

Les dendrimères

Une thématique en plein essor

Jean Pierre Majoral et Anne-Marie Caminade

Résumé Les dendrimères – polymères isomoléculaires dont la taille, la masse moléculaire, la porosité, la solubilité et la réactivité peuvent être contrôlées rigoureusement – constituent une famille de macromolécules aux multiples applications dans de nombreux domaines allant des sciences de la vie à celles des matériaux ou à la catalyse. Ces nano-objets connaissent un développement remarquable à travers le monde. La contribution d'une équipe française pionnière dans cette discipline est illustrée à travers quelques exemples significatifs d'applications de dendrimères phosphorés.

Mots-clés **Dendrimères phosphorés, catalyse, diagnostic, nanotubes, microcapsules, imagerie biomédicale, applications biomédicales.**

Abstract **Dendrimers: a fast growing thematic**
Dendrimers – monodisperse polymers whose size, molecular weight, porosity, solubility and reactivity can be rigorously controlled – constitute a family of macromolecules with diverse applications in different fields ranging from life science, materiel science and catalysis. The contribution of a French team working in the field of phosphorus dendrimers is illustrated in this article through selected examples of applications of these nano-objects.

Keywords **Phosphorus dendrimers, catalysis, diagnosis, nanotubes, microcapsules, biomedical imaging, biomedical applications.**

Nul ne pouvait imaginer, même pas les pionniers dans le domaine des dendrimères, que ces macromolécules allaient connaître un développement aussi important quelques décades après la première publication concernant la synthèse de l'une d'entre elles. En effet, le nombre annuel de publications et de brevets est passé de 20 en 1992 à près de 1 800 en 2009 ! Leurs propriétés et applications dans de très nombreux domaines allant de la biologie/médecine à la science des matériaux, sans oublier la catalyse, en sont certainement responsables.

L'idée de « ramification » est présente à toutes les échelles dans la Nature, de la ramure des arbres à la structure des neurones, mais pas à l'échelle moléculaire. Ce concept a d'abord été développé par Flory au milieu du siècle précédent [1], avant que Vögtle le concrétise en 1978 [2], puis que Tomalia crée le mot « dendrimer » [3].

Mais avant tout, que sont ces objets chimiques, et comment peut-on les définir ?

Les dendrimères sont des macromolécules hyper-ramifiées (arborescentes), à structure répétitive parfaitement définie et hautement fonctionnalisée. Ils sont synthétisés étape par étape (« couche après couche »), ce qui permet un

contrôle parfait de leur structure. La *figure 1* montre la modélisation moléculaire d'une famille de dendrimères phosphorés que nous avons synthétisée. Chaque étape permettant de multiplier le nombre de fonctions terminales crée une génération (notée G) ; il nous faut deux étapes (quantitatives) pour créer une nouvelle génération. C'est la présence de très nombreuses fonctions chimiques terminales, facilement accessibles et donc facilement modifiables, qui constitue le principal attrait des dendrimères et leur confère des propriétés uniques.

Quel est notre apport dans ce domaine ? Notre première publication sur le sujet date de 1994 [4] ; nous avons proposé une méthode de synthèse de dendrimères particulièrement performante puisqu'elle a permis d'obtenir la génération 2, qui est encore aujourd'hui la plus haute génération de dendrimères à structure définie. Notre équipe fait donc partie des pionniers dans le domaine des dendrimères et a constamment accru son activité depuis cette date. C'est ainsi que nous avons mené à bien de très nombreuses synthèses, non seulement de dendrimères phosphorés, mais également de systèmes macromoléculaires dendritiques, ceci grâce à la grande réactivité offerte par la chimie du phosphore, élément

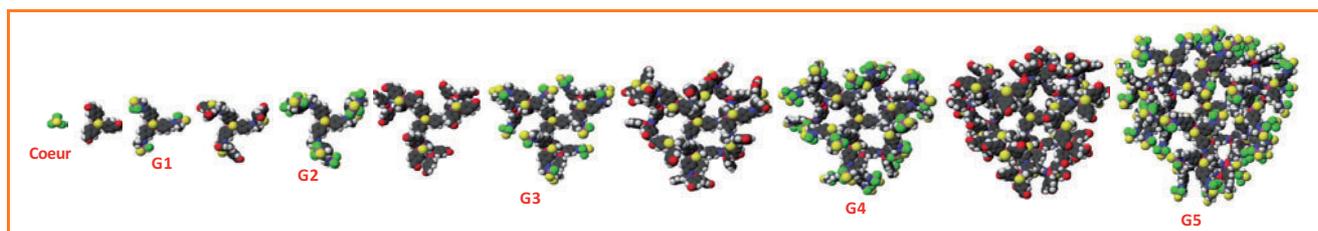


Figure 1 - Modélisation moléculaire d'une série de dendrimères phosphorés, montrant l'accroissement de taille en fonction de la génération.

