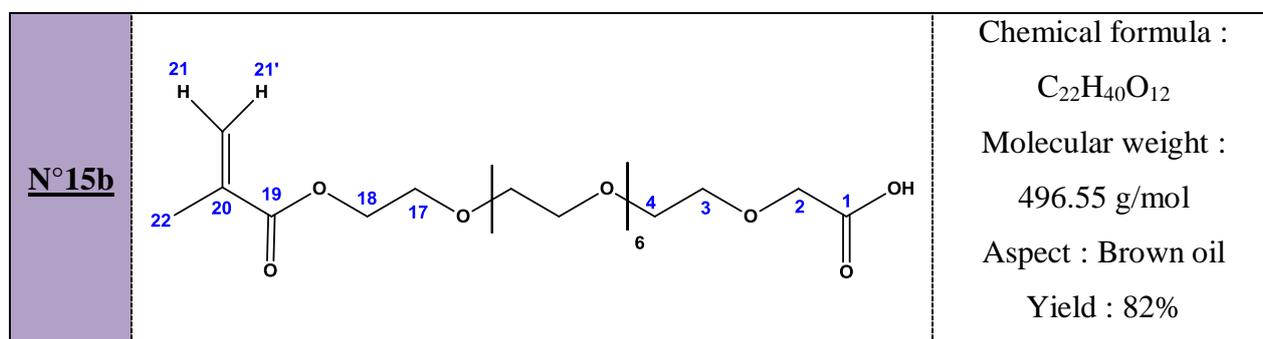
➤ 20-methyl-19-oxo-3,6,9,12,15,18-tetraoxapentadec-20-en-1-oic acid **15a**

N°15a		Chemical formula :
		$\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_9$
		Molecular weight :
		364 g/mol
		Aspect : Brown oil
Yield : 74%		

IR (KBr, cm^{-1}): ν_{OH} = 3105 ; $\nu_{\text{C=O}}$ = 1736,1723; $\nu_{\text{C=C}}$ = 1654 ; $\nu_{\text{C-O}}$ = 1242.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.03 (s, 1H, H15), 5.48 (s, 1H, H15'), 4.61 (s, 2H, H2), 3.82 - 3.22 (m, 20H, H3 - H12), 1.84 (s, 3H, H16).

$^{13}\text{C}\{\text{H}\}$ NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 171.7 (C1), 166.9 (C13), 135.7 (C14), 125.5 (C15), 70.2 - 69.9 (C3 - C11), 68.7 (C2), 63.5 (C12), 17.9 (C16).

➤ 29-methyl-28-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxatriacont-29-en-1-oic acid **15b**


IR (KBr, cm^{-1}): ν_{OH} = 2872 ; $\nu_{C=O}$ = 1738, 1718 ; $\nu_{C=C}$ = 1645 ; ν_{C-O} = 1219.

1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 5.97 (s, 1H, H21), 5.43 (s, 1H, H21'), 4.57 (s, 2H, H2), 4.00-3.82 (m, 2H, H18), 3.64 - 3.36 (m, 38H, H3 - H17), 1.79 (s, 3H, H22).

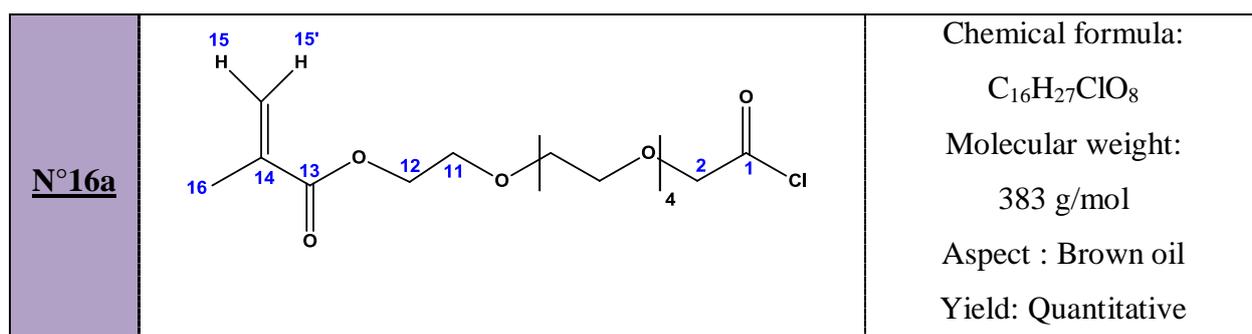
^{13}C {H} RMN (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 172.1 (C1), 167.2 (C19), 136.0 (C20), 125.7 (C21), 71.9 - 69.0 (C3 - C17), 68.4 (C2), 63.8 (C18), 18.2 (C22).

VI.3.8. General Procedure for the preparation of methacrylic-PEG acid chlorides **16**.

A 50 mL flame-dried three necked flask equipped with an argon inlet and a dropping funnel was charged with the carboxylic acid derivative **15a-b** (1 mmol, 1, eq) and 25 mL of freshly distilled DCM. The flask is placed in ice bath (0 °C) and a solution of oxalyl chloride (0.63 g, 5 mmol, 5 eq) in 10 mL of DCM was added dropwise²⁹⁶.

The reaction mixture was then stirred at RT during 24h.

After evaporation under reduced pressure, the crude product was washed twice with 5 mL of DCM and twice with 5 mL of Et_2O and then dried under vacuum for a few minutes.

 ➤ 17-chloro-17-oxo-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecyl methacrylate **16a**


IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{\text{C=O}}$ = 1806, 1718 ; $\nu_{\text{C=C}}$ = 1635; $\nu_{\text{C-O}}$ = 1168 , 1141; $\nu_{\text{C-Cl}}$ = 749.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.10 (d, $^2J_{\text{H-H}}$ = 0.8 Hz, 1H, H15'), 5.55 (d, $^2J_{\text{H-H}}$ = 0.8 Hz, 1H, H15), 4.49 (s, 2H, H2), 4.27 (m, 2H, H12), 3.87 - 3.49 (m, 18H, H3 - H11), 1.92 (s, 3H, H16).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 172.2 (C1), 167.5 (C13), 136.2 (C14), 125.9 (C15), 76.7 (C2), 71.4 - 69.2 (C3 - C11), 63.9 (C12), 18.4 (C16).

➤ 26-chloro-26-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahexacosyl methacrylate **16b**

N°16b		Chemical formula :
		$\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{ClO}_{11}$
		Molecular weight :
		514.99 g/mol
		Aspect : Brown oil
Yield : Quantitative		

IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{\text{C=O}}$ = 1804, 1716 ; $\nu_{\text{C=C}}$ = 1638 ; $\nu_{\text{C-O}}$ = 1171, 1104; $\nu_{\text{C-Cl}}$ = 741.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.12 (d, $^2J_{\text{H-H}}$ = 0.8 Hz, 1H, H21), 5.57 (d, $^2J_{\text{H-H}}$ = 0.8 Hz, 1H, H21'), 4.47 (s, 2H, H2), 4.29 (m, 2H, H18), 3.93 - 3.37 (m, 30H, H3 - H17), 1.94 (s, 3H, H22)

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 172.1 (C1), 167.3 (C19), 136.2 (C20), 125.7 (C21), 76.4 (C2), 71.3 - 69.1 (C3 - C17), 63.9 (C18), 18.3 (C22).

VI.3.9. General Method for the synthesis of HMBPM2-N with PEG linker and amide function **17**

A dry and argon flushed three-necked flask, equipped with a mechanical stirrer, a thermometer, an argon inlet and a septum was charged with the acid chloride derivative **16a**, **16b** (3 mmol, 1.2 eq) and dry dichloromethane (25 mL).

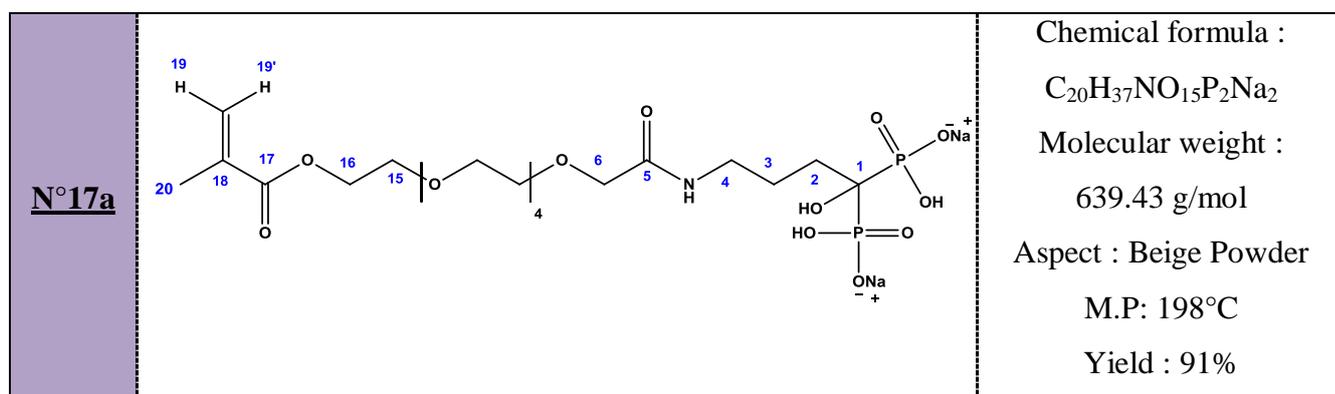
Then, freshly distilled triethylamine (0.5 g, 5 mmol, 2 eq.) was added and the resulting reaction mixture was stirred for a few minutes at room temperature.

The corresponding aminobisphosphonate with $n=3,5,7,10$ (2.5 mmol, 1 eq.) was then added per portion and the mixture was stirred at room temperature.

After full disappearance of the starting material (monitored by ^{31}P NMR), the reaction was quenched with water and the solution was concentrated under reduced pressure.

The excess of the acid chloride and triethylamine were removed from the aqueous layer by washing with chloroform (3 x 20mL) and diethyl ether (3 x 20 mL) and the products are extracted at pH=12 and pH=4.5 respectively in aqueous layer. The products are obtained as a disodium salt after multiple flushing through a cation-exchange resin using DOWEX Na^+ .

- sodium (26-hydroxy-2-methyl-3,21-dioxo-4,7,10,13,16,19-hexaoxa-22-azahexacos-1-ene-26,26-diyl)bis(hydrogenphosphonate) **17a**



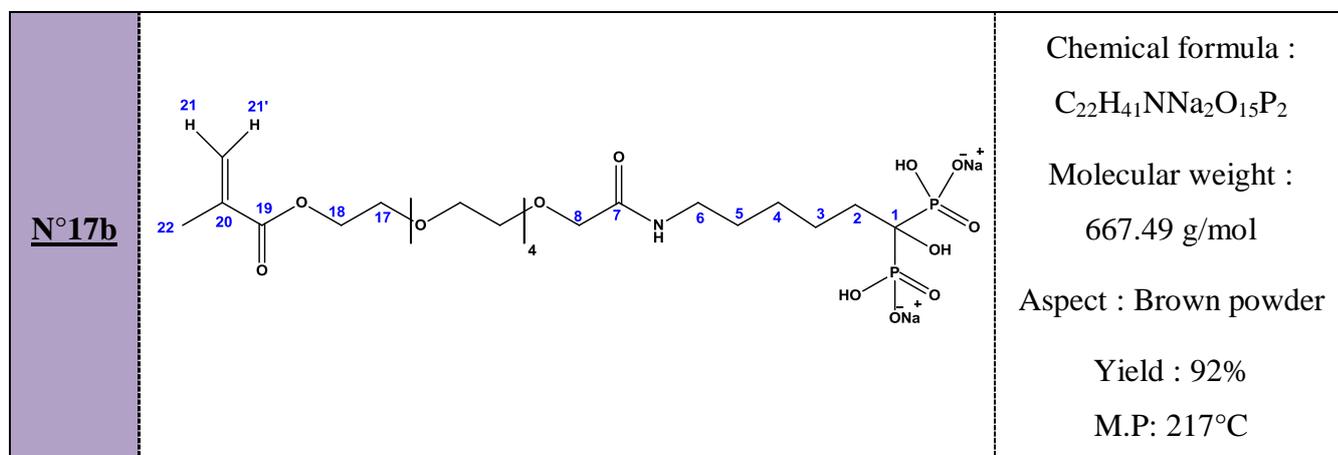
IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{\text{N-H}} = 3040$; $\nu_{\text{C=O}} = 1722, 1656$; $\nu_{\text{P=O}} = 1180, 1050$; $\nu_{\text{P-O}} = 934$.

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 18.20 (t, $^3J_{\text{P-H}} = 11.47$ Hz).

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 6.14 (s, 1H, H19), 5.72 (s, 1H, H19'), 4.43 - 4.24 (m, 2H, H16), 4.00 - 3.52 (m, 20H, H6 - H15), 3.03 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 5.9$ Hz, 2H, H2), 1.95 (m, 7H, H20, H3, H4).

^{13}C {H} NMR (101 MHz, D_2O) δ : 177.9 (C5), 169.6 (C17), 135.7 (C18), 126.9 (C19), 73.5 (t, $^1J_{\text{P-C-P}} = 133.4$ Hz, C1), 69.7 - 68.5 (C6 - C15), 64.1 (C4), 40.0 (C16), 30.9 (C3), 22.4 (t, $^2J_{\text{C-P}} = 7.0$ Hz, C2), 17.4 (C20).

- sodium (28-hydroxy-2-methyl-3,21-dioxo-4,7,10,13,16,19-hexaoxa-22-azaoc-tacos-1-ene-28,28-diyl)bis(hydrogenphosphonate) **17b**



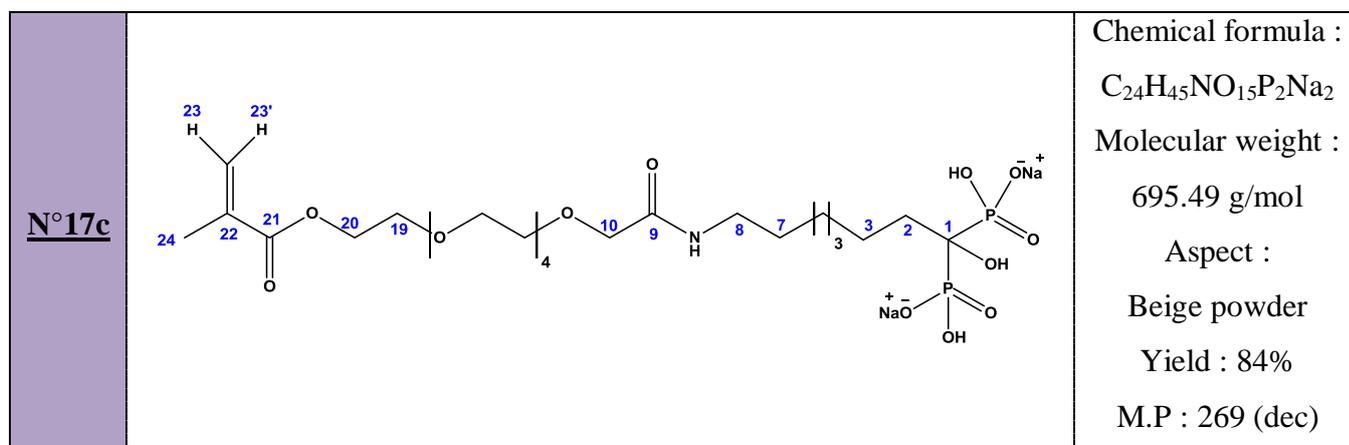
IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{N-H} = 3434$; $\nu_{C=O} = 1719, 1651$; $\nu_{P=O} = 1172, 1109$; $\nu_{P-O} = 953$.

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 18.75 (t, $^3J_{P-H} = 13.49$ Hz)

1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 6.13 (s, 1H, H21), 5.71 (s, 1H, H21'), 4.38 - 4.23 (m, 2H, H18), 4.03 - 3.46 (m, 20H, H8 - H17), 3.00 (t, $^3J_{H-H} = 7.3$ Hz, 2H, H6), 1.97 - 1.76 (m, 5H, H22, H2), 1.74 - 1.49 (m, 4H, H5, H3), 1.40 (qt, $^3J_{H-H} = 7.5$ Hz, 2H, H4).

^{13}C {H} NMR (101 MHz, D_2O) δ : 177.9 (C7), 169.6 (C19), 135.7 (C20), 126.9 (C21), 74.2 (t, $^1J_{P-C-P} = 134.41$ Hz, C1), 69.7 - 64.1 (C8 - C17), 39.2 (C6), 33.6 (C5), 30.2 (C4), 26.2 (C3), 23.0 (t, $^2J_{C-P} = 6.3$ Hz, C2), 17.3 (C22).

- 2-Methyl-acrylic acid 2-{2-[2-(2-{2-[(8-hydroxy-8,8-bis-phosphono-octylcarbamoyl)-methoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethyl ester disodium salts **17c**



IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{N-H} = 3384$; $\nu_{C=O} = 1715, 1657$; $\nu_{P=O} = 1200, 1089$; $\nu_{P-O} = 929$;

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 18.34 (t, $^3J_{P-H} = 12.56$ Hz).

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 6.14 (s, 1H, H23), 5.71 (s, 1H, H23'), 4.32 - 4.29 (m, 2H, H20), 3.96 - 3.55 (m, 20H, H10 - H19), 2.89 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.2$ Hz, 2H, H2), 2.02 - 1.76 (m, 5H, H8, H24), 1.62 - 1.5 (m, 4H, H7, H3), 1.42 - 1.22 (m, 6H, H4 - H6).

^{13}C {H} NMR (101 MHz, D_2O) δ : 177.9 (C9), 169.6 (C21), 135.7 (C22), 126.9 (C23), 74.4 (t, $^1J_{\text{P-C-P}} = 129.2$ Hz, C1), 69.5 - 68.5 (C10 - C19), 64.1 (C20), 39.4 (C8), 33.9 (C7), 29.2 (C5), 27.8 (C4), 26.5 (C6), 25.2 (C3), 23.52 (t, $^2J_{\text{C-P}} = 6.6$ Hz, C2), 17.3 (C24).

- 2-Methyl-acrylic acid 2-{2-[2-(2-{2-[(11-hydroxy-11, 11-bis-phosphono octylcarbamoyl)-methoxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethyl ester **17d**

N°17d		Chemical formula $\text{C}_{27}\text{H}_{51}\text{NO}_{15}\text{P}_2\text{Na}_2$ Molecular weight 737 g/mol Aspect : Beige powder Yield : 79% M.P : 207°C
--------------	--	--

IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{\text{N-H}} = 3448$; $\nu_{\text{C=O}} = 1716, 1657$; $\nu_{\text{P=O}} = 1108$; $\nu_{\text{P-O}} = 950$.

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 18.63 (t, $^3J_{\text{P-H}} = 13.65$ Hz)

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 6.13 (s, 1H, H25), 5.70 (s, 1H, H25'), 4.41 - 4.19 (m, 2H, H23), 4.02 - 3.57 (m, 20H, H13 - H22), 2.89 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, 2H, H2), 2.04 - 1.73 (m, 5H, H11, H27), 1.57 (m, 4H, H10, H3), 1.33 - 1.19 (m, 12H, H4 - H9) .

^{13}C {H} NMR (101 MHz, D_2O) δ : 177.9 (C12), 169.7 (C24), 135.7 (C25), 125.9 (C26), 74.10 (t, $^1J_{\text{P-C-P}} = 131.2$ Hz, C1), 69.4 - 68.2 (C14 - C22), 64.2 (C13), 62.2 (C23), 39.4 (C11), 33.7 (C10), 29.0 (C9), 28.4 - 25.4 (C4 - C8), 24.0 (C3), 23.4 (t, $^2J_{\text{C-P}} = 6.7$ Hz, C2) , 17.4 (C27).

- sodium (35-hydroxy-2-methyl-3,30-dioxo-4,7,10,13,16,19,22,25,28-nonaoxa-31-azapentatriacont-1-ene-35,35-diyl)bis(hydrogenphosphonate) **17e**

17e		Chemical formula $C_{26}H_{49}NNa_2O_{18}P_2$ Molecular weight 771.59 g/mol Aspect : Brown powder Yield : 87% M.P : 209°C
------------	--	--

IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{N-H} = 3334$; $\nu_{C=O} = 1721, 1636$; $\nu_{P=O} = 1238$; $\nu_{P-O} = 935$.

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 18.85 (t, $^3J_{P-H} = 11.54$ Hz).

1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 6.12 (s, 1H, H25), 5.70 (s, 1H, H25'), 4.36 - 4.21 (m, 2H, H22), 3.97 - 3.53 (m, 32H, H6 - H21), 3.01 (t, $^3J_{H-H} = 6.5$ Hz, 2H, H2), 2.00 - 1.86 (m, 7H, H3 - H4, H26).

^{13}C {H} NMR (101 MHz, D_2O) δ : 177.1 (C5), 169.9 (C23), 138.8 (C24), 125.7 (C25), 75.5 (t, $^1J_{P-C-P} = 135.2$ Hz, C1), 70.4 - 69.6 (C6 - C21), 64.0 (C22), 41.7 (C4), 28.6 (C3), 23.6 (t, $^2J_{C-P} = 6.1$ Hz, C2), 18.1 (C26).

- sodium (37-hydroxy-2-methyl-3,30-dioxo-4,7,10,13,16,19,22,25,28-nonaoxa-31-azaheptatriacont-1-ene-37,37-diyl)bis(hydrogenphosphonate) **17f**

N°17f		Chemical formula : $C_{28}H_{53}NNa_2O_{18}P_2$ Molecular weight : 799.64 g/mol Aspect : Brown powder Yield : 82% M.P : 286°C
--------------	--	---

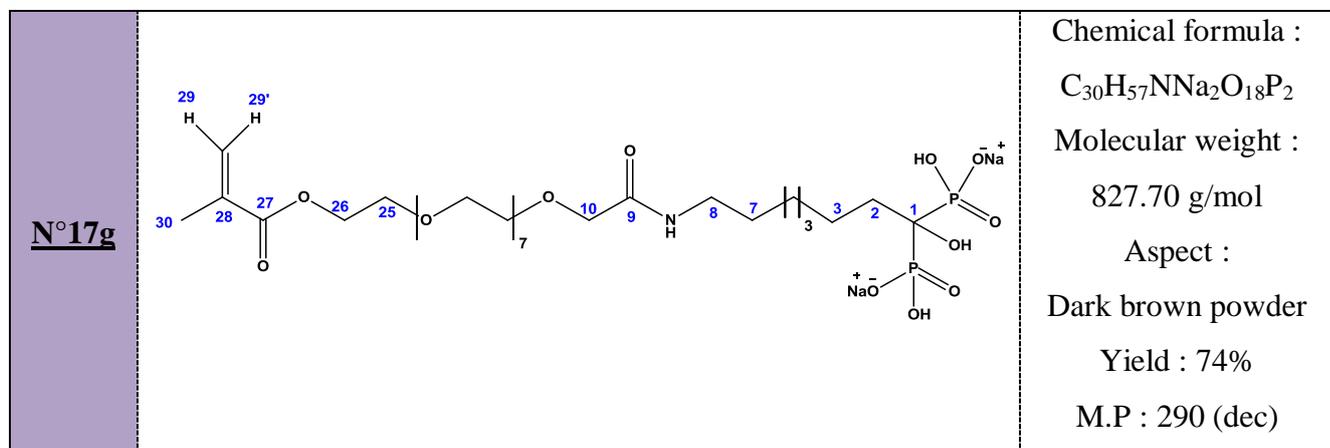
IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{N-H} = 3401$; $\nu_{P=O} = 1113$; $\nu_{P-O} = 946$; $\nu_{C=O} = 1711$; $\nu_{C-O} = 1633$.

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 20.52 (t, $^3J_{\text{P-H}} = 12.68$ Hz).

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 6.12 (s, 1H, H27), 5.7 (s, 1H, H27'), 4.38 - 4.21 (m, 2H, H24), 4.01 - 3.46 (m, 32H, H8 - H23), 2.98 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, 2H, H2), 2.01 - 1.77 (m, 5H, H6, H28), 1.72 - 1.49 (m, 4H, H3, H5), 1.38 (m, 2H, H4).

^{13}C {H} NMR (101 MHz, D_2O) δ : 178.9 (C7), 169.4 (C25), 136.7 (C26), 127.9 (C27), 76.6 (t, $^1J_{\text{P-C-P}} = 133.2$ Hz, C1), 72.8 - 70.4 (C8 - C23), 65.0 (C24), 39.2 (C6), 33.6 (C5), 30.2 (C4), 26.2 (C3), 23.0 (t, $^2J_{\text{C-P}} = 6.3$ Hz, C2), 17.3 (C28).

➤ sodium (39-hydroxy-2-methyl-3,30-dioxo-4,7,10,13,16,19,22,25,28-nonaoxa-31-azanonatriacont-1-ene-39,39-diyl)bis(hydrogenphosphonate) **17g**



IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{\text{N-H}} = 3376$; $\nu_{\text{C=O}} = 1715, 1637$; $\nu_{\text{P=O}} = 1108$; $\nu_{\text{P-O}} = 954$.

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 18.88 (t, $^3J_{\text{P-H}} = 13.22$ Hz).

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 6.14 (s, 1H, H29), 5.71 (s, 1H, H29'), 4.13 - 4.33 (m, 2H, H26), 4.01 - 3.53 (m, 32H, H10 - H25), 2.98 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, 2H, H2), 1.96 - 1.78 (m, 5H, H8, H30), 1.70 - 1.21 (m, 10H, H3 - H7).

^{13}C {H} NMR (101 MHz, D_2O) δ : 177.7 (C9), 169.6 (C27), 135.7 (C28), 126.9 (C29), 74.3 (t, $^1J_{\text{P-C-P}} = 129.2$ Hz, C1), 70.5 - 68.7 (C9 - C25), 68.5 (C10), 64.1 (C26), 39.4 (C8), 33.8 (C7), 33.5 (C5), 30.2 (C4), 27.7 (C6), 26.4 (C3), 23.4 (t, $^2J_{\text{C-P}} = 5.3$ Hz, C2), 17.3 (C30).

VI.3.10. Synthesis of activated methacrylic PEG alcohol with carbonyldiimidazole 18

A dry and argon flushed 250 mL three-necked flask equipped with a mechanical stirrer, a thermometer, an argon inlet and an addition funnel was charged with carbonyldiimidazole (1.83 g, 11 mmol, 1.1 eq.) and 150 mL of freshly distilled acetonitrile. After stirring at room temperature for 1h, a solution of the commercial methacrylic alcohol derivative (1.3 g, 10 mmol, 1 eq.) in 50mL of acetonitrile is added dropwise at 0 ° C and the resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h.

