

Apport des dendrimères biosourcés dans le domaine de la cosmétique

Katia BACHA

2023

COMMUNAUTE FRANÇAISE DE BELGIQUE
COTUTELLE INTERNATIONALE
UNIVERSITE DE LIEGE-GEMBOUX AGRO-BIO TECH
UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
UFR SCIENCES EXACTES ET NATURELLES

Apport des Dendrimères Biosourcés dans le Domaine de la Cosmétique

Katia BACHA

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur
en chimie organique et en sciences agronomiques et ingénierie biologique

– **Février 2023** –

Jury

<i>Président :</i>	Pr. Christophe Blecker	Université de Liège
<i>Rapporteurs :</i>	Pr. Adam Daich	Université du Havre Normandie
	Dr. Sandrine Morandat	Université de Technologie de Compiègne
<i>Examineurs :</i>	Pr. Jean Bernard Behr	Université de Reims Champagne-Ardenne
	Pr. Michel Frederich	Université de Liège
	Pr. Christine Gérardin	Université de Lorraine
<i>Directrices</i>	Pr. Sandrine Bouquillon	Université de Reims Champagne-Ardenne
	Dr. Magali Deleu	Université de Liège

© BACHA Katia, 16/02/2023

RESUME

Résumé

La durée d'utilisation de la plupart des produits cosmétiques employés quotidiennement est limitée en raison de l'instabilité de l'un ou plusieurs actifs utilisés dans leur composition par effet de divers paramètres environnementaux. Par conséquent, la nanotechnologie est fortement sollicitée ces dernières années afin de limiter cette dégradation et d'assurer la délivrance des principes actifs efficacement au niveau de la peau.

Cette thèse de doctorat a un double objectif, l'un plus appliqué visant à évaluer l'utilisation de dendrimères biosourcés comme supports d'actifs cosmétiques innovants et l'autre plus fondamental s'appliquant à comprendre leur mécanisme d'action sur des modèles biomimétiques de *stratum corneum* (SC).

En pratique, quatre familles de dendrimères biosourcés dérivés du glycérol ont été synthétisées. Leur capacité à encapsuler la vitamine C, la caféine et divers autres actifs cosmétiques et leur cytotoxicité sur des fibroblastes dermiques humains ont été testées. Les résultats ont montré que les dendrimères synthétisés ne présentent aucune cytotoxicité à l'exception des dérivés de Poly(PropylèneImine) (PPI). Le GlycéroDendrimère Poly(AMidoAMine) de troisième génération (GD-PAMAM-3) a été sélectionné comme un meilleur candidat, grâce à sa bonne capacité à encapsuler les actifs cosmétiques et à sa faible cytotoxicité. Par ailleurs, huit nouvelles familles de dendrimères dérivés de Poly(AMidoAMine) (PAMAM) et Poly(PropylèneImine) (PPI) possédant des fonctions antioxydantes à base d'acides phénoliques ont été également synthétisées (six familles de dendrimères ioniques et deux autres neutres). Leurs propriétés antioxydantes et cytotoxiques ont également été testées. Les dendrimères ioniques dérivés de l'acide férulique ont été sélectionnés comme étant les dendrimères antioxydants avec un faible effet cytotoxique pour des concentrations qui ne dépassent pas 100 mg/mL.

Enfin, l'interaction des dendrimères performants en termes d'encapsulation, d'effet antioxydant ou peu cytotoxiques avec le SC a été étudié au moyen de modèles de monocouches lipidiques et de liposomes biomimétiques de SC à l'aide de différentes techniques biophysiques. L'étude sur la monocouche a montré que les dendrimères interagissent avec les lipides du SC. L'étude sur les liposomes biomimétiques du SC a montré que les dendrimères ont un faible effet perméabilisant. En outre, les dérivés de PAMAM étudiés augmentent la rigidité de la membrane, ce qui suggère le renforcement de la barrière du SC, alors que le dérivé de PPI a un effet fluidifiant, affaiblissant la barrière du SC.

De manière générale, cette thèse a, non seulement, permis des avancées, dans le domaine d'application des dendrimères en cosmétiques en proposant des nouvelles structures de dendrimères non cytotoxiques et adaptées à l'encapsulation de principes actifs délicats, mais aussi sur le plan fondamental, dans la compréhension du mécanisme d'action de ces dendrimères au niveau de la peau.

Mots clés : Dendrimères biosourcés, dendrimères antioxydants, actifs cosmétiques, encapsulation, interaction membranaire, *stratum corneum* et liposomes.

ABSTRACT

Abstract

The shelf life of most cosmetic products used in daily life is limited due to the instability of one or more active ingredients used in their composition by the effect of various environmental parameters. Consequently, nanotechnology is strongly solicited these last years in order to limit this degradation and to ensure the efficient delivery of the active ingredients to the skin.

This PhD thesis has a double objective, one more applied aiming to evaluate the use of biobased dendrimers as innovative carriers of cosmetic actives and the other fundamental, aiming to understand their mechanism of action on biomimetic models of *stratum corneum* (SC).

Four families of glycerol-derived dendrimers have been synthesized. Their ability to encapsulate vitamin C, caffeine and various other cosmetic actives and their cytotoxicity on human dermal fibroblasts have been tested. The results showed that the synthesized dendrimers have no cytotoxicity except for Poly(Propylrnelmine) (PPI) derivatives. GlyceroDendrimere Poly(AMidoAMine) third generation (GD-PAMAM-3) has been selected as the best candidate, due to its high ability to encapsulate cosmetic actives and its low cytotoxicity. In addition, eight new families of dendrimers derived from Poly(AMidoAMine) (PAMAM) and Poly(Propylrnelmine) (PPI) with antioxidant functions based on phenolic acids have also been synthesized (six families of ionic dendrimers and two neutral ones). Their antioxidant and cytotoxic properties have been also tested. The ionic dendrimers derived from ferulic acid has been selected as the best antioxidant dendrimers with a weak cytotoxic effect for concentrations not exceeding 100 mg/mL.

Finally, the interaction between dendrimers selected as best candidates in terms of encapsulation, antioxidant effect or low cytotoxicity and the SC has been studied using lipid monolayer models and liposomes mimicking the SC and different biophysical tools. The study on the monolayer model showed that dendrimers interact with the lipids composing the SC. The study on liposomes showed that dendrimers have a weak permeabilizing effect. In addition, the PAMAM derivatives studied increase the membrane stiffness suggesting the strengthening of the SC barrier, whereas the PPI derivative has a fluidizing effect, weakening the SC barrier.

Globally, this thesis provided advances in the field of application of dendrimers in cosmetics by proposing new non-cytotoxic dendrimer structures adapted to the encapsulation of delicate active ingredients, and on the fundamental level, in the understanding of the mechanism of action of these dendrimers on the skin.

Key words: Bio-based dendrimers, antioxidants dendrimers, cosmetic actives, encapsulation, membrane interaction, *stratum corneum* and liposomes.

REMERCIEMENTS

Remerciements

Toute ma reconnaissance, ma gratitude et mes remerciements les plus sincères s'adressent tout naturellement à Sandrine et Magali, mes deux directrices de thèse qui m'ont accueillie dans leurs laboratoires et permis de réaliser cette thèse. Magali, je te remercie pour ta gentillesse, ta patience et pour toute la liberté scientifique et la confiance que tu as su m'accorder tout au long de cette thèse. Sandrine, je te remercie profondément pour le soutien et l'aide que tu as pu m'apporter tant au niveau professionnel qu'au niveau personnel. Je te remercie pour ta gentillesse, ta patience et tes conseils. Merci d'avoir cru en moi et en mes capacités non seulement pour ces trois années de thèse, mais aussi pour mes deux stages du Master. Grâce à toi, j'ai pu retrouver la confiance en mes capacités et je t'en suis reconnaissante.

J'exprime toute ma gratitude aux rapporteurs le Pr Adam Daich et le Dr Sandrine Morandat, ainsi qu'aux membres de jury le Pr Christophe Blecker, le Pr Michel Frédérick, le Pr Jean-Bernard Behr et le Pr Christine Gerardin d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je souhaite également remercier les membres du comité de suivi de thèse, Pr Rachida Zerrouki, Pr Marie-Laure Fauconnier, Pr Catherine Sarazin, Pr Michel Frédérick et Dr Cédric Jacquard, pour avoir suivi l'évolution de mes travaux pendant ces trois années de thèse tout en prodiguant des conseils et des recommandations.

Je tiens à remercier le fonds européen du développement régional (FEDER) au travers du programme de recherche Interreg Inticosm d'avoir financé le projet INTICOSM qui a donné lieu à cette thèse. Je remercie également toutes les personnes qui ont collaboré à ce projet et contribué à la réalisation de cette thèse (Pr J.C. Monboisse, Dr S. Brassart-Pasco et Dr J. Estager).

Je passe mes salutations et remerciements à mes collègues du LBMI (Aurélien, Guillaume, Willy, Eloise, Manon et Catherine) pour leur accueil bienveillant pendant mes séjours en Belgique. Tout d'abord, je remercie chacun d'entre vous de m'avoir initiée aux techniques de biophysique et de m'avoir aidée à réaliser certaines tâches. Merci pour votre soutien, vos conseils et pour les moments conviviaux inoubliables partagés ensemble. Grâce à vous, j'ai pu découvrir beaucoup de choses sympas et

amusantes (président, cacaoette de la Noël, brouette, ...), sans oublier la musique des années 80 et celle du coq que je ne supportais plus. Catherine, je tiens à te remercier énormément pour ton aide, ta disponibilité et pour tout ce que tu as pu faire pour assurer la continuité de mes travaux. J'apprécie beaucoup ton effort. Aurélien, je te remercie pour ton accueil et ton attention les tous premiers jours de mon arrivée. Merci de m'avoir aidée à comprendre beaucoup de notions de base de la biophysique, pour ta bonne humeur et ta gentillesse. Tout simplement, tu es une personne agréable.

Je continue en remerciant l'intégralité de l'ICMR notamment son personnel technique (Anthony, Alexis, Nicola, Agathe et Amandine) pour leur soutien, assistance et leurs efforts tout au long de ces trois années.

Je remercie énormément mes collègues de l'ICMR avec qui je partage le bureau (Jean-Pierre, Safa, Emad, Mahasoia et Frederica) pour leur soutien, leur bonne humeur et pour les moments conviviaux partagés ensemble. Ça m'a fait un grand plaisir d'avoir des collègues comme vous. Safa, je te remercie pour ton attention, ton écoute et tes conseils. Jean-Pierre, merci pour tout ce que tu as pu faire pour moi pendant toutes ces années. Je te remercie pour tes conseils, ton écoute, ta gentillesse, ta bonne humeur et ton encadrement notamment pendant mes deux stages de master. Merci d'avoir partagé ton savoir avec moi. J'ai appris beaucoup de choses de ta part. J'apprécie beaucoup tes efforts et ton soutien.

Je remercie ensuite Amandine pour sa gentillesse et de m'avoir invitée à rejoindre les groupes de joueurs de jeux de société et de sports (Lamia, Judith, Céline, Mathieu, Alexis, Arthur, Andres, Vivien, Laura, Basil, Elodie, Nathan...). Je vous remercie tous pour les moments partagés ensemble pendant les pauses de midi. Ça n'a pas duré longtemps à cause de mes déplacements, notamment avec certains d'entre vous, mais ça reste des moments inoubliables. Lamia, je te remercie pour ta confiance, ton attention, ton écoute et ton soutien moral dans les moments difficiles. Mohamed, je tiens à te remercier de m'avoir soutenue pendant les pires moments de ma vie et de m'avoir aidée à récupérer la confiance en moi. Je te remercie pour ton écoute, ta compréhension et ton aide aux niveaux professionnel et personnel.

Je termine par remercier l'ensemble du personnel des équipes, que ce soit à Gembloux AgroBioThech ou à l'ICMR qui m'ont autorisée à accéder à leurs laboratoires et à utiliser leurs matériels. Finalement, je remercie toutes personnes qui

m'ont sous-estimée et jugée. Je leur dis merci, grâce à vous, j'ai eu le courage d'avancer et de récupérer la confiance en mes capacités.

Pour conclure, le coté personnel, une pensée à mes chers parents que je remercie énormément pour leurs soutien et encouragements. Ils sont depuis toujours à mes côtés malgré la distance qui nous sépare. Je vous remercie d'avoir cru en moi et de m'avoir donné la possibilité de continuer au-delà de mes envies. Si j'en suis arrivée là aujourd'hui, c'est grâce à vous et à votre soutien. J'aurai aimé que vous soyez présents à mes côtés pour ce jour si spécial pour moi, mais je sais que votre cœur y est et que vous êtes fières de moi. Je tiens également à remercier mes frères et sœurs (Lila, Sylia, Nabil et Kholaf), mes chères amies et sœurs Sabrina et Fouzia et toute ma famille pour leur soutien de tous les jours, leur écoute attentive et leurs conseils. Un merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Je terminerai par te remercier toi, Yacine, mon cher époux, pour la confiance que tu m'accordes, pour ton soutien de tous les jours. Merci de partager mes joies, d'avoir supporté mes changements d'humeur, d'avoir pu t'adapter à mes déplacements et de m'encourager à atteindre mes objectifs professionnels. Merci de m'avoir aimée, réconfortée vis-à-vis de mes angoisses et donné la force de continuer. Merci d'être là, toujours présent pour moi.

TABLES DES MATIERES

Table des matières

Résumé	VII
Abstract	XI
Remerciements	XV
Liste des figures	XXIX
Liste des schémas	XXXVII
Liste des tableaux	XLI
Liste des abréviations	XLV
Avant-propos	3
Introduction générale.....	7
Chapitre I : Dendrimères : Synthèse, applications et interaction avec le	11
I.1. Contexte et objectifs	11
I.2. Introduction Bibliographique.....	11
1. Généralités sur les dendrimères : Définition et synthèse.....	11
1.1. Définition.....	11
1.2. Synthèse.....	12
2. Applications des dendrimères.....	19
2.1. Imagerie médicale	20
2.2. Pharmaceutique	21
2.3. Catalyse	23
2.4. Environnement	25
2.5. Alimentaire	27
2.6. Cosmétique	28
3. La toxicité des dendrimères.....	30
4. L'interaction des dendrimères avec le SC	34
4.1. La peau	34

4.2.	Le stratum corneum	35
4.3.	La diffusion des principes actifs à travers la peau	37
4.4.	Les membranes biomimétiques de peau	38
4.5.	Interaction dendrimères-stratum corneum	41
I.3.	Conclusion.....	43
Chapitre II : Synthèse de dendrimères biosourcés et encapsulation des molécules d'intérêt cosmétique		
		47
II.1.	Contexte et objectifs	47
II.2.	Résultats et discussion	47
1.	Synthèse de dendrimères biosourcés.	47
1.1.	Synthèse de GlyceroDendrimère-Poly(PropylenImine) (GD-PPIs) ...	47
1.2.	Synthèse de GlycéroDendrimere-Poly(AMidoAMIne) GD-PAMAMs 49	
1.3.	Synthèse de GlycéroClickDendrimères (GCD).....	51
1.4.	Synthèse de GlycérolADendrimères (GAD)	54
2.	Encapsulation des molécules d'intérêt cosmétique par les dendrimères	55
2.1.	Encapsulation de la vitamine C	59
2.2.	Encapsulation de la caféine	59
2.3.	Encapsulation de DHA et d'autres molécules d'intérêt cosmétique...	61
3.	Approche physico-chimique – compréhension des interactions lors de l'encapsulation (RMN).....	62
4.	Cytotoxicité des dendrimères	62
II.3.	Conclusion	63
II.4.	Appareillages et partie expérimentale.....	64
1.	Appareillages	64
2.	Partie expérimentale	64
2.1.	Synthèses des dendrimères	64
2.1.1.	Synthèses du GlycéroDendrimère-Poly(PropylenImine) (GD-PPI)	
[1]	64	

2.1.2.	Synthèses de GlycéroDendrimère-Poly(AMidoAMine) (GD-PAMAM) [4].....	66
2.1.3.	Synthèses du GlycéroClickDendrimère (GCD)[50].....	69
2.1.4.	Synthèse des GlycérolADendrimères (GAD) [51].....	73
2.2.	Encapsulation des actifs cosmétiques.....	76
2.3.	Tests de cytotoxicité.....	77
Chapitre III : Synthèse de nouveaux dendrimères possédant des fonctions anti-oxydantes.....		81
III.1.	Contexte et objectifs.....	81
III.2.	Résumé du premier article.....	81
Synthesis and Activity of Ionic Antioxidant Functionalized PAMAMs and PPIs Dendrimers		84
1.	Introduction	84
2.	Results and Discussion.....	86
2.1.	Synthesis of the Ionic Dendrimers.....	86
2.2.	Synthesis in MW and Microfluidic Reactors	92
2.3.	Determination of the Antioxidant Properties.....	94
2.4.	Determination of Cytotoxic Properties.....	97
3.	Conclusions	99
4.	Materials and Methods	100
4.1.	Experimental	100
4.1.1.	General Procedure for the Synthesis of PPI-PhA and PPI-FA Generations 1, 2 and 3.....	100
4.1.2.	General Procedure for the Microwave-Assisted Synthesis of PPI-PhA and PPI-FA Generations 1, 2 and 3.....	104
4.1.3.	General Procedure for the Flow Synthesis of Ionic Dendrimers	104
4.1.4.	General Procedure for the Synthesis of PPI-CA Generations 1, 2 and 3	105

4.1.5.	General Procedure for the Synthesis of PAMAM-PhA and PAMAM-FA Generations 1, 2 and 3.....	107
4.1.6.	General Procedure for the Synthesis of PAMAM-CA Generations 1, 2 and 3	110
4.2.	Antioxidant Activity Evaluation of Synthesized Dendrimers	113
4.3.	Cytotoxicity Experiment.....	113
4.3.1.	Cell Culture.....	113
4.3.2.	Cell Viability Assay.....	113
III.3.	Evaluation de l'activité antioxydante	115
III.4.	Synthèse de dendrimères antioxydants dérivés de PPIs	118
1.	Rappel bibliographique : les réactions d'amidations.....	118
2.	Résultats et discussions	120
2.1.	Réaction de couplage de PPIs avec l'acide Phlorétique	120
2.2.	Réaction de couplage de PPIs avec l'acide Férulique	123
3.	Conclusion.....	124
4.	Protocoles	124
4.1.	Procédure générale de synthèse de PhA-PPIs.....	124
4.1.1.	Synthèse de PhA-PPI-1.....	124
4.1.2.	Synthèse de PhA-PPI générations 1,2 et 3 sous micro-ondes...	125
4.2.	Procédure générale de synthèse de FA-PPIs.....	126
Chapitre IV : Etude des interactions des dendrimères avec des membranes biomimétiques du SC.....		131
IV.1.	Contexte et objectifs.....	131
IV.2.	Résumé du deuxième article.....	131
Encapsulation of vitamin C by glycerol-derived dendrimers, their interaction with biomimetic models of <i>stratum corneum</i> and their cytotoxicity.....		135
1.	Introduction	135
2.	Results and Discussion	137
2.1.	Encapsulation of vitamin C	137