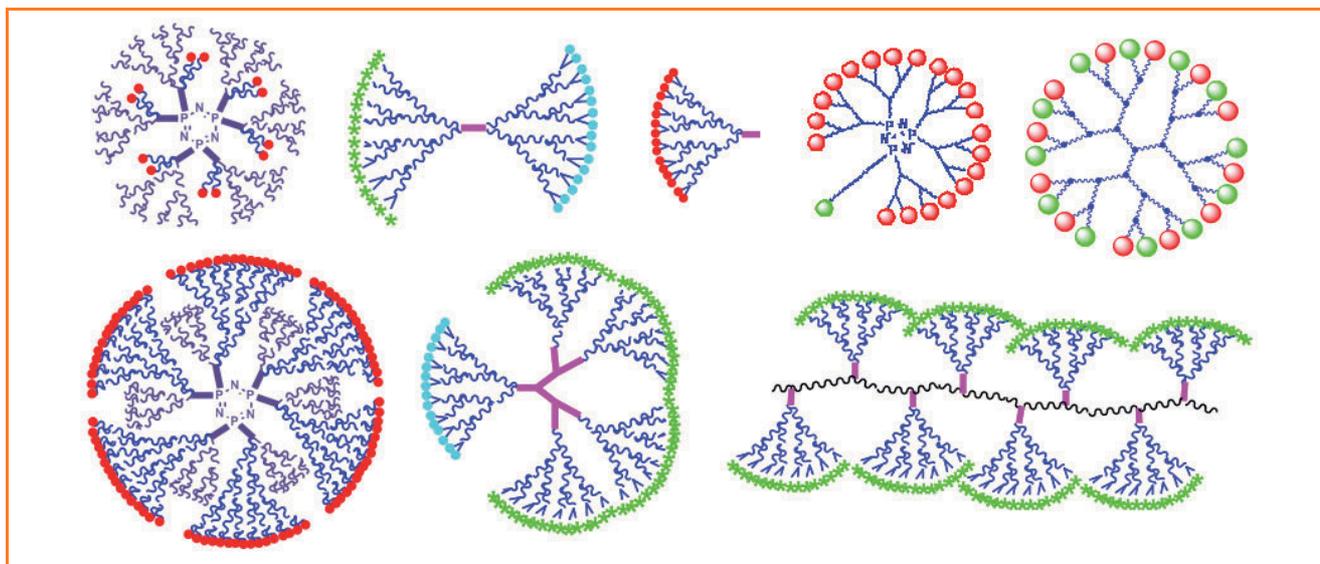


Figure 2 - Exemples de structures dendritiques synthétisées dans notre équipe.

clé de nos dendrimères. La *figure 2* illustre la diversité des structures dendritiques élaborées [5].

Il est à noter que ces dendrimères phosphorés possèdent des propriétés de rigidité et d'hydrophobie de la structure interne qui les différencient de la plupart des autres types de dendrimères. La *figure 3* résume les applications principales de nos dendrimères que nous illustrerons par quelques exemples choisis non seulement pour leur diversité thématique, mais également parce qu'ils ont été développés à diverses interfaces grâce à des collaborations avec des partenaires essentiellement académiques pour le moment,

aux compétences complémentaires aux nôtres. Certaines de ces applications sont aussi développées dans d'autres laboratoires avec d'autres types de dendrimères, en particulier dans le domaine des sciences de la vie, mais certaines sont spécifiques aux dendrimères phosphorés.

Dendrimères et catalyse

Les dendrimères offrent les avantages à la fois de la catalyse homogène – ils sont solubles dans de nombreux solvants, y compris l'eau, et facilement adaptables – et de la catalyse hétérogène – ils sont facilement récupérables et réutilisables grâce à leurs dimensions : quelques nanomètres contre quelques angströms pour la plupart des produits. Dans certains cas, on peut observer un effet de synergie entre les différents sites catalytiques qui sont d'autant plus proches les uns des autres que la génération du dendrimère augmente. Les dendrimères phosphorés ont été utilisés en catalyse énantiosélective, en catalyse en milieu aqueux, avec des métaux peu coûteux et non (ou moins) toxiques.

À titre d'exemple, un effet dendritique très marqué a été observé pour le couplage du pyrazole par une catalyse au cuivre (collaboration avec Marc Taillefer, ENSC Montpellier). Dans ce cas, le catalyseur monomère est quasiment inactif, alors qu'il devient très actif lorsqu'il est lié à un dendrimère, et d'autant plus actif que la génération est élevée [6] (*figure 4*).

