# Les dendrimères : un moyen de transport d'acides nucléiques

Pierre Moreno, Camille Bouillon, Gilles Quéléver et Ling Peng

### Résumé

Les dendrimères sont des macromolécules particulièrement intéressantes pour un très grand nombre d'applications dans des domaines extrêmement variés. Cet intérêt réside essentiellement dans leurs propriétés de coopérativité et de multivalence, ainsi que dans leur très haute capacité d'encapsulation ou de fixation de petites molécules, et ceci dans un volume de taille nanométrique. Cette caractéristique structurale est la conséquence de leur architecture unique de macromolécules ramifiées émanant d'un cœur central et possédant de nombreuses fonctionnalités périphériques. Les dendrimères sont donc des outils très intéressants pour la délivrance de médicaments et d'acides nucléiques. Dans cet article, les auteurs font un bref rapport de leurs travaux de synthèse de deux familles de dendrimères, les dendrimères poly(amidoamines) et poly(aminoesters), ainsi que de leurs applications pour la délivrance d'acides nucléiques.

#### Mots-clés

Dendrimères, poly(amidoamines), poly(aminoesters), délivrance d'acides nucléiques, thérapie génique.

#### Abstract

### Dendrimers: a powerful tool for nucleic acid delivery

Dendrimers have attracted particular attention for drug delivery because of their high drug loading capacity confined within a small nanosized volume. This special feature is the result of their unique molecular architecture with cascade branched units emanating from a focal point and numerous end groups on the surface. In this article, the authors will give a brief highlight of their results in the synthesis of poly(amidoamine) and poly(aminoester) dendrimers as well as their application for nucleic acid delivery.

#### Keywords

Dendrimers, poly(amidoamine), poly(aminoester), nucleic acid delivery, gene therapy.

epuis quelques années, nous nous intéressons aux dendrimères, cette famille de macromolécules synthétiques utilisables notamment en thérapie génique pour la délivrance de matériel génétique. Les premiers résultats que nous avons obtenus dans ce domaine à partir de dendrimères poly(amidoamines) de structure flexible se sont révélés très prometteurs. Afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique de ces macromolécules, nous poursuivons actuellement nos efforts de recherche en développant une nouvelle famille de dendrimères biodégradables : les dendrimères poly(aminoesters). Mais avant toute chose, revenons sur cette famille particulière de macromolécules.

### Qu'est-ce qu'un dendrimère?

Étymologiquement, le terme « dendrimère » vient du grec dendron qui signifie arbre ou branche et meros, partie. Cette appellation « dendrimère » a été introduite par Donald A. Tomalia lors de la mise au point de la première famille de dendrimères, les dendrimères poly(amidoamines), également connus sous le nom de PAMAM [1]. D'une façon générale, ce terme désigne une famille de polymères possédant une architecture arborescente tridimensionnelle parfaitement structurée, monodisperse<sup>(1)</sup> et hyper-ramifiée<sup>(2)</sup> (figure 1) [2]. Ce sont des macromolécules originales et innovantes, dont la chimie connaît un véritable essor depuis une trentaine d'années.

Chimiquement parlant, un dendrimère est donc une macromolécule possédant une structure unique et parfaitement définie, comportant un cœur central, un enchaînement

d'unités répétitives ainsi que des groupements terminaux à la périphérie (figure 1). De telles molécules sont obtenues selon une approche synthétique répétitive contrôlée, impliquant des étapes successives, de façon soit divergente soit convergente, voire en utilisant la combinaison de ces deux approches (figure 2).

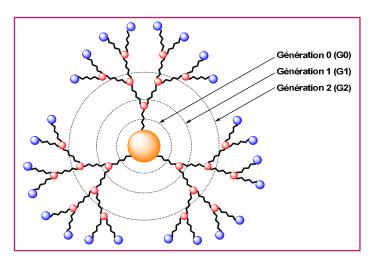


Figure 1 - Structure générale d'un dendrimère.

Un dendrimère comporte trois parties distinctes : un cœur central  $\bigcirc$ , un enchaînement d'unités répétitives  $\bigcirc$  et des groupements terminaux de surface  $\bigcirc$ , dont l'agencement est à l'origine de la présence de nombreuses cavités internes. Il est constitué d'une succession de couches structurellement homogènes, partant du centre vers la périphérie, chacune de ces couches étant désignée sous le nom de « génération ».

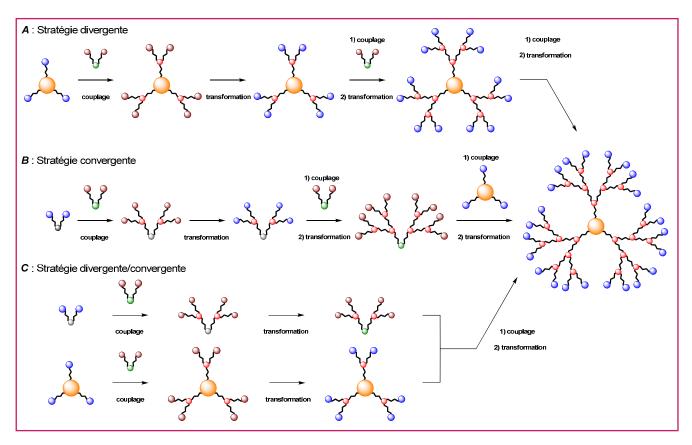


Figure 2 - **Différentes stratégies de synthèse de dendrimères**. **A** : stratégie divergente : le dendrimère est obtenu en partant du cœur vers la périphérie. **B** : stratégie convergente : le dendrimère est cette fois synthétisé de la périphérie vers l'intérieur. **C** : combinaison des stratégies divergente et convergente.

L'approche divergente consiste en la construction progressive du dendrimère en partant du cœur vers la périphérie par répétition d'une série de réactions (figure 2A). La première de ces étapes implique le couplage d'une unité monomère avec le cœur central, conduisant ainsi à l'obtention de la première génération. La transformation ultérieure des groupements terminaux de la molécule issue de ce premier couplage génère de nouveaux sites fonctionnels, permettant la poursuite de la séquence réactionnelle. Cette approche divergente a été très largement utilisée pour la synthèse de nombreuses familles de dendrimères, dont notamment les dendrimères de type PAMAM [1, 3], les poly(propylèneimines) ou PPI de Rolf Mülhaupt [4] et Bert Meijer [5], ou encore les dendrimères phosphorés d'Anne-Marie Caminade et Jean-Pierre Majoral [6].