2.2.	Cytotoxicity of dendrimers.....	139
2.3.	Interaction with Biomimetic Models of Stratum Corneum	140
2.3.1.	Study on the lipid monolayer model.....	141
2.3.2.	Study on the Liposome Model	144
3.	Materials And Methods	147
3.1.	Chemicals	147
3.2.	Synthesis of glycerol derived dendrimers	148
3.3.	Encapsulation procedure	149
3.4.	NMR T ₁ and T ₂ Measurement:.....	149
3.5.	Cytotoxicity assays.....	150
3.6.	Study on lipid monolayer models by Langmuir film balance technique 151	
3.7.	Formulation of fluorescent probe-encapsulated liposomes	151
3.8.	Formulation of laurdan-stained liposomes	152
3.9.	Liposomes characterization: size and quantification.....	152
3.9.1.	Size determination - DLS measurement.....	152
3.9.2.	Morphology Characterization—Cryo-TEM.....	153
3.9.3.	Lipid concentration quantification - NMR spectroscopy	153
3.10.	Leakage assays	154
3.11.	Fluidity measurement.....	154
4.	Conclusion.....	155
IV.3.	Interaction du GD-PPI-4 et du PAMAM-3-FA avec les membranes biomimétiques du SC	158
1.	Résultats et discussions	158
1.1.	Etude sur le modèle monocouche de stratum corneum	158
1.2.	Effet des dendrimères GD-PPI-4 et PAMAM-3-FA sur la perméabilité de liposomes.....	160
1.3.	Effet des dendrimères GD-PPI-4 et PAMAM-3-FA sur la fluidité de la membrane.....	161

2. Conclusion..... 162
Conclusions générales et perspectives..... 165
Valorisations scientifiques..... 173
Références 179
Annexe 1..... 213
Annexes 2: 239

LISTE DES FIGURES

Liste des figures

Figure 1 : Structure générale d'un dendrimère.....	12
Figure 2 : Synthèse de dendrimère par l'approche divergente	13
Figure 3 : Synthèse d'un dendrimère par l'approche convergente, reproduite selon [29] par autorisation de l'auteur	14
Figure 4 : Schéma de synthèse d'un dendrimère PAMAM greffé sur la silice mésoporeuse décoré par de l'isothiocyanate de méthyle, reproduite selon [45]	17
Figure 5 : Structures de 3,4,5-tris(11-hydroxyundécyloxy)-N-(3,4,5-tris(octyloxy)phényl) benzamide (Janus) (a) et 3,4,5-tris(octyloxy)-N-(3,4,5-tris(octyloxy)phényl) benzamide (Twin) (b) [53]	18
Figure 6 : Principe d'encapsulation	19
Figure 7 : Dendrimère amphiphile (HAD) de première génération [77].....	22
Figure 8 : Dendrimères-cyclodextrine de première génération, reproduite selon [80].	23
Figure 9 : Préparation de PdDENS stabilisés par des glycodendrimères, reproduite selon [82] par autorisation de l'auteur.....	24
Figure 10 : Structure des nanoparticules stabilisées par le dendrimère greffé en surface d'un nanocomposite d'oxyde de graphène magnétique de deuxième génération GOF@Dm2@PdNi, reproduite selon [87], par autorisation d'Elsevier.	25
Figure 11 : Structure de dendrimère PAMAM G3 NH ₃ ⁺ NTf ₂ ⁻ , reproduite selon [95] par autorisation de l'auteur.....	27
Figure 12 : Coupe transversale de la peau qui représente les différentes couches, reproduite selon [138], par autorisation de l'auteur	35
Figure 13 : (a) Une image de surface de la peau, (b) micrographie électronique des membranes lamellaires empilées et structurées dans un espace intercellulaire reproduite selon [144], par autorisation d'Elsevier et (c) un modèle structural du SC	36
Figure 14 : Modèle de briques et mortier du SC [140].....	36
Figure 15 : Lipides représentatifs de principales classes de lipides constituant le SC.	37
Figure 16 : Différentes voies de diffusion à travers la peau, reproduite selon [152] par autorisation de l'auteur.....	38

Figure 17 : Représentation schématique des modèles de membranes (A) monocouche lipidique, (B) bicouche lipidique supportée, (C) liposome, reproduite selon [159] par autorisation de l'auteur	39
Figure 18 : Structures des quatre générations de dendrimères GD-PPI.....	49
Figure 19 : Structures des quatre générations de dendrimères GD-PAMAM	51
Figure 20 : Produits de dégradation de l'acide thioglycolique	61
Figure 21 : Effet cytotoxique de (a) GCD-G1, G2 et G3), (b) GAD-G1, G2 et G3 sur des fibroblastes dermiques humains en utilisant la méthode de réduction WST1 ..	63
Figure 22. The inhibition of DPPH (300 μ M) by caffeic acid-derived PAMAM dendrimers.	96
Figure 23. The inhibition of DPPH (300 μ M) by ionic antioxidant dendrimers. ...	97
Figure 24. The inhibition of DPPH (300 μ M) by PAMAM-3-PhA (5 mM).	97
Figure 25. Cytotoxic effects of the phenolic acids (a) derived from PAMAM and (b) derived from PPI dendrimers on human dermal fibroblast cells, evaluated by a WST-1 assay (***: $p < 0.0001$).....	98
Figure 26. Cytotoxic effects of (b) PAMAM-3-CA, (c) PAMAM-3-FA, (d) PAMAM-3 PhA, (e) PPI-3-FA and (f) PPI -3-PhA at 100 μ mol/L on a human dermal fibroblast cell, compared with (a) a blank living cell. Cells were imaged using an EVOS XL Core inverted microscope ($\times 10$ magnification).	99
Figure 27 : [100] : Synthèse de dendron poly(ester-amide) par une réaction d'amidation suivi d'une estérification à partir de bis-MPA et de glycine: Réactifs et conditions : (a) 2,2-diméthoxypropane, acétone, 85% ; (b) BnOH, DCC, DPTS, DCM, 87% ; (c) TFA, DCM ; (d) Méthode A : TEA, DCC, DPTS, DCM, 79% ; Méthode B : TEA, EDC, DMAP, DCM, 99% ; (e) Dowex, CH ₃ CN, 99% ; (f) H ₂ , Pd/C, EtOAc, 99% ; (g) Méthode A : DCC, DPTS, DCM, 90% ; Méthode B : EDC, DMAP, DCM, 79% ; (h) H ₂ , Pd/C, EtOAc, 99%.....	119
Figure 28. Cytotoxicity of (a) GD-PAMAM-3, (b) GD-PPI- G3 and G4, towards human dermal fibroblasts using WST1 reduction method	140
Figure 29. (a) Kinetics of GD-PAMAM-3 (0.2 μ M in the subphase at pH 7.4) adsorption to a bare interface or to a SC mimicking lipid monolayer (C24Cer2/Chol/C24FA 1:1:1 molar ratio). The time zero indicates the time of GD-PAMAM injection underneath the bare interface or the lipid monolayer at different initial surface pressures (Π_i); (b) Evolution of the equilibrium surface pressure further to the adsorption of GD-PAMAM-3 at a bare interface as a function of GD-PAMAM-3 concentration in the subphase at pH 7.4.....	142

Figure 30. Surface pressure variation following adsorption of GD-PAMAM-3 (0.2 μM) and VitC@GD-PAMAM-3 (11.33 μM) versus initial surface pressure (Π_i) of the lipid monolayer (C24Cer2/Chol/C24FA 1:1:1 molar ratio) at 22 °C; (a) at pH 7.4, (b) at pH 6.0 (c) at pH 5.0.143

Figure 31. Release of HTPS and DPX from SC biomimetic liposomes, upon addition of GD-PAMAM-3 (a) or VitC@GD-PAMAM-3 complex (56:1 molar ratio) (b) at different GD-PAMAM-3:liposome molar ratios and 2 incubation periods. T_0 corresponds to the time when the dendrimers are added to the liposomes. The leakage corresponds to the amount of HPTS-DPX released in the presence of the dendrimers expressed as a percentage of the total amount released by Triton X-100 and taking into consideration the re-encapsulation phenomenon (see Section 3.10).146

Figure 32. Change in Laurdan-generalized polarization (ΔGP) in SC biomimetic liposomes following addition of GD-PAMAM-3 or VitC@GD-PAMAM-3 (56:1 VitC:dendrimers molar ratio) at a 1:2500 GD-PAMAM-3:liposome molar ratio. T_0 corresponds to the time when the GD-PAMAM is added to the liposomes.147

Figure 33 : Cinétique de l'adsorption du GD-PPI-4 (a) et du PAMAM-3-FA (b) (0,2 μM dans la sous-phase à pH 5) à une interface dépourvue de lipides ou recouverte de monocouche lipidique imitant le SC (C24Cer2/Chol/C24FA 1:1:1). Le temps zéro correspond au temps d'injection du dendrimère sous une interface dépourvue de lipides ou recouverte de monocouche lipidique à différentes pressions de surface initiales Π_i 159

Figure 34 : Variation de la pression de surface $\Delta\Pi$ après injection du GD-PAMAM-3, GD-PPI-4 et PAMAM-3-FA à 0,2 μM en fonction de la pression de surface initiale Π_i de la monocouche lipidique (C24Cer2/Chol/C24FA 1:1:1) à 22 °C à pH 5. ...160

Figure 35 : Libération de HTPS et DPX des liposomes biomimétiques du SC, après l'ajout de GD-PPI-4 (a) ou du PAMAM-3-FA (b) à différents rapports molaires dendrimère:liposome et 2 périodes d'incubation. T_0 correspond au moment où les dendrimères sont ajoutés aux liposomes. Le leakage correspond à la quantité de HPTS-DPX libérée en présence des dendrimères, exprimée en pourcentage de la quantité totale libérée par le Triton X-100 et en prenant en considération le phénomène de la réencapsulation.161

Figure 36 : Variation de la polarisation généralisée (ΔGP) du laurdan dans la bicouche biomimétique de SC après l'ajout de GD-PAMAM-3, GD-PPI-4 ou PAMAM-3-FA à un ratio molaire dendrimère : liposomes 1 : 2500 au cours du temps162

Annexes

Figure S1. ^1H NMR of PPI-1-PhA in CD_3OD	213
Figure S2. ^{13}C NMR of PPI-1-PhA in CD_3OD	214
Figure S3. COSY NMR of PPI-1-PhA in CD_3OD	214
Figure S4. HSQC NMR of PPI-1-PhA in CD_3OD	215
Figure S5. HMBC NMR of PPI-1-PhA in CD_3OD	215
Figure S6. ^1H NMR of PPI-2-PhA in CD_3OD	216
Figure S7. ^{13}C NMR of PPI-2-PhA in CD_3OD	216
Figure S8. ^1H NMR of PPI-3-PhA in CD_3OD	217
Figure S 9. ^1H NMR of PPI-1-FA in CD_3OD	217
Figure S10. ^{13}C NMR of PPI-1-FA in CD_3OD	218
Figure S11. COSY NMR of PPI-1-FA in CD_3O	218
Figure S12. HSQC NMR of PPI-1-FA in CD_3OD	219
Figure S13. HMBC NMR of PPI-1-FA in CD_3OD	219
Figure S14. ^1H NMR of PPI-2-FA in CD_3OD	220
Figure S 15. ^{13}C NMR of PPI-2-FA in CD_3OD	220
Figure S16. ^1H NMR of PPI-3-FA in CD_3OD	221
Figure S17. ^{13}C NMR of PPI-3-FA in CD_3OD	221
Figure S18. IR of PPI-3-FA.....	222
Figure S19. ^1H NMR of PPI-1-CA in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$	222
Figure S20. ^{13}C NMR of PPI-1-CA in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$	223
Figure S21. ^1H NMR of PPI-2-CA in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$	223
Figure S22. ^{13}C NMR of PPI-2-CA in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$	224
Figure S23. ^1H NMR of PPI-3-CA in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (weak solubility)	224
Figure S24. ^{13}C NMR de PPI-3-CA in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (weak solubility)	225
Figure S25. IR of PPI-3-CA	225
Figure S26. IR of Caffeic acid.....	226
Figure S27. ^1H NMR of PAMAM-1-PhA in CD_3OD	226
Figure S28. ^{13}C NMR of PAMAM-1-PhA in CD_3OD	227
Figure S29. COSY NMR of PAMAM-1-PhA in CD_3OD	227
Figure S30. IR of PAMAM-1-PhA	228
Figure S31. IR of Phloretic acid	228
Figure S32. ^1H NMR of PAMAM-2-PhA in CD_3OD	229
Figure S33. IR of PAMAM-2-PhA	229
Figure S34. ^1H NMR of PAMAM-3-PhA in CD_3OD	230

Figure S35. ¹³ C NMR of PAMAM-3-PhA in CD ₃ OD	230
Figure S36. HMBC NMR of PAMAM-3-PhA in CD ₃ OD.....	231
Figure S37. ¹ H NMR of PAMAM-1-FA in CD ₃ OD	231
Figure S38. ¹³ C NMR of PAMAM-1-FA in CD ₃ OD	232
Figure S39. ¹ H NMR of PAMAM-2-FA in CD ₃ OD	232
Figure S40. IR of PAMAM-2-FA	233
Figure S41. ¹ H NMR of PAMAM-1-CA in (CD ₃) ₂ SO.....	233
Figure S42. ¹³ C NMR of PAMAM-1-CA in (CD ₃) ₂ SO.....	234
Figure S43. IR of PAMAM-1-CA.....	234
Figure S44. ¹ H NMR of PAMAM-2-CA in (CD ₃) ₂ SO.....	235
Figure S45. IR of PAMAM-2-CA.....	235
Figure S46. ¹ H NMR of PAMAM-3-CA in (CD ₃) ₂ SO	236
Figure S47. IR of PAMAM-3-CA.....	236
Figure S 48. Inhibition of DPPH (300 μmol or 118.3 mg/L) by caffeic acid derived- PAMAM dendrimers.....	237
Figure S49. Inhibition of DPPH (300 μmol or 118.3 mg/L) by ionic antioxidant dendrimers.....	237
Figure S50. ¹ H NMR of GD-PAMAM-3 (green), Vitamin C (blue) and Vit C@GD- PAMAM-3 (red)in D ₂ O.....	239
Figure S51. ¹ H NMR of Vit C@GD-PPI-4 in D ₂ O	239
Figure S52. Vit C@GD-PPI-4 NOESY NMR shows NOE interactions between the protons of vitamin C (3.73, 4.03 and 4.64 ppm) with those of the GD-PPI-4 (1.92, 2.14 and 3.22 ppm) in D ₂ O.....	240
Figure S53. T1 measurements of free Vitamin C.....	240
Figure S54. T1 measurements of Vitamin C with GD-PAMAM3.....	241
Figure S55. T1 measurements of Vitamin C with GD-PPI4.	241
Figure S56. T2 measurements of free Vitamin C.....	242
Figure S57. T2 measurements of Vitamin C with GD-PAMAM3.....	242
Figure S58. T2 measurements of Vitamin C with GD-PPI4.	243
Figure S59. Cryo-TEM images of liposomes at 1.2 mM: (a) and (b) in absence of GD-PAMAM-3 showing few and isolated Large unilamellar vesicles (LUVs), (c) and (d) in presence of GD-PAMAM-3 at 0.48 μM showing some liposome aggregation.....	243

LISTE DES SCHEMAS

Liste des schémas

Schéma 1 : Synthèse de GlycéroDendrimère-Poly(PropylenImine) de génération 1 (GD-PPI-1)	48
Schéma 2 : Synthèse de GlycéroDendrimère-Poly(AMidoAMine) de génération 1 (GD-PAMAM-1)	50
Schéma 3 : Synthèse du glycéroclickdendrimère de génération 1 (I.6 = GCD-1) .	52
Schéma 4 : Synthèse des glycéroclickdendrimères de génération 2 et 3 (I.9 et I.12 = GCD-2 et GCD-3)	53
Schéma 5 : Synthèse du glycéroladendrimère de génération 1 (II. 2 = GAD-1)....	54
Schéma 6 : Synthèse des glycéroladendrimères de génération 2 et 3 (II.4 et II.6 = GAD-2 et GAD-3)	55
Schéma 7 : Procédé d'encapsulation d'actifs cosmétiques dans les dendrimères ..	59
Schéma 8 : Encapsulation de la caféine dans les dendrimères	59
Scheme 9 . The ionic functionalization of PPIs with phloretic, ferulic and caffeic acids.....	87
Scheme 10. Ionic functionalization of PAMAMs with phloretic, ferulic and caffeic acids.....	90
Scheme 11. The setup used for the flow synthesis of antioxidant ionic dendrimers, based on various PPI and PAMAM.....	93
Schéma 12 : Principe de la méthode de DPPH.....	118
Schéma 13 : Synthèse de PhAA-PPI-1	122
Schéma 14 : Synthèse de AF-PPI-1 par une réaction d'amidation.....	123
Scheme 15. Encapsulation of vitamin C in GD-PPIs or GD-PAMAMs	138
Scheme 16. Synthesis of (a) GD-PAMAM1 and (b) GD-PPI-1. All schemes were obtained using ChemDraw Professional 16.0.	148

LISTE DES TABLEAUX

Liste des tableaux

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des deux approches convergente et divergente	14
Tableau 2 : Effets cytotoxiques de divers dendrimères sur différents types cellulaires	32
Tableau 3 : Rendements de synthèses des GD-PPIs en présence de 2,5 éq. de carbonate de glycérol par fonction NH ₂ et 2,5 éq. de triéthylamine par fonction NH ₂ , à reflux dans le méthanol, pendant 20h	48
Tableau 4 : Rendements de synthèses des GD-PAMAMs en présence de 2,5 éq. de carbonate de glycérol par fonction NH ₂ et 2,5 éq. de triéthylamine par fonction NH ₂ , à reflux, dans le méthanol, pendant 20h	50
Tableau 5 : Résultats d'encapsulation de la caféine	60
Tableau 6 : Les détails techniques des encapsulations	76
Table 7 . Ionic PPI-derived dendrimers.....	89
Table 8 . Ionic PAMAM-derived dendrimers.	91
Table 9. Synthesis of ionic dendrimers in MW and flow reactors	93
Table 10. Antioxidant activity of ionic dendrimers, determined as IC50.	95
Tableau 11 : Quelques méthodes d'évaluation du pouvoir antioxydant	115
Tableau 12 : Conditions de réaction de PPI de générations 1,2 et 3 avec l'acide 3(4-hydroxyphényl) propionique. La ligne rouge correspond aux conditions de réaction pour lesquelles le greffage est complet	121
Tableau 13 : Résultats de couplage des PPI générations 1,2 et 3 avec l'acide phlorétique sous micro-ondes. La ligne rouge correspond aux conditions de réaction pour lesquelles le greffage est complet	122
Table 14. Encapsulation of vitamin C in glycerol-based dendrimers. Vitamin C (mg) corresponds to the initially added weight of vitamin C, Dendrimers corresponds to initial weight of different generations of dendrimers, Function numbers or 'N' nbr corresponds to the number of nitrogen atoms present in the structure (amine and/or amide functions), Encapsulated VitC (mg) corresponds to the weight of the encapsulate vitamin C and Encapsulated VitC (equiv) corresponds to the equivalents number of the vitamin C encapsulated in 1 equivalent of dendrimer.....	139
Table 15. Values of MIP and dΠ ₀ of GD-PAMAM-3 and VitC-GD-PAMAM-3 at different pH values determined graphically from Figure 3. dΠ ₀ (mN/m): the differential surface pressure variation, corresponding to the difference between the maximum surface pressure variation and the surface pressure value at lipid-free	

interface for the same concentration, MIP (mN/m): the maximum insertion pressure (for $\Delta\Pi = 0$ mN/m).....	144
Table 16. GD-PAMAMs and GD-PPIs synthesis using 2.5 equivalents of Glycerol Carbonate (CG) per NH_2 function, 2.5 equivalents of triethylamine per NH_2 function in refluxing Methanol for 20h. Terminal OH moieties correspond to the hydroxyl functions present in periphery.	149
Tableau 17 : Les valeurs de MIP et de $d\Pi_0$ du GD-PPI-4, PAMAM-3-FA et du GD-PAMAM-3 déterminées graphiquement à partir de la Figure 6. $d\Pi_0$ (mN/m): variation de pression de surface différentielle, qui correspond à la différence entre la variation de pression de surface maximale et la valeur de pression de surface à une interface dépourvue de lipides à la même concentration, MIP (mN/m): la pression d'insertion maximale (pour $\Delta\Pi = 0$ mN/m).....	159

