



HAL
open science

Auto-assemblages biofonctionnels à base de conjugués polymère-b-peptide

Charlotte Drappier

► **To cite this version:**

Charlotte Drappier. Auto-assemblages biofonctionnels à base de conjugués polymère-b-peptide. Autre. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2013. Français. NNT : 2013BOR14896 . tel-00951878

HAL Id: tel-00951878

<https://theses.hal.science/tel-00951878>

Submitted on 25 Feb 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par **Charlotte DRAPPIER**

pour obtenir le grade de

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : POLYMERES

AUTO-ASSEMBLAGES BIOFONCTIONNELS A BASE DE CONJUGUES POLYMERES -*b*-PEPTIDE

Directeur de recherche : Sébastien Lecommandoux

Co-directeur de recherche: Elisabeth Garanger

Soutenue le : 22 Novembre 2013

Devant la commission d'examen formée de :

M. J.F. LUTZ,	Directeur de recherche, CNRS, Université de Strasbourg	Rapporteur
M. E. VIVES,	Maitre de conférences, Université de Montpellier 2	Rapporteur
M. J.F. GOHY,	Professeur, Université Catholique de Louvain	Examinateur
M. H. CRAMAIL,	Professeur, Université de Bordeaux	Examinateur
Mme E. GARANGER	Chargée de recherche, CNRS, Université de Bordeaux	Examinateur
M. S. LECOMMANDOUX	Professeur, Institut Polytechnique de Bordeaux	Examinateur

TITRE EN ANGLAIS

BIOFUNCTIONAL SELF-ASSEMBLIES FROM POLYMER-*b*-PEPTIDE CONJUGATES

Cette thèse a été rédigée en utilisant, pour chaque chapitre, le format habituellement adopté dans les articles scientifiques paraissant dans des revues à comité de lecture. L'indulgence du lecteur est ainsi sollicitée pour les répétitions et redites nécessairement inhérentes à la forme de rédaction choisie.

A mes parents
Philippe & Evelyne

« Il n'y a pas de problème, il n'y a que des solutions »

André Gide

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques (LCPO) et à l'Institut Européen de Chimie et de Biologie (IECB) et financé par une bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Je remercie tout d'abord le Prof. Henri Cramail, directeur du LCPO, pour m'avoir acceptée et accueillie dans son laboratoire afin de réaliser cette étude mais aussi pour l'attention particulière qu'il porte aux doctorants et à leurs bonnes conditions de travail.

Je souhaite ensuite exprimer toute ma reconnaissance au Dr. Elisabeth Garanger et au Prof. Sébastien Lecommandoux pour m'avoir accordé leur confiance en me confiant ce projet de thèse et pour la manière exemplaire dont ils m'ont dirigée et encadrée.

Merci infiniment Elisabeth pour m'avoir guidée et soutenue jour après jour lors de cette aventure, en me transmettant ton énergie incroyable et ta passion pour la recherche. Au-delà de tes excellentes qualités scientifiques, ta bienveillance, ta confiance, ton optimisme à toute épreuve et ce don que tu possèdes pour voir et encourager ce qu'il y a de meilleur chez les autres m'ont permis de prendre confiance en moi, de m'investir à fond et de m'épanouir pleinement dans ce projet. Ta rigueur, ton humilité, ta force de caractère resteront pour moi un exemple à suivre.

Sébastien, je suis extrêmement heureuse et fière d'avoir pu travailler avec toi. Je te remercie pour ta grande disponibilité, ton enthousiasme et ta rigueur scientifique. Ton savoir, ton expérience et ton pragmatisme ont été extrêmement précieux. Je te remercie également pour tes qualités humaines : ta sympathie, ta générosité, ton humour qui font de toi un formidable chef d'équipe. La grande cohésion et l'excellent état esprit que tu entretiens et qui règnent au sein de ton équipe contribuent pour beaucoup à mon sens à sa réussite scientifique et humaine en favorisant la camaraderie et l'entraide. Merci enfin de m'avoir permis de participer à de nombreuses formations d'excellente qualité et de présenter mes travaux à de nombreuses occasions.

Lors de cette thèse j'ai eu la chance de rencontrer et de collaborer avec des personnes admirables :

Mes premières pensées vont au Dr. Julie Thévenot à qui je souhaite exprimer mon admiration profonde et toute ma gratitude, pour m'avoir appris à apprivoiser cet indomptable PTMC, mais aussi pour nos nombreuses discussions passionnantes, scientifiques ou non, pour les innombrables conseils avisés qu'elle m'a prodigués, et pour son amitié. Sa personnalité exemplaire, brillante et déterminée,

son assurance et son immense savoir tant en physico-chimie qu'en chimie m'ont énormément appris et inspirée.

Je souhaite également vivement remercier le Dr. Hugo Oliveira pour avoir apporté ses compétences et son expérience à ce projet et pour m'avoir inculqué en un temps record les bases de la culture cellulaire et les clefs de la philosophie biologiste : persévérance, détachement, pifos et statistique.

Un grand merci à Emmanuel Ibarboure pour les magnifiques images d'AFM et de microscopie confocale qu'il a réalisées mais aussi pour ses conseils sur la DSC et pour ce mélange de conscience professionnelle et d'humour dont il a le secret.

Je remercie également Anne-Laure Wirotius pour nous avoir fait profiter à de nombreuses reprises de son expertise en RMN et pour avoir mis au point l'expérience DOSY.

Je souhaite aussi exprimer toute ma reconnaissance au Dr. Sophie Combet du LLB et au Dr. Olivier Sandre pour le traitement des données de SANS, au Prof. Martin Teichmann et à son équipe pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire de biologie cellulaire à l'IECB, à Katell Bathany du CBMN pour avoir su percer nos chimères à jour grâce à la spectrométrie de masse, à Sabrina Rousseau pour la cytométrie en flux et au Dr. François Dole du CRPP pour m'avoir formée à la micro DSC en solution.

J'adresse également mes plus vifs remerciements au Dr. Claude Manigand pour sa personnalité chaleureuse et bienveillante, pour son humour, et pour tout ce qu'il m'a appris sur la synthèse peptidique et bien plus, qui ont fait de moi sinon une grande chercheuse du moins une personne définitivement plus positive et sereine.

Je souhaite aussi chaleureusement remercier nos collaborateurs : le Dr. Isabel Alves du CBMN pour m'avoir initiée au PWR et à la biophysique, ainsi que pour sa grande patience et sa bonne humeur extrêmement appréciable, et enfin le Prof. Gérard Wong et le Dr. Nathan Schmidt du département Bioengineering de UCLA pour les expériences SAXS et leur apport scientifique déterminant.

Mille mercis à Olivia Condassamy et Zoé Senta-Loys que j'ai eu la chance d'encadrer lors de leur stage de Master 2. Elles ont toutes deux fait preuve d'une adaptabilité, d'une application et d'une persévérance remarquable et ont chacune beaucoup contribué à ce travail. Leur présence et leur soutien face aux difficultés que nous avons rencontrées ensemble ont également beaucoup compté pour moi. Je leur souhaite la meilleure réussite possible lors de leur thèse ainsi que pour la suite de leur carrière.

Je souhaite également particulièrement remercier le Dr. Colin Bonduelle et le Dr. Arnaud Salaün, deux brillants chercheurs et puits de science qui m'ont bien souvent et remarquablement conseillée.

Je souhaite également particulièrement remercier le Dr. Colin Bonduelle et le Dr. Arnaud Salaün, deux brillants chercheurs et puits de science qui m'ont bien souvent et remarquablement conseillée.

Je remercie les membres de mon jury, Le Dr. Jean-François Lutz, le Dr. Eric Vives et le Prof. Jean-François Gohy pour avoir accepté de juger ce travail et pour la qualité de la discussion que nous avons eue à l'issue de ma présentation.

Je n'oublie pas ceux qui assurent le bon fonctionnement quotidien du laboratoire et qui nous facilitent grandement la vie : Nico, Gégé, Christophe, Cédric, Loïc, Corinne, Bernadette, Catherine et Nicole.

Enfin un immense MERCI à tous ceux qui ont fait de ces trois années une succession d'inoubliables bon moments, de pauses cafés en soirées déguisées, de séminaires endiablés en after-works à la Parcelle: Camille Camille et Lise, les meilleures, Silvia l'organisatrice en chef, la reine du Tiramisu ! Maïté la taulière du labo, mon cher Voisin Aurélien, nos précieux supers post-docs : Julie, Colin, Hugo, la dream team Garanger : Laure et Rosine (oui c'est tout et alors ?), les permanents pas vraiment permanents : Nico et Anne-Laure, les thésards et post-docs de tous horizons : Romain, Dan, An, Thomas, Floraine, Kevin, Gaétane, Laurent, Loïc, Valentina, Audrey, Maréva, Paul, Winnie, Yannick, Carine, Samira, Chantal, Stéphanie, Vincent, Jules, Chrystilla, Marie, Edgar, Medhi, les stagiaires : Olivia, Zoé, Arthur, Scarlett, Kamel, l'équipe Guichard : Stéphanie, Neil, Arnaud, Juliette, Claire, Lucile, Christelle ... et tout ceux que j'ai oubliés, encore merci pour cette formidable expérience scientifique et humaine dont je ressors grandie et que je n'oublierai jamais.

Enfin, je remercie de tout mon cœur ma famille : ma sœur Julie, mes parents Philippe et Evelyne, et Thibault, pour leur soutien pendant ces trois ans et depuis toujours, et pour tout leur amour.

Charlotte

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
LISTE DES ABREVIATIONS	5
CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	9
Résumé	11
Sommaire	13
INTRODUCTION	15
I. AUTO-ASSEMBLAGE DE COPOLYMERES A BLOC AMPHIPHILES A BASE DE POLY(ACIDE AMINE)	15
I.1. AUTO-ASSEMBLAGE DES COPOLYMERES A BLOCS AMPHIPHILES.....	15
I.1.1. Généralités	15
I.1.2. Outils de prédiction	18
I.2. AUTO-ASSEMBLAGE DE COPOLYMERES A BLOCS AMPHIPHILES A BASE DE POLY(ACIDE AMINE).....	22
I.2.1. Introduction d'un poly(acide aminé) hydrophobe au sein d'un copolymère à bloc amphiphile	26
I.2.1.1. Bloc peptidique hydrophobe présentant une structure secondaire	26
I.2.1.2. Auto-assemblage par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques	29
I.2.2. Introduction d'un poly(acide aminé) hydrophile au sein d'un copolymère à bloc amphiphile	31
I.2.2.1. Bloc peptidique hydrophile présentant une structure secondaire sensible au pH et/ou à la température	31
I.2.2.2. Bloc peptidique hydrophile thermosensible	34
I.2.2.3. Bloc peptidique aux propriétés d'internalisation cellulaire : poly(L-arginine) – PArg.....	35
I.2.2.4. Bloc peptidique sensible au potentiel d'oxydoréduction : poly(L-cystéine) - PCys	36
CONCLUSION	36
II. LES CHIMERES MACROMOLECULAIRES AMPHIPHILES POLYMERE-<i>b</i>-BIOMACROMOLECULE	37
II.1. DEFINITION : ENJEUX ET PERSPECTIVES	37
II.2. SYNTHESE : CHALLENGES ET STRATEGIES	42
II.2.1. Challenges	42
II.2.1.1. Conjuguer deux macromolécules fondamentalement différentes	42
II.2.1.2. Allier un bloc hydrophile et un bloc hydrophobe	43
II.2.2. Stratégies de synthèse	44
II.2.3. Stratégies convergentes / « grafting to »	45

II.2.3.1.	Couplages « standards » <i>via</i> des fonctions natives	46
II.2.3.2.	Couplages orthogonaux <i>via</i> des fonctions non-naturelles.....	47
II.2.3.3.	Couplages non-covalents <i>via</i> une liaison supramoléculaire spécifique	49
II.2.4.	<i>Stratégies divergentes / « Grafting from »</i>	50
II.2.4.1.	Stratégie « macroinitiateur » : polymérisation initiée par la biomolécule	51
II.2.4.2.	Stratégie inverse : biomolécule synthétisée à partir d'un polymère	52
II.3.	LES CHIMERES MACROMOLECULAIRES AMPHIPHILES POLYMERE- <i>b</i> -BIOMACROMOLECULE DANS LA LITTERATURE	53
II.3.1.	<i>Chimères polymère-b-oligonucléotide</i>	53
II.3.2.	<i>Chimères polymère-b-oligosaccharide</i>	56
II.3.3.	<i>Chimères polymère-b-protéine et polymère-b-peptide</i>	60
II.3.3.1.	Chimères polymère-b-protéine	61
II.3.3.2.	Chimères polymère-b-peptide.....	65
	CONCLUSION	73
III.	NANOPARTICULES EQUIPEES DU PEPTIDE TAT POUR L'INTERNALISATION CELLULAIRE	74
III.1.	LE PEPTIDE DE TRANSDUCTION TAT	75
III.1.1.	<i>Découverte : de la protéine TAT du virus d'immunodéficience humaine (HIV) au peptide Tat</i>	75
III.1.2.	<i>Mécanisme(s) d'internalisation</i>	77
III.1.2.1.	Paramètres moléculaires : caractère basique et rôle des arginines	77
III.1.2.2.	Etape initiale d'adhésion membranaire.....	79
III.1.2.3.	Passage à travers la membrane plasmique : à la recherche du mécanisme d'entrée	80
III.1.2.4.	Sortie de l'endosome.....	86
III.2.	NANOPARTICULES EQUIPEES DU PEPTIDE TAT POUR L'INTERNALISATION CELLULAIRE	88
III.2.1.	<i>Complexes électrostatiques pour la vectorisation de matériel génétique</i>	89
III.2.2.	<i>Nanoparticules inorganiques</i>	91
III.2.2.1.	Nanoparticules d'oxyde de fer super-paramagnétique (SPIO)	91
III.2.2.2.	Nanoparticules d'or	94
III.2.2.3.	Autres nanoparticules métalliques.....	95
III.2.2.4.	Nanoparticules à base de silice.....	95
III.2.3.	<i>Liposomes pour la vectorisation de principes actifs</i>	96
III.2.4.	<i>Nanoparticules à base de protéines</i>	97
III.2.5.	<i>Nanoparticules à base de copolymères à blocs amphiphiles</i>	98
III.2.5.1.	Morphologies de type cœur-écorce	99
III.2.5.2.	Morphologies de type vésiculaire.....	100
III.2.6.	<i>Nanoparticules à base de tensioactifs moléculaires</i>	101
III.3.	NANOPARTICULES MASQUEES : STRATEGIES DE CAMOUFLAGE DU PEPTIDE TAT POUR UNE INTERNALISATION <i>IN VIVO</i>	
	CONTROLEE	104
III.3.1.	<i>Camouflages sensibles au pH acide tumoral</i>	105
III.3.2.	<i>Camouflages sensibles aux enzymes de la matrice extracellulaire</i>	107
III.3.3.	<i>Camouflage sensible à la température</i>	108

III.3.4. <i>Camouflage sensible au potentiel d'oxydoréduction</i>	108
CONCLUSION	109
REFERENCES	110
CHAPITRE 2 : SYNTHÈSE ET AUTO-ASSEMBLAGE DE CHIMÈRES AMPHIPHILES TAT-<i>b</i>-PTMC.....	123
Résumé	125
Sommaire.....	127
INTRODUCTION	129
I. CHEMICAL SYNTHESIS OF AMPHIPHILIC TAT-<i>b</i>-PTMC CHIMERAS	130
I.1. SYNTHESIS OF TAT PEPTIDES.....	131
I.2. RING OPENING POLYMERIZATION OF TMC.....	132
I.2.1. <i>First attempts towards an amino-functionalized PTMC</i>	133
I.2.2. <i>Synthesis of hydroxyl terminated PTMC blocks</i>	133
I.3. COUPLING OF PTMC AND TAT SEGMENTS BY AMIDE BOND FORMATION ON SOLID PHASE	137
I.4. COUPLING OF PTMC AND TAT SEGMENTS BY THIOL-MALEIMIDE LIGATION IN SOLUTION	139
I.4.1. <i>Maleimide chain end-fonctionnalization of PTMC block</i>	139
I.4.2. <i>Conjugation in solution and characterization of Tat-<i>b</i>-PTMC chimeras</i>	140
II. PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF NANOPARTICLES FROM TAT-<i>b</i>-PTMC CHIMERAS	145
II.1. LIGHT SCATTERING AND MICROSCOPY ANALYSES.....	146
II.2. SMALL ANGLE NEUTRON SCATTERING ANALYSES	148
CONCLUSION	151
EXPERIMENTAL SECTION	152
SUPPORTING INFORMATION	159
REFERENCES	166
CHAPITRE 3 : ÉTUDE <i>IN VITRO</i> SUR CELLULES HELA.....	169
Résumé	171
Sommaire.....	173
INTRODUCTION	175
I. <i>IN VITRO</i> PROPERTIES OF TAT-<i>b</i>-PTMC₃₀ AND TAT-<i>b</i>-PTMC₆₆ MICELLES ON HELA CELLS	176

I.1.	CELLULAR UPTAKE STUDIES	176
I.1.1.	<i>Internalization kinetics</i>	177
I.1.2.	<i>Internalization mechanism</i>	179
I.2.	CELL VIABILITY EVALUATION	180
II.	MODULATION OF TAT PEPTIDE-DENSITY IN THE CORONA OF TAT-<i>b</i>-PTMC₃₀ MICELLES	181
II.1.	PREPARATION AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF MIXED TAT- <i>b</i> -PTMC ₃₀ /PEG- <i>b</i> -PTMC ₃₈ NANOPARTICLES	181
II.2.	IMPACT OF TAT-PEPTIDE DENSITY ON CELLULAR UPTAKE	182
II.2.1.	<i>Internalization Kinetics</i>	182
II.2.2.	<i>Internalization mechanism</i>	184
II.3.	IMPACT OF TAT PEPTIDE-DENSITY ON CELL VIABILITY	184
	CONCLUSION	185
	EXPERIMENTAL SECTION	187
	SUPPORTING INFORMATION	191
	REFERENCES	193
	 CHAPITRE 4 : ETUDE DES INTERACTIONS AVEC LES MEMBRANES BIOLOGIQUES : UNE APPROCHE BIOPHYSIQUE	 195
	Résumé	197
	Sommaire	199
	INTRODUCTION	201
I.	INTERACTIONS OF TAT-<i>b</i>-PTMC MICELLES AS STUDIED WITH LIPOSOMES BY DYNAMIC LIGHT SCATTERING AND DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY	202
I.1.	MODEL SYSTEM AND INFORMATION PROVIDED BY DLS AND DSC	202
I.2.	INTERACTIONS WITH ZWITTERIONIC LIPOSOMES	204
I.3.	INTERACTIONS WITH NEGATIVELY CHARGED LIPOSOMES	205
I.3.1.	<i>Tat-<i>b</i>-PTMC₃₀ micelles</i>	205
I.3.2.	<i>Micelles with variable Tat-peptide content</i>	208
II.	INTERACTIONS OF TAT-<i>b</i>-PTMC MICELLES AS STUDIED WITH A PLANAR BILAYER BY PLASMON WAVEGUIDE RESONANCE SPECTROSCOPY	210
II.1.	MODEL SYSTEM AND INFORMATION PROVIDED BY PWR SPECTROSCOPY	210
II.2.	INTERACTIONS WITH PLANAR BILAYERS: STRUCTURAL CHANGES AND BINDING PROFILES	211
II.2.1.	<i>Mass and structural changes: Tat-<i>b</i>-PTMC micelles versus Tat peptide</i>	211

II.2.2.	<i>Binding affinity: zwitterionic versus negatively charged membranes.....</i>	212
II.2.3.	<i>Micelles with variable Tat-peptide content.....</i>	213
III.	INTERACTIONS OF TAT-<i>b</i>-PTMC MICELLES AS STUDIED WITH LIPOSOMES MONITORED BY SMALL ANGLE X-RAY SCATTERING.....	214
III.1.	MODEL SYSTEM AND INFORMATION PROVIDED BY SAXS	214
III.2.	TAT- <i>B</i> -PTMC ₃₀ AND TAT- <i>B</i> -PTMC ₆₆ MICELLES.....	215
III.2.1.	<i>Topological ordering as function of micelles concentration</i>	215
III.2.2.	<i>Topological ordering as a function of membrane composition.....</i>	217
III.3.	MICELLES WITH VARIABLE OF TAT-PEPTIDE CONTENT	218
	CONCLUSION	219
	EXPERIMENTAL SECTION	221
	SUPPORTING INFORMATION	224
	REFERENCES	234
	CHAPITRE 5 : «CAMOUFLAGE» PH-SENSIBLE PAR ADSORPTION ELECTROSTATIQUE DE SEGMENTS PEG ANIONIQUES.....	237
	Résumé	239
	Sommaire.....	241
	INTRODUCTION	243
I.	CHEMICAL MODIFICATIONS AND CHARACTERIZATIONS OF ANIONIC PEG SEGMENTS	245
I.1.	ACYLATION OF GLYCOSYLATED PEG SEGMENT	246
I.2.	ACID-BASE TITRATION OF ANIONIC PEG SEGMENTS	247
II.	ELECTROSTATIC ADSORPTION OF PEG SEGMENTS WITH ANIONIC CHAIN END ONTO TAT-<i>b</i>-PTMC MICELLES	248
II.1.	OPTIMIZATION OF THE ADSORPTION PROCESS.....	248
II.1.1.	<i>Influence of PEG over Tat-<i>b</i>-PTMC ratios.....</i>	248
II.1.2.	<i>Influence of ionic strength.....</i>	250
II.2.	CHARACTERIZATION OF PEG/MICELLE COMPLEXES	251
II.2.1.	<i>Stability towards dilution and at physiological temperature</i>	251
II.2.2.	<i>Physico-chemical parameters and adsorption regimes</i>	251
III.	PEG-COATED MICELLES PH RESPONSIVENESS AND STABILITY IN BIOLOGICAL CONDITIONS.....	254
III.1.	PH-INDUCED DESTABILIZATION	254

III.2. COLLOIDAL INTERACTIONS WITH LIPOSOMES	255
III.3. <i>IN VITRO</i> CELLULAR UPTAKE	256
CONCLUSION	257
EXPERIMENTAL SECTION.....	258
SUPPORTING INFORMATION	261
REFERENCES.....	261
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	263

INTRODUCTION GENERALE

Depuis le début des années 70, le développement de nanoparticules en vue d'applications biomédicales a fait l'objet de recherches qui se sont intensifiées à partir des années 2000. En effet leurs bonnes propriétés pharmacocinétiques et la possibilité d'y encapsuler divers actifs (molécules, biomolécules, macromolécules) en font d'excellents candidats pour la vectorisation de principes actifs ou de sondes pour le diagnostique. Les bénéfices peuvent être nombreux selon les cas : protection et augmentation du temps de circulation d'agents thérapeutiques coûteux et sensibles à la dégradation comme les protéines ou les acides nucléiques, relargage contrôlé dans le temps et ciblé localement de chimiothérapies toxiques, accumulation d'un agent de contraste d'imagerie au sein d'une tumeur, etc.

Au sein de la communauté des polyméristes, les systèmes à base de copolymères à blocs amphiphiles ont suscité un intérêt considérable. Le caractère amphiphile de ces macromolécules synthétiques, qui présentent à la fois un bloc hydrophile et un bloc hydrophobe, leur confère de formidables capacités d'auto-organisation en solution pouvant être finement contrôlées par l'intermédiaire de leur architecture moléculaire et du procédé d'auto-assemblage. Les nombreux progrès de la chimie des polymères et de l'ingénierie macromoléculaire ont considérablement augmenté le nombre et la diversité structurelle et fonctionnelle des architectures copolymères accessibles par voie synthétique. Intelligentement conçues, elles permettent d'obtenir avec précision des structures supramoléculaires spontanément auto-assemblées de morphologies et de dimensions variables, allant de quelques nanomètres au micromètre.

Parmi la grande famille des polymères organiques synthétiques, certains ont fait l'objet d'une attention particulière. Ce sont les polymères biodégradables et biocompatibles, qualités *sine qua non* en vue d'une application biomédicale. Les plus populaires d'entre eux sont les polyesters, les polycarbonates et les polypeptides, parce que leurs monomères sont reliés par des liaisons que l'on retrouve dans les macromolécules naturelles et donc facilement dégradables par les organismes vivants. Le contrôle des techniques de polymérisation par ouverture de cycle de ces polymères est allé de pair avec l'élargissement de leur champ d'application. Certains sont devenus de véritables « hits » de la littérature, comme le poly(acide lactique) (PLA) et la poly(ϵ -caprolactone) (PCL), qui sont des polymères hydrophobes. Mais dans la catégorie des polymères hydrophiles, c'est un polyéther, le poly(éthylène glycol) (PEG), qui s'est imposé comme la référence grâce à son absence d'interaction avec les protéines, lui valant le qualificatif de polymère « furtif ».

Dans le sillon de ces avancées, le développement de nanoparticules polymères pour la vectorisation d'un large panel de principes actifs a été largement exploré. Le point fort de ces vecteurs colloïdaux est l'association d'une faible toxicité et d'un temps de circulation relativement long avec un effet d'accumulation en périphérie voire au sein des tumeurs lié à la dimension nanométrique des objets qui leur permet d'être retenus dans la vascularisation hypertrophiée et perméable des tissus cancéreux (Effet EPR - Enhanced Permeability and Retention). Ces atouts cependant se sont avérés insuffisants pour améliorer de façon significative et rentable les propriétés pharmacocinétiques *in vivo* des cargos encapsulés comparés à leur version soluble. En interaction avec les protéines du plasma et du sang, filtrée par les reins, capturée par la rate, une grande partie de la matière injectée est excrétée et n'atteint donc pas sa cible.¹ D'autre part, il est courant que les nanoparticules, lorsqu'elles y parviennent, restent localisées en périphérie de la tumeur, proches des vaisseaux sanguins par lesquelles elles sont entrées, car elles ne parviennent pas à diffuser au sein du tissu tumoral. Enfin, pour livrer leur cargaison à bon port, il leur faut souvent franchir la membrane plasmique, rempart de protection des cellules séparant le milieu intracellulaire et extracellulaire. Pour surmonter ces barrières, ces systèmes doivent donc évoluer vers plus de complexité, combinant fonctionnalité moléculaire et organisation supramoléculaire.

Si la chimie moléculaire est une science mature, la chimie supramoléculaire régissant l'auto-assemblage de la matière en est elle encore à ses balbutiements. Si nous pouvons observer sa puissance en action au sein des systèmes biologiques, nous sommes bien loin de maîtriser ses mécanismes. Comprendre et reproduire la complexité de la matière vivante, voire pensante, est le prochain défi de la chimie moderne.² La vectorisation par l'intermédiaire de nanosystèmes macromoléculaires auto-organisés est une application concrète idéale pour progresser dans cette voie. En effet, elle vise en substance à intégrer à un élément synthétique dans la machinerie d'un organisme vivant et tend pour cela à mimer les systèmes biomoléculaires et à contrôler leurs modes de fonctionnement.

Afin qu'elles soient plus que de simples objets inertes et spectateurs de leur sort, il est nécessaire d'intégrer aux nanoparticules des propriétés biofonctionnelles. Un moyen déjà très étudié pour cela est de les fonctionnaliser en surface à l'aide de molécules bioactives (ligands divers, anticorps, etc.) Cependant cette approche « additive » est peu transférable au stade clinique du fait de contraintes de reproductibilité et de caractérisation. D'autre part, si l'on veut tendre vers le biomimétisme et s'inspirer du vivant, ce n'est pas la stratégie la plus appropriée car elle consiste à ajouter une molécule pour chaque fonction de l'édifice, ce qui va à l'encontre de la logique des biosystèmes qui tendent à intégrer au sein d'une même molécule toute l'information qu'il leur est nécessaire. Les

1. N. Bertrand and J.-C. Leroux, *Journal of Controlled Release*, 2012, **161**, 152-163.
2. J.-M. Lehn, *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, **52**, 2836-2850.

biopolymères, polysaccharides, oligonucléotides et protéines, sont les meilleurs exemples de ce principe. Une approche plus audacieuse qui s'offre aux chimistes est alors de développer de nouveaux polymères synthétiques biomimétiques capables eux aussi de coder à l'échelle moléculaire propriétés d'auto-assemblage et fonctions biologiques.³ Pour cela, les peptides et les protéines sont une formidable source d'inspiration car ils permettent à partir d'une boîte à outils de quelques monomères, les acides aminés, de composer une infinité de séquences originales et *a fortiori* un nombre de structures et de fonctions quasi-illimité.

La conception de nanoparticules à partir de copolymères amphiphiles à base de polypeptides est un champ de recherche porteur et fertile car les poly(acide aminé) sont simples à synthétiser par ouverture de cycle et possèdent des capacités de structuration très proche de celles de séquences protéiques. En revanche, leur interactivité biologique est encore limitée parce que les édifices auto-assemblés ne sont pas encore aussi complexes et dynamiques que leurs homologues naturels, mais aussi car il manque à ces macromolécules une véritable séquence primaire qui assure des interactions primordiales dans le mode d'activité des protéines.

C'est dans cette optique et dans la continuité du travail déjà effectué au laboratoire que nous avons ainsi évolué de systèmes polymère-*b*-poly(acide aminé) vers des molécules chimériques amphiphiles polymère-*b*-peptide présentant à la fois des propriétés d'auto-assemblage et une fonction biologique apportée par le segment peptidique. A l'issue de l'auto-assemblage, celui-ci se retrouve en surface de la structure et est donc susceptible d'interagir avec son environnement moléculaire et de transférer à la particule l'activité biologique codée dans sa structure primaire voire secondaire.

Parce que la faible perméabilité de la membrane plasmique des cellules est l'une des limitations majeures en pharmacologie, nous nous sommes intéressés aux peptides d'internalisation cellulaire (CPP – cell-penetrating peptides), qui ont suscité depuis leur découverte il y a vingt ans un formidable engouement, et plus particulièrement au peptide Tat. Cette séquence peptidique, dérivée du domaine de transduction de la protéine transactivatrice de transcription Tat du virus VIH-1, a largement fait ses preuves comme vecteur d'internalisation et ne possède pas de conformation secondaire particulière. C'est donc un peptide bioactif modèle d'intérêt que nous avons choisi de conjuguer au poly(triméthylène carbonate) (PTMC), un polycarbonate hydrophobe biocompatible qui a lui aussi fait ses classes au sein de notre équipe.

La thèse présentée ci-après propose une approche transverse du développement de nanoparticules pour l'internalisation cellulaire auto-assemblées à partir de chimères amphiphiles Tat-*b*-PTMC. Cette étude s'étend de la synthèse des bioconjugués jusqu'à l'évaluation de leurs propriétés biologiques *in vitro* en passant par un étude fine du phénomène d'auto-assemblage des objets formés ainsi que de

3. E. Garanger and S. Lecommandoux, *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, **51**, 3060-3062.

leurs interactions avec des modèles biophysiques de membranes plasmiques, dans le but ultime d'établir et comprendre les liens entre la structure moléculaire, les caractéristiques colloïdales et l'activité biologique de ces systèmes.

La première partie de ce manuscrit sera consacrée à une étude bibliographique puis, dans la seconde partie nous décrivons la synthèse de chimères Tat-b-PTMC de différentes fractions massiques hydrophiles et l'étude de leur auto-assemblage en solution. Dans un troisième temps, nous aborderons les propriétés d'internalisation cellulaire des nanoparticules obtenues. Nous verrons ensuite, dans un quatrième temps, leur mode d'interaction avec des membranes phospholipidiques modèles. La cinquième et dernière partie esquisse, quand à elle, la mise au point d'un système camouflage dynamique de la surface de ces nanoparticules via une PEGylation électrostatique sensible au pH dans l'objectif de moduler leur activité et d'augmenter leur sélectivité.

1. N. Bertrand and J.-C. Leroux, *Journal of Controlled Release*, 2012, **161**, 152-163.
2. J.-M. Lehn, *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, **52**, 2836-2850.
3. E. Garanger and S. Lecommandoux, *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, **51**, 3060-3062.

LISTE DES ABREVIATIONS

AFM	Atomic Force Microscopy
ATRP	Atom transfer radical polymerization
BBB	Blood-brain barrier
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BSA	Bovine serum albumine
CBMN	Chimie et biologie des membranes et nano-objets
COSY	Correlation spectroscopy
CPP	Cell-penetrating peptide
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DLS	Dynamic Light Scattering
DMF	Dimethylformamide
DMPC	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DMPG	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerol)
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DOPE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
DOPS	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serine
DOSY	Diffusion ordered spectrscopy
DOX	Doxorubicine
DP _n	Degré de polymérisation
DSC	Differential scanning calorimetry
DTT	Dithiothreitol
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
ELP	Elastin-like polypeptide
EPR	Enhanced permeation and retention
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl
HBTU	<i>O</i> -benzotriazole- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate
HF	Hydrogen fluoride
HIV	Human immunodeficiency virus
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HRP	Horseradish peroxidase
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration

LCST	Lower critical solution temperature
LSCM	Laser scanning confocal microscopy
LUV	Large unilamellar vesicle
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionization
MALS	Multi-angle light scattering
Mb	Myoglobine
MTT	Thiazolyl blue tetrazolium bromide
NCA	N-carboxyanhydride
NCL	Native chemical ligation
NHS	N-hydroxysuccinimide
NMP	Nitroxide mediated polymerization
NMR	Nuclear magnetic resonance
PB	Poly(butadiene)
PBLG	Poly(γ -benzyl glutamate)
PCL	Poly(ϵ -caprolactone)
PDEGMEMA	poly(diethylene glycol methyl ether methacrylate)
PDi	Polydispersity index
PDMAEMA	poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]
PEG	Poly(éthylène glycol)
PEO	Poly(ethylene oxide)
PGA	Poly(glutamic acid)
PIB	Poly(isobutadiene)
PIC	Polyionique complexe
PLA	Poly(lactic acid)
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid)
PMA	Poly(methacrylate)
PMMA	Poly(methyl methacrylate)
PNIPAM	Poly(N-isopropylacrylamide)
POPG	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol)
PPO	Poly(propylene oxide)
PS	Poly(styrene)
PTD	Protein transduction domain
PTMC	Poly(triméthylène carbonate)
PVP	Poly(vinylpyrrolidone)
PWR	Plasmon waveguide resonance
RAFT	Reversible addition-fragmentation chain transfer

ROP	Ring opening polymerization
Sa	Streptavidine
SANS	Small angle neutron scattering
SAXS	Small angle X-ray scattering
SEC	Size exclusion chromatography
SLD	Scattering length density
SPIO	Super-paramagnetic iron oxide
SUV	Small unilamellar vesicle
TEM	Transmission electron microscopy
TFA	Trifluoroacetic acid
THF	Tetrahydrofuran
TOF	Time of flight
UCLA	University of California, Los Angeles

CHAPITRE 1

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION	15
I. AUTO-ASSEMBLAGE DE COPOLYMERES A BLOC AMPHIPHILES A BASE DE POLY(ACIDE AMINE).....	15
I.1. AUTO-ASSEMBLAGE DES COPOLYMERES A BLOCS AMPHIPHILES.....	15
I.1.1. Généralités	15
I.1.2. Outils de prédiction	18
I.2. AUTO-ASSEMBLAGE DE COPOLYMERES A BLOCS AMPHIPHILES A BASE DE POLY(ACIDE AMINE).....	22
I.2.1. Introduction d'un poly(acide aminé) hydrophobe au sein d'un copolymère à bloc amphiphile	26
I.2.1.1. Bloc peptidique hydrophobe présentant une structure secondaire	26
i. Poly(γ -benzyl-L-glutamate) – PBLG	26
ii. Poly(L-leucine) – PLeu	27
iii. Poly(L-alanine) –PAla.....	28
iv. Autres résidus et structures	29
I.2.1.2. Auto-assemblage par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques.....	29
I.2.2. Introduction d'un poly(acide aminé) hydrophile au sein d'un copolymère à bloc amphiphile	31
I.2.2.1. Bloc peptidique hydrophile présentant une structure secondaire sensible au pH et/ou à la température	31
i. Poly(L-lysine) - PLys	32
ii. Poly(L-acide glutamique)- PGlu	33
I.2.2.2. Bloc peptidique hydrophile thermosensible	34
I.2.2.3. Bloc peptidique aux propriétés d'internalisation cellulaire : poly(L-arginine) – PArg.....	35
I.2.2.4. Bloc peptidique sensible au potentiel d'oxydoréduction : poly(L-cystéine) - PCys	36
CONCLUSION	36
II. LES CHIMERES MACROMOLECULAIRES AMPHIPHILES POLYMERE-<i>b</i>-BIOMACROMOLECULE	37
II.1. DEFINITION : ENJEUX ET PERSPECTIVES	37
II.2. SYNTHÈSE : CHALLENGES ET STRATEGIES	42
II.2.1. Challenges.....	42
II.2.1.1. Conjuguer deux macromolécules fondamentalement différentes	42
II.2.1.2. Allier un bloc hydrophile et un bloc hydrophobe	43
II.2.2. Stratégies de synthèse	44
II.2.3. Stratégies convergentes / « grafting to »	45
II.2.3.1. Couplages « standards » <i>via</i> des fonctions natives	46
i. Formation d'une liaison amide.....	46
ii. Formation d'une liaison thioéther	46
iii. Amination réductrice	47
II.2.3.2. Couplages orthogonaux <i>via</i> des fonctions non-naturelles	47
i. Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen – la réaction « click »	47
ii. Formation d'une liaison éther d'oxime	48
iii. Couplage phosphoramidite	48
II.2.3.3. Couplages non-covalents <i>via</i> une liaison supramoléculaire spécifique.....	49

i.	Interaction biotine-streptavidine	49
ii.	Reconstitution cofacteur-apoprotéine	49
iii.	Hybridation de simple-brins d'oligonucléotides complémentaires.....	49
II.2.4.	<i>Stratégies divergentes / « Grafting from »</i>	50
II.2.4.1.	Stratégie « macroinitiateur » : polymérisation initiée par la biomolécule	51
II.2.4.2.	Stratégie inverse : biomolécule synthétisée à partir d'un polymère	52
II.3.	LES CHIMÈRES MACROMOLECULAIRES AMPHIPHILES POLYMÈRE- <i>b</i> -BIOMACROMOLECULE DANS LA LITTÉRATURE	53
II.3.1.	<i>Chimères polymère-b-oligonucléotide</i>	53
II.3.2.	<i>Chimères polymère-b-oligosaccharide</i>	56
II.3.3.	<i>Chimères polymère-b-protéine et polymère-b-peptide</i>	60
II.3.3.1.	Chimères polymère- <i>b</i> -protéine	61
i.	Chimères à base de polymères à température critique basse de solubilité	62
ii.	Chimères à base de polymères hydrophobes.....	63
II.3.3.2.	Chimères polymère- <i>b</i> -peptide.....	65
i.	Chimères à base de peptides hydrophiles formant des nanoparticules sphériques en solution diluée.....	66
ii.	Matériaux biofonctionnels à base de chimères polymère- <i>b</i> -peptide.....	68
	CONCLUSION	73
III.	NANOPARTICULES EQUIPEES DU PEPTIDE TAT POUR L'INTERNALISATION CELLULAIRE	74
III.1.	LE PEPTIDE DE TRANSDUCTION TAT	75
III.1.1.	<i>Découverte : de la protéine TAT du virus d'immunodéficience humaine (HIV) au peptide Tat</i>	75
III.1.2.	<i>Mécanisme(s) d'internalisation</i>	77
III.1.2.1.	Paramètres moléculaires : caractère basique et rôle des arginines	77
III.1.2.2.	Etape initiale d'adhésion membranaire.....	79
III.1.2.3.	Passage à travers la membrane plasmique : à la recherche du mécanisme d'entrée	80
III.1.2.4.	Sortie de l'endosome.....	86
III.2.	NANOPARTICULES EQUIPEES DU PEPTIDE TAT POUR L'INTERNALISATION CELLULAIRE	88
III.2.1.	<i>Complexes électrostatiques pour la vectorisation de matériel génétique</i>	89
III.2.2.	<i>Nanoparticules inorganiques</i>	91
III.2.2.1.	Nanoparticules d'oxyde de fer super-paramagnétique (SPIO)	91
III.2.2.2.	Nanoparticules d'or	94
III.2.2.3.	Autres nanoparticules métalliques.....	95
III.2.2.4.	Nanoparticules à base de silice.....	95
III.2.3.	<i>Liposomes pour la vectorisation de principes actifs</i>	96
III.2.4.	<i>Nanoparticules à base de protéines</i>	97
III.2.5.	<i>Nanoparticules à base de copolymères à blocs amphiphiles</i>	98
III.2.5.1.	Morphologies de type cœur-écorce	99
III.2.5.2.	Morphologies de type vésiculaire.....	100
III.2.6.	<i>Nanoparticules à base de tensioactifs moléculaires</i>	101
III.3.	NANOPARTICULES MASQUEES : STRATEGIES DE CAMOUFLAGE DU PEPTIDE TAT POUR UNE INTERNALISATION <i>IN VIVO</i>	
	CONTROLEE	104

<i>III.3.1. Camouflages sensibles au pH acide tumoral.....</i>	<i>105</i>
<i>III.3.2. Camouflages sensibles aux enzymes de la matrice extracellulaire</i>	<i>107</i>
<i>III.3.3. Camouflage sensible à la température</i>	<i>108</i>
<i>III.3.4. Camouflage sensible au potentiel d'oxydoréduction</i>	<i>108</i>
CONCLUSION	109
RÉFÉRENCES	110

INTRODUCTION

Cette étude bibliographique a pour objectif de fournir les informations conceptuelles et contextuelles nécessaires à une lecture critique et éclairée de ce manuscrit. Elle propose un état de l'art pour les différents domaines de recherche abordés lors de cette thèse. Dans un premier temps, après avoir brièvement décrit les bases de l'auto-assemblage des copolymères à blocs amphiphiles, nous verrons les apports nombreux et récents relatifs à l'introduction, au sein de tels systèmes, d'un ou de plusieurs blocs poly(acide aminé), mimes synthétiques de protéines tant en termes structuraux que fonctionnels. La seconde partie est consacrée aux chimères moléculaires amphiphiles combinant polymères synthétiques et biomacromolécules. Les méthodes de synthèse ainsi que les cas décrits dans la littérature y seront présentés. Enfin la troisième et dernière partie aborde l'utilisation du peptide de transduction Tat et de ses analogues dans le cadre du développement de nanoparticules pour la vectorisation intracellulaire. Les potentialités et limites de cette approche seront discutées.

I. AUTO-ASSEMBLAGE DE COPOLYMERES A BLOC AMPHIPHILES A BASE DE POLY(ACIDE AMINE)

I.1. AUTO-ASSEMBLAGE DES COPOLYMERES A BLOCS AMPHIPHILES

I.1.1. GENERALITES

Un copolymère à blocs est constitué à *minima* de deux segments polymères A et B, liés entre eux de façon covalente et formant ainsi une seule et même macromolécule notée A-b-B. Lorsque ces deux blocs sont de nature chimique incompatible, l'enthalpie défavorable de mélange induit en masse une microséparation de phase, c'est-à-dire une ségrégation des blocs limitée spatialement à l'échelle de la taille des molécules. La matière peut ainsi se nanostructurer d'elle-même, de façon très ordonnée et homogène. Ce phénomène a été largement étudié tant sur le plan théorique qu'expérimental, notamment dans le cas simple d'un dibloc linéaire flexible-flexible, en anglais «coil-coil». ¹⁻⁵

Le type de microphase alors obtenu dépend:

- D'une part, et essentiellement, de la fraction volumique relative d'un bloc par rapport à l'autre $f_A = V_A / (V_A + V_B)$, qui est un paramètre d'ordre géométrique;
- D'autre part, de la force de ségrégation ou d'interaction répulsive entre les deux blocs, paramètre d'ordre énergétique et entropique. Cette tension interfaciale est décrite par le

produit du paramètre d'interaction de Flory-Huggins χ , relatif à l'enthalpie de mélange des deux blocs et du degré de polymérisation N , contribuant à l'entropie du système.

Les microstructures, ou morphologies, régulières pouvant être observées sont représentées sur la figure 1, cette gamme pouvant s'élargir rapidement avec le nombre de blocs et la complexité de la structure macromoléculaire.

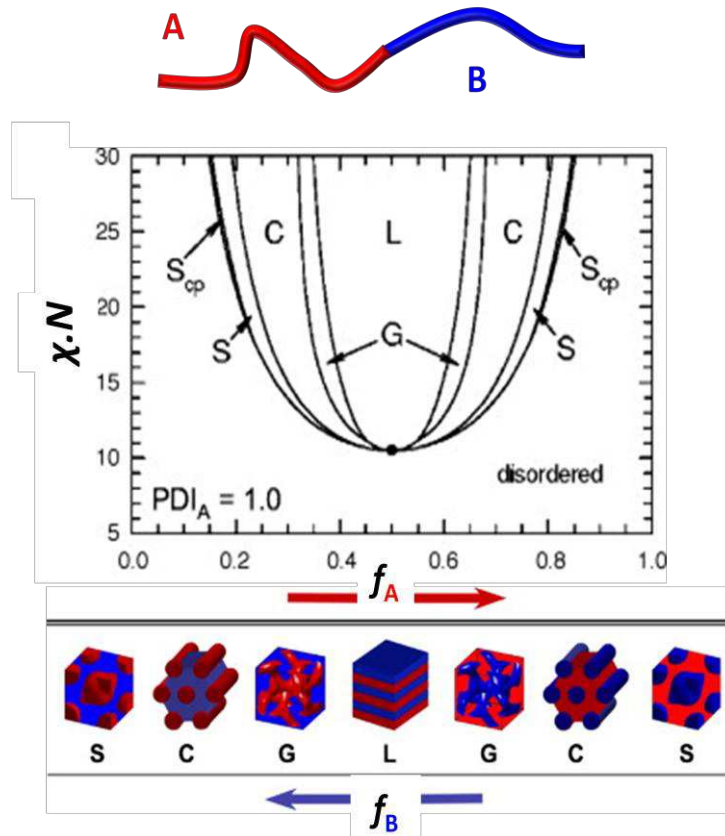


Figure 1- Diagramme de phase en masse d'un copolymère à blocs **A-b-B** (A=PS, B=PVP) et représentation schématique des microphases correspondantes : (S_{cp}) sphérique compacte, (**S**) sphérique conformation cubique faces centrées, (**C**) cylindre conformation hexagonale, (**G**) gyroïde et (**L**) lamellaire. Adaptée de Lynd *et al.*⁶

Cette microséparation de phase peut également être observée en solvant.⁷⁻¹⁰ En effet, l'incompatibilité chimique des deux blocs se traduit également en termes de solubilité et il n'est pas difficile de trouver un solvant sélectif dans lequel l'un des blocs est soluble (solvophile) et l'autre ne l'est pas (solvophobe). Lorsque ce solvant est l'eau, le premier est hydrophile, le second hydrophobe. De même qu'en masse, l'auto-assemblage en solution diluée est mu par la thermodynamique. Au-delà d'une certaine concentration (concentration micellaire critique - cmc) et en-deçà d'une certaine température (température micellaire critique - cmt), le coût enthalpique des contacts entre les blocs hydrophobes et le solvant devient trop élevé face à l'entropie favorisant le désordre et donc la dispersion des chaînes. Les blocs insolubles s'agrègent alors afin de minimiser le contact avec le

solvant. Cette séparation de phase est cependant contrebalancée par la répulsion entre les chaînes hydrophiles qui tendent à s'hydrater de façon maximale. Cet équilibre impose une courbure et donc une morphologie et une dimension aux objets formés. Désignés sous le terme générique de structures micellaires, leur taille varie généralement d'une dizaine à quelques centaines de nanomètres, ce qui en fait donc au sens strict des nanoparticules. Les plus couramment obtenus sont les micelles sphériques, les micelles cylindriques et les vésicules (Figure 2), cependant des morphologies plus complexes ne sont pas exclues. Au-delà d'une certaine concentration (concentration de gel critique - cgc), les objets s'organisent les uns par rapport aux autres et convergent vers les morphologies observées en masse.

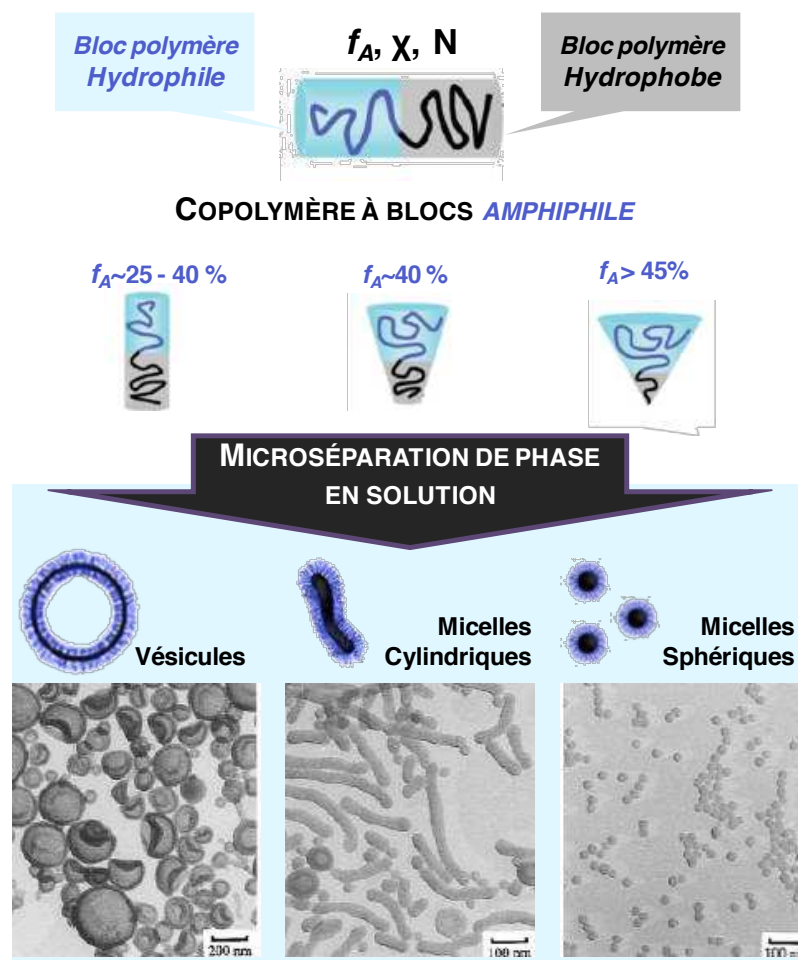


Figure 2 - Représentation schématique de l'auto-assemblage des copolymères à blocs amphiphiles en solution et exemples de morphologies obtenues. Adaptée des travaux de Zhang et al.¹¹ et Discher and Ahmed.¹²

D'un point de vue pratique, les méthodes utilisées pour préparer des nanoparticules par auto-assemblage de copolymères à blocs amphiphiles se divisent en deux catégories :

- Les méthodes de dissolution directe:¹³ le copolymère, en masse ou déposé en film sur une surface, est mis directement en contact avec le solvant sélectif ;

- les méthodes procédant par l'intermédiaire d'un co-solvant non sélectif permettant dans un premier temps de solubiliser le copolymère.¹⁴ Cette phase est ensuite mélangée sous agitation au solvant sélectif. Si les deux solvants sont miscibles alors l'auto-assemblage se produit, ce procédé est alors désigné sous le terme de nanoprécipitation, sinon une émulsion se crée et les nanoparticules ne seront définitivement formées que lors de l'élimination du co-solvant par dialyse ou évaporation.

Il est à noter qu'en utilisant un co-solvant il est possible de piéger cinétiquement les chaînes dans une conformation de phase hors-équilibre et donc d'influencer le type d'objet obtenu en jouant sur les paramètres expérimentaux.¹⁵

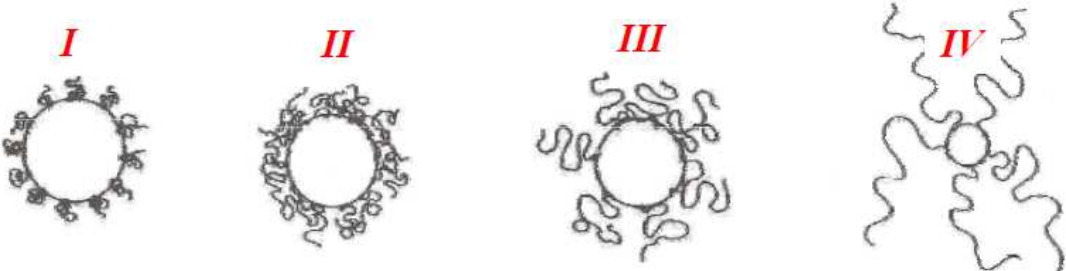
I.1.2. OUTILS DE PREDICTION

Tout comme en masse, l'équilibre des forces en jeu lors de l'auto-assemblage est fortement influencé par les paramètres intrinsèques énergétiques, entropiques et conformationnels du copolymère (χ , N , f).

Aussi la prédiction, à partir de ces paramètres, de la morphologie et de la structure des objets auto-assemblés a fait l'objet de nombreux travaux et différentes théories plus ou moins accessibles ont été développées, dont celles majeures décrites ci après. Pour une description exhaustive et détaillée, nous invitons le lecteur à consulter les excellentes revues de Linse, Riess et Hamley à ce sujet.^{8, 16, 17}

Pierre-Gilles de Gennes est le premier en 1978 à établir une loi d'échelle permettant de décrire l'auto-assemblage de copolymères à blocs A-b-B en micelles sphériques dont le degré de polymérisation N_B du bloc B solvophobe est très supérieur à celui du bloc A solvophile N_A ($N_B \gg N_A$) en micelles de type « crew-cut ».^{18, 19} Daoud et Cotton s'attaquent quant à eux aux cas où $N_B \ll N_A$ pour lesquels les micelles obtenues sont de type « star-like » ou « blobs ».²⁰ La théorie proposée sera ensuite approfondie successivement par Zhulina et Birshtein,^{20, 21} puis par Halperin.²² Les contributions plus récentes de Khokhlov²³ et Wu et Gao²⁴ ont également permis de compléter et d'étendre ces relations respectivement à tout types de ratio N_A/N_B et au cas où l'un des blocs est chargé. L'ensemble de ces lois d'échelles sont présentées figure 3.

En parallèle, des modèles basés sur la théorie des champs moyens ont été développés par Noolandi et Hong²⁵ puis par Leibler *et al.*²⁶ en 1983. Ils permettent *via* une minimisation de l'énergie libre de calculer la taille des agrégats micellaires à l'équilibre et de prédire la variation du nombre d'agrégation avec le degré de polymérisation. Tout comme les lois d'échelles, ils ont été par la suite confirmés expérimentalement, approfondis et étendus à des systèmes plus complexes comme les polyélectrolytes.²⁷



Region	Composition of diblock copolymer	R_B	R_A	P
I	$N_A < N_B^{v/6}$	$N_B^{2/3}$	N_A^v	N_B
II	$N_B < N_A < N_B^{(1+2v)6v}$		$N_A N_B^{(v-1)/6v}$	
III	$N_B^{(1+2v)6v} < N_A < N_B^{(1+2v)5v}$	$N_B N_A^{-2v(1+2v)}$	$N_A^{3v(3v+1)}$	$N_B^2 N_A^{-6v(1+2v)}$
IV	$N_A > N_B^{(1+2v)5v}$	$N_B^{3/5}$	$N_A^v N_B^{2(1-v)/5}$	$N_B^{4/5}$

AB block copolymer micelle in a solvent selective for the A block. R_A =the thickness of the corona; R_B =the radius of the core; P=the aggregation number; v =the Flory exponent in the relation between the radius of gyration and the molecular weight, $v=0.5$ for theta solvents and $v=0.588$ for good solvents.

Figure 3 – Loi d'échelles décrivant l'auto-assemblage de copolymères à blocs A-b-B en micelles sphériques. Reproduit des travaux de Zhulina et Birshtein.²⁸

En complément de ces modèles théoriques, une approche plus abordable et relativement efficace existe basée sur des considérations géométriques. Elle a été initialement établie pour des amphiphiles de faible masse molaire (tensioactifs, phospholipides) par Israelachvili^{29, 30} et étendue au cas des copolymères.³¹ Elle repose sur une description de la molécule *via* trois paramètres : la longueur du bloc hydrophobe en extension l_c , le volume occupé par ce même bloc hydrophobe v , et l'aire occupée à l'interface par la tête hydrophile a_0 . La valeur de cette dernière est optimale lorsque l'énergie libre du système est minimisée, c'est-à-dire lorsque les forces de cohésion hydrophobe qui tendent à la réduire et les forces de répulsion hydrophile qui tendent à l'augmenter ont trouvé un équilibre. Le paramètre d'empilement est alors défini comme $p = \frac{v}{a_0 l_c}$. Pour chaque morphologie, la valeur que peut prendre ce paramètre est bornée par les relations simples de la géométrie. Ainsi en l'estimant numériquement, on peut prédire quelle sera la structure préférentiellement adoptée (Figure 4).

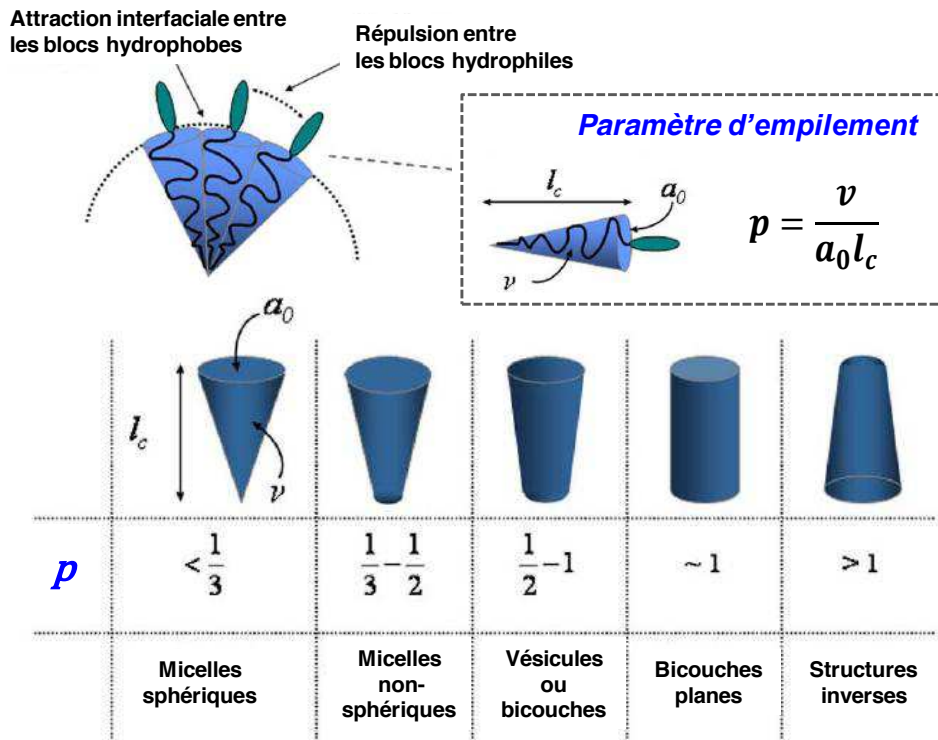
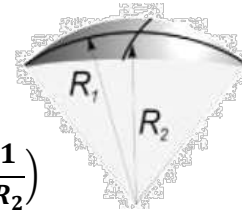


Figure 4 - Influence des paramètres moléculaires sur la morphologie des systèmes micellaires. l_c désigne la longueur du bloc hydrophobe en extension, v le volume du bloc hydrophobe et a_0 l'aire occupée à l'interface par la tête hydrophile. Adapté de Israelachvili.²⁹

La courbure des objets, interfaciale moyenne ou gaussienne, diminue avec la valeur de p et intimement liée au type de morphologie obtenue.³² (Figure 5)

Courbure gaussienne

$$K = \frac{1}{R_2 R_1}$$



Courbure interfaciale moyenne

$$H = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)$$

$$\frac{v}{a_0 l_c} = 1 + H l_c + \frac{K l_c^2}{3}$$

Shape	$v/(al)$	H	K
Sphere	1/3	1/R	1/R ²
Cylinder	1/2	1/(2R)	0
Bilayer	1	0	0

Figure 5 - Relations entre le paramètre d'empilement, la courbure interfaciale moyenne, la courbure gaussienne des objets et leurs morphologies. Adaptée d'après Antonietti et al.³²

Dans la continuité de ces travaux, Discher et Eisenberg ont proposé un modèle empirique simple et spécifiquement adapté aux copolymères à blocs qui donne la morphologie attendue en fonction d'un unique paramètre : la fraction massique du bloc hydrophile, noté f_A ou simplement f .^{12, 33} L'évolution structurale observée alors est semblable à celle d'un diagramme de phase en masse pour un régime de forte ségrégation, c'est-à-dire pour une valeur de $\chi \cdot N$ élevée (Figure 1). Cependant, ces outils théoriques ont leurs limites. Les lois d'échelles sont valables uniquement pour des degrés de

polymérisation élevés et ne donnent que des tendances. Les calculs de champ moyen ne valent que pour des systèmes à l'équilibre et le nombre de variable est limité par le temps de calcul. Enfin les modèles basés sur des considérations géométriques ne s'appliquent en fait que pour des diblocs flexibles « coil-coil » et non chargés. Leurs limites ont été largement éprouvées en particulier dans le cas des copolymères rigide-flexible ou « rod-coil », alliant un segment rigide et de forme anisotrope à un segment souple en conformation pelote statistique. Tout d'abord, ce type de molécule présente une anisotropie conformationnelle importante accentuant fortement l'incompatibilité des blocs, ce qui se traduit par une augmentation conséquente du paramètre de Flory-Huggins. Mais surtout, à la microséparation de phase guidée par l'effet hydrophobe, s'ajoute un second phénomène d'auto-assemblage : l'alignement des blocs hydrophobes les uns par rapports aux autres en un empilement compact et ordonné proche d'une phase nématique. Cette structuration est stabilisée par des interactions intermoléculaires spécifiques (liaisons hydrogènes, π -stacking) qui ont été théoriquement modélisées par Reenders *et al.* à l'aide une interaction attractive de Meier-Saupe.³⁴ Ce paramètre complexifie le diagramme de phase de ce genre de système et rend toute prédiction hasardeuse à partir de paramètres moléculaires. En solution, une tendance générale se dessine néanmoins : l'alignement compact des blocs rigides tend à diminuer la courbure interfaciale, ce qui favorise les phases lamellaires donc la formation de micelles cylindriques et de vésicules.³⁵ On peut classer les copolymères à blocs amphiphiles rigide-flexible étudiés dans la littérature en deux catégories selon l'origine de la raideur du bloc mais aussi du domaine d'application (Figure 6):³⁶

- Structure moléculaire à très faible degré de liberté, « cadencée » par de multiples insaturations, principalement des cycles aromatiques. Ces blocs sont généralement dérivés de structures mésogènes. Le comportement de type cristal liquide en masse de copolymères rigide-flexible dit « aromatiques » a donc été largement investigué dans le cadre d'application pour l'optoélectronique, ce qui a par ailleurs profité à l'étude de tel systèmes en solution.
- Structure hélicoïdale et structure en feuillet beta. Ces conformations, verrouillées par un puissant réseau de liaisons hydrogènes, correspondent aux structures secondaires les plus souvent adoptées par les protéines naturelles. Il n'est donc pas étonnant de les observer au sein de copolymères à blocs amphiphiles destinés à des applications biomédicales, principalement ceux à base de poly(acide aminé), auxquels est consacré le paragraphe suivant.



Figure 6 - Représentation schématique des sortes de copolymère à blocs rigide-flexible (rod-coil). Adaptée de Lim *et al.*³⁶

I.2. AUTO-ASSEMBLAGE DE COPOLYMERES A BLOCS AMPHIPHILES A BASE DE POLY(ACIDE AMINE)

Les protéines sont des polymères linéaires programmés par la nature avec une résolution monomérique pour former de véritables nanomachines dynamiques et biofonctionnelles. Structurale, motrice, enzymatique, hormonale ou régulatrice, le panel des fonctions biologiques qu'elles accomplissent est considérable et essentiel au bon fonctionnement de la machinerie cellulaire. Vingt monomères fonctionnels seulement, les acides aminés, sont à l'origine de cette diversité (Figure 7).

Grâce à un habile jeu d'interactions moléculaires, l'assemblage de ces derniers permet d'induire une structuration tridimensionnelle hiérarchisée. Les techniques de biologie structurale comme le dichroïsme circulaire, la spectroscopie de RMN et la cristallographie ont permis d'élucider les mécanismes de ce repliement, aujourd'hui bien connu et modélisable numériquement.

Cette prouesse de la nature de coder dans un simple polymère un tel niveau d'organisation et de fonctionnalité à la fois inspire et met au défi les chimistes et physico-chimistes des polymères, qui envisagent le biomimétisme comme une source d'innovation et de progrès. En effet, Il est évident que le degré de contrôle accessible à l'échelle nanométrique à partir de copolymères à blocs demeure pour l'instant relativement modeste comparé à la complexité des structures biologiques, optimisées par des millions d'années d'évolution. Ainsi, l'incorporation à ces systèmes d'un ou plusieurs blocs polypeptide a suscité ces 20 dernières années un intérêt et un effort de recherche important, en particulier pour des applications biomédicales et en nanomédecine.³⁷⁻⁴⁰

Dans la littérature, le terme « polypeptide » est employé de façon impropre pour désigner les poly(acide aminé), c'est-à-dire des homo- ou co-polymères dont les unités monomériques sont des acides aminés. Il s'agit à la fois d'un pléonasme, puisqu'un peptide est déjà un polymère d'acide aminé, et d'un abus de langage, les polypeptides *stricto sensu* étant des polymères de peptides, comme par exemple l'élastine qui est un polymère du pentapeptide (VPGVG). Néanmoins, par souci de cohérence, nous utiliserons par la suite cette dénomination pour désigner les polymères peptidiques dans leur ensemble comprenant les poly(acide aminé) ou homopolypeptides d'une part et les poly(peptide) ou polymères de peptides d'autre part. Concernant les poly(acide aminé) de résidus naturels, nous abrègerons leur dénomination par un P majuscule suivi de l'abréviation à trois lettres de l'acide aminé correspondant. *Exemple* : poly(L-acide aspartique) = PAsp.

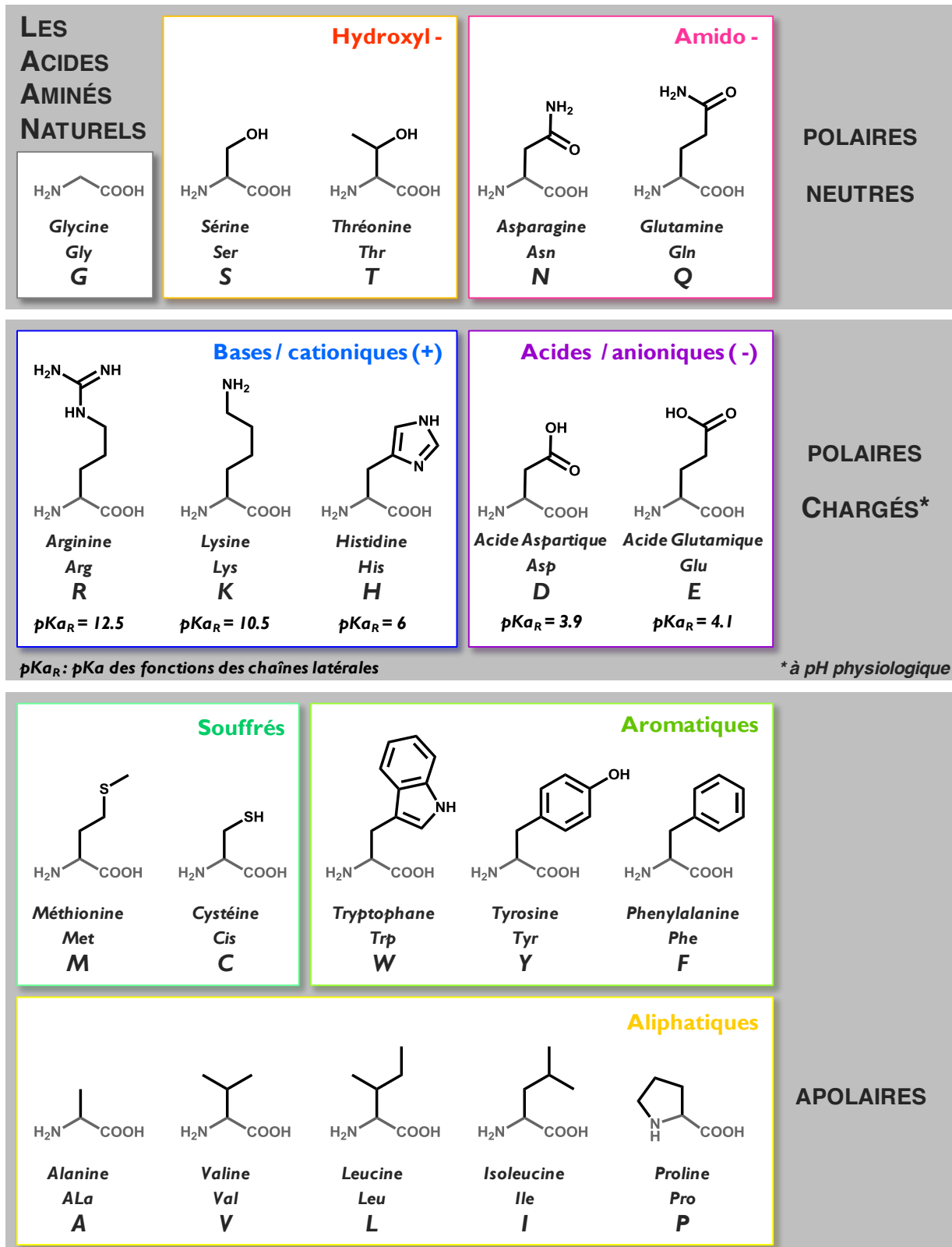


Figure 7 - Acides aminés naturels.

Les nombreuses avancées dans la maîtrise de la préparation de *N*-carboxyanhydride (NCA) d'acide aminé protégé et de leur polymérisation par ouverture de cycle ont permis la synthèse contrôlée d'un large panel de poly(acide aminé) (schéma 1).^{41, 42}

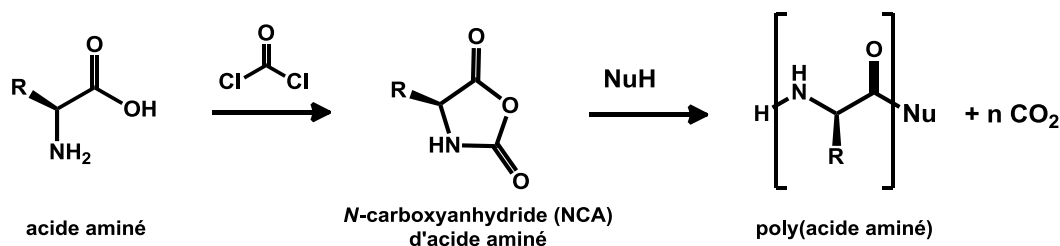


Schéma 1 – Polymérisation par ouverture de cycle des *N*-carboxyanhydrides d'acide aminé

Grâce aux progrès de la biologie moléculaire, il est aussi possible de produire des poly(peptide(s)), ou polymères de peptides, par voie recombinante comme des protéines.^{43, 44} Pour cela, un gène codant pour la séquence polypeptidique désirée est introduit au sein d'une bactérie qui une fois mise en culture va produire la macromolécule correspondante. Cette voie biosynthétique permet d'obtenir des « polymères protéiques » avec une polydispersité nulle et un parfait contrôle de la séquence primaire. L'ingénierie et l'étude de ces matériaux constituent une aire de recherche relativement vierge et très prometteuse, notamment pour l'élaboration de nanosystèmes biofonctionnels à base d'amphiphiles.⁴⁵ Les motifs peptidiques répétitifs étudiés pour l'instant sont dérivés de protéines structurales naturelles comme la soie, l'élastine, la résiline et autres protéines super-hélicoïdales.

Qu'ils soient synthétiques ou recombinants, tous les polypeptides ont en commun avec les protéines la liaison peptidique. Maillon de leur chaîne principale, elle leur permet d'être métabolisés par les systèmes biologiques suivant les mêmes voies que les protéines endogènes. D'un autre côté, la liaison amide est très stable et relativement insensible à l'hydrolyse chimique. Elle leur attribue donc d'un côté un caractère biocompatible et biodégradable et de l'autre une robustesse chimique, qui sont deux qualités très recherchées dans le cadre d'applications biomédicales⁴⁶⁻⁴⁸. D'autre part, les polypeptides peuvent se structurer sur eux-mêmes et entre eux suivant les mêmes mécanismes que ceux actionnant la structuration des protéines naturelles, basés sur l'établissement d'interactions intra- et inter-moléculaires entre les acides aminés. Ces interactions non-covalentes ou réversibles, de courte portée et de faible énergie mais directionnelles et spécifiques sont le ciment supramoléculaire des édifices biologiques. D'abord, grâce aux liaisons hydrogènes et à l'homochiralité de ses résidus, le polypeptide peut se replier pour abandonner la conformation pelote statistique classiquement adoptée par les polymères au profit une structure secondaire ordonnée, soit en se torsadant pour former une hélice, soit en s'arrangeant entre eux en feuillets. Ensuite, la diversité fonctionnelle des chaînes latérales des acides aminés permet l'introduction de ponts moléculaires

faibles ou covalents (ponts disulfures) inter- ou intra-chaînes grâce à des outils naturellement exploités lors de la structuration tertiaire des protéines : pont disulfure, liaisons hydrogène, liaisons de Van der Waals, interactions ioniques, π -stacking, etc. Enfin, la microséparation de phase induite par la nature amphiphile du composé permet d'assembler les chaînes entre elles de façon non-covalente en une structure globale multimère qu'il est facile d'apparenter à une structure protéique quaternaire (Figure 8).

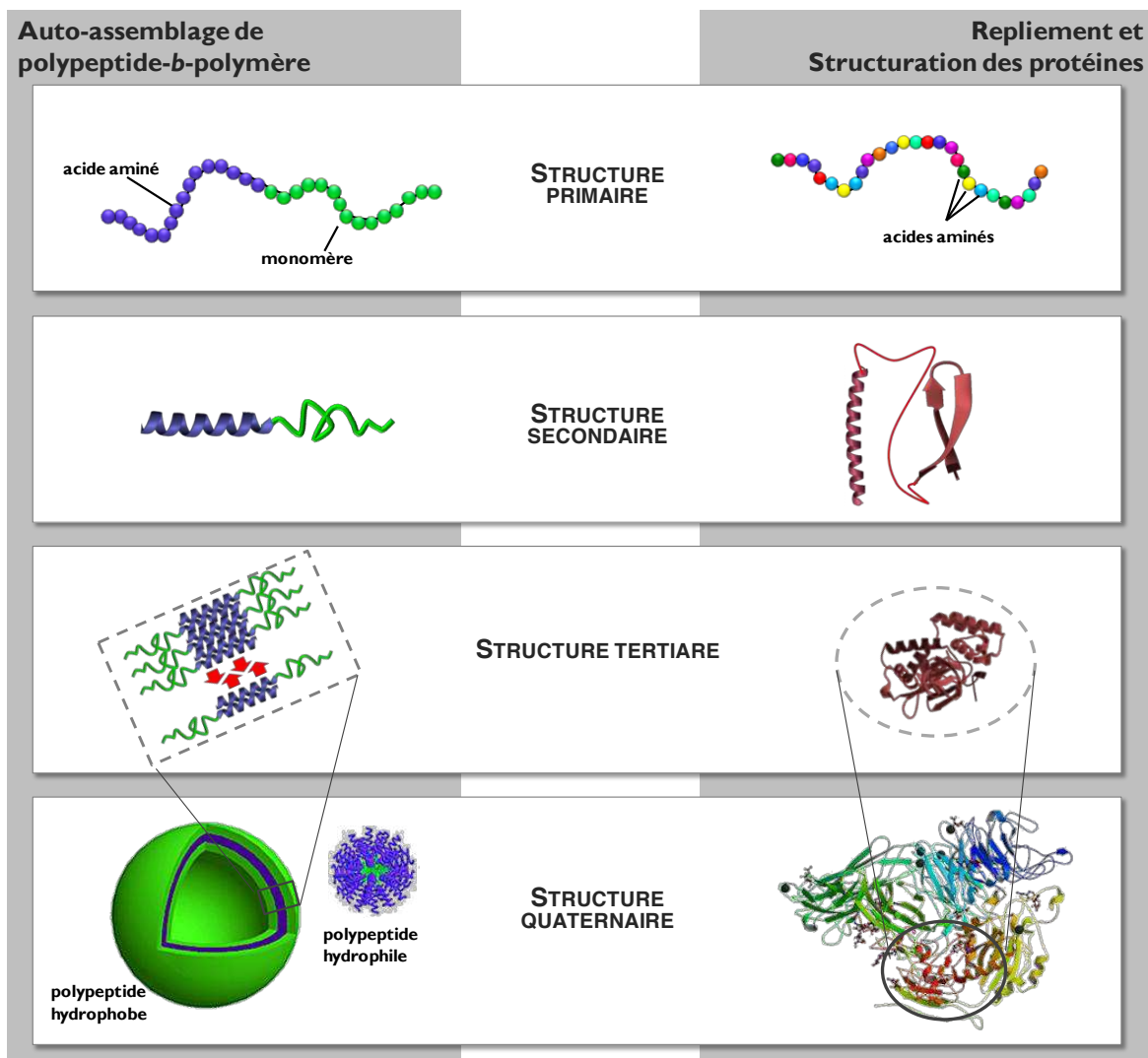


Figure 8 – Illustration schématique comparant l'auto-assemblage des copolymères à bloc amphiphiles comprenant un bloc polypeptidique au processus de repliement et de structuration des protéines. Inspiré des travaux de H. Börner.⁴⁹

L'introduction d'un bloc polypeptide au sein d'un copolymère à bloc permet donc de complexifier et de hiérarchiser l'auto-assemblage résultant. Il induit un degré d'ordre supplémentaire de la matière, de nature supramoléculaire et d'une dimension intermédiaire entre l'échelle moléculaire (1-10 Å) et l'échelle nanométrique des nanoparticules (10-100 nm). Les nanostructures formées se rapprochent en ce sens de superstructures protéiques naturelles comme les capsides virales. D'autre part, la

fonction de nombreuses protéines (membranaires, structurales) dérive de leur structure et de leur capacité à adapter leur conformation en réponse à un stimulus physiologique ou moléculaire. Cette dynamique structurale est permise par la réactivité des groupements fonctionnels portés par les chaînes latérales des acides aminés : acide ou basique, protiques, aromatiques, souffrés, aminés, etc. De la même façon, les auto-assemblages polypeptidiques vont pouvoir interagir avec le milieu biologique et se modifier ou se déstabiliser en réponse à un stimulus physiologique comme le pH ou la température.

Lorsque le bloc peptidique introduit est hydrophobe et ne possède pas de fonction latérale spécifique, l'apport est essentiellement structural. Il peut en revanche fortement influencer le type de morphologie obtenue, la stabiliser et la complexifier.

I.2.1. INTRODUCTION D'UN POLY(ACIDE AMINE) HYDROPHOBE AU SEIN D'UN COPOLYMÈRE A BLOC AMPHIPHILE

I.2.1.1. Bloc peptidique hydrophobe présentant une structure secondaire

La structuration secondaire d'un bloc polypeptide en hélice ou en feuillet β lui confère un caractère rigide (baton – rod-like). Comme indiqué précédemment, ceux-ci ont tendance à s'associer et à s'aligner parallèlement. Inclus dans un copolymère à bloc amphiphile, ils favorisent une organisation bidimensionnelle lamellaire de la phase hydrophobe de l'auto-assemblage conduisant à une faible courbure interfaciale et donc à la formation de vésicules ou de micelles cylindriques.^{32, 35, 36} Ce phénomène, qui a été reportée dans la littérature pour divers acides aminés hydrophobes listés ci-après, s'accompagne d'une déviation importante des morphologies observées vis-à-vis des prédictions théoriques basées sur la balance hydrophile/hydrophobe.

i. Poly(γ -benzyl-L-glutamate) – PBLG

Le poly(γ -benzyl-L-glutamate) (PBLG), qui est en fait un poly(acide glutamique) dont les fonctions acide carboxylique sont protégées par un groupement benzyl, est un exemple très étudié de bloc poly(acide aminé) hydrophobe⁵⁰⁻⁵⁸ qui se replie en une hélice α très rigide, stabilisée par des interactions dipolaires de type π -stacking entre les groupes benzyliques. Alors que Cho *et al.* ont mis en évidence sa conformation hélicoïdale au sein de micelles PBLG-*b*-PEG⁵³, Iatrou *et al.*⁵⁴ ont montré qu'intégré au sein de triblocs PLys-*b*-PBLG-*b*-PLys, il permet grâce à sa rigidité d'obtenir des vésicules sur une gamme très large de fraction hydrophobe allant de 19 à 74%. Cette propension a été exploitée au sein de notre équipe afin d'obtenir des vésicules biomimétiques à base de PBLG-*b*-polysaccharide.⁵⁵⁻⁵⁷ Récemment, Lin *et al.* ont prouvé, expérimentalement et par simulation numérique, que la dénaturation de l'hélice α du bloc PBLG d'un copolymère PBLG-*b*-PEG (M_w PBLG=

158000, M_w PEG=20000) à l'aide TFA, qui passe donc d'un état rigide à un état flexible, s'accompagne d'une transition de morphologie micellaire de cylindrique à sphérique.⁵⁹ Enfin Cai *et al.* ont obtenu à partir de mélanges de PBLG de masses molaires variables avec un PEG-*b*-PBLG d'une fraction massique hydrophile de 40% des structures fibrillaires ou annulaires super-hélicoïdales remarquables (Figure 9).⁵⁸

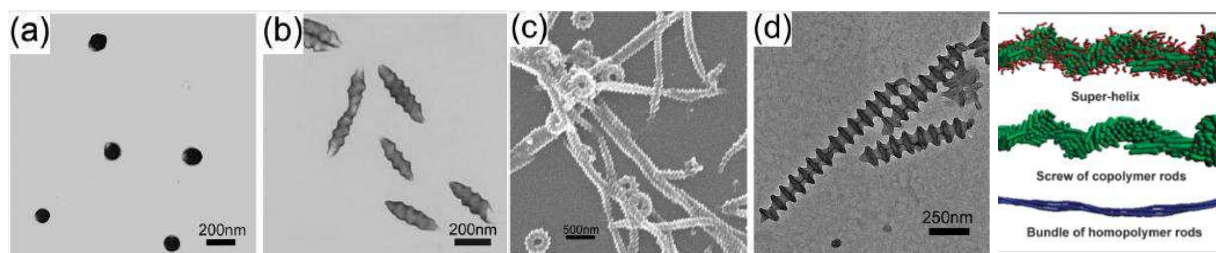


Figure 9 – Clichés de TEM (a, b) et SEM (c,d) de structures obtenues par Cai *et al.*^{38, 58} à partir de mélanges PBLG-*b*-PEG/PBLG a) PBLG₃₁₀₀-*b*-PEG₂₀₀₀ et PBLG₄₀₀₀ b) PBLG₃₁₀₀-*b*-PEG₂₀₀₀ et PBLG₁₁₀₀₀₀ c) PBLG₃₁₀₀-*b*-PEG₂₀₀₀ et PBLG₅₂₀₀₀₀ d) PBLG₃₁₀₀-*b*-PEG₂₀₀₀ et PBLG₅₂₀₀₀₀ formés à 40°C e) simulation prédictive de l'agencement des blocs – bleu: PBLG, vert: PBLG du PBLG-*b*-PEG, rouge: PEG.

ii. Poly(L-leucine) – PLeu

Comme le PBLG, le poly(L-leucine) se replie en hélice α . Cette propriété a été exploitée avec succès par Deming *et coll.* afin d'induire la formation de vésicules avec différents blocs hydrophiles associés (Figure 10).⁶⁰⁻⁶⁵ Ils ont aussi obtenu à partir de PLeu-*b*-PLys à faible concentration des hydrogels nanostructurés en fibrille ou ruban grâce à l'alignement des hélices de poly(L-leucine) dont les propriétés rhéologiques sont modulables *via* l'architecture du copolymère.⁶⁶ Wang *et al.* ont rapporté que la structuration en hélice du bloc PLeu d'un copolymère Mannose-PEG-*b*-PLEu d'une fraction hydrophile de 29% est partiellement responsable de l'obtention de micelles cylindriques plutôt que sphérique.⁶⁷ Constancis *et al.* ont obtenu à partir de PLeu-*b*-PGlu des objets en forme de palet résultant de l'alignement des hélices hydrophobes.⁶⁸ Au sein d'architectures moléculaires plus complexes, le PLeu permet d'obtenir des morphologies plus singulières. Ainsi alors que des triblocs PLeu-*b*-PEG-*b*-PLEu et (PLEu-*co*-PAIa)-*b*-PEG-*b*-(PLEu-*co*-Pala) forment des micelles sphériques de type « fleur »,^{69, 70} l'équipe de Kimura *et coll.* a obtenu par auto-assemblage de diblocs Poly(Sarcosine)-*b*-Poly(Leu-Aib) et de « triskels » moléculaires Poly(Sarcosine)₂-*b*-His-Poly(Leu-Aib) respectivement des nanotubes⁷¹ et des nanorouleaux⁷² grâce à l'empilement des blocs hélicoïdaux (Figure 10).

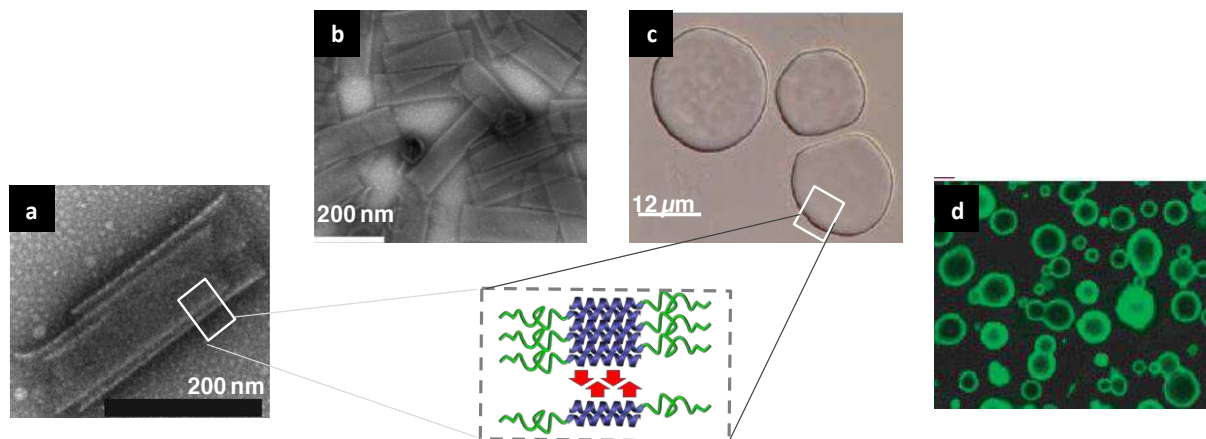


Figure 10 – Clichés de TEM (a,b) et de microscopie confocale (c,d) de structures à phases lamellaires favorisées par l'empilement d'hélices PLeu. a) Nanorouleaux de Poly(Sarcosine)2-b-His-Poly(Leu-Aib),⁷² b) nanotubes de Poly(Sarcosine)-b-Poly(Leu-Aib), c) et d) vésicules de PLeu-b-PLys. Adaptée de Kanzaki et al.⁷¹ et Holowka et al.⁶¹

iii. Poly(L-alanine) –PALa

La soie d'araignée est une fibre de protéine naturelle aux propriétés mécaniques exceptionnelles. Une partie de ces fibres est composée de domaines riches en résidus alanine dont la conformation en feuillet β antiparallèle est à l'origine de leur solidité. Cette tendance du résidu alanine à induire la formation de feuillet β est très utilisée pour la formation d'hydrogels, mais a aussi été exploitée comme source de structuration au sein d'auto-assemblages nanométriques à base d'amphiphiles. Restant proche de la protéine naturelle, Kaplan et coll. ont étudié l'auto-assemblage en solution de copoly(peptide) recombinants dérivés de la soie d'araignée.^{73, 74} Ils ont observé selon la fraction hydrophile la formation de diverses morphologies originales (micelles sphériques, nanofibres, microparticules poreuses), présentant une structuration importante en feuillet β des blocs hydrophobes et directement corrélée au nombre de résidus alanine. Concernant le poly(L-alanine) de synthèse, Jeong et coll. ont rapporté qu'au-delà d'une certaine concentration, les blocs PALa d'un copolymère PALa-b-PEG s'assemblent en feuillet β structurant le système en nanofibres.⁷⁵ La chiralité des résidus est ici primordiale puisque le D-isomère ne se structure pas. Lorsque le ratio hydrophile augmente une transition partielle vers une structure en hélice α s'opère qui amène à la formation de micelles sphériques.⁷⁶ La génération de structures fibrillaires a aussi été mise en évidence pour des systèmes PALa-b-PEG-b-PALa complexés avec de l'acide hyaluronique⁷⁷ et un dibloc PVP-b-PALa⁷⁸. Ces derniers présentent une transition thermique sol-gel réversible intéressante pour des applications biomédicales et induite en partie par la formation de feuillets β .

iv. Autres résidus et structures

D'autres poly(acide aminé)s hydrophobes possédant une structuration secondaire ont été étudiés. Le poly(γ -benzyl-L-lysine) se replie en hélice α similairement au PBLG.⁷⁹ Le poly(γ -benzyl-L-cystéine) en revanche forme plutôt des feuillets β .⁵⁰ Sinaga *et al.* ont synthétisé des copolymères poly(acide acrylique)-*b*-poly(L-valine) qui forment des micelles sphériques au cœur hydrophobe localement structurées grâce à l'arrangement en feuillet β des blocs poly(L-valine).⁸⁰ Leur taux de structuration influe notablement sur la régularité des objets et dépend du pH. Récemment, Huang *et al.* ont obtenu des vésicules à partir de copolymères poly(L-lysine)-*b*-poly(L-tyrosine) et ont montré qu'alors que des segments courts de poly(L-tyrosine) ($DP_n=8$) s'assemblent en feuillets β , des segments plus longs ($DP_n=22,40$) adoptent principalement une conformation en hélice α .⁸¹ Il est alors possible de réticuler la phase hydrophobe de ces auto-assemblages en activant la dimérisation de ses tyrosines par une exposition aux rayonnements UV, ce qui permet de conserver et stabiliser les morphologies obtenues. Enfin Marsden *et al.* ont exploité la capacité d'une paire de poly(peptide) hélicoïdaux dénommés E et K à former l'un avec l'autre une conformation tertiaire en super-hélice (coiled-coil).⁸² Couplés respectivement à un bloc hydrophobe PS et un bloc hydrophile PEG, ils forment une fois associés un tribloc amphiphile non-covalent PS-*b*-E/K-*b*-PEG qui, en solution, génère des micelles cylindriques de façon exclusive et bien définie. La dénaturation du complexe super-hélicoïdal à chaud entraîne une réorganisation vers la morphologie sphérique classiquement observée pour un PS-*b*-PEG équivalent. En remplaçant le bloc PS flexible par un bloc PBLG rigide de longueur variable, des vésicules ainsi que des bicelles et des disques, riches en phase hydrophobe lamellaire sont alors préférentiellement formés.⁸³

1.2.1.2. Auto-assemblage par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques

Certains acides aminés présentent des chaînes latérales chargées à pH physiologique: lysine, arginine, histidine chargés positivement, acide aspartique et glutamique chargés négativement. Les poly(acide aminé)s associés sont donc des polyélectrolytes qu'il est possible de complexer ensemble. La neutralisation mutuelle de deux polyélectrolytes de charges opposées peut induire une séparation de phase et l'auto-assemblage résultant, appelé complexe polyionique (PIC), est stabilisé par un troisième bloc hydrophile neutre (Figure 11). Même si les copolymères à blocs en question ne sont pas strictement amphiphiles, le complexe électrostatique obtenu l'est et les blocs polypeptidiques complexés constituent alors la phase hydrophobe de l'objet.

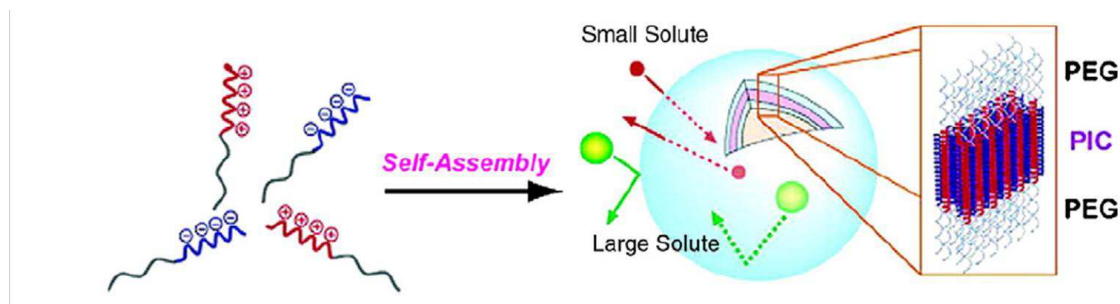


Figure 11 – Diagramme schématisant la formation de complexes polyioniques à partir de diblocs de PAsp-b-PEO/P(Asp-AP)-b-PEO. Adaptée de Kataoka et coll.^{84, 85}

Suivant ce concept, Kataoka et coll. ont conduit de nombreuses études sur la complexation de couples poly(acides aminés) ioniques : PAsp-b-PEO/PLys-b-PEO⁸⁶⁻⁸⁸ et PAsp-b-Poly(2-isopropyl-2-oxazoline)/PLys-b-Poly(2-isopropyl-2-oxazoline)⁸⁹ dotés d'un bloc poly(L-acide aspartique) chargé négativement d'une part et d'un bloc poly(L-lysine) chargé positivement d'autre part, et, plus récemment, de couples PAsp-b-PEO/ P(Asp-AP)-b-PEO^{84, 85}, ce dernier étant pourvu de chaînes latérales d'aspartamide (AP) présentant une amine primaire chargée positivement (Figure 11). Ils ont ainsi obtenu, par un procédé simple basé sur le mélange des deux poly(électrolytes), des micelles et des vésicules nanométriques (PIC micelles et PICsomes) de tailles variables en fonction des ratios hydrophile/hydrophobe et des conditions de préparation, et ce de façon bien contrôlée. La robustesse et la perméabilité de la membrane peptidique des vésicules obtenues peut être ajustée en réticulant celle-ci *via* un couplage peptidique entre les groupements $-NH_3^+$ et $-COO^-$ des chaînes latérales des résidus. Les systèmes à base de PAsp-b-PEO/ P(Asp-AP)-b-PEO présentent notamment une transition structurale de la vésicule vers la particule micellaire avec une acidification du pH.⁹⁰ Du poly(acide aspartique) judicieusement modifié en position latérale a aussi été employé en tant que bloc hydrophobe pour élaborer des micelles anticancéreuses sensibles au pH.⁹¹ Bae *et al.* ont pour cela conjugué ses fonctions acides à de l'adryamycine par une liaison hydrazone. La nature relativement hydrophobe de cet agent anticancéreux suffit à induire la séparation de phase du bloc résultant P(Asp-adryamycine) conduisant à la formation de micelles sphériques d'une dizaine de nanomètre. La liaison hydrazone est stable à pH physiologique (pH=7.4) mais s'hydrolyse dans des conditions plus acides (pH=5-6), ce qui permet un désassemblage de la nanoparticule, le PEG-b-PAsp étant hydrosoluble, et un relargage contrôlé du principe actif dans les compartiments intracellulaires (endosomes, lysosomes).

Par ailleurs, certains poly(acide aminés) électrolytes seuls sous leur forme neutralisée et repliée en hélice, comme le poly(L-acide glutamique) à bas pH ou le poly(L-lysine) à pH élevé, peuvent constituer des blocs suffisamment hydrophobes pour induire une séparation de phase. Cependant ces polypeptides étant hydrosolubles à pH physiologique, leur cas sera abordé dans la partie relative aux blocs peptidiques hydrophiles.

Le cas du poly(L-histidine) est inversé car l'histidine est un acide aminé majoritairement non protoné et donc hydrophobe à un pH physiologique standard de 7,4. En effet son pKa d'environ 6 est inférieur à cette valeur, mais il en est aussi très proche. De ce fait le poly(L-histidine) est un polypeptide « hydrophobe » très pertinent pour l'élaboration d'auto-assemblages pH-stimulables visant une déstabilisation contrôlée dans des environnements biologiques plus acides, comme le milieu extra-cellulaire tumoral ou les compartiments vésiculaires intracellulaires. Dans cette optique, respectivement à partir de copolymères PEG-*b*-PHis⁹² et PNIPAM-*b*-PHis⁹³, Lee *et al.* et Johnson *et al.* ont obtenu des micelles pouvant être déstabilisées par une baisse de pH grâce à la protonation et donc à la solubilisation, partielle ou totale, du bloc poly(L-histidine).

Enfin, des *N*-carboxyanhydrides de phenylalanine et de tryptophane ont été polymérisés ou copolymérisés pour servir de bloc hydrophobe au sein de copolypeptides amphiphiles (PLys-*b*-PPhe⁹⁴, PEG-*b*-PLys-*b*-PPhe⁹⁵, PLys-*b*-P(Trp-co-Leu)⁹⁶) mais sans qu'aucune contribution structurale ou fonctionnelle n'ait été revendiquée ou démontrée. Dans ces études, c'est plutôt le bloc hydrophile associé, en l'occurrence le poly(L-lysine), qui apporte un caractère stimuable original aux systèmes auto-assemblés. Car si lorsqu'il constitue la phase hydrophobe de l'auto-assemblage les interactions du polypeptide avec les éléments de la phase aqueuse sont limitées, à moins de désintégrer le système, un bloc peptidique hydrophile pour sa part est hydraté et exposé au milieu extérieur. L'introduction de polypeptides hydrophiles dans un copolymère à bloc vise donc surtout à apporter de l'interactivité et de la fonctionnalité aux auto-assemblages car les possibilités d'échanges avec l'environnement biologique et de variations structurales en réponse à un stimulus physiologique, essentiellement le pH ou la température, sont plus importantes.

I.2.2. INTRODUCTION D'UN POLY(ACIDE AMINE) HYDROPHILE AU SEIN D'UN COPOLYMERE A BLOC AMPHIPHILE

I.2.2.1. Bloc peptidique hydrophile présentant une structure secondaire sensible au pH et/ou à la température

Pour obtenir un polypeptide sensible au pH, les résidus présentant des groupements acides ou basiques faibles sur leur chaîne latérale sont des monomères de choix : comme le montre les exemples décrits ci-après, le poly(L-lysine) et le poly(L-acide glutamique) ont fait l'objet de nombreuses investigations. Provoqué par une modification de pH, leur passage d'un état chargé à neutre s'accompagne d'un repliement en hélice α ou en feuillet β . Cette transition structurale induit des variations importantes au sein des nanostructures obtenues, en termes de morphologie, de perméabilité, ou d'interaction de surface. Ces conformations secondaires sont aussi parfois thermosensibles et l'on obtient alors des systèmes doublement stimulables par le pH et la température.

i. Poly(L-lysine) - PLys

La lysine présente une amine primaire sur sa chaîne latérale au pKa de 10.5. A un pH supérieur à 11, le poly(L-lysine) est neutre et se replie en hélice α . Lorsque le pH diminue et passe en-deçà du pKa, ses amines sont progressivement protonées, l'hélice est dénaturée et le polymère qui se charge positivement adopte une conformation en pelote statistique. Compacts, rigides et neutres sous forme hélicoïdale, en pelote les blocs hydrophiles deviennent flexibles, volumineux et se repoussent bien plus fortement du fait de leur charge. Ces paramètres étant déterminant pour l'auto-assemblage, ce changement de conformation se répercute inévitablement sur la structure des nanoparticules. Pour des micelles de PLys-*b*-PI^{97, 98} et des vésicules de PLys-*b*-PPhe⁹⁴ et de PLys-*b*-PB^{99, 100}, une augmentation de taille significative est observée lorsque le pH diminue. Celle-ci est directement corrélée à la transition conformationnelle hélice-pelote des blocs PLys qui induit un « gonflement » de la couronne hydrophile des objets. Dans d'autres cas, une réorganisation de l'auto-assemblage vers une morphologie différente a été observée. Ainsi, Savin et coll. ont mis en évidence pour des systèmes PLys-*b*-PB une transition partielle de morphologie micellaire sphérique à cylindrique avec une augmentation du pH.¹⁰¹ Cette même équipe a aussi démontré en condition acide la réorganisation des micelles sphériques obtenues à partir de PLys-*b*-PPO-*b*-PLys en vésicules ou disques selon le ratio hydrophile lorsque le pH augmente au-delà du pKa des résidus Lysine.¹⁰²

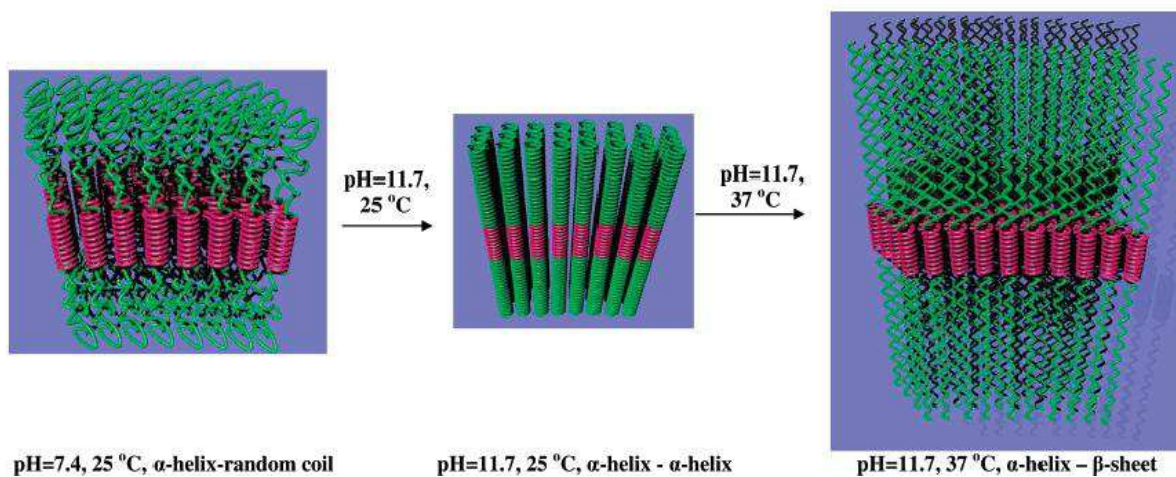


Figure 12– Représentation schématique de l'influence du pH et de la température sur la densité et les dimensions d'une bicouche de PLys-*b*-PBLG-*b*-PLys (vert: PLYs, rouge: PBLG). Adaptée de Iatrou et al.⁵⁴

Deux équipes ont également démontré par des mesures de dichroïsme circulaire qu'à pH élevé et au-delà d'une certaine masse molaire, les blocs poly(L-Lysine) peuvent s'arranger en feuillet β sous l'effet d'une augmentation de température. Iatrou et al. ont en effet rapporté une nette augmentation du rayon hydrodynamique de vésicules de PLys-*b*-PBLG-*b*-PLys quand la température augmente de 25°C à 37°C, attribuable au déploiement des chaînes poly(L-lysine) lorsqu'elles passent d'une structuration compacte en hélice à une conformation plus étendue en feuillet β (Figure 12).⁵⁴ Savin et

coll. ont observé le même phénomène au sein de vésicules PLys-*b*-PB au-delà de 45°C.¹⁰⁰ Gil *et al.* ont quant à eux étudié des micelles de PLys-*b*-PS dont les chaînes se replient en feuillets β à pH > 11,¹⁰³ ce copolymère ayant montré par ailleurs un comportement en solution original conduisant à des morphologies cylindriques quelque- soit la fraction hydrophile.¹⁰⁴

Lorsque le bloc associé au poly(L-lysine) est judicieusement choisi, la transition pH-sensible hélice-pelote peut provoquer un « flip-flop » des copolymères, l'un des blocs passant du cœur à la couronne et *vice versa*. Ceci conduit à des auto-assemblages « schizophrènes » subissant une inversion structurale de leur membrane provoquée par une variation de pH. Les vésicules à base poly(L-acide glutamique)-*b*-poly(L-lysine) développées par Lecommandoux *et coll.* en sont le meilleur exemple: à pH acide, le PGLu est neutre et replié en hélice alors que le PLys est en pelote et chargé positivement. Le premier constitue donc la phase hydrophobe de la vésicule tandis que le second correspond à la partie hydrophile externe. Pour un pH entre 5 et 9, les deux blocs sont chargés et donc le tout est zwitterionique et soluble. A pH basique > 10, le PLys neutre se replie en hélice et se compacte pour former la membrane hydrophobe de vésicules présentant à l'extérieur du PGLu chargé négativement (Figure 13).¹⁰⁵ En utilisant pour second bloc un PPO présentant une LCST autour de 10°C, Savin *et coll.* ont obtenu le même type de comportement en jouant cette fois sur le pH et la température.¹⁰⁶

Enfin Deming *et coll.* ont montré que la dénaturation des hélices PLys au sein de vésicules PLys-*b*-PLeu augmente la fluidité et la perméabilité de leur membrane.⁶¹ Il faut souligner qu'au-delà de cette transition structurale, les amines primaires du PLys peuvent être employées à d'autres fins par exemple pour réticuler l'auto-assemblage *via* une petite molécule bifonctionnelle comme le dialdéhyde glutarique⁹⁸ ou bien encore pour condenser de façon électrostatique des oligonucléotides négativement chargés en vue de leur vectorisation^{54, 95, 107, 108}.

ii. Poly(L-acide glutamique)- PGLu

Le poly(L-acide glutamique) (PGLu, également couramment désigné par l'acronyme PGA) est l'homologue anionique du PLys. Il possède une transition de l'hélice vers la conformation pelote statistique chargée négativement au-delà du pKa = 4.1 de ses fonctions acides conférant aux auto-assemblages une sensibilité vis-à-vis du pH. Par contre, cette structuration n'étant généralement pas thermosensible, le PGLu est souvent associé à un bloc polymère synthétique à LCST.¹⁰⁹⁻¹¹⁴

A partir d'un co-assemblage de PGLu-*b*-PPO-*b*-PGLu et de PPO-*b*-PGLu, Lin *et al.* ont généré des micelles dont le diamètre diminue significativement en réponse au repliement en hélice des blocs de PGLu, alors que le PPO est quant à lui sensible à la température.¹⁰⁹ Schlaad, Lecommandoux *et coll.* ont étudié le PB-*b*-PGLu.^{9, 115-118} En jouant sur le ratio hydrophile/hydrophobe, ils ont obtenu, conformément aux prévisions théoriques, micelles sphériques et vésicules. Si la taille des micelles

augmente sensiblement avec le pH et la dénaturation des hélices de PGLu, le rayon des vésicules en revanche n'est pas significativement affecté. L'impact de la transition structurale sur la taille des auto-assemblages est donc moins marqué pour le PGLu que pour le PLys. Sun *et al.* ont rapporté pour des auto-assemblages à base de triblocs PEG-*b*-PLA-*b*-PGLu un changement de morphologie de la micelle sphérique vers la micelle cylindrique lorsque le pH passe de 4.5 à 3.¹¹⁹ Toujours en utilisant des triblocs mais cette fois de PGLu-*b*-PPO-*b*-PGLu, Cai *et al.* ont observé la formation de micelles sphériques à pH basique (pH 11) qui se réorganisent sous forme vésiculaire à pH acide (pH 4.1).¹¹⁰

Comme pour le PLys, des nanoparticules « schizophrènes » ont été développées à partir de PGLu. Outre le cas du PGLu-*b*-PLys abordé précédemment,¹⁰⁵ Rao *et al.*¹¹² ainsi que Deng *et al.*¹¹³ ont conjugué le PGLu à du PNIPAM. Les copolymères obtenus forment à pH < pKa des micelles dont les hélices de PGLu constituent la phase hydrophobe. A pH basique, elles se dénaturent et redeviennent solubles. Le PNIPAM, chauffé au dessus de sa LCST qui est de $\sim 32^\circ\text{C}$, induit alors une microséparation de phase inverse. Enfin dans le registre des complexes polyioniques, Agut *et al.* ont rapporté la synthèse et l'étude de l'auto-assemblage de PDMAEMA-*b*-PGLu.¹¹⁴ Entre pH 3 et 7, lorsque les deux blocs sont chargés, des vésicules électrostatiques se forment pour lesquels le PGLu se situe au cœur. En-deçà de ce domaine de pH, le PGLu est sous forme d'hélice, et au-delà le PDMAEMA est neutralisé, le copolymère est donc soluble. A pH basique, une augmentation de température au-delà de la LCST du PDMAEMA permet d'obtenir des vésicules ou des micelles sphériques selon la fraction hydrophile dont le PGLu anionique constitue la couronne.