La seconde approche, dite convergente, permet d'élaborer le dendrimère non plus du cœur vers la périphérie, mais au contraire de l'extérieur vers l'intérieur (figure 2B), en construisant progressivement les dendrons. Ces dendrons sont par la suite attachés à un cœur polyfonctionnel pour générer la structure dendritique. Cette méthode a été décrite pour la première fois par Jean M.J. Fréchet pour la synthèse de dendrimères de type polybenzyléther [7].

Une troisième approche alternative, découlant de la combinaison des deux stratégies précédentes, a également été décrite par Fréchet [8]. Elle consiste en une réaction de couplage de dendrons avec un cœur polyfonctionnel possédant déjà plusieurs générations d'unités répétitives, chacune de ces entités étant synthétisée séparément (figure 2C). Cette dernière approche connaît un intérêt croissant depuis quelques années grâce à l'apparition de « nouvelles » méthodologies de synthèse, telles que la « chimie click » [9]. Les dendrons et le cœur sont construits indépendamment les

uns des autres et connectés par simple « click », entre un alcyne et un azoture selon une réaction de Huisgen catalysée par du cuivre [10-11] (voir *encadré 1*) ou par réaction de cycloaddition de Diels-Alder [11], par exemple.

### **Applications des dendrimères**

Grâce à leur architecture parfaitement structurée et modulable selon le mode de synthèse employé et au grand nombre de fonctionnalités confinées dans leur structure, les dendrimères sont des nano-objets qui possèdent des propriétés exceptionnelles liées notamment à leur multivalence. De ce fait, ce sont des outils très intéressants dans des domaines d'applications extrêmement variés dont la liste ne saurait être exhaustive : ils peuvent être utilisés notamment comme matériaux pour l'électronique ou le photovoltaïque ainsi qu'en chimie de synthèse, pour la catalyse de nombreuses réactions [12]. Mais à l'heure actuelle, leur utilisation dans la recherche biomédicale connaît un essor particulier.

Les dendrimères ont été évalués pour diverses applications biomédicales, notamment comme agents de contraste en imagerie médicale ou comme médicaments [12]. En effet, certains dendrimères possèdent des activités antivirales, antibactériennes ou antitumorales. Ils se sont aussi révélés être des nanovecteurs efficaces pour le transport d'agents de diagnostic, de médicaments ou de matériel génétique, soit par encapsulation, soit par conjugaison chimique. Un prototype exemplaire dans ce domaine est d'ailleurs constitué par les dendrimères PAMAM mentionnés précédemment. Nous nous sommes intéressés à la synthèse et à l'évaluation biologique de molécules appartenant à cette famille de dendrimères. Nous avons ainsi développé des molécules dendritiques structurellement flexibles [13] pour un meilleur

#### Encadré 1

# La réaction de cycloaddition de Huisgen

La réaction dite de Huisgen est une réaction de cycloaddition entre deux réactifs insaturés dont l'un est un composé de type 1,3-dipolaire. Décrite pour la première fois en 1963 par Rolf Huisgen [a], cette réaction s'effectue en une seule étape selon un processus concerté. Elle permet ainsi de générer une très grande variété d'hétérocycles à cinq chaînons, dépendamment de la nature du composé insaturé 1,3-dipolaire (figure a).

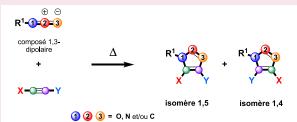


Figure a - Concept général de la cycloaddition de Huisgen.

Parmi les nombreux groupements 1,3-dipolaires pouvant être utilisés, le groupement azido  $N_3$  (1), 2 et 3 = N) est sans conteste le plus intéressant. Il peut aisément réagir avec des alcynes, notamment, pour donner les hétérocycles 1,2,3-triazoles correspondants (*figure b*). Cependant, cette réaction de cycloaddition nécessite une activation thermique et conduit de plus à la formation de deux régioisomères, le triazole 1,4-disubstitué et son isomère 1,5-disubstitué.

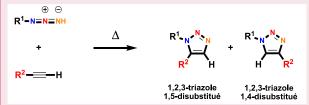


Figure b - Synthèse de 1,2,3-triazoles par réaction de Huisgen.

Du fait de la dangerosité potentielle des azotures à température élevée, cette chimie a longtemps été quelque peu « oubliée ». Elle a été remise au goût du jour par Barry Sharpless lors de l'introduction du concept de « chimie click » [b]. Bien que n'étant que l'une des très nombreuses réactions évoquées dans cette revue parue en 2001, la réaction de Huisgen a rapidement fait l'objet d'une étude intensive. Elle permet en effet de réaliser des réactions de couplage efficaces, rapides et sélectives dans des conditions expérimentales très douces. Il est également possible de contrôler la régiosélectivité de la cycloaddition, l'utilisation d'une catalyse au cuivre (+I) favorisant l'isomère 1,4 [c], alors qu'une catalyse au ruthénium oriente la cycloaddition vers l'isomère 1,5 [d].

En quelques années, la réaction de Huisgen entre un alcyne et un azoture est ainsi devenue l'une des réactions incontournables de la chimie organique moderne ainsi que pour la synthèse de nouveaux dendrimères [e]. Mais lors de son passage à la postérité, elle a complété sa dénomination originale pour être souvent désignée sous l'appellation plus générale de « chimie click », adoptant ainsi le nom du concept décrit par Sharpless [b].

