

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur
Université 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'étude
Master II



Spécialité : Chimie physique et analytique

Présenté par :

**Debabssia Souheyla
Laamami Imane**

Greffage du 4-aminoethylbenzensulfonamide
Sur des Nanoparticules d'or

Sous la Direction de :

Dr. MAAMAR STITI

Juin 2014

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.

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



Dédicace

A dieu le tout miséricordieux

Je dédie ce modeste travail à mon père «Salah», et à ma très chère mère «Fatima» qui ont sacrifié leur vie pour notre bien. Et qui m'ont toujours encouragé pour continuer mes études, qui m'ont soutenu tant par leurs conseils, que par leur patience et leur confiance

- *A mes chers frères : Zouhir, Hichem, Rabia et son épouse « Djamilia »et son fils « Sadjed »et « Madjed' »*
- *Et mes chères sœurs: fadila ,Hamama et son marie .*
- *Et à toute ma famille*
- *A mes belles amis :*
Malika, Bassma ,Afaf, Wafa, Saida, Assma, Sousou, Rjma .
- *Et a mon cllasse de 2ém année mester .*
 - *A toutes celles et tous ceux qui m'aiment*
- *Et mon binôme : Imen*

« Souheyla »





Dédicace

A dieu le tout miséricordieux

A mon père « MEHI EDDINE »

Qui s'est dépensé pour moi sans compter, qui a toujours été là pour moi, et qui m'a donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance.

En vous, je vois un père dévoué à sa famille. Sa présence en toute circonstance m'a maintes fois rappelé le sens de la responsabilité.

A ma mère « Saliha »

Qui s'est tant sacrifiée pour les besoins de nos études.

En vous, je vois la maman parfaite, toujours prête à se sacrifier pour le bonheur de ses enfants.

En reconnaissance de tous les sacrifices consentis pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie.

Avec toute ma tendresse.

• *A mes chers frères : Sohaib, Khaled*

• *A mes chères sœurs : Assma, Nousaiba et son marie, et son fis Raouf*

• *A mes belles amis : Aicha, Sana, Khadidja, Wafa, Rjma*

• *A ma famille : Khala laila, soussou, rania, rahma, Ahlem, samra, sabrina,*

• *A mes oncles et leurs famille.*

• *A mes tontes et leurs famille.*

• *Et mon binôme : Souheyla*

A toutes celles et tous ceux qui m'aiment

« Imene »



Liste des schémas

N°	Titre	page
1	Différentes structures de sulfamides.....	8
2	Détection de l'hybridation de deux brins oligonucleotidiques complémentaires par des nanoparticules d'or fluorescentes	17
3	Nanoparticules hybrides Gd ₂ O ₃	20
4	principe d'action des nanovecteurs de troisième génération dans l'organisme.	25
5	synthèse de nanoparticules d'or par la voie NaBH ₄	32
6	Synthèse de nanoparticules d'or recouvertes par l'acide dihydrolipoïque (Au@DHLA).....	34
7	Synthèse de nanoparticules d'or recouvertes par un bis-amide thiolé de l'acide diéthylènetriamine pentaacétique (Au@DTDTPA).....	35
8	Fonctionnalisation de Au@DHLA par le luminol, une molécule électroluminescente.....	35
9	Une illustration de la façon dont "tout-en-un"	36
10	Accès aux conjugué:arylsulfonamide -acide lipoïque	47
11	Mécanisme du couplage peptidique faisant intervenir des réactions parasites..	48
12	Mécanisme du couplage des arylsulfonamides avec l'acide lipoïque en présence de la triade : EDCI, DMA et DMAP.....	49
13	Synthèse par voie NaBH ₄ de nanoparticules d'or enrobées par des ligands inhibiteurs potentiels de l'CA.....	53

Liste des tableaux

N°	Titre	page
1	Liste de médicaments dirigés contre certaines enzymes humaines.....	6
2	Rendements et caractéristiques physico-chimiques du ligand obtenu.....	52

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Principe de l'inhibition compétitive.....	5
2	Exemples de sulfonamides utilisés en clinique.....	9
3	Structures générales de certains sulfonamides halogénés.....	10
4	Structure générale d'un sulfonamide tetrafluoré inhibiteur subnanomolaire contre le hCAIX.....	10
5	Sulfonamides incorporant une partie hydrazine en leurs structures	11
6	Benzènesulfonamides aromatiques incorporant des parties triazinyle en leurs structures.....	12
7	Sulfamates et sulfamides inhibiteurs de l'hCA.....	13
8	Cellules de Langerhans.....	17
9	Différents types de vecteurs médicamenteux.....	22
10	Liposomes en coupes et liposomes pégylés.....	23
11	nanoparticules hybrides : une élaboration en 3 étapes.....	26
12	greffage de molécules organiques en surface des nanoparticules.....	27
13	Utilisation des nanoparticules pour l'imagerie cellulaire par MET.....	29
14	Structure générale d'une classe de sulfanilamides positivement chargés dérivés de la pyridine ,utilisée pour le ciblage de l'hCAIX.....	42
15	Les bases de Schiff dérivés des sulfonamides sont également des inhibiteurs efficaces de l'CA.....	43
16	Formation d'un complexe de zinc avec les bases de Schiff.	43
17	Inhibiteurs de l'CA incorporant l'élément Bore, peuvent être des candidats potentiels dans la thérapie par capture boroneutronique BNCT.	44
18	Structure générale du ligand obtenu.....	46
19	Structure générale de l'acide lipoïque.....	46
20	Spectre de masse du ligand obtenu.....	50
21	Spectre RMN ¹ H du ligand obtenu dans le DMSO-d ₆	51
22	Spectre RMN ¹³ C du ligand dans le DMSO-d ₆	51

23	Micrographies de microscopie électronique en transmission (MET) de nanoparticules d'or obtenues.....	55
24	Histogramme de distribution de taille pour les nanoparticules obtenues..	56
25	Spectre UV-visible des nanoparticules d'or dispersées dans le DMSO...	57
26	Spectre UV-visible des nanoparticules d'or pris à diverses concentrations : A, B, C dans le DMSO.....	57
27	Spectres IR superposés du ligand et des nanoparticules d'or.....	58

Liste des abréviations

Symbole	Signification
Ar	Groupement aryle
AuNPs	Les nanoparticules d'or
Au@DHLA	Nanoparticule d'or enrobées par des molécules d'acides lipoiq
AZA	Acetazolamide
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BNCT	Thérapie par capture boroneutronique
CAIX	Anhydrases carboniques 9
CAs	Anhydrases carboniques
DCC	1,3-dicyclohexylcarbodiimide
DHLA	Acide dihydrolipoïque
DMA	Diméthylacétamide
DMAP	4-diméthylamoni pyridine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTDTPA	Diéthylènetriamine pentaacétique
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
EDCI	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
EDU	N,N'-éthyl-diméthylaminopropylurée
HCA	Human carbonic anhydras
IR	Infrarouge
IRM	Image par résonance magnétique
KI	Constante d'inhibition
SPR	Résonance plasmon de surface
MET	Microscopie électronique à transmission
MET-HR	Microscopie électronique en transmission haute résolution
nM	Nanomolaire
PEG	Polyéthylène glycols
Rdt	Rendement
RMN ¹³ C	Résonance magnétique nucléaire du carbone-13
RMN ¹ H	Résonance magnétique nucléaire du proton
Rf	Rapport frontal
SM	Spectrométrie de masse
Tf	Température de fusion

Sommaire

SOMMAIRE:

Introduction générale	1
Chapitre I : arylsulfonamides inhibiteurs de l'anhydrase carbonique.	
I.1. Introduction.....	4
I.2. Principe de l'inhibition enzymatique dans le domaine pharmaceutique.....	4
I.3. Applications des anhydrases carboniques (CA _s) en thérapeutique	7
I.4. Inhibiteurs de CAIX dans la série de sulfonamides.....	8
I.5. Conclusion.....	13
Chapitre II : Nanoscience & Nanobiotechnologie.	
II. 1. Introduction.....	15
II.2. Propriétés des nanomatériaux.....	15
II.3. Les recherches actuelles en médecine.....	16
II.3.1. Imagerie médicale.....	16
II.3.2. Les progrès thérapeutiques.....	18
A) -Thérapie du cancer.....	19
-Hyperthermie.....	19
- Activation magnétique des cellules tumorales.....	20
- Utilisation des Nanoparticules hybrides.....	20
B) -La vectorisation des médicaments.....	21
C) -Vecteurs PEG-ylés.....	22
- Un liposome pégylé.	23
D) - les 3 générations de nanovecteurs.....	23
1)- les vecteurs de première génération.....	23
2)- Les vecteurs de deuxième génération.....	24
3)- Les vecteurs de troisième génération.....	24

E) Comment agissent les nanovecteurs de troisième génération dans l'organisme? .	24
II.4. Elaboration des nanoparticules hybrides à cœur métallique.....	25
a) Synthèse de nanoparticules minérales.....	26
b) Greffage de composés organiques.....	26
c) Fonctionnalisation des composés organiques.....	27
II.4.1) Nanoparticules d'or.....	28
II.4.2) Elaboration de nanoparticules hybrides à cœur d'or.....	30
-Synthèses par méthodes chimiques.....	30
a) Généralités.....	30
b) Synthèse de Brust et stabilisation par des thiols.....	31
II.5. Exemple de Synthèse de nanoparticules d'or enrobées par différents ligands.....	34
I) Synthèse de nanoparticules d'or recouvertes par l'acide dihydrolipoïque.....	34
II) Synthèse de nanoparticules d'or recouvertes par un bis-amide thiolé de l'acide diéthylènetriamine pentaacétique (Au@DTDTPA)	35
III) Synthèse de Nanoparticules électroluminescentes.....	35
II.6. Tout-en-un	36
II.7. Conclusion.....	37
Motivation.....	39
Chapitre III : Résultats & Discussions.	
III.1.Introduction.....	41
III.2.Développement d'inhibiteurs de CAIX imperméables aux membranes cellulaires.....	41
III.3. Recherche d'une Nouvelle Approche : L'approche Nano pour le Design d'Inhibiteurs plus sélectifs.....	44
III.4. Elaboration de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des arylsulfonamides pour le ciblage de l'CA.....	45

-Pourquoi l'acide lipoïque ?	46
A) Du point de vue chimique	46
B) Du point de vue biologique	46
III.4. 1. Synthèse des conjugués arylsulfonamides -acide lipoïque.....	47
III.4. 1.1. Caractérisations des ligands obtenus.....	50
a) Par spectrométrie de masse.....	50
b) Par spectrométrie RMN ¹ H.....	50
c) Par spectrométrie RMN ¹³ C.....	51
2. Greffage du ligand:arylsulfonamides-acide lipoïque sur des nanoparticules d'or.	52
III.4. 2.1. Optimisation des conditions opératoires.....	54
III.4. 2.1. Caractérisations des nanoparticules obtenues.....	55
a) Par microscopie électronique à transmission (MET)	55
b) Spectroscopie UV-Visible	56
-La résonance plasmon de surface (SPR)	56
c) Par Spectroscopie IR.....	58
III.5. Conclusion.....	59
Chapitre IV : Protocoles expérimentaux.	
IV.1. Conditions générales.....	61
IV.2. Modes opératoires.....	62
IV.2.1. Préparation du N-[(4-Sulfonamidophenyl)-ethyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl) pentanamide	62
-Caractérisation.....	62
IV.2.2. Préparation des nanoparticules d'or.....	63
-Mode opératoire général.....	63
-Caractérisations.....	63
Conclusion Générale	65

Introduction générale

Introduction:

L'utilisation de molécules polyfonctionnelles possédant non seulement un site de reconnaissance spécifique des cellules malignes mais permettant également leur destruction sélective semble être une alternative très intéressante.

L'élaboration de ce type de structure suppose la préparation de molécules ^(de) comprenant à la fois la partie organique responsable de la reconnaissance mais également un vecteur permettant une destruction ciblée de la cellule cancéreuse.

Les différents médicaments utilisés aujourd'hui pour lutter contre le cancer sont classés selon leur mode d'action thérapeutique et leurs cibles cellulaires.

Les cibles pharmacologiques les plus importantes sont bien connues l'ADN, les enzymes et les microtubules. D'autres cibles étaient établies, notamment depuis que le mécanisme de la division cellulaire à commencer à être mieux connu.

Comme exemple de nouvelles cibles récemment découvertes, on se doit de citer les anhydrases carboniques (CAs). Il s'agit d'une famille d'enzymes qui catalysent la réaction réversible d'hydratation du CO_2 et d'autres réactions dans une variété de processus biologiques. C'est ainsi que l'isoforme IX de l'anhydrase carbonique (CA IX) qui est une métalloenzyme extracellulaire transmembranaire à zinc, joue un rôle très important dans l'acidification du microenvironnement tumoral contribuant à la propagation et la progression des tumeurs. Elle est surexprimée dans plusieurs types de cancers tout en étant présente dans très peu de tissus normaux. L'inhibition sélective de CAIX pourrait constituer une nouvelle approche pour le management des tumeurs hypoxiques.

Les inhibiteurs des CAs disponibles actuellement en thérapeutique en particulier les aryles et les hétéroarylsulfonamides sont loin d'être parfaits car ils présentent d'innombrables effets indésirables, principalement dus à leur manque de sélectivité. Donc le développement d'inhibiteurs plus sélectifs constitue un grand challenge pour l'obtention de nouveaux types d'inhibiteurs.

La vectorisation de principes actifs est par conséquent devenue un aspect essentiel dans le domaine thérapeutique. La pharmacie galénique moderne développe donc des systèmes d'administration susceptibles de promouvoir le passage transmembranaire et/ou intracellulaire vers la cible souhaitée tout en protégeant le

principe actif de la dégradation par les enzymes. De nombreux systèmes de délivrance de molécules actives, possédant des propriétés spécifiques avantageuses pour des applications dans le domaine de la vectorisation, ont été élaborés depuis une vingtaine d'années.

De par leurs propriétés particulières (pour la vectorisation et le diagnostic), notre choix portera sur les nanoparticules d'or comme systèmes de délivrance pour la vectorisation du 4-aminoethylbenzensulfonamide : un arylsulfonamide à activité anti-tumorale potentielle.

Ce manuscrit se décompose en quatre chapitres :

Le premier chapitre présente un aperçu général sur les sulfamides et les arylsulfonamides inhibiteurs de l'anhydrase carbonique utilisés comme nouvelle cible dans le domaine thérapeutique.

Le deuxième chapitre est consacré aux nanoparticules, en particulier les nanoparticules d'or, leur élaboration par voie liquide et leurs applications dans le biomédical.

Le troisième chapitre de ce mémoire est consacré aux résultats et discussion sur la préparation et la caractérisation des composés synthétisés.

Le quatrième chapitre est réservé à la description des protocoles expérimentaux et des essais que nous avons conduits au cours de ce travail, ainsi que les caractéristiques des produits obtenus.

Nous achevons ce travail par une conclusion générale.

Chapitre (I)

Arylsulfonamides Inhibiteurs de l'Anhydrase Carbonique

I.1. Introduction:

Les enzymes sont des catalyseurs des réactions chimiques qui se produisent chez les êtres vivants. Ces catalyseurs sont fabriqués, au moins en ce qui concerne leur partie protéique, par la cellule qui les utilise, selon les phénomènes de synthèse protéique.

L'importance des enzymes est évidente, toutes les molécules des êtres vivants sont formées et dégradées en permanence par des réactions chimiques dont elles sont presque toutes catalysées par des enzymes (les réactions spontanées, se produisant sans intervention d'une enzyme chez un être vivant sont rares).

Il y a au moins une enzyme différente par réaction catalysée et chaque enzyme ne transforme spécifiquement qu'une seule structure chimique, qu'un seul type de molécule. Ce qui représente des milliers d'enzymes pour chaque organisme [1].

I.2. Principe de l'inhibition enzymatique dans le domaine pharmaceutique:

Les progrès réalisés en génétique moléculaire et les divers « projets génome », qui visent à décrypter l'ADN des micro-organismes et de l'homme, laissent entrevoir l'existence d'un nombre encore plus grand d'enzymes à identifier, lesquels seront des cibles potentielles pour des médicaments du futur.

Le défi actuel consiste donc à trouver un produit chimique qui serait capable d'interagir avec ces cibles en vue de comprendre quel est leur rôle et si on pourrait les mettre à profit comme cibles de médicaments.

En principe, toutes les enzymes sont contrôlées par des interactions allostériques qui peuvent soit exalter soit freiner leur activité catalytique. Un tel contrôle dépend des conditions locales régnant dans les cellules. L'activité de nombreuses variétés d'enzymes peut être également régulée par voie externe aux moyens d'activateurs ou d'inhibiteurs d'enzymes. En effet, on peut concevoir une molécule qui ressemble fort au substrat naturel et qui est capable de s'emboîter dans le site actif de l'enzyme, mais en s'y attachant plus fortement. Cette molécule serait en outre conçue de manière à ce qu'elle ne puisse subir aucune réaction dans le site actif. Mais tant qu'elle y réside, elle empêche au substrat naturel d'y accéder, de sorte que la réaction enzymatique est arrêtée.

On parle d'inhibition compétitive puisque la molécule du médicament est réellement en compétition avec le substrat naturel pour occuper le site actif (figure 1).

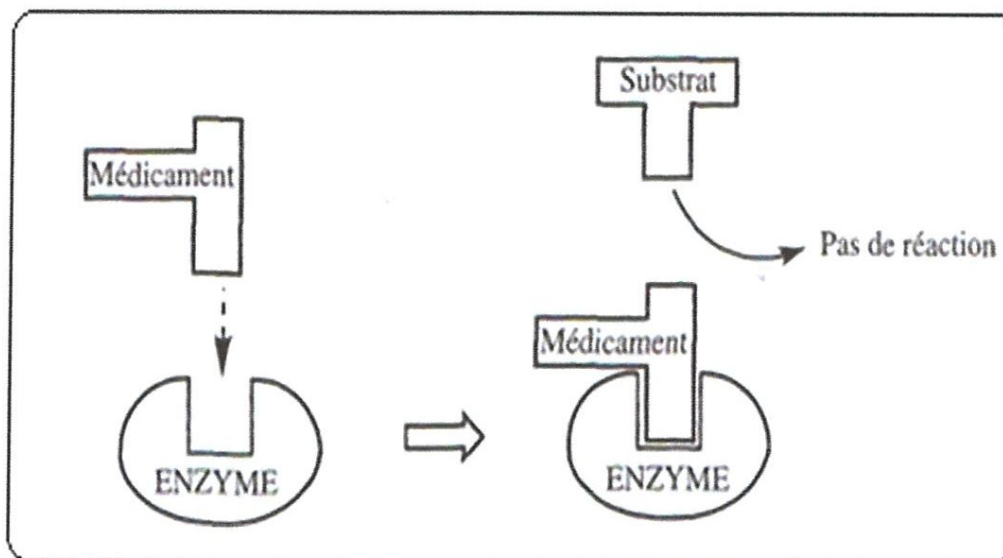


Figure .1 : Principe de l'inhibition compétitive

On peut citer de nombreux exemples de médicaments efficaces qui fonctionnent en tant qu'inhibiteurs compétitifs. Ainsi, les sulfonamides inhibent les enzymes des bactéries, tandis que les anticholinestérases inhibent une enzyme de mammifères qui s'appelle l'acétylcholinestérase. Une bonne part des diurétiques servant à régulariser la tension sanguine, sont des inhibiteurs compétitifs et il en va de même pour certains médicaments antidépresseurs [2].