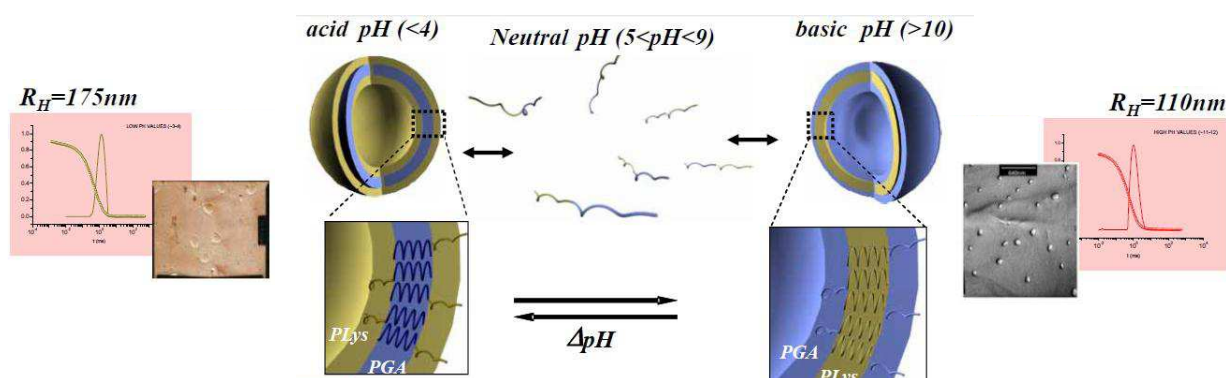


Figure 13- Représentation schématique de l'auto-assemblage de PGLu₁₅-*b*-PLys₁₅, en vésicules « schizophrènes » sensibles au pH analysées par diffusion dynamique de la lumière et microscopie électronique. Adapté de Lecommandoux et coll.¹⁰⁵

I.2.2.2. Bloc peptidique hydrophile thermosensible

Les ELPs (Elastin-Like Polypeptides) sont des poly(peptide)s dérivés du domaine hydrophobe de l'élastine constitués d'une répétition de la séquence VPGXG. Le nombre de répétitions ainsi que

nature du résidu variable X, qui peut être n'importe quel acide aminé à l'exception de la proline, influent grandement sur les propriétés physico-chimiques de ces polymères protéiques.¹²⁰ Certains d'entre eux possèdent une température basse de solubilité (LCST - Low Critical Solubility Temperature) au-delà de laquelle ils se déshydratent et deviennent insolubles. Tirant parti de cet aspect, le concept d'ELP copolymère à bloc (ELP_{BC}) thermosensible a été introduit pour la première fois en 2000 par Conticello et ses collaborateurs.¹²¹ Un bloc ELP (X=V) à LCST est associé à un bloc ELP hydrophile (X=A,G). Au-delà de la LCST du bloc thermosensible, le copolymère initialement hydrosoluble voit celui-ci s'agréger et forme en solution des micelles sphériques parfaitement définies. Depuis, le groupe de Chilkoti a exploité ce concept avec succès afin de générer *in vivo* via une hyperthermie locale la formation de micelles fonctionnelles multivalentes à l'affinité augmentée vis-à-vis de récepteurs cibles.¹²²⁻¹²⁴

Chaikof et coll. ont quant à eux développé des ELP_{BC}s dont l'un des blocs présente une structure secondaire thermosensible,¹²⁵ dont un ELP riche en tyrosine et en isoleucine qui adopte au-delà d'une certaine température ($T > 10^{\circ}\text{C}$) une conformation riche en coudes β suffisamment hydrophobe pour provoquer l'auto-assemblage du système.^{126, 127}

Dans la catégorie des polypeptides synthétiques, Zhibo et coll. ont décrit la synthèse de poly(L-acide glutamique) dont les fonctions acides latérales sont modifiées à l'aide de segments oligo(éthylène glycol) P(L-EG_x-Glu) qui se replient en hélice alpha et présentent une LCST pouvant être ajustée sur une très large gamme de température (de 30 à 70°C) selon le nombre d'unités monomériques éthylène glycol (de 1 à 3).^{128, 129} Ce caractère thermosensible a été mis à profit pour générer à partir de copolymères PEG_{45-b}-P(L-EG₂-Glu)₄₃ en le chauffant au dessus de sa LCST (53°C) des micelles cylindriques d'un diamètre de 16 nm au sein duquel la structuration en hélice du bloc P(L-EG₂-Glu) est conservée.¹³⁰ Soumis ensuite à un recuit, ceux-ci adoptent une conformation en feuillets β qui conduit le système à se réorganiser sous la forme de nano-rubans de 20 nm d'épaisseur. Tout récemment, l'équipe a étendu ce concept au résidu cystéine sur lequel le motif oligo(éthylène glycol) est cette fois introduit par une addition de Michael thiol-ène. Les poly(L-EG_x-Cys) obtenus présentent également des propriétés thermosensibles et de structuration secondaire.¹³¹

I.2.2.3. Bloc peptidique aux propriétés d'internalisation cellulaire : poly(L-arginine) – PArg

Plus en marge mais avec succès, la fonction guanidine de l'arginine a été employé par Deming et ses collaborateurs afin d'obtenir des nanoparticules aux propriétés d'internalisation cellulaire augmentées. En effet, comme nous le détaillerons plus tard, ce résidu joue un rôle capital dans l'import cytoplasmique de certains peptides d'internalisation cellulaire cationiques. Cette équipe a

donc développé des vésicules de PLeu-*b*-PArg mimant ces transporteurs moléculaires. Leur internalisation rapide et sans perturbation de l'auto-assemblage a été mise en évidence *in vitro*.^{62, 132}

I.2.2.4. Bloc peptidique sensible au potentiel d'oxydoréduction : poly(L-cystéine) - PCys

Les résidus cystéine possèdent un rôle essentiel dans la structuration supérieure des protéines puisqu'ils peuvent s'oxyder entre eux pour former des ponts disulfures (-S-S-) covalents mais réversibles en conditions réductrices. Tirant profit de cette propriété, Sun *et al.* ont mis au point des micelles de PLA-*b*-PCys dont la couronne hydrophile est réticulée par la formation de ponts disulfures entre les chaînes de poly(L-cystéine) et ce réversiblement en présence de DTT, un agent réducteur doux.¹³³ Dans le même esprit, Kim *et al.* ont montré qu'au sein de micelles de copoly(peptide) à base d'ELP recombinants, la réticulation intra-chaîne par pontage disulfure à l'interface entre le cœur et la couronne permet de stabiliser sensiblement l'auto-assemblage dans des conditions physiologiques (à 37°C et concentration élevée en protéines).¹²⁶

CONCLUSION

L'emploi de segments polypeptidiques comme tout ou partie de copolymères à blocs amphiphiles a permis à la communauté scientifique des polymères et colloïdes de tirer le meilleur profit de la puissance et de la diversité de structuration des protéines. Objet d'une littérature récente mais déjà riche principalement tournée vers les homopoly(acide aminé)s, il permet l'accès à des auto-assemblages balayant un large panel de morphologies parfois inédites et dotés d'un degré d'organisation supérieur par rapport aux copolymères conventionnels. Cet apport structural est basé pour l'essentiel sur l'aptitude qu'ont ces polymères biomimétiques à adopter des conformations secondaires à la fois rigides et dynamiques. De part leur stabilité, ces interactions intra et inter-chaînes, tout en complexifiant le phénomène d'auto-assemblage, ne le rendent pas moins contrôlable et contribue à la stabilisation des objets formés. D'autre part leur caractère réversible et sensible à l'environnement chimique les rend structurellement interactifs vis-à-vis de stimuli biologiques comme le pH, la T°C ou le potentiel d'oxydoréduction. Ces nanomatériaux, qui bénéficient aussi du caractère biocompatible des protéines, sont donc des candidats de choix pour le développement de vecteurs « intelligents » capable de délivrer localement un cargo *via* une déstabilisation structurale ou un changement de morphologie provoqué par une variation spécifique d'un paramètre environnemental comme le pH ou la température. Cependant, si le mimétisme structural avec les protéines naturelles qu'ils proposent est à la fois convaincant et plein de promesse, le mimétisme fonctionnel reste en revanche très primitif. Bien qu'ils soient sensibles à des paramètres

physiologiques, ces auto-assemblages polypeptidiques ne sont pour la plupart pas activement biofonctionnels. En effet, trois points les distinguent des protéines naturelles : premièrement ils sont encore trop simples avec un ou deux blocs alors que les protéines présentent bien plus d'hélices et de domaines à feuillet β par unimère. Au-delà de cet aspect, ils sont dépourvus d'une véritable séquence primaire, indispensable à une interaction spécifique pour la plupart des protéines impliquées dans la reconnaissance moléculaire comme les enzymes, les hormones, les anticorps, les récepteurs membranaires, etc. Pour pallier à cette limitation, la production recombinante de polypeptides présente de sérieux atouts car elle permet d'introduire facilement et précisément des séquences peptidiques fonctionnelles au sein du matériau.⁴⁵ Enfin, les polypeptides étudiés jusqu'alors ne présentaient pas de modifications post-traductionnelles, comme la glycosylation de certains résidus, phénomène encore mal connu mais intervenant dans de nombreux processus biologiques essentiels, notamment pour la reconnaissance cellulaire.¹³⁴ Afin de relever ce challenge et de pousser encore plus loin le biomimétisme, Deming, Heise, Schlaad, Lecommandoux, Hammond et Menzel s'intéressent actuellement à la synthèse de poly(glycopeptide)s amphiphiles conduisant à des auto-assemblages à la complexité croissante capables de reconnaître spécifiquement certaines lectines (Figure 14).^{57, 63, 135}

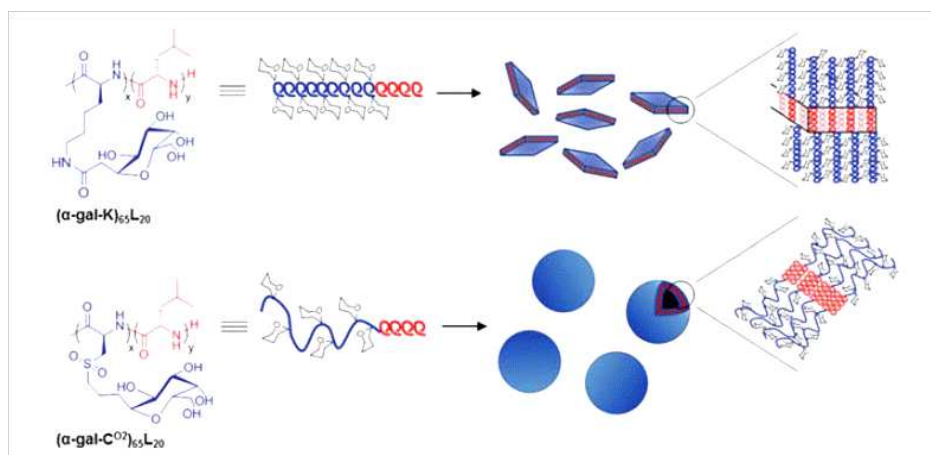


Figure 14 – Schéma illustrant la structure de diblocs copolypeptides glycosylés et les auto-assemblages observés⁶³

II. LES CHIMÈRES MACROMOLÉCULAIRES AMPHIPHILES POLYMÈRE-B-BIOMACROMOLÉCULE

II.1. DÉFINITION : ENJEUX ET PERSPECTIVES

La majeure partie de la matière vivante est faite de biopolymères. Forts de quelques millions d'années d'évolution, polysaccharides, oligonucléotides et protéines remplissent des fonctions essentielles et

variées, tant structurales que fonctionnelles, au sein de systèmes biologiques. En l'espace d'un siècle seulement, la science des polymères a révolutionné notre quotidien. La grande diversité des monomères synthétiquement accessibles à partir des dérivés de la pétrochimie et plus récemment de la biomasse, et les énormes progrès réalisés dans le contrôle des réactions de polymérisation permettent aujourd'hui d'obtenir des matériaux « sur-mesure », aux propriétés chimiques et thermo-mécaniques finement ajustables. Bien que possédant certaines similarités, les polymères d'origines naturelle et synthétique ont historiquement été considérés et étudiés par des communautés scientifiques et pour des domaines d'applications tout-à-fait différents. Depuis une vingtaine d'années cependant, les chimistes des polymères se sont tournés de plus en plus vers les polymères naturels afin de répondre aux divers enjeux actuels de notre société : épuisement des ressources fossiles, développement de matériaux plus respectueux de l'environnement, à visée biomédicales ou tout simplement possédant de meilleures propriétés.

Malgré cette volonté de convergence et les formidables efforts de recherche réalisés en vue de matériaux biodégradables, biocompatibles et biomimétiques, les polymères naturels et synthétiques demeurent fondamentalement différents sur plusieurs points.

Plutôt que de multiplier les structures moléculaires accessibles avec les éléments à sa disposition, la nature génère de la complexité en combinant à l'infini un nombre réduit de fonctions chimiques et de blocs de base à différentes échelles. Les biopolymères sont l'application directe de cet axiome : un peu plus d'une vingtaine d'acides aminés suffisent à décrire la totalité des protéines du vivant. Leur variété résulte en revanche de l'infinité des combinaisons de ces briques de bases au sein d'une même chaîne. Deux sucres - le ribose et le désoxyribose - et cinq bases azotés - la thymine, la cytosine, l'adénine, la guanine et l'uracile - il n'en faut pas plus pour coder et transcrire le génome d'un organisme vivant. Quant aux polysaccharides, ils présentent des ossatures carbohydratées fortement semblables différant essentiellement par des isoméries de position ou de chiralité et des différences de fonctionnalisation des groupements hydroxyles. En suivant ce principe, les systèmes biologiques attribuent une structure moléculaire unique et une fonction spécifique à chacun de leurs agents macromoléculaires.

Allant à l'encontre de cette logique conservatrice, la force des polymères de synthèse réside dans la variété chimique de leurs synthons. En effet, leurs propriétés découlent pour l'essentiel de la nature du ou des monomères qui le constitue(nt). Grâce à la boîte à outils désormais bien équipée de la chimie moléculaire, il est possible d'obtenir des macromolécules aux propriétés singulières et précisément ajustées vis-à-vis de stimuli divers, naturels (pH, T°C) ou non (radiations UV, RX, etc.). Toutefois, malgré de nombreux progrès dans la maîtrise des techniques de copolymérisation, le contrôle de l'enchaînement des monomères demeure assez grossier. Intrinsèquement dotés d'une dispersité en masse et dépourvus de séquences primaires exactement définies, les polymères

synthétiques sont limités en terme de possibilités de structuration et d'interaction moléculaire spécifique, et ce de façon inhérente. En revanche, ils possèdent quelques avantages sur leurs homologues naturels: leur synthèse est plus simple et moins coûteuse, ils possèdent des capacités d'auto-assemblage puissantes et contrôlées expérimentalement, ils sont en général chimiquement, thermiquement et biologiquement plus stables. Enfin, leur nature synthétique peut-être un atout pour résister plus longtemps aux enzymes, qui ont plus de mal à cliver certaines liaisons chimiques non-naturelles comme les carbonates, ou passer inaperçu auprès des agents du système immunitaire, comme sait si bien le faire le poly(éthylène glycol).

Combiner des polymères d'origines naturelle et synthétique est donc une stratégie extrêmement séduisante et moderne pour accéder à des matériaux hybrides supérieurs conjuguant les avantages de chacun et dépassant leurs limitations respectives. Cette idée est à la base d'un axe de recherche émergeant et très actif en science des matériaux qui a fait l'objet de plusieurs revues publiées récemment (Figure 15).^{49, 136-140}

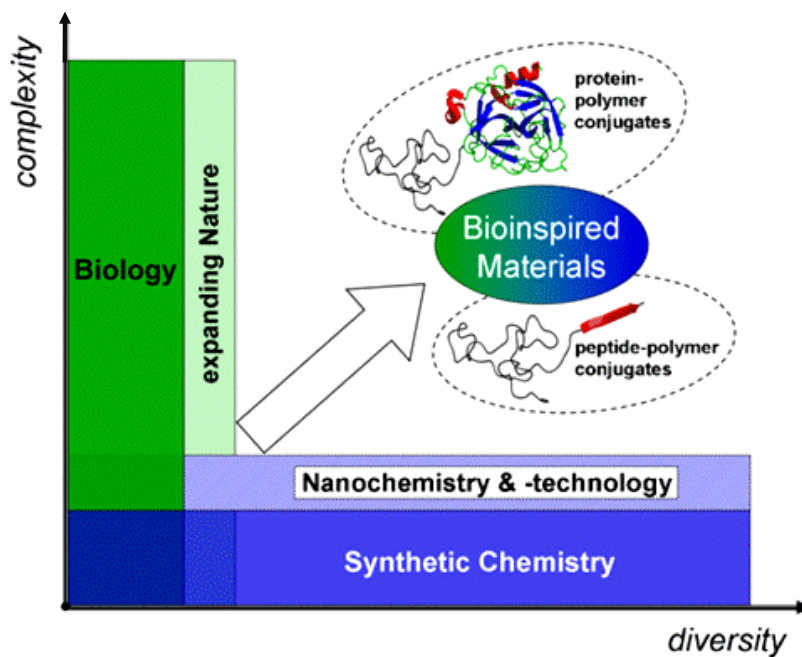


Figure 15– Schéma comparatif mettant en regard les systèmes synthétiques et biologiques vis-à-vis de leur complexité et de leur diversité. Reproduit de la référence ⁴⁹, adapté de Lecommandoux et coll.⁹

Les applications potentielles de ces conjugués « hybrides » mi-synthétiques mi-naturels sont multiples: biocapteurs, enzymes artificielles, photosystèmes, dispositifs nanoélectroniques, etc. Cependant la conception de matériaux à visées biomédicales reste l'objectif principal des études disponibles à ce jour dans la littérature et cela n'est pas un hasard car les concepts et les bases de cette recherche proviennent du domaine de la biologie et la chimie pharmaceutique.

Dans les années 70, le Professeur Davis et ses collaborateurs ont cherché un moyen de diminuer le caractère immunogène et d'améliorer la stabilité des protéines, dans le but ultime d'augmenter leur

temps de circulation dans l'organisme et donc leur efficacité en tant que principe actif. Ils ont proposé pour cela de les conjuguer de façon covalente à un polymère hydrosoluble et biologiquement inerte. Le poly(éthylène glycol) (PEG) et l'albumine de sérum bovin (Bovine serum albumine - BSA) ont été respectivement choisis comme modèle de polymère et de protéine et les résultats se sont avérés plus que concluants.¹⁴¹ Cette découverte a suscité un grand enthousiasme et la « PEGylation » est depuis devenue une technique courante en pharmacologie pour protéger, améliorer la solubilité, minimiser les effets secondaires et augmenter le temps de circulation d'un principe actif grâce au caractère « furtif » du poly(éthylène glycol).¹⁴²⁻¹⁴⁴

Ces avancées ont permis aux chimistes des polymères d'entrevoir les nombreuses possibilités offertes par l'alliance de polymères synthétiques et de molécules naturelles ou biologiquement actives. La synthèse et l'étude de bioconjugués hydrosolubles, ou bioconjugaison, qui désigne une construction moléculaire alliant une biomolécule à un partenaire d'origine synthétique s'est ainsi considérablement développée et l'introduction de polymères, PEG essentiellement, dans les systèmes biologiques est aujourd'hui un domaine de recherche mature.¹⁴⁵ En revanche, l'introduction d'une biomacromolécule en lieu et place d'un matériau est un concept encore relativement nouveau mais qui fait son chemin notamment dans le domaine des nanotechnologies et en particulier dans celui des copolymères à blocs amphiphiles.

En effet, comme nous l'avons abordé précédemment, les copolymères à blocs amphiphiles permettent d'accéder en solution à des nanostructures bien contrôlées mais aux capacités d'interactions biologiques spécifiques limitées. Une approche très répandue pour remédier à ce point faible est de fonctionnaliser leur surface à l'aide de molécules bioactives, le plus souvent des ligands récepteur-spécifiques (anticorps, peptides, aptamères, petites molécules organiques, saccharides).¹⁴⁶ Cependant, ce type de stratégie présente des inconvénients non-négligeables: de nombreuses étapes, une caractérisation délicate de la structure et de la surface des objets, des problèmes de reproductibilité et de synthèse à grande échelle, etc.⁴⁵ Une autre possibilité plus audacieuse et plus directe est donc de remplacer l'un des deux blocs du copolymère par une biomacromolécule. On obtient alors une macromolécule chimérique super-amphiphile liant deux blocs fortement incompatibles capable de s'auto-assembler en solution et de générer des nanoparticules biofonctionnelles spontanément en une seule étape (Figure 16).

Différentes appellations existent dans la littérature pour désigner une macromolécule présentant un bloc polymère et un bloc biomacromoléculaire - protéine, peptide, oligosaccharide ou oligonucléotide - liés de façon covalente: bioconjugués polymères, copolymères à blocs bio-hybrides ou bien encore chimères macromoléculaires. Le terme hybride faisant plutôt référence à des matériaux mixtes organiques/inorganiques et celui de bioconjugué englobant une plus large de gamme de molécules possédant une partie biologique, nous préférons le terme de chimère

macromoléculaire qui évoque selon nous de façon appropriée la dualité de la construction et le contraste existant entre ses deux blocs, de part leurs origines et leurs propriétés (hydrophobie/hydrophilie, polarité, proticité, contraintes structurales).

Si le bloc biologiquement actif est hydrophile, il se retrouve à l'issue de l'auto-assemblage en solution aqueuse en surface de la structure, solvaté et disponible pour interagir avec l'environnement. Le polymère hydrophobe dans ce cas permet de maintenir la cohésion de l'objet, mais constitue également un réservoir pour d'éventuelles molécules d'intérêt. Le cas inverse, plus rare et combinant une biomacromolécule hydrophobe et un polymère hydrophile, peut être envisagé afin de protéger ou d'améliorer la biodisponibilité de la biomolécule qui se retrouve au cœur de la nanoparticule, le polymère hydrophile servant alors de comptabilisant et de coquille protectrice.

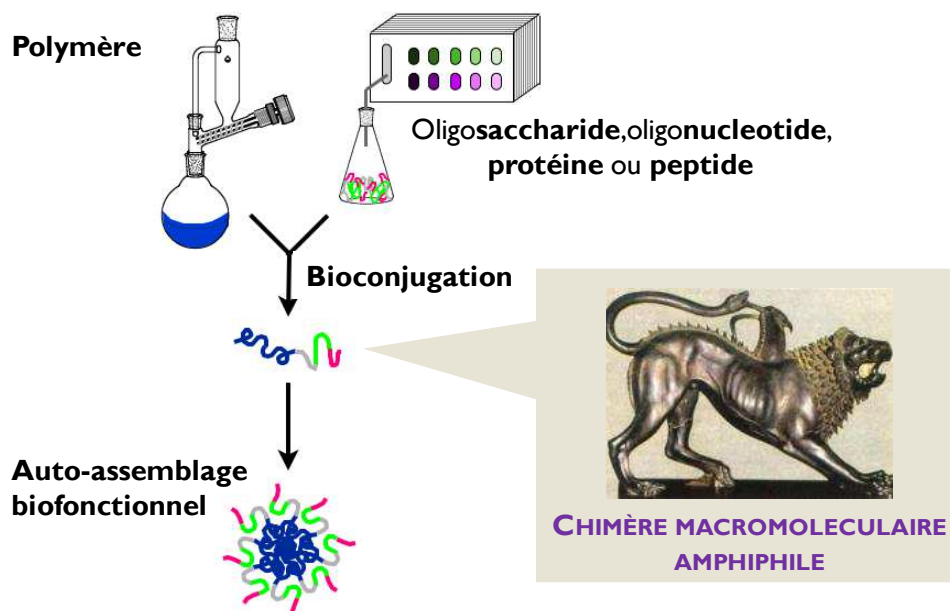


Figure 16– Auto-assemblage biofonctionnel à partir de chimère amphiphile polymère-b-biomacromolécule.

Cette approche est une option économique et polyvalente pour obtenir des nanoparticules biofonctionnelles directement à partir du matériau et sans aucune modification chimique post-auto-assemblage. Basée sur un principe biomimétique qui consiste à coder toute l'information dans la même molécule, elle se distingue fondamentalement des méthodes de fonctionnalisation conventionnelles. La pertinence de ce rationnel n'est plus à démontrer et a été largement promue *via* de nombreuses et très bonnes revues ces dix dernières années tant au sujet des peptides et protéines^{49, 139, 140} que des oligosaccharides¹³⁶ et des oligonucleotides.^{137, 138} En revanche, en regard de cet engouement et de l'apparente simplicité du concept, le nombre d'études disponibles reste relativement modéré et malgré un vaste choix, la majorité d'entre elles se concentrent sur une poignée de polymères: PS, PB, PNIPAM et polyacrylates. L'explication est simple: la synthèse, la purification et la caractérisation de chimères amphiphiles est techniquement délicate et peut s'avérer

être dans certains cas un véritable défi pour le chimiste. De plus, elle requiert la maîtrise de nombreuses compétences transverses en chimie organique, chimie des polymères, biochimie et chimie analytique.

De nombreux outils empruntés à la chimie des polymères ou celle des bioconjugués ont été développés par les chimistes afin de prendre en compte et de surpasser ces contraintes techniques. D'excellentes revues abordant de façon critique et détaillée les différentes méthodes de synthèse envisageables ont été fraîchement édités dans la littérature.^{136, 137, 139, 147-152} Aussi, nous nous contenterons dans cette partie de décrire ces différentes stratégies en se focalisant uniquement sur celles ayant été effectivement utilisées pour la synthèse de chimères polymère-*b*-biomolécule amphiphiles. Nous décrirons ensuite en détail les différents exemples étudiés dans la littérature, en les abordant selon le type de biomacromolécule et en se concentrant sur leur influence structurale et leur apport fonctionnel vis-à-vis des auto-assemblages résultants.

II.2. SYNTHÈSE : CHALLENGES ET STRATÉGIES

La synthèse de chimères amphiphiles polymère-*b*-biomacromolécule est techniquement exigeante. Certaines difficultés découlent des différences entre les biomolécules et les polymères, d'autres de la solubilité opposée des deux blocs, l'un hydrophobe, l'autre hydrophile.

II.2.1. CHALLENGES

II.2.1.1. Conjuguer deux macromolécules fondamentalement différentes

Si la finalité de l'association d'un polymère et d'une biomacromolécule est de pallier à leurs limitations respectives en tant que matériau, pour ce qui est de leurs synthèses elle a plutôt tendance à les additionner.

D'une part les biomacromolécules ont en général une structure complexe et fonctionnelle, ce qui nécessite de nombreuses étapes de synthèse et force le recours à des stratégies de protection. Du fait de ces exigences, les quantités produites sont souvent limitées, typiquement à l'échelle du mg. A l'inverse, la polymérisation permet de produire des macromolécules de très grande masse molaire en une seule étape et en grande quantité. La chimie des polymères en laboratoire opère donc à l'échelle du gramme. Ainsi, alors qu'une dizaine de mg peut constituer une part substantielle du fruit de la synthèse fastidieuse d'une biomacromolécule, cela représente l'échantillon standard à prélever sur un produit de polymérisation pour effectuer une analyse de routine dans de bonnes conditions.

D'autre part, les biomacromolécules sont à l'issue de leur synthèse structurellement bien définies et très pures, ou du moins faciles à purifier. En revanche, la polymérisation pêche en matière de précision car ses mécanismes sont complexes et ne peuvent pas toujours être parfaitement contrôlés. Des réactions de couplage ou de terminaison indésirables peuvent entraîner une augmentation de la polydispersité et une perte de fonctionnalité aux extrémités des chaînes et il est ensuite très difficile de séparer les différents produits de la réaction, car, vis-à-vis des techniques de purifications usuelles, la nature du monomère prédomine sur les autres paramètres chimiques comme la masse molaire ou les fonctions présentes à l'extrémité des chaînes.

Ainsi, la synthèse des polymères, facile mais qui peut manquer de précision, risque d'abaisser la définition moléculaire du système tandis que la synthèse des biomolécules, précise mais exigeante, peut limiter l'échelle de l'étude ou bien augmenter son coût, les deux options étant relativement problématiques pour une application dans le domaine des matériaux en général gourmand en quantité de matière.

A ces difficultés de synthèses s'ajoutent les contraintes de caractérisation liées à la nature propre des deux blocs. En effet, les polymères de synthèse et les biomolécules sont généralement caractérisés par des techniques semblables mais dans des conditions différentes.

Les colonnes de chromatographie d'exclusion stérique (SEC) utilisées pour analyser les polymères ne sont pas forcément compatibles, et *vice versa*, avec les biomacromolécules, susceptibles d'interagir avec la phase stationnaire et de perturber l'élution du fait de leur charge ou de leur structure moléculaire ou secondaire.

En spectroscopie de RMN, les spectres obtenus sont différents: celui d'un polymère présente peu de signaux très intenses alors que celui d'une biomacromolécule affiche beaucoup de signaux de bien moindre intensité. Dans le cas d'une chimère, les signaux de la biomolécule « écrasés » par ceux du polymère risquent de se fondre dans le bruit de fond et il est alors difficile de comparer les intégrations.

L'un des outils de prédilection pour l'analyse des biomolécules est la spectrométrie de masse. Les polymères, dont la masse molaire élevée impose une ionisation laser assistée par une matrice (MALDI), s'ionisent assez peu et sont donc souvent difficilement détectables par cette technique.

II.2.1.2. Allier un bloc hydrophile et un bloc hydrophobe

Viennent ensuite les contraintes de synthèses imposées par la nature amphiphile de la chimère finale. L'un des blocs étant hydrophile et l'autre hydrophobe, les solvants communs aux deux parties et susceptibles d'être utilisés pour la synthèse sont rares : DMSO, DMF, parfois acétonitrile. La

réactivité et la compatibilité des autres réactifs (base, catalyseurs) dans ces conditions doivent également être prises en compte.

Enfin, ce caractère amphiphile réduit aussi les possibilités de caractérisation des chimères car parfois le solvant commun n'est pas adapté aux techniques d'analyse, qui requièrent la plupart du temps de solubiliser le produit. C'est particulièrement le cas avec le DMSO. En SEC, son indice de réfraction élevé peut atténuer voire éteindre ou inverser la détection RI de certaines molécules et ainsi empêcher une analyse quantitative de l'échantillon.^{153, 154} D'autre part, il n'est pas compatible avec la technologie MALDI-TOF qui nécessite par ailleurs de trouver une matrice adéquate pour les deux blocs de la chimère.

Ce dernier point est particulièrement critique car une bonne caractérisation du système est indispensable tant dans la mise au point de sa synthèse qu'en vue de son auto-assemblage et de son application en tant que matériau.

II.2.2. STRATEGIES DE SYNTHÈSE

Pour toutes ces raisons, la méthode de synthèse doit être choisie de façon avisée pour allier une parfaite sélectivité avec une efficacité maximum en prenant en compte les particularités de chacun des blocs.

Différentes options ont été explorées et reportées dans la littérature. Celles-ci peuvent être classées en deux catégories :

- **Les stratégies convergentes ou « grafting to »** qui consistent à coupler en solution des blocs synthétisés au préalable séparément. Cette approche implique l'introduction de groupements réactifs aux extrémités respectives des deux blocs.
- **Les stratégies divergentes ou « grafting from »** pour lesquelles le premier bloc sert de support/macroinitiateur à la synthèse du second. Cette méthode nécessite que la molécule servant d'amorce possède la fonctionnalité adéquate à son extrémité et soit compatible avec les conditions de synthèse de la seconde.

Il est à noter qu'un certain nombre d'entre elles exploitent les avantages de la chimie sur phase solide développée pour la synthèse par étape des peptides et des oligonucléotides, qui apporte des solutions efficaces à certains des problèmes évoqués ci-dessus. Ses groupements fonctionnels latéraux étant protégés, la biomolécule est hydrophobe donc chimiquement compatible avec le polymère lors de la synthèse et la sélectivité des réactions est optimale. La purification du produit est grandement facilitée car il peut être séparé du milieu réactionnel par simple filtration. Elle présente

aussi quelques faiblesses: le point d'accroche est imposé par l'ordre d'enchaînement des résidus, les conditions de clivage sont agressives (TFA en stratégie Fmoc, HF en stratégie Boc, solution ammoniacale concentrée en stratégie phosphoramidite). Bien que suivant une logique de synthèse divergente, la chimie sur support solide est aussi compatible avec des approches convergentes, bien que le couplage d'une macromolécule sur un support solide ne soit pas trivial. En effet avant de réagir, le substrat soluble doit diffuser à travers la maille de la matrice polymère servant de support. Il n'est pas rare que cette étape limite de façon conséquente les rendements de réaction, en particulier lorsque le substrat est encombrant et donc faiblement diffusant.

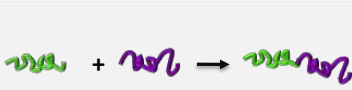

	SYNTHÈSE EN SOLUTION	SYNTHÈSE SUR SUPPORT SOLIDE
PRINCIPE		
AVANTAGES	<ul style="list-style-type: none"> • Probabilité de rencontre maximale • Mise en œuvre facile et accessible • Possibilité de purifier les produits entre chaque étape 	<ul style="list-style-type: none"> • Protections orthogonales des chaînes latérales • Purification simple et optimale par filtration et rinçage du support → Possibilité de travailler en large excès
INCONVÉNIENTS	Sélectivité et purification	<ul style="list-style-type: none"> • Accessibilité des fonctions réactives limitée par la diffusion → Moindre réactivité • Nécessite du matériel spécialisé • Clivages chimiques agressifs

Tableau I – Tableau comparant les avantages et les points faibles des voies de synthèse en solution et sur support solide.

Qu'elle soit supportée ou non, la chimie choisie doit être spécifique et efficace. Les voies de synthèse décrites dans la littérature sont détaillées ci-dessous et combinent généralement techniques de bioconjugaison et chimie des polymères. Les références correspondantes sont citées et rassemblées dans deux tableaux récapitulatifs (tableau 2 et 3) en fonction du type de biomolécule et de la stratégie de synthèse employée.

II.2.3. STRATEGIES CONVERGENTES / « GRAFTING TO »

L'approche par synthèse convergente est la plus commune et la plus polyvalente des stratégies, au vue des multiples réactions de couplage à disposition du chimiste. Les deux blocs sont synthétisés au préalable et caractérisés séparément ce qui permet l'utilisation de méthodes de synthèse «traditionnelles» et un bon contrôle de leur structure et de leur pureté avant le couplage. Cette dernière étape est généralement simple à mettre en œuvre, mais le choix de la réaction et des conditions expérimentales sont très contraints. En effet, les biomolécules présentent de nombreux

groupements fonctionnels susceptibles d'interférer avec la réaction de couplage. Elle doit donc être parfaitement sélective afin de distinguer un point d'accroche unique et spécifique entre les deux blocs, c'est-à-dire chimio-sélective vis-à-vis du système. Ensuite, à fonctionnalité égale, les macromolécules font preuves d'une réactivité expérimentale amoindrie comparées aux petites molécules et ce d'autant plus que leur poids moléculaire est élevé, du fait d'une mobilité réduite et d'une faible concentration en sites fonctionnels par unité de masse. En outre, la disponibilité du site actif peut être fortement limitée par un effet d'encombrement stérique, en particulier lorsque la molécule présente une structure secondaire. Le couplage choisi doit donc aussi être suffisamment réactif, voire quantitatif pour éviter la nécessité de travailler en excès ou de purifier le produit.

II.2.3.1. Couplages « standards » *via* des fonctions natives

La première génération des techniques de couplage met généralement en jeu une attaque nucléophile et utilise des fonctions chimiques naturellement présentes sur les biomolécules : les amines, les thiols, les groupements carbonyles.

i. Formation d'une liaison amide

La plus directe et la plus « naturelle » est la formation d'une liaison amide native *via* l'attaque d'une amine primaire sur un ester, sous forme activé ou à l'aide d'un agent de couplage peptidique. De très bon groupes partants comme l'hydroxybenzotriazole (HOBT) ou le *N*-hydroxysuccinimide (NHS) ont initialement été développés respectivement pour la synthèse peptidique sur support solide et la chimie de bioconjugaison, et sont aujourd'hui utilisés de façon standard. Si elle présente l'avantage de créer une liaison peptidique stable, cette approche souffre de son manque de sélectivité puisque les biomolécules présentent en générale plusieurs autres amines et carbonyles sur leur structure. De plus l'ester activé est sensible à l'hydrolyse.

ii. Formation d'une liaison thioéther

Cette voie nécessite la présence ou l'introduction d'un thiol sur la biomolécule capable de réagir *via* une addition de Michael avec un composé α,β -insaturé. Concernant ce dernier, le groupement maléimide, doublement conjugué et pour lequel l'addition est particulièrement rapide a progressivement supplanté le groupement vinylsulfone moins réactif.^{155, 156} Le caractère « mou » de l'électrophile rend ce couplage relativement sélectif du thiol vis-à-vis d'autres nucléophiles « durs » comme les amines primaires ou les hydroxyles. Ce caractère chimio-sélectif a contribué à sa grande popularité. Néanmoins, une compétition avec la formation de disulfures symétriques en milieu oxydant peut réduire l'efficacité de la réaction et le groupe imido résultant est susceptible d'être hydrolysé.

iii. Amination réductrice

L'hémiacétal du résidu terminal d'un oligosaccharide possède une réactivité différente de celle de ses autres hydroxyles car il est en équilibre défavorable vers sa forme ouverte moins stable exposant un aldéhyde susceptible d'être attaqué par un nucléophile. Cette extrémité réductrice native est idéale et très populaire afin de modifier sélectivement un oligosaccharide à son extrémité à l'aide d'un groupement présentant une amine primaire *via* une amination réductrice. Déplaçant l'équilibre vers la forme ouverte du sucre, l'amine forme avec l'aldéhyde un iminium secondaire réduit *in situ* en une amine secondaire à l'aide d'un réducteur, typiquement du cyanoborohydrure de sodium (NaBH_3CN).¹⁵⁷ Ce couplage intervient systématiquement dans la synthèse de chimères polymère-*b*-oligosaccharide, que ce soit pour coupler directement le polymère ou pour introduire un espaceur. Malgré sa grande sélectivité, il a le désavantage d'être assez lent et son efficacité a tendance à décroître avec la masse molaire des blocs.¹⁵⁸ Il est à préciser que, bien qu'il n'y ait pas d'exemple à ce jour pour des chimères amphiphiles, cette réaction peut également être employée afin de faire réagir sélectivement un polymère pourvu d'un aldéhyde avec l'amine *N*-terminale d'un peptide ou d'une protéine, moins basique que les amines primaires des chaînes latérales. Cependant le pH doit être scrupuleusement contrôlé afin de ne pas favoriser le couplage d'autres résidus aminés.

II.2.3.2. Couplages orthogonaux *via* des fonctions non-naturelles

Les couplages discutés ci-avant ne sont pas proprement spécifiques vis-à-vis de la chimie bioorganique des molécules naturelles basée sur la réactivité du carbonyle. Des voies de conjugaison plus récemment développées permettent d'atteindre un degré supérieur de chimio-sélectivité. Engageant des fonctions et des réactions chimiques non-naturelles, elles assurent un couplage orthogonal mais requièrent l'introduction d'une fonction non-naturelle sur la structure de la biomolécule.

i. Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen – la réaction « click »

La chimie « click » est un concept récent introduit par Sharpless et ses collaborateurs au début des années 2000. Une réaction « click » doit être rapide et quantitative, modulaire, polyvalente, stéréospécifique, sans sous-produit ni réaction secondaire, simple à mettre œuvre en conditions douces (conditions normales de pression et de température, insensible à l'oxygène et à l'eau, en masse ou solvant vert) et facile à purifier. S'inscrivant dans la mouvance de la chimie verte, la chimie « click » exige une force motrice thermodynamique très élevée. Parmi les transformations chimiques répondant à ces critères se trouvent les cycloadditions d'espèces insaturées et en particulier la cycloaddition 1,3 dipolaire entre un alcyne et un azoture initialement découverte par Huisgen dans les années 50.¹⁵⁹ En l'espace d'une dizaine d'années, elle est devenue la plus étudiée et la plus

populaire des réactions « click » grâce à la puissance de sa catalyse par le cuivre (I) mise au point simultanément par les groupes de Sharpless¹⁶⁰ et Meldal¹⁶¹ en 2002, et ce entre autres dans le domaine des polymères et matériaux.¹⁶² D'une efficacité redoutable en conditions douces et tolérante vis-à-vis de nombreux groupement fonctionnels, cette réaction est compatible avec les systèmes biologiques et ne nécessite aucune stratégie de protection puisque l'alcyne et l'azoture sont des fonctionnalités inexistantes au sein des biomacromolécules. Reste à introduire ces groupements aux extrémités de chaque blocs, mais aujourd'hui de nombreux réactifs commerciaux spécifiquement conçus facilitent cette étape : réactifs hétérobifonctionnels, « briques » moléculaires de base (building blocks) pour synthèse supportée, etc. Son seul point faible est l'utilisation d'un catalyseur métallique et de ses ligands qui peuvent induire une dénaturation ou chélater la biomacromolécule et qui doivent être consciencieusement éliminés à l'issue de la réaction.

ii. Formation d'une liaison éther d'oxime

La chimie du carbonyle de type « non-aldol » est une autre source de réactions « clicks ». La formation d'une liaison d'oxime *via* la réaction entre un aldéhyde ou une cétone et une hydroxylamine en fait partie. Initialement développée pour liée des petites molécules à des protéines,¹⁶³ cette voie présente de bons atouts pour conjuguer un polymère synthétique et une biomolécule, bien que seuls deux exemples de chimères amphiphiles synthétisées ainsi ont été décrites pour l'instant.^{164, 165} Mettant en jeux des fonctionnalités non naturelles, elle est efficace et en milieu acide, sélective des hydroxylamines vis-à-vis des autres amines et pourrait également s'avérer très utile pour fonctionnaliser les polysaccharides à leur extrémité réductrice.

iii. Couplage phosphoramidite

Le couplage phosphoramidite est aux oligonucléotides ce que le couplage peptidique est aux peptides. En effet la voie de synthèse la plus répandue des oligonucléotides sur support solide est basée sur le couplage du nucléotide (n+1) sous forme phosphoramidite avec l'hydroxyl déprotégé du ribose du résidu (n) précédent. Ce couplage supporté est donc un outil spécifique de choix pour la synthèse de chimères polymère-*b*-oligonucléotide *via* une liaison phosphate. La fonction hydroxyle terminale du polymère et le chlorure phosphoramidite sont donc d'abord mis à réagir pour former le polymère-phosphoramidite qui est ensuite couplé à l'oligonucléotide en croissance sur le support solide. Le tout est clivé et déprotégé selon les conditions classiques de synthèse supportée.

II.2.3.3. Couplages non-covalents via une liaison supramoléculaire spécifique

Certaines liaisons supramoléculaires non covalentes existant dans la nature au sein des protéines ou des gènes sont très puissantes et sont devenues des outils très populaires en biotechnologie et biologie moléculaire pour manipuler et coupler les biomolécules. Même si nous nous intéressons en priorité aux chimères covalentes, les exemples de chimères conjuguant polymères hydrophobes et protéines de façon non-covalente mais forte et ultra-spécifique méritent également d'être mentionnées.

i. Interaction biotine-streptavidine

La reconnaissance supramoléculaire spécifique entre la biotine et les glycoprotéines avidine ou streptavidine se classe parmi les plus fortes des interactions non-covalentes connues dans la nature. Alors que la biotine, petite molécule aussi dénommée vitamine H ou cofacteur R, est introduite à l'extrémité du polymère, le site de reconnaissance de la (strept)avidine est lui fusionné de façon recombinante avec la protéine d'intérêt.

ii. Reconstitution cofacteur-apoprotéine

Certaines protéines, principalement des enzymes, ne sont actives que lorsqu'elles sont liées de façon non covalente à un cofacteur, une entité chimique non biologique servant de « molécule d'assistance » aux transformations biochimiques. Les deux parties peuvent être séparées, la protéine alors inactive est appelée apoprotéine, puis reconstituées. Cette interaction supramoléculaire très spécifique a été utilisée par plusieurs groupes pour coupler une protéine à un polymère via son cofacteur greffé de façon covalente à celui-ci.

iii. Hybridation de simple-brins d'oligonucléotides complémentaires

L'appariement des simple-brins d'ADN ou d'ARN complémentaires est à l'origine leur assemblage en double hélice bicaténaire via la formation des paires canoniques de Watson-Crick (AT, AU, GC) entre les bases azotées de chaque brin à l'aide de liaisons hydrogène spécifiques et de π -stacking. Ce « zip » moléculaire possède l'avantage d'être très spécifique et réversible à haute température.

Stratégies convergentes										
Liaison covalente	Couplages via fonctions natives	Oligosaccharides	Ref.	Oligonucléotides	Ref.	Proteines	Ref.	Peptides	Ref.	
	<p>Formation d'une liaison amide</p> <chem>R1-C(=O)OX + H2N-R2 -> R1-C(=O)NH-R2</chem> OX = leaving group	PLA- <i>b</i> -βCD PA- <i>b</i> -triacétate de cellulose PLA- <i>b</i> -βCD	79 79 219	PNIPAM- <i>b</i> -ADN, PLGA- <i>b</i> -cmyc PB- <i>b</i> -cytidine, PB- <i>b</i> -ADN, PB- <i>b</i> -ADN, ELP- <i>b</i> -ADN	175 176 180 181 182 183 182 183 184				PS- <i>b</i> -GANPNAAG- <i>b</i> -PS, P ₁₀ -Tat, PS- <i>b</i> -superhélice, hyaluronan- <i>b</i> -GGNQWFI, PLGA- <i>b</i> -GFTGLX	256 270 258 259 262 266
	<p>Formation d'une liaison thioether</p> <chem>R1-N-C(=O)-CH2-SH + HS-R2 -> R1-N-C(=O)-CH2-S-R2</chem>						PNIPAM- <i>b</i> -cytochrome b PNIPAM- <i>b</i> -Sa, PNIPAM- <i>b</i> -Trypsine, PS- <i>b</i> -Lipase, PolyAlcyne- <i>b</i> -BSA BSA- <i>b</i> -PNIPAM- <i>b</i> -BSA	228 226 227 243 245 232	Tat- <i>b</i> -PLGA, GRDGSC- <i>b</i> -PEG- <i>b</i> -PB	267 257
	<p>Amination reductrice</p> <chem>R1-CHO + H2N-R2 -> R1-CH=N-R2 -> R1-CH2-NH-R2</chem> -H ₂ O	PLA- <i>b</i> -hyaluronan, PEOz- <i>b</i> -hyaluronan, PS- <i>b</i> -oligosaccharide, PS- <i>b</i> -dextran, PCL- <i>b</i> -dextran, PS- <i>b</i> -maltodextrine	209 199 204 158 205 158							
	Couplages via fonctions non-naturelles									
	<p>Cycloaddition 1,3-dipolaire alcyne-azide</p> <chem>R1-C#C + N=N=N-R2 -> R1-C=N-N-R2</chem> Cu(I)	PNIPAM- <i>b</i> -Mal, Mal- <i>b</i> -Mal _{acetyls} - <i>b</i> -Mal, PBLG- <i>b</i> -dextran, PBLG- <i>b</i> -(dextran) ₅ , PBLG- <i>b</i> -(hyaluronan) ₅ , P(SiO) ₂ - <i>b</i> -Xyloglycan	207 208 55, 56 217 217 218				PS- <i>b</i> -BSA PEGMEA- <i>b</i> -EGFP PNIPAM- <i>b</i> -BSA	242 237 235	PS- <i>b</i> -GGR-AMC PS- <i>b</i> -Tat	242 253
	<p>Formation d'une liaison oxime</p> <chem>R1-CHO + H2N-O-R2 -> R1-CH=N-O-R2</chem> X= H, R						polyacrylamide- <i>b</i> - endoglucanase, polyacrylamide- <i>b</i> -BSA	165 164		
	<p>Couplage phosphoramidite</p> <chem>R1-OH + Cl-P(=O)(NIPr2)(CH2)2CN -> R1-O-P(=O)(NIPr2)(CH2)2CN</chem> Base i) tetrazole ii) t ₂ , THF, H ₂ O iii) NH ₃						PS- <i>b</i> -ADN, PPO- <i>b</i> -ADN, PEG- <i>b</i> -PCL- <i>b</i> -ADN	177 169 185		
	Liaison non-covalente	<p>Interaction Biotine-Streptavidine</p>					PS ₂ -HRP, PS ₂ -Ferritin	238		
		<p>Reconstitution cofacteur/apoprotéine</p>					PS- <i>b</i> -HRP, PS- <i>b</i> -Mb, PEG- <i>b</i> -PS- <i>b</i> -HRP, PEG- <i>b</i> -PS- <i>b</i> -Mb PNIPAM- <i>b</i> -Mb	239 240 241 241 236		
<p>Hybridation</p>							PNIPAM- <i>b</i> -Sa	175		

Tableau 2 – Stratégies convergentes employées pour la synthèse de chimères polymère-*b*-biomacromolécule

II.2.4. STRATEGIES DIVERGENTES / « GRAFTING FROM »

Les approches divergentes consistant à synthétiser le second bloc à partir du premier sont théoriquement les plus directes et assurent que les deux blocs sont effectivement liés en un point d'accroche localisé. De plus, le bloc amorceur et la chimère résultante sont les seules macromolécules dans le milieu réactionnel et sont donc facilement séparables des petites molécules impliquées dans la réaction: monomères, catalyseur ou agent de couplage, etc. On distingue deux types de stratégies, les stratégies « macroinitiateur » pour lesquelles la biomacromolécule sert d'amorce à la polymérisation, et les stratégies inverses où le polymère sert de support à la synthèse de la biomolécule.

II.2.4.1. Stratégie « macroinitiateur » : polymérisation initiée par la biomolécule

Cette méthode nécessite d'introduire sur la biomolécule la fonction initiatrice adéquate et surtout que la polymérisation soit compatible avec les autres groupements fonctionnels présents sur cette dernière et opérant en conditions douces pour ne pas dégrader la biomolécule. Les techniques pratiquement accessibles dépendent donc fortement de la nature du bloc biomoléculaire. Par exemple, les polymérisations de type anionique ou cationique sensibles aux groupements protiques polaires et aux nucléophiles seront très difficilement contrôlables en présence de biomolécules. En revanche, les polymérisations de type radicalaire sont très tolérantes à ces mêmes groupements.

Si quelques exemples de polymérisation radicalaire sans agents de transfert existent, l'avènement récent des techniques de polymérisation radicalaire contrôlée, d'abord en présence de nitroxydes (Nitroxide Mediated Polymerization (NMP)) puis par transfert d'atome (Atom Transfert Radical Polymerization (ATRP)) et par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT)) a considérablement contribué au développement des synthèses divergentes (Tableau 3). Pour les peptides et protéines, riches en fonctions carbonyles et en amines, les chimistes sont quasi-exclusivement restreints à ces approches radicalaires au demeurant très performantes et donc très populaires, à l'exception d'un exemple de polymérisation de *N*-carboxyanhydride sur support solide. L'agent de transfert de chaîne est généralement introduit par voie chimique en position terminale ou *via* un résidu pré-ou post-fonctionnalisé mais récemment Peeler *et al.* ont réussi à insérer un agent RAFT par voie recombinante à une position définie dans la séquence d'une protéine *via* un résidu phénylalanine modifié.¹⁶⁶ L'ATRP est la plus courante des trois techniques car elle est la plus simple expérimentalement et dont les agents de transferts sont le plus accessibles commercialement. Cependant elle nécessite l'utilisation d'un catalyseur métallique et le nombre de monomère existants est relativement limité contrairement à la RAFT, moins répandue du fait de la faible commercialisation de ses agents de transfert. Reste que les polymères jusque là obtenus par voie radicalaire possèdent un squelette aliphatique. Leur biocompatibilité et leur biodégradabilité est moindre par rapport à celle de polymères comme les polyesters, les polycarbonates ou les polypeptides polymérisés en général par ouverture de cycle. Dans le cas des oligosaccharides, en plus des voies radicalaires, on trouve des exemples de polymérisation par ouverture de cycle du THF, de la caprolactone et du *N*-carboxyanhydride de γ -benzyl-L-glutamate. En revanche, aucun exemple de synthèse divergente n'est disponible à ce jour pour les oligonucléotides.

II.2.4.2. Stratégie inverse : biomolécule synthétisée à partir d'un polymère

Seuls trois exemples ont été décrits dans la littérature, suffisamment singuliers pour être cités ici au cas par cas. Loos *et al.* ont synthétisé des copolymères polystyrène-*b*-amylose par élongation enzymatique d'un polystyrène-maltoheptaose, lui-même obtenu par amination réductrice d'une β -cyclodextrine.^{167, 168} Celui-ci est dispersé en solution sous forme micellaire où la partie sucrée sert d'amorce à la polymérisation de l' α -D-glucose-1-phosphate catalysée par l'enzyme phosphorylase de pomme de terre.

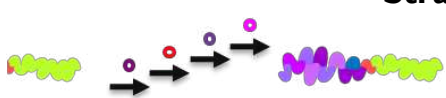
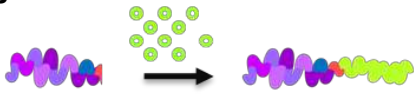
		Stratégies divergentes			
					
		<i>Oligosaccharides</i>	<i>Oligonucléotides</i>	<i>Proteines</i>	<i>Peptides</i>
		<i>Ref.</i>	<i>Ref.</i>	<i>Ref.</i>	<i>Ref.</i>
Polymérisation "macroinitée" par la biomolécule	<i>Polymérisation radicalaire</i>	PNIPAM- <i>b</i> -amylose 212 P(MMA-co-NIPAM)- <i>b</i> -amylose, polychloroprène- <i>b</i> -triester de cellulose 193 PS- <i>b</i> -triester de cellulose 198 PICBA- <i>b</i> -dextran 210 211 PS- <i>b</i> -oligosaccharides 195 196			PNIPAM- <i>b</i> -FEFEFKFK 264
	<i>NMP</i> <i>Polymérisation radicalaire contrôlée en présence de nitroxydes</i>				PS- <i>b</i> -PAA- <i>b</i> -Tritrpticin 154 PMA- <i>b</i> -PAA- <i>b</i> -Tat 251
	<i>ATRP</i> <i>Polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome</i>	PS- <i>b</i> -cellulose, 201 PS- <i>b</i> -dextran, 200 203 PMMA- <i>b</i> -Mal 194		FNIPAM- <i>b</i> -Sa, 230 FNIPAM- <i>b</i> -BSA, 164 250 FNIPAM- <i>b</i> -lysozyme, 231 PS- <i>b</i> -BSA, 244 polyalcyne- <i>b</i> -BSA 245 246	PNMA- <i>b</i> -SGAGAEGAGAS- <i>b</i> -153 PMMA P(DEGMA-ME)- <i>b</i> -GRKFG, 261 PS- <i>b</i> -PAA- <i>b</i> -Tritrpticin 154
	<i>RAFT</i> <i>Polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation</i>			FNIPAM- <i>b</i> -BSA 233 234	PNIPAM- <i>b</i> -GGRGDS, 170 PD(EGMA-ME)- <i>b</i> -hélice- <i>b</i> -PD(EGMA-ME) 260
	<i>ROP</i> <i>Polymérisation par ouverture de cycle</i>	PBLG- <i>b</i> -fragments ovomucoïdes, 188 PTHF- <i>b</i> -Mal, 190 PCL- <i>b</i> -trimaltoheptaose 206			PBLG- <i>b</i> -peptide E (hélice) 82
Synthèse de la biomolécule à partir du polymère	<i>Synthèse peptidique en solution</i>				PS- <i>b</i> -GKYGKY 170
	<i>Polymérisation enzymatique</i>	PS- <i>b</i> -amylose 167 168	PPO- <i>b</i> -DNA 169, 178, 179		

Tableau 3 - Stratégies divergentes employées pour la synthèse de chimères polymère-*b*-biomacromolécule

Dans le même genre, Alemdaroglu *et al.* ont amplifié un copolymère PPO-*b*-ADN sous forme micellaire présentant une amorce de 22 nucléotides avec de la thymidine à l'aide de l'enzyme TdT polymérase.¹⁶⁹ Enfin récemment Lutz *et coll.* ont proposé une nouvelle voie vers des chimères polymère-*b*-peptide, en l'occurrence polystyrène-*b*-GKYGKY, qui consiste en la construction itérative du peptide par chimie Fmoc à partir du polymère soluble.¹⁷⁰ La nature macromoléculaire de ce

support soluble permet de le séparer du milieu réactionnel après chaque étape par précipitation. Cette approche originale s'affranchit des limitations de diffusion des supports solides et permet de vérifier facilement chaque étape de synthèse par SEC. En revanche elle requiert des couplages quantitatifs car à l'issue de la synthèse les copolymères présentant des peptides tronqués ne peuvent être séparés de ceux possédant l'intégralité de la séquence. D'autre part, ce type d'approche reste limité aux polymères suffisamment robustes chimiquement pour résister aux conditions agressives de déprotections, et exclue donc les polymères biodégradables comme par exemple les polyesters.

II.3. LES CHIMERES MACROMOLECULAIRES AMPHIPHILES POLYMERE-*b*-BIOMACROMOLECULE DANS LA LITTERATURE

*II.3.1. CHIMERES POLYMERE-*b*-OLIGONUCLEOTIDE*

Le rôle biologique des poly(acides nucléiques) (ADN, ARN) est de coder et de protéger l'information génétique. L'hybridation moléculaire de deux brins complémentaires grâce à l'appariement des bases azotées de Watson-Crick est une interaction supramoléculaire forte et stable qui, dans la nature, permet de préserver le code génétique. De ce fait, l'inclusion d'un bloc oligonucléotidique simple brin dans un matériau est en général plus motivée par la mise à profit de cet outil de reconnaissance moléculaire exceptionnel, que par celle de son rôle biologique originel. Cela peut être soit dans un but structural, pour construire des édifices supramoléculaires complexes, soit afin d'élaborer des biocapteurs miniaturisés à visée diagnostique, ou bien encore dans le but d'empêcher l'expression d'un gène pathogène, généralement en se liant à ou en détruisant sa forme ARN messenger.

Grâce aux progrès de l'ingénierie génétique et de la biologie moléculaire d'une part, et de la synthèse chimique supportée d'autre part, les possibilités offertes en termes de séquences et de constructions par hybridation ne sont aujourd'hui plus limitées, en théorie, que par notre imagination.¹⁷¹ En pratique, elles le sont surtout par l'accessibilité, la maîtrise et le coût de ces techniques. En effet la synthèse supportée par voie phosphoramidite, si elle est relativement accessible au chimiste, reste très coûteuse en réactifs et limitée à une centaine de bases. D'un autre côté, la réaction en chaîne par polymérase (polymerase chain reaction, PCR) introduite par Mullis et coll.¹⁷² et qui permet d'amplifier de façon exponentielle un ADN possédant jusqu'à 40,000 bases grâce à une enzyme thermostable, est une technologie difficile d'accès et qui requiert des compétences particulières. De plus, elle nécessite de se procurer au préalable la séquence à copier ainsi que les deux amorces associées. Ces contraintes sont à peu près les mêmes pour la construction d'ADN plasmidique par des techniques recombinantes. La synthèse, en plus de l'instabilité chimique, de ces molécules

constitue donc l'inconvénient majeur à leur utilisation en tant que matériau et explique sans doute la faible occurrence d'auto-assemblages de chimères polymère-*b*-oligonucléotide amphiphiles dans la littérature, en comparaison avec les autres biomolécules. Néanmoins depuis une dizaine d'années, quelques équipes s'intéressent de très près et font la promotion *via* une recherche de pointe de ces matériaux prometteurs.^{137, 138, 173, 174}

La première chimère de ce type a été synthétisée par Fong *et al.* par couplage peptidique entre un PNIPAM-NHS et un simple brin d'ADN-NH₂, dans le but de coupler par liaison non-covalente avec streptavidine présentant le brin complémentaire, aucune étude d'auto-assemblage de cette chimère n'a toutefois été rapportée.¹⁷⁵ En 2001, de la même façon, Jeong *et al.* couplent un bloc PLGA-NHS de 10×10^3 g/mol avec *c-myc*, un petit ADN simple brin antisens capable d'inhiber la prolifération de certaines cellules impliquées dans la sténose post-angioplastie.¹⁷⁶ A partir des chimères amphiphiles PLGA-*c-myc* résultantes, ils obtiennent, en solution à l'aide d'un co-solvant, des micelles de ~60 nm de diamètre s'internalisant rapidement dans des fibroblastes de souris NIH 3T3 et capables d'y relarguer le bloc oligonucléotidique par une dégradation lente et contrôlée du PLGA. En 2004, Mirkin et ses collaborateurs utilisent un couplage phosphoramidite supporté pour conjuguer un bloc PS de $5,6 \times 10^3$ g/mol à une séquence d'ADN simple brin modèle (Figure 17).¹⁷⁷

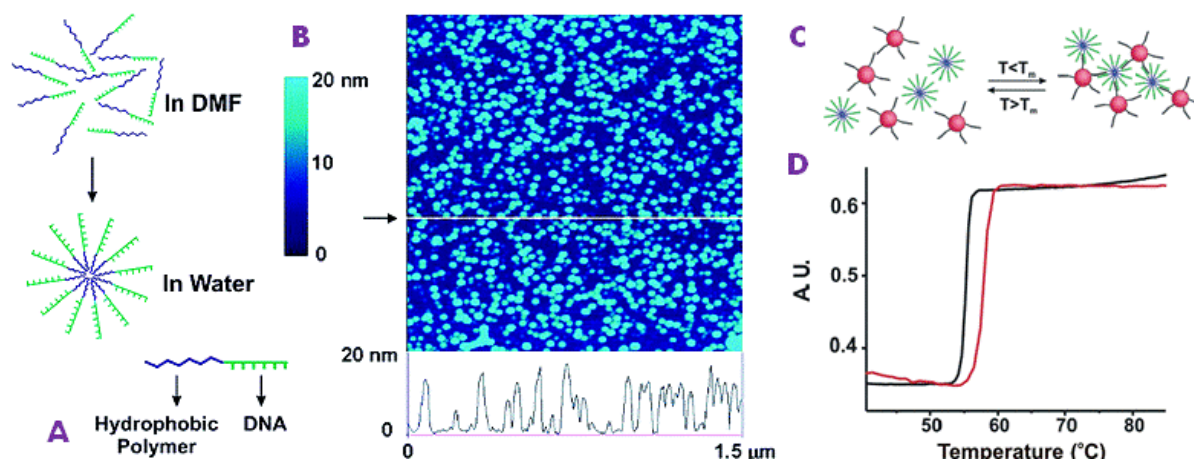


Figure 17 - Etude de l'auto-assemblage de chimères PS-*b*-5'A₅-TCATCCTTATCAATATT^{3'} (A) et de leur hybridation réversible avec des nanoparticules d'or présentant un ADN simple brin complémentaire (C) ; B) Images AFM des micelles obtenues; D) Mesure de la température de fusion du double brin d'ADN via la variation de la bande de résonance plasmonique des nanoparticules d'or (rouge: séquences complémentaires, noir: séquences complémentaires à l'exception d'une base). Adaptée de Mirkin et coll.¹⁷⁷

Les chimères obtenues sont caractérisées par spectroscopie de masse MALDI-TOF et électrophorèse sur gel, et forment en solution, par nanoprecipitation à l'aide de DMF, des micelles bien définies de ~16 nm de diamètre. L'hybridation spécifique, et réversible au-delà de la température de fusion du double brin d'ADN, avec des nanoparticules d'or présentant le brin complémentaire est rapportée.

Suivant la même voie synthétique et avec un rendement d'environ 40%, Herrmann et ses collaborateurs ont synthétisé des chimères PPO-*b*-ADN simple brin modèle. Purifiées par électrophorèse sur gel, elles forment en solution des micelles de ~5 nm de diamètre. Ils ont ensuite utilisé ces nanoparticules afin de confiner et permettre la réaction entre deux partenaires chimiques (formation de liaisons isoindole et amide, couplage thiol-maléimide) greffés respectivement sur des segments monobrins distincts mais tout deux complémentaires de celui des chimères.¹⁶⁹ Dans une étude ultérieure sur ce même système, ils ont montré que l'hybridation avec des brins complémentaires courts ne change par la morphologie, ni la taille des objets, mais qu'en revanche, avec de longs brins présentant une répétition de la séquence complémentaire, elle induit la formation d'agrégats cylindriques d'une trentaine de nanomètres.¹⁷⁸ Enfin ce groupe a également développé des micelles de PPO-*b*-DNA, dont la couronne oligonucléotidique peut être amplifiée par voie enzymatique, comme décrit plus haut.¹⁷⁹

En utilisant cette fois un couplage peptidique supporté, Vebert-Nardin et ses collaborateurs ont synthétisé des chimères PB-*b*-cytidine, un petit ADN de 12 bases, qui génèrent spontanément dans l'eau des vésicules d'un diamètre moyen de 80 nm.¹⁸⁰ Ces structures ont ensuite été utilisées pour préparer des biofilms permettant d'étudier les mécanismes d'adhésion de bactéries.¹⁸¹ Tout récemment et sur la même base, cette équipe a synthétisé et finement caractérisé une librairie de chimères à base de polybutadiène et de polyisobutylène (PB-*b*-A5G7, PIB-*b*-G7A5, PIB-*b*-C7T5, et PB-*b*-T5C7) s'auto-assemblant sous forme de vésicules d'un diamètre moyen allant de 49 à 236 nm.¹⁸² Ces objets ont ensuite été déposés et attachés sur des surfaces sans altération de leur structure *via* l'hybridation de leur bloc oligonucléotidique, formant de cette façon des revêtements qui, probablement du fait de leur structure singulière, empêchent l'adhésion des bactéries (Figure 18).¹⁸³ Toujours à l'aide d'un couplage peptidique supporté, Fluegel *et al.* ont synthétisé des chimères originales ADN-*b*-ELP qui, au dessus de la LCST du bloc ELP, située entre 35 et 45°C selon la concentration et la force ionique, forment des micelles sphériques d'un rayon hydrodynamique de 39 nm.¹⁸⁴ En-deçà de cette température, les chimères sont solubles et en présence d'un ligand oligonucléotidique complémentaire tétravalent forment des structures supramoléculaires en forme d'étoile. Enfin récemment, Mayap Talom *et al.* ont rapporté la synthèse par voie phosphoramidite de triblocs PEG-*b*-PCL-*b*-ADN. Les propriétés de reconnaissance moléculaire des micelles sphériques obtenues à partir de ces chimères ont ensuite été démontrées par hybridation sur des surfaces.¹⁸⁵

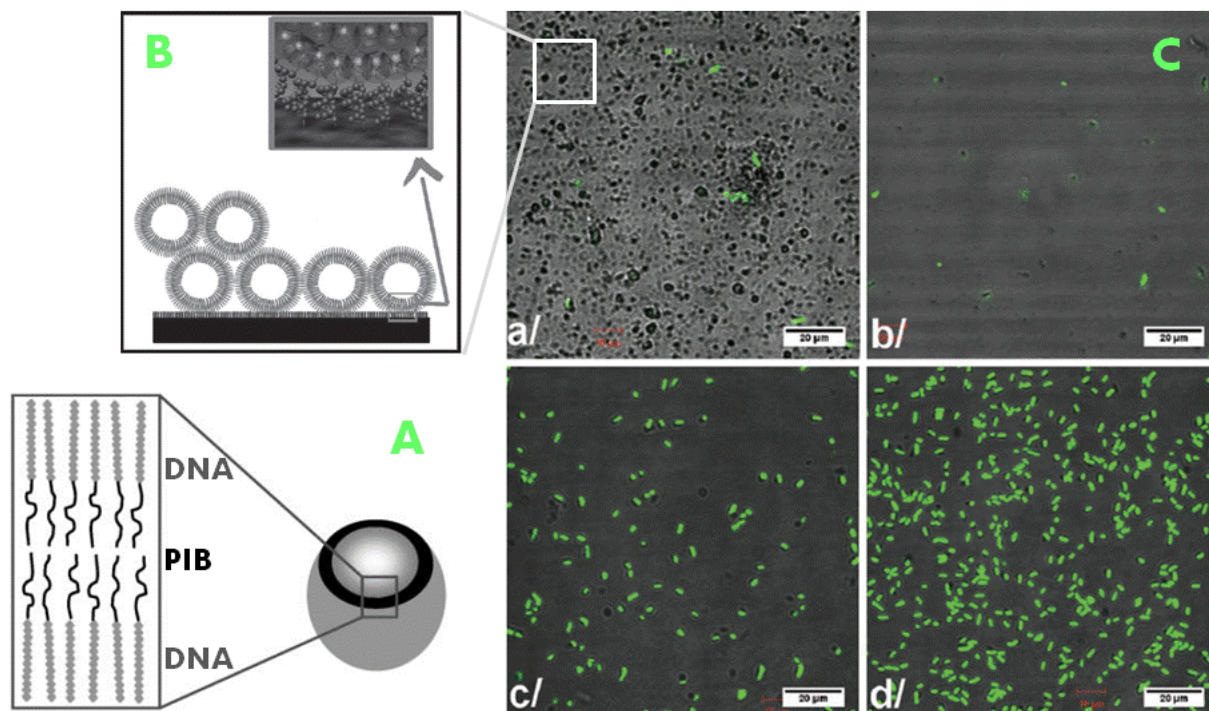


Figure 18 – Vésicules de PIB₃₁-b-G7A₅ (A) déposées et attachées sur une surface de silicone via l'hybridation du bloc oligonucléotidique avec sa séquence complémentaire greffée sur la surface (B). Ce revêtement « mou » prévient efficacement la prolifération bactérienne à sa surface (C): images de microscopie confocale combinant fluorescence et réflexion. Les bactéries sont marquées en vert a) revêtement rugueux à base de vésicules b) revêtement lisse à base de vésicules c) surface de silicone greffée avec la séquence d'ADN complémentaire d) surface de silicone. Adaptée de Vebert-Nardin et coll.¹⁸³

II.3.2. CHIMERES POLYMERE-*b*-OLIGOSACCHARIDE

Dans la nature, on distingue les polysaccharides « de réserve », qui servent à stocker l'énergie (amidon, glycogène), des polysaccharides « structuraux », qui participent à la structuration des tissus (cellulose, hemicellulose, chitine) et de la matrice extracellulaire où ils jouent un rôle dans les mécanismes de migration, de prolifération et d'adhésion des cellules eucaryotes (hyaluronan) et des bactéries (dextran). On trouve aussi des oligosaccharides à la surface des cellules qui, conjugués à des protéines (glycoprotéines) et des lipides (glycolipides), remplissent des fonctions essentielles de reconnaissance cellulaire *via* leurs interactions avec les lectines. Néanmoins ces derniers représentent une très faible proportion de l'ensemble des oligo- et polysaccharides d'un organisme. Les polysaccharides naturels sont donc, en grand partie, des matériaux au sens propre du terme. Leur valeur ajoutée dans une chimère amphiphile tient dans la majorité des cas de leur biocompatibilité et leur biodégradabilité et plus rarement, mais toutefois de plus en plus de leur bioactivité.

La chimie des sucres est très complexe. Ce sont des molécules qui diffèrent par des isoméries structurales (régio- et stéréo-), mais qui sont fonctionnellement très proches (hydroxyles). Pour un

contrôle précis de la structure, deux alternatives synthétiques existent. La synthèse supportée automatisée, similaire à celle des peptides et des poly(acides nucléiques) demeure, malgré un effort de développement important, très laborieuse et donc très peu répandue.¹⁸⁶ La polymérisation par voie enzymatique est une option au degré de contrôle moindre mais bien plus facile et techniquement plus au point.¹⁸⁷ On comprend donc pourquoi l'extraction des oligosaccharides à partir la biomasse est de loin la façon la plus simple et la plus économique de les obtenir. Si l'on accepte les limites en termes de pureté et degré de contrôle moléculaire que cette source implique, la disponibilité massive des oligosaccharides biosourcés est leur atout majeur pour des applications dans le domaine des matériaux. Les réels inconvénients de ces biomolécules sont leur faible solubilité, la difficulté de procéder à une chimie sélective, et la faible réactivité de leur extrémité réductrice, qui explique peut-être pourquoi on trouve dans la littérature beaucoup d'exemples de glyco-copolymères greffés, mais très peu de structures linéaires de type copolymère à blocs.

Un certain nombre de synthèses de chimères amphiphiles possédant un bloc hydrophobe polymère et un bloc hydrophile saccharidique a été décrit dans la littérature sans que leur auto-assemblage en solution, ni leur utilisation en tant qu'amphiphile, ne soient abordées.¹⁸⁸⁻²⁰¹ Pour plus de détails à ce sujet, le lecteur peut se rapporter aux tableaux 2 et 3 ainsi qu'à la revue détaillée de Schatz et Lecommandoux.²⁰² Loos *et al.* sont les premiers à pousser leurs étude jusqu'à ce stade. Après avoir mis au point une synthèse par voie enzymatique,^{167, 168} ils ont montré que des chimères PS-*b*-amylose, soumis à des conditions de hautes température (200°C, > T_g du PS) et pression (15 bars), s'auto-assemblent dans l'eau sous forme de micelles sphériques de taille régulière d'environ 10 nm. Houga *et al.* ont eux étudié de façon approfondie des systèmes PS-*b*-dextran de différentes fractions hydrophiles, synthétisés par polymérisation ATRP du styrène initiée par le bloc saccharidique temporairement protégé.²⁰³ Alors que les chimères de fraction hydrophile élevée (90%) génèrent par dissolution directe des micelles sphériques, celle ayant une faible fraction hydrophile (<20%) conduisent par nanoprecipitation à des vésicules, la formation de phases lamellaires étant supposée par les auteurs être favorisée par la rigidité du bloc dextran. Lepoittevin *et al.* ont étudié le couplage de blocs polystyrènes de 2900 et 4500 g/mol à différents blocs saccharidiques (glucose, maltose, maltotriose, dextran) par amination réductrice.²⁰⁴ Bien que l'étude soit essentiellement focalisée sur la synthèse, la formation de micelles de 50 nm de diamètre pour le PS₂₉₀₀-*b*-maltotriose est évoquée.

Zhang *et coll.* ont quant à eux développé des systèmes à base de polycaprolactone. Dans un premier temps, ils ont synthétisé par amination réductrice des chimères PCL-*b*-dextran qui conduisent, par dissolution directe dans l'eau, à des particules sphériques d'un diamètre de l'ordre de 50 nm.²⁰⁵ Ils ont ensuite obtenu des résultats similaires à partir de systèmes PCL-*b*-maltoheptaose, synthétisés par contre par une approche divergente pour laquelle la polymérisation par ouverture de cycle de la caprolactone est amorcée par le bloc oligosaccharidique.²⁰⁶ Otsuka *et al.* ont aussi étudié le

maltoheptaose mais couplé à des blocs PNIPAM de différents degrés de polymérisation (28, 45, 119, 220) par cycloaddition « click » alcyne-azoture (Figure 19).²⁰⁷ Ce travail très élégant et poussé décrit l'auto-assemblage réversible des chimères PNIPAM₂₂₀-*b*-Maltoheptaose en solution qui, chauffées au dessus de la LCST du polymère conduisent à des morphologies vésiculaires très régulières. Celles-ci se désassemblent intégralement une fois la température redescendue en dessous de la LCST du PNIPAM, judicieusement ajustée *via* son degré de polymérisation à 39.4°, valeur très proche et légèrement supérieure à la température physiologique. Dans la continuité de ce travail, le même groupe s'est attelé à l'étude de chimères entièrement « sucrées » conjuguant un bloc maltoheptaose natif hydrophile et un bloc maltoheptaose peracétylé hydrophobe.²⁰⁸ Elles forment en solution des micelles sphériques d'environ 30 nm de diamètre qui se dégradent enzymatiquement en deux étapes, l'une rapide correspondant à l'hydrolyse de la couronne hydrophile, l'autre plus lente à celle du cœur hydrophobe.

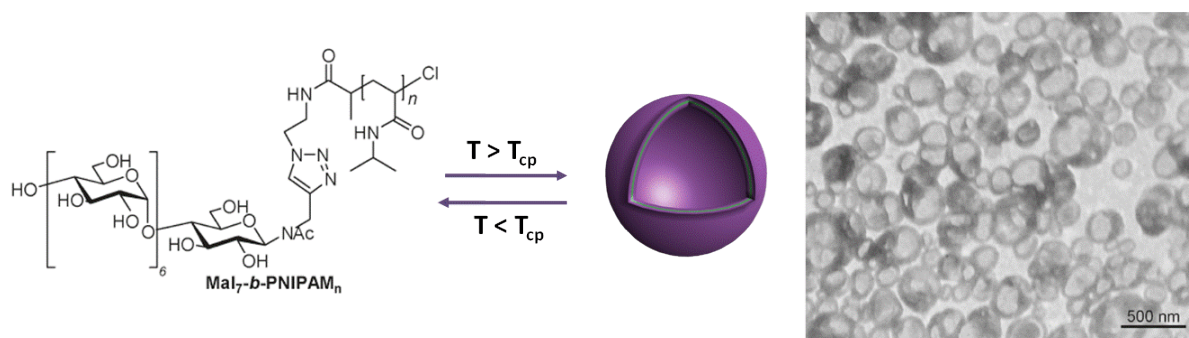


Figure 19- Vésicules thermosensibles de PNIPAM₂₂₀-*b*-Mal₇ imagées par TEM. Adaptée de Otsuka et al.²⁰⁷

Comme rappelé précédemment, certains polysaccharides, comme le hyaluronan, possèdent des propriétés de reconnaissance cellulaire. Liu et al. ont synthétisé et étudié l'auto-assemblage de chimères PLA-*b*-hyaluronan dans le but de développer de systèmes de vectorisation de principes actifs aux propriétés d'adhésion et de pénétration cellulaire augmentées *via* la reconnaissance du hyaluronan par les glycoprotéines des membranes.²⁰⁹ En effet, le hyaluronan est un des ligands principaux du récepteur membranaire CD44, surexprimé par certaines cellules cancéreuses. Les micelles sphériques obtenues possèdent une capacité d'encapsulation augmentant avec la masse molaire du bloc PGA, ainsi que des capacités améliorées d'adhésion cellulaire et de perméabilité à travers la peau, directement reliées à la présence du segment hyaluronan.

D'autres voies plus originales ont été explorées afin d'obtenir des nanoparticules chimériques « sucrées ». En polymérisant par émulsion l'isobutylcyanoacrylate amorcé à l'interface par du dextran, Vauquier et ses collaborateurs obtiennent directement des nanoparticules de PICBA-*b*-dextran de 300 nm de diamètre avec une faible dispersité.^{210, 211} Dans la même idée, mais en polymérisant du NIPAM et du MMA à partir d'amylose obtenue de l'amidon par clivage enzymatique,

Gilbert et coll. ont synthétisés des latex P(NIPAM-co-MMA)-*b*-amylose réguliers aux tailles variant entre 290 et 450 nm.²¹²

L'équipe du Prof. Lecommandoux s'intéresse aussi depuis plusieurs années aux conjugués polysaccharide-*b*-polypeptide. Schatz *et al.* ont ainsi étudié le couplage par cycloaddition de Huisgen azoture-alcyne d'un bloc polypeptidique, le PBLG et de deux blocs oligosaccharides, le dextran et le hyaluronan, dans le but d'obtenir des chimères rigide-flexible (rod-coil) glycopeptidiques conduisant à des morphologies vésiculaires mimant les capsides virales. Dans le cas du PBLG-*b*-dextran, une étude physico-chimique approfondie (DLS, SANS, TEM) met en évidence la formation de vésicules de 45 nm de rayon et d'une épaisseur de membrane de 21 nm.⁵⁵ Ces vésicules ont par la suite été utilisées pour la délivrance ciblée et contrôlée d'agents de chimiothérapie (doxorubicine, docetaxel).^{213, 214 215} Une étude de biodistribution chez la souris a notamment révélé leur accumulation sélective dans des xénogreffes de tumeurs *via* le ciblage des récepteurs CD44.²¹⁶

Plus récemment dans la même équipe, Bonduelle *et al.* ont rapporté la synthèse de chimères glycopeptidiques arborescentes (Figure 20).^{56, 217} Cinq unités propargylglycine ont pour cela été ajoutées à l'extrémité d'un bloc PBLG afin d'y greffer ensuite cinq blocs oligosaccharidiques, dextran ou hyaluronan, fonctionnalisés azoture par cycloaddition de Huisgen. Ces « arbustes » moléculaires s'auto-assemblent spontanément par dissolution directe en de petites micelles sphériques de 50 nm pour le dextran et de 35 nm pour le hyaluronan. Bien que la nature rigide de l'hélice PBLG favorise généralement les phases lamellaires, le volume important et la structure dendritique de la partie hydrophile impose une courbure interfaciale importante conduisant à la formation de micelles. Cette hypothèse a été confirmée dans une seconde étude pour laquelle des blocs PBLG de degrés de polymérisation croissants ont été synthétisés afin d'augmenter la fraction hydrophobe. Pour tous les composés, les auteurs ont observé la formation de micelles dont le diamètre augmente proportionnellement avec la longueur du PBLG. Afin de favoriser la formation de phases lamellaires, ils ont examiné l'auto-assemblage par nanoprécipitation de mélanges de chimères et d'homopolypeptide. Le système évolue alors vers la formation de disques très bien définis (PDI=0.109) de ~200 nm de diamètre, apparaissant dès 10% w/w de PBLG et majoritaires à 30% w/w.

Enfin, les chimères amphiphiles oligosaccharidiques peuvent aussi faire de bons tensioactifs comme l'ont montré Bosker *et al.* pour des systèmes PS-*b*-dextran ainsi que Halila *et al.* pour des chimères poly(organosiloxane)-*b*-xyloglycan.^{158, 218} Récemment, Zhu *et al.* ont aussi utilisé des chimères PGlu-*b*- β -cyclodextrine pour contrôler la cristallisation du carbonate de calcium, mimant ainsi la régulation de la biominéralisation par les glycoptotéines.²¹⁹

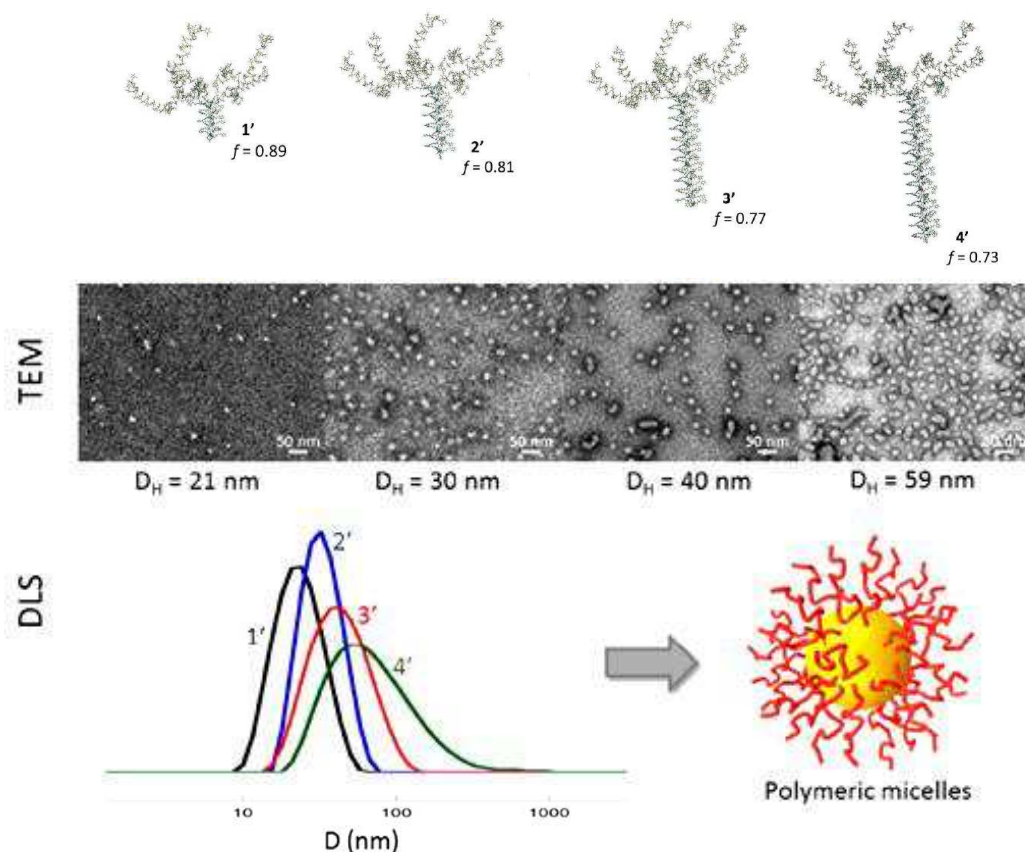


Figure 20 – Auto-assemblages obtenus par dissolution directe à partir de chimères arborescentes PBLG-*b*-dextra. 1' : DP_n PBLG =20, 2' : DP_n PBLG =40, 3' : DP_n PBLG =60, 4' : DP_n PBLG =80. Adaptée de Bonduelle et *al.*

217

II.3.3. CHIMERES POLYMERE-*b*-PROTEINE ET POLYMERE-*b*-PEPTIDE

Bien que leurs compositions chimiques soient identiques, les peptides et les protéines diffèrent sur plusieurs points. Le terme de peptide réfère uniquement à un enchaînement d'acides aminés, alors qu'une protéine définit un assemblage biochimiquement fonctionnel d'une ou de plusieurs chaînes d'acides aminés sous forme repliée et dans certains cas modifiées de façon post-traductionnelle. De ce fait, les peptides désignent plutôt des chaînes relativement courtes et de faible masse molaire, alors que les protéines sont généralement des objets macromoléculaires plus complexes de masse molaire élevée, bien que la différence entre un long peptide et une petite molécule soit parfois ténue. Les voies d'obtention de ces molécules diffèrent notablement selon ces critères. Les petites séquences en dessous d'une quarantaine de résidus sont accessibles par la synthèse peptidique sur support solide, développée par Robert Bruce Merrifield dans les années 60 et pour laquelle il reçut le prix Nobel de Chimie en 1984. Cette synthèse procède à l'ajout séquentiel des acides aminés sous forme protégée à la surface de micro-perles de polymère fonctionnalisées pouvant être aisément séparées du milieu réactionnel (solvant et réactifs) par simple filtration. C'est aujourd'hui une technologie très au point qui permet d'employer les différents réactifs solubles en excès et qui offre

une grande diversité de supports, de résidus variablement protégés et d'agents de couplage, disponibles commercialement afin de venir à bout de toutes les difficultés : sélectivité des réactions, rendements, réaction secondaires, problèmes de diffusion, etc. Malgré cela, elle peut être fastidieuse et peu rentable pour des séquences difficiles ou peu solubles et/ou longues. D'autre part, elle consomme généralement une grande quantité de réactifs et surtout de solvant et peut s'avérer très onéreuse. Pour la synthèse de séquences plus longues, les chimistes peuvent recourir à des techniques de « ligatures » chimiques permettant d'assembler bout à bout des peptides préalablement synthétisés indépendamment. La plus connue d'entre elles est la liaison chimique native (Native Chemical Ligation - NCL) qui conduit à une liaison peptidique native *via* une transestérification entre une cystéine *N*-terminale et un thioester *C*-terminal suivie d'un réarrangement *S,N*-acyl intramoléculaire. Ces techniques synthétiques sont idéales pour des peptides linéaires, mais pour obtenir des protéines pleinement repliées et fonctionnelles, la production par voie recombinante devient vite plus pratique, bien que l'étape d'extraction complique parfois la production de protéines hydrophobes et amphiphiles. Quelque soit la technique, il est aujourd'hui possible, sans pour autant être aisé, d'introduire dans les séquences des acides aminés non-canoniques présentant des groupes latéraux divers comme des fonctions alcyne, azoture ou encore un agent de transfert de polymérisation. Enfin la pureté du produit final est généralement optimale grâce aux techniques chromatographiques de purification accessibles à l'échelle préparative. Contrairement aux polypeptides qui, comme on l'a vu, sont la plupart du temps exploités pour leurs propriétés structurales, introduire un peptide ou une protéine au sein d'un copolymère à blocs amphiphile vise plutôt l'intégration de fonctions biologiques spécifiques. Ces fonctions peuvent être la reconnaissance moléculaire spécifique d'un récepteur permettant l'ancrage et l'accumulation dans un tissu ou un organe spécifique, la régulation d'un signal biologique, le blocage antagoniste d'un récepteur, une activité catalytique, etc. On peut aussi imaginer des nanostructures plus originales, par exemple des mimes de protéines transmembranaire, présentant à leur surface des rubans peptidiques super-hélicoïdaux capables de s'insérer dans les bicouches lipidiques ou bien encore d'accueillir en leur centre de manière hautement sélective des cofacteurs naturels ou synthétiques. Cependant, avant de s'intéresser à leur auto-assemblage et à leurs propriétés, encore faut-il pouvoir synthétiser ces composés. La synthèse de ces chimères est un challenge en soi, et c'est donc logiquement sur ce point que se sont focalisées la plupart des études publiées depuis le début des années 2000.

II.3.3.1. Chimères polymère-*b*-protéine

Les chimères polymère-*b*-protéine ont été peu mais bien étudiées par quelques équipes. Trois revues très complètes ont été publiées récemment sur ce sujet, auxquelles le lecteur peut se reporter pour plus de détails, par Nolte²²⁰, Velonia²²¹ et Boyer²²². Ce domaine de recherche étant relativement émergent et ambitieux, les protéines comme les polymères étudiés jusqu'alors sont en nombre

limité. Les protéines sont soit des protéines modèles parfaitement connues (albumine de sérum bovin (BSA), myoglobine (Mb), protéine fluorescente verte (GFP), streptavidine (SA)) soit des enzymes (cellulase, lipase, lysozyme, trypsine), ou encore dans un cas singulier la protéine membranaire cytochrome b. Le panel de polymères est lui encore plus réduit. Ce sont soit des polymères à LCST (PNIPAM pour l'essentiel et autres polyacrylamides), soit des polymères hydrophobes modèles (le polystyrène dans l'écrasante majorité des cas ainsi qu'un exemple original de polyalcyne « clickable »).

i. Chimères à base de polymères à température critique basse de solubilité

A la fin des années 90, Hoffman et ses collaborateurs ont publié plusieurs études consacrées à la synthèse de chimères conjuguant des protéines, en l'occurrence la streptavidine^{175, 223-226}, la trypsine²²⁷ et le cytochrome b²²⁸, à des blocs thermosensibles, le PNIPAM (poly(*N*-diisopropylacrylamide)^{175, 226-229} et le PDEAAM (poly(*N,N*-diéthylacrylamide),^{223, 224} par couplage thiol-maléimide²²⁶⁻²²⁸, thiol-vinylsulfone^{224, 229} ou par hybridation d'ADN simples brins complémentaires¹⁷⁵. Peu intéressés par la version auto-assemblée de ces systèmes, ils envisageaient la séparation de phase des polymères au-delà de leur LCST comme un moyen de recycler facilement par précipitation des enzymes utilisées comme catalyseur,^{175, 227} ou pour moduler l'affinité de certains récepteurs avec leur ligand (biotine-streptavidine) par un effet de masquage partiel ou temporaire du site de reconnaissance.^{223, 224, 229}

Quelques années plus tard, l'équipe de Heather Maynard (Los Angeles, USA) s'est, à son tour, intéressée à des systèmes PNIPAM-*b*-BSA^{164, 230}, PNIPAM-*b*-Sa²³⁰ et PNIPAM-*b*-lysozyme,²³¹ mais cette fois en tant que modèles pour développer de nouvelles stratégies de synthèse divergentes employant les protéines comme macroinitiateurs pour la polymérisation du NIPAM par ATRP.^{230, 231} La synthèse de triblocs BSA-*b*-PNIPAM-*b*-BSA par polymérisation RAFT puis couplage thiol-maléimide a aussi été décrite²³² par ce groupe, qui a également mis au point l'un des seuls exemples de synthèse de chimères par couplage *via* la formation d'une liaison oxime.¹⁶⁴ Dans ce cas, les polymères (PNIPAM, PHEMA et PEGMA) sont obtenus par polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP) à partir d'un initiateur spécialement synthétisé présentant une fonction hydroxylamine protégée. Une fois déprotégés à l'aide de TFA, les polymères hydroxylaminés en bout de chaîne sont couplés à la BSA *via* une de ses lysines modifiée par un groupement porteur d'une cétone. Ce travail élégant étant tourné vers la chimie, l'auto-assemblage des conjugués PNIPAM-protéines préparés par ATRP au dessus de leur LCST n'a pas été examiné.

Toujours pour le couple PNIPAM-*b*-BSA, Boyer *et al.* ont mis au point une synthèse divergente remarquable pour laquelle le NIPAM est polymérisé par voie RAFT : l'agent de transfert étant introduit sur l'albumine *via* un pont disulfure du côté de son groupe Z. Un important travail de

caractérisation des chimères a été réalisé et prouve que l'intégrité fonctionnelle et structurale de la protéine n'est pas affectée par l'étape de polymérisation.²³³ Quelques temps plus tard, Sumerlin et ses collaborateurs proposaient deux autres voies de synthèse de la chimère PNIPAM-*b*-BSA: l'une très semblable à celle de Boyer *et al.*, mais pour laquelle l'agent de transfert RAFT est couplé à la protéine du côté de son groupe R,²³⁴ l'autre convergente par cycloaddition de Huisgen et pour laquelle les chimères résultantes forment lorsqu'elles sont chauffées au dessus de la LCST du PNIPAM des nanoparticules sphériques stables d'environ 60 nm de diamètre.²³⁵ Le PNIPAM a aussi été couplé à la myoglobine par Wan *et al.* par l'intermédiaire de son cofacteur préalablement « clické » en bout de chaîne du PNIPAM (Figure 21). Au-delà de la LCST du polymère, ces chimères amphiphiles forment des agrégats sphériques bien réguliers d'un rayon hydrodynamique de ~60 nm et d'un indice de polydispersité remarquable inférieur à 0,1.²³⁶ Un an plus tard, Lavigueur *et al.* se démarquent avec la synthèse « click » de chimères EGFP-*b*-PEGMEA qui forment également, au-delà de la LCST du PEGMEA, des micelles de ~60 nm de diamètre.²³⁷

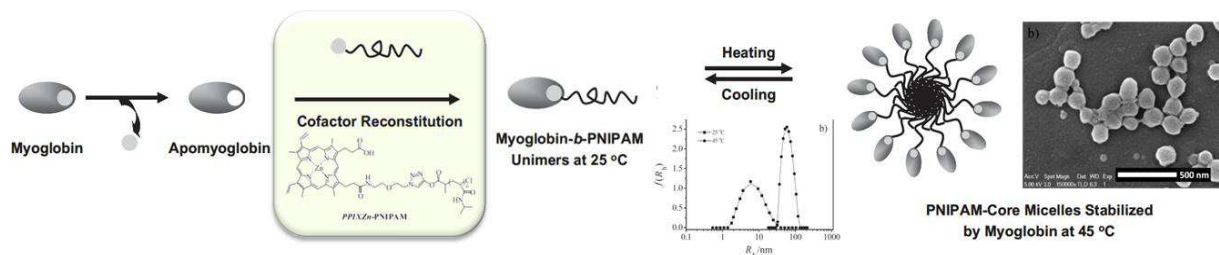


Figure 21 – Synthèse de chimères PNIPAM₉₀-*b*-myoglobine par reconstitution cofacteur/apoprotéine et caractérisation par DLS et TEM des micelles thermosensibles obtenues à chaud. Adaptée de la référence²³⁶

Enfin tout récemment Mackenzie *et al.* ont décrit la synthèse de chimères conjuguant un aminoxy-PNIPAM (PNIPMA) par liaison oxime à une enzyme cellulaire thermostable, l'endoglucanase EGPh, transaminée à l'aide de pyridoxal-5'-phosphate afin d'introduire une fonction cétone.¹⁶⁵ Le caractère thermosensible du polymère permet de récupérer et de recycler cette enzyme, utilisée pour la dépolymérisation de la biomasse, et sans altérer son activité.

ii. Chimères à base de polymères hydrophobes

Roeland Nolte et ses collaborateurs à l'université Radboud de Nimègue sont les premiers à s'intéresser au début des années 2000 aux chimères polymère-*b*-protéine strictement amphiphiles, qu'ils désignent sous le terme d'« amphiphiles géants » justifié par leurs masses moléculaires élevées comparativement à celles des surfactants moléculaires. Leur contribution majeure à ce domaine de recherche commence par la formation par interaction biotine/streptavidine de monocouches de chimères (PS)₂-*b*-ferritine et (PS)₂-*b*-HRP à l'interface air/eau, et montrent que l'activité des protéines est conservée.²³⁸ Ils sont ensuite les premiers à tirer partie de l'interaction liant une protéine à son cofacteur pour créer des chimères PS-*b*-HRP. La reconstitution se fait par simple ajout d'une solution

du bloc PS-cofacteur dans le THF à une solution aqueuse d'apoprotéine et conduit à la formation de structures vésiculaires aux diamètres variant de 80 à 400 nm et encapsulant des agrégats sphériques de polymères.²³⁹ En remplaçant l'apoperoxydase par une apomyoglobine, ils observent par microscopie électronique la formation d'un mélange de micelles sphériques et de vésicules, à la distribution en diamètre relativement large allant de 20 nm à 700 nm de diamètre.²⁴⁰ Puis, le groupe exploite de nouveau cette technique pour conjuguer une apomyoglobine et une apoperoxydase à deux diblocs PEG-*b*-PS de différentes fractions hydrophiles (PEG₁₁₃-*b*-PS₄₈-cofacteur et PEG₁₁₃-*b*-PS₁₄₄-cofacteur) et obtiennent, selon les combinaisons, une multitude de nano- et microstructures, allant de micelles sphériques à des agrégats sphériques géants à phase lamellaire en passant par des micelles cylindriques, toroïdales, en Y, etc. (Figure 22).²⁴¹

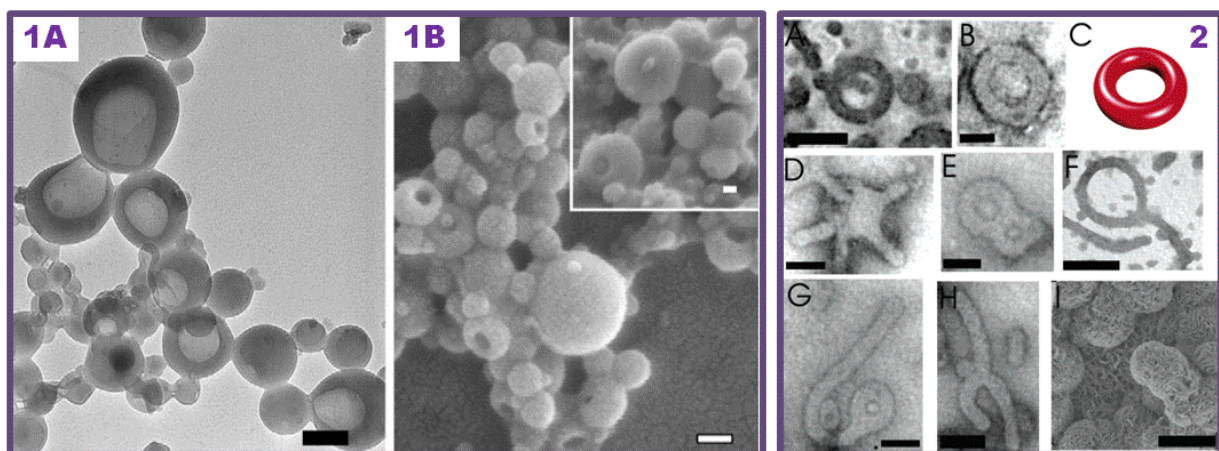


Figure 22 - Encadré 1: Image de TEM (A) et SEM (B) de nanoparticules obtenues à partir de PS-*b*-myoglobine. Barre d'échelle: 100 nm. **Encadré 2:** Image de TEM (A,B,D,E,F,G,H) des différentes structures formées par auto-assemblage de PEG₁₁₃-*b*-PS₁₄₄-*b*-myoglobine. (C): Figure schématique 3D du tore observé en (B). Barre d'échelle : 100 nm. **I:** Image SEM d'agrégats sphériques à phase lamellaire générés en solution à partir de PEG₁₁₃-*b*-PS₄₈-*b*-myoglobine. Barre d'échelle: 500 nm. Adaptée de Nolte et coll.^{240 241}

Bien qu'il soit élégant, spécifique et efficace, le couplage par reconstitution cofacteur/apoprotéine présente le désavantage de diminuer de façon importante l'activité enzymatique des protéines. Des voies de synthèse covalentes ont donc été explorées en parallèle. L'équipe de Nolte a étudié la conjugaison de BSA à un bloc PS par cycloaddition azoture-alcyne et observé par microscopie la formation d'agrégats micellaires aux diamètres allant de 30 à 70 nm.²⁴² Un autre groupe, celui de Kelly Velonia et de ses collaborateurs, s'est intéressé aussi de très près aux amphiphiles géants polymère-*b*-protéine. En 2002 sous la supervision du Prof. Nolte, elle rapporte la synthèse de chimères PS-*b*-CALB (Lipase B de *Candida Antartica*) par couplage thiol-maléimide, ainsi que leur auto-assemblage.²⁴³ Dispersés directement dans l'eau, elles forment des micro-fibrilles constituées de paquets de micelles cylindriques d'un diamètre individuel de 25 à 30 nm retenant environ 6% de l'activité catalytique de l'enzyme. En 2008, son propre groupe décrit une synthèse à la fois simple et très efficace de chimères PS-*b*-BSA par polymérisation ATRP du styrène directement à partir de

l'albumine en solution et en présence de DMSO qui sert de co-solvant.²⁴⁴ Cette synthèse conduit à la formation *in situ* de nanostructures sphériques aux diamètres compris entre 20 et 100 nm et dans lesquels il est possible d'encapsuler simultanément à la polymérisation une autre protéine (HRP) tout en conservant son activité. Par ailleurs, cette équipe est la première en 2007 à introduire d'autres polymères hydrophobes au moyen d'une approche synthétique. Ils conjuguent la protéine avec un polymère hydrophile présentant des fonctionnalités latérales qui permettent dans un second temps de le modifier et de le rendre hydrophobe.²⁴⁵ Plus concrètement, ils ont tout d'abord copolymérisé par ATRP plusieurs monomères de type méthacrylate, dont un propargyl-méthacrylate protégé. Après déprotection, le polymère résultant est hydrophile et présente sur sa structure des fonctions alcyne qui, une fois ce dernier conjugué par couplage thiol-maléimide à une albumine, sont modifiées par cycloaddition avec des groupements alkyl-azoture ou benzyl-azoture. Le polymère devient alors hydrophobe et le conjugué s'auto-assemble *in situ*. Tandis que les chimères alkylées conduisent à des micelles sphériques au diamètre uniforme d'environ 100 nm, les chimères benzylées forment des vésicules de tailles variables allant de 20 à 200 nm (Figure 23). Une seconde publication plus récente sur le même système démontre qu'il est possible, et même étonnamment plus efficace, de réaliser la polymérisation directement à partir de la protéine et la fonctionnalisation par cycloaddition « click » de façon simultanée.²⁴⁶

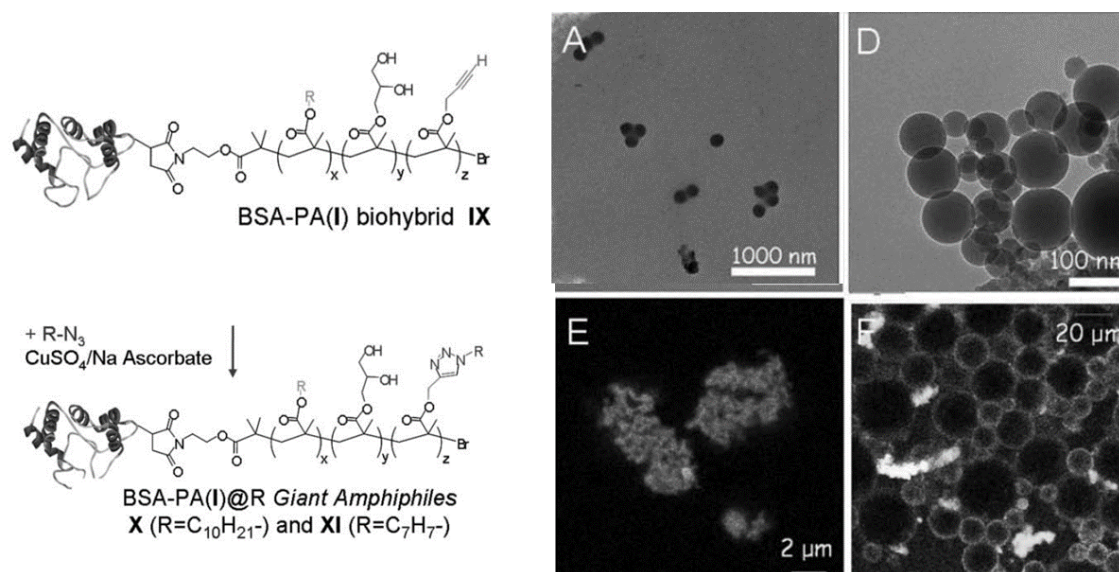


Figure 23 – Représentation schématique de la synthèse d'amphiphiles géants BSA-b-PA(I)@C₁₀H₂₁N₃ et BSA-b-PA(I)@benzyl Images de TEM (haut) et de microscopie confocale (bas) des micelles (A,E) et vésicules (D,F) respectivement formées.²⁴⁵

II.3.3.2. Chimères polymère-*b*-peptide

Si certaines protéines comme les enzymes requièrent, pour être biologiquement actives, une parfaite intégrité et un repliement natif, d'autres ne nécessitent que la présence d'un domaine de quelques

acides aminés. Le peptide correspondant à cette séquence réduite suffit alors pour assurer la fonction essentielle de la protéine, comme par exemple le tripeptide RGD qui permet à de nombreuses protéines d'adhésion, comme la fibronectine et la vitronectine, de se lier spécifiquement aux intégrines membranaires ($\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$).²⁴⁷ De plus, de nombreux rôles physiologiques essentiels sont assurés par des peptides, comme l'insuline, les hormones ou certains neurotransmetteurs. Le ratio fonctionnalité/nombre de résidus peut donc dans certains cas s'avérer bien plus intéressant pour un peptide que pour une protéine. Plus petits, ceux-ci sont plus facilement synthétisables et analysables, et également plus faciles à manipuler et à modifier chimiquement. Leur structure secondaire, lorsqu'elle existe, est aussi plus simple à élucider. Ce sont donc des « briques » macromoléculaires de choix pour évoluer vers des nanostructures synthétiques auto-assemblées biologiquement fonctionnelles en vue d'applications variées: systèmes catalytiques et nanoréacteurs, biomatériaux pour l'adhésion et la régénération de tissus, nanovecteurs de principe actifs, matériaux antimicrobiens, matrices pour la minéralisation biomimétique de cristaux inorganiques, sondes pour l'imagerie, « nanointerrupteurs » photosensibles et « nanocâbles », machines et moteurs moléculaires, etc.²⁴⁸⁻²⁵⁰

Nous n'aborderons pas ici les études décrivant uniquement la synthèse de chimères amphiphiles polymère-*b*-peptide²⁵¹⁻²⁵⁵, par ailleurs répertoriées dans les tableaux récapitulatifs 2 et 3, pour se concentrer sur celles décrivant à *minima* leur auto-assemblage. Nous ne décrirons pas non plus de domaine des « peptide amphiphiles »,²⁴⁸ où le peptide gouverne l'auto-assemblage, afin de se focaliser sur les cas où le peptide est biofonctionnel.

i. Chimères à base de peptides hydrophiles formant des nanoparticules sphériques en solution diluée

Nolte et ses collaborateurs ont décrit le couplage d'un bloc PS à la séquence GGR-AMC constituée de trois acides aminés suivis d'une coumarine fluorescente (AMC) par cycloaddition alcynes-azoture.²⁴² Les chimères PS-*b*-GGR-AMC, caractérisées par SEC et spectrométrie MALDI-TOF, forment par nanopréciipitation dans l'eau à partir d'une solution de THF, des vésicules clairement identifiables par microscopie électronique. D'un diamètre initial de 150 à 500 nm, celles-ci fusionnent avec le temps jusqu'à atteindre 2 μm de diamètre 18 hrs après leur formation. Ce groupe a aussi publié, dans un même temps, une étude sur des di- et tri-blocs conjuguant par couplage peptidique supporté un ou deux blocs de polystyrène de part et d'autre du peptide GANPNAAG, connue pour se replier en « épingle à cheveux » β (β -hairpin).²⁵⁶ Bien que la majeure partie de l'étude soit consacré à la synthèse, l'auto-assemblage des diblocs est lui rapidement évoqué. L'analyse d'images de microscopie électronique permet aux auteurs de conclure à la formation de micelles sphériques

d'environ 20 nm de diamètre, celui-ci augmentant avec le temps et atteignant 250 nm au bout de 4 mois. Un changement de morphologie associé est évoqué mais aucune preuve tangible n'est fournie.