Annexe 1

Table S1. IC_{50} (mg/L).....	238
--	-----

LISTE DES ABREVIATIONS

Liste des abréviations

AcOEt : Acétate d'éthyle	$\Delta\Pi$: Variation de la pression de surface à l'équilibre
AFM : Microscopie à force atomique	$d\Pi_0$: La variation différentielle de la pression de surface
AscNa : Ascorbate de sodium	$\Delta\Pi_0$: Variation de la pression de surface maximale
ATP : Adénosine 5'-Triphosphate	DPPH : Diphénylpicrylhydrazyle
BC : β -carotène	DPTS : Diméthylamino pyridinium toluenesulfonate
bis-MPA : Acide bis-hydroxyméthyl propanoïque	DPX : Bromure de p-xylène-bis-pyrimidium
BnOH : Alcool benzylique	EDA : Ethylènediamine
C24FA : Acide Lignocérique	EDC : Ethyl-(diméthylaminopropyl) carbodiimide
CA : Acide caféique	EG : Essence G
CD : Cyclodextrine	EGCG : Epigallocatechine-3- gallate
CG : Carbonate de glycérol	Eq. : équivalents
DCM : Dichlorométhane	Et ₂ O : Diéthylether
Chol : Cholest-5-en-3-ol	TEA: Triéthylamine
CNTs : Nanotubes de carbone	EtOH : Ethanol
CoQ10 : Coenzyme Q10	FA : Acide férulique
CPEGC : Dendrimère acide citrique-poly(éthylène glycol)-acide citrique	FAA-PPI : Férulique Amide
CSi-PEO : Dendrimères carbosilane-poly(oxyde d'éthylène)	Dendrimère Poly(PropylèneImine)
Da ou kDa : Daltons ou KiloDaltons	FBS : Sérum de veau fœtal
DAB : Diaminobutane	FITC : Isothiocyanate de fluorescéine
DCC : Dicyclohexylcarbodiimide	FTIR : La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
dCer : Dihydrocéramides	GAD : GlycerolADendrimère
DFMO : Difluorométhylornithine	GCD : GlyceroClickDendrimère
DGP : Variation de la polarisation généralisée	GdBOPTA : Gadolinium gadopentétate de diméglumine
DHA : Dihydroxyacétone	GD-PAMAM : GlycéroDendrimère Poly(AMidoAmine)
DL50 : Dose létale capable de tuer 50% de cellule	
DMAP : Diméthylaminopyridine	
DMF : Diméthylformamide	

GD-PPI: GlycéroDendrimère
 Poly(PropylèneImine)
 GP : polarisation généralisée
 GUV : Giant Unilamellar Vesicles
 HAD : Dendrimère amphiphile
 Hal-PAMAM : Poly(AMidoAmine)-halloysite
 HEPES : Tampon acide hydroxyéthyl-pipérazine -éthane sulfonique
 HPTS : Acide 8-hydroxypyrrène-1,3,6-trisulfonique
 HUVEC : Cellules endothéliales de veines ombilicales humaines
 IC₅₀ : Concentration d'inhibition à 50 %
 IR : Infra-rouge
 IRM : Imagerie de résonance magnétique
 LUV : Large Unilamellar Vesicles
 MeOH : Méthanol
 MeSCl : chlorure de méthanesulfonyle
 MIP : Pression d'insertion maximale
 MLV : Vésicules Multilamellaires
 MO : Huile minérale (mineral oil)
 MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
 MW : Micro-ondes (Micro-waves)
 NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
 NP : Nanoparticule
 OG : Oxyde de graphène
 OSA-SMDG : sugary maize dendrimer-like glucan octenyl succinate
 PAMAM : Dendrimère Poly(AMidoAmine)
 PAMAM-CA : Caféate de Poly(AMidoAmmonium)
 PAMAM-FA : Férulate de Poly(AMidoAmmonium)
 PAMAM-PhA : Phlorétate de Poly(AMidoAmmonium)
 PBS : Phosphate Buffer Saline (tampon phosphate salé)
 PdDSN : Nanoparticules de palladium stabilisées par des glycodendrimères
 PdDENs : Palladium- Dendrimères
 PEG : poly (éthylène glycol)
 PhA : Acide phlorétique
 Π_i: Pression de surface initiale
 POPAM : Dendrimère Poly(Propylène Amine)
 PPI : Dendrimère Poly(PropylèneImine)
 PPI-CA : Caféate de Poly(PropylèneIminium)
 PPI-FA : Férulate de Poly(PropylèneIminium)
 PPI-PhA : Phlorétate de Poly(PropylèneIminium)
 p-SCN-Bz-DOTA : 2-(4-isothiocyanatobenzyl)-1,4,7,10-tétraazacyclododécane-N,N8,N'',N'''-tétraacétate
 Rdt : Rendement

RMN : Résonance Magnétique
Nucléaire
SC : *Stratum corneum*
SMDG : Sugary maize dendrimer-like
glucan
SUV : Small Unilamellar Vesicles
T amb : Température ambiante
TBAB : Bromure de
Tétrabutylammonium
tBuOH : Tert-butanol
TFA : Acide trifluoroacétique
TGA : Acide thioglycolique
Vit C : Vitamine C
WST1 : Water Soluble Tetrazolium
C24Cer2 : N-Lignoceroyl-D
sphingosine
4-AP: 4- aminophenol
4-NP : 4-nitophénol
5-ASA : Acide 5-amino salicylique
5FU : 1-bromoacétyl-5-fluorouracil
5-HMF : 5-hydroxyméthylfurfural
8-MOP : 8-méthoxypsoralen

AVANT- PROPOS

Avant-propos

Cette thèse de doctorat s'inscrit dans le cadre du projet Interreg INTICOSM. Elle est réalisée en co-tutelle entre l'Université de Reims Champagne Ardenne (France) et l'Université de Liège (Belgique), au sein de l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR) et du Laboratoire de Biophysique Moléculaire aux Interfaces (LBMI) de Gembloux Agro-Bio Tech, respectivement.

Le projet INTICOSM (Programme Interreg V Fwv) a pour objectifs le développement transfrontalier de composés biosourcés et leur utilisation dans le domaine de la formulation de cosmétiques. Ces composés appelés cargos verts seront préférentiellement élaborés à partir de molécules biosourcées issues prioritairement de bioraffineries de la région franco-belge (notamment la bioraffinerie de Pomacle-Bazancourt près de Reims, la plus grande d'Europe et BioWanze en Wallonie, le plus gros producteur de bio-éthanol en Belgique) en respectant au maximum des principes de la chimie verte, notamment en diminuant l'utilisation de solvants et le nombre d'étapes de synthèse.

Au sein de ce projet, ma thèse de doctorat comportait deux volets ; un plus appliqué basé sur la synthèse de dendrimères biosourcés pour délivrer des principes actifs cosmétiques au niveau de la peau, et l'autre plus fondamental, focalisé sur la compréhension de leur mécanisme d'action sur la peau.

Une partie des travaux de recherche a été réalisée à l'ICMR au sein de l'équipe « Chimie de Coordination » dans le groupe « Systèmes biosourcés appliqués à l'environnement » sous la direction du Pr Sandrine Bouquillon. Ce groupe travaille depuis plusieurs années sur la valorisation des agro-ressources de la région Champagne-Ardenne selon trois thématiques : les tensioactifs verts, les liquides ioniques biosourcés et les Agro-Dendrimères. Plusieurs familles de dendrimères à base de glycérol (glycérodendrimères) ont été développées avec, comme source première, du glycérol ou ses dérivés. Ce glycérol est un sous-produit issu d'huiles végétales, notamment le colza qui est un des végétaux les plus cultivés dans la région. La capacité d'encapsulation de ces glycérodendrimères a été étudiée pour diverses

applications : en catalyse [1,2], imagerie[3], encapsulation de métaux et polluants organiques [4] et récemment la stabilisation des huiles essentielles [5,6]. Pour les travaux décrits dans ce manuscrit, nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement à la synthèse de dendrimères biosourcés et à leur capacité à encapsuler des principes actifs pour des applications en cosmétique. Pour certains dendrimères, l'optimisation des synthèses dans les réacteurs microfluidiques ont été réalisés en collaboration avec le Dr Julien Estager au sein du Centre de Ressources Technologiques en Chimie (CERTECH) (Belgique).

En outre, des tests de cytotoxicité ont été réalisés en collaboration avec le Pr Jean-Claude Monboisse au sein de l'unité Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire (MEDYC) à l'Université de Reims. Après son départ en retraite, le Dr Sylvie Brassart-Pasco a repris le relais.

L'autre partie de travaux a été réalisée à l'Université de Liège au sein du LBMI sous la direction de Dr Magali Deleu. Les activités de recherche de ce laboratoire sont principalement focalisées sur l'étude de l'interaction de biomolécules (de protéines aux petites molécules organiques) avec des modèles de membranes cellulaires par des outils complémentaires de biophysique, afin de comprendre leurs relations structure/activité et leur mécanisme d'action. L'application ciblée de nos dendrimères étant la cosmétique, nous nous sommes donc intéressés plus particulièrement à l'étude de l'interaction des dendrimères (avec ou sans la molécule active) avec des modèles biomimétiques de SC, la couche la plus externe de la peau.

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Les produits cosmétiques à base d'agro-ressources sont de plus en plus consommés au quotidien. Depuis plusieurs années, les chercheurs s'intéressent à la valorisation des agro-ressources pour de nouvelles innovations dans différents domaines et notamment celui de la vectorisation de principes actifs.

Dans ce contexte, les macromolécules symétriques et branchées appelés dendrimères, semblent être une des solutions de vectorisation les plus attrayantes [7,8]. Les dendrimères sont une classe de molécules hyper branchées, de taille nanométrique, radialement symétriques avec une structure bien définie, homogène et monodisperse composée de branches formant des cavités ressemblant à des arbres [9–11]. Ces matériaux possèdent de nombreuses propriétés telles qu'une polyvalence, une capacité à s'auto-assembler et à impliquer des interactions électrostatiques, une stabilité chimique dans les milieux biologiques, une faible cytotoxicité et une solubilité accrue en milieu aqueux [12]. Ces propriétés spécifiques ont un grand impact sur leurs applications [13,14] et notamment sur leur capacité à encapsuler les principes actifs notamment dans les domaines thérapeutique et cosmétique [12].

L'encapsulation est une technologie qui consiste à piéger ou à protéger des agents actifs instables dans une gaine protectrice, qui va les isoler des autres éléments de la composition et les protéger de tous les risques d'oxydation ou de détérioration liés à l'air ou la lumière par exemple. L'encapsulation en cosmétique permet au principe actif d'être libéré au moment de l'application sur la peau, et garantit donc un principe actif absolument inaltéré et de première qualité [15].

Ces dernières années, l'encapsulation des actifs cosmétiques dans les dendrimères a suscité l'intérêt des chercheurs. Les dendrimères peuvent remplacer les polymères classiques à haut poids moléculaire dans des compositions cosmétiques [16]. Ils présentent une bonne capacité à encapsuler les actifs cosmétiques sensibles et à les protéger pour garantir une bonne libération et une meilleure efficacité [17–20]. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre recherche qui a pour objectif de synthétiser des dendrimères biosourcés pour encapsuler des agents actifs cosmétiques et contrôler leur libération et leur interaction avec le SC.

Le *stratum* SC est la couche la plus externe de l'épiderme des mammifères et agit comme une barrière qui dicte le taux d'absorption par la peau des molécules exogènes et empêche la perte d'eau du corps [21]. Le SC est principalement composé de cellules mortes aplaties et entièrement kératinisées (cornéocytes), noyées dans une matrice lipidique [22] composée essentiellement de céramides, de cholestérol et d'acides gras libres à longue chaîne [23].

Le chapitre I de ce manuscrit de thèse est consacré à un état de l'art sur les dendrimères, leur synthèse, leurs applications et leur interaction avec le SC. Il est suivi par deux parties consacrées aux travaux de recherche. L'une, plus appliquée visant à évaluer le potentiel de dendrimères biosourcés comme supports d'actifs cosmétiques (réalisée à l'ICMR), est décrite dans les chapitres II et III et l'autre plus fondamentale, focalisée sur la compréhension de leur mécanisme d'action sur la peau est exposée dans le chapitre IV.

Le chapitre II consiste en la synthèse de dendrimères à base de glycérol ou par fonctionnalisation des dendrimères commerciaux PPI et PAMAM avec du carbonate de glycérol. Leur capacité à encapsuler différents actifs cosmétiques telles que la caféine, la DHA et la vitamine C a été étudiée ainsi que leur cytotoxicité sur des fibroblastes humains.

Le chapitre III décrit la synthèse de nouveaux dendrimères possédant des fonctions antioxydantes à partir d'acides phénoliques (acides caféique, férulique et phlorétique) ainsi que l'évaluation de leur activité antioxydante et leur cytotoxicité.

Ensuite, le chapitre IV présente l'étude des interactions des dendrimères synthétisés encapsulant ou non les principes actifs avec des modèles de membranes biomimétiques de peau afin de définir des relations structure-activités et les paramètres influençant ces interactions.

Pour terminer, le chapitre V résume les principales conclusions de l'ensemble des résultats ainsi que les perspectives en termes de recherche et d'applications.

Chapitre I

**Dendrimères : Synthèse, applications et
interaction avec le SC**

Chapitre I : Dendrimères : Synthèse, applications et interaction avec le

I.1. Contexte et objectifs

Les dendrimères sont de plus en plus étudiés dans le contexte de l'encapsulation. De nombreuses applications potentielles des dendrimères sont basées sur leurs propriétés telles que leur polyvalence, leur surface multifonctionnelle et la présence de cavités internes. Ils sont notamment utilisés dans les systèmes d'administration de médicaments, les cosmétiques, l'alimentation et la chimie.

Ce chapitre est consacré à une introduction bibliographique sur les dendrimères. Les différentes approches de synthèse, la capacité des dendrimères à encapsuler des molécules actives, leurs applications dans différents domaines ainsi que leur cytotoxicité sont décrites. Pour terminer ce chapitre, les principaux travaux sur l'interaction des dendrimères avec le SC sont également exposés.

I.2. Introduction Bibliographique

1. Généralités sur les dendrimères : Définition et synthèse

1.1. Définition

La source du terme dendrimère vient de sa dénomination grecque « dendros » qui signifie arbre ou branche et « meros » qui signifie « une partie de » [24]. D'un point de vue chimique, les dendrimères sont des molécules de taille nanométrique, radialement symétrique avec une structure bien définie, homogène et monodisperse composée de bras ou de branches ressemblant à des arbres [9–11]. Ces molécules hyper ramifiées ont été découvertes pour la première fois par Vogtle *et al.* en 1978 [25] sous le nom molécules en cascade. Ces macromolécules branchées sont ensuite développées sous le nom starburst-dendritique ou dendrimères par Tomalia *et al.* [26] en 1985 et à la même époque, par Newkome *et al.* [11]. Ce dernier a appelé les macromolécules synthétisées "arborols" ce qui signifie en latin, "arbres" ou molécule en cascade, mais ce terme n'est pas aussi bien connu que celui de "dendrimères" [13].

Les dendrimères sont composés de trois parties. De l'intérieur vers l'extérieur, la structure d'un dendrimère est composée d'un cœur sur lequel est greffé une multitude de branches, des cavités internes et des groupements terminaux en périphérie (**Figure 1**). Les parties identiques branchées au niveau du cœur, sont appelées « dendrons » (**Figure 1**). Leur nombre dépend de la multivalence du cœur utilisé comme noyau [12].

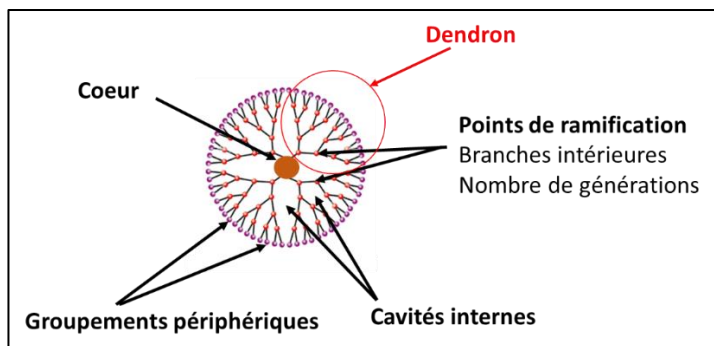


Figure 1 : Structure générale d'un dendrimère

1.2. Synthèse

Les dendrimères sont synthétisés par une réaction chimique répétitive dans laquelle la formation des dendrimères se déroule d'une manière progressive conduisant à une couche appelée génération [27]. Ils sont principalement préparés par deux types d'approches (**Tableau 1**) : l'approche divergente ou l'approche convergente ou une combinaison des deux [13].

Dans les méthodes divergentes, le dendrimère se construit à partir d'une molécule centrale (cœur) multifonctionnelle vers la périphérie (**Figure 2**). Le cœur réagit avec des molécules monomères contenant un groupe réactif et deux groupes non réactifs, ce qui donne le dendrimère de première génération. Ensuite, la nouvelle périphérie de la molécule est activée pour réagir avec d'autres monomères. Le processus est répété pour former d'autres générations supérieures [13]. L'approche divergente est efficace pour la production de grandes quantités de dendrimères. Cependant des problèmes se produisent à cause de réactions secondaires et de réactions incomplètes des groupement périphériques qui conduisent à des défauts de structure. Pour résoudre ces problèmes, il faut un grand excès de réactifs ce qui entraîne par la suite malheureusement certaines difficultés dans la purification du produit final [26].

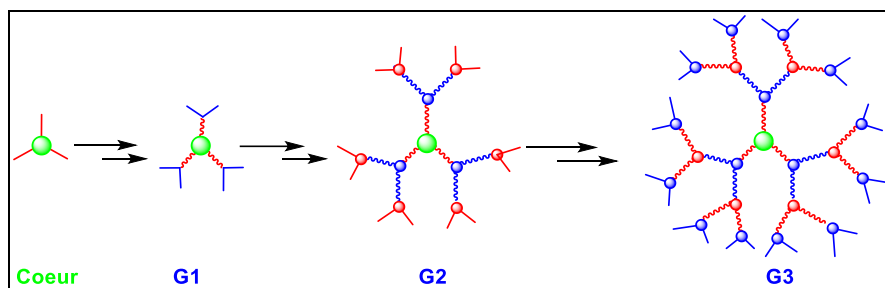


Figure 2 : Synthèse de dendrimère par l'approche divergente

Les méthodes convergentes ont été développées dans le but de limiter les problèmes de purification rencontrés dans les méthodes divergentes. Dans cette approche, le dendrimère est construit en plusieurs étapes, en partant des groupements périphériques et en progressant vers l'intérieur jusqu'au noyau, à l'inverse de la méthode divergente (**Figure 3**). Lorsque les bras polymériques ramifiés, ou dendrons, souhaités sont formés, ils sont attachés à une molécule centrale multifonctionnelle [28]. Le concept d'utilisation d'une approche convergente pour la synthèse de macromolécules dendritiques présente un certain nombre d'avantages : le petit nombre de réactions de couplage pour chaque étape de croissance permet un meilleur contrôle de la synthèse, l'apparition de défauts dans la structure finale est réduite au minimum et les excès importants de réactifs sont évités, ce qui simplifie la purification. Cependant, cette approche ne permet pas la formation de générations élevées car des problèmes stériques surviennent dans les réactions entre les dendrons et la molécule centrale [8,28].