Dendrimères et diagnostics

La demande exponentielle de diagnostics, liée à l'évolution de nos

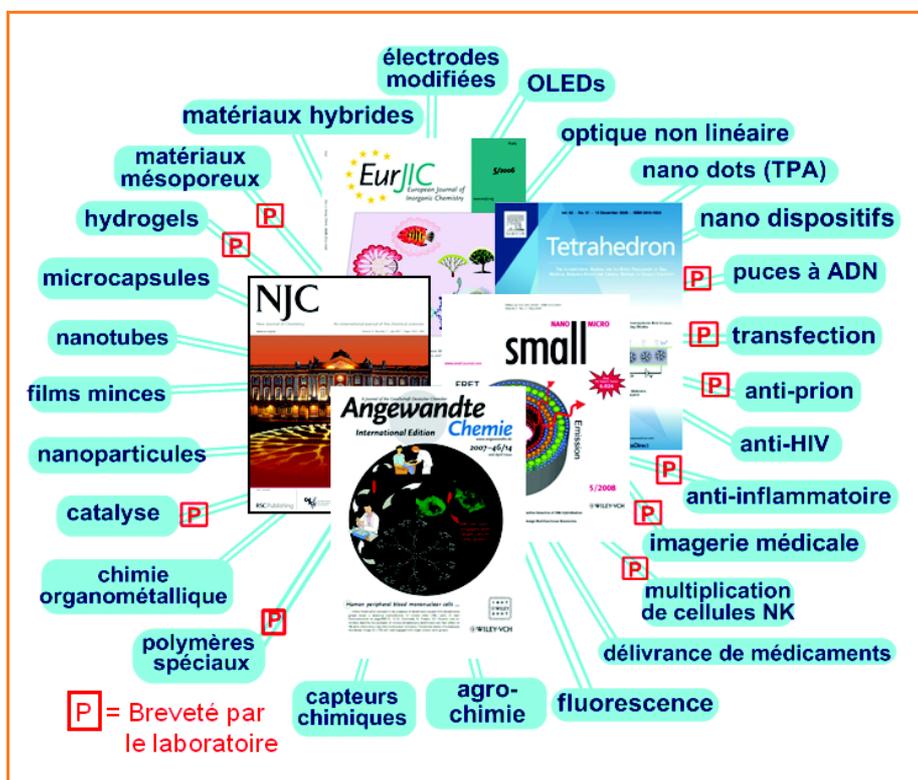


Figure 3 - Quelques domaines d'applications des dendrimères phosphorés.

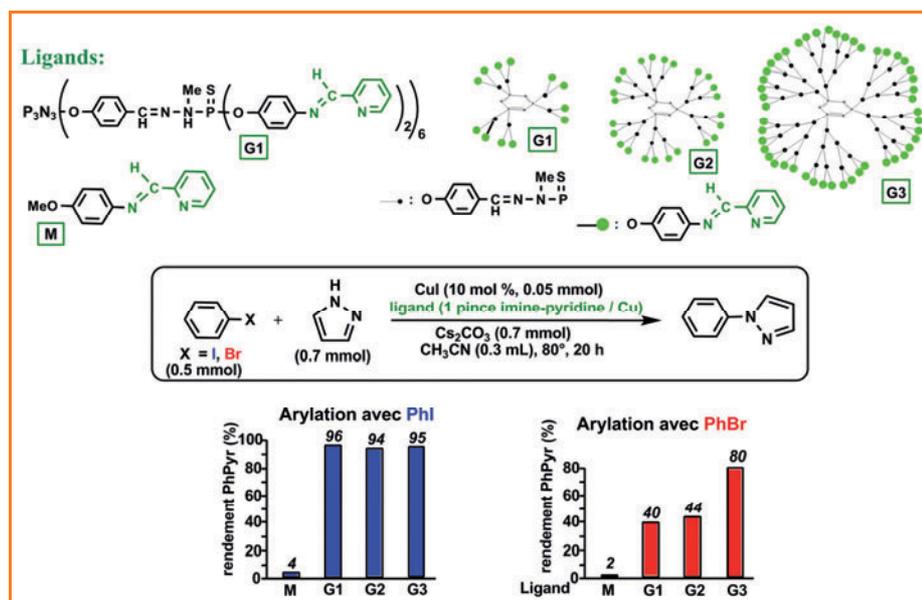


Figure 4 - Un exemple d'utilisation des dendrimères en catalyse, montrant un effet dendritique positif (augmentation de l'efficacité de la catalyse avec l'accroissement de la génération du dendrimère, pour une même quantité de Cu).

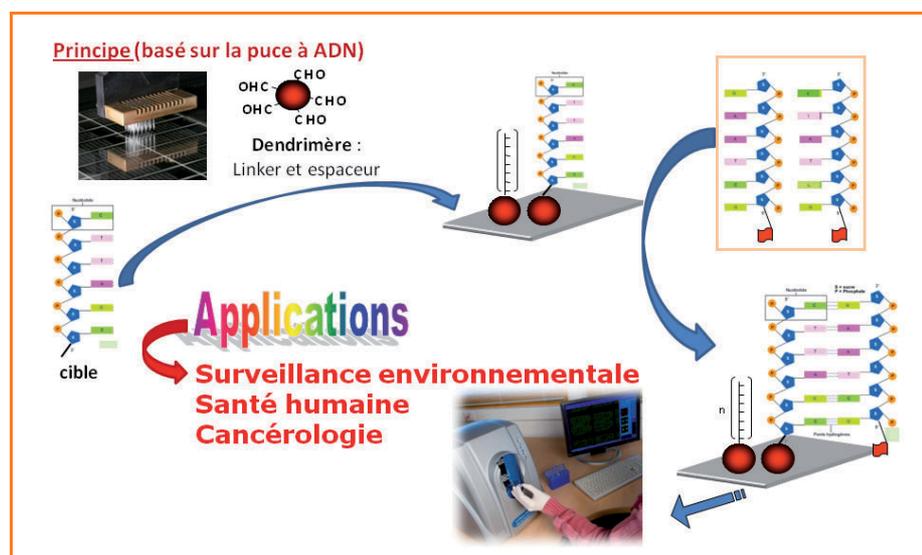


Figure 5 - Principe d'une puce à ADN élaborée à partir de dendrimères.

modes de vie et alimentaire, impose d'innover dans la production quantitative de tests. La conception d'outils et de méthodes dédiés au diagnostic médical, vétérinaire, environnemental et agroalimentaire représente donc un défi important pour notre société.