Ayres *et al.* ont eux rapporté la synthèse de triblocs composés de deux blocs de PMMA entourant la séquence peptidique SGAGAEGAGAS, elle aussi formant une épingle à cheveux β .¹⁵³ Pour cela, le peptide bi-fonctionné sur support solide, à l'aide d'acide 2-bromoisobutyrique par l'intermédiaire de deux sérines terminales, est ensuite clivé pour servir de bi-macroinitiateur à la polymérisation ATRP du méthacrylate de méthyle. L'auto-assemblage réalisé à l'aide de THF comme cosolvant des chimères PMMA-*b*-SGAGAEGAGAS-*b*-PMMA, dont la caractérisation insuffisante du propre aveu des auteurs est attribuée à des limitations techniques, est examiné par microscopie électronique. De larges nanoparticules sphériques sont obtenues, mais leur morphologie précise n'est pas clairement établie et l'éventuelle présence d'épingle β n'est pas détectée.

Zupancich *et al.* introduisent par couplage thiol-maléimide un petit peptide GRGDSC, contenant la séquence RGD, à l'extrémité de diblocs PB-*b*-PEO-maléimide de différentes fractions hydrophiles, puis examinent l'impact de la présence du peptide sur l'auto-assemblage du copolymère par réhydratation de film et dissolution directe (Figure 24).²⁵⁷ Malgré sa petite masse molaire, celui-ci le modifie fortement, conduisant à des morphologies déviant des structures canoniques attendues. A l'extrémité d'un dibloc formant seul des morphologies cylindriques, le peptide crée des branchements fusionnels entre les nanotubes réduisant considérablement leur longueur et créant des réseaux. Pour les diblocs de fractions hydrophiles plus faibles, conduisant seuls à des vésicules unilamellaires, il induit la formation de membranes multi-lamellaires jamais observées jusqu'alors pour des copolymères PB-*b*-PEO. Cette étude confirme clairement qu'une chimère amphiphile incluant un bloc peptidique, même sans repliement ni structuration particulière, ne suit pas nécessairement les règles d'auto-assemblage valables pour les copolymères à blocs pour une même balance hydrophile/hydrophobe.

Xu et ses collaborateurs se sont eux intéressés à l'impact de la conjugaison covalente d'un bloc polystyrène sur le repliement d'un peptide en hélice et, à *fortiori*, en faisceaux super-hélicoïdaux en fonction de la localisation de cette liaison sur le squelette. Les conjugués modèles synthétisés, analysés en solution par diffusion dynamique de la lumière, forment seuls des agrégats mal définis de 100 nm à 1 μ m, et, en présence d'un tensioactif, des micelles d'une dizaine de nanomètres. Le dichroïsme circulaire a permis aux auteurs de conclure que l'ancrage du polymère en position N-terminale du peptide empêche ce dernier de se replier en hélice,²⁵⁸ alors qu'il n'a pas d'influence sur sa structure lorsqu'il est attaché sur l'un de ses résidus en position latérale²⁵⁹. Cette étude, ainsi que l'ensemble du travail de Xu et coll., souligne la nécessité de comprendre les interactions fondamentales en jeu entre les différentes parties du système pour mieux en contrôler les paramètres, de la structure moléculaire à la configuration des chaînes.

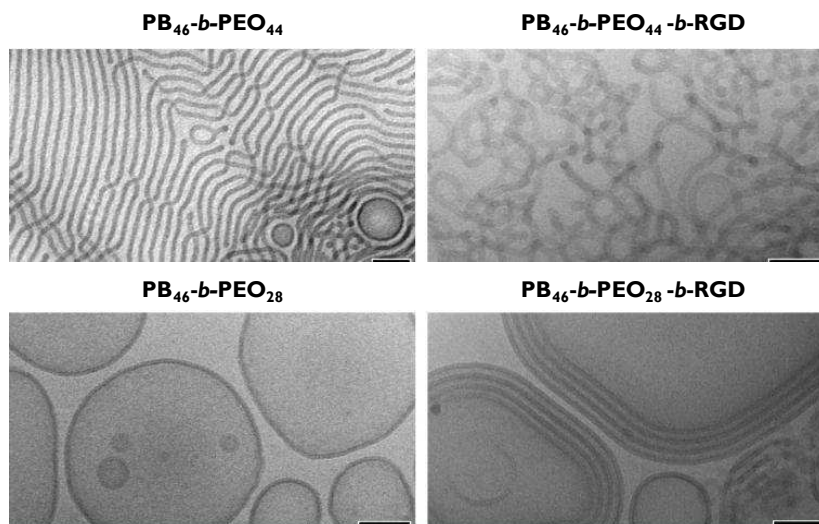


Figure 24 - Clichés de cryo-TEM de dispersions de PB-*b*-PEO et PB-*b*-PEO-*b*-RGD en solution. Barre d'échelle : 100 nm. Adaptée de Zupancich et *al.*²⁵⁷

Dans la catégorie des polymères thermosensibles, Krishna *et al.* se sont intéressés à un peptide de 36 résidus, riche en proline et glycine dérivé du collagène, pour sa capacité à former des triples hélices.²⁶⁰ Après l'avoir conjugué, à ses deux extrémités par couplage peptidique, à des blocs à LCST poly(di(éthylène glycol) monométhyl éther de méthacrylate) PD(EGMA-ME), ils ont pu démontrer par dichroïsme circulaire qu'en solution aqueuse le peptide conserve sa structure hélicoïdale et forme des chimères trimériques de type flexible-rigide-flexible, dont la triple hélice constitue le bloc rigide. Ils ont ensuite examiné leur auto-assemblage en fonction de la température. Au-delà de sa LCST (35°C), la séparation de phase du polymère conduit à des morphologies sphériques de tailles micrométriques. A 75°C, le système subit une seconde transition correspondant à la dénaturation de l'hélice vers des structures fibrillaires composées de filaments de 10 nm de diamètre.

Pour finir, Trzcinska *et al.* ont décrit récemment le comportement en solution de chimères P(DEGMA-ME)-*b*-GRKFG-Dansyl, le polymère étant directement polymérisé à partir du peptide par ATRP.²⁶¹ Au dessus de la LCST du polymère, les diblocs s'auto-assemblent en particules sphériques bien définies d'après les analyses par diffusion de la lumière, qui leur attribuent un rayon de giration de 51 nm et un rapport R_g/R_H de 0.89. Les auteurs qualifient ces nanostructures de mésoglobules, cependant aucune image des objets n'est fournie.

ii. Matériaux biofonctionnels à base de chimères polymère-*b*-peptide

En 2004, Becker *et al.* décrivent la synthèse, l'auto-assemblage et l'étude du caractère fonctionnel de chimères portant un peptide bioactif, le Triterpticin, dont la séquence de 13 résidus – VRRFPWWWPFLRR - comporte un triplet tryptophane hydrophobe entouré de deux segments cationiques.¹⁵⁴ C'est dans ce caractère amphipatique singulier que réside la clef de ses propriétés

antimicrobiennes pour lesquelles les auteurs l'ont choisi. Le peptide est d'abord assemblé sur support solide, puis modifié en position *N*-terminale à l'aide d'un initiateur de polymérisation. Deux types de polymérisation radicalaire, NMP et ATRP, ont été étudiés pour polymériser, sur le support solide à la suite du peptide, le *tert*-butyl acrylate puis le styrène. Les chimères PS-*b*-P(acide acrylique)-*b*-Tritrpticin, récupérées après clivage ont ensuite été facilement purifiées par dialyse, caractérisées par spectroscopie de RMN, DSC et spectrométrie de masse MALDI-TOF, la SEC étant techniquement proscrite, et auto-assemblées par nanopréciptation. Les mesures de diffusion de la lumière indiquent la formation majoritaire de micelles sphériques de 51 nm, mais montrent aussi une population non négligeable de 128 nm de diamètre et quelques agrégats. Des analyses de sédimentation par centrifugation attribuent aux objets formés un nombre d'agrégation de 149 ± 10 , un diamètre de sphère anhydre D_0 de 24 nm et un degré d'hydratation de 2.62 g d'eau par gramme de chimère. Enfin, leur pouvoir antimicrobien, évalué par mesure de la concentration d'inhibition minimum réalisé chez *E.coli* et *S. Aureus*, se révèle être équivalent à celui du peptide unimoléculaire. En revanche leur concentration inhibitrice médiane (IC_{50}), mesurant leur impact sur la viabilité de globules rouges de mammifères et estimée *via* un test colorimétrique au MTT, est inférieure à celle du peptide seul. Bien que le peptide ne se substitue pas entièrement au polymère hydrophile, ce travail est une des seules études complètes et rigoureuses du genre publiée à ce jour. Les mêmes auteurs avait publié une communication une année auparavant sur une synthèse très similaire de conjugués PMA-*b*-PAA-*b*-Tat mais n'avaient pas donné suite, comme annoncé, aux caractérisations complémentaires et aux études des propriétés physico-chimiques en solution et biologiques.²⁵¹

Dans un tout autre registre, Oh *et al.* ont récemment publié le seul exemple de chimère « inverse » pour laquelle le peptide est hydrophobe et le polymère est hydrophile (Figure 25).²⁶² Le petit peptide GGNQWFI est un antagoniste puissant, mais peu soluble dans l'eau du facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF-1), qui régule la vascularisation, de la rétine entre autre et nécessite dans le cadre de certaines pathologies oculaires d'être inhibé. Afin d'augmenter la biodisponibilité du peptide, les auteurs l'ont conjugué par couplage peptidique à un bloc hyaluronan, l'un des composant principal avec le collagène du tissu vitreux oculaire, et qui possède aussi une affinité pour les glycoprotéines membranaires des cellules endothéliales. Une caractérisation précise de la synthèse de ces conjugués et des objets issus de leur auto-assemblage par nanopréciptation fait défaut. En revanche, la solubilité et l'efficacité *in vitro* et *in vivo* du peptide ainsi micellisé sont, elles, scrupuleusement examinées et s'avèrent considérablement améliorées par rapport à sa version non-conjuguée. Les nanoparticules glycopeptidiques permettent en effet d'inhiber significativement la néo-vascularisation de la choroïde induite par laser, ainsi que de réduire la déformation et l'hyperperméabilité vasculaire de la rétine dans le cas de rétinopathie diabétique chez le rat.

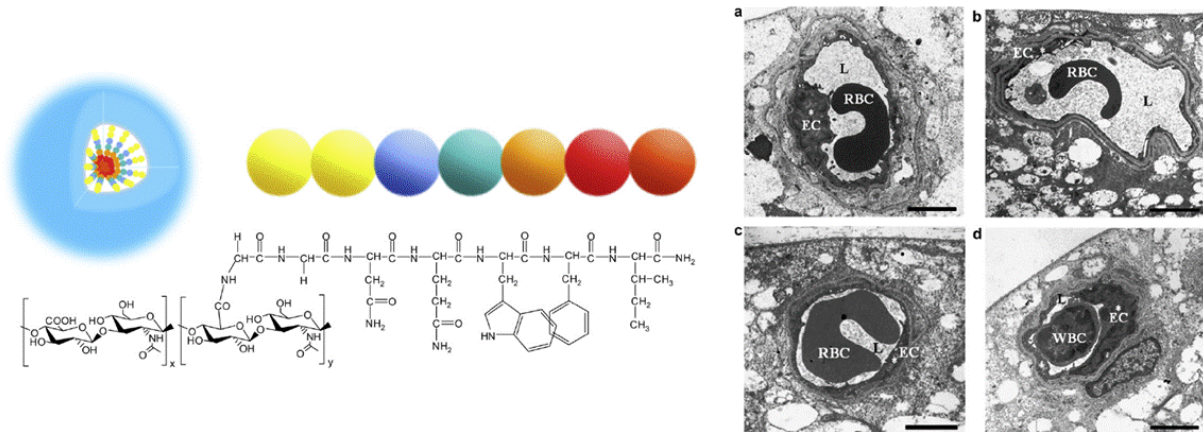


Figure 25 - Efficacité de micelles de hyaluronan-GGNQWFI comparé au peptide GGNQWFI libre pour le traitement de la rétinopathie diabétique. Clichés de TEM de vaisseaux rétinaux de rats SD: a) Contrôle positif – animal sain ; b) Contrôle négatif – animal atteint de rétinopathie ; c) Animal traité avec le peptide libre GGNQWFI ; d) Animal traité avec les micelles hyaluronan-b-GGNQWFI. (L: Lumière du vaisseau, EC: cellules endothéliales, RBC: globules rouges, WBC: globules blancs). Adaptée de Oh *et al.* ²⁶³

Un autre peptide très étudié ces 15 dernières années est le peptide RGD. Afin d'exploiter ses propriétés d'adhésion cellulaire, Hentschel *et al.* ont synthétisé des chimères PNIPAM-*b*-GGRGDS via une stratégie divergente pour laquelle le peptide est d'abord assemblé sur support solide, fonctionnalisé à l'aide d'un trithiocarbonate, puis clivé et utilisé comme macroinitiateur pour la polymérisation RAFT, entre autres monomères, du NIPAM (Figure 26). ¹⁷⁰ Les chimères PNIPAM-*b*-GGRGDS ont ensuite été greffées sur une surface d'or, sur laquelle les auteurs ont étudié l'adhésion de fibroblastes de souris. A 37°C, donc au dessus de la LCST du PNIPAM (32°C), les fibroblastes adhèrent efficacement au revêtement et, ce bien plus rapidement qu'en l'absence de peptide. Son impact favorable sur l'adhésion est également confirmé par l'inhibition de cet effet par introduction compétitive dans le milieu de peptide libre. D'autre part à 25°C, c'est-à-dire en dessous de la LCST du polymère, les cellules s'arrondissent donc se détachent de la surface, phénomène directement attribuable à l'hydratation du PNIPAM qui masque le peptide. Le caractère thermoréversible de ce revêtement adhésif est très pertinent pour le développement de nouveaux supports de culture *in vitro*. Stoica *et al.* ont aussi étudié des gels riches en feuillets β à base de chimères PNIPAM-*b*-FEFEFKFK, qui présentent le même type de réponse à la température²⁶⁴, tandis que Mei *et al.* ont élaboré un revêtement gélifié à base de conjugués hydrosolubles PHEMA-*b*-GRGDS aux propriétés d'adhésion similaires²⁶⁵.

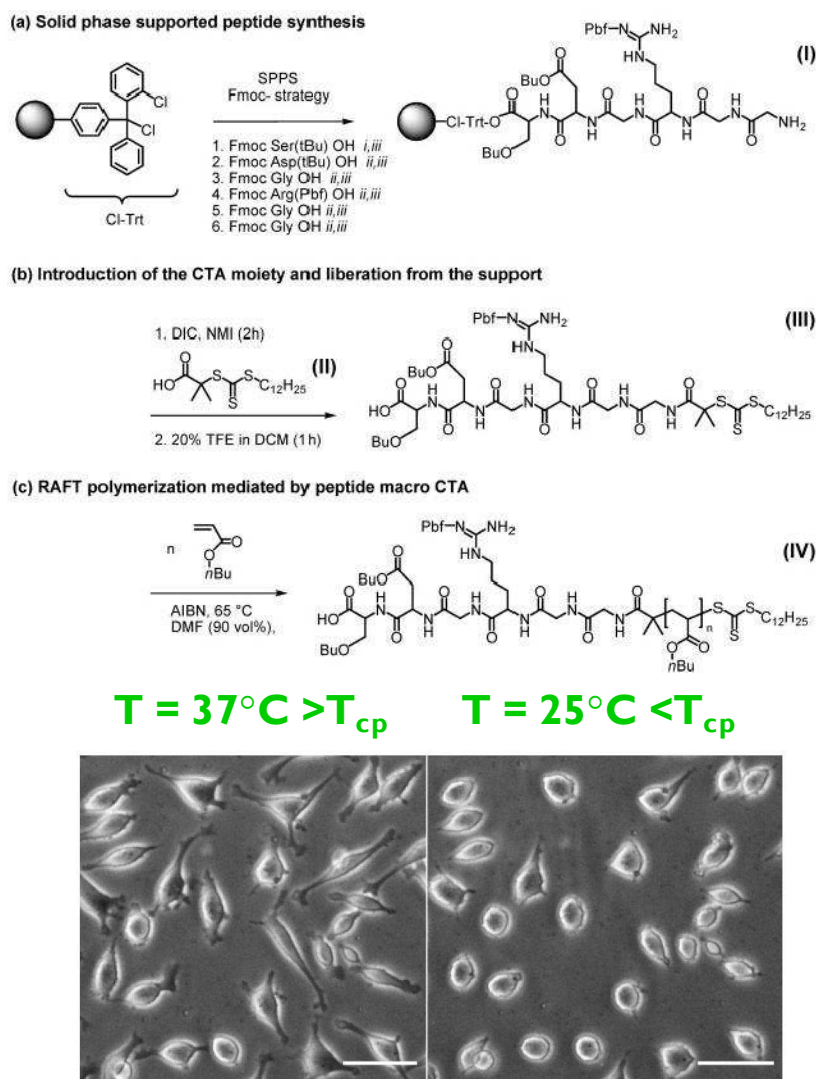


Figure 26 – Schéma de synthèse de chimères PNIPAM-*b*-GGRGDS et clichés de microscopie de fibroblastes de souris mises en culture sur des surfaces d'or greffées de PNIPAM-*b*-GGRGDS après 18 hrs de culture à 37°C et après un refroidissement de 30 min à 25°C. Adaptée des travaux de Hentschel *et al.* ¹⁷⁰

D'autres peptides d'intérêt sont les peptides favorisant le passage de barrières physiologiques limitant l'acheminement d'un agent jusqu'à sa cible. L'une des plus difficiles à franchir est la barrière hémato-encéphalique (BHE), séparant la circulation sanguine du système nerveux central. Dans le but de développer des nanoparticules capables de traverser cette frontière, Costantino *et al.* ont conçu des chimères conjuguant du PLGA (poly(acide D,L-lactide-co-glycolide)) à une série de peptides GFTGFLX, X désignant un résidu sérine O-glycosylé par différentes unités saccharidiques.²⁶⁶ Cette séquence est dérivée d'une substance peptidique opioïde naturelle capable de passer la BHE grâce à une interaction récepteur-spécifique avec les cellules endothéliales des capillaires cérébraux. D'après les images de microscopie électronique, les chimères forment par co-nanoprécipitation avec un bloc de PLGA-Rhodamine des nanoparticules sphériques d'un diamètre compris entre 150 et 200 nm. La synthèse et la caractérisation des conjugués ne sont malheureusement pas claires et pas du tout

abordées dans la discussion, et l'analyse des nanoparticules est sommaire. Cependant les résultats *in vivo* sont convaincants. Les nanoparticules ont été injectées par voie intraveineuse chez le rat, puis une analyse histologique par microscopie confocale à fluorescence, a permis de déterminer leur localisation au sein du tissu cérébral. Pour 3 des 5 peptides étudiés, les nanoparticules atteignent le parenchyme cérébral, alors que les nanoparticules contrôles sans peptide restent confinées à l'intérieur des capillaires sanguins (Figure 27).

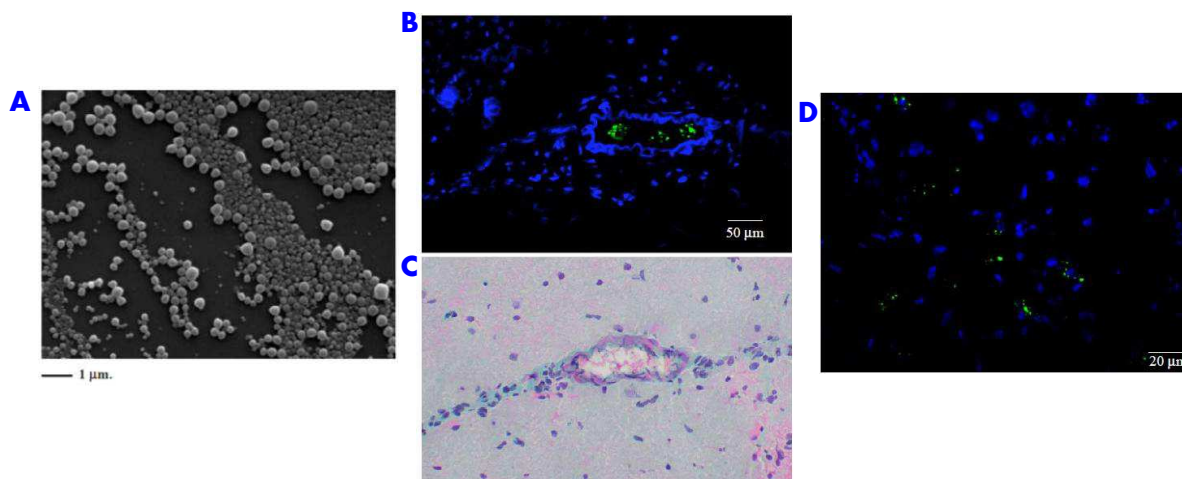


Figure 27 – Cliché de TEM de nanoparticules de PLGA-*b*- GFTGFLX (A). Images de microscopie d'un vaisseau cérébral en coupe de rat traité avec des nanoparticules de PLGA non-fonctionnelles (B et C). Les nanoparticules, marquées en vert sont confinées à l'intérieur des parois du vaisseau (noyaux marqués en bleu). Image de microscopie de tissu cérébral non-vasculaire de rat traité avec des nanoparticules de PLGA-*b*-GFTGFLX (D). Adaptée de Costantino *et al.*²⁶⁶

Enfin, la classe de peptides ayant probablement suscité le plus d'engouement ces 20 dernières années est celle des peptides pour l'internalisation cellulaire (cell-penetrating peptides). D'origines biologiques diverses, ce sont des petites séquences capables de promouvoir le passage de la membrane plasmique des cellules, autre barrière physiologique majeure en pharmacologie. Les conjuguer à un polymère hydrophobe est une stratégie très directe pour obtenir spontanément en solution des nanoparticules fortes d'une densité maximale de peptides en surface, et donc susceptibles de vectoriser toutes sortes de molécules hydrophobes plus profondément dans les tissus cibles voire jusqu'au cytoplasme des cellules.

La plus connue d'entre tous est certainement le peptide Tat, que nous avons choisi d'étudier et dont l'origine et les propriétés seront abordées dans la partie suivante. Lutz *et al.* et Becker *et al.* ont rapporté des voies de synthèse efficaces de conjugués PS-*b*-Tat et PMA-*b*-PAA-*b*-Tat, mais leurs auto-assemblages et propriétés biologiques ne sont pas décrites à ce jour.^{251, 253} Nam *et al.* ont en revanche publié une étude sur l'internalisation *in vitro* de nanoparticules de PLGA-*b*-Tat par des cellules HaCat.²⁶⁷ Cependant, la caractérisation des chimères se limite à un dosage fluorométrique

des amines et à un spectre IR confirmant la présence de liaisons amides mais pas de la liaison thioéther formée. De plus, les chimères ne sont pas purifiées, alors que le taux de couplage annoncé est de 50%. Les nanoparticules sphériques obtenues par nanoprecipitation et analysées par TEM et DLS sont peu résolues en taille et leur potentiel zéta, mesuré à -0.9 mV, n'est pas cohérent avec la présence du peptide cationique à sa surface. Concernant le test d'internalisation, le temps d'incubation n'est pas précisé et les concentrations testées sont extrêmement élevées (1.5 à 50 mg/mL). Enfin, les images de microscopie confocale, qui témoignent qualitativement de l'internalisation par les cellules des nanoparticules, sont floues et saturées en fluorescence et ne sont pas accompagnées d'une image des cellules en transmission, rendant les conclusions difficiles. D'autres systèmes conjuguant le peptide Tat à l'extrémité hydrophile d'un copolymère à bloc amphiphile (PLA-*b*-PEG, PCL-*b*-PEG) ont aussi été rapportés dans la littérature,^{268, 269} mais, étant auto-assemblés en présence d'une majorité de dibloc non-fonctionnel, ils seront décrits dans la partie suivante, décrivant spécifiquement les nanoparticules pour l'internalisation cellulaire à base de peptide Tat. Enfin Yoon *et al.* ont synthétisé des peptides amphiphiles rigides-flexibles Pro₁₀-*b*-Tat qui, bien que ne comportant pas de bloc polymère, sont très proches des chimères décrites ici.²⁷⁰ Ces conjugués peptidiques ont été assemblés par synthèse sur support solide, purifiés par HPLC préparative et leur structure confirmée par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Une analyse de dichroïsme circulaire confirme le repliement en hélice du motif hydrophobe décaproline. Le procédé d'auto-assemblage n'est pas explicité, mais les objets obtenus en solution sont analysés par DLS multiangle et TEM, et les deux techniques concluent à des morphologies sphériques. La diffusion de la lumière indique un rayon hydrodynamique de 74 nm, mais cette valeur est sûrement peu représentative de la taille réelle des objets étant donné la polydispersité visiblement élevée de la distribution de taille présentée sous forme de graphique et les rayons plus importants observés sur les clichés de TEM. Ces dimensions importantes comparativement à la taille du peptide (5 nm en conformation étendue), ainsi que l'aspect des nanoparticules laissent présumer de structures vésiculaires, plutôt que de sphères pleines, dont la formation serait favorisée par la tendance à s'empiler des hélices rigides de décaproline. L'évaluation de ces nanoparticules comme vecteurs pour l'internalisation cellulaire d'une Rhodamine B a ensuite été menée *in vitro* sur des cellules HeLa. Les images de microscopie confocale permettent de colocaliser des signaux fluorescents correspondant aux nanoparticules et à leur cargaison avec le cytoplasme des cellules, cependant cette analyse reste qualitative et aucune donnée contrôle n'est malheureusement fournie.

CONCLUSION

Intégrer, à l'échelle moléculaire, propriétés d'auto-assemblage et fonctions biologiques, en conjuguant un polymère synthétique à une macromolécule biofonctionnelle, est une stratégie prometteuse pour générer spontanément des matériaux bio-interactifs. Mais c'est aussi une approche audacieuse, car la

synthèse et la caractérisation de ces composés sont techniquement très exigeantes. Ces quinze dernières années, des progrès déterminants ont été réalisés sur ce point par les chimistes, qui ont développé des solutions et des outils de synthèse performants et adaptés à ces difficultés. Aujourd'hui, un autre challenge à relever est celui de l'évaluation des propriétés de ces matériaux, qui requiert la maîtrise de compétences transdisciplinaires provenant de domaines scientifiques aussi variés que la biologie, la physico-chimie des colloïdes, la biophysique, la chimie organique et bien sur celle des polymères.

III. NANOPARTICULES EQUIPEES DU PEPTIDE TAT POUR L'INTERNALISATION CELLULAIRE

Les différentes organelles où s'opèrent la plupart des processus biochimiques de la machinerie cellulaire sont confinées dans un espace clos, le cytoplasme, et isolées de l'environnement extracellulaire par la membrane plasmique. Constituée d'une bicouche phospholipidique incluant une fraction protéique substantielle (récepteurs cellulaires, protéines transmembranaires, glycoprotéines etc.), cette barrière physiologique hydrophobe sépare et protège le cytoplasme et son contenu du milieu extracellulaire grâce à une perméabilité très faible et un contrôle sélectif des échanges. Cette barrière physique est un obstacle majeur en pharmacologie, car la plupart des cibles thérapeutiques pertinentes sont situées à l'intérieur des cellules ou au sein de tissus isolés par un dispositif membranaire semblable (ex : barrière hémato-encéphalique, épiderme). Afin de proposer des alternatives à l'approche traditionnelle semi-empirique consistant à sélectionner des principes actifs ayant un coefficient de partage octanol-eau (logP) intermédiaire,²⁷¹ les chercheurs s'intéressent de plus en plus aux solutions trouvées par la nature elle-même pour fissurer le rempart membranaire. Certaines protéines naturelles ont en effet la propriété remarquable de passer à travers la membrane plasmique et d'accéder aux compartiments cytoplasmiques, voire nucléaires. En général, cette capacité de transduction est une caractéristique annexe mais nécessaire à l'accomplissement de la fonction biologique première de la protéine. Parmi ces protéines capables de traverser les membranes, on retrouve donc des facteurs de transcription,^{272, 273} des peptides de signalisation,²⁷⁴ des peptides antimicrobiens,²⁷⁵ et des protéines virales.^{276, 277}

Suite à la découverte de cette formidable faculté chez deux protéines précurseurs, la protéine transactivatrice de transcription du HIV TAT d'une part,^{278, 279} et l'homéoprotéine « Antennapedia » de la drosophile d'autre part,²⁸⁰ biologistes et chimistes se sont efforcés d'élucider les mécanismes à l'origine de ce phénomène et ont découvert que seul un domaine séquentiel relativement court suffisait pour maintenir l'internalisation cellulaire, appelé domaine de transduction de la protéine

(protein transduction domain – PTD). Ils ont identifié par la suite les paramètres moléculaires clefs favorisant le passage de la membrane et à partir de ces données ont développé de nouvelles séquences peptidiques chimériques ou synthétiques présentant des propriétés de transduction semblables. Le concept de peptide d'internalisation cellulaire (cell penetrating peptide – CPP) a alors été introduit pour désigner l'ensemble de ces peptides, qu'ils soient dérivés de protéines naturelles ou issues de bibliothèques synthétiques. Vingt ans après leur découverte, ces peptides ont été employés avec succès pour l'adressage intracellulaire *in vitro* et *in vivo* d'un très grand nombre et d'une large gamme de molécules, de composition et de structure variées, allant de petits peptides à de larges nanoparticules de plusieurs centaines de nanomètres de diamètre en passant par des biomacromolécules diverses telles que des oligonucléotides ou des protéines. Depuis le nombre de publications à ce sujet n'a cessé de croître et la littérature abonde aujourd'hui d'excellentes revues et nous invitons le lecteur à consulter en particulier celles récentes de Torchilin et coll.,²⁸¹ de Divita et coll.,²⁸² de Kelley et coll.,²⁸³ et de Miletto.²⁸⁴

De part son statut de pionnier historique, mais aussi probablement du fait d'une efficacité fermement établie, le peptide Tat, domaine de transduction de la protéine TAT transactivatrice de transcription du HIV, est de loin le plus populaire et le plus documenté d'entre tous. Nous l'avons sélectionné pour notre étude en tant que séquence peptidique modèle, non structurée et à la bioactivité solidement avérée, pour assurer le rôle de bloc hydrophile et biofonctionnel au sein d'une construction chimérique polymère-peptide amphiphile afin d'obtenir par auto-assemblage des nanoparticules pour l'internalisation cellulaire. Ainsi dans cette étude bibliographique nous relaterons dans un premier temps l'origine et l'histoire de ce peptide, puis nous aborderons la question partiellement élucidée de son mécanisme d'internalisation. Nous décrirons ensuite de façon plus exhaustive les exemples de nanovecteurs pour l'internalisation cellulaire équipés de peptide Tat à leur surface avant d'aborder la limitation majeure de ce type d'approche, à savoir son manque de sélectivité, ainsi que les stratégies et perspectives envisagées afin d'y remédier.

III.1. LE PEPTIDE DE TRANSDUCTION TAT

III.1.1. DECOUVERTE : DE LA PROTEINE TAT DU VIRUS D'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (HIV) AU PEPTIDE TAT

A la fin des années 80, deux équipes de recherche américaines, celles de Frankel et Pabo à Baltimore et celle de Green et Loewenstein à Saint Louis, se sont intéressés de près à la protéine TAT sécrétée par le virus HIV-1. Cette petite protéine de 86 résidus transactive la transcription de l'ARN viral en se liant à lui et joue donc un rôle essentiel dans la réplication et la prolifération du virus. Alors qu'ils tentent de mettre au point un test permettant de détecter cette transactivation *in vitro*,

ils découvrent au cours d'un contrôle que la protéine TAT purifiée est spontanément internalisée par les cellules et acheminée jusqu'à l'intérieur de leur noyau.^{278, 279} Elle ne serait donc pas un simple agent de transactivation, mais une sorte de toxine virale, capable par elle-même de sortir de la cellule infectée dans laquelle elle est produite pour aller contaminer des cellules saines et altérer ou modifier l'expression de leurs gènes, une hypothèse qui sera confirmée par la suite (Figure 28).²⁸⁵

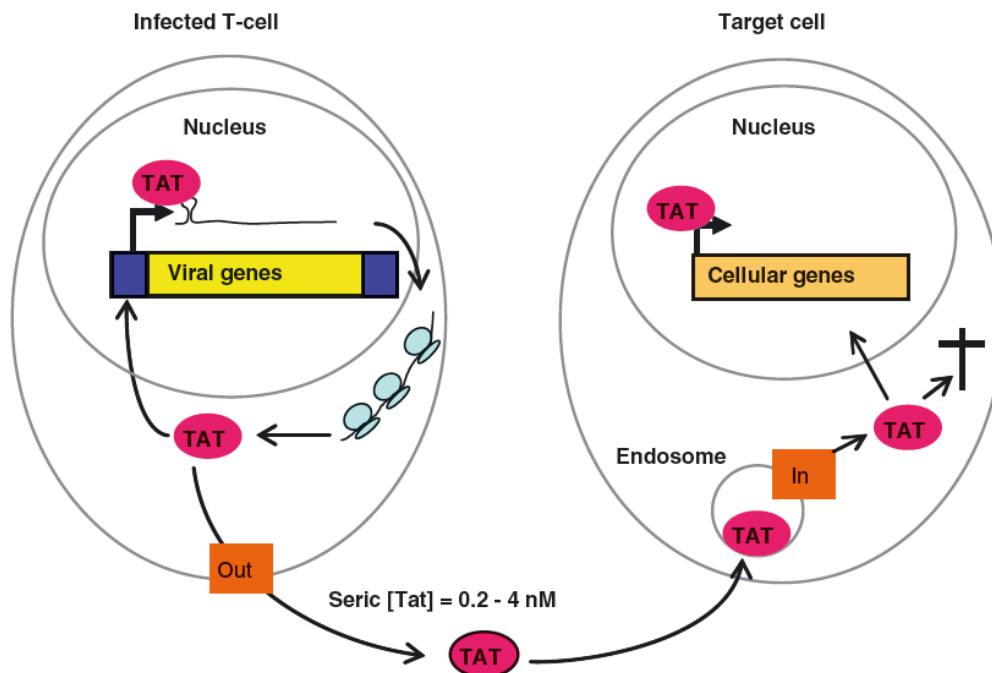


Figure 28 - Représentation schématique de l'activité et du transport cellulaire de la protéine TAT du virus HIV-1. Reproduit des travaux de Debaisieux et al.²⁸⁵

La facilité avec laquelle cette petite protéine hydrophile traverse les barrières membranaires successives est une découverte majeure qui fascine et déconcerte les chercheurs. Dès lors, ils n'auront de cesse de vouloir comprendre les mécanismes qui lui permettent de sortir mais surtout de rentrer si aisément dans les cellules. Sa « dissection » moléculaire est entreprise par Fawel et al. en 1994 lorsqu'ils rapportent que le peptide Tat₃₇₋₇₂, c'est à dire la séquence de 36 acides aminés située entre le 37^{ème} et le 72^{ème} résidu de la protéine TAT, est capable de promouvoir l'internalisation cellulaire de larges protéines modèles auxquelles il est conjugué de façon covalente en 4 ou 5 exemplaires, sans altérer leur activité propre ni affecter la viabilité cellulaire.²⁸⁶ Ce peptide tronqué présente deux domaines susceptibles d'être impliqués dans le processus de transduction : un domaine central non-structuré riche en résidus basiques comprenant 6 arginines et 2 lysines et une séquence N-terminale repliée en hélice α . En 1997, en synthétisant des peptides présentant des délétions de résidus dans ces deux zones, Vives, Brodin et Lebleu (Montpellier, France) démontrent que la faculté de transduction du peptide est entièrement attribuable à son domaine basique tandis que l'hélice est, elle, responsable de sa toxicité.²⁸⁷ Le domaine de transduction de la protéine TAT se

réduit donc à la séquence cationique Tat₄₉₋₅₇ (RKKRRQRRR), appelée plus simplement par la suite peptide Tat. Dès lors, l'utilisation de ce peptide pour transporter dans les cellules toutes sortes de molécules gagne en popularité. En parallèle, les chercheurs continuent à tenter de percer le secret de son mécanisme d'internalisation.

III.1.2. MECANISME(S) D'INTERNALISATION

III.1.2.1. Paramètres moléculaires : caractère basique et rôle des arginines

Le peptide Tat possède majoritairement des résidus basiques (8 sur 9, dont 6 arginines et 2 lysines). Or on sait depuis les années 60 que les macromolécules polycationiques, comme les histones ou le poly(lysine) facilitent l'internalisation cellulaire *in vitro* de protéines.²⁸⁸ D'autre part, on retrouve également une forte proportion de résidus arginines et lysines chez d'autres peptides d'internalisation, comme les peptides antimicrobiens ou la Pénétratine dérivée de l'homéodomaine de la protéine « Antennapedia ». ²⁸⁹ Les fonctions latérales cationiques de ces acides aminés, guanidine et amine primaire respectivement, sont donc fortement suspectées de jouer un rôle crucial dans le processus d'internalisation. Pour confirmer cette hypothèse, Vives *et al.* entreprennent de remplacer un par un chaque résidu de la séquence par une alanine.²⁹⁰ Comme pressenti, pour tous les résidus basiques, cette modification se traduit par une diminution de la transduction. A ce moment là, un autre groupe, celui de Wender et ses collaborateurs (Stanford, USA), entreprend d'identifier et d'exploiter les paramètres moléculaires clefs permettant au peptide Tat de traverser la membrane plasmique. *Via* une série de délétion systématique en position N et C terminale du domaine Tat₄₉₋₅₇, ils parviennent à la même conclusion : la séquence nonamérique complète est nécessaire pour une internalisation optimale.²⁹¹

Afin d'évaluer la contribution relative des lysines et des arginines, Rothbard et coll. synthétisent des homo-oligomères d'acides aminés basiques – arginine, lysine, histidine, ornithine - et structuralement proche - citrulline - de différentes longueurs et examinent leur potentiel d'internalisation cellulaire par cytométrie en flux et microscopie confocale. Ils observent deux choses : d'une part, les oligomères de moins de six acides aminés sont inefficaces, d'autre part, au-delà de cette taille, les oligomères d'arginines sont internalisés de façon beaucoup plus rapide et importante que les autres oligomères cationiques.²⁹² Dans une seconde étude publiée simultanément, Wender et coll. comparent cette fois les propriétés d'internalisation mesurées par cytométrie en flux de ces oligomères avec celles du peptide Tat.²⁹¹ Ils observent que pour une séquence de 9 arginines successives (R₉) le taux de fluorescence associé à la quantité de peptide par cellule est aussi important que pour le peptide Tat et augmente même plus rapidement (20 fois plus vite selon le modèle cinétique de Michaelis-Menten). Une séquence « mélangée » (*scrambled peptide*,

régioisomère) du peptide Tat, son énantiomère D ainsi qu'un analogue dépourvu de squelette peptidique sont aussi évalués dans ces conditions et fournissent une réponse très similaire à celles de R₉ et Tat. Un an plus tard, Futaki *et al.* (Kyoto, Japon) rapportent des résultats semblables. Parmi la série d'oligomères testés, l'octarginine (R₈) présente une affinité cellulaire maximale et équivalente à celle du peptide Tat, dont il est par ailleurs l'analogue moléculaire le plus proche en terme de charge nette, de nombre d'acides aminés et de nombre de résidus arginine.²⁹³

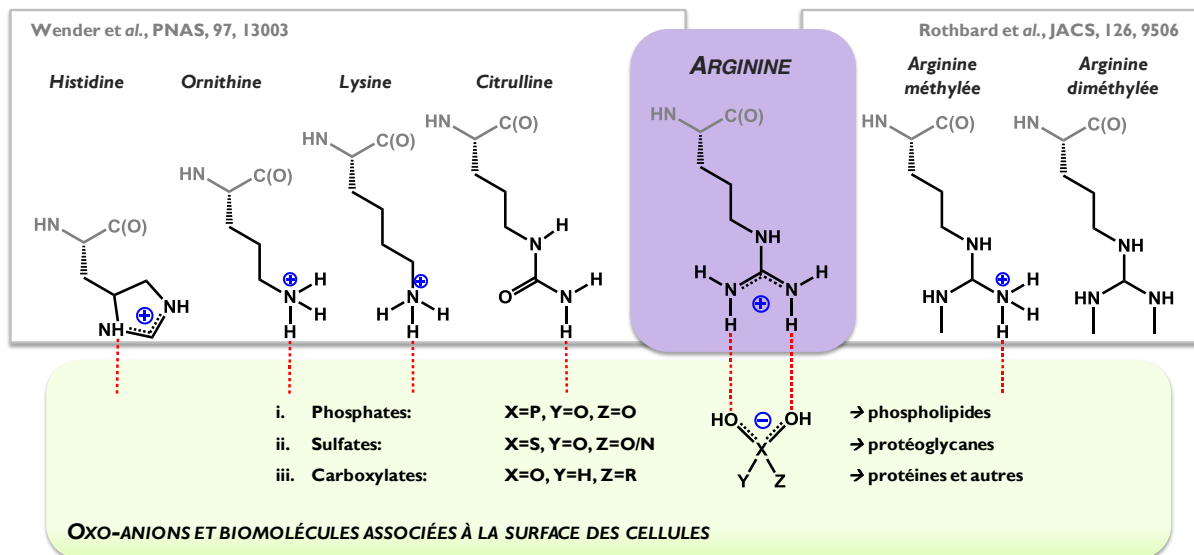


Figure 29 - Coordination bidentate supposée des guanidines latérales des résidus arginine avec les oxo-anions –phosphate, sulfate et carboxylate – par interaction de charge et liaisons hydrogènes et comparaison structurale avec d'autres acides aminés naturels et synthétiques analogues

Collectivement, ces données suggèrent que le mécanisme de transduction du peptide Tat n'est pas strictement lié à sa nature peptidique et ne fait pas appel à la reconnaissance d'un récepteur membranaire spécifique qui serait sensible à un changement de stéréochimie. En revanche, son interaction avec les cellules est fortement affectée par le nombre et l'arrangement spatial de ses résidus basiques et en particulier des arginines, dont l'intégrité moléculaire des guanidines latérales est capitale.²⁹⁴ La différence d'affinité flagrante observée entre les oligomères d'arginines et leurs analogues à base d'autres résidus aminés est remarquable et conduit Wender et ses collaborateurs à formuler la proposition suivante: les guanidines du peptide positivement chargées établissent une liaison bidentate avec les oxo-anions – phosphates, sulfates et carboxylates - abondants en surface de la membrane plasmique, liaison stabilisée à la fois par la neutralisation de charge et par la formation de deux liaisons hydrogènes (Figure 29). Cela n'est possible ni pour les résidus à base d'amines primaires, ni pour la citrulline qui est une arginine dont l'imine primaire est remplacée par un carboxyle. Ils synthétisent alors des octamères d'arginine mono- et diméthylés et observent que l'affinité cellulaire de ces peptides alkylés est diminuée de respectivement 80% et 95% par rapport à celle de l'octaarginine, confirmant ainsi leur hypothèse.²⁹⁵ Dès lors, cette équipe et d'autres s'éloignent de la structure peptidique native pour développer des analogues synthétiques présentant

un nombre et une distribution spatiale en guanidines comparable mais plus simples à synthétiser et moins sensibles aux protéases, comme des structures dendritiques, des polymères de faible masse molaire, des oligosaccharides présentant des guanidines en position latérales, etc.²⁵ Les différents systèmes développés depuis en ce sens ont récemment fait l'objet d'une revue, sous la désignation de transporteurs moléculaires pour l'internalisation cellulaire.²⁹⁴

III.1.2.2. Etape initiale d'adhésion membranaire

En parallèle de ces études relations structure moléculaire/activité menées par des chimistes, les biologistes et biophysiciens, qui analysent eux aussi scrupuleusement le mécanisme d'internalisation de la protéine TAT ou du peptide Tat, mais avec une approche expérimentale et des outils différents, convergent vers la même conclusion : le processus de transduction est initié par l'adhésion électrostatique du peptide à la surface des cellules, favorisée et stabilisée par les pontages non-covalents établis entre les arginines et les groupements anioniques des biomolécules membranaires. Les macromolécules candidates pour ce type d'interactions ne manquent pas à la surface des cellules (Figure 30). Parmi elles, les phospholipides et les protéoglycanes sont les plus abondantes et donc les plus susceptibles d'être impliquées. Alors que les phospholipides sont les briques élémentaires de la bicouche lipidique, les protéoglycanes sont des protéines ancrées dans la membrane et substituées sur leur domaine extracellulaire par une ou plusieurs chaînes de polysaccharides linéaires chargés négativement appartenant à la famille des glycosaminoglycanes (GAGs). Plusieurs études distinctes, détaillées dans la revue de Brooks *et al.*, ont montré que cette première étape d'association membranaire peut être inhibée de façon compétitive par de l'héparine, une glycosaminoglycane hautement sulfatée, ou d'autres GAGs et macromolécules polyanioniques analogues.²⁹⁶ Or les protéoglycanes à base d'héparane sulfate (HSPG), une glycosaminoglycane structurellement très proche de l'héparine, sont présentes de façon importante à la surface des cellules et par ailleurs, de nombreuses études prêtent à ces molécules encore mal connues la fonction de récepteur pour l'endocytose d'autres ligands extracellulaires variés comme les facteurs de croissance, des virus comme celui de l'Herpes et HIV-1 et certaines bactéries intracellulaires.²⁹⁷ Les protéoglycanes membranaires sulfatées sont donc pressenties comme point d'ancrage principal pour le domaine de transduction. Plusieurs études indépendantes d'internalisation sur des cellules mutantes déficientes en protéoglycanes valident cette hypothèse. En leur absence, l'interaction est en effet réduite d'une amplitude variable mais toujours manifeste et parfois sévère selon les cas.²⁹⁸⁻³⁰⁰ Cependant cette affinité n'est pas exclusive car l'internalisation n'est jamais complètement inhibée et des contre-exemples existent impliquant d'autres récepteurs potentiels comme par exemple récemment des protéases membranaires.³⁰¹ De plus, des études biophysiques ont montré que le peptide Tat et ses analogues riches en arginines interagissent aussi fortement et peuvent modifier la courbure et la phase de membranes phospholipidiques modèles, notamment en présence d'un potentiel

membranaire.³⁰²⁻³⁰⁴ Ces différentes observations, ainsi que la plupart de celles ayant été rapportées depuis 15 ans, semblent concorder avec l'hypothèse selon laquelle les biomolécules anioniques en surface des cellules permettent à la protéine TAT et aux peptides riches en arginines de s'arrimer de façon non-spécifique à la membrane. Cette association initiale advient indépendamment de la température et du type de cellules et est particulièrement forte car elle peut résister aux lavages mécaniques même les plus rudes.³⁰⁵ Elle permet à la molécule de se concentrer localement à la surface des cellules avant d'être internalisée. Qu'advient-il alors ? Comment la protéine/le peptide avec sa cargaison s'il en a rejoint-ils le cytoplasme de la cellule ? Voilà l'épineuse question à laquelle la communauté scientifique tente de répondre depuis maintenant 20 ans.

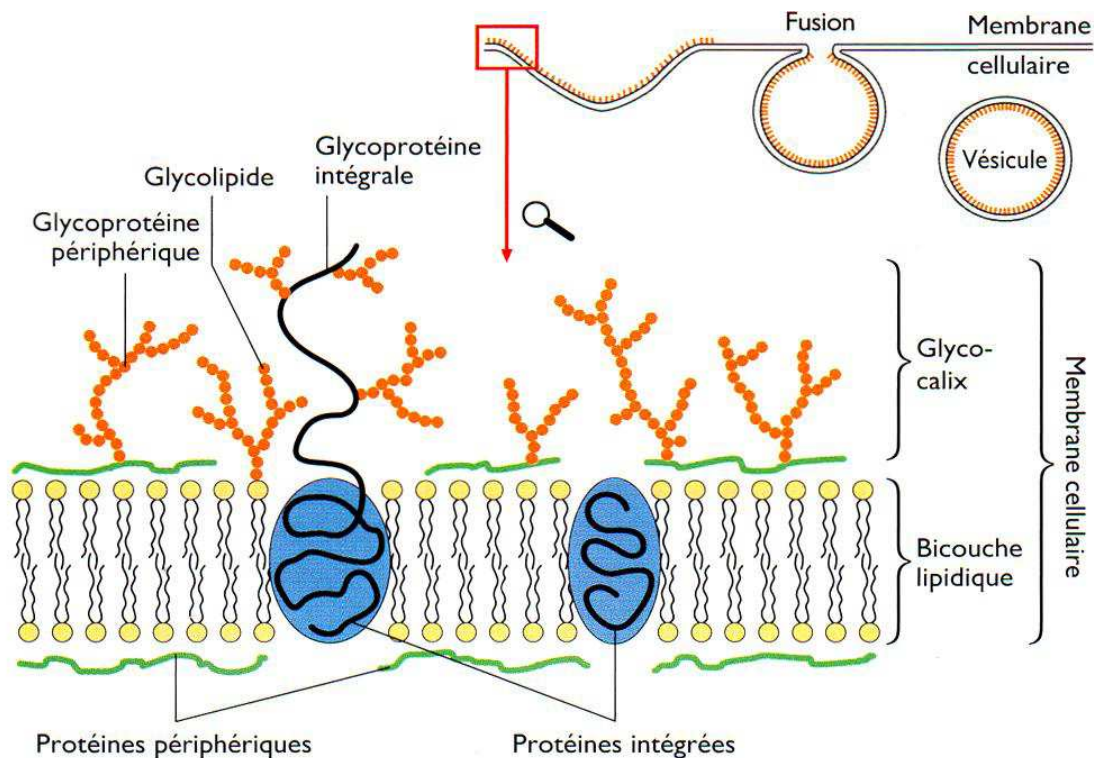


Figure 30- Modèle complet de la constitution d'une membrane cellulaire. Les polysaccharides présents à sa surface (les points oranges correspondent à des unités saccharidiques individuelles) fixés à des protéines (protéoglycanes) et des lipides (glycolipides) forment avec les protéines externes le glyco-calix. L'encadré montre à plus petite échelle la biogénèse du glyco-calix par fusion de vésicules avec la membrane dans lesquelles les composants glycosylés (traits oranges) vont diffuser latéralement. Reproduit de Plattner et Hentschel.³⁰⁶

III.1.2.3. Passage à travers la membrane plasmique : à la recherche du mécanisme d'entrée

La littérature est riche de multiples études et réflexions à ce sujet que nous nous garderons d'aborder extensivement ici, préférant renvoyer le lecteur vers des revues consacrées à cette question, comme celles de Vives et coll.,²⁹⁶ de Dowdy et coll.,³⁰⁷ et de Wang et coll.³⁰⁸ Après la découverte des propriétés de transduction de la protéine TAT et pendant près de 15 ans, les

données expérimentales alors disponibles conduisent à la conclusion que la protéine et la séquence peptidique Tat associée traversent directement la membrane plasmique par un procédé indépendant de l'énergie et des voies classiques d'internalisation par endocytose. De nombreux arguments penchent en faveur de cette hypothèse :

- L'étape initiale d'association membranaire est non-spécifique ;
- Les inhibiteurs classiques des voies d'endocytose (basse température, agents chimiques) ne semblent pas altérer significativement le processus de transduction ;
- le domaine basique de transduction interagit fortement avec les têtes polaires chargées de membranes phospholipidiques modèles.

Un mécanisme d'entrée par micellisation inverse est alors proposé : le peptide, à la charge nette initialement positive, forme, avec les biomolécules chargées négativement de la membrane, un complexe neutre qui s'entoure de têtes polaires lipidiques créant ainsi une micelle inverse. Celle-ci traverse la phase lipidique de la membrane et se disloque comme elle s'est formée de l'autre côté libérant le peptide dans le cytoplasme.

En 2003, cette hypothèse a été remise en question par les équipes de Lebleu et coll.³⁰⁹ et Johansson et coll.³¹⁰ qui ont mis en évidence des failles dans la méthodologie expérimentale des études reportées jusque-là. En effet, l'internalisation cellulaire *in vitro* y était généralement évaluée *via* un marquage fluorescent par deux techniques complémentaires : la microscopie de fluorescence et la cytométrie en flux. Ces deux équipes ont démontré que la fixation des cellules avant leur observation au microscope conduit à une redistribution factice du peptide dans le cytosol et le noyau, biaisant ainsi l'observation de la localisation qualitative des molécules dans les cellules. D'autre part, la cytométrie en flux mesure la fluorescence moyenne des cellules d'où qu'elle provienne. Sachant que l'association du domaine de transduction avec la membrane est très forte et résiste aux lavages mécaniques, il est alors impossible, à moins de prendre des mesures plus drastiques comme un traitement enzymatique ou une extinction chimique de la fluorescence de surface, de distinguer le signal provenant des molécules collées à la membrane de celles effectivement internalisées. L'union de ces deux biais expérimentaux a conduit à une mésinterprétation des données confondant adhésion membranaire, endocytose et translocation directe. A compter de cette date, une réévaluation prudente du mécanisme d'entrée a été entreprise, privilégiant l'imagerie de cellules non-fixées et le suivi de l'internalisation *via* l'activité biologique d'un cargo ne pouvant s'exprimer qu'une fois celui-ci bel et bien internalisé dans le cytoplasme ou le noyau.

La plupart des études menées depuis s'accordent sur une entrée dans les cellules très majoritairement sinon exclusivement dominée par un mécanisme d'endocytose dépendant de l'énergie. L'adhésion membranaire initiale est rapidement suivie par la formation d'une invagination

qui conduit à la translocation de Tat et de son cargo dans le cytoplasme à l'intérieur d'une vésicule formée par le fragment de la membrane sur laquelle le domaine basique s'est ancré. Ce phénomène se traduit visuellement sur les images de microscopie par une distribution ponctuelle et intense de la fluorescence. Ces ponctuations correspondent aux vésicules endosomales et migrent, en général en s'agréant, des abords de la membrane vers la région périnucléaire.^{286, 311}

Or, il y a de nombreuses façons de provoquer une endocytose, impliquant des protagonistes membranaires variés et des cascades complexes d'interaction lipides-protéines et protéines-protéines (Figure 31). On distingue les endocytoses adsorptives qui adviennent *via* l'intermédiaire de récepteurs spécifiques, et les endocytose en phase fluide, ou pinocytose, où les molécules capturées ne sont pas nécessairement liées à la membrane.³¹² Selon ces différentes voies d'import, le devenir des vésicules dans le cytoplasme peut être très différent. Laquelle d'entre elle est empruntée par la protéine TAT ou le peptide Tat associé? Sur ce point comme sur celui des récepteurs impliqués dans l'interaction de surface, la littérature n'a pas réussi à s'accorder sur un mécanisme clair et universel.

Dans un premier temps, différentes voies d'endocytose dominantes, mais jamais absolument exclusives, ont été mises en évidence. Pour le peptide Tat, seul ou inclus dans des protéines de fusion, certaines études penchent en faveur d'une endocytose « standard » *via* les clathrines,^{311, 313} d'autres vers une endocytose par l'intermédiaire de cavéoles, c'est-à-dire des vésicules formées après fixation sur des radeaux lipidiques, microdomaines membranaires riches en sphingolipides et cholestérol, mais aussi en glypicans, des récepteurs anioniques de type protoglycanes potentiels pour le domaine basique de Tat.³¹⁴ Dowdy et coll. (San Diego, USA) ont de leur côté conclu à un mécanisme non-spécifique de macropinocytose.^{315, 316} Pour la protéine TAT intégrale, les choses semblent légèrement plus claire. A deux reprises, Giacca et coll. (Trieste, Italie) ont rassemblé plusieurs éléments en faveur d'une endocytose *via* les cavéoles dans les cellules HeLa.^{314, 317} Puis Beaumelle et coll. (Montpellier, France) ont ensuite montré que les lymphocytes T, dépourvus de cavéoles, internalisent la protéine par l'intermédiaire des clathrines.³¹⁸ Le comportement de la protéine apparait alors semblable à celui d'une toxine bactérienne comme celle du choléra qui peut emprunter plusieurs voies différentes pour infecter une cellule en fonction de sa nature et des récepteurs disponibles à sa surface.³¹⁹ Cette hypothèse est en accord avec les résultats publiés la même année par Fischer *et al.* montrant que des cellules HeLa et des cellules MC57 de fibrosarcome en co-culture internalisent les peptides R₉ et Tat dans des proportions et selon des voies différentes.³²⁰ D'autres part, cette étude révèle une inhibition et une stimulation significative de l'internalisation en présence respectivement de brefeldin A et d'acide nordihydroguaiarétique, deux composés interférant avec le trafic du réseau *trans*-golgien. Ce comportement est très similaire à celui de certaines toxines végétales et bactériennes dont l'entrée dans les cellules par endocytose est suivie d'un transport rétrograde vers l'appareil de Golgi, puis vers le réticulum endoplasmique. Au vu

de leurs nombreux points communs avec ces toxines, les auteurs suggèrent un devenir intracellulaire semblable pour le peptide Tat et les peptides cationiques en général.

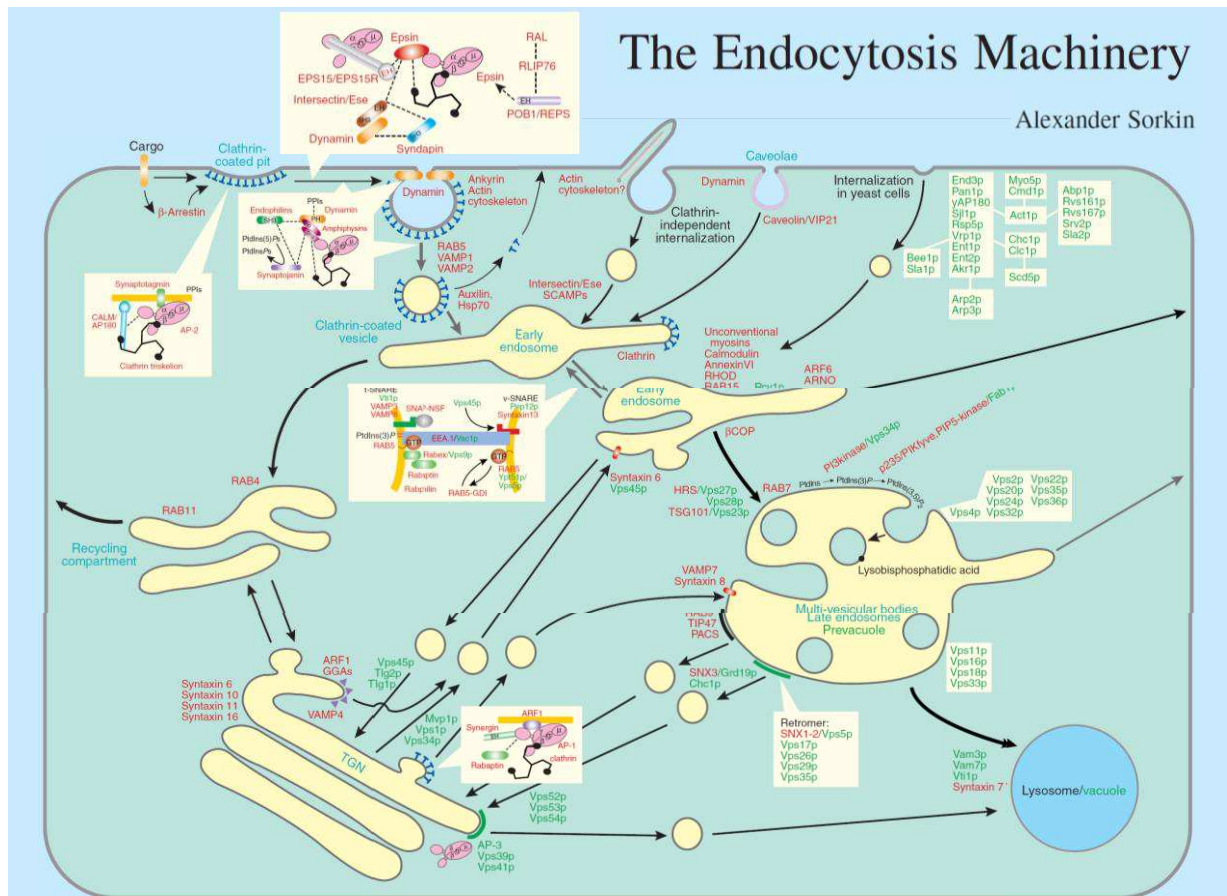


Figure 31- Protéines impliquées dans la régulation des voies endocytiques des cellules de mammifère.

Reproduit des travaux de A. Sorkin.³¹²

En 2007, Duchardt *et al.* font un pas de plus en avant en démontrant que la voie d'internalisation et la distribution intracellulaire des peptides Tat et R₉, conjugués à des fluorochromes, dans des cellules HeLa dépendent fortement de la concentration d'incubation.³²¹ Alors qu'en dessous de 5 µM, l'endocytose semble assurée *via* les radeaux lipidiques, au-delà de cette concentration, une nette inhibition de l'internalisation par la chlorpromazine indique qu'une grande partie de l'endocytose passe alors majoritairement par l'intermédiaire des clathrines. Au-delà de 10 µM, les auteurs notent de surcroix la présence d'une grande quantité de peptide dans le cytoplasme suggérant une translocation directe indépendante de l'endocytose. Afin d'en savoir plus, ils décident d'observer, par microscopie en temps réel des cellules exposées à une concentration élevée de peptide R₉, soit 20 µM. Ils voient alors se former ponctuellement à la surface des cellules des zones de fluorescence intense, indiquant que le peptide s'accumule au niveau de microdomaines membranaires spatialement restreints à raison de un ou de deux sites par cellule. Le peptide momentanément confiné sur ces plateformes est ensuite relargué et dispersé directement dans le cytoplasme puis dans le noyau, le tout en l'espace d'une dizaine de minutes seulement. Ce phénomène étonnant se produit en fait

lorsqu'une forte quantité de peptide se retrouve concentrée à la surface de la membrane, par exemple lorsque l'entrée par endocytose est bloquée par un inhibiteur. Très récemment, Futaki et coll. ont rapporté un comportement analogue pour le peptide R₁₂ lui aussi conjugué à un fluorophore hydrophobe (Figure 32).³⁰⁴

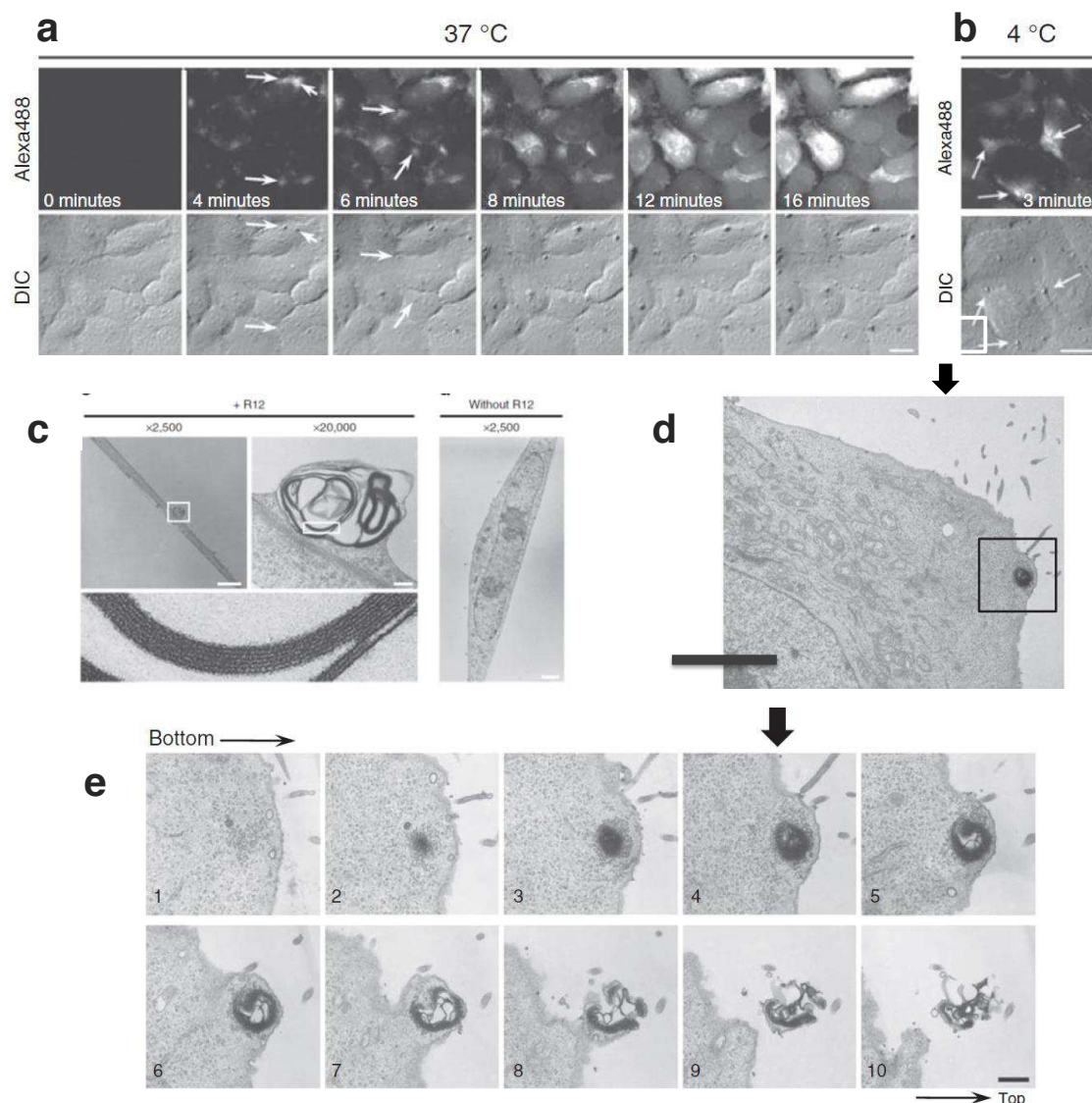


Figure 32 - Internalisation directe du peptide R₁₂-Alexa488 dans le cytosol accompagnée par la formation de structures particulières multi-vésiculaires sur la membrane plasmique. a et b) Suivi du phénomène en temps réel par microscopie de fluorescence (haut) et à contraste interférentiel (bas), les flèches indiquant les points d'influx à 37°C (a) et à 4°C (b); c) clichés de TEM de membrane de cellules traitées (gauche, formation de particule multi-vésiculaire) ou non (droite) avec le peptide; d) cliché de TEM d'une particule, barre d'échelle= 2 µm; e) z-stack TEM de la particule observée en d), barre d'échelle = 500 nm, intervalle = 80 nm. Adaptée de Hirose et al.³⁰⁴

En combinant microscopie optique en temps réel, microscopie électronique à transmission et études biophysiques sur des modèles membranaires, ils ont pu montrer que le peptide se concentre en certains points précis de la membrane plasmique où se trouvent également de nombreux composants membranaires anioniques. Cette accumulation induit la formation de microparticules

protubérantes clairement identifiables sur les clichés de TEM et constituées d'un amas de vésicules multilamellaires. Le peptide alors fortement concentré localement provoque une inversion de la membrane sans toutefois la rompre, ce qui participe à son influx dans le cytosol.

Il est intéressant de noter que ce mécanisme est grandement favorisé par la présence du fluorochrome hydrophobe covalentement lié au peptide. Ce dernier élément suggère que la nature du cargo véhiculé par le peptide Tat peut avoir une influence déterminante sur le mode d'internalisation et rejoint en cela les conclusions de Tuennemann *et al.*³²² Cette équipe a en effet montré qu'à concentration égale, la taille et la nature chimique du cargo attaché au peptide Tat influence la voie d'entrée dans la cellule. Ainsi, au-delà d'une concentration seuil, les petits cargos hydrophobes conduisent simultanément à une endocytose et une translocation directe, tandis que lorsque le peptide Tat est fusionné à une protéine de masse molaire élevée ou à une nanoparticule, l'import est exclusivement vésiculaire. D'autre part, les auteurs suspectent également une corrélation entre la charge du domaine de transduction et sa propension à induire une translocation directe (Figure 33).

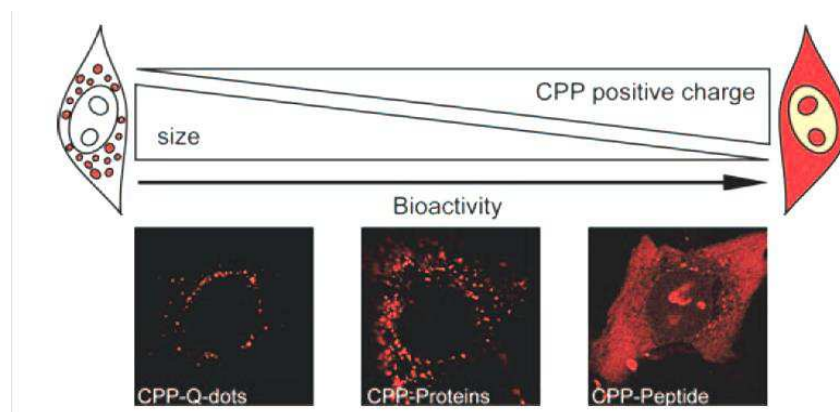


Figure 33 - Influence de la charge du peptide d'internalisation et de la taille du cargo sur le mode d'internalisation et le profil de fluorescence intracellulaire associé. Adaptée de Tuennemann *et al.*³²²

L'ensemble de ces données révèle que le comportement de la protéine TAT et de son domaine de transduction est changeant et s'adapte en fonction du type de cellule, de la concentration, de la nature chimique et de la taille de la molécule qu'il transporte. Ces paramètres étant variables d'une étude à une autre, il est très difficile de comparer les différents résultats publiés et de tirer des conclusions claires. Néanmoins, il en ressort qu'il n'y a pas de mécanisme universel et qu'il faut rester prudent et examiner chaque cas particulier. D'autre part, aucune de ces études n'explique dans les détails comment le domaine de transduction de TAT parvient à activer telle ou telle voie d'internalisation.

Une hypothèse alternative méritant d'être envisagée est que le domaine de transduction ne jouerait justement aucun rôle particulier et se contenterait simplement de se concentrer sur la membrane, en attendant d'être capturé avec sa cargaison par les vésicules naturellement formées dans le cadre

d'autres endocytoses stimulées de façon parfaitement indépendantes ou du recyclage de la membrane, qui se renouvelle naturellement en moins d'une heure. Un tel attentisme expliquerait pourquoi son entrée dans les cellules est si variable et dépendant des conditions expérimentales et pourquoi la plupart des inhibiteurs ont un effet partiel et plus ou moins marqué sur son internalisation. Cependant cette théorie est difficilement compatible avec la formation à concentration élevée de microparticules membranaires multivésiculaires conduisant à une translocation massive et rapide dans le cytosol.^{304, 320} D'autre part des études récentes revendiquent une véritable stimulation membranaire de la part du peptide qui peut, par exemple, depuis l'extérieur d'une vésicule de phospholipides géante, induire le réarrangement de filaments d'actine encapsulés dans cette même vésicule, ou bien encore s'internaliser de lui-même dans des vésicules géantes reconstituées à l'aide de fragments membranaires.^{323, 324}

III.1.2.4. Sortie de l'endosome

Une autre question qui se pose lorsque l'internalisation se produit par endocytose est de savoir comment les molécules sortent des vésicules endosomales dans lesquelles elles ont été capturées. Pour les raisons évoquées ci-dessus, les différents éléments rapportés dans la littérature sont très difficilement comparables, mais il semblerait que la restriction de la protéine TAT à son domaine de transduction ait entraîné la perte de sa capacité spécifique à sortir des endosomes, car les conjugués et particules véhiculés par le peptide Tat s'y retrouvent en grande partie piégés, jusqu'à leur dégradation par les protéases ou leur expulsion de la cellule par exocytose. L'incapacité dans laquelle ils se trouvent d'atteindre efficacement le cytoplasme et le noyau est une des limitations majeures de l'internalisation cellulaire par l'intermédiaire du peptide Tat et de ses analogues riches en arginines. Pourtant la protéine TAT pour sa part parvient jusqu'au noyau puisqu'elle y active la transcription du génome viral. Son mécanisme de sortie de l'endosome a été récemment élucidé par l'équipe de Beaumelle et coll. (Figure34).²⁸⁵ Dans une première étude en 2004, ils ont prouvé que le pH naturellement acide ($\text{pH} < 6$) des endosomes, ainsi que la présence de la protéine chaperonne Hsp90 sont indispensables à la protéine pour sortir des compartiments vésiculaires et rejoindre le cytoplasme puis le noyau sous sa forme active.³¹⁸

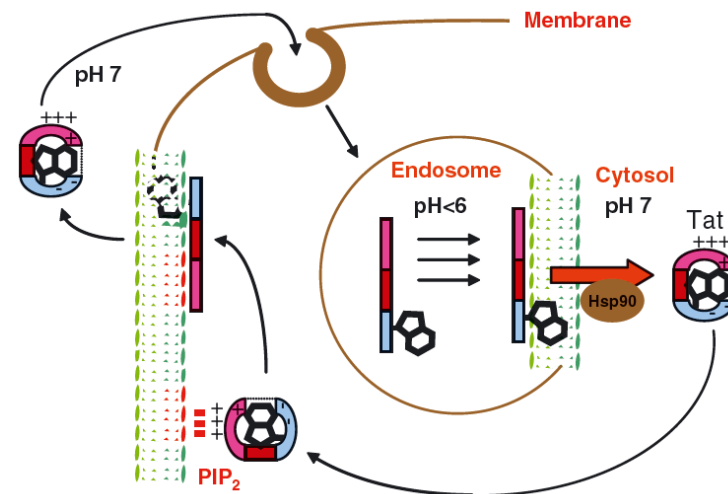


Figure 34 - Mécanisme proposé pour le déploiement et l'insertion membranaire de la protéine TAT.²⁸⁵

En 2009, ils ont découvert qu'à un pH inférieur à 6 la protéine s'insère dans les membranes lipidiques grâce un résidu tryptophane aromatique Trp¹¹ par ailleurs indispensable à sa translocation et strictement conservé chez les différents isolats viraux.³²⁵ Ils ont également mis en évidence un changement de conformation crucial dépendant du pH: à pH >6,5 la protéine est maintenue en position « fermée » par une interaction électrostatique entre ses deux résidus acides N-terminaux Glu et Asp et les arginines 55, 56 et 57 de son domaine basique. Le résidu Trp¹¹ est alors dissimulé. A pH<6, les acides glutamique et aspartique sont en partie protonés et l'interaction est rompue, permettant à la protéine d'adopter une conformation « ouverte » dans laquelle le tryptophane est exposé et disponible pour s'insérer dans la membrane. Comme ce résidu est absent du domaine de transduction, il est donc logique que le peptide Tat ne puisse pas *à priori* sortir des endosomes. Cette conclusion est une preuve que la Nature, et surtout le HIV, ne laisse rien au hasard et que la restriction de la séquence d'une protéine conduit à une perte d'information, qui s'avère en l'occurrence dommageable.

Malgré cela, de nombreuses études montrent que le peptide Tat peut par transduction directe ou en sortant des vésicules par des voies non-élucidées, délivrer une part suffisante de sa cargaison afin de déclencher une réponse biologique significative et satisfaisante. Le fait qu'il soit intégré à plusieurs principes actifs dans le cadre de développements cliniques prouve d'ailleurs son intérêt et sa pertinence en tant que vecteur intracellulaire.^{284, 326} D'autre part, pour certaines applications, une transduction complète n'est pas primordiale, par exemple lorsqu'il s'agit de marquer une cellule *ex vivo* pour suivre ensuite sa trajectoire *in vivo*, ou pour véhiculer une nanoparticule contenant une molécule hydrophobe toxique ou un agent d'imagerie. Dans ce cas, la translocation cytosolique n'est alors pas tant recherchée que la capacité du vecteur à traverser les parois endothéliales et à pénétrer au cœur des tissus. L'utilisation du peptide Tat est alors une option tout-à-fait valable et de nombreux exemples dans la littérature tendent à le prouver.

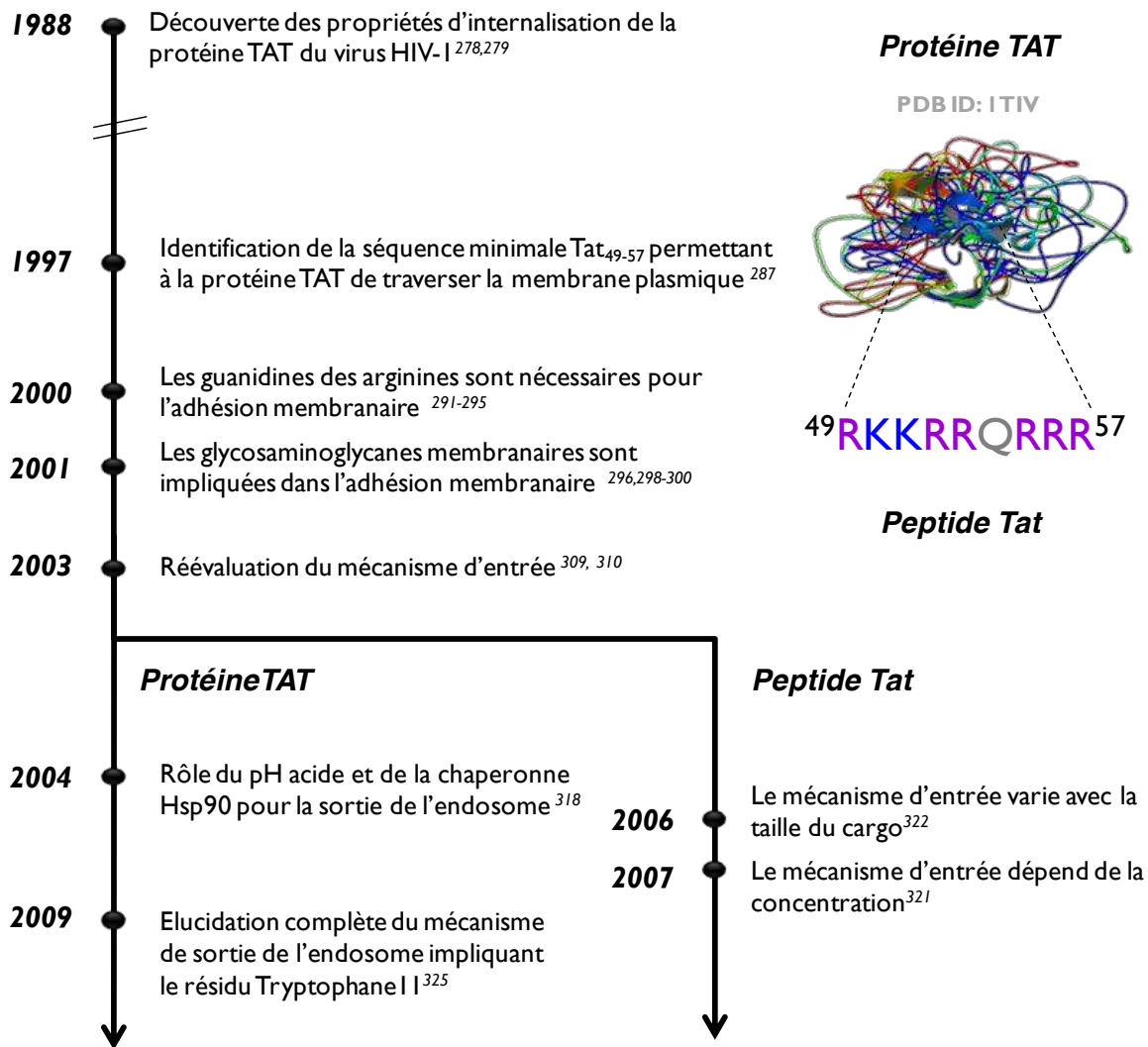


Schéma 2 - Chronologie des découvertes fondatrices sur la protéine TAT et son domaine d'internalisation

III.2. NANOPARTICULES EQUIPEES DU PEPTIDE TAT POUR L'INTERNALISATION CELLULAIRE

La nanomédecine tente d'apporter des réponses à des limitations pharmacologiques majeures, comme la faible solubilité de certains principes actifs, la biodistribution non spécifique d'agents intrinsèquement toxiques, ou bien encore la faible biodisponibilité d'agent thérapeutiques facilement dégradables. Mais de nombreuses cibles thérapeutiques sont situées à l'intérieur des cellules ou profondément enfouies dans certains tissus. Or les barrières biologiques membranaires s'avèrent aussi peu perméables aux nanoparticules qu'aux petites molécules solubles. Aussi, l'alliance de motifs d'internalisation cellulaire comme le peptide Tat et de solutions nanotechnologiques, promettant de pallier à leurs limitations respectives, a suscité un fort engouement au cours de ces dix dernières années. ^{327, 328} Nous décrivons ici les divers exemples de nanoparticules ayant été fonctionnalisées à

l'aide du peptide Tat dans le but de promouvoir leur internalisation cellulaire, en mettant particulièrement l'accent sur leurs propriétés biologiques et leur mécanisme d'entrée dans les cellules.

III.2.1. COMPLEXES ELECTROSTATIQUES POUR LA VECTORISATION DE MATERIEL GENETIQUE

La protéine TAT est naturellement destinée à se lier au matériel génétique de son virus, mais aussi des cellules qu'elle infecte. Il n'est donc pas très étonnant que son domaine de transduction, également impliqué dans son activité de transcription,³²⁹ présente de bons atouts pour la vectorisation d'acides nucléiques. D'une part, plus que tous autres, ces agents thérapeutiques ont besoin d'être internalisés par les cellules et d'être libéré dans le cytoplasme pour agir. Leur acheminement efficace et sans dommage jusqu'à leur cible cytoplasmique ou nucléaire *in vivo* est d'ailleurs l'une des limitations majeures au développement des thérapies géniques. D'autre part, le peptide Tat est fortement chargé positivement et exhibe donc une forte attraction électrostatique pour les oligonucléotides, qui sont à l'inverse chargés négativement. Il a donc logiquement fait l'objet de plusieurs travaux en tant qu'agent macromoléculaire cationique au sein de complexes nanométriques polyioniques pour l'encapsulation et la vectorisation intracellulaire de gènes. L'idée générale est la suivante : une macromolécule complexante fortement cationique, généralement un polymère, est mélangée en solution sous agitation à l'oligonucléotide qui doit être vectorisé. Par complexation électrostatique, les deux parties forment des coacervats nanoparticulaires généralement sphériques, appelés complexes polyioniques ou polyplexes, en encapsulant éventuellement au passage d'autres composants comme par exemple une sonde d'imagerie fluorescente ou magnétique.

Le peptide Tat a tout d'abord été évalué en tant qu'oligomère complexant sous forme de di- tri- et quadrimère et a montré sous cette forme une efficacité, mesurée par le taux de transcription du gène transféré, 6 fois plus importante que du polyarginine et s'est révélé dans certaines situations (lignées cellulaires spéciales, incubation à 24 hrs) plus actif que le polyéthylène imine (PEI) qui fait figure de référence en terme de polymère complexant pour le transfert de gène.³³⁰ Récemment, il a été évalué avec 6 autres peptides dans le cadre d'une étude visant à définir les paramètres moléculaires optimaux pour la formation de nanocomplexes de transfection génétique à base de motifs d'internalisation cellulaire cationiques (Figure 35).³³¹ Les résultats de ce travail comparatif, très complet et systématique, confirment ses qualités en tant que peptide complexant et vecteur.

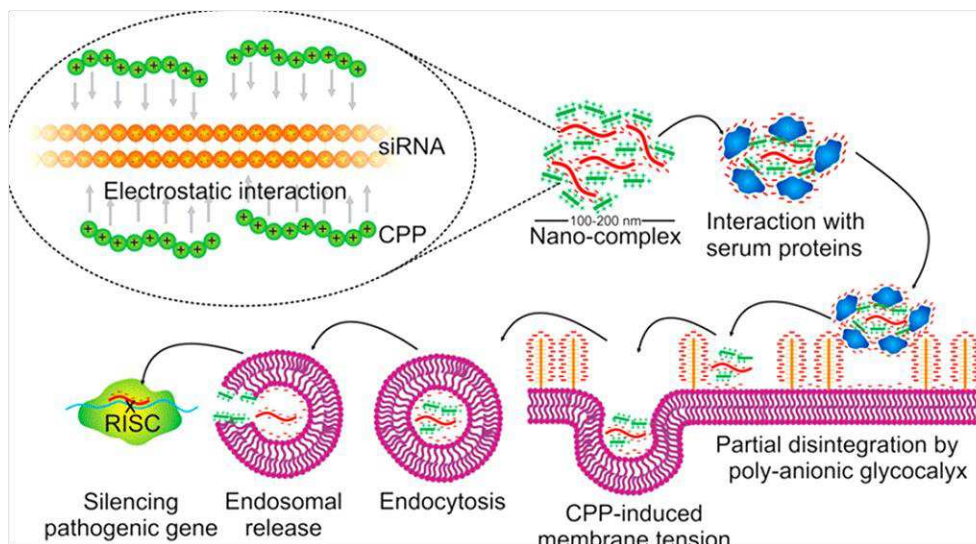


Figure 35 - Représentation schématique du mode d'action de nanocomplexes de transfection génétique à base de peptide d'internalisation cellulaire (CPP) cationique. Adaptée de Van Abseck et al.³³¹

Il a ensuite été envisagé comme motif d'internalisation, et accessoirement comme co-complexant, en vue d'améliorer les performances *in vitro* de vecteurs génétiques non-viraux communément utilisés en laboratoire. Incorporé dans des complexes à base de liposomes cationiques de façon non-covalente, il améliore de façon significative l'expression du gène d'une protéine incorporé dans un plasmide dans des cellules primaires d'épithélium trachéal connues pour être hautement récalcitrantes au transfert de gène par le moyen de vecteurs standards.³³² Attaché de façon covalente à un PEI par l'intermédiaire d'un espaceur PEG, il multiplie jusqu'à 14 fois le transfert d'un ADN modèle dans des cellules neuronales post-mitotiques différenciées, elle aussi notoirement réticentes à la transfection.³³³ Dans une autre étude analogue, il permet d'améliorer les propriétés colloïdales de polyplexes (stabilité, protection du gène face à la dégradation) et contribue à une diminution significative de leur toxicité et à une amélioration de leur efficacité d'adressage *in vivo*.³³⁴ Cependant, l'un des défauts majeurs des agents de transfection standards, comme le PEI ou le PLys, est leur cytotoxicité notoire.³³⁵

De nombreux polysaccharides naturels sont polycationiques car leurs unités saccharidiques présentent des amines primaires. Ces polymères, biosourcés et biocompatibles, sont donc de bons candidats pour le développement de systèmes complexant moins toxiques. Le chitosan est l'un d'entre eux et a, dans une étude récente, été associé au peptide Tat, par couplage peptidique de ce dernier avec une partie des amines naturellement présentes sur les unités saccharidiques.³³⁶ Le copolymère Tat-g-Chitosan obtenu forme, avec un duplex de siRNA, des complexes sphériques très bien définis d'un diamètre de 212 nm, d'un indice de polydispersité de 0,11 et d'un potentiel zéta de +19 mV. La fluorescence moyenne de cellules MCF-7-Luc incubées avec ces complexes est 1,3 fois plus importante que celle des cellules contrôles incubées avec des complexes sans peptide. Ce même

contrôle n'a en revanche pas été effectué pour les expériences de vectorisation *in vivo* présentées dans l'étude suivante, ce qui ne donne de fait aucune information quant à l'apport net du peptide sur l'efficacité pourtant très convaincante de ce système. Il semblerait que le peptide n'ait finalement pas une influence déterminante et que le chitosan se suffise à lui-même pour assurer une transfection efficace.

III.2.2. NANOPARTICULES INORGANIQUES

Les nanoparticules inorganiques, et particulièrement les nanocristaux métalliques – oxyde de fer, or, argent, platine – sont de loin les nanoparticules dont l'adressage intracellulaire par l'intermédiaire du peptide Tat a été le plus largement étudié. Cette différence avec les autres catégories de nanovecteurs tient de leur champ d'application tourné vers l'imagerie cellulaire et le développement d'outils pour le diagnostic médical. En effet ces types de nanoparticules ont au début été développées pour le « pistage » *in vivo* de cellules d'intérêt thérapeutique, comme les cellules du système immunitaire ou les cellules souches. Ces applications ne sont pas affectées par les inconvénients majeurs du peptide Tat, à savoir d'une part, le caractère non spécifique de son internalisation, car les cellules sont d'abord marquées *in vitro*, et d'autre part, sa rétention dans les endosomes, puisque l'essentiel est que la nanoparticule se situe dans l'enceinte plasmique de la cellule. Dans le cas des nanoparticules inorganiques, le peptide est nécessairement greffé sur la particule après que celle-ci ait été synthétisée.

III.2.2.1. Nanoparticules d'oxyde de fer super-paramagnétique (SPIO)

En 1999, les premières nanoparticules à être équipées du peptide Tat sont des nanoparticules d'oxydes de fer superparamagnétique (superparamagnetic iron oxide nanoparticles – SPIO) dans le cadre du travail pionnier entrepris par Weissleder et coll. L'objectif est de « charger magnétiquement » des cellules pour pouvoir, ensuite, suivre leur devenir *in vivo* par imagerie de résonance magnétique et, éventuellement, les récupérer.³³⁷ Pour cela, des nanoparticules inorganiques d'un diamètre de 40 nm sont enrobées de dextran puis le peptide Tat, conjugué à une fluorescéine, est couplé au revêtement polymère à raison de ~7 unités par particule. Les nanoparticules ainsi fonctionnalisées sont rapidement internalisées et localisées dans le cytoplasme et le noyau de lymphocytes et de cellules HeLa, à raison de 12 millions de particules/cellule. Une évaluation qualitative du contraste par IRM des cellules confirme le caractère magnétique acquis grâce au marquage. Avec ces mêmes nanoparticules, les auteurs ont rapporté, dans des études ultérieures, le marquage effectif et sans toxicité apparente, ni altération de leur activité biologique, de cellules souches se différenciant en cellules CD34+ et de lymphocytes T.^{338, 339} Ce marquage magnétique a permis le suivi par IRM de leur biodistribution après injection intraveineuse chez des

souris et la détection de leur accumulation respectivement dans la moelle épinière et la rate. Des cellules différenciées CD34⁺ ont ensuite été récupérées à partir de moelle épinière lysée par chromatographie magnétique. Suite à ces résultats extrêmement prometteurs, l'équipe rajoute à la surface de ces nanoparticules, qu'ils baptisent Tat-CLIO (Tat-cross-linked iron oxide) deux sondes fluorescentes, pour étudier cette fois en détails leur internalisation *in vitro* dans des cellules HeLa (Figure 36).³⁴⁰ Au bout d'une heure, 100% des cellules analysées par cytométrie en flux sont significativement fluorescentes, et cette fluorescence est maintenue jusqu'à plusieurs jours après l'internalisation. Les nanoparticules sont donc retenues durablement dans les cellules et se répartissent uniformément au fur et à mesure des divisions cellulaires. Dans les premières heures suivant le marquage, la fluorescence des nanoparticules est distribuée ponctuellement dans le cytoplasme indiquant une internalisation par endocytose. Au bout de 24 hrs, elle se concentre dans la région nucléaire et périnucléaire. Par ailleurs, le groupe a étudié la biodistribution de ces nanoparticules injectées *in vivo* chez la souris.³⁴¹ Les résultats montrent que le peptide Tat, greffé à raison de 10 unités par particule, diminue de 7 fois leur temps de demi-vie dans le sang et augmente leur capacité à diffuser dans le tissu hépatique, où elles s'accumulent par ailleurs naturellement de la même manière que les nanoparticules contrôles. En parallèle, un autre groupe a également démontré l'internalisation effective de SPIO fonctionnalisées en surface de peptide Tat dans des cellules T et B et des macrophages sans altération de la viabilité cellulaire.³⁴² Enfin, Smith *et al.* ont mis en évidence, pour le même genre de système, une endocytose *via* les cavéoles.³⁴³

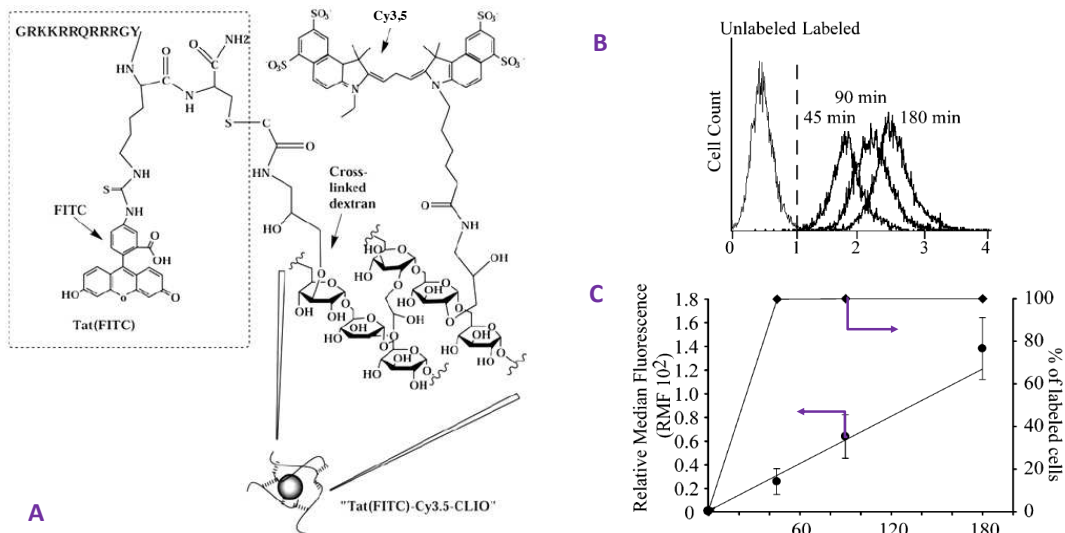


Figure 36 - A) Représentation schématique des nanoparticules Tat(FITC)-Cy3,5-CLIO B) Histogrammes de cytométrie mesurant la fluorescence FITC de cellules HeLa incubées à différents temps avec ces nanoparticules C) Fluorescence moyenne des cellules et nombres de cellules fluorescentes en fonction du temps d'incubation. Adaptée de Weissleder et coll.³⁴⁰

Plus tard, vers la fin des années 2000 est apparu le concept de nanoparticules « théranostiques », combinant agents thérapeutiques et sondes pour l'imagerie et le diagnostique. Dans ce contexte, les SPIO et le peptide Tat se sont retrouvés réunis dans deux études portant sur le développement de

nanovecteurs multifonctionnels pour le transfert de gènes ciblant la moelle épinière. La première, publiée par Song *et al.*, décrit des complexes polyioniques de transfection génétique générés à partir d'un mélange de SPIO recouverts de PEI, d'ADN plasmidique et de peptide Tat augmenté aux deux extrémités de deux segments de 4 histidines afin de promouvoir la sortie de l'endosome par un effet d'éponge à protons.³⁴⁴ Ces complexes ont un diamètre de 120 nm et englobent plusieurs nanoparticules magnétiques dont le diamètre respectif est de 11,6 nm. La présence du peptide Tat augmente le potentiel zéta des complexes qui passe de +30 à +53 mV, et améliore significativement la transfection du plasmide *in vitro* dans trois lignées cellulaires différentes, mais aussi *in vivo* dans la moelle épinière du rat. Les SPIO permettent, quant à elles, aux complexes de s'éloigner du site d'injection sous l'influence d'un champ magnétique appliqué localement. La seconde étude décrit la préparation de nanoparticules magnétiques recouvertes d'un revêtement organique cationique constitué de cholestérol et de chitosan présentant des amines quaternaires et des chaînes de PEG au bout desquelles est greffé le peptide Tat (Figure 37).³⁴⁵ Les nanoparticules individuelles ont d'après les images de TEM un diamètre de 8 nm et sont stabilisées en solution (0,1 M PBS) sous forme d'amas d'environ 80 nm de diamètre et d'un indice de polydispersité voisin de 0,2. La présence du peptide induit une augmentation de l'internalisation cellulaire *in vitro* observée qualitativement par microscopie de fluorescence. Suite à l'injection intraveineuse des nanoparticules *in vivo* chez le rat, une analyse histologique des tissus spinaux et cérébraux montre que le peptide favorise de façon significative le passage des nanoparticules à travers les barrières hémato-encéphalique et hémato-vertébrale.

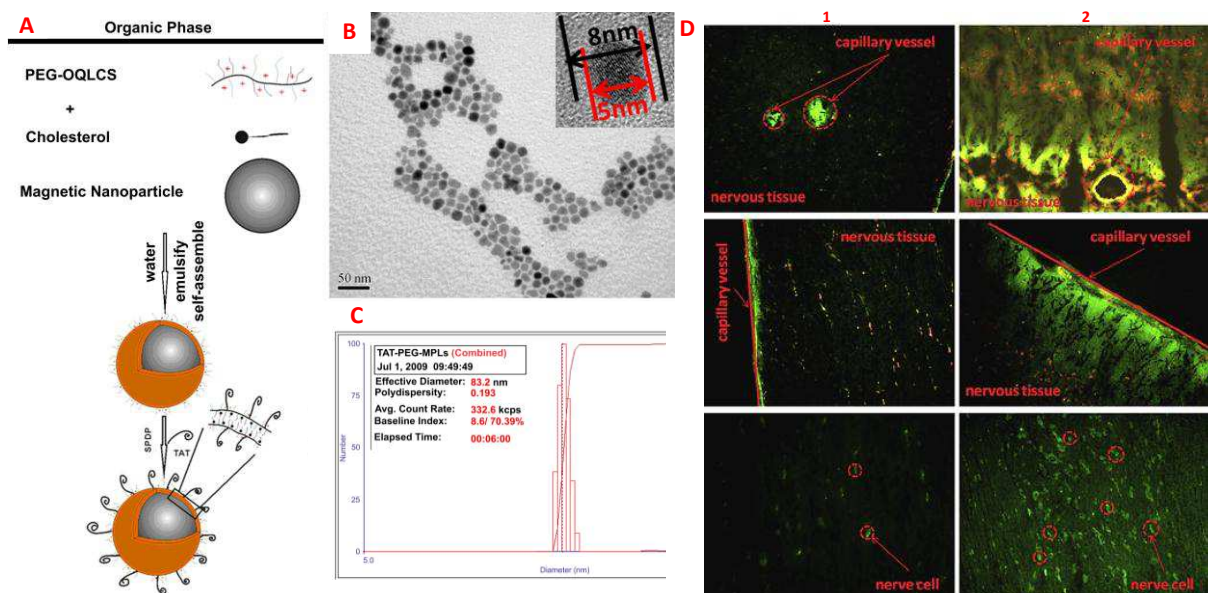


Figure 37 - A) Illustration schématique de nanoparticules organomagnétiques décorées de peptide Tat ; B) image de TEM des nanoparticules ; C) analyse de la taille des nanoparticules en solution par DLS ; D) images de microscopie confocale de sections du tissu vertébral de rats traités avec des nanoparticules (FITC, vert) avec (2) ou sans (1) peptide. Adaptée de Zhang *et al.*³⁴⁵

Enfin un travail publié récemment décrit l'introduction de peptide Tat en surface de nanoparticules magnétiques *via* un copolymère à bloc amphiphile de poly(monoacrylate de glycerol)-*b*-PEG.³⁴⁶ Alors que le peptide est conjugué à l'extrémité du bloc PEG hydrophile par couplage thiol-maléimide, le bloc hydrophobe PMAG permet de lier le copolymère à la nanoparticule d'oxyde de fer par chimisorption. Une affinité cellulaire augmentée vis-à-vis des nanoparticules contrôles est mesurée *in vitro* par cytométrie et microscopie de fluorescence chez des cellules Caco-2.

III.2.2.2. Nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or sont des nanocristaux très étudiés en tant qu'agent d'imagerie pour leurs propriétés de résonance plasmonique qui leur donne la possibilité d'émettre un rayonnement à une longueur d'onde caractéristique dans le domaine visible. Plusieurs travaux rapportent l'internalisation cellulaire *in vitro* de nanoparticules d'or *via* le peptide Tat.³⁴⁷⁻³⁴⁹ Leurs auteurs se sont particulièrement attachés à étudier le mécanisme d'internalisation cellulaire de ces objets. Tkachenko *et al.* ont décrit l'internalisation par endocytose de nanoparticules de 26 nm de diamètre dans les cellules HeLa.³⁵⁰ Berry et De la Fuente ont observé dans des fibroblastes une différence de localisation selon la taille des nanoparticules, les plus petites de 5 nm de diamètre pouvant être visualisées dans le noyau par microscopie électronique, alors que les plus grandes d'un diamètre de 30 nm sont exclusivement observées dans le cytoplasme.^{351, 352} Grâce à une analyse cinétique par microscopie confocale dynamique, Ruan *et al.* ont mis en évidence, pour des nanocristaux d'or de 10 nm de diamètre et qui présentent 20 peptides Tat chacun à leur surface, une entrée par macropinocytose suivie d'une lente migration des vésicules cytoplasmiques le long des microtubules vers une région périnucléaire appelée centre de tri microtubulaire, le tout s'effectuant progressivement sur une période de 24 hrs.³⁵³ Kreptic *et al.* ont pour leur part observé, par microscopie électronique sur une période de 48 hrs, un processus tout-à-fait différent concernant l'import dans des cellules HeLa de nanoparticules de 14 nm fonctionnalisées avec le peptide Tat au dessus d'une couronne de PEG et également.³⁵⁴ Les objets migrent dans un premier temps dans le cytosol par un mécanisme non élucidé, puis s'accumulent massivement dans des vésicules avant d'être excrétés à l'extérieur des cellules. Ces résultats contradictoires montrent bien que sur des particules comme sous sa forme soluble, le peptide Tat est étonnamment imprévisible (Figure 38).

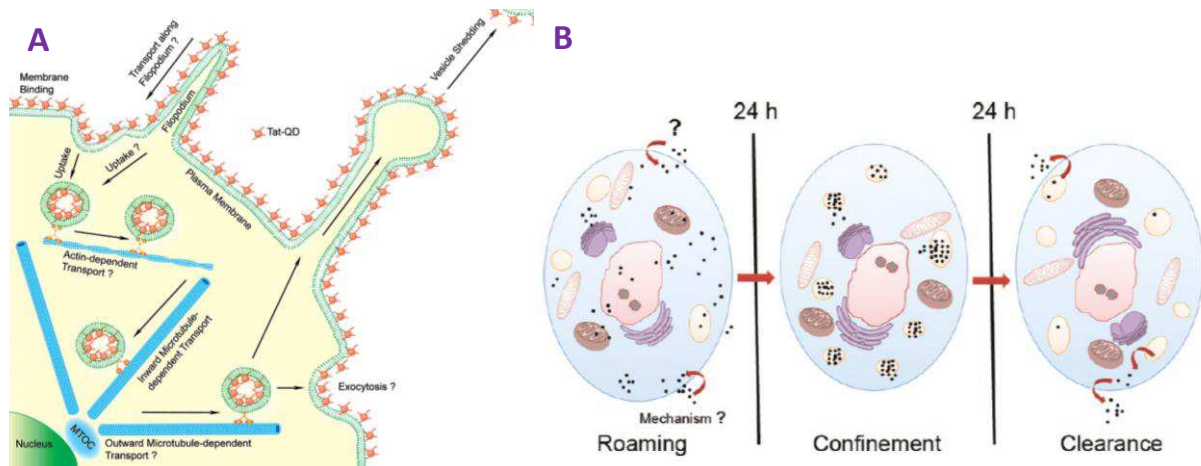


Figure 38 - Représentation schématique des différentes voies d'internalisation et de transport de nanoparticules d'or à l'aide de peptide Tat observés indépendamment par Ruan et al.(A)³⁵³ et Krpetic et al.(B)³⁵⁴ dans des cellules HeLa.

Une étude *in vivo* a également démontré que le peptide Tat augmente la perméabilité de nanoparticules d'or vis-à-vis de la barrière hémato-encéphalique.³⁵⁵

III.2.2.3. Autres nanoparticules métalliques

Tat a également été étudié comme motif d'internalisation pour des nanoparticules inorganiques présentant des propriétés thérapeutiques intrinsèques : d'une part, des nanoparticules de carbure de bore et d'argent pour le traitement de tumeurs cancéreuses, et d'autre part, des nanoparticules d'argent pour leur utilisation en tant qu'agent antioxydant.³⁵⁶⁻³⁵⁹ Pour ces dernières, une amélioration très significative de l'internalisation et de l'efficacité des nanoparticules grâce au peptide a été mesurée de façon originale chez le nématode *C. Elegans*.