- [a] Huisgen R., 1.3-Dipolare Cycloadditionen Rückschau und Ausblick, *Angew. Chem.*, **1963**, *75*, p. 604.
   [b] Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B., Click chemistry: diverse chemi-
- [b] Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B., Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, 40, p. 2004.
- [c] Rostovtsev V.V., Green L.G., Fokin V.V., Sharpless K.B., A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, 41, p. 2596.
- [d] Boren B.C., Narayan S., Rasmussen L.K., Zhang L., Zhao H., Lin Z., Jia G., Fokin V.V., Ruthenium-catalyzed azide-alkyne cycloaddition: scope and mechanism, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, p. 8923.
- [e] Astruc D., Liang L., Rapakousiou A., Ruiz J., Click dendrimers and triazole-related aspects: catalysis, mechanism, synthesis, and functions. A bridge between dendritic architectures and nanomaterials, Acc. Chem. Res., 2012, 45, p. 630.

transport de matériel génétique, aussi bien d'ADN que d'ARNsi, impliqués respectivement dans l'expression et l'atténuation de gènes, et ceci pour différentes pathologies, tant in vitro que in vivo [14]. Les dendrimères PAMAM ne sont pas les seules molécules dendritiques possédant de telles propriétés utilisables en recherche biomédicale. C'est le cas entre autres des dendrimères poly(propylèneimines) ou PPI, des poly(lysines) ou encore des dendrimères poly(phosphorés) [15-18].

En ce qui nous concerne, après nous être intéressés aux dendrimères PAMAM, nous avons étendu depuis quelques années notre domaine de recherche à la synthèse de nouveaux dendrimères poly(aminoesters) biodégradables, analogues de nos poly(amidoamines) mais sensibles aux milieux biologiques et aux variations de pH. Dans la suite de cet article, nous allons évoquer plus précisément nos efforts de recherche concernant le développement de ces deux familles de dendrimères : PAMAM et poly(aminoesters).

## Les dendrimères poly(amidoamines) ou PAMAM

Si à l'origine, les premiers dendrimères PAMAM avaient été imaginés pour mimer des protéines globulaires [1], ils se sont très rapidement révélés être particulièrement efficaces pour une myriade d'applications, notamment en tant que vecteurs pour le transport d'acides nucléiques [19].

Ces molécules sont essentiellement constituées d'amines - primaires en périphérie et tertiaires à l'intérieur liées entre elles par des connexions amides (figure 3). Les nombreuses fonctions amines primaires, une fois protonées, peuvent participer aux interactions électrostatiques avec des molécules chargées négativement comme le sont les oligonucléotides. Les fonctions amines tertiaires se comportent, quant à elles, comme des capteurs de protons, en tamponnant le milieu cellulaire, notamment le milieu acide des endosomes, facilitant ainsi la libération des acides nucléiques. Ce phénomène de libération découlerait de l'effet connu sous le nom d'« éponge à protons » [20]. Ces caractéristiques structurales permettent donc aux dendrimères PAMAM d'être des vecteurs de choix pour une transfection efficace [19, 21]. En conséquence, nous avons tout naturellement étudié ce type de molécules.

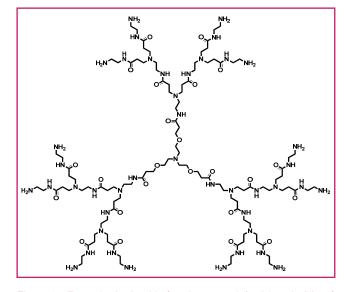


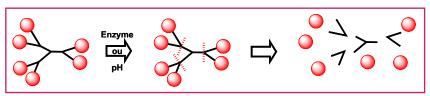
Figure 3 - Exemple de dendrimère de type poly(amidoamine) basé sur un cœur triéthanolamine (PAMAM, génération 2, G2) [13].

Nous avons développé une famille de dendrimères de type PAMAM de structure flexible basés sur un cœur triéthanolamine [13], de la génération 1 (G1-NH2) à la génération 7 (G7-NH2). La synthèse de ces dendrimères a été réalisée par itération de deux étapes clés, selon une séquence réactionnelle analogue à celle décrite par Donald A. Tomalia pour la synthèse des premiers dendrimères PAMAM [1, 3]. La première de ces deux étapes répétitives implique une addition de Michael d'amines primaires sur l'acrylate de méthyle, suivie de l'amidation des fonctions esters méthyliques par un excès d'éthylènediamine (figure 4). Lors de cette seconde étape, l'excès d'éthylènediamine joue à la fois le rôle de nucléophile et de base. Il permet ainsi d'éviter toute réaction secondaire, telles que les réactions de dimérisation ou de cyclisation. Il permet également la bonne tenue de la réaction d'amidation, sans pour autant nécessiter l'emploi d'une assistance basique supplémentaire.

Ces dendrimères PAMAM se sont avérés être d'excellents transporteurs aussi bien pour la délivrance d'ADN que pour l'inactivation de gène par ARNsi, que ce soit in vitro ou in vivo [14]. Ils se sont notamment montrés très efficaces pour la délivrance d'un cocktail d'ARNsi injecté par intraveineuse dans le cadre du traitement de modèles humaine (VIH). Un tel traitement a permis d'obtenir fonctionnels face aux variations des conditions biologiques.

une réduction significative de la charge virale [14c]. Ces résultats démontrent donc le fort potentiel de cette famille de dendrimères pour le transport de matériel génétique et ouvrent ainsi de nouvelles perspectives pour des applications cliniques, mais aussi pour le développement de nouveaux outils thérapeutiques.

Nous poursuivons actuellement nos efforts de recherche pour le développement de nouveaux dendrimères biocompatibles afin d'améliorer la délivrance ciblée sûre et efficace de matériel génétique. Parmi les différentes stratégies pouvant être utilisées pour arriver à ces fins, le développement de dendrimères susceptibles d'être métabolisés dans les conditions physiologiques est l'une des meilleures options (figure 5). Le remplacement des fonctions amides par des fonctions labiles peut être réalisé par introduction de fonctionnalités connues pour leur sensibilité vis-à-vis de l'activité enzymatique ou des variations de pH.



animaux infectés par le virus de l'immunodéficience Figure 5 - Concept de dendrimère biodégradable, basé sur la sensibilité des groupements

# Les dendrimères poly(aminoesters)

Diverses fonctionnalités présentent un tel caractère labile, par exemple les fonctions de type ester. Nous avons donc choisi de nous intéresser à la synthèse de dendrimères poly(aminoesters), et pour ce faire, nous nous sommes inspirés des structures dendritiques de type PAMAM déjà développées au laboratoire [13], en réalisant le « remplacement » de toutes les fonctions amides par des fonctions esters (figure 6).