Puces à ADN

Les dendrimères phosphorés peuvent être utilisés pour recouvrir et fonctionnaliser des surfaces afin de permettre l'immobilisation de biomolécules, démontrant trois avantages par rapport aux chimies de fonctionnalisation existantes : augmentation de la densité de sondes par unité de surface, accessibilité de l'échantillon aux sondes avec une hybridation en 3D et non en 2D, diversité des fonctions réactionnelles portées par les dendrimères qui permettent l'immobilisation de tout un large spectre de biomolécules (ADN, protéines,

sucres) et même de cellules. Une des techniques utilisées consiste en une aminosilansation préalable d'une surface de verre ; sur les fonctions NH_2 ainsi greffées vont se condenser les fonctions aldéhydes de nos dendrimères. Sur les fonctions aldéhydes restantes peuvent être greffés des oligonucléotides ou fragment d'ADN simple brin. En utilisant les réactions d'hybridation avec un oligonucléotide ayant les fonctions strictement complémentaires et marqué par fluorescence, on réalise une puce à ADN (figure 5) (collaboration avec Jean-Marie François, INSA Toulouse, et Bernard Meunier, LCC Toulouse). Ces « dendripuces » sont particulièrement sensibles (détection au picomolaire 10^{-12}M), très stables et réutilisables sans perte des propriétés [7]. Une start-up dédiée à la production de biopuces à diagnostic a été créée en juin 2009 en association avec J.-M. François et R. Fabre.

Nanotubes et microcapsules à base dendrimère

Dans le cadre d'une collaboration avec Wolfgang Knoll (Max Planck Institute, Mainz), des dendrimères chargés positivement ou négativement ont été déposés en monocouches successives, en faisant tremper une matrice constituée par de l'alumine nanoporeuse en alternance dans des solutions de dendrimères chargés négativement et positivement (figure 6). Le dépôt des couches successives de dendrimères (jusqu'à 20 bicouches) suivi de l'élimination chimique de la matrice permet d'isoler des nanotubes (400 nm de diamètre extérieur, 320 nm de diamètre intérieur) constitués exclusivement de dendrimères associés par des interactions électrostatiques extrêmement fortes parce que multivalentes [8]. Le même processus de dépôt mono-

couche par monocouche, mais en alternant des couches de dendrimères chargés positivement avec des couches de quantum dots (nanocristaux inorganiques) chargés négativement, suivi par le greffage d'oligonucléotides et l'hybridation avec des oligonucléotides complémentaires marqués par un groupement fluorescent (voir ci-avant puces à ADN) permet d'améliorer de façon spectaculaire la sensibilité de ces puces à ADN [9].

La même technique de dépôts successifs de dendrimères polycationiques et polyanioniques a été appliquée à diverses surfaces. On peut citer en particulier des microbilles qui, après leur dissolution, ont donné des microcapsules dont la paroi est constituée de dendrimères. Ces microcapsules permettent, grâce à leur porosité contrôlée, d'encapsuler un certain nombre de substances actives. On citera l'encapsulation de l'ADN et l'hybridation d'oligonucléotides complémentaires à l'intérieur de ces microcapsules. Des dépôts