III.2.2.4. Nanoparticules à base de silice

Tian et al. ont décrit la synthèse par procédé sol-gel de nanoparticules mixtes réticulées gélatine-siloxane fonctionnalisées en surface avec le peptide Tat via un espaceur PEG.³⁶⁰ Ces nanoparticules cationiques Tat-PEG-GS présentent un diamètre de 192 nm et un potentiel zéta de 32 mV. Après injection systémique *in vivo* chez la souris, elles présentent une accumulation homogène dans le cerveau et augmentée par rapport aux nanoparticules PEG-CS contrôles, suggérant que le peptide Tat accroît leur perméabilité vis-à-vis de la barrière hémato-encéphalique. Dans une seconde étude, la vectorisation *in vivo* d'un gène thérapeutique encapsulé dans ces systèmes pour le traitement de vasospasme cérébral chez le rat a été examinée.³⁶¹ Les données présentées montrent une atténuation du vasospasme et de son impact neurologique traduisant une expression effective du gène dans le cerveau.

Un peptide Tat augmenté de 6 résidus histidine a aussi été employé pour permettre l'internalisation dans des cellules HeLa de nanoparticules de silice mésoporeuses servant de support solide à des enzymes antioxydantes.³⁶² A l'issue d'une incubation d'une heure, le peptide augmente modérément le pourcentage de cellules fluorescentes des nanoparticules qui passe de 78% à 90%. L'internalisation est inhibée à 4°C et les images de microscopie montrent une localisation intracellulaire vésiculaire, le tout indiquant un import par endocytose active.

III.2.3. LIPOSOMES POUR LA VECTORISATION DE PRINCIPES ACTIFS

Les liposomes sont des vésicules biodégradables et biocompatibles constituées d'une bicouche lipidique de composition semblable à celle des membranes lipidiques naturelles. Ce type de nanoparticules est le premier à avoir été étudié comme vecteur pour l'encapsulation de médicaments. De nombreux systèmes à base de principes actifs hydrophobes ont atteint les phases de développement clinique et plusieurs d'entre eux ont obtenu une autorisation de mise sur le marché, comme par exemple le Doxil, liposome « pegylé » encapsulant l'anticancéreux doxorubicine.³⁶³ Aujourd'hui, diverses stratégies sont à l'étude afin d'améliorer les propriétés d'internalisation des liposomes pour leur permettre de vectoriser efficacement d'autres agents thérapeutiques, comme par exemple du matériel génétique. En 2001, Torchilin et coll. publient une étude fondatrice décrivant la fonctionnalisation de surface de liposomes de 200 nm à l'aide de peptides Tat directement en surface de la bicouche au niveau des têtes polaires ou *via* un espaceur PEG₃₀₀₀.³⁶⁴ Leur incubation dans différentes cultures de lignées cellulaires cancéreuses montre que seuls les liposomes avec du Tat greffé *via* l'espaceur PEG₃₀₀₀ sont effectivement internalisés, signifiant que l'encombrement stérique limite sévèrement le champ d'action du peptide qui nécessite un contact direct avec la membrane. Cette équipe a ensuite mis à profit ces vecteurs lipidiques pour la complexation et la transfection *in vitro* et *in vivo* d'un plasmide codant pour la protéine fluorescente EGFP.^{365, 366} Leur injection locale dans des tumeurs chez la souris, préférée à une injection intraveineuse afin d'éviter une biodistribution non-spécifique, conduit d'après une analyse histologique par microscopie de fluorescence à une plus importante transfection du plasmide par rapport aux liposomes contrôles sans peptide.

Entre temps, Tseng *et al.* ont aussi étudié et comparé l'influence du greffage des peptides Tat et Pénétratine sur un vecteur lipidique chargé d'un plasmide codant pour la protéine fluorescente EGFP.³⁶⁷ Le peptide Tat induit une accumulation significative des liposomes dans différentes lignées tumorales, supérieure à celle observée avec le peptide Pénétratine. Cette étude présente aussi, ce qui est rarement fait, les résultats des tests (MTT) mesurant l'impact des vecteurs sur la viabilité cellulaire. Le liposome décoré de peptide Tat présente une concentration inhibitrice médiane (IC50)

de l'ordre de 1 mg/mL. Les auteurs ont également examiné l'influence de la densité de peptide en surface des liposomes sur le taux d'internalisation. Pour le cas des liposomes fonctionnalisés par Tat, celui-ci atteint un plateau à partir d'un nombre critique de peptides en surface dépendant du type de cellule (cellules de la vésicule HTB-9, cellules de l'épiderme A431). Malgré un effet *in vitro* évident, la cytotoxicité des liposomes *in vivo* sur des tumeurs de souris n'est en revanche pas accrue par la présence de Tat à leur surface. Pour expliquer cela, les auteurs suggèrent la rétention dans les endosomes et l'internalisation non-spécifique des vecteurs dans le reste de l'organisme.

Afin d'améliorer l'ancrage du peptide en surface des liposomes, Yagi *et al.* ont mis au point la synthèse supportée du peptide Tat conjugué à son extrémité N-terminale par 2 acides gras qui lui permettent de s'insérer dans la bicouche lipidique et de promouvoir l'import cellulaire de liposomes.³⁶⁸ Qin *et al.* ont quant à eux synthétisé un conjugué cholestérol-Tat qu'ils ont ensuite inclus dans les liposomes chargés de doxorubicine.³⁶⁹ Outre une internalisation significativement augmentée *in vitro* dans des cellules de gliomes ou endothéliales, le peptide permet à ces liposomes injectés chez des rats atteints de tumeur cérébrale d'augmenter la biodistribution de doxorubicine dans le cerveau et de prolonger le temps de survie médian des animaux de 30%.

III.2.4. NANOPARTICULES A BASE DE PROTEINES

Encapsuler des principes actifs dans des nanoparticules lipidiques ou polymériques est une stratégie biomimétique inspirée des virus, qui protègent leur bagage génétique à l'aide d'une capsid protéique de taille nanométrique. Plutôt que d'élaborer des mimes synthétiques, certaines équipes ont choisi de détourner des nanoparticules naturelles pour en faire des vecteurs thérapeutiques. Il existe en effet, dans la plupart des cellules eucaryotes, des édifices nanométriques à la morphologie très particulière (en forme de voûte, d'où leur nom anglais *vault*) assemblées à partir de quelques dizaines de copie d'une même protéine. Yang *et al.* ont développée une synthèse recombinante de ces nanocages protéiques afin qu'elles présentent sur leur surface deux peptides Tat (Figure 39).³⁷⁰ L'affinité membranaire des nanoparticules ainsi modifiées évaluée *in vitro* par microscopie de fluorescence apparait significativement augmentée et conduit à leur internalisation lente à l'intérieur des cellules, d'après les auteurs probablement *via* le recyclage de la membrane plasmique.

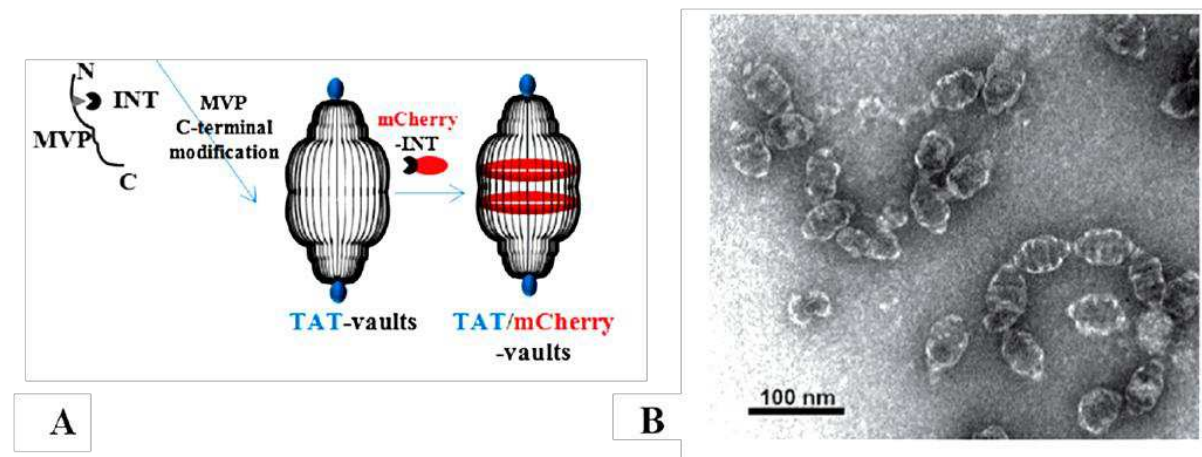


Figure 39 - Représentation schématique (A) et image de TEM (B) de nanocoffres protéiques recombinants équipés du peptide Tat et de la protéine de fusion fluorescente mCherry. Adaptée de Yang et al.³⁷⁰

Cette fois à partir de peptides dérivés de protéines naturelles, Tang et al. ont développé un vaccin synthétique contre le papillomavirus humain (HPV). Ils ont pour cela fusionné le peptide Tat avec le peptide E7₄₉₋₅₇, séquence cytotoxique pour les lymphocytes T dérivée de l'oncoprotéine E7 du virus, et complexé le tout avec un gène thérapeutique stimulant la croissance des macrophages.³⁷¹ L'efficacité des nanoparticules obtenues, d'un diamètre compris entre 20 et 80 nm, a ensuite été examinée *ex vivo* et *in vivo*. Pour l'ensemble des analyses, la contribution du peptide Tat à l'augmentation de la réponse immunitaire, traduisant une amélioration de la distribution du peptide E7₄₉₋₅₇, qui joue le rôle d'antigène, et de la transfection du gène, qui stimule la croissance des macrophages, est nettement significative comparée à une nanoparticule contrôle pour laquelle il est remplacé par un oligomère de 18 lysines K₁₈.

III.2.5. NANOPARTICULES A BASE DE COPOLYMERES A BLOCS AMPHIPHILES

Comme nous l'avons déjà abordé, les copolymères à bloc amphiphiles sont de très bons candidats pour le développement de nanoparticules auto-assemblées biocompatibles pour la vectorisation d'agents thérapeutiques et diagnostiques, et ont fait l'objet en ce sens d'un intérêt considérable ces 10 dernières années. Parmi la littérature, très riche, associée à ce domaine de recherche, plusieurs études visant à décorer la surface de micelles ou de vésicules polymères à l'aide du peptide Tat pour augmenter leurs capacités d'adressage intracellulaire ont été rapportées. Deux stratégies ont été explorées pour cela : le greffage du peptide en solution à la surface des particules déjà formées ou l'incorporation au copolymère « neutre » avant l'auto-assemblage d'une certaine proportion de copolymère fonctionnalisé avec le peptide.

III.2.5.1. Morphologies de type cœur-écorce

Trois études réalisées par Wooley et coll. portent sur la fonctionnalisation de surface avec du peptide Tat de nanoparticules à base de copolymère à bloc amphiphile. La première, publiée en 2001, décrit la synthèse de nanocapsules réticulées de poly(acide acrylique) avec un nombre réduit de peptides Tat couplés à leur surface.³⁷² Pour cela, la couronne hydrophile poly(acide acrylique) des micelles sphériques obtenues à partir de PCL-*b*-PAA est réticulée à l'aide d'un agent de couplage diaminé, fonctionnalisée en surface avec la fluorescéine, puis couplée sur support solide à un peptide Tat protégé. Un traitement au TFA permet alors en une seule étape de déprotéger le peptide, de dissoudre le cœur de PCL et enfin de libérer les nanocapsules de PAA du support solide. Etant donnée la faible probabilité qu'ont les micelles de se coupler à plus d'un peptide sur le support solide, la densité surfacique en peptide est en théorie quasiment réduite à l'unité. La hauteur des objets observés en AFM passe de 10 nm pour les micelles pleines à moins de 5 nm pour les micelles au cœur dégradé, bien plus étalées sur la surface, confirmant l'éviction du polymère hydrophobe. Une étude préliminaire des propriétés d'internalisation de ces structures dans des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) par microscopie et cytométrie en flux est présentée. Après 60 min d'incubation, une fluorescence modérée est détectée majoritairement sur et, dans une moindre mesure, à l'intérieur des cellules, dont 17% sont marquées positivement. La faible densité de peptide par particule explique sans doute cette affinité très modeste. Dans la deuxième étude de l'équipe, des micelles de PtBA-*b*-PAA de 38 nm de diamètre sont décorées avec cette fois une quantité variable de peptide, à raison de respectivement 52, 104 et 210 unités par particule.³⁷³ Si l'affinité cellulaire est cette fois plus importante, aucune différence d'internalisation significative n'est observée en fonction de la densité peptidique. Dans leur troisième et dernière étude, les auteurs étudient cette fois, à densité de peptide égale, l'influence de la morphologie des objets, en comparant des micelles sphériques ($D=10$ nm) et cylindriques ($D=20$ nm, $L=180$ nm) de PS-*b*-PAA et des micelles cylindriques de PS-*b*-PMA-*b*-PAA ($D=30$ nm, $L=970$ nm).³⁷⁴ L'intensité de fluorescence obtenue pour les micelles sphériques semble légèrement supérieure à celles mesurées pour les nanoparticules cylindriques, cependant là encore la différence n'est pas statistiquement significative. Pour les trois études, la distribution intracellulaire de la fluorescence est en partie ponctuelle et en partie diffuse, suggérant la coexistence d'endocytose et de translocation directe. Or l'incubation se fait à une concentration très élevée de ~ 8 μM , ce qui peut, comme nous l'avons déjà souligné, favoriser une seconde voie d'entrée par translocation directe en plus de l'endocytose. L'incubation s'opère également en l'absence de sérum, ce qui amoindrit encore la pertinence biologique de ces tests. D'autre part, de leurs propres aveux, les auteurs ne sont pas en mesure de déterminer si le peptide est bien lié de façon covalente aux nanoparticules ou s'il est seulement adsorbé de façon électrostatique à la surface de leurs couronnes de poly(acide acrylique) chargée négativement. Dans ce cas, rien n'assure qu'une fois dans le milieu cellulaire, celui-ci reste solidaire de la particule. On

voit bien ici une des limites majeures des stratégies basées sur la fonctionnalisation post-auto-assemblage des nanoparticules, à savoir leur caractérisation finale, et les incertitudes qu'elles peuvent induire sur l'évaluation biologique des systèmes.

Dans la perspective de favoriser leur transport cérébral, Rao *et al.* ont eux décrit la fonctionnalisation de la surface de nanoparticules de PLA d'environ 300nm de diamètre avec du peptide Tat marqué à la fluorescéine à l'aide d'un espaceur de couplage bis-epoxy à raison d'environ 2000 unités par particule.³⁷⁵ Ils ont ensuite examiné la biodistribution *in vivo* chez la souris d'un principe actif antirétroviral véhiculé par ces nanoparticules. La présence du peptide Tat sur les nanoparticules augmente significativement la biodisponibilité du principe actif dans les tissus cérébraux, mais seulement à long terme à partir de 24 hrs. D'autre part, les nanoparticules de PLA, fonctionnalisées ou non, ont été localisées par microscopie dans le cerveau, en revanche une accumulation plus importante des nanoparticules fonctionnalisées a été observée dans le troisième ventricule. Ces résultats suggèrent que les nanoparticules de PLA, même non fonctionnalisées, parviennent à passer la barrière hémato-encéphalique et à s'accumuler dans le cerveau. La présence du peptide Tat à leur surface leur permet d'y rester plus longtemps et d'y diffuser plus largement, induisant de fait une meilleure distribution du principe actif qu'elles transportent dans cette zone. Plus tard, une autre équipe est parvenue à des résultats très semblables à l'issue d'un travail analogue portant sur des micelles de 90 nm préparées à partir d'un mélange de PCL-*b*-PEG et Tat-PCL-*b*-PEG.²⁶⁸ Employant également le même copolymère, Xiong *et al.* ont synthétisé des micelles multifonctionnelles de 100 nm de diamètre pour la double vectorisation ciblée d'un siRNA thérapeutique et de doxorubicine à l'aide des peptide RGD et Tat.³⁷⁶ Pour introduire ce dernier, ils ont incorporé en solution, entre autres, 3% mol/mol de copolymère PCL-*b*-PEG-Tat au copolymère PCL-*b*-PEG. A l'issue de l'auto-assemblage de ce mélange, le peptide Tat se retrouve uniformément réparti à la surface de la particule. Les propriétés d'internalisation qu'il confère aux nanoparticules sont malheureusement très peu étudiées et commentées par les auteurs par rapport aux autres composants bioactifs du système. Néanmoins, d'après les images de microscopie présentées, il semble participer, à part égale avec le peptide RGD, à l'internalisation des nanoparticules *in vitro* dans des cellules HeLa.

III.2.5.2. Morphologies de type vésiculaire

Van Dongen *et al.* ont utilisé le peptide Tat pour promouvoir l'internalisation cellulaire de vésicules polymères transportant des peroxydases de raifort (HRP) (Figure 40).³⁷⁷ Le peptide est d'abord couplé à l'extrémité hydrophile d'un copolymère PS-*b*-PEG. Le tribloc PS-*b*-PEG-Tat obtenu est alors ajouté à raison de 10% à une solution de PS-*b*-PIAT dans le THF, puis le tout est auto-assemblé par nanopréciipitation en présence des protéines GFP et HRP sous la forme de vésicules de 114 ± 28 nm de diamètre. L'internalisation de ces polymersomes dans trois lignées cellulaires (HeLa, Jurkat,

HEK973) ainsi que l'activité enzymatique de la peroxydase encapsulée sont mises en évidence par microscopie confocale de fluorescence. La distribution intracellulaire ponctuelle de fluorescence associée aux objets, ainsi que sa colocalisation partielle avec un marqueur des compartiments vésiculaires acides impliqués dans le trafic intracellulaire de l'endocytose prèchent en faveur de cette voie d'internalisation.

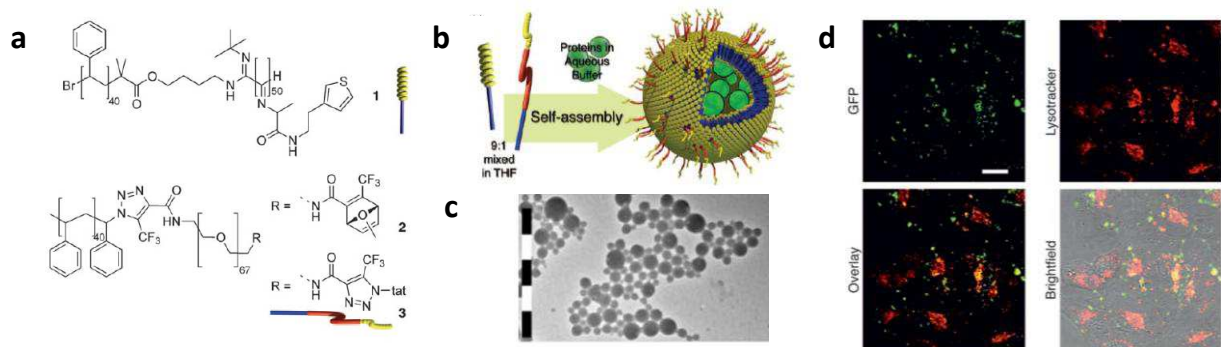


Figure 40 - a) Structure des copolymères utilisés pour l'auto-assemblage de polymersomes exposant du peptide Tat en surface et encapsulant GFP et HRP; b,c) schéma représentatif de l'auto-assemblage et image de TEM des polymersomes; d) clichés de microscopie confocale de cellules HeLa après incubation avec des polymersomes (GFP, vert) et un marqueur des compartiments vésiculaires acides (LysoTracker, rouge). Adaptée de Van Dongen et al.³⁷⁷

Dans le même esprit, mais par un procédé de réhydratation de film, Christian et al. ont préparé à partir d'un mélange de PB-*b*-PEO et de PB-*b*-PEO-Tat marqué à la fluorescéine (90 :10), des polymersomes de 115 ± 34 nm de diamètre décorés de peptide Tat et encapsulant dans leur phase hydrophobe un fluorophore émettant dans le proche infrarouge.³⁷⁸ L'objectif ultime étant le marquage et le suivi analytique *in vivo* de cellules dendritiques, l'internalisation de ces vésicules ainsi que son impact sur l'activité et la viabilité de cellules dendritiques a ensuite été examinée. Les auteurs observent une internalisation des polymersomes significative et dépendante de la concentration, évaluée sur une gamme de 5 à 80 μM en peptide, à raison de $(70 \pm 10) \times 10^6$ vésicules/cellule. La distribution intracellulaire ponctuelle de la fluorescence suggère, là aussi, une entrée par endocytose. La présence intracellulaire de ces nanoparticules n'affecte pas la maturation des cellules quand elle est induite par des cytokines. Par contre, elle affecte légèrement leur viabilité et sensiblement leur maturation activée par les lymphocytes T.

III.2.6. NANOPARTICULES A BASE DE TENSIOACTIFS MOLECULAIRES

On trouve aussi dans la littérature des exemples de nanoparticules obtenues à partir de tensioactifs moléculaires chimériques dont la tête hydrophile est intégralement ou en partie constituée du peptide Tat. Han et al. ont par exemple décrit la synthèse d'un peptide amphiphile alliant le peptide Tat à une queue hydrophile et rigide constituée d'un segment oligohistidine et de deux groupements

Fmoc hydrophobes et qui génère par auto-assemblage en solution des nanoparticules sphériques allant de 20 à 100 nm selon leur cargaison.³⁷⁹ Leurs propriétés d'internalisation cellulaire, ainsi que la vectorisation anti-tumorale de doxorubicine et d'un plasmide codant pour la protéine suppresseur de tumeur p53, ont été mises en évidence respectivement *in vitro* et *in vivo*.

Liu *et al.* ont quant à eux choisi le cholestérol comme partenaire hydrophobe pour le peptide (Figure 41).³⁸⁰ Couplé à la séquence peptidique G₃R₆TG-Tat₄₇₋₅₈ en position N-terminale, il induit la formation de micelles sphériques bien définies d'un diamètre hydrodynamique de 177 nm, d'un potentiel zéta de +50 mV et d'un nombre d'agrégation de 91 chimères par particules. Au-delà de leurs excellentes propriétés antimicrobiennes évaluées *in vitro* et *in vivo* chez la souris, un examen histologique des tissus cérébraux de lapins infectés par le staphylocoque doré puis traités avec les nanoparticules apporte la preuve que ces micelles entièrement recouvertes de peptide Tat sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) pour aller inhiber la croissance des bactéries dans le cerveau. Un mécanisme de perméation par transcytose adsorptive est proposé par les auteurs. Par ailleurs, aucun effet toxique significatif sur le foie et les reins des lapins traités n'a été détecté.

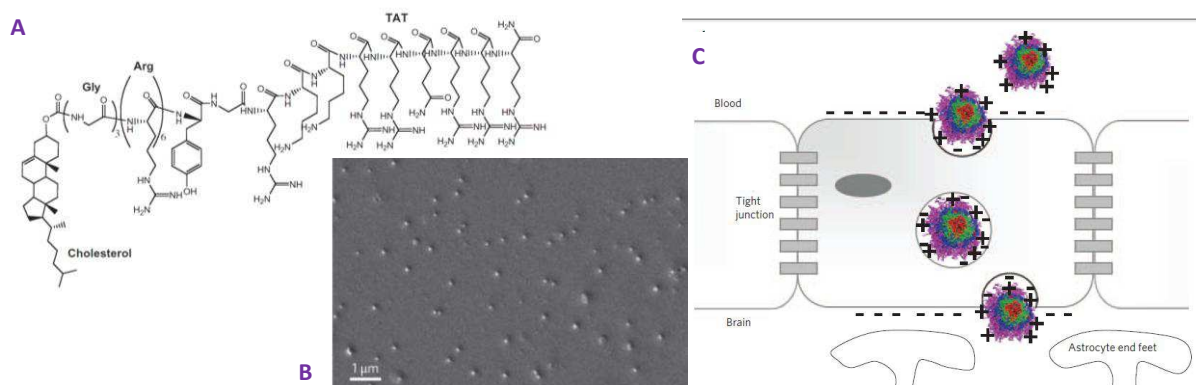


Figure 41 - Nanoparticules micellaires antimicrobiennes à base de cholestérol-G₃R₆TG-Tat₄₇₋₅₈. A) Structure chimique du tensioactif; B) Image de TEM des micelles obtenues ; C) Mécanisme possible de passage des nanoparticules à travers la BHE par transcytose adsorptive. Adaptée de la référence ³⁸⁰

Enfin, un autre examen très complet portant sur la synthèse et l'auto-assemblage de chimères tensioactives conjuguant des chaînes « grasses » C₈ à l'extrémité N-terminale du peptide Tat a été récemment publié (Figure 42).³⁸¹ Le composé tensioactif possédant 4 chaînes aliphatiques conduit en solution à des nanofibres aux dimensions très régulières d'un diamètre de section de 15 nm au sein desquelles le peptide est structuré en feuillet β. Leur internalisation ainsi que leur capacité à encapsuler et à transporter du paclitaxel ont été examinées *in vitro* sur différentes lignées cellulaires. Si les objets sont capables d'encapsuler une grande quantité de principe actif en conservant leur intégrité morphologique, et malgré une entrée massive dans les cellules par endocytose, l'action du paclitaxel bien qu'effective est relativement lente, ce que les auteurs expliquent par la retenue des vecteurs et de leur cargaison dans les endosomes.

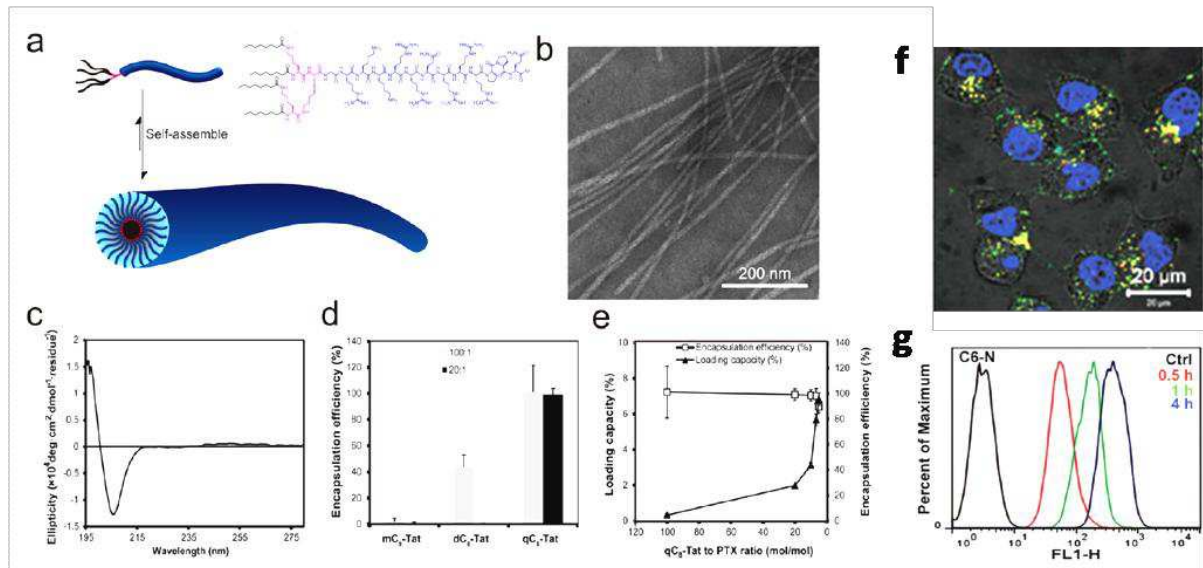


Figure 42 - Caractéristiques physico-chimiques et étude des capacités d'encapsulation et d'internalisation de chimères tensioactives qC₈-Tat. a) Illustration schématique de l'auto-assemblage ; b) Image de TEM des nanofibres formées ; c) Spectre de dichroïsme circulaire présentant la signature des feuillets β ; d) Comparaison de l'efficacité d'encapsulation de paclitaxel avec les conjugués monoC₈-Tat et diC₈-Tat ; e) Variation de la capacité et de l'efficacité d'encapsulation par les nanofibres en fonction du ratio molaire qC₈-Tat/paclitaxel ; f) Colocalisation des nanofibres (signal vert) avec les compartiments vésiculaires acides (rouge) de cellules KB-3-I (noyaux en bleu) ; g) Histogrammes de cytométrie en flux mesurant la fluorescence moyenne de cellules incubées 30 min (rouge), 1 hrs (vert) et 4 hrs (bleu) avec des nanofibres marquées à la coumarine. Adaptée de Zhang *et al.*³⁸¹

L'ensemble de ces travaux montre que le peptide Tat est capable d'assurer l'adressage intracellulaire de nanoparticules de diverses natures, et ce, visiblement, dans quasiment tout type de cellules.³⁸² Cette polyvalence est sa force, car elle fournit une solution universelle pour l'internalisation cellulaire, valable quelque soit le tissu ciblé ou le phénotype des patients, contrairement à d'autres stratégies à base de ligands spécifiques de récepteurs cellulaires. Mais elle est aussi sa faiblesse pour les applications *in vivo* typiquement envisagées en nanomédecine nécessitant une injection systémique. Dans ce cas, la forte affinité membranaire conférée par le peptide conduit à une adhésion non-spécifique des vecteurs sur le site d'injection et dans l'ensemble des tissus, cerveau compris.^{383, 384}

Au-delà d'une perte substantielle de matériel précieux, ce phénomène peut causer de sérieux dommages aux tissus touchés du fait de la toxicité intrinsèque de la particule ou des molécules qu'elle transporte. De plus, le caractère polycationique du peptide décorant leur surface expose les nanoparticules à de fortes interactions électrostatiques avec les protéines présentes dans le sang, abrégant ainsi leur temps de séjour dans la circulation sanguine. Ce manque de sélectivité va donc à l'encontre du bénéfice qu'apporte le recours à une nanoparticule pour le transport d'un principe actif thérapeutique, qui consiste justement à augmenter son temps de circulation dans le sang afin de pouvoir cibler au mieux la zone pathogène et de diminuer ainsi la dose globale injectée et les

éventuels effets secondaires. Pour résoudre ce problème critique, commun à tous les peptides d'internalisation cellulaire cationiques, plusieurs stratégies ont été développées.

III.3. NANOPARTICULES MASQUEES : STRATEGIES DE CAMOUFLAGE DU PEPTIDE TAT POUR UNE INTERNALISATION *IN VIVO* CONTROLÉE

Plusieurs stratégies de « camouflage » visant à dissimuler temporairement le peptide Tat, par neutralisation de ses charges ou par encombrement stérique, ont été envisagées afin de permettre aux nanoparticules d'atteindre le tissu cible.³⁸⁵ Une fois arrivées à destination, le peptide est démasqué par l'action d'un stimulus local. Celui-ci peut être déclenché depuis l'extérieur de l'organisme (hyperthermie, lumière ou autre rayonnement, agent chimique co-injecté) ou bien tirer partie d'une spécificité endogène de la zone ciblée, de nature biochimique (récepteurs ou enzymes surexprimés localement) ou physiologique (variations de pH, de potentiel d'oxydoréduction, etc.). Les différentes approches rapportées dans la littérature et actuellement activement investiguées sont décrites ci-dessous et rassemblées dans le tableau 4 en fonction du type de stimulus utilisé pour contrôler l'exposition du peptide Tat. Pour une description plus exhaustive abordant également les autres peptides d'internalisation cationique, nous invitons le lecteur à consulter les revues très récemment parues de Huang *et al.* et de Mac Ewan *et al.*^{386, 387}

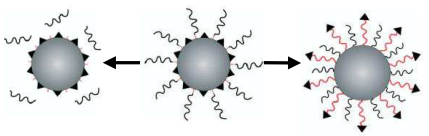

Stratégies de camouflage ▲ = peptide Tat	Stimulus activant l'internalisation			
	pH intratumoral	Enzymes MMP	Température	Potentiel redox
Masquage par encombrement stérique 	Liposomes ³⁸⁹⁻³⁹¹ Micelles polymères PHis-b-PEG / PLA-b-PEG-b-PHis-Tat ³⁷⁹ Micelles polymères PLA-b-PEG ³⁹²⁻³⁹³	Liposomes ³⁹⁶	Nanoparticules d'or ⁴⁰¹	Liposomes ^{403,404}
Inhibition par neutralisation électrostatique 	Micelles polymères PCL-b-PEG ³⁸⁰	Nanoparticules dendritiques ⁴⁰⁰		

Tableau 4 - Stratégies de camouflage du peptide Tat pour l'internalisation sélective et ciblée de nanoparticules. Adapté de la référence ³⁸⁷

III.3.1. CAMOUFLAGES SENSIBLES AU PH ACIDE TUMORAL

Avec un $\text{pH} \approx 6,8$, le microenvironnement tumoral est légèrement plus acide que celui des tissus sains dont le pH est de 7,4.³⁸⁸ Cette différence a été exploitée de différentes manières pour activer l'exposition du peptide Tat sélectivement dans les tumeurs.

Une méthode simple pour empêcher le peptide Tat de se lier aux membranes est de créer une barrière stérique à l'aide de molécules volumineuses, typiquement des chaînes de polymères et, de préférence inertes vis-à-vis du système immunitaire, autrement dit du PEG dans la majorité des cas. Ayant préalablement observé l'effet inhibiteur de l'encombrement stérique du PEG sur l'action du peptide, Torchilin et coll. sont les premiers à avoir expérimenté ce concept en ajoutant en surface de liposomes fonctionnalisés par Tat des chaînes de PEG via une liaison hydrazone sensible au pH .³⁸⁹ Les images de microscopie confocale montrent qu'après 1 heure d'incubation, l'internalisation cellulaire de ces vecteurs est inhibée à pH 7,4–8 et presque entièrement restaurée à pH 5-6 du fait du clivage des chaînes de polymères. Les auteurs ont ensuite utilisé ces vecteurs pour la transfection locale du gène de la protéine EGFP codé dans un plasmide dans des tumeurs chez la souris.³⁹⁰ Le taux de fluorescence, directement corrélé au taux de transfert du gène γ est augmenté de 3 fois par rapport aux liposomes couverts de PEG de manière non-clivable. Cette technique a ensuite été étendue à des liposomes multifonctionnels étudiés *in vitro* sur différentes lignées cellulaires cancéreuses, présentant aussi des anticorps de ciblage et chargés de doxorubicine.³⁹¹

Le PEG occultant peut aussi être introduit de façon non-covalente par complexation électrostatique entre le peptide et un espaceur anionique. Ainsi, Sethuraman *et al.* ont camouflé les peptides Tat greffés en surface de micelles PLA-*b*-PEG avec deux copolymères PEG-*b*-Polysulfonamide sensibles au pH : le PEG-*b*-poly(méthacryloyl sulfadiméthoxine) dans une première étude, le PEG-*b*-(L-cystine bisamide-*g*-sulfadizine) dans une seconde.^{392, 393} Ces polysulfonamides sont chargés négativement à pH physiologique et complexent donc les résidus basiques du peptide. Ainsi, les chaînes de PEG qui lui sont associées camouflent la micelle et ses peptides. Le pK_b des polysulfonamides étant fixé de façon très précise à pH 7, dans l'environnement légèrement acide de la tumeur, leurs fonctions basiques sont neutralisées et libèrent par décomplexation les groupements cationiques indispensables au peptide Tat pour assurer l'internalisation de la particule. La baisse de pH s'accompagne logiquement d'une variation du potentiel zéta des nanoparticules, qui passe de la neutralité à une valeur positive, mais aussi de la formation d'agrégats que les auteurs supposent constitués de PEG-*b*-polysulfonamides neutralisés. Des tests d'internalisation *in vitro* de ces micelles montrent une inhibition à pH 7,4 et une réhabilitation partielle à pH 6,6 de l'affinité cellulaire pour le premier copolymère, quasiment complète pour le second.

Plutôt que d'être éliminée, la couronne de protection stérique peut aussi être simplement modulée. Cette approche a l'avantage de permettre à la nanoparticule de restaurer le camouflage si d'aventure elle ressort de l'environnement tumoral. Suivant ce concept, Lee *et al.* ont mis au point des micelles à base de copolymères PHis-*b*-PEG et PLA-*b*-PEG-*b*-PHis-Tat dont le cœur est composé de PLA et de PHis et la couronne de PEG et de peptide Tat (Figure 43).³⁹⁴ A pH 7.4, l'espaceur PHis liant le Tat et le PEG est déprotoné et donc hydrophobe. Il « ancre » le peptide dans la couche de PEG, l'empêchant ainsi d'agir. A pH 7 et 6,8, les groupements imidazoles des histidines s'ionisent et le peptide est libéré à l'extérieur de la couronne de PEG, ce qui induit une multiplication respectivement par 30 (pH 7) et 70 (pH 6,8) du taux d'internalisation des micelles dans des cellules mammaires cancéreuses MCF-7, mesuré par cytométrie. L'efficacité de ces micelles « pop-up » pour la vectorisation de doxorubicine a été examinée *in vivo* chez la souris sur des greffons de tumeurs humaines ovarienne (A2780/AD), mammaire (MCF-7) et pulmonaire (A549). La régression tumorale est significativement améliorée par rapport aux différents contrôles, en particulier par rapport aux micelles présentant du peptide Tat de manière constante indépendamment de la valeur du pH. La restauration des propriétés d'internalisation, et donc de la toxicité, de ces vecteurs avec la diminution du pH a également été confirmée *in vitro* par un test de viabilité cellulaire.

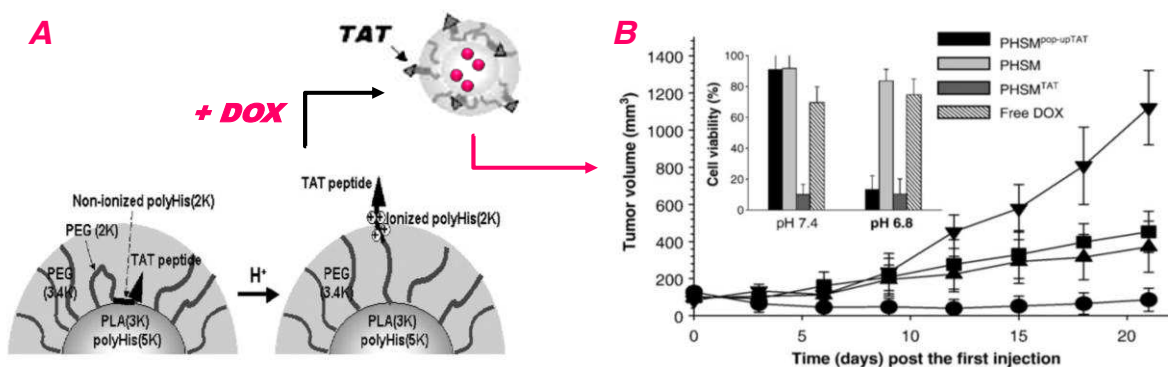


Figure 43 - A) Représentation schématique des micelles “pop-up” à base PHis-*b*-PEG et PLA-*b*-PEG-*b*-PHis-Tat sensibles au pH acide de l’environnement tumoral; B) Efficacité de ces micelles chargées de doxorubicine (PHSM^{pop-up}TAT - rond) *in vivo* sur la régression de greffon de tumeur ovarienne humaine chez la souris (graphique principal) et *in vitro* sur des cellules tumorales (petit graphique). Contrôles: micelles présentant du Tat à tout pH (PHSM^{TAT} – triangle), micelles sans peptide (PHSM – carré), doxorubicine libre (DOX – triangle inversé). Adapté de Lee *et al.*³⁹⁴

Enfin, le pH acide intratumoral a été utilisé de manière originale par Jin *et al.* pour libérer les amines primaires des résidus lysine des peptides Tat décorant des micelles de PCL-*b*-PEG, initialement protégées sous la forme d'amide à l'aide d'anhydride succinique.³⁹⁵ Cette modification chimique inhibe complètement l'action du peptide à pH 7,4, la restitue au bout de 5 hrs à pH 5 *in vitro*, et annule l'impact négatif imputable au peptide sur le temps de circulation et la toxicité des nanoparticules à pH 7,4 *in vivo*. Néanmoins, cette stratégie a peu de chance d'aboutir *in vivo*, le pH intratumoral étant bien supérieur au pH=5 visiblement requis pour la déprotection des amines primaires des lysines et donc pour l'activation du peptide.

III.3.2. CAMOUFLAGES SENSIBLES AUX ENZYMES DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

Les métalloprotéinases matricielles (MMP) sont des protéases qui reconnaissent et clivent des séquences peptidiques spécifiques. Certaines d'entre elles (MMP-2, MMP-9) sont surexprimées dans la matrice extracellulaire des tumeurs cancéreuses. Elles représentent un stimulus biochimique intéressant par exemple pour cliver des chaînes de PEG ou d'autres molécules participant au masquage temporaire du peptide Tat.

Cette stratégie a récemment été explorée par Zhu *et al.* pour camoufler des liposomes en conjuguant à leur surface des chaînes de PEG *via* un motif peptidique clivable par l'une de ces enzymes, la MMP-2, et présentant à leur extrémité exposée en surface des anticorps de ciblage (Figure 44).³⁹⁶ Dans un premier temps, les anticorps exposés sur la couronne protectrice de PEG permettent aux nanoparticules de s'accumuler dans les tumeurs, puis les enzymes MMP-2 clivent le lien retenant les chaînes de PEG et libèrent le peptide qui assure alors l'internalisation et la diffusion des vecteurs dans les cellules tumorales. La preuve de l'efficacité de ce concept est apportée par un test d'internalisation de ces nanoparticules *in vitro*, positif en présence des enzymes MMP2 et négatif en leur absence. Par ailleurs, deux autres équipes ont utilisé cette approche pour contrôler avec succès l'exposition d'autres peptides d'internalisation cationiques analogues au peptide Tat sur des nanoparticules d'or et d'oxyde de fer.^{397, 398}

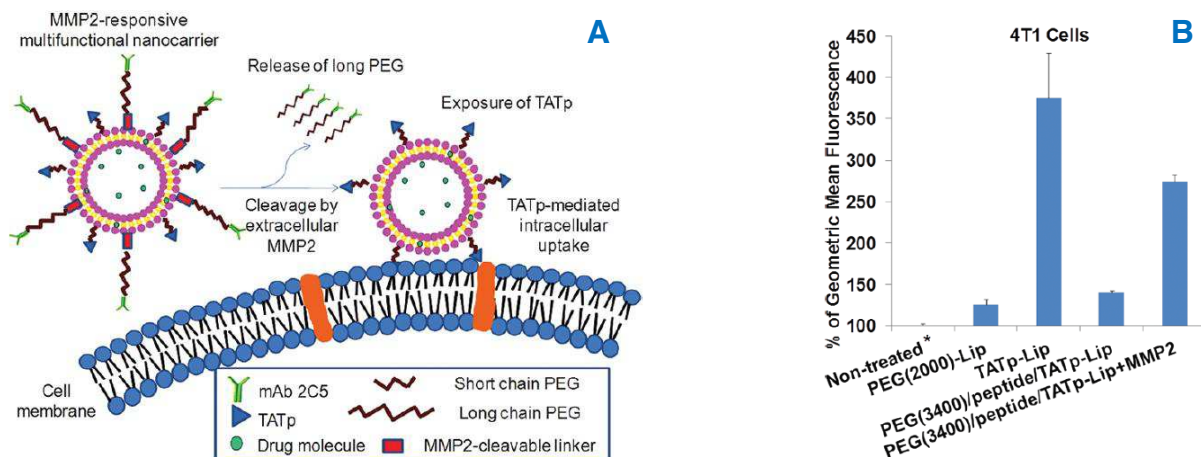


Figure 44 - A) Représentation schématique du camoufrage de liposomes multifonctionnels contrôlé par l'action des enzymes MMP2 de la matrice extracellulaire tumorale ; B) Analyse par cytométrie en flux de l'internalisation dans des cellules 4T1 de ces systèmes en présence (PEG₃₄₀₀/peptide/Tatp-Lip+MMP2) ou non (PEG₃₄₀₀/peptide/Tatp-Lip+MMP2) d'enzymes et comparé à des liposomes sans camoufrage (Tatp-Lip).³⁹⁶

Une autre approche pour inhiber l'action du peptide est de neutraliser ses résidus cationiques à l'aide d'un partenaire polyanionique. Tsien *et coll.* ont mis au point pour cela une technique élégante consistant à maintenir lié de façon covalente un petit peptide anionique PGLu au peptide d'internalisation *via* une séquence clivable par les MMP.³⁹⁹ Le tout forme alors un complexe neutre en

forme d'épingle qui ne sera dissocié qu'une fois dans la tumeur par l'action des MMP. Huang *et al.* ont récemment adapté cette approche pour camoufler des nanoparticules dendritiques multifonctionnelles transportant du matériel génétique.⁴⁰⁰

III.3.3. CAMOUFLAGE SENSIBLE A LA TEMPERATURE

Une approche originale de camouflage contrôlé par la température mérite d'être décrite ici bien qu'elle n'ait pas été appliquée au peptide Tat mais à un autre peptide d'internalisation cellulaire cationique de composition très semblable.⁴⁰¹ Elle consiste au masquage du peptide décorant des nanoparticules d'or non pas avec du PEG mais avec du PNIPAM (Figure 45). A 25°C donc au dessous de sa LCST, le PNIPAM est parfaitement soluble et masque effectivement le peptide. A 37°C en revanche, il se déshydrate et se ramasse sur les nanoparticules, révélant le peptide qui provoque l'internalisation cellulaire des objets. L'effet observé *in vitro*, bien qu'il ne soit pas radical, est tout de même encourageant. Cette stratégie en plus d'être innovante est intéressante car elle implique un stimulus externe dont l'application peut donc être parfaitement contrôlée.

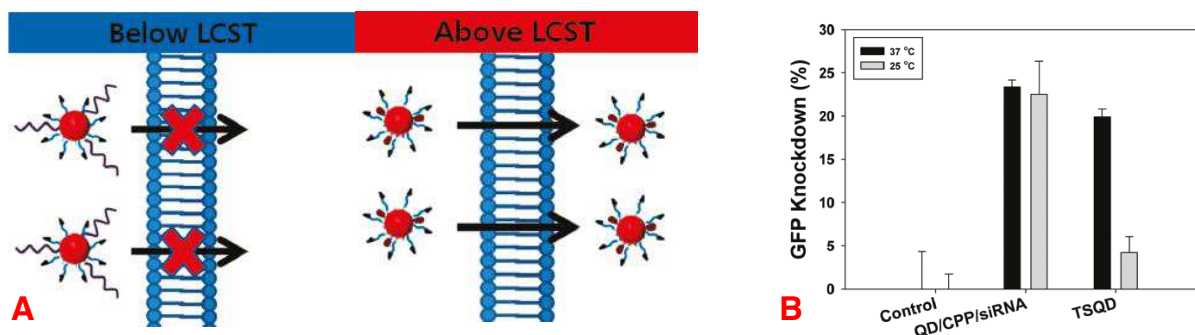


Figure 45 - A) Schéma décrivant l'internalisation de nanoparticules d'or décorées de peptide Tat contrôlée par la température par l'intermédiaire d'un camouflage de PNIPAM ; B) Analyse quantitative de l'internalisation de ces nanoparticules (TSQD) à 37°C (au dessus de la LCST) et à 25°C (au dessous de la LCST) comparé à une nanoparticule non camouflée (QD/CPP/siRNA) mesurée via la transfection d'un siRNA permettant d'éteindre la fluorescence de la GFP.⁴⁰¹

III.3.4. CAMOUFLAGE SENSIBLE AU POTENTIEL D'OXYDOREDUCTION

Une autre alternative pour moduler l'encombrement stérique du peptide par des chaînes de PEG « furtives » est le recours à un pont disulfure clivable sous l'action d'un agent réducteur, comme l'ont fait Kuai *et al.* sur des liposomes de DOPE puis de DSPE.^{402, 403} L'incorporation à leur surface de 8% de PEG suffit pour masquer complètement l'action du peptide. L'ajout de 20 mM de cystéine provoque le clivage des chaînes qui permet de multiplier par 4 le taux d'internalisation. *In vivo*, cette technique permet aux liposomes de DSPE de s'accumuler dans des modèles de tumeurs du colon (C26) par effet EPR plutôt que dans le foie. L'injection systémique de cystéine 24 hrs après celle des liposomes provoque une augmentation de 56% de leur distribution dans les tumeurs, indiquant que

les chaînes de PEG se sont sensiblement dissociées des nanoparticules suite à ce traitement. Là aussi, l'activation du stimulus est initiée depuis l'extérieur de l'organisme.

CONCLUSION

Pour conclure, au regard des divers éléments fournis par la littérature, le peptide Tat constitue une option polyvalente et efficace afin de promouvoir l'internalisation cellulaire de nanoparticules quelques soient les cellules ciblées. Plusieurs études prêtent également au peptide Tat la capacité de promouvoir le passage de la barrière hémato-encéphalique de nanoparticules, ce qui est un atout considérable pour le développement de traitements non-invasifs de pathologies cérébrales comme les gliomes. En revanche le caractère non-spécifique de son mode d'action peut significativement affecter sa sélectivité et donc son efficacité globale dans le cas d'une injection par voie systémique. Pour pallier à cette difficulté, les chercheurs s'emploient actuellement à développer des stratégies de camouflage exploitant judicieusement les paramètres physiologiques et biochimiques de la pathologie ciblée ou faisant appel à un stimulus extérieur.

D'une manière générale et de plus en plus, les études rapportées se focalisent sur l'évaluation *in vivo* des nanoparticules en vue d'applications potentielles. En revanche, parce qu'elle nécessite des techniques pointues et de nombreux contrôles, l'étude du mode d'entrée des nanoparticules et de la façon dont il est influencé par des paramètres physico-chimiques comme la taille des particules ou la densité surfacique réelle de peptide est peu décrite dans la littérature. Cette tendance n'aide pas à répondre aux questions fondamentales qui se posent sur la façon dont les cellules appréhendent et transforment les nanoparticules colloïdales et sur les mécanismes cellulaires à l'origine de l'internalisation des peptides cationiques, qui restent bien mystérieux malgré 20 ans d'intense recherche. En particulier, le mode d'internalisation des nanoparticules, qui, au-delà d'une première étape d'adhésion de nature électrostatique avec la membrane, implique, dans la plupart des cas, une endocytose dépendante de l'énergie, est loin d'être complètement élucidé.

RÉFÉRENCES

1. L. Leibler, *Macromolecules*, 1980, **13**, 1602-1617.
2. F. S. Bates and G. H. Fredrickson, *Annual Review of Physical Chemistry*, 1990, **41**, 525-557.
3. G. H. Fredrickson and F. S. Bates, *Annual Review of Materials Science*, 1996, **26**, 501-550.
4. I. W. Hamley, ed., *The Physics of Block Copolymers*, Oxford edn., Oxford University Press., 1998.
5. S. Lecommandoux and R. Borsali, *Polymer International*, 2006, **55**, 1161-1168.
6. N. A. Lynd, A. J. Meuler and M. A. Hillmyer, *Progress in Polymer Science*, 2008, **33**, 875-893.
7. A. Choucair and A. Eisenberg, *European Physical Journal E*, 2003, **10**, 37-44.
8. G. Riess, *Progress in Polymer Science*, 2003, **28**, 1107-1170.
9. J. Rodríguez-Hernández, F. Chécot, Y. Gnanou and S. Lecommandoux, *Progress in Polymer Science*, 2005, **30**, 691-724.
10. J.-F. Gohy, in *Block Copolymers II*, ed. V. Abetz, Springer Berlin Heidelberg, 2005, vol. 190, pp. 65-136.
11. L. Zhang and A. Eisenberg, *Macromolecules*, 1996, **29**, 8805-8815.
12. D. E. Discher and F. Ahmed, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2006, **8**, 323-341.
13. S. E. M. Webber, Petr; Tuzar, Zdenek, ed., *Solvents and Self-Organization of Polymers*, 1996.
14. Z. T. a. P. Kratochvíl, ed., *Surface and Colloid Science*, New York Plenum Press edn., 1993.
15. L. Zhang, H. Shen and A. Eisenberg, *Macromolecules*, 1997, **30**, 1001-1011.
16. P. Linse, in *Amphiphilic Block Copolymers*, eds. A. Paschalis and L. Björn, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 2000, pp. 13-40.
17. I. W. Hamley, *Block copolymers in solution: fundamentals and applications*, Wiley, 2005.
18. P. G. De Gennes, *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*, 1978, **16**, 1883-1885.
19. P. De Gennes, *Scaling Concepts in Polymer Physics*, First edition edn., Cornell University Press, 1979.
20. M. Daoud and J. P. Cotton, *J. Phys. France*, 1982, **43**, 531-538.
21. T. M. Birshtein and E. B. Zhulina, *Polymer*, 1989, **30**, 170-177.
22. A. Halperin, *Macromolecules*, 1987, **20**, 2943-2946.
23. N. P. Shusharina, I. A. Nyrkova and A. R. Khokhlov, *Macromolecules*, 1996, **29**, 3167-3174.
24. C. Wu and J. Gao, *Macromolecules*, 2000, **33**, 645-646.
25. J. Noolandi and K. M. Hong, *Macromolecules*, 1983, **16**, 1443-1448.
26. L. Leibler, H. Orland and J. C. Wheeler, *The Journal of Chemical Physics*, 1983, **79**, 3550-3557.
27. S. V. Venev, P. Reineker and I. I. Potemkin, *Macromolecules*, 2010, **43**, 10735-10742.
28. E. B. Zhulina and T. M. Birshtein, *Molecular Biology*, 1982, **16**, 1066-1069.
29. J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces* Hartcourt Brace & Company, 1992.
30. J. N. Israelachvili, in *Intermolecular and Surface Forces (Third Edition)*, Academic Press, San Diego, 2011, pp. 535-576.
31. S. Jain and F. S. Bates, *Science*, 2003, **300**, 460-464.
32. M. Antonietti and S. Forster, *Advanced Materials*, 2003, **15**, 1323-1333.
33. D. E. Discher and A. Eisenberg, *Science*, 2002, **297**, 967-973.
34. M. Reenders and G. ten Brinke, *Macromolecules*, 2002, **35**, 3266-3280.
35. H. A. Klok and S. Lecommandoux, *Advanced Materials*, 2001, **13**, 1217-1229.
36. Y.-b. Lim, K.-S. Moon and M. Lee, *Journal of Materials Chemistry*, 2008, **18**, 2909-2918.
37. A. Carlsen and S. Lecommandoux, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2009, **14**, 329-339.
38. C. Cai, L. Wang and J. Lin, *Chemical Communications*, 2011, **47**, 11189-11203.
39. B. Tian, X. Tao, T. Ren, Y. Weng, X. Lin, Y. Zhang and X. Tang, *Journal of Materials Chemistry*, 2012, **22**, 17404-17414.

40. J. G. Ray, A. J. Johnson and D. A. Savin, *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, 2013, **51**, 508-523.
41. H. Leuchs, *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 1906, **39**, 857-861.
42. J. Huang and A. Heise, *Chemical Society Reviews*, 2013, **42**, 7373-7390.
43. J. Cappello, J. Crissman, M. Dorman, M. Mikolajczak, G. Textor, M. Marquet and F. Ferrari, *Biotechnology Progress*, 1990, **6**, 198-202.
44. M. J. Fournier, H. S. Creel, M. T. Krejchi, T. L. Mason, D. A. Tirrell, K. P. McGrath and E. D. T. Atkins, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 1991, **6**, 326-338.
45. E. Garanger and S. Lecommandoux, *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, **51**, 3060-3062.
46. S. Motala-Timol, D. Jhurry, J. Zhou, A. Bhaw-Luximon, G. Mohun and H. Ritter, *Macromolecules*, 2008, **41**, 5571-5576.
47. L. Wang, R. Zeng, C. Li and R. Qiao, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2009, **74**, 284-292.
48. C. M. Dong and E. L. Chaikof, *Colloid and Polymer Science*, 2005, **283**, 1366-1370.
49. H. G. Börner, *Progress in Polymer Science*, 2009, **34**, 811-851.
50. R. Obeid and C. Scholz, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 3797-3804.
51. M. K. Yoo, M. K. Jang, J. W. Nah, M. R. Park and C. S. Cho, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2006, **207**, 528-535.
52. J. Jacobs, G. Pound-Lana and B. Klumperman, *Polymer Chemistry*, 2012, **3**, 2551-2560.
53. C. S. Cho, J. W. Nah, Y. I. Jeong, J. B. Cheon, S. Asayama, H. Ise and T. Akaike, *Polymer*, 1999, **40**, 6769-6775.
54. H. Iatrou, H. Frielinghaus, S. Hanski, N. Ferderigos, J. Ruokolainen, O. Ikkala, D. Richter, J. Mays and N. Hadjichristidis, *Biomacromolecules*, 2007, **8**, 2173-2181.
55. C. Schatz, S. Louguet, J.-F. Le Meins and S. Lecommandoux, *Angewandte Chemie-International Edition*, 2009, **48**, 2572-2575.
56. C. Bonduelle, J. Huang, E. Ibarboure, A. Heise and S. Lecommandoux, *Chemical Communications*, 2012, **48**, 8353-8355.
57. J. Huang, C. Bonduelle, J. Thevenot, S. Lecommandoux and A. Heise, *Journal of the American Chemical Society*, 2012, **134**, 119-122.
58. C. Cai, J. Lin, T. Chen, X.-S. Wang and S. Lin, *Chemical Communications*, 2009, 2709-2711.
59. W. Ding, S. Lin, J. Lin and L. Zhang, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2007, **112**, 776-783.
60. E. G. Bellomo, M. D. Wyrsta, L. Pakstis, D. J. Pochan and T. J. Deming, *Nature Materials*, 2004, **3**, 244-248.
61. E. P. Holowka, D. J. Pochan and T. J. Deming, *Journal of the American Chemical Society*, 2005, **127**, 12423-12428.
62. E. P. Holowka, V. Z. Sun, D. T. Kamei and T. J. Deming, *Nature Materials*, 2007, **6**, 52-57.
63. J. R. Kramer, A. R. Rodriguez, U.-J. Choe, D. T. Kamei and T. J. Deming, *Soft Matter*, 2013, **9**, 3389-3395.
64. U. J. Choe, A. R. Rodriguez, Z. B. Li, S. Boyarskiy, T. J. Deming and D. T. Kamei, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2013, **214**, 994-999.
65. A. R. Rodriguez, U. J. Choe, D. T. Kamei and T. J. Deming, *Macromolecular Bioscience*, 2012, **12**, 805-811.
66. V. Breedveld, A. P. Nowak, J. Sato, T. J. Deming and D. J. Pine, *Macromolecules*, 2004, **37**, 3943-3953.
67. R. Wang, G.-T. Chen, F.-S. Du and Z.-C. Li, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2011, **85**, 56-62.
68. A. Constancis, R. Meyrueix, N. Bryson, S. Huille, J. M. Grosselin, T. Gulik-Krzywicki and G. Soula, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1999, **217**, 357-368.
69. S.-H. Hua, Y.-Y. Li, Y. Liu, W. Xiao, C. Li, F.-W. Huang, X.-Z. Zhang and R.-X. Zhuo, *Macromolecular Rapid Communications*, 2010, **31**, 81-86.
70. H. J. Moon, B. G. Choi, M. H. Park, M. K. Joo and B. Jeong, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 1234-1242.

71. T. Kanzaki, Y. Horikawa, A. Makino, J. Sugiyama and S. Kimura, *Macromolecular Bioscience*, 2008, **8**, 1026-1033.
72. A. Uesaka, M. Ueda, A. Makino, T. Imai, J. Sugiyama and S. Kimura, *Langmuir*, 2012, **28**, 6006-6012.
73. O. S. Rabotyagova, P. Cebe and D. L. Kaplan, *Biomacromolecules*, 2009, **10**, 229-236.
74. O. S. Rabotyagova, P. Cebe and D. L. Kaplan, *Macromolecular Bioscience*, 2010, **10**, 49-59.
75. Y. Y. Choi, M. K. Joo, Y. S. Sohn and B. Jeong, *Soft Matter*, 2008, **4**, 2383-2387.
76. Y. Y. Choi, J. H. Jang, M. H. Park, B. G. Choi, B. Chi and B. Jeong, *Journal of Materials Chemistry*, 2010, **20**, 3416-3421.
77. M. H. Park, B. G. Choi and B. Jeong, *Advanced Functional Materials*, 2012, **22**, 5118-5125.
78. J. O. Han, M. K. Joo, J. H. Jang, M. H. Park and B. Jeong, *Macromolecules*, 2009, **42**, 6710-6715.
79. K. Wang, H.-Q. Dong, H.-Y. Wen, M. Xu, C. Li, Y.-Y. Li, H. N. Jones, D.-L. Shi and X.-Z. Zhang, *Macromolecular Bioscience*, 2011, **11**, 65-71.
80. A. Sinaga, T. A. Hatton and K. C. Tam, *Macromolecules*, 2007, **40**, 9064-9073.
81. Y.-C. Huang, Y.-S. Yang, T.-Y. Lai and J.-S. Jan, *Polymer*, 2012, **53**, 913-922.
82. H. R. Marsden, A. V. Korobko, E. N. M. van Leeuwen, E. M. Pouget, S. J. Veen, N. A. J. M. Sommerdijk and A. Kros, *Journal of the American Chemical Society*, 2008, **130**, 9386-9393.
83. H. R. Marsden, J.-W. Handgraaf, F. Nudelman, N. A. J. M. Sommerdijk and A. Kros, *Journal of the American Chemical Society*, 2010, **132**, 2370-2377.
84. Y. Anraku, A. Kishimura, M. Oba, Y. Yamasaki and K. Kataoka, *Journal of the American Chemical Society*, 2010, **132**, 1631-1636.
85. A. Koide, A. Kishimura, K. Osada, W. D. Jang, Y. Yamasaki and K. Kataoka, *Journal of the American Chemical Society*, 2006, **128**, 5988-5989.
86. A. Harada and K. Kataoka, *Macromolecules*, 1995, **28**, 5294-5299.
87. A. Harada and K. Kataoka, *Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry*, 1997, **A34**, 2119-2133.
88. A. Harada and K. Kataoka, *Science*, 1999, **283**, 65-67.
89. J.-S. Park, Y. Akiyama, Y. Yamasaki and K. Kataoka, *Langmuir*, 2006, **23**, 138-146.
90. A. Kishimura, S. Liamsuwan, H. Matsuda, W.-F. Dong, K. Osada, Y. Yamasaki and K. Kataoka, *Soft Matter*, 2009, **5**, 529-532.
91. Y. Bae, N. Nishiyama, S. Fukushima, H. Koyama, M. Yasuhiro and K. Kataoka, *Bioconjugate Chemistry*, 2004, **16**, 122-130.
92. E. S. Lee, H. J. Shin, K. Na and Y. H. Bae, *Journal of Controlled Release*, 2003, **90**, 363-374.
93. R. P. Johnson, Y.-I. Jeong, J. V. John, C.-W. Chung, D. H. Kang, M. Selvaraj, H. Suh and I. Kim, *Biomacromolecules*, 2013.
94. J. Sun, X. Chen, C. Deng, H. Yu, Z. Xie and X. Jing, *Langmuir*, 2007, **23**, 8308-8315.
95. Y.-Y. Li, S.-H. Hua, W. Xiao, H.-Y. Wang, X.-H. Luo, C. Li, S.-X. Cheng, X.-Z. Zhang and R.-X. Zhuo, *Journal of Materials Chemistry*, 2011, **21**, 3100-3106.
96. T. B. Schuster, D. d. B. Ouboter, E. Bordignon, G. Jeschke and W. Meier, *Soft Matter*, 2010, **6**, 5596-5604.
97. J. Babin, J. Rodriguez-Hernandez, S. Lecommandoux, H. A. Klok and M. F. Achard, *Faraday Discussions*, 2005, **128**, 179-192.
98. J. Rodriguez-Hernandez, J. Babin, B. Zappone and S. Lecommandoux, *Biomacromolecules*, 2005, **6**, 2213-2220.
99. R. Sigel, M. Łosik and H. Schlaad, *Langmuir*, 2007, **23**, 7196-7199.
100. K. E. Gebhardt, S. Ahn, G. Venkatachalam and D. A. Savin, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2008, **317**, 70-76.
101. K. E. Gebhardt, S. Ahn, G. Venkatachalam and D. A. Savin, *Langmuir*, 2007, **23**, 2851-2856.
102. J. G. Ray, S. S. Naik, E. A. Hoff, A. J. Johnson, J. T. Ly, C. P. Easterling, D. L. Patton and D. A. Savin, *Macromolecular Rapid Communications*, 2012, **33**, 819-826.

103. G. O. Gil, S. Prevost, M. Losik, F. Hermes, H. Schlaad and T. Hellweg, *Colloid and Polymer Science*, 2009, **287**, 1295-1304.
104. A. Lubbert, V. Castelletto, I. W. Hamley, H. Nuhn, M. Scholl, L. Bourdillon, C. Wandrey and H. A. Klok, *Langmuir*, 2005, **21**, 6582-6589.
105. J. Rodriguez-Hernandez and S. Lecommandoux, *Journal of the American Chemical Society*, 2005, **127**, 2026-2027.
106. S. S. Naik, J. G. Ray and D. A. Savin, *Langmuir*, 2011, **27**, 7231-7240.
107. J. Deng, N. Gao, Y. Wang, H. Yi, S. Fang, Y. Ma and L. Cai, *Biomacromolecules*, 2012, **13**, 3795-3804.
108. K. Numata, M. R. Reagan, R. H. Goldstein, M. Rosenblatt and D. L. Kaplan, *Bioconjugate Chemistry*, 2011, **22**, 1605-1610.
109. J. Lin, J. Zhu, T. Chen, S. Lin, C. Cai, L. Zhang, Y. Zhuang and X.-S. Wang, *Biomaterials*, 2009, **30**, 108-117.
110. C. Cai, L. Zhang, J. Lin and L. Wang, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008, **112**, 12666-12673.
111. W. Agut, A. Brulet, D. Taton and S. Lecommandoux, *Langmuir*, 2007, **23**, 11526-11533.
112. J. Rao, Z. Luo, Z. Ge, H. Liu and S. Liu, *Biomacromolecules*, 2007, **8**, 3871-3878.
113. L. Deng, K. Shi, Y. Zhang, H. Wang, J. Zeng, X. Guo, Z. Du and B. Zhang, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2008, **323**, 169-175.
114. W. Agut, A. Brulet, C. Schatz, D. Taton and S. Lecommandoux, *Langmuir*, 2010, **26**, 10546-10554.
115. H. Kukula, H. Schlaad, M. Antonietti and S. Forster, *Journal of the American Chemical Society*, 2002, **124**, 1658-1663.
116. F. Chécot, S. Lecommandoux, Y. Gnanou and H.-A. Klok, *Angewandte Chemie International Edition*, 2002, **41**, 1339-1343.
117. F. Checot, S. Lecommandoux, H. A. Klok and Y. Gnanou, *European Physical Journal E*, 2003, **10**, 25-35.
118. F. Checot, A. Brulet, J. Oberdisse, Y. Gnanou, O. Mondain-Monval and S. Lecommandoux, *Langmuir*, 2005, **21**, 4308-4315.
119. J. Sun, C. Deng, X. Chen, H. Yu, H. Tian, J. Sun and X. Jing, *Biomacromolecules*, 2007, **8**, 1013-1017.
120. A. Ribeiro, F. J. Arias, J. Reguera, M. Alonso and J. C. Rodríguez-Cabello, *Biophysical journal*, 2009, **97**, 312-320.
121. T. A. T. Lee, A. Cooper, R. P. Apkarian and V. P. Conticello, *Advanced Materials*, 2000, **12**, 1105-1110.
122. M. R. Dreher, A. J. Simnick, K. Fischer, R. J. Smith, A. Patel, M. Schmidt and A. Chilkoti, *Journal of the American Chemical Society*, 2008, **130**, 687-694.
123. A. J. Simnick, C. A. Valencia, R. Liu and A. Chilkoti, *ACS Nano*, 2010, **4**, 2217-2227.
124. A. J. Simnick, M. Amiram, W. Liu, G. Hanna, M. W. Dewhirst, C. D. Kontos and A. Chilkoti, *Journal of Controlled Release*, 2011, **155**, 144-151.
125. R. E. Sallach, M. Wei, N. Biswas, V. P. Conticello, S. Lecommandoux, R. A. Dluhy and E. L. Chaikof, *Journal of the American Chemical Society*, 2006, **128**, 12014-12019.
126. W. Kim, J. Thevenot, E. Ibarboure, S. Lecommandoux and E. L. Chaikof, *Angewandte Chemie-International Edition*, 2010, **49**, 4257-4260.
127. W. Kim, J. Xiao and E. L. Chaikof, *Langmuir*, 2011, **27**, 14329-14334.
128. C. Chen, Z. Wang and Z. Li, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 2859-2863.
129. S. S. Zhang, C. Y. Chen and Z. B. Li, *Chinese Journal of Polymer Science*, 2013, **31**, 201-210.
130. J. Y. Shen, C. Y. Chen, W. X. Fu, L. Q. Shi and Z. B. Li, *Langmuir*, 2013, **29**, 6271-6278.
131. X. H. Fu, Y. Shen, W. X. Fu and Z. B. Li, *Macromolecules*, 2013, **46**, 3753-3760.
132. V. Z. Sun, Z. Li, T. J. Deming and D. T. Kamei, *Biomacromolecules*, 2010, **12**, 10-13.
133. J. Sun, X. Chen, T. Lu, S. Liu, H. Tian, Z. Guo and X. Jing, *Langmuir*, 2008, **24**, 10099-10106.
134. R. A. Dwek, *Chemical Reviews*, 1996, **96**, 683-720.

135. J. R. Kramer and T. J. Deming, *Journal of the American Chemical Society*, 2012, **134**, 4112-4115.
136. H. Schlaad, ed., *Bio-synthetic Polymer Conjugates*, Springer Berlin Heidelberg, 2013.
137. G. Fuks, R. Mayap Talom and F. Gauffre, *Chemical Society Reviews*, 2011.
138. F. E. Alemdaroglu and A. Herrmann, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2007, **5**, 1311-1320.
139. J.-F. Lutz and H. G. Börner, *Progress in Polymer Science*, 2008, **33**, 1-39.
140. H. A. Klok, *Macromolecules*, 2009, **42**, 7990-8000.
141. A. Abuchowski, T. van Es, N. C. Palczuk and F. F. Davis, *Journal of Biological Chemistry*, 1977, **252**, 3578-3581.
142. S. Zalipsky, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1995, **16**, 157-182.
143. J. M. Harris and R. B. Chess, *Nat Rev Drug Discov*, 2003, **2**, 214-221.
144. G. Pasut and F. M. Veronese, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, **61**, 1177-1188.
145. R. Duncan, *Nat Rev Drug Discov*, 2003, **2**, 347-360.
146. J. Shi, Z. Xiao, N. Kamaly and O. C. Farokhzad, *Accounts of Chemical Research*, 2011, **44**, 1123-1134.
147. H. G. Borner and H. Schlaad, *Soft Matter*, 2007, **3**, 394-408.
148. J. C. M. Van Hest, *Polymer Reviews*, 2007, **47**, 63-92.
149. L. A. Canalle, D. W. P. M. Lowik and J. C. M. van Hest, *Chemical Society Reviews*, 2010, **39**, 329-353.
150. H. Robson Marsden and A. Kros, *Macromolecular Bioscience*, 2009, **9**, 939-951.
151. M. A. Gauthier and H.-A. Klok, *Chemical Communications*, 2008, **0**, 2591-2611.
152. R. M. Broyer, G. N. Grover and H. D. Maynard, *Chemical Communications*, 2011, **47**, 2212-2226.
153. L. Ayres, P. Hans, J. Adams, D. W. P. M. Löwik and J. C. M. van Hest, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2005, **43**, 6355-6366.
154. M. L. Becker, J. Liu and K. L. Wooley, *Biomacromolecules*, 2004, **6**, 220-228.
155. E. Friedmann, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1952, **9**, 65-75.
156. J. D. Gregory, *Journal of the American Chemical Society*, 1955, **77**, 3922-3923.
157. R. F. Borch, M. D. Bernstein and H. D. Durst, *Journal of the American Chemical Society*, 1971, **93**, 2897-2904.
158. W. T. E. Bosker, K. Ágoston, M. A. Cohen Stuart, W. Norde, J. W. Timmermans and T. M. Slaghek, *Macromolecules*, 2003, **36**, 1982-1987.
159. R. Huisgen, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1963, **2**, 565-598.
160. V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin and K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition*, 2002, **41**, 2596-2599.
161. C. W. Tornøe, C. Christensen and M. Meldal, *The Journal of Organic Chemistry*, 2002, **67**, 3057-3064.
162. J.-F. Lutz, *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, **46**, 1018-1025.
163. R. R. Webb and T. Kaneko, *Bioconjugate Chemistry*, 1990, **1**, 96-99.
164. K. L. Heredia, Z. P. Tolstyka and H. D. Maynard, *Macromolecules*, 2007, **40**, 4772-4779.
165. K. J. Mackenzie and M. B. Francis, *Journal of the American Chemical Society*, 2013, **135**, 293-300.
166. J. C. Peeler, B. F. Woodman, S. Averick, S. J. Miyake-Stoner, A. L. Stokes, K. R. Hess, K. Matyjaszewski and R. A. Mehl, *Journal of the American Chemical Society*, 2010, **132**, 13575-13577.
167. K. Loos and R. Stadler, *Macromolecules*, 1997, **30**, 7641-7643.
168. K. Loos and A. H. E. Müller, *Biomacromolecules*, 2002, **3**, 368-373.
169. F. E. Alemdaroglu, K. Ding, R. Berger and A. Herrmann, *Angewandte Chemie International Edition*, 2006, **45**, 4206-4210.
170. J. Hentschel, K. Bleek, O. Ernst, J.-F. Lutz and H. G. Borner, *Macromolecules*, 2008, **41**, 1073-1075.
171. Á. Somoza, *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, **48**, 9406-9408.

172. R. Saiki, D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. Horn, K. Mullis and H. Erlich, *Science*, 1988, **239**, 487-491.
173. M. Kwak and A. Herrmann, *Angewandte Chemie-International Edition*, 2010, **49**, 8574-8587.
174. C. Vebert-Nardin, *Chimia*, 2011, **65**, 782-786.
175. R. B. Fong, Z. Ding, C. J. Long, A. S. Hoffman and P. S. Stayton, *Bioconjugate Chemistry*, 1999, **10**, 720-725.
176. J. H. Jeong and T. G. Park, *Bioconjugate Chemistry*, 2001, **12**, 917-923.
177. Z. Li, Y. Zhang, P. Fullhart and C. A. Mirkin, *Nano Letters*, 2004, **4**, 1055-1058.
178. K. Ding, F. E. Alemдарoglu, M. Börsch, R. Berger and A. Herrmann, *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, **46**, 1172-1175.
179. F. E. Alemдарoglu, J. Wang, M. Börsch, R. Berger and A. Herrmann, *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, **47**, 974-976.
180. F. Teixeira Jr, P. Rigler and C. Vebert-Nardin, *Chemical Communications*, 2007, **0**, 1130-1132.
181. N. Cottenye, F. Teixeira, A. Ponche, G. Reiter, K. Anselme, W. Meier, L. Ploux and C. Vebert-Nardin, *Macromolecular Bioscience*, 2008, **8**, 1161-1172.
182. N. Cottenye, M. I. Syga, S. Nosov, A. H. E. Muller, L. Ploux and C. Vebert-Nardin, *Chemical Communications*, 2012, **48**, 2615-2617.
183. N. Cottenye, K. Anselme, L. Ploux and C. Vebert-Nardin, *Advanced Functional Materials*, 2012, **22**, 4891-4898.
184. S. Fluegel, J. Buehler, K. Fischer, J. R. McDaniel, A. Chilkoti and M. Schmidt, *Chemistry – A European Journal*, 2011, **17**, 5503-5506.
185. R. M. Talom, G. Fuks, L. Kaps, J. Oberdisse, C. Cerclier, C. Gaillard, C. Mingotaud and F. Gauffre, *Chemistry-a European Journal*, 2011, **17**, 13495-13501.
186. P. H. Seeberger and W.-C. Haase, *Chemical Reviews*, 2000, **100**, 4349-4394.
187. K. M. Koeller and C.-H. Wong, *Chemical Reviews*, 2000, **100**, 4465-4494.
188. A. Douy and B. Gallot, *Die Makromolekulare Chemie*, 1977, **178**, 1595-1599.
189. A. Douy and B. Gallot, *Biopolymers*, 1980, **19**, 493-507.
190. C. Feger and H. J. Cantow, *Polymer Bulletin*, 1980, **3**, 407-413.
191. C. Feger and H. J. Cantow, *Polymer Bulletin*, 1982, **6**, 321-326.
192. C. Feger and H. J. Cantow, *Polymer Bulletin*, 1982, **6**, 583-588.
193. T. Mezger and H. J. Cantow, *Polymer Bulletin*, 1983, **9**, 598.
194. D. M. Haddleton and K. Ohno, *Biomacromolecules*, 2000, **1**, 152-156.
195. A. Narumi, H. Kaga, K. Kawasaki, Y. Taniguchi, T. Satoh and T. Kakuchi, *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, 2001, **39**, 4061-4067.
196. A. Narumi, Y. Miura, I. Otsuka, S. Yamane, Y. Kitajyo, T. Satoh, A. Hirao, N. Kaneko, H. Kaga and T. Kakuchi, *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, 2006, **44**, 4864-4879.
197. T. Kakuchi, A. Narumi, Y. Miura, S. Matsuya, N. Sugimoto, T. Satoh and H. Kaga, *Macromolecules*, 2003, **36**, 3909-3913.
198. H. Kamitakahara, Y. Enomoto, C. Hasegawa and F. Nakatsubo, *Cellulose*, 2005, **12**, 527-541.
199. Y. Yang, K. Kataoka and F. M. Winnik, *Macromolecules*, 2005, **38**, 2043-2046.
200. J. Lohmann, C. Houga, H. Driguez, J. Wilson, M. Destarac, S. Fort, J.-F. Le Meins, R. Borsali, D. Taton and Y. Gnanou, in *Controlled/Living Radical Polymerization: Progress in ATRP*, American Chemical Society, 2009, vol. 1023, pp. 231-240.
201. S. Yagi, N. Kasuya and K. Fukuda, *Polymer Journal*, 2010, **42**, 342-348.
202. C. Schatz and S. Lecommandoux, *Macromolecular Rapid Communications*, 2010, **31**, 1664-1684.
203. C. Houga, J.-F. L. Meins, R. Borsali, D. Taton and Y. Gnanou, *Chemical Communications*, 2007, **0**, 3063-3065.
204. B. Lepoittevin, A. Elhiri, L. Bech, J. Belleney, J. P. Baltaze, I. Capron, V. Planchot and P. Roger, *Carbohydrate Polymers*, 2011, **83**, 1174-1179.
205. J. Y. Liu and L. M. Zhang, *Carbohydrate Polymers*, 2007, **69**, 196-201.
206. B. G. Li and L. M. Zhang, *Carbohydrate Polymers*, 2008, **74**, 390-395.

207. I. Otsuka, K. Fuchise, S. Halila, S. b. Fort, K. Aissou, I. Pignot-Paintrand, Y. Chen, A. Narumi, T. Kakuchi and R. Borsali, *Langmuir*, 2009, **26**, 2325-2332.
208. S. D. Modolon, I. Otsuka, S. Fort, E. Minatti, R. Borsali and S. Halila, *Biomacromolecules*, 2012, **13**, 1129-1135.
209. C. C. Liu, K. Y. Chang and Y. J. Wang, *Journal of Polymer Research*, 2010, **17**, 459-469.
210. C. Chauvierre, D. Labarre, P. Couvreur and C. Vauthier, *Macromolecules*, 2003, **36**, 6018-6027.
211. I. Bertholon, S. Lesieur, D. Labarre, M. Besnard and C. Vauthier, *Macromolecules*, 2006, **39**, 3559-3567.
212. M. Gaborieau, H. de Bruyn, S. Mange, P. Castignolles, A. Brockmeyer and R. G. Gilbert, *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, 2009, **47**, 1836-1852.
213. K. K. Upadhyay, J. F. Le Meins, A. Misra, P. Voisin, V. Bouchaud, E. Ibarboure, C. Schatz and S. Lecommandoux, *Biomacromolecules*, 2009, **10**, 2802-2808.
214. K. K. Upadhyay, A. N. Bhatt, A. K. Mishra, B. S. Dwarakanath, S. Jain, C. Schatz, J. F. Le Meins, A. Farooque, G. Chandraiah, A. K. Jain, A. Misra and S. Lecommandoux, *Biomaterials*, 2010, **31**, 2882-2892.
215. K. K. Upadhyay, A. N. Bhatt, E. Castro, A. K. Mishra, K. Chuttani, B. S. Dwarakanath, C. Schatz, J. F. Le Meins, A. Misra and S. Lecommandoux, *Macromolecular Bioscience*, 2010, **10**, 503-512.
216. K. K. Upadhyay, A. K. Mishra, K. Chuttani, A. Kaul, C. Schatz, J. F. Le Meins, A. Misra and S. Lecommandoux, *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 2012, **8**, 71-80.
217. C. Bonduelle, S. Mazzaferro, H. Jin, O. Lambert, A. Heise and S. Lecommandoux, *Faraday Discussions*, 2013, DOI: 10.1039/c1033fd00082f.
218. S. Halila, M. Manguian, S. Fort, S. Cottaz, T. Hamaide, E. Fleury and H. Driguez, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2008, **209**, 1282-1290.
219. W. J. Zhu, J. P. Lin, C. H. Cai and Y. Q. Lu, *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, **1**, 841-849.
220. I. C. Reynhout, J. J. L. M. Cornelissen and R. J. M. Nolte, *Accounts of Chemical Research*, 2009, **42**, 681-692.
221. K. Velonia, *Polymer Chemistry*, 2010, **1**, 944-952.
222. C. Boyer, X. Huang, M. R. Whittaker, V. Bulmus and T. P. Davis, *Soft Matter*, 2011, **7**, 1599-1614.
223. P. S. Stayton, T. Shimoboji, C. Long, A. Chilkoti, G. Ghen, J. M. Harris and A. S. Hoffman, *Nature*, 1995, **378**, 472-474.
224. Z. Ding, R. B. Fong, C. J. Long, P. S. Stayton and A. S. Hoffman, *Nature*, 2001, **411**, 59-62.
225. Z. Ding, *Bioconj. Chem.*, 1999, **10**, 395-400.
226. V. Bulmus, Z. Ding, C. J. Long, P. S. Stayton and A. S. Hoffman, *Bioconj. Chem.*, 1999, **11**, 78-83.
227. Z. Ding, G. Chen and A. S. Hoffman, *Journal of Biomedical Materials Research*, 1998, **39**, 498-505.
228. A. Chilkoti, G. Chen, P. S. Stayton and A. S. Hoffman, *Bioconjugate Chemistry*, 1994, **5**, 504-507.
229. Z. Ding, C. J. Long, Y. Hayashi, E. V. Bulmus, A. S. Hoffman and P. S. Stayton, *Bioconjugate Chemistry*, 1999, **10**, 395-400.
230. K. L. Heredia, D. Bontempo, T. Ly, J. T. Byers, S. Halstenberg and H. D. Maynard, *Journal of the American Chemical Society*, 2005, **127**, 16955-16960.
231. D. Bontempo and H. D. Maynard, *Journal of the American Chemical Society*, 2005, **127**, 6508-6509.
232. L. Tao, C. S. Kaddis, R. R. Ogorzalek Loo, G. N. Grover, J. A. Loo and H. D. Maynard, *Chemical Communications*, 2009, **0**, 2148-2150.
233. C. Boyer, V. Bulmus, J. Liu, T. P. Davis, M. H. Stenzel and C. Barner-Kowollik, *Journal of the American Chemical Society*, 2007, **129**, 7145-7154.

234. P. De, M. Li, S. R. Gondi and B. S. Sumerlin, *Journal of the American Chemical Society*, 2008, **130**, 11288-11289.
235. M. Li, P. De, S. R. Gondi and B. S. Sumerlin, *Macromolecular Rapid Communications*, 2008, **29**, 1172-1176.
236. X. J. Wan and S. Y. Liu, *Macromolecular Rapid Communications*, 2010, **31**, 2070-2076.
237. C. Lavigneur, J. G. Garcia, L. Hendriks, R. Hoogenboom, J. Cornelissen and R. J. M. Nolte, *Polymer Chemistry*, 2011, **2**, 333-340.
238. J. M. Hannink, J. J. L. M. Cornelissen, J. A. Farrera, P. Foubert, F. C. De Schryver, N. A. J. M. Sommerdijk and R. J. M. Nolte, *Angewandte Chemie International Edition*, 2001, **40**, 4732-4734.
239. M. J. Boerakker, J. M. Hannink, P. H. H. Bomans, P. M. Frederik, R. J. M. Nolte, E. M. Meijer and N. A. J. M. Sommerdijk, *Angewandte Chemie International Edition*, 2002, **41**, 4239-4241.
240. M. J. Boerakker, N. E. Botterhuis, P. H. H. Bomans, P. M. Frederik, E. M. Meijer, R. J. M. Nolte and N. A. J. M. Sommerdijk, *Chemistry – A European Journal*, 2006, **12**, 6071-6080.
241. I. C. Reynhout, J. J. L. M. Cornelissen and R. J. M. Nolte, *Journal of the American Chemical Society*, 2007, **129**, 2327-2332.
242. A. J. Dirks, S. S. van Berkel, N. S. Hatzakis, J. A. Opsteen, F. L. van Delft, J. J. L. M. Cornelissen, A. E. Rowan, J. C. M. van Hest, F. P. J. T. Rutjes and R. J. M. Nolte, *Chemical Communications*, 2005, 4172-4174.
243. K. Velonia, A. E. Rowan and R. J. M. Nolte, *Journal of the American Chemical Society*, 2002, **124**, 4224-4225.
244. B. Le Droumaguet and K. Velonia, *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, **47**, 6263-6266.
245. B. Le Droumaguet, G. Mantovani, D. M. Haddleton and K. Velonia, *Journal of Materials Chemistry*, 2007, **17**, 1916-1922.
246. E. Daskalaki, B. Le Droumaguet, D. Gerard and K. Velonia, *Chemical Communications*, 2012, **48**, 1586-1588.
247. M. D. Pierschbacher and E. Ruoslahti, *Nature*, 1984, **309**, 30-33.
248. S. Cavalli, F. Albericio and A. Kros, *Chemical Society Reviews*, 2010, **39**, 241-263.
249. F. Versluis, H. R. Marsden and A. Kros, *Chemical Society Reviews*, 2010, **39**, 3434-3444.
250. J. Y. Shu, B. Panganiban and T. Xu, *Annual Review of Physical Chemistry*, 2013, **64**, 631-657.
251. M. L. Becker, J. Liu and K. L. Wooley, *Chemical Communications*, 2003.
252. H. Rettig, E. Krause and H. G. Börner, *Macromolecular Rapid Communications*, 2004, **25**, 1251-1256.
253. J. Lutz, H. G. Börner and K. Weichenhan, *Australian Journal of Chemistry*, 2007, **60**, 410-413.
254. R. Chapman, K. A. Jolliffe and S. Perrier, *Australian Journal of Chemistry*, 2010, **63**, 1169-1172.
255. A. Meszynska, N. Badi, H. G. Borner and J.-F. Lutz, *Chemical Communications*, 2012, **48**, 3887-3889.
256. I. C. Reynhout, D. W. P. M. Lowik, J. C. M. van Hest, J. J. L. M. Cornelissen and R. J. M. Nolte, *Chemical Communications*, 2005, **0**, 602-604.
257. J. A. Zupancich, F. S. Bates and M. A. Hillmyer, *Biomacromolecules*, 2009, **10**, 1554-1563.
258. J. Y. Shu, Y.-J. Huang, C. Tan, A. D. Presley, J. Chang and T. Xu, *Biomacromolecules*, 2010, **11**, 1443-1452.
259. N. Dube, A. D. Presley, J. Y. Shu and T. Xu, *Macromolecular Rapid Communications*, 2011, **32**, 344-353.
260. O. D. Krishna, K. T. Wiss, T. Luo, D. J. Pochan, P. Theato and K. L. Kiick, *Soft Matter*, 2012, **8**, 3832-3840.
261. R. Trzcinska, D. Szweda, S. Rangelov, P. Suder, J. Silberring, A. Dworak and B. Trzebicka, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2012, **50**, 3104-3115.
262. E. J. Oh, J. S. Choi, H. Kim, C. K. Joo and S. K. Hahn, *Biomaterials*, 2011, **32**, 3115-3123.
263. E. J. Oh, K. Park, J.-S. Choi, C.-K. Joo and S. K. Hahn, *Biomaterials*, 2009, **30**, 6026-6034.

264. F. Stoica, C. Alexander, N. Tirelli, A. F. Miller and A. Saiani, *Chemical Communications*, 2008, 4433-4435.
265. Y. Mei, K. L. Beers, H. C. M. Byrd, D. L. VanderHart and N. R. Washburn, *Journal of the American Chemical Society*, 2004, **126**, 3472-3476.
266. L. Costantino, F. Gandolfi, G. Tosi, F. Rivasi, M. A. Vandelli and F. Forni, *Journal of Controlled Release*, 2005, **108**, 84-96.
267. Y. S. Nam, J. Y. Park, S.-H. Han and I.-S. Chang, *Biotechnology Letters*, 2002, **24**, 2093-2098.
268. T. Kanazawa, H. Taki, K. Tanaka, Y. Takashima and H. Okada, *Pharm Res*, 2011, **28**, 2130-2139.
269. X. Li, M. Wang, C. Liu, X. Jing and Y. Huang, *Journal of Applied Polymer Science*, 2013, n/a-n/a.
270. Y.-R. Yoon, Y.-b. Lim, E. Lee and M. Lee, *Chemical Communications*, 2008, **0**, 1892-1894.
271. C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy and P. J. Feeney, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1997, **23**, 3-25.
272. A. Prochiantz, *Current Opinion in Cell Biology*, 2000, **12**, 400-406.
273. A. Joliot and A. Prochiantz, *M S-Medecine Sciences*, 2005, **21**, 309-314.
274. G. Gouridis, S. Karamanou, I. Gelis, C. G. Kalodimos and A. Economou, *Nature*, 2009, **462**, 363-367.
275. K. Splith and I. Neundorf, *Eur Biophys J*, 2011, **40**, 387-397.
276. S. Lu, L. A. Tager, S. Chitale and L. W. Riley, *Analytical Biochemistry*, 2006, **353**, 7-14.
277. J. P. M. Langedijk, *Journal of Biological Chemistry*, 2002, **277**, 5308-5314.
278. A. D. Frankel and C. O. Pabo, *Cell*, 1988, **55**, 1189-1193.
279. M. Green and P. M. Loewenstein, *Cell*, 1988, **55**, 1179-1188.
280. A. Joliot, C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin and A. Prochiantz, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991, **88**, 1864-1868.
281. B. Gupta, T. S. Levchenko and V. P. Torchilin, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, **57**, 637-651.
282. F. Heitz, M. C. Morris and G. Divita, *British Journal of Pharmacology*, 2009, **157**, 195-206.
283. S. B. Fonseca, M. P. Pereira and S. O. Kelley, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, **61**, 953-964.
284. F. Milletti, *Drug Discovery Today*, 2012, **17**, 850-860.
285. S. Debaisieux, F. Rayne, H. Yezid and B. Beaumelle, *Traffic*, 2012, **13**, 355-363.
286. S. Fawell, J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L. L. Chen, B. Pepinsky and J. Barsoum, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, **91**, 664-668.
287. E. Vives, P. Brodin and B. Lebleu, *Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**, 16010-16017.
288. H. J.-P. Ryser and R. Hancock, *Science*, 1965, **150**, 501-503.
289. J. S. Wadia and S. F. Dowdy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, **57**, 579-596.
290. E. Vivès, C. Granier, P. Prevot and B. Lebleu, *Lett Pept Sci*, 1997, **4**, 429-436.
291. P. A. Wender, D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman and J. B. Rothbard, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, **97**, 13003-13008.
292. D. J. Mitchell, L. Steinman, D. T. Kim, C. G. Fathman and J. B. Rothbard, *The Journal of Peptide Research*, 2000, **56**, 318-325.
293. S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda and Y. Sugiura, *Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**, 5836-5840.
294. E. G. Stanzl, B. M. Trantow, J. R. Vargas and P. A. Wender, *Accounts of Chemical Research*, 2013.
295. J. B. Rothbard, T. C. Jessop, R. S. Lewis, B. A. Murray and P. A. Wender, *Journal of the American Chemical Society*, 2004, **126**, 9506-9507.
296. H. Brooks, B. Lebleu and E. Vives, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, **57**, 559-577.
297. M. Belting, S. Sandgren and A. Wittrup, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, **57**, 505-527.
298. S. Console, C. Marty, C. Garcia-Echeverria, R. Schwendener and K. Ballmer-Hofer, *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**, 35109-35114.
299. M. Tyagi, M. Rusnati, M. Presta and M. Giacca, *Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**, 3254-3261.

300. E. G. Argyris, J. Kulkosky, M. E. Meyer, Y. Xu, M. Mukhtar, R. J. Pomerantz and K. J. Williams, *Virology*, 2004, **330**, 481-486.
301. J. M. Gump, R. K. June and S. F. Dowdy, *Journal of Biological Chemistry*, 2010, **285**, 1500-1507.
302. A. Mishra, V. D. Gordon, L. Yang, R. Coridan and G. C. L. Wong, *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, **47**, 2986-2989.
303. K. Sakamoto, K. Aburai, T. Morishita, K. Sakai, H. Sakai, M. Abe, I. Nakase and S. Futaki, *Chemistry Letters*, 2012, **41**, 1078-1080.
304. H. Hirose, T. Takeuchi, H. Osakada, S. Pujals, S. Katayama, I. Nakase, S. Kobayashi, T. Haraguchi and S. Futaki, *Mol Ther*, 2012, **20**, 984-993.
305. T. Suzuki, S. Futaki, M. Niwa, S. Tanaka, K. Ueda and Y. Sugiura, *Journal of Biological Chemistry*, 2002, **277**, 2437-2443.
306. H. Plattner and J. Hentschel, *Manuel de poche de biologie cellulaire*, Flammarion, 2006.
307. J. M. Gump and S. F. Dowdy, *Trends in Molecular Medicine*, 2007, **13**, 443-448.
308. X. Zhang, X. Zhang and F. Wang, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2012, **9**, 457-472.
309. J. P. Richard, K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M. J. Gait, L. V. Chernomordik and B. Lebleu, *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**, 585-590.
310. M. Lundberg, S. Wikstrom and M. Johansson, *Molecular Therapy*, 2003, **8**, 143-150.
311. T. B. Potocky, A. K. Menon and S. H. Gellman, *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**, 50188-50194.
312. A. Sorkin, *Journal of Cell Science*, 2000, **113**, 4375-4376.
313. J. P. Richard, K. Melikov, H. Brooks, P. Prevot, B. Lebleu and L. V. Chernomordik, *Journal of Biological Chemistry*, 2005, **280**, 15300-15306.
314. A. Fittipaldi, A. Ferrari, M. Zoppé, C. Arcangeli, V. Pellegrini, F. Beltram and M. Giacca, *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**, 34141-34149.
315. J. S. Wadia, R. V. Stan and S. F. Dowdy, *Nat Med*, 2004, **10**, 310-315.
316. I. M. Kaplan, J. S. Wadia and S. F. Dowdy, *Journal of Controlled Release*, 2005, **102**, 247-253.
317. A. Ferrari, V. Pellegrini, C. Arcangeli, A. Fittipaldi, M. Giacca and F. Beltram, *Mol Ther*, 2003, **8**, 284-294.
318. A. Vendeville, F. Rayne, A. Bonhoure, N. Bettache, P. Montcourrier and B. Beaumelle, *Molecular Biology of the Cell*, 2004, **15**, 2347-2360.
319. R. D. Singh, V. Puri, J. T. Valiyaveetil, D. L. Marks, R. Bittman and R. E. Pagano, *Molecular Biology of the Cell*, 2003, **14**, 3254-3265.
320. R. Fischer, K. Köhler, M. Fotin-Mleczek and R. Brock, *Journal of Biological Chemistry*, 2004, **279**, 12625-12635.
321. F. Duchardt, M. Fotin-Mleczek, H. Schwarz, R. Fischer and R. Brock, *Traffic*, 2007, **8**, 848-866.
322. G. Tuennemann, R. M. Martin, S. Haupt, C. Patsch, F. Edenhofer and M. C. Cardoso, *Faseb Journal*, 2006, **20**, 1775-1784.
323. A. Mishra, G. H. Lai, N. W. Schmidt, V. Z. Sun, A. R. Rodriguez, R. Tong, L. Tang, J. Cheng, T. J. Deming, D. T. Kamei and G. C. L. Wong, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, **108**, 16883-16888.
324. P. Saalik, A. Niinep, J. Pae, M. Hansen, D. Lubenets, U. Langel and M. Pooga, *Journal of Controlled Release*, 2011, **153**, 117-125.
325. H. Yezid, K. Konate, S. Debaisieux, A. Bonhoure and B. Beaumelle, *Journal of Biological Chemistry*, 2009, **284**, 22736-22746.
326. E. Koren and V. P. Torchilin, *Trends in Molecular Medicine*, 2012, **18**, 385-393.
327. M. Breunig, S. Bauer and A. Goepferich, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, **68**, 112-128.
328. R. R. Sawant and V. P. Torchilin, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 2012, **16**, 269-275.
329. K.-T. Jeang, H. Xiao and E. A. Rich, *Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**, 28837-28840.

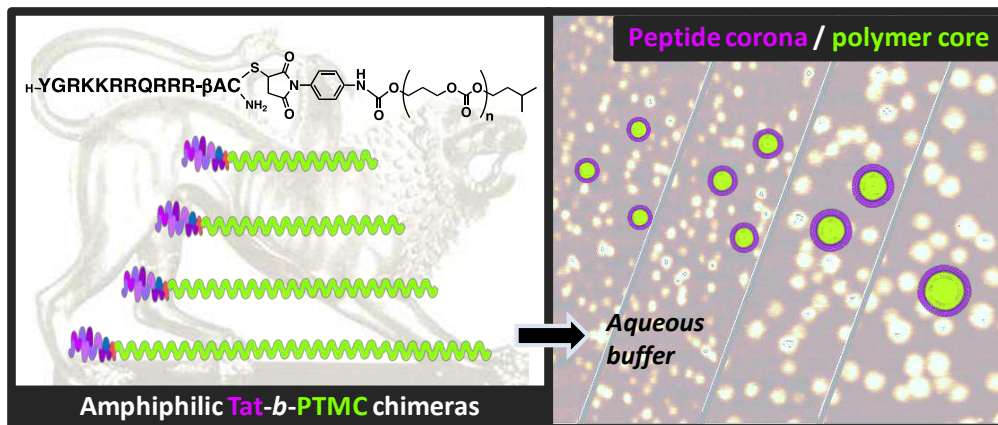
330. C. Rudolph, C. Plank, J. Lausier, U. Schillinger, R. H. Müller and J. Rosenecker, *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**, 11411-11418.
331. A. H. van Asbeck, A. Beyerle, H. McNeill, P. H. M. Bovee-Geurts, S. Lindberg, W. P. R. Verdurmen, M. Hällbrink, Ü. Langel, O. Heidenreich and R. Brock, *ACS Nano*, 2013, **7**, 3797-3807.
332. L. Hyndman, J. L. Lemoine, L. Huang, D. J. Porteous, A. C. Boyd and X. S. Nan, *Journal of Controlled Release*, 2004, **99**, 435-444.
333. J. S. Suk, J. Suh, K. Choy, S. K. Lai, J. Fu and J. Hanes, *Biomaterials*, 2006, **27**, 5143-5150.
334. E. Kleemann, M. Neu, N. Jekel, L. Fink, T. Schmehl, T. Gessler, W. Seeger and T. Kissel, *Journal of Controlled Release*, 2005, **109**, 299-316.
335. H. Lv, S. Zhang, B. Wang, S. Cui and J. Yan, *Journal of Controlled Release*, 2006, **114**, 100-109.
336. F. F. Yang, W. Huang, Y. F. Li, S. Liu, M. J. Jin, Y. L. Wang, L. H. Jia and Z. G. Gao, *Biomaterials*, 2013, **34**, 5689-5699.
337. L. Josephson, C.-H. Tung, A. Moore and R. Weissleder, *Bioconjugate Chemistry*, 1999, **10**, 186-191.
338. M. Lewin, N. Carlesso, C.-H. Tung, X.-W. Tang, D. Cory, D. T. Scadden and R. Weissleder, *Nat Biotech*, 2000, **18**, 410-414.
339. C. H. Dodd, H.-C. Hsu, W.-J. Chu, P. Yang, H.-G. Zhang, J. D. Mountz Jr, K. Zinn, J. Forder, L. Josephson, R. Weissleder, J. M. Mountz and J. D. Mountz, *Journal of Immunological Methods*, 2001, **256**, 89-105.
340. A. M. Koch, F. Reynolds, M. F. Kircher, H. P. Merkle, R. Weissleder and L. Josephson, *Bioconjugate Chemistry*, 2003, **14**, 1115-1121.
341. P. Wunderbaldinger, L. Josephson and R. Weissleder, *Bioconjugate Chemistry*, 2002, **13**, 264-268.
342. C. L. Kaufman, M. Williams, L. Madison Ryle, T. L. Smith, M. Tanner and C. Ho, *Transplantation*, 2003, **76**, 1043-1046.
343. C. A. M. Smith, J. de la Fuente, B. Pelaz, E. P. Furlani, M. Mullin and C. C. Berry, *Biomaterials*, 2010, **31**, 4392-4400.
344. H. P. Song, J. Y. Yang, S. L. Lo, Y. Wang, W. M. Fan, X. S. Tang, J. M. Xue and S. Wang, *Biomaterials*, 2010, **31**, 769-778.
345. H. J. Wang, S. N. Zhang, Z. Y. Liao, C. Y. Wang, Y. Liu, S. Q. Feng, X. G. Jiang and J. Chang, *Biomaterials*, 2010, **31**, 6589-6596.
346. C. H. Wang, L. Qiao, Q. Zhang, H. S. Yan and K. L. Liu, *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, **430**, 372-380.
347. B. R. Liu, J.-F. Li, S.-W. Lu, H.-J. Lee, Y.-W. Huang, K. B. Shannon and R. S. Aronstam, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2010, **10**, 6534-6543.
348. V. Sanz, J. Conde, Y. Hernandez, P. V. Baptista, M. R. Ibarra and J. M. de la Fuente, *Journal of Nanoparticle Research*, 2012, **14**.
349. A. M. Fales, H. Yuan and V. D. Tuan, *Molecular Pharmaceutics*, 2013, **10**, 2291-2298.
350. A. G. Tkachenko, H. Xie, Y. Liu, D. Coleman, J. Ryan, W. R. Glomm, M. K. Shipton, S. Franzen and D. L. Feldheim, *Bioconjugate Chemistry*, 2004, **15**, 482-490.
351. J. M. de la Fuente and C. C. Berry, *Bioconjugate Chemistry*, 2005, **16**, 1176-1180.
352. C. C. Berry, J. M. de la Fuente, M. Mullin, S. W. L. Chu and A. S. G. Curtis, *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 2007, **6**, 262-269.
353. G. Ruan, A. Agrawal, A. I. Marcus and S. Nie, *Journal of the American Chemical Society*, 2007, **129**, 14759-14766.
354. Z. e. Krpetić, S. Saleemi, I. A. Prior, V. Sée, R. Qureshi and M. Brust, *ACS Nano*, 2011, **5**, 5195-5201.
355. S. Santra, H. Yang, J. T. Stanley, P. H. Holloway, B. M. Moudgil, G. Walter and R. A. Mericle, *Chemical Communications*, 2005, 3144-3146.
356. M. W. Mortensen, O. Björkdahl, P. G. Sørensen, T. Hansen, M. R. Jensen, H. J. G. Gundersen and T. Bjørnholm, *Bioconjugate Chemistry*, 2006, **17**, 284-290.

357. J. Kim, T. Shirasawa and Y. Miyamoto, *Biomaterials*, 2010, **31**, 5849-5854.
358. J. H. Liu, Y. X. Zhao, Q. Q. Guo, Z. Wang, H. Y. Wang, Y. X. Yang and Y. Z. Huang, *Biomaterials*, 2012, **33**, 6155-6161.
359. Y. Sakaue, J. Kim and Y. Miyamoto, *International Journal of Nanomedicine*, 2010, **5**, 687-695.
360. X. H. Tian, F. Wei, T. X. Wang, D. Wang, J. Wang, X. N. Lin, P. Wang and L. Ren, *Materials Letters*, 2012, **68**, 94-96.
361. X. H. Tian, Z. G. Wang, H. Meng, Y. H. Wang, W. Feng, F. Wei, Z. C. Huang, X. N. Lin and L. Ren, *International Journal of Nanomedicine*, 2013, **8**, 865-876.
362. Y. P. Chen, C. T. Chen, Y. Hung, C. M. Chou, T. P. Liu, M. R. Liang and C. Y. Mou, *Journal of the American Chemical Society*, 2013, **135**, 1516-1523.
363. H. Chang and M. K. Yeh, *International Journal of Nanomedicine*, 2012, **7**, 49-60.
364. V. P. Torchilin, R. Rammohan, V. Weissig and T. S. Levchenko, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, **98**, 8786-8791.
365. V. P. Torchilin, T. S. Levchenko, R. Rammohan, N. Volodina, B. Papahadjopoulos-Sternberg and G. G. M. D'Souza, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, **100**, 1972-1977.
366. B. Gupta, T. S. Levchenko and V. P. Torchilin, *Oncology Research*, 2007, **16**, 351-359.
367. Y.-L. Tseng, J.-J. Liu and R.-L. Hong, *Molecular Pharmacology*, 2002, **62**, 864-872.
368. N. Yagi, Y. Yano, K. Hatanaka, Y. Yokoyama and H. Okuno, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2007, **17**, 2590-2593.
369. Y. Qin, H. Chen, Q. Zhang, X. Wang, W. Yuan, R. Kuai, J. Tang, L. Zhang, Z. Zhang, J. Liu and Q. He, *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, **420**, 304-312.
370. J. Yang, A. Srinivasan, Y. Sun, J. Mrazek, Z. Y. Shu, V. A. Kickhoefer and L. H. Rome, *Integrative Biology*, 2013, **5**, 151-158.
371. J. Tang, R. Yin, Y. Tian, Z. M. Huang, J. L. Shi, X. L. Fu, L. Wang, Y. Z. Wu, F. Hao and B. Ni, *Vaccine*, 2012, **30**, 1071-1082.
372. J. Q. Liu, Q. Zhang, E. E. Remsen and K. L. Wooley, *Biomacromolecules*, 2001, **2**, 362-368.
373. M. L. Becker, E. E. Remsen, D. Pan and K. L. Wooley, *Bioconjugate Chemistry*, 2004, **15**, 699-709.
374. K. Zhang, H. F. Fang, Z. Y. Chen, J. S. A. Taylor and K. L. Wooley, *Bioconjugate Chemistry*, 2008, **19**, 1880-1887.
375. K. S. Rao, M. K. Reddy, J. L. Horning and V. Labhasetwar, *Biomaterials*, 2008, **29**, 4429-4438.
376. X.-B. Xiong and A. Lavasanifar, *ACS Nano*, 2011, **5**, 5202-5213.
377. S. F. M. van Dongen, W. P. R. Verdurmen, R. Peters, R. J. M. Nolte, R. Brock and J. C. M. van Hest, *Angewandte Chemie-International Edition*, 2010, **49**, 7213-7216.
378. N. A. Christian, M. C. Milone, S. S. Ranka, G. Li, P. R. Frail, K. P. Davis, F. S. Bates, M. J. Therien, P. P. Ghoroghchian, C. H. June and D. A. Hammer, *Bioconjugate Chemistry*, 2006, **18**, 31-40.
379. K. Han, S. Chen, W. H. Chen, Q. Lei, Y. Liu, R. X. Zhuo and X. Z. Zhang, *Biomaterials*, 2013, **34**, 4680-4689.
380. L. Liu, K. Xu, H. Wang, P. K. Jeremy Tan, W. Fan, S. S. Venkatraman, L. Li and Y.-Y. Yang, *Nat Nano*, 2009, **4**, 457-463.
381. P. Zhang, A. G. Cheetham, Y.-a. Lin and H. Cui, *ACS Nano*, 2013, **7**, 5965-5977.
382. M. Zorko and U. Langel, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, **57**, 529-545.
383. T. A. Aguilera, E. S. Olson, M. M. Timmers, T. Jiang and R. Y. Tsien, *Integrative Biology*, 2009, **1**, 371-381.
384. S. R. Schwarze, A. Ho, A. Vocero-Akbani and S. F. Dowdy, *Science*, 1999, **285**, 1569-1572.
385. E. Vivès, J. Schmidt and A. Pèlegri, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 2008, **1786**, 126-138.
386. Y. Huang, Y. Jiang, H. Wang, J. Wang, M. C. Shin, Y. Byun, H. He, Y. Liang and V. C. Yang, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013.