En médecine, un grand nombre d'enzymes propres aux pathologies peuvent être inhibées par des médicaments en vue de modifier les réactions chimiques intervenant au cours des processus métaboliques. Ainsi, les inhibiteurs enzymatiques se sont révélés extrêmement efficaces dans la lutte contre plusieurs maladies ; Quelques exemples sont présentés dans le tableau1 [3].

Tableau 1 : Liste de médicaments dirigés contre certaines enzymes humaines.

Médicament	Enzyme ciblée	Effet thérapeutique
pirine	Cyclo-oxygénase	Anti-inflammatoire
Captopril et énalapril	Enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA)	Antihypertenseur
Simvastatine	HMG-CoA-réductase	Hypocholestérolémiant
Désipramine	Monoamine-oxydase	Antidépresseur
Clorgyline	Monoamine-oxydase A	Antidépresseur
Sélégiline	Monoamine-oxydase B	Traitement de la maladie de Parkinson
Méthotrexate	Dihydrofolate-réductase	Anticancéreux
5-Fluorouracile	Thymidylate-synthétase	Anticancéreux
Allopurinol	Xanthine-oxydase	Traitement de la goutte
U-75875	Protéase du VIH	Thérapie du SIDA
R0-41-0960	Catéchol-O-méthyltransférase	Traitement de la maladie de Parkinson
Oméprazole	ATPase de la pompe à protons H ⁺ /K ⁺	Traitement de l'ulcère gastroduodéal
Organophosphorés	Acétylcholinestérase	Traitement de la myasthénie gravis, du glaucome et de la maladie d'Alzheimer
Zileutine	5-Lipo-oxygénase	Antiasthmatique
Methotrexate	Dihydrofolate-réductase	Cytostatiques
Tritoqualine	Histidine-Décarboxylase	Anti-allergique
Vigabatrin	GABA-Transaminase	Anti-convulsivants
Acide mycophénolique	IMP-Deshydrogénase	Immunosuppresseur
Acétazolamide	Anhydrase arbonique (CA)	Diurétique

I.3. Applications des anhydrases carboniques (CA_s) en thérapeutique :

Les CAs jouent plusieurs fonctions physiologiques et physio-pathologiques importantes dans les êtres vivants. Ces remarquables enzymes sont particulièrement bien adaptées pour servir de modèles attractifs et très riches dans beaucoup d'études biophysiques et biomédicales.

Actuellement, l'inhibition de l'anhydrase carbonique constitue l'une des approches physiologiques les plus utilisées pour le développement de nouvelles drogues, nouveaux outils de diagnostic, ou pour mieux comprendre les processus biologiques intervenant au sein des êtres vivants [4] Et compte tenu du nombre élevé d'isoenzymes de l'CA, chacune d'elle représente une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de pathologies impliquant leur surexpression, En fait, beaucoup de recherches sont consacrées pour l'instant sur au moins cinq axes dans le drug- design d'agents pharmacologiques liés à cette classe d'enzymes :

- (I) Médicaments anti-glaucome, en cherchant d'autres composés plus efficaces que le dorzolamide et le brinzolamide déjà introduits en thérapeutique. Les isoenzymes cibles de tels composés sont le CA II et le CA XII.
- (II) Médicaments anti-cancéreux, ciblant en premier lieu et d'une manière prédominante les isoenzymes CA IX et/ou CA XII, surexprimés dans les cellules tumorales.
- (III) Agents anti-obésité, en se basant sur les résultats encourageants rapportés par le topiramate et le zonisamide, qui ont probablement comme cible les isoformes mitochondriales CA VA et/ou CA VB.
- (IV) Agents anti-convulsivants : visant les CA II, VII, XII, et XIV).
- (V) Agents antibactériens, antifongiques et autres types d'agents qui visent plusieurs CAs d'organismes pathogènes tel que les bactéries *H pylori*, tuberculose *Mycobacterium*, etc, les protozoaires *P. falciparum* ou les moisissures *C. albicans*, et *Cr. Neoformans* etc.

I.4. Inhibiteurs de CAIX dans la série de sulfonamides:

Plus d'un demi-siècle après leur découverte, les sulfamides occupent toujours une place importante dans la chimiothérapie de plusieurs maladies (antibactériens, anti-diabétiques, anti-glaucome, diurétiques.. etc.)

D'autres applications dans le traitement du cancer et de l'obésité font actuellement l'objet de recherches avancées.

Le plus simple des sulfamides répondant à la formule **1** (Schéma.1) et comportant le pharmacophore sulfonamide (SO₂NH₂) couramment utilisé en chimie médicammenteuse est considéré comme la molécule mère d'une grande classe de composés biologiquement actifs, avec au moins cinq principaux types de dérivés obtenus en substituant les divers atomes d'hydrogène dans la molécule de base.

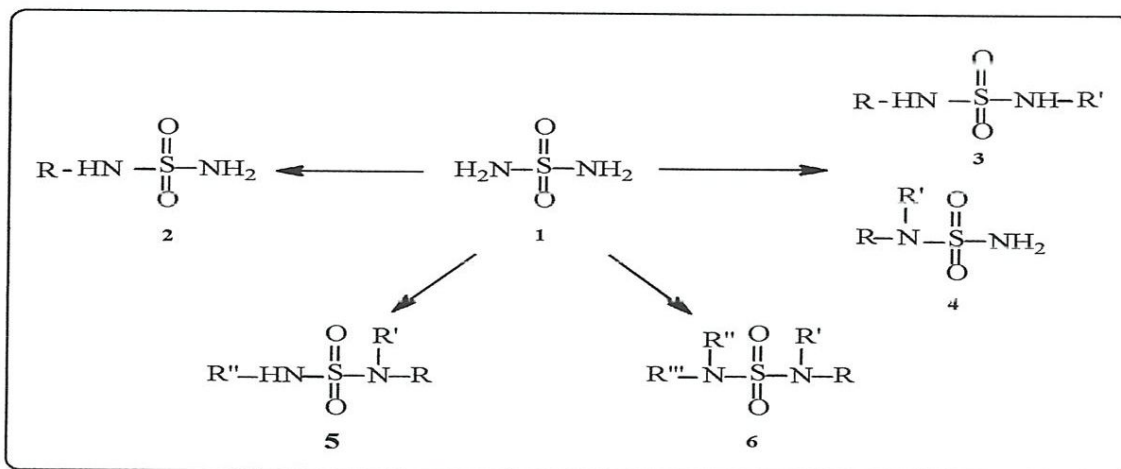


Schéma 1 : Différentes structures de sulfamides.

Les substituants (R, R', R'' et R''') qui peuvent être identiques ou différents entre eux et de nature chimique très variée, fournissent d'excellents exemples de médicaments très connus et qui sont largement utilisés actuellement en thérapeutique [5].

Récemment, de nombreux inhibiteurs de l'anhydrase carbonique (CAs) appartenant à la série des aryles et des hétéro-arylsulfonamides (ArSO₂NH₂) ont été décrits dans la littérature comme étant aussi des inhibiteurs contre la croissance in vitro et in vivo de plusieurs variétés de tumeurs, ceci est dû essentiellement à l'inhibition de certaines isozymes de CA telles que le CA IX et le CA XII surexprimées dans ces tumeurs.

L'inhibition de l'isozyme transmembranaire IX associé aux tumeurs a été d'abord étudiée avec une série de sulfonamides aromatiques et hétérocycliques, y compris les six dérivés utilisés en clinique : l'acetazolamide (AZA) **7**, le methazolamide **9**, l'ethoxzolamide **10**, le dichlorophenamide **11**, et le dorzolamide **12** (figure 2) [6].

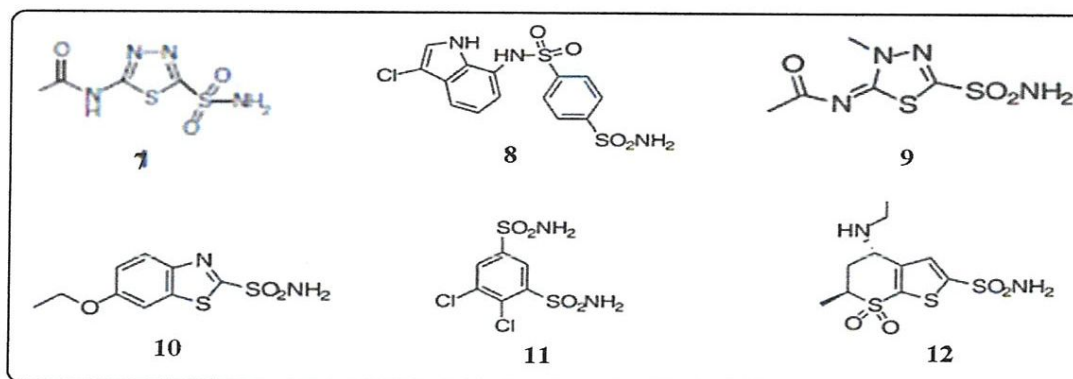


Figure 2 : Exemples de sulfonamides utilisés en clinique.

Ces composés phares manifestent un profil pharmacologique très intéressant pour l'inhibition du CAIX avec des constantes d'inhibition K_I situées dans la gamme de 14-50 nM. Ils peuvent être considérés comme des chefs de file intéressants pour le développement de nouveaux dérivés anticancéreux.

Ainsi, l'Indisulam **8**, (E7070), qui est parmi les sulfonamides anticancéreux les plus efficaces, avec une constante d'inhibition K_I de l'ordre de 24 nM contre le CA IX, a été déjà développé jusqu'aux stades des essais cliniques en Europe et aux Etats-Unis [7].

Parmi les nombreuses possibilités de développements offertes par ces composés biologiquement actifs, un accent particulier a été apporté pour la synthèse de deux séries de sulfonamides halogénés [8]. La première série renferme des sulfanilamides mono/dihalogéné du type **13**, tandis que la seconde se compose d'aminobenzolamides mono/dihalogénés du type **14**, incorporant divers halogènes (F, Cl, Br, et I ;) (Figure 3). Ces sulfonamides ont été synthétisés à partir des anilines correspondantes par l'acétylation (protection du groupe aminé), chlorosulfonylation, suivi soit d'amidation, ou de réaction avec le 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide (et éventuellement une déacétylation).

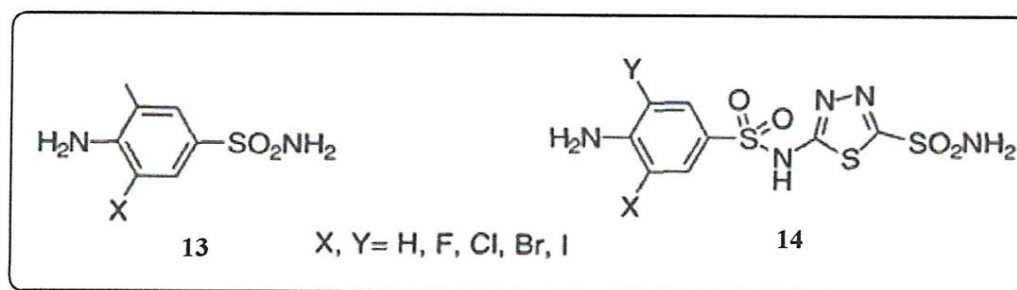


Figure 3 : Structures générales de certains sulfonamides halogénés.

L'évaluation biologique de ces composés a déjà permis d'obtenir des propriétés inhibitrices sélectives intéressantes vis-à-vis des isozymes CA I, II, IV et IX, ce qui va permettre le design et la conception de nouveaux inhibiteurs plus efficace et plus sélectifs. Une autre contribution par l'équipe du Professeur C T. Supuran et qui consistait à introduire des atomes de fluor dans des structures dérivées de sulfonamides aromatique/hétérocyclique a été rapportée. Parmi les composés obtenus, il faut citer le 2,3,5,6-tétrafluorobenzoyle (Figure 4), dérivé du méthanilamide qui est considéré comme l'inhibiteur subnanomolaire le plus sélectif avec une constante d'inhibition de 0.8 nM contre le hCA IX, et un rapport de sélectivité de 26 par rapport au CA II [9].

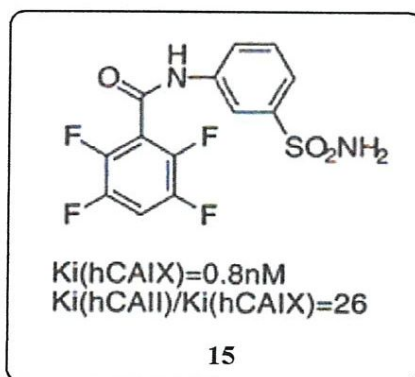


Figure 4 : Structure générale d'un sulfonamide tétrafluoré inhibiteur subnanomolaire contre le hCAIX.

Pour rester toujours dans la pharmacomodulation des sulfonamides récemment rapportée, on se doit de citer une série de dérivés de sulfonamides incorporant une partie hydrazine en leur structure (figure 5) [10].

Tous les composés de cette série se sont révélés posséder une activité inhibitrice contre le hCA IX meilleure ou égale à celle de l'indisulam qui se trouve actuellement au stade des essais cliniques. Trois composés de cette série possédant des constantes d'inhibition situées dans la gamme de 3.2-5.4 nM, étant considérés parmi les inhibiteurs du hCA IX les plus efficaces et leur pouvoir d'inhibition comparé à celui de l'indisulam est de cinq à sept fois plus élevé.

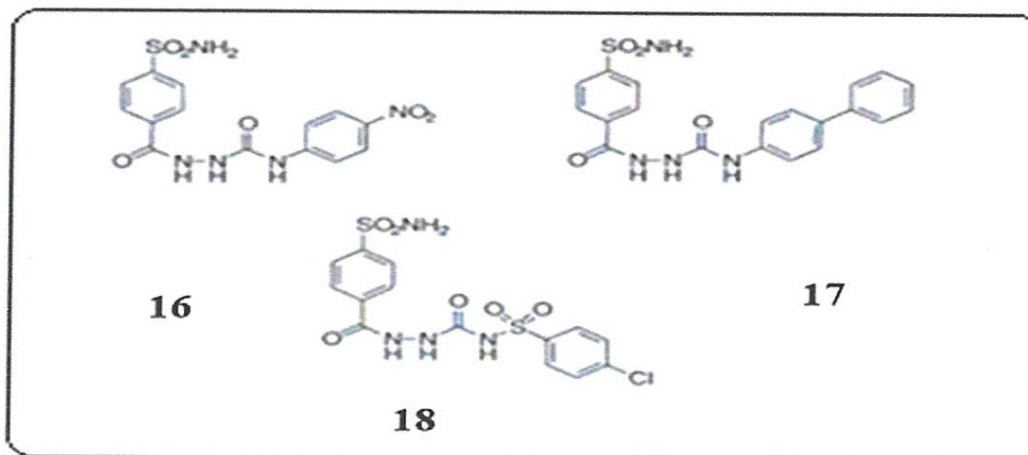


Figure 5 : Sulfonamides incorporant une partie hydrazine en leurs structures.

Presque tous les exemples des sulfonamides renfermant le pharmacophore urée rapporté dans cette étude étaient en faveur des propriétés inhibitrices du hCA IX, et contrairement aux dérivés utilisés actuellement en thérapeutique (y compris indisulam), tous ces composés présentent une forte activité vis-à-vis de l'isoforme transmembranaire hCA IX tout en montrant une bonne sélectivité par rapport à l'isoenzyme cytosolique hCA II omniprésent dans l'organisme.

Récemment l'affinité exceptionnelle de divers benzenesulfonamides aromatiques incorporant des parties triazinyle a été indiquée dans les travaux rapportés par Garaj et Al [11,12].

Trois composés têtes de séries : Le chlorotriazinyl-sulfanilamide **19** aussi bien que les dérivés bis-éthoxytriazinyle de la sulfanilamide **20** et l'homosulfanilamide **21** (figure .6) étaient parmi les inhibiteurs du hCA les plus efficaces et les plus sélectifs pour le CAIX jamais obtenus jusqu'à présent avec des *K_i*s dans la gamme subnanomolaire de 0.12-0.34 nM.

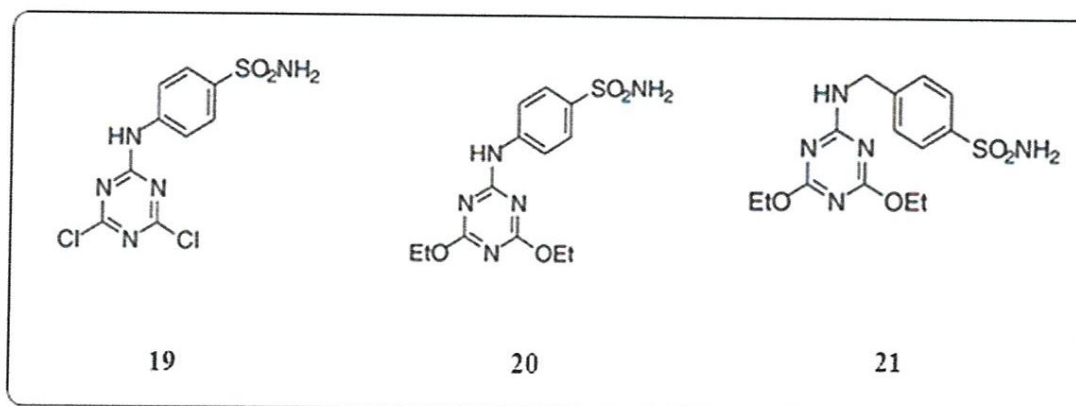


Figure 6 : Benzenesulfonamides aromatiques incorporant des parties triazinyle en leurs structures.

Beaucoup d'autres classes d'inhibiteurs de CA IX en particulier des dérivés sulfamates et sulfamides (Figure 7) ont été rapportées [13, 14, 15].

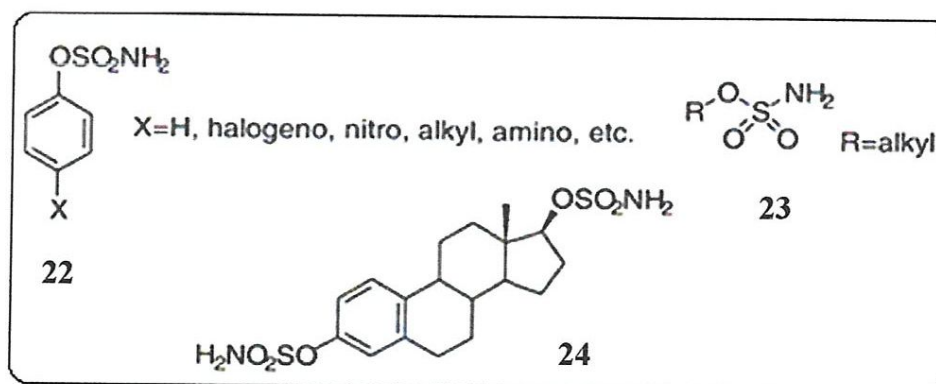


Figure 7 : Sulfamates et sulfamides inhibiteurs de l'hCA.

Cependant, une recherche plus poussée doit être faite dans le domaine des CAIX, étant donné que l'inhibition de ces isoenzymes est gouvernée par des mécanismes d'action complexes et que dans certains cas, l'activité antitumorale peut être exaltée par la combinaison de plusieurs agents inhibiteurs de CA IX ou en association avec d'autres thérapies [16].

I.5. Conclusion :

Les CAs constituent actuellement une nouvelle approche dans le domaine thérapeutique pour le ciblage de plusieurs pathologies impliquant leur surexpression.