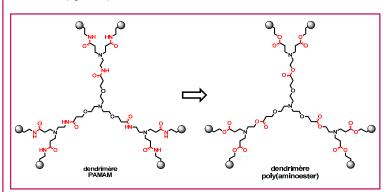


Figure 6 - Des dendrimères PAMAM aux dendrimères poly(aminoesters).

La synthèse de cette nouvelle famille de composés constitue un réel défi, la littérature étant extrêmement pauvre en exemples de telles molécules [22]. En effet, la synthèse des dendrimères nécessite des réactions très performantes en termes de rendement de molécule purifiée. Or, même si la formation de liaisons esters est une réaction très fréquente en chimie organique, la synthèse de poly(aminoesters) n'en est pas pour autant aisée. Il semblerait que la difficulté réside principalement dans la présence des doublets non liants des fonctions amines tertiaires dans le squelette de la molécule. Du fait de ces doublets libres, les fonctions amines tertiaires se retrouvent plus ou moins protonées, interférant dès lors avec le bon déroulement de la réaction d'estérification. En conséquence, nous avons été dans l'obligation

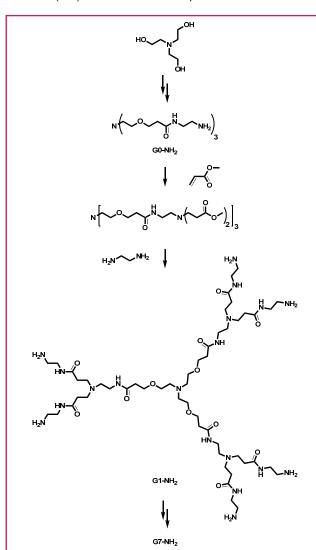


Figure 4 - Synthèse des dendrimères de type PAMAM menée au laboratoire à partir d'un cœur triéthanolamine [13].

d'élaborer une stratégie de synthèse originale, en quatre étapes [23], complètement différente de celle utilisée pour la conception des dendrimères PAMAM précédemment cités. La première étape consiste en la déprotection des fonctions esters périphériques afin de générer les acides carboxyliques qui seront ultérieurement estérifiés. La deuxième étape implique l'activation de ces acides carboxyliques en leurs esters cyanométhylés par action du chloroacétonitrile. Ces esters activés subissent ensuite une réaction de transestérification en présence d'un excès de l'alcool souhaité et d'une base, le 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU), absolument indispensable. Enfin, l'alcool utilisé en excès ayant une polarité sur colonne de gel de silice analogue à celle de la molécule finale, un piégeage en solution de cet alcool par de l'anhydride benzoïque permet de faciliter la purification du dendrimère poly(aminoester) attendu. Cette méthodologie nous a conduits à la préparation de dendrimères poly(aminoesters) de petites générations par itération de cette séquence réactionnelle, et ceci avec de très bons rendements (figure 7) [24].

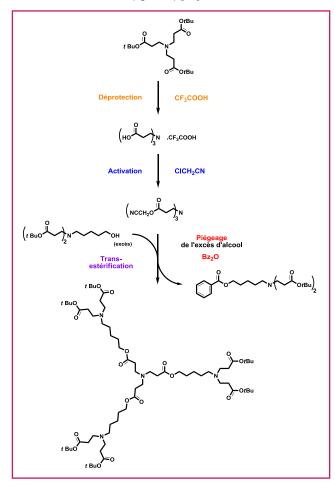


Figure 7 - Synthèse de dendrimères poly(aminoesters), fonctionnalisés par des esters *tertio*-butyliques périphériques, selon une stratégie originale en quatre étapes basée sur un intermédiaire ester cyanométhyle activé [23-24].

Il s'agit dans ce cas de dendrimères fonctionnalisés en périphérie par des fonctions esters et non des fonctions amines. À partir du même noyau central, nous avons également obtenu les poly(aminoesters) fonctionnalisés en périphérie par des amines primaires (figure 8) [25]. Ces résultats, très intéressants pour la synthèse de dendrimères poly(aminoesters) de petites générations, nous encouragent à poursuivre nos efforts de recherche afin d'atteindre des molécules de plus hautes générations.

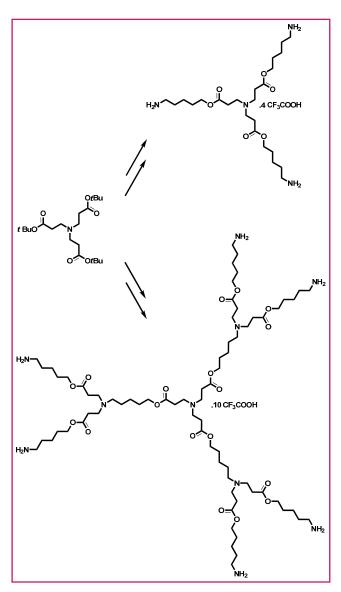


Figure 8 - Synthèse de dendrimères poly(aminoesters) fonctionnalisés par des amines périphériques utilisant la stratégie en quatre étapes basée sur un intermédiaire ester cyanométhyle activé [25].

# Les défauts structuraux des dendrimères

Quelles que soient la stratégie synthétique envisagée, la nature et les fonctionnalités des dendrimères, leur construction n'est pas aussi simple que cela peut a priori le sembler. Malgré toutes les précautions prises pour mener à bien une telle construction, aucun dendrimère n'est exempt de défauts. Ces anomalies découlent notamment de réactions incomplètes. Lors de l'itération des étapes de fonctionnalisation ou de déprotection de tous les groupements périphériques, un nombre croissant de réactions doit être réalisé simultanément pour chaque génération. En conséquence, la présence d'imperfections structurales est statistiquement une réalité selon les termes employés par Bert Meijer [26]. Ces anomalies peuvent également être dues à la réactivité intrinsèque des molécules synthétisées. Ainsi, les dendrimères de type PAMAM donnent lieu à la formation de produits secondaires issus notamment de réactions de transamidation intra- ou intermoléculaires [27].