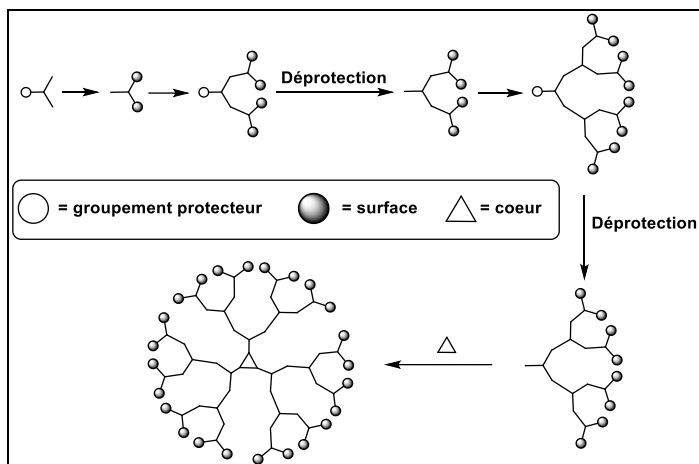


Figure 3 : Synthèse d'un dendrimère par l'approche convergente, reproduite selon [29] par autorisation de l'auteur

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des deux approches convergente et divergente

Approches	Principes	Avantages	Inconvénients	Références
Divergente	Le dendrimère se construit à partir d'une molécule centrale (cœur) multifonctionnelle vers la périphérie	Production de grandes quantités de dendrimères Production de génération plus élevées	Réactions secondaires et réactions incomplètes des groupements périphériques Utilisation d'un grand excès de réactifs Difficultés de purification du produit final	[13]
Convergente	Consiste à construire séparément les dendrons et à les rattacher lors d'une étape finale à un cœur multifonctionnel	Un meilleur contrôle de la synthèse Les excès importants de réactifs sont évités Limitation des problèmes de purification	Cette approche ne permet pas la formation de générations élevées Des problèmes stériques surviennent dans les réactions entre les dendrons et la molécule centrale	[8,28]

Les deux principaux dendrimères disponibles dans le commerce sont le Poly(PropylèneImine) PPI [30,31] et le Poly(AMidoAMine) PAMAM.

Le PAMAM a été synthétisé pour la première fois par Tomalia *et al.* en utilisant une approche divergente [26]. La synthèse se fait en deux étapes, une addition de type Michael entre l'éthylènediamine (EDA) ou l'ammoniac et l'acrylate de méthyle, suivie d'une amidation des esters résultants avec un excès d'éthylènediamine. Sept générations ont ainsi été synthétisées. Quelques propriétés telles que la symétrie et la capacité de s'auto-assembler de ces dendrimères ont été ensuite étudiées [32].

La synthèse d'autres dendrimères de type PAMAM comportant un cœur cyclique a aussi été réalisée par une approche divergente par la même séquence réactionnelle à partir du 4,7,10-tétraazacyclododécane, d'acrylate de méthyle et d'éthylènediamine [33]. Onze générations (de G 0,5 à G 5,5) ont été synthétisées et caractérisées. La surface des générations 4 et 5 de ces dendrimères a été ensuite modifiée avec le 1-bromoacétyl-5-fluorouracil (5FU) pour former le dendrimère-5FU, ce dernier est ensuite hydrolysé pour contrôler la libération de 5FU. Il a été montré que ce type de dendrimère peut être utilisé comme un support prometteur pour la libération contrôlée de principes actifs antitumoraux [33].

La synthèse des dérivés de PAMAM par une combinaison des approches convergente et divergente a été développée par Lee *et al.* : le dendron PAMAM fonctionnalisé par un azide est obtenu par la méthode divergente en utilisant l'azidopropylamine comme point focal. Ensuite, par la méthode convergente, les dendrons formés sont liés à des cœurs possédant des alcynes par une réaction click [34].

Le Poly(PropylèneImine) dendrimère nommé aussi 'POPAM' [35] a été développé par de Brabander-van den Berg *et al.* en 1993 par une approche divergente [30]. Il est obtenu par répétition d'une double addition de Michael d'acrylonitrile avec des amines primaires, suivie de l'hydrogénation des nitriles par catalyse hétérogène. Le 1,4-diaminobutane DAB et l'éthylènediamine EDA ont été utilisés comme cœur de dendrimère. Cette méthode de synthèse est largement décrite dans la littérature et très souvent utilisée [36,37].

Plusieurs modifications de surface de PPI et PAMAM ont été proposées. Dans la plupart des cas, les groupements amine de surface des PPIs et PAMAMs, sont

remplacés par des entités plus neutres afin d'augmenter leur solubilité et/ou réduire leur cytotoxicité ou par des entités bioactives pour des applications spécifiques [38].

Dans de nombreux cas, les amines terminales sont aussi fonctionnalisées par du PEG Poly (Ethylène Glycol) [39–43]. Ce type de dendrimère est largement utilisé dans le domaine thérapeutique.

Il a également été montré la possibilité de décorer les dendrimères avec des sucres par glycosylation. Ces entités jouent un rôle important dans la reconnaissance moléculaire à courte distance, comme les interactions avec la matrice extracellulaire et les cellules voisines ou la communication avec l'ensemble du système, étant donné que la plupart des protéines hormonales sont glycosylées [14].

En 2015, Youngseon *et al.* ont développé des dendrimères par fonctionnalisation du PAMAM avec des entités bifonctionnelles, fluorescéine et acide curfolique reliés entre eux par des oligonucléotides d'ADN dans le but de cibler des cellules cancéreuses [44].

Ces dix dernières années, notre équipe de recherche a développé des nouvelles familles de dendrimères dérivés de PAMAM et PPI en décorant la surface par des groupements hydroxyles, par réaction des groupements amines terminales avec du carbonate du glycérol; de nombreuses applications ont été développées (encapsulation de complexes de Gadolinium pour l'imagerie médicale, encapsulation de nanoparticules métalliques pour la catalyse, encapsulation de polluants émergents pour la dépollution) [1–4].

Récemment, Luan *et al.* ont développé des dendrimères dérivés de PAMAM greffés sur de la silice mésoporeuse par fonctionnalisation avec de l'isothiocyanate dans le but d'améliorer l'adsorption de Hg(II) et Cd(II) essentiellement pour le traitement des eaux [45]. Ces composites dendrimères PAMAM/silice mésoporeuse décorés par l'isothiocyanate de méthyl ont été synthétisés par la réaction directe sol-gel de dendrimères PAMAM fonctionnels contenant des alcoxysilyles (**Figure 4**).

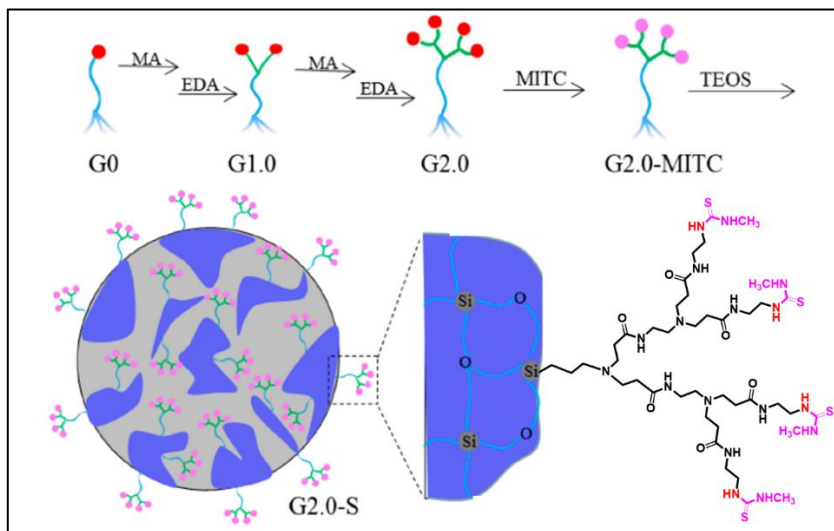


Figure 4 : Schéma de synthèse d'un dendrimère PAMAM greffé sur la silice mésoporeuse décoré par de l'isothiocyanate de méthyle, reproduite selon [45]

De nouvelles familles de dendrimères dérivés de PAMAM appelées tectodendrimères ont été développées ces dernières années [46–49]. Les tectodendrimères, appelés également megamers, sont des dendrimères super structurés dont les noyaux sont des dendrimères de haute génération et les coquilles des dendrimères de faible génération [47]. Ils ont d'excellentes propriétés similaires à celles des dendrimères simples de haute génération, mais ils permettent également de surmonter certains inconvénients tels que la capacité limitée d'encapsulation et l'effet de rétention accru en raison de leur petite taille [46]. En outre, la synthèse des tectodendrimères est beaucoup plus simple que la synthèse de dendrimères simples à haute génération. En effet, le nombre de réactions répétitives est limité, ainsi le problème d'encombrement stérique rencontré lors de la synthèse d'un dendrimère simple de très haute génération est évité [47].

Par ailleurs, plusieurs familles de dendrimères autres que celles dérivées de PAMAM ou de PPI ont été développées. En effet, au sein du laboratoire, nous avons développé deux familles de dendrimères à partir du glycérol comme base par une approche divergente. La première famille appelée GlycéroClickDendrimer est obtenue par réaction de click entre des alcynes et des azotures, dérivés du glycérol [50]. La deuxième famille GlycerolADendrimer est obtenue par réaction du glycérol

avec le bromure d'allyle suivi d'une oxydation d'oléfines [51]. La synthèse de ces familles sera détaillée dans la partie résultat de cette thèse.

En 2017, une nouvelle famille de dendrimère a aussi été développée par une approche divergente à partir de carbosilanes fonctionnalisés avec des polyphénols. Ils sont destinés à être utilisés comme antioxydants dans les industries cosmétiques et pharmaceutiques [52].

Dans le domaine biomédical, plusieurs approches ont été aussi réalisées avec des dendrimères : Nnadiékwe *et al.* ont synthétisé des dendrimères de type Twin et Janus à base de benzamide biologiquement actifs par une approche convergente à partir d'un précurseur primaire, le gallate de méthyle (**Figure 5**) ; ces dendrimères possèdent des groupes terminaux à longues chaînes octyloxy et hydroxyundécyloxy (des groupes fonctionnels identiques pour Twin et différents pour Janus) [53]. Cette fonctionnalisation permet d'augmenter le caractère amphiphile favorisant l'autoassemblage du dendrimère, qui permet par conséquent d'incorporer diverses architectures supramoléculaires telles que les structures colonnaires, globulaires et bicouches. Diverses familles de dendrimères peptidiques ont été également développées ces dernières années [54–56]: ces dendrimères sont des macromolécules ramifiées constituées de noyau peptidyl et/ou des groupements fonctionnels peptidiques en périphéries attachées d'une manière covalente[57]. Ils peuvent être symétriques ou asymétriques et utilisés comme réactifs de diagnostic, agents anticancéreux et antiviraux, vaccins et transporteurs de principes actifs et de gènes [54,58] grâce à leurs propriétés de s'auto-assembler [56].

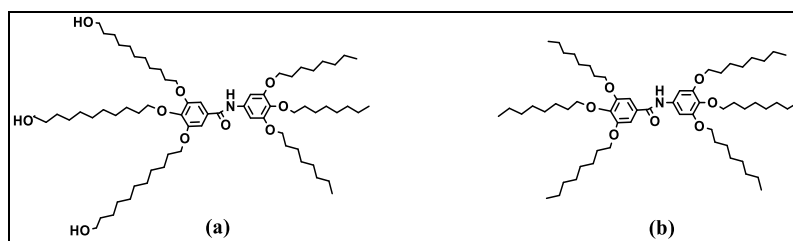


Figure 5 : Structures de 3,4,5-tris(11-hydroxyundécyloxy)-N-(3,4,5-tris(octyloxy)phényl) benzamide (Janus) (a) et 3,4,5-tris(octyloxy)-N-(3,4,5-tris(octyloxy)phényl) benzamide (Twin) (b) [53]

2. Applications des dendrimères

Certaines applications de dendrimères ont déjà été mentionnées ci-dessus ; elles découlent de leurs propriétés physico-chimiques, telles que la polyvalence de structures, la capacité d'autoassemblage, la stabilité et la capacité d'intervenir dans des interactions électrostatiques [13,59,60]. Ainsi, leur capacité à encapsuler des molécules de taille appropriée aux cavités internes ou la possibilité de greffer en leur périphérie des molécules de manière covalente permettent de les utiliser dans de multiples domaines [61]. En général, les dendrimères sont du domaine de la nanoparticule ; plusieurs paramètres peuvent affecter le rendement de nano-encapsulation, notamment la génération, le type de groupes terminaux, la charge de surface, la structure du noyau, le pH et les facteurs environnementaux [62]. La symétrie a également un rôle très important dans la détermination des propriétés d'encapsulation [63] puisque ce paramètre dirige les modes d'empilement interne, ce qui différencie les propriétés clés des dendrimères, telles que les densités, les indices de réfraction et les porosités intérieures. Ainsi, les dendrimères symétriques encapsulent plus que les dendrimères dissymétriques.

L'encapsulation consiste à piéger des agents actifs non stables dans une gaine protectrice contre les réactions indésirables (oxydation ou de dégradation liés à la lumière, à l'air ou au pH par exemple). Deux types d'encapsulation peuvent être utilisées : (i) la nano-encapsulation qui consiste à enrober diverses substances dans un autre matériau ayant une taille nanométrique et (ii) la micro-encapsulation impliquant des particules plus grandes de l'ordre du micromètre (**Figure 6**) [15].

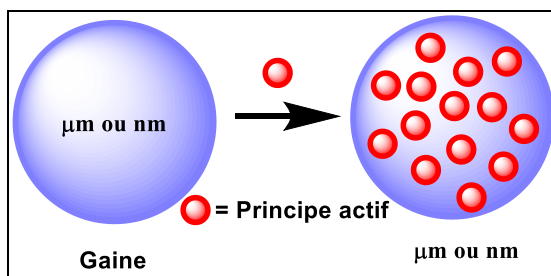


Figure 6 : Principe d'encapsulation

Depuis plusieurs années, l'encapsulation dans les dendrimères est principalement utilisée dans le domaine biomédical (imagerie, pharmacie) mais aussi en alimentaire

et cosmétique. Les dendrimères peuvent également être utilisés dans le domaine de la catalyse et celui de l'environnement pour purifier des eaux ou des sols en piégeant les polluants organiques et métalliques.

Nous allons ci-dessous détailler les différents domaines où l'encapsulation dans les dendrimères présente un intérêt.

2.1. Imagerie médicale

Les agents de contraste macromoléculaires offrent la possibilité de mesurer les changements locaux du volume sanguin cérébral associés à la fonction cérébrale ou au grade de la tumeur [64]. Les dendrimères, notamment des dendrimères contenant des ions chélatés en surface [13] semblent très adaptés pour une utilisation en tant que support d'agents de contraste pour l'imagerie de résonance magnétique (IRM).

En 1996, E. C. Wiener *et al.* ont étudié la dynamique moléculaire des complexes de chélate de vanadyle fixés par covalence à la surface de PAMAM dans l'objectif de montrer l'effet de l'ion chélate de vanadyle sur le temps de relaxation du PAMAM [65]. Ils ont démontré que le temps de relaxation du chélate de surface ressemble à ceux des carbones internes du PAMAM et augmente avec l'augmentation du poids moléculaire, ce qui n'a pas été observé dans le cas des polymères linéaires. Une comparaison des modèles isotrope et anisotrope a été étudié. Il a été constaté que le modèle anisotrope décrit mieux les formes de lignes modulées par le mouvement qu'un modèle isotrope, ainsi, ces complexes dendritiques possédant des formes ellipsoïdales, aplaties ou allongées ou avec des chaînes latérales rigides sont de meilleurs agents de contraste IRM. Une étude sur l'encapsulation de l'ion Gadolinium, un agent de contraste, dans les dendrimères de type PAMAM de hautes générations conjuguées avec le chélate bifonctionnel 2-(4-isothiocyanatobenzyl)-1,4,7,10-tétraazacyclododécane-N,N8,N'',N'''-tétraacétate (p-SCN-Bz-DOTA) a été réalisée par L. Henry Bryant *et al.* [66]. Ils ont montré que les dendrimères de génération 5 comportaient une moyenne de 127 chélates encapsulant 96 ions Gd^{+3} . Le nombre de chélates et la capacité d'encapsulation augmente avec les générations plus élevées. Ils ont suggéré que ces résultats sont pertinents pour la conception d'agents récepteurs de haute génération à base de dendrimères. Dans le même esprit, les travaux du laboratoire sur l'encapsulation du complexe à base de Gadolinium gadopentétate de diméglumine (GdBOPTA) par les dendrimères de PPI fonctionnalisés par le carbonate de glycérol [3] ont montré que ce dendrimère est un très bon encapsulant des agents de contraste et qu'il présente aussi une faible

cytotoxicité sur les fibroblastes pulmonaires. Pour l'imagerie des plaques athérosclérotiques [67], l'utilisation de dendrimères représente une méthode innovante et avantageuse par rapport aux autres nanoparticules mais le coût et la complexité de synthèse des hautes générations et leur toxicité vis-à-vis des cellules (notamment dans le cas des dendrimères cationiques) [67] représentent un frein.

En outre, il a été montré que les dendrimères sont aussi des outils performants pour transporter les fluorophores dans les systèmes biologiques. Ils peuvent améliorer les propriétés optiques et la solubilité des colorants organiques dans l'eau, ce qui permet de réduire l'impact négatif sur l'objet ciblé et d'augmenter l'intensité des signaux de fluorescence *in vitro* et *in vivo*. Toutefois, il est important d'améliorer l'autofluorescence dans la bio-imagerie mais sans utiliser d'agents qui pourraient avoir des effets sur les cultures de cellules ou d'organismes [68]. Récemment, un mécanisme de signalisation à base de dendrimère dans lequel les sondes fluorescentes sont connectées de manière ordonnée les unes aux autres, a été proposé pour améliorer le contraste en imagerie cellulaire, en évitant la dispersion du signal [69]. Il a été montré que la structure la plus grande présente une mobilité plus faible et l'accumulation de fluorescence des sondes connectées présente un contraste important.

2.2. Pharmaceutique

En ce qui concerne le domaine pharmaceutique, le facteur clé pour l'administration d'un médicament est la libération de la molécule active au bon endroit, au bon moment et à la bonne concentration. Cependant, il existe de nombreux obstacles à cette libération : la faible solubilité du médicament, sa dégradation environnementale ou enzymatique, son taux d'élimination rapide de l'organisme, sa toxicité non spécifique et son incapacité à franchir les barrières biologiques. Les vecteurs à base de polymères ou dendrimères (coordination en surface ou encapsulation interne) peuvent contourner ces problèmes [70–72].