Le mécanisme catalytique et le mécanisme d'inhibition des CAs sont connus en détail et beaucoup de données biochimique, physiologique et pharmacologique sont maintenant suffisantes pour justifier la possibilité d'utiliser l'isozyme transmembranaire CA IX comme cible dans le management des tumeurs hypoxiques qui ne répondent pas, ou répondent mal à la chimio- et à la radiothérapie classique.

De nombreux exemples de composés appartenant à une variété de classes chimiques et présentant des constantes d'inhibition dans la gamme de 50-500 nM sont actuellement disponibles pour l'inhibition de CAIX. Mais le problème majeur de ces inhibiteurs est leur manque de sélectivité surtout par rapport aux isoenzymes CA I et II omniprésents dans l'organisme ; Ce qui nécessite la mise au point de nouveaux inhibiteurs du CAIX plus efficaces et plus sélectifs.

Chapitre (II)

Nanoscience & Nanobiotechnologie

II. 1. Introduction :

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, les nanotechnologies permettent de créer et d'utiliser des particules, des dispositifs et des matériaux composites qui sont dotés de propriétés particulières du fait de leur taille infiniment petite (de 1 à 100 nanomètres) [1].

C'est ainsi que sont créées des structures novatrices et que de nouveaux phénomènes peuvent voir le jour. Cette matière nanoscopique trouve toutes sortes d'applications: de la création de produits cosmétiques, de peintures et de lubrifiants de qualité supérieure à la production d'énergie, en passant par le dépistage et le traitement des maladies.

Les communautés biologiques et médicales exploitent les propriétés des nanomatériaux pour des applications variées (des agents contrastants pour l'imagerie de cellules, des outils de diagnostic, de vectorisation des médicaments et des thérapeutiques très efficaces) [2].

II.2. Propriétés des nanomatériaux :

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, carbonés, polymères, etc.

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 10 nm et 50 % pour une particule de 3 nm).

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.3. Les recherches actuelles en médecine :

Les nanotechnologies ont vite trouvé une application immédiate en médecine. Elles peuvent en effet servir à voir, soigner, ou même réparer. Ainsi, elles participent déjà à des applications essentielles dans l'aide au diagnostic, la recherche de traitements et la régénération des tissus.

Mais leur utilisation ne s'arrête pas là : dans la recherche fondamentale, les nanotechnologies permettent d'identifier les différents acteurs moléculaires et les fonctions qu'ils exercent localement dans une cellule ou un compartiment tissulaire sain ou malade [4].

II.3.1. Imagerie médicale :

Les applications de l'imagerie optique sont très variées dans la recherche fondamentale étude de l'organisation des réseaux cellulaires, de la dynamique des signalisations inter cellulaires, de l'oxymétrie cérébrale, des interactions protéines/protéines, des activités enzymatiques.

Au-delà, les finalités de l'imagerie médicale sont nombreuses : prévention (dépistage d'un certain nombre de cancers), diagnostic ou suivi de nombreuses maladies, permettant dans ce dernier cas des comparatifs rationnels. Elle permet aussi de suivre le bon déroulement d'une intervention chirurgicale ou l'efficacité d'un traitement pharmaceutique. Enfin, l'imagerie, lorsqu'elle se veut "fonctionnelle" est à même de suivre différentes fonctions sensori-motrices et cognitives chez l'homme (langage, raisonnement, mémoire, apprentissage, motivation, émotion) [5].

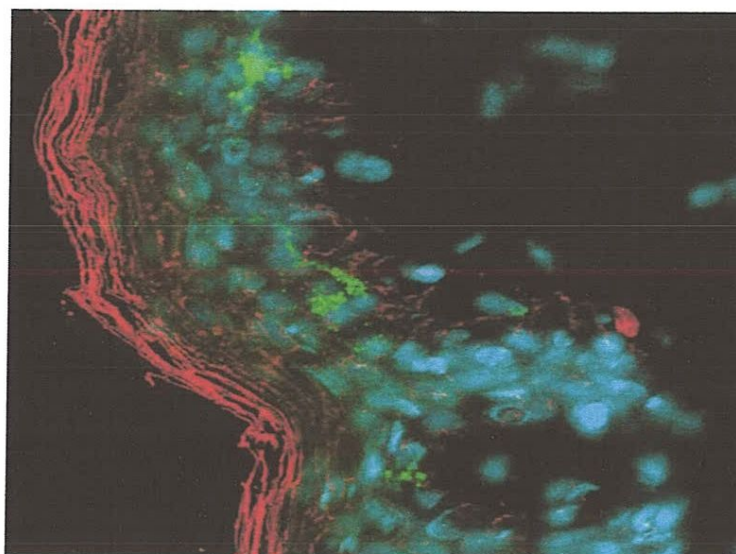


Figure.8: Cellules de Langerhans

Exemple : Fonctionnalisation d'Au@DHLA par le luminol, une molécule électroluminescente.

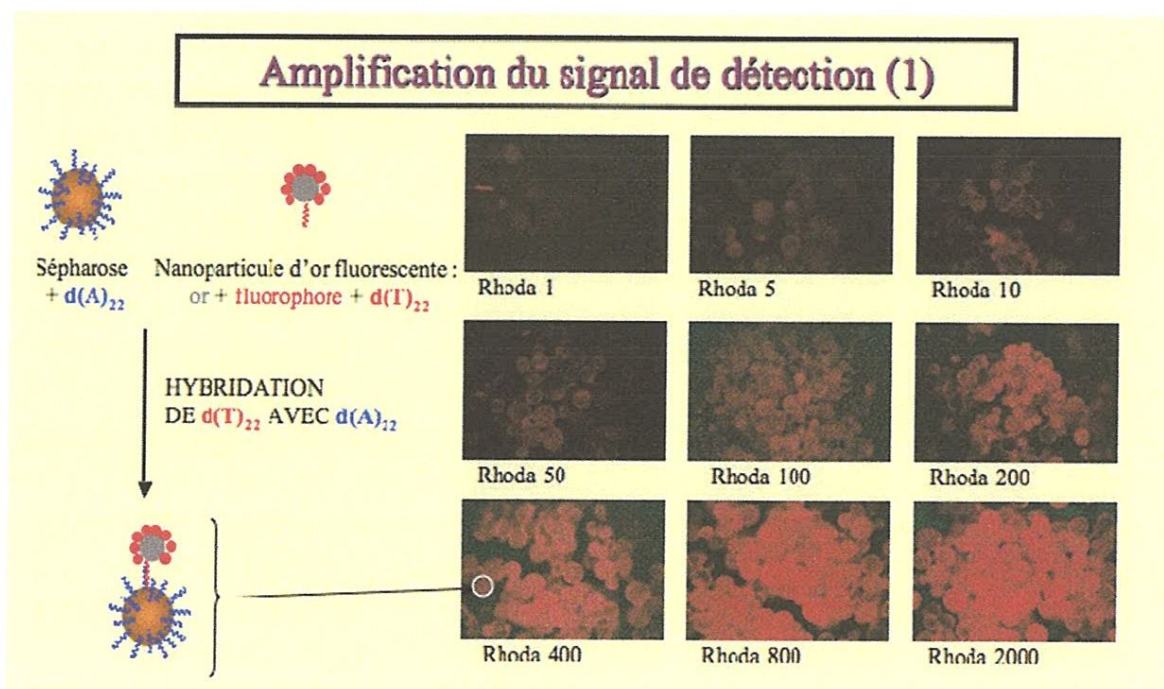


Schéma.2: Détection de l'hybridation de deux brins oligonucléotidiques complémentaires par des nanoparticules d'or fluorescentes.

Ces particules sont rendues luminescentes par l'immobilisation d'un nombre variable de fluorophores (entre 5 et 2000 pour des particules de 12 nm de diamètre). Le marquage d'un oligonucléotide par ces particules permet d'amplifier le signal de détection (et donc d'abaisser le seuil de détection).

L'intensité du signal croît avec le nombre de fluorophores (rhodamine) immobilisés sur les particules, jusqu'à une limite située entre 400 et 800 fluorophores. Cette limite correspond au nombre maximal de fluorophores qui peuvent être immobilisés sur une particule d'or de 12 nm [6].

II.3.2. Les progrès thérapeutiques

Les possibilités de ciblage qu'offrent les technologies utilisant des nanoparticules permettent d'envisager des interventions extrêmement ciblées de nombreuses équipes cherchent à utiliser les particules de taille nanométrique pour transporter spécifiquement des médicaments jusqu'aux cellules malades, évitant ainsi de détruire les cellules saines et minimisant les effets toxiques secondaires.

Le traitement du cancer devrait particulièrement bénéficier de ces nouveaux "vecteurs". La microchirurgie peut aussi en premier lieu bénéficier de la miniaturisation d'outils d'intervention. Mais d'autres applications devraient en découler, au premier rang desquelles se situe l'ingénierie tissulaire.

Les nouvelles techniques de criblage des médicaments s'inspirent des biocapteurs : comme eux, au niveau moléculaire, elles permettent de définir l'affinité spécifique entre deux protéines. Mais la recherche de molécules actives ne suffit pas : la mise au point de nouveaux traitements passe aussi par la recherche de voies d'administration efficaces. "un médicament se définit à la fois par son principe actif (forme chimique) et par son mode d'administration (forme galénique)".

Les nanoparticules permettent d'envisager de nouvelles voies d'administration pour les médicaments (des aérosols par exemple pour la voie pulmonaire ou bien encore des patchs transdermiques destinés aux patients inconscients), elles permettent aussi de délivrer spécifiquement les médicaments dans les tissus ou cellules malades.

Des travaux laissent présager la possibilité de construire un grand nombre de protéines et de substances thérapeutiques. Ainsi en est-il des nanomoteurs moléculaires qui, s'ils n'ont pas d'application thérapeutique en soi, témoignent du niveau de précision des nanotechnologies. Ou bien encore des nanosystèmes destinés au criblage moléculaire [7].

A) -Thérapie du cancer :

Les nanotechnologies peuvent générer des médicaments activables à volonté, capables de traiter les cellules tumorales. Ainsi, en associant à une nanoparticule donnée une molécule capable de se diriger droit vers les cellules tumorales, on peut espérer cibler exclusivement les cellules cancéreuses et imaginer détruire très précisément les tumeurs.

La destruction mécanique des cellules tumorales ayant intégré les nanoparticules choisies avec la molécule chargée de les cibler peut être commandée à distance, selon le type de nanoparticules, par un champ magnétique, un laser, des rayons X, ou simplement de la lumière. On combine la plupart du temps, pour ces applications, à la fois le diagnostic et la thérapie [8].

-Hyperthermie :

Les particules d'or ont la particularité de chauffer lorsqu'on les éclaire, ce qui laisse ainsi envisager de nouveaux traitements. Elles peuvent être fonctionnalisées pour dépister une tumeur cancéreuse, par la greffe d'une sonde spécifique par exemple, que l'on peut doubler d'une greffe d'agents de contraste à base de gadolinium : il suffit, une fois la tumeur détectée, de l'irradier avec un faisceau de lumière pour que les particules d'or ainsi chauffées la détruisent.

Dans cet esprit, des chercheurs de la Rice University à Houston (équipe du Pr. West) ont par exemple mis au point un système de nanoballes en or capable de détruire des types de cancers inopérables. Ces nanoballes, de petites particules de silice de 110nm de diamètre, sont recouvertes d'une couche d'or de 10nm d'épaisseur qui s'échauffe quand une lumière se situant dans l'infrarouge proche est envoyée. En fixant des anticorps spécifiques des anti-gènes de la tumeur cancéreuse, on fabrique un système de nanoballes capable de cibler exclusivement les cellules cancéreuses. La technique a été expérimentée en 2004 sur des patients souffrant de graves cancers des poumons.

L'équipe de El-Sayed (Georgia Institute of Technology) a obtenu des résultats similaires en utilisant des nanoaiguilles d'or au lieu d'une structure core/shell silice/or [9].

- Activation magnétique des cellules tumorales :

Plusieurs types de nanoparticules peuvent également être activés à distance, par un champ magnétique par exemple. En Allemagne, l'équipe berlinoise du Pr Maier-Hauff a ainsi soigné un glioblastome (une tumeur cérébrale) ainsi qu'une tumeur cancéreuse sous-claviculaire, après avoir injecté des nanoparticules magnétiques à base de fer, respectivement dans le cerveau et sous la clavicule. Sous anesthésie générale, ces nanoparticules, absorbées plus rapidement dans les cellules tumorales que dans les cellules saines, ont été chauffées grâce à un champ magnétique extérieur. Les cellules humaines étant détruites par une élévation de température à 45° pendant deux ou trois heures, les cellules tumorales soumises à un tel traitement ont bien été détruites [10].

- Utilisation des Nanoparticules hybrides :

Nombre de nouveaux matériaux hybrides sont développés, en particulier pour leurs propriétés optiques

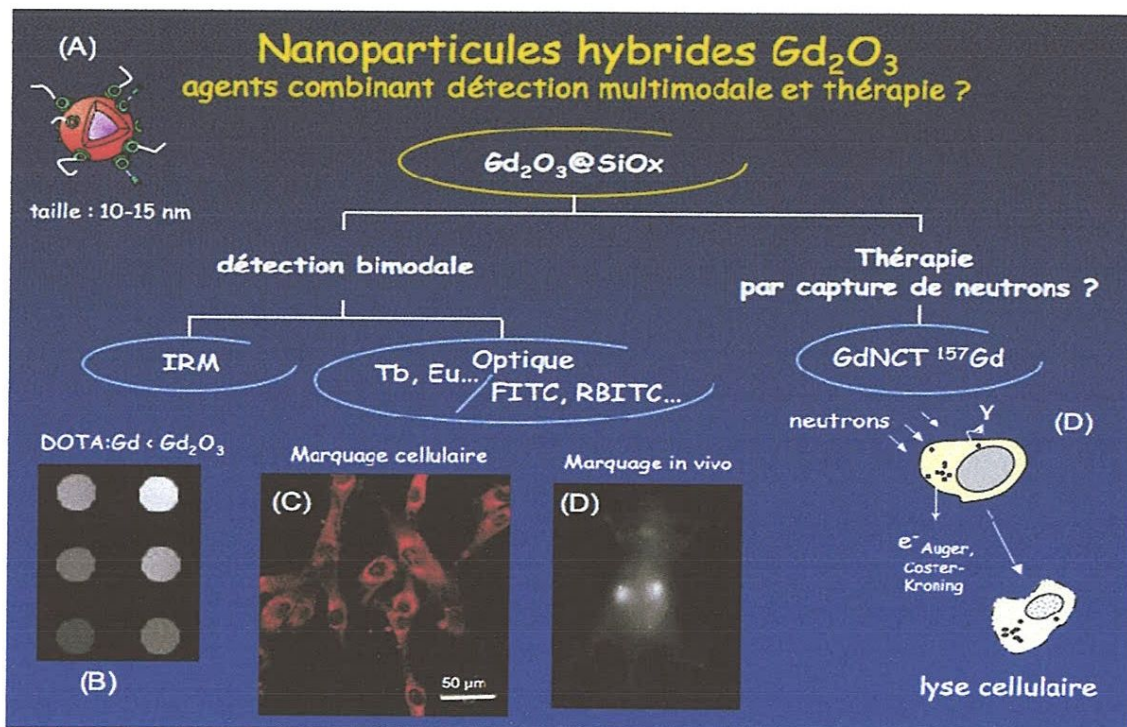


Schéma.3: Nanoparticules hybrides Gd_2O_3 .

(A) Représentation schématique d'une nanoparticule d'oxyde de gadolinium enrobée par une couche de polysiloxane qui renferme des fluorophores organiques (fluoresceine, rhodamine ou cyanine 5) et dont la surface est fonctionnalisée par des molécules organiques et/ou biologiques.

(B) Image par résonance magnétique pondérée: comparaison du contraste généré par des complexes de gadolinium DOTA:Gd (couramment utilisés pour des examens cliniques) et par les nanoparticules hybrides d'oxyde de gadolinium (A). Ces dernières génèrent un contraste positif plus marqué facilitant l'interprétation des images IRM.

(C) Cliché de microscopie confocale de cellules incubées en présence des particules (A). La présence des particules à l'intérieur des cellules est révélée par l'émission de lumière rouge (rhodamine).

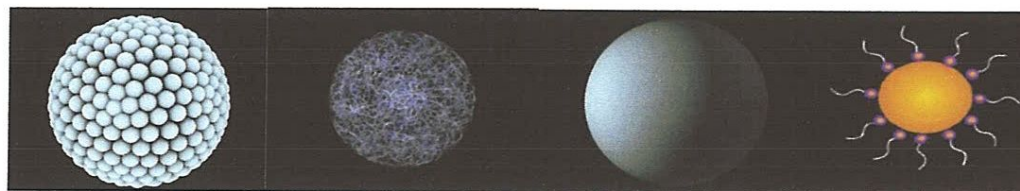
(D) Cliché d'une souris ayant subi l'injection de nanoparticules (A) (fluorophore: cyanine 5). Ce cliché montre que les particules injectées peuvent être suivies par imagerie de fluorescence (la souris, comme les cellules montrées en (C), supportent sans désagrément la présence des particules). (E) Principe de la thérapie par capture de neutrons [11].

B) -vectorisation des médicaments :

Les nanoparticules sont particulièrement efficaces pour administrer les médicaments. Sous diverses formes (liposomes, nanosphères, nanoparticules métalliques etc...), elles peuvent en contenir les principes actifs, eux-aussi à l'état nanoparticulaire. La petite taille de ces dispositifs thérapeutiques les fait aisément pénétrer dans l'organisme.

Grâce aux nombreux mécanismes de contrôle mis au point, ils pourront libérer leur précieux contenu au moment voulu et dans les seules cellules qui en auront besoin.

Les nanoparticules peuvent servir de "véhicules" pour transporter une substance donnée (un médicament, un gène...) au cœur d'un tissu, d'une cellule, d'un compartiment cellulaire. Elles sont habituellement constituées de polymères biodégradables car, comme elles sont supposées pénétrer profondément dans les tissus pour en atteindre les cellules, il s'agit d'éviter tout problème lié à leur accumulation éventuelle. Elles peuvent avoir des formes diverses, comme celle d'une nanocapsule, d'une nanosphère ou encore d'un liposome [12].



Un liposome

Nanosphère

Nanocapsule

nanoparticule d'or

Figure.9 : Différents types de vecteurs médicamenteux.**C) -Vecteurs PEG-ylés:**

Des vecteurs pour toutes les tumeurs cancéreuses et pour les maladies du sang. A l'inverse, comment atteindre une tumeur lorsqu'elle n'est pas localisée au torse? La réponse tient en deux mots "répulsion stérique". Autrement dit, il s'agit de "repousser" les protéines plasmatiques responsables de l'opsonisation de la surface des nanoparticules.

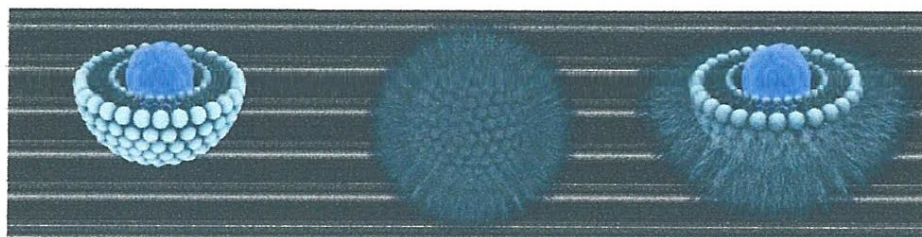
L'astuce est de greffer aux nanoparticules des polyéthylène glycols (PEG), un traitement dénommé "PEGylation". Les PEG ressemblent à de petits cheveux qui vont venir se fixer à la surface des nanoparticules, constituant une véritable barrière physique à l'opsonisation puisqu'ils empêchent les protéines plasmatiques d'approcher [13].