After evaporation of the volatile fractions, 50 mL of acetonitrile was added and the organic layer is washed with water (3 x 15 mL), brine (1 x 15 mL), dried with Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure.

➤ 2-(methacryloyloxy)ethyl *1H*-imidazole-1-carboxylate **18a**

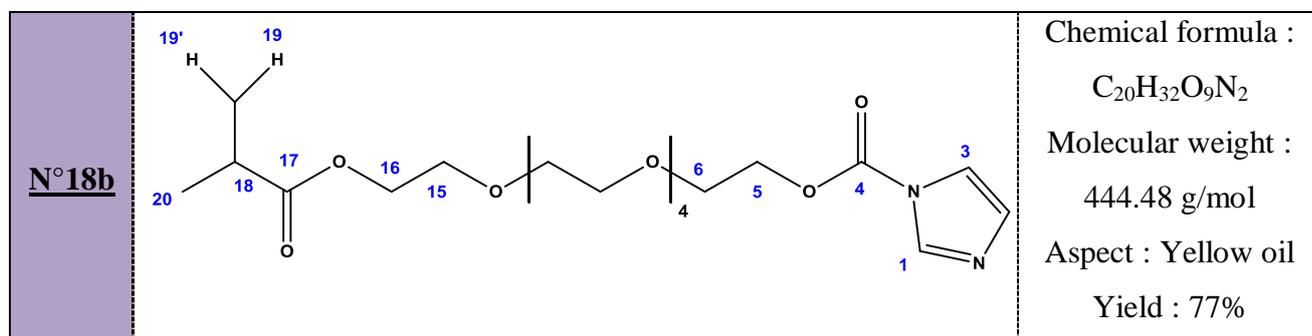
<u>N°18a</u>		<p>Chemical formula : C₁₀H₁₂N₂O₄ Molecular weight : 224.21 g/mol Aspect : Yellow oil Yield : 95%</p>
---------------------	--	---

IR (KBr, cm⁻¹): $\nu_{C=O}$ = 1708 ; $\nu_{C=C}$ = 1637; $\nu_{C=N_{aro}}$ = 1263; ν_{C-O} = 1088.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.10 (m, 1H, H1), 7.44 - 7.33 (m, 1H, H3), 7.10 - 6.98 (m, 1H, H2), 6.17 - 6.02 (m, 1H, H9), 5.63 - 5.50 (m, 1H, H9'), 4.68 - 4.56 (m, 2H, H5), 4.52 - 4.37 (m, 2H, H6), 1.95 - 1.83 (m, 3H, H10).

¹³C {H} NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 166.8 (C7), 148.4 (C4), 137.0 (C1), 135.5 (C8), 130.7 (C2), 126.4 (C9), 117.0 (C3), 65.7 (C5), 61.6 (C6), 18.1 (C10).

- 2-(2-(2-(2-(2-(2-(methacryloyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl imidazole-1-carboxylate **18b** 1H



IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{C=O}$ = 1717; $\nu_{C=C}$ = 1630; $\nu_{C=N_{aro}}$ = 1280; ν_{C-O} = 1088.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.16 (s, 1H, H1), 7.45 (s, 1H, H3), 7.07 (s, 1H, H2), 6.13 (s, 1H, H19), 5.57 (s, 1H, H19'), 4.56 (m, 2H, H16), 4.30 (m, 2H, H5), 3.94 - 3.47 (m, 20H, H6 - H15), 1.95 (s, 3H, H20).

^{13}C {H} NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 167.3 (C17), 148.7 (C4), 137.9 (C1), 137.5 (C18), 130.6 (C2), 125.7 (C19), 117.2 (C3), 70.7 - 68.6 (C6 - C15), 67.1 (C16), 63.9 (C5), 18.3 (C20).

VI.3.11. Synthesis of HMBPM3-N with carbamate bound : Coupling of activated PEG alcohol with aminobisphosphonate **19**

A 10mL flask is charged with the amino bisphosphonate derivative (alendronate or neridronate) (1 mmol, 1 eq) dissolved in a minimum of water at pH = 12. The “activated” alcohol derivative (0.25g, 1.1 mmol, 1.1 eq.) is then added dropwise and the pH was checked and adjusted to pH=12. The evolution of the reaction was monitored by ^{31}P NMR and more of the “activated” alcohol was added if necessary²⁹⁷.

When the reaction is complete, the reaction mixture was washed with chloroform at pH = 4.5 in order to eliminate the residual alcohol.

The aqueous phase is concentrated under reduce pressure and the product is precipitated several times in acetone in order to remove the residual imidazole. The purification was performed using column chromatography in a reverse phase.

- (1-hydroxy-4-(((4-methyl-3-oxopent-4-enyl)oxy)carbonyl)amino)butane-1,1-diyldiphosphonic acid **19a**

N°19a		Chemical formula : $C_{11}H_{19}NNa_2O_{11}P_2$ Molecular weight : 449.2 g/mol Aspect : Oily paw Yield : 72%
--------------	--	---

IR (KBr, cm^{-1}): ν_{N-H} =3150 ; $\nu_{C=O}$ = 1742, 1708 ; ν_{C-O} = 1234; $\nu_{P=O}$ = 1152 ; ν_{P-O} = 965 ;

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 18.67 (t, $^3J_{P-H}$ = 12.8 Hz).

1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 5.61 (s, 1H, H10), 5.30 (s, 1H, H10'), 4.10-4.07 (m, 2H, H6), 3.72 (m, 2H, H4), 3.11 (t, $^3J_{H-H}$ = 6.4 Hz, 2H, H7), 2.02 - 1.66 (m, 7H, H11, H3, H2).

^{13}C { 1H } NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 167.6 (C8), 156.5 (C5), 139.9 (C9), 123.2 (C10), 74.3 (t, $^1J_{P-C-P}$ = 137.7 Hz, C1), 60.4 (C6, C7), 42.2 (C4), 24.6 (C3), 23.9 - 23.6 (m, C2), 17.1 (C11).

- (1-hydroxy-6-(((4-methyl-3-oxopent-4-en-1-yl)oxy)carbonyl)amino)hexane-1,1-diyldiphosphonic acid **19b**

N°19b		Chemical formula : $C_{13}H_{23}NNa_2O_{11}P_2$ Molecular weight : 477.25 g/mol Aspect : Oily white paw Yield : 64%
--------------	--	---

IR (KBr, cm^{-1}): ν_{N-H} = 3408 ; $\nu_{C=O}$ =1741, 1702; ν_{C-O} = 1254; $\nu_{P=O}$ = 1139 ; ν_{P-O} = 962.

^{31}P NMR { 1H } (162 MHz, D_2O) δ : 18.75 (s).

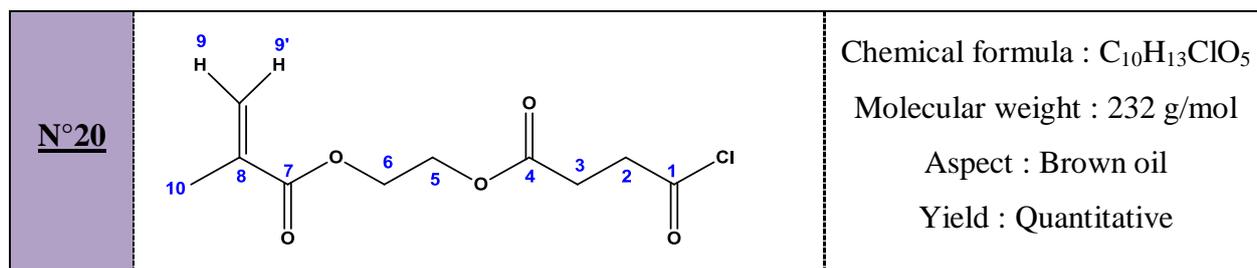
1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 5.59-5.54 (m, 1H,H12), 5.37 – 5.19 (m, 1H), 4.12 – 3.98 (m, 2H,H8), 3.79 – 3.67 (t, $^3J_{H-H}$ = 6.9 Hz 2H,H9), 3.08 (m, 2H,H6), 1.94 – 1.75 (m, 5H,H5,H13), 1.55 – 1.42 (m, 4H,H3,H4), 1.34 – 1.18 (m, 2H,H2).

VI.3.12.Synthesis of 2-(methacryloyloxy)ethyl 4-chloro-4-oxobutanoate 20

A 50 mL flame-dried three necked flask equipped with an argon inlet and a dropping funnel was charged with the carboxylic acid derivative (1.05g, 5 mmol, 1eq) and 15 mL of freshly distilled . The flask is placed in ice bath (0 °C) and a solution of oxalyl chloride (3.15 g, 25 mmol, 5 eq) in 10 mL of DCM was added dropwise.

The reaction mixture was then stirred at reflux for 4h and 12h at room temperature .

After evaporation under reduced pressure, the crude product was washed twice with 5 mL of DCM and twice with 5 mL of Et₂O and then dried under vacuum for a few minutes.



IR (CDCl₃, cm⁻¹): $\nu_{\text{Cl-C=O}} = 1810$; $\nu_{\text{C=O}} = 1719, 1727$.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 6.15 - 5.98 (m, 1H,H9'), 5.61-5.47 (m,1H, H9), 4.35 (dd, $J = 2.5, 2.0$ Hz, 4H), 3.21 (dd, $J = 7.7, 5.4$ Hz, 2H,H2), 2.70 (dd, $J = 7.8, 5.4$ Hz, 2H,H3), 1.90 (s, 3H,H10).

¹³C NMR {H} (101 MHz, CDCl₃) δ : 198.6 (C4), 173.2 (C1), 169.8 (C7), 145.9 (C8), 125.2 (C9), 60.5 (C5), 38.0 (C6), 34.2 (C2), 30.7 (C3), 17.1 (C10).

VI.3.13.Synthesis of 5-oxotetrahydrofuran-2,2-diyl)diphosphonic acid 23

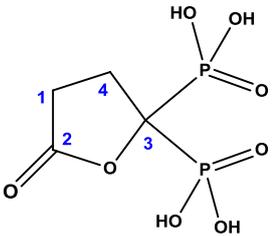
A 25 mL three-necked flask under argon equipped with a thermometer and a dropping funnel was charged with the methacrylic acid chloride 20 (1.16 g, 5 mmol, 1 eq.). Then, tris (trimethyl silyl) phosphite (2.98g, 10mmol, 2 eq.) was added dropwise at 0°C¹⁰⁶.

Once the addition is complete, the reaction mixture was stirred at room temperature and the progress of the reaction is then monitored by ³¹P {¹H} NMR. The reaction is completed after 4h.

Volatile fractions were then evaporated under reduced pressure and the resulting oil was hydrolyzed in methanol in presence of triethyl amine at room temperature for 2h.

Endly, the crude product was precipitated in ether for several times.

➤ (5-oxotetrahydrofuran-2,2-diyl)diphosphonic acid **23**

N°23		Chemical formula : C ₄ H ₈ O ₈ P ₂ Molecular weight : 246.05 g/mol Aspect : Yellow Powder Yield : 34%
-------------	---	---

IR (KBr, cm⁻¹): $\nu_{\text{O-H}}$ = 3286; $\nu_{\text{C=O}}$ = 1726 ; $\nu_{\text{C-O}}$ = 1123 ; $\nu_{\text{P=O}}$ = 1099 ; $\nu_{\text{P-O}}$ = 825

³¹P {H} RMN (162 MHz, D₂O) δ : 13.72 (s)

¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ : 3.65 (t, ³J_{H-H} = 6.5 Hz, 2H, H1), 2.62 (t, ³J_{H-H} = 6.5 Hz, 2H, H4)

¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ : 184.5 (C2), 75.5 (t, ¹J_{P-C} = 131.6 Hz, C3), 37.8 (C1), 35.1 (C4).

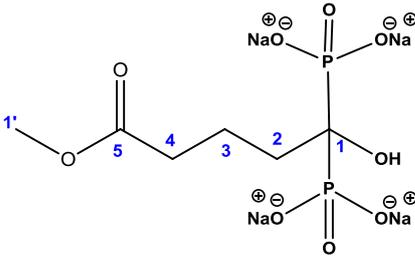
VI.3.14. Silylated method for the synthesis of bisphosphonates **24**

A 50 mL three-necked flask under argon equipped with a thermometer and a dropping funnel was charged with the commercial methyl ester chloride with n = 3,4,6,8 (5 mmol, 1 eq.). Then, tris (trimethyl silyl) phosphite (2.98g, 10mmol, 2 eq.) was added dropwise at 0°C¹⁰⁶.

Once the addition is complete, the reaction mixture was stirred at room temperature and the progress of the reaction is then monitored by ³¹P {¹H} NMR. The reaction times is between 0h 30-1h depending to the carbon chain length.

Volatile fractions were then evaporated under reduced pressure and the resulting oil was hydrolyzed in methanol at room temperature for 2h. We obtained the pure products after evaporating the solvents without purification.

➤ Sodium 5-hydroxy-5,5-diphosphonatopentanoate **24a**

N°24a		Chemical formula : C ₆ H ₁₀ O ₉ P ₂ Na ₄ Molecular weight : 380.04 g/mol Aspect : White powder Yield : 94 %
--------------	---	---

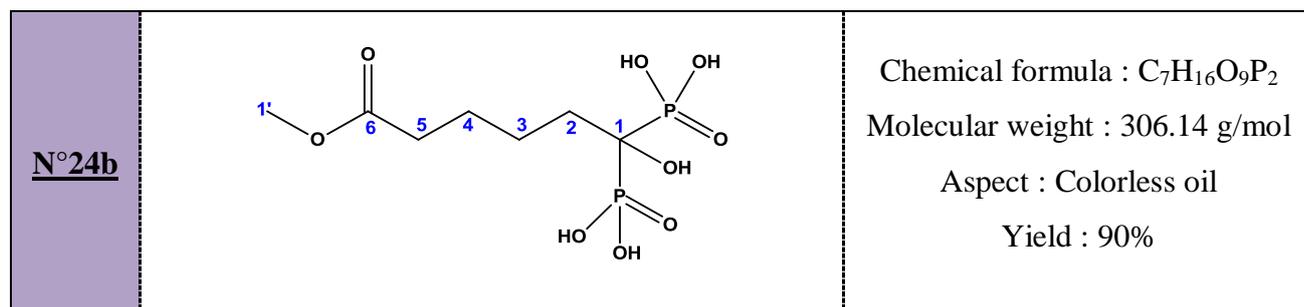
IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{\text{O-H}} = 3240$; $\nu_{\text{C=O}} = 1732$; $\nu_{\text{P=O}} = 1180$; $\nu_{\text{P-O}} = 982$.

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 19.4 (t, $^3J_{\text{P-H}} = 15.12$ Hz)

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 3.28 (s, 3H, H1'), 2.26 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.2$ Hz, 2H, H4), 2.03 - 1.68 (m, 4H, H3, H2).

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ : 182.0 (C5), 73.9 (t, $^1J_{\text{P-C-P}} = 134.6$ Hz, C1), 54.1 (C1'), 36.9 (C4), 33.1 (C3), 20.4 (t, $^2J_{\text{C-P}} = 6.8$ Hz, C2).

➤ 1-hydroxy-6-methoxy-6-oxohexane-1,1-diylldiphosphonic acid **24b**



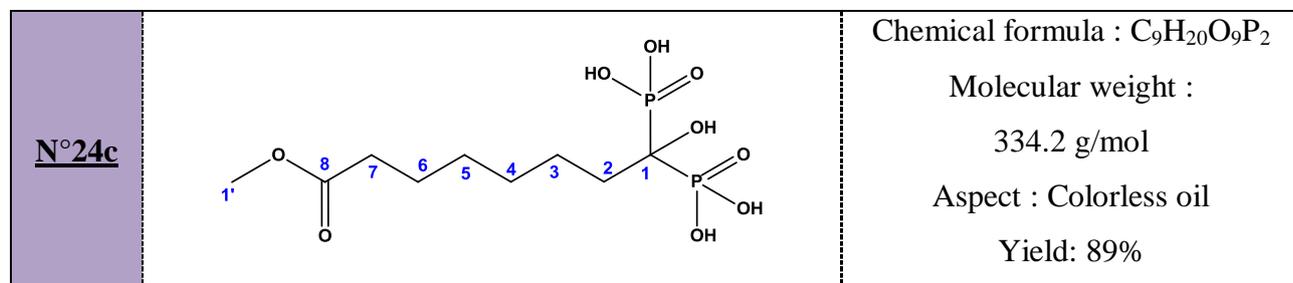
IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{\text{O-H}} = 3194$; $\nu_{\text{C=O}} = 1734$; $\nu_{\text{P=O}} = 1250, 1122$; $\nu_{\text{P-O}} = 939$.

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 19.6 (t, $^3J_{\text{P-H}} = 15.2$ Hz)

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 3.23 (s, 3H, H1'), 2.32 (m, 2H, H5), 2.02 - 1.74 (m, 2H, H2), 1.56 - 1.39 (m, 4H, H3, H4).

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ : 177.3 (C6), 73.1 (t, $^1J_{\text{P-C-P}} = 146.9$ Hz, C1), 52.0 (C1'), 33.4 (C5), 33.1 (C4), 24.8 (C3), 22.6 (t, $^2J_{\text{C-P}} = 6.3$ Hz, C2).

➤ 1-hydroxy-8-methoxy-8-oxooctane-1,1-diylldiphosphonic acid **24c**



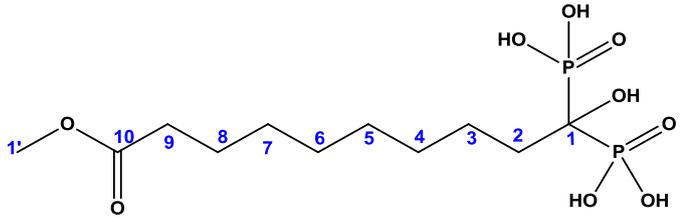
IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{\text{O-H}} = 3374$; $\nu_{\text{C=O}} = 1731$; $\nu_{\text{P=O}} = 1102$; $\nu_{\text{P-O}} = 957$.

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 19.9 (t, $^3J_{\text{P-H}} = 14.82$ Hz);

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 3.63 (s, 3H, $\text{H1}'$), 2.35 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 2H, H7), 1.92 - 1.72 (m, 2H, H2), 1.63 - 1.41 (m, 4H, H3, H6), 1.34-1.28 (m, 4H, H4, H5).

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ : 178.0 (C8), 74.5 (t, $^1J_{\text{P-C-P}} = 128.1$ Hz, C1), 52.1 (C1'), 34.2 (C7), 29.5 (C4), 28.9 (C5), 28.3 (C3), 26.1 (C6), 23.9 (t, $^2J_{\text{C-P}} = 6.06$ Hz, C2)

➤ 1-hydroxy-10-methoxy-10-oxodecane-1,1-diylldiphosphonic acid **24d**

N°24d		Chemical formula : $\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{O}_9\text{P}_2$ Molecular weight : 362.25 g/mol Aspect : Colorless oil Yield : 91%
--------------	---	---

IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{\text{O-H}} = 3422$; $\nu_{\text{C=O}} = 1737$; $\nu_{\text{P=O}} = 1107$; $\nu_{\text{P-O}} = 958$.

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 19.8 (t, $^3J_{\text{P-H}} = 14.76$ Hz).

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 3.34 (s, 3H, $\text{H1}'$), 2.07 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 2H, H9), 1.95-1.77 (m, 2H, H2), 1.51 - 1.37 (m, 4H, H8, H3), 1.39 - 1.23 (m, 8H, H4 - H7).

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ : 177.2 (C10), 73.26 (t, $^1J_{\text{P-C-P}} = 147.7$ Hz, C1), 51.9 (C1'), 33.8 (C9), 33.4 (C4), 29.5-28.8 (C5 - C7), 28.3 (C3,C8), 24.3 (t, $^2J_{\text{C-P}} = 5.6$ Hz,C2).

VI.3.15.Synthesis of HMPBM4 from transesterification reaction **25**

A 50mL single-necked flask equipped with a Dean Stark apparatus was charged with 2-hydroxyethyl methacrylate (Or methacrylate-PEG) (6 mmol, 1 eq.) and 40mL of dry toluene. After addition of sodium hydride (0.024 g, 1 mmol, 1/6 eq.), the reaction was stirred for a few minutes at room temperature.

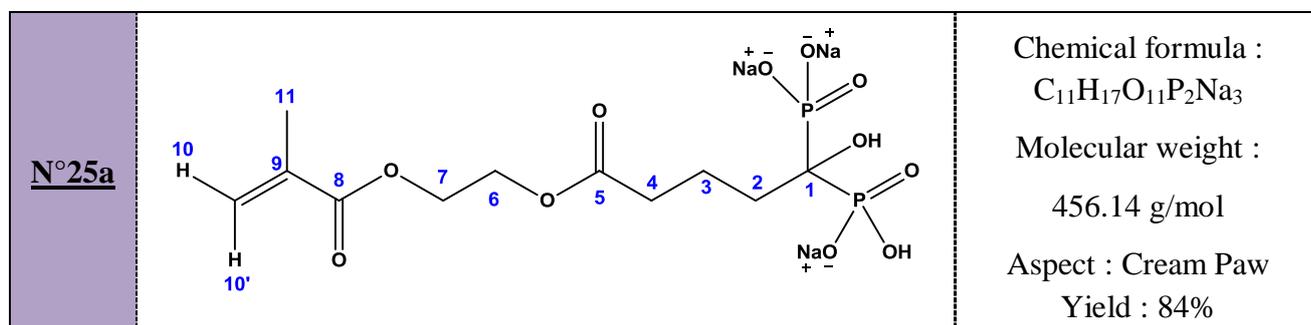
Methyl ester bisphosphonate derivative **24a-d** was then added at pH=12 in small portions.

Once the addition is complete, the reaction mixture stirred at $T=140^\circ\text{C}$ and the progress of the reaction is then monitored by ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ NMR. The reaction was completed between 2-3h

After quenching of the reaction with water, the volatile fractions were evaporated under reduced pressure and the resulting aqueous phase was washed with chloroform. The pure product was evaporated under vacuum and lyophilized.

The products were obtained with sufficient purity and no further purification is necessary.

- Sodium 1-hydroxy-5-(2-(methacryloyloxy)ethoxy)-5-oxopentane-1,1-diyl diphosphonate **25a**



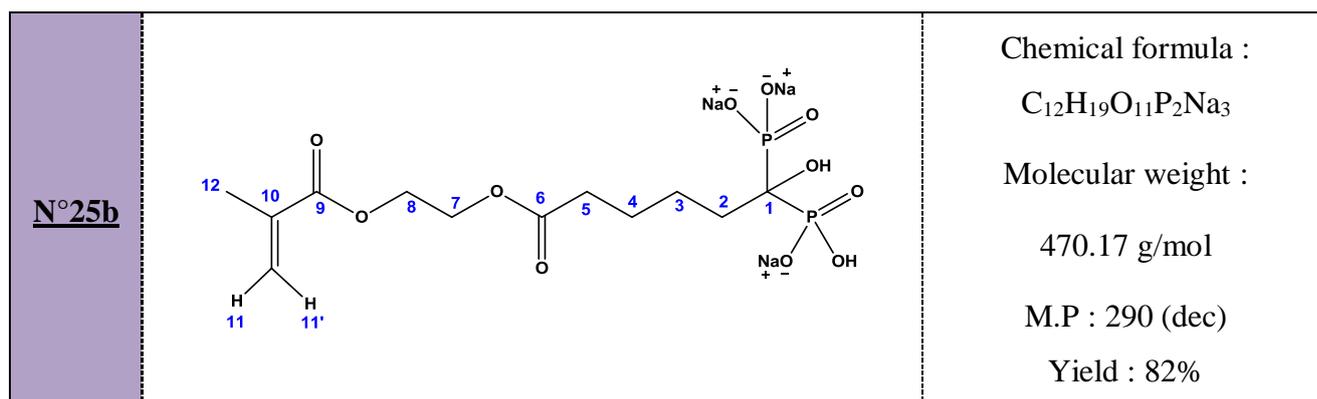
IR (KBr, cm^{-1}): ν_{O-H} = 3284 ; $\nu_{C=O}$ = 1731 ; $\nu_{C=C}$ = 1613 ; $\nu_{P=O}$ = 1147 ; ν_{P-O} = 948.

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 19.15 (t, $^3J_{P-H}$ = 12.89 Hz).

1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 5.6 (s, 1H, H10), 5.28 (s, 1H, H10'), 3.59 (bs, H7,H6), 2.01 - 2.14 (m, 2H, H4), 1.81 - 1.76 (m, 3H, H11), 1.58 - 1.46 (m, 4H, H2, H3).

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ : 184.2 (C5), 177.4 (C8), 142.3 (C9), 120.4 (C10), 76.4 (t, $^1J_{P-C}$ = 134.4 Hz, C1), 62.6 (C7, C6), 38.7 (C4), 35.9 (C3), 21.5 (t, $^2J_{C-P}$ = 5.4 Hz, C2), 18.9 (C11).

- Sodium 1-hydroxy-6-(2-(methacryloyloxy)ethoxy)-6-oxohexane-1,1-diyl diphosphonate **25b**



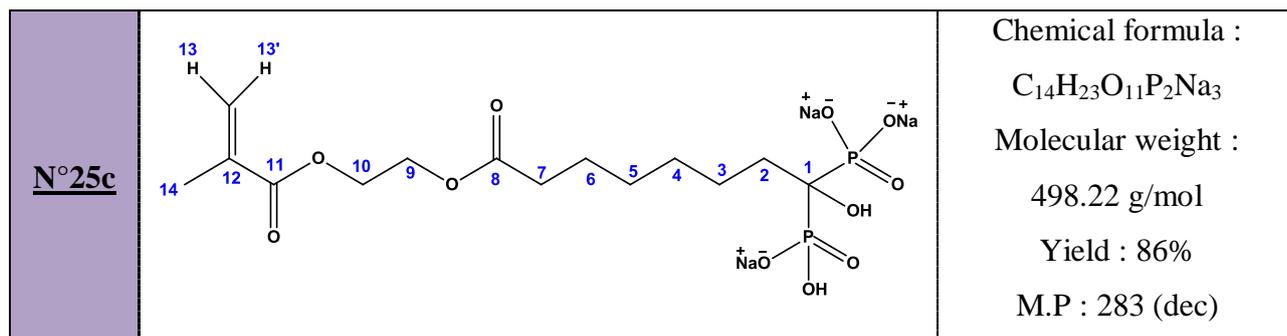
IR (KBr, cm^{-1}): ν_{O-H} = 3194 ; $\nu_{C=O}$ = 1733 ; $\nu_{C=C}$ = 1625 ; $\nu_{P=O}$ = 1150 ; ν_{P-O} = 968.

