

17540.01

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE GUELMA

Faculté des mathématiques et de l'informatique et des sciences de la matière
Département des sciences de la matière



Mémoire de fin d'études
Master II



Spécialité : Chimie Physique et Analytique

Présenté par :

Rezaiguia samiya
Saadna mounya

N/S

**Synthèse et Caractérisation de Nanoparticules d'or
enrobées d'Acide Lipoïque**

Sous la Direction de :

Dr. MAAMAR STITI

Juin 2015

Remerciements

Remerciements

Ce travail a été effectué au sein du **Laboratoire de Chimie Appliquée (LCA)**, à l'université 8 Mai 1945 de Guelma. Que le **professeur Mohamed ABDAOUI**, Chef du labo; trouve ici l'expression de notre respectueuse considération et de notre sincère gratitude pour l'intérêt qu'il a accordé à notre travail.

Nous tenons à exprimer notre très sincère reconnaissance à Monsieur le **D^r Maamar STITI** qui nous a fait l'honneur de diriger ce travail, aussi pour sa disponibilité, sa patience, ses conseils judicieux et ses orientations précieuses et toute l'attention qu'il nous a accordée le long de la réalisation de ce travail. Qu'il trouve dans l'aboutissement de ce travail le témoignage de notre profonde gratitude et parfaite considération.

A nos enseignants qui nous ont beaucoup aidés et encouragés durant notre formation en particulier **Melle Soria Nigri** de nous avoir aidé à tirer les spectres IR et **M me H. Bouzit** pour nous avoir aidé à enregistrer les Spectres UV-Vis.

Nous présentons nos remerciements pour les membres de jury d'avoir accepté de juger ce travail.

Sommaire

SOMMAIRE:

Introduction générale	1
Chapitre I : Vectorisation Par Les Nanoparticules D'or	
I)-Nanotechnologie et nanomatériaux.....	3
II)- Définition des nanoparticules.....	3
II.1)- Les différentes nanoparticules.....	4
II.2.1)-Les nanoparticules d'or	5
II.2.2)- Les liposomes	6
II.2.3)- Les polymères organiques	6
II.2.4)- Les nanoparticules lipidiques	7
II.2.5)- Les nano-émulsions	7
II.2.6)- Les micelles	8
II.2.7)-Les quantum dots	8
II.2. 8)- Les nanoparticules d'oxyde de fer	8
II.2. 9)- Les nanoplateformes de carbone.....	9
II.2.10)- Les nanoparticules de silice.....	10
III)- La vectorisations des médicaments.....	10
III.1) 1 ^{ère} génération de vecteurs.....	11
III.2) 2 ^{ème} génération de vecteurs.....	11
III.3) 3 ^{ème} génération de vecteurs.....	12

IV)- Vers une nanoparticule idéale. : le tout en un.....	13
V)-Intérêts des nanoparticules pour la médecine.....	15
VI)- Méthodes de synthèse des nanoparticules d'or.....	16
VI.1)- La voie physique.....	16
VI.2)- La voie chimique	16
VI.2.1)- Synthèse de nanoparticules d'or en solution aqueuse	17
VI.2.2)- Synthèse de nanoparticules d'or en milieu organique	18
VII)- Stabilisation des nanoparticules d'or contre l'agrégation	19
VII.1)- Mécanismes de stabilisation des nanoparticules d'or	19
VII.1.1)- Stabilisation électrostatique.....	19
VII.1.2)- Stabilisation stérique.....	20
VII.1.3)- Stabilisation « électrostérique ».....	21
VIII)- Méthodes de caractérisation des nanoparticules métalliques.....	21
VIII.1)- Microscopie électronique en transmission (MET).....	21
VIII.2)- Spectroscopie Ultraviolet-visible (UV-vis).....	21
VIII.3)- Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF).....	22
VIII.4)- Diffraction des rayons X et autres spectroscopies utilisant des rayons X.....	23
VIII.5)- Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	23
IX)-Conclusion.....	24
- Références.....	25

Chapitre II : L'acide lipoïque : un antioxydant universel

I)-Définition du stress oxydant.....	29
I.1)- Les entités oxydant et leur production.....	29
I.2)- Les facteurs environnementaux comme source d'entités oxydantes.....	31
II)- les antioxydantes.....	31
II.1)- Définition.....	31
II.2)-Les systèmes de défenses antioxydants.....	31
III)- Les systèmes antioxydants non enzymatiques et leurs effets.....	32
III.1)-Le glutathion (GSH)	33
III.2)-La vitamineE (α -tocophérol)	33
III.3)-La vitamine C (acide L-ascorbique)	34
III.4)- Les caroténoïdes.....	34
III.5)- Les flavonoïdes.....	35
III.6)-L'acid α -lipoïque (LA)	36
III.6.1).Fonction, propriétés physiques et chimiques de LA.....	36
III.6.2) Propriétés pharmacologiques de LA.....	38
III.6.3)-Pharmacomodulation de l'acide lipoïque.....	38
III.6.4)-Synthèse de plateformes nanoparticulaires à base d'acide lipoïque.....	40
IV)-Conclusion.....	43
- Références.....	44

Chapitre III : Résultats et Discussion

I)-Introduction	47
II)-Objectifs du travail	47
III)-Choix des nanoparticules	47
IV)-Choix de l'agent stabilisant	48
V)- Choix de la méthode de synthèse des nanoparticules d'or	49
1)- Matériels et solvant utilisés.....	50
2)- Mode opératoire	50
A-Préparation des nanoparticules d'or enrobée de citrate de sodium	50
B-Préparation des nanoparticules d'or enrobée d'acide lipoïque.....	51
VI)-Optimisation des conditions opératoires	52
VII)-Stabilité et réactivité des nanoparticules d'or	52
VIII)-Caractérisation physico-chimique des nanoparticules d'or obtenues	53
-Séparation centrifuge des nanoparticules obtenues	54
VIII.a)-Caractérisation par spectroscopie UV-Vis (ultraviolet-visible)	55
1-Principe de la spectroscopie UV - Visible	55
2-Appareillage et Fonctionnement	56
VIII h)-Caractérisation par spectroscopie infrarouge (FT-IR).....	60
1-Appareillage et Fonctionnement	60
2-Principe de la spectroscopie IR.....	60
3-Préparation de l'échantillon	62

XI)-Conclusion	67
Référence	67
Motivation	71
Conclusion Générale	72

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Gamme de tailles des nanostructures comparée à celles des principaux objets connus.....	4
2	Représentation schématique des principaux nano objets utilisés en recherche biomédicale	4
3	Evolution des nanoparticules: (a) 1 ^{ère} génération de vecteurs, (b) 2 ^{ème} génération de vecteurs et (c) 3 ^{ème} génération de vecteurs.....	13
4	Image de fluorescence in vivo d'une souris nude porteuse d'une tumeur après injection IV d'une substance fluorescente à base de [Gd3+].....	13
5	(a) Clichés de microscopie électronique à transmission des particules de 15 nm, 22 nm et 34 nm (de gauche à droite, barres d'échelle 20 nm). (b) Distribution en taille des différents échantillons. (c) Spectres UV-visible.....	22
6	Déséquilibre entre les molécules pro-oxydantes et les systèmes de défense antioxydant lors du stress oxydant..... Les	29
7	différentes enzymes, protéines et petites molécules non protéiques impliquées dans la lutte contre le stress oxydant.....	32
8	Formule semi-développée du glutathion réduit(GSH).....	33
9	Structure de la vitamine E.....	34
10	Structure de l'acide ascorbique (ou vitamine C).....	34
11	Structures de différents caroténoïdes	35
12	Structures de base des quatre familles des flavonoïdes	36
13	Structure de LA et du DHLA.....	37
14	Les deux énantiomères R et S de l' α -acide lipoïque.....	37
15	Nouvelles structures d'esters obtenues par couplage de l'acide lipoïque avec des phénols.....	39
16	Nouveaux esters hydrosolubles obtenus par pégylation de l'acide lipoïque.....	39
17	Structures de molécules anticancéreuses dérivées de l'acide lipoïque...	40

18	Structures des chromans analogues de l'acide lipoïque douées de propriétés antioxydantes et Antiarrhythmiques.....	40
19	Structures moléculaires de l'acide α -lipoïque (I) et l'acide dihydrolipoïque (DHLA) (II).....	48
20	Formation des nanoparticules d'or stabilisées par les citrates et l'acide dihydrolipoïque à partir d'une solution d'acide chloroaurique.....	51
21	Micrographies de microscopie électronique en transmission (MET) de nanoparticules d'or obtenues. La barre d'échelle représente 50 nm pour toutes les images.....	54
22	Histogrammes de distribution de taille (c') et (d') correspondants respectivement aux images(c) et (d) représentées sur la figure21.....	54
23	Centrifugeuse utilisée pour la séparation et la purification des nanoparticules obtenues.....	55
24	Image de l'équipement UV-Vis utilisé dans cette étude.....	57
25	Spectres UV-visible en solutions de nanoparticules d'or stabilisées par les citrates.....	58
26	Spectres UV-visible en solutions de nanoparticules d'or stabilisées par les l'acide dihydrolipoïque	58
27	Spectres UV-visible de nanoparticules d'or stabilisées par les citrates(en turquois) et l'acide lipoïque(en mauve) montrant un effet bathochrome.....	59
	Image des instruments FT-IR utilisé dans cette étude.....	60
28	Spectre(IR) de l'acide lipoïque.....	63
29	Spectre(IR) de nanoparticules d'or stabilisées par les citrates.....	63
30	Spectre (IR) de nanoparticules d'or stabilisées par l'acide	
31	dihydrolipoïque.....	64
32	Spectres (IR) de l'acide lipoïque(en mauve) et des nanoparticules d'or stabilisés par les citrates(en noir) et l'acide dihydrolipoïque(en bleu) superposés en mode décalé.....	66
33	Nanoparticules d'or enrobées d'acide lipoïque (LA).....	71

18	Structures des chromans analogues de l'acide lipoïque douées de propriétés antioxydantes et Antiarrhythmiques.....	40
19	Structures moléculaires de l'acide α -lipoïque (I) et l'acide dihydrolipoïque (DHHLA) (II).....	48
20	Formation des nanoparticules d'or stabilisées par les citrates et l'acide dihydrolipoïque à partir d'une solution d'acide chloroaurique.....	51
21	Micrographies de microscopie électronique en transmission (MET) de nanoparticules d'or obtenues. La barre d'échelle représente 50 nm pour toutes les images.....	54
22	Histogrammes de distribution de taille (c') et (d') correspondants respectivement aux images(c) et (d) représentées sur la figure21.....	54
23	Centrifugeuse utilisée pour la séparation et la purification des nanoparticules obtenues.....	55
24	Image de l'équipement UV-Vis utilisé dans cette étude.....	57
25	Spectres UV-visible en solutions de nanoparticules d'or stabilisées par les citrates.....	58
26	Spectres UV-visible en solutions de nanoparticules d'or stabilisées par les l'acide dihydrolipoïque	58
27	Spectres UV-visible de nanoparticules d'or stabilisées par les citrates(en turquoise) et l'acide lipoïque(en mauve) montrant un effet bathochrome.....	59
	Image des instruments FT-IR utilisé dans cette étude.....	60
28	Spectre(IR) de l'acide lipoïque.....	63
29	Spectre(IR) de nanoparticules d'or stabilisées par les citrates.....	63
30	Spectre (IR) de nanoparticules d'or stabilisées par l'acide	
31	dihydrolipoïque.....	64
32	Spectres (IR) de l'acide lipoïque(en mauve) et des nanoparticules d'or stabilisées par les citrates(en noir) et l'acide dihydrolipoïque(en bleu) superposés en mode décalé.....	66
33	Nanoparticules d'or enrobées d'acide lipoïque (LA).....	71

Liste des abréviations

Symbole	Signification
ATP	Adénosine triphosphate
AuNPs	Nanoparticules d'or
CCD	Charge coupled device
CTAB	Bromure de cétyltriméthylammonium
DHLA	Acide dihydrolipoïque
DLVO	Théorie de Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
EXAFS	Extended X-ray absorption fine structure
FT-IR	Fourier transformer
GSH	Glutathion
HR-MAS	High-Resolution-Magic Angle Spinning NMR
IR	Spectroscopie infrarouge
IRM	Image par Résonance Magnétique
IRTF	Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier
LA	Acide α -Lipoïque
MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie électronique en transmission
MSA	Acide mercaptosuccinique
MWCNT	Multi Wall Carbone NanoTube
ND	Nanodiamants
NPs	Nanoparticules
NTC	Nanotubes de carbone
PEG	Polyéthylène glycol
PGA	Poly (acide glycolique)
PLA	Poly (acide lactique)
PLGA	Poly(lactide-co-glycolide)
QDs	Quantum dots
RCS	Entités halogénées réactives
RNS	Entités nitrées réactives
ROS	Entités oxygénées réactives

RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMN ¹³ C	Résonance magnétique nucléaire du carbone-13
SPIO	Super Paramagnetic Iron Oxide
SWCNT	Single Wall Carbone NanoTube
TOAB	Bromure de tétraoctylammonium
UV-vis	Spectroscopie Ultraviolet-visible
XANES	X-ray absorption near edge structure
XPS	X-ray photoelectron

Liste des schémas

N°	Titre	page
1	Chronologie des débuts de la nanomédecine au stade clinique (liste non exhaustive).....	5
2	Nanoparticule idéale et ses caractéristiques bio-physico-chimiques.....	14
3	Une illustration de la façon dont "tout-en-un" nano-systèmes peuvent être utilisés dans le corps humain pour le diagnostic et traitement du cancer...	15
4	Synthèse de nanoparticules d'or par la voie citrate/acide tannique.....	17
5	synthèse de nanoparticules d'or par la voie NaBH ₄	18
6	Stabilisation électrostatique de nanoparticules métalliques.....	20
7	Stabilisation stérique de nanoparticules métalliques.....	20
8	Structure chimique de l'acide α -lipoïque(LA) et sa forme réduite acide dihydrolipoïque(DHLA).....	37
9	Synthèse par voie NaBH ₄ de nanoparticules d'or enrobées par des arylsulfonamides inhibiteurs de l'anhydrase carbonique (XI).....	41
10	Stratégie de synthèse pour la fonctionnalisation des nanoparticules d'or enrobées d'acide lipoïque avec le complexe amino-nitrilo-triacetic-Co(II) (ANTA Co ⁺²) pour une immobilisation spécifiques d'enzymes.....	42
11	représentation schématique des nanoparticules d'or stabilisées par les citrates (1 ^{ère} étape) et enrobées d'acide dihydrolipoïque (2 ^{ème} étape).....	50
12	Fonctionnalisation de la surface des NP d'or stabilisées par l'acide dihydrolipoïque par le glutathion(GSH):une molécule active à visée Antioxydante.....	53
13	Représentations schématiques de spectrophotomètres de type double faisceau.....	56
14	Représentations schématiques de principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre IR.....	61

Liste des tableaux

N°	Titre	page
1	Principales entités oxydantes présentes dans les cellules vivantes. On distingue trois familles: les entités oxygénées (ROS), nitrées (RNS) ou halogénées (RCS) réactives qui peuvent exister sous forme radicalaire ou non radicalaire.....	30
2	principales bandes d'absorption dans l'acide lipoïque, les nanoparticules d'or stabilisées par les citrates et les celles enrobées de DIILA.....	65

Introduction générale

Introduction

L'intérêt pour les matériaux de taille nanométrique n'a cessé de croître ces vingt dernières années. Cette caractéristique dimensionnelle confère à ces matériaux des propriétés ou des comportements particuliers, utilisés notamment pour de nouvelles applications technologiques. En effet, les nanoparticules (NPs) possèdent des propriétés magnétiques, optiques, électroniques, catalytiques et biologiques uniques, différentes de celles du matériau massif ou de la molécule, liées à leur taille et à leur forme. Leur champ d'application est par conséquent très vaste.

Les propriétés des nanomatériaux varient notamment selon leur composition chimique, leur taille, leur surface spécifique, l'état de surface, ou encore la forme du nano-objet considéré. De plus, chaque nanomatériau peut être doté d'une réactivité ou d'un comportement différent selon la formulation et la matrice du produit fini qui le contient.

Désormais, les nanomatériaux ne sont plus seulement confinés dans les laboratoires de recherche, mais sont aujourd'hui intégrés dans de nombreux procédés industriels et participent à la composition d'une grande variété de produits ou systèmes utilisés dans la vie courante (crèmes solaires, textiles, aliments, domaine des transports, médicaments, etc.).

Ces nanomatériaux sont présents dans des secteurs aussi variés que le bâtiment, l'automobile, l'emballage, la chimie, l'environnement, l'électronique, le stockage et la production de l'énergie ou la santé.

Il existe une grande variété de nanomatériaux (métaux, oxydes métalliques, silicium, carbone,...).

Parmi ces nanomatériaux, les nanoparticules d'or (AuNPs) sont les plus anciennes, elles sont utilisées depuis longtemps avant même la définition du terme "nano". Un exemple célèbre est la coupe de Lycurgue d'époque romaine, qui possède des propriétés optiques particulières (éclairée de l'intérieur, elle apparaît verte ; éclairée de l'extérieur, elle apparaît rouge) dues à la présence des nanoparticules d'or.

Les nanoparticules d'or ont suscité de tout temps beaucoup d'intérêt et de curiosité, et les recherches dans cet axe se sont considérablement accélérées durant ces dernières années en raison de leurs applications en optique (liées à leur absorption plasmonique), en catalyse et en nanomédecine (vectorisation d'agents thérapeutiques).

Les (AuNPs) représentent en effet des outils parfaitement adaptés non seulement par leur synthèse aisée mais aussi par leurs grandes capacités de fonctionnalisation (voire de multi-fonctionnalisation) en surface, par greffage de molécules soufrées ou aminées, de molécules biologiques, anticorps,...etc.

L'utilisation des NPs dans le domaine biomédical exige notamment une solubilité élevée et une excellente stabilité en conditions physiologiques.

Cependant les (AuNPs) en solution ont tendance à s'agréger et à précipiter, du fait des interactions de type Van der Waals qui existent entre elles.

Différentes stratégies ont été employées ces dernières années afin d'améliorer leur stabilité. Parmi celles-ci, figure la formation de liaisons covalentes entre les (AuNPs) et des composés porteurs d'une ou plusieurs fonctions thiols.

Donc pour empêcher l'agglomération des nanoparticules, la présence d'un agent stabilisant localisé à leur surface est nécessaire. De plus, l'utilisation de produits non toxiques, de solvants bénins pour l'environnement, et de matériel recyclable reste à développer.

Dans ce contexte, nous avons à travers notre travail cherché à développer une nouvelle stratégie de stabilisation de nanoparticules d'or(AuNPs) dans l'eau, et d'étudier les meilleures conditions de leurs stabilisation par l'emploi d'un dithiol, plus précisément l'acide lipoiqee (LA):un antioxydant universel et un agent thérapeutique d'avenir, et ce dans le but de synthétiser une plateforme nanoparticulaire servant à des fonctionnalisations variées. Notre mémoire renferme trois chapitres:

Le premier chapitre de ce mémoire est consacré à une mise au point bibliographique sur les nanomatériaux en particulier les nanoparticules d'or, leurs propriétés, leurs stratégies de synthèse ainsi que leurs différents domaines d'applications.

Le second chapitre donne un aperçu général sur le stress oxydant et son implication dans plusieurs pathologies et l'utilisation de l'acide lipoiqee et ses analogues de synthèse en tant qu'antioxydant efficace.

Le troisième chapitre nommé résultats et discussion résume les faits marquants de nos travaux expérimentaux.

Enfin vient une conclusion générale qui achève ce travail.

Chapitre (I)

Vectorisation par les Nanoparticules D'or

VECTORISATION PAR LES NANOPARTICULES D'OR

I)-Nanotechnologie et nanomatériaux :

Par « nanotechnologies », on entend la maîtrise et la manipulation de la matière aux échelles moléculaire et atomique. Mettant à profit les progrès réalisés dans des disciplines telles que la physique, la chimie, la biologie, l'électronique et l'informatique, L'étude et l'utilisation de matériaux nanostructurés connaissent un essor considérable en raison de leurs propriétés particulières par rapport aux matériaux massifs. Toutes les grandes familles de matériaux sont concernées: métaux, céramiques, diélectriques, oxydes magnétiques, charpentes silicatées, carbones, polymères,..... etc [1].

Du fait de leur taille, les nanomatériaux présentent des caractéristiques différentes de l'échelle macroscopique. En effet, lorsque la taille d'une particule diminue, le nombre de particules par gramme croît considérablement : ce nombre est multiplié par 1.000.000 lorsque le diamètre d'une particule évolue de 100 nm à 1 nm. Parallèlement, à quantité de matière équivalente (soit un gramme de matière présentant une densité de 10 g/cm³), la surface particules/environnement est multipliée par un facteur 100. D'autre part, la diminution du diamètre des particules conduit à une augmentation de la proportion d'atomes présents en surface (5 % des atomes d'une particule de 30 nm sont en surface, contre 20 % pour une particule de 10nm et 50 % pour une particule de 3 nm) [2].

Une masse donnée de nanomatériaux sous forme de nanoparticules sera donc plus réactive que la même masse constituée de particules de plus grande dimension.

Les structures nanométriques permettent alors d'obtenir de nouveaux matériaux présentant des propriétés mécaniques, électriques, magnétiques, optiques et catalytiques particulières ou des combinaisons de propriétés originales, différentes parfois des propriétés du même matériau à une échelle différente [3].

II)- Définition des nanoparticules

En octobre 2011, la commission de l'union européenne a défini un nanomatériau comme « un matériau dont les constituants principaux ont des dimensions comprises entre 1 et 100 nm ». Une NP est alors un assemblage d'atomes, formant un objet dont au moins une dimension est comprise entre 1 et 100 nm.

La figure 1 compare les nanostructures avec les objets connus dans la vie quotidienne.

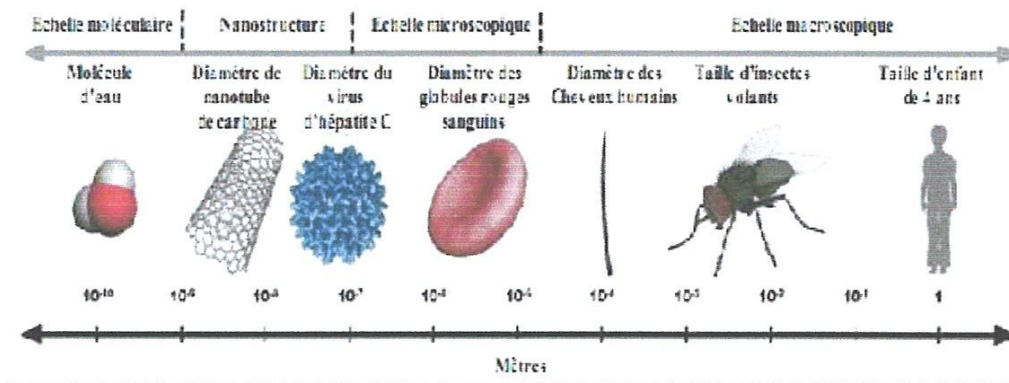


Figure 1: Gamme de tailles des nanostructures comparée à celles des principaux objets connus [4]

II.1)- Les Différentes Nanoparticules :

Il existe une grande variété de NPs allant des particules d'or aux liposomes, en passant par les NPs polymériques. Si le choix du cœur des particules est primordial en ce qui concerne la protection et l'éventuel relargage des agents d'intérêt, le contrôle de la surface l'est tout autant. Ce sont en effet ses propriétés de surface qui permettront à la particule de véhiculer les agents thérapeutiques ou de diagnostic vers la zone ciblée [5]. Le cœur de ces NPs est généralement composé d'assemblages organiques ou inorganiques des compositions et des structures très diverses, comme l'illustre la Figure 2.