Ces défauts ne se limitent pas aux dendrimères PAMAM, mais concernent nombre d'autres familles [28]. Fort heureusement, ils sont en général anecdotiques et les dérivés formés ne le sont qu'à l'état de traces non purifiables, dont la présence ne peut souvent être mise en évidence que par spectrométrie de masse, la résonance magnétique nucléaire n'étant pas suffisamment sensible pour les détecter.

Dans le cas de nos dendrimères de type poly(aminoester), nous avons également noté la présence de certains défauts structuraux, et ceci dès les premières générations (figure 9) [29]. L'un de ces défauts a été observé lors de la réaction d'activation des fonctions acides carboxyliques. Il consiste en la perte de l'un des bras du dendrimère naissant et son remplacement par un bras cyanométhyle (figure 10). Il est tout à fait envisageable de penser que, au cours de cette étape d'activation, certaines fonctions amines tertiaires présentes dans le squelette du dendrimère subissent une réaction de quaternisation, suivie de la perte de l'un des trois bras acryloyles par réaction de rétro-Michael. Ce défaut n'est que marginal et sa détection ne peut être effectuée que par spectrométrie de masse [29].

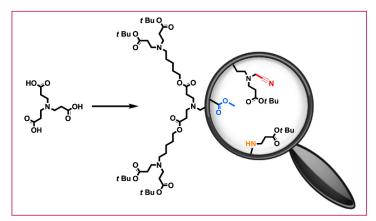


Figure 9 - Défauts structuraux de dendrimères poly(aminoesters) [29b].

Figure 10 - Défaut structural : hypothèse permettant d'expliquer l'un des défauts structuraux de nos dendrimères poly(aminoesters), observé par spectrométrie de masse.

Cependant, il faut noter que dans certains cas, les « défauts » des dendrimères peuvent être utilisés à bon escient. Ainsi, les dendrimères PAMAM partiellement dégradés par hydrolyse aléatoire de certaines liaisons amides, se sont avérés être de meilleurs vecteurs que les dendrimères intacts dont ils étaient issus [30]. Il est désormais reconnu que ces dendrimères, possédant une structure moins dense et par conséquent plus flexible, présentent une meilleure interaction avec les molécules d'ADN. Ces travaux constituent d'ailleurs le point de départ du développement des dendrimères de structure flexible pour le transfert de gènes que nous étudions dans notre laboratoire.

### **Conclusion et perspectives**

Au cours de ces dernières années, nous avons pu assister à un développement spectaculaire des nanotechnologies et notamment à l'émergence des dendrimères, véritables nano-objets et de leurs applications. En effet, ces macromolécules arborescentes possédant une architecture unique et modulable sont des outils extrêmement intéressants pour des applications très variées, souvent très éloignées les unes des autres, et notamment dans le domaine de la nanomédecine. Dans notre laboratoire, nous étudions plus particulièrement des dendrimères de type poly(amidoamine) ou PAMAM, de structure flexible et amphiphiliques, qui se sont avérés être d'excellents vecteurs pour la délivrance d'acides nucléigues [14, 31] (voir encadré 2). Nous nous intéressons également à la synthèse d'une nouvelle famille de dendrimères biodégradables : les dendrimères poly(aminoesters) [22]. Afin d'élaborer ces molécules, nous avons développé une stratégie de synthèse originale qui nous a permis d'isoler des dendrimères poly(aminoesters) de petites générations [24].

#### Encadré 2

# Les dendrimères et le transport de matériel génétique

La thérapie génique est une stratégie thérapeutique basée sur l'utilisation des acides nucléiques et qui consiste en l'altération de l'expression génétique soit pour remplacer ou compléter un allèle mutant défectif, soit pour surexprimer ou au contraire pour atténuer une protéine ayant un effet thérapeutique. Plusieurs stratégies peuvent alors être envisagées, le choix de la stratégie s'effectuant en fonction de la pathologie concernée ainsi que des cellules ciblées.

Deux méthodes principales se distinguent. L'une d'entre elles, la thérapie *in vivo*, consiste en l'introduction directe du gènemédicament par injection dans l'organe ou le tissu malade. La seconde, dite *ex vivo*, nécessite le prélèvement chez le malade de cellules ciblées qui sont par la suite génétiquement modifiées avant d'être réadministrées au patient.

Cependant, la principale entrave à l'application de la thérapie génique est le manque de transporteur efficace et sûr permettant au matériel génétique de pénétrer dans les cellules ou les tissus d'un organisme. En effet, la délivrance de matériel génétique nu comporte de nombreux obstacles, du fait notamment de sa taille mais aussi de sa sensibilité vis-à-vis du milieu physiologique. Afin de pouvoir être bénéfique dans le traitement d'une maladie, le gène-médicament devra traverser diverses barrières biologiques pour pouvoir accéder à la cellule cible puis franchir la membrane cellulaire pour enfin pénétrer dans le noyau de cette cellule dans lequel va s'exercer l'action du gène. Pour que ces obstacles soient franchis avec succès, il est nécessaire que le gènemédicament soit introduit par l'intermédiaire d'un vecteur. En théorie, le vecteur idéal doit être très efficace, non immunogène, non toxique, biodégradable et posséder un temps de survie dans le sang suffisamment long pour lui permettre d'assurer son rôle de transporteur. Dans la pratique, ces vecteurs peuvent être soit viraux, soit non viraux.

• Les vecteurs viraux : l'activité première d'un virus est de transporter efficacement son propre génome d'une cellule hôte à une autre. Pour se faire, il doit entrer dans les cellules cibles pour ensuite initier l'expression de son matériel génétique afin de se répliquer. Les virus sont donc les vecteurs naturels les plus évolués pour le transfert d'informations génétiques. De nombreux virus ont d'ailleurs fait l'objet d'études de vectorisation. Cependant, la production biotechnologique de tels vecteurs utilise des virus génétiquement modifiés, dits « sécurisés ». Leur génome est reconstruit pour incorporer les séquences du gène thérapeutique,

alors que les séquences susceptibles de conduire à un comportement pathogène sont éliminées.