" Habituellement, si l'on injecte des liposomes, ils sont opsonisés, vont dans le foie et disparaissent très vite de la circulation. Mais si on les PEGyle, ces liposomes PEGylés vont demeurer beaucoup plus longtemps dans le système circulatoire, étant devenus, grâce à cette modification de surface, indétectables par le système immunitaire! " L'intérêt de ces vecteurs est par exemple de traiter les maladies du sang, mais aussi des maladies auto-immunes ainsi que de nombreuses tumeurs cancéreuses.

Dans leur structure même, les tumeurs sont le siège de réactions inflammatoires qui rendent l'endothélium tumoral beaucoup plus perméable. Ainsi, les nanoparticules avec leur contenu médicamenteux vont pouvoir extravaser spécifiquement vers les tumeurs et s'y accumuler. Des travaux chez des animaux atteints d'encéphalomyélite allergique ont montré que les vecteurs PEGylés pouvaient franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE) habituellement infranchissable et se retrouver dans le tissu cérébral.

-Un liposome pégylé :

Le liposome est recouvert de polyéthylène glycol (polymères hydrophiles). Sur la (figure 10) à droite, on voit la bicouche de phospholipides sur laquelle ont été greffés des polyéthylènes glycols (PEG) et au centre le médicament hydrophile contenu dans le compartiment aqueux central [14].



Un liposome vu en coupe

Liposome pégylé

Un liposome pégylé vu en coupe

Figure.10:Liposomes en coupes et liposomes pégylés.**D) -les 3 générations de nanovecteurs:**

Le développement des nanotechnologies permet aujourd'hui de proposer l'idée de «vectorisation» des médicaments, permettant la délivrance spécifique de molécules thérapeutiques vers un organe, un tissu ou une cellule malade :Trois générations de nanovecteurs pour trois types de cibles. (Le nanovecteur pris en exemple ici est un liposome) [15].

1)- les vecteurs de première génération :

Le système hépatique est la cible principale des vecteurs de première génération. Captés par les macrophages du foie, les nanovecteurs de première génération vont ainsi être particulièrement efficaces pour délivrer des médicaments dans cet organe.

2)- Les vecteurs de deuxième génération :

Les vecteurs de deuxième génération ne sont pas captés par le foie comme le sont les vecteurs de première génération. Restant plus longtemps dans la circulation sanguine, ils vont ainsi pouvoir atteindre l'organe ou le tissu malade et y amener de façon sélective le principe actif d'un médicament.

3)- Les vecteurs de troisième génération :

Les vecteurs de troisième génération sont conçus pour éviter la barrière hépatique (comme les vecteurs de deuxième génération), mais également, et surtout, pour cibler très précisément les cellules malades. Certains peuvent même cibler des compartiments cellulaires spécifiques (ADN..) au sein de ces cellules malades et délivrer le médicament à l'endroit exact où il sera le plus efficace.

E) -Comment agissent les nanovecteurs de troisième génération dans l'organisme?

Les nanocapsules de troisième génération, c'est à dire des nanocapsules sur lesquelles on a fixé des polymères hydrophiles comme par exemple du polyéthylène glycol (PEG.), puis que l'on a ensuite ornés d'acide folique, sont injectées au patient par voie intraveineuse. L'acide folique permettra aux nanocapsules de reconnaître, les récepteurs à l'acide folique qui sont très présent à la surface des cellules cancéreuses. C'est ce que l'on appelle l'adressage moléculaire. Les nanocapsules qui sont environ 70 fois plus petits que les globules rouges, entrent alors dans la circulation sanguine. Les nanocapsules rencontrent alors des opsonines. La présence de PEG à la surface des nanovecteurs va empêcher leur combinaison avec des opsonines. Ils ne seront donc pas vulnérables aux macrophages (globules blancs), ce qui empêchera leur phagocytose c'est-à-dire leur capture, ingestion et digestion par les globules blancs. On les appelle alors des nanovecteurs furtifs car l'organisme ne les reconnaît pas comme étant des corps étrangers. Ils continuent donc leur chemin dans la circulation sanguine. En arrivant à proximité d'une tumeur, les nanovecteurs ornés d'acide folique se fixent sélectivement sur les cellules cibles malades, porteuses du récepteur à l'acide folique. Ils sont ensuite transportés à l'intérieur de la cellule par endocytose. Le principe actif est alors délivré dans la cellule cancéreuse [16].

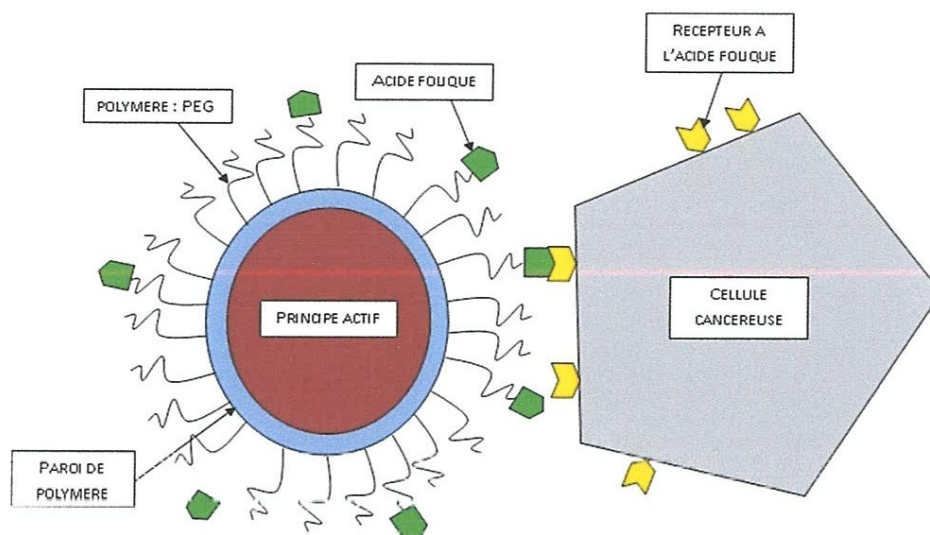


Schéma.4: principe d'action des nanovecteurs de troisième génération dans l'organisme.

II.4. Elaboration des nanoparticules hybrides à cœur métallique :

La synthèse maîtrisée de nanoparticules a ouvert la voie vers de nouvelles applications grâce non seulement à leurs propriétés intrinsèques mais aussi par les propriétés qui peuvent leur être associées. Ces nano-objets aux caractéristiques nouvelles présentent un intérêt grandissant si elles sont associées à celles d'autres éléments organiques ou biologiques. En effet, les nanoparticules quelles qu'elles soient, offrent des possibilités intéressantes de greffage pour des molécules organiques. Ces matériaux hybrides organo- minéraux sont alors l'association des avantages des deux parties sans en retrouver les inconvénients de chacun. Le cœur minéral apporte une morphologie fixée avec une forme et une surface caractéristique ainsi que des propriétés magnétiques et optiques. Les composés organiques possèdent une chimie bien plus développée avec un nombre important de molécules commerciales aisément modifiables ou fonctionnalisables selon les besoins par un large éventail de réactions. Ces molécules organiques greffées en surface permettront le contrôle de la réactivité et de la stabilité en solution des nanoparticules, et assureront l'interface avec la biologie. Le principe de l'élaboration des nanoparticules répond dans la majorité des cas à une stratégie en 3 étapes décrite ci-dessous et résumée sur (figure 11) [17].

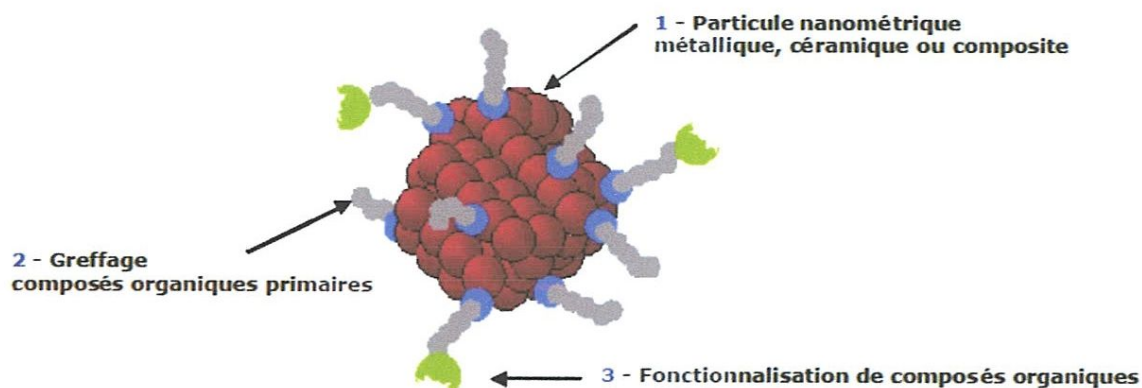


Figure.11 : nanoparticules hybrides : une élaboration en 3 étapes.

a) **Synthèse de nanoparticules minérales :**

L'élaboration de nanoparticules hybrides passe dans un premier temps par la synthèse du cœur minéral. Les nanoparticules minérales répertoriées dans la littérature peuvent être de différents types. Quel que soit le type de nanoparticules, l'objectif est de synthétiser des particules adaptées aux futures applications essentiellement par leur taille mais aussi par leur structure et leur composition. La nanoparticule doit posséder une surface adaptée pour l'accrochage de molécules organiques de façon stable. On répertorie ainsi très peu de liaisons stables de ce type. Enfin, satisfaire aux conditions précédentes on a amené à développer des nanoparticules à structure complexe du type core-shell ou des matériaux composites [18].

b) **Greffage de composés organiques :**

Le greffage de molécules organiques en surface des nanoparticules va ouvrir la voie vers de nouvelles applications. Le large panel de molécules à notre disposition ouvre un large horizon à la création de nanoparticules hybrides, même si les liaisons métallo-organique stables ne sont pas nombreuses, ce qui limite tout de même les possibilités de greffage en surface des nanoparticules. Les liaisons métal-composés organiques les plus répandues sont les liaisons or-thiol et argent-thiol, les liaisons par l'intermédiaire d'un siloxane ou d'un phosphonate.

Les composés organiques dits primaires ont essentiellement pour fonction de stabiliser les nanoparticules ce qui explique leur utilisation in situ dès l'étape de synthèse afin de prévenir l'agglomération et maîtriser la taille des particules comme c'est le cas dans les synthèses de nanoparticules d'or élaborées par Brust [19].

Dans ce dernier cas, les surfactants thiolés permettent aussi d'ajuster les caractéristiques de la nanoparticule notamment en termes de taille. Cette stabilisation prendra tout son intérêt lors des étapes d'extraction et de purification des nanoparticules et surtout lors de la fonctionnalisation par des molécules plus complexes pouvant nécessiter des conditions environnementales plus contraignantes pour la stabilité des nanoparticules (solvant, pH...).

Outre sa fonction de protection de la nanoparticule, ces molécules organiques primaires doivent aussi être les intermédiaires vers la fonctionnalisation par des molécules complexes possédant des propriétés adaptées pour l'application visée.

Elles doivent donc posséder des fonctions terminales réagissant avec celles du composé fonctionnalisant selon des méthodes de chimie organique classique. Le composé organique primaire sera donc de la forme suivante donnée sur la (figure 12).

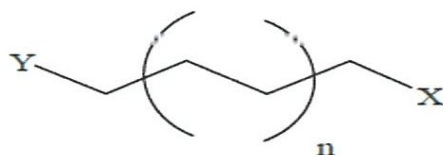


Figure.12: greffage de molécules organiques en surface des nanoparticules

X : fonction formant une liaison stable avec la nanoparticule. (SH, SiOH₃)

Y : fonction stabilisante vis à vis du milieu ou réagissant avec les fonctions de la molécule à greffer (NH₂, OH, halogènes).

c) Fonctionnalisation des composés organiques :

L'intérêt des nanoparticules réside dans cette possibilité de greffer des molécules ayant des propriétés qui font des nanoparticules hybrides des objets avec des applications originales ou améliorées. Ces molécules apportent donc au noyau minéral des propriétés supplémentaires (dispersabilité, luminescence, fonctionnalisation biologique).

La réaction entre le composé organique primaire et le composé organique complexe se fera selon des synthèses organiques classiques. La présence des particules minérales engendre cependant un encombrement stérique ainsi que des effets inducteurs. Les nanoparticules en suspension étant en très faible concentration, les réactions se dérouleront en milieu dilué. Il faudra aussi tenir compte de la présence des nanoparticules qui restent des objets encore fragiles et sensibles au milieu environnant et qui peuvent donc s'agglomérer. Cette sensibilité rendra les manipulations de séparation et de purification très délicates [20].

II.4.1. Nanoparticules d'or :

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. Dans ce domaine, les nanoparticules d'or représentent en effet des objets parfaitement adaptés non seulement par leur non-toxicité mais aussi par leur gamme de taille qui leur confère une bonne biocompatibilité et biodisponibilité. 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 multifonctionnalisation) en surface par greffage de molécules soufrées (notamment biologiques) [21].

Les nombreuses méthodes de synthèses développées pour l'élaboration de nanoparticules d'or permettent tout d'abord l'accès à des particules stables et de taille adaptable en fonction de l'application sur une gamme de 2 à 200 nm. La stabilité et la taille de ces nanoparticules en solution aqueuse (pour des applications biologiques) sont essentiellement fonction du ou des différents ligands soufrés greffés en surface des nanoparticules qui possèdent des caractères hydrophiles. Les propriétés intrinsèques du noyau métallique (masse atomique élevée, taille) permettent notamment une détection en microscopie électronique à transmission (MET) [22]. Pour obtenir une image en MET, il est nécessaire d'utiliser des matériaux denses, ce qui n'est pas le cas des molécules biologiques. Les biologistes ont donc greffé des métaux lourds aux molécules sensibles : or, platine, etc. La signature de ces métaux est différente au microscope électronique, on peut donc en utiliser plusieurs pour obtenir un marquage complexe.

Les nanoparticules métalliques étant de masse élevée, la détection par microscopie électronique à transmission est l'outil de prédilection des nanotechnologies. Cette propriété a donc été appliquée au marquage *in vitro* de coupes cellulaires analysées en MET (Figure 13).

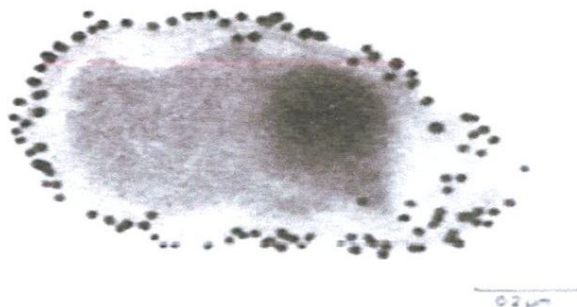


Figure.13: Utilisation des nanoparticules pour l'imagerie cellulaire par MET.

La propriété intrinsèque la plus remarquable des nanoparticules d'or reste toutefois la résonance plasmon de surface (en anglais SPR) [23]. Cette oscillation collective des électrons du nuage électronique provoque en effet pour les solutions colloïdales une absorption (bande plasmon) autour de 520 nm. Cette propriété a ainsi permis l'utilisation des nanoparticules d'or comme agent de contraste pour l'imagerie optique par microscopie photonique. La SPR procure aux nanoparticules des propriétés d'applicables dans l'étude par diffusion de la lumière. La section efficace des nanoparticules d'or est ainsi largement supérieure à celle de nanoparticules polymères de la même taille, Les nanoparticules d'or par leur simplicité de synthèse et leurs possibilités de fonctionnalisation de surface semblent posséder tous les atouts nécessaires pour l'application à la détection biologique. Leur application à la détection par fluorescence (notamment sur biopuces), si elle semble prometteuse, a toutefois encore une large marge de progression. Leur application à l'IRM n'a quant à elle jamais été rapportée bien que ses possibilités de fonctionnalisation de surface offrent une opportunité de greffer des chélates de gadolinium. Ces nanoparticules pourrait ainsi développer des propriétés intéressantes comme agent de contraste pour la relaxation en T1. Ce sont les raisons pour lesquelles des nanoparticules d'or fonctionnalisées par des fluorophores et des chélates de gadolinium ont été développées respectivement pour l'abaissement du seuil de détection en luminescence et en IRM [24].

II.4.2. Elaboration de nanoparticules hybrides à cœur d'or :

-Synthèses par méthodes chimiques :

a) Généralités :

Michael Faraday fut le premier à étudier la formation de colloïdes d'or. La méthode qu'il utilisa était basée sur la réduction d'ions AuCl_4^- par un agent phosphoré. Depuis ces travaux, nombreuses furent les méthodes de synthèse d'AuNPs d'or décrites utilisant différents types de réducteurs et conduisant à des tailles et des morphologies différentes. Cette réduction aisée d'Au (III) ou Au (I) sous forme de sels en Au (0) par différents types de réducteurs est due au fait que l'or est le plus électronégatif des métaux de transition [25]. Les méthodes utilisées ont permis d'obtenir des particules d'or monodisperses de 3 à 160 nm. Les différentes méthodes de synthèse de colloïdes d'or sont basées sur le contrôle de la réduction de l'Au(III) en Au(0). Ces méthodes utilisent généralement l'acide tétrachloro-aurique (HAuCl_4) mais varient considérablement dans la nature du réducteur, l'ordre de l'addition des réactifs, les paramètres physiques (concentration, température et vitesse d'agitation), et bien sûr la taille finale des nanoparticules. Le diamètre final est déterminé par le nombre de noyaux icosaédriques formés au début de la réaction comparé au taux d'augmentation de la taille des particules.

L'utilisation d'un réducteur rapide (phosphore blanc, acide tannique) permet d'obtenir un grand nombre de noyaux, consomme donc beaucoup d' HAuCl_4 et limite de ce fait la quantité disponible pour la croissance des nanoparticules. Les colloïdes d'or sont composés d'un noyau d'or pur Au(0) entouré d'ions AuCl_2^- adsorbés en surface. Ce sont ces ions qui confèrent la charge négative aux colloïdes et protègent de l'agrégation par répulsion électrostatique. Toutes les synthèses de colloïdes d'or sont sensibles à l'anion (chlorure>bromure>iodure) qui compresse la double couche ionique et réduit donc les répulsions électrostatiques. La déstabilisation du système aboutit à une agrégation qui s'accompagne d'un changement de couleur de la solution et éventuellement d'une sédimentation de l'or [26].

De nombreuses méthodes de synthèse ont été élaborées en faisant varier la nature de sel d'or (HAuCl_4 , $\text{AuPC}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NH}_2$ et surtout celle du réducteur employé ($\text{NaSCN}+\text{K}_2\text{CO}_3$ phosphore blanc acide ascorbique, K_2CO_3 , PPh_3 , NaBH_4 , citrate de sodium).

Parmi ces méthodes, nombreuses sont celles qui ont mené à des nanoparticules instables ou des protocoles complexes qui ont limité leur développement et leurs applications.