La Chronologie de l'application de certaines nanoparticules en médecine au stade des essais cliniques sont présentées sur la schéma 1.

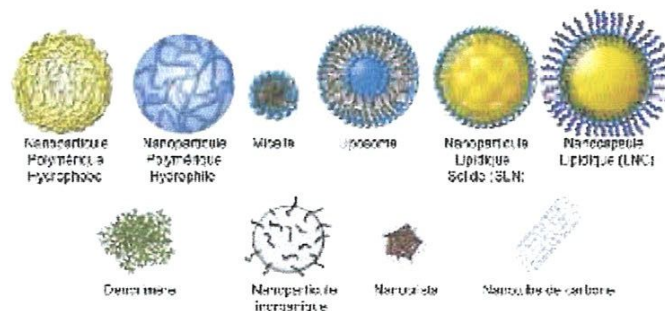


Figure 2 : Représentation schématique des principaux nano objets utilisés en recherche biomédicale [6].

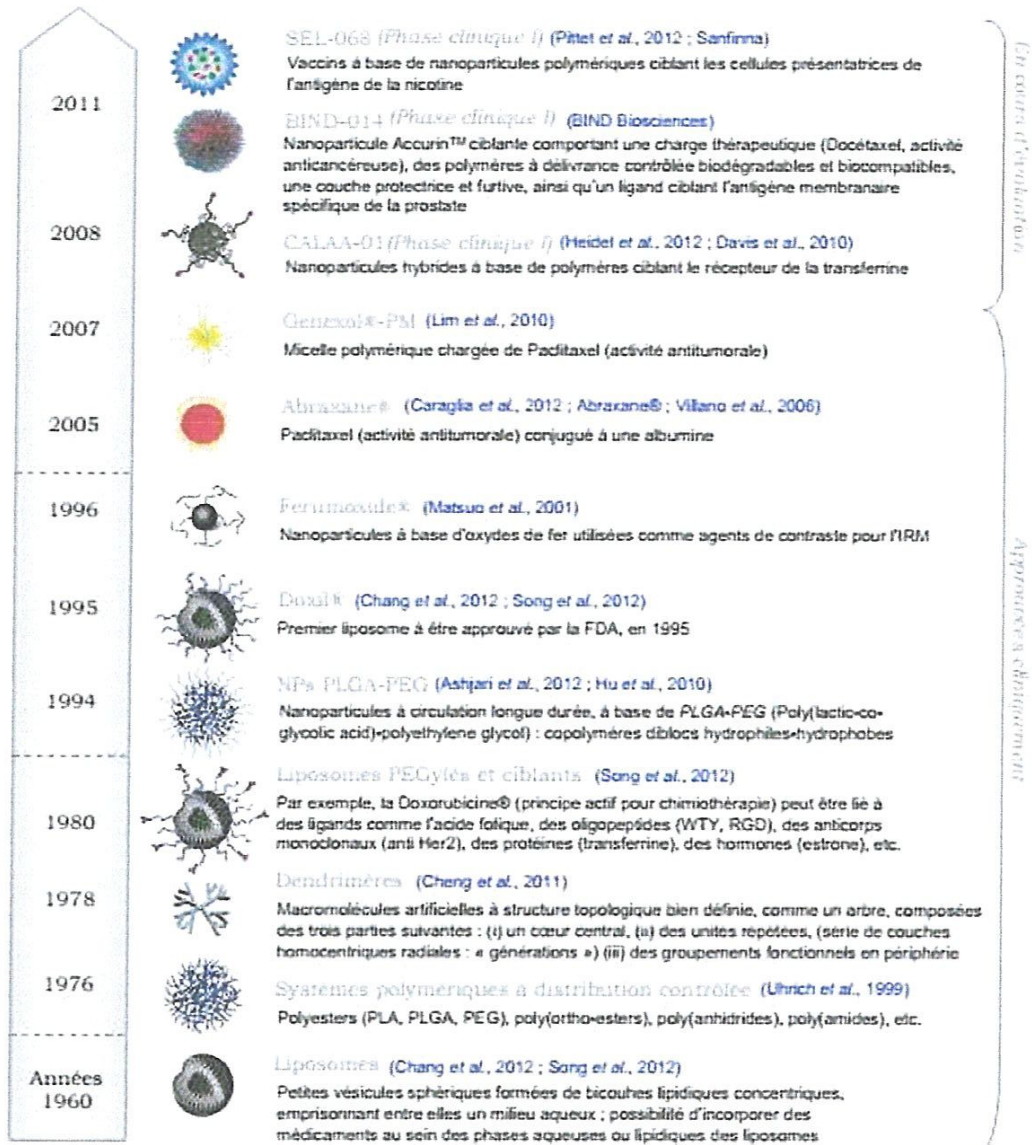


Schéma 1: Chronologie des débuts de la nanomédecine au stade clinique (liste non exhaustive).

II.2.1)- Les nanoparticules d'or (AuNPs) :

L'avancée rapide des nanotechnologies observée durant cette dernière décennie a permis le développement de différents types de AuNPs fonctionnalisées pour des applications en thérapie photo-thermique, imagerie moléculaire, bio-détection et en thérapie génétique [7]. Les propriétés : optique et photo-thermique de ces NPs dépendent de

leur taille en raison de l'oscillation collective des électrons de surface. [8]. L'intensité d'absorption et de diffusion des AuNPs est significativement plus élevée que celle de la plupart des colorants absorbants et diffusants organiques, ce qui les rend excellentes comme candidates d'agent de contraste en imagerie. Les interactions électron-phonon et phonon-phonon dans ces nanoparticules génèrent de la chaleur après une exposition dans le proche infrarouge (650-900 nm) [9].

Les nanobilles, nanocapsules et nanobâtonnets d'or, synthétisés en utilisant une grande variété de réactifs par des méthodes de synthèse chimiques et électrochimiques [10]; absorbent dans la région NIR. Ces NPs couplées à l'imagerie ont été largement utilisées pour la destruction thermique des tumeurs [11].

II.2.2)-Les liposomes :

Les liposomes ont été utilisés comme vecteurs de médicaments depuis 1965. Ce sont des vésicules sphériques de quelques dizaines à quelques milliers de nm de diamètre. Ces vésicules sont composées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques qui permettent de séparer un milieu intra-vésiculaire d'un milieu extérieur. Ces particules sont depuis de nombreuses années utilisées comme outils pour la biologie, la biochimie, la médecine ainsi que par l'industrie des cosmétiques en tant que transporteurs de principes actifs thérapeutiques ou d'agents d'imagerie. Leur caractère non toxique et biocompatible fait de ces colloïdes des systèmes intéressants pour les applications in vivo.

Cependant, les liposomes présentent également quelques limitations: ils ont effectivement montré une faible capacité d'encapsulation (notamment pour les molécules lipophiles piégées dans la double couche de phospholipides), une stabilité modérée, une production délicate, et un relargage précoce des principes actifs hydrophiles dans le sang. Les niosomes sont des ensembles supramoléculaires similaires aux liposomes, à la différence que les molécules constituant la double couche ne sont pas des phospholipides mais des surfactants de synthèse (lipides non ioniques). C'est également le cas des polymersomes, pour lesquels des copolymères bloc (comportant une partie hydrophile et une partie hydrophobe) forment la structure emprisonnant le réservoir aqueux [12].

II.2.3)- Les polymères organiques :

Les NPs de polymères, sont synthétisées par des méthodes de polymérisation/polycondensation de polymères biodégradables. Les polymères les plus couramment utilisés sont : le poly(acide lactique) (PLA), poly(acide glycolique) (PGA),

poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), le chitosane, le poly-epsilon-caprolactone. Ils sont utilisés dans l'industrie alimentaire ou encore dans le domaine de la chirurgie (fils de suture..). Les polymères peuvent être également naturels, à base d'albumine ou de gélatine[13]. Ils peuvent se présenter soit sous la forme de nanosphères constituées de matrice de polymère dans laquelle le principe actif peut être dispersé ou dissous, soit sous la forme de nanocapsules comportant un réservoir dans lequel le principe actif est protégé par une mince paroi de polymère de quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur. Leur taille est généralement inférieure à 300 nm. Du polyéthylène glycol (PEG) peut être greffé à leur surface, ils sont souvent utilisés dans le traitement du cancer.

II.2.4)-Les nanoparticules lipidiques :

Les NPs lipidiques ont une place de choix dans leur utilisation comme nanovecteurs de principes actifs[14] En effet, les lipides rentrent dans la composition de la membrane plasmique. Ils sont également synthétisables par émulsion et peuvent se présenter sous la forme de nanocapsules ou nanosphères. Dans les deux cas, ils peuvent présenter un cœur aqueux ou huileux, ce qui leur permet de transporter des principes actifs de propriétés physico-chimiques variées (hydrophiles, hydrophobes ou encore amphiphiles). De la même manière que pour les liposomes, à leur surface, des agents dispersants (de type PEG par exemple) et des ligands (anticorps, peptides, acide folique...) peuvent être greffés pour acquérir respectivement un caractère « furtif » et un ciblage spécifique vers les cellules cibles[15].

II.2.5)-Les nano-émulsions :

Les nano-émulsions sont obtenues par dispersion d'un mélange de phases huile/eau. Les gouttelettes de phases dispersées sont transparentes ou translucides et de taille nanométrique (20-200 nm). Elles sont stabilisées par un film à surface active composé de surfactant ou de co-surfactant [16].

Les nano-émulsions sont beaucoup utilisées en formulations pharmaceutiques car elles se forment spontanément (facile à préparer), sont optiquement transparentes, et thermodynamiquement stables. Grâce à leur petite taille, elles permettent d'éviter le crémage ou la sédimentation qui peut avoir lieu lors du stockage ou coalescence des gouttelettes.

II.2.6)- Les micelles :

Les nano-émulsions et les phases micellaires peuvent apparaître similaires du point de vue composition et taille structurale, mais il convient de noter que les phases micellaires se forment par auto-assemblage thermodynamique alors que les nano-émulsions ne se forment pas spontanément. En effet, dans le cas des nano-émulsions, la formation de gouttelettes nécessite l'application d'un cisaillement externe. La structure des micelles est du type cœur-coquille (« core-shell » en anglais) en milieu aqueux. Les micelles se forment lorsque la concentration en surfactants dans le milieu dépasse une valeur seuil nommée concentration micellaire critique. Les micelles sont donc des systèmes supramoléculaires qui sont en équilibre avec les molécules amphiphiles en solution. Selon le surfactant utilisé, on distingue différents types : micelles à base de phospholipides ou de surfactants pégylés, micelles à base de copolymères (pluronic, (L) acide polyaminés, polyesters). Les micelles polymériques sont fortement stables *in vitro* et *in vivo*, biocompatibles et ont fait récemment l'objet de quelques essais cliniques .

II.2.7)-Les quantum dots (QDs) :

Les « quantum dots » (QDs) sont des nano-cristaux colloïdaux semi-conducteurs de taille allant de 2 à 8 nm[17]. Les QDs sont dotés de propriétés électroniques et optiques uniques de par leur taille et leur composition.

Ils peuvent être administrés par injection, excitables *in vivo* à des longueurs d'onde variant avec le milieu chimique local et sont détectables grâce à leur fluorescence par une caméra CCD (charge coupled device) [18].

Leur surface peut être modifiée pour améliorer leur solubilité, sensibilité, spécificité et leur visualisation en ciblage tissulaire. Ces QDs révèlent néanmoins des inconvénients : leur luminescence est « aléatoire », elle disparaît et réapparaît. On parle de phénomène de scintillement ou « photobleaching » en anglais. De plus, la durée de vie de luminescence est faible de l'ordre de 20 ns, ce qui n'est pas adapté pour des observations de longue durée [19]. Les études préliminaires révèlent qu'ils sont toxiques à cause de la présence d'éléments toxiques qui rentrent dans leur composition (Cd, ...). Enfin, les modes d'élimination naturelle de ces composés demeurent méconnus.

II.2. 8)-Les nanoparticules d'oxyde de fer :

Les NPs d'oxyde de fer superparamagnétiques désignées par le terme SPIO (Super Paramagnetic Iron Oxide) possèdent des propriétés magnétiques uniques qui font

d'elles des matériaux avancés candidats pour la biomédecine. Elles peuvent servir d'agents de contraste pour l'IRM, de « points chauds » locaux capables de tuer les cellules malignes et de transporteurs colloïdaux lors de la vectorisation de médicaments ou du diagnostic. La propriété des SPIOs provient du fort moment magnétique qu'ils acquièrent en présence d'un champ magnétique externe. Leur moment magnétique élevé engendre un fort contraste en imagerie IRM. En plus de posséder d'excellentes propriétés magnétiques, les SPIOs sont biocompatibles et biodégradables ; donc non toxiques. Au cours de la dégradation, les ions Fe libres n'augmentent pas sensiblement la teneur en fer contenu dans le corps et s'incorporent naturellement dans l'hémoglobine. Ils sont alors dégradés par des voies normales de recyclage du fer. Les SPIOs sont généralement synthétisés par co-précipitation de suspensions alcalines de $\text{Fe}(\text{OH})_2$ et $\text{Fe}(\text{OH})_3$. La taille des particules peut varier entre quelques nanomètres et plusieurs centaines nanomètres de diamètre. Pour accroître leur stabilité, leur demi-vie de circulation et leur biocompatibilité, diverses méthodes ont été utilisées pour fonctionnaliser les NPs de SPIO avec un revêtement de polymères inertes, comme le dextran, des polysaccharides, le polyéthylène glycol (PEG) et l'oxyde de polyéthylène (PEO).

II.2. 9)-Les nanoplateformes de carbone :

On distingue principalement les fullerènes, les nanotubes de carbone (NTC) et les nanodiamants. Les fullerènes sont une famille de composés du carbone dont l'existence a été prédite en 1970 et officiellement prouvée en 1985[20].

La forme la plus connue est le fullerène C_{60} . Les fullerènes peuvent prendre une forme géométrique rappelant celle d'une sphère, d'un ellipsoïde, d'un tube ou d'un anneau. Grâce à leurs caractéristiques physiques, chimiques, propriétés électriques et optiques, les fullerènes et leurs dérivés sont incorporés dans des nouveaux dispositifs ou matériaux[21]. Les fullerènes peuvent jouer le rôle de radio-protecteur. En effet, ils permettent la protection contre les dommages causés par irradiation aux rayons X *in vitro* et *in vivo* chez la souris, en réduisant la formation d'espèces réactives de l'oxygène[22].

Des études se poursuivent sur l'augmentation de la solubilité des fullerènes et leur toxicité. Les nanotubes de carbone (NTC) sont des feuilles de graphène cylindriques. Les NTC peuvent être utilisés pour l'ablation des cellules cancéreuses par hyperthermie en raison de leur forte absorption optique dans la région du NIR, ainsi que pour la vectorisation de médicaments vers les cellules cancéreuses en raison de leur grande surface spécifique. On distingue : les NTC mono paroi désignés par le terme SWCNT (Single Wall Carbone

Nano Tube) dont le diamètre est compris entre 1 et 3 nm et la longueur comprise entre 5 et 30 nm, des NTC multi parois désignés par le terme MWCNT (Multi Wall Carbone Nano Tube) de diamètre compris entre 10 et 150 nm et de longueur allant de 200 nm à quelques micromètres[23]. Les Nanodiamants (ND) sont des agents très intéressants pour des applications en biologie et en médecine en raison de leur plus grande biocompatibilité par rapport à d'autres nanomatériaux de carbone, leur photo-stabilité, la facilité de purification, la disponibilité commerciale et de leur faible cytotoxicité. Ils peuvent être fonctionnalisés et conjugués à une grande variété de molécules pour le marquage cellulaire et la vectorisation de médicaments, ce qui leur confère un potentiel important d'applications thérapeutiques et de diagnostic.

II.2.10)-Les nanoparticules de silice :

Les autres types de NPs qui sont en cours de développement sont les nanoparticules de silice. Les NPs de SiO₂ sont synthétisées par le procédé sol-gel [24]. Leur taille est généralement inférieure à 50 nm. Celles-ci sont rendues luminescentes en incorporant dans leur matrice des terres rares, typiquement de l'euporium trivalent (Eu³⁺). En effet l'ion Eu³⁺ introduit dans une matrice minérale, possède une luminescence stable dans le temps. Elles sont facilement modifiables, chimiquement et biologiquement par des agents détecteurs. Elles sont généralement utilisées en imagerie par fluorescence et comme agent vecteur de médicaments et de gènes [25].

III)-La vectorisations des médicaments :

La plupart des pathologies sont traitées grâce à l'utilisation de médicaments. Certains de ces médicaments sont composés de molécules chimiques alors que d'autres sont constitués de molécules biologiques. Cependant, l'utilisation des médicaments génère souvent certains effets secondaires. L'amélioration des systèmes d'administration et plus particulièrement l'injection directe des médicaments est une procédure qui cherche à être améliorée par l'industrie pharmaceutique et les patients. L'encapsulation des médicaments dans des transporteurs est une possibilité qui a été étudiée durant cette dernière décennie [26].

Le concept de **vectorisation** a pour objet le « ciblage » de composés (traduit en anglais par **drug targeting**): il s'agit donc de permettre à ces composés d'atteindre une cible biologique, celle-ci pouvant être de nature diverse (un organe, une cellule, un compartiment subcellulaire, voire une molécule). L'objectif premier était à la fois de réduire les effets secondaires d'une

molécule active résultant de sa bio-distribution trop large et d'augmenter la concentration de cette molécule au sein de la cible.

III.1)- 1^{ère} génération de vecteurs :

Constituée de nanoparticules sphériques ou capsulaires, c'est la génération la plus connue et la plus accessible. L'intérêt de ces particules résidait dans leur capacité à éviter l'excrétion et l'élimination par le système rénal. En effet, l'élimination se fait principalement dans l'organisme par le rein disposant d'un système de fonctionnement basé sur la filtration à travers les pores de quelques nanomètres. Ainsi, lorsque des agents d'intérêt de faible poids moléculaire sont encapsulés au sein de vecteurs colloïdaux d'une dizaine de nanomètres, l'élimination par voie rénale devient impossible. En conséquence, l'effet de ces particules est prolongé. La taille des NPs doit toutefois être suffisamment petite pour qu'elles ne restent pas bloquées dans les plus petits vaisseaux sanguins. Bien que la taille des NPs leur permette d'éviter de nombreux pièges « géométriques » de l'organisme, elles peuvent être souvent phagocytées par les défenses immunitaires : les macrophages. Il convient alors d'éviter la phagocytose en trompant les défenses immunitaires pour atteindre la zone d'intérêt : on parle alors de furtivité [27].

III.2) - 2^{ème} génération de vecteurs :

Comme nous l'avons évoqué dans le cas de la 1^{ère} génération de vecteurs, les mécanismes naturels de métabolisation et d'élimination limitent grandement l'activité thérapeutique ou de diagnostic des médicaments ou des agents de contraste injectés. Non seulement l'élimination de la substance d'intérêt de la circulation sanguine diminue la dose qui va finalement atteindre les tissus ciblés, mais l'accumulation de cette même substance dans les organes d'élimination ou de séquestration (rein, foie, rate ...) peut également entraîner des effets secondaires toxiques au niveau de ces tissus. Dans le cas de l'utilisation d'agent de contraste, ces accumulations peuvent de plus masquer la zone d'intérêt, et donc perturber et fausser la détection. C'est pourquoi de nouvelles stratégies ont été développées afin d'augmenter la durée de vie des NPs dans le compartiment sanguin. Il s'agit de la modification chimique de la surface des nano-transporteurs. Nous pouvons distinguer les NPs PEGylées ou des NPs revêtues d'une couche de polymère hydrophile servant d'agent de furtivité. Le temps de séjour de ces NPs dans la circulation sanguine peut être suffisamment important pour relarguer lentement un agent thérapeutique dans le

sang, ou pour qu'il se produise une accumulation passive au sein des tissus[28]. Cependant certaines particules telles que les colloïdes furtifs restent longtemps dans le sang et finissent par être extravasées hors du compartiment sanguin. Ainsi, pour faciliter leur accumulation dans un tissu donné, il est indispensable de fonctionnaliser leur surface avec des ligands biologiques qui seront reconnus par les cellules composant le tissu d'intérêt. La 3^{ème} génération de vecteurs fut alors créée.

III.3) - 3^{ème} génération de vecteurs :

C'est la combinaison des NPs cœur « core » et une enveloppe « shell » à base de polymère dotée de ligands biologiques biosélectifs comme des anticorps, des peptides, des saccharides, des oligonucléotides ou d'autres molécules comme l'acide folique. L'ajout de ces ligands à la surface des nanoparticules favorise généralement leur capture par les macrophages[29]. C'est pourquoi il est important d'associer aux agents de ciblage des agents de furtivité afin de contrebalancer cet effet. La formation d'une barrière stérique risque toutefois de masquer les ligands et donc de rendre caduque le ciblage actif. La balance entre les deux effets est parfois difficile à régler. Par conséquent, les agents de ciblage sont éloignés du cœur de la NP par un bras espaceur (le plus souvent une chaîne polyoxyéthylène de manière à ce qu'ils évoluent à la surface de la couche de furtivité. L'utilisation des bras espaceurs est également avantageuse dans la mesure où elle offre à l'agent de ciblage une plus grande liberté de mouvement favorisant ainsi sa complexation avec la cible (récepteurs). En effet, il a été montré que le greffage de ligands directement à la surface d'une particule entraîne une diminution importante de la vitesse de complexation, la liberté de mouvement du ligand étant fortement réduite par l'inertie de la particule. La flexibilité du bras espaceur permet alors de redonner suffisamment de liberté de mouvement à l'agent de ciblage afin de maximiser les probabilités de rencontre entre le ligand et le récepteur dans la bonne conformation. La figure 3 illustre l'évolution de ces 3 générations de nanoparticules.

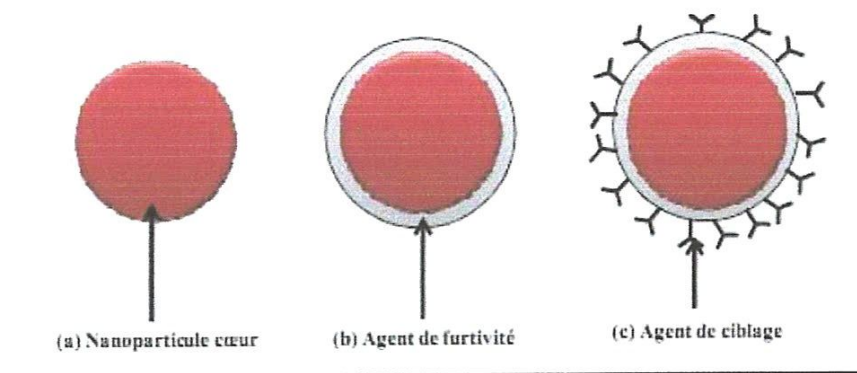


Figure 3: Evolution des nanoparticules: (a) 1^{ère} génération de vecteurs, (b) 2^{ème} génération de vecteurs et (c) 3^{ème} génération de vecteurs.