Les vecteurs viraux sont donc des vecteurs très efficaces pour le transport de l'information génétique. Néanmoins, ils ne peuvent transporter que des acides nucléiques de petite taille, et leur production est très exigeante et extrêmement coûteuse. De plus, malgré toutes les précautions, leur utilisation peut poser des problèmes de sécurité. Il apparaît donc indispensable de trouver de nouveaux vecteurs.

• Les vecteurs non viraux [a] : à la différence des vecteurs viraux, les vecteurs non viraux présentent de nombreux avantages. Plus faciles à produire, ils présentent peu de risques de pathogénicité et d'immunogénicité. Ils permettent également d'envisager des administrations répétées ainsi qu'une grande flexibilité quant à la nature et à la taille du gène-médicament à insérer. Ce sont, en général, des molécules qui interagissent de façon électrostatique avec les acides nucléiques pour former des nanoparticules, les protègent contre les attaques enzymatiques et favorisent leur entrée dans la cellule. Nombre de vecteurs non viraux ont ainsi pu être évalués ; c'est le cas notamment des dendrimères PAMAM. En 1993, Jean Haensler et Francis C. Szoka Jr rapportent pour la première fois l'efficacité des dendrimères PAMAM pour le transport de gènes en culture cellulaire [b]. Dès lors, de nombreuses études ont été réalisées dans ce domaine [c-d] et il a ainsi été démontré que les dendrimères PAMAM étaient de très bons véhicules pour le transport de séquences d'acides nucléigues variées, que ce soit de l'ADN [b] ou de l'ARN [e]. En 2006, les ARNsi utilisés pour le silençage de gène(1) font eux aussi l'objet d'une étude approfondie de délivrance ciblée par des dendrimères PAMAM (voir figure 3 p. 15) [e]. Plus récemment, une étude a mis en évidence l'efficacité de cette même famille de dendrimères PAMAM pour la délivrance ciblée d'ARNsi pour le traitement, aussi bien in vitro qu'in vivo, d'un cancer de la prostate [f-g] ou du VIH [h].

Bien évidemment, l'utilisation des dendrimères pour la délivrance de gènes ne se limite pas aux seuls dendrimères PAMAM, mais utilise également les propriétés de nombre d'autres familles de dendrimères [i].

- (1) Silençage de gène: l'expression d'un gène se produit lorsque son ADN est transcrit en ARN. À l'issu de ce processus dit de transcription, l'ARN messager résultant est converti en protéine lors du phénomène de traduction. Le silençage de gène implique l'utilisation d'un gène médicament conçu pour intercepter une molécule de cet ARN messager produit par le gène, permettant ainsi d'inhiber la synthèse de la protéine. On dit alors que ce gène est transcrit mais non traduit, d'où son silence apparent et l'utilisation de l'expression générale « silençage de gène ».
- [a] Pour une revue sur le transfert de gènes par des vecteurs non viraux, voir Mintzer M.A., Simanek E.E., Nonviral vectors for gene delivery, *Chem. Rev.*, **2009**, *109*, p. 259.
   [b] Haensler J., Szoka F.C. Jr., Polyamidoamine cascade polymers
- [b] Haensler J., Szoka F.C. Jr., Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture, *Bioconjugate Chem.*, 1993, 4, p. 372.
- [c] Voir par exemple Kukowska-Latallo J.F., Bielinska A.U., Johnson J., Spindler R., Tomalia D.A., Baker J.R. Jr., Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, p. 4897; Tang M.X., Redemann C.T., Szoka F.C. Jr., *In vitro* gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers, *Bioconjugate Chem.*, 1996, 7, p. 703.
- [d] Pour une revue sur l'utilisation des dendrimères pour le transport de gènes, voir Guillot-Nieckowski M., Eisler S., Diederich F., Dendritic vectors for gene transfection, *New J. Chem.*, 2007, 31, p. 1111.
   [e] Zhou J.H., Wu J.Y., Hafdi N., Behr J.-P., Erbacher P., Peng L., PAMAM
- Zhou J.H., Wu J.Y., Hafdi N., Behr J.-P., Erbacher P., Peng L., PAMAM dendrimers for efficient siRNA delivery and potent gene silencing, *Chem. Commun.*, 2006, p. 2362.
   Liu X., Rocchi P., Qu F., Zheng S., Liang Z., Cleave M., Iovanna J.,
- Liu X., Rocchi P., Qu F., Zheng S., Liang Z., Cleave M., Iovanna J., Peng L., PAMAM dendrimer mediated siRNA delivery to target heatshock protein 27 and produce potent antiproliferation effect on prostate cancer PC-3 cells, *ChemMedChem*, 2009, 4, p. 1302.
   Liu X., Liu C., Laurini E., Posocco P., Pricl S., Qu F., Rocchi P., Peng L.,
- [g] Liu X., Liu C., Laurini E., Posocco P., Pricl S., Qu F., Rocchi P., Peng L., Efficient delivery of sticky siRNA and potent gene silencing in a prostate cancer model using a generation 5 triethanolamine-core PAMAM dendrimer, Mol. Pharmaceut., 2012, 9, p. 470.
- [h] Zhou J., Neff P., Liu X., Zhang J., Li H., Smith D.D., Swiderski P., Huang Y., Du Q., Liang Z., Peng L., Akkina R., Rossi J., Systemic administration of combinatorial dsiRNAs via nanoparticles efficiently suppresses HIV-1 infection in humanized mice, Mol. Ther., 2011, 19, p. 2228.
- Pour une revue récente sur l'utilisation de dendrimères pour le transport d'ARNsi, voir Liu X., Rocchi P., Peng L., Dendrimers as nonviral vectors for siRNA delivery, New J. Chem., 2012, 36, p. 256.