387. S. R. MacEwan and A. Chilkoti, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2013, **5**, 31-48.
388. M. Stubbs, P. M. J. McSheehy, J. R. Griffiths and C. L. Bashford, *Molecular Medicine Today*, 2000, **6**, 15-19.
389. R. M. Sawant, J. P. Hurley, S. Salmaso, A. Kale, E. Tolcheva, T. S. Levchenko and V. P. Torchilin, *Bioconjugate Chemistry*, 2006, **17**, 943-949.
390. A. A. Kale and V. P. Torchilin, *Journal of Drug Targeting*, 2007, **15**, 538-545.
391. E. Koren, A. Apte, A. Jani and V. P. Torchilin, *Journal of Controlled Release*, 2012, **160**, 264-273.
392. V. A. Sethuraman and Y. H. Bae, *Journal of Controlled Release*, 2007, **118**, 216-224.
393. V. Sethuraman, M. Lee and Y. Bae, *Pharmaceutical Research*, 2008, **25**, 657-666.
394. E. S. Lee, Z. Gao, D. Kim, K. Park, I. C. Kwon and Y. H. Bae, *Journal of Controlled Release*, 2008, **129**, 228-236.
395. E. Jin, B. Zhang, X. Sun, Z. Zhou, X. Ma, Q. Sun, J. Tang, Y. Shen, E. Van Kirk, W. J. Murdoch and M. Radosz, *Journal of the American Chemical Society*, 2012, **135**, 933-940.
396. L. Zhu, P. Kate and V. P. Torchilin, *ACS Nano*, 2012, **6**, 3491-3498.
397. H. Mok, K. H. Bae, C.-H. Ahn and T. G. Park, *Langmuir*, 2008, **25**, 1645-1650.
398. T. J. Harris, G. von Maltzahn, M. E. Lord, J.-H. Park, A. Agrawal, D.-H. Min, M. J. Sailor and S. N. Bhatia, *Small*, 2008, **4**, 1307-1312.
399. T. Jiang, E. S. Olson, Q. T. Nguyen, M. Roy, P. A. Jennings and R. Y. Tsien, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, **101**, 17867-17872.
400. S. Huang, K. Shao, Y. Liu, Y. Kuang, J. Li, S. An, Y. Guo, H. Ma and C. Jiang, *ACS Nano*, 2013, **7**, 2860-2871.
401. C. Kim, Y. Lee, J. S. Kim, J. H. Jeong and T. G. Park, *Langmuir*, 2010, **26**, 14965-14969.
402. R. Kuai, W. M. Yuan, Y. Qin, H. L. Chen, J. Tang, M. Q. Yuan, Z. R. Zhang and Q. He, *Molecular Pharmaceutics*, 2010, **7**, 1816-1826.
403. R. Kuai, W. M. Yuan, W. Y. Li, Y. Qin, J. Tang, M. Q. Yuan, L. Fu, R. Ran, Z. R. Zhang and Q. He, *Molecular Pharmaceutics*, 2011, **8**, 2151-2161.

CHAPITRE 2

SYNTHESE ET AUTO-ASSEMBLAGE DE CHIMERES AMPHIPHILES TAT-*b*-PTMC



Mots clefs: chimères amphiphiles peptide-*b*-polymère, PTMC, peptide Tat, couplage chimio-sélectif thiol-maléimide, auto-assemblage, nanoparticules biofonctionnelles, micelles, internalisation cellulaire

Keywords: amphiphilic peptide-*b*-polymer chimeras, PTMC, Tat peptide, chemoselective thiol-maleimide ligation, self-assembly, biofunctional cell-penetrating micellar nanoparticles

Résumé: Ce chapitre détaille la synthèse et l'étude de l'auto-assemblage des chimères amphiphiles peptide-b-polymère étudiées dans le cadre de cette thèse. Celles-ci associent un bloc polymère hydrophobe biocompatible poly(triméthylène carbonate) (PTMC) de longueur variable et le peptide d'internalisation cellulaire Tat (YGRKKRRQRRR) dérivé de la protéine transactivatrice de transcription (TAT) du VIH. Deux voies de synthèse convergente ont été étudiées, l'une consistant à coupler le peptide et le bloc polymère, préalablement synthétisés, sur support solide par formation d'une liaison amide, l'autre basée sur leur conjugaison en solution par un couplage chimio-sélectif thiol-maléimide. Si l'efficacité du couplage de la première approche s'est avéré insuffisante, la seconde approche a permis de synthétiser, avec une bonne précision moléculaire, une série de conjugués Tat-b-PTMC de fractions massiques hydrophiles variables, finement caractérisés par spectrométrie de masse MALDI, spectroscopie de RMN (¹H et DOSY) et calorimétrie différentielle. Ces chimères amphiphiles s'auto-assemblent en solution par dissolution directe pour former des nanoparticules de morphologie micellaire, très stables et aux dimensions particulièrement régulières, dont les caractéristiques physico-chimiques ont été examinées en détails à l'aide de techniques complémentaires d'imagerie (AFM, TEM) et de diffusion (DLS, SANS). Il apparaît que la répulsion électrostatique entre les segments peptidiques fortement cationiques impose une densité surfacique de peptide limitée et relativement constante, ainsi qu'une courbure interfaciale élevée prévenant la formation de morphologies à base de phases lamellaires. L'augmentation du degré de polymérisation du bloc PTMC, quant à elle, conduit à un accroissement sensible et graduel du diamètre des particules, allant de 22 nm à 40 nm. La taille des micelles peut donc être précisément ajustée sans pour autant faire varier leurs propriétés de surface.

Le travail présenté dans ce chapitre a fait l'objet de deux publications. ^{1, 2}

1. C. Drappier, A.-L. Wirotius, K. Bathany, E. Ibarboure, O. Condassamy, E. Garanger and S. Lecommandoux, *Polymer Chemistry*, 2013, **4**, 2011-2018, 2. C. Drappier, H. Oliveira, O. Sandre, E. Ibarboure, S. Combet, E. Garanger and S. Lecommandoux, *Faraday Discussions*, 2013, **166**, DOI: 10.1039/C1033FD00098B.

CHAPTER 2

SYNTHESIS AND SELF-ASSEMBLY OF AMPHIPHILIC TAT-*b*-PTMC CHIMERAS

INTRODUCTION	129
I. CHEMICAL SYNTHESIS OF AMPHIPHILIC TAT- <i>b</i> -PTMC CHIMERAS	130
I.1. SYNTHESIS OF TAT PEPTIDES.....	131
I.2. RING OPENING POLYMERIZATION OF TMC.....	132
I.2.1. <i>First attempts towards an amino-functionalized PTMC</i>	133
I.2.2. <i>Synthesis of hydroxyl terminated PTMC blocks</i>	133
I.3. COUPLING OF PTMC AND TAT SEGMENTS BY AMIDE BOND FORMATION ON SOLID PHASE	137
I.4. COUPLING OF PTMC AND TAT SEGMENTS BY THIOL-MALEIMIDE LIGATION IN SOLUTION	139
I.4.1. <i>Maleimide chain end-functionnalization of PTMC block</i>	139
I.4.2. <i>Conjugation in solution and characterization of Tat-<i>b</i>-PTMC chimeras</i>	140
II. PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF NANOPARTICLES FROM TAT- <i>b</i> -PTMC CHIMERAS	145
II.1. LIGHT SCATTERING AND MICROSCOPY ANALYSES.....	146
II.2. SMALL ANGLE NEUTRON SCATTERING ANALYSES	148
CONCLUSION	151
EXPERIMENTAL SECTION	152
SUPPORTING INFORMATION	159
REFERENCES	166

INTRODUCTION

For the past two decades, amphiphilic block copolymers have been extensively used to generate by spontaneous self-assembly complex and well-defined structures at the micro- and nanoscales.^{3, 4} In particular, specifically engineered amphiphilic block copolymers have raised increasing interest for the fields of nanotechnology and drug delivery systems.^{5, 6} Among these, polypeptides have emerged as polymeric segments with great potential regarding their biomimeticism, biocompatibility, biodegradability, secondary structures and self-assembly properties in aqueous solution.⁷ However, the vesicular or micellar morphologies obtained from amphiphilic block copolypeptides still possess limited biological interactivity since they lack the complex functional information encoded in the primary sequence of natural peptides and proteins. This prompted the development at the same time of “hybrid” polymer-peptide and polymer-protein amphiphiles encoding both self-assembly and biological properties at the molecular level.⁸⁻¹⁸

In preparing such chimeric amphiphiles, presenting two chemically different blocks, one being a synthetic polymer, the other a natural amino acid-based oligo-/polymer, chemical bioconjugation methods initially developed in a different context found excellent opportunities to apply. Indeed, the goal of this approach is significantly different from the one aroused in the 90's from the clinical pharmacist community who intended to conjugate a water-soluble polymer, mostly poly(ethylene glycol) (PEG), to a therapeutic (bio)molecule (e.g. drug, peptide, protein, antibody) to improve its pharmacokinetic properties and simultaneously reduce its eventual immunogenicity and toxicity.¹⁹ However, the so-called “PEGylation process” has widely contributed to the development of bioconjugation reactions and chemoselective ligation methods combining high coupling yields with water-friendly conditions, so as to modify site-specifically therapeutic agents without affecting their bioactivity, in the same extent than in amphiphilic polymer-peptide/protein conjugates.

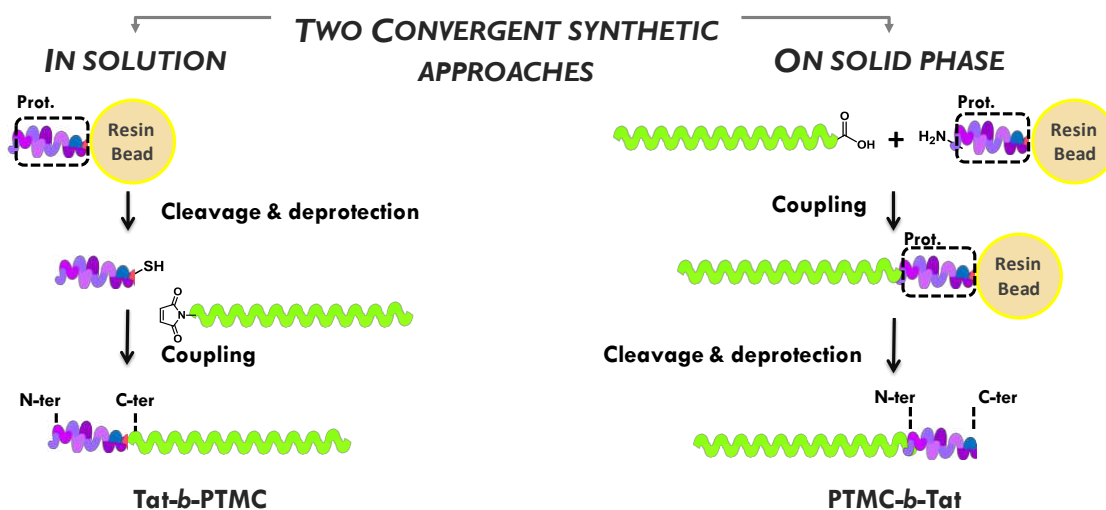
To contribute to a long-term goal of our team, namely developing polymer-based self-assembled nanoparticles capable of interacting and responding specifically to biological settings,²⁰⁻²³ we have chosen to synthesize and study amphiphilic chimeras, featuring a hydrophobic biodegradable polymer together with a natural cell-penetrating peptide, as an alternative to a more primitive polypeptide segment, in order to access nano-assemblies specifically dedicated to cellular internalization. Poly(trimethylene carbonate) (PTMC) was chosen as a biocompatible low- T_g polymer segment for its compelling self-assembly properties.^{24, 25} The Tat₄₇₋₅₇ sequence from HIV-1 transactivator of transcription (TAT) protein was selected as a highly hydrophilic peptide with well-established cell penetrating properties.²⁶⁻³⁰ This peptide has already been successfully used for the intracellular delivery of nanocarriers.³¹⁻³⁵ However, in comparison with strategies where the peptide ligand is grafted onto the surface of pre-formed nanoparticles, the preparation of molecular chimeras fully

equipped with self-assembly and biological properties present significant benefits such as discussed earlier.³⁶ In previous similar works, cell-penetrating nanoparticles have been successfully obtained when Tat peptide was mimicked by polyarginines,³⁷⁻³⁹ or incorporated at the hydrophilic block chain end of amphiphilic polymer diblocks.⁴⁰⁻⁴⁴ However, in the current study, we intended to use Tat peptide as the full hydrophilic block of the chimera similarly to previously reported works by Lee *et al.* on Pro₁₀-*b*-Tat rod-coil molecules, by Lutz *et al.* on PS-*b*-Tat bioconjugates, or by Nam *et al.* on PLGA-*b*-Tat diblocks.⁴⁵

Regarding the challenging synthesis of such amphiphiles, requiring various skills from distinct chemistry fields, we have endeavoured to do our best to characterize our Tat-*b*-PTMC chimeras thanks to different complementary techniques. Our work also shows that a precise control and knowledge of the chemical structure is of prime importance when attempting to establish structure-activity relationships, particularly when correlating molecular architectures with self-assembly properties.

I. CHEMICAL SYNTHESIS OF AMPHIPHILIC TAT-*b*-PTMC CHIMERAS

In order to access a series of amphiphilic Tat-*b*-PTMC chimeras with different polymer block lengths, we explored two convergent synthetic approaches where the peptide and the polymer were synthesized separately and subsequently conjugated either on solid support *via* an amide bond formation or in solution *via* a chemoselective thiol-maleimide coupling (Scheme 1).



Scheme 1- Two convergent synthetic routes investigated to obtain our amphiphilic chimeras.

However, only the strategy in solution proved in our hands to fulfil the efficiency level required for the synthesis of significant amounts of materials. In the latter, the Michael-type thiol-maleimide

ligation⁴⁶ was chosen as an efficient, convenient and suitable reaction considering the reactive functional groups – (guanidines, primary amines, amide, phenol) presented on the amino acid side-chains of the Tat₄₇₋₅₇ peptide sequence, formerly YGRKKRRQRRR.

I.1. SYNTHESIS OF TAT PEPTIDES

Two peptides containing the Tat₄₇₋₅₇ peptide sequence (YGRKKRRQRRR) were synthesized: H-YGRKKRRQRRR-βAC-NH₂ and H-βAβA-YGRKKRRQRRR-NH₂. On the former, a thiol function was introduced as an additional cysteine residue at the C-terminal end of Tat₄₇₋₅₇ and slightly separated from the active sequence thanks to a β-alanine linker. On the latter, a double β-alanine linker spaced out the N-terminal end of the peptide, supposed to react with the PTMC segment, from the functional motif. Both sequences present a carboxamide C-terminal end, uncharged and therefore poorly reactive in physiological conditions as compared with a carboxylic acid C-terminal end.

The peptides were prepared by traditional Fmoc/*t*-Bu solid phase peptide synthesis using an automated microwave-assisted synthesizer. Interacting directly with the molecules (solvent, reagents, catalysts), microwave irradiation provides a powerful and high-speed in-core volumetric temperature increase of the reaction medium, that dramatically enhance conversion rates of thermally induced chemical transformation as compared with traditional thermal heating.⁴⁷ This technology allowed us to greatly improve efficiency (overall yield multiplied by 2) and reaction times (5-10 min instead of 1-2 hrs) of our peptides synthesis. Systematic acetylations of non-reacted amines were carried out after every coupling, so that to prevent any deleted sequences from growing and presenting a functional N-terminal primary amine.

Once assembled on resin beads, the H-YGRKKRRQRRR-βAC-NH₂ sequence was cleaved and deprotected under acidic conditions and purified by preparative reverse phase HPLC. As the sequence presents several bulky protected amino acids, especially six arginine residues, leading to low-yield coupling steps, the overall yield, 63% relative to the resin loading, was rather satisfying in comparison with the literature.⁴⁸ Peptide purity and molar mass were characterized respectively by analytic reverse phase HPLC and MALDI mass spectrometry (Figure 1).

The H-βAβA-YGRKKRRQRRR-NH₂ sequence was conjugated on solid support with a PTMC segment presenting a terminal carboxylic acid function (*Vide infra* § I.3). The resulting chimera was then cleaved and deprotected in acidic conditions and purified by dialysis.

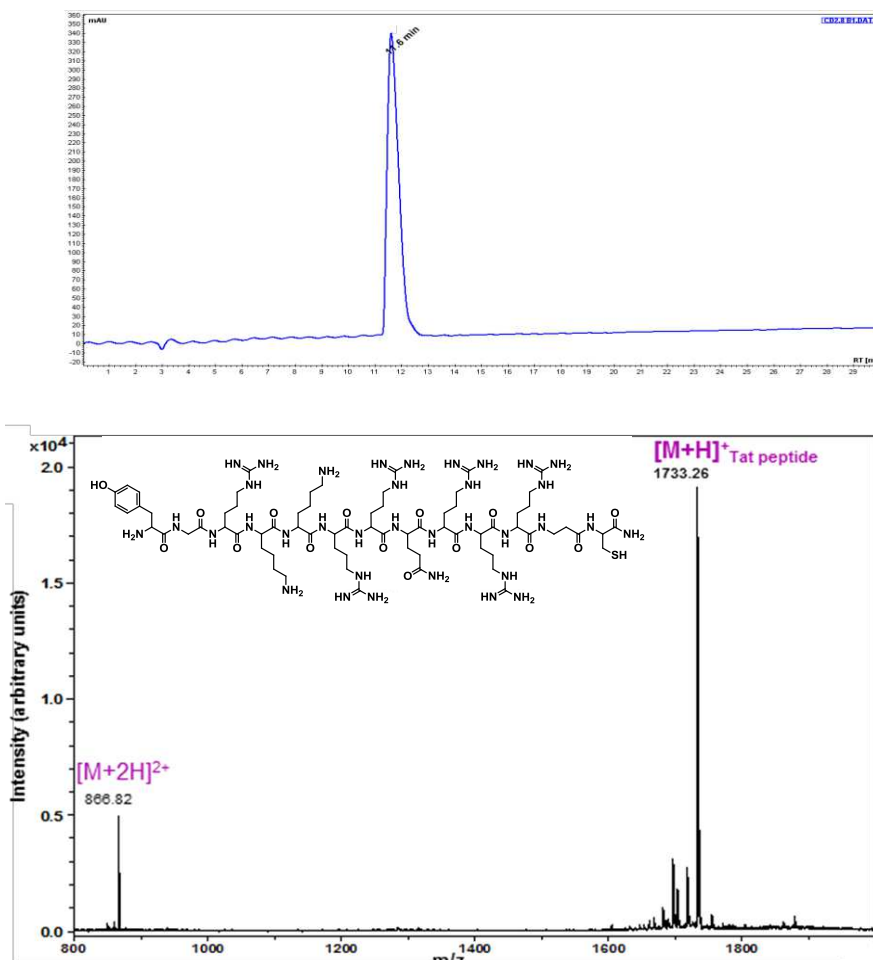
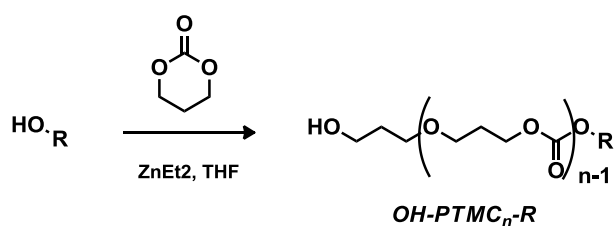


Figure 1 – HPLC chromatogram and MALDI-TOF spectrum of Tat peptide x (theoretical monocharged peak $[M+H]^+ = 1733.02$ Da)

I.2. RING OPENING POLYMERIZATION OF TMC

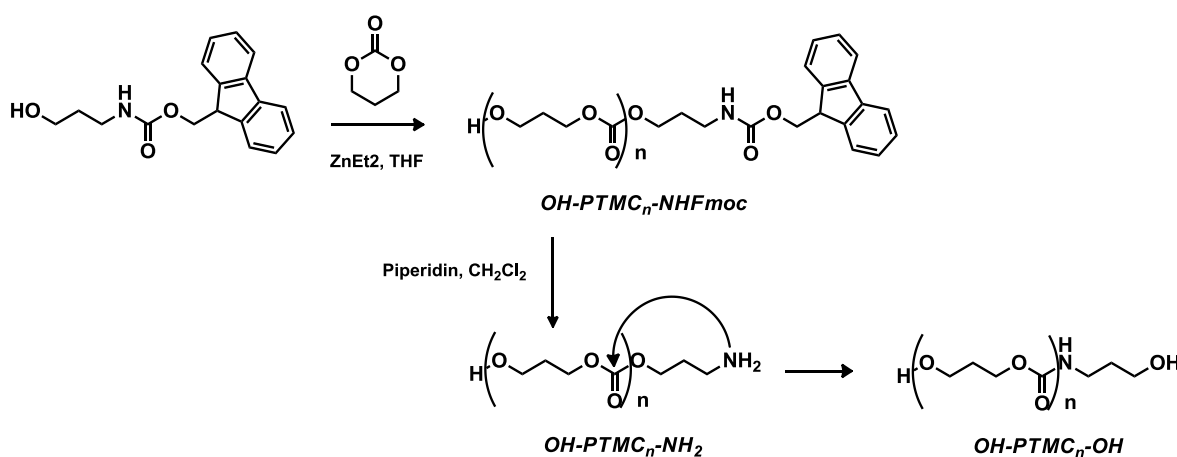
PTMC segments were prepared by ring opening polymerization (ROP) of trimethylene carbonate (TMC) carried out in THF, initiated by an hydroxyl function, and catalyzed by diethyl zinc. Already used in previous works, this living polymerization procedure must be achieved on strictly anhydrous conditions (Scheme 2).^{49, 14}



Scheme 2 – Ring opening polymerization (ROP) of TMC.

I.2.1. FIRST ATTEMPTS TOWARDS AN AMINO-FUNCTIONALIZED PTMC

As primary amines are reactive nucleophilic functions widely used in bioconjugation chemistry, we initially considered to synthesize amino-functionalized PTMC blocks. Polymerization of TMC was thus initiated with the 3-(Fmoc-amino)-1-propanol, a reagent containing simultaneously a primary alcohol and a Fmoc-protected primary amine (Scheme 3). The resulting OH-PTMC-NHFmoc was then deprotected with a piperidin solution 20%v/v to release the primary amine function at one of its chain end (OH-PTMC-NH₂). However, the basic conditions imposed by this deprotection step simultaneously promoted the intramolecular nucleophilic attack of the primary amine on the adjacent carbonate. This side-reaction lead to the formation of a urethane bond and a hydroxyl terminal function instead of a primary amine, as indicated by the typical ¹H NMR shifts of the CH₂ protons in α positions of the urethane and hydroxyl functions at respectively 3.33 ppm and 3.73 ppm.

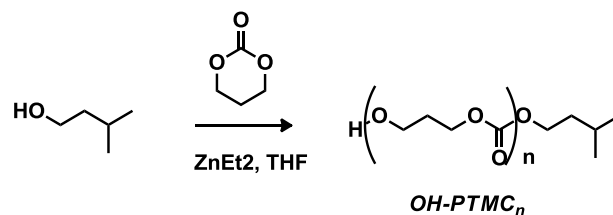


Scheme 3 - Synthesis of amino-functionalized PTMC and undesired side-reaction associated.

The loss of the primary amine group was also confirmed by colorimetric titration with HBr in acetic acid. We therefore considered a second strategy to avoid the presence of a primary amine next to the terminal carbonate moiety of the polymer.

I.2.2. SYNTHESIS OF HYDROXYL TERMINATED PTMC BLOCKS

To access chemically fragile polycarbonates with high molecular precision and quantitatively functionalized chain ends, we opted for a two-step synthetic route, involving the polymerization of TMC towards a hydroxyl terminated PTMC (OH-PTMC), followed by its quantitative modification with a highly reactive isocyanate moiety to simultaneously introduce the maleimide functional group required for peptide conjugation. To this end, the ROP of TMC was initiated with 3-methyl-1-butanol, an aliphatic non-functional alcohol (Scheme 4).



Scheme 4 - Synthesis of hydroxyl terminated PTMC.

ROP experiments were initially conducted at room temperature until complete conversion. Surprisingly, SEC chromatograms displayed two molecular weight distributions, with the average molar mass of the largest being approximately twice the one of the smaller, according to the calibration with polystyrene standards (Figure 2). Kinetic studies revealed that the population at highest molecular weight was mostly formed when reaching high conversion rate, since almost not observed at low conversion (e.g. 27% as shown on figure 2). As the diethylzinc catalyst allows the growing of two chains per metallic center, we suspected a coupling reaction to occur between the extremities of two chains coordinated by the same zinc atom (Figure 2).

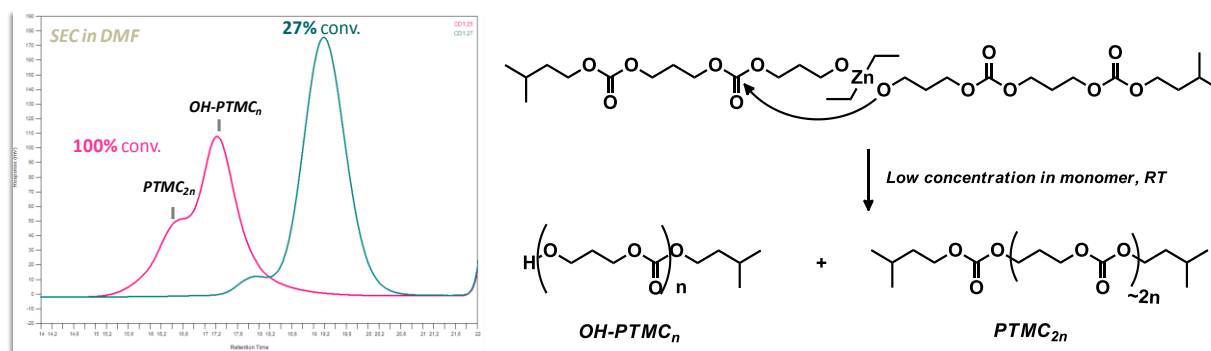


Figure 2 - SEC chromatograms and proposed mechanism for the coupling side-reaction occurring during the ROP of TMC catalyzed by diethylzinc at low monomer concentration.

In unfavourable competition with the monomer insertion, this side-reaction can significantly happen only when monomer concentration is sufficiently low, namely at the end of the polymerization. Such a mechanism would indeed explain the almost doubling of molecular weight observed and is fully consistent with the fact that this side reaction does not occur with other catalysts such as the DBU (1,8-diazabicycloundec-7-ene, described in chapter 3). This hypothesis was further supported by mass spectrometry analyses (Figure 3), showing two mass populations corresponding to the molecular weights of the expected OH-PTMC_n block and of the PTMC_{2n} segment formed by coupling.

The decrease of the signals of the CH₂ protons in α and β positions of the disappearing hydroxyl function on the ¹H NMR spectra were also in good agreement with the proposed mechanism. As usually observed for thermodynamically favored transesterification-type side-reactions, a lowering of the reaction temperature was found to significantly reduce this phenomenon. Thus, carrying the ROP

at 17°C instead of room temperature and quenching the reaction before complete monomer consumption, namely around 95% conversion, allowed us to significantly reduce this side-reaction.

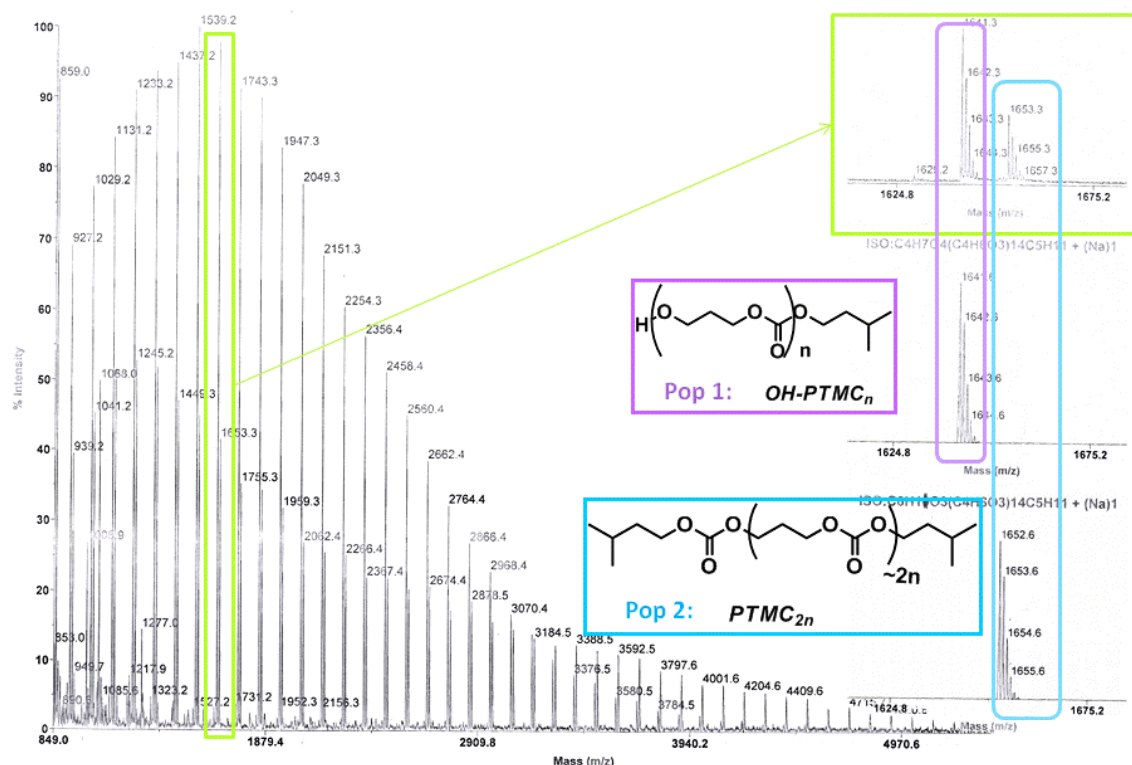


Figure 3 - MALDI-TOF spectrum of products from uncontrolled ROP of TMC.

Four alcohol-terminated PTMC segments with increasing molecular weights were thus synthesized this way (Table I). Their degree of polymerisation (DP_n), ranging from 22 to 66, and consequently their M_n, were easily calculated from ¹H NMR spectra thanks to the integration of the well-isolated signal of terminal methyl groups from the initiator (Figure S1). SEC chromatograms revealed narrow molecular weight distributions and MALDI mass spectra showed a unique population, attesting very little coupling or decarboxylation side-reactions (Figures 4 and 5).

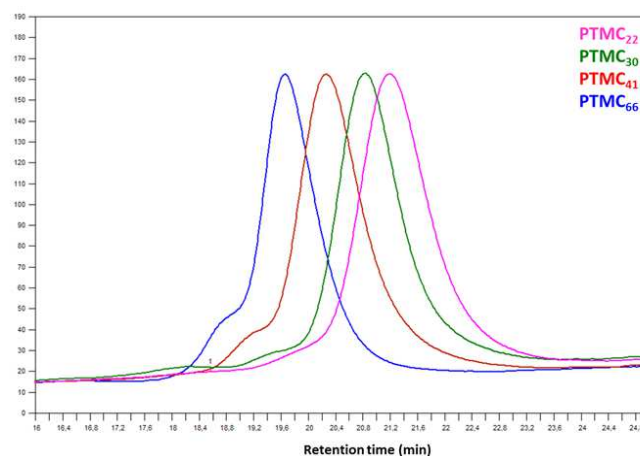


Figure 4 - SEC chromatograms of PTMC homopolymers in THF with RI detection.

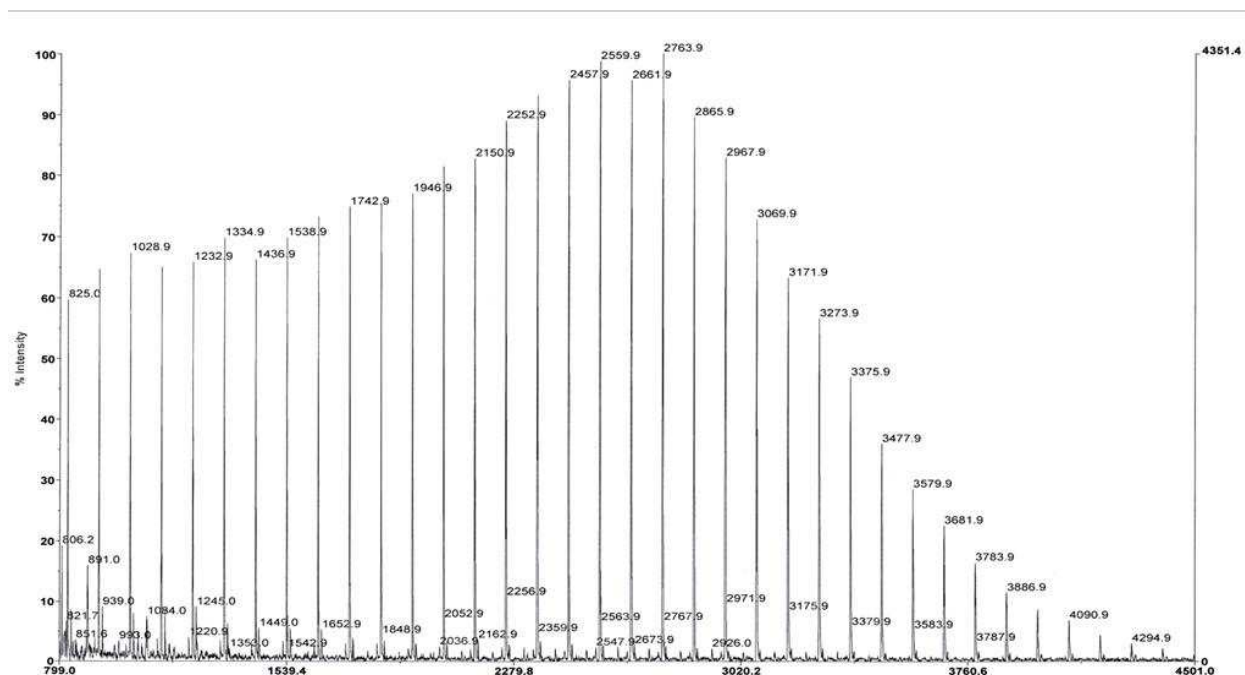


Figure 5 - MALDI-TOF spectrum of OH-PTMC₂₂.

The four PTMC homopolymers DSC thermograms presents a glass transition around -25°C and an endothermic peak traducing a semi-crystalline character (Figure S5). The crystallization of PTMC is a very slow process that can take days to months to complete, especially when the molecular weight is getting high. For that reason, the exothermic recrystallization of chains was not observed when cooling down the sample during DSC measurement and the melting could only be detected during the first heating slope. Melting temperatures increased slightly with increasing molar mass, from 23°C for PTMC₂₂ to 27°C for PTMC₆₆.

Entry	DP _n ^a	M _n ^a /g.mol ⁻¹	PD ^b	T _g ^c /°C	T _m ^c /°C
PTMC ₂₂	22	2332	1.08	-26	23
PTMC ₃₀	30	3148	1.06	-26	25
PTMC ₄₁	41	4270	1.1	-24	26
PTMC ₆₆	66	6820	1.08	-24	27

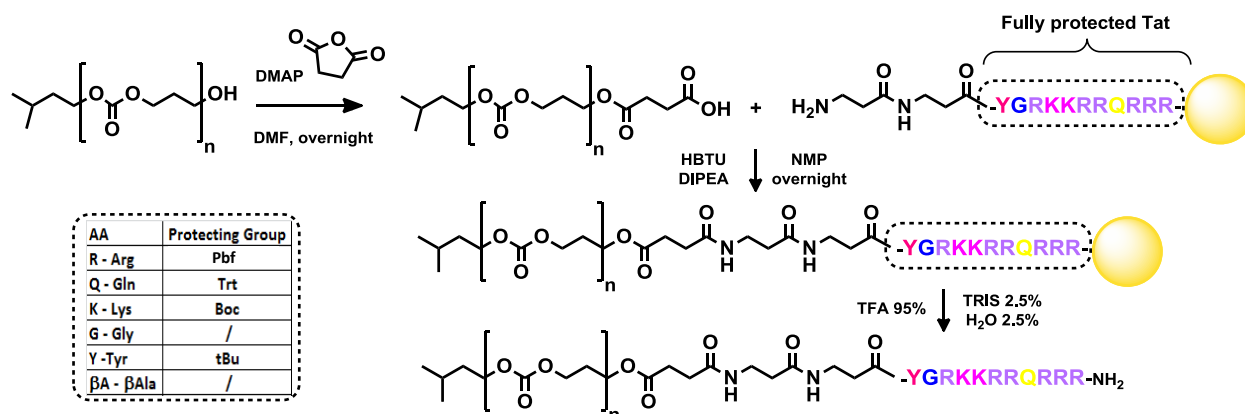
^aCalculated from polymer ¹H NMR spectrum. ^bDetermined by SEC in THF. ^cDetermined by DSC.

Table I- Characteristics of the four OH-PTMC segments synthesized.

To conclude, after a first and unsuccessful attempt to introduce a primary amine function at the chain end of PTMC blocks *via* an amino-protected initiator, we decided to make use of the hydroxyl terminal function of PTMC and chose an aliphatic initiator. We then evidenced a coupling side-reaction occurring at the end of the polymerization that can be avoided by a controlling temperature and conversion parameters.

I.3. COUPLING OF PTMC AND TAT SEGMENTS BY AMIDE BOND FORMATION ON SOLID PHASE

One of the convergent synthetic route investigated to access PTMC-*b*-Tat chimeras involved the coupling of carboxylic acid functionalized PTMC with the fully protected Tat peptide on the solid support used for its solid phase synthesis. The polymer segment was thus introduced at the *N*-terminal end of the peptide by amide bond formation (Scheme 6). This approach enables to engage an excess of PTMC as the “cheapest” reactant so as to optimize the coupling efficiency, the latter being effectively removed after coupling by simple filtration and extensive washing of the resin beads. More importantly, since unreacted peptides would be easily eliminated by dialysis of the self-assembled chimeras, purification of the peptide by preparative HPLC could eventually be avoided. This last point would be a significant advantage since this tedious, time and solvent-consuming purification step represents a serious drawback for scale-up.



Scheme 5 – Synthesis of PTMC-*b*-Tat chimeras via the formation of an amide bond on solid support.

For this specific purpose, a carboxylic acid function was introduced at the chain end of OH-PTMC segments *via* acetylation with succinic anhydride activated by DMAP. A large, 20-fold molar excess of succinic anhydride was used to ensure quantitative conversion, as evidenced by the appearance of the signal of the protons CH₂ in α position of the acyl groups and the disappearance of those related to the hydroxyl chain end on the ¹H NMR spectrum (Figure S2).

We then endeavoured to form an amide bond between the resulting COOH-PTMC block and the *N*-terminal primary amine function of the solid-supported and protected Tat peptide βAβA-YGRKKRRQRRR. As we feared diffusion and steric hindrance limitations, the polymer segment with the lowest degree of polymerization (DP_n=22) was first used and 4- and 5- fold molar excesses of polymer and activating agent HBTU, respectively, were used to ensure optimal coupling conditions. Despite these precautions, the ¹H NMR spectrum of the crude product, obtained after acidic cleavage of the solid support and deprotection of the peptide, revealed a very low coupling

conversion (11%), as calculated from the ratio of polymer signals over aromatic protons from tyrosine residue of peptide. Additional attempts were carried out to improve this result, with either a larger excess of COOH-PTMC₂₂ segment or using μ -wave activation, with no better success. We suspect that the high molecular weight of the polymer together with the bulkiness of some residues and protecting groups of the peptide to seriously limit the coupling efficiency.

To confirm this hypothesis, we compared the conversion rate obtained for the coupling of COOH-PTMC₂₂ block with dipeptide sequences β AX, where X is a variable residue, in the same conditions than those used for the full Tat sequence (Table 2). While a quantitative conversion is reached when X is a non-protected β -alanine (β A) or a glutamine protected with a trityl group (Q), its substitution with lysine and arginine amino acids, bearing respectively *tert*-butyloxycarbonyl (Boc) and Pbf protective moieties, strongly affects the coupling rate, respectively measured as 62% and 47%. Since the Tat peptide sequence presents 6 arginines and 2 lysines in a highly condensed manner, these two last residues then appeared to be most likely responsible for its poor reactivity towards the COOH-PTMC segment.

Entry	Peptidic sequence	Coupling conversion ^a
PTMC ₂₂ - β AA	H- β A β A-NH ₂	Quant.
PTMC ₂₂ - β AQ	H- β AQ(Trt)-NH ₂	Quant.
PTMC ₂₂ - β AK	H- β AK(Boc)-NH ₂	62%
PTMC ₂₂ - β AR	H- β AR(Pbf)-NH ₂	47%
PTMC ₂₂ - β A β A-Tat	H- β A β A-Y(tBu)GR(Pbf)K(Boc)K(Boc)R(Pbf) R(Pbf)QR(Pbf)R(Pbf)R(Pbf)-NH ₂	11%

^aCalculated from polymer ¹H NMR spectrum.

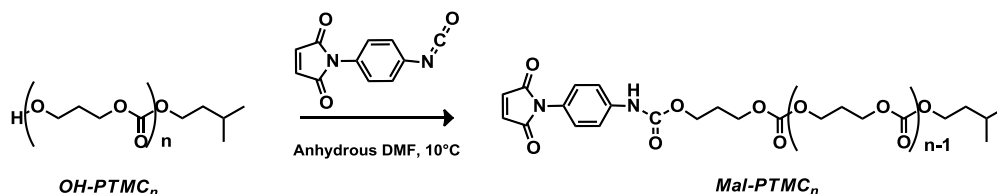
Table 2 – Coupling rate of COOH-PTMC₂₂ with different solid supported peptide sequences.

As the peptide synthesis was from far the major limiting factor of our syntheses in terms of cost and scale, we could not afford to lose 90% unreacted peptide at this step. We therefore left out this synthetic route to focus on the second convergent synthetic approach, based on the chemoselective thiol-maleimide ligation in solution of PTMC segments with the cleaved, deprotected and purified peptide.

I.4. COUPLING OF PTMC AND TAT SEGMENTS BY THIOL-MALEIMIDE LIGATION IN SOLUTION

I.4.1. MALEIMIDE CHAIN END-FUNCTIONALIZATION OF PTMC BLOCK

Introduction of a maleimide group onto the OH-PTMC chain end was achieved by using a heterobifunctional crosslinker, namely *N*-(*p*-maleimidophenyl)isocyanate (PMPI), presenting a maleimide group and a highly reactive isocyanate moiety (Scheme 6).



Scheme 6 – Synthesis of maleimide-functionalized PTMC segments (Mal-PTMC).

In anhydrous DMF, using 1.6 molar equivalent of PMPI relative to the polymer, a urethane bond was formed quantitatively, as observed by the total disappearance of the signals of the protons in α position of the hydroxyl function and by the appearance of the aromatic protons from the cross-linker in the ^1H NMR spectrum (Figure 6 and 7). This was observed visually by the yellow colour of the reaction mixture, correlated with a high UV absorbance, and confirmed by mass spectrometry (Figure S4).

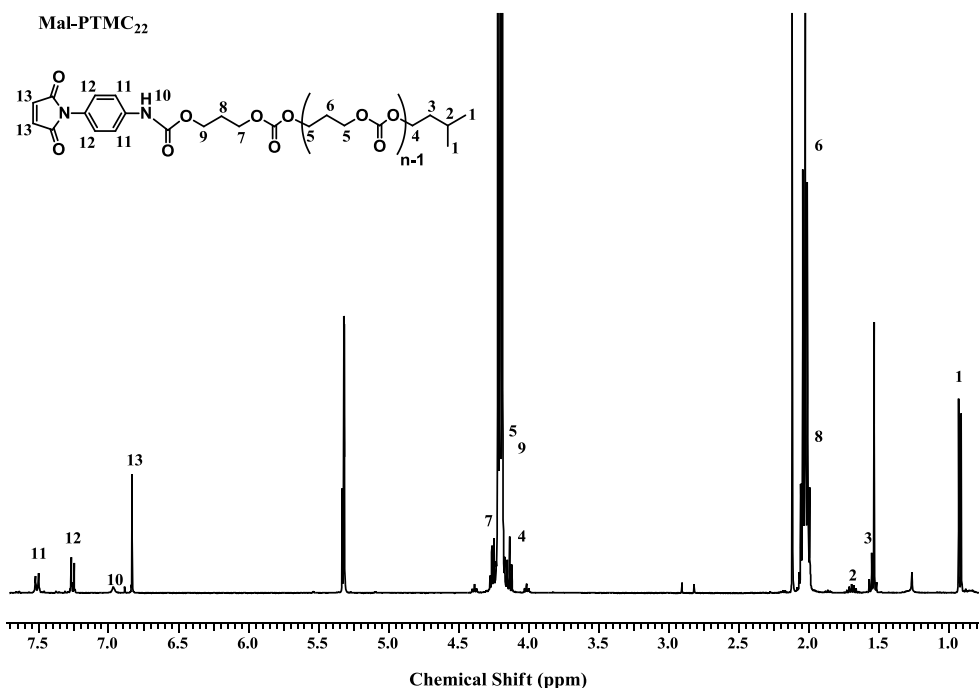
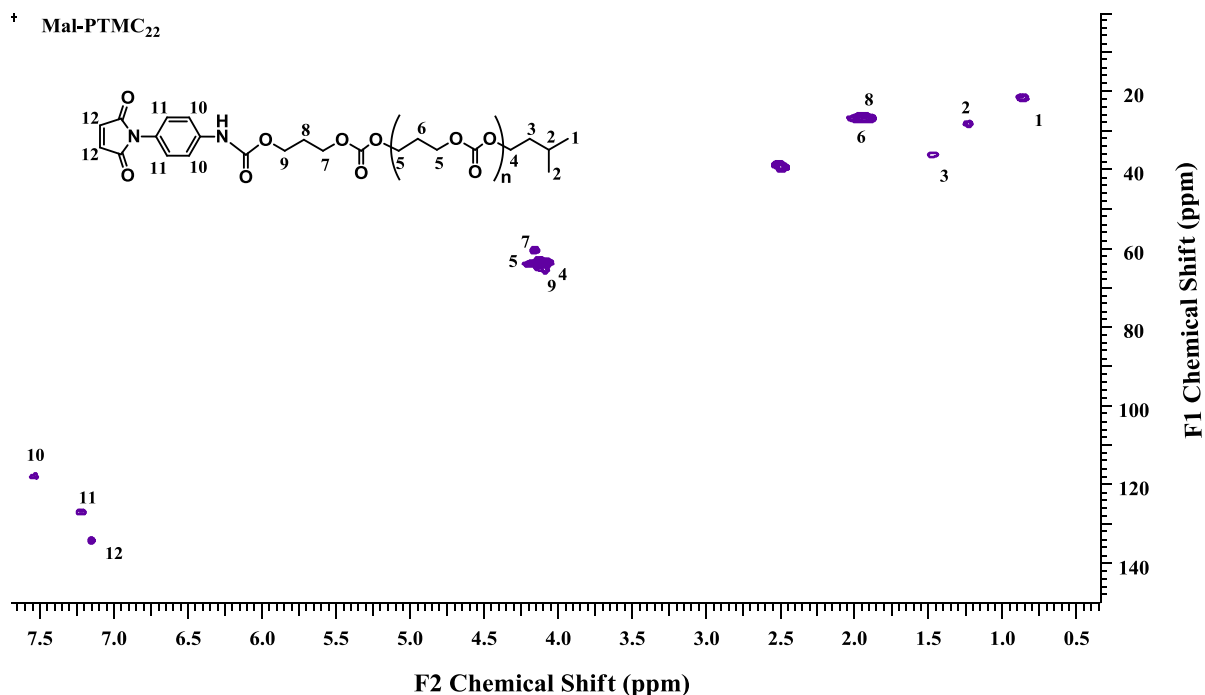
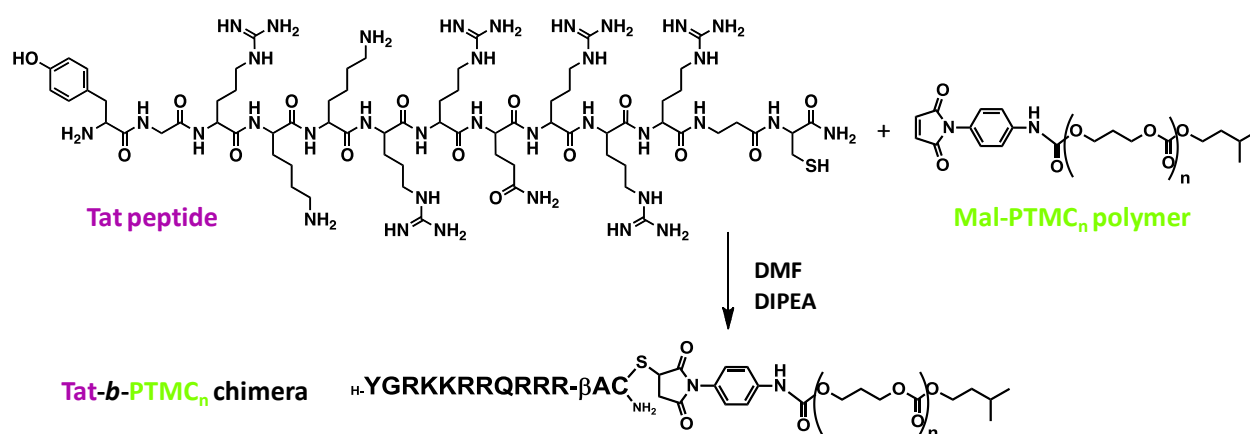


Figure 6 - ^1H NMR spectrum of Mal-PTMC₂₂ in CD_2Cl_2 .



I.4.2. CONJUGATION IN SOLUTION AND CHARACTERIZATION OF TAT-B-PTMC CHIMERAS

The conjugation of the peptide with the different PTMC segments was carried out in DMF and activated by DIPEA (Scheme 7).



Scheme 7 - Synthesis of Tat-*b*-PTMC chimera by chemoselective thiol-maleimide ligation.

A slight excess of peptide (1.5 equiv. relative to the polymer) was used to enhance reactivity and compensate the competitive oxidation of cysteine residus thiol groups into a disulfide bond, leading to dipeptide Tat-S-S-Tat formation. While separating an excess of polymer from the chimeras would have been highly challenging, the excess of peptide was easily removed from the crude product by

dispersion and extensive dialysis in ultrapure water. As expected, the reaction proceeded quantitatively since no trace of maleimide signal on the ^1H and HSQC NMR spectra of the different products was found (Figures 8 and 9).

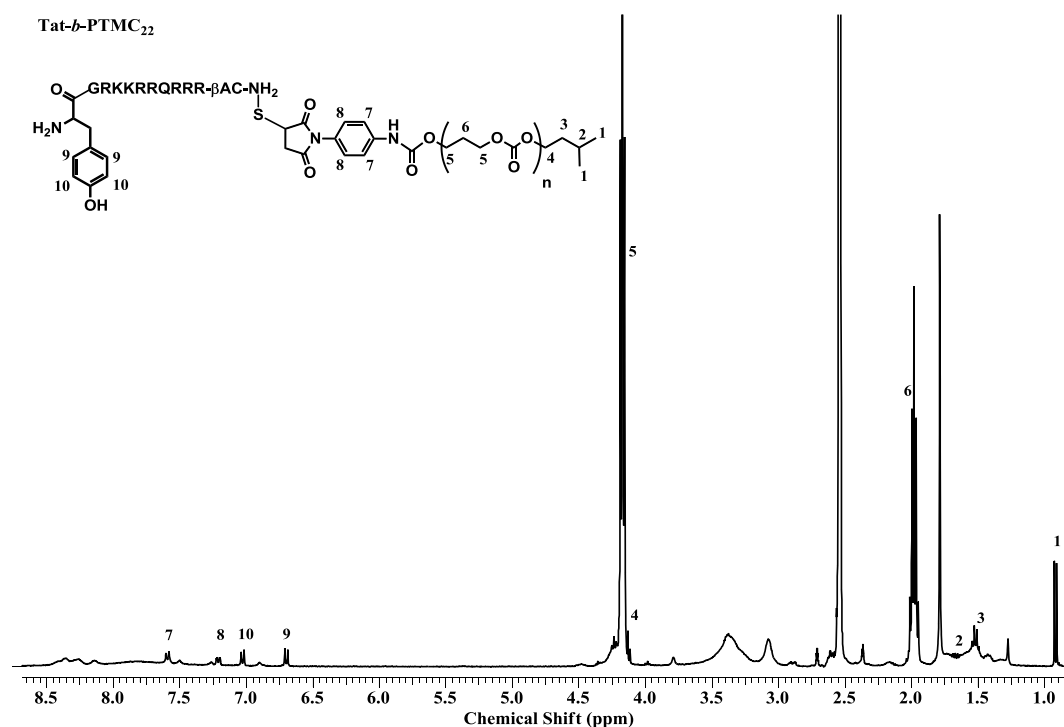


Figure 8 - ^1H NMR spectrum of Tat-*b*-PTMC₂₂ in DMSO.

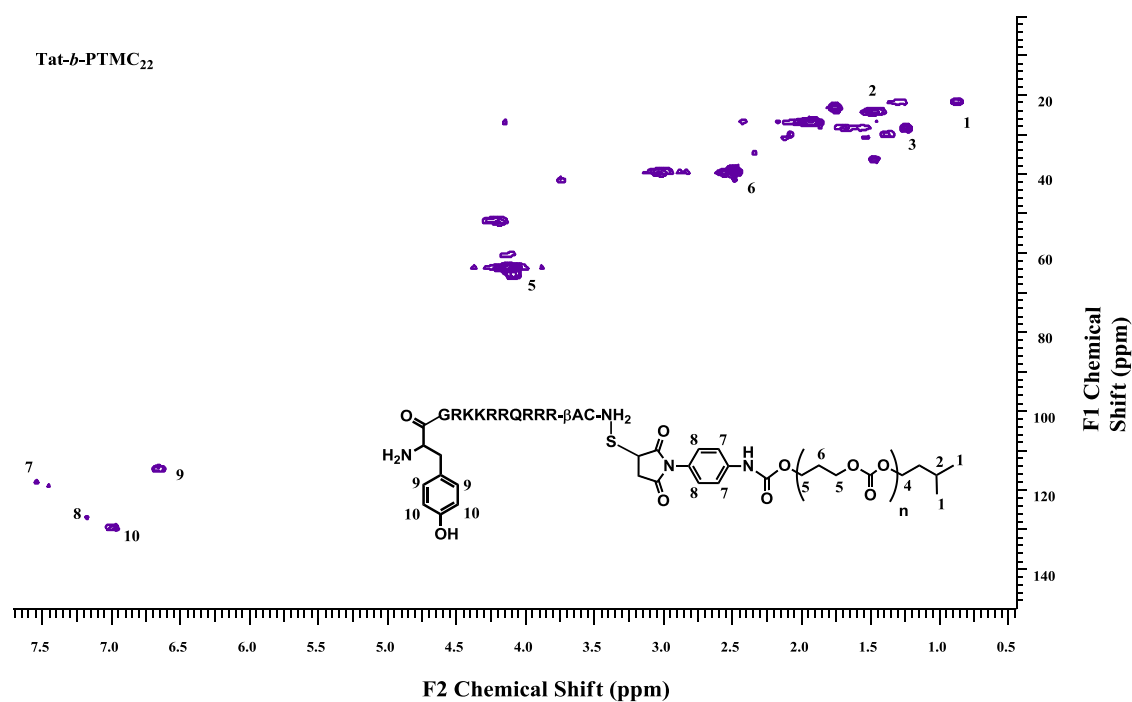


Figure 9 - HSQC NMR spectrum of Tat-*b*-PTMC₂₂ in DMSO

MALDI mass analyses revealed however that the imido cycle as well as carbonate groups of the polymer chain were hydrolyzed during this step, while unaffected when treating Mal-PTMC alone in the same conditions (Figure 10, scheme 8).

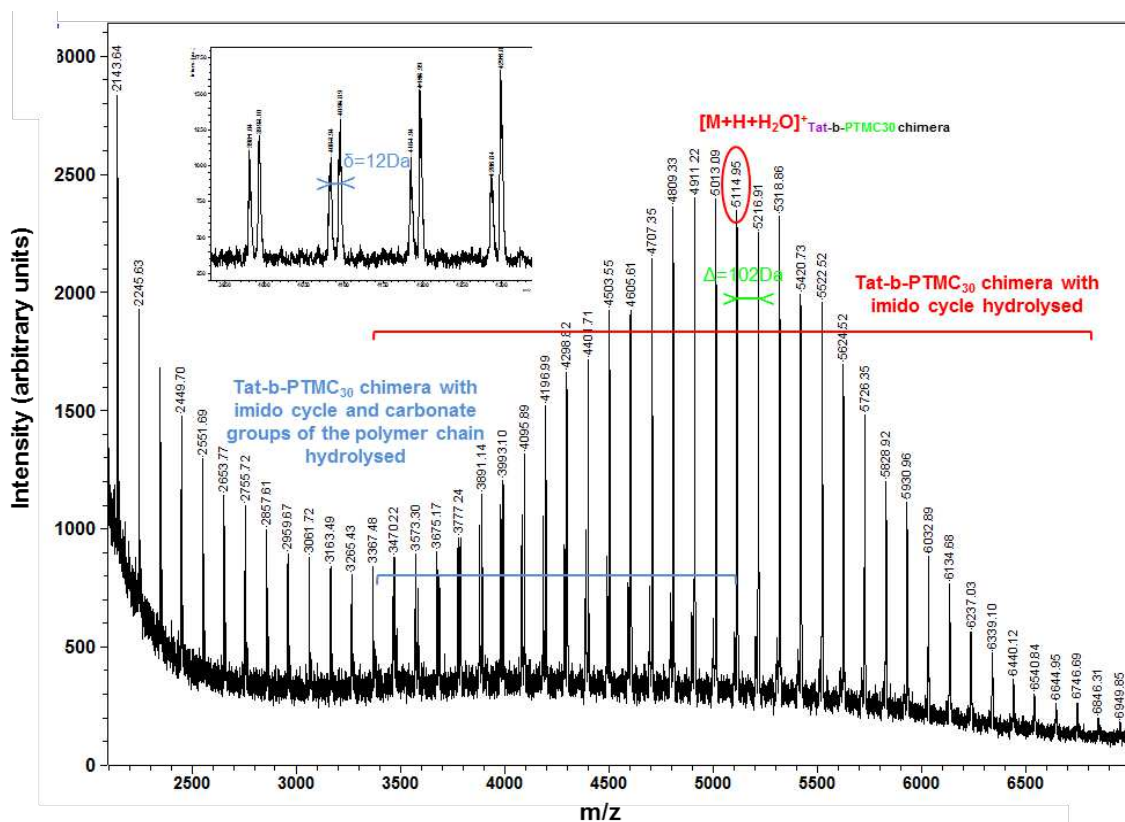
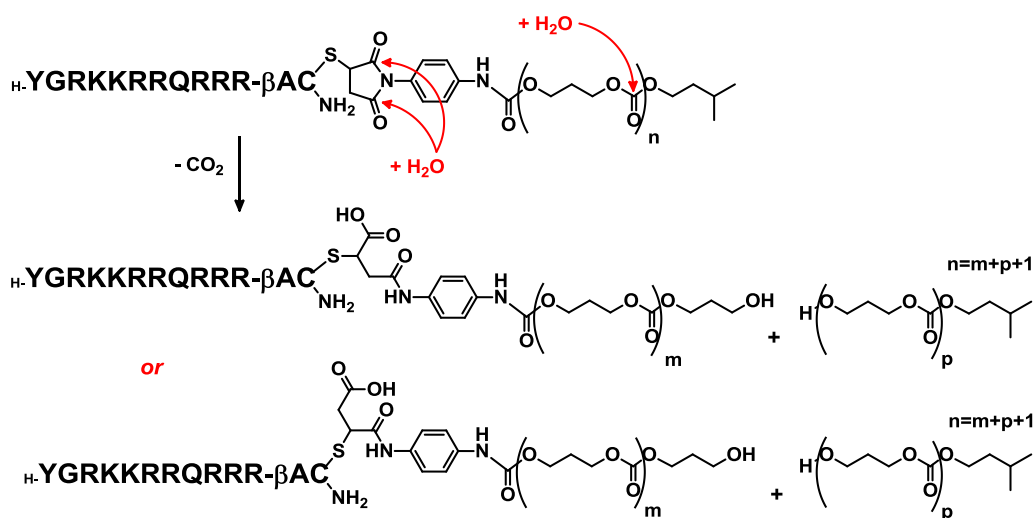


Figure 10 - MALDI-TOF spectrum of hydrolysed Tat-*b*-PTMC₃₀ chimera (theoretical monocharged peak $[M+H+H_2O]^+=5114.11$ Da).



Scheme 8 – Hydrolytic degradation of Tat-*b*-PTMC chimeras when dialysed in ultrapure water.

We suspected a template catalytic effect of the primary amine or guanidine functions of the peptide to be responsible for that phenomenon, favoured by basic conditions resulting from traces of DIPEA. To further address this point, PTMC- β AX (X=Q, K or R), previously synthesized for other purposes (*vide supra* § 1.3), were first solubilised in DMF, either with or without DIPEA, and then dispersed in ultrapure water, where they were left 7 days under stirring before ^1H NMR spectroscopy analyses. In the absence of DIPEA, the pH of the dispersions was found to be around 4 and no significant hydrolysis was observed. The acidic pH originated from the substantial residual amount of TFA from previous cleavage step. With 1.5 equivalent of DIPEA, the pH was found around 5 for all 3 dispersions. One could expect that the presence of DIPEA should have increased the pH in a much more extent. We actually suspect that, as a non miscible with water, this basic compound is retained in the hydrophobic microphase of micellar dispersions. The pH values measured are far below the pKa of primary amines and guanidines functions but, surprisingly, around 30% chains of PTMC- β AQ and PTMC- β AR underwent a hydrolytic truncation, either at one of their carbonate group or at the ester bond resulting from the acetylation of OH-PTMC (Figure S3). This partial hydrolysis, detected by the appearance of CH_2 protons in α and β position of the generated hydroxyl groups, was most probably enhanced by traces of basic DIPEA confined in the polymer micellar cores. The ^1H NMR spectrum of PTMC- β AK conjugate revealed even more severe degradation. The different NMR shifts observed can be explained by an intermolecular *N,N*-rearrangement, accompanied with the almost complete hydrolysis of the ester bond linking the PTMC with the dipeptide (Figure S3). The primary amine function on the lateral chain of the lysine residue is most probably responsible for these reactions. This result suggests that the hydrolytic degradation of Tat-*b*-PTMC chimeras during dialysis indeed occurred *via* a catalytic effect of the basic primary amine functions of the peptide, afforded by a local pH increase from remaining traces of basic DIPEA. Conducting the dispersion and the dialysis of the chimeras with a pH 5 ammonium acetate buffer allowed these side-reactions to be completely avoided, as it can be attested by MALDI mass spectrometry analysis (Figure 12).

Characterization of bare Tat-*b*-PTMC chimeras proved challenging due to the different chemical nature and character of the two blocks, most probably explaining why this aspect was sometimes eluded in previously reported similar work.⁴³ No solvent except DMSO was found to perfectly solubilize the amphiphiles, preventing conclusive SEC analyses with sufficient RI detection. A poor baseline and signal-to-noise ratio in ^1H NMR spectrometry together with a high diversity of proton shifts, led to spectra of insufficient quality to reveal couplings by a 2D correlation sequence and to assert unambiguously the covalent conjugation between the two blocks. This last issue was however assessed by Diffusion Ordered Spectroscopy NMR. DOSY NMR is a 2D NMR experiment in which the signal intensity emitted from a molecule can be directly linked to its diffusion coefficient.^{50, 51} The DOSY 2D-spectrum thus displays diffusion coefficients as a function of ^1H NMR chemical shifts. The

superimposed DOSY spectra of PTMC₂₂ and Tat-*b*-PTMC₂₂ are for instance presented figure 11. On Tat-*b*-PTMC₂₂ spectrum, both peptide and polymer ¹H signals had the same diffusion coefficient at 5.64 10⁻⁷ m².s⁻¹, significantly different from the diffusion coefficient of PTMC₂₂ at 8.46 10⁻⁷ m².s⁻¹ attesting effective covalent union of the two blocks.

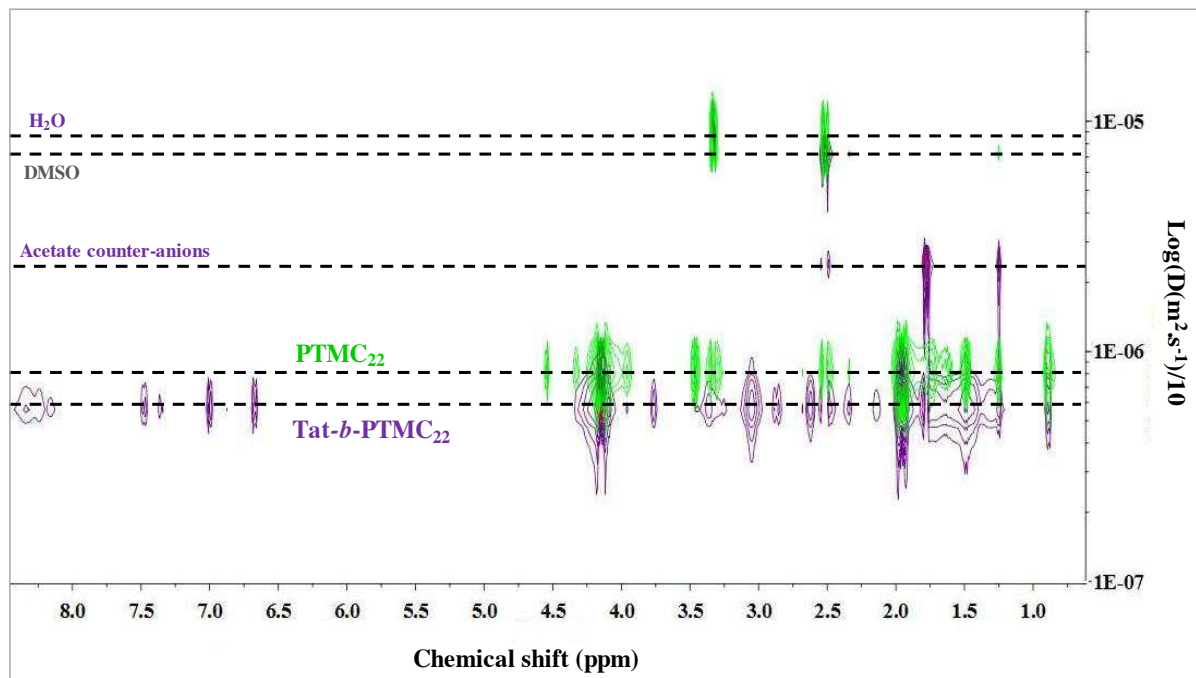


Figure 11 - Superposition of 400 MHz DOSY ¹H NMR spectra in DMSO-*d*₆ of PTMC₂₂ (green) and Tat-*b*-PTMC₂₂ chimera (purple).

The molecular weights of the chimeras were also confirmed by MALDI mass spectrometry analysis. As observed in figure 3 for Tat-*b*-PTMC₂₂, well-resolved monocharged [M+H]⁺ and dicharged [M+2H]²⁺ molar mass distributions were detected, peaks within each population being spaced from a TMC monomer mass increment (102 Da). Experimental masses were in good agreement with the expected theoretical values calculated from the chimera chemical structure. The DP_n of the PTMC blocks, inferred from the most intense peaks, fitted the value determined by NMR. On Tat-*b*-PTMC₂₂ spectrum, the signal appearing at *m/z* 3463.01 can be assigned to Tat peptide covalent dimer (from disulfide formation). However, since the technique is not quantitative, a correct estimation of the amount of remaining peptide cannot be deduced from the intensity of the peak, which is besides biased by its superposition with one of the signals of the chimera. Additional purifications, either by dialysis or size exclusion chromatography on gel filtration columns, were carried out to eliminate those residual peptidic species, with no better success. Moreover no free peptide was detected by DOSY NMR. This amount is therefore most probably negligible but much more easily detectable by mass spectrometry than the chimera.

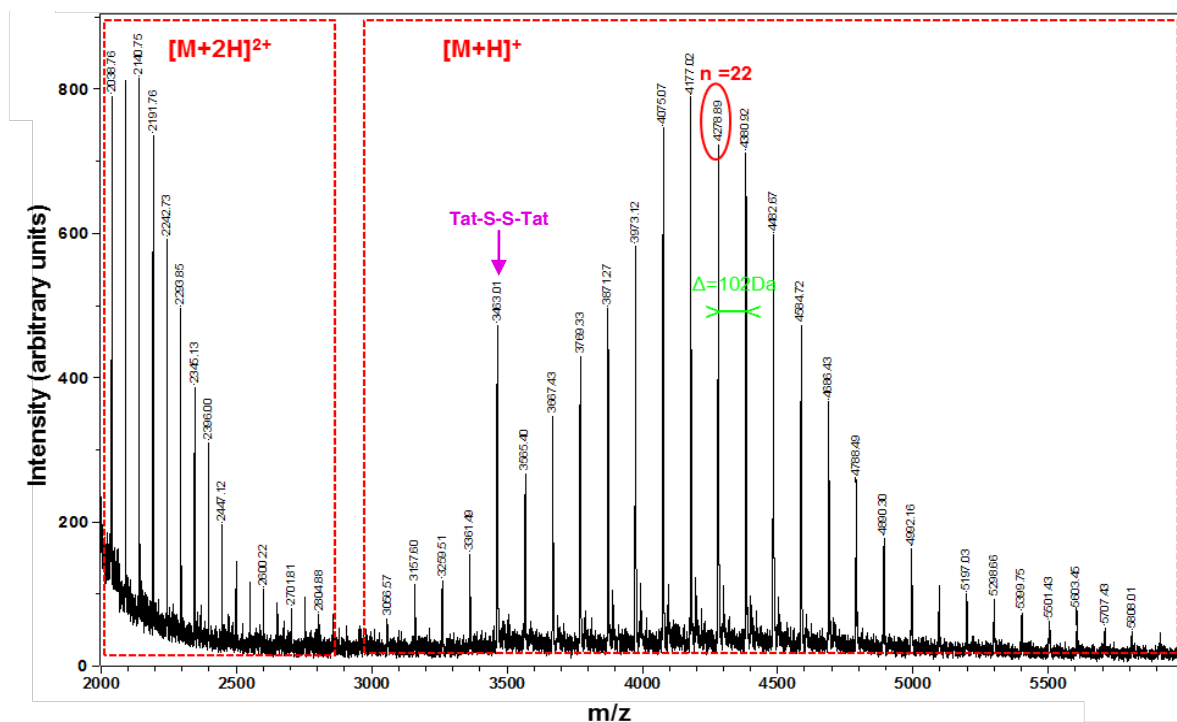


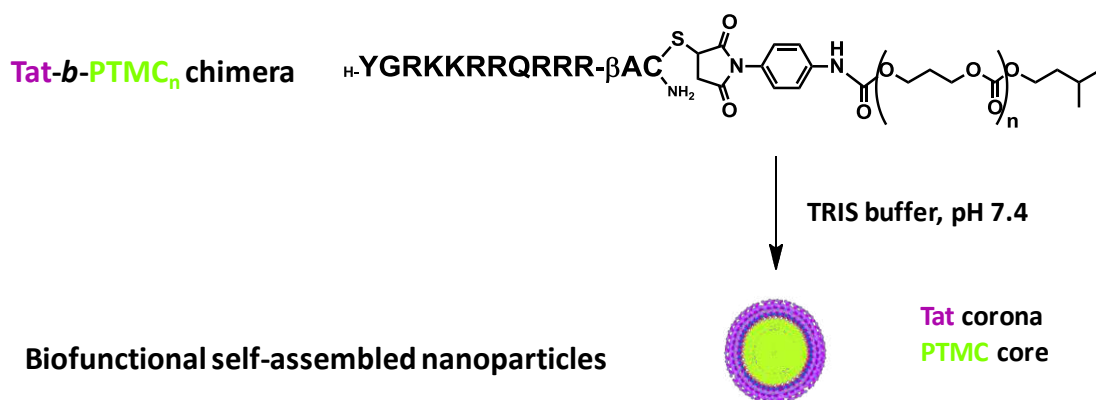
Figure 12 - MALDI-TOF spectrum of Tat-*b*-PTMC₂₂ chimera

DSC thermograms of the different synthesized Tat-*b*-PTMC chimeras ($DP_n = 22, 30, 41$ and 66) revealed a glass transition around -20°C corresponding to the PTMC segment and presented in table 3, and a large endothermic transition from -10 to 100°C as a signature of water loss in the peptide moiety. This phenomenon concealed an eventual melting transition from PTMC (Figure S6).

The self-assembly behaviour in aqueous solution of these four Tat-*b*-PTMC chimeras, with hydrophilic mass fractions ranging from 41 to 20% as detailed in table 3, were further explored.

II. PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF NANOPARTICLES FROM TAT-*b*-PTMC CHIMERAS

Tat-*b*-PTMC chimeras were interestingly able to self-assemble by direct dissolution in aqueous medium for 24 hrs under magnetic stirring, possibly because Tat segment is preventing the crystallization of the PTMC segment (Scheme 9). This avoided any time-consuming dialysis step to remove bio-unfriendly organic solvent when solvent-displacement or nanoprecipitation techniques are used to produce micelles. The self-assembly of the chimeras in a phosphate buffer, which is typically used for preparation of nanoparticles on biological purpose, was precluded by the strong interactions between phosphate species and guanidine functions of peptide arginine residus. TRIS buffer was then selected as a suitable substitute to prepare Tat-*b*-PTMC self-assemblies in physiological conditions.



Scheme 9 – Self-assembly of Tat-*b*-PTMC chimeras by direct dissolution in TRIS buffer.

II.1. LIGHT SCATTERING AND MICROSCOPY ANALYSES

The combination of multi-angle dynamic light scattering (Table 3, figure I3 and figure S9) and microscopy (AFM: figure 4, appendix S1 and figure S8; TEM: figure S7) analyses revealed the formation of well-defined spherical micellar assemblies with a low size polydispersity, whatever the PTMC block length and hydrophilic mass fraction of the chimeras. Hydrodynamic radii (R_H) measured by DLS ranged gradually from 11 nm to 20 nm with increasing PTMC block length (Table 3 and figure I3 panel A). AFM images (Figure I3 panel B, C and D) confirmed the high homogeneity of all dispersions. The uniform and distinct spread of particles onto the mica surface allowed a statistical analysis of section dimensions (Figure I3 panel E, appendix S1 and figure S8). The so-measured diameters of micelles (D) present a narrow distribution, confirming their low size dispersity. Because of the strong positive charge of micelles, as attested by the highly positive zeta potential values measured (ζ , table 3), nanoparticles strongly adsorbed and spread onto the negatively charged mica surface, explaining the apparent larger diameters to those measured by DLS.

Entry	Chimeras			Self-assembled nanoparticles		
	$M_w^a/\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$T_g^b/^\circ\text{C}$	f^c	R_H^d/nm	PDI^e	ζ^f/mV
Tat-<i>b</i>-PTMC₂₂	4279	-24	41%	11	0.09	+49 ± 2.5
Tat-<i>b</i>-PTMC₃₀	5095	-22	34%	12	0.09	+41 ± 2.3
Tat-<i>b</i>-PTMC₄₁	6217	-20	28%	17	0.06	+38 ± 1.8
Tat-<i>b</i>-PTMC₆₆	8767	-19	20%	20	0.03	+37 ± 2.4

^aCalculated from conversion. ^bDetermined by DSC. ^cHydrophilic mass fraction. ^dMeasured by multiangle DLS.

^eMeasured by DLS at 90°. ^fMeasured by laser doppler micro-electrophoresis measurements.

Table 3 – Characteristics of Tat-*b*-PTMC chimeras and resulting self-assembled nanoparticle

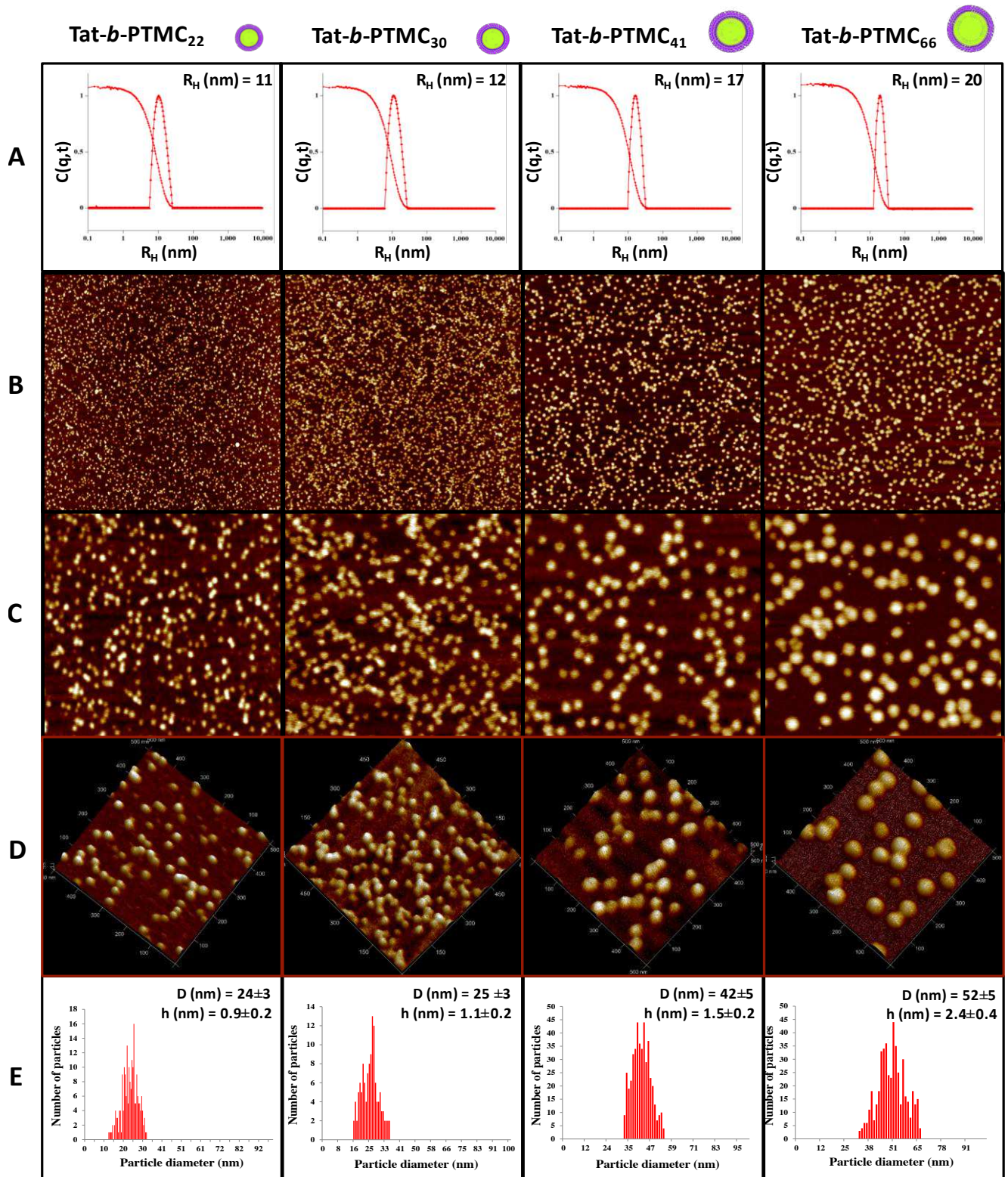


Figure 13 - Dynamic Light Scattering and Atomic Force Microscopy analyses of Tat-*b*-PTMC nanoparticles. Panel A : Relaxation curves and corresponding cumulant fits (90° angle) and hydrodynamic radius calculated from Multiangle Dynamic Light Scattering analyses; Panel B: Tapping mode AFM images 3x3 μm; Panel C: Tapping mode AFM images 1x1 μm; Panel D: Tapping mode AFM images 500x500 nm; Panel E: Statistical distributions of AFM particles diameters, mean diameter and height values of AFM particles.

In the whole range of hydrophilic mass fraction, ranging from 20% for Tat-*b*-PTMC₆₆ to 41% for Tat-*b*-PTMC₂₂, only spherical micellar assemblies were observed, but no worm-like or vesicles as it could be expected.² Empirical laws developed by Disher and Eisenberg are however based on observation resulting from copolymers with flexible and neutral polymer chains. In our case, both the tendency of PTMC to crystallize, together with the high positively charged Tat peptide, presumably strongly influence the resulting self-assembled structures. Electrostatic repulsions between the cationic Tat blocks are likely to impose a high curvature to the hydrophilic corona excluding vesicle formation. Instead, the increase of PTMC block length induced an enlargement of the hydrophobic core that can be clearly appreciated visually on AFM images.

Additionally, Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles were analyzed by differential scanning calorimetry in solution to status on the possible semi-crystalline nature of PTMC blocks and to ultimately address the question of whether self-assemblies are dynamic or “frozen”. No endothermic melting transition was detected when heating the dispersions from 5 to 60°C (Figure S10, experimental section in chapter 4), evidencing that PTMC chains were in amorphous state within micelle cores. As the glass transition temperature of chimeras were found to be around -20°C, nanoparticles were thus formed, conserved and used under conditions allowing chain mobility, which is in favor of dynamic self-assemblies and not “frozen” self-assemblies.

II.2. SMALL ANGLE NEUTRON SCATTERING ANALYSES

An extensive analysis of the internal structure of micelles by multi-angle static light scattering (SLS) was impossible due to the low scattering intensity of solutions, preventing us from calculating radii of gyration and molecular weights of micelles. To bring a further insight into the structural characterization, and especially to determine relevant parameters regarding their biological properties such as aggregation numbers and densities of Tat peptide per particle, small angle neutron scattering experiments were thus performed on Tat-*b*-PTMC₃₀ and Tat-*b*-PTMC₆₆ self-assemblies in D₂O. All resulting data are summarized in table 4.

Entry	R_G /nm	R_0^a /nm(s)	$\langle V^2 \rangle / \langle V \rangle$ /cm ³	R_{ave} /nm	N_{agg}	N_{agg}/S_{ave} /nm ⁻²	$\Delta\rho_n^b$ /cm ⁻²	$N(D_2O)$
Tat-<i>b</i>-PTMC₃₀	7.1	7.2 (0.15)	2.14×10^{-18}	8.0	253	0.32	3.43×10^{10}	126
Tat-<i>b</i>-PTMC₆₆	9.9	11.0 (0.14)	7.34×10^{-18}	12.1	504	0.28	3.58×10^{10}	188

^a Parameters of Log-normal distribution. ^b Deduced from the invariant (Experimental section, Eq. 4).

Table 4 - Physico-chemical characteristics from SANS analysis of Tat-*b*-PTMC₃₀ and Tat-*b*-PTMC₆₆ micelles.

In the low q -regime, the micelles radius of gyration (R_G) can be calculated using the Guinier approximation from the slope of $\ln(I(q))$ plot as a function of q^2 . This resulted in 7.1 nm and 9.9 nm R_G values for Tat-*b*-PTMC₃₀ and Tat-*b*-PTMC₆₆ micelles, respectively. The ensuing $\rho=R_G/R_H$ ratios, precisely 0.59 for Tat-*b*-PTMC₃₀ and 0.50 for Tat-*b*-PTMC₆₆, were found a bit too low as compared to the 0.775 ρ value usually expected for uniform spherical micelles.⁵² This can be ascribed to an underestimation of R_G due to repulsive interactions between micelles, leading to a structure factor $S(q)<1$ at low q (strong electrostatic repulsions are expected from the highly positive zeta potentials of micelles reported in table 3). In the mean time, the hydrodynamic radius (R_H) is probably over-estimated due to electrostatic repulsions within the shell. In the following, R values were thus re-estimated from the average sphere radii (R_{ave}) deduced from the fit of the whole SANS curves rather than on Guinier's plateau. (*Vide infra*) Radii determined by SANS were nevertheless in line with radii calculated from AFM section dimensions (Appendix S1) for which the same important gap was observed as compared to hydrodynamic dimensions. We assume that this originates from a significant hydration shell complying with the highly hydrophilic and charged peptide corona.

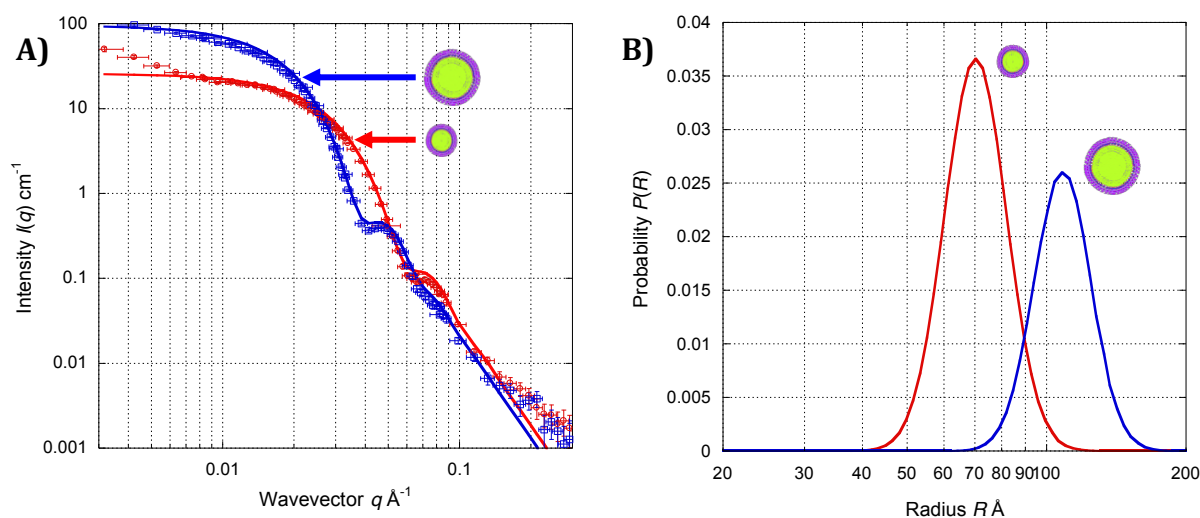


Figure 14 - (A) SANS curves of Tat-*b*-PTMC₃₀ (red circles) and Tat-*b*-PTMC₆₆ (blue squares) at $\Phi=1\%$ in D_2O . Solid lines are fits with the form factor of polydisperse spheres with a Log-normal distribution of radii (table 4). (B) Log-normal distributions of radii deduced from the fits.

At intermediate wave-vectors, intensity oscillations with an envelope varying as q^{-4} were typical of well-defined spherical structures with narrow size dispersity (Figure 14 panel A). The curves present relative minima related to the radius R of nanoparticles as expected with monodisperse spheres at theoretical values $q \times R = 4.5$ (1st order) and 7.7 (2nd order). The curves were nicely fitted with the form factor of filled spheres, with radii described by a Log-normal distribution law, of median $R_0 = 7.2$ nm for Tat-*b*-PTMC₃₀ and $R_0 = 11.0$ nm for Tat-*b*-PTMC₆₆ micelles and respective widths of $\sigma = 0.15$ and $\sigma = 0.14$ (Figure 14 panel B). The distributions being particularly narrow, σ was nearly identical to the coefficient of variation (ratio of standard width on mean radius), respectively 15 % and 14 %. From

this Log-normal probability law obtained by curve fitting, we calculated the average volume of the volume-weighted distribution ($\langle V^2 \rangle / \langle V \rangle$) and deduced the volume-averaged radius of the particles (R_{ave}). New ratios $\rho' = R_{ave} / R_H$ could thus be computed and were found as 0.67 for Tat-*b*-PTMC₃₀ and 0.60 for Tat-*b*-PTMC₆₆, which are closer to the expected value for homogeneous micelles. The number of chains per particle, also called aggregation number (N_{agg}) could also be deduced. The value $N_{agg} = 504$ for Tat-*b*-PTMC₆₆ was found to be about twice that of Tat-*b*-PTMC₃₀, $N_{agg} = 253$. When divided by the average surface of the sphere $S_{ave} = 4\pi \times R_{ave}^2$, this gave an almost constant density of Tat peptide per unit of surface area: $N_{agg} / S_{ave} = 0.30 \pm 0.02$ unit.nm⁻². This finding is consistent with the hypothesis that electrostatic repulsions between cationic peptide blocks impose a limited and rather constant surface packing and a high curvature, explaining why micellar morphologies were found whatever the hydrophilic weight fraction. The length of the PTMC block only mainly impacts the hydrophobic core dimension, and we can therefore consider that the size of the micelles can be tuned without modifying their surface properties. This outcome is of prime importance as it should allow examining the influence of these two parameters on biological properties of micelles in an independent manner.

Finally, a non-negligible lowering was observed between the calculated scattering length density contrast based on the chemical formulas (see Experimental Section) and the experimental values deduced from the calculated scattering invariant reported in Table I. This can be explained by the labile exchange from light to heavy protons in the hydration shell of micelles, D₂O molecules associated to the shell lowering the contrast with the solvent. Based on this assumption, we recalculated the effective neutron SLD values of hydrated molecules, $\rho_n = 2.91 \times 10^{10}$ cm⁻² for Tat-*b*-PTMC₃₀ and $\rho_n = 2.76 \times 10^{10}$ cm⁻² for Tat-*b*-PTMC₆₆. We deduced that 126 and 188 D₂O molecules per chain were associated to Tat-*b*-PTMC₃₀ and Tat-*b*-PTMC₆₆ micelles, respectively. Considering the surface area of the peptide S_{ave} / N_{agg} of 317 Å² for Tat-*b*-PTMC₃₀ and 362 Å² for Tat-*b*-PTMC₆₆, we expect that each associated D₂O molecule covers 2.5 Å² and 1.9 Å² of the micelle surface, respectively. The projected area of a water molecule being around 9 Å², we estimated the hydration shell to be made of 4 molecular layers of water on average.

Lastly and more generally, no aggregation or increased polydispersity of particles was noticed by DLS monitoring over 2 months. Tat-*b*-PTMC chimeras thus self-assembled into extremely regular and stable cationic micelles with tunable size, their physico-chemical characteristics being closely related to their molecular architecture.

CONCLUSION

Tat-*b*-PTMC amphiphilic chimeras were synthesized with high molecular precision, fully characterized and self-assembled into size-tuneable, highly monodisperse and stable core-shell nanometer-sized particles. A gradual enlargement in particle size, ranging from 22 nm to 40 nm in hydrodynamic diameter, has been clearly observed when progressively increasing the PTMC block with a constant Tat peptide block. *In vivo* cell-penetrating properties as well as toxicity of these cationic micelles as a function of their chemical and physico-chemical profiles are addressed in the next chapter.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials

Solvents (THF, DMF) were purchased from Sigma-Aldrich, thoroughly dried over sodium and calcium hydride, respectively, and distilled under reduced pressure. Trimethylene carbonate (1,3-dioxane-2-one; TMC) was kindly provided by Labso chimie fine (Boehringer Ingelheim) and purified by four successive recrystallizations in dry toluene. Diethyl zinc (1.1 M in toluene), *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA), piperidine, acetic anhydride, and 3-methyl-1-butanol were purchased from Sigma-Aldrich. The latter was distilled over sodium under reduced pressure prior to use. *N*-(*p*-maleimidophenyl)isocyanate (PMPI) from Thermo Fisher Scientific was stored in a glove-box and used as supplied. NovaSyn® TGR resin was purchased from Merck. *O*-Benzotriazole-*N,N,N',N'*-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate (HBTU) and *N*- α -Fmoc-protected amino acids were provided by Iris Biotech GmbH.

Instrumentation and measurements

NMR spectroscopy. All NMR experiments were performed at 298 K on a Bruker Avance I NMR spectrometer operating at 400 MHz, using TMS as standard, and equipped with a Bruker multinuclear z-gradient direct probe head capable of producing gradients in the z direction with 53.5 G.cm⁻¹ strength. ¹H NMR spectra were recorded with a DI of 5 s and 32 scans. ¹³C data were obtained via HSQC experiments and recorded with a DI of 1.5 s and 64 scans. Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY) spectra were acquired in DMSO-d₆ with the “*ledbpgp2s*” pulse program from Bruker topsin software. The gradient strength was linearly incremented in 16 steps from 2 up to 95% of the maximum gradient strength. Diffusion times ranged from 50 to 100 ms and the maximum bipolar gradient pulse length of 2.2 ms was used for all experiments. The data were processed using 4096 points in the F2 dimension and 256 points in the F1 dimension.

Size exclusion chromatography. Size exclusion chromatography (SEC) analyses were performed on dilute polymer samples (5 mg.mL⁻¹) at 40°C using THF as eluent (1 mL.min⁻¹) and trichlorobenzene as a flow marker. A Varian apparatus was used, equipped with both refractive index and UV detectors and a three-column set of TSK gel TOSOH (G2000HXL, G3000HXL, G4000HXL with pore sizes of respectively 20, 75, and 200 Å) calibrated by narrow polystyrene standards.

Differential scanning calorimetry. Differential scanning calorimetry (DSC) analyses were performed on a TA Instruments Q100 under continuous flow of nitrogen and helium (25 mL.min⁻¹), using 5 mg samples in sealed aluminium capsules. Thermograms of three successive cycles were recorded: *i*) -80 to 100°C at 10°C.min⁻¹; *ii*) 100 to -80°C at 10°C.min⁻¹; *iii*) -80 to 100°C at 10°C.min⁻¹.

l. As the crystallization process of the polymers was slow, the melting temperature (T_m) was observed and measured only on the first heating slope.

Colorimetric titration of polymer-terminal primary amine functions. For this analysis, ultrapure acetic acid is required (99.7% v/v). 100 mg of polymer was solubilised in 3 ml of chloroform/acetic acid (1:2) and 3 drops of crystal violet, a pH-sensitive dye, was added. The mixture was then titrated with a 7.8 mM HBr solution in acetic acid. The equivalence was reached when the solution, initially purple, turned green.

Reverse phase high performance liquid chromatography. Water and acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) were used as eluents A and B, respectively. Analytical RP-HPLC was carried out on a Varian ProStar HPLC system, using a Microsorb C₁₈ column (100 Å; 5 µm; 250 X 4.6 mm) from Macherey Nagel at 1 mL.min⁻¹ flow rate. Peptide samples were run with a gradient from 5 to 40% eluent B in 30 min. Semi-preparative RP-HPLC was performed on a Waters apparatus equipped with two 515 pump, a C₁₈ SunFire column (90 Å, 5 µm, 10 x 250 mm) and a 2487 absorbance detector adjusted to 214 nm. Elution was achieved with a linear gradient from 6 to 10 % eluent B in 15 min at 4 mL.min⁻¹ flow rate.

Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Mass spectrometry analyses were performed on a MALDI-TOF/TOF (Ultraflex III, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a SmartBeam laser (Nd:YAG, 355nm). All MS measurements were acquired in reflectron positive mode with external calibration. The matrices alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (ACHCA) (5 mg.mL⁻¹ in acetonitrile containing 0.1% aqueous TFA (1/1, v/v)) and 2,4,6-trihydroxy-acetophenone (THAP) (10 mg.mL⁻¹ in ethanol) were used for mass analysis of Tat peptide and Tat-*b*-PTMC chimeras, respectively. Tat peptide ready for mass analysis was solubilized in 0.1% aqueous TFA. Maleimide-functionalized PTMCs were dissolved in dichloromethane. Micellar dispersions of Tat-*b*-PTMC chimeras with different polymer block lengths were prepared in ultrapure water.

Dynamic and static light scattering. Dynamic and static light scattering experiments were performed using an ALV CGS-3 Compact Goniometer System, equipped with a 35 mW HeNe linear polarized laser with a wavelength of 632.8 nm and an ALV/LSE-5004 light scattering electronic and Multiple Tau Digital correlator. The accessible scattering angles ranged from 30° to 150°. Samples (2 mL in 2 cm-diameter cylindrical glass cells) were immersed in a filtered toluene bath. Static data of 3 independent 5 s-measurements with less than 3% variation were recorded with the ALV-Correlator Control software. Three independent 20 s-measurements were recorded for dynamic data. Mean hydrodynamic diameters and size distributions were determined using a cumulant analysis method. Nanoparticle dispersions were prepared at a concentration of 1 mg.mL⁻¹ in 100 mM TRIS buffer at pH 7.4.

Zeta potential measurements. For zeta potential measurements, samples were diluted ten fold in 1 mM NaCl. Laser Doppler micro-electrophoresis was conducted using M3-PALS (Phase analysis Light Scattering) Malvern technology with sequential fast and slow field reversal applying a potential of ± 150 V. The so-measured electrophoretic mobility (μ) was then converted to zeta potential (ζ) using the Smoluchowski approximation.

Transmission Electron Microscopy. TEM images were recorded at Bordeaux Imaging Center (BIC) on a FEI TECNAI 12 microscope working at 120 kV equipped with a GATAN Orius 11 MP camera. Samples were prepared by spraying nanoparticle dispersions in ultra-pure water ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) onto formvar/carbon-coated copper grids (200 mesh) using a tailor-made spray device.

Atomic Force Microscopy. AFM measurements were performed at room temperature using a Veeco Dimension Icon AFM system equipped with a Nanoscope V controller. Both topographic and phase images of individual particles were obtained in Tapping Mode using rectangular silicon cantilever (AC 160-TS, Atomic Force, Germany) with a spring constant of $26 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$, a resonance frequency lying in the 270-320 kHz range and a radius of curvature of less than 10 nm. Samples were prepared by solvent casting at ambient temperature from dilute solutions either in pure water or buffer solution (1 wt %). Freshly cleaved mica pieces were placed in a spin-coating apparatus (G3P-8 Spin Coater, PI-Kem, UK) and excess solvent was removed by spinning for 120 s at angular rotation of 3000 rpm. Measurements of diameter were taken using the section Particle Analysis tool provided with the AFM software (Nanoscope Analysis V1.20 from Bruker). About 200 particles were used to estimate micelles size distribution.

Small angle neutron scattering experiments. SANS measurements were performed on the PACE spectrometer of Laboratoire Léon Brillouin (CEA-Saclay, France) equipped with an isotropic BF_3 detector made of 30 concentric rings of 1 cm width each. We used three configurations: the first one with a sample-to-detector distance D of 4.7 m and a neutron wavelength λ of 13 Å to cover a q range of $3.2 \times 10^{-3} - 1.4 \times 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$; the second one with $D=4.7$ m and $\lambda=5$ Å to cover a q range of $1.3 \times 10^{-2} - 8.8 \times 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$; and the third one with $D=0.9$ m and $\lambda=5$ Å to cover a q range of $8.3 \times 10^{-2} - 0.5 \text{ \AA}^{-1}$. Tat-*b*-PTMC₃₀ ($\text{C}_{81}\text{H}_{136}\text{N}_{37}\text{O}_{19}\text{S} + 30 \times (\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_3) + \text{C}_5\text{H}_{11}$) and Tat-*b*-PTMC₆₆ ($\text{C}_{81}\text{H}_{136}\text{N}_{37}\text{O}_{19}\text{S} + 66 \times (\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_3) + \text{C}_5\text{H}_{11}$) chimeras both have a theoretical neutron scattering length density (SLD) ρ_n of $1.47 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$ significantly different from the value of PTMC homopolymer ($\rho_n=1.27 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$). When dissolved in D_2O ($\rho_n=6.34 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$), the theoretical contrast is $\Delta\rho_n=4.87 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$. Measurements were performed at a concentration of $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in a 2 mm thick quartz cuvette. Scattered intensities were corrected for the transmission factor and incoherent backgrounds. They were normalized by the flat signal of a cuvette filled with light water to correct the detector efficiency and converted into absolute units (cm^{-1}).⁵³ In order to fit the SANS curves, the form factor

of a polydisperse suspension of spheres of volume fraction Φ and SLD contrast $\Delta\rho_n$ was computed numerically using the following formulas:⁵⁴

$$I(q) = \Phi(\Delta\rho_n)^2 \frac{\int_0^\infty \left(4\pi R^3 \frac{\sin(qR) - qR \cos(qR)}{(qR)^3} \right)^2 P(R) dR}{\int_0^\infty \left(\frac{4\pi R^3}{3} \right) P(R) dR} \quad (\text{Eq. 1})$$

Using a Log-normal distribution to represent the size-dispersity:

$$P(R) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma R} \exp \left[-\frac{1}{2\sigma^2} \left(\ln \frac{R}{R_0} \right)^2 \right] \quad (\text{Eq. 2})$$

In particular, when $q \rightarrow 0$, the intensity $I(q)$ tends towards:

$$I(q) \xrightarrow{q \rightarrow 0} \Phi(\Delta\rho_n)^2 \frac{\int_0^\infty \left(\frac{4\pi R^3}{3} \right)^2 P(R) dR}{\int_0^\infty \left(\frac{4\pi R^3}{3} \right) P(R) dR} = \Phi(\Delta\rho_n)^2 \frac{\langle V^2 \rangle}{\langle V \rangle} \quad (\text{Eq. 3})$$

The scattering invariant was computed by numerical integration of the scattering curve:

$$\int_0^\infty I(q) q^2 dq = 2\pi^2 \Phi(1-\Phi)(\Delta\rho_n)^2 \quad (\text{Eq. 4})$$

The knowledge of this invariant and of the volume fraction enables to determine the actual SLD contrast $\Delta\rho_n$ accurately. The volume-averaged volume $\langle V^2 \rangle / \langle V \rangle$ of the particles can thus be deduced from (Eq. 3). The parameters R_0 and σ of the distribution of radii were determined by least-squares fitting of the experimental curve $I_{\text{exp}}(q)$ with the curve $I_{\text{calc}}(q)$ calculated with equations (1) and (2). The sum of squares $\Sigma(F_{\text{exp}} - F_{\text{calc}})^2 / (\Delta F)^2$ (where the denominator is the experimental error) was minimized both for $F=I(q)$ and $F=I(q) \times q^4$ in order to fit the curve over the whole q -range.

Chemical procedures

Ring opening polymerization of TMC The procedure described below was used for a target DP of 20 and adapted for higher DPs (30, 40 and 70) using the same final diethyl zinc concentration. Under inert atmosphere (argon, < 0.5 ppm O₂, < 5 ppm H₂O), the initiator (see below) and diethyl zinc (74 mg, 1.04 mmol in 933 μ L toluene) were mixed together in 4.91 mL THF in a flame-dried Schlenk flask and stirred at room temperature for 1 hr. TMC (5 g, 49 mmol in 16 mL THF) was then added and the polymerization was allowed to proceed at 17°C under vigorous stirring up to 96% conversion as monitored by ¹H NMR. The reaction was quenched with an excess of acetic acid (181

μL , 3.2 mmol in 2 mL of toluene). The polymer was precipitated twice in cold methanol and dried under vacuum. PTMC was characterized by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy, SEC in THF, MALDI-TOF spectrometry and DSC.

Polymerization initiated by 3-methyl-1-butanol (223 μL , 2.07 mmol). $\text{DP}_n=22$; Notation PTMC₂₂; $M_n^{\text{exp}}=2332$ g.mol⁻¹; PD=1.08; mass yield=81% (4.22 g); ^1H NMR (CD_2Cl_2) δ 4.24 (t, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); 4.18 (t, 4(n-1)H, $\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})$); 4.12 (t, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 3.67 (q, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); 2.01 (qt, 2(n-1)H, $\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})$); 1.86 (qt, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); 1.68 (m, 1H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 1.53 (q, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 0.91 (d, 6H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); ^{13}C NMR (CD_2Cl_2) δ 66.6 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); 64.9 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 58.9 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); 64.2 ($\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})$); 37.2 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 31.5 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); 28.0 ($\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})$); 24.8 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 22.3 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

Polymerization initiated by 3-(Fmoc-amino)-1-propanol (727 mg, 2.45 mmol). $\text{DP}_n=18$; Notation NHFmoc-PTMC₁₈; $M_n^{\text{exp}}=2145$ g.mol⁻¹; PD=1.2; mass yield=70% (3.62 g); ^1H NMR (CDCl_3): 7.1-7.8 (8H, aromatic Fmoc protons); 5.01 (s, 1H, $\text{NHC}(\text{O})\text{O}$); 4.39 (d, 2H, $\text{NHC}(\text{O})\text{OCH}_2$); 4.29 (t, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); 4.23 (t, 4(n-1)H, $\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})$); 4.17 (t, 2H, $\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$); 3.67 (q, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); 2.04 (qt, 2(n-1)H, $\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})$); 1.91 (qt, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 1.83 (m, 2H, $\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}$).

Deprotection of Fmoc-amino-PTMC (PTMC-NHFmoc). The procedure described below was used for a PTMC DP of 18 and adapted for other DPs. NHFmoc-PTMC₁₈ (1g, 0.47 mmol) was dissolved in 10 mL CH_2Cl_2 with piperidine 10%v/v (1ml) and left under stirring 2 hrs at room temperature. The polymer was then precipitated twice in cold methanol, dried under vacuum and characterized by ^1H NMR spectroscopy and SEC in DMF with RI and UV detection. $\text{DP}_n=19$; $M_n^{\text{exp}}=2006$ g.mol⁻¹; PD=1.2; yield=43% (40 mg). Quantitative removal of Fmoc group. ^1H NMR (CDCl_3): 5.0 (s, 1H, $\text{NHC}(\text{O})\text{O}$); 4.29 (t, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); 4.23 (t, 4(n-1)H, $\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})$); 4.16 (t, 2H, $\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{NH}$); 3.73 (q, 2H, $\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); 3.68 (q, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); 3.33 (q, 2H, $\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); 2.04 (qt, 2(n-1)H, $\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})$); 1.91 (qt, 2H, $\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 1.68 (m, 2H, $\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$).

Synthesis of carboxylic acid-functionalized PTMC (COOH-PTMC). The procedure described below was used for a PTMC DP of 30 and adapted for other DPs (22 and 40). PTMC₃₀ (500 mg, 0.16 mmol) was dissolved in 1.5 mL DMF. Separately, succinic anhydride (316 mg, 3.16 mmol) and DMAP (4-dimethylaminopyridine, 38.6 mg, 0.32 mmol) were dissolved in 1.5 mL DMF. The solutions were then mixed together and stirred overnight at room temperature. The polymer

was precipitated 3 times in cold methanol to eliminate any trace of succinic anhydride or acid, dried under-vacuum and characterized by ^1H NMR spectroscopy and SEC in THF. Notation PTMC₃₀-COOH; $M_n^{\text{exp}}=3248$ g.mol⁻¹; PD=1.06; Mass yield=72% (250 mg); ^1H NMR (CD_2Cl_2) 4.18 (t, 4nH, C(O)OCH₂CH₂CH₂OC(O)); 4.12 (t, 2H, OCH₂CH₂CH(CH₃)₂); 2.60 (m, 4H, C(O)OCH₂CH₂OC(O)OH); 2.01 (qt, 2nH, C(O)OCH₂CH₂CH₂OC(O)); 1.68 (m, 1H, OCH₂CH₂CH(CH₃)₂); 1.53 (q, 2H, OCH₂CH₂CH(CH₃)₂); 0.91 (d, 6H, OCH₂CH₂CH(CH₃)₂).