IV)- Vers une nanoparticule idéale: le "tout en un" :

Bien que les nanoparticules ciblantes soient entrées tardivement en phase clinique, leur potentiel en tant que nouvelle génération d'agents d'imagerie, de thérapie ou **théranostiques** reste immense. Ces nouveaux systèmes comprenant des ligands ciblant inoffensifs, efficaces et spécifiques, des matériaux biocompatibles et un choix approprié d'agents d'imagerie et/ou de thérapie, sont susceptibles de fournir des traitements plus efficaces pour un grand nombre de maladies humaines et plus particulièrement, le cancer [30].

La nanoparticule idéale répond à trois critères essentiels : (i) elle associe différentes modalités d'imagerie de manière à aboutir à un diagnostic plus précoce et plus précis, (ii) elle rend la thérapie plus efficace et (iii) elle permet de suivre l'évolution du traitement par ces mêmes modalités d'imagerie [31].

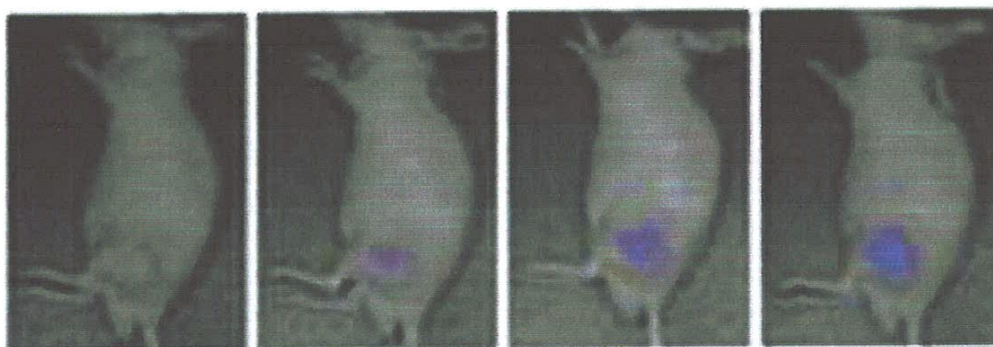


Figure 4: Image de fluorescence in vivo d'une souris nude porteuse d'une tumeur après injection IV d'une substance fluorescente à base de [Gd3+].

Le développement de nanoparticules à visée thérapeutique doit également prendre en considération les critères suivants :

l'utilisation de matériaux biocompatibles et biodégradables ou bio-éliminables, l'utilisation de méthodes de bio-conjugaison des vecteurs à la nanoparticule simples, efficaces et reproductibles avec un minimum d'étapes et de purification, l'optimisation des propriétés physicochimiques des nanoparticules (**Schéma 2**) pour atteindre une libération optimale, un temps de circulation long au sein de l'organisme, une biodistribution adaptée, ainsi qu'une accumulation dans les tissus cibles maximale et une exposition systémique faible, la validation de la stabilité et une durée de vie prévisible des nanoparticules in vivo, le développement de processus adaptables à grande échelle pour la fabrication des nanoparticules en grande quantité pour le développement clinique et la commercialisation. Les recherches dans le domaine des nanomédecines ciblantes sont nombreuses et ces efforts doivent être perpétués dans l'idée de les transposer du laboratoire au chevet du patient. [32].

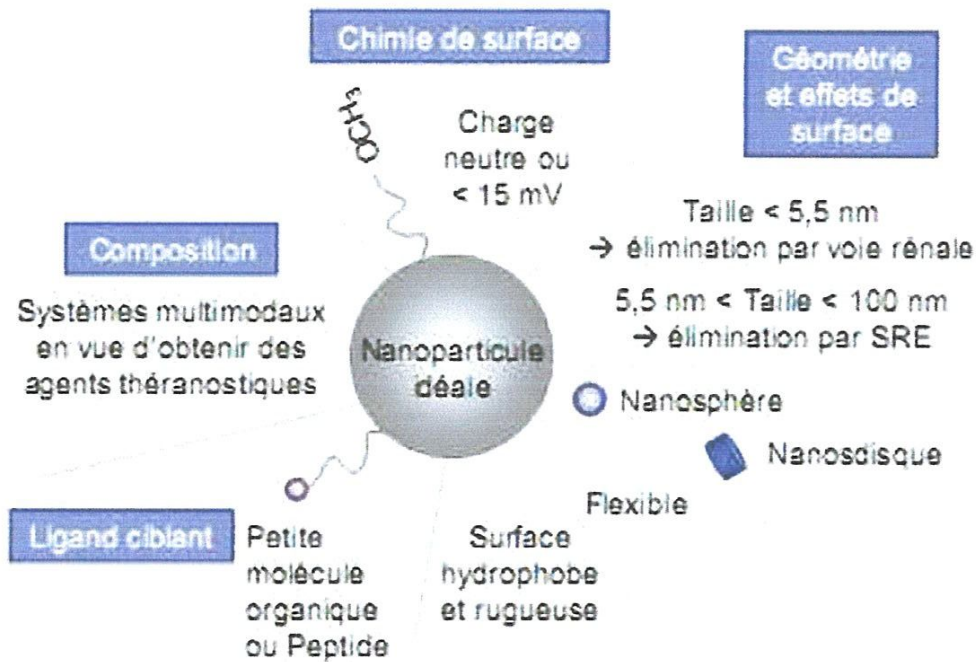


Schéma 2: Nanoparticule idéale et ses caractéristiques bio-physico-chimiques.

V)- Intérêts des nanoparticules pour la médecine :

L'utilisation des NPs en médecine : la nanomédecine est devenue un domaine très prometteur quant aux différents modes de délivrance des médicaments (« drug delivery » en anglais) et en particulier le développement de thérapies ciblées pour l'oncologie. Transporter des médicaments à l'aide de NPs présente plusieurs avantages tels que : La protection des médicaments contre les dégradations dans l'organisme avant d'atteindre leur cible. L'amélioration de l'absorption des médicaments dans les tumeurs et les cellules cancéreuses elles-mêmes. Le meilleur contrôle de la distribution des médicaments dans les tissus au cours du temps. L'absence d'interactions des médicaments avec les cellules saines, évitant ainsi les effets secondaires. Comme nous l'avons détaillé dans les paragraphes précédents, outre la délivrance des médicaments, les NPs peuvent être utilisées en radiothérapie, thérapie photodynamique et en diagnostic plus particulièrement en imagerie médicale.

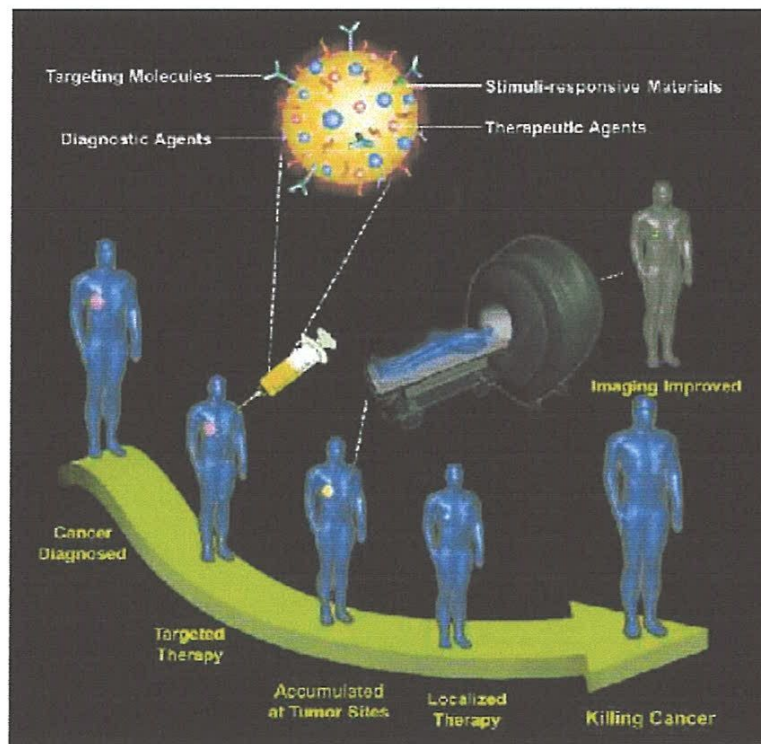


Schéma.3 : Une illustration de la façon dont "tout-en-un" nano-systèmes peuvent être utilisés dans le corps humain pour le diagnostic et traitement du cancer [33].

VI)-Méthodes de synthèse des nanoparticules d'or :

De nouvelles méthodes de synthèse des AuNPs ont été récemment introduites. Selon la méthode de synthèse utilisée, nous pouvons obtenir des AuNPs avec des tailles variant du nanomètre à quelques dizaines de nanomètres. De plus, les AuNPs peuvent être sous forme de sphères, de nano-tiges, de nano-cages, ou de nano-bâtonnets. Les méthodes de synthèse peuvent être divisées en deux approches principales : la synthèse par voie physique ou chimique [34].

VI.1)-La voie physique : de préparation dite « **top-down** » consiste à fragmenter l'or massif à l'aide de techniques mécaniques. Citons par exemple, l'ablation laser qui permet d'élaborer une large gamme de NPs. Néanmoins, l'approche « top-down » présente quelques inconvénients:

- 1°) La distribution de la taille est relativement large.
- 2°) L'absence de contrôle de la composition chimique des clusters [35]. Dans la suite, nous n'aborderons pas ces méthodes.

VI.2) - La voie chimique : d'association dénommée « **bottom-up** » est la fabrication de AuNPs via l'assemblage d'atomes. Cette méthode consiste à la réduction d'un précurseur d'or par des techniques de chimie douce comme la réduction chimique, sonochimique et électrochimique. Parmi ces dernières, la réduction chimique est de loin la méthode la plus utilisée pour la synthèse d'AuNPs. Elle permet un meilleur contrôle des caractéristiques des NPs, telles que leur taille, leur morphologie et leur distribution de taille [36].

Le principe général de la voie chimique consiste en la réduction d'un sel d'or de degré d'oxydation (+III) en or métallique (degré d'oxydation 0) dans un milieu aqueux ou biphasique en présence d'un agent stabilisant. De plus, cette synthèse subit deux étapes successives de nucléation et de croissance. La nucléation est la collision en solution avec des ions, atomes ou clusters afin de former un noyau tandis que la croissance correspond à l'ajout progressif d'atomes ou de groupes d'atomes sur le noyau déjà existant, donnant ainsi naissance à des agrégats de quelques nanomètres avec des formes sphériques (croissance isotrope) ou non sphériques (croissance anisotrope).

De nombreuses méthodes ont été développées et se différencient par la nature du réducteur et/ou de l'agent stabilisant. Seules les méthodes par réduction chimique les plus couramment utilisées seront abordées et divisées en deux groupes : la synthèse de AuNPs en milieu aqueux et la synthèse de NP d'or dans un solvant organique.

VI.2.1) - Synthèse de nanoparticules d'or en solution aqueuse :

La méthode de Faraday (1857) est encore couramment utilisée aujourd'hui, améliorée par les travaux de Turkevich et al. (1951) et de Frens (1973). Ces travaux consistent en la réduction par les **ions citrate** d'un sel d'or pour former des AuNPs de taille comprise entre 10 et 20 nm. L'ion citrate agit à la fois comme réducteur et agent stabilisant des particules formées, en s'adsorbant à la surface des NPs pour créer une couche chargée négativement. Ceci va introduire une répulsion électrostatique entre les particules empêchant leur agrégation et donc permettant leur stabilisation ; cette méthode ne demande recours à aucun autre stabilisant. L'ion citrate a donc une grande importance dans la formation de AuNPs, sa concentration et sa vitesse d'addition étant les paramètres clés de la synthèse [37]. De nos jours, plusieurs compagnies (SPI, Sigma-Aldrich, Meliorum Technologies, BB International, Ted Pella, etc...) commercialisent des AuNPs stabilisées par les ions citrate et présentant différentes tailles. Plus récemment, une évolution de cette méthode proposée par Brown et al. (1999) a permis d'obtenir des AuNPs plus petites, de l'ordre de 5 nm ; la réduction d' HAuCl_4 se fait par l'intermédiaire de tétraborohydrure de sodium (NaBH_4), en présence de citrate de sodium.

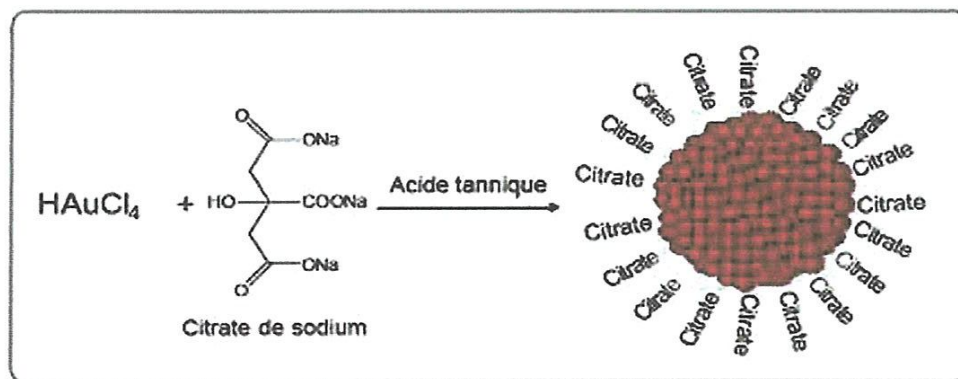


Schéma 4: Synthèse de nanoparticules d'or par la voie citrate/acide tannique.

Les AuNPs peuvent également être synthétisées dans un milieu aqueux par la réduction d'un sel d'or en présence d'autres molécules telles que la diméthylaminopyridine, l'acide mercaptosuccinique (MSA), des méthoxy-polyéthylène glycols (PEG) porteurs de groupements fonctionnels thiol, des peptides, des dendrimères, pour ne citer que quelques-uns. Toutes ces molécules présentent un groupement chimique

qui est capable de se lier à la surface métallique des NPs ainsi que de ralentir et de contrôler leur croissance. Contrairement aux AuNPs stabilisées par des ions citrate, les AuNPs stabilisées par ces molécules ont une gamme de taille très étroite et leur taille dépend directement de la molécule utilisée [38].

VI.2.2)- Synthèse de nanoparticules d'or en milieu organique :

En 1994, Brust et Schiffrin ont mis au point une méthode de synthèse des AuNPs non plus en solution aqueuse mais en milieu organique à base de toluène [39].

La méthode consiste à nouveau à réduire un sel d'or en présence de ligands formant une liaison covalente avec les AuNPs pour empêcher l'agrégation de ces nanocristaux d'or.

Cette méthode repose sur le transfert d'un sel d'or (dissous dans une solution aqueuse) vers une solution organique au moyen d'un agent de transfert de phase tel que le bromure de tétraoctylammonium (TOAB). Puis, un agent réducteur puissant doit alors être ajouté, comme le NaBH_4 , pour provoquer la formation du cœur métallique d'or.

Le TOAB sert d'agent stabilisant et de catalyseur entre les deux phases lors de la réaction. Du fait de la faible interaction entre le TOAB et les NPs, ces dernières peuvent être stabilisées en greffant à leur surface, par liaisons covalentes, de longues chaînes alkyles portant au moins un groupement thiol. Il est possible d'obtenir des AuNPs de taille comprise entre 1,5 et 5,2 nm.

De plus, la quantité de thiol en excès, la température et la vitesse à laquelle la réaction se produit, sont des paramètres clés de cette synthèse.

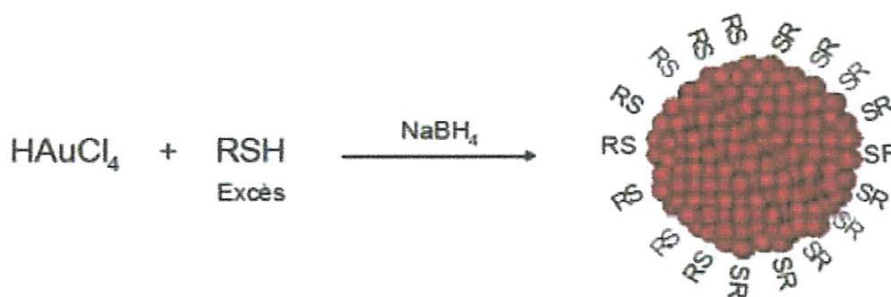


Schéma 5: synthèse de nanoparticules d'or par la voie NaBH_4 .

La stabilisation des NP d'or peut également être assurée par l'utilisation d'amines à longue chaîne alkyle qui se lient néanmoins moins fortement à la surface des NP que les thiols. D'autres molécules telles que le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB),

les micelles de copolymère à blocs [40], les polyéthylènes glycols (PEG) et d'autres polymères ont également été utilisés. Contrairement à la synthèse en milieu aqueux, la synthèse en milieu organique n'est pas limitée par la concentration d'or en solution et elle permet la synthèse de NPs à l'échelle du gramme.

Par contre, cette technique est beaucoup moins adaptée aux applications biomédicales. En effet, la bioconjugaison n'est pas possible en milieu organique et elle requiert donc le transfert de phase de NPs du milieu organique vers le milieu aqueux [41].

VII)- Stabilisation des nanoparticules d'or contre l'agrégation :

L'utilisation des AuNPs dans le domaine médical (en diagnostique et en thérapeutique) requiert une grande stabilité de la structure nanoparticulaire.

Le terme « stabilité » peut avoir plusieurs connotations selon les applications. Par exemple, un médicament stable peut être défini comme son aptitude à conserver ses propriétés physico-chimiques, microbiologiques et biologiques. Quand il est appliqué aux AuNPs, ces dernières correspondent à des particules résistant à l'agrégation et, de ce fait, possédant une longue stabilité. Le terme « agrégation » est utilisé dans ce manuscrit au sens large pour caractériser l'union de particules en suspension pour en former de plus grosses.

VII.1)- Mécanismes de stabilisation des nanoparticules d'or :

Pour éviter l'agrégation des AuNPs lors de leur préparation, l'utilisation d'un agent stabilisant dans le milieu réactionnel est nécessaire. De plus, la présence d'un agent stabilisant à la surface d'or a pour effet de contrôler la taille et la forme des particules. Trois mécanismes de stabilisation sont proposés : la stabilisation électrostatique, la stabilisation stérique et la stabilisation « électrostérique » (la somme des deux mécanismes précédents).

VII.1.1)-Stabilisation électrostatique :

La stabilisation électrostatique des colloïdes est donnée généralement par la théorie de Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek (DLVO). Elle suggère que la stabilité d'une particule dans une solution est dépendante de l'énergie d'interaction totale (forces d'attraction de Van der Waals et forces de répulsion).

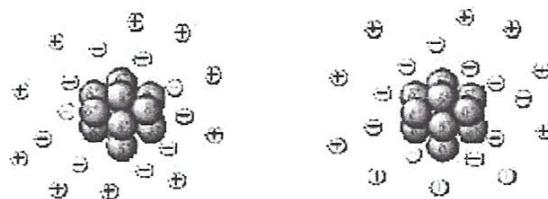


Schéma 6 : Stabilisation électrostatique de nanoparticules métalliques

En effet, la stabilisation électrostatique est le résultat essentiellement de l'adsorption de molécules chargées à la surface des AuNPs, ce qui entraîne une répulsion entre les particules de même charge.

VII.1.2)-Stabilisation stérique :

La répulsion stérique est un autre moyen de protéger les AuNPs. En effet, les ligands organiques (thiols, polymères) ou de macromolécules (copolymères, dendrimères) adsorbés à la surface d'or forment une couche protectrice qui diminue la réactivité de surface des AuNPs

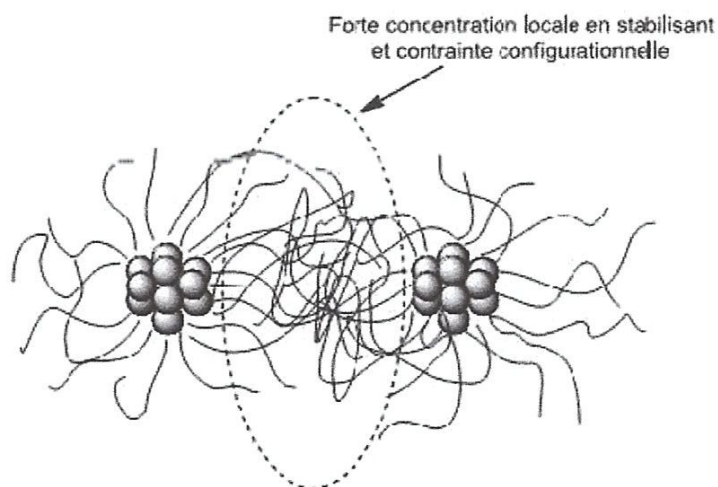


Schéma 7 : Stabilisation stérique de nanoparticules métalliques

Contrairement à la stabilisation électrostatique (en milieux aqueux), la stabilisation stérique est efficace en milieu organique ou aqueux.

VII.1.3)-Stabilisation « électrosterique » :

La stabilisation électrosterique est la combinaison des deux précédents mécanismes de stabilisation. Les ligands couramment employés sont généralement des composés organiques chargés qui bénéficient à la fois de l'effet de cette charge et de l'effet d'encombrement stérique. Les molécules les plus utilisées sont les polymères chargés et les tensioactifs.

VIII)-Méthodes de caractérisation des nanoparticules métalliques :

Les nanoparticules métalliques peuvent être caractérisées par différentes techniques. On peut notamment déterminer la taille, la structure ou encore la composition des nanoparticules.

VIII.1) - Microscopie électronique en transmission (MET) :

La microscopie électronique en transmission est la technique de choix pour la caractérisation de nanoparticules métalliques. Elle nous permet d'obtenir des informations directes sur la taille, la dispersité, et la morphologie des nanoparticules. Ce que nous voyons sur les photos prises avec ce type de microscope correspond au cœur des nanoparticules et le diamètre estimé est celui de la partie métallique centrale des nanoparticules sans la couche protectrice de ligands.

De façon générale, les dimensions des nanoparticules sont homogènes si on fait abstraction des agrégats formés à certains endroits. Pour ce qui est de la taille nous pouvons l'estimer à l'œil nu. Toutefois pour déterminer le diamètre exact des nanoparticules, un logiciel spécial d'une grande utilité sert à calculer le diamètre moyen du cœur des AuNPs.

VIII.2)-Spectroscopie Ultraviolet-visible (UV-vis) :

La spectroscopie UV-vis est particulièrement utilisée pour la caractérisation de nanoparticules métalliques dont la longueur d'onde (λ_{\max}) se situe dans le visible telles que le cuivre, l'argent ou l'or. Dans cette technique, l'interaction d'une onde électromagnétique avec une nanoparticule métallique excite les électrons libres de la bande de conduction se trouvant à la surface de la nanoparticule. Ce qui est à l'origine de la création de moment(s) dipolaire(s) qui vont induire une forte augmentation du champ électrique à l'intérieur de la particule. Cette augmentation provoque l'apparition d'une bande d'absorption, la bande **plasmon**, visible entre **500 et 600 nm**. Cette technique est également utilisée pour déterminer la taille des nanoparticules et donc le degré d'agrégation de celles-ci. En effet, dans le cas de l'or par exemple, la position et la taille de la bande plasmon de résonance dépendent de la

taille et de la distribution des nanoparticules. En effet, lorsque la taille des nanoparticules diminue, la longueur d'onde λ_{\max} correspondante diminue également [42].