Ainsi, dans le domaine de la lutte contre les cancers, diverses stratégies spécifiques aux tumeurs sont utilisées pour le ciblage, l'imagerie et la thérapie [14,73]. En 2013, Mollazade *et al.* ont comparé l'effet de la curcumine libre et de la curcumine encapsulée dans le dendrimère PAMAM sur la cellule cancéreuse du sein T47D [74]. Ils ont montré que les dendrimères PAMAM n'avaient aucune cytotoxicité sur les cellules. Cependant, le dendrimère a amélioré l'effet inhibiteur de la curcumine sur l'activité télomérase et a diminué l'IC₅₀ pour la prolifération des cellules du cancer du sein. De nombreuses études sur des dendrimères PAMAM fonctionnalisés par un

acide folique ont montré leur intérêt pour le traitement des cancers (poumon, sein, ovaire, cerveau et cou) [75] avec un ciblage spécifique des cellules tumorales pour la libération des composés de chimiothérapie encapsulés. La capacité du PAMAM fonctionnalisé par le PEG à encapsuler des agents anticancéreux tels que l'adriamycine et la méthotrexate, croît avec la génération du dendrimère et la longueur de la chaîne de PEG [76] mais l'adriamycine et la méthotrexate se libèrent facilement en présence de sérum physiologique. Un nouveau dendrimère amphiphile (HAD) (**Figure 7**) développé par chimie Click à partir d'un dérivé de 2-nitroimidazole avec un dendron de polylysine, encapsule la chlorine e6 et devient un adjuvant immunologique activable par la lumière (LIA) pour la vaccination *in situ* contre le cancer [77]. Par une activation infrarouge, LIA induit la lyse des cellules tumorales et la libération d'antigènes tumoraux. Il inhibe efficacement la croissance des tumeurs primaires et l'effet abscopal et induit un fort effet de mémoire immunitaire spécifique de l'antigène pour prévenir les métastases et les récurrences tumorales *in vivo*.

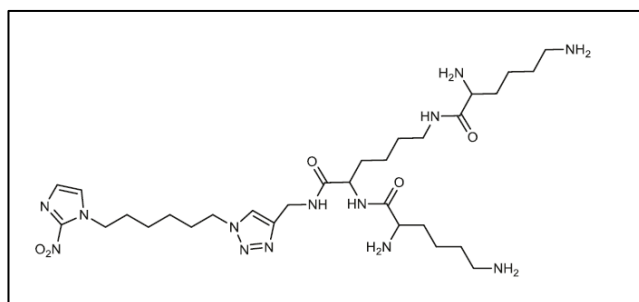


Figure 7 : Dendrimère amphiphile (HAD) de première génération [77]

Les dendrimères sont également utilisés pour délivrer des principes actifs autres que les anticancéreux notamment les anti-inflammatoires. L'étude de la capacité du PAMAM-3 et du PPI-4 à encapsuler la phénylbutazone utilisée comme principe actif modèle a montré que le PAMAM-3 offrait une encapsulation plus élevée, une libération plus lente et une toxicité plus faible que le PPI-4 [27]. Les PAMAMs de différentes générations sont aussi de bons véhicules ophtalmiques pour l'administration oculaire du nitrate d'ilopcarpine et du tropicamide [78]. D'autres dendrimères de type tri-blocs acide citrique-poly(éthylène glycol)-acide citrique (CPEGC), des composés biocompatibles, ont montré une capacité à lier, à solubiliser et à polariser des molécules hydrophobes telles que l'acide 5-amino salicylique (5-ASA), l'acide méfénamique et le diclofénac [79]. Le naproxène (anti-inflammatoire) et la naltrexone (ayant une propriété antagoniste utilisé dans le traitement des

toxicomanies aux opiacés) ont quant à eux été encapsulés avec succès dans des dendrimères à base de cyclodextrines par Namazi et al (**Figure 8**) [80].

Pour finir cette partie en thérapeutique, un polyéther fonctionnalisé par le PEG décrit par Mingjun Liu *et al.* [81] peut encapsuler le cholestérol et dérivés d'acides aminés.

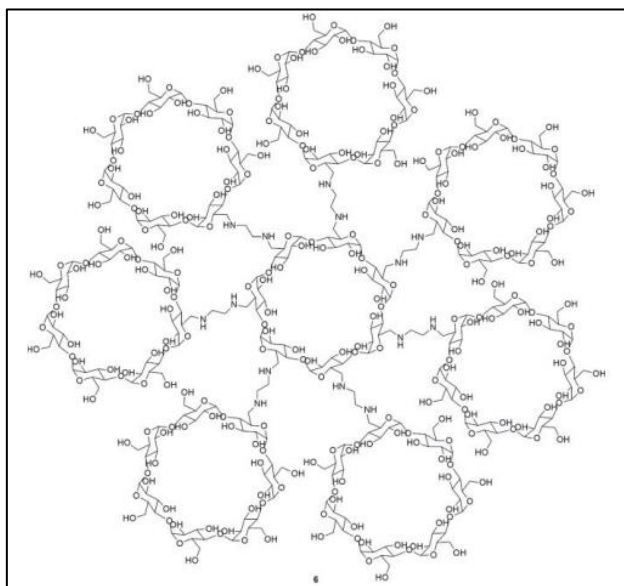


Figure 8 : Dendrimères-cyclodextrine de première génération, reproduite selon [80].

2.3. Catalyse

Les dendrimères offrent une topologie spécifique qui permet une coordination intradendritique fluide contrôlant la taille des nanoparticules (NP) et empêchant l'agglomération [82] ; en catalyse, ce sont des modèles pour la préparation de la réplique d'une particule, mais également ils stabilisent aussi des nanoparticules et permettent aussi d'améliorer la solubilité des catalyseurs et la sélectivité catalytique [83]. Ainsi, ces nano-objets ont été utilisés pour une large gamme de réactions catalytiques, y compris les hydrogénations, le couplage de Heck et les réactions de Suzuki dans divers solvants (eau, solvants organiques, solvants organiques/fluorés biphasiques et CO₂ supercritique). Dans de nombreux cas, il est très simple de recycler les catalyseurs encapsulés dans les dendrimères [83,84].

A titre d'exemples, au laboratoire, nous avons développé une nouvelle famille de dendrimère poly(propylèneimine) fonctionnalisée avec le carbonate de glycérol (GD-

PPI) qui se comporte comme un catalyseur basique recyclable pour l'ouverture du cycle des époxydes un acide carboxylique [1]. En outre, ces glycérodendrimères ont aussi été utilisés pour la préparation de nanoparticules de platine stables qui ont montré une bonne activité catalytique sur plusieurs cycles, pour la réduction des cétones α,β insaturées en cétones saturées [2].

En 2008, Guangan et son équipe ont travaillé sur l'encapsulation des nanoparticules de Pd dans des dendrimères (PdDENS) dérivés de PAMAM chargés négativement. Ces PdDENS sont très stables dans des liquides ioniques et peuvent être utilisés comme catalyseurs très actifs pour l'hydrogénation de styrène avec une efficacité maintenue après 12 recyclages [85]. D'autres nanoparticules de palladium stabilisées par des glycodendrimères (PdDENS) préparés au sein de notre laboratoire (**Figure 9**) ont montré, en phase aqueuse, une bonne activité catalytique lors de la réduction du 4-nitrophénol (4-NP) en 4-aminophénol (4-AP) et lors du couplage C-C Miyaura-Suzuki avec le bromure d'aryle substitué [82].

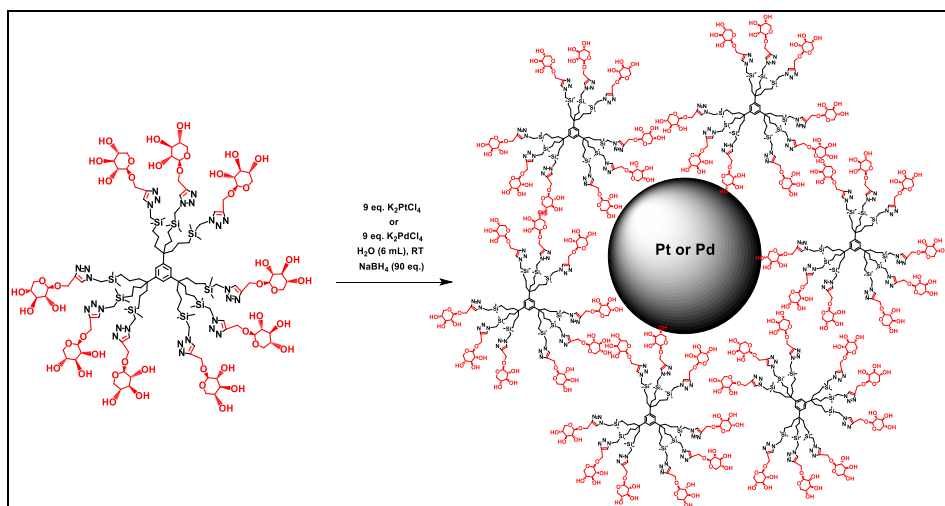


Figure 9 : Préparation de PdDENS stabilisés par des glycodendrimères, reproduite selon [82] par autorisation de l'auteur.

Depuis plusieurs années, les dendrimères contenant du ferrocène sont employés dans le domaine de la nanocatalyse,[86] pour stabiliser des nanoparticules de Pd et d'Au stables et très actives en couplage croisé C-C, en hydrogénation d'oléfines et en réaction d'oxydation. Le ferrocène joue un rôle crucial dans ces supports dendritiques avec son activité redox et sa tridimensionnalité stabilisant les nanoparticules. D'autres dendrimères greffés en surface d'un nanocomposite d'oxyde de graphène magnétique

ont été développés par Niakan et al (**Figure 10**) [87] et utilisés avec succès pour immobiliser des nanoparticules bimétalliques Pd/Ni actives en réaction de Suzuki-Miyaura ; la combinaison des nanoparticules de Pd et de Ni avec la structure dendritique du catalyseur a permis d'obtenir une excellente activité catalytique grâce à la présence de dendrimères comportant de nombreuses cavités permettant ainsi l'adsorption rapide des réactifs et une synergie entre les deux métaux.

Pour finir, la combinaison cellulose/dendrimère à base de triacryloylhéxahydro-triazine et de l'éthanedithiol de 3^{ème} génération obtenue par le greffage *via* des dérivés soufrés en surface de la cellulose, permet d'obtenir un catalyseur hétérogène [88] capable de convertir le fructose en 5-hydroxyméthylfurfural (96 % de conversion) et d'être recyclé au moins cinq fois sans perdre sa stabilité et son activité.

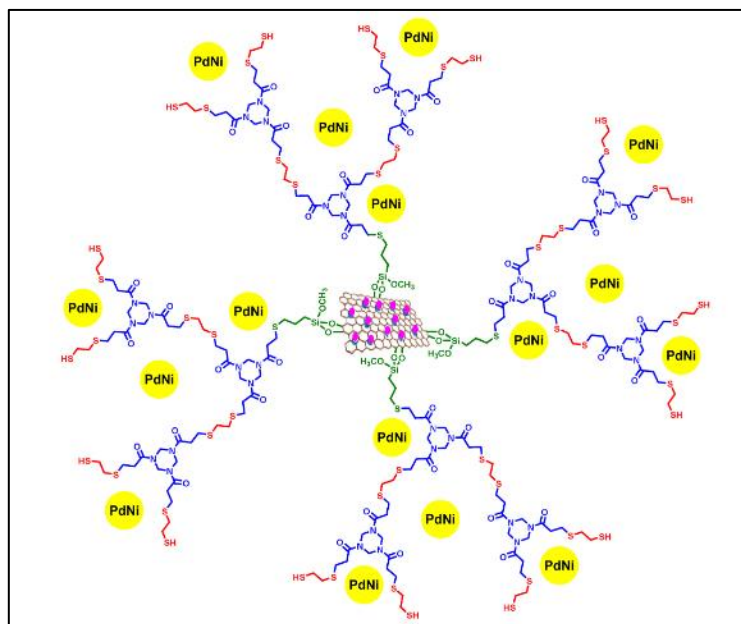


Figure 10 : Structure des nanoparticules stabilisées par le dendrimère greffé en surface d'un nanocomposite d'oxyde de graphène magnétique de deuxième génération GOF@Dm2@PdNi, reproduite selon [87], par autorisation d'Elsevier.

2.4. Environnement

La pollution de l'eau causée notamment par les métaux lourds représente un danger délétère pour la santé publique et le système écologique. Dans le domaine de la purification des eaux, les nanotechnologies offrent la possibilité d'éliminer efficacement les polluants et les germes [89]. L'utilisation des dendrimères comme

adsorbants des polluants organiques et métalliques a suscité un intérêt considérable ces dernières années.

En 2005, Diallo *et al.* ont testé les dendrimères de type PAMAM pour récupérer les ions Cu (II) dans des solutions aqueuses [90]. Ils ont montré que les liaisons Cu(II)-PAMAM sont beaucoup plus importantes et plus sensibles au pH de la solution que les liaisons Cu(II)-polymères linéaires à groupes amines, ce qui permet de récupérer facilement le complexe par filtration et ainsi de recycler le dendrimère. Il en est de même pour la pollution des sols, où les dendrimères PAMAM de différentes générations peuvent être utilisés comme de très bons agents d'extraction réutilisables pour l'élimination *in situ* des métaux lourds des sols contaminés [91].

Récemment, des dendrimères dérivés de PAMAM greffés sur de la silice mésoporeuse par la fonctionnalisation avec des sulfures ont également été développés pour le traitement des eaux [45]. Ces dendrimères présentent une meilleure propriété d'adsorption pour Hg (II) et Cd (II) par rapport aux adsorbants traditionnels. De plus, ils montrent d'excellentes propriétés d'adsorption sélective et de régénération (95,2% d'efficacité après cinq cycles). D'autres matériaux à base de PAMAM tels que les nanotubes de carbone/PAMAM (CNTs/PAMAM), oxyde de graphène/PAMAM (OG/PAMAM) et silice/PAMAM (SiO₂/PAMAM) ont été développés pour être utilisés en tant que capteur pour la détection et la quantification des ions métalliques (Cu²⁺, Hg²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺ et Co²⁺) et des polluants organiques (kétoprofène, tamoxifène et acide clofibrique) [92]. Dans le même esprit, le sel de diclofénac, le β-estradiol, l'atrazine et le diuron ont été encapsulés au laboratoire par des glycérodendrimères (GD-PAMAM et GD-PPI) et leur relargage étudié en fonction du pH [4]. L'ibuprofène et le naproxène ont eux aussi pu être éliminés dans l'eau en présence de PAMAM-halloysite (Hal-PAMAM) comme adsorbant [93], avec des capacités d'adsorption maximales (à pH compris entre 3 et 6) de 68,3 et 6,0 mg g⁻¹ pour l'ibuprofène et le naproxène, respectivement. Le PAMAM G 2,5 cette fois greffé sur les membranes amidoximées a aussi été utilisé comme agent adsorbant d'antibiotiques (lasalocid A, salinomycin et semduramicine) présents dans des eaux usées [94] avec de très bons rendements de 82 à 91%. Enfin, des dendrimères ioniques sont aussi employés dans le domaine de l'environnement : en effet, l'extraction de cations métalliques tels que (Cu²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺ et Ag⁺) peut être réalisée avec des dendrimères dérivés de PAMAM ou PPI (PAMAM G₃ NH₃⁺ Tf₂N⁻, PPI G₃ NH₃⁺ Tf₂N⁻, PPI G₃NH₂Me⁺ BF₄⁻ and PAMAM G₃NH₂Me⁺ BF₄⁻ (**Figure 11**) [95]. D'autres dendrimères ioniques fonctionnalisés par des imidazoliums (HPIL) stabilisent des

nanoparticules d'argent de taille uniforme et stables dans l'eau [96] et peuvent délivrer des biomolécules [97].

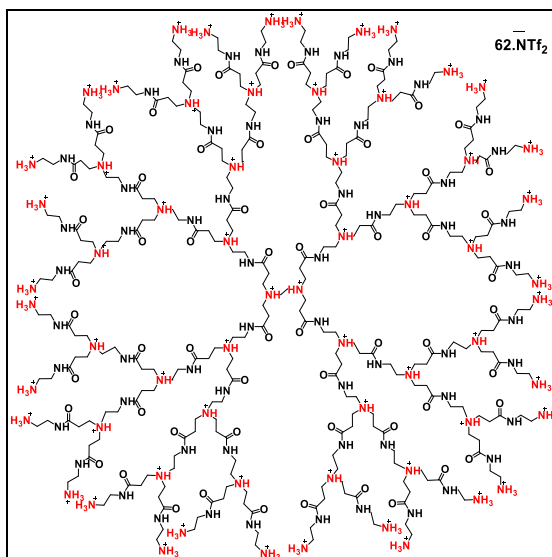


Figure 11 : Structure de dendrimère PAMAM G3 NH₃⁺ NTf₂⁻, reproduite selon [95] par autorisation de l'auteur

2.5. Alimentaire

De nombreux composés bioactifs utilisés dans le domaine alimentaire sont de nature hydrophobe insolubles ou très peu solubles dans l'eau. Parmi ceux-ci, on peut citer les caroténoïdes, les acides gras essentiels, les huiles essentielles, certaines vitamines et composés phénoliques [98]. Leur insolubilité ou leur faible solubilité dans l'eau les empêche d'être formulés à la dose prévue, ce qui entraîne leur faible biodisponibilité [98]. Par conséquent, des systèmes d'administration tels que les liposomes, les nanotubes, les protéines, les biopolymères et les dendrimères ont été développés pour améliorer leur solubilité et leur biodisponibilité [99–101]. Cela offre également d'autres avantages comme la protection contre l'évaporation (le cas des huiles essentielles), les réactions chimiques ou la migration dans les aliments, l'administration contrôlée et la préservation de la stabilité des composés bioactifs pendant le traitement et le stockage [101,102]. Les dendrimères offrent ainsi une nouvelle approche pour la solubilisation de ces ingrédients, en fournissant des propriétés spécifiques de délivrance des composés bioactifs. Cependant, les

applications alimentaires des dendrimères ne sont pas aussi courantes que celles des liposomes et des micelles mais ils peuvent avoir un grand avenir dans ce domaine [100].

En 2019, la revue de Yousefi *et al.* donne les principaux travaux sur la synthèse de dendrimères et leur capacité à encapsuler des ingrédients bioactifs tels que le resvératrol, la curcumine et les vitamines C et B12 qui peuvent être utilisés dans le domaine alimentaire [98]. Quatre nouvelles familles de dendrimères à base de glycérol récemment développées au laboratoire ont encapsulé des huiles essentielles de cannelle et de citronnelle [5,6].

L'encapsulation de β -carotène (BC) par le dendrimère dérivé du glucane octenyl succinate (OSA-SMDG) (extrait de sucre de maïs) a été réalisée dans le but d'étudier l'impact du dendrimère sur la stabilité au stockage et l'activité antioxydante d'émulsions chargées en β -carotène (BC) ainsi que sur sa bioaccessibilité [103]. Ainsi, la capacité d'encapsulation du β -carotène dans les deux émulsions en présence de 3% et 5% de dendrimères est importante et l'activité antioxydante des deux émulsions est supérieure à celle du β -carotène pur. L'extension à l'encapsulation du coenzyme Q10 (CoQ10) a aussi confirmé l'intérêt de ce type de dendrimère dans le domaine de l'encapsulation alimentaire [104].

2.6. Cosmétique

En cosmétique, de nombreuses substances biologiquement actives ne sont pas stables et sont sensibles à la température, au pH, à la lumière et à l'oxydation. Pour cela, il est important qu'elles soient protégées de toute dégradation indésirable pour contrôler la libération de la substance active. L'utilisation de polymères biodégradables comme les dendrimères pour l'encapsulation de principes actifs cosmétiques peut augmenter leur efficacité et leur biodisponibilité, et permet également d'améliorer la stabilité et la libération des substances actives [105]. Les dendrimères peuvent être utilisés dans la formulation de divers produits cosmétique tels que les produits de soins et de protection de la peau, des cheveux, des ongles, des lèvres et/ou des dents [106]. Ainsi, depuis plusieurs années, l'utilisation de dendrimères dans les cosmétiques a suscité l'intérêt des chercheurs. Un brevet déposé par L'Oréal [16] décrit l'emploi de dendrimères polyesters fonctionnalisés par des hydroxyles dans des compositions cosmétiques et dermatologiques pouvant être appliquées sur différents supports (peau, ongles, fibres kératiniques, membranes semi-

muqueuses et/ou muqueuses). La cohésion principe actif/support est renforcée avec de surcroît de meilleures propriétés sensorielles. On peut aussi noter l'emploi de dendrimères dans des compositions autobronzantes menant à une intensité de coloration accrue et à une bonne résistance au lavage [107].