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 19.15 (t, $^3J_{P-H}$ = 12.39 Hz).

1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 5.61-5.5 (m, 1H, H11), 5.37 - 5.20 (m, 1H, H11'), 3.69 - 3.60 (m, 4H, H7,H8), 2.39 (t, $^3J_{H-H}$ = 7.0 Hz, 2H, H5), 1.94 - 1.72 (m, 5H, H2, H12), 1.58 - 1.46 (m, 4H, H3, H4).

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ : 184.5 (C6), 177.5 (C9), 142.4 (C10), 120.2 (C11), 75.6 (t, $^1J_{\text{C-P}}$ = 132.0 Hz, C1), 62.5 (C7, C8), 37.8 (C5), 35.3 (C4), 27.2 (C3), 24.3 (t, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.2 Hz, C2), 18.9 (C12).

➤ Sodium 1-hydroxy-8-(2-(methacryloyloxy)ethoxy)-8-oxooctane-1,1-diylidiphosphonate **25c**



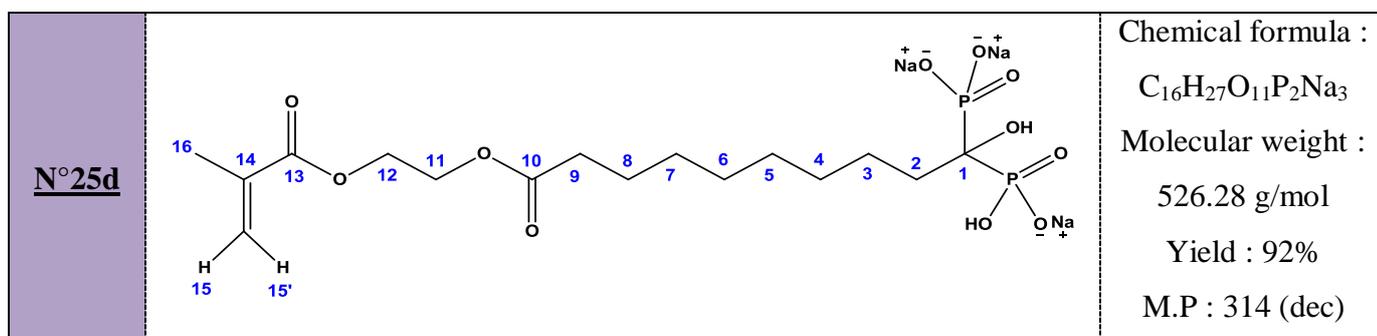
IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{\text{O-H}}$ = 3387 ; $\nu_{\text{C=O}}$ = 1735 ; $\nu_{\text{C=C}}$ = 1648 ; $\nu_{\text{P=O}}$ = 1107 ; $\nu_{\text{P-O}}$ = 958.

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 19.27 (t, $^3J_{\text{P-H}}$ = 12.45 Hz).

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 5.58 (s, 1H), 5.27 (s, 1H), 3.73 – 3.44 (m, 4H, H10, H9), 2.11 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H7), 1.89 – 1.71 (m, 5H, H14, H2), 1.53-1.49 (m, 4H, H6, H3), 1.35 – 1.14 (m, 4H, H4, H5).

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ : 184.3 (C8), 177.5 (C11), 142.3 (C12), 120.3 (C13), 74.6 (t, $^1J_{\text{P-C-P}}$ = 96.5 Hz, C1), 62.5 (C9, C10), 59.4 (C7), 37.6 (C6), 33.8 (C5), 28.8 (C4), 25.9 (C3), 23.7 (t, $^2J_{\text{C-P}}$ = 6.1 Hz, C2), 18.9 (C14).

➤ Sodium 1-hydroxy-10-(2-(methacryloyloxy)ethoxy)-10-oxodecane-1,1-diylidiphosphonate **25d**



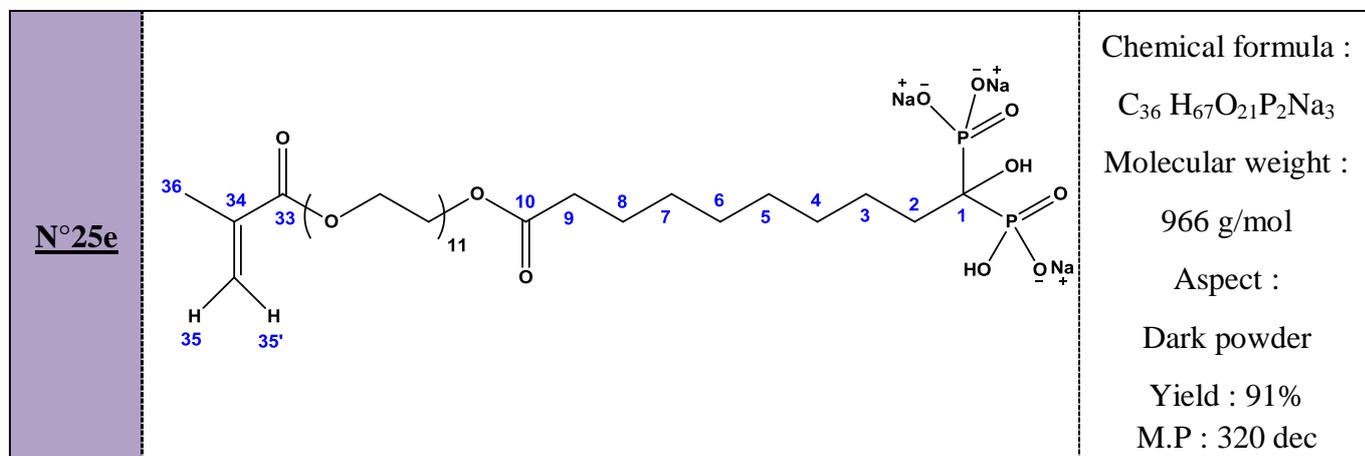
IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{\text{O-H}}$ = 3332 ; $\nu_{\text{C=O}}$ = 1736 ; $\nu_{\text{C=C}}$ = 1571 ; $\nu_{\text{P=O}}$ = 1103 ; $\nu_{\text{P-O}}$ = 968.

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 19.44 (t, $^3J_{\text{P-H}} = 13.28$ Hz).

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 5.63-5.56 (m, 1H, H15), 5.31-5.26 (m, 1H, H15'), 3.80 - 3.51 (m, 4H, H11, H12), 2.76 - 2.56 (m, 2H, H2), 2.12 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 2H, H9), 1.88 (s, 3H, H16), 1.55 - 1.35 (m, 2H, H8), 1.31 - 1.08 (m, 10H, H3 - H7).

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ : 184.4 (C10), 177.4 (C13), 142.3 (C14), 120.3 (C15), 76.6 (t, $^1J_{\text{P-C-P}} = 129.28$ Hz, C1), 62.5 (C11, C12), 37.6 (C9), 36.2 (C2), 30.4 (C4), 28.7 - 28.4 (C5, C6, C7), 25.9 (C8), 24.3 (C3), 22.6 (t, $^2J_{\text{C-P}} = 6.3$, C1), 18.9 (C16).

➤ Sodium 47-hydroxy-2-methyl-3,38-dioxo-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37-dodecaoxaheptatetracont-1-ene-47,47-diylidiphosphonate **25e**



IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{\text{O-H}} = 3235$; $\nu_{\text{C=O}} = 1726$; $\nu_{\text{C=C}} = 1629$; $\nu_{\text{P=O}} = 1113$; $\nu_{\text{P-O}} = 988$.

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 19.26 (t, $^3J_{\text{P-H}} = 13.41$ Hz).

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 5.60-5.54 (m, 1H, H35), 5.28 - 5.24 (m, 1H, H35'), 3.81 - 3.49 (m, 44H, H11 - H32), 2.11 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, 2H, H9), 1.98-1.83 (m, 5H, H36, H2), 1.57 - 1.39 (m, 4H, H7, H8), 1.33 - 1.17 (m, 8H, H3 - H6).

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ : 182.3 (C10), 175.1 (C33), 142.4 (C34), 120.3 (C35), 75.5 (t, $^1J_{\text{P-C-P}} = 131.15$ Hz, C1), 70.4 - 69.9 (C11 - C32), 60.3 (C9), 29.4 (C6), 28.9 (C5), 28.8 (C4), 27.8 (C7), 25.7 (C8), 25.3 (C3), 23.6 (t, $^2J_{\text{C-P}} = 7.1$ Hz, C2), 18.9 (C36).

VI.3.16. Synthesis of HMBPM5 using tris(trimethyl silyl) phosphate **26**

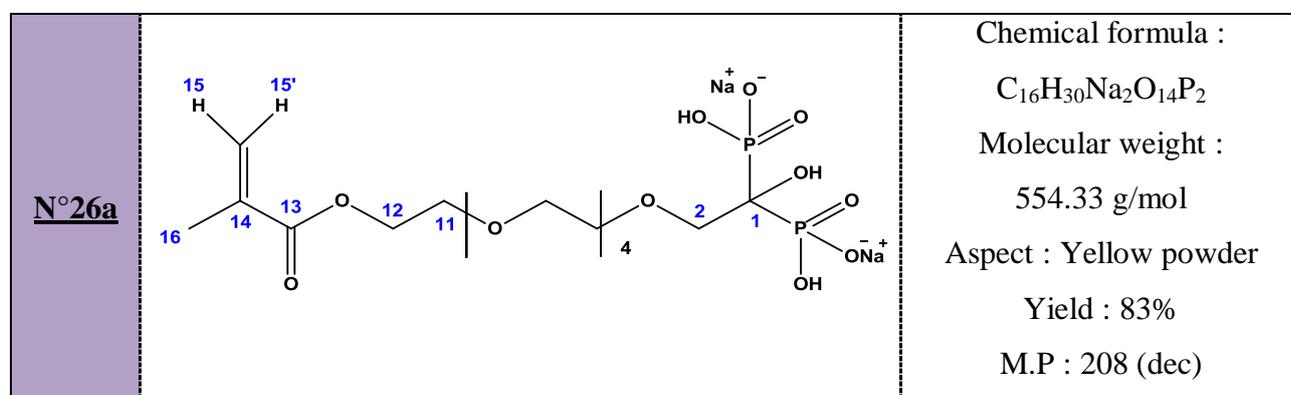
A 25 mL three-necked flask under argon equipped with a thermometer and a dropping funnel was charged with the acid chloride (5 mmol, 1 eq.). Then, tris (trimethyl silyl) phosphite (2.98g, 10mmol, 2 eq.) was added dropwise at 0°C .

Once the addition is complete, the reaction mixture was stirred at room temperature and the progress of the reaction is then monitored by ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ NMR. The reaction was completed between 6- 12h depending to the chain length.

Volatile fractions were then evaporated under reduced pressure and the resulting oil was hydrolyzed in methanol in presence of triethylamine at room temperature for 4h.

Endly, the crude product was precipitated in ether for several times. The product was obtained as a disodium salt after flushing through a cation exchange resin DOWEX ® Na^+ .

- sodium 1-hydroxy-20-methyl-19-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenic-20-ene-1,1-diylbis(hydrogenphosphonate) **26a**



IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{\text{O-H}}$ = 3415 ; $\nu_{\text{C=O}}$ = 1719 ; $\nu_{\text{C=C}}$ = 1638 ; $\nu_{\text{P=O}}$ = 1127 ; $\nu_{\text{P-O}}$ = 950.

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 15.90 (t, $^3J_{\text{P-H}}$ = 9.7 Hz)

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 6.12 (s, 1H, H15), 5.69 (s, 1H, H15'), 4.36 - 4.24 (m, 2H, H12), 3.98 - 3.58 (m, 20H, H2 - H11), 1.89 (s, 3H, H16)

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ : 169.8 (C13), 135.8 (C14), 126.9 (C15), 73.2 (t, $^1J_{\text{P-C-P}}$ = 132.51 Hz, C1), 70.22 - 68.47 (m, C3 - C12), 64.1 (C2), 17.3 (C16)

MS ($\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{Na}_2\text{O}_{14}\text{P}_2$, pH=6) : $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 511; $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^+$ = 532.9; $[\text{M}+\text{H}+2\text{Na}]^+$ = 555; $[\text{M}+\text{H}+3\text{Na}]^+$ = 576.9; $[\text{M}+\text{H}+4\text{Na}]^+$ = 599

- sodium 1-hydroxy-29-methyl-28-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxatriacont-29-ene-1,1-diylbis(hydrogenphosphonate) **26b**

N°26b		Chemical formula : $C_{22}H_{42}Na_2O_{17}P_2$ Molecular weight : 686.49 g/mol Aspect : Brown powder Yield : 81% M.P : 231(dec)
--------------	--	---

IR (KBr, cm^{-1}): ν_{O-H} = 3428 ; $\nu_{C=O}$ = 1722 ; $\nu_{C=C}$ = 1637 ; $\nu_{P=O}$ = 1113 ; ν_{P-O} = 955.

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 16.01 (t, $^3J_{P-H}$ = 9.69 Hz)

1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 6.13 (s, 1H, H21), 5.70 (s, 1H, H21'), 4.44 - 4.18 (m, 2H, H18), 4.01 - 3.50 (32H, H2 - H17), 1.90 (s, 3H, H22).

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ : 169.6 (C19), 135.8 (C20), 126.9 (C21), 73.2 (t, $^1J_{P-C-P}$ = 123.4 Hz, C1), 70.2 - 68.5 (C3 - C18), 64.2 (C2), 17.4 (C22).

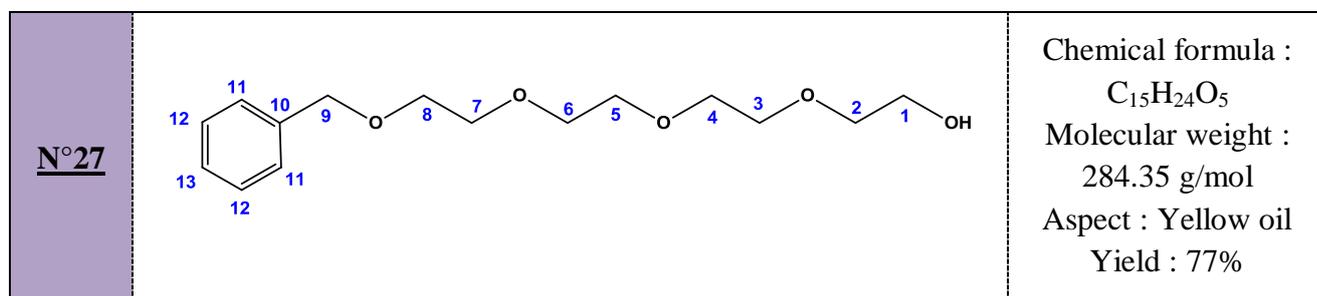
MS ($C_{22}H_{42}Na_2O_{17}P_2$, pH=6.28): $[M+H]^+$ = 643; $[M+H+Na]^+$ = 665; $[M+H+2Na]^+$ = 687; $[M+H+3Na]^+$ = 709. $[M+H+4Na]^+$ = 731.

VI.3.17. Synthesis of monoprotected PEG compound **27**

In a dry and argon flushed 125 mL three-necked flask equipped with a mechanical stirrer, a thermometer, an argon inlet and an addition funnel, was charged with sodium hydride (1.3 g, 56.1 mmol, 1.1 eq.) and dry THF (40 mL). Then, a solution of PEG (10.2 g, 51 mmol, 1 eq.) in dry THF (60 mL) was added at $-70^\circ C$ and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight.

Then, benzyl bromide (6.1 mL, 51 mmol) was added dropwise and the resulting solution was stirred at room temperature. The reaction is monitored by TLC (eluent: 20/80 hexane/ ethyl acetate) and 1H NMR.

After completion of the reaction, the reaction mixture is filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in dichloromethane (7 mL) and washed three times with water (20 mL) and the combined organic layers were dried with $MgSO_4$. The solvent was evaporated under reduced pressure.

➤ 2-(2-(2-(2-(benzyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethanol 27

IR (KBr, cm^{-1}): ν_{O-H} = 3424 ; ν_{C-Haro} = 3005 - 3087 ; $\nu_{C-Halip}$ = 2867 ; $\nu_{C=C}$ = 1454, 1495 ; ν_{C-O} = 1141.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.49 - 7.11 (m, 5H, H11, H12, H13), 4.55 (s, 2H, H9), 3.78 - 3.45 (m, 16H, H1 - H8), 3.11 (s, 1H, OH).

^{13}C {H} NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 138.2 (C10), 128.3 - 127.5 (2C11, 2C12, C13), 73.1 (C9), 72.4 - 69.3 (C2 - C8), 61.5 (C1).

VI.3.18. Synthesis of aldehyde from Bn-PEG-OH 28

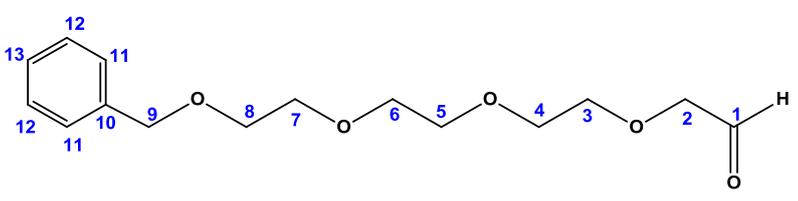
In a dry and argon flushed 100mL three-necked flask, equipped with a mechanical stirrer, a thermometer, an argon inlet and a septum, a solution of DMSO (1.7 g, 21.8 mmol) in 4.4 mL of dichloromethane is added dropwise at $-55\text{ }^\circ\text{C}$ to a solution of oxalyl chloride (2.16 g, 17.2 mmol) in 22.6 mL of dichloromethane.

After two minutes, a solution of alcohol (2.84g, 10 mmol) in 9 mL of dichloromethane is added dropwise.

After stirring for 15 min, the mixture was allowed to warm to $-30\text{ }^\circ\text{C}$. Then, freshly distilled triethylamine was added dropwise (5.1 g, 50.4 mmol).

After 12 h at room temperature, the mixture is quenched with 20 mL of water. The aqueous phase was extracted twice with 20mL of dichloromethane and the combined organic phases were washed successively with HCl (20%) and $NaHCO_3$ (5%), dried over $MgSO_4$ and concentrated in vacuo

➤ 1-phenyl-2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-al

N°28		Chemical formula :
		$C_{15}H_{22}O_5$
		Molecular weight :
		288.33 g/mol
		Aspect : Yellow oil
Yield : 89%		

IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{C-H(Aro)} = 3075$; $\nu_{C-H(Ald)} = 2832$; $\nu_{C=O} = 1707$; $\nu_{C=C(Aro)} = 1598$.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.58 (s, 1H, H1), 7.51 - 6.98 (m, 5H, H11, H12, H13), 4.48 (s, 2H, H9), 4.04 (s, 2H, H2), 3.70 - 3.22 (m, 12H, H3 - H8)

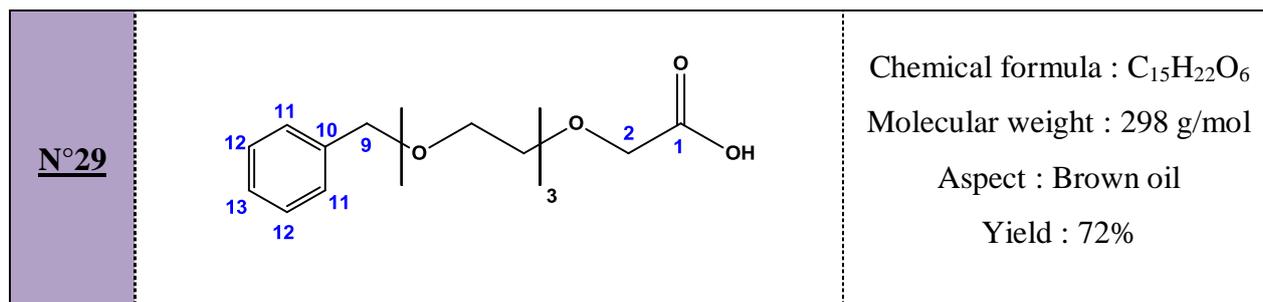
^{13}C {H} NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 200.4 (C1), 137.9 (C10), 127.9 - 127.1 (C11, C12, C13), 76.3 (C2), 72.2 (C9), 70.6 - 69.0 (C3 - C8).

VI.3.19. Synthesis of 2-(2-(2-(2-(benzyloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)acetic acid **29**

A three necked 250 mL flask equipped with a dropping funnel is charged with 128.75 mL of dry acetonitrile and periodic acid H_5IO_6 (4.035 g, 17.7 mmol, 1.1 eq.) and the resulting mixture was stirred at room temperature for 15 min.

Then, a solution of the aldehyde derivative **28** (4.64 g, 16.1 mmol, 1 eq.) in 15.95 mL of dried acetonitrile is added dropwise at 0 °C, followed by dropwise addition of a solution of pyridinium chlorochromate PCC (0.07 g, 0.325 mmol) in 15.95 mL of acetonitrile. The reaction was monitored by TLC (eluent: DCM / EtOH = 95/5)²⁴⁶.

When the reaction was complete, 40 mL of ethyl acetate were added to the mixture and the resulting solution was washed with saturated NaCl, saturated $NaHSO_3$, saturated NaCl and dried with $MgSO_4$. Endly, the volatile fractions were evaporated under reduced pressure.



IR (KBr, cm^{-1}): ν_{OH} = 3062; ν_{C-Haro} = 3029; $\nu_{C=O}$ = 1757; ν_{C-Caro} = 1352; ν_{C-O} = 1110.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.46 - 7.1 (m, 5H, H11, H12, H13), 6.97 (s, 1H, OH), 4.57 (s, 2H, H9), 4.21 - 4.00 (m, 2H, H2), , 3.79 - 3.56 (m, 12H, H3 - H8).

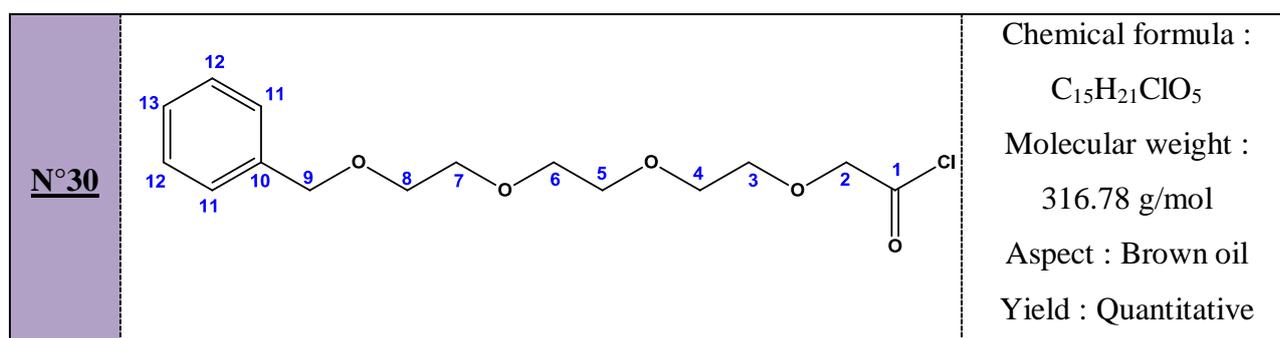
^{13}C {H} NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 172.5 (C1), 138.1 (C10), 128.3 - 127.5 (C11, C12, C13), 73.1 (C9), 70.1 - 69.2 (C3 - C8), 68.5 (C2)

VI.3.20.Synthesis of 1-phenyl-2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-oyl chloride **30**

A 50 mL flame-dried three necked flask equipped with an argon inlet and a dropping funnel was charged with the carboxylic acid derivative **29** (2.98g, 1 mmol, 1, eq) and 15 mL of freshly distilled DCM. The flask is placed in ice bath (0 °C) and a solution of oxalyl chloride (0.63 g, 5 mmol, 5 eq) in 10 mL of DCM was added dropwise.

The reaction mixture was then stirred at RT and monitored with infrared spectroscopy.

After evaporation under reduced pressure, the crude product was washed twice with 5 mL of DCM and twice with 5 mL of Et_2O and then dried under vacuum for a few minutes.



IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{C=O}$ = 1801 ; $\nu_{C=C}$ = 1455; ν_{C-O} = 1029, 1352 ; ν_{C-Cl} = 748.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.43 - 7.12 (m, 5H, H11 - H13), 4.70 (s, 2H, H2), 4.57 - 4.41 (m, 2H, H9), 3.71 - 3.30 (m, 12H, H3 - H8).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 170.8 (C1), 138.2 (C10), 128.4 - 127.4 (2 C11, 2 C12, C13), 73.3 (C2), 69.4 - 68.8 (C3 - C9).

VI.3.21. Synthesis of HMBPM5 with 3 PEG units. **31**

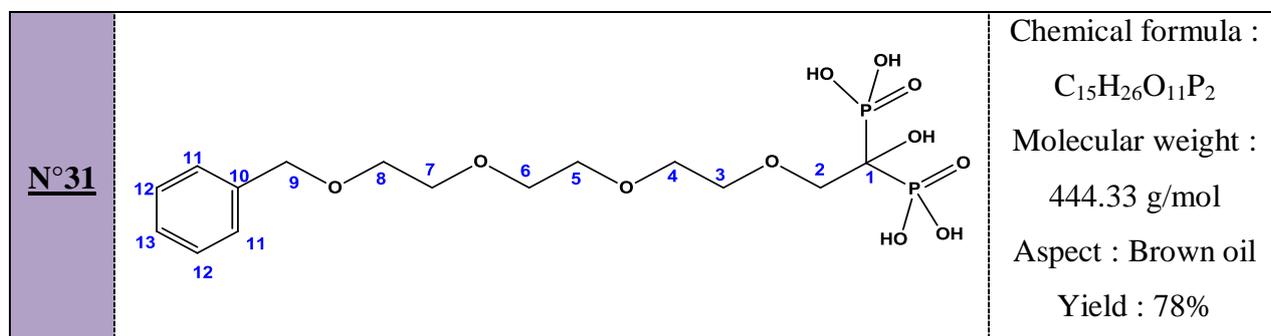
A 25 mL three-necked flask under argon equipped with a thermometer and a dropping funnel was charged with the acid chloride **30** (1.58g, 5 mmol, 1 eq.). Then, tris (trimethyl silyl) phosphite (2.98g, 10mmol, 2 eq.) was added dropwise at 0°C .