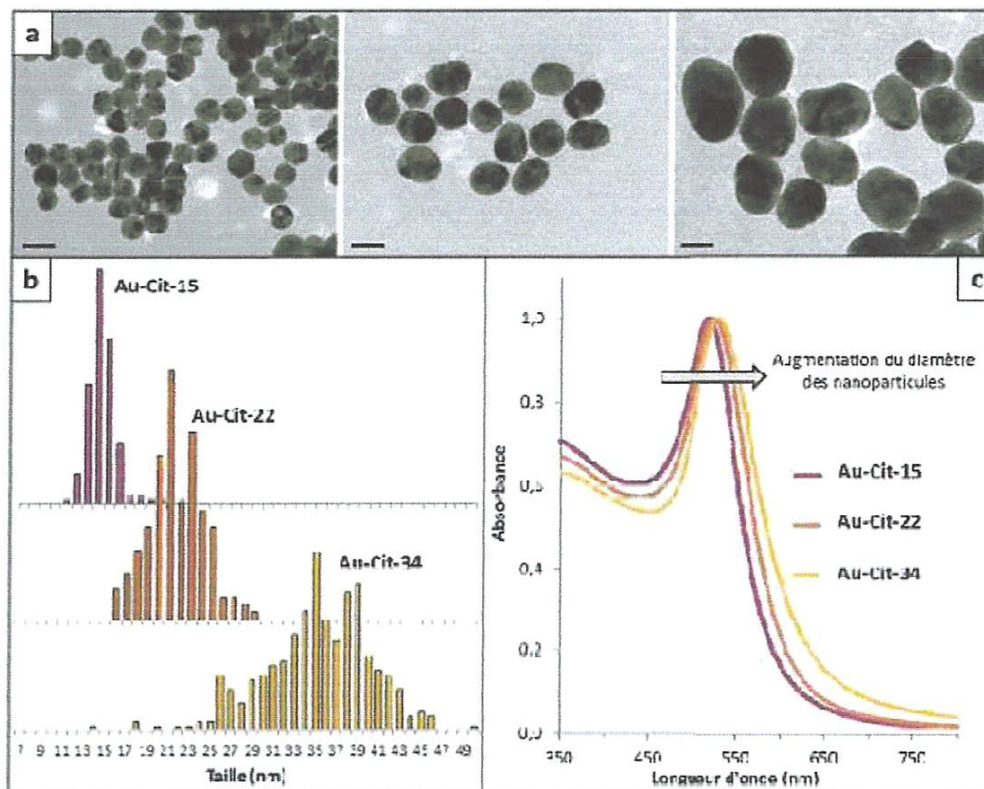


Figure 5: (a) Clichés de microscopie électronique à transmission des particules de 15 nm, 22 nm et 34 nm (de gauche à droite, barres d'échelle 20 nm). (b) Distribution en taille des différents échantillons. (c) Spectres UV-visible.

VIII.3)-Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) :

La spectroscopie IRTF est utilisée pour sonder la surface des nanoparticules métalliques et ainsi analyser l'adsorption des molécules sur cette surface. L'adsorption du monoxyde de carbone est celle qui a été la plus étudiée en raison des fréquences vibrationnelles du CO très sensibles à l'environnement chimique. En effet, différentes bandes caractéristiques du CO peuvent être obtenues en fonction du mode d'encrage du CO sur la nanoparticule. Par exemple, si le CO est lié à un atome de platine (pic à 2050 cm^{-1} , CO terminal), s'il est lié à 2 atomes de platine (pic à 1850 cm^{-1} , CO ponté). Bradley a montré une variation des ratios entre ces 2 pics en fonction de la taille des nanoparticules métalliques. Il a expliqué ces résultats par la présence de deux sites différents

à la surface des nanoparticules, sites présents en ratio variable en fonction de la taille des nanoparticules

VIII.4)-Diffraction des rayons X et autres spectroscopies utilisant des rayons X :

La diffraction des rayons X permet d'identifier la phase cristalline des particules. Cependant, pour l'analyse des nanoparticules, ce sont généralement des techniques plus complexes qui sont utilisées tels que la spectroscopie XANES (« X-ray absorption near edge structure ») ou la Spectroscopie d'absorption X (EXAFS : « Extended X-ray absorption fine structure »). Ces deux méthodes peuvent être complémentaires pour donner des indications concernant la densité électronique, le voisinage plus ou moins proche des atomes métalliques (nombre et nature des voisins, distance interatomique). L'EXAFS permettra d'observer une zone plus grande que la technique XANES. Des travaux de Palina ont notamment montré l'intérêt de ces deux méthodes pour expliquer les variations de taille lors de différentes synthèses de nanoparticules de platine stabilisées par du PVP. Enfin, la spectroscopie de photoélectrons induits par rayon X (XPS : « X-ray photoelectron spectroscopy ») consiste à exciter les atomes d'une substance par rayonnements électromagnétiques et à mesurer le spectre en énergie des électrons émis par photoémission. Cette méthode permet de déterminer la composition et l'état chimique des surfaces et des interfaces des nanoparticules.

VIII.5)- Résonance magnétique nucléaire (RMN) :

Dans le cas des nanoparticules métalliques, la RMN peut permettre d'étudier les interactions entre les atomes métalliques de surface et les ligands. On peut nommer entre autres les travaux du groupe de Chaudret qui ont démontré par RMN du solide ou en solution (^1H , ^{13}C et ^{31}P) des interactions existant entre la nanoparticule métallique et le ligand[85]. D'autres travaux ont été réalisés à l'aide de la technique HR-MAS-RMN (« High-Resolution-Magic Angle Spinning NMR ») [43]. La technique de RMN NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) a été utilisée afin de mettre en évidence le de ligands variés à la surface de nanoparticules d'or.

IX)- Conclusion :

Les nanotechnologies recouvrent un grand nombre de domaines technologiques ayant pour dénominateur commun la taille nanométrique des structures obtenues. L'aspect du développement des nanotechnologies vers la médecine est certainement l'un des plus beaux exemples où chimistes, physiciens, biologistes, pharmaciens et médecins travaillent ensemble dans un intérêt commun.

Le concept de vectorisation a largement prouvé aujourd'hui sa pertinence et l'imagination des chercheurs a permis l'émergence d'une variété considérable d'outils utiles à la thérapie comme au diagnostic (les agents théranostiques). Le chemin a été balisé d'enjeux successifs, sources de nouveaux progrès à chaque étape, comme l'amélioration de l'index thérapeutique, le franchissement de barrières biologiques, l'administration de molécules fragiles, de molécules insolubles dans l'eau, etc. Aujourd'hui, les enjeux résident dans la combinaison d'approches permettant à la fois de sécuriser encore mieux les traitements et de créer une synergie entre différentes modalités de traitement, avec un seul et unique vecteur (le tout en un).

Les nanoparticules d'or fonctionnalisées constituent une classe d'édifices présentant des propriétés physiques et chimiques originales. Des travaux récents ont permis de développer des méthodes de synthèse préparatives (les synthèses dérivées de celles de Brust en est un bon exemple) ouvrant la voie à de nombreuses études des propriétés et applications pouvant résulter de ces édifices.

C'est là qu'interviennent les nanoparticules théranostiques qui de par leurs tailles et leurs capacités de polyfonctionnalisation sont des vecteurs idéaux.

Les méthodes nanométriques rendent le processus de recherche thérapeutique moins hasardeux et moins empirique et de ce fait plus fiable. La lutte contre le cancer en est l'exemple le plus parlant. Et dont le diagnostic précoce et la prise en charge de la maladie en appliquant une thérapie efficace mène rapidement à la guérison.

Références

- [1] Ratner, D., *Nanotechnologies: la révolution de demain* (Nanotechnology : à gentile introduction to a big idea), (2003), Campus press, Upper Saddle River, NJ :prentice Hall
- [2] El-Sayed H., Huang X., El-Sayed A, *NanoLett*, (2005), 829.
- [3] Développement et Conseil (2004). Etude prospective sur les nanomatériaux. Etude réalisée par Développement et Conseil pour le compte du MINEFI / DIGITIP / SIMAP.
- [4] Lahmani M., Bréchnignac C., Houdy P., *Les nanosciences, 2. Nanomatériau et nanochimie*, Edition Belin, (2006).
- [5] Les nanomatériaux Avis de l'Afsset Effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement, Rapport du groupe d'experts, Juillet (2006). [6] C. Kumar . *Biological and Pharmaceutical Nanomaterials. Nanotechnologies for the Life Sciences*, 2006, 2.
- [7] H. Pinto-Alphandary, A. Andremon, P. Couvreur, Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications, *International Journal of Antimicrobial Agents*,
- [8] Kreibitz, U. Vollmer, M. *Optical properties of metal cluster*. Springer, (1995).
- [9] Knauth P., Schoonman J., *NANOSTRUCTURED MATERIALS, Selected Synthesis Methods, Properties and Applications*, (2004) Kluwer Academic Publishers, New York.
- [10] N. L. Rosi, D. A. Giljohann, C. S. Thaxton, A. K. Lytton-Jean, M. S. Han, C. A. Mirkin, *Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles for Intracellular Gene Regulation*, *Science*, 2006, 312, 1027.
- [11] M. Thomas, A. M. Klivanov, *Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimines transfer of plasmid DNA into mammalian cells*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2003, 100, 9138-9143
- [12] A. Lorin, C. Flore, A. Thomas, R. Brasseur, *Les liposomes : description, fabrication et applications*, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 2004, 8 (3), 163-176.
- [13] K. Letchford, H. Burt, *A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres,*

- nanocapsules and polymersomes, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2007, 65(3), 259-269.
- [14] J. Seki, S. Sonoke, A. Saheki, H. Fukui, H. Sasaki, T. Mayumi, A nanometer lipid emulsion, lipid nano-sphere (LNS), as a parenteral drug carrier for passive drug targeting. *Int J Pharm*, 2004, 273, 75-83.
- [15] T. Tadros, P. Izquierdo, J. Esquena, C. Solans, Formation and stability of nano-emulsions, *Adv Colloid Interface Sci*, 2004, 108-109, 303 - 18.
- [16] F. Podlogar, M. Gasperlin, M. Tomsic, A. Jamnik, M. B. Rogac. Structural characterisation of water-Tween 40/Imwitor 308-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods, *Int J Pharm*, 2004, 276, 115-28.
- [17] W. Cai, X. Chen, Preparation of peptide-conjugated quantum dots for tumor vasculature-targeted imaging. *Nat. Protoc*, 2008, 3 (1), 89-96.
- [18] W. Yunqing, C. Lingxin, Quantum dots, lighting up the research and development of nanomedicine, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2011, 7, 4, 385-402.
- [19] T. S. Hauck, R. E. Anderson, H. C. Fischer, S. Newbigging, W. C. W. Chan, In vivo quantum-dot toxicity assessment, *Small*, 2009, 6 (1), 138-144.
- [20] D. Koruga, L. Matija, N. Mistic, P. Rakin, Fullerene C60: properties and possible applications. *Trans. Tech. Publ. Mat. Sci. Forum*, 1996, 214, 49-56.
- [21] J.H. Zagal, S. Griveau, K. I. Ozoemena, T. Nyokong, F. Bedioui, Carbon nanotubes, phthalocyanines and porphyrins: attractive hybrid materials for electrocatalysis and electroanalysis, *J Nanosci. Nanotechnol*, 2009, 9 (4), 2201-2214.
- [22] G. V. Andrievsky, V. I. Bruskov, A. A. Tykhomyrov, S. V. Gudkov, Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C (60) fullerene nanostructures in vitro and in vivo, *Radic. Biol. Med*, 2009.
- [23] T. Enoki, K. Takai, V. Osipov, M. Baidakova, A. Vul, Nanographene and nanodiamond; new members in the nanocarbon family. *Chem. Asian J*, 2009, 4, 796-804.
- [24] Lee JE, Lee N, Kim T, Kim J, Hyeon T. Multifunctional mesoporous silica nanocomposite nanoparticles for theranostic applications. *AccChem Res* 2011;44:893-902.
- [25] Lee JE, Lee N, Kim T, Kim J, Hyeon T. Multifunctional mesoporous silica nanocomposite nanoparticles for theranostic applications *AccChem Res* 2011;44:893-902.
- [26] G. Gregoriadis, Carrier Potential of Liposomes in Biology and Medicine .1, *New England Journal of Medicine*, 1976, 295(13), 704-710. 2000, 13(3), 155-168.

- [27] Y. Fukumori, H. Ichikawa, Nanoparticles for cancer therapy and diagnosis, *Adv. Powder Technology*, 2006, 17, 1-28
- [28] O. M. Koo, I. Rubinstein, H. Onyuksel, Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2005, 1(3), 193-212
- [29] M. Cianfrocca, V. Kaklamani, S. Rosen, J. von Roenn, A. Rademaker, S. Rubin, R. Friedman, R. Uthe, W. Gradishar, A Phase I Trial of a Pegylated Liposomal Anthracycline (Doxil TM) and Lapatinib Combination in the Treatment of Metastatic Breast Cancer: Dose-Escalation Results of an Anthracycline and Lapatinib Combination Trial, *Cancer Res*, 2009, 69, 24, 3.
- [30] P. Couvreur, C. Vauthier, Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease, *Pharm. Res*, 2006, 23, 1417-1450.
- [31] S. Link, M. A. El-Sayed, Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals, *Int. Rev. Phys. Chem*, 2000, 19 (3) 409–453.
- [32] J. Y. Chen, D. L. Wang, J. F. Xi, L. Au, A. Siekkinen, A. Warsen, Z. Y. Li, H. Zhang, Y. N. Xia, X. D. Li, Immuno gold nanocages with tailored optical properties for targeted photothermal destruction of cancer cells, *Nano Lett*, 2007, 7 (5), 1318–1322.
- [33] A. Krueger, materials: biological applications of functionalized nanodiamond materials, *Chemistry*, 2008, 14 (5), 1382–1390.
- [34] J. Burdick, E. Alonas, H. C. Huang, K. Rege, J. Wang, High-throughput template multisegment synthesis of gold nanowires and nanorods, *Nanotechnology*, 2009, 20 (6).
- [35] Su, Y. L.; Wei, X. F.; Liu, H. Z., Effect of sodium chloride on association behavior of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer in aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science* 2003, 264, (2), 526-531.
- [36] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine, *J. Phys. D: Appl. Phys*, 2003, 36, 167–181.
- [37] R. Weissleder, D. D. Stark, B. I. Engelstad, B. R. Bacon, C. C. Compton, D. L. White, P. Jacobs, J. Lewis, Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity, *AJR*, 1989, 152 (1), 167–173.
- [38] G. Kaul, M. Amiji, Long-circulating poly (ethylene glycol)-modified gelatine nanoparticles for intracellular delivery, *Pharm. Res*, 2002, 19, 1061-1067.

- [39] K. M. McNeeley, A. Annapragada, R.V. Bellamkonda, Decreased circulation time offsets increased efficacy of PEGylated nanocarriers targeting folate receptors of glioma, *Nanotechnology*, 2007,
- [40] D. Dosev, M. Nichkova, M. Liu, B. Guo, G.Y. Liu, B. D. Hammock, I.M. Kennedy, Application of luminescent nanoparticles to the visualization of protein micropatterns, *Journal of Biomedical Optics*, 2005, 10:064006.
- [41] A. K. Gupta, M. Gupta, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials*, 2005, 26 (18), 3995–4021.
- [42] S. Link, M. A. El-Sayed, Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods, *J. Phys. Chem. B*, 1999, 103 (40), 8410–8426.
- [43] D.R. Baer, M.H. Engelhard, *J. Electron Spectrosc. Rel. Phenom.*, **2010**, 178-179, 415.
- 141 T. Pery, K. Pelzer, G. Buntkowsky, K. Philippot, H. Limbach, B. Chaudret,

Chapitre (II)

L'acide lipoïque:un antioxydant universel

L'acide lipoïque:un antioxydant universel et un agent thérapeutique d'avenir

I)- Définition du stress oxydant :

Dans une cellule eucaryote normale, l'énergie nécessaire à son fonctionnement se fait de façon aérobie en utilisant des réactions d'oxydo-réduction. Ces réactions font intervenir des oxydants ou accepteurs d'électrons et des réducteurs ou donneurs d'électrons. Elles ont lieu dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie, qui fournit 90% de l'énergie nécessaire [1]. Dans cet organe intracellulaire, l'oxygène est l'accepteur final d'électron après une cascade de réactions d'oxydo-réduction, faisant intervenir quatre complexes protéiques.

Lorsque l'oxygène est transformé en molécule d'eau, cela permet de générer de l'ATP (adénosine triphosphate), molécule à haut potentiel énergétique. Cependant 2 à 3% de l'oxygène n'est pas réduit en eau ; il est dévié pour former des radicaux libres ou des espèces dérivées de l'oxygène très réactives [2].

Ces entités oxydantes sont physiologiquement maintenues en équilibre par de nombreux systèmes antioxydants. Quand un déséquilibre apparaît entre molécules pro-oxydantes et antioxydantes (**figure 6**), en faveur des entités oxydantes, on parle alors de **stress oxydant** [3]. Il peut être la cause de système antioxydant défectueux ou d'une quantité d'entités oxydantes produites trop importante.

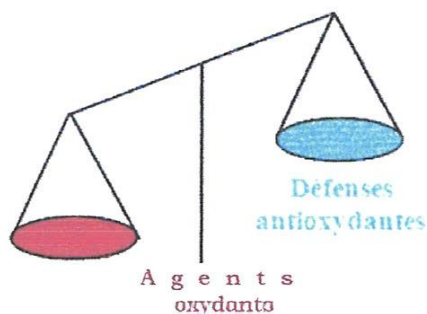


Figure 6: Déséquilibre entre les molécules pro-oxydantes et les systèmes de défense antioxydantes lors du stress oxydant.

I.1)-Les entités oxydantes et leur production :

Les entités oxydantes sont souvent des radicaux libres, c'est-à-dire des espèces chimiques qui possèdent un électron célibataire ou non apparié sur la dernière couche électronique. Cet électron célibataire n'est pas compensé ce qui provoque des dérèglements dans leur champ magnétique, rendant ainsi ces espèces très instables. Elles vont alors tenter de récupérer des électrons sur

d'autres molécules comme les substrats biologiques, en les oxydant. Il existe majoritairement trois grandes familles d'espèces réactives: les entités oxygénées réactives (ROS), les entités nitrées réactives (RNS) [4] et les entités halogénées réactives (RCS) (Tableau 1).

Tableau 1: Principales entités oxydantes présentes dans les cellules vivantes. On distingue trois familles: les entités oxygénées (ROS), nitrées (RNS) ou halogénées (RCS) réactives qui peuvent exister sous forme radicalaire ou non radicalaire.

† : Quelques espèces appartiennent soit aux ROS soit aux RCS (HOCl et HOBr)

Entités oxygénées réactives	
- Radicaux	- Non radicaux
Superoxyde $O_2^{\cdot -}$ Hydroxyle OH^{\cdot} Peroxyle RO_2^{\cdot} Alcoxyle RO^{\cdot} Hydroperoxyle HO_2^{\cdot}	Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 Acide hypochloreux $HOCl$ † Ozone O_3 Oxygène singulet O_2^* Acide hypobromeux $HOBr$ †
Entités nitrées réactives	
- Radicaux	- Non radicaux
Oxyde nitrique NO^{\cdot} Dioxyde de nitrogène NO_2^{\cdot}	Acide nitreux HNO_2 Cation nitrosyle NO^+ Anion nitrosyle NO^- Tétroxyde de dinitrogène N_2O_4 Trioxyde de dinitrogène N_2O_3 Peroxynitrite $ONOO^-$ Cation nitronium NO_2^+ Chlorure de nitryle NO_2Cl Alkyl peroxy-nitrate $ROONO^{\cdot}$ Anion nitroxyle NO^{\cdot}
Entités halogénées réactives	
	- Non radicaux
	Acide hypochloreux $HOCl$ † Acide hypobromeux $HOBr$ † Chlorure de nitryle NO_2Cl

I.2)- Les facteurs environnementaux comme source d'entités oxydantes :

Les facteurs environnementaux contribuent également à la formation d'entités radicalaires. Une production beaucoup trop importante d'entités réactives est observée dans le cas d'intoxication aux métaux lourds ou dans les phénomènes d'irradiation. Des métaux lourds comme le cadmium, le mercure ou l'arsenic sont souvent trouvés dans l'environnement. L'Homme y est de plus en plus exposé que ce soit par le sol, l'air ou l'eau. Des études ont montré que ces métaux lourds ont la capacité de générer des espèces radicalaires actives, provoquant des dommages cellulaires importants en diminuant les activités enzymatiques et en lésant la bicouche lipidique et les molécules d'ADN [5].

Les radiations UV provoquent des dommages au niveau de l'ADN (Sutherland, 1980). Les champs électriques, des résidus de la fumée de cigarette, l'alcool ou même certains médicaments sont une source importante de radicaux libres par oxydation des composés au niveau du cytochrome P450 [6].

II)- les antioxydants :

II.1)-Définition :

Le terme *antioxydant* était à l'origine utilisé pour désigner les substances chimiques qui empêchent les réactions avec l'oxygène. À la fin du XIX^e siècle et au début du XX^e siècle les propriétés des antioxydants ont été largement étudiées pour leur utilisation dans les procédés industriels afin de réduire, par exemple, la corrosion des métaux. Les antioxydants, dans le cas présent, sont des molécules naturellement produites par le corps ou bien apportées par l'alimentation pour combattre les effets toxiques des radicaux lors du stress oxydant. La production des entités oxydantes est constamment en équilibre avec les systèmes de défense antioxydante.

II.2)-Les systèmes de défenses antioxydants :

L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses antioxydantes très efficaces afin de diminuer la concentration des entités oxydantes dans l'organisme. Le terme d'antioxydant désigne toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxygène, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat [7]. La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire [8]. Il existe différents types de molécules qu'elles soient naturelles ou synthétiques et dont le mode d'action repose sur un système enzymatique

(premières lignes de défense) ou non (molécules piégeuses d'électrons) (**figure7**); Les molécules toxiques sont ainsi transformées en molécules assimilables comme l'eau et l'alcool.



Figure 7: Les différentes enzymes, protéines et petites molécules non protéiques impliquées dans la lutte contre le stress oxydant.

Les molécules impliquées peuvent:

- 1) agir directement sur les entités oxydantes en les éliminant de manière enzymatique ou non enzymatique
- 2) les séquestrer dans des protéines ou;
- 3) réparer les molécules modifiées.

III)-Les systèmes antioxydants non enzymatiques et leurs effets :

Les systèmes antioxydants non enzymatiques sont des nutriments naturellement apportés par l'alimentation ou par des composés endogènes. Ils peuvent avoir un rôle de « scavenger », c'est à

dire qu'ils ont la capacité de piéger les entités oxydantes en captant leur électron libre et en formant ainsi des entités plus stables qui pourront être éliminées par d'autres systèmes antioxydants. Les principales molécules sont le glutathion (GSH), la vitamine E (α -tocophérol), la vitamine C (acide L-ascorbique) la vitamine A (caroténoïde) et L'acide α -lipoïque (LA).