La méthode de Brust développée en 1994 marque une véritable révolution dans la synthèse de nanoparticules d'or avec l'obtention de nanoparticules stables et redispersables par un protocole simple de mise en œuvre. De telle sorte que, l'essentiel des articles publiés depuis sur les nanoparticules d'or sont consacrés à des nanoparticules d'or élaborées par cette méthode. Parmi les autres synthèses développées et utilisées de nos jours, la synthèse par réduction d' HAuCl_4 en présence de citrate de sodium rencontre un moindre succès dû à ses spécificités d'élaboration qui lui apporte pour certaines applications un avantage sur la méthode de Brust [27].

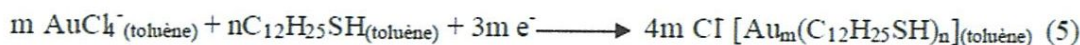
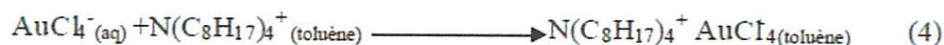
b) Synthèse de Brust et stabilisation par des thiols :

Les thiols restent le type de stabilisant le plus employé pour les nanoparticules d'or de n'importe quelle taille du fait de la plus grande force de la liaison Au-S. La stabilisation de AuNPs par des thiols fut pour la première fois publiée en 1993 par Mulvaney et Giersig qui démontraient la possibilité d'utiliser des thiols de chaînes carbonées de différentes longueurs. Les thiols sont liés de façon covalente par réaction avec la surface métallique. Deux mécanismes différents sont proposés pour la formation de cette monocouche thiolée à la surface des nanoparticules, comme décrit dans les équations 1 et 2. Si on considère une couche supérieure d'oxyde à la surface des particules, la réduction par les thiols entraîne alors la formation d'eau. En l'absence d'oxydes, on suit l'équation 2 avec formation d'hydrogène. La formation d'une liaison or-thiolate en présence de disulfures est un procédé d'oxydoréduction où la surface d'or est oxydée et la liaison S-S est rompue (équation 3) [28].



Trois facteurs doivent être pris en considération pour la réalisation d'une monocouche d'alcane-thiol stable : l'adsorption du groupement soufré à la surface de la particule, les interactions entre les chaînes alkylées et l'interaction entre le groupement de la fonction terminale et le milieu.

La technique utilisée se rapproche de la synthèse en deux phases de Faraday et utilise des thiols fortement liés à l'or. HAuCl_4 est dissous dans le toluène en présence de bromure de tétraoctylammonium (agent de transfert de phase) et réduit par NaBH_4 en présence de Dodécane-thiol [29].



En 1994, Schiffrin et Brust publièrent une méthode de synthèse de AuNPs en présence d'alcanethiols qui révolutionna le monde des nanotechnologies. En effet, les AuNPs obtenus par cette méthode simple étaient stables thermiquement et par rapport à l'air mais aussi d'une taille jamais obtenue jusque-là (1,5 à 5,2 nm) ce qui permettait leur isolement et leur redispersion dans de nombreux solvants organiques sans agrégation irréversible ou décomposition. Cette stabilité augurait donc une grande facilité de manipulation et une grande variété d'application avec une grande flexibilité de caractérisation. Brust étendit cette technique de synthèse avec la réalisation de nanoparticules stabilisées par le mercaptophénol en une seule étape, ce qui ouvrit la voie vers la synthèse de nanoparticules stabilisées par une grande variété de ligands thiolés. Le rapport thiol/ AuCl_4^- contrôle la taille des particules, pour un rapport maximal de 1/6, on obtient des nanoparticules de l'ordre de 5,2 nm avec une dispersité de l'ordre de 10 % [30].

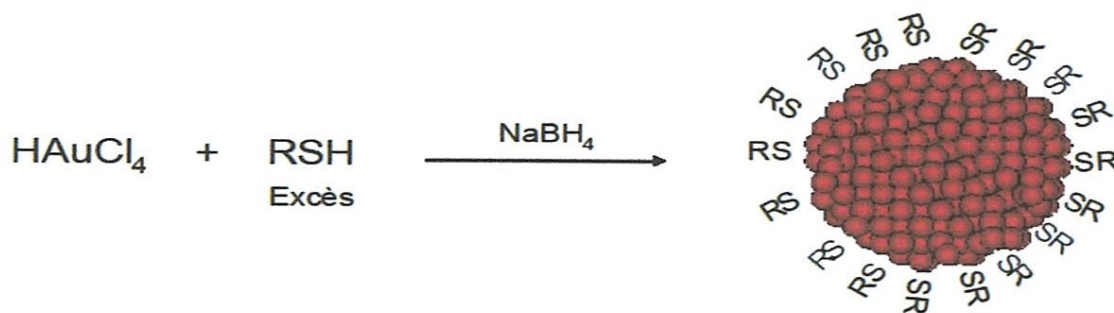


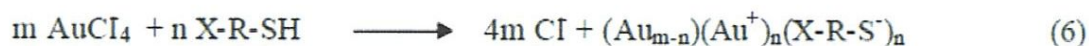
Schéma.5: synthèse de nanoparticules d'or par la voie NaBH_4 .

Les ligands thiolés à la surface des nanoparticules synthétisées par la méthode de Brust possèdent la particularité de pouvoir subir une réaction d'échange avec d'autres ligands thiolés mis en solution.

La cinétique de cet échange dépend de la concentration en ligands entrants et sortants. Le taux d'échange à la surface des nanoparticules décroît avec l'augmentation de la taille du ligand entrant et la longueur de la chaîne carbonée greffée à la surface des nanoparticules. Le greffage de nanoparticules à longue chaîne carbonée est ainsi préférable pour la stabilisation des AuNPs. Cet échange permet notamment de greffer en surface des molécules thiolées fonctionnalisées. En contrepartie, l'équilibre et la répartition de ces ligands à la surface des particules sont donc sensibles au milieu environnant. Des réactions d'échange avec des molécules thiolées porteuses d'une fonction hydrophile ont permis de rendre ces nanoparticules solubles en milieu aqueux et de ce fait, ont permis d'accéder à des applications biologiques [31].

Des nanoparticules solubles en milieu aqueux peuvent aussi être obtenues par réaction directe avec une molécule thiolée porteuse d'une fonction hydrophile (hydroxyl, acide carboxylique, amine, acide sulfonique, acide boronique, acide phosphonique thioetherocycle) permettant sa solubilité en solution.

On a alors une équation de la forme:



La charge à la surface des particules est fonction de ce groupement et est caractérisée en mesurant le potentiel (-45,3 mV pour des AuNPs stabilisées par des dérivés acide carboxylique). La charge de surface est dépendante du pH, permettant ainsi un contrôle de la solubilité. Par exemple, les AuNPs fonctionnalisées par des molécules porteuses de groupements amines sont solubles en solution acide, tandis qu'avec une fonction acide carboxylique, elles sont solubles en milieu basique. Quand le pH change, il y a neutralisation de la charge de surface (potentiel = 0), perte de solubilité et agrégation des particules. Il a été ainsi démontré que les variations du potentiel correspondaient aux variations théoriques de la longueur de Debye et du potentiel de surface [32].

La liaison covalente établit par réaction entre une seconde molécule et un groupement de la première molécule greffée à la surface de l'or est une technique efficace pour fonctionnaliser une nanoparticule et obtenir des structures complexes.

L'effet de l'encombrement stérique sur la réactivité à la surface de nanoparticules d'or a été étudié sur un mécanisme de substitution SN2. Le taux de réaction d'une SN2 a été trouvé comme étant fonction de l'encombrement stérique du nucléophile substitué (la réactivité baisse quand l'encombrement augmente) et de la longueur de la molécule en surface (la réactivité augmente quand la taille augmente).

Quoiqu'il en soit la réactivité reste proche d'une réaction classique en solution.

Les synthèses dérivées de celles de Brust en présence de ligands thiolés possèdent donc une grande stabilité et des capacités de fonctionnalisation importantes qui leur permettent d'accéder à une large gamme d'application. C'est la raison pour laquelle, elles représentent l'essentiel des publications sur les nanoparticules d'or [33].

II.5. Exemple de Synthèse de nanoparticules d'or enrobées par différents ligands :

I) Synthèse de nanoparticules d'or recouvertes par l'acide dihydrolipoïque :

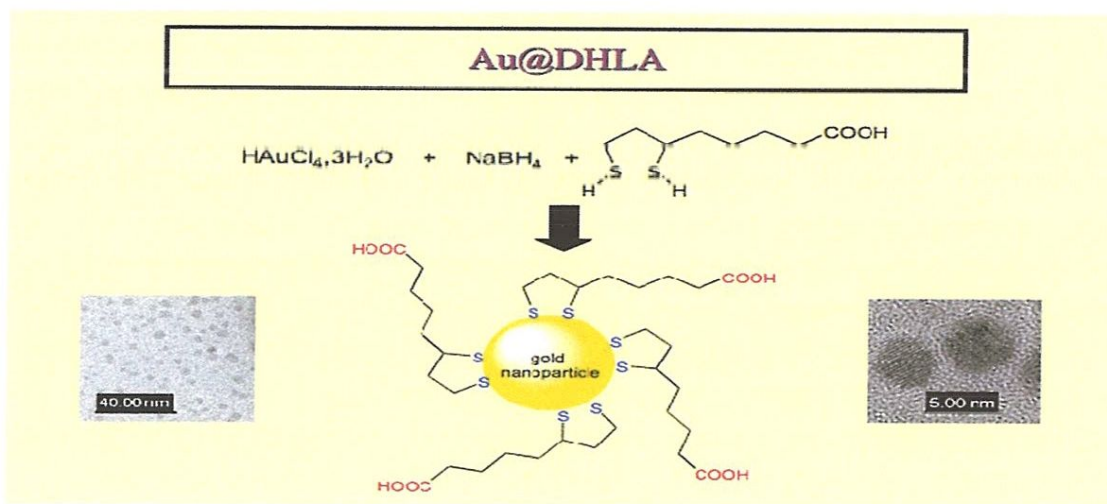


Schéma.6: Synthèse de nanoparticules d'or recouvertes par l'acide dihydrolipoïque (Au@DHLA). Clichés en microscopie électronique à transmission après purification de Au@DHLA (taille d'environ 5 nm). La présence des deux thiols induit un meilleur ancrage du DHLA sur les particules d'or.

La fonction COOH assure une meilleure stabilité colloïdale et permet l'accrochage de molécules organiques ou biologique (fluorescence, ciblage...) [34].

II) Synthèse de nanoparticules d'or recouvertes par un bis-amide thiolé de l'acide diéthylènetriamine pentaacétique (Au@DTDTPA):

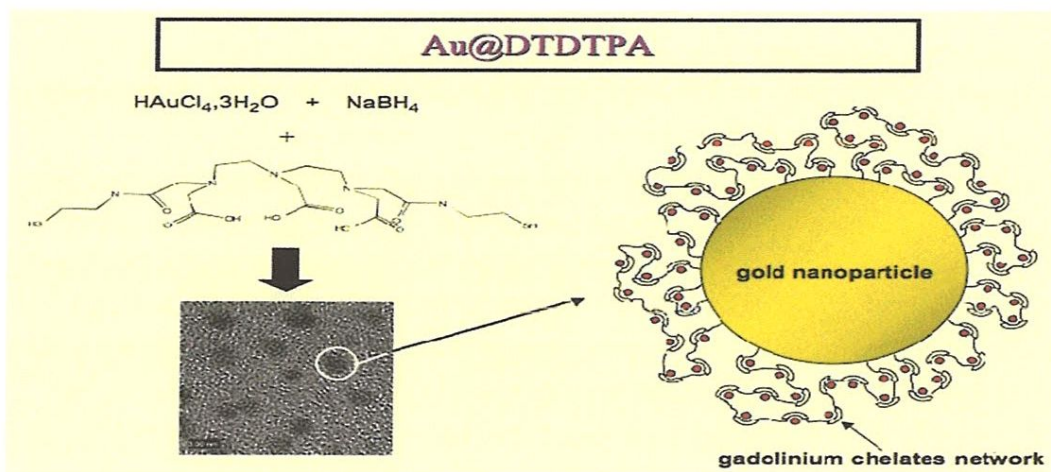


Schéma.7: Synthèse de nanoparticules d'or recouvertes par un bis-amide thiolé de l'acide diéthylènetriamine pentaacétique (Au@DTDTPA).

Clichés en microscopie électronique à transmission. La présence des deux thiols assure l'accrochage du DTDTPA sur l'or et la constitution d'un réseau résultant de l'association de plusieurs DTDTPA unis les uns aux autres par des ponts disulfures. Ce réseau, en raison des propriétés complexantes du DTDTPA, permet l'immobilisation d'ions Gd^{3-} .

III) Synthèse de Nanoparticules électroluminescentes :

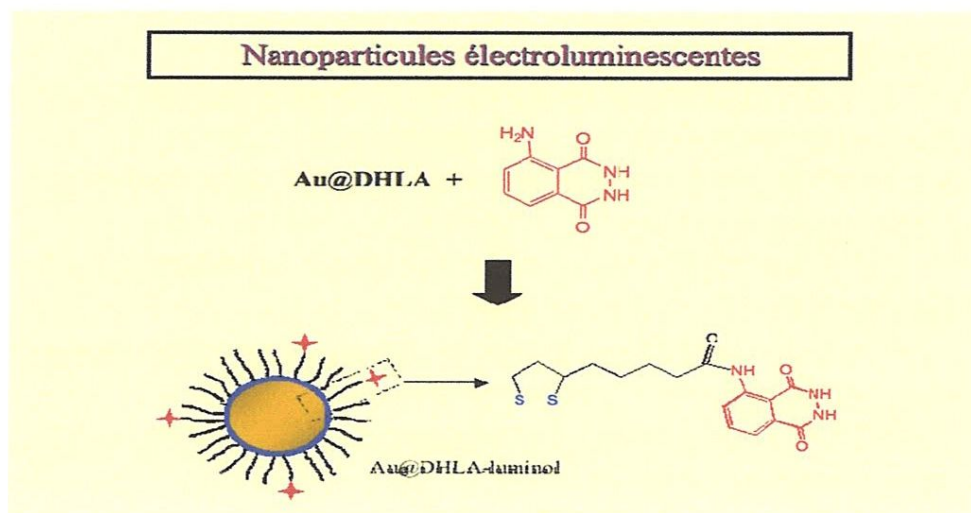


Schéma.8: Fonctionnalisation de Au@DHLA par le luminol, une molécule électroluminescente [35].

II.6. Tout-en-un :

Dans le futur proche, on espère concevoir des nanosystèmes multifonctionnels renfermant des agents diagnostiques et thérapeutiques qui seront administrés dans l'organisme et permettent le suivi visuel de la thérapie du cancer, comme le montre le schéma 9 [36].

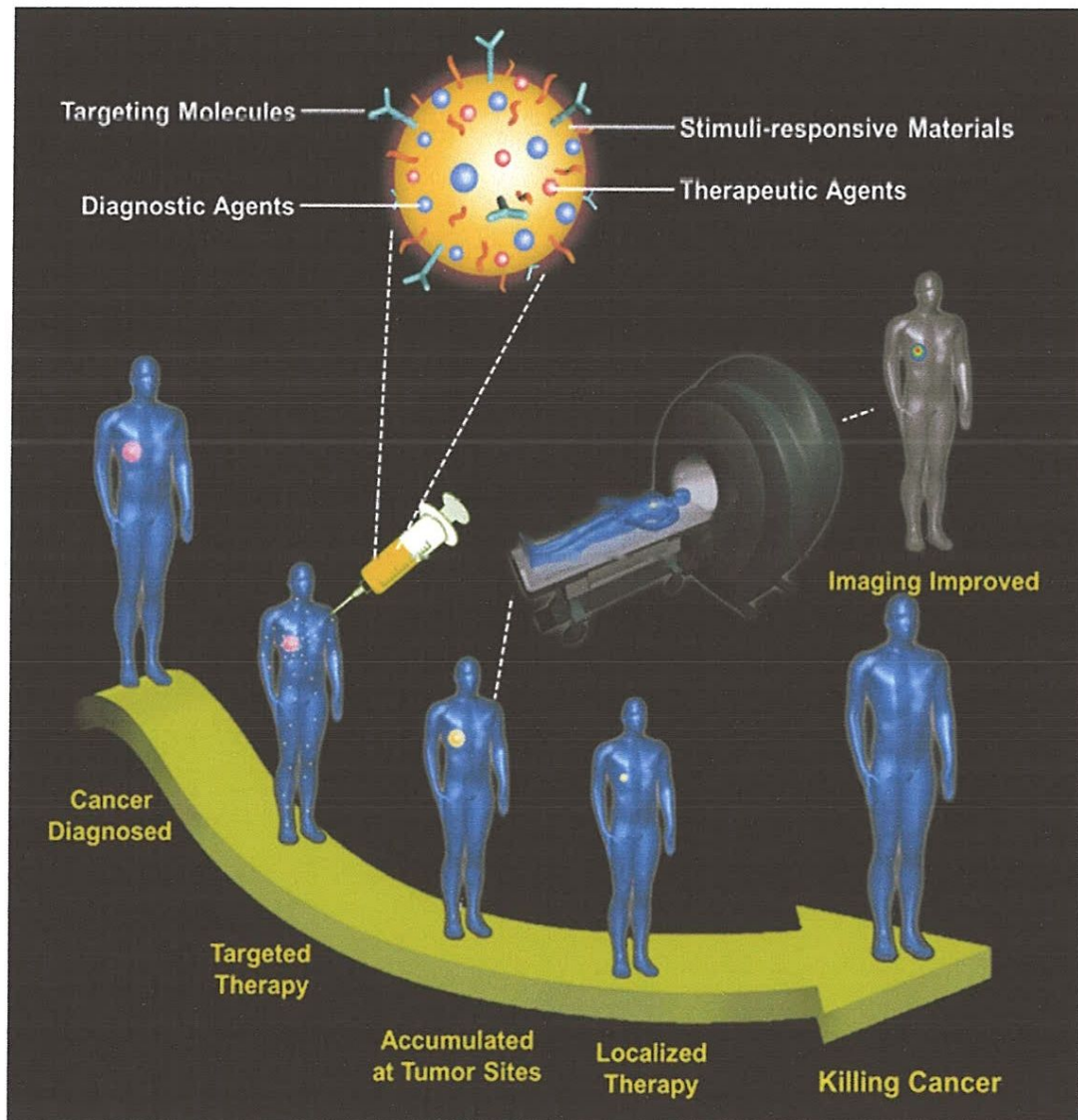


Schéma.9: Une illustration de la façon dont "tout-en-un" nano-systèmes peuvent être utilisés dans le corps humain pour le diagnostic et traitement du cancer.

II.7. 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.

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 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. Le diagnostic et la prise en charge de la maladie à un stade précoce limiteraient ainsi considérablement les traitements nécessaires à la guérison.

Motivation

Motivation:

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.

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. Le diagnostic et la prise en charge de la maladie à un stade précoce limiteraient ainsi considérablement les traitements nécessaires à la guérison.

La mise au point de médicaments dirigés spécifiquement vers des isoenzymes bien définies aboutit fréquemment à des médicaments qui agissent uniquement sur certains organes ou sur certaines zones très précises de notre organisme. C'est là qu'interviennent les nanoparticules qui de part leurs tailles et leurs capacités de polyfonctionnalisation sont des vecteurs idéaux

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 edifices

Les anhydrases carboniques (CAs) constituent actuellement une nouvelle approche dans le domaine thérapeutique pour le ciblage de plusieurs pathologies impliquant leur surexpression mais le problème majeur de ces inhibiteurs est leur manque de sélectivité surtout par rapport aux isoenzymes CAI et II omniprésents dans l'organisme ce qui nécessite la mise au point de nouveaux inhibiteurs du CAIX plus efficaces et plus sélectifs.