Once the addition is complete, the reaction mixture was stirred at room temperature and the progress of the reaction is then monitored by ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ NMR. The reaction was completed after 24h.

Volatile fractions were then evaporated under reduced pressure and the resulting brown oil was hydrolyzed in methanol at room temperature for 2h.

Endly, the crude product was precipitated in ether for several times.

➤ 13-hydroxy-1-phenyl-2,5,8,11-tetraoxatridecane-13,13-diylldiphosphonic acid (**31**).



IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{\text{O-H}}$ = 3400 ; $\nu_{\text{C-O}}$ = 1246 ; $\nu_{\text{C=C}}$ = 1232; $\nu_{\text{P=O}}$ = 1103 ; $\nu_{\text{P-O}}$ = 945.

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 16.8 (t, $^3J_{\text{P-H}}$ = 11.8 Hz).

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 7.55 - 7.08 (m, 5H, H11, H12, H13), 4.54 (s, 2H, H9), 4.01 - 3.84 (m, 2H, H2), 3.83 - 3.55 (m, 12H, H3 - H8).

^{13}C NMR (125 MHz, D_2O) δ : 137.1 (C10), 128.3 - 127.5 (m, 2 C11, 2 C12, C13), 73.4 (t,

$^1J_{\text{P-C-P}}$ = 117.8 Hz, C1), 72.6 - 69.5 (m, C9 - C3), 60.2 (C2).

VI.3.22. Deprotection of hydroxyle group of Bn-PEG-BP 32

In a 50 mL round bottom flask, bisphosphonate 31 (1g, 2.25 mmol) was dissolved in water (20 mL), and palladium on activated charcoal 10% (0.3 g) was added. After purging the reaction atmosphere three times with dihydrogen, the reaction mixture was stirred under H₂ atmosphere (1 atm). After 24 h, the solution was filtered through a celite pad, the pH is adjusted to 6 and the product was freeze dried.

➤ (1,11-dihydroxy-3,6,9-trioxaundecane-1,1-diyl)diphosphonic acid disodium salt (32)

N°32		Chemical formula : $C_8H_{18}Na_2O_{11}P_2$ Molecular weight : 398.15 g/mol Aspect : Brown solid Yield : 72% M.P : 235°C
-------------	--	--

IR (KBr, cm⁻¹): ν_{O-H} = 3426 ; $\nu_{P=O}$ = 1117 ; ν_{P-O} = 975.

³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ : 16.2 (t, ³J_{P-H} = 12.4 Hz).

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ : 3.8 - 3.77 (m, 2H, H8), 3.72 - 3.53 (m, 12H, H2 - H7).

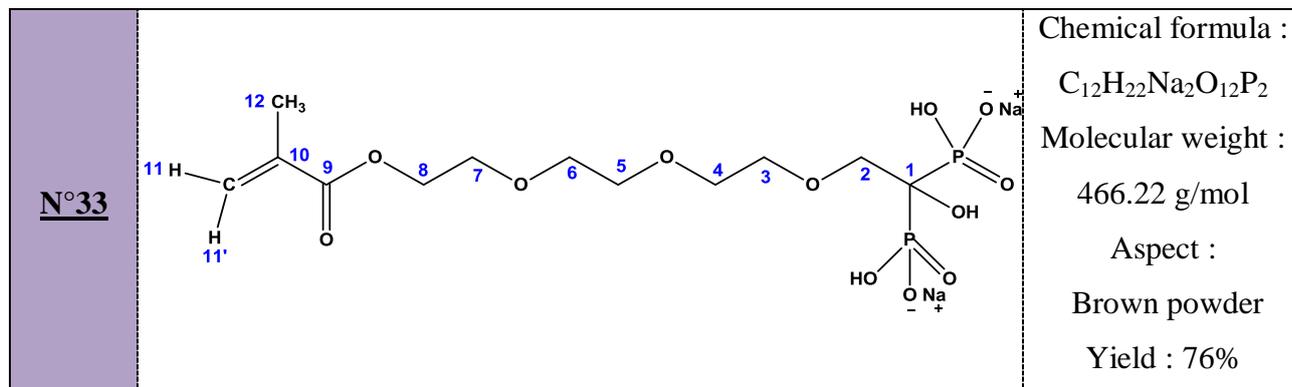
¹³C {H} NMR (101 MHz, D₂O) δ : 72.5 (t, ¹J_{P-C-P} = 116.5 Hz, C1), 70.9 - 68.9 (C2 - C7), 60.3 (C8).

VI.3.23. Method for coupling of alcohol bisphosphonate 32 with methacryloyl chloride 33

The bisphosphonate PEG 32 (1 eq., 1mmol, 0.398g) was diluted in distilled dichloromethane at room temperature under an Argon atmosphere. Then, triethyl amine (0.20 g, 2mmol, 2 eq.) was added and the reaction mixture was stirred for a few minutes. Methacryloyl chloride (0.21 g, 2 mmol, 2 eq.) was then added dropwise and the reaction mixture was stirred at room temperature. The reaction is monitored by ³¹P NMR.

After 36 h at room temperature, the reaction was complete. The coupling product was extracted in the aqueous phase after elimination of the excess of triethylamine and methacrylic acid at pH= 4 and pH= 12 by successive extractions in chloroform.

- sodium (1-hydroxy-14-methyl-13-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-ene-1,1-diyl)bis(hydrogenphosphonate) (**33**)



IR (KBr, cm^{-1}): ν_{O-H} = 3423 ; $\nu_{C=O}$ = 1717 ; ν_{C-O} = 1631 ; $\nu_{P=O}$ = 1122 ; ν_{P-O} = 943.

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 16.06.

1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 5.68 - 5.48 (m, 1H, H11), 5.32 - 5.18 (m, 1H, H11'), 3.77 (s, 2H, H8), 3.71 - 3.47 (m, 12H, H2 - H7), 1.77 (s, 3H, H12).

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ : 168.8 (C9), 136.2 (C10), 125.7 (C11), 72.42 (t, $^1J_{P-C-P}$ = 125.6 Hz, C1), 71.1 - 67.6 (C3 - C8), 64.1 (C2), 18.3 (C12).

VI.3.24. General Procedure for the preparation of tosylates compounds **34**

A solution of sodium hydroxide (5.48 g, 137 mmol) in water (30 mL) was added to a solution of PEG (904 mmol) in THF (30 mL).

The resulting mixture was cooled to 0 °C and a solution of *p*-toluenesulfonyl chloride (16.6 g, 87.4 mmol) in THF (100 mL) was slowly added under stirring for 2h²⁴⁸.

After stirring at 0 °C for 3h, the reaction mixture was poured onto an ice/water mixture (500 mL). The organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 200 mL). The combined organic layers were washed twice with water (100 mL), dried with $MgSO_4$ and the solvent was evaporated under reduced pressure.

➤ 2-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate **34a**

N°34a		Chemical formula : $C_{15}H_{24}O_7S$ Molecular weight : 348.41 g/mol Aspect : Clear oil Yield : 94%
--------------	--	---

IR (KBr, cm^{-1}): ν_{OH} = 3468 ; ν_{S-O} = 944 ; $\nu_{S=O}$ = 1103, 1295 ; ν_{C-Haro} = 733.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.77 (d, $^3J_{H-H}$ = 8.2 Hz, 2H, H10), 7.32 (d, $^3J_{H-H}$ = 8.0 Hz, 2H, H11), 4.21 - 4.01 (m, 2H, H8), 3.79 - 3.47 (m, 14H, H1 - H7), 2.75 (s, 1H, OH), 2.42 (s, 3H, H13).

^{13}C {H} NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 144.7 (C9), 132.6 (C12), 129.7 (2C11), 127.7 (2C10), 72.3 - 70.0 (C2 - C6), 69.1 (C7), 68.3 (C8), 61.3 (C1), 21.4 (C13).

 ➤ 2-(2-(2-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate **34b**

N°34b		Chemical formula : $C_{19}H_{32}O_9S$ Molecular weight : 450.64 g/mol Aspect : Clear oil Yield : 97%
--------------	--	---

IR (KBr, cm^{-1}): ν_{OH} = 3459 ; ν_{S-O} = 976 ; $\nu_{S=O}$ = 1076, 1308 ; $\nu_{C-H aro}$ = 751.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.54 (d, $^3J_{H-H}$ = 8.3 Hz, 2H, H14), 7.13 (d, $^3J_{H-H}$ = 8.2 Hz, 2H, H15), 3.98 - 3.85 (m, 2H, H12), 3.57 - 3.26 (m, 22H, H1 - H11), 2.20 (s, 3H, H17).

^{13}C {H} NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 144.3 (C13), 132.3 (C16), 129.3 (2C15), 127.3 (2C14), 72.0 - 68.9 (C2 - C11), 67.9 (C12), 60.8 (C1), 21.0 (C17) .

VI.3.25. Synthesis of azide-PEG-OH 35

Sodium azide (9.34 g, 143.7 mmol) was added to a solution of the mono-tosylated PEG derivative (28.8 mmol) in dry DMF (100 mL). The reaction mixture was then heated to 60°C during 5 h.

The solvent was removed under reduced pressure and the residue was placed in water and extracted with dichloromethane (3 x 100 mL)²⁴⁹. The combined organic layers were washed with water and brine, dried with MgSO₄ and the solvent was evaporated under reduced pressure.

➤ 2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethanol **35a**

<u>N°35a</u>		Chemical formula :
		$C_8H_{17}N_3O_4$
		Molecular weight :
		219.24 g/mol
		Aspect : Clear oil
Yield : 83%		

IR (KBr, cm⁻¹): ν_{N_3} = 2107 ; ν_{OH} = 3464.7 ; ν_{C-O} = 1123.9.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.74 - 3.45 (m, 14H, H2 - H8), 3.32 (m, 2H, H1)

¹³C {H} NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 72.5 - 69.9 (C2 - C7), 61.6 (C8), 53.5 (C1)

➤ 2-(2-(2-(2-(2-(2-Azido-ethoxy)-ethoxy)-ethoxy)-ethoxy)-ethoxy)-ethanol **35b**

<u>N°35b</u>		Chemical formula
		$C_{12}H_{25}N_3O_6$
		Molecular weight
		307.34 g/mol
		Aspect: Yellow oil
Yield: 81%		

IR (KBr, cm⁻¹): ν_{N_3} =2035 ; ν_{OH} = 3445 ; ν_{C-O} = 1103.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.70 - 3.43 (m, 22H, H2 - H12), 3.36 - 3.24 (m, 2H, H1).

^{13}C {H} NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 72.6 - 69.9 (C2 - C11), 61.5 (C12), 50.6 (C1)

VI.3.26.Synthesis of carboxylic ester derivatives **36**

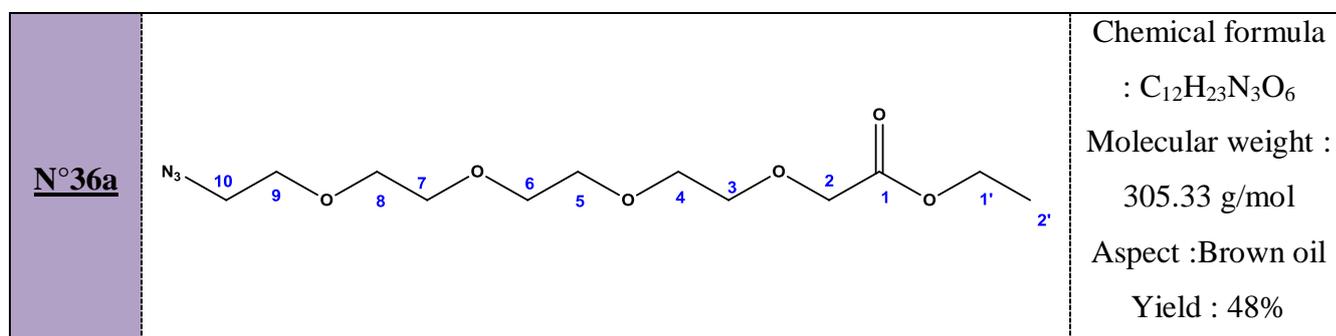
A solution of azide **35a** or **35b** (23.8 mmol) in dry DMF (7.5 mL) was added to a cooled solution of sodium hydride (0.63 g, 26.4 mmol,) in dry DMF (15 mL). The resulting reaction mixture was stirred for 30 min and ethyl bromoacetate (2.94 mL, 26.2 mmol) was added dropwise at 0°C.

After completion of the addition, the reaction mixture was stirred for 20 h at room temperature²⁴⁹.

After quenching with ice/water, the solvent was removed under reduced pressure and the resulting residue was placed in water and extracted with ethyl acetate (3 x 50 mL).

The combined organic layers were washed with water and brine and dried with MgSO_4 . Evaporation of the solvent gave crude oil. Purification using van pump during 1 h at 80°C afforded derivative compounds **36**.

➤ ethyl 14-azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecan-1-oate **36a**



IR(KBr, cm^{-1}): ν_{N_3} = 2009 ; $\nu_{\text{C=O}}$ = 1740 ; $\nu_{\text{C-O}}$ = 1115.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.27 - 3.97 (m, 4H, H2, H1'), 3.75 - 3.48 (m, 14H, H3 - H9), 3.36 - 3.25 (m, 2H, H10), 1.31 - 1.07 (m, 3H, H2').

^{13}C {H} NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 170.3 (C1), 70.7 - 68.5 (C3 - C9), 68.3 (C2), 60.5 (C1'), 50.4 (C10), 20.1 (C2')

➤ ethyl 2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)acetate **36b**

N°36b		Chemical structure : $C_{16}H_{31}N_3O_8$ Molecular weight : 393.43 g/mol Aspect : Brown oil Yield : 53%
--------------	--	---

IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{N_3} = 2072$; $\nu_{C=O} = 1737$; $\nu_{C-O} = 1109$.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.30 - 4.04 (m, 4H, H2, H1'), 3.75 - 3.52 (m, 22H, H3 - H13), 3.44 - 3.31 (m, 2H, H14), 1.33 - 1.10 (m, 3H, H2').

^{13}C {H} NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 170.2 (C1), 70.6 - 68.5 (C3 - C13), 66.6 (C2), 61.4 (C1'), 50.4 (C14), 20.8 (C2').

VI.3.27. Method of the saponification of carboxylic ester derivatives **37**

Aqueous 2M NaOH (23 mL) was added to a solution of **36a-b** (11.5 mmol) in methanol (23 mL). The reaction was monitored by TLC analysis. After 10 min indicated the absence of the starting material as a result of hydrolysis of the methyl ester function. The methanol from the filtrate was removed under vacuum and concentrated it to dryness to obtain the crude product the reaction mixture was acidified to pH= 3.5 and extracted with 3 x 30 mL of chloroform. The solvent was removed under reduced pressure yielding the pure product.

➤ 14-azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecan-1-oic acid **37a**

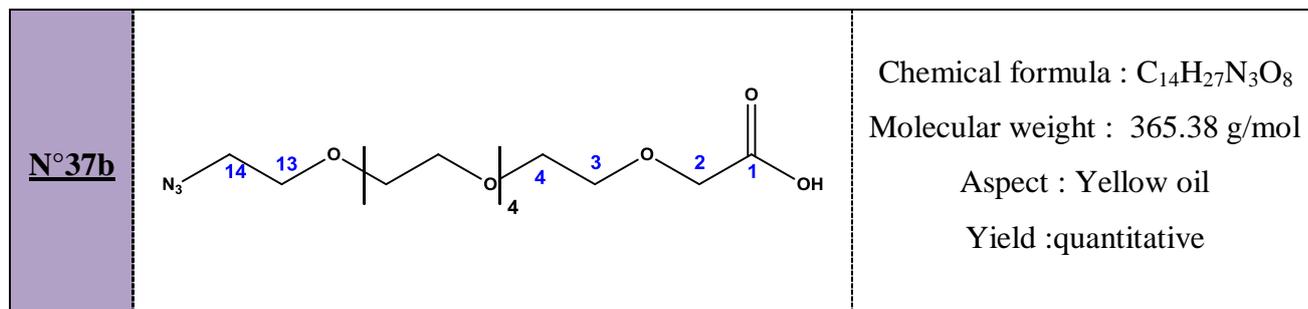
N°37a		Chemical formula : $C_{10}H_{19}N_3O_6$ Molecular weight : 277.27 g/mol Aspect : Yellow oil Yield : quantitative
--------------	--	---

IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{N_3} = 2104$; $\nu_{C=O} = 1757$; $\nu_{C-O} = 1122$; $\nu_{O-H} = 3464$.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.16 (s, 2H, H2), 4.27 - 3.85 (m, 2H, H3), 3.83 - 3.45 (m, 12H, H4 - H9), 3.30 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7$ Hz, 2H, H10).

^{13}C {H} NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 172.6 (C1), 70.8 - 69.8 (C3 - C9), 68.4 (C2), 50.4 (C10).

➤ 2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)acetic acid **37b**



IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{\text{N}_3} = 2110$; $\nu_{\text{C=O}} = 1753$; $\nu_{\text{C-O}} = 1097$; $\nu_{\text{O-H}} = 3481$.

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 3.86 (s, 2H, H2), 3.73 - 3.53 (m, 22H, H3 - H13), 3.47 - 3.32 (m, 2H, H14).

^{13}C {H} NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 172.3 (C1), 70.8 - 69.9 (C3 - C13), 68.7 (C2), 50.1 (C14).

VI.3.28. Preparation of azide-PEG-carboxylic acid chlorides **38**.

A 50 mL flame-dried three necked flask equipped with an argon inlet and a dropping funnel was charged with the carboxylic acid derivative **37a** or **37b** (10 mmol, 1, eq) and 40 mL of freshly distilled DCM. The flask is placed in ice bath (0°C) and a solution of oxalyl chloride (6.3 g, 50 mmol, 5 eq) in 10 mL of DCM was added dropwise.

The reaction mixture was then stirred at RT during 48h and the formation of acide chloride was monitored by infrared spectroscopy.

After evaporation under reduced pressure, the crude product was washed twice with 5 mL of DCM and twice with 5 mL of Et_2O and then dried under vacuum for a few minutes.

➤ 14-azido-3,6,9,12-tetraoxatetradecan-1-oyl chloride **38a**

N°38a		Chemical formula : $C_{10}H_{18}ClN_3O_5$ Molecular weight : 295 g/mol Aspect : Yellow oil Yield : Quantitative
--------------	--	--

IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{N_3} = 2109$; $\nu_{O-C} = 1129.8$; $\nu_{C=O} = 1801.6$.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.49 (s, 2H, H2), 3.79 - 3.69 (m, 2H, H9), 3.69 - 3.55 (m, 12H, H3 - H8), 3.36 (t, $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz, 2H, H10).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 172.1 (C1), 71.4 (C2), 71.2 - 70.1 (C3 - C9), 50.7 (C10).

 ➤ 14-azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxadocosan-1-oyl chloride **38b**

N°38b		Chemical formula : $C_{14}H_{26}ClN_3O_7$ Molecular weight : 383 g/mol Aspect : Yellow oil Yield : Quantitative
--------------	--	--

IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{N_3} = 2114$; $\nu_{C-O} = 1127$; $\nu_{C=O} = 1803$.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 4.51 (s, 2H, H2), 3.74 - 3.59 (m, 2H, H13), 3.70 - 3.57 (m, 20H, H3 - H12), 3.16 (t, $^3J_{H-H} = 5.0$ Hz, 2H, H14).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ : 172.4 (C1), 71.5 (C2), 70.8 - 69.7 (C3 - C13), 50.5 (C14).

VI.3.29. Synthesis of the compounds N_3 -PEG-BP **39** with the silylated method

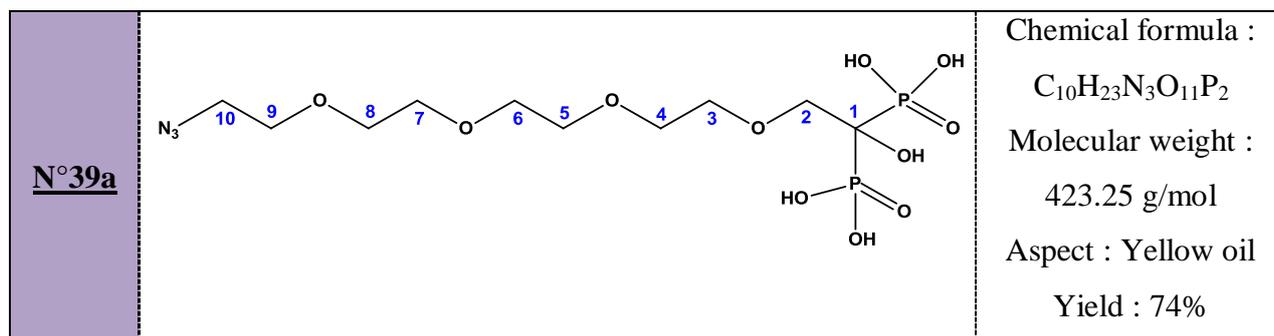
A 25 mL three-necked flask under argon equipped with a thermometer and a dropping funnel was charged with the acid chloride **38a** or **38b** (5 mmol, 1 eq.). Then, tris (trimethyl silyl) phosphite (2.98g, 10mmol, 2 eq.) was added dropwise at $0^\circ C$.

Once the addition is complete, the reaction mixture was stirred at room temperature and the progress of the reaction is then monitored by ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ NMR. The reaction is complete after 12 and 18h for the **38a** and **38b** respectively.

Volatile fractions were then evaporated under reduced pressure and the resulting oil was hydrolyzed in methanol at room temperature for 2h.

Endly, the crude product was precipitated in ether for several times.

➤ 14-azido-1-hydroxy-3,6,9,12-tetraoxatetradecane-1,1-diyldiphosphonic acid **39°**



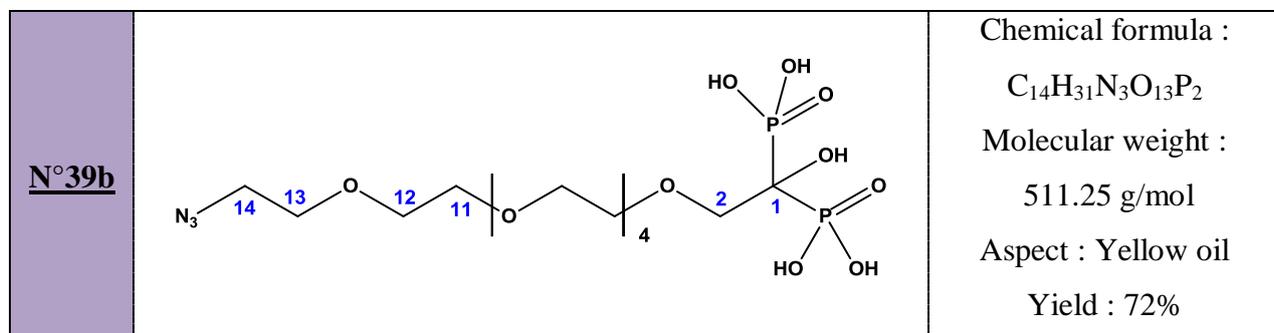
IR (KBr, cm^{-1}): ν_{N_3} = 2132; $\nu_{\text{P}=\text{O}}$ = 1087 ; $\nu_{\text{P}-\text{O}}$ = 947 ;

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 16.83 (t, $^3J_{\text{P}-\text{H}}$ = 11.23 Hz).

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 3.75 - 3.52 (m, 16H, H2 - H9), 3.46 - 3.37 (m, 2H, H10)

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ : 71.41 (t, $^1J_{\text{P}-\text{C}-\text{P}}$ = 137.1 Hz, C1), 69.9 - 69.5 (C3 - C9), 63.5 (C2), 52.5 (C10).

➤ 21-azido-1-hydroxy-3,6,9,12,15,19-hexaoxahenicosane-1,1-diyldiphosphonic acid **39b**



IR (KBr, cm^{-1}): ν_{N_3} = 2132; $\nu_{\text{P}=\text{O}}$ = 1087 ; $\nu_{\text{P}-\text{O}}$ = 947.

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 16.66 (t, $^3J_{\text{P}-\text{H}}$ = 11.57 Hz).

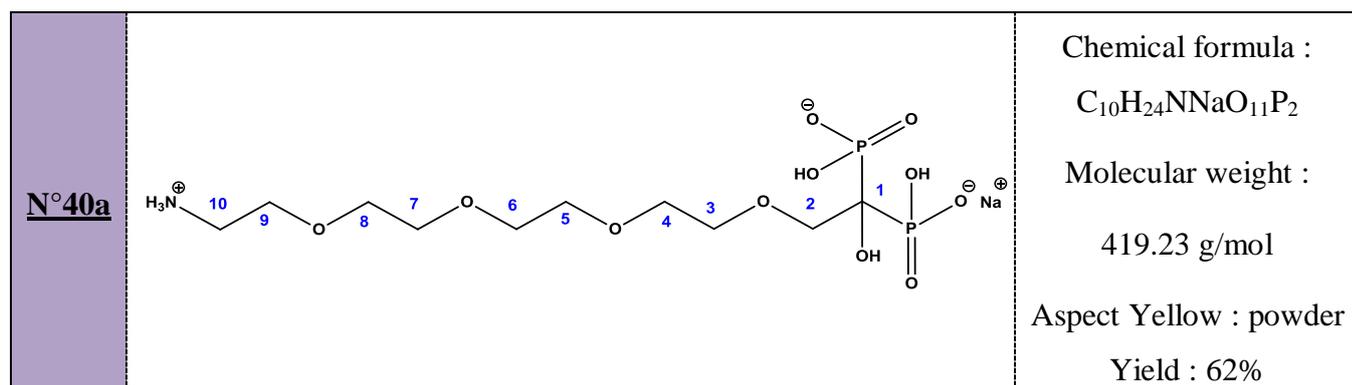
^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 3.88 - 3.78 (m, 2H, H2), 3.74 - 3.52 (m, 22H, H3 - H13), 3.49 - 3.39 (m, 2H, H14).

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ : 71.2 (t, $^1J_{\text{P-C-P}} = 136.34$ Hz, C1), 69.9 - 69.4 (C3 - C13), 63.4 (C2), 52.5 (C14).

VI.3.30.Reduction of azide group in the compounds 39

In a 50 mL round bottom flask, the compounds 39a or 39b (2.25 mmol) was dissolved in water (25 mL), and palladium on activated charcoal 10% (0.3 g) was added. After purging the reaction atmosphere three times with dihydrogen, the reaction mixture was stirred under H_2 atmosphere (1 atm). After 24 h, the solution was filtered through a celite pad, the pH is adjusted to 6 and the product was freeze dried.