III.1)-Le glutathion (GSH) :

Le glutathion (GSH) est un tripeptide (γ Glu-L-Cys-Gly) intracellulaire formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. C'est le thiol le plus répandu parmi les êtres vivants [9]. Sa forme oxydée (GSSG) est également présente. Son action est polyvalente. Il protège les lipides de la peroxydation et les protéines de l'oxydation et de l'agrégation. Il permet la conversion des ponts disulfures (R-S-S-R) des protéines oxydées en deux fonctions thiols (R-SH). De plus, il piège le peroxyde d'hydrogène et réagit avec l'oxygène singulet et le radical hydroxyle [10].

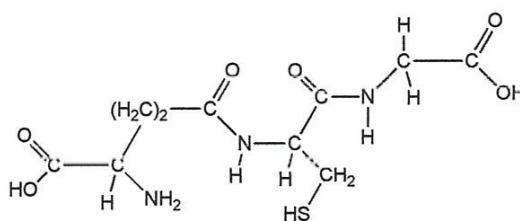


Figure 8: Formule semi-développée du glutathion réduit(GSH)

Les formes GSH (réduite) (**figure 8**) et GSSG (oxydée) forment un couple d'oxydoréduction très important dans la cellule car il permet les échanges d'électrons à l'intérieur de celle-ci. Des études ont montré son importance dans de nombreuses pathologies comme le cancer où une protéine exercerait son effet anti-carcinogène en augmentant les concentrations de GST. De plus, il protégerait des complications afférentes au diabète [11].

III.2)-La vitamine E (α -tocophérol):

La vitamine E, liposoluble, est un antioxydant membranaire. La forme la plus active est l' α -tocophérol (**Figure 9**) [12]. Elle piège les radicaux libres organiques provenant de l'oxydation des lipides et contribue à diminuer la peroxydation lipidique. La vitamine E peut mettre fin à une réaction radicalaire en se chargeant du radical. Devenue radicalaire, la vitamine E est relativement stable.

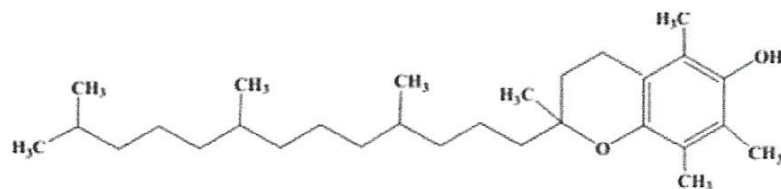


Figure 9 : Structure de la vitamine E

III.3)-La vitamine C (acide L-ascorbique) :

La vitamine C (figure 10) piège l'anion superoxyde, le radical hydroxyle, l'oxygène singulet et réduit le peroxyde d'hydrogène en eau via l'ascorbate peroxydase [13]. Elle permet de régénérer la forme non radicalaire de la vitamine E. Lorsqu'elle est à son tour oxydée, elle est réduite par l'acide alpha lipoïque ou par les ascorbates réductases ou excrétée dans les urines. Sa structure est présentée ci-dessous.

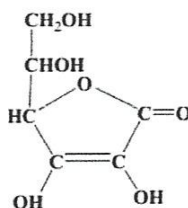


Figure 10: Structure de l'acide ascorbique (ou vitamine C).

La préservation du pouvoir antioxydant des molécules est fondamentale. Par exemple, le fait d'éplucher une pomme réduit sensiblement sa capacité antioxydants car la peau est riche en vitamine C et en quercétine. La répartition des antioxydants dans l'aliment est différente d'un produit à un autre. D'autre part, la cuisson, qui est un phénomène d'oxydation, diminue le potentiel antioxydant de certains aliments. La vitamine C est notamment très sensible à la chaleur.

III.-4)- Les caroténoïdes :

Les caroténoïdes sont une famille de pigments contenant au moins 600 membres retrouvés dans les bactéries, les algues et les champignons et appartenant à la famille des rétinoïdes (Figure 11). La structure chimique de chaque caroténoïde dérive d'une structure de base : le lycopène formé par l'enchaînement de 8 unités isopréniques. Les caroténoïdes se différencient par leur taux de

cyclisation, d'insaturation et d'oxydation. Dans les cellules, les caroténoïdes sont associés aux bicouches lipidiques et sont transportés dans l'organisme par les lipoprotéines. Certains caroténoïdes présents chez l'homme, via leur apport dans l'alimentation peuvent être métabolisés enzymatiquement pour aboutir à de l'acide rétinol (Vitamine A). Leur activité antioxydante peut s'expliquer par leurs propriétés à piéger les molécules d'oxygène singulet, formées par les radiations solaires. Grâce à leur longue chaîne carbonée, riche en doubles liaisons, ils sont également de bons piégeurs de radicaux peroxydes. Une molécule de caroténoïde peut piéger plusieurs espèces radicalaires avant d'être détruite [14].

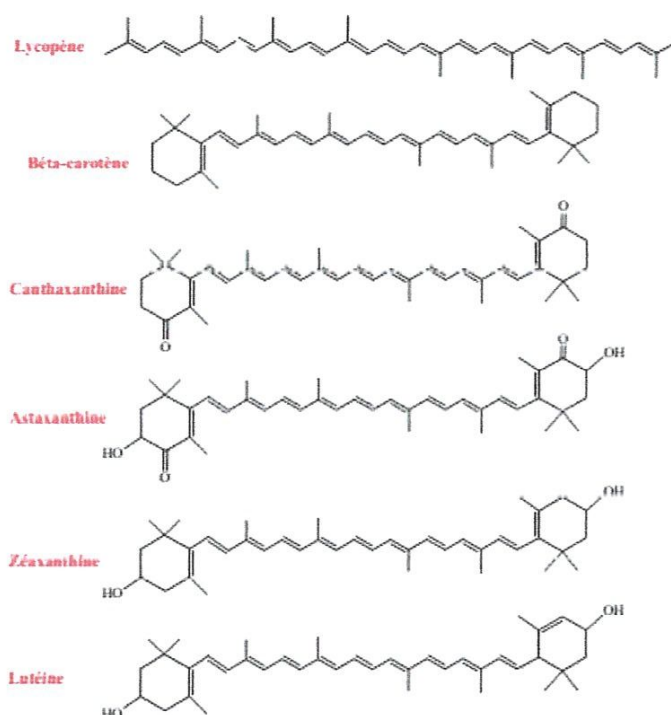


Figure 11: Structures de différents caroténoïdes

III.5)- Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes constituent une famille de plus de 4000 composés polyphénoliques qui sont présents uniquement dans les végétaux. Il existe différentes sous-classes : les flavanols, les flavanones, les flavones, les isoflavones et les anthocyanes (**Figure 12**). Un grand nombre d'études menées in vitro ont permis de montrer qu'ils possédaient des propriétés antioxydantes en tant que piégeur de ROS et de RNS. Leur mécanisme d'action antioxydante implique le transfert sur l'entité réactive d'un électron ou d'un atome d'hydrogène pour le stabiliser. Ils possèdent de nombreuses

propriétés in vivo : anti allergiques, anti-inflammatoires, antioxydantes, antimutagènes, anti-carcinogènes et sont impliquées dans la régulation de nombreuses activités enzymatiques. L'épigallocatechine gallate du thé vert et la procyanidine B₂ qui sont des polyphénols ont des effets antioxydants majeurs [15].

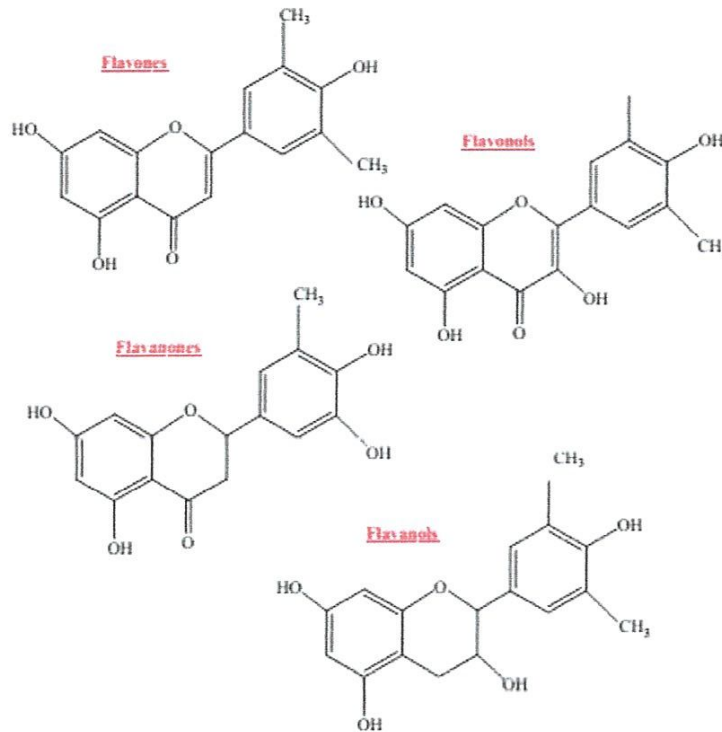


Figure 12: Structures de base des quatre familles des flavonoïdes

III.6)-L'acide α -lipoïque (LA) :

III.6.1)-Fonction, propriétés physiques et chimiques de LA :

L'acide α -lipoïque (LA) qui est biosynthétisé par le cleavage de l'acide Linoléique, est un des cofacteurs essentiels de deux enzymes intervenant dans le cycle de Krebs : la pyruvate déshydrogénase et l'alpha cétooglutarate déshydrogénase (2 oxoglutarate déshydrogénase). Ces deux protéines sont des complexes combinant trois activités enzymatiques agissant séquentiellement : une décarboxylase, une transacétylase et une réductase [16].

L'acide α -lipoïque appelé aussi acide thioctique ou, encore acide lipodominique. (acide 1,2-dithiolane-3-pentanoïque), est un acide carboxylique ($pK_a = 5.10$) et sa base conjuguée est l'anionlipoate. Sous forme oxydée, il est de couleur jaune, alors que sous forme réduite l'acide dihydrolipoïque (DHLA) (Figure 13), il est incolore.

L'acide α -lipoïque est soluble dans le méthanol, l'éthanol, le diéther et le chloroforme et insoluble dans l'eau (127mg/l à 25°C). Sa température de fusion est de 47,5-48°C [17].

Du fait de son atome de carbone chiral, LA a deux énantiomères R et S (Figure 13, 14).

La forme naturelle est la forme R., la forme S est synthétique et pourrait avoir une activité biologique plus faible que la forme R. La plupart des suppléments commerciaux sont des racémiques.

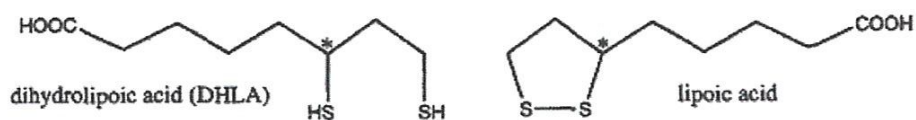


Figure 13: Structure de LA et du DHHLA

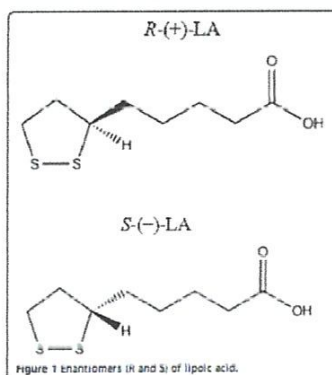


Figure 14: Les deux énantiomères R et S de l' α -acide lipoïque.

L'acide lipoïque est réduit, en particulier, dans les globules rouges, en acide dihydrolipoïque (Schéma 8). Cette réaction est dépendante du NADPH, une forme active de vitamine B₃ [18].

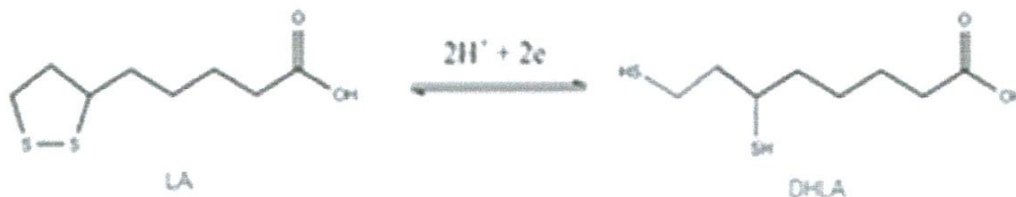


Schéma 8: Structure chimique de l'acide α -lipoïque (LA) et sa forme réduite acide dihydrolipoïque (DHHLA).

III.6.2)- Propriétés pharmacologiques de LA :

L'acide lipoïque mérite bien le titre d'antioxydant universel, sa propriété amphiphile (à la fois hydrosoluble et liposoluble) améliore grandement sa capacité à se distribuer dans tout l'organisme, y compris le système nerveux central. Il est très bien absorbé par le tube digestif et se diffuse dans tous les tissus., il neutralise les radicaux libres et régénère d'autres antioxydants[19], il chélate les métaux lourds[20]., il aide à la réparation de l'ADN et a des effets positifs sur l'expression génique[21].

Le domaine où l'efficacité thérapeutique de l'acide lipoïque est reconnue est le diabète, notamment dans la prévention de ses complications et, en particulier, la neuropathie et la cataracte [22]. Il devrait être utilisé dans les pathologies responsables d'une chute de glutathion intracellulaire comme l'exposition aux rayonnements ionisants [23], dans les maladies prolifératives et inflammatoires [24], dans les maladies auto-immunes et virales en particulier, le VIH et les hépatites [25].

Enfin, il pourrait avoir son indication dans le cancer [26] et les troubles cardiovasculaires comme l'athérosclérose et l'hyper-cholestérolémie [27].

III.6.3)-Pharmacomodulation de l'acide lipoïque :

L'acide lipoïque est une substance largement étudiée et dont les effets thérapeutiques sont liés en particulier à son activité antioxydante.

Cette molécule présente les caractéristiques chimiques uniques de posséder une fonction disulfure cyclique à une extrémité de la molécule. et à l'autre extrémité, une fonction acide carboxylique (**Figure13**), ce qui rend cette molécule parfaitement compatible avec les différents couplages (peptidiques, d'estérification ...).

L'acide lipoïque a fait l'objet de nombreuses études de recherche dans le but d'améliorer son profil pharmacocinétique et son efficacité thérapeutique.

En effet, et en termes d'amélioration de l'activité antioxydante de cette molécule, un ensemble de molécules hybrides ont été synthétisées.

Une série d'esters (**figure 15**) obtenue par couplage de l'acide lipoïque avec des phénols doués d'activité antioxydante a révélé un effet de synergie remarquable [28].

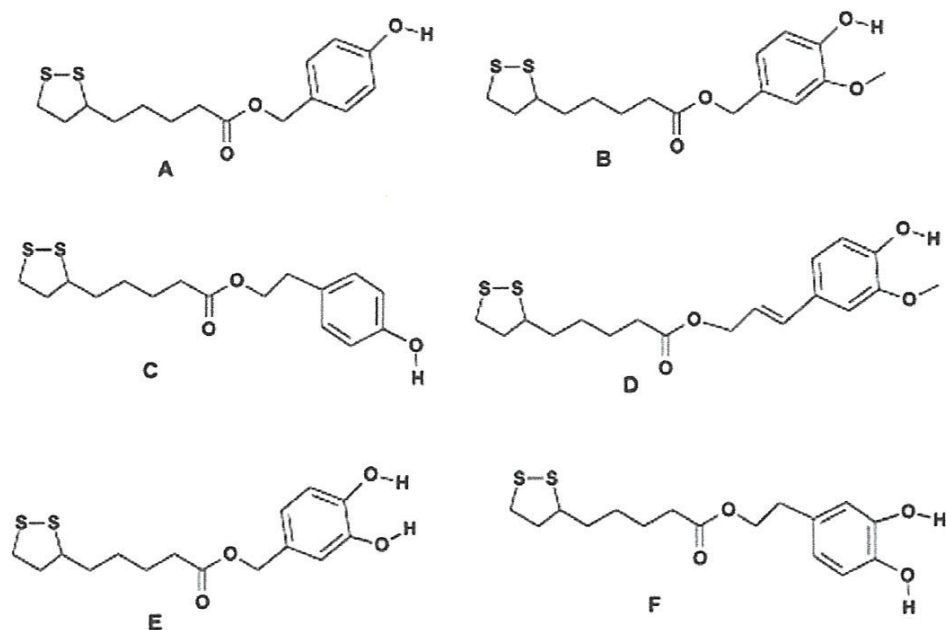


Figure 15: Nouvelles structures d'esters obtenues par couplage de l'acide lipoïque avec des phénols.

La pégylation de l'acide lipoïque (Figure 16) a pour effet d'augmenter son hydrosolubilité, ce qui améliore d'avantage ses propriétés pharmacologiques [29].

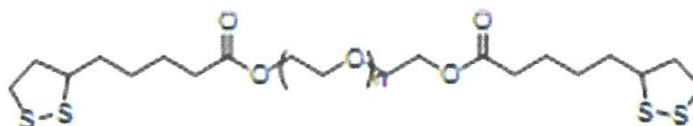


Figure 16: Nouveaux esters hydrosolubles obtenus par pégylation de l'acide lipoïque.

La synthèse et l'évaluation biologique de plusieurs séries de molécules anticancéreuses dérivées de l'acide lipoïque ont été rapportées dans la littérature [30].

trois têtes de séries sont donnés sur la figure 17 suivante:

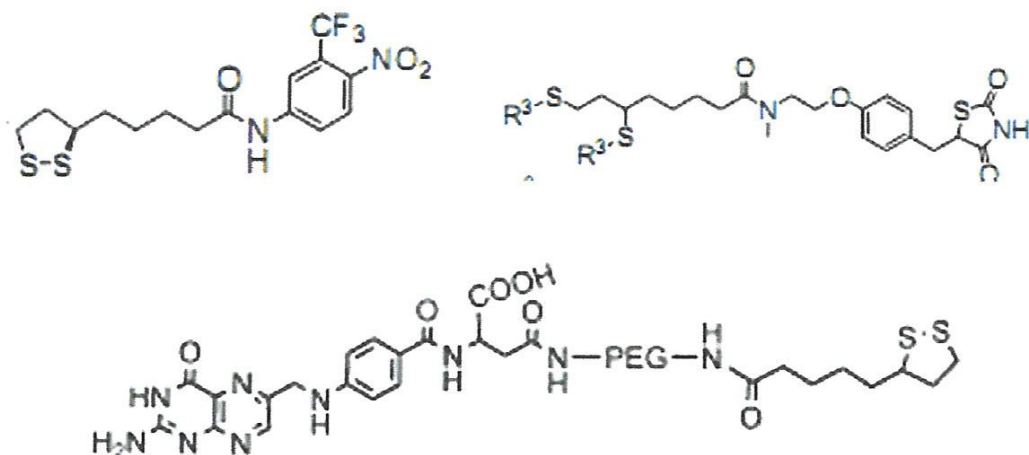


Figure 17 : Structures de molécules anticancéreuses dérivées de l'acide lipoïque.

Parmi les nombreuses possibilités de développements offertes par l'acide lipoïque en tant qu'agent thérapeutique, un accent particulier a été apporté pour la synthèse de nouveaux conjugués acide lipoïque-chroman (**Figure18**). L'évaluation biologique de ces composés a déjà permis d'obtenir de meilleures activités cardioprotectives et antioxydantes [31].

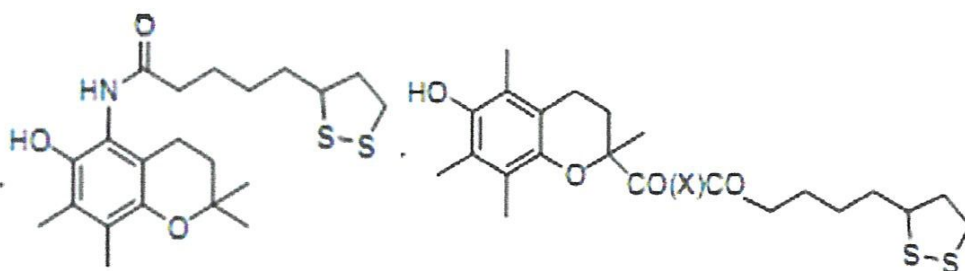


Figure 18: Structures des chromans analogues de l'acide lipoïque dotées de propriétés antioxydantes et Antiarrhythmiques

III.6.4)-Synthèse de plateformes nanoparticulaires à base d'acide lipoïque :

Les molécules soufrées, en raison de leur forte affinité pour l'or, permettent des possibilités de fonctionnalisation quasi-illimitées des nanoparticules d'or [32].

L'acide lipoïque: une molécule qui porte un hétérocycle avec un pont disulfure a déjà été étudiée

pour l'élaboration de nanoparticules d'or stables [33].

La fonctionnalisation d'une nanoparticule d'or en présence de l'acide lipoïque peut se faire suivant deux méthodes différentes : directe et indirecte.

La méthode directe consiste à coupler préalablement l'acide lipoïque avec des molécules variées, par exemple des biomolécules, pour accéder à des conjugués fonctionnelles ; ces dernières seront greffées ultérieurement sur la surface des nanoparticules d'or.

Les exemples de ce procédé d'élaboration de nanoparticules d'or sont très nombreux dans la littérature. On peut par exemple citer la synthèse de nanoparticules d'or couvertes d'arylsulfonamides (Schéma 9) pour le ciblage de l'anhydrase carbonique (XI) impliquée dans le cancer rapportée par Stiti et al [34].

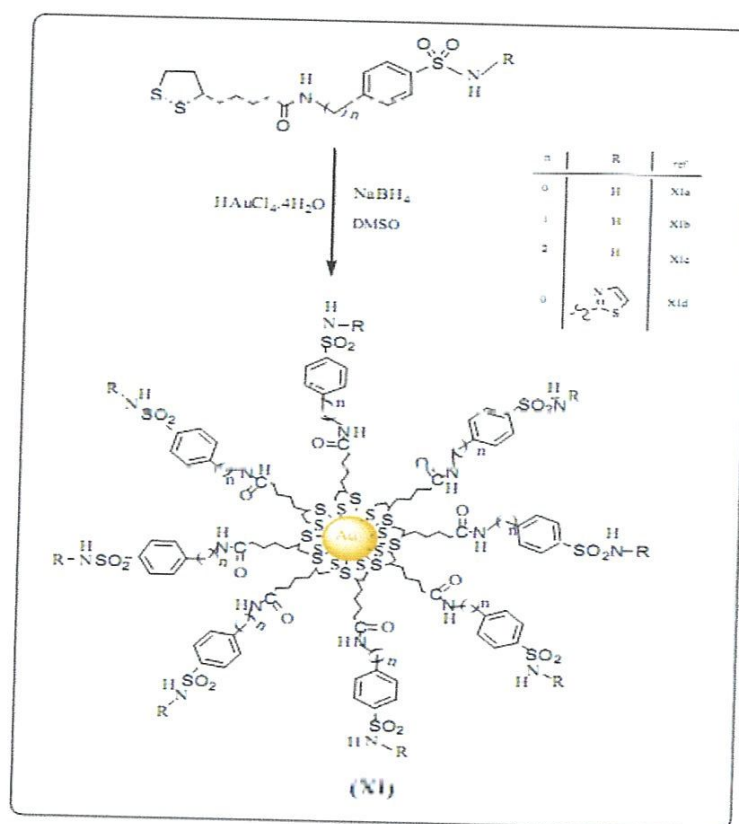


Schéma 9: Synthèse par voie NaBH₄ de nanoparticules d'or enrobées par des arylsulfonamides inhibiteurs de l'anhydrase carbonique (XI).