À l'heure actuelle, nous explorons de nouvelles stratégies afin de préparer efficacement des dendrimères poly(aminoesters) de plus hautes générations, possédant des propriétés de délivrance analogues, voire supérieures, à celles de nos dendrimères PAMAM, mais présentant la caractéristique d'être biodégradables. Dans cette optique, nous envisageons de privilégier l'utilisation de la chimie « click » qui est sans conteste l'une des approches les plus prometteuses pour l'obtention de telles macromolécules [32].

### Notes et références

- (1) Monodisperse : se dit d'un polymère dont toutes les molécules ont exactement la même masse molaire.
- 2) Hyper-ramifié: se dit d'un polymère tridimensionnel et hautement ramifié.
- [1] Tomalia D.A., Baker H., Dewald J., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J., Smith P., A new class of polymers: Starburst-dendritic macromolécules, *Polymer J.*, 1985, 17, p. 117.
- [2] Majoral J.P., Caminade A.-M., Les dendrimères : une thématique en plein essor, L'Act. Chim., 2011, 348-349, p. 90.
- [3] Tomalia D.A., Baker H., Dewald J., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J., Smith P., Dendritic macromolecules: Synthesis of starburst dendrimers, *Macromolecules*, 1986, 19, p. 2466.
- [4] Wörner C., Mülhaupt R., Polynitrile-functional and polyamine-functional poly(trimethylene imine) dendrimers, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1993, 32, p. 1306.
- [5] De Brabander-van den Berg E.M.M., Meijer E.W., Poly(propylene imine) dendrimers: Large-scale synthesis by heterogeneously catalyzed hydrogenations, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1993**, 32, p. 1308.
- 6] a) Launay N., Caminade A.-M., Lahana R., Majoral J.-P., A general synthetic strategy for neutral phosphorus-containing dendrimers, Angew. Chem. Int. Ed., 1994, 33, p. 1589; b) Majoral J.-P., Caminade A.-M., Dendrimers containing heteroatoms (Si, P, B, Ge, or Bi), Chem. Rev., 1999, 99, p. 845.
- [7] a) Hawker C.J., Fréchet J.M.J., Preparation of polymers with controlled molecular architecture: A new convergent approach to dendritic macromolecules, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, p. 7638; b) Hawker C.J., Fréchet J.M.J., A new convergent approach to monodisperse dendritic macromolecules, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1990, p. 1010.
   [8] Wooley K.L., Hawker C.J., Fréchet J.M.J., Hyperbranched macromolecules
- [8] Wooley K.L., Hawker C.J., Frechet J.M.J., Hyperbranched macromolecules via a novel double-stage convergent growth approach, J. Am. Chem. Soc., 1991, 113, p. 4252.
- [9] Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B., Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, 40, p. 2004.
- [10] Pour une revue récente, voir Astruc D., Liang L., Rapakousiou A., Ruiz J., Click dendrimers and triazole-related aspects: Catalysts, mechanism, synthesis, and functions. A bridge between dendritic architectures and nanomaterials, Acc. Chem. Res., 2012, 45, p. 630.
- [11] Pour une revue récente, voir Franc G., Kakkar A.K., "Click" methodologies: efficient, simple and greener routes to design dendrimers, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, 39, p. 1536.
- [12] Pour une revue récente sur les applications des dendrimères, voir Astruc D., Boisselier E., Ornelas C., Dendrimers designed for functions: From physical, photophysical, and supramolecular properties to applications in sensing, catalysis, molecular electronics, photonics, and nanomedicine, *Chem. Rev.*, 2010, 110, p. 1857.
  [13] Wu J.Y., Zhou J.H., Qu F.Q., Bao P.H., Zhang Y., Peng L., Polycationic
- [13] Wu J.Y., Zhou J.H., Qu F.Q., Bao P.H., Zhang Y., Peng L., Polycationic dendrimers interact with RNA molecules: polyamine dendrimers inhibit the catalytic activity of Candida ribozymes, *Chem. Commun.*, **2005**, p. 313.
   [14] a) Zhou J.H., Wu J.Y., Hafdi N., Behr J.-P., Erbacher P., Peng L., PAMAM
  - dendrimers for efficient siRNA delivery and potent gene silencing, Chem. Commun., 2006, p. 2362; b) Liu X., Rocchi P., Qu F., Zheng S., Liang Z. Cleave M., Iovanna J., Peng L., PAMAM dendrimer mediated siRNA  $delivery \,to\,target\,heat\text{-}shock\,protein\,27\,and\,produce\,potent\,antiproliferation$ effect on prostate cancer PC-3 cells, ChemMedChem, 2009, 4, p. 1302; c) Zhou J., Neff P., Liu X., Zhang J., Li H., Smith D.D., Swiderski P., Huang Y., Du Q., Liang Z., Peng L., Akkina R., Rossi J., Systemic administration of combinatorial dsiRNAs via nanoparticles efficiently suppresses HIV-1 infection in humanized mice, Mol. Ther., 2011, 19, p. 2228; d) Liu X., Wu J., Yamine M., Zhou J., Posocco P., Viel S., Liu C., Ziarrelli F., Fermeglia M., Pricl S., Vicotrero G., Nguyen C., Erbacher P., Behr J.-P., Peng L., Structurally flexible triethanolamine core PAMAM dendrimers are effective nanovectors for DNA transfection in vitro and in vivo to the mouse thymus, Bioconjugate Chem., 2011, 22, p. 2461; e) Lang M.-F., Yang S., Zhao C., Sun G., Murai K., Wu X., Wang J., Gao H., Brown C.E., Liu X., Zhou J., Peng L., Rossi J.J., Shi Y., Genome-wide profiling identified a set of miRNAs that are differentially expressed in glioblastoma stem cells and normal neural stem cells, *PLoŚ ONE*, **2012**, 7, p. e36248; f) Liu X., Liu C., Laurini E., Posocco P., Pricl S., Qu F., Rocchi P., Peng L., Efficient delivery of sticky siRNA and potent gene silencing in a prostate cancer model using a generation 5 triethanolamine-core PAMAM dendrimer, Mol. Pharmaceut., 2012, 9, p. 470 ; g) Liu X., Posocco P., Liu C., Yu T., Wang Q., Dal Col V., Chen C., Wang Y., Rocchi P., Pricl S., Peng L.,