Synthesis of maleimide-functionalized PTMC (Mal-PTMC). The procedure described below was used with PTMC₂₂ and adapted for PTMC₃₀, PTMC₄₁ and PTMC₆₆. Under inert atmosphere (argon, < 0.5 ppm O₂, < 5 ppm H₂O), PMPI (43 mg, 0.20 mmol) was dissolved in 860 μL DMF and added onto 1500 μL of PTMC₂₂ solution (300 mg, 0.13 mmol) in DMF. The reaction mixture was stirred overnight at 10°C and the polymer was recovered by precipitation in cold methanol as a yellow viscous liquid. Mal-PTMC₂₂ was characterized by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy in CD_2Cl_2 , SEC in THF with UV detection, and MALDI mass spectrometry. Notation Mal-PTMC₂₂; $M_n^{\text{exp}}=2546$ g.mol⁻¹; PD=1.08; mass yield=91% (301 mg); ^1H NMR (CD_2Cl_2) δ 7.50 (d, 2H, C(CHCH)₂NH); 7.25 (d, 2H, C(CHCH)₂NH); 6.91 (s, 1H, C(CHCH)₂NH); 6.81 (s, 2H, H₂C₂(CO)₂N); 4.24 (t, 2H, OCH₂CH₂CH₂OC(O)); 4.18 (t, 4(n-1)H, C(O)OCH₂CH₂CH₂OC(O)); 4.17 (q, 2H, OCH₂CH₂CH₂OC(O)); 4.12 (t, 2H, OCH₂CH₂CH(CH₃)₂); 2.01 (qt, 2(n-1)H, C(O)OCH₂CH₂CH₂OC(O)); 2.00 (qt, 2H, OCH₂CH₂CH₂OC(O)); 1.68 (m, 1H, OCH₂CH₂CH(CH₃)₂); 1.53 (q, 2H, OCH₂CH₂CH(CH₃)₂); 0.91 (d, 6H, OCH₂CH₂CH(CH₃)₂); ^{13}C NMR (CD_2Cl_2) δ 135.0 (H₂C₂(CO)₂N); 127.6 (C(CHCH)₂NH); 118.8 (C(CHCH)₂NH); 66.8 (OCH₂CH₂CH₂OC(O)); 64.9 (OCH₂CH₂CH(CH₃)₂); 64.2 (C(O)OCH₂CH₂CH₂OC(O)); 61.6 (OCH₂CH₂CH₂OC(O)); 37.2 (OCH₂CH₂CH(CH₃)₂); 28.0 (C(O)OCH₂CH₂CH₂OC(O)); 24.8 (OCH₂CH₂CH(CH₃)₂); 22.3 (OCH₂CH₂CH(CH₃)₂).

Solid-phase synthesis of Tat peptides. The linear sequences H-YGRKKRRQRRR β AC-NH₂ (Thiol-functionalized Tat peptide) and H- β A β A-YGRKKRRQRRR-NH₂ (Amino-functionalized Tat peptide) were synthesized onto a NovaSyn® TGR resin using a Fmoc/*t*-Bu strategy on a microwave-assisted synthesizer (Liberty 1, CEM). Coupling reactions were performed using, relative to the resin loading (0.22 mmol.g⁻¹), 5 equiv. *N*- α -Fmoc protected amino acid activated in situ with 5 equiv. HBTU and 5 equiv. DIPEA (2 M in NMP) in DMF (20 mL.g⁻¹ resin). A systematic acetylation of non-reacted amines was carried out with acetic anhydride/DMF (1:4) (20 mL.g⁻¹ resin). Removal of *N*- α -Fmoc protecting groups by treatment with piperidine/DMF (1:4) (20 mL.g⁻¹ resin) was monitored by an integrated UV-detector and repeated up to complete deprotection. While the amino-functionalized Tat peptide sequence was kept protected to undergo PTMC coupling on the free *N*-terminal primary amine, the thiol-functionalized Tat peptide sequence was cleaved under acidic condition using a cocktail of TFA/ethanedithiol/water/triisopropylsilane (95:1.5:1.5:2) (20 mL.g⁻¹ resin) for 4 hrs. The cleavage

solution was recovered and concentrated under reduced pressure. The crude peptide was precipitated and triturated in cold ether and purified by semi-preparative RP-HPLC. Chemical formula: $C_{70}H_{129}N_{35}O_{15}S$; Theoretical molecular weight=1733.06 g.mol⁻¹; Exact mass=1732.01; yield=63%; Experimental m/z: $[M+H]^+=1733.27$, $[M+2H]^{2+}=866.82$.

Synthesis of PTMC-*b*-Tat chimeras via solid phase coupling. The procedure described below was used for the amino-functionalized Tat peptide sequence H- β A β A-YGRKKRRQRRR-NH₂ and adapted for H- β A β A-NH₂, H- β AQ-NH₂, H- β AK-NH₂ and H- β AR-NH₂. PTMC₂₂ (95 mg, 40 μ mol) was dissolved in 1.5 mL NMP with HBTU (15 mg, 40 μ mol) and DIPEA (4-dimethylaminopyridine, 8,8 μ L, 50 μ mol). The solution was then added to the resin beads bearing the protected peptidic sequence H- β A β A-YGRKKRRQRRR-resin swollen in 1.5 ml of NMP. The reaction was allowed to proceed overnight at room temperature. The resin beads were then extensively washed with DMF to remove any trace of unconjugated polymer, and the chimeras were cleaved under acidic condition using a cocktail of TFA/ water/triisopropylsilane (95:2.5:1.2.5) (20 mL.g⁻¹ resin) for 4 hrs. The cleavage solution was recovered and concentrated under reduced pressure, and the crude product was precipitated and in cold ether. Coupling conversion calculated from ¹H NMR in DMSO-d₆ : 11%. Mass yield: 6.7%.

Synthesis of Tat-*b*-PTMC chimeras via thiol-maleimide coupling in solution. The procedure described below was used with Mal-PTMC₂₂ and adapted for Mal-PTMC₃₀, Mal-PTMC₄₁ and Mal-PTMC₆₆. Mal-PTMC₂₂ (50 mg, 21 μ mol) as well as Tat peptide (73 mg, 42 μ mol) were dissolved separately in 625 μ L DMF. DIPEA (6.4 μ L, 34 μ mol) was added to Mal-PTMC₂₂ solution and immediately followed by the addition of Tat solution. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature protected from light and precipitated in cold ether. After centrifugation, the recovered white solid was solubilized in 500 μ L DMSO. Ammonium acetate buffer (4.5 mL, 10 mM, pH 5) was poured under vigorous stirring. The dispersion obtained was extensively dialysed with 25 kDa cut-off tubing against AcONH₄ buffer and lyophilized. The white powder obtained was characterized by ¹H and DOSY NMR spectroscopy in DMSO-d₆ and MALDI mass spectrometry. Mass yield: 92% (97 mg) Experimental m/z: $[M+H]^+_{n=22}=4278.89$, $[M+2H]^{2+}_{n=22}=2141.3$.

Hydrolytic degradation test for PTMC₂₂- β AX (X=R,Q,K) – general procedure. 10 mg of PTMC₂₂- β AX (X=R,Q,K) (10 mg, 3,8 μ mol) was dissolved in 250 μ L of DMF and eventually with DIPEA (1 μ L, 5,8 μ mol), and the mixture was then precipitated in cold ether. After centrifugation, the recovered white solid was solubilised in 200 μ L DMSO. Ultrapure water (2 mL) was poured under vigorous stirring. The dispersion obtained was stirred over 7 days and lyophilized.

Preparation of nanoparticles – general procedure. Micellar dispersions were obtained by direct dissolution from bulk Tat-*b*-PTMC chimeras (5 mg) under stirring at room temperature in 100

mM TRIS buffer at pH 7.4 (5 mL) for 24 hrs (in ultrapure water in case of samples for AFM and TEM analyses, in D₂O for SANS analysis).

SUPPORTING INFORMATION

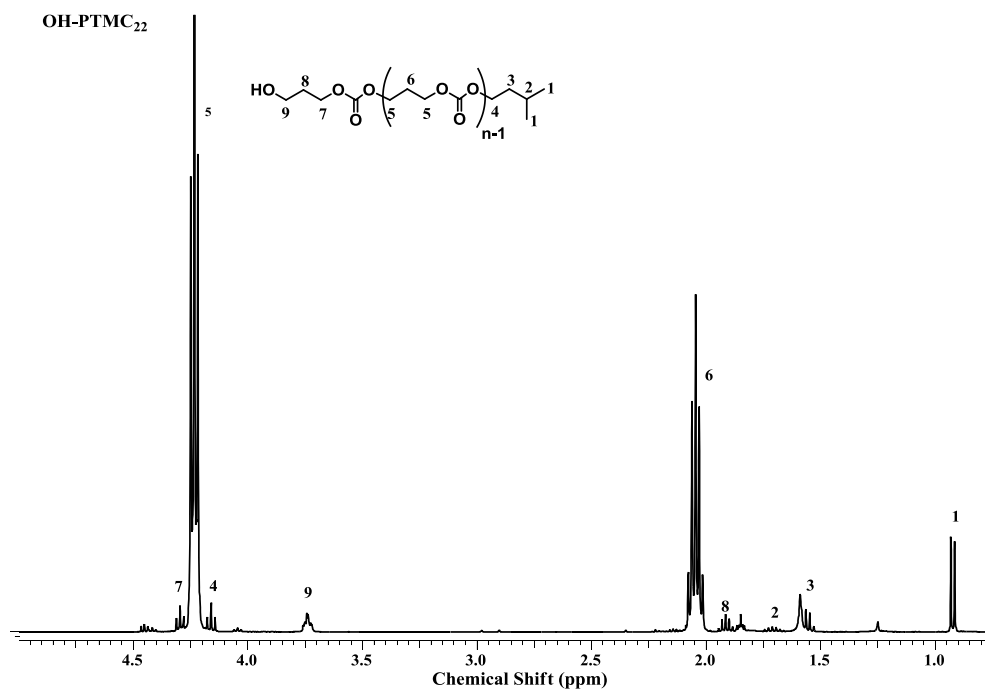


Figure S1 - ¹H NMR spectrum of OH-PTMC₂₂ in CD₂Cl₂.

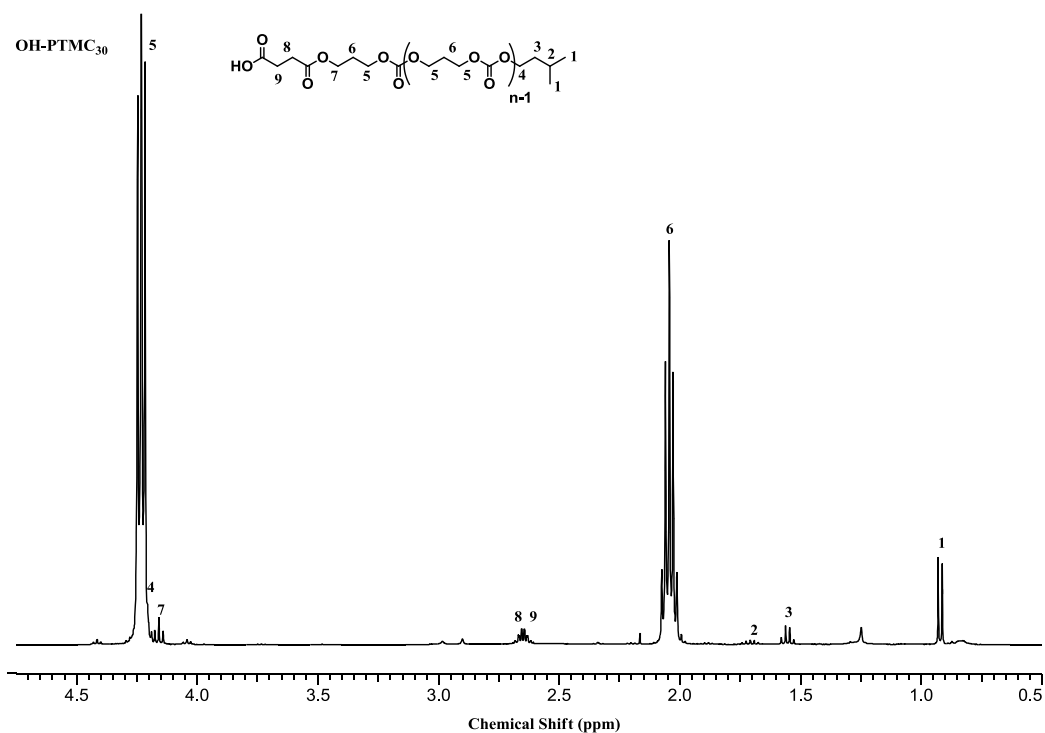


Figure S2 - ¹H NMR spectrum of COOH-PTMC₃₀ in CD₂Cl₂.

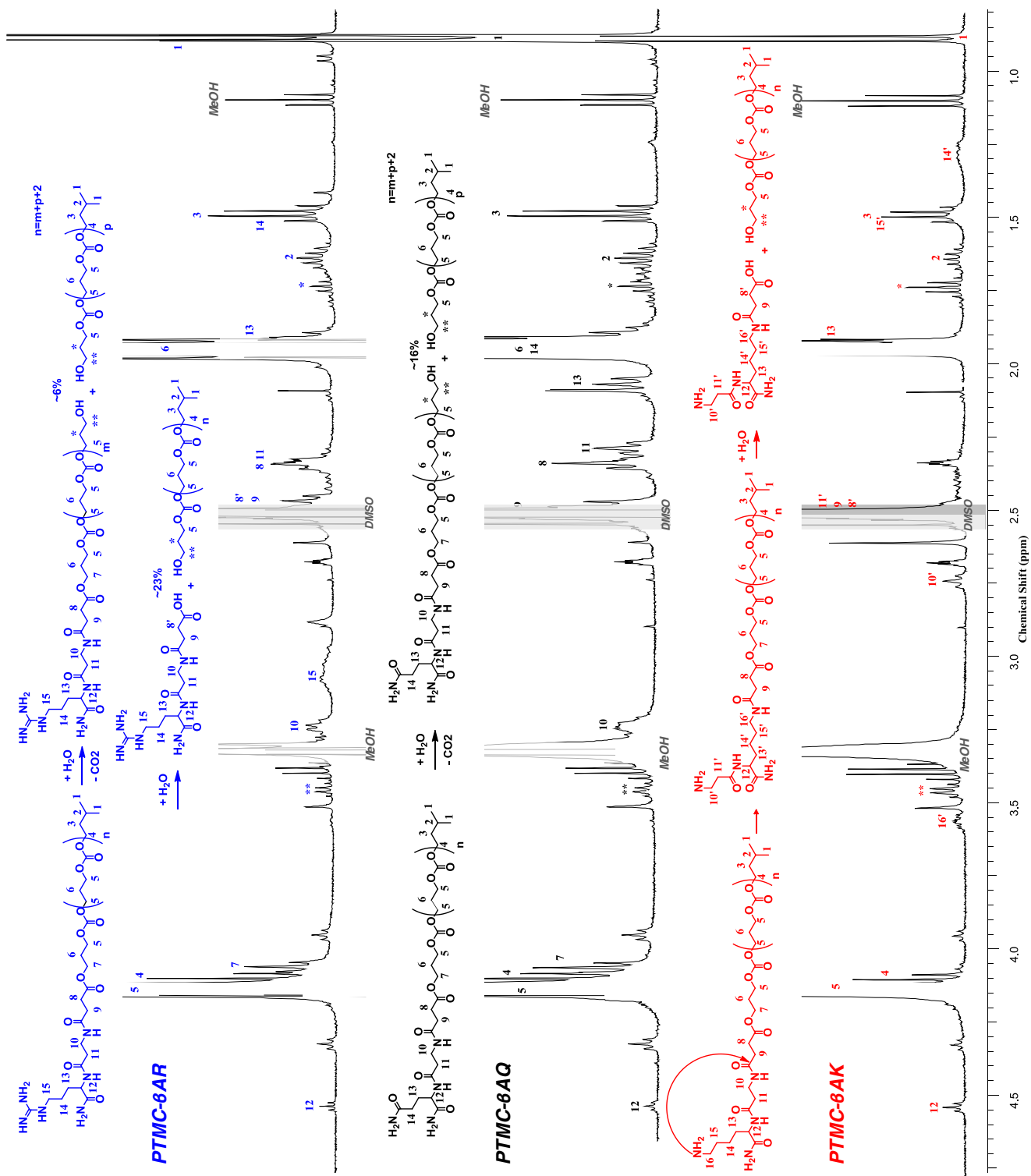


Figure S 3 - ¹H NMR spectra of PTMC₂₂-βAX (X=R,Q,K) in DMSO-d₆ after 7 days in ultrapure water without buffering in -presence of DIPEA.

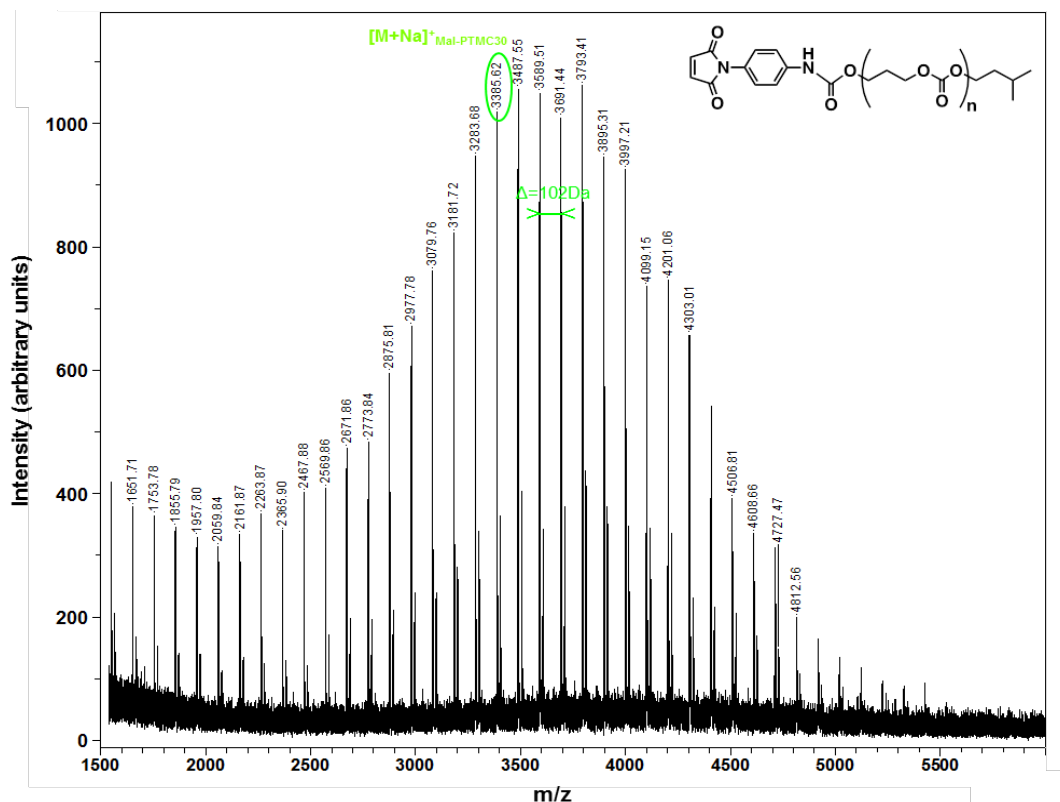


Figure S4 - MALDI-TOF spectrum of Mal-PTMC₃₀ (theoretical monocharged peak $[M+Na]^+ = 3386.07$ Da).

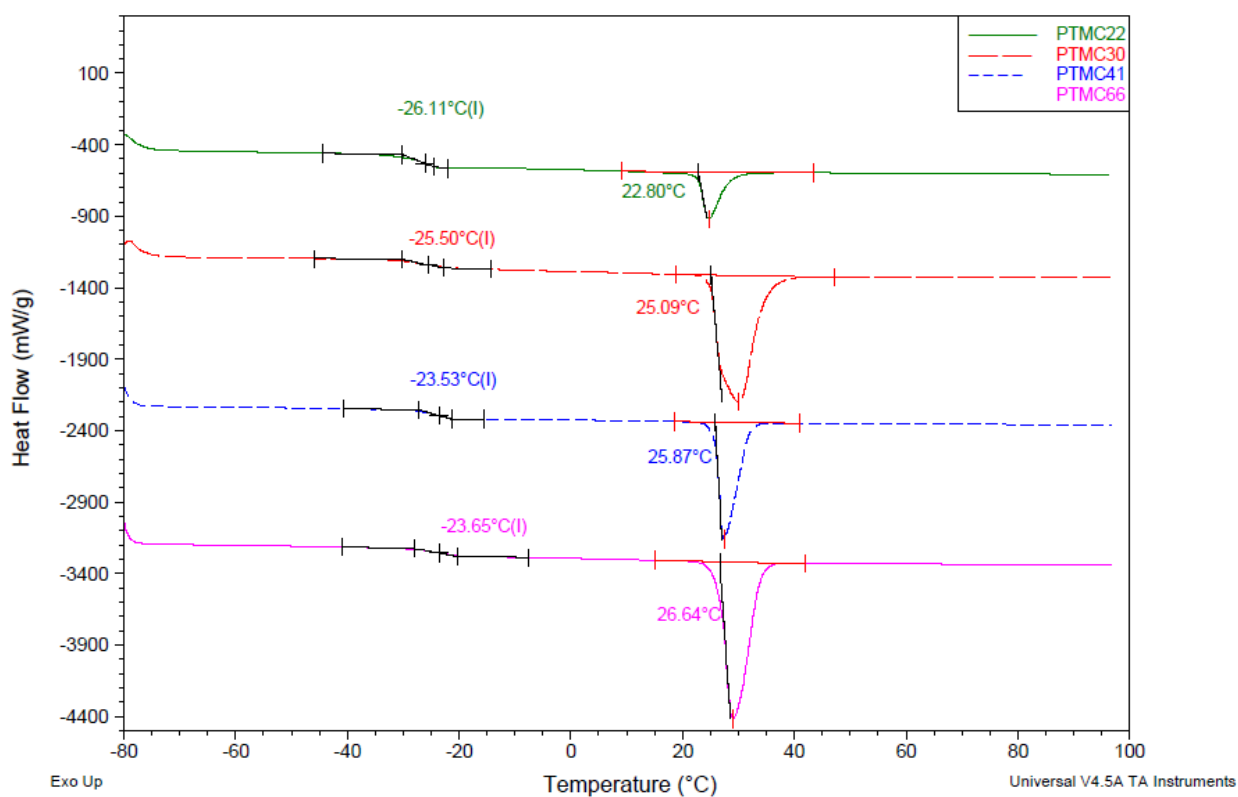


Figure S5 - DSC thermograms of PTMC₂₂, PTMC₃₀, PTMC₄₁ (14 months after synthesis) and PTMC₆₆ (3 months after synthesis)

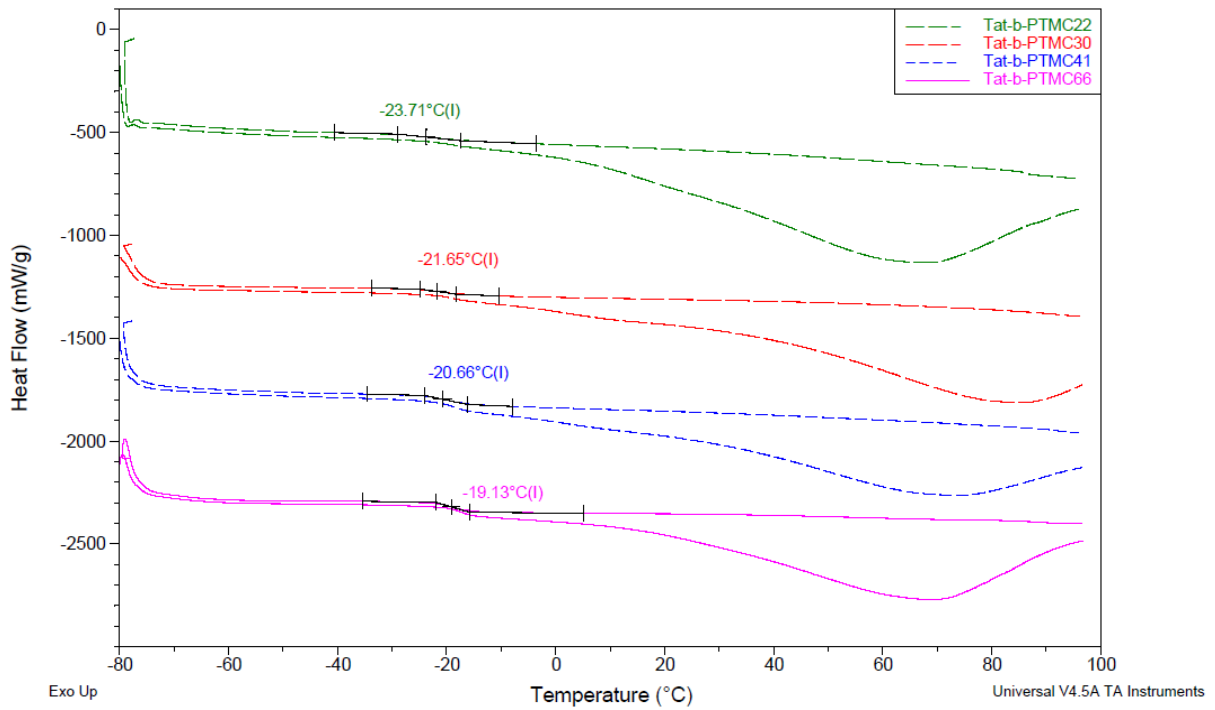


Figure S6 - DSC thermograms of Tat-*b*-PTMC copolymers (2 months after synthesis)

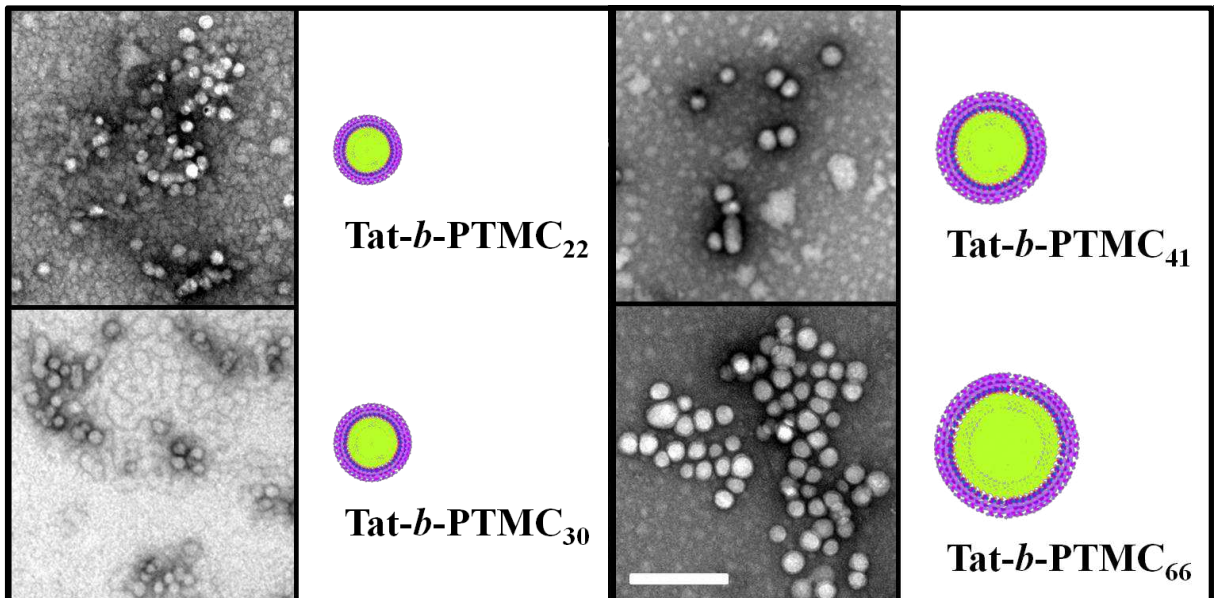


Figure S7 - TEM micrographs of Tat-*b*-PTMC micelles. Scale bar 200 nm.

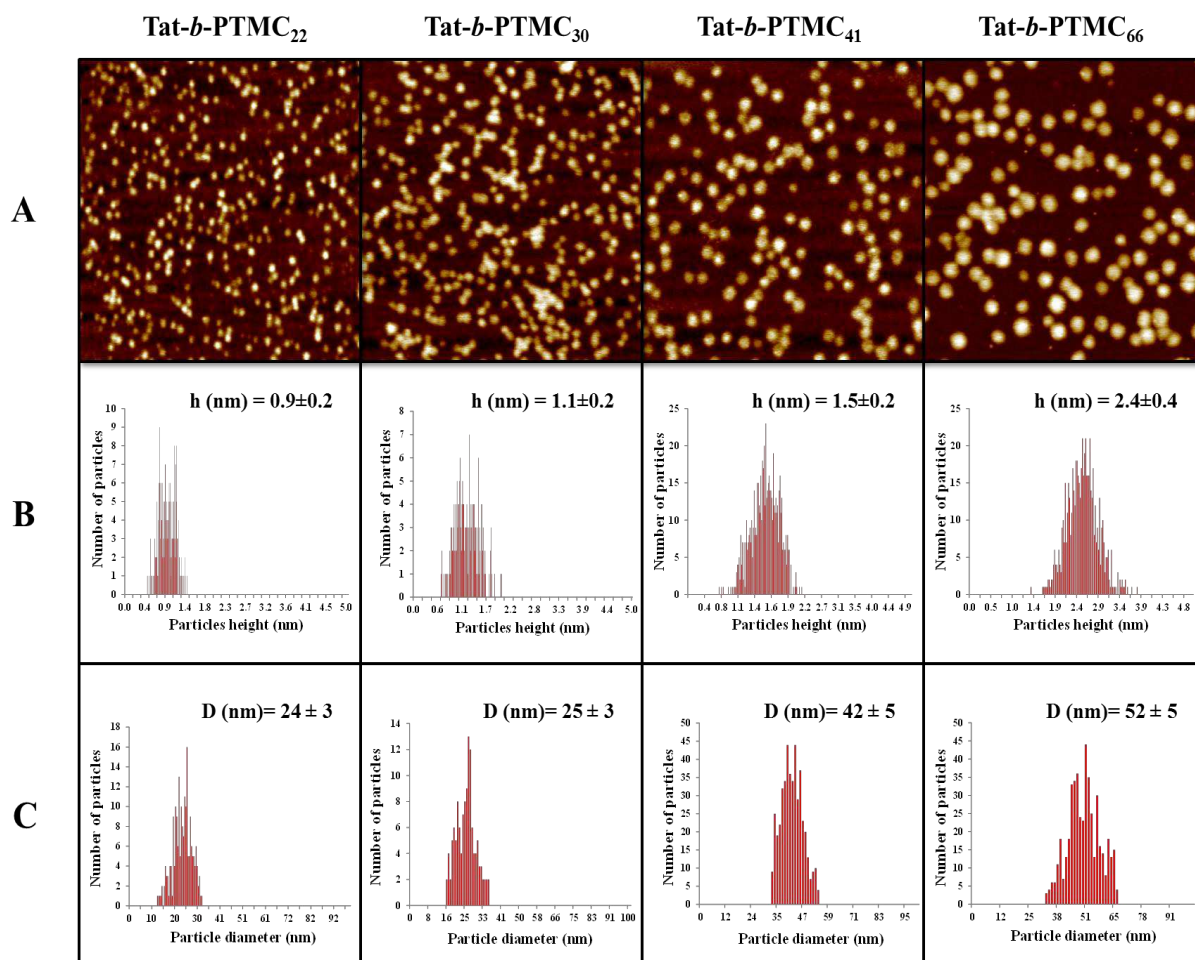


Figure S8 - Figure S16: Atomic Force Microscopy height images and statistical size analysis of Tat-*b*-PTMC nanoparticles. Panel A : Tapping mode AFM images 1x1 μm; panel B: Distributions of particles heights; panel C: Distributions of particles diameters

Appendix S1 - Dimensions from statistical analysis of the disk-like structures observed in AFM (diameter D_d radius R_d and height h_d) and estimation of the equivalent micelles radii R_{AFM}

The uniform and distinct spread of particles onto the mica surface allowed a statistical analysis of section dimensions. This spreading can be modelled as a disk-like structure. The radius of micelles (R_{AFM}) can then be estimated from the dimensions of the observed disks (diameter D radius R and height h), assuming that the volume of the disks (V) is equal to the volume of spherical micelles (V_{AFM}):

$$\text{Volume of spherical micelle: } V_{AFM} = \frac{4}{3} \pi R_{AFM}^3$$

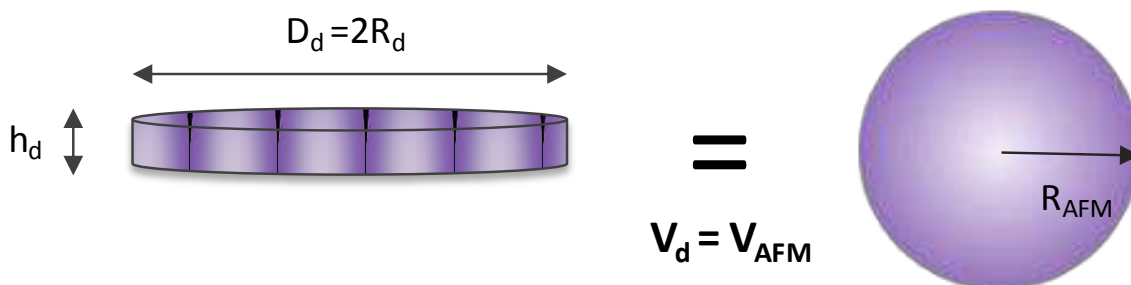
$$\text{Volume of disk: } V = \pi R^2 h$$

Assuming $V_{AFM} = V$, we obtained: $R_{AFM} = \left(\frac{3}{4}R^2h\right)^{\frac{1}{3}}$

Standard deviation calculation: $\frac{\Delta R_{AFM}}{R_{AFM}} = \frac{2}{3} \frac{\Delta R}{R} + \frac{1}{3} \frac{\Delta h}{h}$

As hydrodynamic radii (R_H , Table 1) were significantly larger than those calculated by AFM (approximately twice), we assumed that the solvation shell of the nanoparticles was rather significant, complying with the cationic nature of the hydrophilic layer.

DPn	D	R	h	R_{AFM}
22	24±3	12±2	0.9±0.2	4.6±0.8
30	25±3	12.5±1.5	1.1±0.2	5.1±0.7
41	42±5	21±3	1.5±0.2	7.9±1.1
66	52±5	26±3	2.4±0.4	10.7±1.4



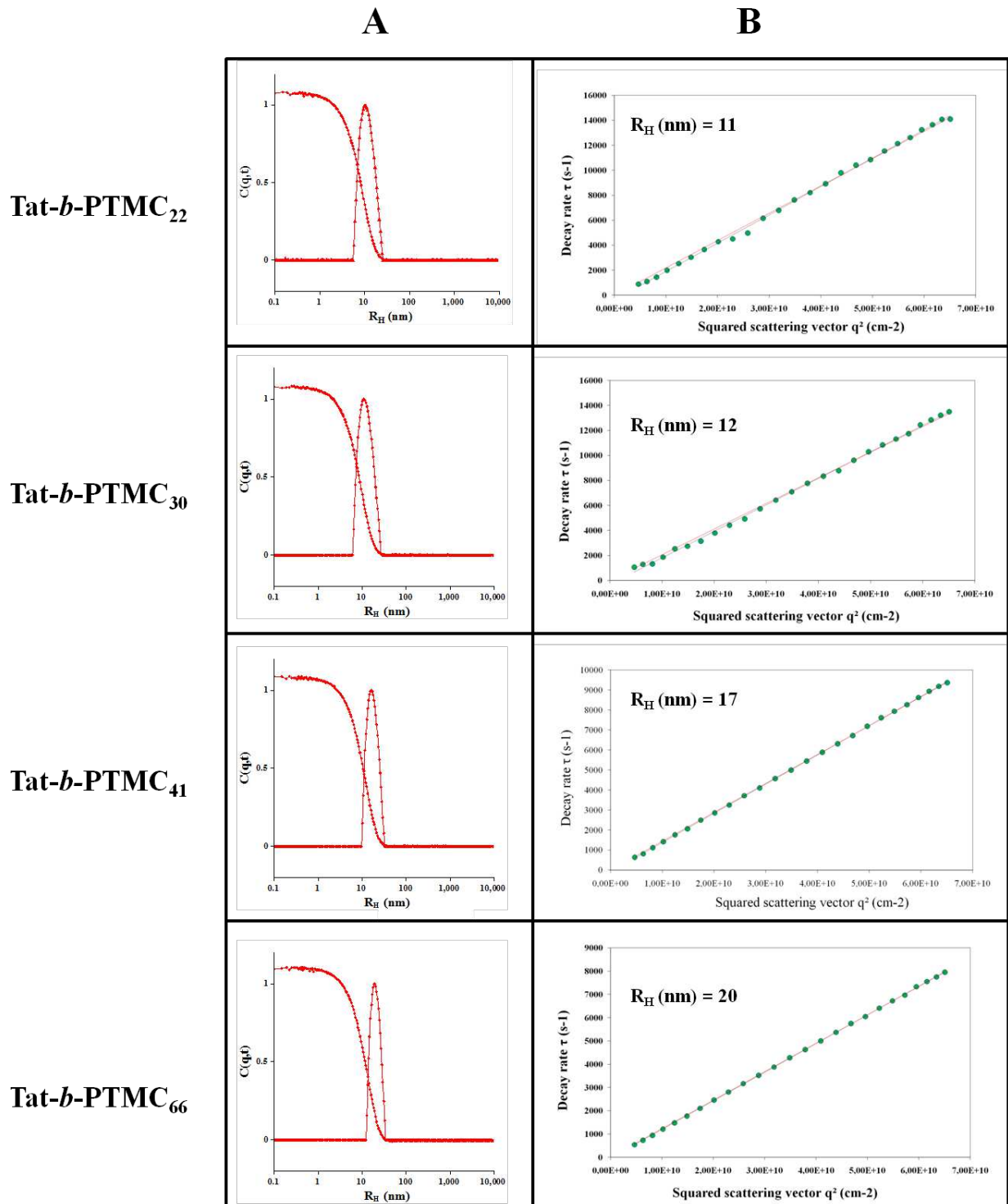


Figure S 9 - Multiangle Dynamic Light Scattering analysis of Tat-*b*-PTMC nanoparticles. Panel A: Relaxation curves and corresponding cumulant fits obtained (90°C angle); panel B: Variations of decay rate versus squared scattering vector with linear fits

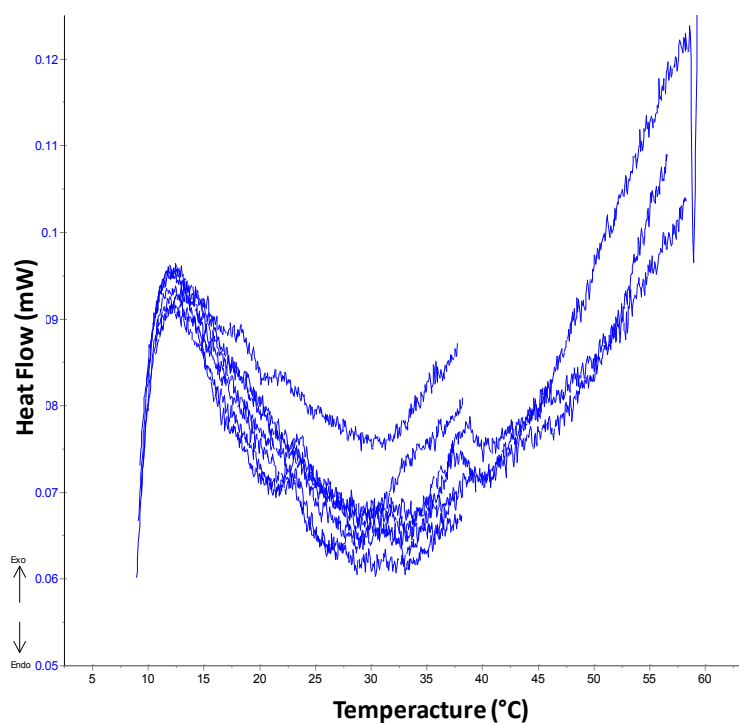


Figure S19 - DSC thermograms of Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles.

REFERENCES

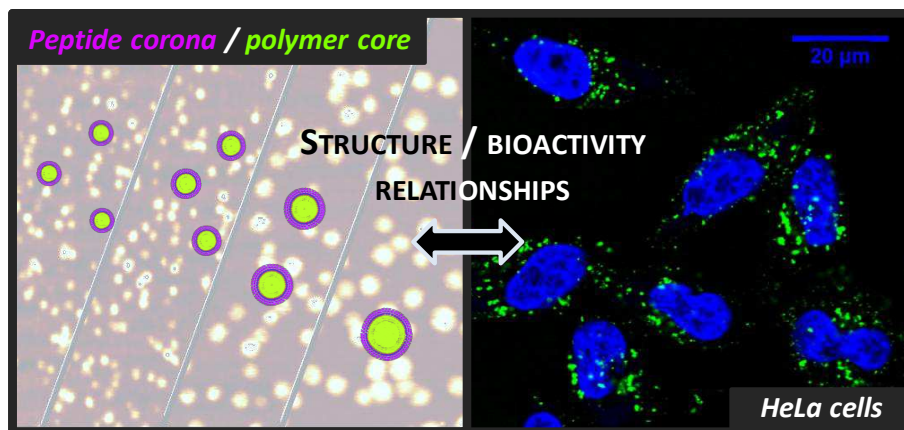
1. C. Drappier, A.-L. Wirotius, K. Bathany, E. Ibarboure, O. Condassamy, E. Garanger and S. Lecommandoux, *Polymer Chemistry*, 2013, **4**, 2011-2018.
2. C. Drappier, H. Oliveira, O. Sandre, E. Ibarboure, S. Combet, E. Garanger and S. Lecommandoux, *Faraday Discussions*, 2013, **166**, DOI: 10.1039/C1033FD00098B.
3. S. Jain and F. S. Bates, *Science*, 2003, **300**, 460-464.
4. D. E. Discher, *Science*, 2002, **297**, 967-973.
5. J. Rodríguez-Hernández, F. Chécot, Y. Gnanou and S. Lecommandoux, *Progress in Polymer Science*, 2005, **30**, 691-724.
6. A. Rösler, G. W. M. Vandermeulen and H.-A. Klok, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, **53**, 95-108.
7. A. Carlsen and S. Lecommandoux, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2009, **14**, 329-339.
8. H. G. Börner, *Progress in Polymer Science*, 2009, **34**, 811-851.
9. H.-A. Klok, *Macromolecules*, 2009, **42**, 7990-8000.
10. G. Fuks, R. Mayap Talom and F. Gauffre, *Chemical Society Reviews*, 2011.
11. I. C. Reynhout, J. J. L. M. Cornelissen and R. J. M. Nolte, *Accounts of Chemical Research*, 2009, **42**, 681-692.
12. M. L. Becker, J. Liu and K. L. Wooley, *Biomacromolecules*, 2004, **6**, 220-228.
13. M. G. J. ten Cate and H. G. Borner, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2007, **208**, 1437-1446.
14. J. Hentschel, K. Bleek, O. Ernst, J.-F. Lutz and H. G. Borner, *Macromolecules*, 2008, **41**, 1073-1075.

15. O. S. Rabotyagova, P. Cebe and D. L. Kaplan, *Biomacromolecules*, 2011, null-null.
16. N. K. Singha, M. I. Gibson, B. P. Koiry, M. Danial and H.-A. Klok, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 2908-2913.
17. M. Danial, M. J. Root and H.-A. Klok, *Biomacromolecules*, 2012.
18. A. Meszynska, N. Badi, H. G. Borner and J.-F. Lutz, *Chemical Communications*, 2012, **48**, 3887-3889.
19. J. M. Harris and R. B. Chess, *Nat Rev Drug Discov*, 2003, **2**, 214-221.
20. C. Schatz, S. Louguet, J. F. L. Meins and S. Lecommandoux, *Angewandte Chemie - International Edition*, 2009, **48**, 2572-2575.
21. K. K. Upadhyay, A. N. Bhatt, A. K. Mishra, B. S. Dwarakanath, S. Jain, C. Schatz, J.-F. Le Meins, A. Farooque, G. Chandraiah and A. K. Jain, *Biomaterials*, 2010, **31**, 2882-2892.
22. C. Sanson, O. Diou, J. Thévenot, E. Ibarboure, A. Soum, A. Brûlet, S. Miraux, E. Thiaudière, S. Tan, A. Brisson, V. Dupuis, O. Sandre and S. Lecommandoux, *ACS Nano*, 2011, **5**, 1122-1140.
23. J. Huang, C. Bonduelle, J. Thévenot, S. Lecommandoux and A. Heise, *Journal of the American Chemical Society*, 2012, **134**, 119-122.
24. C. Sanson, J. F. Le Meins, C. Schatz, A. Soum and S. Lecommandoux, *Soft Matter*, 2010, **6**, 1722.
25. C. Sanson, C. Schatz, J.-F. o. Le Meins, A. Brûlet, A. Soum and S. b. Lecommandoux, *Langmuir*, 2010, **26**, 2751-2760.
26. A. D. Frankel and C. O. Pabo, *Cell*, 1988, **55**, 1189-1193.
27. E. Vivès, P. Brodin and B. Lebleu, *Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**, 16010-16017.
28. K. S. Rao, M. K. Reddy, J. L. Horning and V. Labhasetwar, *Biomaterials*, 2008, **29**, 4429-4438.
29. M. C. Morris, S. Deshayes, F. Heitz and G. Divita, *Biology of the Cell*, 2008, **100**, 201-217.
30. A. Mishra, G. H. Lai, N. W. Schmidt, V. Z. Sun, A. R. Rodriguez, R. Tong, L. Tang, J. Cheng, T. J. Deming, D. T. Kamei and G. C. L. Wong, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, **108**, 16883-16888.
31. B. Gupta, T. S. Levchenko and V. P. Torchilin, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, **57**, 637-651.
32. T. Vladimir P, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, **60**, 548-558.
33. S. Santra, H. Yang, J. T. Stanley, P. H. Holloway, B. M. Moudgil, G. Walter and R. A. Mericle, *Chemical Communications*, 2005, 3144-3146.
34. Z. e. Krpetić, S. Saleemi, I. A. Prior, V. Sée, R. Qureshi and M. Brust, *ACS Nano*, 2011, **5**, 5195-5201.
35. X. B. Xiong and A. Lavasanifar, *ACS Nano*, 2011, **5**, 5202-5213.
36. E. Garanger and S. Lecommandoux, *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, **51**, 3060-3062.
37. E. P. Holowka, V. Z. Sun, D. T. Kamei and T. J. Deming, *Nature Materials*, 2006, **6**, 52-57.
38. X.-D. Xu, J.-X. Chen, H. Cheng, X.-Z. Zhang and R.-X. Zhuo, *Polymer Chemistry*, 2012, **3**, 2479-2486.
39. Y. Kim, S. Binauld and M. H. Stenzel, *Biomacromolecules*, 2012, **13**, 3418-3426.
40. N. A. Christian, M. C. Milone, S. S. Ranka, G. Li, P. R. Frail, K. P. Davis, F. S. Bates, M. J. Therien, P. P. Ghoroghchian, C. H. June and D. A. Hammer, *Bioconjugate Chemistry*, 2006, **18**, 31-40.
41. K. Tanaka, T. Kanazawa, Y. Shibata, Y. Suda, T. Fukuda, Y. Takashima and H. Okada, *International Journal of Pharmaceutics*, 2010, **396**, 229-238.
42. S. F. M. Van Dongen, W. P. R. Verdurmen, R. J. R. W. Peters, R. J. M. Nolte, R. Brock and J. C. M. Van Hest, *Angewandte Chemie - International Edition*, 2010, **49**, 7213-7216.
43. H. Y. Nam, J. Kim, S. Kim, J. W. Yockman, S. W. Kim and D. A. Bull, *Biomaterials*, 2011, **32**, 5213-5222.
44. T. Kanazawa, K. Sugawara, K. Tanaka, S. Horiuchi, Y. Takashima and H. Okada, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2012, **81**, 470-477.
45. Y. S. Nam, J. Y. Park, S.-H. Han and I.-S. Chang, *Biotechnology Letters*, 2002, **24**, 2093-2098.

46. R. J. Pounder, M. J. Stanford, P. Brooks, S. P. Richards and A. P. Dove, *Chemical Communications*, 2008, 5158-5160.
47. C. O. Kappe, *Angewandte Chemie International Edition*, 2004, **43**, 6250-6284.
48. S. Abramkin, S. M. Valiahdi, M. A. Jakupec, M. Galanski, N. Metzler-Nolte and B. K. Keppler, *Dalton Transactions*, 2012, **41**, 3001-3005.
49. M. Le Hellaye, N. Fortin, J. Guilloteau, A. Soum, S. Lecommandoux and S. M. Guillaume, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 1924-1933.
50. C. S. Johnson Jr, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 1999, **34**, 203-256.
51. Y. Bakkour, V. Darcos, S. Li and J. Coudane, *Polymer Chemistry*, 2012, **3**, 2006-2010.
52. D. Kunz, A. Thurn and W. Burchard, *Colloid & Polymer Sci*, 1983, **261**, 635-644.
53. A. Brulet, D. Lairez, A. Lapp and J.-P. Cotton, *Journal of Applied Crystallography*, 2007, **40**, 165-177.
54. J. S. Pedersen, *Advances in Colloid and Interface Science*, 1997, **70**, 171-210.

CHAPITRE 3

ETUDE *IN VITRO* SUR CELLULES HELa



Mots clefs: nanoparticules pour l'internalisation cellulaire, micelles mixtes, cellules HeLa, microscopie confocale à fluorescence, cytométrie en flux, endocytosis, test de viabilité au MTT, IC₅₀

Keywords: cell-penetrating nanoparticles, mixed micelles, HeLa cells, confocal fluorescence microscopy, flow cytometry, endocytosis, MTT viability assay, IC₅₀

Résumé: Les propriétés d'internalisation de deux populations de micelles à base de Tat-b-PTMC₃₀ et de Tat-b-PTMC₆₆, ont été étudiées *in vitro* sur des cellules HeLa par cytométrie en flux et par microscopie confocale de fluorescence. Les nanoparticules s'avèrent être rapidement recrutées puis internalisées par les cellules, la cinétique de ce phénomène étant légèrement plus rapide pour les micelles de Tat-b-PTMC₃₀, d'un diamètre hydrodynamique de 22 nm, que pour les micelles de Tat-b-PTMC₆₆, d'un diamètre de 40 nm. Les résultats de cette même expérience conduite à 4°C, ainsi que la distribution intracellulaire ponctuelle de la fluorescence associée aux nanoparticules à 37°C, suggèrent un mécanisme en deux étapes, pour lequel l'internalisation intra-cytoplasmique des nanoparticules par endocytose est précédée de leur accumulation et de leur adhésion massive sur la membrane des cellules. Afin de mieux comprendre ce phénomène et la façon dont il est influencé par la densité de peptide à la surface des nanoparticules, des micelles mixtes ont été préparées à partir de mélanges de Tat-b-PTMC₃₀ et de copolymère PEG-b-PTMC₃₈ aux contenus croissants en chimères de 0, 25, 50, 75 et 100 %w/w. Les nanoparticules obtenues, toutes de morphologie micellaire sphérique, présentent un diamètre variant de 21 nm à 31 nm et un potentiel zeta nettement positif en présence de chimère allant de + 20 à + 40 mV. *In vitro*, leur accumulation à la surface des cellules croît de façon non-linéaire avec le rapport de chimère qu'elles contiennent. En revanche, leur propension à être effectivement internalisées dans les cellules par endocytose semble peu affectée par ce paramètre. Enfin, l'impact des micelles sur la viabilité des cellules a été évalué à différentes concentrations et temps d'incubation via un test colorimétrique au MTT à l'issue d'une période de croissance de 72 hrs. Leurs concentrations inhibitrices médianes (IC₅₀), de l'ordre 50 µg/ml, ont été calculées à partir des courbes dose-réponses obtenues. Sur la gamme de composition testée (25 à 100%_{w/w} en Tat-b-PTMC₃₀), la viabilité cellulaire s'avère bien plus impactée par la quantité de nanoparticules internalisées que par leur contenu en chimère.

Une grande partie des résultats présentés dans ce chapitre a été publiée dans le volume 166 des Faraday Discussions intitulé « Self-assembly of biopolymers ». ¹

1. C. Drappier, H. Oliveira, O. Sandre, E. Ibarboure, S. Combet, E. Garanger and S. Lecommandoux, *Faraday Discussions*, 2013, **166**, DOI: 10.1039/C1033FD00098B.

CHAPTER 3

IN VITRO EVALUATION ON HELA CELLS

INTRODUCTION	175
I. <i>IN VITRO</i> PROPERTIES OF TAT-<i>b</i>-PTMC₃₀ AND TAT-<i>b</i>-PTMC₆₆ MICELLES ON HELA CELLS	176
I.1. CELLULAR UPTAKE STUDIES	176
<i>I.1.1. Internalization kinetics</i>	<i>177</i>
<i>I.1.2. Internalization mechanism</i>	<i>179</i>
I.2. CELL VIABILITY EVALUATION	180
II. MODULATION OF TAT PEPTIDE-DENSITY IN THE CORONA OF TAT-<i>b</i>-PTMC₃₀ MICELLES	181
II.1. PREPARATION AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF MIXED TAT- <i>b</i> -PTMC ₃₀ /PEG- <i>b</i> -PTMC ₃₈ NANOPARTICLES	181
II.2. IMPACT OF TAT-PEPTIDE DENSITY ON CELLULAR UPTAKE	182
<i>II.2.1. Internalization Kinetics.....</i>	<i>182</i>
<i>II.2.2. Internalization mechanism.....</i>	<i>184</i>
II.3. IMPACT OF TAT PEPTIDE-DENSITY ON CELL VIABILITY	184
CONCLUSION	185
EXPERIMENTAL SECTION	187
SUPPORTING INFORMATION	191
REFERENCES	193

INTRODUCTION

Poor permeability of cellular membrane is a major issue in pharmacology. This physical barrier prevents molecules to access many relevant intracellular as well as targets located in tissues protected by similar barriers (e.g. brain protected by BBB or cells beneath the skin). Developing tools to enhance cellular translocation of therapeutic compounds is of prime importance to improve their efficacy and to expand the scope of “drugable” targets.

In the 90's, several natural proteins, like HIV-1 transcription transactivator protein (TAT),^{2,3} or the Antennapedia homeoprotein of *drosophila melanogaster*,⁴ were found to be spontaneously internalized by cells. Following these seminal works, chemists, biologists and biophysicists endeavored to understand the mechanisms ruling this phenomenon, to identify critical molecular parameters involved and to design synthetic alternatives with optimal transduction properties. The concept of cell-penetrating peptides (CPP) thus emerged designating peptide sequences presenting translocation properties, either derived from natural proteins (protein transduction domain-PTD) or selected by high throughput screening on peptide libraries.⁵⁻⁸

The field of nanomedicine, relying on the use of nanosized colloids for drug delivery and imaging, is attempting to solve other major pharmacological issues, such as low aqueous solubility of chemotherapeutics, non-specific biodistribution of toxic drugs leading to severe side-effect and low biodisponibility of easily degradable therapeutics. Nonetheless, biological membranes and tissues are no more permeable to nanosized carriers than to smaller molecules. Therefore, equipping nanoparticles with cell penetrating motifs has aroused as an attractive alternative to access versatile delivery devices providing long circulation time and promoting cellular internalization of various ranges of cargoes.^{9,10}

Twenty years after their discovery, the CPP family has considerably enlarged but none of them has been more studied and popular than the protein transduction domain Tat₄₉₋₅₇ (RKKRRQRRR) of HIV-1 TAT protein identified by Vives and his collaborators in 1997¹¹ and well-known under the name of Tat peptide. This 9-residue long cell-penetrating sequence has been shown to promote the intracellular import of a wide variety of molecular cargoes, from small therapeutic molecules to large proteins and nanometer-sized particles, with great success and in an impressive range of cell types.^{12,13} However, although it is now admitted that the first contact of the peptide with cells is mediated by electrostatic interactions between positively-charged basic residues of the peptide and negatively charges membrane biomolecules, the exact mechanism of cellular entry is still being discussed and has been shown to highly depend on cell type,^{14,15} concentration,¹⁶ as well as chemical nature and dimension of the conveyed cargo.¹⁷ Therefore, the behavior of Tat-functionalized nanoparticles in biological contexts and the way it is possibly impacted by chemical and colloidal parameters, such as

the nanoparticle size and global charge as well as the content and surface density of the peptide, is far from predictable *a priori* and hence must be carefully investigated.

In the previous chapter, we have described the precision synthesis of a series of Tat-*b*-PTMC chimeras with different hydrophilic weight fractions, featuring the Tat₄₇₋₅₇ cell-penetrating sequence as hydrophilic block and hydrophobic biocompatible, low-Tg poly(trimethylene carbonate) (PTMC) segments of variable lengths. Once self-assembled by direct dissolution in TRIS buffer, these amphiphilic conjugates formed highly monodisperse and stable core-shell nanometer-sized particles with constant Tat-peptide surface density and gradually increasing diameters. In the present study, we aimed at correlating physico-chemical characteristics of these nanoparticles with their biological properties. Presenting a Tat-rich corona, strongly positively charged, these micelles are expected to present remarkable cell transduction ability, but also substantial toxicity. We thus selected two chimeras among the previous series, featuring PTMC blocks with polymerization degree (DP_n) of 30 (Tat-*b*-PTMC₃₀) and 66 (Tat-*b*-PTMC₆₆) and forming micelles with respective hydrodynamic radii (R_H) of 12 nm and 20 nm, so as to examine these two properties *in vitro* on HeLa cells and assess how they are affected by micelles dimension, using a combination of flow cytometry and confocal microscopy techniques. The same biological experiments were also conducted on nanoparticles of similar size but with variable Tat-peptide content. To this aim, micelles obtained from the co-assembly of Tat-*b*-PTMC₃₀ chimera and PEG-*b*-PTMC₃₈ were thus investigated to point out the impact of the density of the bioactive Tat peptide at the surface of nanoparticles over their internalization mode and inherent toxicity.

I. IN VITRO PROPERTIES OF TAT-*b*-PTMC₃₀ AND TAT-*b*-PTMC₆₆ MICELLES ON HELA CELLS

I.1. CELLULAR UPTAKE STUDIES

Regarding the powerful cell-penetrating properties of Tat₄₇₋₅₇ peptide,^{2, 3, 11, 18} originally stemming from the protein transduction domain of the transcription transactivator protein (TAT) of HIV-1,¹⁹ Tat-*b*-PTMC₃₀ and Tat-*b*-PTMC₆₆ micelles were expected to present remarkable cell transduction ability due to the multivalent presentation of the peptide in the corona.²⁰ The cellular uptake process was thus investigated *in vitro* on the HeLa cell line model, which is a standard cancer cell line widely used for preliminary *in vitro* biological experiments. Micelles with a hydrodynamic diameter of 26 nm and 0.06 polydispersity index, obtained from the self-assembly of a PEG-*b*-PTMC₃₃ block copolymer featuring a 2,000 g/mol molecular weight as hydrophilic block were used as negative control. In order

to enable their detection by fluorescence, nanoparticles were labelled by incorporating 3% w/w Fluorescein-PTMC₃₀ (Scheme S1) into the bulk Tat-*b*-PTMC chimeras (or PEG-*b*-PTMC₃₃ block copolymer) prior to self-assembly. This amount of labelling was sufficient to ensure proper detection by fluorescence and low enough to prevent any deleterious effect on the self-assembly mechanism. The procedure also insured equal fluorescence intensity per weight of particle for the three different formulations, namely Tat-*b*-PTMC₃₀, Tat-*b*-PTMC₆₆ and PEG-*b*-PTMC₃₃.

I.1.1. INTERNALIZATION KINETICS

Cell internalization kinetics was first addressed by incubating HeLa cells with nanoparticles over a variable time course, from 15 min to 4 hrs. The effective intracellular uptake was qualitatively evidenced by laser scanning confocal microscopy (LSCM) imaging, and quantitatively measured by flow cytometry (Figure 1). The capacity of Tat-*b*-PTMC micelles to be readily internalized by cells was revealed by the green punctual intracellular pattern of fluorescence observed by LSCM, suggesting nanoparticles confinement into cytoplasmic vesicular compartments (Figure 1, panel C). No signal was detected inside nuclei indicating that, in the current experimental conditions, the tested formulations, most probably trapped in endosomes, were not given the chance to reach, and possibly to cross, the nuclear membrane. As measured by FACS, 100% cells were positive after 2 hrs of exposure with nanoparticles, and their mean fluorescence intensity was at least 10³ times higher for Tat-*b*-PTMC micelle-treated cells as compared to non-treated cells (Figure 1, panels A and B). Cell uptake occurred in homogenous fashion as evidenced by the presence of a single fluorescent cell population on FACS histograms (Figure S1). However, smaller nanoparticle size seemed to favour internalization in the tested conditions since cells treated with Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles presented faster kinetics of internalization than those treated with the larger Tat-*b*-PTMC₆₆ micelles as evidenced by the faster increase of mean fluorescence intensity (Figure 1, panel B). In contrast, nearly no fluorescence was detected by FACS and LSCM for PEG-*b*-PTMC₃₃ micelles-treated cells, confirming that the Tat₄₇₋₅₇ segment is entirely responsible for the cell-penetrating properties of Tat-*b*-PTMC self-assemblies.

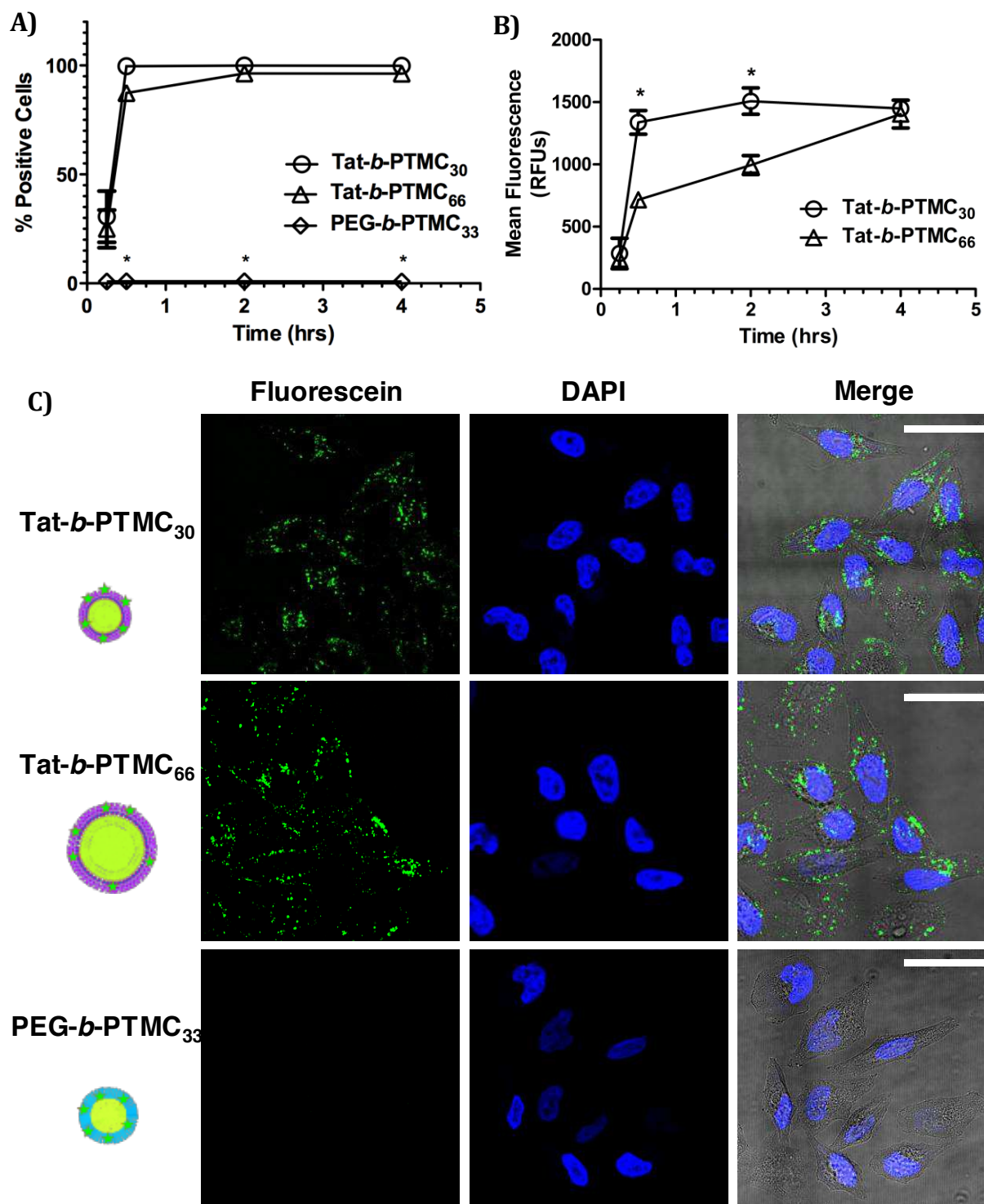


Figure 1- (A) Percentage of fluorescein-positive cells and (B) mean fluorescence intensity obtained from flow cytometry analysis of HeLa cells incubated for 15, 30 min, 2 and 4 hrs with fluorescein-labelled Tat-*b*-PTMC₃₀ (○), Tat-*b*-PTMC₆₆ (Δ), and PEG-*b*-PTMC₃₃ (◇) nanoparticles at 50 μg.mL⁻¹ (optimal dose providing sufficient signal without saturating the totality of the cells). * denotes statistical significant differences (p<0.05) between: PEG-*b*-PTMC₃₃ and Tat-*b*-PTMC formulations at the same time points (A) and both Tat-*b*-PTMC formulations at the same time points (B). (C) Laser scanning confocal microscopy images of HeLa cells after 30 min-incubation with nanoparticle formulations. Cell nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar = 30 μm.

I.1.2. INTERNALIZATION MECHANISM

We secondly questioned whether the internalization mechanism of Tat-*b*-PTMC micelles was energy-dependent and thus involved an active endocytotic process. To address this point, cells were incubated with nanoparticles for 30 min at 4°C instead of 37°C, low temperature conditions inhibiting ATP-dependent processes. As observed by flow cytometry studies, a significant decrease of fluorescein-positive cells was measured when cells were incubated at 4°C in comparison with the 37°C condition (Figure 2, panel A). Because the fluorescence signal at 4°C was not null, we used LSCM imaging in order to discriminate nanoparticles cellular localization in each condition. Z-stack 3D reconstructions clearly showed that when incubated at 4°C, fluorescein-labelled Tat-*b*-PTMC micelles were located at the cell membrane, while located inside the cytoplasm at 37°C (Figure 2, panel B and movies provided on the web as supplementary information of the related publication^{1,a}).

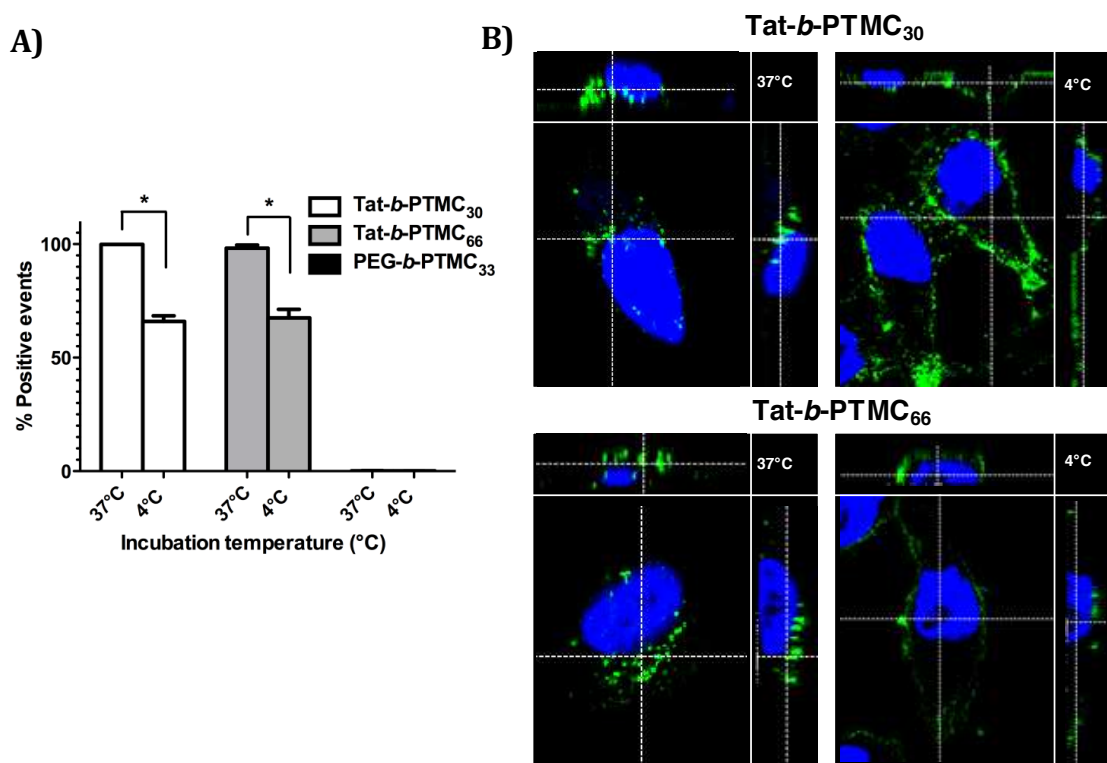


Figure 2 - Cellular uptake inhibition study at 4°C. (A) Percentage of fluorescein-positive cells obtained from flow cytometry analyses and **(B)** 3D LSCM reconstructions of HeLa cells incubated for 30 min at 37°C or 4°C with 50 µg.mL⁻¹ fluorescein-labelled Tat-*b*-PTMC₃₀ and Tat-*b*-PTMC₆₆ nanoparticles. Cell nuclei were stained with DAPI (blue). * denotes statistical significant differences between indicated groups, p < 0.05.

We assume a 2-step mechanism for the uptake process to occur, which is fully consistent with what has been previously reported in the literature for Tat peptide and Tat-peptide functionalised systems (Figure 3).²¹ Regarding their highly cationic and arginine-rich surface, nanoparticles are first adsorbed

^a <http://cyber.bu.u-bordeaux1.fr:2225/en/content/articlelanding/2013/fd/c3fd00098b#!divAbstract>

onto the outside cell membrane by means of electrostatic interactions and hydrogen bonding with negatively membrane constituting-charged species (e.g. glycoproteins, phospholipids).²²⁻²⁴ In a second step, they are internalized by an energy-dependent endocytotic mechanism. At 4°C, the first step still occurs as measured by FACS, but the second one is inhibited as evidenced by microscopy. These experiments however do not permit to point out the exact mechanism of Tat-*b*-PTMC micelles internalization (e.g. clathrin-dependent endocytosis, caveolae-mediated endocytosis, macropinocytosis, etc.). To address this point, additional experiments using specific chemical inhibitors of the different endocytosis pathways would need to be performed.

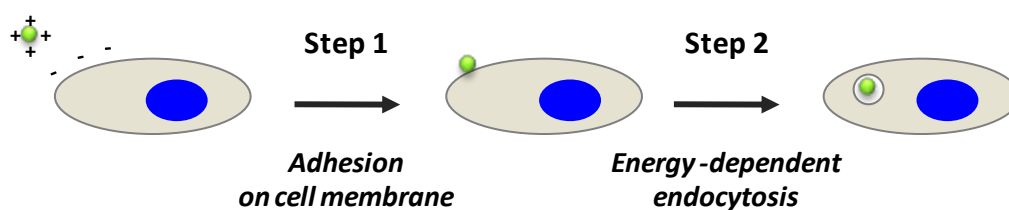


Figure 3 – Two-step mechanism proposed for the cellular uptake of Tat-*b*-PTMC micelles.

I.2. CELL VIABILITY EVALUATION

Presenting a strong positively charged surface as evidenced by highly positive zeta potential values (see chapter 2), a substantial cellular toxicity can as well be expected from Tat-*b*-PTMC micelles considering previous studies of poly(L-lysine)-based drug delivery systems or poly(ethylenimine) (PEI) complexes.²⁵⁻²⁷ In parallel with cellular uptake studies, the long-term viability of Tat-*b*-PTMC nanoparticles-treated cells was thus assessed using the MTT cell metabolic activity assay. HeLa cells were incubated for 72 hrs (a time long enough to reveal eventual toxicity exerted by nanoparticles) with increasing nanoparticle concentrations. Metabolic activity, directly related to cell viability, was measured by spectrophotometry *via* the reduction of MTT into the colored formazan product by active mitochondrial dehydrogenases. We here stress out that the MTT assay provides information on cell metabolic activity, and thus cell viability, but does not enable to discriminate the cell fates (i.e. inhibition of cell proliferation, cell mortality by necrosis or apoptosis) or to identify the exact mechanism of toxicity. Representative dose-response curves are presented in figure 4 (panel A). A half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of approximately $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was calculated from 3 independent experiments for both Tat-*b*-PTMC₃₀ and Tat-*b*-PTMC₆₆ formulations, while control PEG-*b*-PTMC₃₃ micelles did not affect cell metabolic activity. When exposed over a variable time course, respectively 30 min, 4 hrs and 72 hrs, at a constant $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ nanoparticle concentration (near the IC_{50} value), HeLa cells did not show significantly different metabolic activity (except for Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles between 30 min and 72 hrs time points) (Figure 4, panel B). This suggests that the “toxicity”

of micelles is directly correlated to their rapid and complete cellular uptake mentioned above. Indeed, once exceeding the time for most nanoparticles to be taken up by cells (about 1 hr according to kinetics shown on figure 1), the time of exposure of HeLa cells to Tat-*b*-PTMC nanoparticles has very little effect on their viability.

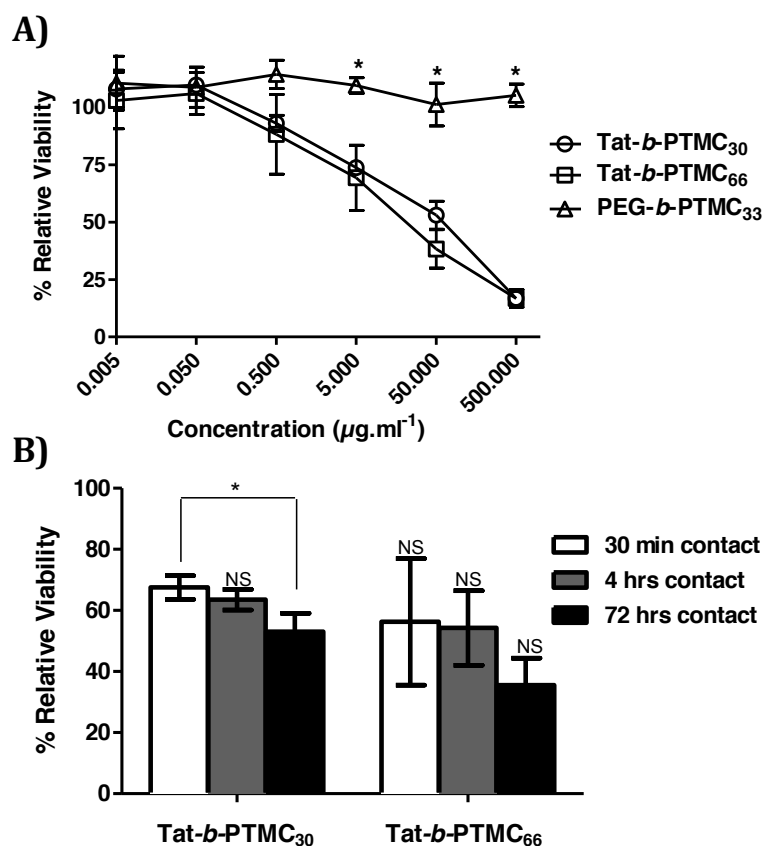


Figure 4 - Viability of HeLa cells incubated (A) for 72 hrs with increasing concentrations of nanoparticles, and (B) with nanoparticle formulations at $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for different time period. * denotes statistical significant differences between indicated groups, $p < 0.05$. NS indicates no statistical significant differences between groups at different times for the same formulation.

II. MODULATION OF TAT PEPTIDE-DENSITY IN THE CORONA OF TAT-*b*-PTMC₃₀ MICELLES

II.1. PREPARATION AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF MIXED TAT-*b*-PTMC₃₀/PEG-*b*-PTMC₃₈ NANOPARTICLES

In order to understand the impact of the bioactive Tat peptide density on the surface of nanoparticles, and possibly to clarify their internalization mechanism, we prepared core-shell micelles

with variable Tat-*b*-PTMC₃₀ chimera content. This was achieved by formulating mixed nanoparticles from a blend of Tat-*b*-PTMC₃₀ chimera and PEG-*b*-PTMC₃₈ block copolymer (M_w PEG=2000 g/mol), with an increasing ratio of Tat-*b*-PTMC₃₀, presently 0, 25, 50, 75 and 100%. As PEG-*b*-PTMC₃₈ self-assembly *via* direct dissolution did not provide nanoparticle dispersions with sufficiently low polydispersity, the different formulations were prepared by a solvent displacement method.²⁸ Spherical micellar nanoparticles were obtained with a hydrodynamic diameter size ranging from 20 to 31 nm depending on the ratio of Tat-*b*-PTMC₃₀ (Figure 5). The high homogeneity of the dispersions with polydispersity indexes between 0.05 and 0.15 indicated the formation of a sole population of nanoparticles with PEG- and Tat-containing blocks randomly distributed within their hydrophilic corona (Figure S2). Zeta potential values almost linearly increased with the amount of cationic Tat peptide in formulations containing 25% to 100% Tat, while a slightly negative value for plain PEG-*b*-PTMC₃₈ micelles (0% Tat) was found (Figure 5).

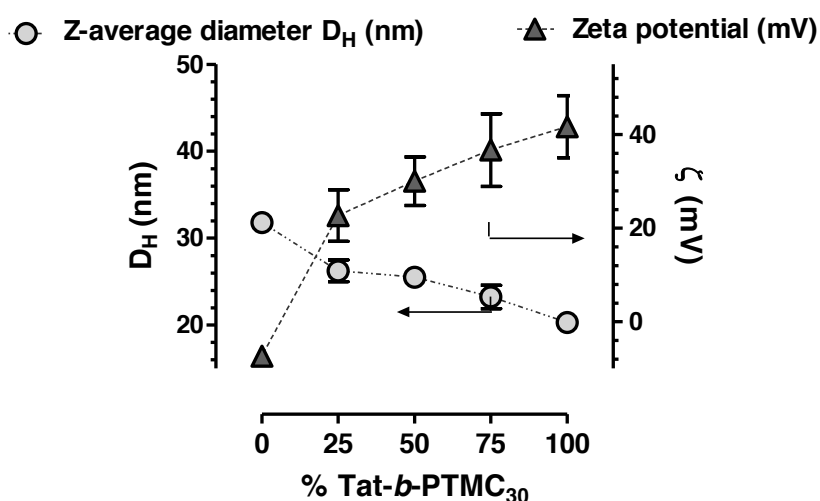


Figure 5 - Physico-chemical characteristics of mixed nanoparticles obtained from X% Tat-*b*-PTMC₃₀ / (1-X) % PEG-*b*-PTMC₃₈ blends.

II.2. IMPACT OF TAT-PEPTIDE DENSITY ON CELLULAR UPTAKE

II.2.1. INTERNALIZATION KINETICS

The different nanoparticle formulations were further assayed *in vitro* in a similar fashion to plain Tat-*b*-PTMC core-shell micelles (*vide supra*). As an enriched Tat-peptide corona implies a direct increase in guanidinium motifs at the surface of nanoparticles, one can expect implications at two different levels: at the molecular scale, the more Tat-peptide, the more interactions with cell-surface biomolecules through ionic associations and hydrogen bonding, and at the nanoscale with an increase of nanoparticles global charge.^{24, 29}

Cell internalization kinetics was studied as previously by incubating HeLa cells for 30 min and 24 hrs with the different formulations of fluorescein-labelled Tat-*b*-PTMC₃₀/PEG-*b*-PTMC₃₈ mixed micelles at 50 µg.mL⁻¹.

At 30 min, as envisioned, the percentage of fluorescein-positive cells increased with Tat-*b*-PTMC₃₀ content, although not in a linear fashion. Plain Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles were able to internalize in nearly 100% cells, while the percentage of positive cells decreased from 95, 63 to 11% for 75, 50 and 25% Tat-containing nanoparticles, respectively (Figure 4, panel A). The same trend was observed when measuring mean fluorescence intensities (Figure S3).

This result is consistent with the increase of zeta potential and the slight decrease of nanoparticle size observed with increasing Tat content, these two factors improving charge interactions with the cellular membrane and accelerating internalization kinetics, as mentioned before. However, regarding the faint size variation (6 nm difference between 25% and 100% Tat-containing micelles) and the wide difference in positive cells measured (11% and nearly 100% positive cells, respectively), internalization kinetics enhancement is likely to be mostly due to Tat-peptide density of nanoparticle shell rather than to size difference.

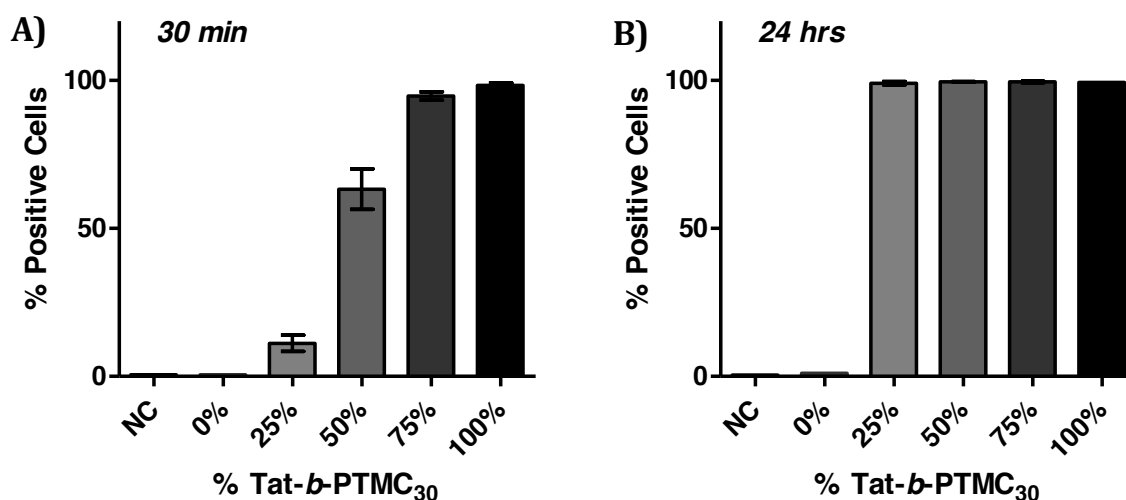


Figure 6 - Percentage of fluorescein positive cells obtained from FACS analyses of HeLa cells incubated for 30 min and 24 hrs with fluorescein-labelled mixed nanoparticles obtained from X% Tat-*b*-PTMC₃₀ / (1-X)% PEG-*b*-PTMC₃₈ blends at 50 µg.mL⁻¹.

At 24 hrs, for all Tat-containing formulations, almost 100% cells were detected as fluorescein-positive (Figure 6, panel B), and differences in mean fluorescence intensities as a function of Tat percentage were largely reduced (Figure S3). These findings thus suggest that increasing Tat ratio significantly enhances cellular uptake kinetics but barely influence the overall cell-penetrating propensity of the nanoparticles in the long run.

II.2.2. INTERNALIZATION MECHANISM

As mentioned previously, the internalization of micelles is likely to occur in two steps: first by surface adsorption and secondly by endocytosis. To investigate to what extent these two steps might be affected by the modulation of Tat-peptide density in the corona of micelles, HeLa cells were incubated for 30 min with the different formulations of fluorescein-labelled Tat-*b*-PTMC₃₀/PEG-*b*-PTMC₃₈ mixed micelles either at 4°C or at 37°C, Trypan blue was then used to quench extracellular fluorescence emitted by nanoparticles adsorbed onto the membrane. At 37°C, as shown in figure 7, the mean fluorescence intensity was found to increase linearly with Tat content and was significantly attenuated for 75% and plain Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles as compared to non-quenched cells. When cells were incubated at 4°C, condition where nanoparticles uptake by endocytosis is prohibited, mean fluorescence intensity increased with Tat-*b*-PTMC₃₀ content in a non-linear fashion similarly to 37°C non-quenched cells (Figure 7 panel A). The same trends were observed when measuring percentage of fluorescein-positive cells instead of mean fluorescence intensity (Figure 7 panel B).

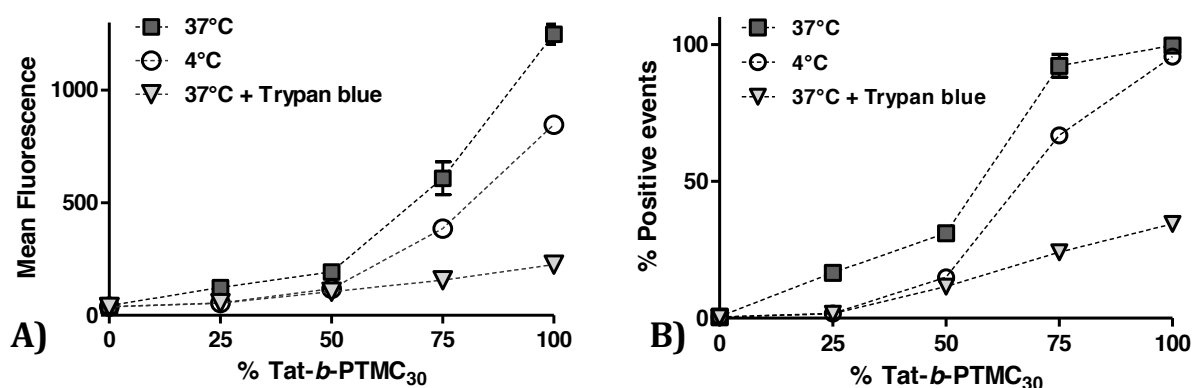


Figure 7 – Mean fluorescence and percentage of fluorescein-positive cells obtained from FACS analyses of HeLa cells incubated for 30 min with mixed X% Tat-*b*-PTMC₃₀ / (1-X)% PEG-*b*-PTMC₃₈ nanoparticles at 37°C followed (▽) or not (■) by a 5 min incubation with fluorescent quencher Trypan blue and at 4°C (○).

From these data, one can infer that increasing Tat-peptide content enhances micelle adsorption onto cell membranes by electrostatic adsorption, which appears to occur in an almost immediate fashion, but does not affect their internalization by endocytosis as evidenced by 24 hrs incubation data (Figure 6, panel B).

II.3. IMPACT OF TAT PEPTIDE-DENSITY ON CELL VIABILITY

Cellular toxicity was also addressed and assayed in the same conditions than previously, using a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ nanoparticle concentration, close to the previously determined IC₅₀ of Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles (40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, *vide supra*), and over 72 hrs to insure maximum internalization of all formulations. The

percentage of Tat peptide was found to have little impact on cell viability, since 60% metabolic activity was measured for 50%, 75% and 100% Tat formulations and 70% for the 25% one (Figure 8). This supports the previous findings that internalization is simply delayed with lower Tat content and that the “toxicity” is correlated to total amount of internalized micelles rather than to Tat-peptide content.

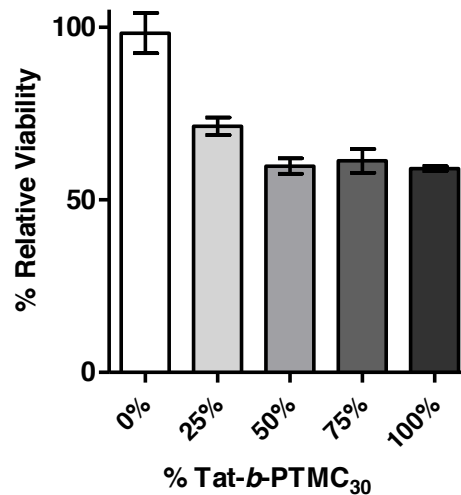


Figure 8 - Viability of HeLa cells incubated for 72 hrs with mixed X% Tat-*b*-PTMC₃₀ / (1-X)% PEG-*b*-PTMC₃₈ nanoparticles at 50 µg.mL⁻¹.

CONCLUSION

As expected regarding Tat₄₇₋₅₇ peptide cell-penetrating properties, Tat-*b*-PTMC micelles were found to be rapidly and efficiently internalized by HeLa cells. Regarding this powerful transduction ability, Tat-*b*-PTMC nanoparticles would be particularly suitable as drug carriers for local administration in pathological conditions where rapid cell internalization is crucial, such as stereotaxic administration after solid brain tumor surgical removal in order to target remaining tumor cells. However, the possible retention of nanoparticles in endosomes is a remaining issue that is still needed to be addressed. Tat-*b*-PTMC nanoparticles contain *a priori* no “signal” encoded in the Tat segment to drive their escape from endosomes as intact particles. However, it is very likely that in the “harsh” conditions of endosomes (acidic pH, high enzymatic activity), the PTMC block will be digested and thus nanoparticles will fall apart. Or they will be excreted in endosomal vesicles as efficiently as they entered the cytoplasm. Additional experiments need to be performed to understand the intracellular fate of Tat-*b*-PTMC nanoparticles.

Cellular internalization of Tat-*b*-PTMC nanoparticles was also found to occur through an energy-dependent endocytic process since no intracellular labelling was detected under low temperature conditions. We suspect a two-step mechanism to be involved in the cellular uptake process of Tat-*b*-PTMC core-shell micelles: a first step membrane-binding event promoted by long-distance electrostatic interactions between the basic positively-charged residues of Tat segments and the acidic negatively-charged cell-surface biomolecules, followed by a second entry step through active endocytosis.

When comparing nanoparticle formulations with variable Tat content, we found cellular uptake kinetics to be strongly dependent on the density of Tat peptide per nanoparticle. Indeed, an exponential increase in labelled cells at short incubation time point was observed with gradually increasing Tat-peptide density. This trend was found to be directly correlated with an exponential accumulation of micelles onto the cell membrane by electrostatic adsorption and independent of the entry step. This finding was not trivial regarding the moderate variations of nanoparticles size and zeta potential with Tat-peptide content. A comprehensive biophysical study shedding light on this issue will be reported in the next chapter.

At longer time of incubation, all Tat-containing formulations ended up to be almost equally internalized by cells, suggesting that the endocytotic step is proceeding in a much slower fashion than their surface binding and is barely influenced by the variation of Tat-peptide density (in the range investigated in this study, from 25% to 100% Tat-*b*-PTMC₃₀). The molecular parameters mediating this energy-dependent transport across the cellular membrane however still need to be elucidated, as well as the exact endocytic mechanism involved.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials and reagents

All cell culture reagents were purchased from Gibco® Life Technologies (Invitrogen). HeLa cells were kindly provided by Prof. Martin Teichmann (IECB, Bordeaux, France). Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) was supplied by Euromedex. 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) and 5-((5-aminopentyl)thioureidyl)fluorescein (Fluorescein-cadaverine) were obtained from VWR. Fluoromount-G™ aqueous mounting medium was supplied by SouthernBiotech. Trimethylene carbonate (1,3-dioxane-2-one; TMC) was kindly provided by Labso chimie fine (Boehringer Ingelheim) and purified by four successive recrystallizations in dry toluene. MeO-PEG-OH ($M_w=2000$ g/mol) was supplied by Fluka. O-Benzotriazole-*N,N,N',N'*-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate (HBTU) was obtained from Iris Biotech GmbH. Trypan blue (CAS: 72-57-1, bioreagent grade), solvents (DMF, DMSO and dichloromethane) and all other chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich. Dichloromethane was thoroughly dried over calcium hydride and distilled under reduced pressure. PTMC homopolymers and Tat-*b*-PTMC chimeras were synthesized as described in chapter 2.

Experimental procedures

Synthesis of PEG-*b*-PTMC₃₃ and PEG-*b*-PTMC₃₈ block copolymers. The procedure described below was adapted from Nederberg *et al.* for a target polymerization degree (DP) of 38 and adjusted for a DP of 33.³⁰ In a flame-dried Schlenk flask, MeO-PEG-OH with a molecular weight of 2000 g/mol (1 g, 0.5 mmol) was freeze-dried in dioxane. Under inert atmosphere (argon, <0.5 ppm O₂, <5 ppm H₂O), TMC (2 g, 20 mmol in 10 mL dichloromethane) and distilled DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene, 50 μ L, 334 μ mol) were subsequently added and the polymerization was allowed to proceed to full conversion at room temperature under vigorous stirring for 48 hrs. The reaction was quenched with an excess acetic acid. The polymer was precipitated twice in cold methanol and dried under vacuum. The block copolymer was characterized by ¹H NMR spectroscopy in CD₂Cl₂ and by size exclusion chromatography (SEC) in THF as described in chapter 2. DP_n of PTMC block found as 38; Notation PEG_{2,000}-*b*-PTMC₃₈; $M_n^{exp}=5876$ g.mol⁻¹; PD=1.04; Mass yield=87% (2.62 g); ¹H NMR (CDCl₃) δ 4.30 (t, 2H, CH₂OCH₂CH₂OC(O)); 4.24 (t, 4(n-1)H, C(O)OCH₂CH₂CH₂OC(O)); 3.74 (q, 2H, OCH₂CH₂CH₂OH); 3.64 (s, 4x45H, OCH₂CH₂O); 3.38 (s, 3H, CH₃OCH₂CH₂O); 2.05 (qt, 2(n-1)H, C(O)OCH₂CH₂CH₂OC(O)); 1.92 (qt, 2H, OCH₂CH₂CH₂OH).

Synthesis of Fluorescein-labelled PTMC₃₀ (Fluorescein-PTMC₃₀). COOH-PTMC₃₀ (15 mg, 4.6 μmol) was dissolved in 135 μL DMF and 54 μL HBTU in DMF was added (5.2 mg, 14.2 μmol). Separately, Fluorescein-cadaverine (6.8 mg, 9.4 μmol) was dissolved in 137 μL DMSO containing 49 μL of DIEA (*N,N*-diisopropylethylamine, 2.5 μL , 14.2 μmol) in DMF. The solutions were then mixed together and stirred protected from light overnight at room temperature. Ultrapure water (1 mL) was poured under magnetic stirring and the resulting dispersion was then extensively dialyzed, using 25 kDa cut-off tubing, against water to remove unreacted dye. Quantitative coupling was assessed by ¹H NMR spectroscopy as described in chapter 2. Notation Fluorescein-PTMC₃₀; $M_n^{\text{exp}}=3882 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) 6.5-8 (8H, aromatic protons); 4.13 (t, 4nH, C(O)OCH₂CH₂CH₂OC(O)); 4.05 (t, 2H, OCH₂CH₂CH(CH₃)₂); 3.47 (q, 2H, C(S)NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NH); 3.05 (q, 2H, C(S)NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NHC(O)); 2.67 (m, 2H, C(O)OCH₂CH₂OC(O)NH); 2.33 (m, 2H, C(O)OCH₂CH₂OC(O)NH); 1.94 (qt, 2nH, C(O)OCH₂CH₂CH₂OC(O)); 1.63 (m, 1H, OCH₂CH₂CH(CH₃)₂); 1.57 (m, 4H, C(S)NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NHC(O)); 1.49 (q, 2H, OCH₂CH₂CH(CH₃)₂); 1.32 (m, 2H, C(S)NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NHC(O)); 0.88 (d, 6H, OCH₂CH₂CH(CH₃)₂).

Preparation of nanoparticles – General procedure. Tat-*b*-PTMC₃₀ and Tat-*b*-PTMC₆₆ nanoparticles for SANS analysis were prepared in D₂O at 10 mg·mL⁻¹ concentration using a similar procedure as described in chapter 2. Fluorescent Tat-*b*-PTMC₃₀ and Tat-*b*-PTMC₆₆ nanoparticles used in the internalization and toxicity studies were prepared by direct dissolution in aqueous buffer as described in the following. Fluorescein-PTMC₃₀ (3 mg, 0.772 μmol) and Tat-*b*-PTMC chimera (9.7 mg) were separately dissolved in 100 μL DMSO. Ten μL of the fluorescein-PTMC₃₀ solution was then added to the later. Ammonium acetate buffer (2 mL, 30 mM, pH 5) was poured under stirring. The resulting dispersion was extensively dialyzed against ammonium acetate buffer using 25 kDa cut-off tubing and lyophilized. The resulting bulk (97:3) w/w mix of Tat-*b*-PTMC/Fluorescein-PTMC₃₀ (10 mg) was self-assembled by direct dissolution at room temperature in 10 mM TRIS buffer (1 mL) at pH 7.4 for 24 hrs. Fluorescent PEG-*b*-PTMC₃₃ and mixed Tat-*b*-PTMC₃₀/PEG-*b*-PTMC₃₈ nanoparticles were prepared by a solvent-displacement process also called “nanoprecipitation”.²⁸ Fluorescein-PTMC₃₀, Tat-*b*-PTMC₃₀ chimera and PEG-*b*-PTMC block copolymer were dissolved separately in DMSO and mixed together in variable proportions (detailed in the table below) so as to obtain 10 mg of the different blends in a final volume of 100 μL DMSO:

Entry	% w/w			
	Tat- <i>b</i> -PTMC ₃₀	PEG _{2,000} - <i>b</i> -PTMC ₃₈	PEG _{2,000} - <i>b</i> -PTMC ₃₃	Fluorescein-PTMC ₃₀
100% Tat	97	0	0	3
75% Tat	73	24	0	3
50% Tat	49	49	0	3
25% Tat	24	73	0	3
0% Tat	0	97	0	3
PEG- <i>b</i> -PTMC ₃₃	0	0	97	3

TRIS buffer (600 μL , 10 mM, pH 7.4) was then poured in the mixture under stirring. The homogenous dispersions obtained were subsequently extensively dialyzed using 25 kDa cut-off tubing against TRIS buffer to remove any trace of organic solvent.

Dispersions containing fluorescent nanoparticles were carefully handled protected from light and sterilized by filtration over sterile 0.22 μM pore-sized low-protein binding Millex® syringe filter units prior use. Final concentration was determined by dry extract weighing.

Dynamic light scattering and zeta potential measurements. Dynamic light scattering and zeta potential measurements were performed using a Malvern Nano ZS ZetaSizer equipped with a standard 632.8 nm HeNe laser. The data were recorded at 25°C with a scattering angle of 90°, and mean hydrodynamic diameters and size distributions were determined with the second order cumulant analysis method. For zeta potential measurements, samples were diluted tenfold in 1 mM NaCl. Laser Doppler micro-electrophoresis was conducted using M3-PALS (Phase analysis Light Scattering) Malvern technology with sequential fast and slow field reversal applying a potential of ± 150 V. The so-measured electrophoretic mobility (μ) was then converted to zeta potential (ζ) using the Smoluchowski approximation.

Cell culture. The HeLa (Human cervical carcinoma) cell line was routinely cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) foetal bovine serum (FBS), 100 units.mL⁻¹ penicillin and 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ streptomycin. Cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator using standard tissue culture protocols.

Cell viability assay – General procedure. Reporting to growth curves to ensure a constant exponential growth and prevent cell packing from introducing any bias, cells were seeded at a density of 7×10^3 cells.cm⁻² on 96-well plates and grown for 24 hrs prior treatment. Cells were then exposed to the different nanoparticle dispersions diluted ten times in medium at designated times and concentrations. After 72 hrs, the medium was removed and cells were incubated at 37°C for 3 hrs with 0.5 mg.mL⁻¹ MTT in medium (5 mg.mL⁻¹ solution in PBS diluted 10 times in medium). The medium was subsequently discarded and the same volume of DMSO was added to dissolve formazan crystals formed. Optical density of the supernatant was measured at 540 nm using a SpectraMax™ Molecular Devices microplate UV-Vis spectrophotometer. Results were expressed as the percentage of metabolic activity of treated cells relative to untreated cells. Independent experiments were carried out 3 times with 4 replicates per condition.

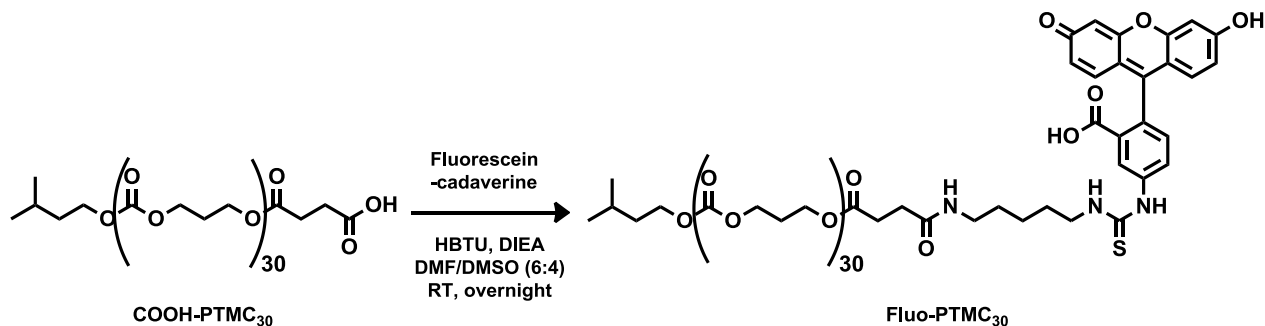
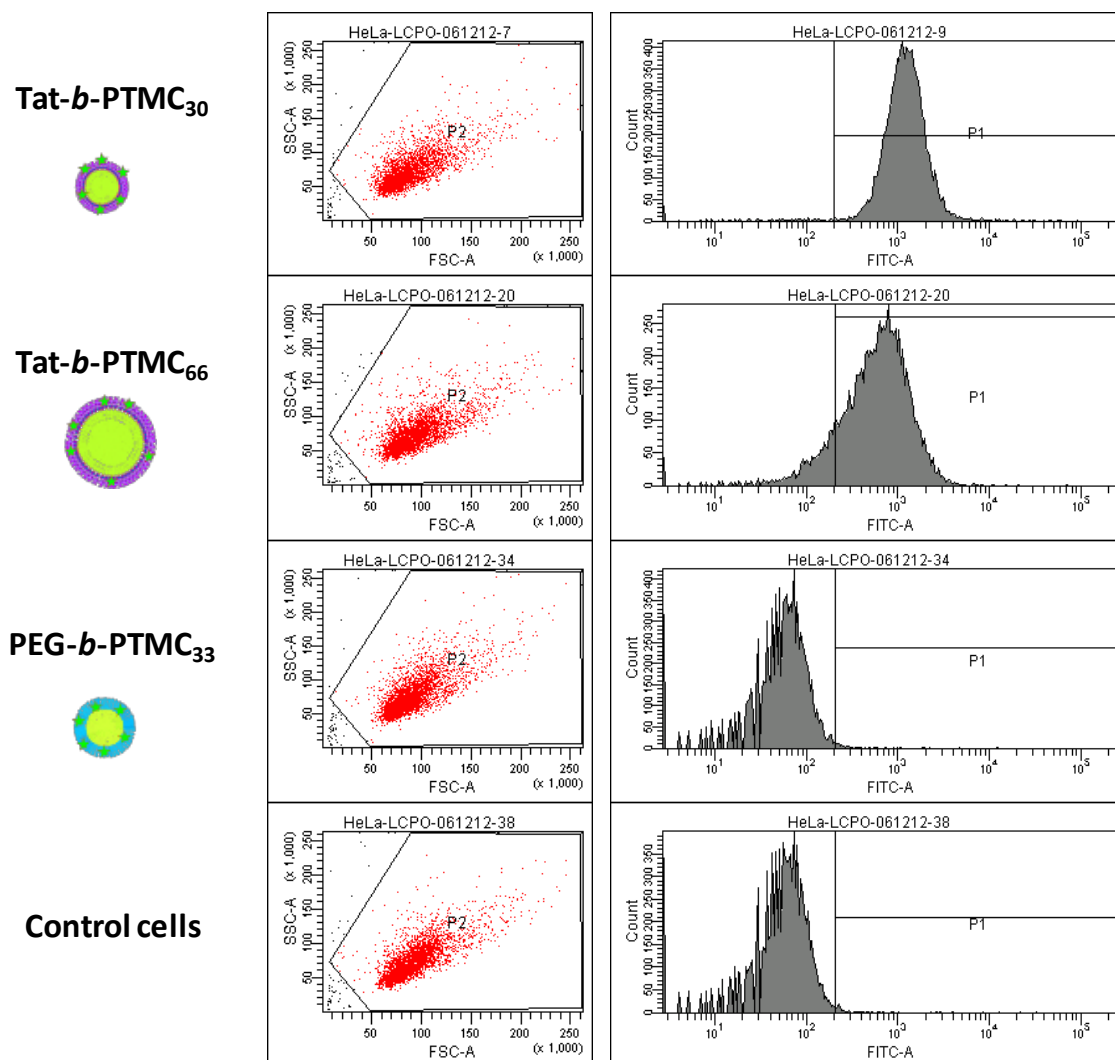
Cellular uptake studies - Flow cytometry analysis. HeLa cells were sub-cultured in 24-well plates for 24 hrs at a density of 15×10^3 cells.cm⁻² and exposed to the different nanoparticle dispersions diluted tenfold in medium (to a final 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ concentration) for variable times (*i.e.* 15 min, 30 min, 2 hrs, 4 hrs and 24 hrs) at 37°C or 4°C. For 4°C experiments, plates were cooled down

for 15 min prior to exposure. After medium removal, cells were rinsed twice with PBS. For extracellular quenching experiments, they were incubated with a Trypan blue solution in PBS diluted tenfold in medium (to final 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ concentration) for 5 min and rinsed again twice with PBS. Cells were then trypsinized with a 0.05% Trypsin/EDTA solution for 5 min at 37°C, recovered in medium and centrifuged for 4 min at 1,000 rpm. Cell pellets were then re-suspended in PBS containing 0.5% BSA and 1 mM EDTA and kept cold until analysis. Flow cytometry analysis were performed at UMS3033 (IECB, Bordeaux, France) using a FACS Aria cytometer (BD Biosciences, USA) equipped with Argon ion laser tuned to 488 nm. Ten thousand scattered light-gated events were measured for each replicate and analysed by histogram for green fluorescence using the BD FACSDiva software (version 5.0.3, USA). Fluorescein positive gating was set up on control cells. Independent experiments were carried out 3 times with 3 replicates per condition.