L'utilisation des dendrimères PAMAM dans des applications cosmétiques et de soins telles que les crèmes, des shampoings et des après-shampoings, des toniques et du maquillage, pour l'encapsulation de l'acide salicylique dans les compositions anti-acnéiques a aussi été rapportée. L'acide salicylique est à la fois encapsulé dans les cavités, mais il a aussi tendance à se lier aux groupements amines de la surface de dendrimères ce qui le stabilise avant l'application sur la peau où il est libéré. L'utilisation de ce complexe acide salicylique-PAMAM dans divers composés de maquillage permet ainsi d'éviter la réaction avec les pigments d'oxyde de fer [18]. Les dendrimères de type PAMAM sont également utilisés dans des compositions déodorantes et présentent de plus des propriétés d'absorption des odeurs [108].

Il a été également montré que diverses familles de dendrimères dérivés de PEG solubles dans l'eau sont appropriées pour le transport de molécules d'acide ascorbique grâce à leur multivalence contrôlée [20]. L'encapsulation de l'acide ascorbique peut aussi être réalisée dans des PAMAMs (G 2,5 à G4) dans le méthanol [109] avec de meilleures encapsulations pour les demi-génération 2,5 et 3,5. En 2010, E. Boisselier *et al.* ont travaillé sur l'encapsulation des vitamines C, B3 et B6 dans les dendrimères. Les encapsulations sont effectuées dans l'eau avec deux types de dendrimères commerciaux PAMAM et PPI avec les différentes générations G2, G3 et G5 [17] et l'encapsulation est prouvée par titrage des vitamines qui sont complexées aux amines primaires et tertiaires des dendrimères ; le nombre de molécules encapsulées le plus élevé est bien évidemment observé pour les générations supérieures.

Des dendrimères de carbosilane comportant des groupes polyphénols ont aussi été développés par De La Mata *et al.* comme antioxydants dans les industries cosmétiques et pharmaceutiques [52]. Un copolymère comportant un dendrimère à base de carbosiloxane a par la suite été développé par Iimura *et al.* pour améliorer la stabilité de la formulation et pour fournir une bonne résistance à l'eau et au sébum, une brillance et une sensation tactile et/ou des propriétés adhésives aux cheveux et/ou à la peau [110]. Ce dendrimère a été breveté récemment pour une application cosmétique [111].

De nombreuses tentatives ont été menées pour augmenter la solubilité de la quercétine à l'aide de techniques de nanoencapsulation. Dans cette optique, Madaan *et al.* ont étudié la solubilité de la quercétine dans des solutions de PAMAM de

diverses générations (G0 à G3) et concentrations ; ainsi, la solubilité de la quercétine a pu être augmentée et la formation de complexes quercétine/PAMAM confirmée par FTIR [112].

Le composé PAMAM-3/acide caféique (liaisons covalentes) récemment rapporté dans la littérature présente une activité de cicatrisation dermocosmétique et une capacité antioxydante importante ; utilisé pour la cicatrisation de plaies et la régénération des tissus, il peut également être employé dans des compositions dermocosmétiques, pour les soins de peau et pour réduire l'apparence des rides et des lignes d'expression [113].

Enfin, des formulations dendrimères/resvératrol ont également été étudiées [114], pour augmenter la solubilité, la stabilité et la perméation transdermique du resvératrol pour des produits anti-âge, shampooings, gels capillaires, écrans solaires, sprays, lotions et anti-acnéiques [115].

3. La toxicité des dendrimères

L'étude de la toxicité d'une manière générale est la mesure de la capacité d'une substance à provoquer des effets néfastes et mauvais pour la santé sur toute forme de vie [116]. Elle dépend de son interaction avec la matière vivante, mais aussi de la dose du composé nécessaire pour produire un effet. Cette toxicité est exprimée en dose létale capable de tuer 50% d'une population : la DL₅₀ [116].

On distingue trois types de toxicité [117] : (1) la toxicité aiguë pour laquelle les effets provenant de l'administration massive en une seule fois d'une substance sont immédiats ; (2) la toxicité subaiguë, due à une absorption chronique pendant plusieurs mois (alcool par exemple) ; (3) la toxicité à long terme, où l'effet apparaît après accumulation de doses absorbées jusqu'à atteindre la dose seuil comme pour les produits cumulatifs (le plomb par exemple), des substances irritantes (tabagisme passif par exemple) ou mutagènes [116].

Le test de cytotoxicité est le test le plus couramment utilisé pour évaluer la toxicité d'une substance ou molécule. Ce test consiste à évaluer le potentiel de la substance/molécule à inhiber la croissance des cellules d'un organisme ou provoquer la mort des cellules. Ces essais *in vitro* peuvent être réalisés par des méthodes qualitatives et quantitatives [118]. La méthode d'essai appropriée est choisie en fonction de la nature de l'échantillon à évaluer, le type de cellules et les conditions de culture [118,119].

La cytotoxicité d'une substance peut être évaluée expérimentalement par une variété de méthodes de dosage classées par catégories : (1) les méthodes d'exclusion de colorant, (2) les méthodes basées sur l'activité métabolique avec (3) les dosages de l'Adénosine 5'-Triphosphate (ATP), (4) de la sulforhodamine B, (5) du marqueur de viabilité protéasique, (6) des cellules clonogéniques qui survivent ou (7) des cellules qui profilèrent par synthèse d'ADN, en utilisant potentiellement la micro-spectroscopie Raman [119].

Les méthodes les plus simples à utiliser sont les méthodes d'exclusion de colorant tel que le trypan bleu indicateur de cellules mortes et les méthodes basées sur l'activité métabolique telles que les méthodes MTT [120] et WST1 (*Water Soluble Tetrazolium*) [121]. Pour cette dernière, c'est la réduction du sel de tétrazolium en formazan par les enzymes oxydoréductases mitochondriales NADH dans les cellules vivantes qui est observée. **Le tableau 2** reprend quelques exemples des effets cytotoxiques de divers types de dendrimères évalués par différentes méthodes sur les différentes cellules.

La cytotoxicité des dendrimères dépend fortement du nombre et de la nature des groupements fonctionnels de surface. Les dendrimères cationiques présentent souvent une toxicité élevée, tandis que les dendrimères anioniques et neutres présentent des effets toxiques faibles voire nuls [122,123].

En règle générale, la cytotoxicité des dendrimères cationiques s'explique par l'interaction entre les membranes cellulaires chargées négativement et la surface des dendrimères chargée positivement. Cette interaction conduit à la formation de nanopores dans la membrane cellulaire, à son endommagement et à la fuite subséquente du contenu cellulaire qui conduit à la mort de la cellule [124].

En ce qui concerne les dendrimères PPI, leur toxicité augmente avec le nombre de groupes de surface. Il est bien démontré que les dendrimères de 5^{ème} génération (PPI-5) sont plus toxiques que les dendrimères de générations inférieures [125]. Il en est de même pour le PAMAM où l'on retrouve une cytotoxicité plus élevée pour les générations élevées [124], alors que les dendrimères carbosilane-poly(oxyde d'éthylène) (CSi-PEO) et d'autres dendrimères possédant des fonctions terminales neutres ou anioniques semblent être beaucoup moins toxiques [126]. Il a été également montré par comparaison des deux familles de dendrimères PPI et PAMAM possédant le même nombre de fonctions en périphérie (32 NH₂) que le PAMAM G3 est moins toxique que le PPI G4 [27]. Par conséquent, il est recommandé pour certains dendrimères de remplacer les groupements de surface par des entités plus neutres afin de réduire leur cytotoxicité [39,122].

Stasko N.A *et al.* ont étudié la cytotoxicité des PPI avec des surfaces modifiées par des entités PEG ou acétamides sur les cellules endothéliales humaines cultivées (HUVEC). Les tests de cytotoxicité ont confirmé que la fonctionnalisation de PPI a diminué efficacement la cytotoxicité des dendrimères [40]. Il en est de même lorsque la surface de PPI est modifiée avec du maltotriose (tests réalisés sur des cellules sanguines d'une souris) [127] ou par du carbonate de glycérol (tests sur des fibroblastes pulmonaires) [3].

En ce qui concerne le PAMAM, D'Emanuele et son équipe ont étudié l'influence de la modification de la surface des PAMAM sur la cytotoxicité vis-à-vis de cellules épithéliales humaines Caco-2 [39]. Les PAMAMs cationiques non modifiés sont plus toxiques que les PAMAMs anioniques et la toxicité des deux types augmente avec l'augmentation de la génération. Les mêmes observations ont été faites sur les cellules du cancer du col de l'utérus [128]. La fonctionnalisation avec le carbonate de glycérol conduit à la même conclusion donnée ci-dessus avec le PPI [4].

Pour finir, Frechet et ses collègues ont également montré que les dendrimères de type polyester portant des groupements hydroxyles en périphérie, s'avéraient être légèrement toxiques *in vivo* à de très fortes concentrations chez la souris [129].

Tableau 2 : Effets cytotoxiques de divers dendrimères sur différents types cellulaires

Dendrimères	Cytotoxicité	Cellules	Méthodes	Références
PAMAM G3 PAMAM G3.5 6-Lauroyl- PAMAM-3	IC ₅₀ (mM) = 0,14 ± 0 IC ₅₀ (mM) >1 IC ₅₀ (mM) >1	Cellules épithéliales humaines Caco-2	MTT	[39]
CPD-G2 CPD-G3	IC ₅₀ = 2,33 µM IC ₅₀ = 1,31 µM	Cellules hippocampiques embryonnaires de souris (mHippoE- 18)	MTT	[130]
CPD-G2 CPD-G3	IC ₅₀ = 1,84 µM IC ₅₀ = 1,74 µM	Cellules de neuroblastome de souris (N2a)		

PAMAM-G2 DAB-G2 PEA-G2 CSi-PEO-G2	IC ₅₀ (mg/mL) > 2 IC ₅₀ (mg/mL) = 0,3 IC ₅₀ (mg/mL) > 0,1 IC ₅₀ (mg/mL) > 2	Cellules mélanocytes B16F10	MTT	[123]
PPI-4 GD-PPI-4	Cytotoxique à C ≥ 10 µg/mL Cytotoxique à C > 100 µg/mL	Fibroblastes pulmonaires humaines MRC5	WST1	[3]
PAMAM-3 GD-PAMAM-3	Cytotoxiques à C ≥ 1000 µg/mL	Fibroblastes pulmonaires humaines MRC5	WST1	[4]
PAMAM-4 PAMAM-5 PAMAM-6	Valeurs EC ₅₀ (µM) (test Clonogénique) 2,63 [1,78–3,47] 0,57 [0,37–0,77] 0,19 [0,14–0,25]	Kératinocytes humains (HaCaT)	Bleu d'Alamar (AB) Rouge neutre (NR) MTT Clonogénique	[131]
PAMAM-4 PAMAM-5 PAMAM-6	Valeurs EC ₅₀ (µM) (test Clonogénique) 1,43 [1,27–1,59] 0,41 [0,39–0,42] 0,18 [0,15–0,2]	Cellules d'adénocarcinome du côlon (SW480)		
DAB-Ac ₄₀ -FITC ₂ DAB-Ac ₅₉ -FITC ₂ DAB-Ac ₄₀ -PEG-4-FITC ₂	Cytotoxique à 3µM après 150 min Cellules mortes > 90% Non cytotoxique à 3µM Non cytotoxique à 3µM	Cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC)	Propidium Iodide (PI) et Lactate Dehydrogenase (LDH)	[40]

<p>PAMAM– pyrrolidone dendrimère</p>	<p>Non cytotoxique</p>	<p>Fibroblastes d’hamster chinois (B14) Cellules hippocampiques embryonnaires de souris (mHippoE- 18) et Cellules dérivées du foie de rat (BRL- 3A)</p>	<p>MTT</p>	<p>[132]</p>
--	------------------------	---	------------	--------------

4. L’interaction des dendrimères avec le SC

Comme dans ce travail, les dendrimères sont destinés au domaine de la cosmétique, les interactions des dendrimères avec la couche cornée de la peau appelée SC sont, dans ce cas, importantes à caractériser pour, d’une part, comprendre comment ces dendrimères agissent sur la peau et, d’autre part, pour optimiser le design du dendrimère le plus performant et le moins cytotoxique. Après avoir introduit la structure de la peau, les différentes voies de diffusion des principes actifs à travers la peau et les principaux modèles biomimétiques de peau, ce chapitre se consacrera à une revue de la littérature sur les interactions dendrimères SC.

4.1. La peau

La peau est un organe constitué de plusieurs couches et tissus, représentant l’organe le plus étendu du corps humain, avec environ 2 m² de surface (pour un adulte) et 10 % de notre poids [133]. D’un point de vue chimique, la peau comprend en moyenne 70% d’eau, 27,5% de protéines, 2% de matières grasses et 0,5% de sels minéraux et oligo-éléments [134]. Sa fonction principale est de protéger l’organisme des agressions extérieures, physiques, chimiques et infectieuses, mais également, de jouer un rôle actif dans de nombreux processus biologiques et biochimiques [135]. La peau est constituée de trois couches principales (**Figure 12**) : (i) l’hypoderme ou sous-couche épidermique i.e. la couche la plus profonde constituée de cellules adipeuses, fibres de collagène et vaisseaux sanguins [135], (ii) le derme : la couche intermédiaire la plus épaisse, élastique, constituée de fibroblastes, collagène, élastine, de tissus conjonctifs de vaisseaux lymphatiques, de récepteurs sensoriels et de racines des poils [135], et (iii) l’épiderme.

L'épiderme est la couche la plus externe dont l'épaisseur varie de 0,06 mm dans les paupières à 0,8 mm dans la peau des talons [136]. Il joue un rôle important pour la protection de notre corps contre les toxines, les bactéries et la perte de fluides. Il est constitué de 5 sous-couches de kératinocytes [137] (**Figure 12**) : (1) la couche basale (*stratum basale*) appelée également la jonction serrée dermo—épidermique, qui est la couche la plus profonde où les kératinocytes sont produits, (2) la couche épineuse (*stratum spinosum*) dans laquelle les kératinocytes produisent de la kératine (fibres de protéine) et deviennent fusiformes, (3) la couche granuleuse (*stratum granulosum*) où la kératinisation débute et où les cellules produisent des granulés durs, qui se transforment en kératine et en lipides épidermiques, (4) la couche claire (*stratum lucidum*) dans laquelle les cellules sont très comprimées et aplaties, et (5) la couche cornée (*stratum corneum*) qui est la couche la plus externe de l'épiderme.

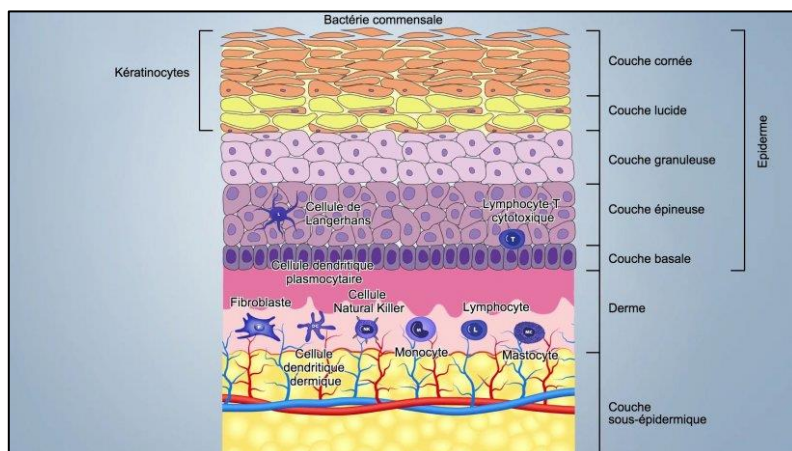


Figure 12 : Coupe transversale de la peau qui représente les différentes couches, reproduite selon [138], par autorisation de l'auteur

4.2. *Le stratum corneum*

Le SC est la couche la plus externe de l'épiderme des mammifères, est responsable de la fonction barrière de la peau [21,139]. Elle dicte le taux d'absorption des molécules exogènes par la peau et empêche la perte d'eau du corps [21]. Le SC est principalement composé de cellules mortes aplaties et entièrement kératinisées (cornéocytes), noyées dans un espace intercellulaire (matrice lipidique multilamellaire) constituée de bicouches empilées (**Figure 13**) [22]. Le modèle de « briques et mortier » est généralement utilisé pour décrire la structure de cette couche, où les briques représentent les cornéocytes et le mortier représente la matrice lipidique (**Figure 14**) [140]. Le SC dépourvu de phospholipides est constitué essentiellement

de céramides, de cholestérol et d'acides gras libres à longue chaîne en quantités équimolaires (**Figure 15**) [23,141]. Ce mélange lipidique se trouve en phase cristalline à la température physiologique, ce qui empêche la libre diffusion des substances à travers la peau [142,143].

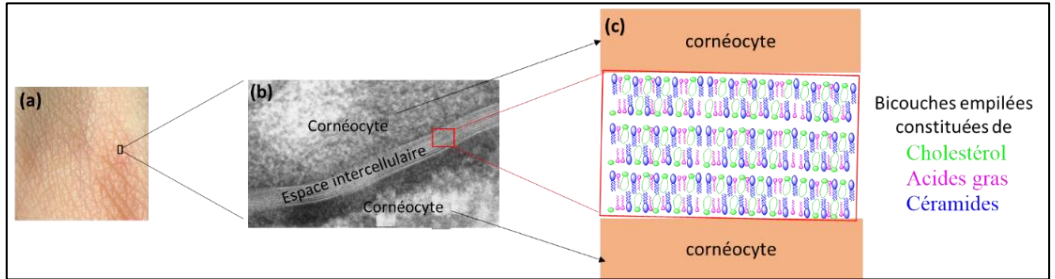


Figure 13 : (a) Une image de surface de la peau, (b) micrographie électronique des membranes lamellaires empilées et structurées dans un espace intercellulaire reproduite selon [144], par autorisation d'Elsevier et (c) un modèle structural du SC

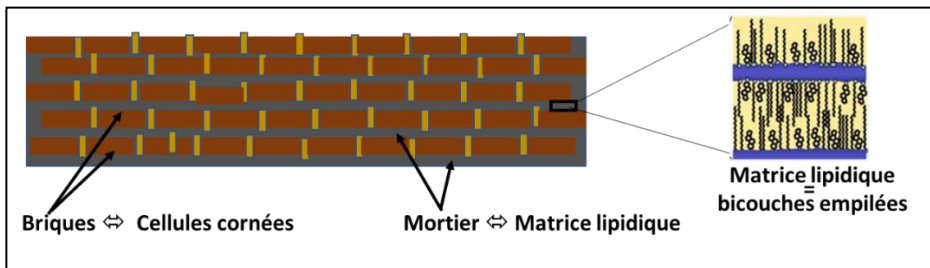


Figure 14 : Modèle de briques et mortier du SC [140]

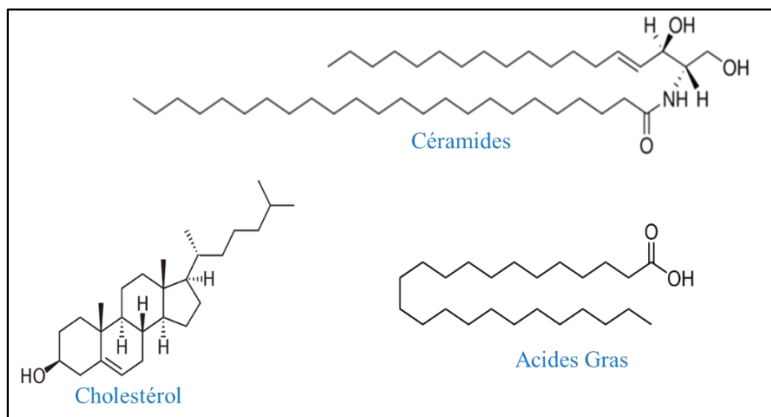


Figure 15 : Lipides représentatifs de principales classes de lipides constituant le SC.