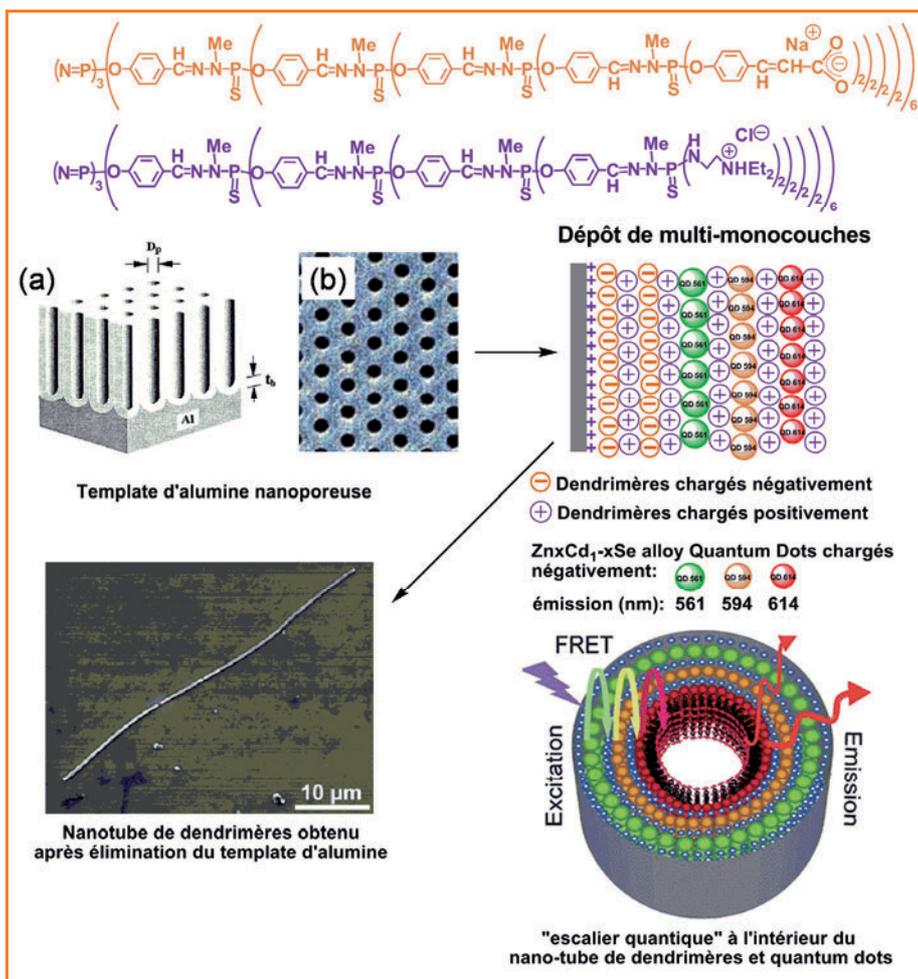


Figure 6 - Nanotubes obtenus par dépôt en alternance de dendrimères chargés négativement et positivement.

L'utilisation de quantum dots à la place des dendrimères chargés négativement permet d'obtenir un « escalier quantique » permettant un transfert et une exaltation de fluorescence et son utilisation pour détecter l'hybridation de l'ADN.

successifs de dendrimères différemment chargés ont été effectués aussi sur des surfaces de verre sur lesquelles des neurones ont ensuite été cultivés. L'état de charge de la dernière couche de dendrimères est particulièrement important : les ammoniums en couche terminale (dendrimères polycationiques) permettent un meilleur accrochage des neurones sur la surface, une prolifération plus rapide et une plus grande connectivité des réseaux neuronaux que les groupements carboxylates (dendrimères polyanioniques).

Imagerie biomédicale

Nous avons synthétisé des dendrimères fluorescents pour des utilisations dans le domaine de la biologie (voir ci-près), mais une part importante de notre activité dans le domaine de l'imagerie a été effectuée en collaboration avec Mireille Blanchard-Desce (Université de Rennes). Son équipe synthétise des fluorophores spéciaux capables d'absorber simultanément deux photons. Ce domaine prend une importance croissante, en particulier en lien avec la biologie. En effet, l'absorption à deux photons permet d'utiliser une irradiation dans le proche infrarouge au lieu d'une irradiation dans l'ultraviolet utilisée pour beaucoup de fluorophores classiques. L'utilisation d'une longueur d'onde moins énergétique provoque moins de dommages biologiques. Il existe

différents types de nanocristaux inorganiques fluorescents (« quantum dots ») qui possèdent ces propriétés d'absorption à deux photons, mais ils sont généralement constitués de métaux toxiques. Le but de notre collaboration a été de synthétiser des équivalents organiques à ces nanocristaux inorganiques (du point de vue de leurs propriétés).

Nous avons dans un premier temps greffé ces fluorophores particuliers en surface de différentes générations de nos dendrimères (figure 7). La présence d'un nombre croissant de fluorophores se traduit par une augmentation de la section efficace d'absorption à deux photons, qui atteint pour la quatrième génération la valeur très élevée de 56 000 GM (GM en l'honneur de Maria Goeppert-Mayer ; à titre de comparaison, des valeurs de quelques dizaines de GM sont généralement observées pour des petites molécules fluorophores), comme le montre la figure 8 [10]. Cette valeur d'absorption est comparable (voire supérieure) à celles obtenues avec les meilleurs quantum dots. Nous avons ainsi obtenu les premiers véritables « nanodots » organiques.

D'autres dendrimères fluorescents ont été synthétisés pour des études biologiques. C'est en particulier le cas pour des dendrimères ayant un seul fluorophore absorbant à deux photons au cœur et lié à deux dendrons (un dendron est un dendrimère porteur d'une fonction particulière au niveau du cœur) terminés par des ammoniums, pour assurer la solubilité de l'ensemble dans l'eau. Cette structure dendritique a été injectée par voie intraveineuse à un rat et a permis l'observation du réseau