Cellular uptake studies - Laser Scanning Confocal Microscopy (LSCM) analysis. HeLa cells were sub-cultured for 24 hrs at a density of 15×10^3 cells. cm^{-2} in 12-well plates containing nitric acid-treated 18 mm glass coverslips. Cells were exposed to the different nanoparticle dispersions diluted tenfold in medium (to final 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ concentration) for 30 min at 37°C or 4°C. For 4°C experiments, plates were cooled down for 15 min prior exposure. After medium removal, cells were rinsed twice with PBS and fixed with *p*-formaldehyde 3.7% (w/v) in PBS for 15 min at 37°C. Cells were then washed with PBS, stained with DAPI (5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in PBS for 5 min at room temperature, rinsed again with PBS and mounted for microscopy. Laser Scanning Confocal Microscopy images were acquired on an inverted Leica TCS SP5 microscope equipped with an HCX PL APO 63X, NA 1.4 oil immersion objective in fluorescence mode. The laser outputs were controlled *via* the Acousto-Optical Tunable Filter (AOTF) and the two collection windows using the Acousto-Optical Beam Splitter (AOBS) and photomultipliers (PMT) as follows: DAPI was excited with a diode laser at 405 nm (12.5%) and measured with emission settings at 416-463 nm, FITC was excited with an argon laser at 488 nm (15%) using a 498-549 nm window. The Helium-Neon laser at 633 nm (14%) was only used in transmission mode. Images were collected using the microscope in sequential mode with a line average of 4 and a format of 1024*512 pixels or 1024*256 pixels. A Z-stack of 50 frames covering a depth of 10 μm was recorded for assessment of label distribution across the section. Photomultipliers gain and offset configurations were set up on control cells so as to correct images from green auto-fluorescence signal.

Statistical analysis. Using the Graphpad Prism 5.0 software, statistically significant differences between two groups were analysed by non-parametric Man-Whitney test. Statistically significant differences between several groups were analysed by non-parametric Kruskal–Wallis test, followed by Dunns post-test. A *p* value lower than 0.05 was considered statistically significant.

SUPPORTING INFORMATION

Scheme S I - Chain end functionalization of PTMC₃₀-COOH with fluorescein-cadaverine.Figure S I - Flow cytometry histograms of HeLa cells after incubation for 30 min with Tat-*b*-PTMC₃₀, Tat-*b*-PTMC₆₆ and PEG-*b*-PTMC₃₃ at 50 μg/mL.

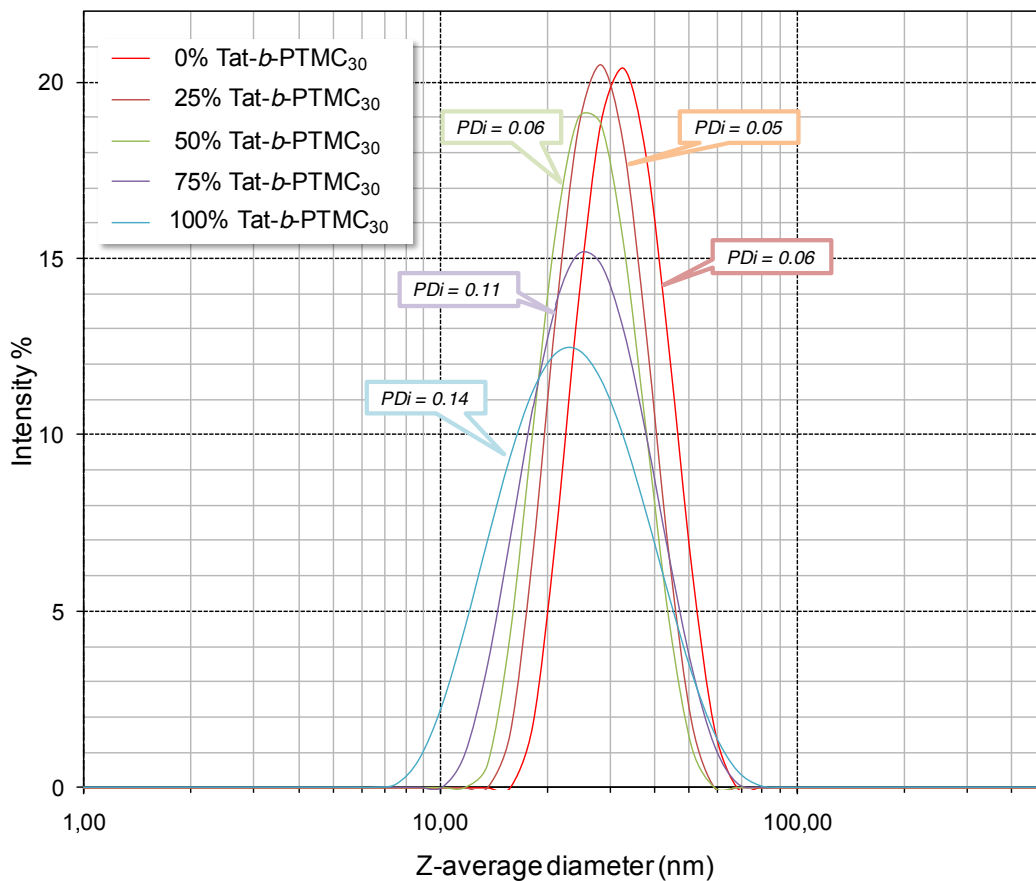


Figure S 2 - Light scattering intensity distributions and polydispersity indexes of mixed Tat-*b*-PTMC₃₀/PEG-*b*-PTMC₃₈ nanoparticles

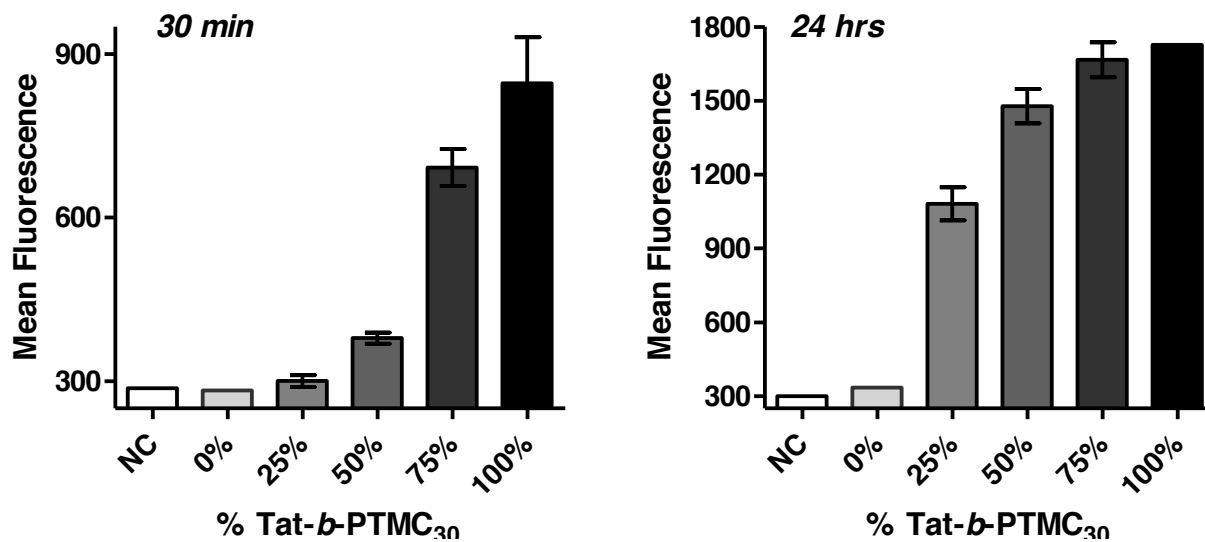


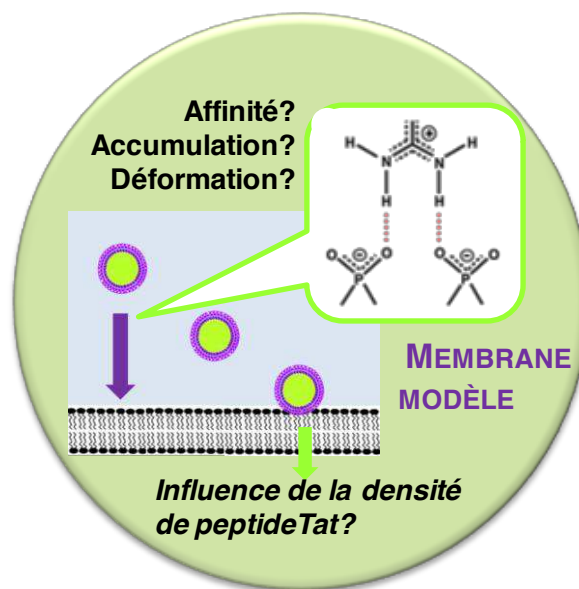
Figure S 3 – Mean fluorescence intensity obtained from FACS analyses of HeLa cells incubated for 30 min and 24 hrs with fluorescein-labelled mixed nanoparticles obtained from X% Tat-*b*-PTMC₃₀ / (1-X)% PEG-*b*-PTMC₃₈ blends at 50 µg.mL⁻¹.

REFERENCES

1. C. Drappier, H. Oliveira, O. Sandre, E. Ibarboure, S. Combet, E. Garanger and S. Lecommandoux, *Faraday Discussions*, 2013, **166**, DOI: 10.1039/C1033FD00098B.
2. A. D. Frankel and C. O. Pabo, *Cell*, 1988, **55**, 1189-1193.
3. M. Green and P. M. Loewenstein, *Cell*, 1988, **55**, 1179-1188.
4. A. Joliot, C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin and A. Prochiantz, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991, **88**, 1864-1868.
5. B. Gupta, T. S. Levchenko and V. P. Torchilin, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, **57**, 637-651.
6. F. Heitz, M. C. Morris and G. Divita, *British Journal of Pharmacology*, 2009, **157**, 195-206.
7. S. B. Fonseca, M. P. Pereira and S. O. Kelley, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, **61**, 953-964.
8. F. Milletti, *Drug Discovery Today*, 2012, **17**, 850-860.
9. M. Breunig, S. Bauer and A. Goepferich, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, **68**, 112-128.
10. R. R. Sawant and V. P. Torchilin, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 2012, **16**, 269-275.
11. E. Vives, P. Brodin and B. Lebleu, *Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**, 16010-16017.
12. B. Gupta and V. P. Torchilin, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2006, **3**, 177-190.
13. M. Zorko and Ü. Langel, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, **57**, 529-545.
14. A. Vendeville, F. Rayne, A. Bonhoure, N. Bettache, P. Montcourrier and B. Beaumelle, *Molecular Biology of the Cell*, 2004, **15**, 2347-2360.
15. R. Fischer, K. Köhler, M. Fotin-Mleczek and R. Brock, *Journal of Biological Chemistry*, 2004, **279**, 12625-12635.
16. F. Duchardt, M. Fotin-Mleczek, H. Schwarz, R. Fischer and R. Brock, *Traffic*, 2007, **8**, 848-866.
17. G. Tuennemann, R. M. Martin, S. Haupt, C. Patsch, F. Edenhofer and M. C. Cardoso, *Faseb Journal*, 2006, **20**, 1775-1784.
18. M. C. Morris, S. Deshayes, F. Heitz and G. Divita, *Biology of the Cell*, 2008, **100**, 201-217.
19. S. Debaisieux, F. Rayne, H. Yezid and B. Beaumelle, *Traffic*, 2012, **13**, 355-363.
20. V. P. Torchilin, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, **60**, 548-558.
21. H. Brooks, B. Lebleu and E. Vives, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, **57**, 559-577.
22. M. Tyagi, M. Rusnati, M. Presta and M. Giacca, *Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**, 3254-3261.
23. J. M. Gump, R. K. June and S. F. Dowdy, *Journal of Biological Chemistry*, 2010, **285**, 1500-1507.
24. J. B. Rothbard, T. C. Jessop, R. S. Lewis, B. A. Murray and P. A. Wender, *Journal of the American Chemical Society*, 2004, **126**, 9506-9507.
25. Z. Kadlecova, L. Baldi, D. Hacker, F. M. Wurm and H.-A. Klok, *Biomacromolecules*, 2012, **13**, 3127-3137.
26. H. Lv, S. Zhang, B. Wang, S. Cui and J. Yan, *Journal of Controlled Release*, 2006, **114**, 100-109.
27. S. M. Moghimi, P. Symonds, J. C. Murray, A. C. Hunter, G. Debska and A. Szewczyk, *Mol Ther*, 2005, **11**, 990-995.
28. C. Sanson, C. Schatz, J.-F. Le Meins, A. Brûlet, A. Soum and S. Lecommandoux, *Langmuir*, 2009, **26**, 2751-2760.
29. P. A. Wender, D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman and J. B. Rothbard, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, **97**, 13003-13008.
30. F. Nederberg, B. G. G. Lohmeijer, F. Leibfarth, R. C. Pratt, J. Choi, A. P. Dove, R. M. Waymouth and J. L. Hedrick, *Biomacromolecules*, 2006, **8**, 153-160.

CHAPITRE 4

ÉTUDE DES INTERACTIONS AVEC LES MEMBRANES BIOLOGIQUES : UNE APPROCHE BIOPHYSIQUE



Mots clefs: Micelles Tat-*b*-PTMC, bicouche phospholipidique, liposome, adsorption, association, affinité, transition de phase, réseau cristallin, courbure négative gaussienne en « selle de cheval », phénomène de « clustering » à la membrane.

Keywords: Tat-*b*-PTMC micelles, phospholipid bilayer, liposome, adsorption, binding, affinity, phase transition, crystal lattice, saddle-splay negative Gaussian curvature, membrane-mediated clustering.

Résumé: Ce chapitre présente une étude de l'interaction des différentes nanoparticules à base de Tat-b-PTMC décrites précédemment avec des membranes phospholipidiques modèles au moyen de techniques biophysiques complémentaires. Celle-ci a été réalisée dans le cadre de collaborations avec le Dr. Isabel Alves (CBMN, Bordeaux) d'une part, et le Dr. Nathan Schmidt et le Pr. Gérard Wong (UCLA, Los Angeles) d'autre part.

Des mesures de calorimétrie différentielle et de diffusion de la lumière sur des liposomes d'une part, et de spectroscopie de résonance de plasmon sur des bicouches planes d'autre part, ont montré que les micelles de Tat-b-PTMC possèdent une affinité bien plus importante pour les membranes chargées négativement que pour les membranes zwitterioniques, confirmant que leur adsorption sur la membrane des cellules est essentiellement gouvernée par des interactions électrostatiques avec les biomacromolécules membranaires chargées négativement. Des expériences de diffusion des rayons X aux petits angles combinées à des mesures de diffusion dynamique de la lumière sur des vésicules phospholipidiques chargées négativement ont d'autre part révélé que les micelles de Tat-b-PTMC s'adsorbent sur les membranes en se regroupant de façon relativement compacte et avec une distance caractéristique, maximisant ainsi la surface couverte et générant à de très faibles concentrations la formation de phases ordonnées impliquant une courbure négative gaussienne de la bicouche lipidique. L'élargissement de l'endotherme de transition gelliquide des lipides, mesuré par DSC, suggère que l'adsorption des micelles déforme localement la membrane. On peut alors imaginer que celle-ci se réorganise afin de minimiser cette déformation en rapprochant les micelles les unes des autres. Ce phénomène s'est avéré disparaître rapidement lors de la substitution progressive des chimères Tat-b-PTMC par des copolymères PEG-b-PTMC. Ceci pourrait alors expliquer l'augmentation non-linéaire de l'accumulation des micelles en surface des cellules HeLa avec l'augmentation de leur contenu en peptide Tat observée dans le chapitre précédent.

CHAPTER 4

INTERACTIONS WITH BIOLOGICAL MEMBRANES: A BIOPHYSICAL STUDY

INTRODUCTION	201
I. INTERACTIONS OF TAT-<i>b</i>-PTMC MICELLES AS STUDIED WITH LIPOSOMES BY DYNAMIC LIGHT SCATTERING AND DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY	202
I.1. MODEL SYSTEM AND INFORMATION PROVIDED BY DLS AND DSC.....	202
I.2. INTERACTIONS WITH ZWITTERIONIC LIPOSOMES	204
I.3. INTERACTIONS WITH NEGATIVELY CHARGED LIPOSOMES.....	205
I.3.1. <i>Tat-b-PTMC₃₀ micelles</i>	205
I.3.2. <i>Micelles with variable Tat-peptide content</i>	208
II. INTERACTIONS OF TAT-<i>b</i>-PTMC MICELLES AS STUDIED WITH A PLANAR BILAYER BY PLASMON WAVEGUIDE RESONANCE SPECTROSCOPY	210
II.1. MODEL SYSTEM AND INFORMATION PROVIDED BY PWR SPECTROSCOPY.....	210
II.2. INTERACTIONS WITH PLANAR BILAYERS: STRUCTURAL CHANGES AND BINDING PROFILES.....	211
II.2.1. <i>Mass and structural changes: Tat-b-PTMC micelles versus Tat peptide</i>	211
II.2.2. <i>Binding affinity: zwitterionic versus negatively charged membranes</i>	212
II.2.3. <i>Micelles with variable Tat-peptide content</i>	213
III. INTERACTIONS OF TAT-<i>b</i>-PTMC MICELLES AS STUDIED WITH LIPOSOMES MONITORED BY SMALL ANGLE X-RAY SCATTERING.....	214
III.1. MODEL SYSTEM AND INFORMATION PROVIDED BY SAXS	214
III.2. TAT- <i>b</i> -PTMC ₃₀ AND TAT- <i>b</i> -PTMC ₆₆ MICELLES	215
III.2.1. <i>Topological ordering as function of micelles concentration</i>	215
III.2.2. <i>Topological ordering as a function of membrane composition</i>	217
III.3. MICELLES WITH VARIABLE OF TAT-PEPTIDE CONTENT	218
CONCLUSION	219
EXPERIMENTAL SECTION	221
SUPPORTING INFORMATION	224
REFERENCES	234

INTRODUCTION

In the last decades, the rapidly emerging field of nanotechnology, referring to the manipulation of materials with at least one dimension sized in the nanometer range, typically 1 to 100 nm, has aroused great hopes and excitement but also safety concerns regarding the potential toxicity and environmental impact of nanomaterials. Indeed, in a biological context, nano-sized particles are somehow “alien” molecular constructions that can be seen either as surfaces by most of biomolecules, or as a macromolecular machine, like ribosomes or viruses when viewed from the microscale of a whole cell. As they can be considered neither as single molecules nor as materials in bulk, their interactions with biological systems are *a priori* unknown. There is thus a critical need to develop a higher level of understanding on this specific issue to engineer optimized and safer nanomaterials.

The first physical barrier that a micelle is likely to strike in a biological context is the cellular membrane which consists in a phospholipid bilayer with embedded organic molecules (eg cholesterol) and glycoproteins (eg transmembrane receptor). Phospholipids are amphiphilic molecules composed of a hydrophilic polar head separated from two hydrophobic hydrocarbon chains by a negatively charged phosphate group. They spontaneously self-assemble in aqueous solution to form highly ordered flexible bilayers which are commonly used by biophysicists as models of biological membranes. They can be processed and formulated through different morphologies: monolayers, planar bilayers, uni or multi-lamellar vesicles (liposomes), depending on the phenomenon studied and the techniques used to probe it.

In the first chapter (paragraph III. I.), we have reviewed the particular behaviour of Tat peptide that is able to spontaneously cross over cell membranes in a receptor-independent manner. The molecular mechanism ruling this phenomenon is however still being debated in the literature. Depending on experimental conditions, different cellular entry mechanisms have been proposed for Tat peptide or for various conjugates, from different endocytic pathways to direct translocation. However, in all cases, the internalization process has been shown to be initiated by adhesion of the peptide onto the cell membrane. This binding step is most likely mediated by specific electrostatic interactions between guanidine and primary amine groups of the peptide and negatively charged biomacromolecules, featuring anions such as phosphates and sulphates.^{1, 2} Interactions between Tat peptide and model membranes have been addressed in several biophysical studies showing that the peptide can insert and “float” between loosely packed polar heads of model lipid bilayers and induce fusion of large unilamellar vesicles.³⁻⁷ Accumulating evidences suggest that, in biological context, Tat peptide, as well as other arginine-rich CPPs, could induce topological membrane deformations and

defects leading to their internalization through the formation of endocytotic invaginations, vesicular clusters and even pores when highly concentrated at the cell surface.⁸⁻¹¹ Among other groups, Prof. Wong's team has evidenced that arginine rich-CPPs can generate saddle-splay "negative Gaussian" curvature on model membranes with negative intrinsic curvature, which is a necessary condition to biophysical processes such as blebbing during endosomes formation to occur.¹²⁻¹⁴ They also rationalized this phenomenon with regard to peptide primary sequences of the peptides and the conveyed cargo (hydrophobic dye, micelles).

In the previous chapter, we have shown that the cellular uptake of Tat-*b*-PTMC micelles is kinetically driven by their massive binding at cells surface. Amplitude of this initial association step decreased in a non-linear manner when Tat-*b*-PTMC₃₀ content was gradually replaced by PEG-*b*-PTMC₃₈. In the present study, we aimed at rationalizing this non-trivial trend at the molecular scale. To this end, we initiated a collaborative work with biophysicists to probe interactions between Tat-*b*-PTMC micelles and model membranes by complementary biophysical techniques. We have first studied the impact of the presence of micelles on the colloidal properties and thermodynamic phase transition behaviour of DMPC/DMPG large unilamellar vesicles by dynamic light scattering and differential scanning calorimetry. To gain further insight and confirm the resulting findings, plasmon waveguide resonance spectroscopy measurements were performed in collaboration with Dr. Isabel Alves (CBMN, Bordeaux, France) on planar egg-PC/POPG lipid bilayers, while small angle X-ray scattering experiments were conducted on DOPE/DOPC/DOPS small unilamellar vesicles by Dr. Nathan Schmidt under the supervision of Prof. Gerard Wong from UCLA bioengineering department (Los Angeles, USA). Collectively, these investigations, which are still in progress, reveal the particular nanoscopic stepwise scenario occurring when Tat-*b*-PTMC micelles come in contact with model and cellular membranes.

I. INTERACTIONS OF TAT-*b*-PTMC MICELLES AS STUDIED WITH LIPOSOMES BY DYNAMIC LIGHT SCATTERING AND DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY

I.1. MODEL SYSTEM AND INFORMATION PROVIDED BY DLS AND DSC

Large unilamellar vesicles (LUVs), namely liposomes, were selected as first cell membrane model system for two main reasons. One the one hand, such model membrane can be considered as locally planar from the molecular scale point of view, similarly to cell membranes. One the other hand, their colloidal nature allows their dimensions and surface properties to be easily monitored by dynamic

light scattering. They were prepared *via* a standard hydration-extrusion procedure from phospholipids with 1,2-dimyristoyl hydrophobic tails (DM, (14:0/14:0)) presenting a gel/liquid-crystal phase transition (melting temperature, T_m) around 25°C offering the best compromise between stability towards fusion at room temperature and easy processing for preparation and DSC experiments (Figure S1). Phospholipids with zwitterionic phosphatidylcholine polar head (PC) are the most abundant lipids of eukaryotic cell membranes and commonly used as standard component of bilayer model.¹⁵ DMPC was then used as main constituent for the preparation of LUVs. Although normal eukaryotic cells possess almost no anionic lipid in their outer leaflet, they do have an anionic character due to the presence of glycoproteins on their surface. We therefore introduced 30% DMPG, presenting an anionic phospho-(1'-rac-glycerol) polar head (PG), in the LUVs composition to mimic and assess the influence of negatively charged glycoproteins on the interaction between micelles and membranes, which was *a priori* suspected to be determinant. In addition to dynamic light scattering measurements, differential scanning calorimetry in solution was performed to examine the phase transition profile of lipid bilayers upon addition of Tat-*b*-PTMC micelles since they directly reflect membrane structural changes and can then provide relevant information on the nature of the interaction.

Micelles used to interact with these large unilamellar liposomes but also with planar bilayer prepared for PWR measurements (*vide infra*) were prepared in TRIS buffer (10 mM) containing sodium chloride (100 mM) and EGTA (2 mM) to respectively reproduce physiological saline conditions and prevent any chelation with ions such as calcium and magnesium (Table I). In this medium, direct dissolution of Tat-*b*-PTMC chimeras lead to micelles with slightly higher polydispersity, and therefore mean hydrodynamic diameter, as compared with micelles previously prepared in TRIS buffer.

Entry	Preparation	Buffer	D_H (nm)	PDi	ζ (mV)
Tat- <i>b</i> -PTMC ₆₆	Direct dissolution		45	0.17	37±4
Tat- <i>b</i> -PTMC ₃₀	Direct dissolution		25	0.10	41±7
75% Tat- <i>b</i> -PTMC ₃₀ /25% PEG- <i>b</i> -PTMC ₃₈	Nanoprecipitation	TRIS 10 mM NaCl 100 mM	22	0.12	37±8
50% Tat- <i>b</i> -PTMC ₃₀ /50% PEG- <i>b</i> -PTMC ₃₈	Nanoprecipitation	EGTA 2 mM	26	0.10	30±5
25% Tat- <i>b</i> -PTMC ₃₀ /75% PEG- <i>b</i> -PTMC ₃₈	Nanoprecipitation		30	0.03	23±6
PEG- <i>b</i> -PTMC ₃₈	Nanoprecipitation		34	0.08	-7±2

Table I – Characteristics of micelles used for DLS and DSC experiments.

I.2. INTERACTIONS WITH ZWITTERIONIC LIPOSOMES

We first investigated the colloidal features and phase transition behaviour of zwitterionic DMPC liposomes upon addition of increasing concentration of Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles. The mass concentration ratio of micelles was expressed as the percentage of liposome surface covered, assuming that micelles were all adsorbed on the outer surface of liposomes. This percentage of surface coverage, noted %Sc, was calculated from experimental data and geometrical considerations as described in the literature for other colloidal systems and as detailed in supplementary information (Appendix S1).¹⁶ Except from a slight increase of dispersions polydispersity, no significant variation of liposomes hydrodynamic diameter was measured by dynamic light scattering (Table 2) and no tangible difference was observed on temperatures and related enthalpies of lipids pre-transition and melting transition on DSC thermograms (Figure 1).

DMPC Liposomes 2 mg/mL	D _H /nm	PDi
Bare liposomes	198	0.05
with Tat- <i>b</i> -PTMC ₃₀ micelles 0.25 mg/mL (9%Sc)	207	0.09
Bare liposomes	214	0.14
with Tat- <i>b</i> -PTMC ₃₀ micelles 1 mg/mL (36%Sc)	207	0.18

Table 2– Hydrodynamic diameter and polydispersity index of DMPC liposomes in the absence or mixed with Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles at different concentrations.

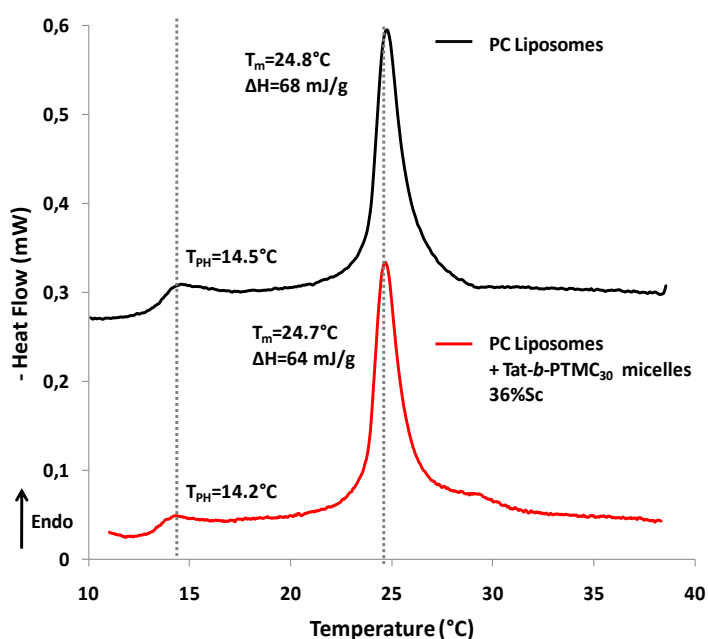


Figure 1- DSC thermograms of DMPC liposomes sole or in presence of Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles.

The amount of micelles possibly bound to the membrane was then most probably not sufficient for their presence and impact on the bilayer to be detected by these techniques. It is also worthwhile mentioning that, due to their tenfold difference in size, light scattering intensity from micelles was negligible as compared to the signal of liposomes.

I.3. INTERACTIONS WITH NEGATIVELY CHARGED LIPOSOMES

I.3.1. TAT-*b*-PTMC₃₀ MICELLES

I.3.1.1. Colloidal stability

To assess the influence of membrane negative charges, liposomes containing 70% DMPC and 30% DMPG w/w were thus prepared and mixed with Tat-*b*-PTMC micelles at increasing concentrations. At low concentration of micelles (corresponding to %Sc<100%), we observed an instantaneous macroscopic aggregation of LUVs dispersions followed by their rapid and complete collapse. As evidenced by hydrodynamic size measurements upon micelles addition (Figure 2), this aggregation phenomenon was progressively delayed with increasing amount of micelles until a threshold concentration was reached, above which liposomes no longer aggregated and remained stable.

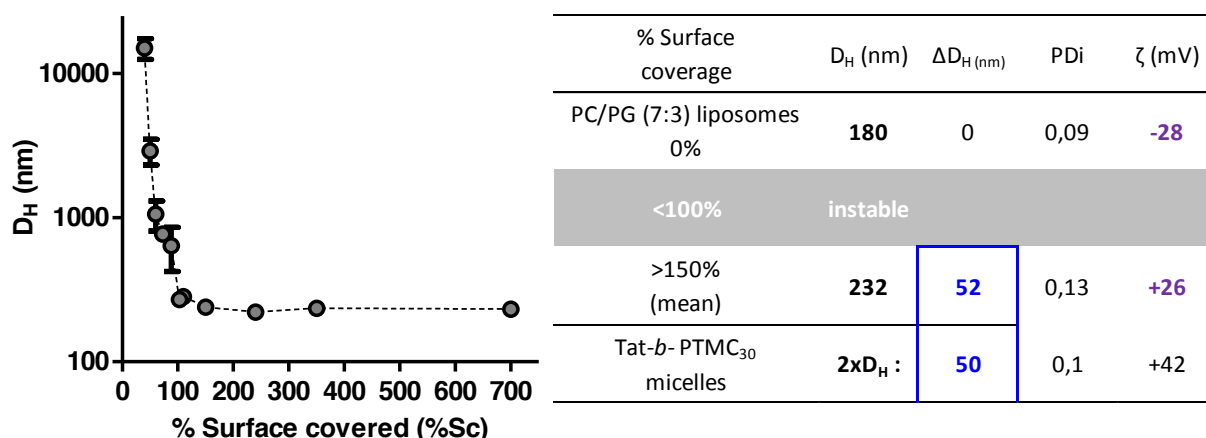


Figure 2 – Dynamic light scattering analyses of DMPC/DMPG (7:3) liposomes mixed with increasing concentration of Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles.

We found that the threshold concentration, at which the system underwent this sharp transition from aggregation to stability, approximately corresponded to the amount of micelles needed to fully cover liposome surface, namely 100% surface coverage. Above 100% surface coverage, hydrodynamic diameters of liposomes were measured and found to be incremented by 52 nm on average, which corresponded to two micelles diameter. Moreover, zeta potential measurements revealed that liposomes surface charge switched from negative to positive upon micelles addition. Indeed, as

composed of 30% anionic phospholipids, bare liposomes displayed a zeta potential value of -28 mV, while liposomes with micelles above 100% surface coverage were found to present a zeta potential value around $+26$ mV.

Collectively, these data infer that, due to electrostatic attraction between positively charged residues of Tat peptide and negatively charged DMPG polar heads, micelles were readily and almost quantitatively adsorbed at the surface of liposomes (Figure 3). When negatively charged surface liposomes are not fully covered, namely below 100%Sc, adsorbed micelles allow them to be bridged together leading to aggregation. When micelles are adsorbed in sufficient amount, namely above 100%Sc, liposomes are then positively charged due to the covering layer provided by micelles and electrostatic repulsions then maintain the colloidal stability.

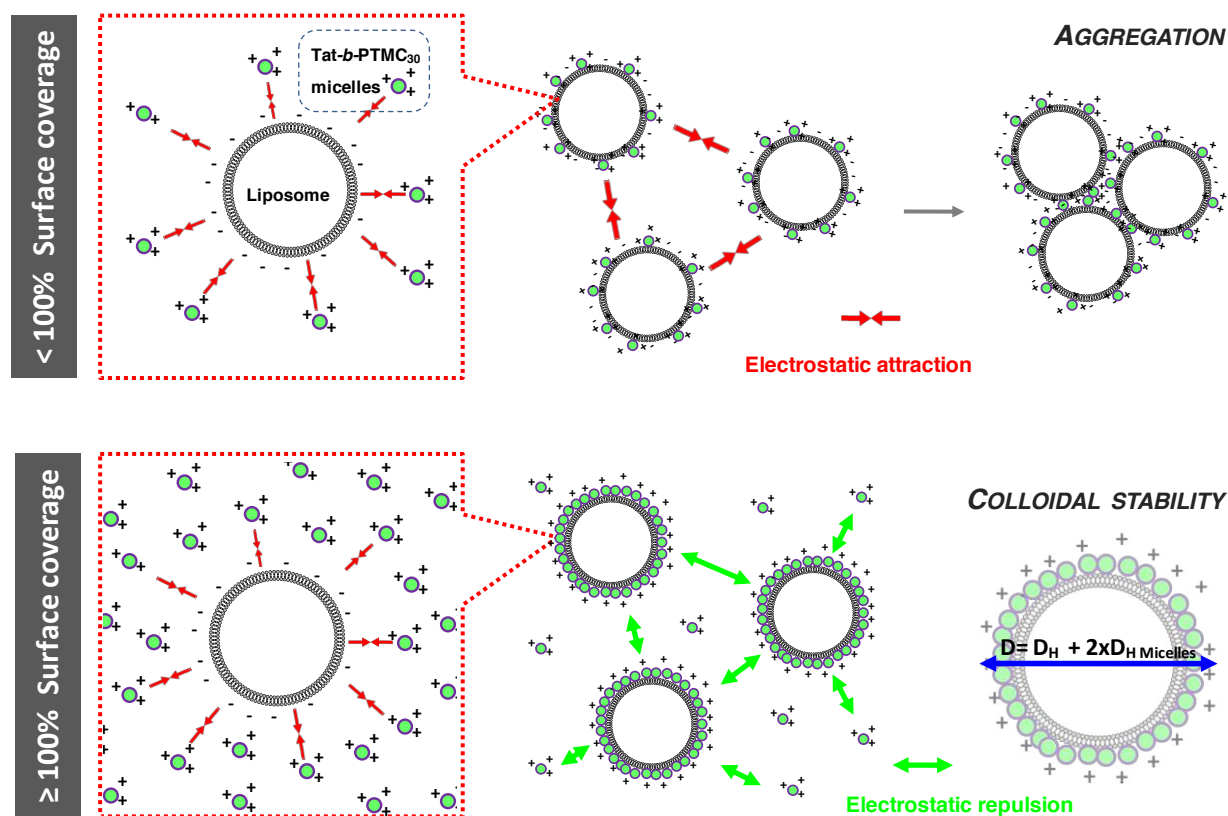


Figure 3 - Schematic drawing illustrating the colloidal evolution of DMPC/DMPG (7:3) liposomes upon Tat-b-PTMC₃₀ micelles addition at concentrations below and above 100% Surface coverage.

A similar effect has been previously reported with negatively charged micelles and positively charged liposomes.^{16, 17} However in our case, micelles were found to be able to cover entirely liposomes surface, suggesting that they are probably densely packed, despite their neat positive surface charge suspected to force to repel from each other. To the best of our knowledge, such a high packing density has not been described in the literature so far.

Finally, these findings also indicate that negative charges at the bilayer surface are crucial and lead to and enable a much higher amount of micelles to be adsorbed at the surface of DMPC/DMPG (7:3) liposomes as compared with DMPC liposomes. This is in good agreement with the consensual hypothesis that Tat-mediated initial association with cell membranes is mainly driven by electrostatic interactions with negatively charged membrane components.

I.3.1.2. Thermotropic phase transition behavior of lipid bilayer

To gain further insights onto the influence of micelles adsorption on the structure of the lipid bilayer, differential scanning calorimetry analyses were performed on DMPC/DMPG liposomes upon addition of Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles (Figure 4). We first noticed the disappearance of the thermal pre-transition (T_{PH}) at $\sim 15^{\circ}\text{C}$, associated with lipid polar heads and originating from periodic ripples at the surface of the bilayer, confirming that micelles were physically located at the surface of the membrane, preventing the formation of the ripple phase.¹⁸

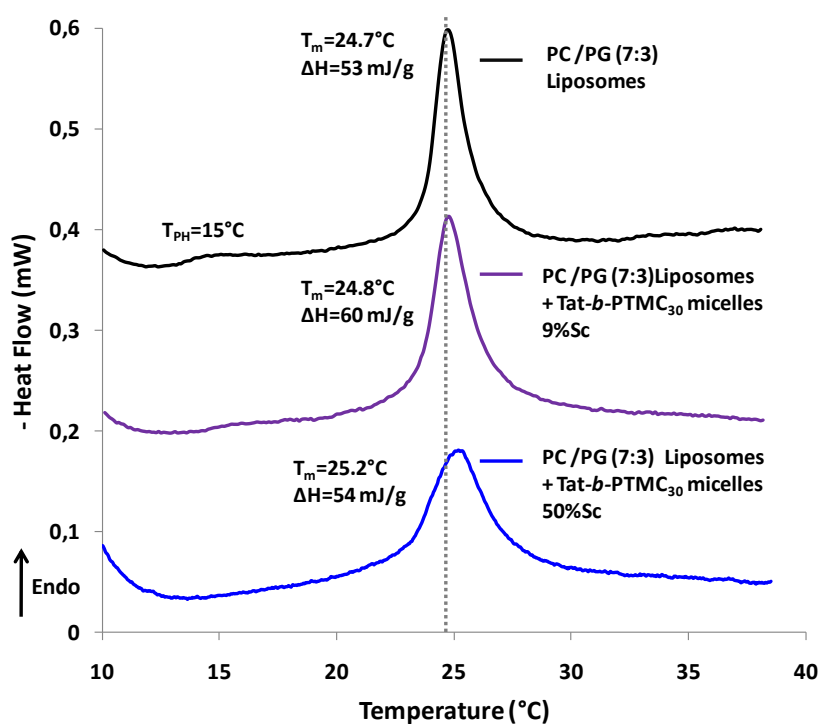


Figure 4 – DSC thermograms of DMPC/DMPG (7:3) liposomes in presence of Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles at increasing concentrations.

Secondly, the enthalpy of the main endothermic transition peak ($T_m \approx 25^{\circ}\text{C}$), corresponding to the gel to liquid crystal phase transition of lipid tails, was found to be conserved among the different conditions, suggesting micelles do not insert between lipid tails. An insertion into the lipid bilayer would indeed break lipid-lipid Van der Waals interactions and lead to a loss of transition enthalpy. However, a significant enlargement of the peak was observed increasing with micelles concentration

without significant shift of its maximum position (melting temperature, T_m defined as the maximum position of the peak), revealing a reduction of the transition cooperativity. Previous studies reported in the literature correlated such a widening of the main transition peak with an increased curvature of membrane bilayers.^{16, 19} In the present case, it might originate from a local bending of the membrane where the micelle is standing to maximize the contact between their respective surfaces. Again, the marked differences between these results and the ones obtained with zwitterionic DMPC liposomes (Figure 1) evidence the importance of membrane negative charges on the amplitude of interactions.

I.3.2. MICELLES WITH VARIABLE TAT-PEPTIDE CONTENT

I.3.2.1. In TRIS buffer (10 mM, 100 mM NaCl, 2 mM EGTA)

DMPC/DMPG liposomes were then mixed with Tat-*b*-PTMC₃₀/PEG-*b*-PTMC₃₈ micelles with increasing ratios of Tat-*b*-PTMC₃₀ at micelle concentrations corresponding to 50% surface coverage. The evolution of LUVs hydrodynamic size was monitored by DLS over time (Figure 5).

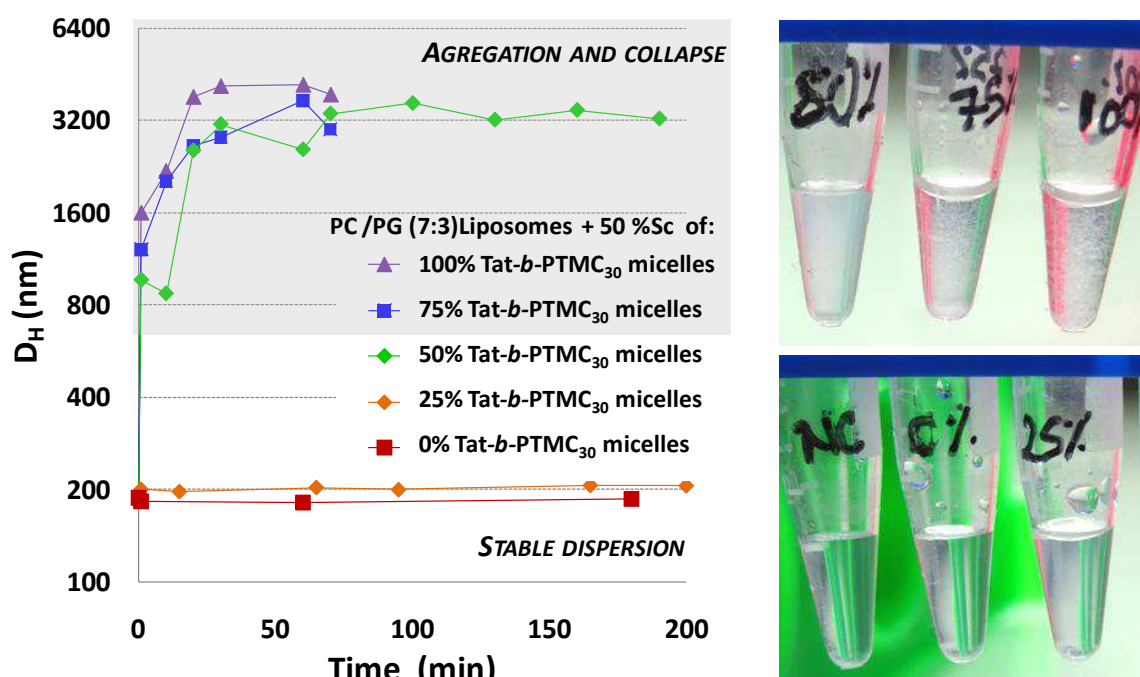


Figure 5 – Hydrodynamic diameter and appearance of DMPC/DMPG (7:3) liposome dispersions mixed with X% Tat-*b*-PTMC₃₀ / (1-X)% PEG-*b*-PTMC₃₈ micelles at a 50% surface coverage.

As observed previously for plain Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles, 75% Tat-containing micelles induced an instantaneous aggregation of LUVs dispersion. Micelles with 50% Tat-*b*-PTMC₃₀ destabilized it as well but in a delayed fashion. In contrast, liposomes remained stable upon addition of 25% Tat-containing micelles, their hydrodynamic diameter being incremented by approximately 20 nm, while plain PEG-*b*-PTMC₃₈ micelles did not affect them in any aspect.

The same experiment was carried out at 150% surface coverage (Figure 6). As expected, all dispersions were stable, the number of micelles introduced being sufficient to saturate all sites of adsorption at the membrane surface and hence ensure colloidal stability. For all Tat-containing micelles, an increase of liposomes diameter was detected, while unchanged in the presence of PEG-*b*-PTMC₃₈ micelles. Zeta potential values were found to increase progressively from strongly negative to highly positive values with Tat content. This suggests that the amount of micelles that can be adsorbed at the surface of liposomes increases with their Tat content. The more Tat peptide in the corona, the more micelles adsorbed onto liposomes. For 50% Tat-containing micelles, liposomes surface charge was neutralized. Then, deprived of electrostatic repulsive interactions to maintain them apart from each other, they underwent a slight aggregation, as evidenced by an increase in size and polydispersity.

All together, these results suggest that the introduction of PEG chains deprived micelles from being able to closely order at the surface of liposomes. This phenomenon seems to mainly occur at a critical value of Tat-*b*-PTMC content (below 75% and above 50%). This finding could possibly be explained by a reduction of micelles affinity or “anchoring potency” towards membranes due to a decrease of Tat peptide on micelle surfaces, together with an inter-micelles steric repulsion arising from PEG chains.

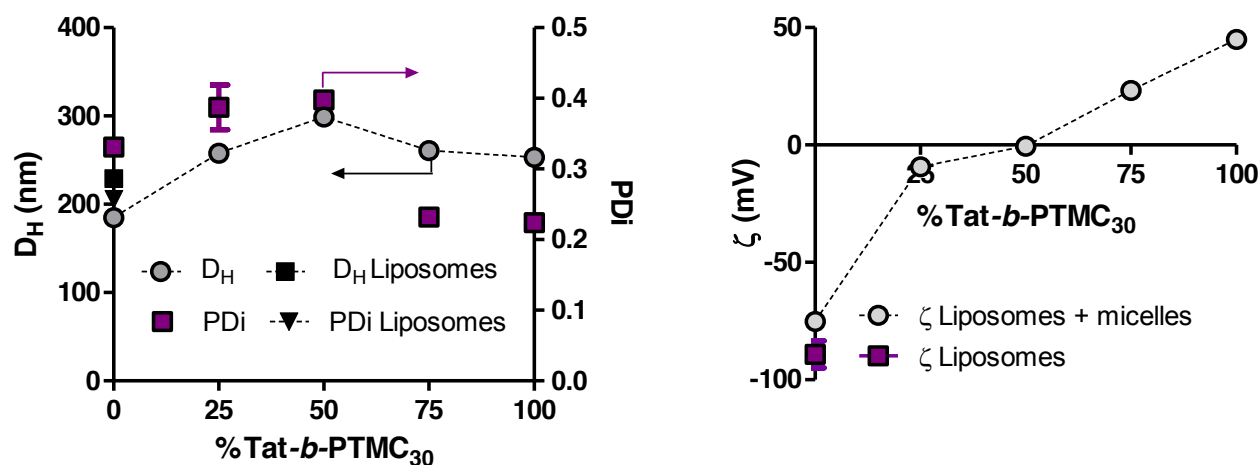


Figure 6 - Hydrodynamic diameter, polydispersity index (left) and zeta potential (right) of DMPC/DMPC (7:3) liposome dispersions mixed with X% Tat-*b*-PTMC₃₀ / (1-X)% PEG-*b*-PTMC₃₈ micelles at a 150% surface coverage.

I.3.2.2. In complemented culture medium

To match as best as possible biological conditions, liposomes and micelles with variable Tat content were mixed together in culture medium complemented with serum similarly to the conditions for *in vitro* experiments. Hydrodynamic size of dispersions was measured by DLS 20 min following their

mix. Interactions between liposomes and micelles appeared to be significantly weakened, since 50% Tat-containing micelles no longer destabilized LUVs dispersions and aggregation induced by 75% Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles was markedly delayed as compared with the same experiments performed in TRIS buffer. Serum proteins are likely to adsorb onto liposomes and provide competitive electrostatic interactions with micelles attenuating liposomes tendency to flocculate.

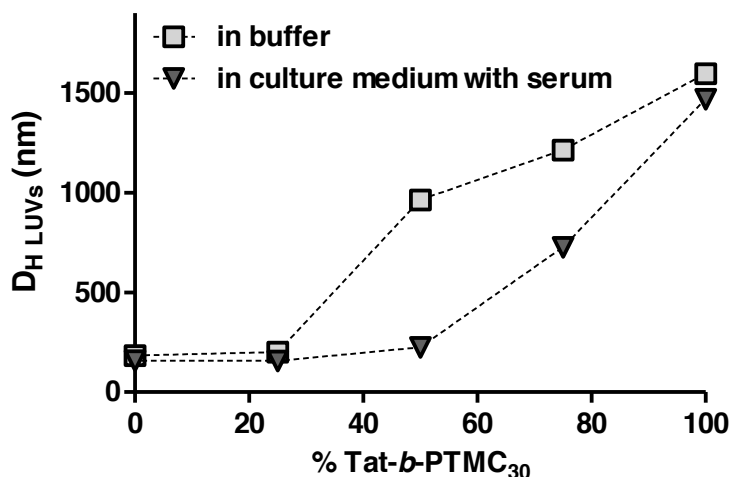


Figure 7 - Hydrodynamic diameter of DMPC/DMPC (7:3) liposome dispersions 20 min after their mixed with X%Tat-*b*-PTMC₃₀ / (1-X)%PEG-*b*-PTMC₃₈ micelles at a concentration corresponding to a liposome surface coverage of 50% either in buffer or culture medium complemented with serum.

These results are fully consistent with the ones obtained with HeLa cells, namely a drastic non-linear decrease of micelles binding on cellular membranes when progressively replacing Tat-*b*-PTMC₃₀ by PEG-*b*-PTMC₃₈ copolymer. LUVs then proved to be a particularly relevant model to mimic and predict membrane interactions.

II. INTERACTIONS OF TAT-*b*-PTMC MICELLES AS STUDIED WITH A PLANAR BILAYER BY PLASMON WAVEGUIDE RESONANCE SPECTROSCOPY

II.1. MODEL SYSTEM AND INFORMATION PROVIDED BY PWR SPECTROSCOPY

Plasmon waveguide resonance spectroscopy is a relatively new and highly refined technique that enables to probe conformational changes occurring on membranes when interacting with ligands through the variation of their optical properties. Principles and experimental set up are further detailed in supplementary information (Appendix S2). Briefly, a planar lipid bilayer is formed at the surface of PWR resonator while the ligand is gradually added to an aqueous compartment directly in contact with the membrane. PWR resonator then monitors the angular variation of the resonance

peak, resulting from ligand adsorption on the membrane and from the subsequent molecular reorganization that may occur. In the present study, PWR spectroscopy was used to deepen the understanding of the interactions of Tat-*b*-PTMC-containing micelles with model membranes. Planar lipid bilayer composed of either egg PC or egg PC/POPG (7/3 mol/mol) was here used as models of zwitterionic and charged membranes respectively (Figure S4). Egg PC is a natural PC-phospholipid blend extracted from egg yolk and widely used as eukaryotic cell membrane model. However, for LUVs preparation, DMPC was preferred over egg PC since egg-PC bilayers present a very wide phase transition endothermic peak due to the intrinsic heterogeneity of their lipid tails, making them inappropriate for DSC analyses. POPG is a phospholipid featuring an anionic phospho-*rac*-(1-glycerol) polar head and two dioleoyl hydrocarbon chains which is the most abundant lipid tail found in egg PC. Micellar dispersions used were the same as those prepared for DLS and DSC measurements (Table 1). Control experiments included Tat peptide as a single molecule to possibly enlighten the different behavior between the peptide alone and the peptide presented at the micelles surface. This work was performed by Dr. Isabel Alves at CBMN in Bordeaux.

II.2. INTERACTIONS WITH PLANAR BILAYERS: STRUCTURAL CHANGES AND BINDING PROFILES

II.2.1. MASS AND STRUCTURAL CHANGES: TAT-*b*-PTMC MICELLES VERSUS TAT PEPTIDE

As shown in figure 8 (panel A) and figure 9, interaction of Tat-*b*-PTMC₃₀ and Tat-*b*-PTMC₆₆ micelles with an egg PC bilayer lead to a saturating binding event evidenced by positive spectral changes for both polarizations, respectively + 18 and + 33 millidegrees for *p*-polarization, + 13 and + 16 millidegrees for *s*-polarization at saturation. An increase in the angle resonance position is correlated (among other factors) to an increase in the refractive index of the system which is directly correlated with an increase in mass.

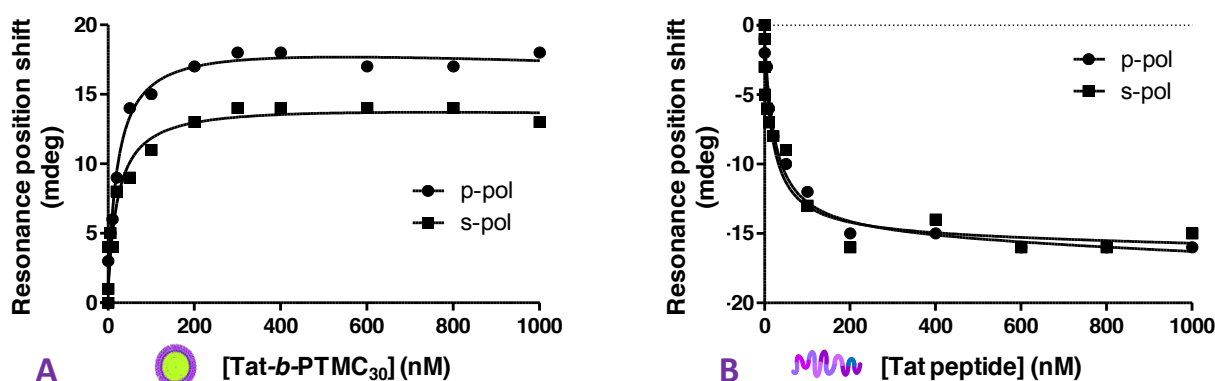


Figure 8 - Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles and Tat peptide interaction with an egg PC lipid bilayer. Resonance position shift in the PWR minima as a function of ligand addition observed for *p*- (●) and *s*- (■) polarizations.

The trend observed then indicated that Tat-*b*-PTMC micelles bound to the planar membrane, leading to an increase of mass. The shifts in *p*- and *s*-polarization were found to be slightly anisotropic (different magnitude for the two polarizations) meaning that the membrane conformational changes induced by micelles were different in the perpendicular and parallel directions relatively to the membrane. Changes in the perpendicular direction (*s*- polarization) were slightly more important than the ones in the parallel direction (*p*- polarization). The higher values measured for Tat-*b*-PTMC₆₆ micelles as compared to Tat-*b*-PTMC₃₀ are likely due to the higher mass of a single micelle so that the overall signal measured has a larger magnitude.

In contrast, interaction of Tat peptide as a single molecule with the same membrane lead to negative spectral shifts for both polarizations (Figure 8, panel B). Decrease in the resonance angle was then related with a decrease in mass of the system originating from a lipid reorganization leading to lower mass over surface ratio. Therefore, Tat peptide binding increased the surface area occupied by each lipid molecule, in good agreement with observations previously reported in the literature showing that Tat peptide can insert and “float” between loosely packed polar heads of model lipid bilayers.³⁻⁷ Tat peptide then provided a completely different response when presented at the surface of micelle or as soluble single molecule. A graphical analysis of the PWR spectral shifts for both polarizations was performed to provide information on the relative contribution of mass and structural changes to spectral modifications. For all samples, mass changes contribution to the global spectral variation dominated relative to the structural changes contribution (Table 3).

<i>Entry</i>	Egg PC		Egg PC/POPG	
	Mass (%)	Structure (%)	Mass (%)	Structure (%)
Tat- <i>b</i> -PTMC ₃₀ micelles	94	6	93	7
Tat- <i>b</i> -PTMC ₆₆ micelles	76	24	88	12
Tat peptide	91	8	94	6

Table 3 - Mass and structural contributions to the spectral changes observed upon Tat-*b*-PTMC micelles or Tat peptide interaction (at saturating concentrations) with lipid bilayers.

II.2.2. BINDING AFFINITY: ZWITTERIONIC VERSUS NEGATIVELY CHARGED MEMBRANES

Experiencing saturating binding events, the difference between the binding density [M] (maximum amount that can be bind per surface unit) and binding affinity expressed by the dissociation constant K_d (amount of ligand remaining free in the solution when 50% of binding sites are occupied with a ligand), must be stressed out. As DLS experiments proved that a high fraction of micelles were adsorbed on LUVs surface, the concentration in micelles remaining free in solution could not be

assimilated to the total concentration in micelles. This prevented us from determining the apparent dissociation constants K_d of micelles from regular hyperbolic fit of PWR curves. We therefore used a graphical method extrapolating the tangent of the curves at the origin to calculate $[M]$ and K_d (Appendix S3).

We observed that Tat-*b*-PTMC micelles saturate negatively charged egg PC/POPG membranes at much lower concentrations than zwitterionic egg PC membranes, and that the dissociation constant K_d decrease from 5.7 nM to 1.3 nM when introducing negatively charged POPG phospholipid in the bilayer composition (Figure 9). Micelles binding affinity is then higher when the membrane is negatively charged, which is consistent with DLS and DSC findings.

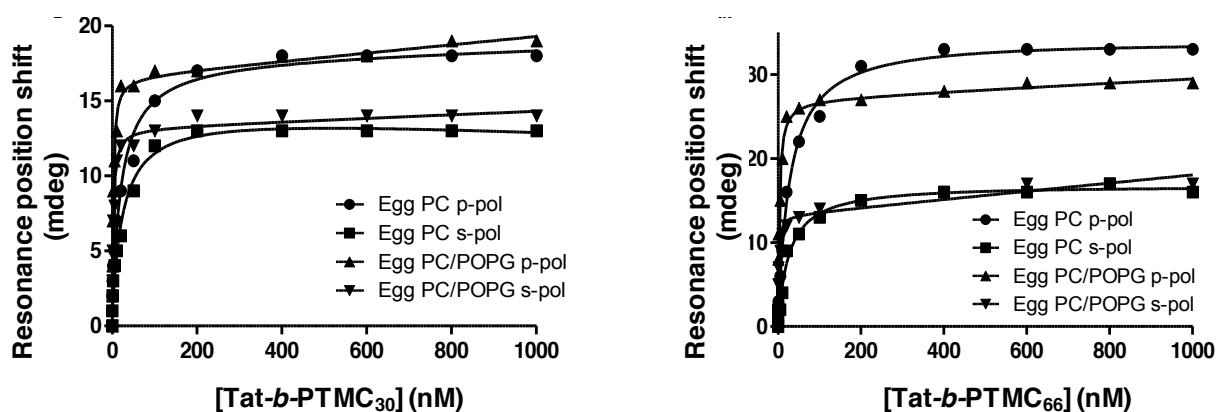


Figure 9 - Tat-*b*-PTMC micelles interaction with lipid bilayers either zwitterionic (egg PC) or negatively charged (egg PC/POPG). Resonance position shift in the PWR minima is plotted as a function of ligand addition observed for *p*- and *s*-polarizations.

II.2.3. MICELLES WITH VARIABLE TAT-PEPTIDE CONTENT

Interactions between membranes and Tat-*b*-PTMC₃₀/PEG-*b*-PTMC₃₈ micelles with variable Tat content were also measured by PWR. For all Tat-containing samples, namely 25%, 50% and 75%, the resulting spectral response proved to be very similar than for plain Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles, with positive spectral shifts for both polarizations of similar amplitudes and a dominating mass contribution of 94% whatever the Tat-*b*-PTMC fraction.

As no clear linear trend could be observed at the beginning of the curves, binding density $[M]$ calculation probably lacks accuracy (Figure 10, panel A). Nevertheless, in good agreement with results obtained from DLS experiments, $[M]$ was found to decrease when % Tat-*b*-PTMC decreases (Figure 10, panel B). More surprisingly, we observed that the dissociation constant K_d significantly decreases with Tat-*b*-PTMC content, evidencing an enhanced affinity when lowering Tat peptide density (for an equal quantity of binding sites, a lower concentration is needed to bind 50% of them). Same trends were observed with zwitterionic egg PC membranes. These data reveal that the impact

of Tat-peptide density on micelles interactions with membranes is far from trivial and that affinity must not be assimilated with binding density.

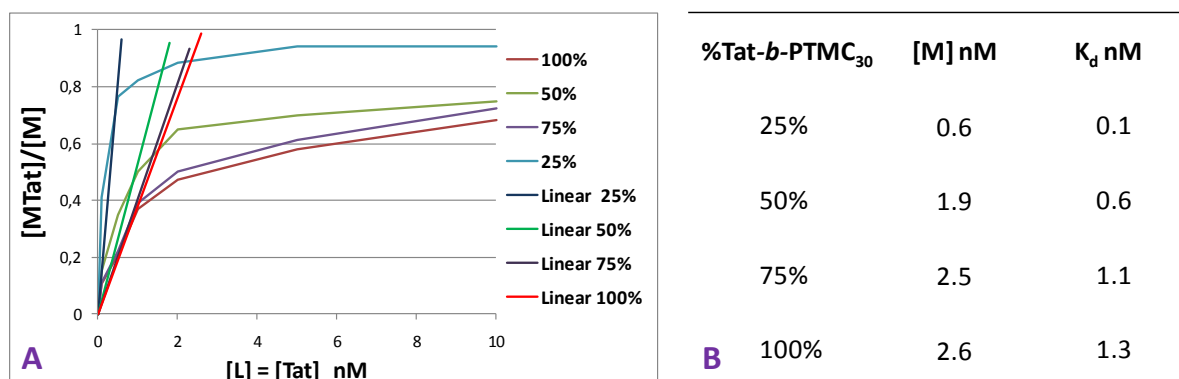


Figure 10 – X% Tat-*b*-PTMC₃₀/(1-X)% PEG-*b*-PTMC₃₈ micelles interactions with egg PG/POPG bilayer. Panel A: Binding ratio (ratio of bound site concentration [MTat] over total binding site concentration [M]) as a function of ligand concentration observed for *s*-polarization and associated linear fit at the origin; Panel B: Binding densities [M] and dissociation constants K_d calculated from PWR curves.

Finally, interaction of control PEG-*b*-PTMC micelles with lipid bilayers also lead to positive spectral shifts for both polarizations, but, in contrast to what was observed with Tat-containing micelles, the response was non-saturating indicating a non-specific binding (Figure S4).

III. INTERACTIONS OF TAT-*b*-PTMC MICELLES AS STUDIED WITH LIPOSOMES MONITORED BY SMALL ANGLE X-RAY SCATTERING

III.1. MODEL SYSTEM AND INFORMATION PROVIDED BY SAXS

Small angle X-ray scattering (SAXS) is a non-destructive technique which probes matter ordering at the nano-scale. Structural features of model membranes-micelles complexes were investigated with this powerful technique thanks to collaboration with Prof. Gérard Wong and Dr. Nathan Schmidt (UCLA, USA).

Micelles for SAXS experiments were prepared in TRIS buffer (10 mM) with sodium chloride (100 mM), by direct dissolution in the case of Tat-*b*-PTMC₆₆ and by nanoprecipitation in the case of Tat-*b*-PTMC₃₀ so as to obtain in this case micelles fully comparable with other micelles with variable Tat content (Table 3). As a consequence of the higher ionic strength of the buffer, micelles appeared to be slightly smaller than previously, with a hydrodynamic diameter of 16 nm instead of 25 nm when obtained by direct dissolution. Both Tat-*b*-PTMC₃₀ and Tat-*b*-PTMC₆₆ were analyzed by SAXS and

their intensity curves were well-fitted with the form factor of spheres of 13 and 30 nm-large diameter respectively (Figures S7 and S8).

<i>Entry</i>	Preparation process	Buffer	D_H(nm)	PDi	ζ (mV)	D_{ave}^a (nm)
Tat- <i>b</i> -PTMC ₆₆	Direct dissolution	TRIS 10 mM	53	0.18	48±6	30
Tat- <i>b</i> -PTMC ₃₀	Nanoprecipitation		16	0.06	46±7	13
75% Tat- <i>b</i> -PTMC ₃₀ /25% PEG- <i>b</i> -PTMC ₃₈	Nanoprecipitation	NaCl 100 mM	22	0.11	39±8	-
50% Tat- <i>b</i> -PTMC ₃₀ /50% PEG- <i>b</i> -PTMC ₃₈	Nanoprecipitation		27	0.07	33±4	-
PEG- <i>b</i> -PTMC ₃₈	Nanoprecipitation		33	0.08	-8±2	-

^aAverage diameter calculated from SAXS curves fits (Fig. S7 and S8).

Table 4 - Characteristics of micelles studied in SAXS experiments.

Small unilamellar liposomes (SUVs) prepared by sonication from ternary lipid mixtures of DOPS, DOPE and DOPC, with constant amount of DOPS and different DOPE/DOPC weight ratios, namely (8:0:2), (2:7:1), (2:6:2) and (2:4:4) were used as model membranes (Figure S5). Phospho-L-serine (PS) anionic lipid head group was chosen to model negatively charged anionic biomolecules such as glycoproteins, while phosphoethanolamine (PE) was introduced to increase negative intrinsic curvature of the membrane monolayers, making them more sensitive to topological structural changes involving curvature deformation as usually observed with CPPs. This particular phospholipid was then used not only as a physiologically relevant compound but also as a mean to amplify and thus detect easier membrane deformation originating from their interaction with micelles.

III.2. TAT-*b*-PTMC₃₀ AND TAT-*b*-PTMC₆₆ MICELLES

III.2.1. TOPOLOGICAL ORDERING AS FUNCTION OF MICELLES CONCENTRATION

Interactions between Tat-*b*-PTMC₃₀ and Tat-*b*-PTMC₆₆ micelles with liposomes composed of 80% DOPE and 20% DOPS were first investigated at different chimera over lipid ratio (P/L - P standing for meaning the full Tat-*b*-PTMC chimera). Appearance of diffraction reflection peaks on SAXS intensity curves evidenced a marked structural transition of the vesicular bilayer towards a crystalline phase (Figure 11). Ratios of scattering vectors at reflections were analyzed as presented in supplementary information (Appendix S4) and were found to match the $\sqrt{2} : \sqrt{3} : \sqrt{4} : \sqrt{6}$ characteristic reflections indicating the formation of cubic Pn3m “double diamond” phase. Their lattice constants (a) were deduced from linear fits of d-spacing values (Appendix S4) and were found relatively constant over

the ranged of chimera over lipid ratio studied, around 20 nm for Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles and 17-19 nm for Tat-*b*-PTMC₆₆ micelles.

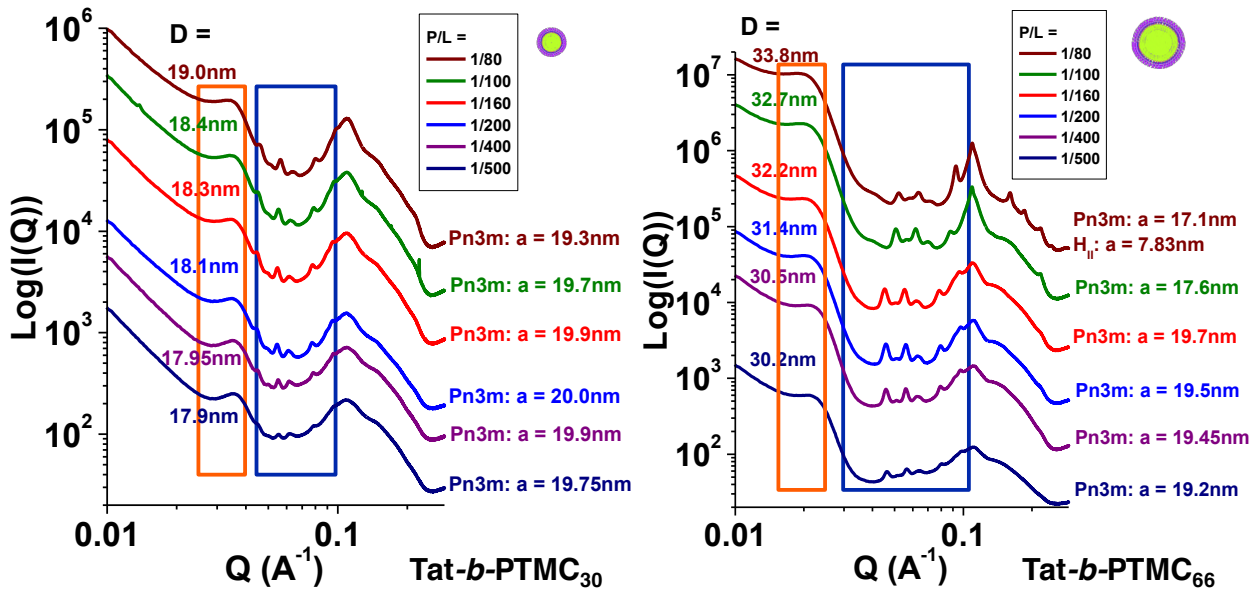


Figure 11 - SAXS curves for DOPE/DOPS (80/20) liposomes interacting with Tat-*b*-PTMC₃₀ (left) and Tat-*b*-PTMC₆₆ micelles (right) at increasing chimera (P for polymer) over lipid molar ratios P/L. *D* corresponds to the d-spacing of micelle-micelle structure correlation peak (orange box), while *a* refers to the lattice parameter of the different crystalline phases observed, namely cubic Pn3m and hexagonal H_{II} (blue box).

Pn3m is a bicontinuous cubic phase where two non-intersecting water channels are separated by a lipid bilayer.²⁰ The midpoint of the bilayer traces out a minimal surface with saddle-splay (or equivalent negative Gaussian) curvature at every point, meaning that geometrically the surface of the bilayer curves upwards in one direction and downwards in the perpendicular direction, locally giving it the shape of a saddle (Figure 12).

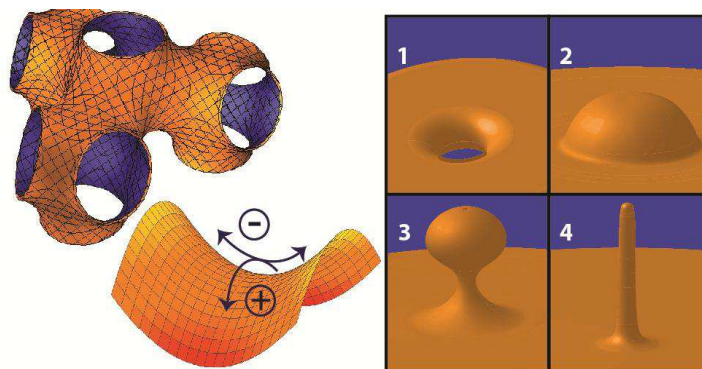


Figure 12 - Illustrations of Pn3m cubic phases, surface with saddle-splay curvature and associated membrane morphologies for which such curvature is topologically required. Reproduced from ref.²¹

Saddle-splay curvature is necessary for “hole” formation in membranes but also for a variety of membrane destabilizing processes, including endosomes blebbing and budding. Induction of negative Gaussian curvature-rich phases by Tat-*b*-PTMC micelles was consistent with previous findings with

Tat peptide alone, with Tat-decorated micelles as well as with other arginine-rich CPPs and nanoparticles.¹²⁻¹⁴ However, in all these examples a higher threshold ligand over lipid ratio value was required for negative Gaussian curvature to occur. In contrast, Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles induced the formation of Pn3m cubic phases even at the lowest measured chimera over lipid ratio (1/500), meaning that Tat peptide is much more efficient to induce this specific topological ordering when self-assembled into Tat-*b*-PTMC micelles than when used as single molecule or presented on the surface of other types of nanoparticles.

In addition to reflection signals of Pn3m cubic phase coming from the membrane restructuring, a second correlation peak, absent from SAXS curves of bare micelles, appeared on intensity curves upon addition of micelles. The latter evidenced the structural arrangement of the system in repeating 3-dimensional pattern. The d-spacing associated with this pattern (D - corresponding to the scattering vector at maximum of this peak in the real space) was found to be very close to diameter of micelles, 18 and 30 nm for Tat-*b*-PTMC₃₀ and Tat-*b*-PTMC₆₆ micelles respectively. Similarly to the cubic phase of lipids, this ordering phenomenon occurred even at very low concentration in micelles.

We hypothesized that a membrane-mediated attraction between micelles forces them to come much closer than they would be in the case of a random distribution based purely on electrostatics and packing arguments and that leads them to order in a regular arrangement at the surface of liposomes. This clustering phenomenon increases locally Tat-*b*-PTMC micelles concentration, allowing the system to reach the threshold concentration needed to generate lipid cubic phases with negative Gaussian curvature. The correlation peak observed then corresponds to a micelle-micelle quasi-2 dimensional liquid-like ordering with a characteristic average distance D between micelles. As suggested by previous DSC results, Tat-*b*-PTMC micelles are suspected to locally bend the membrane, generating mechanical strain. The membrane-mediated attraction between micelles could then potentially originate from this bending strain that the membrane would try to minimize by getting the micelles closer.

III.2.2. TOPOLOGICAL ORDERING AS A FUNCTION OF MEMBRANE COMPOSITION

When replacing progressively the spontaneous negative curvature lipid DOPE by DOPC, more representative of eukaryotic cells phospholipid composition, the formation of the Pn3m cubic phase was no longer detected (as expected since DOPE was precisely used to amplify this phenomenon) (Figure 14). Indeed, at a constant P/L of 1/80, the characteristic peaks of the Pn3m structure disappeared for a critical composition above DOPE/DOPC/DOPS (70/10/20).

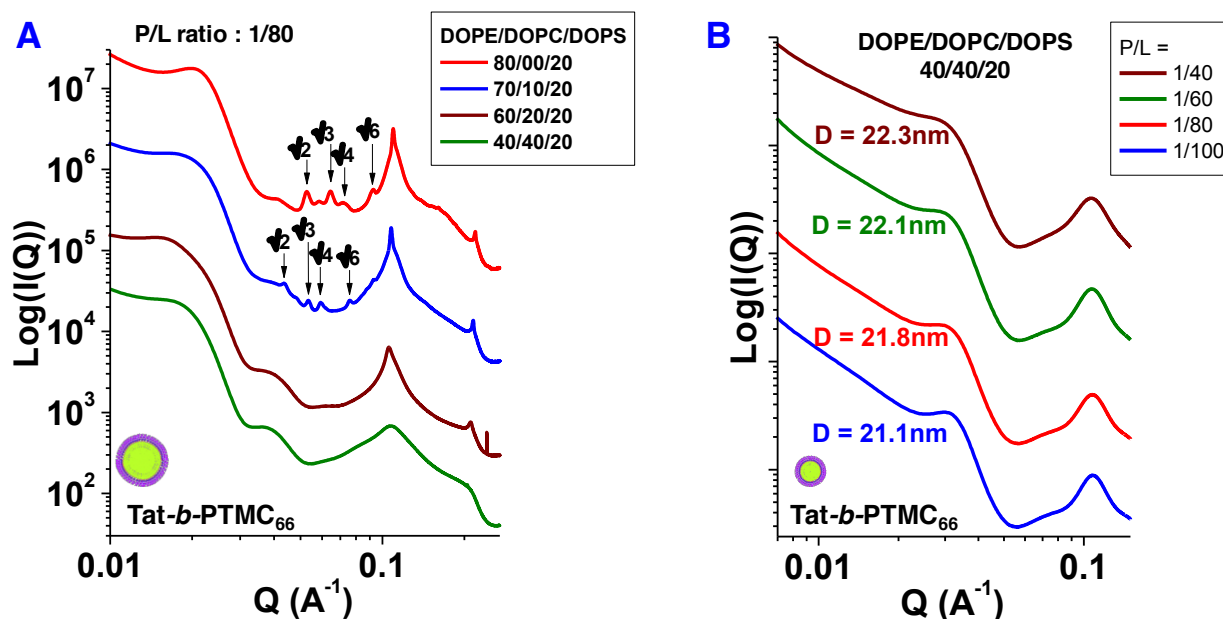


Figure 13 – A: SAXS curves for liposomes with variable lipid compositions interacting with Tat-*b*-PTMC₆₆ micelles at a chimera over lipid molar ratio P/L=1/80 (similar results were obtained with Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles); **B:** SAXS curves for DOPE/DOPC/DOPS (40/40/20) liposomes interacting with Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles (right) at increasing chimera over lipid molar ratios P/L.

However the correlation peak attributed to inter-micelle lattice was conserved for both micelles size even at low concentration, confirming that the topological ordering of the bilayer in cubic phase is a consequence of the clustering phenomenon, and not the other way round (Figure 14 panel B and figure S8).

III.3. MICELLES WITH VARIABLE OF TAT-PEPTIDE CONTENT

SAXS experiments were as well performed on Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles with variable Tat content. When lowering Tat peptide density in the corona of micelles at a constant chimera/copolymer over lipid ratio, we observed the rapid disappearance of the Pn3m cubic phase diffraction pattern as well as clear attenuation and shift of micelles correlation peak towards lower scattering vectors (meaning higher d-spacing) whatever the membrane composition (Figure 15 and figure S9). This result suggests that compact ordering and clustering of micelles at the surface of membrane only occurs at high Tat-peptide density. This also clearly reveals that the membrane and micelle ordering are strongly correlated. This is consistent with all previous results obtained when diluting Tat with PEG chains.

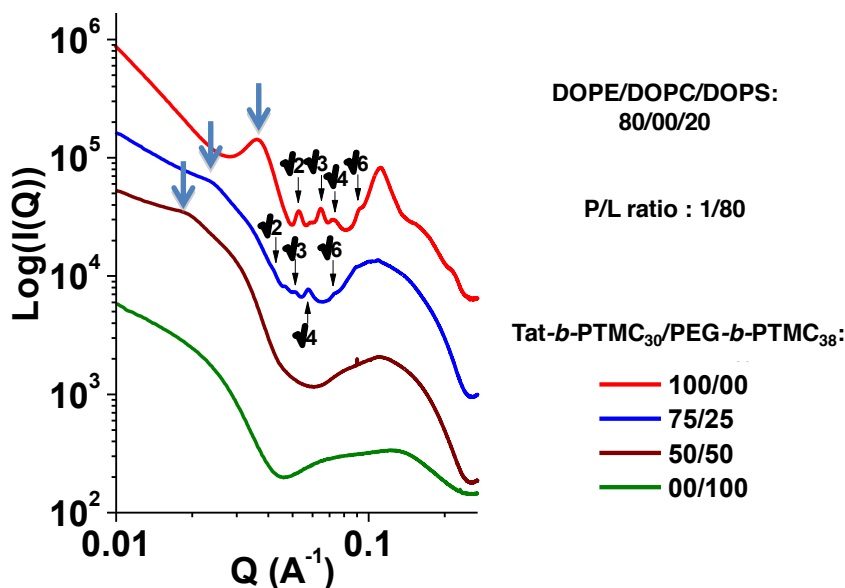


Figure 14 - SAXS curves for DOPE/DOPC/DOPS (80/00/20) liposomes in presence of micelles with variable Tat-*b*-PTMC₃₀ content at constant chimera and copolymer over lipid molar ratio P/L=1/80. Blue arrows indicate micelles correlation peak.

CONCLUSION

Complementary biophysical techniques were used to shed light on the interactions between Tat-*b*-PTMC micelles and phospholipid bilayer model membranes with regard to membrane surface charge and Tat-peptide density on the surface of micelles. PWR spectroscopy measurements on planar bilayers on one hand, and DLS and DSC experiments on large unilamellar vesicles on the other hand, showed that micelles possess a much higher affinity for charged membranes than for zwitterionic membranes, confirming the essential role of negatively charged membrane biomacromolecules (mostly glycoproteins and glycolipids) in the binding of micelles to cellular membranes. SAXS measurements also evidenced that Tat-*b*-PTMC micelles adsorb in a dense arrangement onto membranes and, induce the formation of negative Gaussian curvature-rich cubic phases on membranes with negative intrinsic curvature at very low concentration. As suggested by the significant enlargement of the lipid gel-to-liquid transition peak, local modifications of the membrane curvature are suspected to occur at the binding site with no altering of the integrity of the bilayer by rupture or breaching insertion between lipid tails. We assume micelles clustering to be driven by a membrane-mediated force that tends to relax the bending strain, imposed by the strong electrostatic attraction between Tat-presenting micelles and negatively charged polar head of lipids. Such phenomenon, to our knowledge, has never been observed for Tat peptide, Tat peptide conjugates or Tat-decorated nanoparticles. We suspect it to arise from the particular combination of high Tat-peptide density, high surface to volume ratio and low polydispersity featured by Tat-*b*-PTMC

micelles. When replacing progressively Tat-*b*-PTMC₃₀ by PEG-*b*-PTMC₃₈, the ability of the micelles to induce lipid membrane ordering and to get closer from each other is rapidly lost, giving way back to random adsorption distribution. These results seem consistent with the ones obtained on HeLa cells, namely a non-linear decrease of micelles binding on cellular membranes when lowering their Tat-content. However, the way Tat-peptide density affects micelle/membrane molecular affinity is still unclear and may not follow the same trend. PWR data processing is still in progress to further address that question.

More generally, this study demonstrates that phospholipid bilayers are suitable cell membrane models to understand and even predict interactions between nanoparticles and membranes before involving tedious biological assays, and highlights the remarkable behaviour of biofunctional nanoparticles in biological settings as compared to their molecular counterparts.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials and reagents

All lipids were purchased from Avanti Polar Lipids and used as received. Solvents and other chemical reagents were obtained from Sigma-Aldrich. Tat-*b*-PTMC chimeras and PEG-*b*-PTMC₃₈ block copolymer were synthesized as described in chapter 2 and 3.

Experimental procedures

Preparation of micelles.

Tat-*b*-PTMC₃₀ and Tat-*b*-PTMC₆₆ micelles for DLS, DSC and PWR analyses were prepared by direct dissolution at 10 mg.mL⁻¹ in aqueous buffer (10 mM TRIS, 100 mM NaCl, 2 mM EGTA, pH 7.4) under stirring for 24 hrs.

Mixed Tat-*b*-PTMC₃₀/PEG-*b*-PTMC₃₈ micelles and Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles for SAXS experiments were prepared by a solvent-displacement process also called “nanoprecipitation”. Tat-*b*-PTMC₃₀ chimera and PEG-*b*-PTMC₃₈ block copolymer were dissolved separately in DMSO and mixed together in variable proportions so as to obtain 10 mg of the different blends in a final volume of 100 μ L DMSO:

Entry	% w/w	
	Tat- <i>b</i> -PTMC ₃₀	PEG _{2,000} - <i>b</i> -PTMC ₃₈
100% Tat	97	0
75% Tat	73	24
50% Tat	49	49
25% Tat	24	73
0% Tat	0	97

600 μ L of buffer at pH 7.4 (10 mM TRIS, 100 mM NaCl, 2 mM EGTA for DLS, DSC and PWR analyses, 10 mM TRIS, 100 mM NaCl for SAXS experiments) was then poured in the mixture under stirring. The homogenous dispersions obtained were subsequently extensively dialyzed against buffer using 25 kDa cut-off tubing to remove any trace of organic solvent.

Preparation of liposomes for DLS and DSC experiments (“Large” Unilamellar Vesicles - LUVs).

1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) and 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sodium salt - DMPG) were dissolved separately in chloroform and chloroform/methanol (3:2) respectively at a concentration of 3 mg/mL. Lipid solutions, either 4 mL DMPC, or 2.8 mL DMPC and 1.2 mL DMPG to obtain a DMPC/DMPG mixture with a (7:3) mass ratio, were transferred in a round flask bottom. Solvent was evaporated using a rotary evaporator

under reduced pressure and heating above the gel/liquid-crystal phase transition temperature of lipids ($T_m \approx 25^\circ\text{C}$). The dry lipid film formed on the wall of the rotating flask was then allowed to rehydrate in buffer (1 mL) under rotation and heating above lipids T_m during 1 hr. Still heating above lipids T_m , the resulting multilamellar vesicle suspension was extruded at least 11 times through a $0.2\ \mu\text{m}$ pore-sized polycarbonate membrane using an Avanti® Mini-Extruder. Final concentration of the obtained liposome dispersion was determined by dry extract weighing. As with time vesicles fusion increase polydispersity and size of the dispersions, samples were kept in the fridge, namely above the lipids T_m , and used within the week following their preparation.

Dynamic light scattering and zeta potential measurements. Dynamic light scattering and zeta potential measurements were performed using a Malvern Nano ZS ZetaSizer equipped with a standard 632.8 nm HeNe laser. The data were recorded at 25°C with a scattering angle of 90° , and mean hydrodynamic diameters and size distributions were determined with the second order cumulant analysis method. For zeta potential measurements, samples were diluted tenfold in 1 mM NaCl. Laser Doppler micro-electrophoresis was conducted using M3-PALS (Phase analysis Light Scattering) Malvern technology with sequential fast and slow field reversal applying a potential of $\pm 150\ \text{V}$. The so-measured electrophoretic mobility (μ) was then converted to zeta potential (ζ) using the Smoluchowski approximation. Liposomes at 0,5 mg/mL and micelles at varying concentrations were thoroughly mixed and analysed at different times.

Differential scanning calorimetry. Thermograms were recorded on a MicroDSC III calorimeter from Setaram. Liposomes and micelles solutions were thoroughly mixed just before analysis. 500 μL of the resulting dispersion, containing liposomes at 2 mg/mL and micelles at a variable concentration, was introduced and weighted in the measurement cell. The reference cell was filled with an equivalent mass of buffer. Sample was first stabilized at 5°C for 1 hr. Five heating and cooling cycles were then successively recorded from -5 to 40°C at a scan rate of $1^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Transition temperatures and enthalpies were calculated from data of the last heating slope with "Calisto Processing" software.

Plasmon waveguide resonance spectroscopy. The lipid films were prepared as previously reported in literature^{22, 23} and as described in supplementary information. Lipid planar bilayers were formed on the hydrated silica surface of the PWR resonator from lipid solutions at 5 mg/mL containing egg phosphatidylcholine (PC) and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-*rac*-(1-glycerol) (sodium salt - POPG) in squalene/butanol/methanol (0.05:9.5:0.5, v/v) at either (1:0) or (7:3) molar ratios. All experiments were carried out at ambient temperature, using 10 mM TRIS buffer at pH=7.4 containing 2 mM EGTA and 100 mM NaCl in the 0.5 mL sample cell. Ligand (micelles or Tat peptide) concentration was increased by adding incrementally ligand in the aqueous

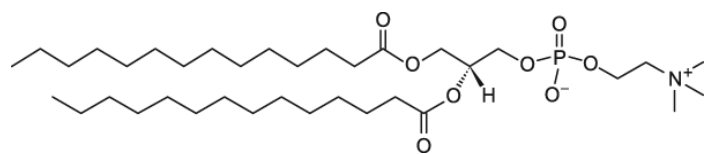
compartment. The spectral changes were recorded for the two polarizations used: *p* and *s*, using a Beta PWR instrument from Proterion Corp. (Piscataway, NJ) that records the relative reflectance *versus* the absolute angle with a resolution of 1 mdeg.

Preparation of liposomes for SAXS experiments (“Small” Unilamellar Vesicles - SUVs).

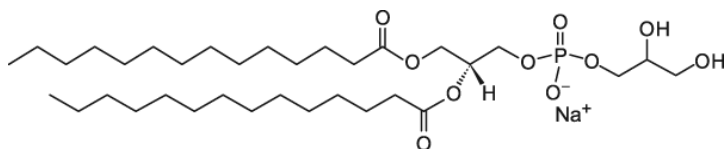
1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (sodium salt - DOPS), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) were purchased from Avanti Polar Lipids and were used without further preparation. DOPC and DOPE were dissolved in chloroform and DOPS were dissolved in chloroform/methanol (9:1). Ternary mixtures DOPS/DOPE/DOPC were prepared with constant amount of DOPS and different DOPE/DOPC mass ratios: (8:0:2), (2:7:1), (2:6:2) and (2:4:4). Lipid solutions were dried under N₂ and desiccated under vacuum overnight. The dried lipid films were rehydrated with 100mM NaCl, 10mM Tris at pH 7.4 to a final concentration of 20 mg/mL at 37 °C overnight and sonicated until clear. Vesicles were obtained by extrusion through a 0.2- μ m nucleopore (Whatman, Inc.) filter.

Small angle X-ray scattering measurements. Micelles and liposomes were thoroughly mixed at specific molar ratios in buffer (TRIS 10 mM, NaCl 100 mM pH 7.4) and sealed in quartz capillaries. SAXS data were collected at Stanford Synchrotron Radiation Laboratory (BL4-2) and at the Advanced Light Source (BL 7.3.3) using 10-11 keV, and 10 keV X-rays, respectively. The scattered intensity was collected using a Rayonix MX225-HE detector (pixel size 73.2 μ m) at SSRL, and a Pilatus 100k detector (pixel size 172 μ m). All experiments were conducted at room temperature. The 2D SAXS powder patterns were integrated using the Nika²⁴ 1.48 package for Igor Pro 6.21 and FIT2D²⁵.

SUPPORTING INFORMATION

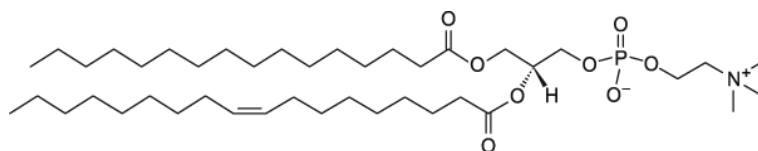


DMPC _ PC(14:0/14:0)_ Zwitterionic polar head

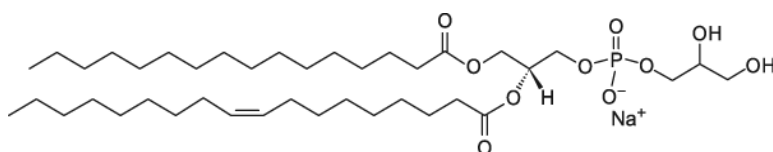


DMPG PG(14:0/14:0) Anionic polar head

Figure S1- Phospholipids used to prepare large unilamellar liposomes (LUVs) for DLS and DSC experiments.

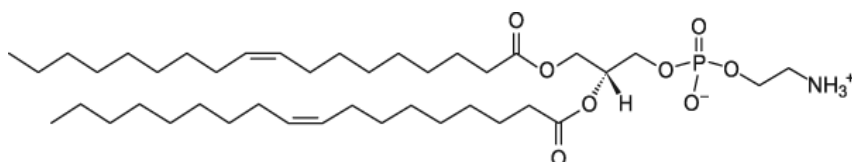


Egg PC _ natural extract _99% L- α -PhosphatidylCholine_ Zwitterionic polar head

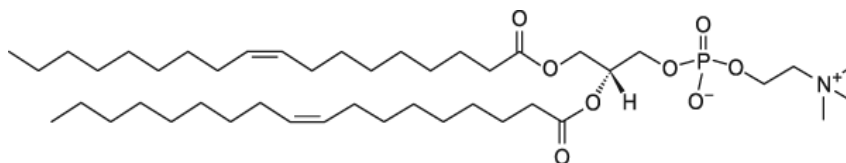


DOPG _ PG(16:0/18:1(9Z))_ Anionic polar head

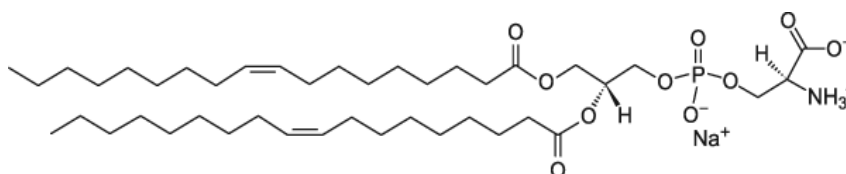
Figure S2 - Phospholipids used to prepare planar bilayer for PWR experiments.



DOPE _ PE(18:1(9Z)/18:1(9Z))_ Zwitterionic polar head – Negative intrinsic curvature ($C_0 < 0$)



DOPC _ PC(18:1(9Z)/18:1(9Z))_ Zwitterionic polar head– No intrinsic curvature ($C_0 \sim 0$)



DOPS _ PS(18:1(9Z)/18:1(9Z))_ Anionic polar head – No intrinsic curvature ($C_0 \sim 0$)

Figure S3 - Phospholipids used to prepare small unilamellar vesicles (SUVs) for SAXS experiments.

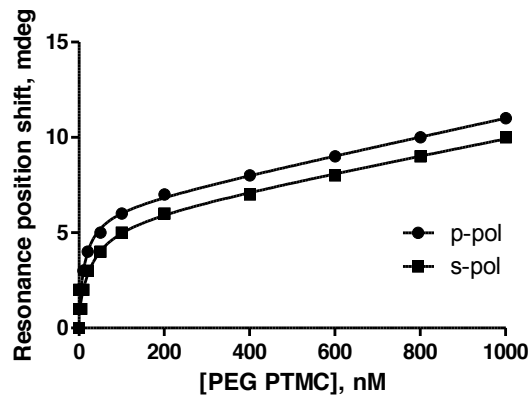


Figure S4 - PEG-*b*-PTMC₃₈ micelles interaction with an egg PC lipid bilayer. Resonance position shift in the PWR minima as a function of molecule addition observed for p- (●) and s- (■) polarizations.

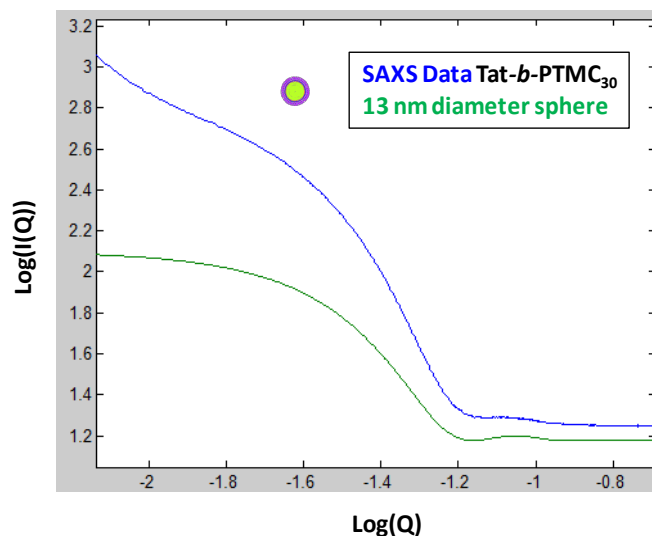


Figure S5 - SAXS curve for Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles (blue) and form factor of a 13 nm diameter sphere (green).

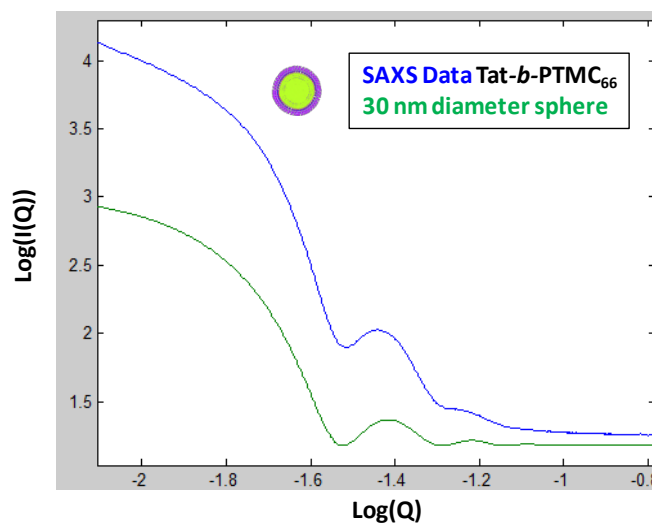


Figure S6 - SAXS curve for Tat-*b*-PTMC₆₆ micelles (blue) and form factor of a 30 nm diameter sphere (green).

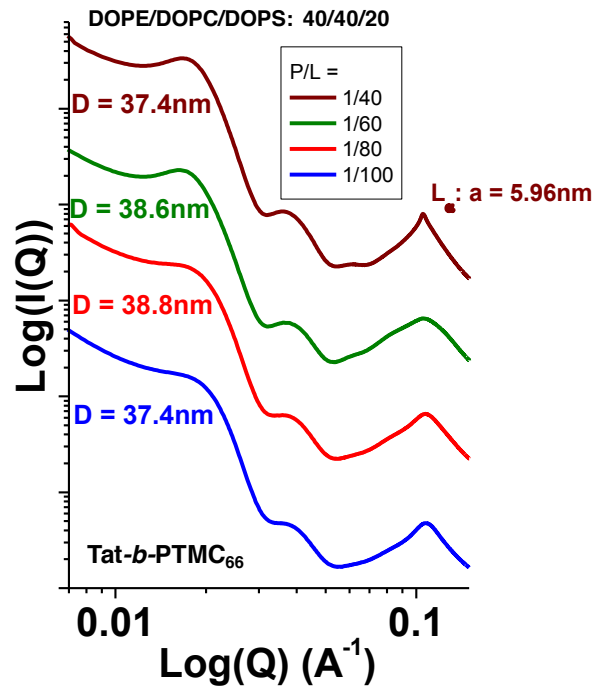


Figure S7 - SAXS curves for DOPE/DOPC/DOPS (40/40/20) liposomes interacting with Tat-*b*-PTMC₆₆ micelles (right) at increasing chimera over lipid molar ratios P/L.

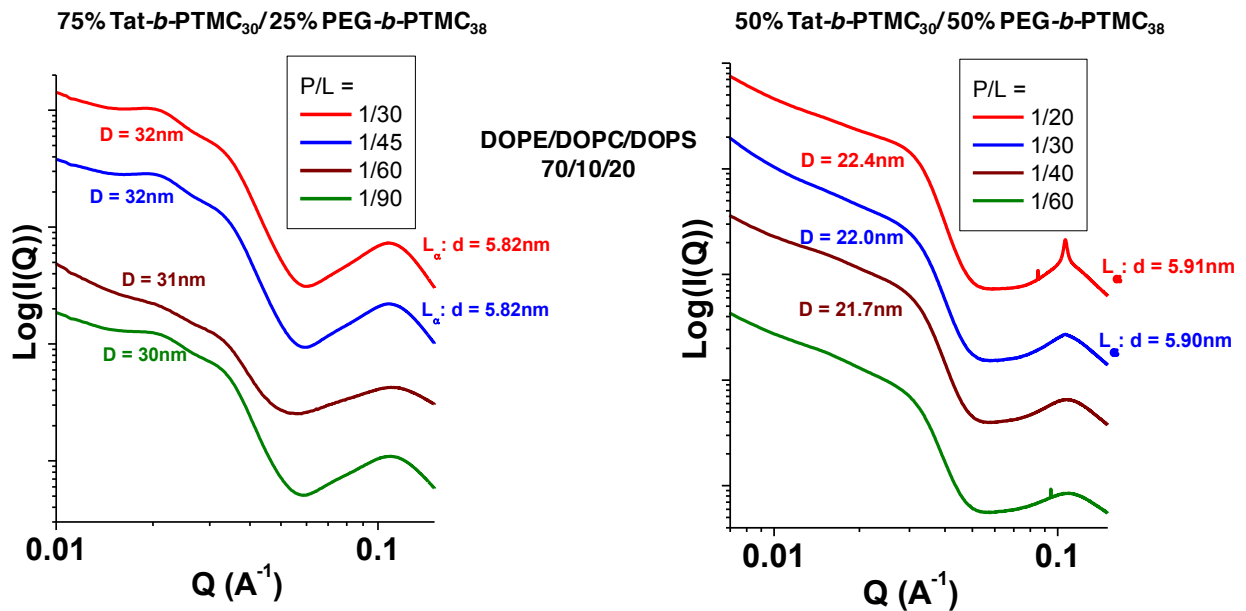


Figure S8 - SAXS curves for DOPE/DOPC/DOPS (70/10/20) liposomes interacting with micelles containing 75% (right) and 50% (left) Tat-*b*-PTMC₃₀ at increasing chimera/copolymer over lipid molar ratios P/L.

Appendix SI - Surface coverage calculation.

For DLS and DSC experiments, the concentration ratio between nanoparticles and liposomes was expressed by the percentage of surface coverage (noted %Sc), which is the percentage of the liposome surface covered with nanoparticles assuming that nanoparticles are systematically adsorbed on the outer surface of liposomes. This maximum coverage is obtained when the nanoparticles are hexagonally packed, with their centre separated by a distance of twice their radius. Then the surface SC_{NP} covered by a single nanoparticle of radius R_{NP} is the surface of a hexagon with a vertex c defined as:

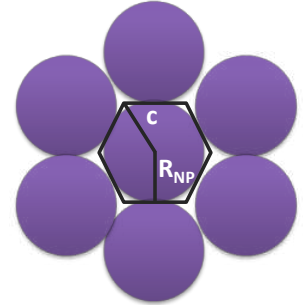
$$c^2 = \frac{R_{NP}^2}{2}$$

Then

$$SC_{NP} = 3 \frac{cR_{NP}}{2} = \frac{6}{\sqrt{3}} \times R_{NP}^2$$

The number N_{NP} of nanoparticles in the sample is:

$$N_{NP} = \frac{C_{NPw/w} \times V}{\frac{N_{agg} \times M_{WTat-b-PTMC}}{N_a}}$$



Where $C_{NPw/w}$ is the mass concentration of nanoparticle in the sample

V is the volume of the sample

N_{agg} is the number of aggregation of the nanoparticles.

$M_{WTat-b-PTMC}$ is the molecular weight of the chimeras

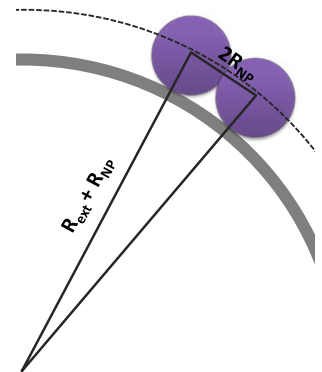
N_a is the Avogadro number

The surface SC_{Lip} of a liposome of radius R_{ext} that can possibly be covered by nanoparticles of radii R_{NP} is the surface of sphere with radius $R = R_{ext} + R_{NP}$:

$$SC_{Lip} = 4\pi(R_{ext} + R_{NP})^2$$

The number N_{Lip} of liposomes of radii R_{ext} can be calculated as follows:

$$N_{LUV} = \frac{C_{Lipw/w} \times V}{\frac{M_{wlipid} \times \frac{4}{3}(R_{ext}^3 - R_{int}^3)}{N_a \times (V_{lipid} + 3.7 \times V_{H_2O})}}$$



With $C_{Lip_{w/w}}$ being the mass concentration of nanoparticle in the sample

$M_{w_{lipid}}$, the average molecular weight of lipids

R_{int} , the inner radius of liposome, given by $R_{int} = R_{ext} - d$, d being the bilayer thickness

V_{lipid} , the volume occupied by a dry lipid molecule

V_{H_2O} , the volume occupied by a water molecule

Then, the percentage of surface coverage %Sc is given by the ratio of the total surface possibly covered by nanoparticles S_{NP} over the total surface available on the outer surface of liposomes S_{Lip} :

$$\%Sc = \frac{S_{NP}}{S_{Lip}} = \frac{Sc_{NP} \times N_{NP}}{Sc_{LUV} \times N_{LUV}}$$

The experimental values used for calculations were:

- Liposome radius: hydrodynamic radius measured by DLS
- N_{agg} and radius of nanoparticles: N_{agg} determined by SANS in chapter 2 for Tat-b-PTMC₃₀ micelles (253) and related hydrodynamic radius (11 nm).

Theoretical values of 1100 Å³, 30 Å³ and 5 nm were found in literature for V_{lipid} , V_{H_2O} and d .²⁶

Appendix S2 - Plasmon waveguide resonance spectroscopy

Principle of PWR spectroscopy

PWR spectroscopy is a variant of surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy with higher spectral resolution and sensitivity which has been developed relatively recently by Salamon and Tollin.²⁷⁻³⁰ This biophysical technique measures the variation of the optical properties of a membrane induced by interactions with ligands. Membrane is deposited at the surface of the PWR resonator while ligands are injected in an aqueous compartment directly in contact with the membrane (Figure S9). No labeling is required, as parameters are based solely on the intrinsic optical properties of the sample being examined.

The basic experimental set up for a PWR resonator, given in figure S9, consists of a prism successively overcoated on its external surface with a silver film and a SiO₂ film. This device is mounted on a rotating table with a CW laser and a light polarizer that can give either *s*- (*perpendicular*) or *p*- (*parallel*) polarized light in respect to the incident plane. For large incident

angles (which are used here), in *p*-pol light the electric vector becomes perpendicular to the film plane and in *s*-polarized parallel to the film plane. At a specific angle and wavelength, the *s*- or *p*-polarized light from the CW laser induces the resonant excitation of collective electronic oscillations (plasmons) in the silver film. It generates an evanescent electromagnetic field localized at the outer surface of the SiO₂ dielectric film, which is used to probe the optical properties of molecules immobilized on this surface.

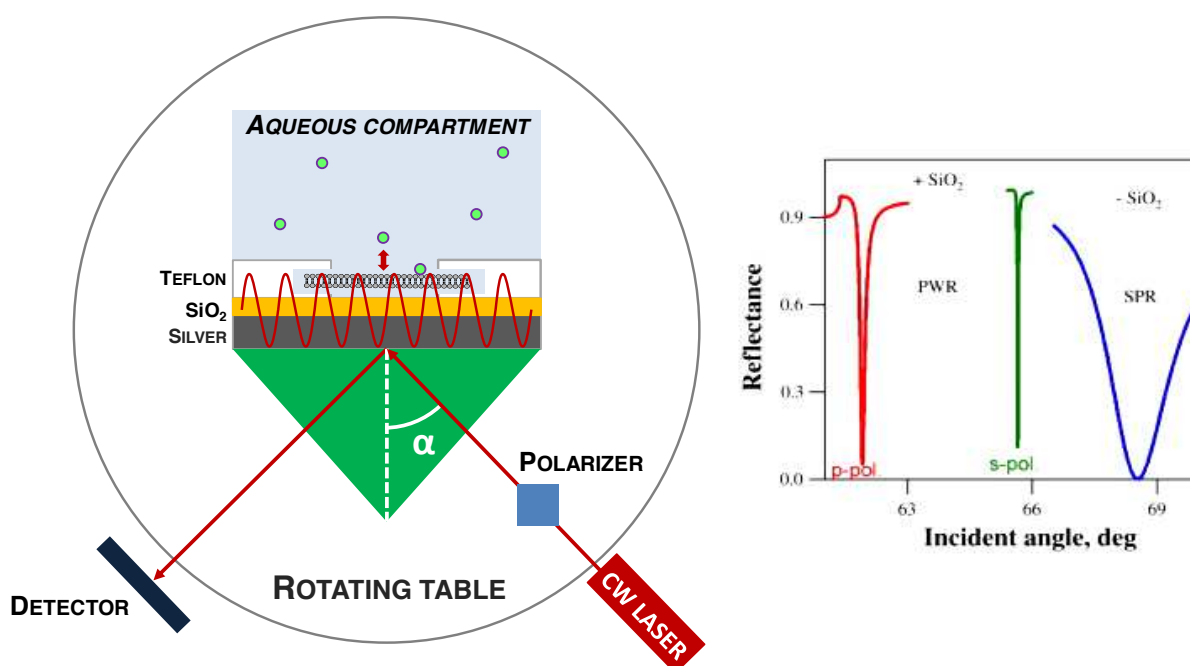


Figure S9- Features of a PWR spectrometer. As illustrated on the right, PWR spectra have much narrower linewidths than SPR spectra, providing higher spectral resolution and sensitivity. Reproduced from ref ³⁰.

Resonance is achieved by varying the angle α at a fixed wavelength ($\lambda = 632.8$ nm) by steps of 1 millidegree thanks to the rotating table. Signal recorded by the detector is then the reflected light intensity of the electric field of the excitation as a function of the incident angle. This spectrum depends on three physical parameters; 1) the refractive index (n); 2) the extinction coefficient (k) at the excitation wavelength; and 3) the sample thickness (t). Those parameters are directly correlated with the mass density and the molecular structural features (conformation, orientation) of the deposited materials. The use of the two polarizations provides independent information on mass and structure changes and allow the characterization of anisotropic systems.

Because the resonance coupling generates electromagnetic waves at the expense of incident light energy, the intensity of totally reflected light is diminished at a specific angle. When the membrane deposited at the surface undergoes mass and structural changes, e.g. due to the binding of a ligand, this

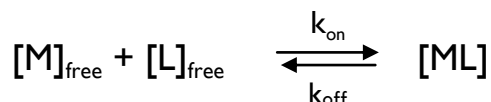
minimum resonance position shifts. Then by plotting it as a function of total concentration in ligand, one can monitor the affinity of binding process and the accompanying structural changes.