4.3. La diffusion des principes actifs à travers la peau

Il existe trois voies principales par lesquelles les substances bioactives peuvent pénétrer dans la peau :

- la voie intercellulaire qui passe à travers la matrice lipidique,
- la voie intracellulaire qui passe par les cornéocytes,
- et la voie transépidermique qui passe à travers les follicules et les pores

(**Figure 16**) [145,146].

La multicouche lipidique dans la matrice intercellulaire est considérée comme la principale barrière de transport pour les principes actifs [147].

L'administration des principes actifs à travers la peau peut être classée en deux catégories : soit l'administration transdermique par laquelle les substances actives diffusent à travers les différentes couches de la peau pour arriver à la circulation systémique ; soit l'administration topique ou locale pour laquelle les substances actives s'appliquent directement sur les sites pathologiques ciblés au sein de la peau [148–150].

Comme l'épiderme (ou plus précisément la couche cornée SC) joue un rôle de barrière, l'administration de molécules médicamenteuses est limitée. Seules les molécules à faible poids moléculaire (<500 Da) ayant des propriétés physico-chimiques optimales ($1 < \log P < 3$) peuvent être transportées passivement par le SC [151]. Par conséquent, l'utilisation de biomatériaux tels que les protéines, les peptides,

les cyclodextrines et les dendrimères est apparue comme une nouvelle approche pour augmenter la diffusion des substances actives au travers la peau [149].

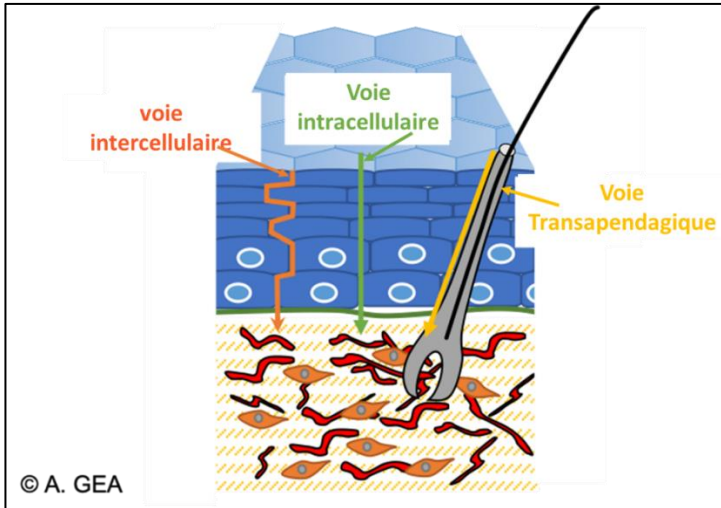


Figure 16 : Différentes voies de diffusion à travers la peau, reproduite selon [152] par autorisation de l'auteur

4.4. Les membranes biomimétiques de peau

Les membranes biologiques d'une manière générale sont très complexes en termes de composition et d'organisation. Afin de comprendre les mécanismes à l'échelle moléculaire et notamment les interactions entre une molécule externe et la membrane, il est nécessaire de simplifier les systèmes d'étude. C'est pour cette raison que des modèles membranaires simplifiés sont développés [153,154], représentant ainsi un bon compromis entre simplicité et représentation fidèle de la membrane native.

Il existe trois grands types de modèles membranaires biomimétiques : les monocouches lipidiques, les bicouches supportées et les liposomes (**Figure 17**) [153].

Les monocouches lipidiques considérées comme des demi-bicouches sont les modèles les plus simples pour imiter les membranes biologiques. Ces modèles sont souvent utilisés pour évaluer la capacité d'insertion d'une substance dans le feuillet externe de la membrane et pour caractériser les interactions en termes de cinétique et de spécificité [155].

Les bicouches lipidiques supportées sont des modèles constitués d'une bicouche lipidique plane supportée sur une surface solide. Ces systèmes sont capables d'imiter

certaines des propriétés de la membrane cellulaire comme la fluidité des lipides, la formation et l'organisation de domaines et le support des protéines, mais sans la complexité du système biologique réel [156].

Les liposomes, nommés également vésicules lipidiques, sont formés d'une ou plusieurs bicouches lipidiques renfermant entre elles des compartiments aqueux. Elles sont classées en trois groupes selon leur morphologie et leur taille qui peut varier de quelques dizaines de nanomètres à quelques dizaines de microns : les petites vésicules unilamellaires (Small Unilamellar Vesicles - SUV), les larges vésicules unilamellaires (Large Unilamellar Vesicles - LUV), les vésicules unilamellaires géantes (Giant Unilamellar Vesicles - GUV) et les vésicules multilamellaires (Multilamellar Vesicles - MLV) constituées de plusieurs bicouches superposées [157]. Ces modèles sont utilisés pour étudier le comportement des phases membranaires (fluidité/rigidité) et les processus membranaires tels que la fusion membranaire, la reconnaissance moléculaire, la perméabilité et la stabilité [158].

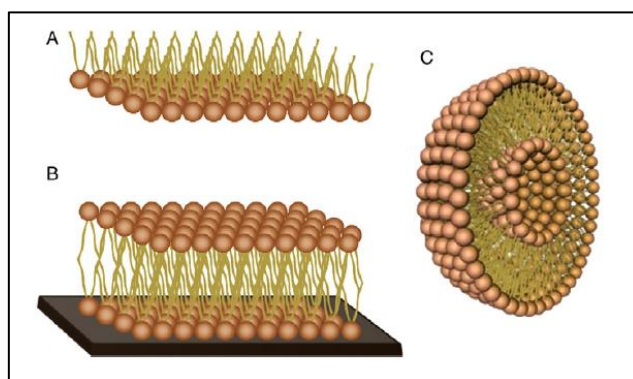


Figure 17 : Représentation schématique des modèles de membranes (A) monocouche lipidique, (B) bicouche lipidique supportée, (C) liposome, reproduite selon [159] par autorisation de l'auteur

Le choix de la composition lipidique et le choix des modèles dépend respectivement de la composition de l'organisme considéré et de la propriété de la membrane qu'on souhaite étudier [159].

Dans le cas de la membrane biologique de peau des mammifères, le SC est la couche responsable de la fonction barrière de la peau comme évoqué ci-dessus [139]. Les modèles membranaires biomimétiques de SC sont constitués des principales classes de lipides prépondérants de la peau, les céramides, le cholestérol et les acides gras libres à longue chaîne [23,141]. Les céramides jouent un rôle important dans la

structuration et le maintien de la fonction barrière de la peau [21,160]. Le cholestérol est l'un des stérols les plus présents dans les membranes biologiques et le seul dans le SC [161]. Les acides gras sont les responsables de la protection du corps de la déshydratation et jouent un rôle important par leur effet anti-inflammatoire [162].

De nombreuses études utilisant des monocouches lipidiques biomimétiques du SC ont été réalisées généralement au moyen de la balance de Langmuir ou la microscopie à force atomique (AFM) [163–165]. Les modèles monocouches de SC présentent une isotherme sans transition de phase, caractéristique des films très rigides [165]. La variation des ratios des constituants lipidiques permet de déterminer le rôle de chaque lipide et son influence sur les propriétés de la membrane [163].

Les modèles liposomes biomimétiques de la peau sont souvent préparés par hydratation à une température élevée supérieure à 72°C [23,166–168]. Cette valeur se situe dans l'intervalle de température de transition de phase de la composition lipidique, d'une phase de type gel lamellaire à une phase cubique respectivement de 40 à 80°C [166]. Lors d'une étude de transition de phase d'un liposome biomimétique du SC, il a été observé que le liposome avait trois points de transition à 45°C, 76°C et 98°C [169]. Il a été suggéré que la transition observée près de 45°C est attribuée à des mouvements des chaînes latérales du cholestérol. La transition proche de 76°C est attribuée au changement de phase de gel au cristalline des chaînes hydrocarbonées de l'acide gras et de céramide et de la rupture de l'association entre les têtes polaires des lipides. La transition à des températures proche de 100°C est due à la vaporisation de molécules d'eau [169,170].

Des études sur les modèles liposomes de SC ont montré que la composition lipidique et le pH influence la stabilité et la structure des liposomes [23,171,172]. Par exemple, à pH physiologique, les liposomes ne sont pas stables [172,173]. Cependant, à 32°C, le pH n'influence pas les propriétés de la membrane [167,173]. En outre, le cholestérol fluidifie les membranes lipidiques de SC aux températures situées en-dessous de la transition de phase principale et condense les membranes pour les températures supérieures [173].

La longueur de la chaîne des céramides influence l'organisation et les propriétés de la bicouche. Plus la chaîne est longue, plus la densité électronique est importante et plus l'épaisseur de la bicouche est importante, ce qui améliore la fonction barrière [160]. Une étude par diffraction des rayons X a d'ailleurs montré que le modèle de SC composé de céramides à courtes chaînes s'organise selon trois couches ; deux couches aux extrémités de 50 Å se trouvent à l'état cristallin et une couche intermédiaire de 30 Å se trouve dans un état liquide, facilement perméable [174].

Le type de céramide utilisé influence également la perméabilité [168]. En effet, en utilisant des dihydrocéramides (dCer), l'effet du raccourcissement de la chaîne acyle est moins marqué que dans le cas des céramides. Par exemple, les membranes composées de dCer à courtes chaînes sont jusqu'à 6 fois moins perméables que les membranes constituées de céramides à courtes chaînes correspondants. De plus, la même étude a montré par spectroscopie infrarouge que le dCer long se mélangeait moins avec les acides gras mais qu'il formait des domaines ordonnés plus stables thermiquement que le céramide correspondant [168].

4.5. Interaction dendrimères-stratum corneum

La compréhension des interactions entre les dendrimères et les membranes biologiques est essentielle pour l'utilisation des dendrimères comme systèmes d'administration de principe actifs ou de gènes [175].

Ces dernières années, les dendrimères ont montré leur potentiel pour améliorer l'administration cutanée de diverses molécules avec un faible potentiel d'irritation cutanée et une capacité de délivrance des substances actives élevée [150].

Plusieurs études sur l'interaction de dendrimères avec la membrane cutanée ont été réalisées, généralement sur des tissus cutanés humains [176–178] ou animaux [179,180]. Cependant, à notre connaissance, aucune étude d'interaction des dendrimères avec des modèles biomimétiques de SC n'a été décrite dans la littérature [181].

La nature, la concentration, la charge, la taille et l'hydrophobicité du dendrimère influencent à la fois la pénétration dans la peau et la délivrance du principe actif [182–184]. Dans le cas de l'étude de l'interaction de dendrimères PAMAM avec les cellules épidermiques porcines [184], il a été montré que le PAMAM G2 pénètre mieux la couche que le PAMAM G4. En outre, la modification de la surface de PAMAM G2 par acétylation (surface cationique) ou par carboxylation (surface neutre) augmente la perméabilité de la peau. La fonctionnalisation de dendrimères G2 par l'acide oléique augmente le coefficient de partage 1-octanol/PBS ce qui entraîne une augmentation de son absorption et de sa rétention cutanée.

En revanche, d'autres études sur le même type de peau ont montré que les dendrimères cationiques pénètrent dans des couches plus profondes de la peau au contraire des dendrimères anioniques ou neutres [182,183], leur charge superficielle positive permettant une plus grande interaction avec la surface de la peau chargée négativement.

En 2008, Venuganti *et al.* ont mené une étude sur l'effet du dendrimère PAMAM sur la perméabilité cutanée porcine du 5-fluorouracil (5FU) en présence d'un tampon phosphate (PB), d'huile minérale (MO) ou de myristate d'isopropyle (MIP) [185]. Ils ont constaté que l'application simultanée du 5FU et du dendrimère a augmenté le flux de 5FU dans l'IPM et le MO, alors qu'il n'y a pas eu de changement dans le tampon PB. Le prétraitement des cellules avec le dendrimère a multiplié par 4 le coefficient de perméabilité du 5FU dans le MO et par 2,5 dans l'IPM et cela augmente avec le temps du prétraitement, tandis qu'il a diminué de moitié dans le PB. Par conséquent, le prétraitement avec les dendrimères a augmenté la perte d'eau transépidermique et diminué la résistance de la peau (modification de la barrière cutanée), expliquant ainsi l'amélioration de la perméation cutanée du 5FU.

Le dendrimère PAMAM a été également utilisé comme support du 8-méthoxypsoralen (8-MOP) pour faciliter sa pénétration dans la couche profonde de la peau d'une souris [179]. L'utilisation du dendrimère augmente significativement la concentration de 8-MOP ayant pénétré la peau. Le PAMAM G4 permet d'atteindre une concentration cutanée plus élevée de 8-MOP que le dendrimère PAMAM G3. Une autre étude a aussi montré que les dendrimères PAMAMs peuvent améliorer efficacement la pénétration des anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que le kétoprofène et le diflunisal à travers la peau [186].

En 2017, Volz *et al.* ont étudié l'interaction des tectodendrimères dérivés de PAMAM marqués par l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) avec des tissus de peau humaine. Ils ont démontré par microscopie de fluorescence (FLIM) que les tectodendrimères pénètrent dans la couche cornée de la peau humaine mais ne traversent pas la barrière de la jonction serrée ou la couche basale [187].

Par ailleurs, les effets de l'ionophorèse et de la sonophorèse sur la perméation ou le dépôt de dendrimères peptidiques à travers ou au sein de la peau humaine ont pu démontrer que la perméation cutanée des dendrimères est améliorée par sonophorèse et ionophorèse comparativement aux études de diffusion passive classique [176,178]. Ces dendrimères sont stables pendant 6 h dans l'épiderme et le derme et ce n'est qu'après 24 h que certains dendrimères de petit poids moléculaire pénètrent dans l'épiderme [178].

Des dendrimères peptidiques formés à partir de trois acides aminés - glycine, arginine et lysine - ont été également utilisés pour l'administration cutanée du kétoprofène lié d'une manière covalente avec ces dendrimères [188]. Cette étude réalisée sur la peau de souris *in vivo* et *in vitro* a montré que ces dendrimères ont amélioré la solubilité de kétoprofène et augmenté considérablement la perméabilité cutanée par sonophorèse après 6h. La perméation du 5-fluorouracile à travers l'épiderme humain, assistée par ces dendrimères peptidiques est également améliorée [177], tout comme l'administration transdermique d'antioxydants silibinine et d'épigallocatechine-3- gallate (EGCG) [189].

I.3. Conclusion

Les dendrimères sont une classe de macromolécules connus grâce à leur architecture et leurs propriétés notamment d'encapsulation et de délivrance de substances actives dans différents domaines. Ils sont principalement synthétisés par deux approches, divergente et convergente. La cytotoxicité des dendrimères dépend de la nature de la charge et du nombre de générations.

Leur intérêt pour le domaine cosmétique est indéniable. Ils permettent d'améliorer la perméabilité et la diffusion des principes actifs dans la peau. La nature, la concentration, la charge, la taille et l'hydrophobicité des dendrimères influencent à la fois leur pénétration dans la peau et la délivrance du principe actif. L'étude de leurs interactions avec la peau est primordiale pour mieux comprendre leur activité et pour développer des dendrimères performants et non cytotoxiques. La peau étant un système très complexe, l'utilisation de modèles biomimétiques de peau et plus particulièrement du SC est une approche prometteuse pour obtenir des informations à l'échelle moléculaire.

Chapitre II

**Synthèse de dendrimères biosourcés et
encapsulation des molécules d'intérêt
cosmétique**

Chapitre II : Synthèse de dendrimères biosourcés et encapsulation des molécules d'intérêt cosmétique

II.1. Contexte et objectifs

De nombreux actifs utilisés dans les compositions cosmétiques sont instables et subissent des oxydations ou des dégradations par effet de l'air, de la lumière, du pH et/ou de la chaleur par exemple. C'est dans ce contexte que nous souhaitons utiliser des dendrimères biosourcés pour l'encapsulation des composés d'intérêt cosmétique sensibles.

Au cours de ce chapitre, nous allons dans un premier temps décrire la synthèse de dendrimères à base de glycérol (familles GAD et GCD) et la fonctionnalisation des dendrimères commerciaux PPIs et PAMAMs par du carbonate de glycérol. Dans un second temps, nous étudierons la capacité d'encapsuler les actifs cosmétiques telles que la caféine, la DHA et la vitamine C puis nous montrerons les interactions encapsulés/encapsulants par la technique de RMN. Nous terminerons ce chapitre par l'étude de la toxicité des dendrimères synthétisés.

II.2. Résultats et discussion

1. Synthèse de dendrimères biosourcés.

La synthèse de quatre types de dendrimères biosourcés a été réalisée en s'inspirant de la thèse de B. Menot, intitulée « Dendrimères dérivés du glycérol : Synthèses et Applications » (Université de Reims, 2015). Les quatre premières générations de GlycéroDendrimère PolyPropylèneImine (GD-PPI) et de GlycéroDendrimère PolyAMidoAMine (GD-PAMAM), ainsi que les trois premières générations de GlycéroClickDendrimère (GCD) et de GlycérolADendrimère (GAD) ont été obtenues avec de bons rendements [1], [4],[50],[51], [6].

1.1. Synthèse de GlycéroDendrimère-Poly(PropylèneImine) (GD-PPIs)

Les quatre premières générations de GD-PPI (**Figure 18**) ont été synthétisées à partir de produits commerciaux par réaction du carbonate de glycérol avec les PPIs (**Schéma 1**). Les réactions sont réalisées avec un excès de carbonate de glycérol dans

le méthanol en présence de triéthylamine [1]; d'autres réactions ont été réalisées dans l'éthanol supprimant ainsi l'utilisation du méthanol. Un large excès de carbonate de glycérol (2,5 éq./NH₂) est utilisé dans ces réactions dans l'objectif de favoriser un greffage complet des fonctions amines terminales. Les rendements sont supérieurs à 70% (**Tableau 3**).