- (14-amino-1-hydroxy-3, 6, 9, 12-tetraoxatetradecane-1,1-diyl)diphosphonic acid monosodium salt 40a



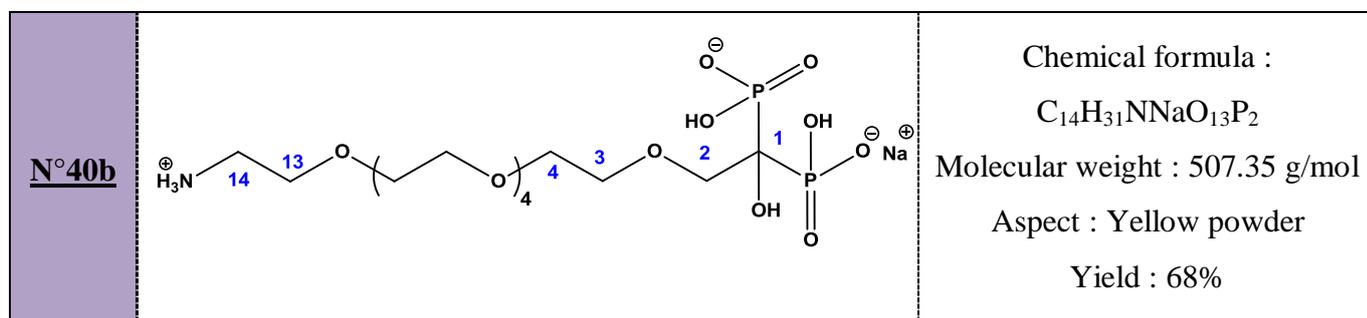
IR (KBr, cm^{-1}): $\nu_{\text{N-H}} = 3245$; $\nu_{\text{C-O}} = 1175$; $\nu_{\text{P=O}} = 1110$; $\nu_{\text{P-O}} = 966$.

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 16.11.

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 4.02 - 3.78 (m, 2H, H10), 3.64 (m, 16H, H2 - H9)

^{13}C {H} NMR (125 MHz, D_2O) δ : 75.2 (t, $^1J_{\text{P-C-P}} = 116.5$ Hz, C1), 73.6 (C9), 69.9 - 69.5 (C3 - C8), 65.7 (C2), 41.4 (C10).

- (20-amino-1-hydroxy-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosane-1,1-diyl)diphosphonic acid disodium salt **40b**



IR (KBr, cm^{-1}): ν_{N-H} = 3237 ; ν_{C-O} = 1169; $\nu_{P=O}$ = 1102 ; ν_{P-O} = 971.

^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 16.08.

1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 3.82 - 3.66 (m, 2H, H14), 3.66 - 3.41 (m, 24H, H2 - H13).

^{13}C {H} NMR (160 MHz, D_2O) δ : 74.9 (t, $^1J_{P-C-P}$ = 116.2 Hz, C1), 72.2 (C13), 71.9 - 69.2 (C3 - C12), 60.2 (C2), 39.8 (C14).

VI.4.Experimental part of the chapter V

4, 4'-Azobis(4-cyanopentanoic acid) was purified by recrystallization from methanol.

VI.4.1.Synthesis of N-(2-Hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA) 41

(18 g, 0.17 mol) of anhydrous sodium carbonate was suspended in a solution of (11.45 g, 0.15 mol) of 1-aminopropan-2-ol in 40 mL freshly distilled methylene dichloride. The suspension was cooled to 0 °C and a solution of (16 g, 0.145 mol) methacryloyl chloride in 20 mL methylene dichloride was added dropwise under cooling and vigorous stirring within 1 h. The reaction mixture was stirred for another 30 min at 15 °C. Then, 5 g of anhydrous sodium sulfate was added, the solid was filtered off, and the dry filtrate was concentrated to half volume under reduced pressure. HPMA was obtained by crystallization from methylene dichloride at -20 °C and purified by recrystallization from acetone.

➤ N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (**41**)

N°41		Chemical formula : C ₇ H ₁₃ NO ₂ Molecular weight : 143 g/mol Aspect: White cristal Yield : 87% Mp : 76°C
-------------	--	--

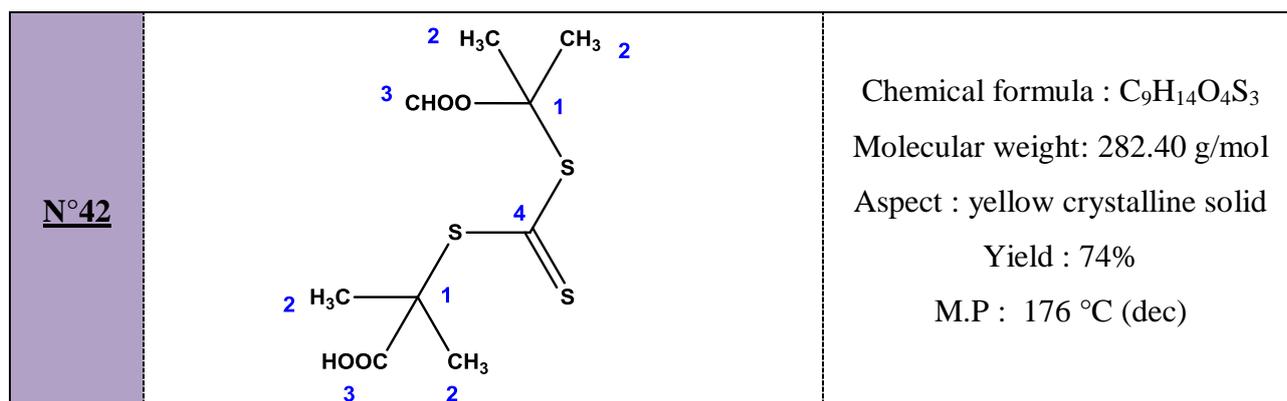
¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ : 5.72 (s, 1H, H₆), 5.47 (s, 1H, H_{6'}), 3.98 (dd, ³J_{H-H} = 11.3, 6.5 Hz, 1H, H₂), 3.30 (qd, ³J_{H-H} = 13.9, 5.8 Hz, 2H, H₃), 1.95 (s, 3H, H₇), 1.19 (d, ³J_{H-H} = 6.4 Hz, 3H, H₁).

¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ : 160.9 (C₄), 139.0 (C₅), 121.0 (C₆), 66.2 (C₂), 46.2 (C₃), 19.3 (C₁), 17.6 (C₇).

VI.4.2.Synthesis of the CTAs

VI.4.2.1.Synthesis of S,S'-Bis(α,α'-dimethyl acetic acid)- trithiocarbonate **42**

Carbon disulfide (27.4 g, 0.36 mol, 1eq), chloroform (107.5 g, 0.9 mol, 2.5eq), acetone (52.3 g, 0.9 mol, 2.5eq), and tetrabutylammonium hydrogen sulfate (2.41 g, 7.1 mmol) were mixed with 120 mL of mineral spirits in a 1 L of reactor under nitrogen. Sodium hydroxide (50%) (201.6 g, 2.52 mol) was added dropwise over 90 min in order to keep the temperature below 25 °C. The reaction was stirred overnight. 900 mL of water was then added to dissolve the solid, followed by 120 mL of concentrated HCl to acidify the aqueous layer. It was stirred for 30 min with nitrogen purge. Filter and rinse the solid thoroughly with water. Dry to constant weight to collect 41.3 g of earth-colored product. It can be purified by recrystallizations from acetone to afford a final product²⁹⁰.

➤ S,S'-Bis(α,α' -dimethyl acetic acid)- trithiocarbonate **42**

IR (KBr, cm⁻¹): $\nu_{C=O}$ = 1712 ; $\nu_{C=S}$ = 1045.

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ : 12.95 (s, 2H, H3), 1.60 (s, 12H, H2).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ : 219.4 (C4), 173.5 (C3), 56.6 (C1), 25.4 (C2).

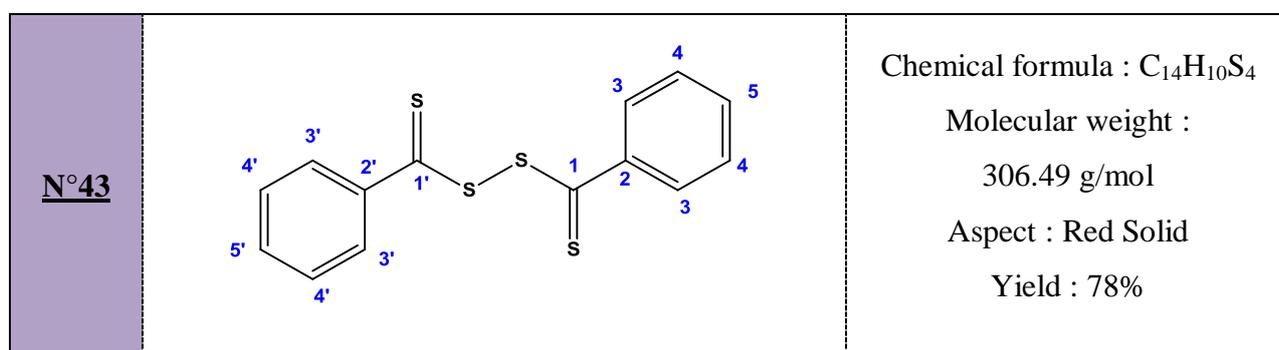
VI.4.2.2.Synthesis of 4-Cyanopentanoic Acid Dithiobenzoate **44**

a. Synthesis of Dithiobenzoic Acid (DTBA).

Three-necked round-bottom dried flask equipped with a magnetic stir bar, addition funnel (250.0 mL), thermometer and rubber septum for liquid transfers was added sodium methoxide (30% solution in methanol, 180.0 g, 1.0 mol). Anhydrous methanol (250.0 g) was added to the flask, followed by rapid addition of elemental sulfur (32.0 g, 1.0 mol). Benzyl chloride (63.0 g, 0.5 mol) was then added dropwise via the addition funnel over a period of 1 h, at room temperature under a dry nitrogen atmosphere. The reaction mixture was heated in an oil bath at 67 °C for 10 h. After this time, the reaction mixture was cooled to 7 °C using an ice bath. The precipitated salt was removed by filtration and the solvent removed *in vacuo*. To the residue was added deionized water (500.0 mL). The solution was filtered a second time and then transferred to a 2 L separatory funnel. The crude sodium dithiobenzoate solution was washed with diethyl ether (3*200.0 mL). Diethyl ether (200.0 mL) and 1.0 N HCl (500.0 mL) were added, and dithiobenzoic acid was extracted into the organic layer. Deionized water (300.0 mL) and 1.0 N NaOH (600.0 mL) were added, and sodium dithiobenzoate was extracted to the aqueous layer. This washing process was repeated two more times to finally yield a solution of sodium dithiobenzoate. The product is placed directly into reaction in the second step.

➤ Di(thiobenzoyl) Disulfide **43**

Potassium ferricyanide (32.9 g, 0.1 mol) was dissolved in deionized water (500.0 mL). Sodium dithiobenzoate solution (350.0 mL) was transferred to a 1 L conical flask equipped with a magnetic stir bar. Potassium ferricyanide solution was added dropwise to the sodium dithiobenzoate via an addition funnel over a period of 1 h under vigorous stirring. The red precipitate was filtered and washed with deionized water until the washing became colorless. The solid was dried *in vacuo* at room temperature overnight. The product was recrystallized from ethanol²⁷⁶.

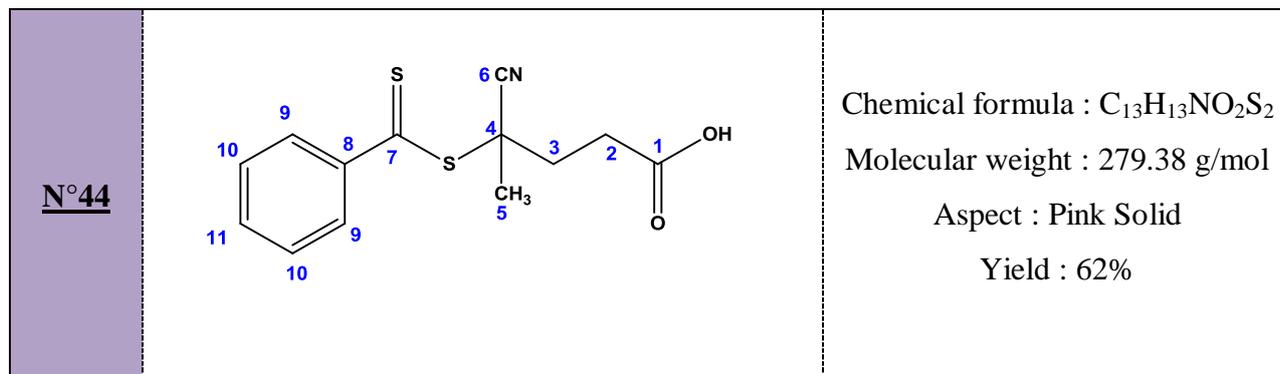


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.08 - 7.61 (m, 6H, H₄, H₅, H_{4'}, H_{5'}), 7.59 - 7.40 (m, 4H, H₃, H_{3'})

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 218.2(C₁, C_{1'}), 141.76(C₂, C_{2'}), 132.95(C₅, C_{5'}), 129.33(C₄, C_{4'}), 125.58(C₃, C_{3'}).

b. 4-cyano-4-((phenylcarbonothioyl)thio)pentanoic acid **44**

To a 250 mL round-bottomed flask was added distilled ethyl acetate (80.0 mL). To the flask was added dry 4,4'-azobis(4-cyanopentanoic acid) (5.84 g, 21.0 mmol) and di(thiobenzoyl) disulfide **43** (4.25 g, 14.0 mmol). The reaction solution was heated at reflux for 18 h. The ethyl acetate was removed *in vacuo*. The crude product was isolated by column chromatography silica gel using ethyl acetate: hexane (2: 3) as eluent. Fractions that were red in color were combined and dried over anhydrous sodium sulfate overnight. The solvent mixture was removed *in vacuo*, and the red oily residue placed in a freezer at -20 °C, whereupon it crystallized. The target compound was recrystallized from benzene²⁷⁶.

➤ 4-cyano-4-((phenylcarbonothioyl)thio)pentanoic acid **44**

IR (KBr, cm⁻¹): $\nu_{\text{O-H}}$ = 2840 - 3150 ; $\nu_{\text{C=O}}$ = 1719 ; $\nu_{\text{C=S}}$ = 1070 ; ν_{CN} = 2840.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.91 - 7.88 (m, 2H, H2'), 7.63 - 7.53 (m, 1H, H6'), 7.45 - 7.34 (m, 2H, H1'), 2.84 - 2.56 (m, 3H, H3, OH), 2.45 - 2.39 (m, 2H, H2), 1.94 (s, 3H, H5').

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ : 224.2 (C4), 176.5 (C1), 144.5 (C3'), 133.1 (C6'), 128.6 (C1'), 126.7 (C2'), 118.4 (C5), 45.6 (C4), 33.1 (C3), 29.5 (C2), 24.2 (C5')

VI.4.3.Method of polymerization

VI.4.3.1. Synthesis of HPMA macro CTA **45** and **46**

HPMA macro-CTA was prepared by aqueous RAFT polymerization employing V-501 as the primary radical source and CTP or CMP as the RAFT CTA at 70 °C. The polymerization was performed directly in an aqueous acetic buffer pH= 5.2 prepared with 0.27 mol/L acetic acid and 0.73 mol/L sodium acetate; with an initial monomer concentration $[M]_0$ of 0.3M , septum-sealed, round-bottom flask that was purged with nitrogen for 15 min prior to polymerization. The polymerization was performed at various report $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ For example for the report 900/3/1 we have used HPMA (0.858 g, 6 mmol), 4-cyanopentanoic acid dithiobenzoate (5.59 mg, 0.02 mmol) (CTP) or (CMP) (5.648 mg, 0.02 mmol) , and 4,4'-azobis- (4-cyanopentanoic acid) (1.876 mg, 0.0067 mmol) were dissolved in acetate buffer(20mL). The ampule was degassed and subsequently flame-sealed. The solution was heated at 70 °C in oil bath for 12 h. The resulting polymerization solution was terminated by immersion of the reaction flask in liquid nitrogen. The solution was concentrated until a volume of 5mL followed by it precipitation in acetone (150mL). Both HPMA macroCTA were isolated by dialysis followed by lyophilization.

➤ HPMA-Macro-CTA (CTP)_ **45**

N°45		Chemical formula : $(C_7NO_2H_{13})_x(C_{13}S_2NOH_{13})$ $X = 285$ units $M_{th} = 41\,464$ Da $M_{exp} = 41\,690$ Da Aspect : White powder Yield: 96 %
-------------	--	--

1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 3.97 (s, 1H, Ha), 3.26 – 3.14(m, 2H, Hb), 2.07 - 1.72 (m, 2H, Hd), 1.25(sl, 3H, He), 1.0(sl, 3H, Hc)

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ : 179.3 (Cf), 65.5 (Ca), 47.0 (Cb), 46.9¹⁶², 20.2 (Ce), 19.9 (Cc)

 ➤ HPMA-Macro-CTA (CMP) **46**

N°46		Chemical formula : $(C_7NO_2H_{13})_{x+y}(C_9S_3O_4H_{14})$ $X+Y = 264$ motifs $M_{th} = 49\,423$ Da $M_{exp} = 38\,020$ Da Aspect : Yellow powder Yield: 94%
-------------	--	---

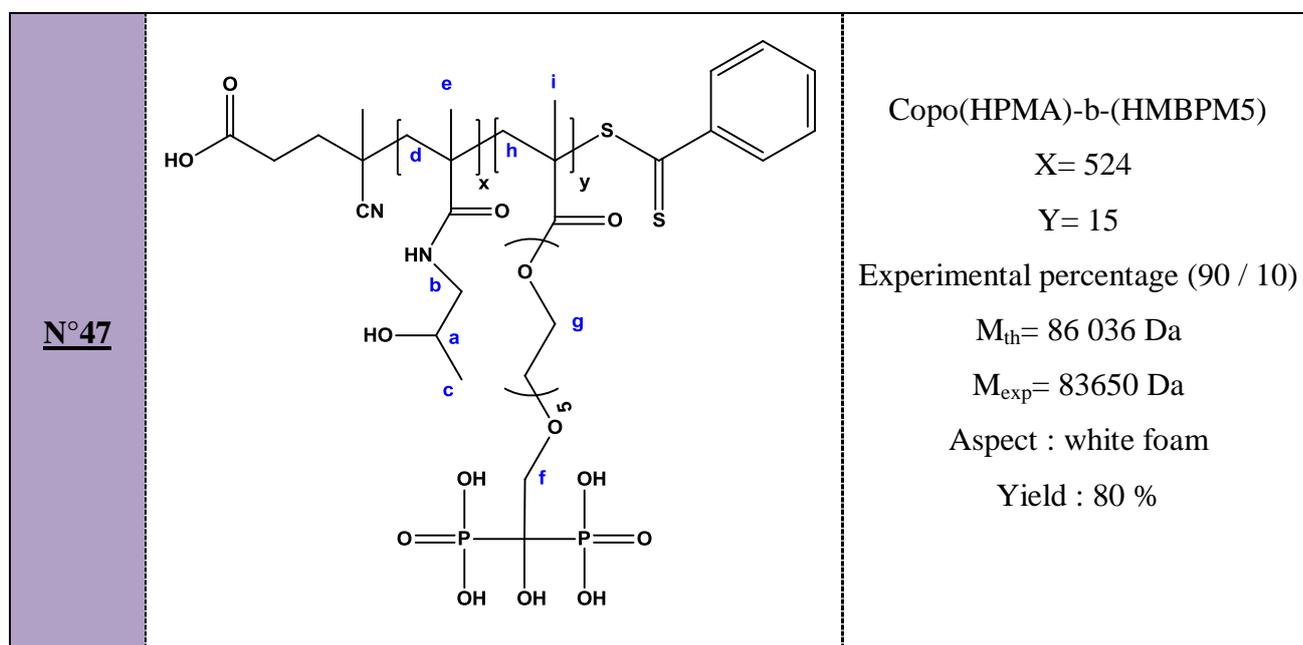
1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 3.85 (s, 1H, Ha), 3.25 - 2.90 (m, 2H, Hb), 1.99 - 1.57 (m, 2, 06 H, Hf, Hh), 1.15(sl,3H, Hg), 0.93(bs,3H,Hc)

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ : 215.4 (Cj), 180.7 (Ci), 176.3¹⁶², 65.6 (Ca), 47.1 (Cb), 46.9(Cf), 45(Cf) , 30.2 (Ck), 23.2 (Ch), 20.2 (Ce), 20.0 (Cc).

IV.4.3.2. Synthesis of HPMA-*b*-HMBPM5 (n=5) 47

The block copolymer poly (HPMA- *b*-HMBPM5) was synthesized in an acetic acid/sodium acetate buffer using the appropriate HPMA macro-CTP instead of CTP. For instance, **HMPBM5** (1.88 g, 0.0034 mol) was dissolved in 0.8 mL of acetic acid/sodium acetate buffer at 0 °C, and the pH of the solution was adjusted to 5.2 with HCl. Macro-HPMA (1.42 g, 0.034 mmol) and V-501 (3.08 mg, 0.011 mmol) were added, and the solution was diluted to 5 mL volume with the buffer solution. Polymerization solutions were degassed by purging with argon for 15 min and allowed to react at 70 °C for 24h. The diblock polymers poly(HPMA-*b*-HMBPM5) was prepared under the conditions described for the preparation of macro-HPMA using the appropriate macro-CTA as the chain transfer agent instead of CTP and a buffer solution instead of H₂O. The bloc copolymer was dialyzed in water during 5 days and lyophilized.

➤ HPMA-*b*-HMBPM5 (n=5). 47



³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ : 15.72.

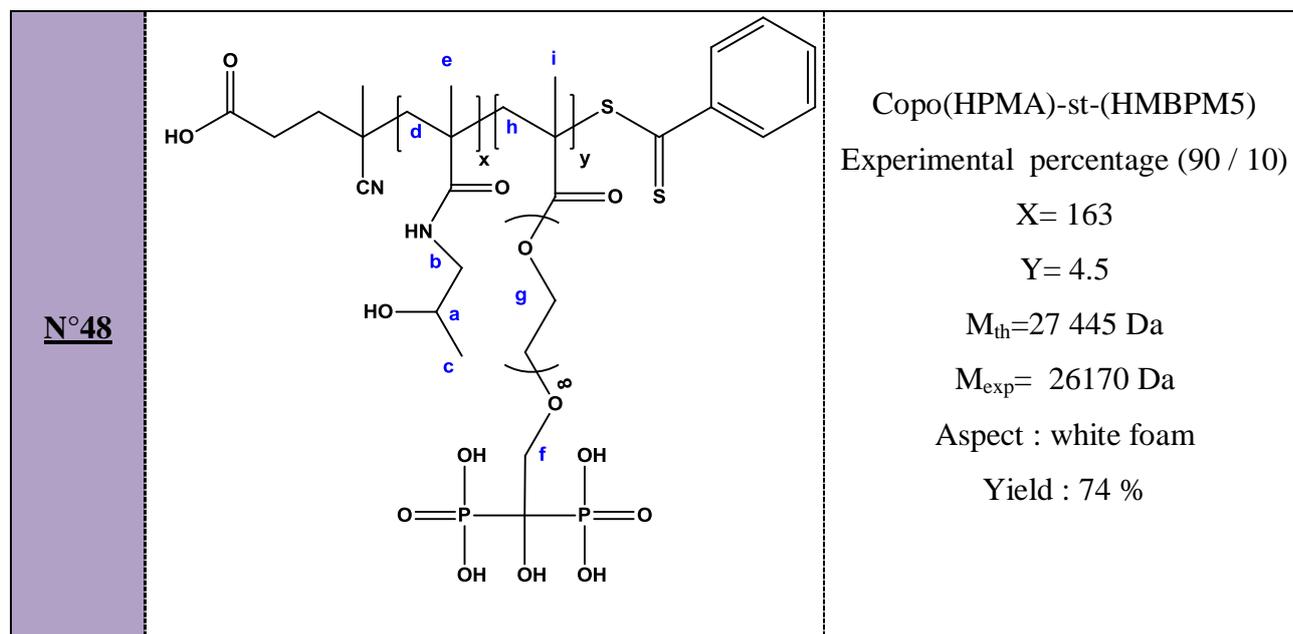
¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ : 4.40 - 4.25 (m, 2H, Hf), 4.14 - 3.75 (m, 5H, Ha, Hg), 3.27-2.91 (m, 2H, Hb), 2.21 - 1.79 (m, 4H, Hd, Hh), 1.54 - 1.04 (m, 9H, He, Hc, Hi).

IV.4.3.3. General method for the synthesis of HPMA-*st*-HMBPM Copolymer **48** to **56**

HPMA-*st*-HMBPM was synthesized as previously reported in *Scheme 69*. Briefly, 8.38 mg (0.03 mmol) of CTP was weighed and added to a round-bottomed flask equipped with a stir bar. 90 mol% HPMA (1.16 g, 8.1 mmol) and 10 mol% HMBPM (0.9 mmol) were then added to the flask and dissolved in 30 mL of acetate buffer (pH 5.2, 0.27 M acetic acid and 0.73 M sodium acetate) bringing the initial monomer concentration ($[M]_0$) to 0.3 M. After complete dissolution of monomer and CTA, (2.8 mg, 0.01 mmol) of V-501 was added to the flask. The round bottomed flask was then septum sealed and purged with nitrogen for 15 min and submerged in an oil bath at 70 °C for 24h. The copolymer was recovered after precipitation in acetone.