Dans la méthode indirecte, cette réaction de couplage, au lieu d'être réalisée en amont de la synthèse des nanoparticules, est réalisée en solution colloïdale.

Pour cela, la molécule d'acide lipoïque qu'on qualifera de « primaire » est greffée dans un premier temps à la surface des nanoparticules puis conjuguée à la molécule fonctionnelle.

Un exemple de ce procédé a été indiqué dans les travaux rapportés par Schiffrin et al [35] décrivant la fonctionnalisation des nanoparticules d'or enrobées d'acide lipoïque avec le complexe amino-nitrilo-triacetic-Co(II) pour une immobilisation spécifiques d'enzymes (Schéma 10).

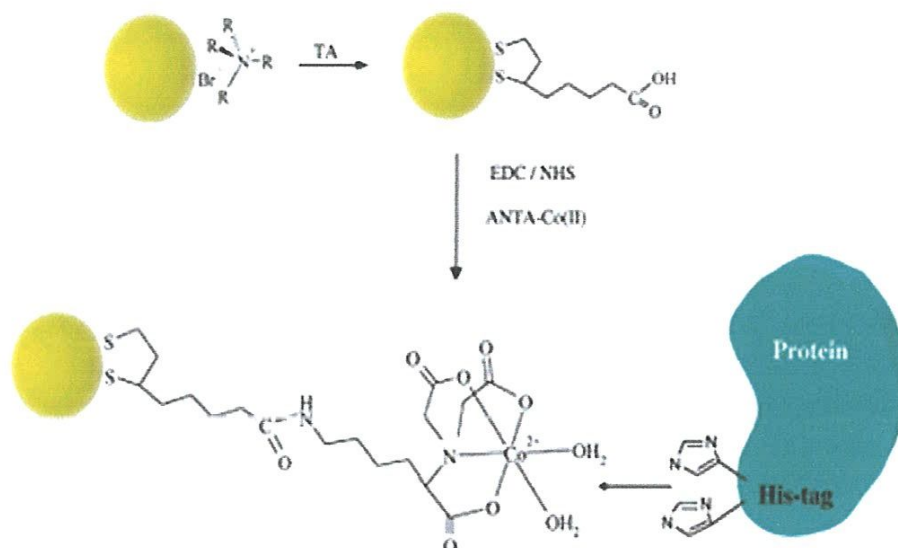


Schéma 10 : Stratégie de synthèse pour la fonctionnalisation des nanoparticules d'or enrobées d'acide lipoïque avec le complexe amino-nitrilo-triacetic-Co(II) (ANTA Co⁺²) pour une immobilisation spécifiques d'enzymes

IV)- Conclusion

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées et les défenses antioxydantes de l'organisme.

Notre mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice physique intense), mais aussi nos mauvaises habitudes alimentaires, augmentent de façon anormale la production des espèces oxydantes dans notre organisme. A long terme, ceci peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies.

Afin d'apporter les corrections nécessaires pour optimiser nos défenses antioxydantes et diminuer les dommages oxydatifs et les pathologies qui leur sont liées, il est important de disposer de défenses antioxydantes adéquates qui doivent nous être apportées par une alimentation saine, particulièrement riche en fruits et légumes.

Et comme traitement préventif et curatif contre le stress oxydant, on peut considérer l'acide lipoïque comme antioxydant universel et un supplément thérapeutique efficace contre plusieurs maladies, notamment le cancer, les troubles cardiovasculaires, le diabète et ses complications, les maladies prolifératives et inflammatoires, les maladies auto-immunes et virales en particulier, le VIH et les hépatites.

Références

- [1] Delattre J, Beaudoux J-L, Bonnefont-Rousselot D. Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques. Première édition. Ed. Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 2005, 547 pages.
- [2] Droge W., Free radicals in the physiological control of cell function, *Cellular Physiol. Rev.*, 2002, 82, p. 47.
- [3] Sies H., Antioxidant in disease mechanisms and therapy, *Advances in Pharmacology*, Academic Press, New York, 1997, 38.
- [4] Hare J. Nitroso-redox balance in the cardiovascular system. *N Engl J Med*, 2004, 351, 2112-2114.
- [5] Cadet J., Bellon S., Berger M., Bourdat A.G., Douki T., Duarte V., Frelon S., Gasparutto D., Muller E., Ravanat J.L., Sauvaigo S., Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases, *Biol. Chem.*, 2002, 383(6), p. 93.
- [6] Favier A., Cadet J., Kalaryanaman R., Fontecave M., Pierre J.-L., *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*, Birkhauser, New-York, 1995.
- [7] Yoshikawa T., Yamamoto Y., Naito Y., *Free radicals in chemistry, Biology and Medicine*, Ed. Oica International, Londres, 2000.
- [8] Droge W., Free radicals in the physiological control of cell function, *Cellular Physiol. Rev.*, 2002, 82, p. 47.
- [9] Garcia, J.; Han, D.; Sancheti, H., Yap, L. P.; Kaplowitz, N.; Cadenas, E. Regulation of mitochondrial glutathione redox status and protein glutathionylation by respiratory substrates. *J. Biol. Chem.* 285:39646–39654; 2010.
- [10] Rebrin, I.; Kamzalov, S.; Sohal, R. S. Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice. *Free Radic. Biol. Med.* 35:626–635; 2003.
- [11] Gallogly, M. M.; Mieyal, J. J. Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7:381–391; 2007
- [12] Packer L., Protective role of vitamin E in biological systems, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991, 53, p. 1050S
- [13] Yoshikawa T., Yamamoto Y., Naito Y., *Free radicals in chemistry, Biology and Medicine*, Ed. Oica International, Londres, 2000.
- [14] Hozawa A, Jacobs D, Steffes M, et al. Relationships of circulating carotenoid concentrations with several markers of inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction : the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA)/ Young Adult Longitudinal Trends in Antioxidants (YALTA) Study. *ClinChem*, 2007, 53, 1-9.

- [15] Bors W., Heller W., Michel C., Sazanav L., Flavinoids as antioxidants: determination of radical-scavenging-efficiencies, *Methods in Enzymology*, **1990**, *186*, p. 343. *Clin Chim Acta*, 2006, *366*, 190-195.
- [16] Szlag M, Mikulski D, Molski M: Quantum-chemical investigation of the structure and the antioxidant properties of α -lipoic acid and its metabolites. *J Mol Model* 2012, *18*:2907–2916
- [17] Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM: Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta* 2009, *1790*(10):1149–1160.
- [18] McLain AL, Cormier PJ, Kinter M, Szewda LI: Glutathionylation of α -ketoglutarate dehydrogenase: the chemical nature and relative susceptibility of the cofactor lipoic acid to modification. *Free Radic Biol Med* 2013, *61C*:161–169.
- [19] Moini H, Packer L, Saris N-E: Antioxidant and prooxidant activities of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002, *182*:84–90.
- [20] Tritscheler HJ, Wolff SP: Thiocetic (lipoic acid): a therapeutic metal-chelating antioxidant? *Biochem Pharmacol* 1995, *50*:123–126.
- [21] Bast A, Haenen GR: Lipoic acid: a multifunctional antioxidant. *Biofactors* 2003, *17*(1–4):207–213.
- [22] Gulbidi S, Roldan M, Lopez I: Dihydro and alpha lipoic Acid. *Front Pharmacol* 2011, *2*:69
- [23] Koriyama Y, Nakayama Y, Matsugo S, Kato S: Protective effect of lipoic acid against oxidative stress is mediated by Keap1/Nrf2-dependent hemoxygenase-1 induction in the RGC-5 cell line. *Brain Res* 2013, *1499*:145–157.
- [24] Pullerits R, Bokarewa M, Dahlberg L, Tarkowski A. Decreased levels of soluble receptor for advanced glycation end products in patients with rheumatoid arthritis indicating deficient inflammatory control. *Arthritis Res Therapy*, 2005, *7*, 817-824.
- [25] Wilking M, Ndiaye M, Mukhtar H, Ahmad N: Circadian rhythms connection to oxidative stress: implications for human health. *Antioxid Redox Signal* 2013, *19*:192–208.
- [26] Al Abdan M: Alpha-lipoic acid controls tumor growth and modulates hepatic redox state in Ehrlich-ascites-carcinoma-bearing mice. *Scientific World Journal* 2012, *2012*:509838.
- [27] McNeilly AM, Davison GW, Murphy MH, Nadeem N, Trinick T, Duly E, Novials A, McEneny J: Effect of α -lipoic acid and exercise training on cardiovascular disease risk in Obesity with impaired glucose tolerance. *Lipids Health Dis*
- [28] Shiva Shanker Kaki, Carl Grey, Patrick Adlercreutz, Bioorganic synthesis, Characterization and antioxidant activity of esters of natural phenolics and lipoic acid, *Journal of Biotechnology* 157 (2012) 344–
- [29] Chichong Lu, Bo-Mi Kim, Kyu Yun Chai, Design, synthesis and evaluation of PEGylated lipoic acid derivatives with functionality as potent anti-melanogenic agents, *European Journal of Medicinal Chemistry* 46 (2011) 5184e5188

- [30] Shi-Jie Zhang, Qiu-Fu Ge, Dian-Wu Guo, Wei-Xiao Hu, Hua-Zhang Liu, Synthesis and anticancer evaluation of lipoic acid derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20 (2010) 3078–3083.
- [31] Maria Koufaki, Anastasia Detsi, Elissavet Theodorou, Christina Kiziridi, Theodora Calogeropoulou, Athanasios Vassilopoulos, Angeliki P. Kourounakis, Eleni Rekka, Panos N. Kourounakis, Catherine Gaitanaki and Panagiota Papazafiri, Synthesis of chroman analogues of lipoic acid and evaluation of their activity against reperfusion arrhythmias, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12 (2004) 4835–4841.
- [32] Vivechana Dixit, Jeroen Van den Bossche, Debra M. Sherman, David H. Thompson, and Ronald P. Andres, Synthesis and Grafting of Thioctic Acid-PEG-Folate Conjugates onto Au Nanoparticles for Selective Targeting of Folate Receptor-Positive Tumor Cells, *Bioconjugate Chem.* **2006**, 17, 603–609 60.
- [33] Tommaso Carofiglio, Roberto Fornasier, Laszlo Jicsinszky, Umberto Tonellato and Chiara Turco, Synthesis, characterization and chemisorption on gold of a β -cyclodextrin-lipoic acid conjugate, *Tetrahedron Letters* 42 (2001) 5241–5244.
- [34] M. Stiti, A. Cecchi, M. Rami, M. Abdaoui, V. Baragan-Montero, A. Scozzafava, Y. Guari, J.-Y. Winum and C. T. Supuran, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 16130–16131.
- [35] Jose M. Abad, Stijn F. L. Mortens, Marcos Pita, Victor M. Fernandez, and David J. Schiffrin, Functionalization of Thioctic Acid-Capped Gold Nanoparticles for Specific Immobilization of Histidine-Tagged Proteins 5694 *J. AM. CHEM. SOC.* 9 VOL. 127, NO. 15, 2005

Chapitre (III)

Résultats et Discussion

I)-Introduction :

Depuis le début des années 1980 l'emploi des nanotechnologies dans une approche thérapeutique ont pris un essor important et les domaines d'application sont aujourd'hui multiples [1-3]. Le développement des nanotechnologies a permis de proposer le concept de vectorisation des médicaments à l'aide d'outils de taille nanométrique qui sont capables d'acheminer des principes actifs (destinés à la thérapie) ou des agents de contraste (destinés au diagnostic) vers leur site d'action[4-7].

L'utilisation des nanoparticules(NP) dans le domaine biomédical exige notamment une solubilité élevée en solution aqueuse et une excellente stabilité en conditions physiologiques [8].

II)-Objectifs du travail :

Les objectifs du présent chapitre sont les suivants :

- (i) synthétiser en phase aqueuse des NP d'or stabilisées par un dithiol
- (ii) employer des techniques de routine qui permettent de les caractériser.

Pour ce faire, nous avons choisi de travailler avec des NP d'or stabilisées par l'acide lipoïque et nous avons essayé de comprendre l'origine de la meilleure stabilisation des NP d'or par ce ligand.

III)- Choix des nanoparticules :

L'objectif de cette étude consiste en l'élaboration d'une plateforme nanoparticulaire stable et de taille la plus petite possible pour faciliter la diffusion dans les fluides biologiques et au travers des barrières physiologiques (nasale, intestinale, membrane cellulaire,...) [9]. De plus, cette plateforme doit être capable de véhiculer un agent thérapeutique pour traiter diverses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires et le cancer. Afin d'assurer ces attentes et ce rôle de plateforme thérapeutique, les NP doivent répondre à un certain nombre de critères [10-11] :

- i) présenter une taille inférieure à 100 nm;
- ii) être non cytotoxiques et biocompatibles
- iii) être stables (pas d'aggrégation) au contact des fluides corporels;
- iv) être « furtives » vis-à-vis du système des phagocytes pour prolonger leur temps de circulation dans le sang etc...

Les nanoparticules d'or sont bien aimées des biologistes. L'or est un métal noble, réputé non toxique, même à l'échelle nanométrique. De plus, les nanoparticules d'or ont une excellente stabilité et leur réponse optique ne présente pas de fluctuations dans le temps. Leurs

possibilités d'applications sont non seulement liées aux propriétés intrinsèques de leur cœur métallique mais aussi et surtout à leurs énormes capacités de fonctionnalisation (et de multi fonctionnalisation) en surface par greffage de molécules soufrées (notamment biologiques) [12-15].

La présence à la surface externe des NP de groupements organiques fonctionnels libres permet le greffage ultérieur de molécules d'intérêt pharmacologique.

Par exemple, les NP d'or ont été utilisées en tant que véhicules pour améliorer la perméabilité de principes actifs (tels que l'insuline, le méthotrexate, le paclitaxel, la streptomycine et la kanamycine) à travers les barrières physiologiques [16-18].

Récemment, un essai clinique de phase (I) a été approuvé par l'agence de réglementation suisse pour évaluer le potentiel des NP d'or en tant que véhicule pour l'administration par voie orale de l'insuline chez l'Homme [19].

IV)-Choix de l'agent stabilisant :

Dans notre étude nous avons choisi comme ligand l'acide alpha-lipoïque également connu sous le nom d'acide thioctique, c'est une substance qui est produite naturellement dans les plantes, les animaux et chez l'homme en petites quantités. Lorsqu'il est synthétisé de façon endogène, il est lié à une protéine et agit comme cofacteur de nombreuses et importantes enzymes mitochondriales [20].

L'acide alpha-lipoïque possède la particularité d'agir à la fois dans des environnements hydro et liposolubles de l'organisme. En d'autres termes, l'acide alpha-lipoïque peut accéder à n'importe quelle partie de la cellule [21].



Figure19: Structures moléculaires de l'acide α -lipoïque (I) et l'acide dihydrolipoïque(DHLA) (II).

Mais l'acide alpha-lipoïque a été choisi aussi pour deux raisons principales:

- Il s'agit tout d'abord d'un composé non toxique. Il est un puissant antioxydant endogène et peut piéger les radicaux libres, chélater les métaux et régénérer d'autres antioxydants (**voir chapitre(II)**).

- L'acide alpha-lipoïque présente une grande affinité pour la surface des NP d'or grâce à ses deux groupements fonctionnels thiols [22,23].

V)- Choix de la méthode de synthèse des nanoparticules d'or :

Les nanoparticules d'or peuvent être obtenues par plusieurs méthodes de synthèse. La plus facile à accomplir, c'est la méthode chimique, qui se base sur la réduction d'un précurseur d'or (sel ou acide) par un agent réducteur (citrate de sodium, borohydrure de sodium...) [24-26].

Des NP d'or fonctionnalisées par le DHLA ont été synthétisées auparavant par Roux et al. [27] et Stiti et al [28] (voir figure 21 & figure 22) en phase organique, en se basant sur la synthèse de Brust et al. (1994) [29]. L'inconvénient de cette méthode est l'utilisation d'un solvant organique (méthanol, toluène, DMSO....) difficile à éliminer par la suite pour une utilisation dans des milieux biologiques.

Pour palier à cet inconvénient majeur, nous avons choisi de synthétiser ces NP en phase aqueuse. En effet, l'utilisation de l'eau comme solvant est plus adéquat pour des applications ultérieures dans le domaine de la santé. Nous avons utilisé une synthèse en deux étapes :

La première étape de synthèse consiste à synthétiser des NP d'or stabilisées par les ions citrates selon la méthode classique de Terkovich et al. [30] avec de légères modifications.

Lors d'une seconde étape de synthèse, les NP d'or stabilisées par les ions citrates ont été fonctionnalisées par le DHLA par échange de ligands.

En effet, l'acide alpha-lipoïque possède un groupement polaire chargé négativement à pH supérieur à 4,85, entraînant une répulsion entre les NP d'or de même charge et une chaîne latérale lipophile créant un effet stérique. De plus, ce ligand se lie fortement à la surface des NP d'or de manière covalente, assurant une faible réactivité chimique des NP d'or [27,31-33].

Cette procédure de synthèse a permis de définir une plateforme nanoparticulaire fonctionnalisée à base d'acide alpha-lipoïque.

réaction, le milieu réactionnel est agité pendant une période supplémentaire de 5 min, et la solution colloïdale rouge foncée résultante est immédiatement stocké dans l'obscurité à 4°C.

2)-Préparation des nanoparticules d'or enrobée d'acide lipoïque:

600 μmol d'acide lipoïque dissout dans 10 ml d'une solution aqueuse de NaOH 0.5 mol/l sont ajoutés à 25 ml d'une suspension colloïdale des nanoparticules d'or enrobée de citrate de sodium fraîchement préparées. Le mélange réactionnel est agité pendant 24 h à une température de 20 à 23°C.

Les nanoparticules d'or obtenues ont été soumises deux fois successives à une centrifugation à 7000 tours par minute pendant 10 min en présence d'eau distillée et de d'éthanol pour éliminer tout les sels et l'acide lipoïque n'ayant pas réagi. Enfin la suspension colloïdale a été conservée dans des flacons de verres scellés.

Le changement de couleur, permet de suivre l'évolution de la réaction. En effet, la **figure 20** montre la couleur de la suspension colloïdale qui change de jaune clair au jaune pâle puis grisâtre sombre (nanoparticules d'or stabilisées par les citrates) et bleuâtre en passant par une couleur vin rouge et enfin une couleur noirâtre (nanoparticules d'or stabilisées par l'acide dihydrolipoïque).

C'est la bande de résonance plasmon des nanoparticules d'or (coefficient d'extinction molaire $\sim 24 \cdot 10^8 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) qui est à l'origine de la couleur rouge vin de la solution colloïdale d'or [34].

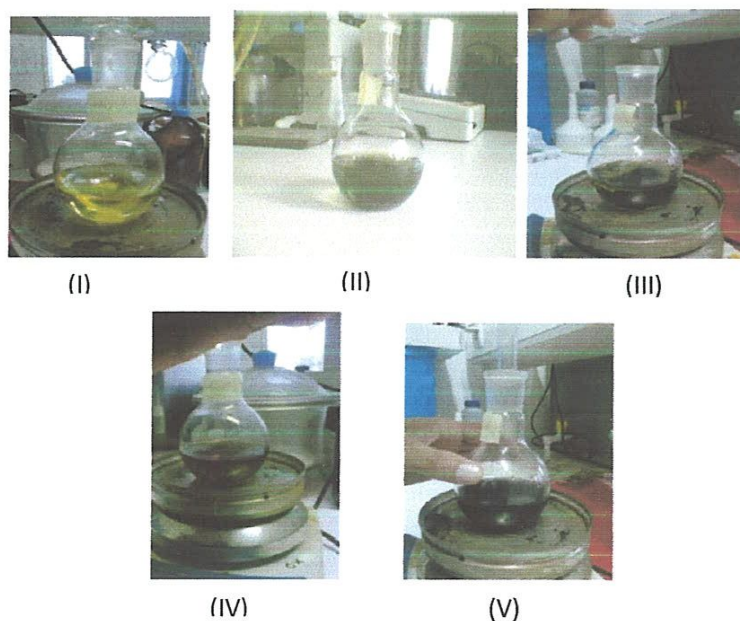


Figure 20: Formation des nanoparticules d'or stabilisées par les citrates et l'acide dihydrolipoïque à partir d'une solution d'acide chloraurique.

VI)-Optimisation des conditions opératoires :

Pour avoir des nanoparticules avec les caractéristiques souhaitées (stabilité, taille faible, dispersion), on a pu jouer sur plusieurs paramètres:

En effet, la taille moyenne pour la synthèse directe de ces nanoparticules peut être modifiée de diverses manières, en jouant tout d'abord :

- sur la quantité de réducteur : augmentation en réducteur pour réduire la taille.
- Sur la vitesse d'agitation durant l'étape de nucléation : augmentation de la vitesse dans le but de diminuer la vitesse de nucléation pour réduire la taille,

Une hétérogénéité en taille est souvent caractéristique d'un taux de nucléation irrégulier. Afin de réduire ces problèmes, les solutions utilisées doivent être fraîchement préparées et filtrées pour minimiser les impuretés.

Dans la plupart des synthèses, la nucléation se déroule spontanément à moins d'une seconde après l'addition du réducteur, c'est pourquoi, la solution réductrice doit être ajoutée rapidement avec une vitesse d'agitation suffisante pendant et après l'addition.

Les nanoparticules ainsi obtenues sont isolées sous forme d'une poudre noire après une série de lavages (eau distillée, C_2H_5OH) afin d'éliminer le $NaBH_4$ et l'excès des ligands.

Cette poudre noire est facilement redispersable dans différents solvants.

VII)- Stabilité et réactivité des nanoparticules d'or :

Afin d'assurer leur rôle de « vecteurs de molécules biologiquement actives », les NP d'or doivent être stables dans un milieu physiologique, et présenter une surface non réactive aux molécules présentes dans l'organisme.

Notre hypothèse de travail a été la suivante: les NP d'or sont d'autant plus stables et non réactives vis-à-vis des biomolécules qu'elles sont fortement stabilisées et plus couvertes par le ligand greffé [26].

En effet, les ions citrates d'agent stabilisant sont adsorbés à la surface métallique par des liaisons hydrogène non stables en milieu physiologique (interaction de faible énergie avec le cœur métallique). En revanche, les NP d'or couvertes de DHLA, en raison de ses deux groupements thiol s'ancrant de façon covalente à la surface métallique, (interaction de forte énergie); offrent une meilleure stabilité à la NP d'or pour des applications biologiques futures. De plus, la densité de couverture est un paramètre crucial pour améliorer la stabilité des NP d'or en solution physiologique. Une densité élevée est idéale pour obtenir une meilleure stabilité colloïdale [35].

Ces NP d'or enrobées de DHLA élaborées par une méthode de synthèse sans résidu de solvant organique et stables dans des conditions physiologique (à pH = 7.4 .peuvent présenter donc un fort potentiel pour des applications biologiques futures pour par exemple véhiculer un principe actif greffé en surface [36 ,37].