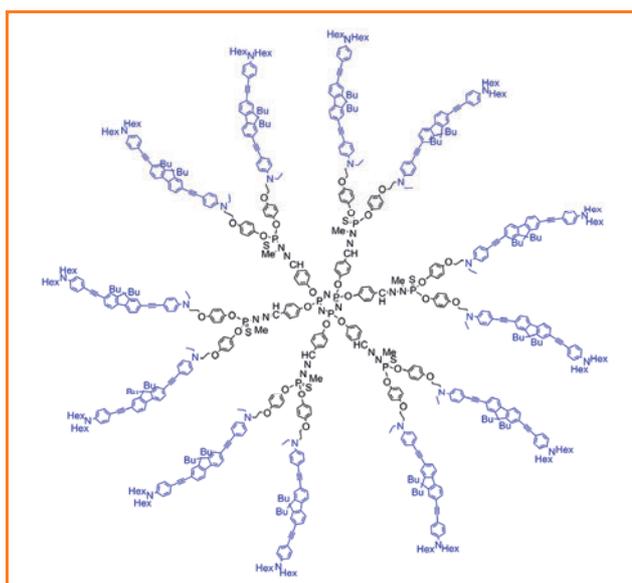


Figure 7 - Structure chimique d'un dendrimère de première génération, ayant des fluorophores absorbant deux photons en surface.

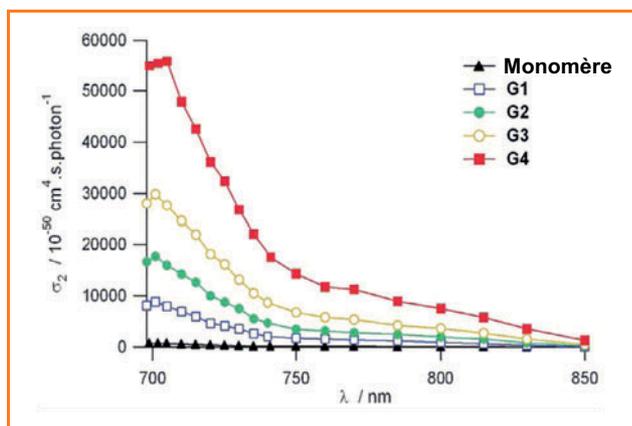


Figure 8 - Augmentation de la section efficace d'absorption à deux photons en fonction de la génération des dendrimères.

a été consacré à la collaboration que nous avons depuis maintenant six ans avec Rémy Poupot et Jean-Jacques Fournié du Centre de Physiopathologie du CHU Toulouse-Purpan (INSERM U563). Cette équipe est spécialisée dans l'étude des cellules immunitaires du sang humain. Nous avons préalablement montré que certains de nos dendrimères à extrémités sels de sodium d'acide phosphonique avaient la propriété de faire se multiplier une catégorie de cellules immunitaires, appelées NK (pour « natural killer »), qui normalement ne se multiplient pas en culture. Ces cellules NK jouent un rôle clé dans l'immunité innée ; elles ont des propriétés antivirales, antibactériennes et anticancéreuses. Après la découverte de cette capacité totalement inattendue des dendrimères, il a fallu vérifier si les cellules NK obtenues en présence des dendrimères avaient d'une part gardé leurs propriétés « tueuses » vis-à-vis de cellules cancéreuses, et n'avaient pas d'autre part acquis des propriétés délétères vis-à-vis des cellules saines venant du même donneur [12].

Ces deux points ayant été validés, notre rôle a consisté à synthétiser un grand nombre de dendrimères dérivés du premier sur lequel l'activité avait été mise en évidence, et à fournir aux biologistes des outils (en particulier des dendrimères fluorescents) pour les aider à élucider le mécanisme d'action. Il ressort de ces nombreuses études que le mécanisme d'action n'est pas direct : sur des cellules NK isolées, le dendrimère n'entraîne pas leur multiplication.

Par contre, l'utilisation d'un dendrimère fluorescent (un groupe FITC greffé statistiquement en surface) a permis de mettre en évidence une interaction immédiate avec les monocytes, comme le montrent les images de la figure 10 extraites d'un film effectué par l'équipe de J.-J. Fournié et R. Poupot. En fait, l'activation des monocytes par les dendrimères est la première étape du processus. Ces monocytes vont ensuite transmettre l'information aux cellules NK (via des cytokines) de se multiplier.

Parallèlement aux études de mécanisme, c'est toute une bibliothèque de composés qui ont été testés. Quelques règles générales concernant l'influence de la structure sur les propriétés ont pu être mises en évidence :

- Même si les interactions électrostatiques jouent un rôle fondamental, elles ne sont pas suffisantes : mettre par exemple des carboxylates à la place des phosphonates fait perdre la possibilité de multiplier les cellules NK.

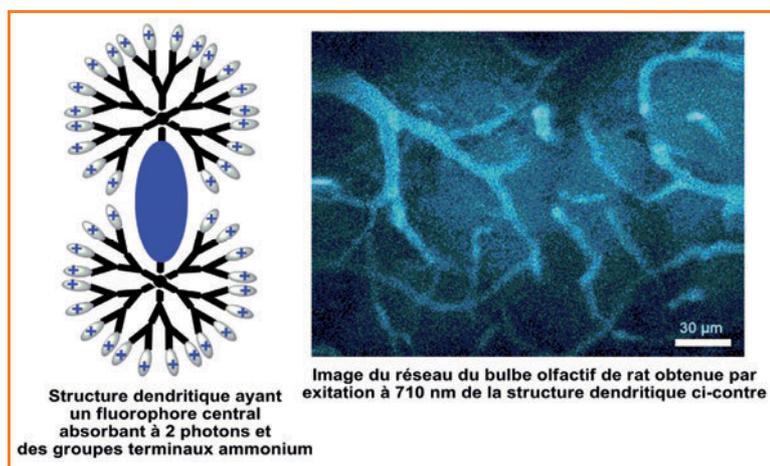


Figure 9 - Structure schématisée d'un dendrimère ayant un fluorophore au cœur et image du réseau du bulbe olfactif d'un rat après injection intraveineuse de ce dendrimère.