PWR experiment

The experiment consisted first in preparing a planar lipid bilayer following the same procedure used by Mueller and Rudin in the 60's to form freely suspended lipid bilayers, also called black lipid membranes.³¹ This involves spreading a small amount of lipid solution across a small hole in a Teflon sheet that separates the thin dielectric film (SiO₂) from the aqueous compartment (figure X). The hydrophilic surface of hydrated SiO₂ attracts the polar groups of the lipid molecules, thus inducing an initial orientation of the lipid molecules, with the hydrocarbon chains pointing toward the droplet of excess lipid solution. The next steps of bilayer formation, induced by adding aqueous buffer to the aqueous compartment, involve a thinning process and the anchoring of the membrane to the Teflon spacer by a lipid reservoir called plateau Gibbs border. This reservoir provides a certain degree of fluidity and flexibility to the membrane as it can be used as a buffer system for lipids to move in and out of the center of the bilayer into this reservoir, this while keeping the membrane integrity. Following bilayer stabilization, aliquots of increasing concentration of the ligands (nanoparticles or Tat peptide) were added and the spectral changes monitored for the two polarizations used: *p* and *s*, that are respectively perpendicular and parallel to the lipid membrane. By plotting the minimum resonance position as a function of total concentration in ligand, a hyperbolic profile is obtained resulting from molecule adsorption onto the membrane and from the subsequent molecular reorganization (both from the molecule itself and the lipid bilayer) that may occur.

Appendix S3 - Binding theory.

The binding interaction between the membrane M and a ligand L can be describe by the following equilibrium:



With $[M]_{\text{free}}$ being the concentration of free binding site

$[L]_{\text{free}}$, the concentration of free ligand

$[ML]$, the concentration of ligand bound to the membrane

K_d as the equilibrium dissociation constant of the reaction

At the thermodynamic equilibrium:

$$K_d = \frac{[M]_{\text{free}} [L]_{\text{free}}}{[ML]} \quad \text{Equ. 1}$$

Introducing $[M]$ as the concentration of total binding site accessible to the ligand on the membrane, then:

$$[M] = [M]_{\text{free}} + [ML] \quad \text{Equ. 2}$$

Introducing $[L]$ as the total concentration of ligand, then:

$$[L] = [L]_{\text{free}} + [ML] \quad \text{Equ.3}$$

When introducing Equ. 3 in Equ 1:

$$\frac{[ML]}{[L]} = \frac{[M]_{\text{free}}}{K_d + [M]_{\text{free}}} \quad \text{Equ. 4}$$

When 50% of ligand are bound to a binding site:

$$[ML] = \frac{1}{2} [L]$$

$$[M]_{\text{free}} = K_d$$

K_d represents the amount of membrane binding sites that need to be “waste” to bind 50% of ligands.

The less the K_d , the better the affinity.

PWR measures the variation of the minimum resonance position $\Delta\alpha$ as a response to ligand binding.

When all sites are bound to a ligand, the minimum resonance position $\Delta\alpha$ reaches a plateau value

$$\Delta\alpha_{\text{MAX}} \cdot \frac{\Delta\alpha}{\Delta\alpha_{\text{MAX}}} = \frac{[ML]}{[M]}$$

Then, with PWR, we know:

$$\frac{[ML]}{[M]} \text{ as a function of } [L]$$

[M] calculation by extrapolation from tangent at the origin

If considering that a large fraction of ligand bind to the membrane →

at low $[L]$ concentration,

$$[ML] \gg [L]_{\text{free}}$$

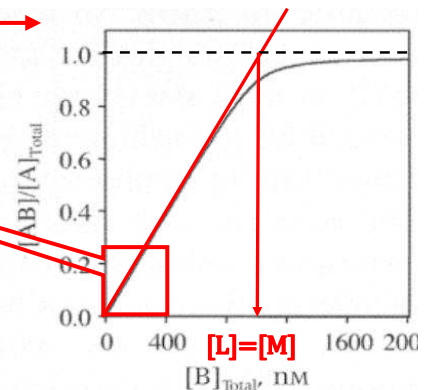
$$[ML] \cong [L]$$

$$\text{then } \frac{[ML]}{[M]} \cong \frac{[L]}{[M]}$$

$[L]$ varies linearly in this area with $[ML]/[M]$

By extrapolating this line we can find $[M]$.

Aspect of curve expected for extreme case when $[M] \gg K_d$



[K_d] calculation from equilibrium equation when [M]_{free} ≈ K_d

$$\frac{[ML]}{[L]} = \frac{[M]_{free}}{K_d + [M]_{free}}$$

If $[M]_{free} = K_d$, $\frac{[ML]}{[L]} = \frac{1}{2}$ then $\frac{[ML]}{[M]} = \frac{[L]}{2[M]}$

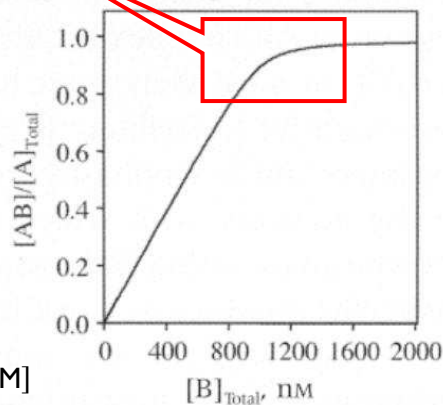
By plotting

$$Y = \frac{[L][M]}{[ML]} - 2[M] = \frac{[L]\Delta_{MAX}}{2[M]} - 2[M]$$

When Y=0,

$$[M]_{free} = [M] \left(1 - \frac{\Delta}{\Delta_{MAX}} \right) = K_d$$

The K_d obtained by PWR are called “apparent” dissociation constants as they do not result from the direct thermodynamic measurement of the constant (such as the case of those determined by titration calorimetry) but result both from the molecule interaction with the membrane and the subsequent molecular reorganization (both from the molecule itself and the lipid bilayer) that may occur.



Appendix S4 - Crystal phases studied by small angle X-ray scattering

Small angle X-ray scattering is a non-destructive technique which probes matter at the nano and micro-scale. When the analysed sample is ordered in a crystalline phase with a characteristic dimension in the reciprocal space within the range of the examined scattering vector, Bragg’s diffraction pattern can superposes to the scattered intensity.

A crystalline structure can be described by periodic planes spaced from each other by a characteristic distance d, also called d-spacing. One structure usually posses several d-spacings, associated with different kind of planes. For couples of wavelength λ and incident angle θ satisfying the Bragg’s Law $n\lambda=2d\sin\theta$, the scattered X-Ray beams interfere in a positive manner. As a consequence, series of discrete reflection peaks appeared on the intensity spectrum recorded during the SAXS experiments for specific scattering vectors $q=4\pi\sin\theta/\lambda$, which are directly related to the d-spacings of the different planes of the crystal phase by the relation $q=2\pi/d$ (Figure S10). As each crystal phase possesses a unique combination of permitted reflections, the peaks number, positions and splitting determines which phase is present in the sample.

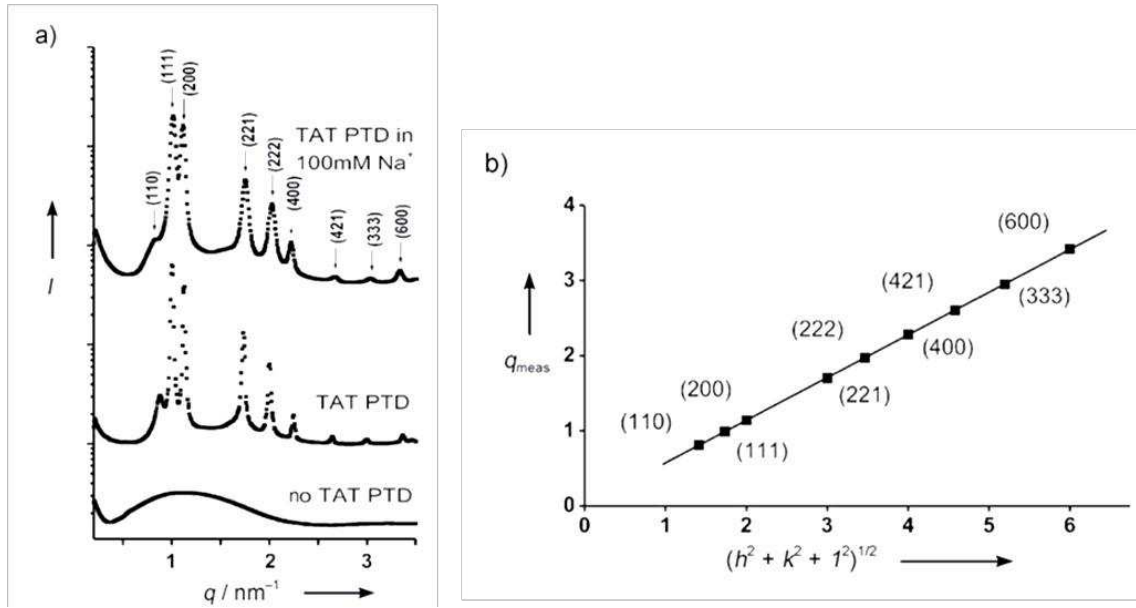


Figure S10 - a) SAXS spectrum showing that PS/PE (2:3) vesicles (bottom) form a cubic “double-diamond” Pn3m phase when interacting with TAT protein transduction domain either in pure water (middle) or in presence of 100 mM Na⁺ (top); b) Graph revealing the good agreement between measured reflection peak positions and the corresponding Pn3m cubic indexation. Reproduced from ref.¹²

Each reflection plane can be described by three integers h , k , and l , called Miller indices. They are written $(hk\ell)$ and denotes a plane orthogonal to a vector $\mathbf{g}_{h,k,l}$ with (h, k, ℓ) as coordinates in the basis of the reciprocal lattice vectors $(\mathbf{b}_1, \mathbf{b}_2, \mathbf{b}_3)$: $\mathbf{g}_{h,k,l} = h\mathbf{b}_1 + k\mathbf{b}_2 + l\mathbf{b}_3$. For example, a Pn3m cubic phase has 4 main reflection planes: (110), (111), (200) and (211). The relation between d -spacing and the $\mathbf{g}_{h,k,l}$ vector is $d = 2\pi/|\mathbf{g}_{h,k,l}|$.

For the special case of cubic crystals, the lattice vectors $\mathbf{a}_1, \mathbf{a}_2, \mathbf{a}_3$ are orthogonal and of equal length as well as the reciprocal lattice vectors $\mathbf{b}_1, \mathbf{b}_2, \mathbf{b}_3$. The real lattice parameter a is related to the reciprocal lattice parameter b by the simple relation $a = 2\pi/b$, and $g_{h,k,l} = \sqrt{h^2 + k^2 + l^2} \times b = \frac{2\pi}{a}$. Therefore, at the reflection peak corresponding to the plane (h,k,l) , the scattering vector $q_{h,k,l}$ is related to the lattice parameter a by the relation:

$$q_{h,k,l} = \frac{\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}}{a}$$

To identify the type of phase formed in the sample, the ratios of the scattering vectors at reflections $q_{h,k,l}$ are calculated. For a Pn3m cubic phases, the allowed values of $\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}$ are $\sqrt{2}, \sqrt{3}, \sqrt{4}$ and $\sqrt{6}$. Consequently, four reflection peaks are expected to be found with the ratios of their corresponding scattering vectors $q_{h,k,l}$ taking the following values: $\frac{q_{111}}{q_{110}} = \frac{\sqrt{3}}{\sqrt{2}}, \frac{q_{200}}{q_{110}} = \frac{\sqrt{4}}{\sqrt{2}}$ and $\frac{q_{211}}{q_{110}} = \frac{\sqrt{6}}{\sqrt{2}}$. Once the crystal phase is determined, its lattice parameter a is calculated by a linear trend line fit of the scattering vectors at reflections $q_{h,k,l}$ versus their assigned $\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}$ (figure S10).

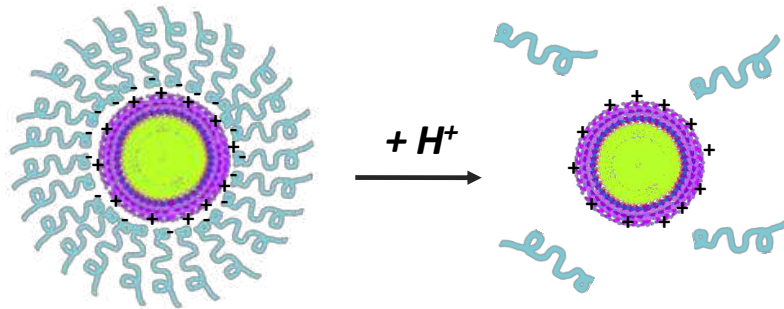
REFERENCES

1. Y. Su, A. J. Waring, P. Ruchala and M. Hong, *Biochemistry*, 2010, **49**, 6009-6020.
2. K. Melikov and L. Chernomordik, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, **62**, 2739-2749.
3. A. Ziegler, X. L. Blatter, A. Seelig and J. Seelig, *Biochemistry*, 2003, **42**, 9185-9194.
4. P. E. G. Thoren, D. Persson, P. Lincoln and B. Norden, *Biophysical Chemistry*, 2005, **114**, 169-179.
5. S. R. Dennison, R. D. Baker, I. D. Nicholl and D. A. Phoenix, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, **363**, 178-182.
6. C. Ciobanasu, E. Harms, G. Tuennemann, M. C. Cardoso and U. Kubitscheck, *Biochemistry*, 2009, **48**, 4728-4737.
7. A. Pantos, I. Tsogas and C. A. Paleos, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2008, **1778**, 811-823.
8. H. Hirose, T. Takeuchi, H. Osakada, S. Pujals, S. Katayama, I. Nakase, S. Kobayashi, T. Haraguchi and S. Futaki, *Mol Ther*, 2012, **20**, 984-993.
9. K. Sakamoto, K. Aburai, T. Morishita, K. Sakai, H. Sakai, M. Abe, I. Nakase and S. Futaki, *Chemistry Letters*, 2012, **41**, 1078-1080.
10. D. Choi, J. H. Moon, H. Kim, B. J. Sung, M. W. Kim, G. Y. Tae, S. K. Satija, B. Akgun, C. J. Yu, H. W. Lee, D. R. Lee, J. M. Henderson, J. W. Kwong, K. L. Lam, K. Y. C. Lee and K. Shin, *Soft Matter*, 2012, **8**, 8294-8297.
11. X. C. Chen, F. Sa'adedin, B. Deme, P. F. Rao and J. Bradshaw, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2013, **1828**, 1982-1988.
12. A. Mishra, V. D. Gordon, L. Yang, R. Coridan and G. C. L. Wong, *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, **47**, 2986-2989.
13. A. Mishra, G. H. Lai, N. W. Schmidt, V. Z. Sun, A. R. Rodriguez, R. Tong, L. Tang, J. Cheng, T. J. Deming, D. T. Kamei and G. C. L. Wong, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, **108**, 16883-16888.
14. N. Schmidt, A. Mishra, G. H. Lai and G. C. L. Wong, *Febs Letters*, 2010, **584**, 1806-1813.
15. W. Dowhan, M. Bogdanov and E. Mileykovskaya, in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Fifth Edition)*, eds. E. V. Dennis and E. V. Jean, Elsevier, San Diego, 2008, pp. 1-1.
16. R. Michel, T. Plostica, L. Abezgauz, D. Danino and M. Gradzielski, *Soft Matter*, 2013, **9**, 4167-4177.
17. L. Zhang and S. Granick, *Nano Letters*, 2006, **6**, 694-698.
18. M. J. Janiak, D. M. Small and G. G. Shipley, *Journal of Biological Chemistry*, 1979, **254**, 6068-6078.
19. S. Ahmed and S. L. Wunder, *Langmuir*, 2009, **25**, 3682-3691.
20. U. S. Schwarz and G. Gompper, *Physical Review Letters*, 2000, **85**, 1472-1475.
21. N. W. Schmidt, A. Mishra, G. H. Lai, M. Davis, L. K. Sanders, D. Tran, A. Garcia, K. P. Tai, P. B. McCray, A. J. Ouellette, M. E. Selsted and G. C. L. Wong, *Journal of the American Chemical Society*, 2011, **133**, 6720-6727.
22. Z. Salamon, S. Cowell, E. Varga, H. I. Yamamura, V. J. Hruby and G. Tollin, *Biophysical Journal*, 2000, **79**, 2463-2474.
23. I. D. Alves, Z. Salamon, E. Varga, H. I. Yamamura, G. Tollin and V. J. Hruby, *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**, 48890-48897.
24. usaxs.xor.aps.anl.gov/staff/ilavsky/nika.html.
25. www.esrf.eu/computing/scientific/FIT2D/.
26. J. F. Nagle and S. Tristram-Nagle, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 2000, **1469**, 159-195.
27. Z. Salamon, H. A. Macleod and G. Tollin, *Biophysical Journal*, 1997, **73**, 2791-2797.
28. Z. Salamon, M. F. Brown and G. Tollin, *Trends in Biochemical Sciences*, 1999, **24**, 213-219.

29. Z. Salamon and G. Tollin, *Biophysical Journal*, 2001, **80**, 1557-1567.
30. V. J. Hruby, I. Alves, S. Cowell, Z. Salamon and G. Tollin, *Life Sciences*, 2010, **86**, 569-574.
31. P. Mueller, D. O. Rudin, H. Ti Tien and W. C. Wescott, *Nature*, 1962, **194**, 979-980.

CHAPITRE 5

«CAMOUFLAGE» PH-SENSIBLE PAR ADSORPTION ELECTROSTATIQUE DE SEGMENTS PEG ANIONIQUES



Mots clefs: micelles Tat-*b*-PTMC, revêtement furtif de polyéthylène glycol, PEGylation, adsorption électrostatique, camouflage, encombrement stérique, écran de charge, système sensible au pH, microenvironnement tumoral acide

Keywords: Tat-*b*-PTMC micelles, polyethylene glycol stealth coating, PEGylation, electrostatic adsorption, shielding, steric hindrance, charge screening, pH responsive, tumor acidic microenvironment

Résumé: Ce dernier chapitre décrit une tentative de camouflage de la surface des micelles de Tat-b-PTMC à l'aide d'un revêtement furtif non-covalent de poly(oxyde d'éthylène) sensible au pH dans le but d'augmenter leur sélectivité vis-à-vis des cellules tumorales nichant dans un environnement légèrement plus acide (pH=6.8) que celui des tissus normaux (pH=7.4). L'adsorption électrostatique sur la surface des micelles de Tat-b-PTMC₃₀ de segments PEG de différentes masses molaires (2000, 5000, 10000 g.mol⁻¹) présentant un groupement anionique en bout de chaîne (phosphate ou triacétate) a ainsi été étudiée. De façon générale, une augmentation du diamètre moyen des nanoparticules est observée par diffusion dynamique de la lumière (90° et multi-angles) et par microscopie de force atomique, indiquant l'adsorption effective des chaînes de PEG à leur surface. Cette variation de taille s'accompagne d'une diminution du potentiel zeta des micelles, confirmant l'écrantage de leurs charges positives de surface. L'épaisseur de la couche de PEG mesurée indique une faible densité de greffage et une conformation des chaînes de PEG adsorbées en conformation «champignon». L'augmentation de la masse molaire du segment PEG favorise le taux de couverture, tandis que le nombre de points d'ancrage anioniques par chaîne semble influencer positivement sur la densité et la stabilité de la couche adsorbée. Le retard de l'interaction déstabilisante entre les micelles masquées et des liposomes chargés négativement confirme le camouflage effectif du peptide Tat à leur surface. Lorsque le pH est abaissé à 5.5, le revêtement adsorbé par l'intermédiaire des trois fonctions acétate (pKa=4.4) est relativement stable, alors que les micelles masquées par des segments PEG à extrémité phosphate (pKa=6.5), majoritairement déprotonée, sont déstabilisées. Les propriétés d'internalisation de ces micelles camouflées ont ensuite été évaluées in vitro. Cependant, il apparaît que l'adsorption des segments PEG n'est pas suffisamment stable en milieu biologique pour empêcher ou même retarder l'interaction des micelles avec les cellules.

Ce travail a fait l'objet du stage de Master 2 de Zoé Senta-Loys que j'ai encadrée lors de ma dernière année de thèse.

CHAPTER 5

PH-RESPONSIVE SURFACE SHIELDING BY ELECTROSTATIC ADSORPTION OF PEG SEGMENTS WITH ANIONIC CHAIN END

INTRODUCTION	243
I. CHEMICAL MODIFICATIONS AND CHARACTERIZATIONS OF ANIONIC PEG SEGMENTS	245
I.1. ACYLATION OF GLYCOSYLATED PEG SEGMENT	246
I.2. ACID-BASE TITRATION OF ANIONIC PEG SEGMENTS	247
II. ELECTROSTATIC ADSORPTION OF PEG SEGMENTS WITH ANIONIC CHAIN END ONTO TAT- <i>b</i> -PTMC MICELLES	248
II.1. OPTIMIZATION OF THE ADSORPTION PROCESS	248
II.1.1. Influence of PEG over Tat- <i>b</i> -PTMC ratios	248
II.1.2. Influence of ionic strength.....	250
II.2. CHARACTERIZATION OF PEG/MICELLE COMPLEXES	251
II.2.1. Stability towards dilution and at physiological temperature	251
II.2.2. Physico-chemical parameters and adsorption regimes	251
III. PEG-COATED MICELLES PH RESPONSIVENESS AND STABILITY IN BIOLOGICAL CONDITIONS.....	254
III.1. PH-INDUCED DESTABILIZATION	254
III.2. COLLOIDAL INTERACTIONS WITH LIPOSOMES.....	255
III.3. <i>IN VITRO</i> CELLULAR UPTAKE	256
CONCLUSION	257
EXPERIMENTAL SECTION	258
SUPPORTING INFORMATION	261
REFERENCES	261

INTRODUCTION

Promoting the targeted delivery of chemotherapeutics in carcinogenic tumors to improve their efficacy and to reduce their damages on healthy tissues is currently a major pharmaceutical challenge in cancer research. A milestone was however set in this way when discovering that nanometer-sized particles and macromolecules with prolonged systemic circulation could passively diffuse through leaky hypertrophic neoplasm vasculature (Enhance Permeability) and be retained and accumulated in the tumor tissues lacking draining lymphatic vessels to efficiently clear them out (Retention).¹ This phenomenon, so called EPR (Enhanced Permeability and Retention) effect, has then motivated considerable efforts for the development of nanoparticles as passive tumor targeting drug delivery vectors. However, these “1st generation” nanocarriers have faced some limitations, such as competitive accumulation in other organs (kidneys, liver and spleen) as well as uneven delivery and retention at the tumor periphery. Targeting strategies based on specific interactions between ligands and receptors specifically overexpressed in carcinogenic microenvironnements were then considered to improve specific accumulation of nanomaterials in malignant tissues. Their clinic outcomes unfortunately appeared to be restricted by the heterogeneity of tumors and patient phenotypes, as a result of the inherent complexity and mutant nature of cancer.^{2 3}

In contrast, cell-penetrating peptides, and especially Tat peptide, promote an efficient cell membrane translocation in almost every type of cells or tissues. They thus represent a versatile and powerful tool to turn nanocarriers into molecular “Trojan Horses” capable of crossing over physiological barriers encountered once retained in the tumor periphery by EPR effect and of eventually delivering a massive therapeutic payload into carcinogenic tissues and cells, whatever the cancer type or patient profile.⁴

However, since being administrated by systemic injection, the lack of specificity of cellular uptake provided by CPPs is also their major weakness, leading to important off-target adhesion and transduction at the injection site and in all organs come accross.^{5, 6} Since “*Too wild to go only to Troy*”,⁷ a substantial amount of nano-sized Trojan Horses is then lost, requiring to increase the dose needed for a sufficient therapeutic response, and ineluctably causing serious damages to healthy tissues, especially when carrying toxic therapeutics. In addition, the cationic nature of CPPs is likely to accelerate blood clearance of nanovectors, shortening their stay in the systemic circulation. This would definitely prevent them from reaching the tumor site and from being retained by EPR effect. In other words, the unfavorable biodistribution profile of cell-penetrating peptides is likely to wipe out all pharmacokinetics benefits provided by the use of nano-sized delivery devices.

To solve this dilemma, opposing high translocation potency and poor selectivity, different stimuli-responsive shielding strategies have been developed to mask temporarily cell-penetrating peptides on

the surface of nanoparticles, allowing them to bypass healthy tissues and to circulate up to the disease site. Once located in the tumor, release of the cover and peptides exposure can be triggered by a local biochemical (enzymes or specific receptors) physiological (pH change, redox potential) or exogenously applied (hyperthermia, co-injected chemical agent, radiations) stimulus to restore nanoparticles cell-penetrating properties.^{8,9} In the specific case of Tat peptide, the different shielding approaches that have been described in the literature (chapter I, paragraph III.3) so far rely either on the charge neutralization of the peptide basic residues with anionic molecular counterparts,^{10, 11} or on the steric hindrance provided by polymer coating, mainly PEG, screening cationic charges and physically preventing the contact between peptides and anionic biomolecules.¹²⁻¹⁹ This latter strategy is particularly appealing considering the pharmacokinetic properties provided by “PEGylation” (reduced renal clearance, plasma proteins repellency).²⁰

In the previous chapters, we described the preparation of Tat-presenting core-corona nanoparticles self-assembled from Tat-*b*-PTMC amphiphilic chimeras and shown their massive accumulation on cellular membranes in a dense organization before their internalization by an energy-dependant mechanism. However, for these particles to be used as “Trojan Horse” nanocarriers, their powerful cell-binding and penetrating properties must be balanced. In chapter 3, Tat-peptide density in the corona of self-assemblies was modulated by preparing mixed core-corona micelles from blends of Tat-*b*-PTMC₃₀ chimera and PEG-*b*-PTMC₃₈ block copolymer with variable chimera content. Introduction of PEG chains in the micelles however lead to the loss of their specific ordering propensities, thereby reducing the amount of bound materials and delaying their cellular uptake. This effect offers a compromise that would possibly benefit to the micelles pharmacokinetic properties, but to the detriment of their cellular uptake potency.

As tumor microenvironment is slightly more acidic (pH≈6.8) than healthy tissues (pH≈7.4),²¹ the small but tangible pH difference represents a suitable local stimulus to specifically trigger Tat peptide display. This has been already achieved and reported in literature, by removal of the PEG layer attached to particles thanks to a pH-labile bond,¹² or by the triggered decomplexation of the polyanionic segment of a diblock copolymer^{13, 14} or of anionic segments located in the core of the Tat-bearing nanoparticle initially maintaining the Tat peptide anchored in a brush of PEG.¹⁵

The present work intends to investigate the electrostatic adsorption of anionic PEG segments onto Tat-*b*-PTMC nanoparticles as a pH-sensitive stealth shielding strategy towards the controlled cellular uptake in tumors. We selected PEG segments presenting at one chain end an acidic oxoanion (phosphate or acetate) moiety with a pKa close to or slightly below the tumor pH. At physiological pH, these functions negatively charged may act as a buoy, anchoring PEG chains at the surface of Tat-*b*-PTMC micelles by means of electrostatic interactions with the basic positively charged residues of the peptide. The resulting non-covalent PEG coating should then prevent the peptide from

interacting with anionic biomolecules by a simultaneous combination of charge screening and steric hindrance, without altering the integrity of the self-assemblies. In the tumor microenvironment, the anionic anchor-buoy with a pKa close to the local acidic pH should then be partially neutralized by protonation, causing destabilization of the occluding PEG layer and restoring the intact Tat-b-PTMC micelles with their full binding and penetrating propensities (Figure 1).

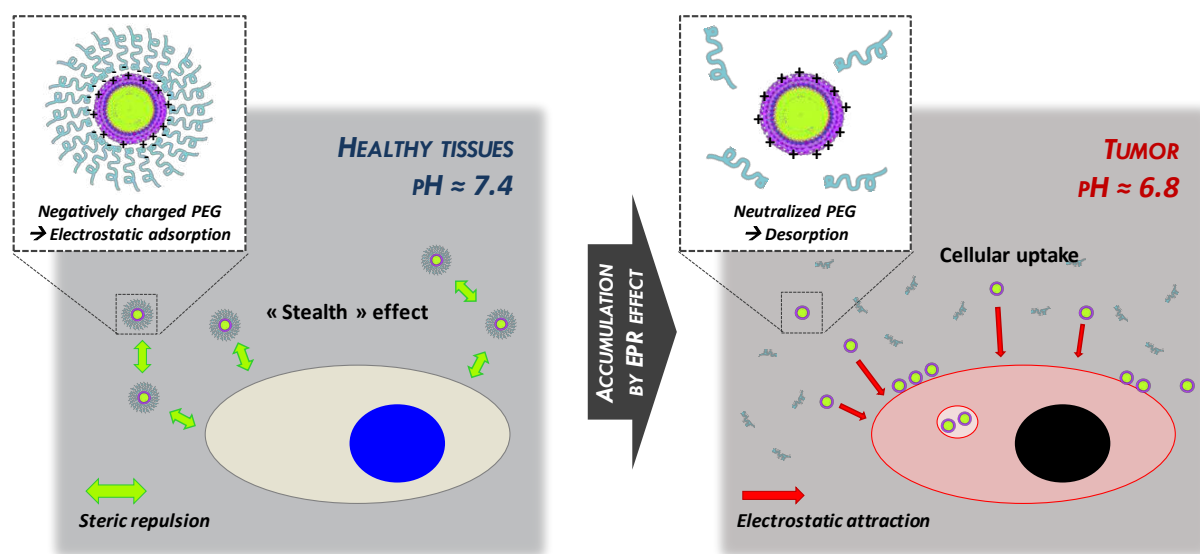


Figure 1- Illustration of the rationale for using pH-sensitive PEG-coated Tat-b-PTMC micelles as nanocarriers for intracellular drug-delivery in tumors.

We here first present the chemical modifications and characterizations of the different anionic PEG segments studied. We then secondly describe the optimization of the adsorption process varying PEG over Tat-b-PTMC ratios as well as ionic strength. We then assessed the stability of the resulting complexes at 37°C and in diluted regime and intended to determine adsorption modes of the different PEG segments with regard to their molecular weight and anchoring group. We finally examined their pH responsiveness, colloidal interactions with liposomes at different pH and cellular uptake properties *in vitro* on HeLa cells.

I. CHEMICAL MODIFICATIONS AND CHARACTERIZATIONS OF ANIONIC PEG SEGMENTS

Guanidinium groups displayed by arginine lateral chains of Tat peptide are known to strongly interact with oxanions (phosphate, sulfate and carboxylate), supposedly by forming an electrostatic bidentate coordination stabilized by two hydrogen bonds.^{22, 23} We actually experienced this particular and strong interaction when attempting to self-assemble Tat-b-PTMC chimeras in phosphate buffer. We

observed an almost immediate macroscopic aggregation and collapse of the system. We thus figured we could take advantage of this strong, yet non-covalent, binding to adsorb a PEG layer onto the previously described Tat-*b*-PTMC micelles featuring a peptide corona displaying numerous guanidine groups, as evidenced by their highly positive zeta potential (Figure 2). Towards this goal, the adsorption profile of three different PEG segments presenting a terminal anchor-buoy anionic phosphate group (noted PEG- PO_4^{2-}) with increasing molecular weights ($M_w=2000$, 5000 and 10000) were studied in order to investigate the influence of PEG chain length over the PEG layer conformation and screening properties. A PEG segment (noted PEG- $(\text{COO}^-)_3$, $M_w=5000$) bearing 3 acetate groups on a terminal glucose motif was also studied to compare the influence of nature and the number of oxoanionic terminal complexing group on the characteristics of the adsorbed PEG layer (Figure 2).

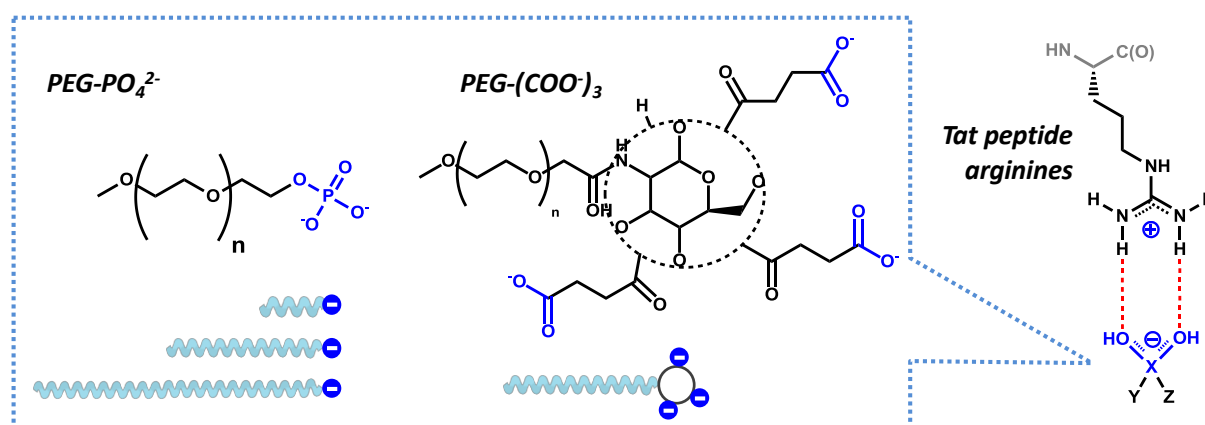
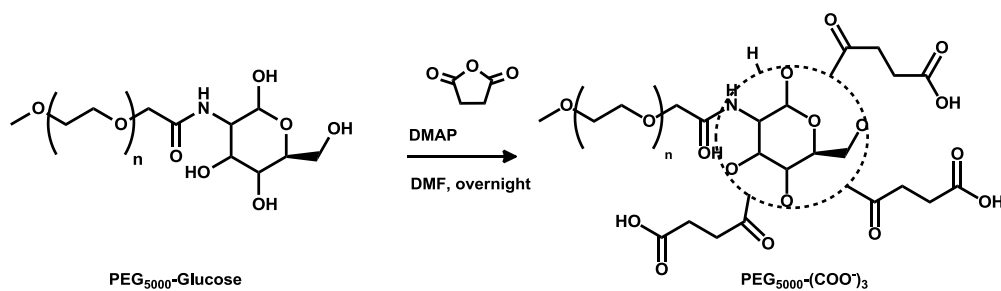
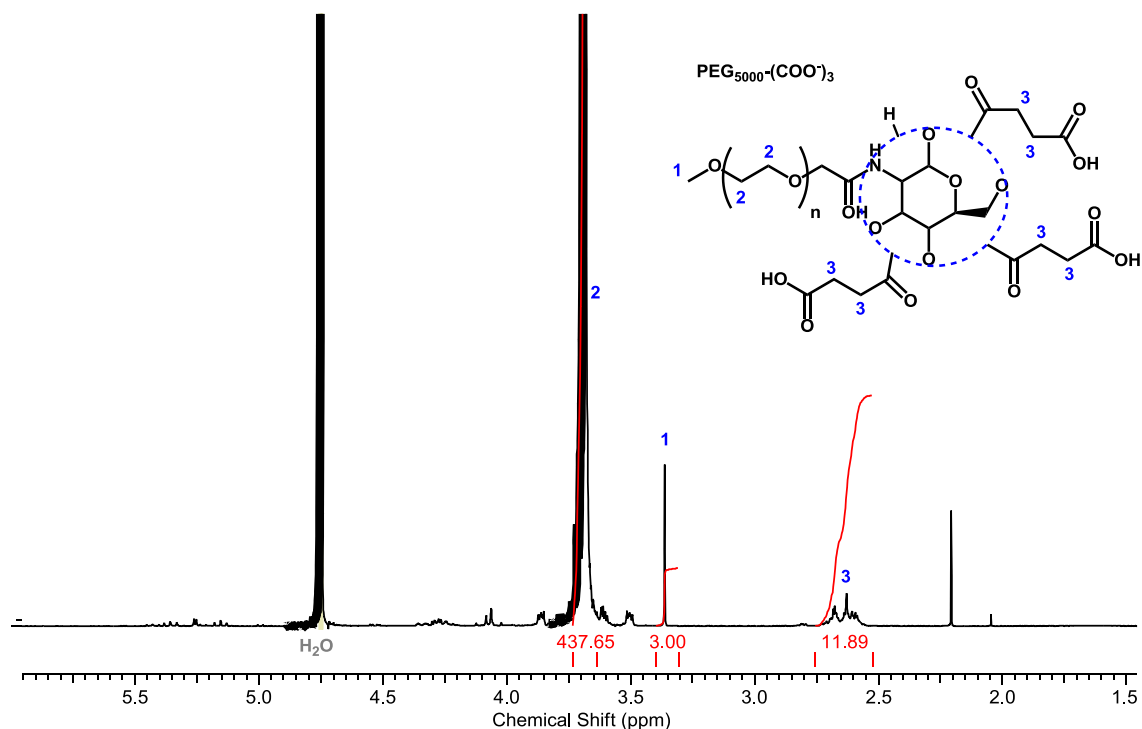


Figure 2 – Chemical structures of anionic PEG segments studied and chemical sketch of the bidentate coordination through electrostatic and hydrogen bonding expected with the guanidine groups of Tat-*b*-PTMC micelles.

I.1. ACYLATION OF GLYCOSYLATED PEG SEGMENT

The triacetate terminated PEG segment - $\text{PEG}_{5000}\text{-(COO}^-)_3$ - was prepared by chemical modification of a commercial PEG segment bearing a terminal glucose moiety ($\text{PEG}_{5000}\text{-Glucose}$, Scheme 1). Glucose hydroxyl groups were acylated with succinic anhydride activated by DMAP, leading to the introduction of pendant succinate moieties. A 18-fold molar excess of anhydride per hydroxyl group was used to ensure the highest conversion. The resulting polymer was characterized by ^1H NMR. The appearance on the ^1H NMR spectrum of a signal counting for 12 protons at 2.4 ppm, corresponding to the characteristic chemical shift of CH_2 protons in α position of an acyl groups, revealed that 3 hydroxyl group on the glucose cyclic scaffold were acylated (Figure 3). The final $\text{PEG-(COO}^-)_3$ segment thus featured a bulky polar chain end displaying 3 carboxylate moieties at physiological pH.

Scheme I – Acylation of PEG₅₀₀₀-GlucoseFigure 3 – ¹H NMR spectrum of PEG₅₀₀₀-(COO)₃ in DMSO-d₆.

I.2. ACID-BASE TITRATION OF ANIONIC PEG SEGMENTS

The pK_a of the different PEG anionic anchor-buoy chain ends were determined by acide-base titration (Table I, figure S2) and were found to be in good agreement with expected theoretical values. With a second pK_a value around 6.5, phosphate groups should be substantially protonated upon pH decrease from 7.4 to 6.8. These were thus expected to provide a suitable pH-sensitive non-covalent bond between PEG chains and micelles destabilized in the slightly acidic tumor microenvironment (pH≈6.8). A pK_a of 4.4 was found for PEG₅₀₀₀-(COO)₃ acetate groups. The stability of the adsorption of this polymer segment was thus suspected to be affected in a much lesser extent as compared to the former when lowering the pH down to 6.8. This PEG segment was then initially considered as a “negative control” for studying the pH-responsive character of the PEG/micelles complexes.

Chemical structures of all phosphate-terminated polymer segments were verified by ^1H and ^{13}P NMR spectroscopy. Their degrees of polymerization were calculated from molecular weights provided by the supplier. Their theoretical size when adsorbed on a surface were estimated, according to Alexander-De Gennes formalism,²⁴⁻²⁷ by calculating their Flory Radius (R_F) which scales in as $R_F \approx aN^{3/5}$ in good solvent, where N is the number of repeating units and a the monomer size, whose value is 0.358 nm for ethylene glycol.²⁸

PEG Mw g/mol	Phosphate $\text{H}_2\text{PO}_4^- \rightleftharpoons \text{HPO}_4^{2-} \rightleftharpoons \text{PO}_4^{2-}$			Glucose triacetate $\text{COOH} \rightleftharpoons \text{COO}^-$		Theoretical coil size	
	Notation	pKa ₁	pKa ₂	Notation	pKa	DP _n ^a	R _F ^b (nm)
2000	PEG ₂₀₀₀ -PO ₄ ²⁻	3.8	6.1	-	-	45	3,5
5000	PEG ₅₀₀₀ -PO ₄ ²⁻	4.5	6.8	PEG ₅₀₀₀ -(COO ⁻) ₃	4.4	115	6,2
10000	PEG ₁₀₀₀₀ -PO ₄ ²⁻	4.5	6.5	-	-	230	9,4

^a Calculated from molecular weights provided by the supplier. ^b Flory radius calculated from the Alexander-De Gennes scaling law in good solvent.

Table I- Anionic PEG segments characteristics and associated notations used in this chapter

II. ELECTROSTATIC ADSORPTION OF PEG SEGMENTS WITH ANIONIC CHAIN END ONTO TAT-*b*-PTMC MICELLES

II.1. OPTIMIZATION OF THE ADSORPTION PROCESS

II.1.1. INFLUENCE OF PEG OVER TAT-*b*-PTMC RATIOS

Assuming a Langmuir type adsorption isotherm, the amount of adsorbed PEG segments was expected to increase rapidly with concentration following a hyperbolic trend and reaching a plateau when all adsorption sites on micelles surface are occupied. The amount of free PEG required to reach this plateau is directly correlated to the affinity between the anionic PEG chain ends and micelles surface, which was *a priori* unknown, but suspected to be high, regarding the high affinity previously observed between Tat-*b*-PTMC micelles and negatively charged phospholipids.

In TRIS buffer (10 mM) at pH 7.4, a constant volume of Tat-*b*-PTMC micelles was added to the PEG solution under vigorous stirring. PEG adsorption was then monitored by dynamic light scattering, as the complexation process was expected to be accompanied with an increase of hydrodynamic radius together with a decrease of zeta potential value due to charge neutralisation and physical screening. Results obtained with the four different PEG segments are presented in figure 3, with the PEG

concentration in PEG expressed as molar equivalents to Tat-*b*-PTMC chimera. A significant increase of the mean hydrodynamic radius of particles (Figure 5, panel A) together with a remarkable lowering of their zeta potential (Figure 5, panel B) was observed for all samples and concentrations, evidencing the effective physical adsorption of PEG segments at the surface of particles. Size increase though was accompanied with an increase of polydispersity most likely due to dynamic reorganization or slight aggregation. Aggregation is indeed expected to occur as a consequence of non-specific hydrogen bonding interactions between PEG ether functions and protonated groups in the micelles peptide corona. Size dispersion enlargement likely participates to the mean hydrodynamic radius increase measured together with the effective size increment caused by PEG layer complexation in a lesser extent. For phosphate terminated PEG segments, no significant zeta potential difference was measured with regard to PEG concentration, indicating that the saturation, namely the maximum amount of PEG that can be adsorbed at the surface of micelles, has already been reached with 2 PEG chains per chimera. The progressive size increase observed for PEG₁₀₀₀₀-PO₄²⁻ and in a lesser extent for PEG₅₀₀₀-PO₄²⁻ with increasing amount of PEG can be correlated with the simultaneous and marked increase of polydispersity.

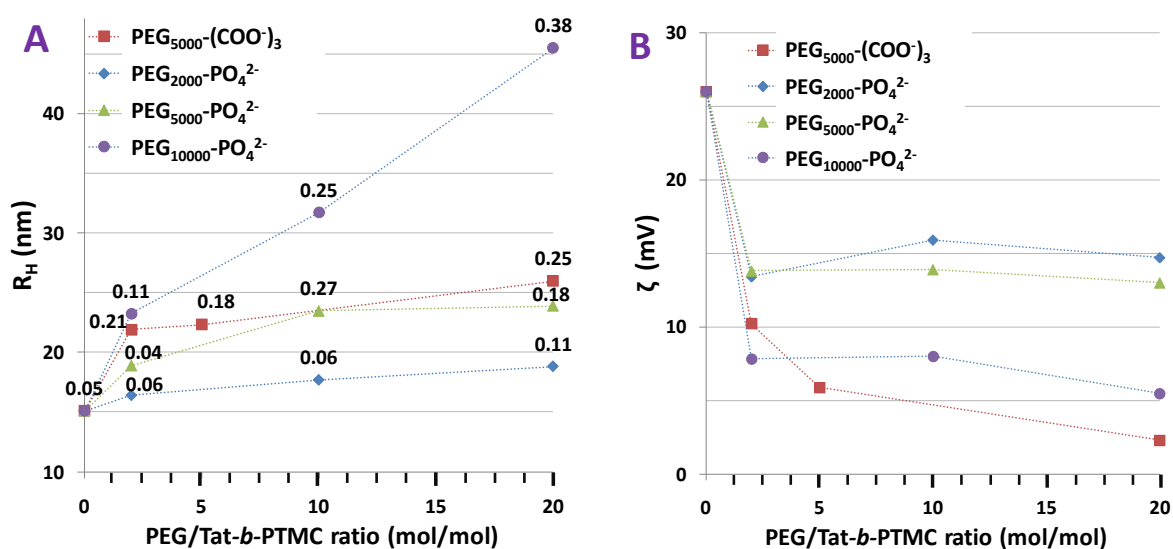


Figure 4 – Hydrodynamic radii (A) and zeta potential values (B) of Tat-*b*-PTMC micelles in TRIS buffer (10 mM) as a function of PEG amount, expressed as molar excess over Tat-*b*-PTMC blocks. Polydispersity indexes are indicated above data point in panel A.

For the triacetate terminated PEG segment, between 2 and 20 molar equivalents per Tat-*b*-PTMC chain, hydrodynamic radii and zeta potential values underwent a gradual increase and decrease respectively which reveals that saturation has not been reached and that more PEG chains are adsorbed.

When comparing the charge surface lowering with PEG chain ends nature, PEG₁₀₀₀₀-PO₄²⁻ and PEG₅₀₀₀-(COO)⁻₃ appeared to provide a better charge screening than PEG₂₀₀₀-PO₄²⁻ and PEG₅₀₀₀-PO₄²⁻.

Indeed, zeta potential values of micelles coated with PEG₂₀₀₀-PO₄²⁻ and PEG₅₀₀₀-PO₄²⁻ were both measured around +14 mV, while those of micelles coated with PEG₁₀₀₀₀-PO₄²⁻ and PEG₅₀₀₀-(COO⁻)₃ were found to be significantly lower, below +5 mV for a 20 fold PEG molar excess. In the case of PEG₅₀₀₀-(COO⁻)₃, this difference can reasonably be explained by a higher grafting density, while for PEG₁₀₀₀₀-PO₄²⁻ this could also originate from its higher molecular weight as compared to the two other phosphate terminated PEG, providing a better covering and a bulkier PEG layer.

II.1.2. INFLUENCE OF IONIC STRENGTH

As intended for biological application, masked micelles require to be stable in physiological saline conditions. Ionic strength could however possibly have two main unfavourable effects on adsorbed PEG segments electrostatic adsorption, namely lowering of the entropic gain caused by the release of counter-ions and decreasing of the range and force of electrostatic interactions. To investigate the influence of ionic strength on the adsorption process, complexation where carried out either in TRIS (10 mM) or in TRIS buffer (10 mM) containing sodium chloride (100 mM), the latter matching the ionic strength of physiological fluids. Hydrodynamic radii and zeta potential values of PEG coated micelles were measured by dynamic light scattering (Table 2). No significant difference was observed except from a slight general decrease of the zeta potential, most probably due to an artefactual charge screening effect from NaCl salts during zeta potential measurement rather than to a real modification of the adsorption profiles.

Entry	Buffer	R _H (nm)	PDI	ζ (mV)
Bare Tat- <i>b</i> -PTMC micelles	TRIS 10 mM	16	0.06	38±6
	TRIS 10 mM, NaCl 100 mM	16	0.15	31±2
Micelles coated with PEG ₂₀₀₀ -PO ₄ ²⁻	TRIS 10 mM	18	0.1	16±2
	TRIS 10 mM, NaCl 100 mM	19	0.2	12±1.5
Micelles coated with PEG ₅₀₀₀ -PO ₄ ²⁻	TRIS 10 mM	24	0.3	14±2
	TRIS 10 mM, NaCl 100 mM	27	0.3	14±2
Micelles coated with PEG ₁₀₀₀₀ -PO ₄ ²⁻	TRIS 10 mM	32	0.2	8±1
	TRIS 10 mM, NaCl 100 mM	26	0.2	5±1
Micelles coated with PEG ₅₀₀₀ -(COO ⁻) ₃	TRIS 10 mM	22	0.1	5±0.6
	TRIS 10 mM, NaCl 100 mM	20	0.1	4 ± 0.5

Table 2– Influence of ionic strength on the physico-chemical features of Tat-*b*-PTMC micelles when mixed with anionic PEG segments.

II.2. CHARACTERIZATION OF PEG/MICELLE COMPLEXES

II.2.1. STABILITY TOWARDS DILUTION AND AT PHYSIOLOGICAL TEMPERATURE

To investigate simultaneously whether PEG coated-micelles remained stable when diluted similarly than when injected in systemic circulation and whether the excess of anionic PEG segments used for the complexation could be removed without destabilizing or desorbing the PEG layer, PEG coated-micelles dispersions were dialyzed in 5 L buffer for 3 hrs. Hydrodynamic radii and zeta potentials were monitored by dynamic light scattering. Colloidal properties of shielded micelles appeared to be barely affected by dilution and remained stable, while hydrodynamic radius of bare Tat-*b*-PTMC micelles was found to increase slightly together with their polydispersity index (Table 3). The stability of complexes at body temperature (37°C) was also investigated and no difference has been detected as compared with room temperature.

Entry	Dilution (25×10 ³)	R _H (nm)	PDI	ζ (mV)
Bare Tat- <i>b</i> -PTMC micelles	before dialysis	16	0.06	38±6
	after dialysis	19	0.15	31±2
Micelles coated with PEG ₂₀₀₀ -PO ₄ ²⁻	before dialysis	20	0.1	16±2
	after dialysis	21	0.2	12±1.5
Micelles coated with PEG ₅₀₀₀ -PO ₄ ²⁻	before dialysis	18	0.3	14±2
	after dialysis	23	0.3	14±2
Micelles coated with PEG ₁₀₀₀₀ -PO ₄ ²⁻	before dialysis	27	0.2	8±1
	after dialysis	25	0.2	5±1
Micelles coated with PEG ₅₀₀₀ -(COO) ₃	before dialysis	26	0.1	5±0.6
	after dialysis	30	0.1	4 ± 0.5

Tableau 3 - Influence of dilution by dialysis on the stability of bare and masked Tat-*b*-PTMC micelles.

In the following, all complexes were then prepared in a TRIS (10 mM) NaCl (100 mM) buffer at pH 7.4, with a PEG/Tat-*b*-PTMC ratio of 2 for PEG₅₀₀₀-(COO)₃ and 10 for PEG-PO₄²⁻ segments, and dialyzed in buffer to remove the excess of PEG.

II.2.2. PHYSICO-CHEMICAL PARAMETERS AND ADSORPTION REGIMES

Once their preparation procedure was optimized, electrostatic complexes were analyzed by multi-angle dynamic light scattering. A good agreement was found between the hydrodynamic radii

measured routinely at 90° and the ones calculated from linear fits of the decay rate variation as a function of squared scattering vector. PEG-coated micelles were then observed by atomic force microscopy. Images are presented in figure 6 together with corresponding dynamic light scattering data.

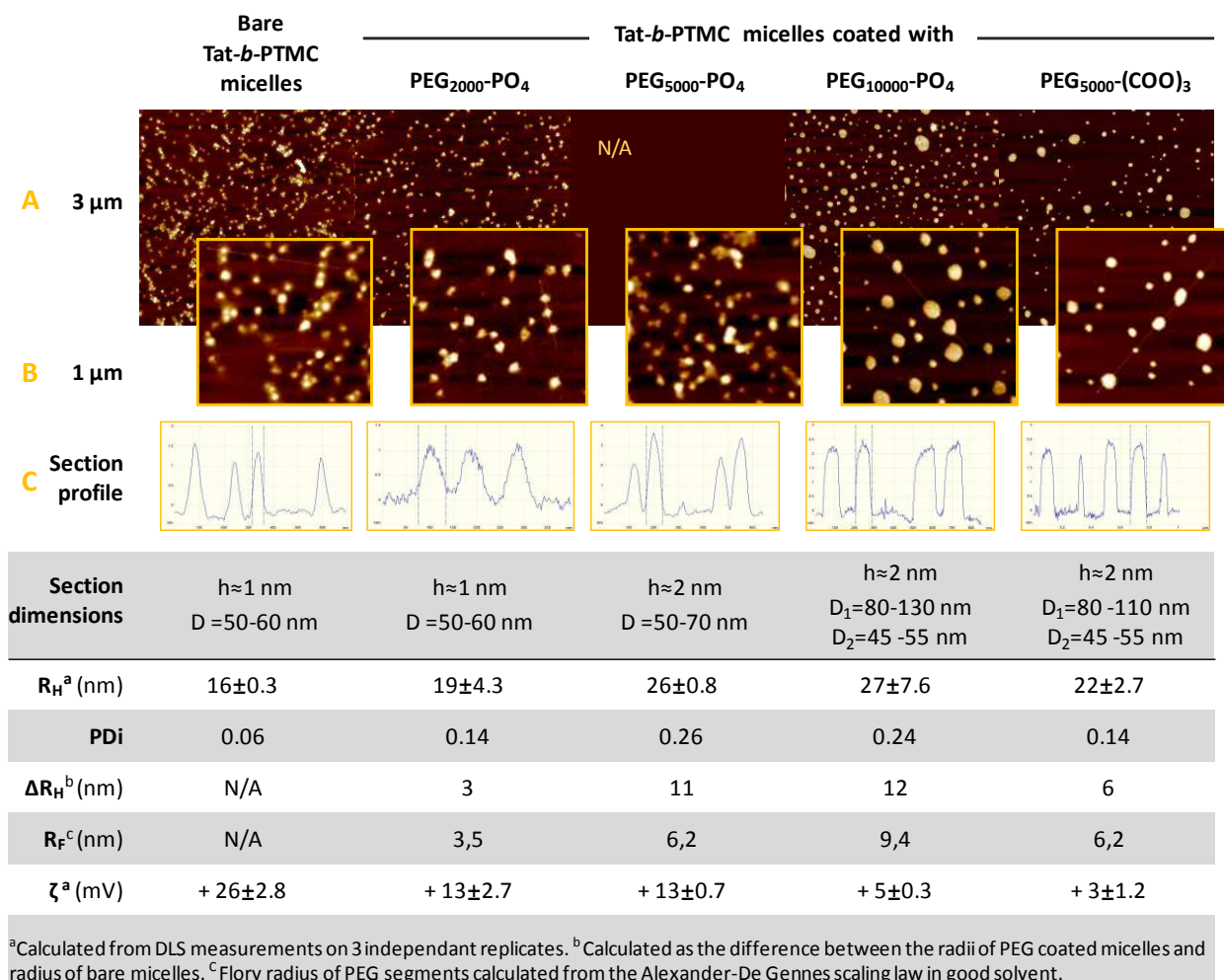


Figure 5 - Atomic Force Microscopy (upper part) and Dynamic Light Scattering (lower part) analyses of Tat-*b*-PTMC micelles coated with different anionic PEG segments. Panel A: Tapping mode AFM images 3x3 μm; Panel B: Tapping mode AFM images 1x1 μm; Panel C: AFM section profiles; Table: Mean height and diameter values of AFM particles and physicochemical characteristics obtained by dynamic light scattering.

The thickness of the polymer layers, calculated as the difference ΔR_H between the hydrodynamic radius of masked and bare Tat-*b*-PTMC micelles, was found to be close to the Flory radii of PEG chains. Slightly higher ΔR_H values obtained for PEG₅₀₀₀-PO₄²⁻ and PEG₁₀₀₀₀-PO₄²⁻ were due to the broadening of micelles radii originating from polydispersity increase. According to scaling laws established by Alexander and De Gennes, this indicated a low adsorption regime, namely a low amount of PEG chains grafted per surface unit. In such regime, PEG chains are adsorbed in a “mushroom” conformation, occupying roughly a half sphere with a radius comparable to their Flory radius in good solvent. The distance (D) between two chains attachment points is then higher or

equal to the Flory radius (Figure 7). Whereas the affinity between anionic chains and cationic micelles relies mostly on the nature of electrostatic partners, the grafting density depends more on the chain molecular features, striking a balance between entropic, energetic and conformational parameters.

On AFM images, a clear difference on particles appearance was noticed between micelles coated with PEG₂₀₀₀-PO₄²⁻ or PEG₅₀₀₀-PO₄²⁻ on the one hand and those coated with PEG₁₀₀₀₀-PO₄²⁻ or PEG₅₀₀₀-(COO⁻)₃. Micelles masked with PEG₂₀₀₀-PO₄²⁻ or PEG₅₀₀₀-PO₄²⁻ and bare Tat-*b*-PTMC micelles have very similar features and size increment caused by PEG adsorption is very faint. The grafting density is therefore suspected to be very low, consistent with zeta potential measurements revealing an incomplete charge screening. The PEG layer appeared to be very thin, possibly due to the spread out of PEG “mushrooms” through non specific adsorption with the micelle surface by hydrogen bonding and other weak interactions (Figure 7, panel A). A substantial aggregation of micelles coated with PEG₅₀₀₀-PO₄²⁻ was observed, fully consistent with the high polydispersity indexes measured by light scattering for all complexes dispersions prepared with this polymer. We hypothesized that, for this specific molecular weight and anionic group, neither electrostatic nor repulsion forces are sufficient to stabilize the colloidal dispersion after adsorption which then tends to aggregate.

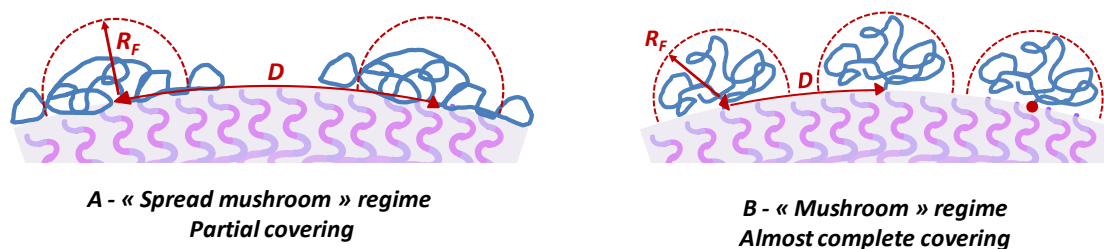


Figure 6 – Schematic representation of the two adsorption conformations suspected.

In contrast, for micelles masked with PEG₁₀₀₀₀-PO₄²⁻ and PEG₅₀₀₀-(COO⁻)₃, AFM images reveal significantly larger and higher morphologies with sharper edges as compared to bare Tat-*b*-PTMC micelles. This observation, together with the zeta potential measurements assessing an almost complete charge screening, is consistent with a higher grafting density than the one provides by PEG₂₀₀₀-PO₄²⁻ and PEG₅₀₀₀-PO₄²⁻ segments, allowing the surface to be efficiently covered by PEG layer (Figure 5, B). In the case of the PEG₅₀₀₀-(COO⁻)₃ segment, the higher amount of adsorbed polymer and better charge screening observed as compared with PEG₅₀₀₀-PO₄²⁻ segment could be attributed to the multivalency of its anionic anchor-buoy favouring electrostatic interactions against hydrogen bonding, thus providing a better charge neutralization. The better covering obtained with PEG₁₀₀₀₀-PO₄²⁻ as compared to other phosphate-terminated polymers could possibly be explained by its higher molecular weight, allowing a better surface coverage per chain and/or a higher amount adsorbed by increasing the entropy released from chain adsorption and thus decreasing of the free energy of the system. For these two samples, AFM images also revealed the presence of two particle

populations. As electrostatic interactions between Tat peptide segments were previously identified as the main parameters governing Tat-*b*-PTMC self-assembly, we suspected that, once partially complexed with anionic PEG segments, self-assemblies reorganized in a segregating manner in either smaller or larger particles.

As this initial physico-chemical study is far from being complete, the hypothetical conjectures stated above would need confirmation by additional experiments, such as isothermal titration calorimetry and complete measurement of the Langmuir isotherm in order to measure the net amount of adsorbed polymer and consequently the grafting density and the distance *D* between two chains attachments points.

III. PEG-COATED MICELLES pH RESPONSIVENESS AND STABILITY IN BIOLOGICAL CONDITIONS

III.1. pH-INDUCED DESTABILIZATION

To assess the influence of pH decrease over PEG layer stability, masked micelles were acidified either rapidly by adjusting pH with HCl, or slowly by dialysis against buffer at the desired pH. Hydrodynamic radii and zeta potentials of PEG coated micelles were monitored by dynamic light scattering (Table 4).

Entry	pH	Acidification by adding HCl			Acidification by dialysis in buffer		
		R _H (nm)	PDi	ζ (mV)	R _H (nm)	PDi	ζ (mV)
Bare Tat- <i>b</i> -PTMC micelles	7.4	19	0.1	19±1	19	0.1	19±1
	6.5	22	0.3	26±2	28	0.3	15±1
	5.5	35	0.6	21±2	73	0.6	33±3
Micelles coated with PEG ₂₀₀₀ -PO ₄ ²⁻	7.4	23	0.2	13±3	23	0.2	13±3
	6.5	21	0.3	21±5	22	0.3	28±2
	5.5	23	0.4	25±2	141	0.7	23±2
Micelles coated with PEG ₅₀₀₀ -PO ₄ ²⁻	7.4	26	0.2	13±1	26	0.2	7±2
	6.5	27	0.3	8±1	23	0.3	16±3
	5.5	29	0.4	11±1	33	0.5	9±2
Micelles coated with PEG ₁₀₀₀₀ -PO ₄ ²⁻	7.4	30	0.2	6±2	30	0.2	6±1
	6.5	30	0.4	21±3	30	0.4	7±2
	5.5	39	0.5	20±2	36	0.6	7±1
Micelles coated with PEG ₅₀₀₀ -(COO ⁻) ₃	7.4	25	0.2	4±1	25	0.2	4±1
	6.5	22	0.1	3.5±1	23	0.2	4±1
	5.5	30	0.4	5±1	39	0.3	6±3

Table 4 – Influence of pH decrease on physico-chemical characteristics of Tat-*b*-PTMC micelles coated with anionic PEG segments.

In all cases, bare Tat-*b*-PTMC micelles included, an important increase of polydispersity indexes, together with change in zeta potential values with apparently no tangible trend were observed. This is most probably due to aggregation of dispersions upon acidification of the medium. This

phenomenon prevented any conclusion about PEG chains desorption. Nevertheless, we still noticed that the pH-induced strong destabilization of the colloidal dispersion occurred in a much lesser extent for micelles coated with PEG₅₀₀₀-(COO⁻)₃. This is consistent with the fact that, presenting a lower pKa, PEG₅₀₀₀-(COO⁻)₃ adsorbed layer is less sensitive to acidification in this pH range the one from phosphate terminated PEG segments.

III.2. COLLOIDAL INTERACTIONS WITH LIPOSOMES

In chapter 4, bare Tat-*b*-PTMC micelles were shown to strongly interact with anionic phospholipid polar heads of DMPC/DMPG (7:3) liposomes, leading, below a threshold concentration, to an instantaneous macroscopic aggregation. To provide additional evidence of anionic PEG segments adsorption at the surface of Tat-*b*-PTMC micelles, and to evaluate roughly the stability of this molecular shielding in presence of competitive oxoanionic counterparts, PEG-coated micelles were mixed with DMPC/DMPG (7:3) liposomes at pH 7.4 and 5.5. Effective interaction between liposomes and micelles, resulting from the destabilization of the system, was assessed qualitatively, following visually the solution turbidity (Table 5).

Coating	pH=7.4		pH=5.5	
	t = 0	t = 1 hr	t = 0	t = 1 hr
Bare Tat- <i>b</i> -PTMC micelles	+++	+++	+++	+++
PEG ₂₀₀₀ -PO ₄ ²⁻	-	++	++	++
PEG ₅₀₀₀ -PO ₄ ²⁻	-	++	++	++
PEG ₁₀₀₀₀ -PO ₄ ²⁻	-	++	++	++
PEG ₅₀₀₀ -(COO ⁻) ₃	-	-	-	+

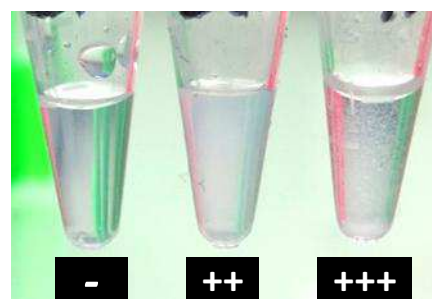


Table 5 – Turbidity tests evidencing electrostatic interactions between negatively charged liposomes (PC/PG, 7:3) and Tat-*b*-PTMC micelles coated with anionic PEG segments, immediately (t=0) and 1 hr upon addition, at pH=7.4 and pH=5.5. (-): clear dispersion; (+): dispersion becomes opalescent (++): visible aggregation; (+++): sedimentation

At pH=7.4, the dispersions containing bare Tat-*b*-PTMC micelles immediately aggregated and collapsed. In contrast, dispersions containing masked micelles were perfectly clear at time zero, evidencing the absence of interaction between micelles and liposomes and consequently the physical adsorption of anionic PEGs at the surface of micelles. However, after 1 hr, mixes containing micelles coated with PEG-PO₄²⁻ segments started to aggregate, indicating that PEG chains were desorbed and replaced by anionic phospholipids heads. Dispersion containing the micelles masked with PEG₅₀₀₀-

(COO)₃ blocks remained stable up to a several hours. Triacetate-terminated PEG segment indeed provided a more stable adsorption towards competitive electrostatic interactions than phosphate terminated PEG segments, probably because they present 2 additional anionic anchor-buoys per chains better stabilizing their adsorption.

At pH=5.5, samples containing PEG-PO₄²⁻ masked nanoparticles aggregated instantaneously, while PEG₅₀₀₀-(COO)₃ still provided a stable colloidal dispersion that was only slightly destabilized after 1 hr. One can hence conclude that, in good agreement with their respective pKa values, the adsorbed PEG-PO₄²⁻ layers were much more destabilized at pH 5.5 than the one provided by PEG₅₀₀₀-(COO)₃ blocks.

III.3. *IN VITRO* CELLULAR UPTAKE

Regarding their surface charge concealing potency, PEG₅₀₀₀-(COO)₃ and PEG₁₀₀₀₀-PO₄²⁻ segments were selected as the two best shielding candidates, to delay or even prevent the Tat-*b*-PTMC micelles cellular uptake. Using similar conditions as previously (chapter 3), HeLa cells were thus incubated for 30 min and 4 hrs with bare, PEG₅₀₀₀-(COO)₃- and PEG₁₀₀₀₀-PO₄²⁻-coated fluorescein-labelled Tat-*b*-PTMC₃₀ micelles at pH=7.4. Unfortunately, no significant lowering of cell fluorescence was observed between bare and shielded micelles (Figure 8, figure S2). PEG chains are most probably immediately desorbed from micelles surface by competitive interactions with the numerous anionic counterparts presented on cellular membranes

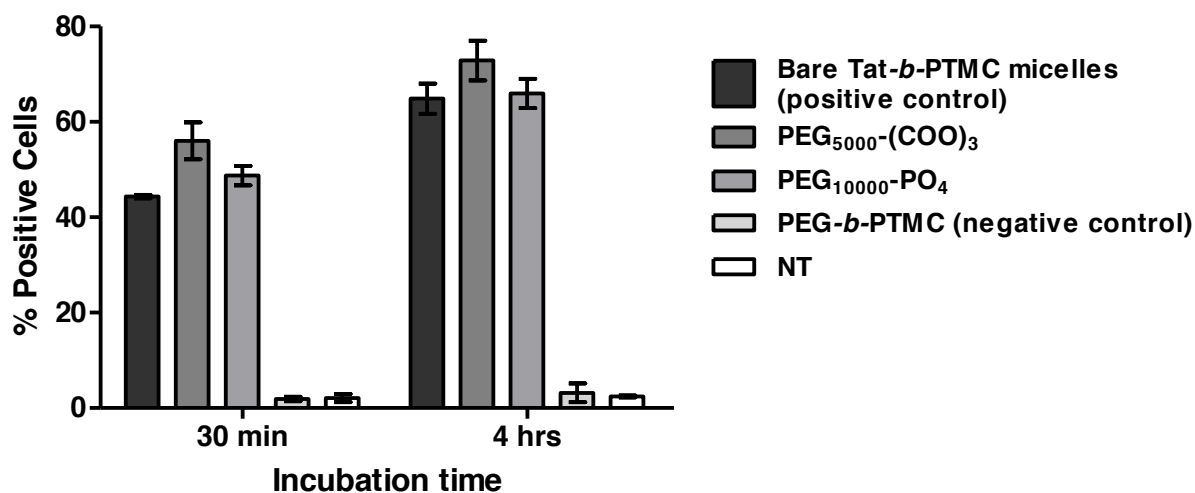


Figure 7 - Mean fluorescence obtained from FACS analysis of HeLa cells incubated for 30 min and 4 hrs with Tat-*b*-PTMC micelles coated with anionic PEG segments at pH=7.4 and 37°C.

CONCLUSION

Electrostatic physisorption equilibrium of anionic PEG segments at the surface of Tat-*b*-PTMC micelles was expected to depend mainly on five physico-chemical parameters: PEG concentration, ionic strength, dilution, pH and the presence of competitive anions. To find the best compromise between high charge screening and colloidal stability, we first studied the influence of PEG concentration over the amount of adsorbed materials. Ionic strength as well as dilution proved to have a negligible impact on nanoparticles physico-chemical characteristics. Once their preparation optimised, we endeavoured to characterise PEG segments adsorption regimes by combining dynamic light scattering and atomic force microscopy analyses. We finally tested their stability with regard to pH decrease and presence of anionic biological counterparts, namely negatively charged liposomes and cells. In good agreement with their respective pKa values, adsorbed PEG-PO₄²⁻ layer were found to be much more destabilized when lowering pH from 7.4 to 5.5 than the one provided by PEG₅₀₀₀-(COO⁻)₃. However, none of them proved to be sufficiently stable to prevent or at least delay Tat-*b*-PTMC micelles cellular uptake *in vitro*. To reach this goal, stronger electrostatic interactions should probably be engaged in the adsorption process, for instance by using a polyelectrolyte block instead of a single anionic group as anchor-buoy.^{29, 30}

EXPERIMENTAL SECTION

Materials and reagents

All PEG segments were purchased from Jenkem Technology. DMPC (1,2-DiMyristoyl-sn-glycero-3-PhosphoCholine) and DMPG (1,2-DiMyristoyl-sn-glycero-3-Phospho-(1'-rac-Glycerol)) were supplied by Avanti Polar Lipids. Solvents and other chemical reagents were obtained from Sigma-Aldrich. All cell culture reagents were purchased from Gibco® Life Technologies (Invitrogen). HeLa cells were kindly provided by Prof. Martin Teichmann (IECB, Bordeaux, France). Tat-*b*-PTMC and Fluorescein-PTMC chimeras were synthesized as described in chapter 2 and 3.

Experimental procedures

Acylation of Methoxy-PEG-glucose ($M_w = 5000$, PEG₅₀₀₀-Glu). PEG₅₀₀₀-Glu (100 mg, 20 μ mol) was dissolved in 1.5 mL DMF. Separately, succinic anhydride (140 mg, 1.4 mmol) and DMAP (4-dimethylaminopyridine, 17 mg, 140 μ mol) were dissolved in 1.5 mL DMF and stirred for 1 hr. The solutions were then mixed together and stirred overnight at room temperature. The polymer was precipitated in cold ether. After centrifugation, the recovered white solid was solubilized in 500 μ L ammonium acetate buffer (10 mM, pH 5), dialysed with 2 kDa cut-off tubing against buffer and lyophilized. The white powder obtained was characterized by ¹H NMR. Notation PEG₅₀₀₀-(COO⁻)₃; Mass yield=77% (77 mg); ¹H NMR (D₂O) 2.6 (m, 12H, OC(O)CH₂CH₂COOH) ; δ 3.4 (s, 3H, CH₃O); δ 3.73 (s, 4nH, OCH₂CH₂O).

Titration of anionic PEG segments. PEG was solubilised in ultrapure water and pH of the resulting solution was adjusted to 4 with a 1 mM HCl solution. The polymer was then titrated with a 10 mM NaOH solution. The pKa values were determined graphically.

Complexation – general procedure. Tat-*b*-PTMC micelles and fluorescent Tat-*b*-PTMC micelles were obtained from respectively bulk Tat-*b*-PTMC₃₀ chimeras and bulk (97:3) w/w mix of Fluorescein-PTMC₃₀/ Tat-*b*-PTMC₃₀ (prepared as described in chapter 3) by direct dissolution (10 mg) in buffer (pH 7.4, TRIS 10 mM or TRIS 10 mM, NaCl 100 mM, 1 mL) at room temperature for 24 hrs. PEG segments were dissolved in the same buffer at varying concentration. All solutions were sterilized by filtration over 0.22 μ m pore-sized filter units. Diluted Tat-*b*-PTMC micellar dispersion (100 μ L, 1 mg/mL) was then added to PEG solution (100 μ L) under vigorous stirring (1400 rpm). After a 2 min stirring, the resulting complexes were analysed as it is or dialyzed against buffer (5 L) using 25 kDa cut-off tubing for 3 hrs.

Acidification procedure. PEG-coated micelles pH values, initially 7.4, were adjusted to 6.5 and 5.5 either by adding HCl solution (10 mM) or by dialysis against buffer at the desired pH (TRIS 10 mM or TRIS 10 mM, NaCl 100 mM, 5 L) using 25 kDa cut-off tubing for 3 hrs.

Preparation of liposomes (Large Unilamellar Vesicles – LUV). DMPC and DMPG were dissolved separately in chloroform and chloroform/methanol (3:2) respectively at a concentration of 3 mg/mL. To obtain a DMPC/DMPG solution with a (7:3) mass ratio, 2.8 mL DMPC solution and 1.2 mL DMPG solution were mixed in a round flask bottom. Solvent was evaporated using a rotary evaporator under reduced pressure and heating above the melting temperature of lipids ($T_m \approx 25^\circ\text{C}$). The dry lipid film formed on the wall of the rotating flask was then allowed to rehydrate in buffer (1 mL) under rotation heating above lipids T_m during 1 hr. Still heating above lipids T_m , the resulting multilamellar vesicle suspension was extruded at least 11 times through a 0.2 μm pore-sized polycarbonate membrane using an Avanti[®] Mini-Extruder. Final concentration of the obtained liposome dispersion was determined by dry extract weighing. As with time vesicles fusion increase polydispersity and size of the dispersion, samples were kept in the fridge, namely far above the lipids T_m , and used within the week following their preparation. For turbidity tests, equal volumes (50 μL) of liposome and micellar dispersions were mixed at 1 and 0.5 mg/mL respectively.

NMR spectroscopy. All NMR experiments were performed at 298 K on a Bruker Avance I NMR spectrometer operating at 400 MHz, using TMS as standard. ^1H and ^{13}P were recorded with a D1 of 5 s and 32 scans.

Dynamic and static light scattering. Dynamic and static light scattering experiments were performed using an ALV CGS-3 Compact Goniometer System, equipped with a 35 mW HeNe linear polarized laser with a wavelength of 632.8 nm and an ALV/LSE-5004 light scattering electronic and Multiple Tau Digital correlator. The accessible scattering angles ranged from 30° to 150° . Samples (2 mL in 2 cm-diameter cylindrical glass cells) were immersed in a filtered toluene bath. Static data of 3 independent 5 s-measurements with less than 3% variation were recorded with the ALV-Correlator Control software. Three independent 20 s-measurements were recorded for dynamic data. Mean hydrodynamic diameters and size distributions were determined using a cumulant analysis method.

Zeta potential measurements. For zeta potential measurements, samples were diluted tenfold in 1 mM NaCl. Laser Doppler micro-electrophoresis was conducted using M3-PALS (Phase analysis Light Scattering) Malvern technology with sequential fast and slow field reversal applying a potential of ± 150 V. The so-measured electrophoretic mobility (μ) was then converted to zeta potential (ζ) using the Smoluchowski approximation.

Atomic Force Microscopy. AFM measurements were performed at room temperature using a Veeco Dimension Icon AFM system equipped with a Nanoscope V controller. Both topographic and

phase images of individual particles were obtained in Tapping Mode using rectangular silicon cantilever (AC 160-TS, Atomic Force, Germany) with a spring constant of 26 N.m⁻¹, a resonance frequency lying in the 270-320 kHz range and a radius of curvature of less than 10 nm. Samples were prepared by solvent casting at ambient temperature from dilute solutions either in pure water or buffer solution (1 wt %). Freshly cleaved mica pieces were placed in a spin-coating apparatus (G3P-8 Spin Coater, PI-Kem, UK) and excess solvent was removed by spinning for 120 s at angular rotation of 3000 rpm.

Cell culture. The HeLa (Human cervical carcinoma) cell line was routinely cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) foetal bovine serum (FBS), 100 units.mL⁻¹ penicillin and 100 µg.mL⁻¹ streptomycin. Cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator using standard tissue culture protocols.

Cellular uptake studies - Flow cytometry analysis. HeLa cells were sub-cultured in 24-well plates for 24 hrs at a density of 15x10³ cells.cm⁻² and exposed to the different nanoparticle dispersions diluted tenfold in medium (to a final 50 µg.mL⁻¹ concentration) for variable times (*i.e.* 30 min and 4 hrs) at 37°C. After medium removal, cells were rinsed twice with PBS. Cells were then trypsinized with a 0.05% Trypsin/EDTA solution for 5 min at 37°C, recovered in medium and centrifuged for 4 min at 1,000 rpm. Cell pellets were then re-suspended in PBS containing 0.5% BSA and 1 mM EDTA and kept cold until analysis. Flow cytometry analysis were performed at UMS3033 (IECB, Bordeaux, France) using a FACS Aria cytometer (BD Biosciences, USA) equipped with Argon ion laser tuned to 488 nm. Ten thousand scattered light-gated events were measured for each replicate and analysed by histogram for green fluorescence using the BD FACSDiva software (version 5.0.3, USA). Fluorescein positive gating was set up on control cells. Independent experiments were carried out 3 times with 3 replicates per condition.

SUPPORTING INFORMATION

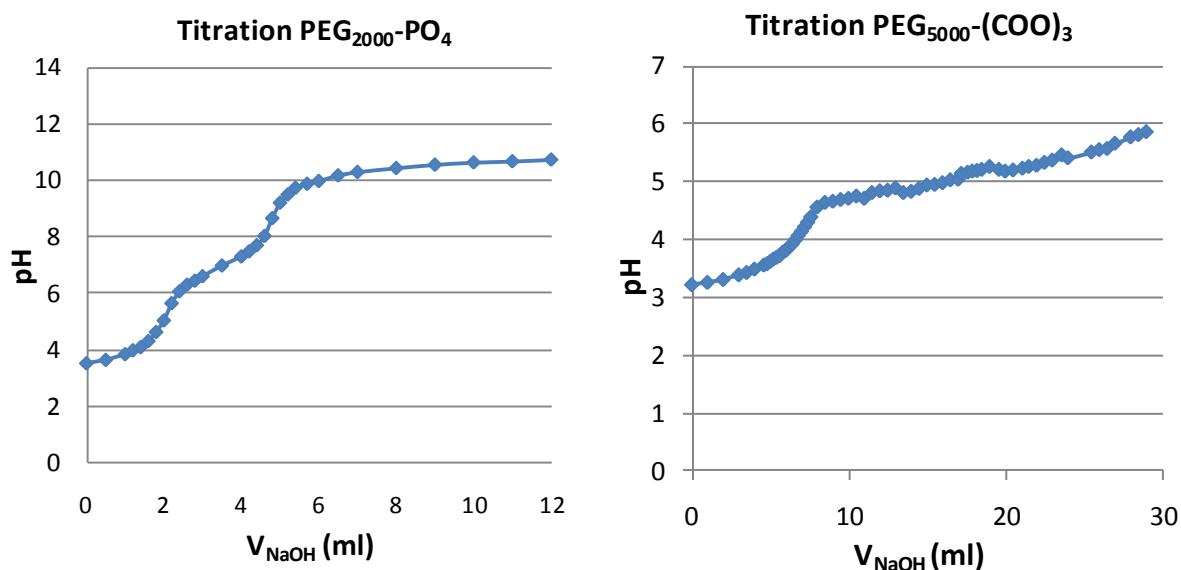


Figure S1 – Titration curves of PEG₂₀₀₀-PO₄2- (similar curves were obtained for other molecular weights) and PEG₅₀₀₀-(COO)₃ with a NaOH solution.

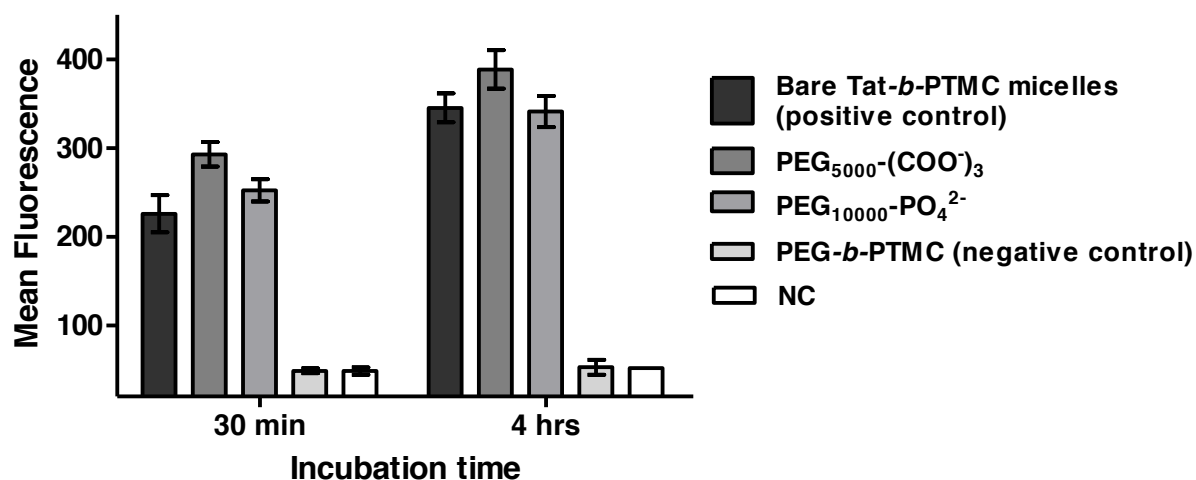


Figure S2 – Percentage of fluorescein positive cells obtained from FACS analysis of HeLa cells incubated for 30 min and 4 hrs with Tat-*b*-PTMC micelles coated with anionic PEG segments at pH=7.4 and 37°C.

REFERENCES

1. H. Maeda, *Bioconjugate Chemistry*, 2010, **21**, 797-802.
2. D. Hanahan and Robert A. Weinberg, *Cell*, 2011, **144**, 646-674.
3. R. K. Jain and T. Stylianopoulos, *Nat Rev Clin Oncol*, 2010, **7**, 653-664.
4. G. P. H. Dietz and M. Bahr, *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2004, **27**, 85-131.

5. T. A. Aguilera, E. S. Olson, M. M. Timmers, T. Jiang and R. Y. Tsien, *Integrative Biology*, 2009, **1**, 371-381.
6. S. R. Schwarze, A. Ho, A. Vocero-Akbani and S. F. Dowdy, *Science*, 1999, **285**, 1569-1572.
7. E. Vives, *Journal of Controlled Release*, 2005, **109**, 77-85.
8. Y. Huang, Y. Jiang, H. Wang, J. Wang, M. C. Shin, Y. Byun, H. He, Y. Liang and V. C. Yang, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013.
9. S. R. MacEwan and A. Chilkoti, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2013, **5**, 31-48.
10. E. Jin, B. Zhang, X. Sun, Z. Zhou, X. Ma, Q. Sun, J. Tang, Y. Shen, E. Van Kirk, W. J. Murdoch and M. Radosz, *Journal of the American Chemical Society*, 2012, **135**, 933-940.
11. S. Huang, K. Shao, Y. Liu, Y. Kuang, J. Li, S. An, Y. Guo, H. Ma and C. Jiang, *ACS Nano*, 2013, **7**, 2860-2871.
12. R. M. Sawant, J. P. Hurley, S. Salmaso, A. Kale, E. Tolcheva, T. S. Levchenko and V. P. Torchilin, *Bioconjugate Chemistry*, 2006, **17**, 943-949.
13. V. A. Sethuraman and Y. H. Bae, *Journal of Controlled Release*, 2007, **118**, 216-224.
14. V. Sethuraman, M. Lee and Y. Bae, *Pharmaceutical Research*, 2008, **25**, 657-666.
15. E. S. Lee, Z. Gao, D. Kim, K. Park, I. C. Kwon and Y. H. Bae, *Journal of Controlled Release*, 2008, **129**, 228-236.
16. L. Zhu, P. Kate and V. P. Torchilin, *ACS Nano*, 2012, **6**, 3491-3498.
17. M. B. Hansen, E. van Gaal, I. Minten, G. Storm, J. C. M. van Hest and D. W. P. M. Löwik, *Journal of Controlled Release*, 2012, **164**, 87-94.
18. R. Kuai, W. M. Yuan, Y. Qin, H. L. Chen, J. Tang, M. Q. Yuan, Z. R. Zhang and Q. He, *Molecular Pharmaceutics*, 2010, **7**, 1816-1826.
19. R. Kuai, W. M. Yuan, W. Y. Li, Y. Qin, J. Tang, M. Q. Yuan, L. Fu, R. Ran, Z. R. Zhang and Q. He, *Molecular Pharmaceutics*, 2011, **8**, 2151-2161.
20. J. M. Harris and R. B. Chess, *Nat Rev Drug Discov*, 2003, **2**, 214-221.
21. M. Stubbs, P. M. J. McSheehy, J. R. Griffiths and C. L. Bashford, *Molecular Medicine Today*, 2000, **6**, 15-19.
22. J. B. Rothbard, T. C. Jessop, R. S. Lewis, B. A. Murray and P. A. Wender, *Journal of the American Chemical Society*, 2004, **126**, 9506-9507.
23. Y. Su, A. J. Waring, P. Ruchala and M. Hong, *Biochemistry*, 2010, **49**, 6009-6020.
24. S. Alexander, *J. Phys. France*, 1977, **38**, 983-987.
25. P. G. de Gennes, *Macromolecules*, 1980, **13**, 1069-1075.
26. P. G. de Gennes, *Advances in Colloid and Interface Science*, 1987, **27**, 189-209.
27. S. Alexander, *J. Phys. France*, 1977, **38**, 977-981.
28. J. Thevenot, A.-L. Troutier, L. David, T. Delair and C. Ladavière, *Biomacromolecules*, 2007, **8**, 3651-3660.
29. S. Louguet, A. C. Kumar, G. Sigaud, E. Duguet, S. Lecommandoux and C. Schatz, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2011, **359**, 413-422.
30. S. Louguet, A. C. Kumar, N. Guidolin, G. Sigaud, E. Duguet, S. Lecommandoux and C. Schatz, *Langmuir*, 2011, **27**, 12891-12901.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif premier de cette thèse était la préparation et l'étude d'auto-assemblages biofonctionnels élaborés à partir de conjugués amphiphiles polymère-*b*-peptide. En effet, de telles chimères macromoléculaires, associant propriétés d'auto-assemblage et fonctions biologiques « codées » à l'échelle moléculaire, sont susceptibles de générer directement en solution des nanoparticules biologiquement fonctionnelles.

Dans ce cadre, nous avons consacré notre travail à l'étude d'un conjugué amphiphile modèle Tat-*b*-PTMC, associant un bloc polymère hydrophobe biocompatible, le poly(triméthylène carbonate) (PTMC), au peptide d'internalisation cellulaire Tat (YGRKKRRQRRR) dérivé de la protéine transactivatrice de transcription (TAT) du VIH, pour former des nanoparticules douées de propriétés d'internalisation cellulaire. Cette approche, employant un peptide bioactif en lieu et place d'un segment polypeptidique obtenu par polymérisation, étant récente au laboratoire, notre ambition première n'était pas tant de mettre au point une réelle stratégie de vectorisation intracellulaire, mais plutôt d'établir et de comprendre d'un point de vue fondamental les liens entre structure macromoléculaire, caractéristiques colloïdales et activité biologique de ces systèmes.

Nous avons dans un premier temps synthétisé une série de chimères Tat-*b*-PTMC de fractions massiques hydrophiles variables. Cette tâche s'est avérée plus délicate que prévue, en partie à cause des difficultés que nous avons rencontrées pour produire le seul segment Tat en quantité suffisante. En effet, cette séquence, bien que relativement courte, présente une majorité de résidus protégés encombrants dont la difficulté de couplage affaiblit considérablement le rendement de synthèse. D'autre part, l'automate à notre disposition s'est révélé peu fiable et a conduit à des synthèses peu reproductibles. Les quelques centaines de milligrammes que nous sommes parvenus à produire à l'issue d'un travail important d'optimisation des conditions de synthèse et d'une purification laborieuse par HPLC semi-préparative représentent néanmoins un résultat tout-à-fait honorable au vue de ces difficultés et en comparaison avec les rendements indiqués dans la littérature. Mais ils demeurent bien modestes compte-tenu de l'application envisagée, requérant une quantité de matière conséquente tant pour la synthèse des conjugués que pour la préparation et l'étude des auto-assemblages. Ainsi, malgré la précision moléculaire qu'elle peut offrir, la synthèse peptidique est loin d'être adaptée et suffisamment performante en termes de coûts et d'échelle de synthèse pour la production de macromolécules en vue de la fabrication de nanomatériaux en comparaison avec les techniques de polymérisation. Ce déséquilibre d'échelle a compliqué et limité l'étendue notre étude.

Concernant la stratégie de synthèse, nous avons opté pour une approche convergente permettant la caractérisation préalable des blocs polymère et peptidique synthétisés séparément. Celle-ci s'est avérée déterminante car elle nous a permis de détecter la cyclisation en milieu basique des amines primaires en bout de chaîne du poly(triméthylène carbonate) ainsi que de mettre en évidence une réaction secondaire lors de la polymérisation par ouverture de cycle catalysée par le diéthyl zinc. Afin de s'affranchir de l'étape de purification du peptide, nous avons envisagé la conjugaison du bloc PTMC au peptide Tat encore protégé, directement sur le support solide. Ce couplage s'est néanmoins avéré très inefficace (11% de conversion), probablement du fait de la faible diffusion des chaînes de polymère dans le réseau du support et de la faible disponibilité de l'amine terminale du peptide fortement contraint stériquement. La seconde voie étudiée, reposant sur la conjugaison des deux blocs en solution par un couplage chimio-sélectif thiol-maléimide, a permis en revanche d'accéder à quatre conjugués Tat-*b*-PTMC au degré de polymérisation croissant (22, 30, 41 et 66) avec de bons rendements. Du fait de la forte incompatibilité chimique des deux segments, la caractérisation de ces amphiphiles n'a également pas été évidente. En raison de la mauvaise résolution spectrale obtenue dans le DMSO (seul solvant commun aux deux blocs) et de son indice de réfraction élevé, l'élucidation de la structure chimique des chimères par spectroscopie de RMN et leur analyse par SEC n'ont pas pu être réalisées. Mettant un point d'honneur à trouver des alternatives analytiques, nous avons toutefois pu confirmer le couplage covalent des deux blocs par une expérience peu classique de RMN DOSY. Les spectres de masse MALDI, obtenus par ailleurs grâce aux efforts d'une collaboratrice spécialiste en spectrométrie de masse, nous ont quant-à eux permis de mesurer des masses molaires cohérentes avec les valeurs théoriques attendues, mais aussi de détecter la dégradation hydrolytique des segments polymères advenant lors des étapes de purification par dialyse et provoquée par les amines primaires nucléophiles du squelette peptidique, qui a alors pu être résolue. Dans ce même temps, nous avons observé que cette dégradation chimique conduisait à une augmentation considérable de la polydispersité et de l'hétérogénéité des auto-assemblages obtenus en solution. Ainsi, si la polydispersité associée au degré de polymérisation peut contribuer favorablement à la régularité des auto-assemblages générés en solution, l'hétérogénéité structurale pouvant résulter de la présence de sous-produits de réactions secondaires, de dégradation ou d'impuretés a, sur ce point, un effet fort dommageable. Nous souhaitons donc particulièrement insister sur la nécessité de synthétiser et de caractériser de façon précise les macromolécules amphiphiles, lorsque l'on vise des nanoparticules aux caractéristiques bien définies et contrôlées.

Nous avons ensuite observé à l'aide de techniques complémentaires d'imagerie (AFM, TEM) et de diffusion (DLS, SANS) que les chimères amphiphiles Tat-*b*-PTMC synthétisées s'auto-assemblent en solution et forment des nanoparticules de morphologie micellaire, très stables et aux dimensions

particulièrement régulières. Leur auto-assemblage spontané par dissolution directe, qui a l'avantage d'éviter le recours à un co-solvant organique et à des étapes chronophages de purification par dialyse, est permis par la faible Tg du PTMC ($\approx -20^\circ\text{C}$) autorisant la mobilité des chaînes à température ambiante et probablement favorisé par le caractère fortement chargé et polaire du peptide Tat. Un lien évident entre la structure chimique des chimères et la morphologie des auto-assemblages obtenus a été observé, le diamètre hydrodynamique des micelles augmentant graduellement de 22 à 40 nm avec l'augmentation du degré de polymérisation du bloc PTMC. Des mesures complémentaires de diffusion des neutrons aux petits angles (SANS), effectuées dans le cadre de la formation à la neutronique (FAN) dispensée par le LLB au CEA de Saclay et à laquelle j'ai pu participer, nous ont également permis de calculer le rayon de giration, le rayon moyen et le nombre d'agrégation des micelles de Tat-*b*-PTMC₃₀ ($D_H=22$ nm) et Tat-*b*-PTMC₆₆ ($D_H=40$ nm). Ces analyses ont révélé que la répulsion électrostatique entre les segments peptidiques fortement cationiques impose une densité surfacique de peptide limitée et quasi-constante, ainsi qu'une courbure interfaciale élevée prévenant la formation de morphologies à plus faible courbure. Le diamètre du cœur variant directement avec la longueur du bloc PTMC, la taille des micelles peut donc être précisément ajustée sans modification de leurs propriétés de surface. Cette conclusion revêt une importance capitale puisqu'elle nous a ensuite permis de comparer l'impact de la taille des micelles, toutes choses étant égales par ailleurs, sur leurs propriétés d'internalisation cellulaire.

L'étude *in vitro*, ensuite initiée sur le modèle HeLa avec des micelles à base de Tat-*b*-PTMC₃₀ ou de Tat-*b*-PTMC₆₆, avait en effet pour objectif d'évaluer l'influence des propriétés colloïdales des nanoparticules sur leur mode d'internalisation cellulaire. Nous avons pu observer, par cytométrie en flux et microscopie de fluorescence, que les nanoparticules sont rapidement recrutées à la membrane et internalisées, le phénomène étant légèrement plus rapide pour les micelles de Tat-*b*-PTMC₃₀ plus petites que celles de Tat-*b*-PTMC₆₆. Les résultats de ces expériences conduites à 4°C , ainsi que la distribution intracellulaire ponctuelle de la fluorescence associée aux nanoparticules à 37°C , suggèrent un mécanisme en deux étapes, pour lequel l'internalisation cytoplasmique des nanoparticules par endocytose est précédée de leur adhésion et accumulation massive sur la membrane. Ce résultat est tout-à-fait cohérent avec ceux de la littérature, très riche d'exemples à ce sujet, dans laquelle il est admis que le peptide Tat adhère fortement à la membrane cellulaire par le biais d'interactions électrostatiques attractives stabilisées par des liaisons hydrogènes entre les résidus arginine cationiques et les biomolécules membranaires anioniques. Afin d'évaluer l'influence de la densité du peptide Tat à la surface des nanoparticules sur ces phénomènes, des micelles mixtes ont été préparées à partir de mélanges de Tat-*b*-PTMC₃₀ et de copolymère PEG-*b*-PTMC₃₈ aux contenus croissants en chimères de 0, 25, 50, 75 et 100 %w/w. Les nanoparticules obtenues, de morphologie micellaire sphérique, présentaient un diamètre variant de 21 à

31 nm et un potentiel zeta nettement positif en présence de chimère allant de +20 à +40 mV. Leurs propriétés d'internalisation ont ensuite été examinées et nous avons pu constater, non sans surprise, que leur accumulation à la surface des cellules croît de façon non-linéaire avec leur contenu en chimère. Ce résultat était en effet inattendu étant donnée les faibles variations de taille et de charge de surface des particules avec leur contenu en peptide. Leur propension à être internalisées par endocytose, phénomène plus lent que celui d'adhésion membranaire, semble en revanche peu affectée par ce paramètre. Leur toxicité, mesurée à l'aide d'un test colorimétrique au MTT à l'issue d'une période de croissance de 72 hrs, s'avère également plus impactée par la quantité de nanoparticules effectivement « ingérées » par les cellules, que par leur contenu en chimère. La ou les voie(s) d'internalisation cellulaire, ainsi que les paramètres moléculaires impliqués, n'ont en revanche pas été déterminés, une étude complète, dépassant le cadre de cette thèse et de nos compétences, à l'aide d'inhibiteurs spécifiques des différentes voies d'endocytose étant nécessaire pour répondre à ces questions. Le mécanisme d'action du peptide Tat étant lui-même encore soumis à controverse, nous laissons volontiers aux spécialistes le soin d'y répondre.

Intrigués par l'accroissement non linéaire et quasi-exponentiel de la quantité de micelles recrutées à la membrane avec leur contenu en peptide Tat, nous avons tenté de comprendre et de rationaliser cette tendance à l'aide d'outils à notre portée en tant que physico-chimistes et avons entrepris d'étudier l'interaction des micelles de Tat-*b*-PTMC avec des membranes phospholipidiques modèles. Afin de confronter plusieurs techniques, nous avons travaillé en collaboration avec deux équipes de biophysiciens, celle du Dr. Isabel Alves (CBMN, Bordeaux), spécialiste de la spectroscopie de résonance de plasmon, et celle du Pr. Gérard Wong (UCLA, Los Angeles), qui a réalisé des mesures de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS). Les micelles de Tat-*b*-PTMC ont montré une affinité plus importante pour les membranes chargées négativement que pour les membranes zwitterioniques, ce résultat confirmant que leur association aux membranes cellulaires est bien gouvernée par des interactions de nature électrostatique avec les biomacromolécules chargées négativement. Les expériences de SAXS et DLS ont révélé que les micelles de Tat-*b*-PTMC s'adsorbent sur les membranes en se regroupant de façon relativement compacte et avec une distance caractéristique, maximisant ainsi la surface couverte et générant, à de très faibles concentrations, la formation de phases ordonnées impliquant une courbure négative gaussienne de la bicouche lipidique. L'élargissement de l'endotherme de transition gel/liquide des lipides, observé par DSC, suggère que l'adsorption des micelles déforme localement la membrane. On peut alors imaginer que celle-ci se réorganise afin de minimiser cette déformation en rapprochant les micelles les unes des autres. Ce comportement est à notre connaissance inédit pour le peptide Tat et les nanoparticules fonctionnalisées à l'aide de celui-ci. Il pourrait résulter à

la fois de l'important rapport surface/volume des micelles et de leur faible polydispersité, mais probablement aussi de la forte concentration de peptide à leur surface. En effet, lorsque les chimères Tat-*b*-PTMC sont progressivement substituées par des copolymères PEG-*b*-PTMC, ce phénomène disparaît pour laisser place à une adsorption aléatoire classique, et ce de façon d'autant plus marquée en présence de sérum. Ces résultats expliqueraient alors l'accumulation non-linéaire des micelles en surface des cellules HeLa avec leur contenu en peptide Tat. Dans quelle mesure ce phénomène est affecté par la séquence primaire et la présentation du peptide à la surface des micelles (notamment le rôle éventuel du résidu tyrosine *N*-terminal) reste une interrogation à laquelle nous aimerions répondre. Il est regrettable que la voie de synthèse sur support solide n'ait pas permis d'accéder aux chimères PTMC-*b*-Tat en quantité suffisante, car, le peptide γ étant modifié sur son extrémité *N*-terminale, il aurait constitué un excellent contrôle. Des chimères présentant la séquence Tat « mélangée » (*scrambled peptide*) pourraient également permettre de répondre à cette question.

Les résultats de notre étude biophysique ont révélé que les micelles de Tat-*b*-PTMC possèdent des propriétés particulières vis-à-vis des membranes par rapport à celles du peptide Tat unimoléculaire, de part leur taille nanométrique les situant à la frontière entre surface de matière molle et molécule individuelle. De manière plus générale, ils mettent l'accent sur le fait que les nanoparticules ne doivent pas être réduites à leurs propriétés chimiques, et que leurs géométrie et propriétés de surface doivent également être prises en compte lors de leur évaluation en milieu biologique.

Par ailleurs, l'adéquation entre les résultats obtenus avec des membranes modèles et ceux obtenus *in vitro* sur cellules montre que les membranes phospholipidiques constituent de bons modèles pour étudier les interactions entre nanoparticules et membranes. A l'heure où la tendance est la fonctionnalisation de surface des nanoparticules avec toutes sortes de ligands et de biomolécules, elles peuvent alors constituer de bons outils pour les physico-chimistes et les galénistes afin d'évaluer en première approximation la stabilité et les propriétés de surface des systèmes et d'optimiser leur formulation avant d'avoir recours à des tests biologiques plus contraignants.

Les nanoparticules à base de chimères Tat-*b*-PTMC développées au cours de cette thèse se sont donc avérées être effectivement de très bons vecteurs d'internalisation cellulaire. Cependant, à l'instar du peptide Tat, elles ont une totale absence de sélectivité. Dans le cadre d'applications *in vivo* nécessitant une injection systémique, ces propriétés vont à l'encontre du bénéfice pharmacocinétique qu'apporte le recours à une nanoparticule pour le transport d'un principe actif thérapeutique. Dans la dernière partie de cette thèse, nous avons donc entrepris d'essayer de camoufler la surface des micelles à l'aide d'un revêtement furtif non-covalent de poly(oxyde d'éthylène) sensible au pH, dans le but d'augmenter leur

sélectivité vis-à-vis des cellules tumorales nichant dans un environnement légèrement plus acide (pH=6.8) que celui des tissus normaux (pH=7.4). L'adsorption électrostatique sur la surface des micelles de Tat-*b*-PTMC₃₀ de segments PEG de différentes masses molaires (2000, 5000, 10000 g.mol⁻¹) présentant un groupement anionique en bout de chaîne (phosphate ou triacétate) a donc été étudiée. De façon générale, une augmentation du diamètre moyen des nanoparticules a pu être observée par DLS et AFM indiquant l'adsorption des chaînes de PEG à leur surface. Cette variation de taille s'accompagne d'une diminution du potentiel zeta des micelles, confirmant l'écrantage effectif de leurs charges positives de surface. Cependant, l'adsorption des segments PEG ne s'est pas avérée suffisamment stable pour empêcher ou même seulement retarder l'interaction des micelles avec les cellules HeLa *in vitro*, ce que nous avons attribué à la liaison électrostatique trop faible entre la couverture de PEG et la surface des micelles. Un copolymère comportant un segment PEG et un segment polyanionique s'avèrerait probablement plus efficace.

Des approches intéressantes ont été reportées récemment dans la littérature permettant de conférer un caractère pH-sensible aux peptides d'internalisation cellulaires, basé sur la protonation de résidus histidine (pKa=6).¹ Zhang *et al.* ont dans ce cadre introduit à la surface de liposomes un peptide d'internalisation formant une hélice α empêchant son entrée dans les cellules à pH=7.4 dénaturée dans l'environnement tumoral où l'activité de la séquence est pleinement recouverte.² De manière plus générale, l'association au sein de constructions chimériques amphiphiles de peptides bioactifs comme le peptide Tat et de segments tels que les poly(acide aminé)s adoptant une structuration secondaire capable de s'adapter en réponse à un stimulus physiologique ou moléculaire, représente des perspectives intéressantes pour tendre vers des auto-assemblages plus complexes et multi-hiérarchisés mimant les protéines. Plus concrètement nous pouvons envisager dans l'avenir de synthétiser des chimères présentant d'autres peptides, par exemples une séquence de ciblage spécifique^{3,4} ou favorisant la sortie de l'endosome,⁵ qui, une fois co-auto-assemblées avec les chimères Tat-*b*-PTMC, permettraient d'améliorer les propriétés de ciblage et de translocation cytoplasmique des auto-assemblages. L'emploi de blocs PTMC au degré de polymérisation nettement plus élevé (100-200) couplés au peptide Tat ou bien le couplage de deux voire de plusieurs chaînes de PTMC par peptide pourraient probablement permettre d'obtenir d'autres morphologies nanométriques d'intérêt.⁶

1. W. Zhang, J. Song, B. Zhang, L. Liu, K. Wang and R. Wang, *Bioconjugate Chemistry*, 2011, **22**, 1410-1415.
2. Q. Zhang, J. Tang, L. Fu, R. Ran, Y. Liu, M. Yuan and Q. He, *Biomaterials*, 2013, **34**, 7980-7993.
3. E. Vivès, J. Schmidt and A. Pèlerin, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 2008, **1786**, 126-138.
4. M. Lukanowska, J. Howl and S. Jones, *Biotechnology Journal*, 2013.
5. S. L. Lo and S. Wang, *Biomaterials*, 2008, **29**, 2408-2414.
6. X.-D. Xu, J.-X. Chen, H. Cheng, X.-Z. Zhang and R.-X. Zhuo, *Polymer Chemistry*, 2012, **3**, 2479-2486.

Résumé

La thèse présentée décrit la préparation et l'étude d'auto-assemblages élaborés à partir de conjugués amphiphiles Tat-*b*-poly(triméthylène carbonate) (Tat-*b*-PTMC) doués de propriétés d'internalisation cellulaire conférées par le segment peptidique Tat. L'objectif principal de ces travaux était d'établir et de comprendre les liens entre la structure macromoléculaire, les caractéristiques colloïdales et l'activité biologique de ces systèmes. Les efforts de précision moléculaire et de caractérisation fournis pour la synthèse des chimères Tat-*b*-PTMC a permis de corrélér finement leurs structures chimiques aux paramètres physico-chimiques des nanoparticules obtenues. Grâce à une approche expérimentale transverse combinant des études de biologie cellulaire et de biophysique, le mécanisme d'interaction *in vitro* de ces nanoparticules avec les cellules HeLa a pu être en partie élucidé. Enfin, un camouflage électrostatique pH-sensible a été mis au point pour tenter de moduler leur activité et d'augmenter leur sélectivité vis-à-vis de l'environnement tumoral.

Summary

This thesis work deals with preparation and study of cell-penetrating self-assemblies from amphiphilic polymer-*b*-peptide Tat-*b*-poly(trimethylene carbonate) conjugates. Tat-*b*-PTMC chimeras with tunable hydrophilic fractions were synthesized, thoroughly characterized and self-assembled in aqueous buffer into size-tunable, highly monodisperse core-shell nanoparticles, presenting a full Tat corona. Their physico-chemical profiles were assessed by complementary imaging (AFM, TEM) and scattering techniques (multiangle DLS, SANS) and correlated with their molecular architectures. Their transduction ability *in vitro* on HeLa cells and interaction mode with phospholipid membranes were studied with a view to correlate their physico-chemical profiles with their biological properties. This interdisciplinary approach partially shed light on the interactions at play in the cellular uptake process. With the ultimate goal of improving pharmacological characteristics, we finally endeavored to develop an ON/OFF PEGylation strategy to harness the cell penetrating power of those biomacromolecular self-assembled systems.

Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques

16, Avenue Pey Berland

F-33607 Pessac

LCPO