Tels sont des principes actifs à visée antioxydante comme le glutathion (**Schéma 12**) ou d'autres structure médicamenteuses en formant une liaison covalente de type amide avec la fonction acide du ligand [38 ,39].

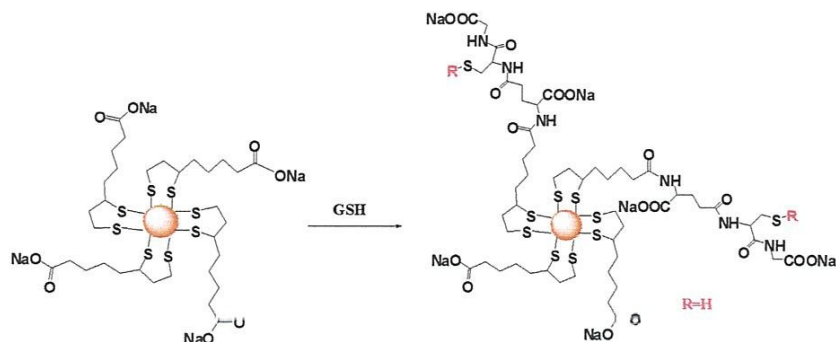


Schéma 12 : Fonctionnalisation de la surface des NP d'or stabilisées par l'acide dihydrolipoïque par le glutathion(GSH):une molécule active à visée antioxydante.

VIII)- Caractérisation physico-chimique des nanoparticules d'or obtenues :

La caractérisation complète des NP d'or reste une tâche extrêmement complexe, qui tend à freiner la recherche dans ce domaine. Cette caractérisation est primordiale pour valider le résultat et le mode de synthèse et mieux prévoir les effets biologiques et les applications à venir.

Les techniques approfondies de détermination des propriétés physico-chimiques,(taille, morphologie, état de surface, ...etc) classiquement décrites dans la littérature [40,41] sont :

La microscopie électronique à transmission(MET) (**Figure 21**), la spectroscopie UV-visible, la microscopie électronique à balayage(MEB), la diffraction des rayons x, la spectroscopie infrarouge(IR)etc.

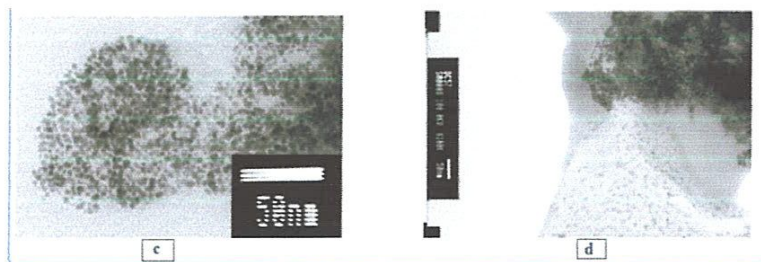


Figure 21: Micrographies de microscopie électronique en transmission (MET) de nanoparticules d'or obtenues dans le DMSO [28], La barre d'échelle représente 50 nm pour toutes les images.

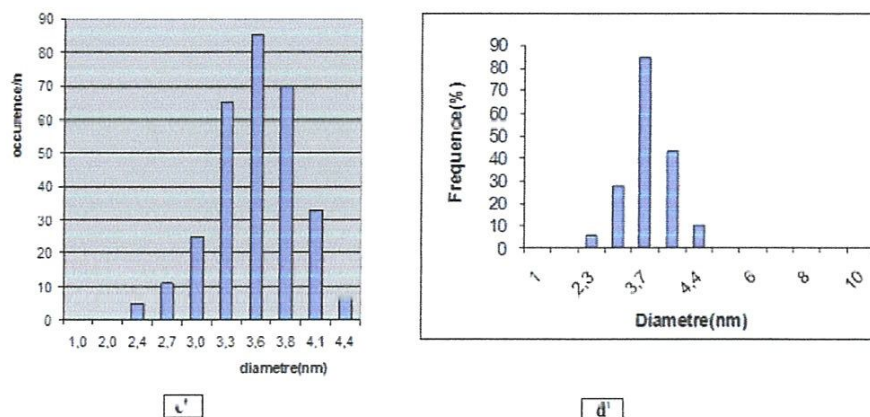


Figure 22: Histogrammes de distribution de taille (c') et (d') correspondants respectivement aux images(c) et (d) représentées sur la figure 21.

-Séparation centrifuge des nanoparticules obtenues :

Avant la caractérisation des nanoparticules obtenues, nous avons procédé à une centrifugation dans le but de les séparer et de s'assurer de leur pureté.

Une centrifugeuse est un appareil destiné à séparer les particules d'une taille donnée à partir d'une solution colloïdale qui contient des nanoparticules de tailles différentes et ce grâce à un mouvement de rotation.

Ce type d'appareil peut aussi servir à séparer les mélanges constitués de parties ayant une densité différente. Sous l'effet de la rotation, une accélération due à une force centrifuge est appliquée au contenu.

Avec l'utilisation d'une ultra-haute vitesse centrifugeuse (7000 tours par minute), la suspension obtenue a été lavée trois fois avec de l'eau distillée et l'éthanol pour éliminer tous

les produits résidus et enfin stockée dans un flacon ambré à la température ambiante pour une utilisation ultérieure.

Dans notre étude, la caractérisation physico-chimique des NP d'or stabilisées par les ions citrates et l'acide lipoiq ue a été réalisée avec les spectroscopies UV-visible et IR



Figure 23:Centrifugeuse utilisée pour la séparation et la purification des nanoparticules obtenues

VIII-a) Caractérisation par spectroscopie UV-Vis (ultraviolet-visible):

1-Principe de la spectroscopie UV- Visible :

La spectroscopie UV-Vis est un outil important pour les analyses qualitatives et quantitatives; Elle rend compte de l'interaction entre une onde électromagnétique et la matière. A l'échelle atomique, la matière n'étant pas continue mais constituée d'assemblage de particules élémentaires, l'énergie ne l'est pas non plus et ne peut prendre que des valeurs discrètes.

Chaque substance absorbe des radiations bien déterminées selon sa structure ;

La détermination des longueurs d'onde des rayonnements électromagnétiques absorbés par un échantillon se fait grâce à l'utilisation d'un spectrophotomètre.

2-Appareillage et Fonctionnement :

L'appareil le plus utilisé est le spectrophotomètre double-faisceau, dont le schéma de principe est présenté ci-dessous (**Schéma 13**): Deux sources lumineuses sont tenues de balayer l'ensemble des radiations UV-Vis: Une lampe de deutérium et une lampe de Tungstène éclairent toute la bande des UV-Vis e tun monochromateur (grille ou prisme) change progressivement les petites bandes de rayonnement et l'envoie au séparateur de faisceau. Après cela, le séparateur de faisceau réalise une bande distincte à une cellule contenant la solution d'échantillon et une solution de référence. Le détecteur mesure la différence entre la lumière transmise à travers l'échantillon (I) par rapport à la lumière incidente (I_0) et envoie cette information à l'enregistreur.

Dans notre étude, les mesures sont effectuées sur un spectrophotomètre UV-1800 Shimadzu, en utilisant des cuves en quartz de 1 centimètre de trajet optique. Toutes les mesures sont prises à 20-23 °C, la solution mère est diluée 5 fois pour la mesure, le spectre est pris entre 200 to 900 nm.

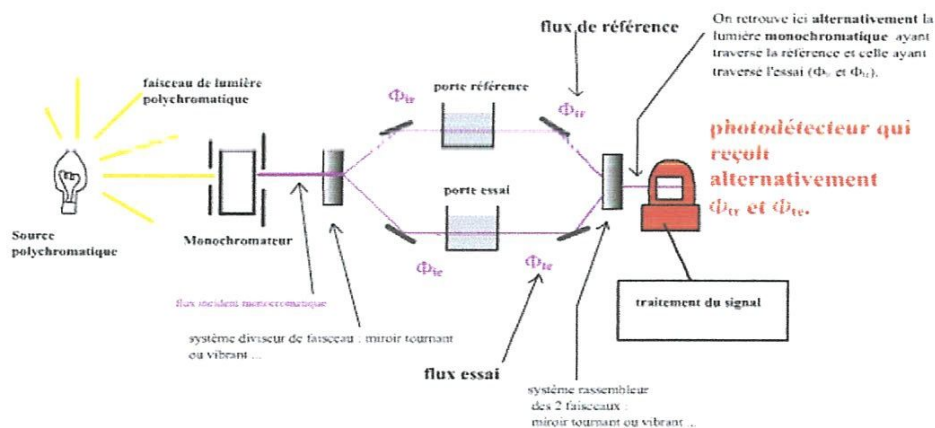


Schéma 13 : Représentations schématiques de spectrophotomètres de type double faisceau.

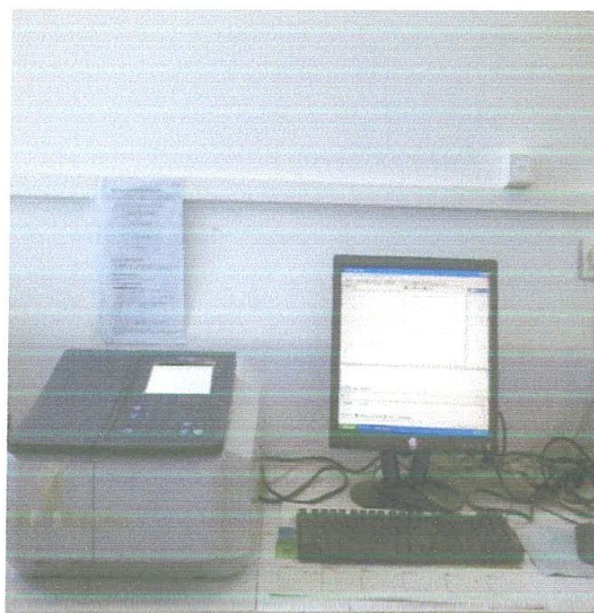


Figure 24 : Image de l'équipement UV-Vis utilisé dans cette étude

Les spectres UV-visible des nanoparticules étudiées en suspensions dans des solutions aqueuses présentent une bande d'absorption très intense qui est centré autour de 542 nm correspondant aux nanoparticules d'or stabilisées par les citrates (**figure 25**) et une bande qui se situe à 532 nm liée aux nanoparticules d'or enrobées par l'acide lipoiique (**Figure 26**) qui sont typiques et caractéristiques des colloïdes d'or confirmant ainsi leurs faibles diamètres.

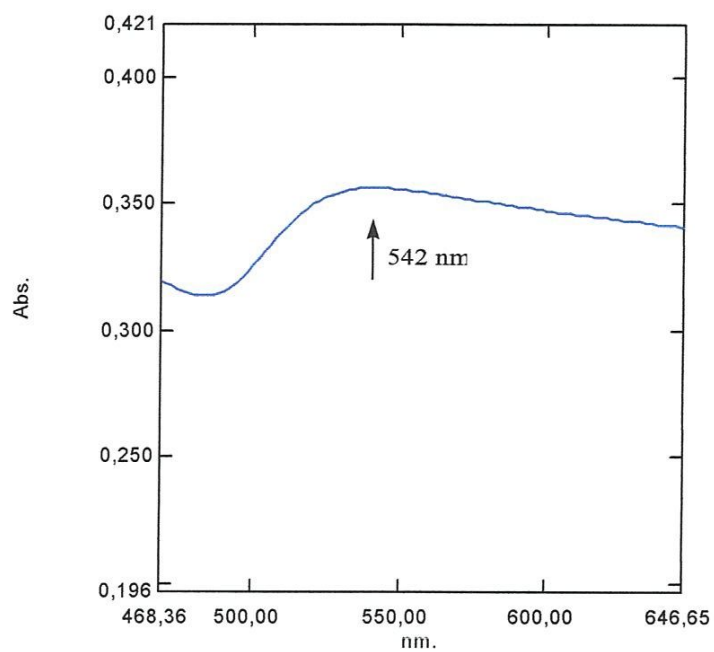


Figure 25: Spectre UV-visible en solutions de nanoparticules d'or stabilisées par es citrates.

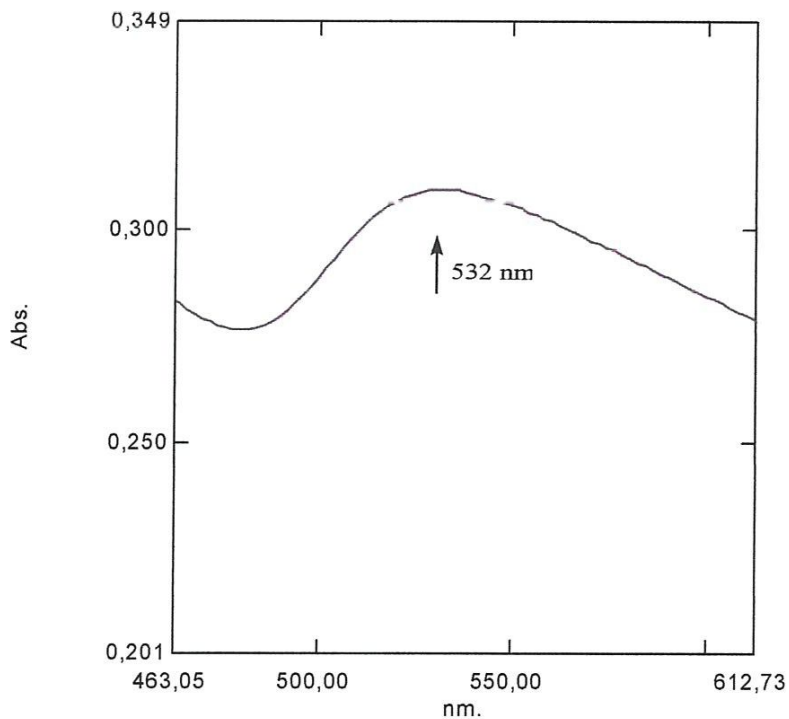


Figure 26: Spectre UV-visible en solutions de nanoparticules d'or stabilisées par l'acide dihydrolipoïque

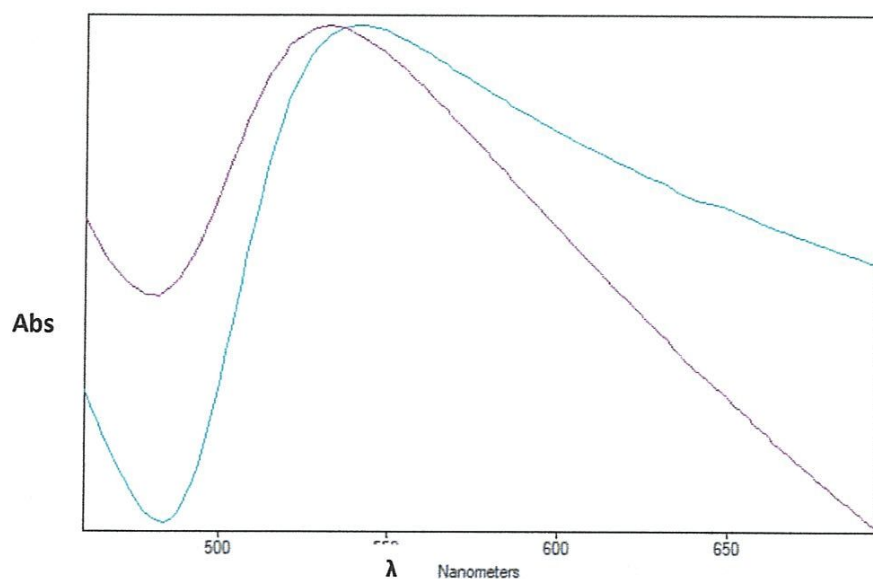


Figure 27 : Spectres UV-visible de nanoparticules d'or stabilisées par les citrates(en turquoise) et l'acide lipoiq(en mauve) montrant un effet bathochrome.

Cette caractéristique optique typique des solutions d'or est reliée à une oscillation collective des électrons conducteurs en réponse à une excitation optique. L'intensité de la bande d'absorption varie en fonction du diamètre, donc sur les spectres des nanoparticules de plus grandes tailles, on observe une courbe avec un maximum bien défini, tandis qu'avec les nanoparticules de petites tailles (< 3 nm), on remarque seulement un petit épaulement autour de 520 nm.

La dimension nanométrique des NP d'or (inférieure à 20 nm) facilite leur passage à travers des barrières physiologiques, mais surtout évite aux NP d'or d'être éliminées rapidement par les systèmes de défense de l'organisme, ce qui permet d'augmenter leur temps de résidence dans le sang. Cette dimension représente donc un avantage pour leur fonction de vecteur [5].

Par ailleurs, d'autres études ont démontré que l'intensité de cette bande était sensible au solvant dans lequel les nanoparticules ont été formées [40].

La fonctionnalisation des NP d'or par le DHLA a provoqué un déplacement hypsochromique de λ_{max} , ce qui prouve l'échange des ligands citrates par les ligands DHLA.

VIII.b)- Caractérisation par spectroscopie infrarouge (FT-IR (infrarouge à transformée de Fourier) :

Pour avoir de l'information structurale sur la couche protectrice de ligands qui entourent les nanoparticules, nous avons utilisé l'analyse fonctionnelle par spectroscopie infrarouge.

La spectroscopie infrarouge (parfois désignée comme spectroscopie IR) est une classe de spectroscopie qui traite de la région infrarouge du spectre électromagnétique. Elle recouvre une large gamme de techniques, la plus commune étant un type de spectroscopie d'absorption. elle peut être employée pour l'identification des groupes fonctionnels présents dans une molécule ou pour déterminer la composition d'un échantillon en se servant des tables de corrélation de spectroscopie infrarouge largement présentes dans la littérature scientifique. C'est une technique très sensible qui peut nous donner énormément d'information et ce, même si une très faible quantité de produit est utilisée.

1-Appareillage et Fonctionnement :

Les spectres FT-IR des échantillons ont été enregistrés en utilisant un modèle Perkin Elmer Système (Waltham, MA) FT-IR.

Pour l'enregistrement des spectres, nous avons adopté la technique de pastille de KBr la plus couramment utilisée.



Figure 28 : Image des instruments FT-IR utilisé dans cette étude

2-Principe de la spectroscopie IR :

Cette technique qui nécessite une source de la lumière qui génère des radiations dans la région infrarouge et un monochromateur (prisme) qui sépare le rayonnement de la source dans ses différentes longueurs d'onde. Une fente sélectionne l'ensemble des longueurs d'onde

qui brillent à travers l'échantillon à un moment donné qui est par la suite recueilli par le détecteur (Schéma 14).

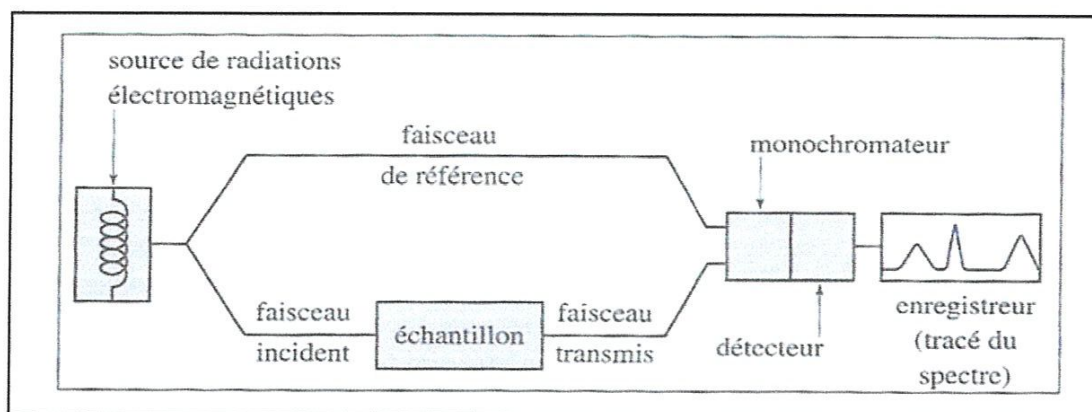


Schéma 14 : Représentations schématiques de principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre IR

On obtient des spectres qui mesurent la transmittance (T) en fonction du nombre d'onde et non l'absorbance (A) (d'où l'allure des spectres inversés) :

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Avec :

I : intensité du faisceau transmis (après passage dans l'échantillon)

I_0 : intensité du faisceau incident (faisceau de référence)

La loi de Beer-Lambert est aussi valable en spectroscopie IR:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon_{\lambda} \ell c$$
$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-\varepsilon_{\lambda} \ell c}$$

Avec :

ε_{λ} : coefficient d'extinction moléculaire

ℓ : chemin optique

c : Concentration

Actuellement on utilise des spectrophotomètres infrarouge à transformée de Fourier, ce qui permet d'obtenir toutes les fréquences en même temps sans effectuer un balayage. On obtient les spectres plus rapidement.

2-Préparation de l'échantillon :

La préparation dépend de l'appareil utilisé: on peut soit analyser directement le composé pur soit le solubiliser dans un solvant (pour un liquide) ou le disperser dans un solide (pour un solide) avant l'analyse.

a) Analyse du composé pur:

On place quelques gouttes (pour un liquide) ou une pointe de spatule (pour un solide) entre des plaques faites d'un sel qui n'absorbe pas dans le domaine de l'infrarouge (NaCl, KBr, AgCl)

b) Analyse du composé dilué ou dispersé:

Pour les solides, on prépare une pastille de bromure de potassium (KBr) à l'aide d'une presse dans laquelle on a dispersé le composé à analyser.

Pour les liquides, on mélange le composé à un solvant inerte (le plus souvent le tétrachlorure de carbone). Ce solvant absorbe dans l'infrarouge, mais on peut s'affranchir de ce problème en plaçant une cellule de compensation contenant le solvant pur sur le trajet du faisceau de référence.

Pour avoir une preuve plus directe du greffage des ligands citrates et acide lipoiqque sur les nanoparticules d'or, une analyse par spectrométrie infrarouge a été conduite en tirant les spectres (IR) de l'acide lipoiqque, des nanoparticules d'or stabilisées par les ions citrates et

celles enrobées de DHLA, ces spectres sont représentés respectivement sur les figures 29, 30 et 31.