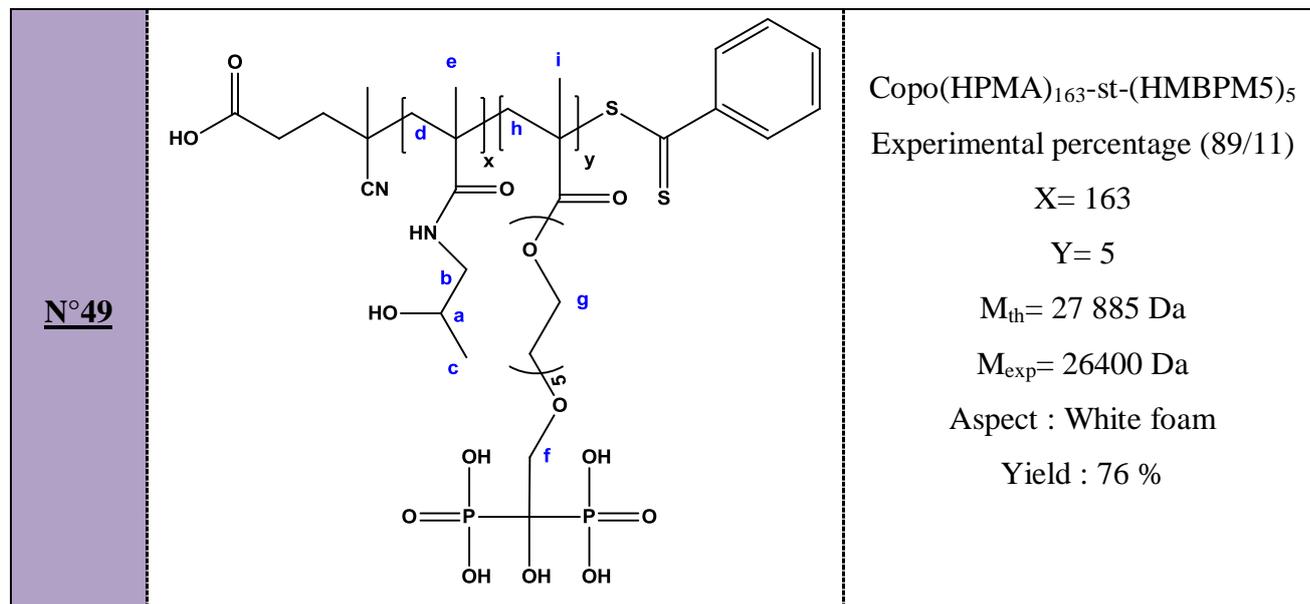
The copolymer was dialyzed for 5 days and dried via lyophilization. HPMA-*s*-HMBPM (90/10) was characterized via aqueous size exclusion chromatography and NMR ^1H and ^{31}P .

➤ HPMA-*s*-HMBPM5(n=8) **48**



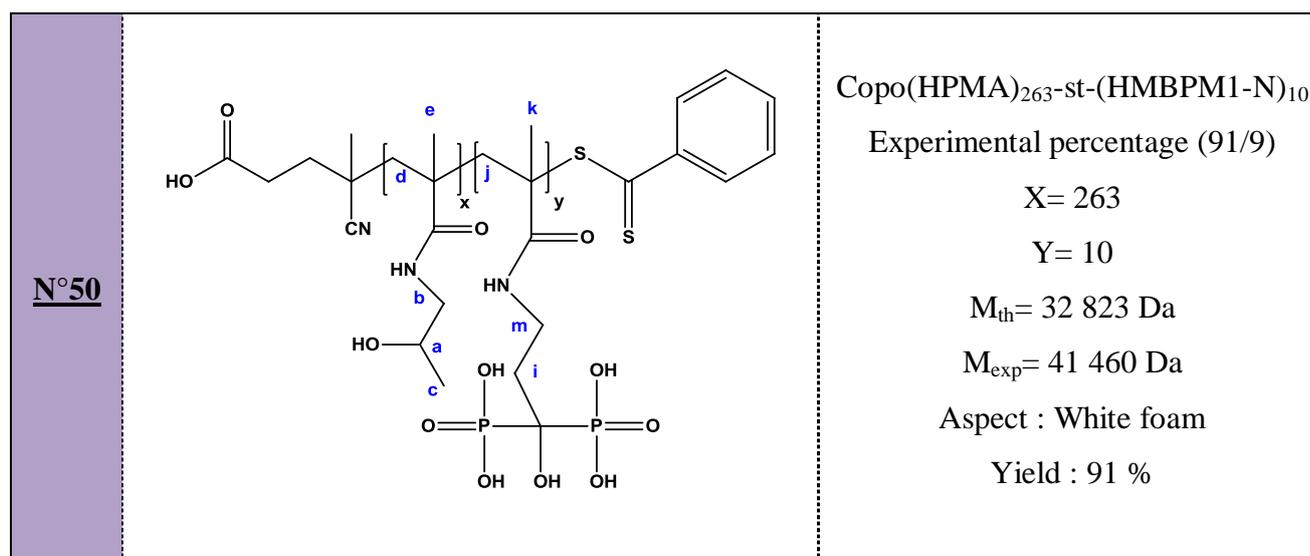
^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 15.72.

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 4.40 - 4.25 (m, 2H, Hf), 4.14 - 3.75 (m, 5H, Ha, Hg), 3.27-2.89 (m, 2H, Hb), 2.21 - 1.79 (m, 4H, Hd, Hh), 1.54 - 1.04 (m, 9H, He, Hc, Hi).

➤ HPMA-s-HMBPM5 **49**


³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ : 15.96.

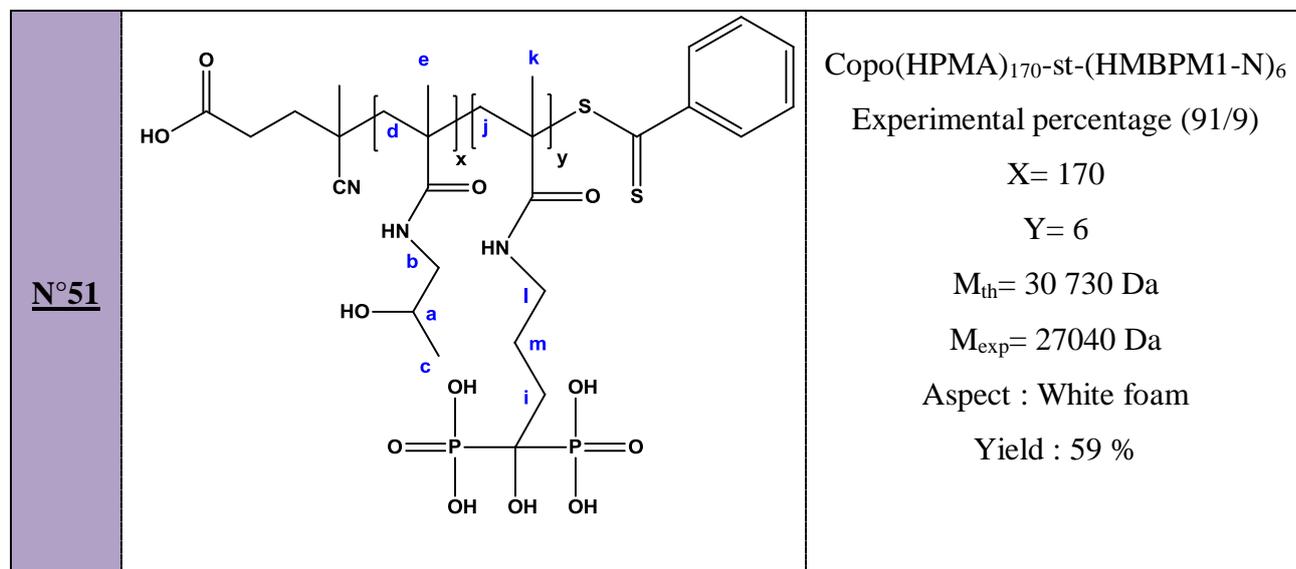
¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ : 4.26 - 4.01 (m, 2H, Hf), 3.97 - 3.46 (m, 3.2H, Ha, Hg), 3.06 (d, ³J_{H-H} = 35.6 Hz, 2H, Hb), 2.05 - 1.53 (m, 4H, Hd, Hh), 1.37 - 0.57 (m, 9H, He, Hc, Hi).

 ➤ HPMA-s-HMBPM1-N(n=2) **50**


³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ : 17.27.

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 3.73 (s, 1H, Ha), 3.21 - 2.67 (m, 4H, Hb, Hm), 2.01 - 1.45 (m, 7H, Hd, Hk, Hj), 1.29 - 1.14 (m, 2H, Hi), 1.11- 0.91 (m, 6H, He, Hc).

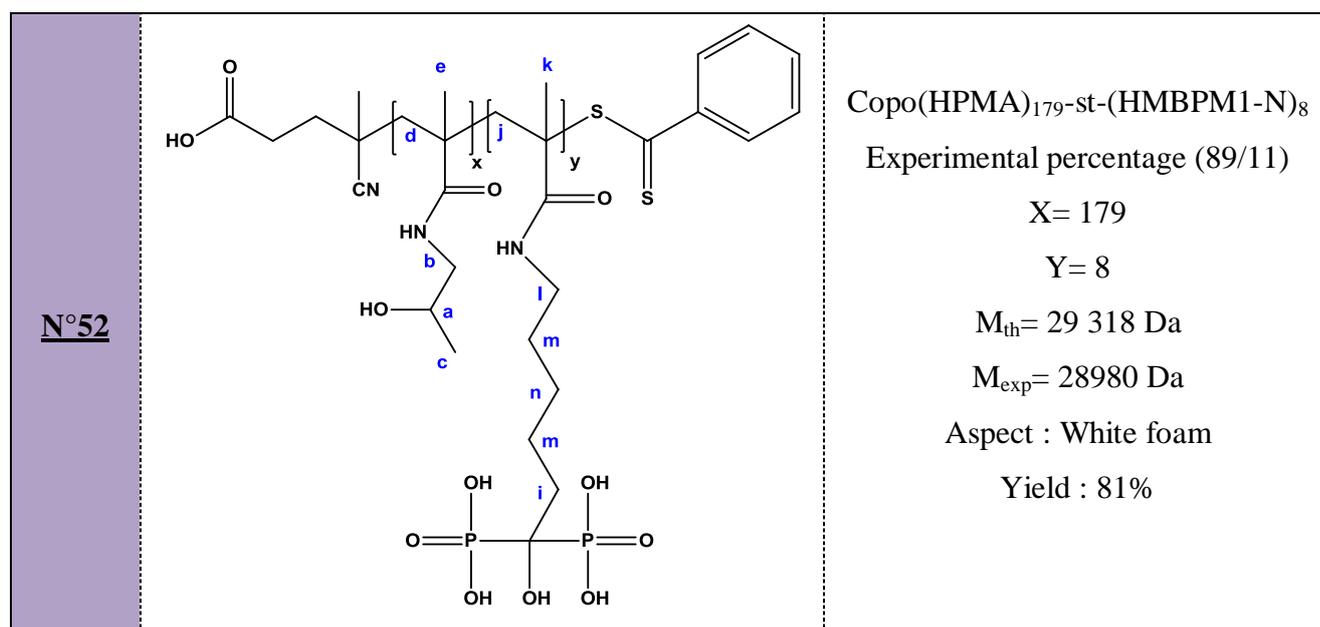
➤ HPMA-s-HMBPM1-N(n=3) **51**



^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 17.93.

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 3.79 (s, 1H, Ha), 3.25 - 2.70 (m, 4H, Hb, Hl), 2.01 - 1.45 (m, 7H, Hd, Hk, Hj), 1.32 - 1.16 (m, 4H, Hi, Hm), 1.16- 0.95 (m, 6H, He, Hc).

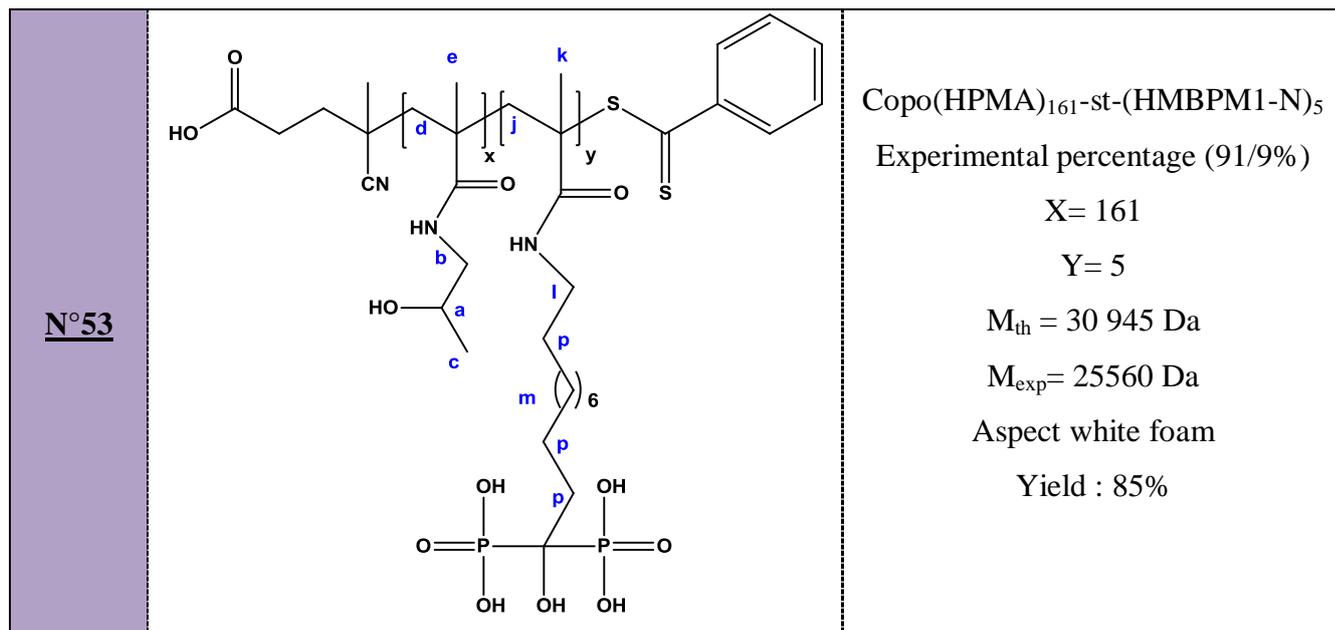
➤ HPMA-s-HMBPM1-N(n=5) **52**



^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 18.63.

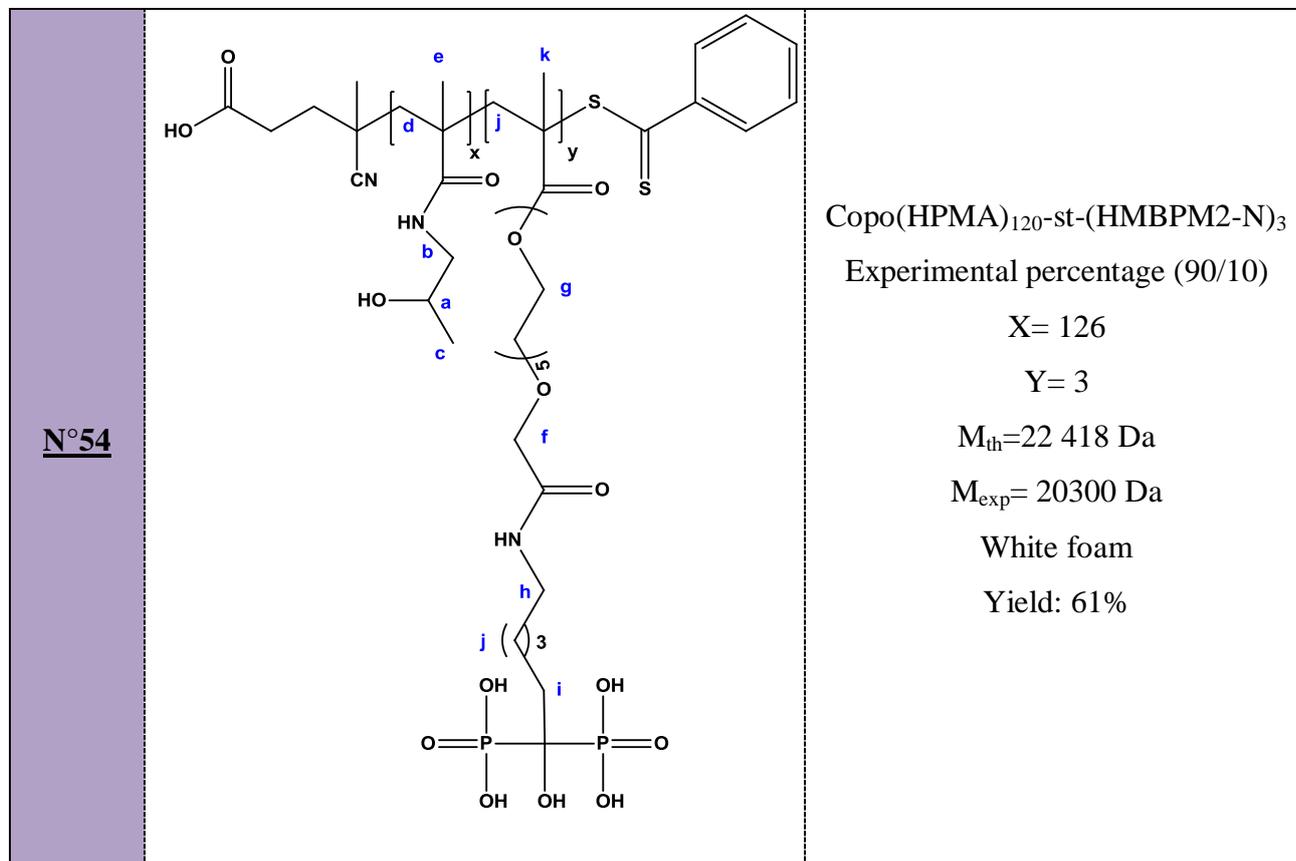
^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 3.78 (s, 1H, Ha), 3.43 - 2.75 (m, 4H, Hb, Hl), 2.04 - 1.52 (m, 9H, Hd, Hk, Hi, Hj), 1.50 - 1.31 (m, 4H, Hm), 1.29 - 0.63 (m, 8H, He, Hc, Hn).

➤ HPMA-s-HMBPM1-N (n =10) **53**



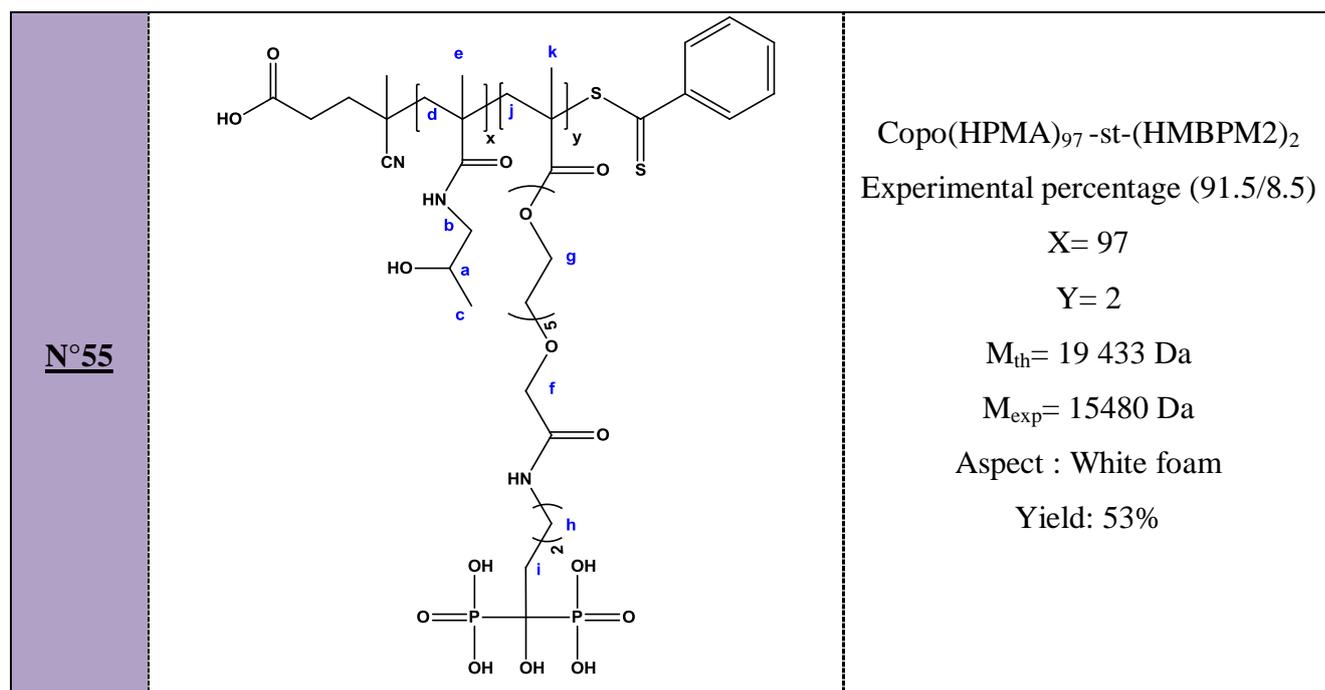
^{31}P NMR (162 MHz, D_2O) δ : 18.70

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ : 3.78 (s, 1H, Ha), 3.37 - 2.78 (m, 6H, Hb, Hl, Hj), 1.97 - 1.45 (m, 11H, Hd, Hk, Hp), 1.40 - 0.54 (m, 18H, He, Hc, Hm).

➤ HPMA-s-HMBPM2-N ($n^{\circ}=5$, $n=5$) **54**


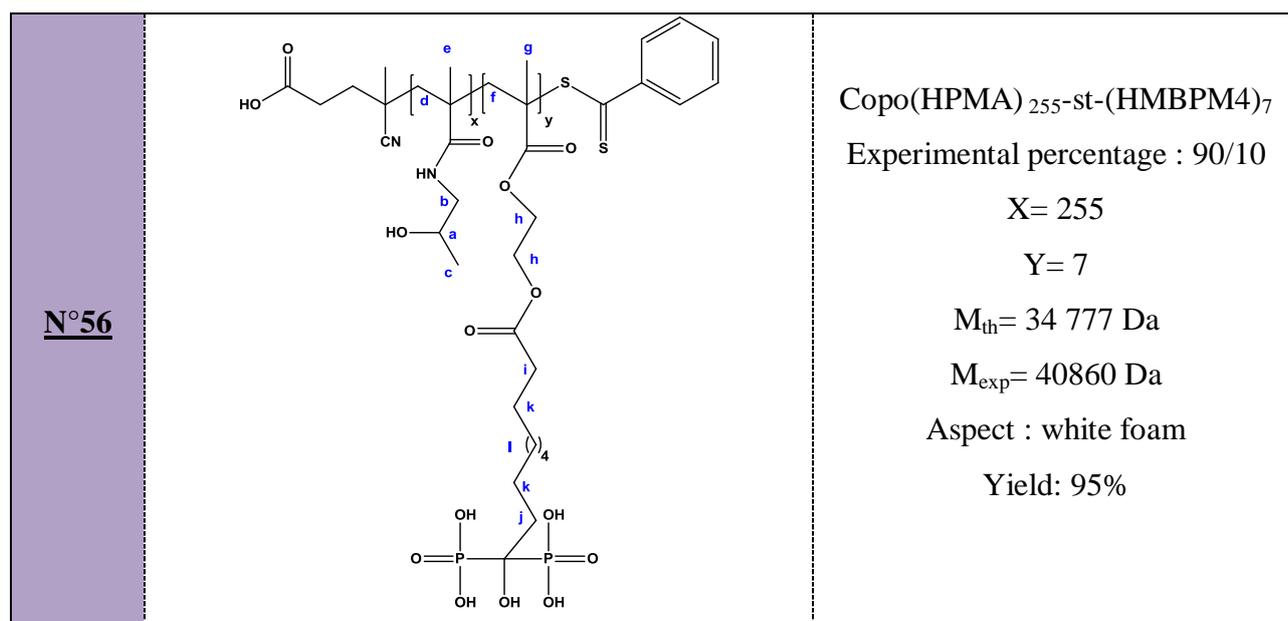
³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ: 15.7

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ : 4.52 - 4.32 (m, 2H, Hf), 4.21 - 4.13 (m, ³J_{H-H} = 8.3 Hz, 1H, Ha),
 4.06 - 3.80 (m, 20H, Hg), 3.42 - 3.31 (m, 4H, Hb, Hi), 1.96 (d, ³J_{H-H} = 21.5 Hz, 2H, Hd),
 1.84-1.79 (m, 5H, Hk, Hh), 1.61 - 1.54 (m, 6H, Hj), 1.30 (sl, 3H, He), 1.1(sl, 3H, Hc)

➤ HPMA-s-HMBPM2-N (n=3,n'=5) **55**


³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ: 15.63.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ: 4.48-4.28 (m, 2H, Hf), 3.86 (s, 1H, Ha), 3.74-3.69 (m, 20H, Hg), 3.07 (m, 4H, Hb, Hi), 2.06 - 1.49 (m, 7H, Hd, Hk, Hj), 1.48 - 0.70 (m, 10H, Hh, He, Hc).

 ➤ HPMA-st-HMBPM4(n=8) **56**


³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ : 18.79.

$^1\text{H NMR (400 MHz, D}_2\text{O)}$ δ : 3.85 (bs, 5H, Ha,Hh), 3.25-2.90 (m, 2H, Hb), 2.09 (t, $^3J_{H-H} = 7.0$ Hz, 2H, Hj), 2.02 - 1.58 (m, 6H, Hd, Hf, Hi), 1.58 - 1.33 (m, 7H, Hg, Hk), 1.30 - 0.67 (m, 14H, Hm, He, Hc).

VI.5. Biological Characterization

VI.5.1. Cell Lines and Cell Culture

Cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 50 U mL⁻¹ streptomycin (all obtained Invitrogen Inc.), at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Human A431 squamous cell carcinoma (vulvar epidermoid carcinoma), breast carcinoma (MDA-MB-231) and mouse melanoma (B16F10) cells were obtained from the American Type Culture Collection.

VI.5.2. Cell Viability Experiments

Cell viability was evaluated using the MTT microculture tetrazolium assay (Mosmann, 1983) based on the ability of mitochondrial enzymes to reduce 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, St. Louis, MO) into purple formazan crystals. Cells were seeded at a density of 5x10³, 20x10³ and 2.5x10³ cells/well for A431, MDA-MB-231, and B16F10 cells respectively. Cells were seeded in 96-well flat-bottom plates (Falcon, Strasbourg, France) and incubated in complete culture medium for 24h. Then, the medium was removed and replaced by 10% FCS-medium containing increasing concentrations of alendronate, CMD and CMD-alendronate varying from 0 to 25 μM . After 72h incubation for A431, MDA-MB-231 and B16F10 cells, the cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS, Life Technologies) and incubated with 0.1 mL of MTT (2 mg.mL⁻¹, Sigma-Aldrich) for an additional 4h at 37°C. The insoluble product was then dissolved by addition of 200 μL of DMSO (Sigma-Aldrich). The absorbance corresponding to the solubilized formazan pellet (which reflects the relative viable cell number) was measured at 570 nm using a Labsystems Multiskan MS microplate reader. Concentration-response curves were constructed, and IC₅₀ values (concentration of the compound inhibiting 50% of cell proliferation) were determined. All *in vitro* cell experiments (viability, migration, and invasion assays) were carried out at 37°C in a 5% CO₂ incubator.