Dans le but d'améliorer leur propriétés pharmacocinétiques, et d'augmenter leur sélectivité, il nous a alors apparut intéressant d'élaborer des clusters de nanoparticules d'or enrobées par des 4-aminoethylbenzensulfonamide via un pont lipoyle. De part leurs tailles nanométriques, ces nanoparticules conviennent parfaitement à des applications dans le domaine thérapeutique en particulier le ciblage spécifique de l'anhydrase carbonique IX possédant un site actif extracellulaire et surexprimée dans plusieurs types de cancers.

Chapitre (III)

Résultats & Discussions

III.1. Introduction :

Les différents médicaments utilisés aujourd'hui pour lutter contre le cancer sont classés selon leur mode d'action thérapeutique et leurs cibles cellulaires. Comme exemple de nouvelles cibles récemment découvertes, on se doit de citer les anhydrases carboniques (CAs). C'est ainsi que l'isoforme IX de l'anhydrase carbonique (CA IX) qui est une métalloenzyme extracellulaire transmembranaire à zinc, joue un rôle très important dans l'acidification du microenvironnement tumoral contribuant à la propagation et la progression des tumeurs. Elle est surexprimée dans plusieurs types de cancers tout en étant présente dans très peu de tissus normaux. L'inhibition sélective de CAIX pourrait constituer une nouvelle approche pour le management des tumeurs hypoxiques.

Les inhibiteurs des CAs disponibles actuellement en thérapeutique en particulier les aryles et les hétéroarylsulfonamides sont loin d'être parfaits car ils présentent d'innombrables effets indésirables, principalement dus à leur manque de sélectivité. Les principes actifs du médicament peuvent être libérés loin du site d'action visé, perdant ainsi de leur efficacité et risquant, de surcroît, d'entraîner des effets secondaires toxiques pour des zones saines de l'organisme.

Donc le développement d'inhibiteurs plus sélectifs constitue un grand challenge pour l'obtention de nouveaux types d'inhibiteurs.

Dans une chimie pharmaceutique qui se veut moderne, la spécificité des cibles ainsi que la sélectivité sont des critères de recherche incontournables. Plus un médicament sera sélectif vis-à-vis de sa cible, moins il y aura de chances de le voir interagir avec des cibles différentes, c'est-à-dire d'assister à des effets indésirables.

III. 2. Développement d'inhibiteurs de CAIX imperméables aux membranes cellulaires :

Dans ce qui suit, nous nous concentrerons sur les derniers développements dans la conception et la synthèse des inhibiteurs sélectifs de CAIX touchant à notre thème.

Il est possible de concevoir des inhibiteurs de l'anhydrase carbonique (CAIs) imperméables à la membrane- c'est à dire des inhibiteurs spécifiques dirigés uniquement vers les CAs extracellulaires telle que le CAIX.

Cette possibilité a complètement été explorée en concevant en particulier des sulfonamides porteurs de charges positives ou sous forme de complexes métalliques.

L'inhibition du CAIX a été étudiée avec une série de composés positivement chargés issus de sulfanilamide (Figure 14), d'homosulfanilamide et de 4-aminoethylbenzene-sulfonamide tous dérivés de la pyridine [1].

La majorité de ces composés a montré une activité inhibitrice d'un intérêt considérable contre le CAIX ((KI dans la gamme de 6-54 nM) avec une nette sélectivité par rapport aux isozymes CAI, CAII et CAIV omniprésents dans l'organisme, ce qui souligne l'importance de cette stratégie pour le développement d'agents anticancéreux plus efficaces et plus sélectifs.

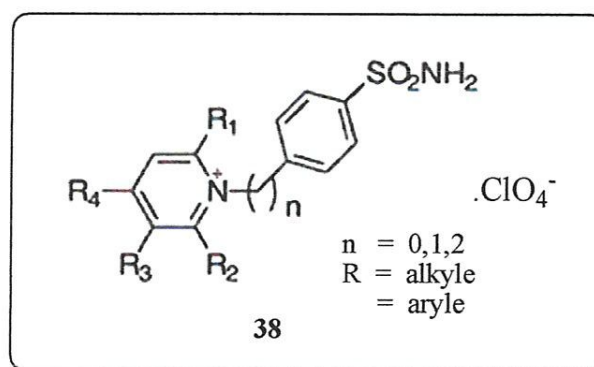


Figure.14: Structure générale d'une classe de sulfanilamides positivement chargés dérivés de la pyridine, utilisée pour le ciblage de l'hCAIX.

D'autre part, Il a été montré récemment que les bases de Schiff dérivés des sulfonamides [2] se sont révélés posséder une activité inhibitrice efficaces contre plusieurs isozymes de l'CA, telles que l'CAI, II et IV. Ces composés et en particulier ceux appartenant aux séries aromatiques et leurs complexes métalliques (Figure 15) se sont montrés comme inhibiteurs contre le CAIX associées aux tumeurs, avec des KIs dans la gamme de 6.3-48 nm, faisant ainsi de ces composés des chefs de fil très intéressants pour le développement ultérieur d'autres inhibiteurs plus sélectifs pour le ciblage du CAIX.

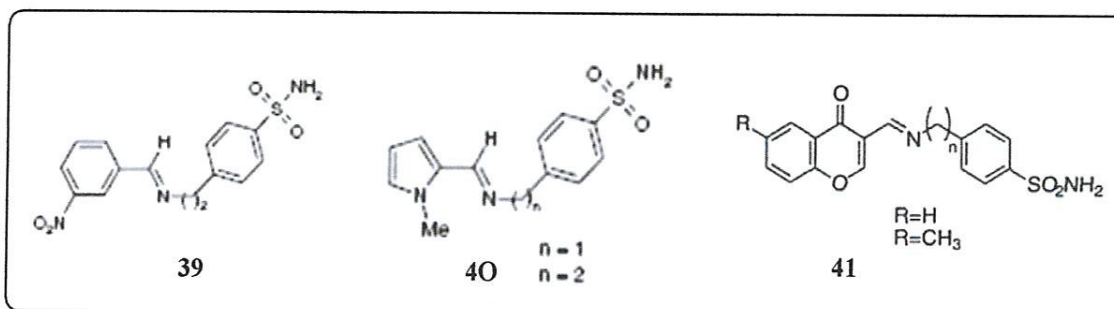


Figure.15: Les bases de Schiff dérivés des sulfonamides sont également des inhibiteurs efficaces de l'CA.

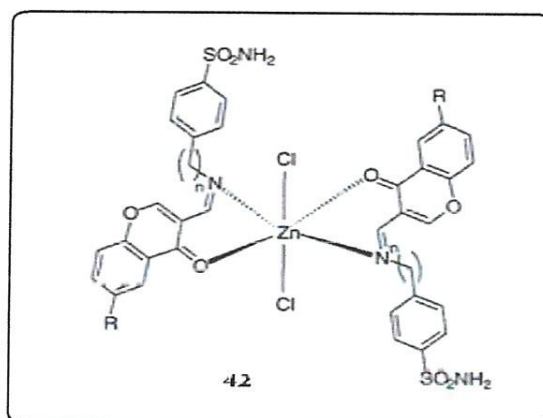


Figure.16: Formation d'un complexe de zinc avec les bases de Schiff.

Plus récemment, la conception d'une famille d'inhibiteurs sélectifs contre le CAIX contenant l'élément bore a été proposée par l'équipe du Dr J-Y. Winum [3].

L'accumulation de ces inhibiteurs (Figure 17) dans des tumeurs peut mener à la destruction sélective de la partie atteinte, sans toucher aux tissus sains (thérapie par capture boroneutronique : BNCT)

Dotés d'une tête chercheuse, ils seront capables d'atteindre précisément leur cible. Le ciblage spécifique peut donc réduire la toxicité et l'encapsulation ou la conjugaison à des nanoparticules peut protéger également la molécule active du métabolisme et de l'évacuation générale (macrophages du foie).

Autre avantage de ces missiles intelligents miniaturisés : il est possible d'y intégrer des nanoparticules métalliques qui, excitées par un laser ou des ultrasons, s'échauffent et détruisent, sélectivement les cellules tumorales.

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 et pharmaceutiques.

Notre objectif dans ce travail consiste donc à appliquer le principe de la vectorisation Par les nanoparticules d'or à un arylsulfonamide à activité anti-tumorale potentielle, et ce dans le but d'augmenter sa sélectivité vis-à-vis de certaines enzymes telle que l'isoforme IX de l'anhydrase carbonique impliquée dans une large variété de cancers.

III.4. Elaboration de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des arylsulfonamides pour le ciblage de l'CA :

Notre tâche dans ce mémoire porte essentiellement sur la synthèse d'inhibiteurs de l'anhydrase carbonique avec une nouvelle approche: L'approche *nano*, cette dernière requière d'excellentes compétences en médecine.

Dans ce domaine, les nanoparticules d'or représentent en effet des objets parfaitement adaptés non seulement par leur non-toxicité mais aussi par leur gamme de taille qui leur confère une bonne biocompatibilité et biodisponibilité. Leurs possibilités d'applications sont non seulement liées aux propriétés intrinsèques de leur coeur métallique mais aussi à leurs énormes capacités de fonctionnalisation. Les molécules soufrées, en raison de leur forte affinité pour l'or, permettent des possibilités de fonctionnalisation quasi- illimitées des nanoparticules d'or. Ce constat a d'ores et déjà permis l'élaboration d'un grand nombre de nanoparticules fonctionnalisées pour des domaines d'application aussi diverse et variée que la catalyse, l'optique non linéaire, l'électrochimie ou la biologie.

Pour notre cas, la solution la plus simple pour le greffage d'une arylsulfonamide sur la surface d'une nanoparticule d'or passe donc par l'élaboration d'un ligand disulfuré ayant la structure générale présentée par la figure suivante :

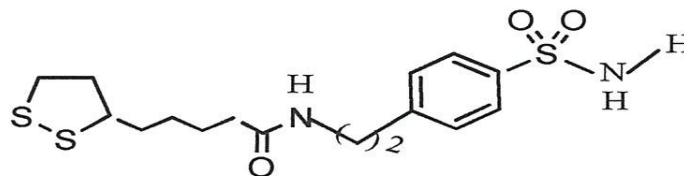


Figure.18: Structure générale du ligand obtenu.

Il est obtenu par le couplage de l'arylsulfonamide avec l'acide thiooctique aussi appelé acide **lipoïque**. (Figure 19). Il est à noter que d'autres alternatives sont envisageables mais semblent bien moins séduisantes.

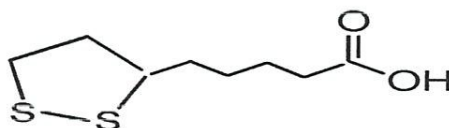


Figure.19: Structure générale de l'acide lipoïque.

Pourquoi l'acide lipoïque ?

A) Du point de vue chimique :

Cette molécule présente les caractéristiques uniques de posséder une fonction disulfure cyclique à une extrémité de la molécule. Elle présente aussi à l'autre extrémité, une fonction acide qui est une fonction nécessaire pour former des liaisons peptidiques. L'acide lipoïque a déjà été étudié dans l'élaboration de nanoparticules d'or qui se sont avérées plus stables mécaniquement et thermiquement [4] que les nanoparticules formées d'alcanethiols à longue chaîne. Cette stabilité est expliquée par la coopérativité entre les deux soufres pour renforcer la liaison avec la surface métallique. De plus, le fait de posséder déjà un pont disulfure dans la molécule au départ empêche la dimérisation que l'on observe en solution avec des thiols simples.

B) Du point de vue biologique:

Outre ses propriétés chimiques particulières, l'acide lipoïque en tant que structure biologique, joue plusieurs rôles physiologiques [5].

La validité de notre travail en choisissant l'acide lipoïque comme motif de couplage intéressant, se trouve en effet renforcée par la littérature [6, 7, 8] décrivant les dérivés de l'acide lipoïque comme étant des dérivés pouvant produire des effets bénéfiques ou favorables dans le traitement de certaines pathologies notamment :

- Les troubles cardiovasculaires et cérébrovasculaires
- les maladies prolifératives et inflammatoires
- Les maladies auto-immunes et virales.
- Le cancer.
- les maladies neurologiques associées à des intoxications
- toutes les pathologies caractérisées par une production ou un dysfonctionnement de monoxyde d'azote (NO) [9].

A cet effet, **l'acide lipoïque** est parfaitement compatible avec notre stratégie de synthèse qui nous a permis d'obtenir un ligand (Figure 18) comportant une fonction disulfure terminale avec laquelle ce ligand sera greffé sur des nanoparticules d'or.

III.4. 1. Synthèse des conjugués arylsulfonamides -acide lipoïque :

Les conjugués: arylsulfonamides- acide lipoïque de formule générale évoquée précédemment (Figure 18) sont obtenus avec un bon rendement par le couplage d'une série d'arylsulfonamides inhibiteurs potentiels de l'anhydrase carbonique avec l'acide lipoïque dans le DMA (diméthylacétamide) en présence de l'EDCI (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide) et du DMAP (4-diméthylamoni pyridine) à température ambiante selon le schéma réactionnel suivant :

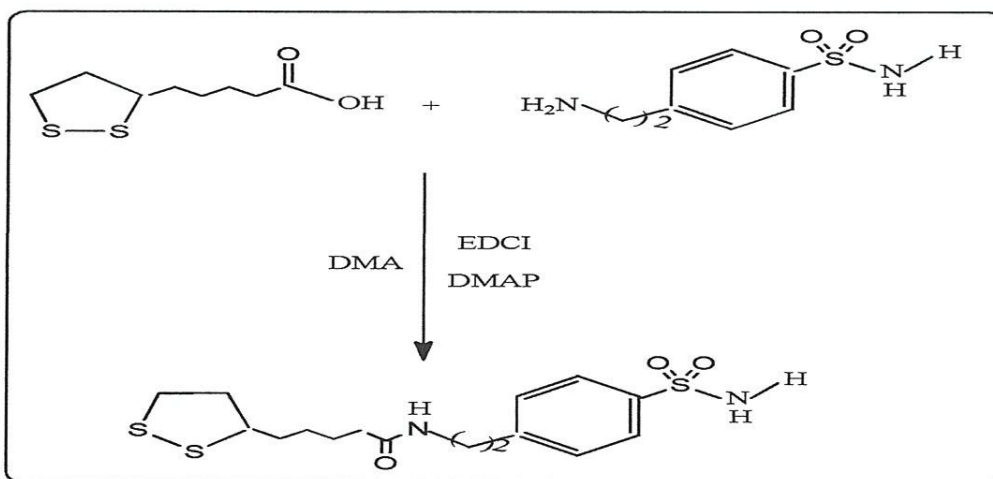


Schéma.10: Accès aux conjugués:arylsulfonamide -acide lipoïque.

L'emploi des carbodiimides tels que le DCC (1,3-dicyclohexylcarbodiimide) ou l'EDCI (1-éthyl-3-(3'-diméthylaminopropyl)carbodiimide) pour la formation d'une fonction amide est un moyen éprouvé et très connu en synthèse peptidique [10, 11]; Cependant ce procédé s'accompagne souvent de réactions secondaires qui peuvent compliquer l'isolement des produits désirés tout en diminuant considérablement leurs rendements. Le mécanisme général connu faisant intervenir ces réactions est présenté dans le schéma 11 suivant :

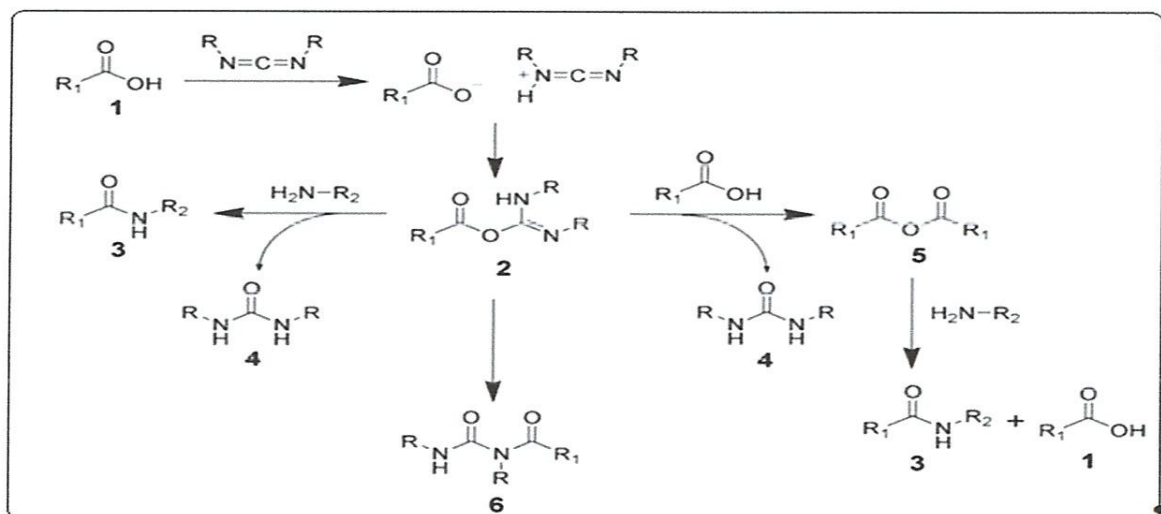


Schéma.11: Mécanisme du couplage peptidique faisant intervenir des réactions parasites.

En effet, l'acide 1 réagit avec le carbodiimide pour conduire au produit clé: l'O-acylisourée 2 considéré comme un ester carboxylique possédant un groupement activé facilement partant ; ensuite, l'O-acylisourée obtenu réagit avec les amines pour donner l'amide désiré 3 et l'urée 4. Cependant, le composé intermédiaire O-acylisourée peut réagir également avec un acide carboxylique additionnel 1 pour produire un anhydride d'acide 5 lequel peut réagir ultérieurement avec une amine pour donner l'amide désiré 3.

La réaction qui implique le réarrangement de l'O-acylisourée 2 au N-acylurée 6 est la réaction indésirable principale.

L'optimisation de cette réaction par la mise au point de nouvelles conditions expérimentales qui consiste à utiliser l'EDCI comme agent déshydratant en présence du DMAP en tant que catalyseur dans le DMA, nous a permis d'accéder aux produits désirés avec des rendements satisfaisants.