veineux du bulbe olfactif de ce rat par fluorescence après une excitation dans le proche infrarouge, donc pour une absorption à deux photons. Ce travail a été effectué par l'équipe de Serge Charpak (INSERM Paris). L'image de la figure 9 montre ce réseau avec une excellente netteté (image obtenue sur le rat vivant). Du fait de sa taille, la structure dendritique utilisée n'a que peu tendance à diffuser dans les tissus voisins, contrairement à ce qui se passe avec un petit fluorophore. Il s'agit là du premier exemple d'utilisation d'un « nanodot » organique pour l'imagerie biomédicale [11].

Applications biomédicales des dendrimères phosphorés

Nous avons mis en évidence un certain nombre de propriétés de nos dendrimères dans différents domaines (propriétés anti-proliferatives par exemple de dendrimères à extrémités ammonium), mais l'essentiel de notre activité dans le domaine biologique

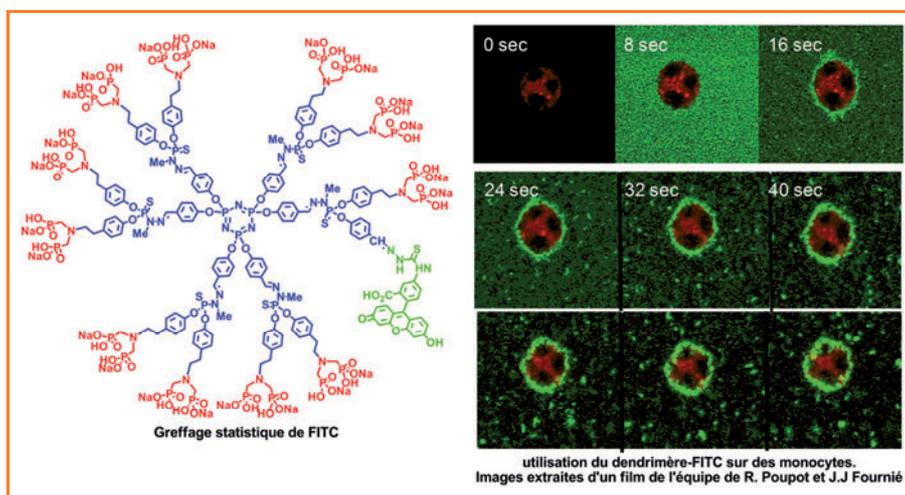


Figure 10 - Structure d'un dendrimère fluorescent et son utilisation pour visualiser son interaction avec les monocytes (cellules immunitaires du sang).

- La pince aminobisphosphonate a la géométrie adéquate : les monophosphonates sont beaucoup moins actifs, et même les aminobisphosphonates non symétriques (rattachés au dendrimère non par l'azote central mais par le carbone lié à un phosphonate) sont beaucoup moins actifs.
- La première génération est la plus active : la génération zéro est peu active, et la génération 2 semble très active mais précipite rapidement dans le milieu de culture.
- Notre savoir-faire dans la fonctionnalisation sélective du cœur cyclotriphosphazène nous a permis de synthétiser des molécules dendritiques ayant spécifiquement une, deux, trois, quatre ou cinq branches manquantes au niveau du cœur par rapport à notre dendrimère de référence qui en a six. Les molécules à une ou deux branches manquantes ont quasiment la même activité que le dendrimère de référence, mais l'activité décroît très rapidement avec moins de quatre branches.

Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour l'immunothérapie cellulaire anticancéreuse pour laquelle un très grand nombre de cellules NK est nécessaire : c'est le cas par exemple du traitement du myélome multiple par greffe de moelle osseuse.

Un travail récent dans ce domaine a permis de démontrer *in vivo* l'efficacité des cellules NK obtenues en culture avec des dendrimères. Des souris auxquelles ont été injectées des cellules d'un cancer virulent de la moelle osseuse (myélome multiple, MM) développent une grosse tumeur en seulement 24 jours. Si des cellules NK (obtenues avec des dendrimères) sont injectées le même jour que les cellules MM, il n'y a pas de trace de tumeur après 24 jours.

Nous avons très récemment découvert une autre propriété extrêmement intéressante (activation de monocytes *via* une voie anti-inflammatoire) permettant d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde ou de maladies inflammatoires auto-immunes (collaboration R. Poupot, J.-L. Davignon).