VI.5.3. Cell Migration Assay

The influence of alendronate, CMD, CMD-alendronate on the migration of MDA-MB-231 cells was investigated using Boyden invasion chambers with 8 μm pore size filters coated with 100 μL of fibronectin (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and were allowed to stand overnight at 4°C. Then, 5×10^4 MDA-MB-231 untreated cells or 24h alendronate, CMD, CMD-alendronate (35 μM or 0,35 μM) pretreated MDA-MB-231 cells were added to each insert (upper chamber). A strong chemoattractant (10% FCS) for MDA-MB-231 cells was added to the lower chamber. After 24h incubation at 37°C in a 5% CO_2 incubator, non-migrated cells were removed by scraping and migrated cells were fixed in methanol and stained with hematoxylin. Cells migrating on the lower surface of the filter were counted in 10 fields using a Zeiss microscope. Results were expressed as a percentage, relative to controls normalized to 100%. Experiments were performed in triplicate.

VI.5.4. Cell Invasion Assay

Cell invasion experiments were performed with Boyden chambers as described above. The inserts were coated with Matrigel membrane matrix (Falcon, Becton Dickinson Labware, Bedford, MA). The 5×10^4 MDA-MB-231 cells were seeded in the upper well of the Boyden chamber, and 10% FCS was added to the lower chamber. Before seeding in the upper chamber, the cells were pretreated with alendronate, CMD, CMD-alendronate (35 μM or 0,35 μM). After 24h at 37°C in a 5% CO_2 incubator, non-invaded cells in the upper chamber were wiped with a cotton swab and the filters were fixed, stained, and counted. Results were expressed as a percentage, relative to controls normalized to 100%. Experiments were performed in triplicate.

VI.5.5. Xenografts in nude mice

MDA-MB-231 cells (2×10^6 cells) were inoculated subcutaneously ¹³³ 4-week-old athymic nude mice (nu/nu, Janvier, France, n = 40). Then, mice were arbitrarily placed in control (n=9) and in each bisphosphonate treated group (n=8). The administration of alendronate or CMD-alendronate (6 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and 0,6 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) started one week after cell inoculation when tumor sizes were 30 mm^3 . The control group received 0.1 mL of NaCl 0.9% solution. This solution, alendronate or CMD-alendronate were intravenously administered twice a week for four weeks. Tumor volume was measured once a week along to major axes using callipers.

Tumor volume (mm^3) was calculated as following: $V=4/3\pi R_1 R_2$ where $R_1 < R_2$. The animal protocol was in accordance with a french ethic committee (N° Ce5/2010/020).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Duncan, R.; Ringsdorf, H.; Satchi-Fainaro, R. *Adv.Polym.Sci.* **2006**, 192, 1.
- (2) Hoffman, A. S. *J.Controlled Release.* **2008**, 132, 153.
- (3) Pan, H.; Kopecek, J. *Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers.* **2008**, 81.
- (4) Feng, X. *Literature Seminar.* **2010**.
- (5) Stresing, V.; Daubin , F.; Benzaid, I.; Mönkkönen, H.; Clézardin, P. *Cancer Lett.* **2007**, 257, 16.
- (6) Shinoda, H.; Adamek, G.; Felix, R.; Fleisch, H.; Schenk, R.; Hagan, P. *Calcif.Tissue Int.* **1983**, 35, 87.
- (7) Wu, S.; Dahut, W. L.; Gully, J. L. *Acta Oncologica.* **2007**, 46, 581.
- (8) Senaratne, S. G.; Colston, K. W. *Breast Cancer Res.* **2002**, 4, 18.
- (9) Lee, M. V.; Fong, E. M.; Singer, F. R.; Guenette, R. S. *Cancer Res.* **2001**, 61, 2602.
- (10) Muller, S.; Migianu, E.; Lecouvey, M.; Kraemer, M.; Oudar, O. *Anti-cancer Res.* **2005**, 25, 2655.
- (11) Sonnemann, J.; Eckervogt, V.; Truckenbrod, B.; Boos, J.; Winkelmann, W.; van Valen, F. *Anticancer Drugs.* **2001**, 12, 459.
- (12) Shipman, C. M.; Croucher, P. L.; Russel, R. G. G.; Helfrich, M. H.; Rogers, M. J. *Cancer Res.* **1998**, 58, 5294.
- (13) Hama-Kourbali, Y.; Di Benedetto, M.; Ledoux, D.; Oudar, O.; Leroux, Y.; Lecouvey, M.; Kraemer, M. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **2003**, 310, 816.
- (14) Caraglia, M.; Marra, M.; Naviglio, S.; Botti, G.; Addeo, R.; Abbruzzese, A. *Expert Opin.Pharmacother.* **2010**, 11, 141.
- (15) Tanvetyanon, T. *Ann.Oncol.* **2006**, 17, 897.
- (16) Aapro, M.; Abrahamsson, P. A.; Body, J. J.; Coleman, R. E.; Colomer, R.; Costa, L.; Crino, L.; Dirix, L.; Gnant, M.; Gralow, J.; Hadji, P.; Hortobagyi, G. N.; Jonat, W.; Lipton, A.; Monnier, A.; Paterson, A. H. G.; Rizzoli, R.; Saad, F.; Th rlimann, B. *Ann.Oncol.* **2008**, 19, 420.
- (17) Drake, M. T.; Clarke, B. L.; Khosla, S. *Mayo.Clin.Proc.* **2008**, 83, 1032.
- (18) Onishi, H.; Machida, Y. *Molecules.* **2008**, 13, 2136.
- (19) Qiu, L. Y.; Bae, Y. H. *Pharmaceut.Res.* **2006**, 23, 1.
- (20) Gowda Kadajji, V.; Betageri, G. V. *Polymers.* **2011**, 3, 1972.
- (21) Engel, R. *Chem. Rev.* **1977**, 77, 349.
- (22) Wiemer, D. F. *Tetrahedron.* **1997**, 53, 16609.
- (23) Gardner, G.; Steffens, J. J.; Grayson, T. B.; Kleier, D. A. *J.Agr.Food Chem.* **1992**, 40, 318.
- (24) De Clercq, E. *Annu. Rev. Pharmacol.Toxicol.* **2011**, 51, 1.
- (25) De Clercq, E. *Clin.Microbiol.Rev.* **2003**, 16, 569.
- (26) Maruyama, H. B.; Aisawa, M.; Sawada, T. *Antimicrob. Agents Ch.* **1979**, 16, 444.
- (27) Hahn, F. E. *Naturwissenschaften.* **1981**, 68, 90.
- (28) Beltowski, J.; Wojcicka, G.; Jamroz-Wisniewska, A. *Curr.Drug Saf.* **2009**, 4, 209.
- (29) Burke, T. R.; Kole, H. K.; Roller, P. P. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **1994**, 204, 129.

- (30) Uise, T. A. *Cancer Treat.Rev.* **2008**, *34*, S19.
- (31) Martin, M. B.; J.S., G.; Lewis, J. C.; Heath, H. T.; B.N., B.; H., K.; Yardley, V.; Caldera, A.; Lira, R.; Urbina, J. A.; Moreno, S. N.; Docampo, R.; Croft, S. L.; Oldfield, E. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 909.
- (32) Yardley, V.; Khan, A. A.; Martin, M. B.; Slifer, T. R.; Araujo, F. G.; Moreno, S. N. *Intl. J. Antimicrob. Agents.* **2002**, *46*, 929.
- (33) Shipman, C.; Rogers, M.; Apperley, J.; Russell, R.; Croucher, P. *Br.J.Haematol.* **1997**, *98*, 665.
- (34) Kunzmann, V.; Bauer, E.; Feurle, J.; Weissinger, F.; Tony, H. P.; Wilhelm, M. *Blood.* **2000**, *96*, 384.
- (35) Sanders, J. M.; Ghosh, S.; Chan, J. M. W.; Meints, G.; Wang, H.; Raker, A. M.; Song, Y.; Colantino, A.; Burzynska, A.; Kafarski, P.; Morita, C. T.; Oldfield, E. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 375.
- (36) Von Baeyer, H.; Hofmann, K. A. *Ber.* **1897**, *30*, 1897.
- (37) Francis, M. D.; Russell, R. G.; Fleisch, H. *Science.* **1969**, *165*, 1264.
- (38) Fleisch, H.; Russell, R. G.; Francis, M. D. *Science.* **1969**, *165*, 1262.
- (39) Rogers, M. J.; Gordon, S.; Benford, H. L.; Coxon, F. P.; Luckman, S. P.; Monkkonen, J.; Frith, J. C. *Cancer.* **2000**, *88*, 2961.
- (40) Van Beek, E.; Pieterman, E.; Cohen, L.; Lowik, C.; Papapoulos, S. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **1999**, *255*, 491.
- (41) Body, J. J.; Bartl, R.; Burckhardt, P.; Delmas, P. D.; Diel, I. J.; Fleisch, H.; Kanis, J. A.; Kyle, R. A.; Mundy, G. R.; Paterson, A. H.; Rubens, R. D. *J.Clin.Oncol.* **1998**, *16*, 3890.
- (42) Bisaz, S.; Jung, A.; Fleisch, H. *Clin.Sci.Mol.Med.* **1978**, *54*, 265.
- (43) Fleisch, H. *Endocr.Rev.* **1998**, *19*, 80.
- (44) Eastell, R.; Devogelaer, J.; Peel, N.; Chines, A.; Bax, D.; Sacco-Gibson, N. *Osteoporos Int.* **2000**, *1*, 331
- (45) Heymann, D.; Ory, B.; Gouin, F.; Green, J. R.; Redini, F. *Trends Mol.Med.* **2004**, *10*, 337.
- (46) Clezardin, P. *Semin. Oncol.* **2002**, *29*, 33.
- (47) Green, J. R. *Cancer.* **2003**, *97*, 840.
- (48) Senhaji, O.; Derwich, E.; Skalli, M. K.; Benali, A. H.; Achchoubi, M.; Robin, J. J.; Filali-Baba, M.; Taouil, R. *M. J. Condensed Matter.* **2010**, *12*.
- (49) Brown, J. E.; Neville-Webbe, H.; Coleman, R. E. *Endocr.Relat.Cancer.* **2004**, *11*, 207.
- (50) Gnant, M.; Clézardin, P. *Cancer Treat.Rev.* **2012**, *38*, 407.
- (51) Fromigue, O.; Lagneaux, L.; Body, J. J. *J.Bone Miner.Res.* **2000**, *15*, 2211.
- (52) Yoneda, T.; Sasaki, A.; Dunstan, C.; Williams, P. J.; Bauss, F.; De Clerck, Y. *A. J. Clin. Invest.* **1997**, *99*, 2509.
- (53) Senaratne, S. G.; Pirianov, G.; Mansi, J. L.; Arnett, T. R.; Colston, K. W. *Br.J.Cancer.* **2000**, *82*, 1459.
- (54) Hiraga, T.; Williams, P. J.; Mundy, G. R.; Yoneda, T. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 4418.
- (55) Takagi, M.; Takahiashi, K.; Maruyama, T.; Kaneko, K.; Obinata, K.; Tadokoro, R.; Kastumata, K.; Miura, Y.; Fujita, H.; Tokita, A.; Ishimoto, K.; Yabuta, K. *Pediatr.Hematol.Oncol.* **1998**, *15*, 283.
- (56) Ogihara, H.; Saito, H.; Shin, B. C.; Terado, T.; Takenoshita, S.; Nagamachi, Y.; Inui, K.; Takata, K. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **1996**, *220*, 848.
- (57) Denoyelle, C.; Hong, L.; Vannier, J. P.; Soria, J.; Soria, C. *Br.J.Cancer.* **2003**, *88*, 1631.

- (58) Fisher, J. E.; Rogers, M. J.; Halasy, J. M.; Luckman, S. P.; Hughes, D. E.; Masarachia, P. J.; Wesolowski, G.; Russell, R. G.; Rodan, G. A.; Reszka, A. A. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **1999**, *96*, 133.
- (59) Frith, J. C.; Mönkkönen, J.; Auriola, S.; Mönkkönen, H.; Rogers, M. J. *Arthritis & Rheumatism.* **2001**, *44*, 2201.
- (60) Boissier, S.; Magnetto, S.; Frappart, L.; Cuzin, B.; Ebetino, F. H.; Delmas, P. D.; Clezardin, P. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 3890.
- (61) van der Pluijm, G.; Vloedgraven, H.; van Beek, E.; van der Wee-Pals, L.; Lowik, C.; Papapoulos, S. *J.Clin.Invest.* **1996**, *98*, 698.
- (62) Clezardin, P. *Prog.Urol.* **2003**, *13*, 28.
- (63) Bezzi, M.; Hasmim, M.; Bieler, G.; Dormond, O.; Ruegg, C. *J.Biol.Chem.* **2003**, *278*, 43603.
- (64) Boissier, S.; Ferreras, M.; Peyruchaud, O.; Magnetto, S.; Ebetino, F. E.; Colombel, M.; Delmas, P.; Delaissé, J.-M.; Clezardin, P. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2949.
- (65) Ichinose, K.; Tomiyama, N.; Nakashima, M.; Ohya, Y.; Ichikawa, M.; Ouchi, T.; Kanematsu, T. *Anticancer Drugs.* **2000**, *11*, 33.
- (66) Clézardin, P.; Benzaïd, I.; Croucher, P. *Bone.* **2011**, *49*, 66.
- (67) Fournier, P.; Boissier, S.; Filleur, S.; Guglielmi, J.; Cabon, F.; Colombel, M.; Clezardin, P. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 6538.
- (68) Wood, J.; Bonjean, K.; Ruetz, S.; Bellahcene, A.; Devy, L.; Foidart, J. M.; Castronovo, V.; Green, J. R. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *302*, 1055.
- (69) Santini, D.; Vincenzi, B.; Tonini, G.; Scarpa, S.; Baldi, A. *Clin.Cancer Res.* **2003**, *9*, 3215.
- (70) Sebbah-Louriki, M.; Colombo, B. M.; el Manouni, D.; Martin, A.; Salzmann, J. L.; Leroux, Y.; Perret, G. Y.; Crepin, M. *Anticancer Res.* **2002**, *22*, 3925.
- (71) Clézardin, P. *Bone.* **2011**, *48*, 71.
- (72) Pazianas, M.; Abrahamsen, B. *Bone.* **2011**, *49*, 103.
- (73) Lin, J. H. *Bone.* **1996**, *18*, 75.
- (74) Hoffman, A.; Stepensky, D.; Ezra, A.; Van Gelder, J. M.; Golomb, G. *Int.J.Pharm.* **2001**, *220*, 1.
- (75) Adami, S.; Zamberlan, N. *Drug Saf.* **1996**, *14*, 158.
- (76) Mondelo, N.; Parma, M. D.; Peluffo, V. A.; Zanchetta, J. R.; Piccinni, E.; Montuori, E. *Medicina.* **1997**, *57*, 17.
- (77) Suri, S.; Monkkonen, J.; Taskinen, M.; Pesonen, J.; Blank, M. A.; Phipps, R. J.; Rogers, M. J. *Bone.* **2001**, *29*, 336.
- (78) Fitton, A.; McTavish, D. *Drugs.* **1991**, *41*, 289.
- (79) Ezra, A.; Golomb, G. *Adv.Drug Deliver.Rev.* **2000**, *42*, 175.
- (80) Rizzoli, R.; Burlet, N.; Cahall, D.; Delmas, P.; Eriksen, E.; Felsenberg, D. *Bone.* **2008**, *42*, 841.
- (81) Cremers, S.; Papapoulos, S. *Bone.* **2011**, *49*, 42.
- (82) Jung, A.; Bisaz, S.; Bartholdi, P.; Fleisch, H. *Calcif.Tissue Res.* **1973**, *13*, 27.
- (83) Felix, R.; Guenther, H. L.; Fleisch, H. *Calcif.Tissue Int.* **1984**, *36*, 108.
- (84) Sato, M.; Grasser, W.; Endo, N.; Akins, R.; Simmons, H.; Thompson, D. D.; Golub, E.; Rodan, G. A. *J.Clin.Invest.* **1991**, *88*, 2095.
- (85) Rogers, M. J.; Xiong, X.; Ji, X.; Monkkonen, J.; Russell, R. G.; Williamson, M. P.; Ebetino, F. H.; Watts, D. J. *Pharmaceutical Res.* **1997**, *14*, 625.
- (86) Fleisch, H. *Medicina.* **1997**, *57*, 65.
- (87) Neves, M.; Gano, L.; Pereira, N.; Costa, M. C.; Costa, M. R.; Chandia, M.; Rosado, M.; Fausto, R. *J.Nucl.Med.Biol.* **2002**, *29*, 329.
- (88) Masarachia, P.; Weinreb, M.; Balena, R.; Rodan, G. A. *Bone.* **1996**, *19*, 281.

- (89) Ezra, A.; Hoffman, A.; Breuer, E.; Alferiev, I. S.; Monkkonen, J.; El Hanany-Rozen, N.; Weiss, G.; Stepensky, D.; Gati, I.; Cohen, H.; Tormalehto, S.; Amidon, G. L.; Golomb, G. *J.Med.Chem.* **2000**, *43*, 3641.
- (90) Janner, M.; Muhlbauer, R. C.; Fleisch, H. *Calcif.Tissue Int.* **1991**, *49*, 280.
- (91) Tsuji, A.; Tamai, I. *Biochem.Pharmacol.* **1989**, *38*, 1019.
- (92) Merino, M.; Peris-Ribera, J. E.; Torres-Molina, F.; Sanchez-Pico, A.; Garcia-Carbonell, M. C.; Casabo, V. G.; Martin-Villodre, A.; Pla-Delfina, J. M. *Biopharm.Drug Dispos.* **1989**, *10*, 279.
- (93) Munck, L. K. *Gut.* **1995**, *36*, 215.
- (94) Palacin, M.; Estevez, R.; Bertran, J.; Zorzano, A. *Physiol.Rev.* **1998**, *78*, 969.
- (95) Shepherd, E. J.; Lister, N.; Affleck, J. A.; Bronk, J. R.; Kellett, G. L.; Collier, I. D.; Bailey, P. D.; Boyd, C. A. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **2002**, *296*, 918.
- (96) Terada, T.; Sawada, K.; Saito, H.; Hashimoto, Y.; Inui, K. *Am.J.Physiol.* **1999**, *276*, G1435.
- (97) Hu, M.; Subramanian, P.; Mosberg, H. I.; Amidon, G. L. *Pharm.Res.* **1989**, *6*, 66.
- (98) Ganapathy, M. E.; Huang, W. W., H.; Ganapathy, V.; Leibach, F. H. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **1998**, *246*, 470.
- (99) Vepsalainen, J. J. *Curr.Med.Chem.* **2002**, *9*, 1201.
- (100) Raiman, J.; Niemi, R.; Vepsalainen, J.; Yrityis, K.; Jarvinen, T.; Monkkonen, J. *Int.J. Pharm.* **2001**, *213*, 135.
- (101) Bortolini, O.; Fantin, G.; Fogagnolo, M.; Rossetti, S.; Maiuolo, L.; Di Pompo, G.; Avnet, S.; Granchi, D. *Europ.J.Med.Chem.* **2012**, *52*, 221.
- (102) Monkkonen, H.; Tormalehto, S.; Asunmaa, K.; Niemi, R.; Auriola, S.; Vepsalainen, J.; Monkkonen, J. *Eur. J.Pharm.Sci.* **2003**, *19*, 23.
- (103) Niemi, R.; Turhanen, P.; Vepsäläinen, J.; Taipale, H.; Järvinen, T. *Eur. J.Pharm.Sci.* **2000**, *11*, 173.
- (104) Abdelkarim, M.; Guenin, E.; Sainte-Catherine, O.; Vintonenko, N.; Peyri, N.; Yves Perret, G.; Crepin, M.; Khatib, A.-M.; Lecouvey, M.; Di Benedetto, M. *Plos.One.* **2009**, *4*.
- (105) Giger, E.; Castagner, B.; Leroux, J. *J.Control Release.* **2013**, *167*, 175.
- (106) Lecouvey, M.; Leroux, Y. *Heteroatom Chem.* **2000**, *11*, 556.
- (107) Fernandes, F.; Souza Leite, R.; Mauro Lança, F. *Quim. Nova.* **2005**, *28*, 274.
- (108) Abdou, W. M.; Shaddy, A. A. *Arkivoc.* **2009**, *9*, 143.
- (109) Cade, J. A.; Gerrard, W. *J. Chem. Soc.* **1954**, 2030.
- (110) Prentice, J. B.; Quimby, O. T.; Grabenstetter, R. J.; D.A., N. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6119.
- (111) Kieczkowski, G. R.; Jobson, R. B.; Melillo, D. G.; Reinhold, D. F.; Grenda, V. J.; Shinkai, I. *J.Org.Chem.* **1995**, *60*, 8310.
- (112) Divvela, V. N.; Srinivasa, R.; Ramesh, D.; Garimella, K. A. S. S. N.; Racha, L.; Sivakumaran, M.; Naidu, A. *Synth.Commun.* **2007**, *37*, 4359.
- (113) Mustafa, D. A.; Kashemirov, B. A.; McKenna, C. E. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 2285.
- (114) Meziane, D.; Hardouin, J.; Elias, A.; Guénin, E.; Lecouvey, M. *Heteroatom Chem.* **2009**, *20*, 369.
- (115) Dhawan, B.; Redmore, D. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 4018.
- (116) Turhanen, P. A.; Ahlgren, M. J.; Jarvinen, T.; Vepsalainen, J. J. *Synthesis.* **2001**, *4*, 633
- (117) Lecouvey, M.; Mallard, I.; Bailly, T.; Burgada, R.; Leroux, Y. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8475.

- (118) Teixeira, F. C.; Antunes, I. F.; Curto, M. J. M. *Arkivoc.* **2009**, 9, 69.
- (119) Ghosh, S.; Chan, J. M. W.; Lea, C. R.; Meints, G. A.; Lewis, J. C.; Tovian, Z. S.; Flessner, R. M.; Loftus, T. C.; Bruchhaus, I.; Kendrick, H.; Croft, S. L.; Kemp, R. G.; Kobayashi, S.; Nozaki, T.; Oldfield, E. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 175.
- (120) Guénin, E.; Monteil, M.; Bouchemal, N.; Prangé, T.; Lecouvey, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 3380.
- (121) Egorov, M.; Aoun, S.; Padrines, M.; Redini, F.; Heymann, D.; Lebreton, J.; Mathé-Allainmat, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 7148.
- (122) Ferrari, M. *Nat. Rev. cancer.* **2005**, 5, 161.
- (123) Folkman, J.; Long, D. *J. Surg. Res.* **1964**, 4, 139.
- (124) Ringsdorf, H. *J. Polym. Sci. Symp.* **1975**, 51, 135.
- (125) Maeda, H.; Iwai, K.; Konno, T. *Cancer Res.* **1984**, 44, 2115.
- (126) Arun, K. I.; Greish, K.; Jun, F.; Hiroshi, M. *Drug. Disco. Today.* **2006**, 11, 812.
- (127) Maeda, H.; Bharate, G. Y.; Daruwalla, J. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, 71, 409.
- (128) Fang, J.; Nakamura, H.; Maeda, H. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2011**, 63, 136.
- (129) Hiroshi, M. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2001**, 46, 169.
- (130) Vicent, M. J.; Ringsdorf, H.; Duncan, R. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2009**, 61, 1117.
- (131) Solomon, R.; Gabizon, A. A. *Cl. Lymph. Myelom. Leuk.* **2008**, 8, 21.
- (132) Avila-Olias, M.; Pegoraro, C.; Battaglia, G.; Canton, I. *Ther. Deliv.* **2013**, 4, 27.
- (133) Stolnik, S.; Dunn, S. E.; Garnett, M. C.; Davies, M. C.; Combes, A. G. A.; Taylor, D. C.; Irving, M. P.; Purkiss, S. C.; Tadros, T. F.; Davis, S. S.; Illum, I. *Pharmaceut. Res.* **1994**, 11, 1800.
- (134) Veronese Francesco, M.; Harris Milton, J. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2008**, 60, 1.
- (135) Yu, D.; Peng, P.; Dharap, S. S.; Wang, Y.; Mehlig, M.; Chandna, P.; Zhao, H.; Filpula, D.; Yang, K.; Borowski, V.; Borchard, G.; Zhang, Z.; Minko, T. *J. Controlled Release.* **2005**, 110, 90.
- (136) Owens, D. E.; Peppas, N. A. *Int. J. Pharm.* **2006**, 307, 93.
- (137) Hong, R.-L.; Huang, C.-J.; Tseng, Y.-L. *Clin. Cancer Res.* **1999**, 5, 3645.
- (138) Gullotti, E.; Yeo, Y. *Mol. Pharm.* **2009**, 6, 1041.
- (139) Alexis, F.; Pridgen, E.; Molnar, L. K.; Farokhzad, O. C. *Mol. Pharmaceut.* **2008**, 5, 505.
- (140) Greenwald, R. B.; Choe, Y. H.; McGuire, J.; Conover, C. D. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2003**, 55, 217.
- (141) Choe, Y. H.; Conover, C. D.; Wu, D.; Royzen, M.; Greenwald, R. B. *J. Controlled Release.* **2002**, 79, 41.
- (142) Schiavon, O.; Pasut, G.; Moro, S.; Orsolini, P.; Guiotto, A.; Veronese, F. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, 39, 123.
- (143) Hoste, K.; De Winne, K.; Schacht, E. *Int. J. Pharm.* **2004**, 277, 119.
- (144) Ruoslahti, E.; Bhatia, S. N.; Sailor, M. J. *J. Cell Biol.* **2010**, 188, 759.
- (145) Oyewumi, M. O.; Yokel, R. A.; Jay, M.; Coakley, T.; Mumper, R. J. *J. Controlled Release.* **2004**, 95, 613.
- (146) Suzuki, R.; Takizawa, T.; Kuwata, Y.; Mutoh, M.; Ishiguro, N.; Utoguchi, N.; Shinohara, A.; Eriguchi, M.; Yanagie, H.; Maruyama, K. *Int. J. Pharm.* **2008**, 346, 143.
- (147) Nicolas, J.; Mura, S.; Brambilla, D.; Mackiewicz, N.; Couvreur, P. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 1147.
- (148) Diab, R. *Université Claude Bernard-Lyon 1.* **2009**.
- (149) Hillerdal, G.; Riska, H. *J. Thorac. Oncol.* **2008**, 3, 1325.
- (150) Redziniak, G. *Pathol. Biol.* **2003**, 51, 279.