Et dans ce cas, le mécanisme réactionnel probable est le suivant (Schéma 12) :

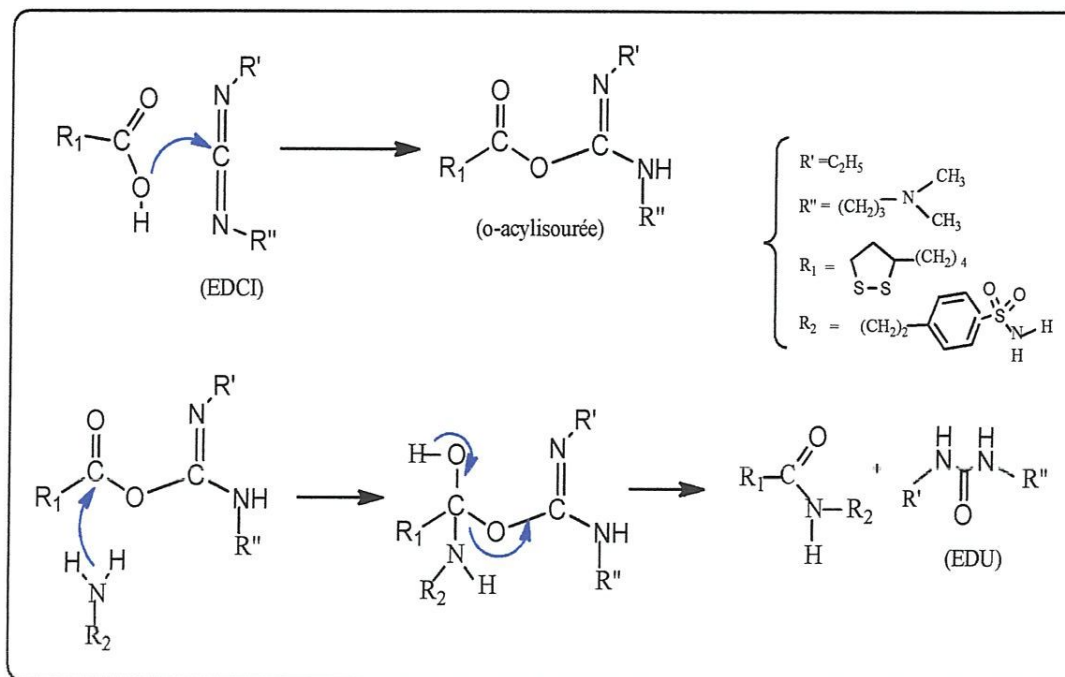


Schéma.12: Mécanisme du couplage des arylsulfonamides avec l'acide lipoïque en présence de la triade : EDCI, DMA et DMAP.

L'attaque nucléophile de l'acide lipoïque sur l'EDCI conduit à une O-acylisourée intermédiaire. L'attaque de l'amine primaire sur le carbonyl activé de ce dernier suivi d'un réarrangement conduit à la formation de la liaison peptidique et à la libération du produit N, N'-éthyl-diméthylaminopropylurée (EDU).

Le produit que nous avons préparé en associant l'acide lipoïque avec l'arylsulfonamide en faisant intervenir des liaisons peptidiques biodégradables seront de toute évidence de bons candidats susceptibles d'induire une activité biologique intense.

A notre connaissance, aucune référence à la synthèse de ces composés n'a été relevée dans la littérature, et ces composés apparaissent donc comme une classe nouvelle qui peut présenter des propriétés inédites.

III.4. 1.1. Caractérisations des ligands obtenus:

Les caractéristiques spectroscopiques du composé obtenu sont en accord avec la structure prévue pour ce composé.

a) Par spectrométrie de masse :

Le ligand obtenu a été observé par spectrométrie de masse SM (ESI⁺; ESI⁻), qui donne un pic moléculaire de 387,18 [M-H]⁻ parfaitement en accord avec la masse de la structure proposée (Figure 20).

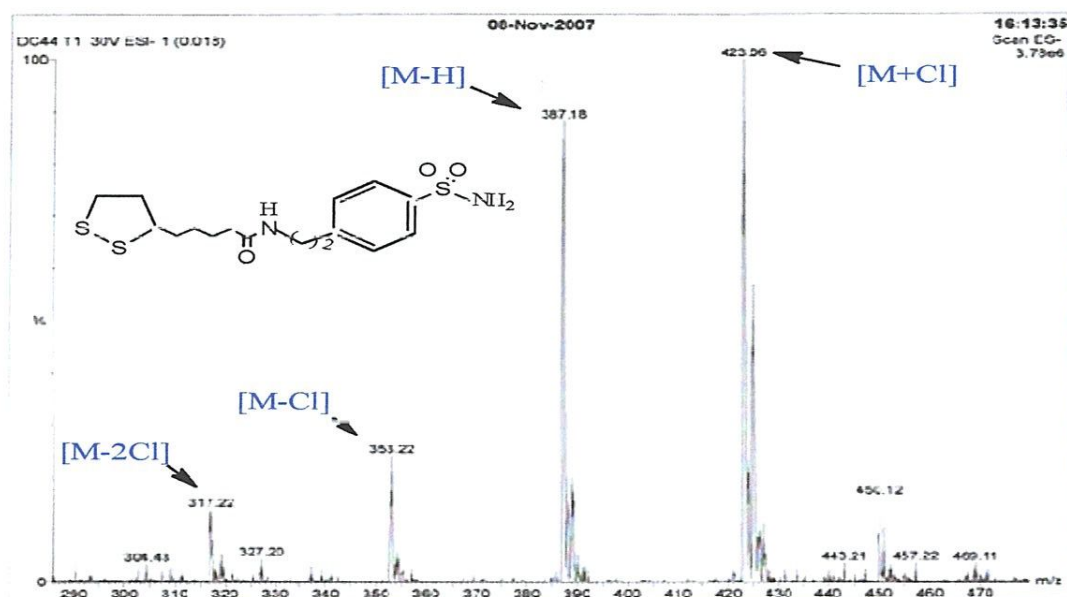


Figure.20: Spectre de masse du ligand obtenu

b) Par spectrométrie RMN¹H :

En RMN¹H obtenu dans le DMSO, le spectre du ligand est présenté sur la figure 23. On constate en particulier que le proton N-H de la liaison peptidique est mis en évidence par l'apparition d'un signal sous forme de triplet entre 7.91 ppm, par contre le signal intense allure de singulet apparaissant vers 7.37 ppm est attribué aux protons NH₂ du groupement sulfonamide. Les protons aromatiques apparaissent à gauche dans la région des champs faibles et à droite dans la zone des champs forts apparaissent les protons aliphatiques. Les signaux des protons aromatiques sont observés entre 7.38 et 7.76 ppm.

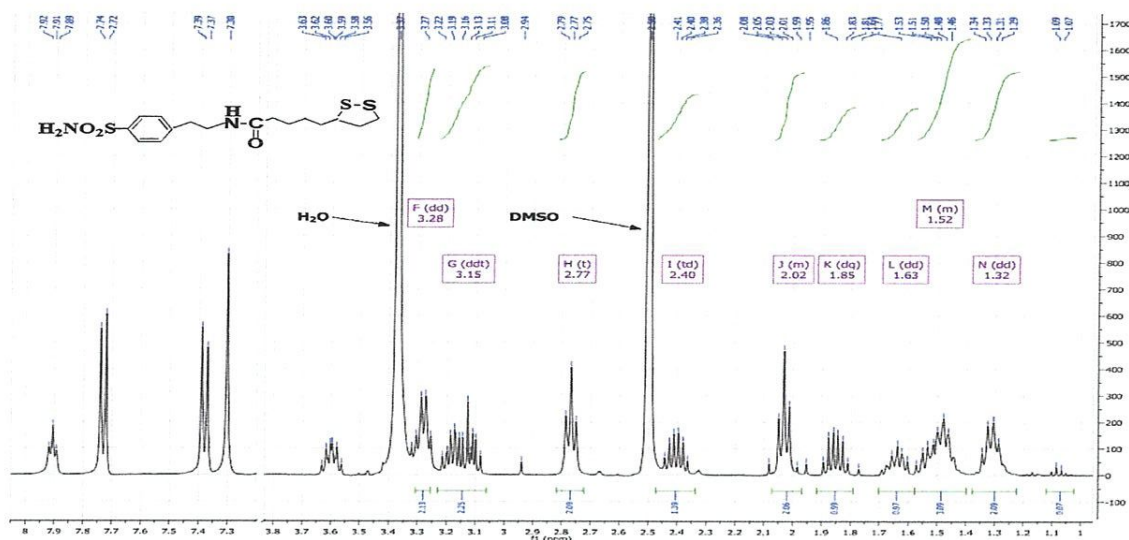


Figure.21: Spectre RMN¹H du ligand obtenu dans le DMSO-d₆.

c) Par spectrométrie RMN ¹³C :

Sur le spectre RMN ¹³C dans le DMSO-d₆, enregistrés à température ambiante, on constate l'apparition d'un signal vers 172.17 ppm caractéristique du carbone C=O de la fonction amide, quatre signaux entre 143.81 et 125.62 ppm correspondant aux carbones aromatiques et trois signaux : l'un vers 56.09 ppm correspondant à un carbone déblindé lié au groupement carbonyle et les deux autres entre 41.62 et 38.08 ppm, sont attribués aux carbones liés au pont disulfure dans l'hétérocycle du reste lipoyle. Les signaux situés vers la zone des champs plus forts correspondent aux carbones aliphatiques (Figure 22).

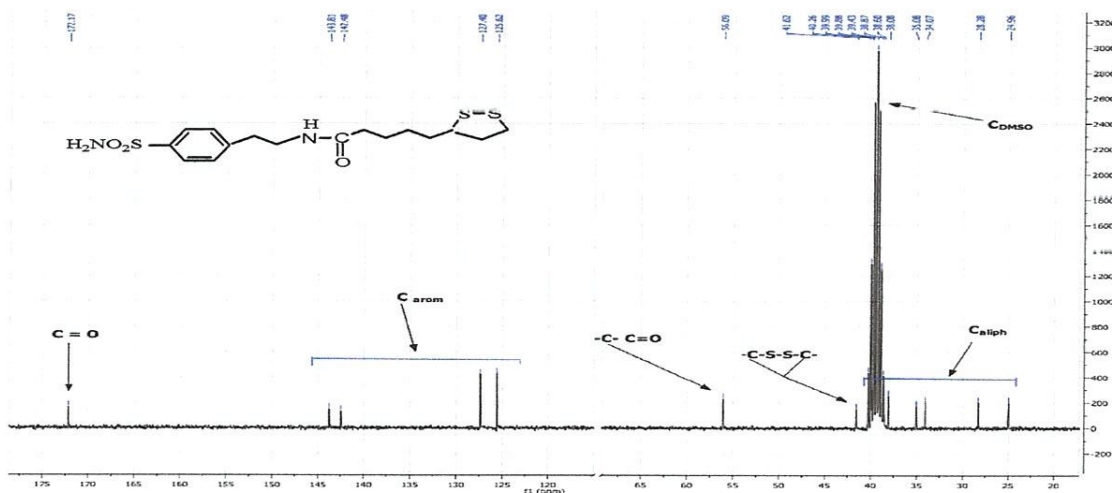


Figure.22: Spectre RMN ¹³C du ligand dans le DMSO-d₆.

Le tableau ci-dessous regroupe certaines caractéristiques physico-chimiques du ligand obtenu.

Tableau. 2: Rendements et caractéristiques physico-chimiques du ligand obtenu

SM (ESI ⁺ et/ ou ESI ⁻)	Rf*	Tf (°C)	Rdt %
353.22, 387.18, 423.06	0,88	131	68

* Eluant utilisé : (CH₂Cl₂/MeOH, 7,5/1,5).

III.4. 2. Greffage du ligand:arylsulfonamides-acide lipoïque sur des nanoparticules d'or :

Le deuxième objectif de notre travail dans cette partie a été consacré au greffage du conjugué arylsulfonamide-acide lipoïque obtenu sur des nanoparticules d'or.

L'élaboration de nanoparticules d'or peut être réalisée par un large panel de méthodes qu'elles soient chimiques ou physiques.

Toutes les approches pour préparer les colloïdes d'or stables impliquent la réduction d'un sel d'or en présence d'un stabilisant.

Deux méthodes sont apparues clairement comme les plus intéressantes et les plus répandues, il s'agit de la méthode Brust et la méthode citrate.

Ces deux méthodes (déjà développées dans le chapitre II de la partie étude bibliographique) mènent à des nanoparticules aux caractéristiques différentes, et selon les applications visées.

Il nous a donc fallu choisir la méthode de Brust communément utilisée au laboratoire. La littérature présente un grand nombre de synthèses dérivées de cette méthode, Par cette méthode, il est possible de synthétiser en une seule étape des nanoparticules d'or greffées par différents types de dérivés thiolés.

La synthèse se fait par réduction à l'aide de NaBH₄ en présence d'un excès de ligands se greffant directement sur la nanoparticule (voie directe) comme présenté sur le schéma 13, le greffage du conjugué:arylsulfonamide -acide lipoïque sur des nanoparticules d'or a été réalisé en une seule étape par l'action de ce ligand sur l'acide chloraurique en présence de NaBH₄ dans le DMSO et à température ambiante pour conduire à un cluster stable.

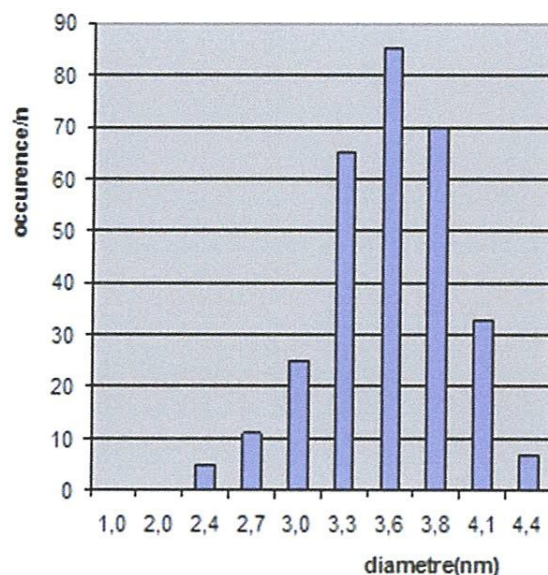


Figure.24: Histogramme de distribution de taille pour les nanoparticules obtenues

b) Spectroscopie UV-Visible :

-La résonance plasmon de surface (SPR) :

La propriété intéressante des métaux à l'échelle nanométrique est la présence de résonances plasmons de surface. Ces résonances sont dues à des oscillations collectives des électrons de conduction (électrons de valence du métal considérés comme un gaz ou plasma d'électrons libres). Ces oscillations peuvent se propager dans le volume du métal provoquant une forte polarisation de la particule.

La fréquence de la résonance plasmon dépend de plusieurs facteurs: Comme La nature du matériau (fonction diélectrique), La taille, La forme, L'environnement et L'état de surface (functionalization= chimisorption ou physisorption...).charge extérieure, agrégation degré ou distance d'interparticule [13].

Les spectres UV-visible des nanoparticules bien dissoutes et dispersées dans le DMSO (dimethylsulfoxyde) présentent une bande d'absorption correspondant au plasmon de résonance de surface typique et caractéristique des colloïdes d'or qui est centré autour de 530 nm (Figure 25).

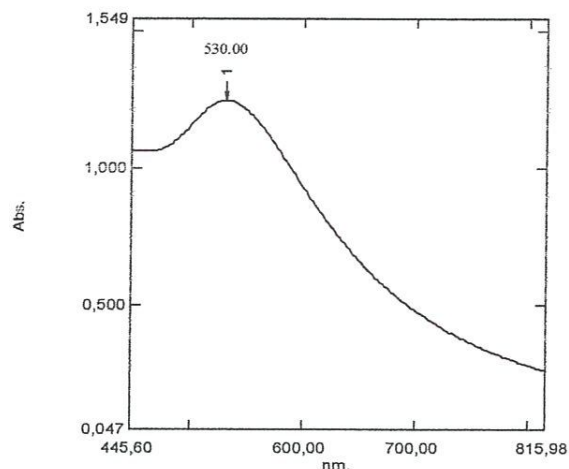


Figure.25: Spectre UV-visible des nanoparticules d'or dispersées dans le DMSO.

A différentes concentrations dans le DMSO, on constate que toutes les dispersions colloïdales obtenues absorbent à la même longueur d'onde (530 nm), (figure 2), et au fur et à mesure qu'on augmente la concentration, l'intensité de l'absorption augmente, cette déstabilisation du système aboutit à un changement de couleur de la solution du mauve clair au pourpre.

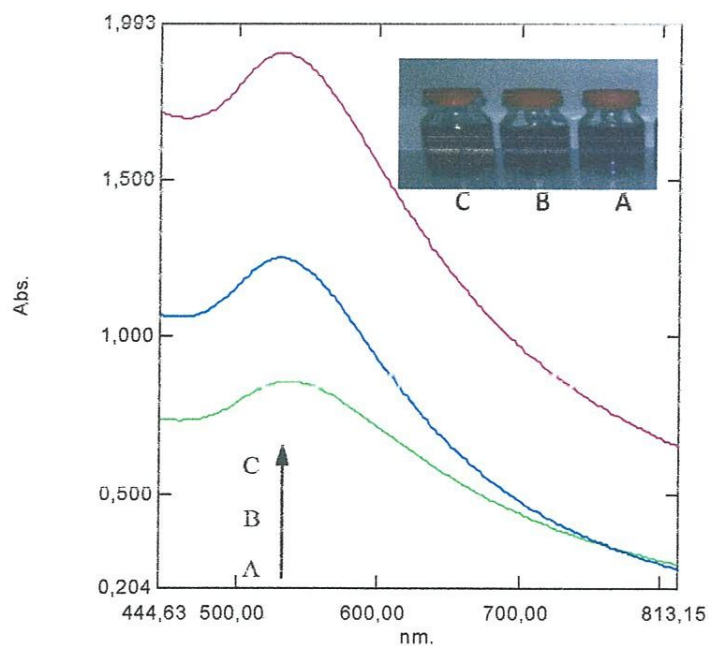


Figure.26: Spectre UV-visible des nanoparticules d'or pris à diverses concentrations :A,B ,C dans le DMSO.

c) Par Spectroscopie IR :

Pour avoir une preuve plus directe du greffage du ligand arylsulfonamide sur les nanoparticules d'or, une analyse par spectrométrie infrarouge a été conduite les spectres ont été enregistrés à partir des échantillons en poudre la (figure 27) fait apparaitre le spectre IR de l'arylsulfonamide en couleur mauve et celui des nanoparticules enrobées avec le même ligand en rouge.

La superposition de ces deux 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 d'arylsulfonamides.

En effet, les bandes à 1335 et 1157 cm^{-1} sont assignées respectivement aux vibrations asymétrique et symétrique du groupement sulfonyle SO_2 .

Les bandes étroites à 1626 et 1543 cm^{-1} dans le spectre du ligand sulfonamide sont attribuées respectivement aux vibrations des groupements $\text{C}=\text{O}$ de l'amide et $\text{C}=\text{C}$ du noyau aromatique. Ces mêmes bandes apparaissent avec épaulements sur le spectre des nanoparticules et dont la bande est centrée à 1590 cm^{-1} . Les bandes à 1095 et 1001 cm^{-1} sont dues aux vibrations du reste lipoyle dans le ligand et les nanoparticules d'or respectivement. Les bandes à 3084 et 3045 cm^{-1} sont assignées respectivement aux vibrations $\text{C}-\text{H}$ aromatiques du ligand et des nanoparticules.

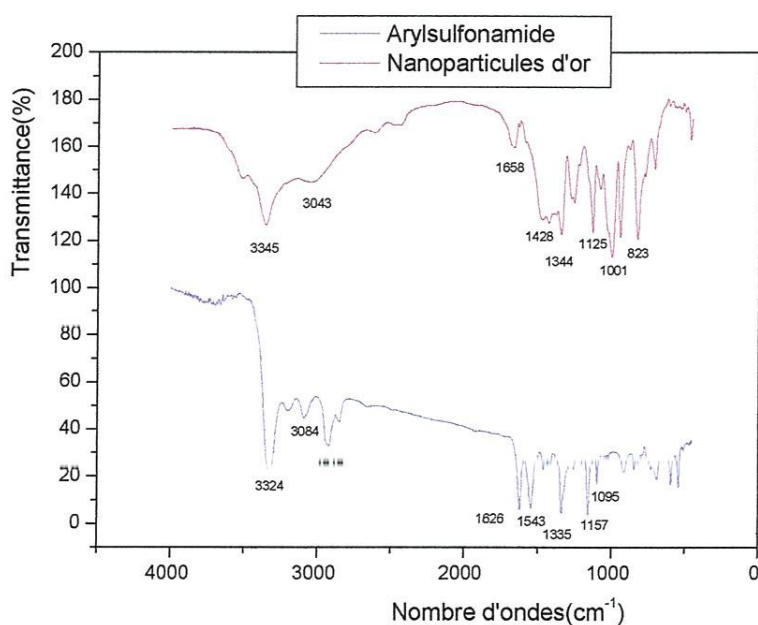


Figure.27: Spectres IR superposés du ligand et des nanoparticules d'or.