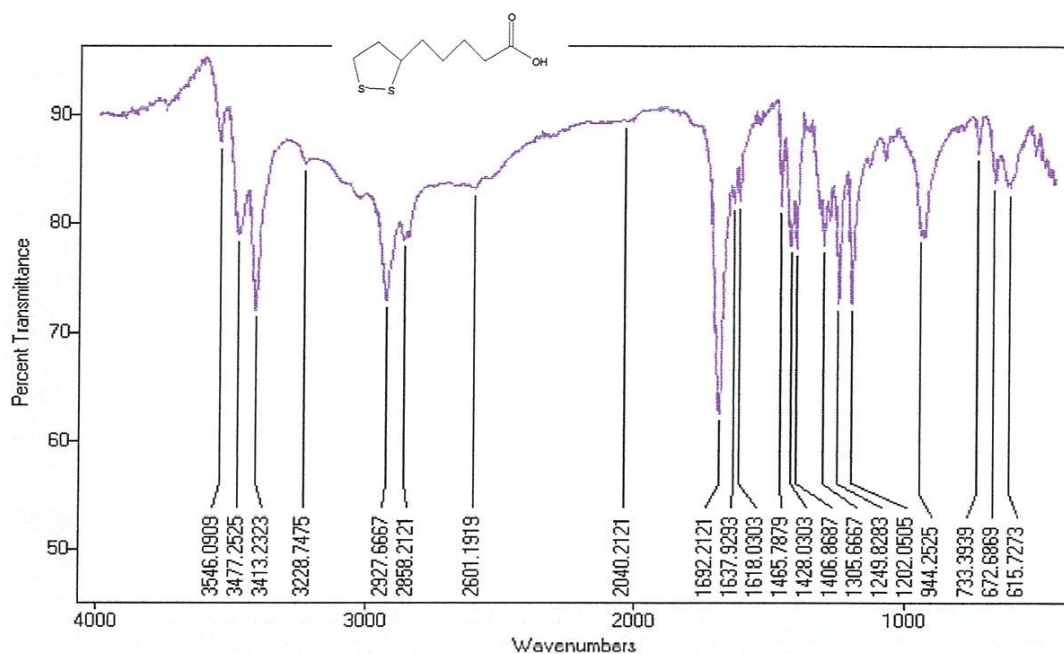


Figure 29 : Spectre(IR) de l'acide lipique

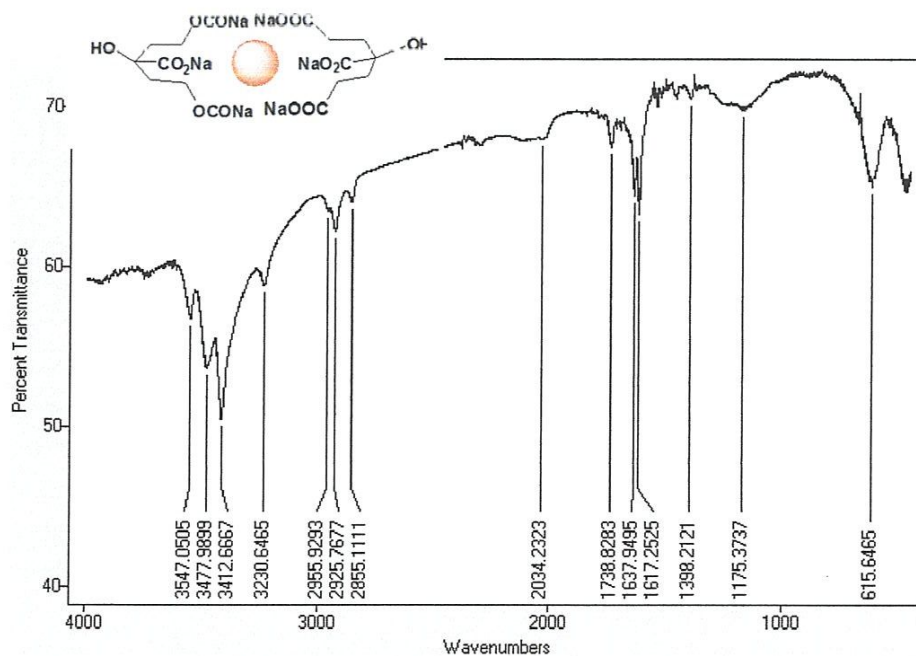


Figure 30 : Spectre(IR) de nanoparticules d'or stabilisées par les citrates.

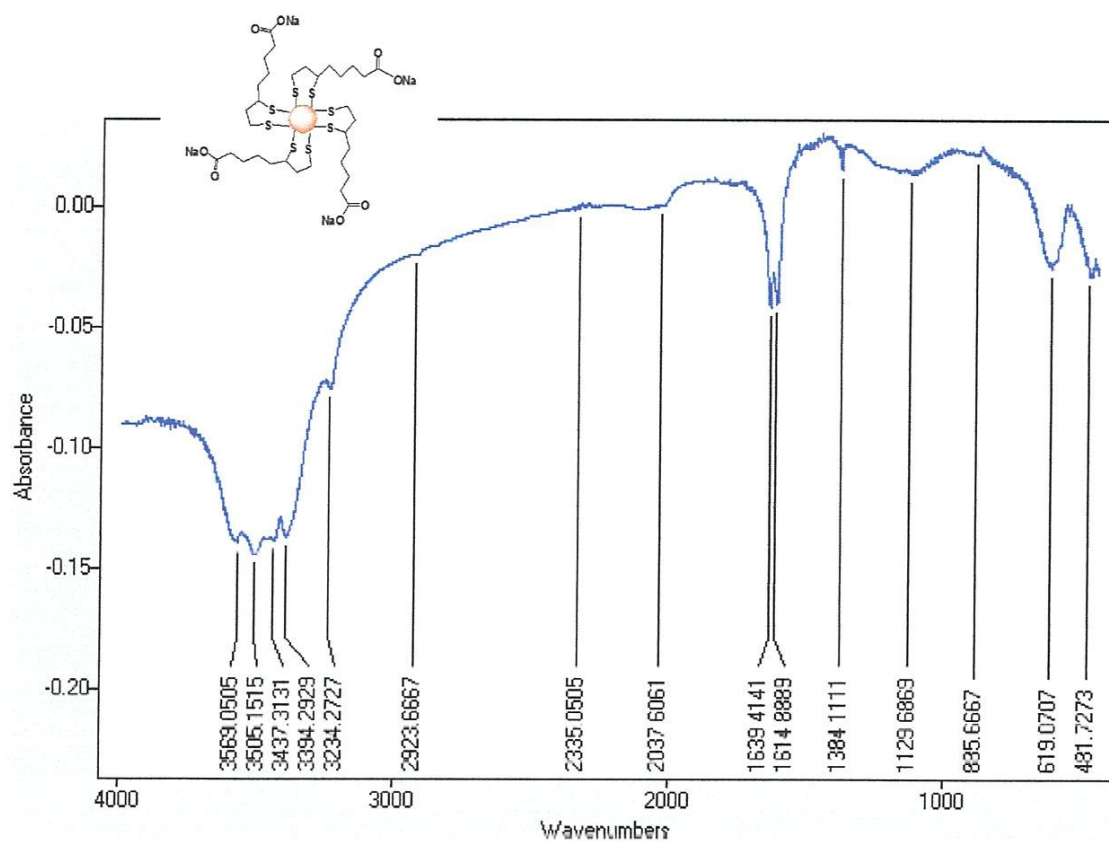
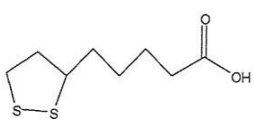

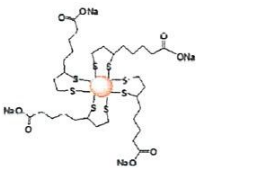


Figure 31: Spectre (IR) de nanoparticules d'or stabilisées par l'acide dihydroliquoique.

Les principales bandes d'absorption de ces produits sont récapitulées dans le **tableau 2** suivant :

Tableau 2 : principales bandes d'absorption dans l'acide lipoïque, les nanoparticules d'or stabilisées par les citrates et les celles enrobées de DHLA

	$\bar{\nu}$ (cm ⁻¹)	commentaires
	3413	OH acide carboxylique
	2858-2957	-CH ₂ - aliphatique
	1692	C=O acide carboxylique
	1428	-CH ₂ -S cyclique
	733	S-S cyclique
	3412	OH alcool
	2855	-CH ₂ - aliphatique
	1637-1617	COO ⁻ (jumelles) carboxylate de Na
	3505-3234	OH (résidu de citrates non échangé avec DHLA.)
	2923	-CH ₂ - aliphatique
	1639-1614	COO ⁻ (jumelles) carboxylate

La superposition de ces trois spectres montre leur grande ressemblance, ce résultat met en évidence la formation des nanoparticules d'or et confirme que les nanoparticules d'or sont réellement ornées ou enrobées de ligands citrates et acide lipoïque.

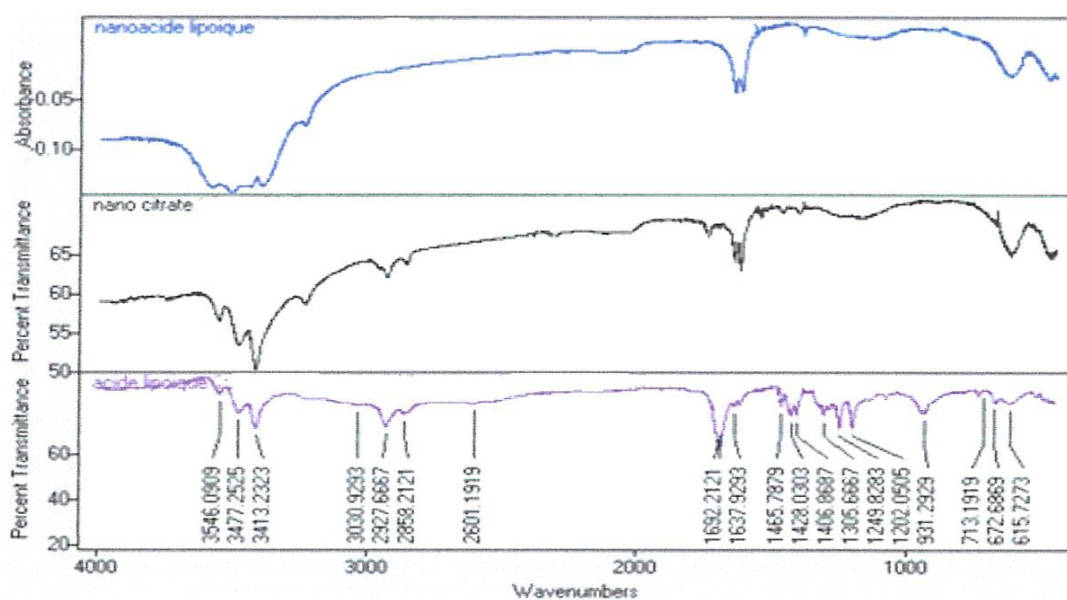


Figure 32 : Spectres (IR) de l'acide lipoïque(en mauve) et des nanoparticules d'or stabilisées par les citrates(en noir) et l'acide dihydrolipoïque(en bleu) superposés en mode décalé.

Certains indices remarquables pourraient démontrer la présence de nos ligands à la surface des nanoparticules comme l'apparition de deux bandes jumelles vers: 1637 cm^{-1} et 1617 cm^{-1} dans les nanoparticules enrobées de citrates et deux autres vers 1639 cm^{-1} et 1614 cm^{-1} et assignées aux vibrations symétriques et asymétriques des ions carboxylates.

On constate également l'apparition d'une bande vers 733 cm^{-1} attribuée à l'élongation de la liaison S-S dans le cycle de l'acide lipoïque contenant un pont dissulfure ; et son absence dans le spectre des nanoparticules stabilisées par le DHLA ce qui démontre clairement le clivage de ce pont lors de la réaction de réduction avec le NaBH_4 et formation des nanoparticules d'or couvertes de DHLA.

IX)-Conclusion :

Ce travail est consacré à la synthèse de nanoparticules d'or fonctionnalisées par un composé dithiol, plus précisément l'acide lipoïque ainsi qu'à leur caractérisation physico-chimique.

L'élaboration de ces nanoparticules en milieu aqueux a été basée sur la méthode de Turkevich modifiée.

En effet, l'utilisation du NaBH_4 comme réducteur et d'un excès d'acide lipoïque, nous a permis d'aboutir à une plateforme nanoparticulaire à base d'acide lipoïque.

De part leurs tailles nanométriques, ces nanoparticules conviennent parfaitement à des applications dans le domaine thérapeutique: soit pour le diagnostic soit pour le traitement par un ciblage spécifique des systèmes biologiques.

Références

- [1]De, M., Ghosh, P.S., Rotello, V.M. Applications of nanoparticles in biology. *Adv Mater.* 2008;20: 4225-4241.
- [2]Zhang, Y., Huang, R., Zhu, X., Wang, L., Wu, C. Synthesis, properties, and optical applications of noble metal nanoparticle-biomolecule conjugates. *Chinese Sci Bull.* 2012; 57: 238-246.
- [3]Boisselier, E., Astruc, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Soc Rev.* 2009; 38: 1759-1782.
- [4]Astruc, D., Daniel, M.C., Ruiz, J. Dendrimers and gold nanoparticles as exo-receptors sensing biologically important anions. *Chem Commun.* 2004; 23: 2637-2649.
- [5]Ackerson, C.J., Jadzinsky, P.D., Sexton, J.Z., Bushnell, D.A., Kornberg, R.D. Synthesis and bioconjugation of 2 and 3 nm-diameter gold nanoparticles. *Bioconjugate Chem.* 2010; 21: 214-218.
- [6]Boisselier, E., Astruc, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Soc Rev.* 2009; 38: 1759-1782.
- [7]Balasubramanian, S.K., Yang, L., Yung, L.-Y.L., Ong, C.-N., Ong, W.-Y., Yu, L.E. Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles. *Biomaterials.* 2010a; 31: 9023-9030.

- [8] Daniel, M.C., Astruc, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev.* 2004; 104: 293-346.
- [9] Baptista, P., Pereira, E., Eaton, P., Doria, G., Miranda, A., Gomes, I., Quaresma, P., Franco, R. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Anal Bioanal Chem.* 2008; 391: 943-950.
- [10] Bogliotti, N., Oberleitner, B., Di-Cicco, A., Schmidt, F., Florent, J.C., Semetey, V. J. Optimizing the formation of biocompatible gold nanorods for cancer research: Functionalization, stabilization and purification. *Colloid Interf Sci.* 2011; 357; 75-81.
- [11] Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C.K., Rotello, V.M. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60: 1307-1315.
- [12] Llevot, A., Astruc, D. Applications of vectorized gold nanoparticles to the diagnosis and therapy of cancer. *Chem Soc Rev.* 2012; 41: 242-257.
- [13] Dreaden, E.C., Alkilany, A.M., Huang, X., Murphy, C.J., El-Sayed, M.A. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem Soc Rev.* 2012; 41: 2740-2779.
- [14] Duncan, B., Kim, C., Rotello, V.M. Gold nanoparticles platforms as drug and biomacromolecule delivery systems. *J Control Release.* 2010; 148: 122-127.
- [15] Love, J.C., Estroff, L.A., Kriebel, J.K., Nuzzo, R.G., Whitesides, G.M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem Rev.* 2005; 105: 11039.
- [16] Lubitz, I., Kotlyar, A. G4-DNA-Coated gold nanoparticles: synthesis and assembly. *Bioconjugate Chem.* 2011; 22: 2043-2047.
- [17] Nguyen, D.T., Kim, D.-J., Kim, K.-S. Controlled synthesis and biomolecular probe application of gold nanoparticles. *Micron.* 2011; 42: 207-227.
- [18] Joshi, H.M., Bhumkar, D.R., Joshi, K., Pokharkar, V., Sastry, M. Gold nanoparticles as carriers for efficient transmucosal insulin delivery. *Langmuir.* 2006; 22: 300-305.
- [19] Alan. Trial of Insulin-Coated Gold Nanoparticles Approved. In: *Science Business*; 2011. <http://sciencebusiness.technewslit.com/?p=6957>.
- [20] Wuelfing, W.P., Gross, S.M., Miles, D.T., Murray, R.W. Nanometer gold clusters protected by surface-bound monolayers of thiolated poly(ethylene glycol) polymer electrolyte. *J Am Chem Soc.* 1998; 120: 12696-12697.
- [21] Garcia, B., Salome, M., Lemelle, L., Bridot, J.L., Gillet, P., Perriat, P., Roux, S., Tillement, O. Sulfur K-edge XANES study of dihydrolipoic acid capped gold nanoparticles: dihydrolipoic acid is bound by both sulfur ends. *Chem Commun.* 2005: 369-371.

- [22] Vance, A.L., Willey, T.M., Nelson, A.J., van Buuren, T., Bostedt, C., Terminello, L.J., Fox, G.A., Engelhard, M., Bear, D. XAS and XPS characterization of monolayers derived from a dithiol and structurally related disulfide-containing polyamides. *Langmuir*. 2002; 18: 8123-8128.
- [23] Zhou, J.F., Ralston, J., Sedev, R., Beattie, D.A. Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. *J Colloid Interface Sci*. 2009; 331: 251-262.
- [24] Chen, S., Kimura, K. Synthesis and characterization of carboxylate-modified gold nanoparticle powders dispersible in water. *Langmuir*. 1999; 15: 1075-1082.
- [25] Paciotti, G.F., Kingston, D.G.I., Tamarkin, L.. Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors *Drug Dev Res*. 2006; 67: 47-54.
- [26] Sperling, R.A., Parak, W.J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philos Trans A*. 2010; 368: 1333-1383.
- [27] Roux, S., Garcia, B., Bridot, J.-L., Salomé, M., Marquette, C., Lemelle, L., Gillet, P., Blum, ., Perriat, P., Tillement, O. Synthesis, characterization of dihydrolipoic acid capped gold nanoparticles, and functionalization by the electroluminescent luminol. *Langmuir*. 2005; 21: 2526-2536.
- [28] M. Stiti, A. Cecchi, M. Rami, M. Abdaoui, V. Baragan-Montero, A. Scozzafava, Y. Guari, J.-Y. Winum and C. T. Supuran, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 16130–16131.
- [29] Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D.J., Whyman, R. Synthesis of thiol-derivatized gold nanoparticles in a 2-phase liquid-liquid system. *J Chem Soc, Chem Commun*. 1994: 801-
- [30] Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H., Plech, A. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *J Phys Chem B*. 2006; 110: 15700-15707.
- [31] Brewer, S. H., Glomm, W. R., Johnson, M. C., Knag, M. K., Franzen, S. Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces. *Langmuir*. 2005; 21: 9303-9307.
- [32] Zhu, T., Vasilev, K., Kreiter, M., Mittler, S., Knoll, W. Surface modification of citrate-reduced colloidal gold nanoparticles with 2-mercaptosuccinic acid. *Langmuir*. 2003; 19: 9518-9525.
- [33] Oh, E., Susumu, K., Goswami, R., Mattoussi, H. One phase synthesis of water-soluble gold nanoparticles with control over size and surface functionalities. *Langmuir*. 2010; 26: 7604-.
- [34] Liu, X., Atwater, M., Wang, J., Huo, Q. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids Surf B*. 2007; 58: 3-7.
- [35] Sakura, T., Takahashi, T., Kataoka, K., Nagasaki, Y. One-pot preparation of mono-dispersed and physiologically stabilized gold colloid. *Colloid Polym Sci*. 2005; 284: 97.

- [36] Paszko, E., Ehrhardt, C., Senge, M.O., Kelleher, D.P., Reynolds, J.V. Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagn Photodyn*. 2011; 8: 14-29.
- [37] Pissuwan, D., Niidome, T., Cortie, M.B. The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems. *J Control Release*. 2011; 149: 65-71.
- [38] Zhao, Y., Gu, X., Ma, H., He, X., Liu, M., Ding, Y. Association of glutathione level and cytotoxicity of gold nanoparticles in lung cancer cells. *J Phys Chem C*. 2011; 115: 12797-
- [39] Zhang, Z.W., Jia, J., Lai, Y.Q., Ma, Y.Y., Weng, J., Sun, L.P. Conjugating folic acid to gold nanoparticles through glutathione for targeting and detecting cancer cells. *Bioorg Med Chem*. 2010; 18: 5528-5534.
- [40] Huang, X.H., Jain, P.K., El-Sayed, I.H., El-Sayed, M.A. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostic and therapy. *Nanomedicine*. 2007; 2: 681-693.
- [41] Kelly, K.L., Coronado, E., Zhao, L.L., Schatz, G.C. The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. *J Phys Chem B*. 2003; 107: 668-677.

Motivation

Motivation

En gardant en tête les qualités des nanoparticules d'or comme vecteur de choix pour la vectorisation des agents thérapeutiques, et les propriétés physicochimiques et pharmacologiques de l'acide lipoïque considéré comme candidat potentiel et supplément efficace contre plusieurs pathologies.

Notre approche dans ce travail consiste donc à synthétiser dans des conditions optimales une plateforme nanoparticulaire stable à base d'acide lipoïque et sur laquelle on peut coupler ultérieurement une multitude de molécule bioactives.

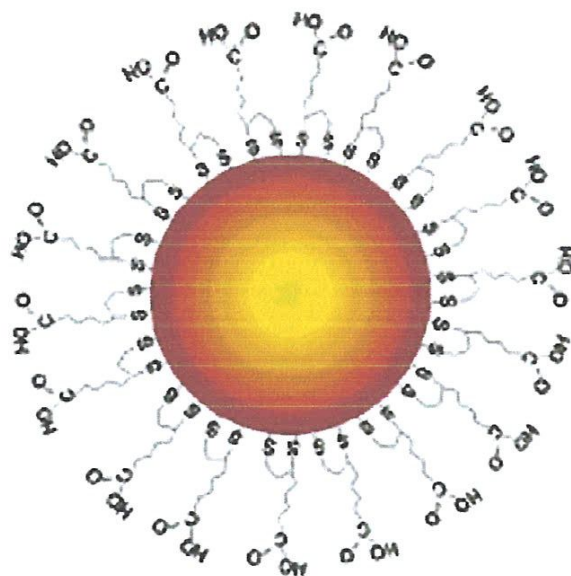


Figure 33: Nanoparticules d'or enrobées d'acide lipoïque (LA).

Conclusion générale

Conclusion

Dans un premier temps, nous avons fait une étude bibliographique sur les nanoparticules, leur obtention et leurs applications dans plusieurs domaines.

En effet, les nanotechnologies représentent aujourd'hui un domaine scientifique et technique en plein essor. A l'échelle mondiale, les nanotechnologies suscitent de plus en plus d'intérêt et sont en voie de constituer le cœur de la prochaine révolution industrielle. Ainsi, l'utilisation des nanotechnologies, et notamment les nanoparticules dans le cadre plus spécifique de la médecine (ce que l'on appelle désormais nanomédecine) connaît actuellement de grands progrès et devrait permettre d'améliorer la détection précoce et le traitement de nombreuses pathologies (cancers, maladies auto-immunes ou infectieuses maladies cardiovasculaires...etc.). Le développement de ce type de technologie constitue donc un enjeu majeur de santé publique.

Les nanoparticules d'or (AuNPs) sont historiquement les nanoparticules qui ont lancé les nanotechnologies. L'intérêt pour les nanoparticules d'or reste encore vif aujourd'hui et représente une grande partie des travaux rapportés notamment dans le domaine des applications biologiques.

Par ailleurs, nous avons décrit le stress oxydant qui correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées et les défenses antioxydantes de l'organisme. Actuellement, l'acide lipoïque : antioxydant universel est considéré comme traitement préventif et curatif contre le stress oxydant impliqué dans plusieurs pathologies notamment le cancer, les troubles cardiovasculaires le diabète et ses complications, les maladies prolifératives et inflammatoires, les maladies auto-immunes et virales en particulier, le VIH et les hépatites.

Dans ce travail nous avons élaboré des nanoparticules d'or fonctionnalisées par un composé dithiol, plus précisément l'acide lipoïque en se basant sur la méthode de Turkevich modifiée. En effet, l'utilisation du NaBH_4 comme réducteur et d'un excès d'acide lipoïque, nous a permis d'aboutir à une plateforme nanoparticulaire à base d'acide lipoïque. L'étude expérimentale aux moyens des techniques spectrométriques usuelles (IR, UV-Vis) nous a permis de mettre en évidence leur formation.

La pharmacomodulation de cette plateforme par conjugaison avec d'autres molécules conviendrait parfaitement à des applications dans le domaine thérapeutique: soit pour le diagnostic soit pour le traitement par un ciblage spécifique des systèmes biologiques.