- (151) De Kroon, A. I. P. M.; Heger, M.; Salles, I. I.; Deckmyn, H. *Microvascular Res.* **2009**, *78*, 1.
- (152) Soo In, K.; Duckhyang, S.; Hyeon, L.; Byung-Yoon, A.; Yeup, Y.; Meehyein, K. *J.Hepatol.* **2009**, *50*, 479.
- (153) Immordino, M. L.; Brusa, P.; Arpicco, S.; Stella, B.; Dosio, F.; Cattel, L. *J.Controlled Release.* **2003**, *91*, 417.
- (154) Júnior, Á. D. C.; Mota, L. G.; Nunan, E. A.; Wainstein, A. J. A.; Wainstein, A. P. D. L.; Leal, A. S.; Cardoso, V. N.; De Oliveira, M. C. *Life Sciences.* **2007**, *80*, 659.
- (155) Carvalho Júnior, A. D.; Vieira, F. P.; De Melo, V. J.; Lopes, M. T. P.; Silveira, J. N.; Ramaldes, G. A.; Garnier-Suillerot A.; Pereira-Maia, E. C.; De Oliveira, M. C. *Braz.J.Med.Biol.Res.* **2007**, *40*, 1149.
- (156) Allen, T.; Cheng, W.; Hare, J.; Laginha, K. *Anticancer.Agents.Med.Chem.* **2006**, *6*, 513.
- (157) Kedar, U.; Phutane, P.; Shidhaye, S.; Kadam, V. *Nanomedicine.* **2010**, *6*, 714.
- (158) Nishiyama, N.; Okazaki, S.; Cabral, H.; Miyamoto, M.; Kato, Y.; Sugiyama, Y.; Nishio, K.; Matsumura, Y.; Kataoka, K. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 8977.
- (159) Kim, D.-W.; Kim, S.-Y.; Kim, H.-K.; Kim, S.-W.; Shin, S. W.; Kim, J. S.; Park, K.; Lee, M. Y.; Heo, D. S. *Ann.Oncol.* **2007**, *18*, 2009.
- (160) Letchford, K.; Burt, H. *Europ.J.Pharm.Biopharm.* **2007**, *65*, 259.
- (161) Cheng, Y.; Samia, A. C.; Meyers, J. D.; Panagopoulos, I.; Fei, B.; Burda, C. *J.Am.Chem.Soc.* **2008**, *32*, 10643.
- (162) MacDiarmid, J.; Mugridge, N. B.; Weiss, J. C.; Phillips, L.; Burn, A. L.; Paulin, R. P.; Haasdyk, J. E.; Dickson, K.-A.; Brahmabhatt, V. N.; Pattison, S. T.; James, A. C.; Al Bakri, G.; Straw, R. C.; Stillman, B.; Graham, R. M.; Brahmabhatt, H. *Cancer Cell.* **2007**, *11*, 431.
- (163) Alexis, F.; Pridgen, E. M.; Langer, R.; Farokhzad, O. C. *Handbook of Experimental Pharmacology.* **2010**, *197*, 56.
- (164) Couvreur, P.; Kanté, B.; Roland, M.; Guiot, P.; Baudhuin, P.; Speiser, P. J. *Pharm. Pharmacol.* **1979**, *31*, 331.
- (165) Bhattacharyya, S.; Kudgus, R. A.; Bhattacharya, R.; Mukherjee, P. *Pharmaceutical Res.* **2011**, *28*, 237.
- (166) Tahara, K.; Sakai, T.; Yamamoto, H.; Takeuchi, H.; Kawashima, Y. *Int. J. Pharm.* **2008**, *354*, 210.
- (167) Li, L.; Wartchow, C.; Danthi, S.; Shen, Z.; Dechene, N.; Pease, J.; Choi, H.; Doede, T.; Chu, P.; Ning, S.; Lee, D.; Bednarski, M.; Knox, S. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* **2004**, *58*, 1215.
- (168) Wust, P.; Gneveckow, U.; Johannsen, M.; Böhmer, D.; Henkel, T.; Kahmann, F.; Sehouli, J.; Felix, R.; Rieke, J.; Jordan, A. *Int.J.Hyperthermia.* **2006**, *22*, 673.
- (169) Chatterjee, D.; Fong, L.; Zhang, Y. *Adv.Drug Deliv.Rev.* **2008**, *60*, 1627.
- (170) Lecouvey, M.; Leroux, Y.; Kraemer, M.; Crépin, M.; El Manouni, D.; Louriki, M. *Chem. Abstr.* **2003**, *138*, 122736.
- (171) Monteil, M.; Guenin, E.; Migianu, E.; Lutomski, D.; Lecouvey, M. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *61*, 7528.
- (172) Migianu, E.; Guenin, E.; Lecouvey, M. *Synlett.* **2005**, *3*, 425.
- (173) Chebbi, I. *Thèse Université de pierre marie currie.* **2009**.
- (174) Chebbi, I.; Migianu-Griffoni, E.; Sainte-Catherine, O.; Lecouvey, M.; Seksek, O. *Int.J. Pharm.* **2010**, *383*, 116.
- (175) Benyettou, F.; Lalatonne, Y.; Sainte-Catherine, O.; Monteil, M.; Motte, L. *Int.J. Pharm.* **2009**, *379*, 324.

- (176) Benyettou, F.; Lalatonne, Y.; Chebbi, I.; Di Benedetto, M.; Serfaty, J.-M.; Lecouvey, M.; Motte, L. *Phys.Chem.Chem.Phys* **2011**, *13*, 10020.
- (177) Dang, W.; Colvin, O. M.; Brem, H.; Saltzman, W. M. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 1729.
- (178) York, A. W.; Kirkland, S. E.; McCormick, C. L. *Adv.Drug Deliver.Rev.* **2008**, *60*, 1018.
- (179) Guetta, O.; Mazeau, K.; Auzely, R.; Milas, M.; Rinaudo, M. *Biomacromolecules.* **2003**, *4*, 1362.
- (180) Rinaudo, M. *Polym .Int.* **2008**, *57*, 397.
- (181) Heux, L.; Brugnerotto, J.; Desbrieres, J.; Versali, M.-F.; Rinaudo, M. *Biomacromolecules.* **2000**, *1*, 746.
- (182) Huguet, M. L.; Dellacherie, E. *Process.Biochem.* **1996**, *31*, 745.
- (183) de Belder, A. N. *Handbooks from Amersham Biosciences.* **2003**, 1.
- (184) Schoeler, B.; Delorme, N.; Doench, I.; Sukhorukov, G. B.; Fery, A.; Glinel, K. *Biomacromolecules.* **2006**, *7*, 2065.
- (185) Persin, Z.; Stana-Kleinschek, K.; Foster, T. J.; Van Dam, J. E. G.; Boeriu, C. G.; Navard, P. *Carbohydr.Polym.* **2011**, *84*, 22.
- (186) Zhanga, L.-M. *Macromol. Mater.Eng.* **2001**, 286, 267.
- (187) Millqvist-Fureby, A. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* **2003**, *31*, 65.
- (188) Moh Cairul Iqbal, M. A.; Gumah Abadi, A.; Naveed, A.; Katas, H.; JAzdina, a. *Sains Malaysiana.* **2012**, *41*, 561.
- (189) Majeti, N. V.; Kumar, R. *React. Funct. Polym.* **2000**, *46*, 1.
- (190) Miwa, a.; Ishibe, a.; Nakano, m. *Pharmaceut.Res.* **1998**, *15*, 1844.
- (191) Anekant, J.; Yashwant, G.; Sanjay, K. J. *J.Pharm.Pharmaceut.Sci.* **2007**, *10*, 86.
- (192) Vipin, B.; Pramod Kumar, S.; Nitin, S.; Om Prakash, P.; Rishabha, M. *Adv.Biol.Res.* **2011**, *5*, 28.
- (193) Bruneel, D.; Schacht, E. *Polymer.* **1993**, *34* 2633.
- (194) Bruneel, D.; Schacht, E. *Polymer.* **1994**, *35*, 2656.
- (195) Bataille, I.; Meddahi-Pellé, A.; Le Visage, C.; Letourneur, D.; Chaubet, F. In "Polysaccharides in medicinal and pharmaceutical applications"; V. Popa, Ed.; Smithers: 2011; Vol. 145-82.
- (196) Lu, D.-x.; Wen, X.-t.; Liang, J.; Zhang, X.-d.; Gu, Z.-w.; Fan, Y.-j. *Chinese.J.Polym.Sci.* **2008**, *26*, 369–374.
- (197) Xin, D.; Wang, Y.; Xiang, J. *Pharmaceut.Res.* **2010**, *27*, 380.
- (198) Dhaneshwar, S. S.; Kandpal, M.; Gairola, N.; Kadam, S. S. *Indian.J.Pharm.Sci.* **2006**, *68*, 705.
- (199) Hermant, N. J. *Pharmaceutical technol.* **1988**, 7.
- (200) Behravan, J.; Bazzaz, B. S. F.; Salimi, Z. *Biotechnol.Appl.Biochem.* **2003**, *38*, 267.
- (201) Ul-Qader, S. A.; Iqbal, L.; Afroz Rizvi, H.; Zuberi, R. *Biotechnol.Appl.Biochem.* **2001**, *34*, 93.
- (202) Hirataa, Y.; Sanob, Y.; Aokia, M.; Shohjia, H.; Katohc, S.; Abed, J.-i.; Hitsukurid, S.; Yamamoto, H. *Carbohydr.Polym.* **2003**, *53*, 331.
- (203) Vega, C.; Kim, E.-H.-J.; Chen, X. D.; Roos, Y. o. H. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* **2005**, *45*, 66.
- (204) Baldwin, A. D.; Kiick, K. L. *Biopolymers (Peptide Science).* **2010**, *94*, 128.
- (205) Khalikova, E.; Susi, P.; Korpela, T. *Microbiol.Mol. Biol.Rev.* **2005**, *69*, 306.
- (206) Varshosaz, J. *Expert.Opin.Drug Deliv.* **2012**, *9*, 509.
- (207) Mehvar, R. *J.Contr.Rel.* **2000**, *69*, 1.

- (208) Vandamme, T.; Ienourry, A.; Charrueau, C.; Chaumeil, J.-C. *Carbohydr.Polym.* **2002**, *48*, 219.
- (209) Beesh, M.; Majewska, P.; Vandamme, T. F. *Int.J.Drug Deliv.* **2010**, *2*, 22.
- (210) Lu, M.; Johansson, G.; Albertsson, P.; Tjernel, F. *Bioseparation.* **1995**, *5*, 351.
- (211) Rotureau, E.; Chassenieux, C.; Durand, A.; Dellacherie, E. *Macromol. Chem. rev.* **2005**, *206*, 2038.
- (212) Bauer, K. H.; Reinhart, T.; Stenz, R. *Macromolecules.* **1997**, *120*, 39.
- (213) Ramirez, J. C.; Sanchez-Chaves, M.; Arranz, F. *Angew. Makromol.Chem.* **1993**, *206*, 77.
- (214) Nichifor, M.; Carpov, A. *Eur.Polym.J.* **1999**, *35*, 2125.
- (215) Hidetoshi, T.; Kimitoshi, Y.; Kenji, M.; Kazuhisa, E. *Japan Kokai Tokkyo Koho.* **1998**, 1.
- (216) Liebert, T.; Hornig, S.; Hesse, S.; Heinze, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10484.
- (217) Rodrigues, P. C. A.; Beyer, U.; Schumacher, P.; Roth, T.; Fiebig, H. H.; Unger, C.; Messori, L.; Orioli, P.; Paper, D. H.; Ihaupt, R. M.; Kratz, F. *Bioorgan. Med.Chem.* **1999**, *7*, 2517.
- (218) Coessens, V.; Schacht, E.; Domurado, D. *J.Controlled Release.* **1996**, *38* 141.
- (219) Nomura, T.; Saikawa, A.; Morita, S.; Sakaeda, T.; Yamashitaa, F.; Hondab, K.; Takakuraa, Y.; Hashidaa, M. *J.Controlled Release.* **1998**, *52*, 239.
- (220) Chaubet, F.; Champion, J.; Maiga, O.; Mauray, S.; Jozefonvicz, J. *Carbohydr.Polym.* **1995**, *28*, 145.
- (221) Nakajima, N.; Ikada, Y. *Bioconjug. Chem.* **1995**, *6*, 123.
- (222) Mongerard-Coulanges, M.; Migianu-Griffoni, E.; Lecouvey, M.; Jolles, B. *Biochem.Pharmacol.* **2009**, *77*, 1580.
- (223) Hashimoto, K.; Morishige, K.-I.; Sawada, K.; Tahara, M.; Kawagishi, R.; Ikebuchi, Y.; Sakata, M.; Tasaka, K.; Murata, Y. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 540.
- (224) Haag, R.; Kratz, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1198
- (225) Duncan, R. *Nat.Rev.Cancer.* **2006**, *6*, 688.
- (226) Duncan, R. *Nat.Rev.Drug.Discov.* **2003**, *2*, 347.
- (227) Duncan, R. *Curr.Opin.Biotech.* **2011**, *22*, 492.
- (228) Pignatello, R.; Sarpietro, M. G.; Castelli, F. *J. Funct. Biomater.* **2012**, *3*, 79.
- (229) Long, K. A.; Jackson, J. K.; Yang, C.; Chehroudi, B.; Brunette, D. M.; Burt, H. M. *J. Biomat. Sci.* **2009**, *20*, 653.
- (230) Wang, D.; Miller, S.; Sima, M.; Kopeckova, P.; Kopecek, J. *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14*, 853.
- (231) Miller, K.; Erez, R.; Segal, E.; Shabat, D.; Satchi-Fainaro, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2949
- (232) Sundell, M. J.; Ekman, K. B.; Svarfvar, B. L.; Nasman, J. H. *React. Polym.* **1995**, *25*, 1.
- (233) Alferiev, I. S.; Vyavahare, N. R.; Song, C. X. X.; Levy, R. J. *J.Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2001**, *39*, 105.
- (234) Fishbein, I.; Alferiev, I. S.; Nyanguile, O.; Gaster, R.; Vohs, J. M.; Wong, G. S.; Felderman, H.; Chen, I. W.; Choi, H.; Wilensky, R. L.; Levy, R. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 159.
- (235) Renner, C.; Piehler, J.; Schrader, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 620.
- (236) Chougrani, K.; Boutevin, B.; David, G.; Boutevin, G. *Eur.Polym.J.* **2008**, *44*, 1771.
- (237) Chougrani, K.; Boutevin, B.; Dacid, G.; Seabrook, S.; Loubat, C. *J. Pol. Sci. Part. : A Polym. Chem.* **2008**, *46*, 7972.

- (238) Chougrani, K.; Niel, G.; Boutevin, B.; David, G. *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 364.
- (239) Degenhardt, C. R.; Burdsall, D. C. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3488.
- (240) Akgun, B.; Avci, D. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2012**, *50*, 4854.
- (241) Catel, Y.; Degrange, M.; Pluart, L.; Le Madec, P.-J.; Pham, T.-N.; Chen, F.; Cook, W. D. *J. Pol. Sci. Part.A Polym. Chem.* **2009**, *47*, 5258.
- (242) Bala, J. L. F.; Kashemirov, B. A.; McKenna, C. E. *Synth. Commun.* **2010**, *40*, 3577.
- (243) Wang, L.; Zhang, M.; Yanga, Z.; Xu, B. *Chem. Commun.* **2006**, 2795, 2795.
- (244) Gluz, E.; Mizrahi, D. M.; Margel, S. *Polymer.* **2013**, *54*, 565.
- (245) Bayryamov, S. *НАУЧНИ ТРУДОВЕ НА РУСЕНСКИЯ УНИВЕРСИТЕТ.* **2010**, *49*, 20.
- (246) Hunsen, M. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 1651.
- (247) Cristau, H.-J.; Hervé, A.; Loiseau, F.; Virieux, D. *Synthesis.* **2003**, *14*, 2216.
- (248) Smet, M.; Dehaen, W. *Molecules.* **2000**, *5*, 620.
- (249) Shirude, P. S.; Kumar, V. A.; Ganesh, K. N. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 5207.
- (250) Liu, J. N.; Duong, H. E.; Whittaker, M. R.; Davis, T. P.; Boyer, C. *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33*, 760–766.
- (251) Williams, C. C.; Thang, S. H.; Hantke, T.; Vogel, U.; Seeberger, P. H.; Tsanaksidis, J.; Lepenies, B. *Chem.Med.Chem.* **2012**, *7*, 281–291.
- (252) Vicent, M.; Duncan, R. *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 39.
- (253) Ulbrich, K.; Etrych, T.; Chytil, P.; Jelínková, M.; Říhová, B. *J. Controlled Release.* **2003**, *87*, 33.
- (254) Zhou, Y.; Yang, J.; Kopeček, J. *Biomaterials.* **2012**, *33*, 1863.
- (255) Xiang, Q.; Yang, Y.; Zhou, Z.; Zhou, D.; Jin, Y.; Zhang, Z.; Huang, Y. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, *80*, 379.
- (256) Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Polymer.* **2008**, *49*, 1079–1131.
- (257) Braunecker, W. A.; Matyjaszewski, K. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 93–146.
- (258) Kopeček, J.; Kopečková, P. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2010**, *62*, 122.
- (259) Vasey, P.; Twelves, C.; Kaye, S.; Wilson, P.; Morrison, R.; Duncan, R.; Thomson, A.; Hilditch, T.; Murray, T.; Burtles, S.; Cassidy, J. *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 83.
- (260) Meerum, J.; Terwogt, W.; Huinink, B.; Schellens, J.; Schot, M.; Mandjes, I.; Zurl, M.; Rocchetti, M.; Rosing, H.; Koopman, F.; Beijnen, J. *Anti-Cancer Drugs.* **2001**, *12*, 315.
- (261) Kopeček, J.; Kopečková, P. *Drug Deliver. Oncol.* **2012**, *2*, 485.
- (262) Ulbrich, K.; Šubr, V.; Strohalm, J.; Plocova, D.; Jelinkova, M.; Rihova, B. *J. Controlled Release.* **2000**, *64*, 63.
- (263) Scales, C. W.; Vasilieva, Y. A.; Convertine, A. J.; Lowe, A. B.; McCormick, C. L. *Biomacromolecules.* **2005**, *6*, 1846.
- (264) Lammers, T.; Hennink, W.; Storm, G. *Br. J. Cancer.* **2008**, *99*, 392
- (265) Lin, X.; Zhang, Q.; Rice, J. R.; Stewart, D. R.; Nowotnik, D. P.; Howell, S. B. *Eur. J. Cancer.* **2004**, *40*, 291.
- (266) Shoemaker, N. E.; van Kesteren, C.; Rosing, H.; Jansen, S.; Swart, M.; Lieverst, J.; Fraier, D.; Breda, M.; C. Pellizzoni; Spinelli, R.; Grazia Porro, M.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M.; ten Bokkel Huinink, W. W. *Br. J. Cancer.* **2002**, *87*, 608.
- (267) Lammers, T.; Kühnlein, R.; Kissel, M.; Subr, V.; Etrych, T.; Pola, R.; Pechar, M.; Ulbrich, K.; Storm, G.; Huber, P.; Peschke, P. *J. Controlled Release.* **2005**, *110*, 103.
- (268) Ulbrich, K.; Vladimír, Š. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 150.
- (269) Yang, J.; Luo, K.; Pan, H.; Kopečková, P.; Kopeček, J. *React. Funct. Polym.* **2011**, *71*, 294.

- (270) Pan, H.; Yang, J.; Kopečková, P.; Kopeček, J. *Biomacromolecules*. **2011**, *12*, 247.
- (271) Ouchi, M.; Terashima, T.; Sawamoto, M. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4963–5050.
- (272) Chiefari, J.; Chong, Y. K. B.; Ercole, F.; Krstina, J.; Jeffery, J.; Le, T. P. T.; Mayadunne, R. T. A.; Meijs, G. F.; Moad, C. L.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Macromolecules*. **1998**, *31*, 5559.
- (273) Alan F. Tominey, J. L., Sun Wei, Klaus Kowski; Kraft, T. S. a. A. *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, 1.
- (274) Loo, C.; Lowery, A.; Halas, N.; West, e.; Drezek, R. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 709.
- (275) Boyer, C.; Bulmus, V.; Davis, T. P.; Ladmiral, V.; Liu, J.; Perrier, S. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5402.
- (276) Mitsukami, Y.; Donovan, M. S.; Lowe, A. B.; McCormick, C. L. *Macromolecules*. **2001**, *34*, 2248.
- (277) Donovan, M. S.; Sanford, T. A.; Lowe, A. B.; Sumerlin, B. S.; Mitsukami, Y.; McCormick, C. L. *Macromolecules*. **2002**, *35*, 4570.
- (278) Sumerlin, B. S.; Donovan, M. S.; Mitsukami, Y.; Lowe, A. B.; McCormick, C. L. *Macromolecules*. **2001**, *34*, 6561.
- (279) Ganachaud, F.; Monteiro, M. J.; Gilbert, R. G.; Dourges, M.-A.; Thang, S. H.; Rizzardo, E. *Macromolecules* **2000**, *33*, 6738.
- (280) Mishra, V.; Kumar, R. *J.Sci.Res.* **2012**, *56.*, 141.
- (281) Venkatesh, R. *Thesis of the Netherlands University*. **2004**.
- (282) Roshan T. A. Mayadunne, E. R.; John Chiefari, J. K., Graeme Moad,; Almar Postma, S. H. T. *Macromolecules*. **2000**, *33*, 243.
- (283) Hong, C.-Y.; Pan, C.-Y. *Macromolecules*. **2006**, *39*, 3517.
- (284) Yanjarappa, M. J.; Gujraty, K. V.; Joshi, A.; Saraph, A.; Kane, R. *Biomacromolecules*. **2006**, *7*, 1665.
- (285) Subr , V.; Kostka , L.; Strohalm , J.; Etrych , T.; Ulbrich, K. *Macromolecules*. **2013**, *46*, 2100.
- (286) Zhang, R.; Luo, K.; Yang , J.; Sima , M.; Sun, Y.; Janát-Amsbury, M. M.; Kopeček, J. i. *J.Controlled Release*. **2013**, *166*, 66.
- (287) Pan, H.; Sima, M.; Yang, J.; Kopeček, J. *Macromol. Biosci.* **2013**, *13*, 155.
- (288) Huang, J.; Pintauer, T.; Matyjaszewski, K. *J. Polym. Sci. Part A Polym Chem.* **2004**, *42*, 3285.
- (289) Vasilieva, Y. A.; Thomas, D. B.; Scales, C. W.; McCormick, C. L. *Macromolecules*. **2004**, *37*, 2728.
- (290) Lai, J. T.; Filla, D.; Shea, R. *Macromolecules*. **2002**, *35*, 6754.
- (291) Zehm, D.; Ratcliffe, L. P. D.; Armes, S. P. *Macromolecules*. **2013**, *46*, 128.
- (292) Raula, J.; Shan, J.; Nuopponen, M.; Niskanen, A.; Jiang, H.; Kauppinen, E. I.; Tenhu, H. *Langmuir*. **2003**, *19*, 3499.
- (293) Becke, F.; Hagen, H.; Badische, A.; Soda, F. *Chem.Abstr.* **1969**, *70*, 322.
- (294) Vega-Rios, A.; Licea-Claverie, A. *J. Mex. Chem. Soc.* **2011**, *55*, 21.
- (295) Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Polym. Int.* **2011**, *60*, 9.
- (296) Burgada, R.; Bailly, T.; Noel, J. P.; Gomis, J. M.; Valleix, A.; Ansoborlo, E.; Hengé-Napoli, M. H.; Paquet, F.; Gourmelon, P. *J.Labelled.Comp.Rad.* **2001**, *44*, 13.
- (297) Lecouvey, M.; Dufau, C.; El Manouni, D.; Leroux, Y. *Nucleos.Nucleot.* **1999**, *18*.

VECTORISATION D'ANTITUMORAUX PHOSPHORES GREFFES SUR DIFFERENTES PLATEFORMES POLYMERES : CONCEPTION, SYNTHESE ET EVALUATION BIOLOGIQUE.**Résumé**

De nos jours, l'une des avancées majeures dans l'administration de médicaments est leur conjugaison à des plateformes polymères. Ce travail est donc focalisé sur la vectorisation d'antitumoraux phosphorés greffés sur deux plateformes polymères naturelle ou synthétique. La conception, la synthèse et l'évaluation biologique de ces conjugués ont été étudiées. Nous avons alors vectorisé des bisphosphonates en les conjuguant à un support macromoléculaire polymère inerte naturel : le dextrane ou synthétique : copolymères HPMA afin de changer leur cible naturelle qui est l'os. Pour les conjugués naturels biodégradables, nous avons synthétisé deux systèmes CMD-BP, caractérisés et évalués biologiquement *in vitro* et *in vivo*. Par ailleurs, pour les conjugués synthétiques, nous avons développés différentes familles de comonomères méthacryliques bioactifs avec des longueurs de chaîne variées ainsi que des espaceurs de nature chimique différente entre le groupement méthacrylate et le bisphosphonate. Nous avons par la suite copolymérisé ces monomères originaux avec le HPMA utilisant la RAFT, technique qui nous a permis d'obtenir des copolymères portant le BP avec une distribution étroite et une masse moléculaire contrôlée.

VECTORIZATION OF PHOSPHORUS ANTITUMOR AGENT BY GRAFTING ON DIFFERENT POLYMERIC PLATFORMS: DESIGN, SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION.**Abstract:**

Nowadays, one of the major advances in drug delivery systems is their conjugation to polymeric platforms. This work is focused on the vectorization of the phosphorus antitumor agent by their grafting into natural or synthetic polymeric platforms. The design, synthesis and biological evaluation of these conjugates were studied. We have then vectorized the bisphosphonates by using inert polymeric macromolecular carrier either natural: dextran or synthetic HPMA copolymers in order to change their natural target which is bone. For the biodegradable natural conjugate, we have synthesized two CMD-BP systems, which are characterized and evaluated biologically *in vitro* and *in vivo*. Moreover, for the synthetic conjugates, we developed different families of bioactive methacrylic comonomers bearing bisphosphonates which have different chain length and linkers with various chemical nature between the methacrylate group and bisphosphonate. Afterwards, the original monomers were copolymerized with HPMA using the RAFT polymerization; this allowed to obtain copolymers bearing BP with a narrow size distribution and controlled molecular weight.

Mots clés : Bisphosphonates, monomères méthacryliques bisphosphonates, vectorisation, polymères conjugués, RAFT.