- Poly(amidoamine) dendrimes as non-viral vectors for the delivery of RNA therapeutics, *Dendrimers in Biomedical Applications*, V. Cena, B. Klajnert, L. Peng (eds), RSC Publishing, **2013**, p. 73.
- [15] Pour une revue récente sur l'utilisation de dendrimères pour le transfert d'ARNsi, voir Liu X., Rocchi P., Peng L., Dendrimers as non-viral vectors for siRNA delivery, New J. Chem., 2012, 36, p. 256.
- [16] Pour une revue sur l'utilisation des dendrimères pour le transport de gènes, voir Guillot-Nieckowski M., Eisler S., Diederich F., Dendritic vectors for gene transfection, New J. Chem., 2007, 31, p. 1111.
- [17] Raviña M., Paolicelli P., Seijo B., Sanchez A., Knocking down gene expression with dendritic vectors, *Mini Rev. Med. Chem.*, 2010, 10, p. 73.
- [18] Pour une revue récente des applications biologiques des dendrimères poly(phosphorés), voir Caminade A.M., Turrin C.-O., Majoral J.-P., Biological properties of phosphorus dendrimers, *New J. Chem.*, 2010, 34, p. 1512.
- [19] Haensler J., Szoka F.C. Jr., Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture, *Bioconjugate Chem.*, 1993, 4, p. 372.
- [20] Behr J.-P., The proton sponge: A trick to enter cells the viruses did not exploit, Chimia, 1997, 51, p. 34.
- [21] Kukowska-Latallo J.F., Bielinska A.U., Johnson J., Spindler R., Tomalia D.A., Baker J.R. Jr., Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, p. 4897.
- [22] a) Wang Y., Quéléver G., Peng L., The seemingly trivial yet challenging synthesis of poly(amino)ester dendrimers, Curr. Med. Chem., 2012, 19, p. 5011; b) Quéléver G., Bouillon C., Moreno P., Tintaru A., Charles L., Pricl S., Peng L., Poly(aminoester) dendrimers: design, synthesis and characterization, Dendrimers in Biomedical Applications, V. Cena, B. Klajnert, L. Peng, RSC Publishing, 2013, p. 167.
- [23] Bouillon C., Quéléver G., Peng L., Efficient synthesis of esters containing tertiary amine functionalities via active cyanomethyl ester intermediates, Tetrahedron Lett. 2009, 50, p. 4346.
- Tetrahedron Lett., 2009, 50, p. 4346.
   [24] Bouillon C., Tintaru A., Monnier V., Charles L., Quéléver G., Peng L., Synthesis of poly(amino)ester dendrimers via active cyanomethyl ester intermediates, J. Org. Chem., 2010, 75, p. 8685.
- [25] Bouillon C., Thèse de 3° cycle, Université de la Méditerranée, sept. 2009.
- [26] Bosman A.W., Janssen H.M., Meijer E.W., About dendrimers: Structure, physical properties and applications. *Chem. Rev.* 1999, 99 p. 1665.
- physical properties and applications, Chem. Rev., 1999, 99, p. 1665.
  [27] Giordanengo R., Mazarin M., Wu J., Peng L., Charles L., Propagation of structural deviations of poly(amidoamine) fan-shape dendrimers (generations 0-3) characterized by MALDI and electrospray mass spectrometry, Int. J. Mass Spectrom., 2007, 266, p. 62 et réf. citées.
  [28] Voir par exemple Hummelen J.C., van Dongen J.L.J., Meijer E.W.,
- [28] Voir par exemple Hummelen J.C., van Dongen J.L.J., Meijer E.W., Electrospray mass spectrometry of poly(propy1ene imine) dendrimers: The issue of dendritic purity or polydispersity, Chem. Eur. J., 1997, 3, p. 1489.
- [29] a) Tintaru A., Monnier V., Bouillon C., Giordanengo R., Quéléver G., Peng L., Charles L., Structural characterization of poly(amino)ester

- dendrimers and related impurities by electrospray tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2010**, *24*, p. 2207; b) Tintaru A., Chendo C., Monnier V., Bouillon C., Quéléver G., Peng L., Charles L., Electrospray tandem mass spectrometry of poly(amino)ester dendrimers: Dissociation rules and structural characterization of defective molecule, *Int. J. Mass Spectrom.*, **2011**, *308*, p. 56.
- [30] Tang M.X., Redemann C.T., Szoka F.C. Jr., In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers, Bioconjugate Chem., 1996, 7, p. 703.
- [31] Yu T., Liu X., Bolcato-Bellemin A.-L., Wang Y., Liu C., Erbacher P., Qu F., Rocchi P., Behr J.-P., Peng L., An amphiphilic dendrimer combining properties of lipid and dendrimer vectors for effective siRNA delivery and gene silencing in vitro and in vivo, Angew. Chem. Int. Ed., 2012, 51, p. 8478
- [32] Moreno P., Thèse de 3e cycle, Aix-Marseille Université, en cours.









P. Moreno

G. Quéléver

L. Peng

C. Bouillo

Pierre Moreno est doctorant, Gilles Quéléver, maître de conférences, et Ling Peng, directrice de recherche au CNRS, dans le département Ingénierie Moléculaire et Matériaux Fonctionnels (IMMF) du Centre Interdisciplinaire de Nanoscience de Marseille (CINAM, CNRS UMR 7325)\*.

Camille Bouillon a obtenu sa thèse en septembre 2009 sur « La synthèse de dendrimères poly(aminoesters) », sous la codirection de Ling Peng et Gilles Quéléver

Leur principale thématique de recherche consiste en la synthèse et l'évaluation de nouveaux dendrimères biocompatibles pour la vectorisation de matériel génétique.

\* Aix-Marseille Université, CINaM, Centre Interdisciplinaire de Nanoscience de Marseille, CNRS UMR 7325, Campus Scientifique de Luminy, Case 913, F-13288 Marseille Cedex 9.

Courriels: gilles.quelever@univ-amu.fr, ling.peng@univ-amu.fr