III.5.Conclusion :

Des nanoparticules d'or avec une taille moyenne de 3,5 nm ont été synthétisées en une seule étape par la méthode de Brust modifiée utilisant le NaBH₄ comme réducteur et le DMSO comme solvant. L'élaboration de ces nanoparticules a été basée sur le greffage direct des ligands préalablement préparés par couplage entre une série d'arylsulfonamides avec l'acide lipoïque pour conduire de manière reproductible à des clusters de taille homogène et stables.

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.

Chapitre (IV)

Protocoles Expérimentaux

IV.1. Conditions générales :

Les réactifs utilisés sont fournis par Sigma-Aldrich et Flucka et sont utilisés sans purifications. Les chromatographies sur couches minces (CCM) ont été réalisées sur plaque de silice en aluminium Merck 60 F354 (art.5554). Selon leur nature, les produits ont été révélés par différentes méthodes: à la lumière UV (254nm) pour les composés possédant un chromophore, à l'aide d'un révélateur chimique approprié; pour les aminés dans une solution de ninhydrine dans l'éthanol (0,1%).

La purification des composés par chromatographie a été effectuée soit sur gel de silice avec de la silice Carlo Erba (Silica Gel 60A, et 60 F254 granulométrie: 35-70 μ m)

Les points de fusion non corrigés ont été déterminés en capillaire sur un appareil Buchi 530.

Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés à température ambiante sur Bruker DRX 400 (à une fréquence de 400MHz). Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm, utilisant DMSO- d_6 comme solvants et le tetramethylsilane (TMS comme référence interne).

La multiplicité des signaux est indiquée par une (ou plusieurs) lettre(s) minuscule(s): singulet, d : doublet ,t : triplet ,m :multiplet.

Les spectres UV-visible sont enregistrés à température ambiante sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda 35 sur une gamme de 400 à 800 nm,

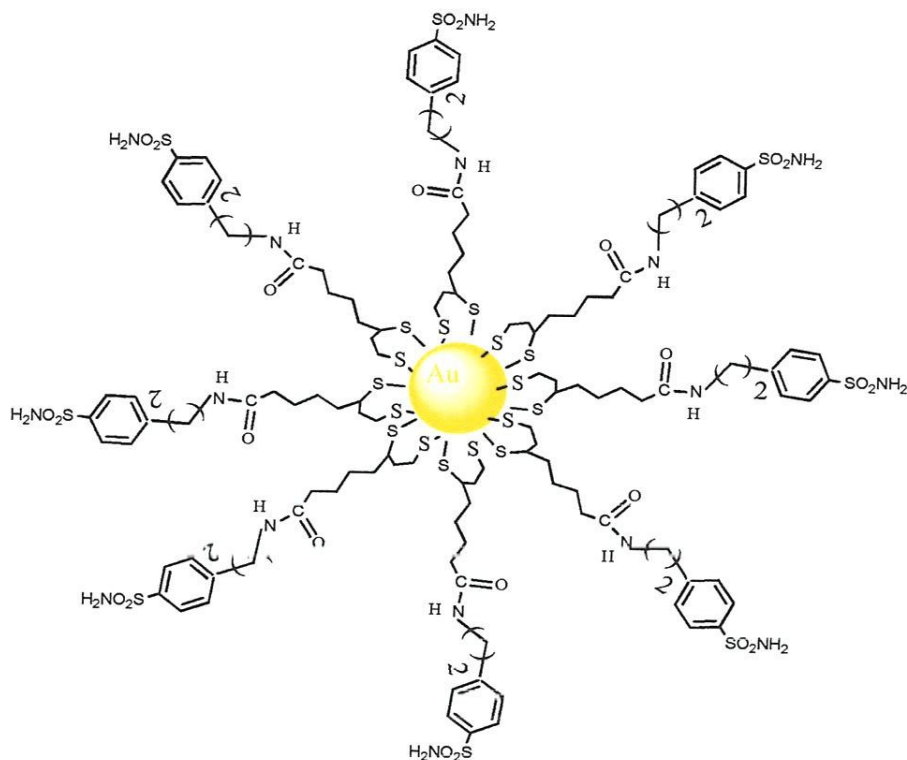
Les spectres FT-IR sont enregistrés sur un spectrophotomètre Perkin Elmer spectrum one. les spectres infrarouges Fourier-transformés

Les spectres de masse sont obtenus par technique electrospray sur un appareil Water Micro-Mass ZQ, en mode positif et négatif.

Les analyses en microscopie électronique à transmission (MET) ont été effectuées à une tension d'accélération de 100 kV sur un microscope (JEOL 1200 EXII), (10° 60 $^\circ$) équipé d'un filtre à base de nickel à l'encontre des radiations émises par le cuivre (1.5405 Å).

Les paramètres de mesure sont : stepsize, 0.01671; counting time, 60 sec.

IV.2.2. Préparation des nanoparticules d'or :



-Mode opératoire général:

50 mg de $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (8.12 éq) dissout dans 20ml DMSO est rapidement mélangé avec un même volume de DMSO (20ml) contenant 75.5 mg (133.5 éq) de NaBH_4 et (1 éq) du ligand : (N-[4-Sulfonamidophenyl]-ethyl]-5-(1,2-dithiolan-3-yl) pentanamide; le mélange réactionnel devient rapidement brun intense. Après 24h d'agitation à température ambiante, 40ml de CH_3CN sont ajoutés pour donner un précipité noir, ce dernier est collecté par centrifugation, lavé deux fois par 60ml de CH_3CN , DMSO (V/V = 1/1) et 60ml d'EtOH puis séché sous vide pendant 12h à 80°C pour donner les nanoparticules d'or désirées.

-Caractérisations:

Morphologie : nanoparticules homogènes de forme sphériques.

Taille : diamètre moyen 3.33 nm correspondant à 720 atomes d'or par particule.

Analyse par UV-visible : (échantillon en poudre), une bande d'absorption centrée autour de 530nm caractéristique des nanoparticules d'or.

Analyse par IR : 1344 et 1125 cm^{-1} [SO_2], 1658 cm^{-1} [$\text{C}=\text{O}$], 1428 cm^{-1} [$\text{C}=\text{C}_{\text{Ar}}$], 1001 cm^{-1} reste lipoylé, 3043 cm^{-1} [$\text{C}-\text{H}_{\text{Ar}}$].

Conclusion générale

Bibliographie

Références Bibliographiques

Chapitre I :

- [1] Borel, Maquart, LePeuch, Randoux, Gillery, Bellon, Monboisse ; Biochimie Dynamique, De Boeck Université, Paris, Bruxelles, (1997).
- [2] Graham L.P, Chimie pharmaceutique, Traduction de la 2eme édition anglaise par Paul Depovere, édition De Boeck université, Paris, Bruxelles, (2003).
- [3] Adenot, M., Initiation à la chimie médicinale, Ellipses Edition Marketing S.A., (2000).
- [4] Krishnamurthy, V. M.; Kaufman, G. K.; Urbach, A. R.; Gitlin, I.; Gudiksen, K. L.; Weibel, D. B.; Whitesides, G. M. , *Chem. Rev.* (2008), 108, 946–1051.
- [5] Winum JY, Scozzafava A, Montero JL, Supuran CT. Therapeutic potential of sulfamides as enzyme inhibitors. *Med Res Rev* (2006); 26:767-792.
- [6] Vullo D., Franchi M., Gallori E., Pastorek J., Scozzafava A., Pastorekova S., Supuran CT., Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of the tumor-associated isozyme IX with aromatic and heterocyclic sulfonamides. *Bioorg Med Chem Lett*, (2003); 13:1005-1009. Supuran, C.T.; Scozzafava, A.; Casini, A. Carbonic anhydrase inhibitors. *Med. Res. Rev* (2003), 23, 146-18.
- [7] Supuran CT., Indisulam: An anticancer sulfonamide in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs* (2003); 12:283-287.
- [8] Hies MA, Vullo D, Pastorek J, Scozzafava A, Hies M, Caproiu MT, Pastorekova S, Supuran CT., Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of tumor-associated isozyme IX by halogenosulfonamides and halogenophenylaminobenzamide derivatives. *J Med Chem* (2003); 46:2187-2196.
- [9] Vullo D, Scozzafava A, Pastorekova S, Pastorek J, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of the tumor-associated isozyme IX with fluorine-containing sulfonamides. The first subnanomolar CAIX inhibitor discovered. *Bioorg Med Chem Lett* (2004); 14:2351-2356.
- [10] Winum JY., Dogne JM., Casini A., de Leval X., Montero JL., Scozzafava A., Vullo D., Innocenti A., Supuran CT., Carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and inhibition of

icanhydrase isozymes I, II, and IX with sulfonamides incorporating hydrazino moieties. *J Med Chem* (2005); 48:2121-2125.

[11] Garaj V., Pucetti L., Fasolis G., Winum J-Y., Montero J-L., Scozzafava A., Vullo D., Innocenti A., Supuran CT., Carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with sulfonamides incorporating 1,2,4-triazine moieties. *Bioorg Med Chem Lett* 2004; 14:5427-5433.

[12] Garaj V., Pucetti L., Fasolis G., Winum J-Y., Montero J-L., Scozzafava A., Vullo D., Innocenti A., Supuran CT., Carbonic anhydrase inhibitors: Novel sulfonamides incorporating 1,3,5-triazine moieties as inhibitors of the cytosolic and tumour-associated carbonic anhydrase isozymes I, II and IX. *Bioorg Med Chem Lett* ; (2005); 15:3102-3108.

[13] Winum JY., Vullo D., Casini A., Montero JL., Scozzafava A., Supuran CT., Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of cytosolic isozymes I and II and transmembrane tumor-associated isozyme IX with sulfamates including EMA1E also acting as steroid sulfatase inhibitors. *J Med Chem* (2003); 46:2197-2204.

[14] Nussbaumer P., Billich A., Steroid sulfatase inhibitors: Their potential in the therapy of breast cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents* (2005); 5:507-528.

[15] Winum JY., Pastorekova S., Jakubickova L., Montero JL., Scozzafava A., Pastorek J., Vullo D., Innocenti A., Supuran CT., Carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with bis-sulfamates. *Bioorg Med Chem Lett* (2005); 15:579-584.

[16] O. Swietach, A. Hulikova, R.D. Vaughan-Jones, A.L. Harris, *Oncogene* 29, 6509 (2010).

Chapitre II:

[1] Ratner, D. *Nanotechnologies: la révolution de demain* (Nanotechnology : a gentle 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'Afssset Effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement*, Rapport du groupe d'experts, Juillet (2006).

[6] Lahmani M., Dupas C., Houdy P., *Les nanosciences, 1. Nanotechnologies et nanophysique*, Edition Belin, (2006).

[7] Lahmani M., Boisseau P., Houdy P., *Les nanosciences, 3 : Nanobiotechnologies et nanobiologie*, Edition Belin, (2007).

[8] Lim EK, Huh YM, Yang J, Lee K, Suh JS, Haam S. pH-triggered drug-releasing magnetic nanoparticles for cancer therapy guided by molecular imaging by MRI. *Adv Mater* 2011;23:2436–42

[9] Liz-Marzàñ L.M., Kamat P.V., *Nanoscale Materials*, (2003), Kluwer academic publishers, Dordrecht.

[10] Lee JE, Lee N, Kim T, Kim J, Hyeon T. Multifunctional mesoporous silica nanocomposite nanoparticles for theranostic applications. *Acc Chem Res* 2011;44:893–902.

[11] Hayat M.A., *Colloidal Gold, Principles, Methods and Applications* ;(1989), Academic Press: New York

[12] Lee JE, Lee N, Kim T, Kim J, Hyeon T. Multifunctional mesoporous silica nanocomposite nanoparticles for theranostic applications *Acc Chem Res* 2011;44:893–902.

[13] S. Nappini, T. Al Kayal, D. Berti, B. Norden, P. Baglioni. *J. Phys. Chem. Lett.* 2, 713 (2011).

- [14] Yavuz MS, Cheng YY, Chen JY, Cobley CM, Zhang Q, Rycenga M, et al. Gold nanocages covered by smart polymers for controlled release with near-infrared light. *Nat Mater* 2009;8:935–9
- [15] Lawless, D.; Kapoor, S.; Meisel, D. Bifunctional Capping of CdS Nanoparticles and Bridging to TiO₂. *J. Phys. Chem.* 1995,99, 10329-10335
- [16] Parak, W.J. et al. (2003) Biological applications of colloidal nanocrystals. *Nanotechnology* 14, R15–R27
- [17] Gaffet E., Le Caër G. (2004). *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Eds. H.S. Nalwa - American Scientific Publishers, 5.
- [18] Mirkin, C.A. et al. (1996) A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature* 382, 607–609
- [19] S. Nappini, M. Bonini, F.B. Bombelli, F. Pineider, C. Sangregorio, P. Baglioni, B. Norden, *Soft Matter* 7, 1025 (2011).
- [20] S. Nappini, F.B. Bombelli, M. Bonini, B. Norden, P. Baglioni, *Soft Matter* 6, 154 (2010)
- [21] R A. Sperling, P. Rivera Gil, F. Zhang, M. Zanella, W.J. Parak, *Chem. Soc. Rev.* 37, 1896 (2008).
- [22] Knauth, P., Schoonman, J., *NANOSTRUCTURED MATERIALS, Selected Synthesis Methods, Properties and Applications*, (2004) Kluwer Academic Publishers, New York.
- [23] Kreibitz, U. Vollmer, M. *Optical properties of metal clusters*, Springer, (1995).
- [24] Shi, H. T., Qi, L. M., Ma, J. M. & Cheng, H. M. Synthesis of single crystal bawo₄ nanowires in cationic reverse micelles. *Chem. Commun.*, (2002). 1704–1705.
- [25] Schubert M. M., Hackenberg S., van Veen A. C., Muhler M., Plzak V., Behm R.J., *Journal of Catalysis*, (2001), 197, 113.
- [26] Liz-Marzàn L.M., Kamat P.V., *Nanoscale Materials*, (2003), Kluwer academic publishers, Dordrecht.
- [27] Brust M.; Fink J., Bethell D., Schiffrin D.J, Kiely C. J., *Chem. Commun.*, (1995)

- [28] Faulk W.P., Taylor G.M., *Immunochemistry*,(1971), 8, 1081, b) Horisberger M., Rosset J., *HistochemistryCytochem.*, (1977), 25, 295.
- [29] Brust M.; Walker M., Bethell D., Schiffrin D.J.; Whyman R.J, *Chem. Commun.*, (1994), 801.
- [30] W.P. Wuelfing, S.M. Gross, D.T. Miles, R.W. Murray, *J.Am. Chem. Soc.* 120, 12696 (1998).
- [31] Brust M.; Fink J., Bethell D., Schiffrin D.J, Kiely C. J., *Chem. Commun.*, (1995), 1655, b) Chen S., *Langmuir*, (1999), 15, 7551, c) S. Chen, R.W. Murray, *Langmuir*,(1999), 15, 682
- [32] A.G. Kanaras, F.S. Kamounah, K.Schaumburg, C.J.Kiely, M. Brust, *Chem. Commun.* 20, 2294 (2002).
- [33] J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo, G.M. Whitesides, *Chem. Rev.* 105, 1103 (2005).
- [34] J. Nam, N. Won, H. Jin, H. Chung, S. Kim, *J. Am. Chem.Soc.* 131, 13639 (2009).
- [35] Balasubramanian R., Kim B., Tripp S.L., Wang X, Lieberman M., Wei A., *Langmuir*, (2002), 18, 3676.
- [36] Chen J., Calvet L.C., Reed M.A., Grushiba D.S., Bennett D.W., *Chem. Phys. Lett.*, (1999), 313, 741.

Chapitre III:

- [1] Pastorekova S, Casini A, Scozzafava A, Vullo D, Pastorek J, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: The first selective, membrane-impermeant inhibitors targeting the tumor-associated isozyme IX. *Bioorg Med Chem Lett* (2004); 14:869-873.
- [2] Scozzafava A, Mastrolorenzo A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors and activators and their use in therapy. *Expert Opin Ther Patents* (2006);16:1627-1664.
- [3] Supuran CT., Indisulam: An anticancer sulfonamide in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs*(2003);12:283-287.
- [4] Hies MA, Vullo D, Pastorek J, Scozzafava A, Hies M, Caproiu MT, Pastorekova S, Supuran CT., Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of tumor-associated isozyme IX by halogenosulfanilamide and halogenophenylaminobenzamide derivatives. *J Med Chem* (2003);46:2187-2196.
- [5] Garaj V., Pucetti L., Fasolis G., Winum J-Y., Montero J-L., Scozzafava A., Vullo D., Innocenti A., Supuran CT., Carbonic anhydrase inhibitors: Novel sulfonamides incorporating 1,3,5-triazine moieties as inhibitors of the cytosolic and tumour-associated carbonic anhydrase isozymes I, II and IX. *Bioorg Med Chem Lett* ;(2005);15:3102-3108.
- [6] Winum JY., Vullo D., Casini A., Montero JL., Scozzafava A., Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of cytosolic isozymes I and II and transmembrane, tumor-associated isozyme IX with sulfamates including EMATE also acting as steroid sulfatase inhibitors. *J Med Chem* (2003); 46:2197-2204.
- [7] Nussbaumer P., Billich A.. Steroid sulfatase inhibitors: Their potential in the therapy of breast cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents* (2005); 5:507-528.
- [8] Winum JY., Pastorekova S., Jakubickova L., Montero JL., Scozzafava A., Pastorek J., Vullo D., Innocenti A., Supuran CT., Carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with bis-sulfamates. *Bioorg Med Chem Lett* (2005); 15:579-584.
- [9] Marangon K, Devaraj S, Tirosh O, et autres. Comparaison de l'effet de la supplémentation d'acide et d'alpha-tocophérol d'alpha-lipoïque sur des mesures d'effort oxydant. *Biol libre Med de rad.* (1999) ; 27:1114 - 1121.
- [10] Winum JY, Cecchi A, Montero JL, Innocenti A, Scozzafava A, Supuran CT.

Carbonic anhydrase inhibitors. Synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with boron-containing sulfonamides, sulfamides, and sulfamates: Toward agents for boron neutron capture therapy of hypoxic tumors. *Bioorg Med Chem Lett* (2005);15:3302-3306.

[11] Dixit V., Van den Bossche., Sherman D. M., Thompson D. H., Andres R. P., Synthesis and Grafting of Thiocctic Acid-PEG-Folate Conjugates onto Au Nanoparticles for Selective Targeting of Folate Receptor-Positive Tumor Cells, *Bioconjugate Chem.* (2006), 17, 603-609

[12] Bartlett D.W.,M.E.Davis, Physicochemical and Biological Characterization of Targeted, Nucleic Acid-Containing Nanoparticles, *Bioconjugate Chem.*(2007),18,456-468.

[13] Lahmani M.,Bréchnignac C.,Houdy P.,*Les nanosciences,2.Nanomatériau et nanochimie*,Edition Belin, (2006).