Conclusion

Ces quelques exemples (voir aussi *figure 3*) illustrent les potentialités offertes par les dendrimères et notamment les dendrimères phosphorés dans de très nombreux domaines où leur taille et leur fonctionnalisation modulables à souhait apportent à façon des propriétés nouvelles. Les dendrimères constituent de formidables outils permettant des avancées significatives dans diverses disciplines, et plus particulièrement aux interfaces de la chimie avec la biologie, la science des matériaux ou la physique.

La contribution française à ce domaine de recherche en pleine expansion est marquante et aux tous premiers rangs mondiaux, malgré la très forte concurrence internationale. Cette activité devrait conduire sans nul doute à des développements spectaculaires dans les années à venir.

Beaucoup d'autres applications essentielles des dendrimères sont en cours de développement à travers le monde. Le lecteur désireux d'en savoir plus pourra consulter les ouvrages et revues récentes mentionnées ci-après [13-14].

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier non seulement tous les étudiants en thèse et les chercheurs postdoctoraux qui ont apporté leur contribution à ce travail, mais également les chercheurs permanents de l'équipe (Régis Laurent et Cédric-Olivier Turrin, plus récemment Béatrice Delavaux-Nicot et Armelle Ouali) et nos collègues dont les noms apparaissent dans cette présentation qui ont permis, grâce à leur dynamisme et leur implication, d'obtenir les résultats décrits ci-dessus.

Références

- [1] Flory P.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1936**, *58*, p. 1877 ; Flory P.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1940**, *62*, p. 1561.
- [2] Buhleier E., Wehner F., Vögtle F., *Synthesis*, **1978**, *78*, p. 155.
- [3] Tomalia D.A., Baker H., Dewald J., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J., Smith P., *Polymer J.*, **1985**, *17*, p. 117.
- [4] Launay N., Caminade A.M., Lahana R., Majoral J.P., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1994**, *33*, p. 1589.
- [5] Galliot C., Larré C., Caminade A.M., Majoral J.P., *Science*, **1997**, *277*, p. 1981 ; Maraval V., Laurent R., Donnadiou B., Mauzac M., Caminade A.M., Majoral J.P., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, p. 2499.
- [6] Ouali A., Laurent R., Caminade A.M., Majoral J.P., Taillefer M., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, p. 15990.
- [7] Le Berre V., Trevisiol E., Dagkessamanskaia A., Sokol S., Caminade A.M., Majoral J.P., Meunier B., François J., *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, e88 ; Trevisiol E., Leberre-Anton V., Leclaire J., Pratiel G., Caminade A.M., Majoral J.P., François J.M., Meunier B., *New J. Chem.*, **2003**, *27*, p. 1713.
- [8] Kim D.H., Karan P., Göring P., Leclaire J., Caminade A.M., Majoral J.P., Gösele U., Steinhart M., Knoll W., *Small*, **2005**, *1*, p. 99.
- [9] Feng C.L., Zhong X.H., Steinhart M., Caminade A.M., Majoral J.P., Knoll W., *Adv. Mater.*, **2007**, *19*, p. 1933.
- [10] Mongin O., Rama Krishna T., Werts M.H.V., Caminade A.M., Majoral J.P., Blanchard-Desce M., *Chem. Commun.*, **2006**, p. 915.
- [11] Krishna T.R., Parent M., Werts M.H.V., Moreaux L., Gmouh S., Charpak S., Caminade A.M., Majoral J.P., Blanchard-Desce M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, p. 4645.
- [12] Poupot M., Griffe L., Marchand P., Maraval A., Rolland O., Martinet L., L'Faïghi-Olive F.E., Turrin C.O., Caminade A.M., Fournié J.J., Majoral J.P., Poupot R., *FASEB J.*, **2006**, *20*, p. 2339.
- [13] Fréchet J.M.J., Tomalia D.A., *Dendrimers and other Dendritic Polymers*, John Wiley & Sons, Chichester, **2001** ; Newkome G.R., Moorefield C.N., Vögtle F., *Dendrimers and Dendrons. Concepts, Syntheses, Applications*, Wiley VCH, Weinheim, **2001**.
- [14] Quelques articles récents : Newkome G.R., Shreiner C.D., *Polymer*, **2008**, *49*, p. 1 ; Niederhafner P., Reinis M., Sebestik J., Jezek J., *J. Pept. Sci.*, **2008**, *14*, p. 556 ; Caminade A.M., Turrin C.O., Majoral J.P., *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, p. 7422 ; Caminade A.M., Servin P., Laurent R., Majoral J.P., *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, *37*, p. 56 ; Caminade A.M., Hameau A., Majoral J.P., *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, p. 9270 ; Astruc D., Boisselier E., Ornelas C., *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, p. 1857 ; Caminade A.M., Turrin C.O., Majoral J.P., *New J. Chem.*, **2010**, *34*, p. 1512 ; Caminade A.M., Majoral J.P., *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, p. 2034 ; Newkome G.R., Shreiner C.D., *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, p. 6338.



J.P. Majoral

Jean Pierre Majoral est directeur de recherche émérite et Anne-Marie Caminade est directrice de recherche au Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC), Toulouse*.



A.-M. Caminade

* Laboratoire de Chimie de Coordination, 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse Cedex 04.
Courriel : majoral@lcc-toulouse.fr