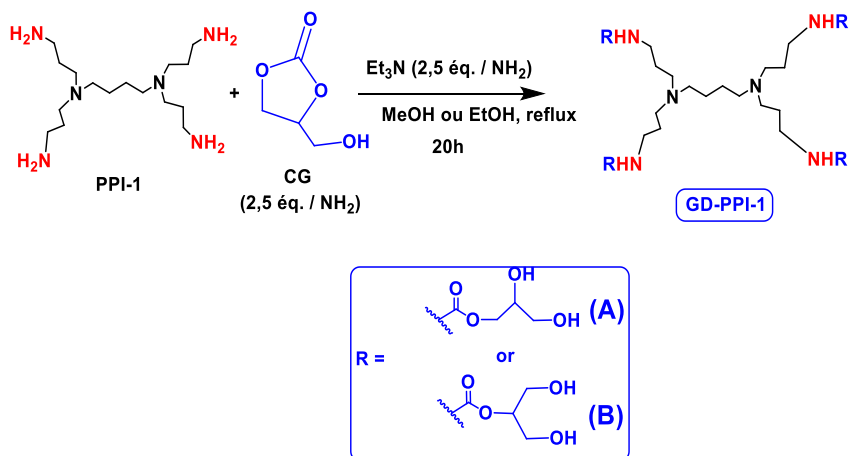


Schéma 1 : Synthèse de GlycéroDendrimère-Poly(PropylenImine) de génération 1 (GD-PPI-1)

Tableau 3 : Rendements de synthèses des GD-PPIs en présence de 2,5 éq. de carbonate de glycérol par fonction NH₂ et 2,5 éq. de triéthylamine par fonction NH₂, à reflux dans le méthanol, pendant 20h

<i>GD-PPI</i>	<i>Rdt (%)</i>	<i>Fonctions Terminales OH</i>
G1	80	8
G2	70	16
G3	85	32
G4	75	64

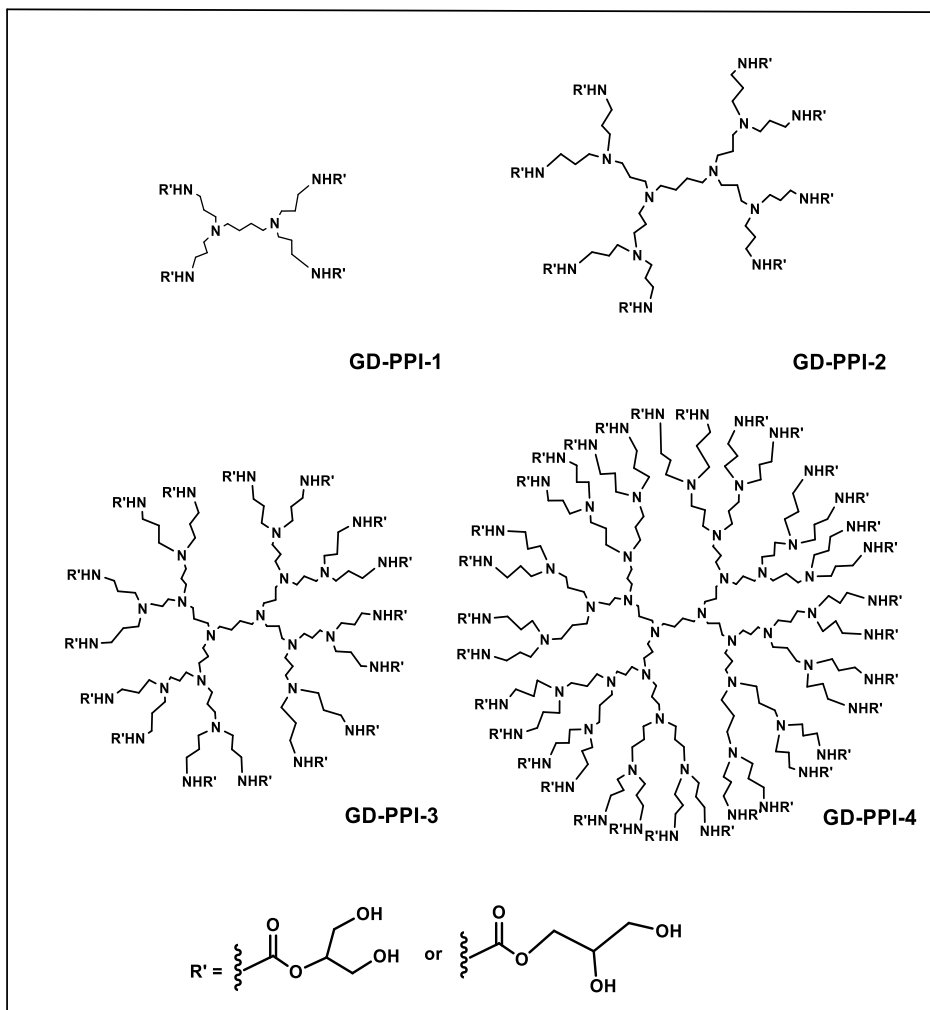
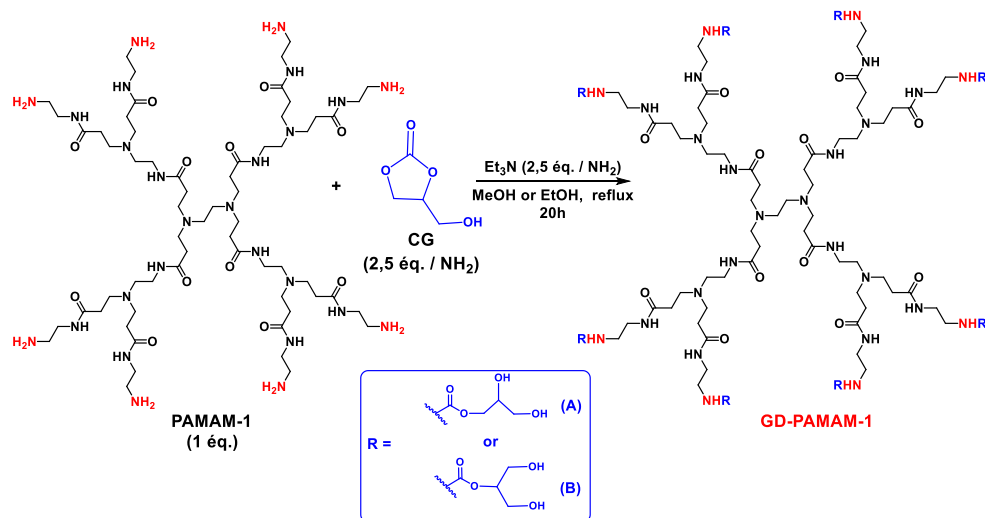


Figure 18 : Structures des quatre générations de dendrimères GD-PPI

1.2. Synthèse de GlycéroDendrimère-Poly(AMidoAMIne) GD-PAMAMs

Les quatre premières générations de GD-PAMAM (**Figure 19**) ont été synthétisées à partir de produits commerciaux par réaction du carbonate de glycérol avec les PAMAMs (**Schéma 2**). Les réactions sont réalisées avec un excès de carbonate de glycérol dans le méthanol ou de l'éthanol en présence de triéthylamine [4], un large

excès de carbonate du glycérol (2,5 éq./NH₂) permettant de favoriser un greffage complet des fonctions amines terminales. Les rendements sont supérieurs à 70% (**Tableau 4**).



Sch\u00e9ma 2 : Synth\u00e8se de Glyc\u00e9roDendrim\u00e8re-Poly(AMidoAMine) de g\u00e9n\u00e9ration 1 (GD-PAMAM-1)

Tableau 4 : Rendements de synth\u00e8ses des GD-PAMAMs en pr\u00e9sence de 2,5 \u00e9q. de carbonate de glyc\u00e9rol par fonction NH₂ et 2,5 \u00e9q. de tri\u00e9thylamine par fonction NH₂, \u00e0 reflux, dans le m\u00e9thanol, pendant 20h

<i>GD-PAMAM</i>	<i>Rdt (%)</i>	<i>Fonctions Terminales OH</i>
G0	70	8
G1	85	16
G2	87	32
G3	90	64

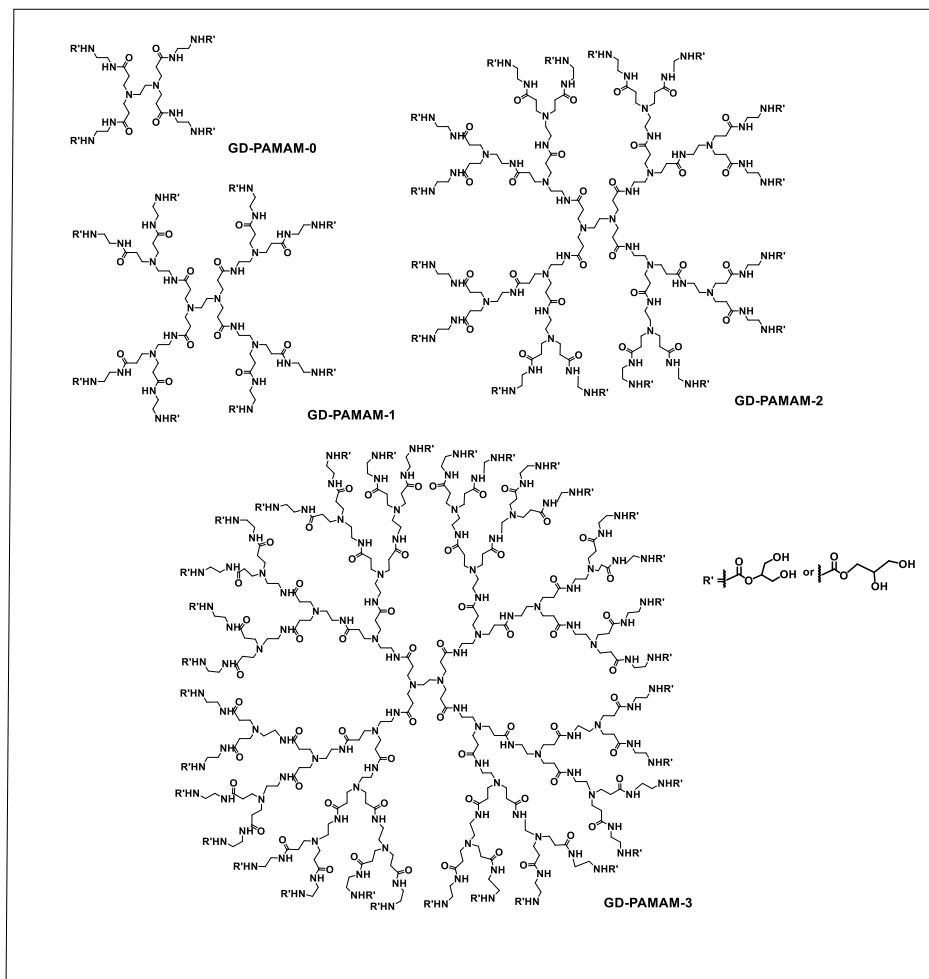


Figure 19 : Structures des quatre générations de dendrimères GD-PAMAM

1.3. Synthèse de GlycéroClickDendrimères (GCD)

Les trois premières générations ont été synthétisées à partir du glycérol. Les synthèses sont longues (de 4 à 7 jours) et les rendements varient de 30 à 50% selon les générations [50]. [6]

La première génération est obtenue en quatre étapes (**Schéma 3**) : l'azoture du 1,2-isopropylidène-glycérol (I.3) est préparé en deux étapes ; parallèlement, la synthèse du trialcyne de glycérol (I.4) est réalisée. Les deux composés obtenus sont couplés entre eux par une réaction de Click, ce qui conduit au composé I.5 puis la déprotection

des groupements acétals conduit au composé I.6 appelé GCD-1. Certains réactifs sont utilisés en excès afin de favoriser le greffage complet des groupements terminaux.

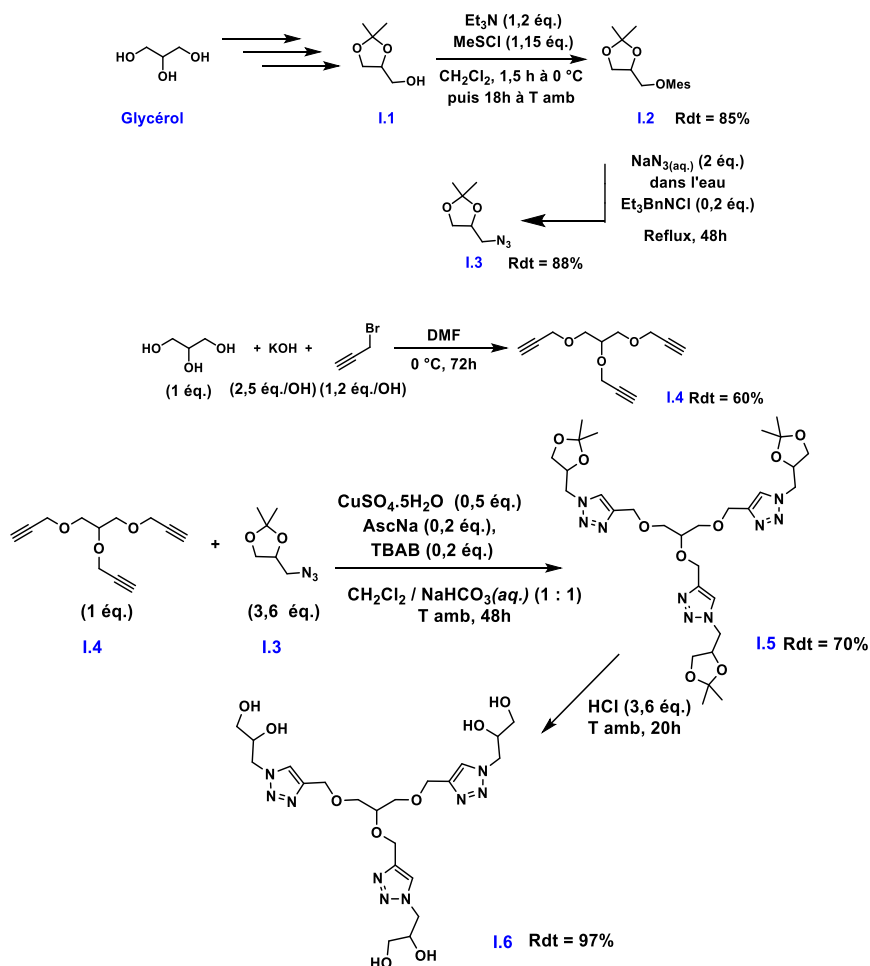


Schéma 3 : Synthèse du glycéroclickdendrimère de génération 1 (I.6 = GCD-1)

La synthèse des composés de deuxième et troisième génération respectivement nommé I.9 et I.12 (GCD-2 et GCD-3) a été réalisée en suivant le même protocole que celui suivi pour la première génération (**Schéma 4**).

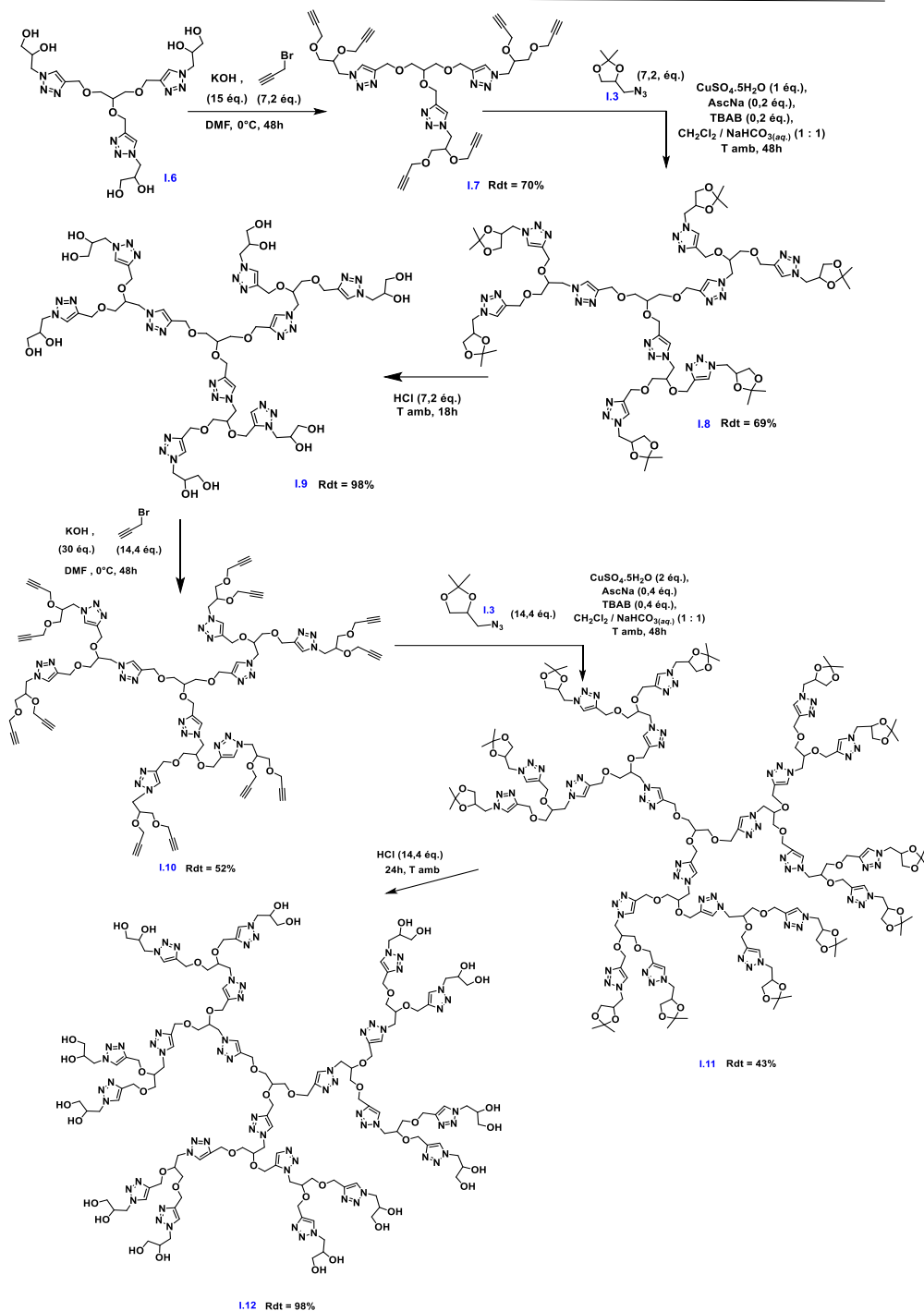


Schéma 4 : Synthèse des glycéroclickdendrimères de génération 2 et 3 (I.9 et I.12 = GCD-2 et GCD-3)

1.4. Synthèse de GlycérolADendrimères (GAD)

Les trois premières générations ont été synthétisées à partir du glycérol. Les synthèses sont très longues (de 5 à 7 jours) et les rendements sont faibles notamment pour la première génération, car plusieurs étapes de purification ont été réalisées [51]-[6]. Les réactions ont été effectuées seulement en deux étapes (**Schéma 5**) qui consistent en la synthèse du trialcène de glycérol II.1 suivie d'une dihydroxylation des fonctions alcènes terminales conduisant au composé II.2 nommé GAD-1. Nous avons cherché à améliorer les synthèses décrites au laboratoire et dans le brevet [51] en modifiant certains paramètres comme la température. Il est à noter que la réaction peut se faire à température ambiante sans influencer le rendement. La substitution de l'AD mix (oxydant coûteux) par le KMnO_4 n'a pas permis d'obtenir de bons rendements (rendements de 10%). Les composés de générations 2 et 3 (II.4 et II.6) nommés respectivement GAD-2 et GAD-3 sont obtenus par la même séquence réactionnelle à partir de II.2 (GAD-1) (**Schéma 6**).

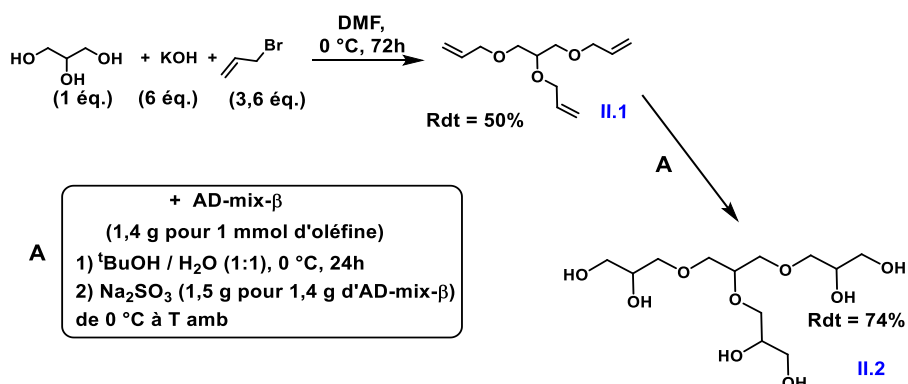


Schéma 5 : Synthèse du glycéroladendrimère de génération 1 (II. 2 = GAD-1)

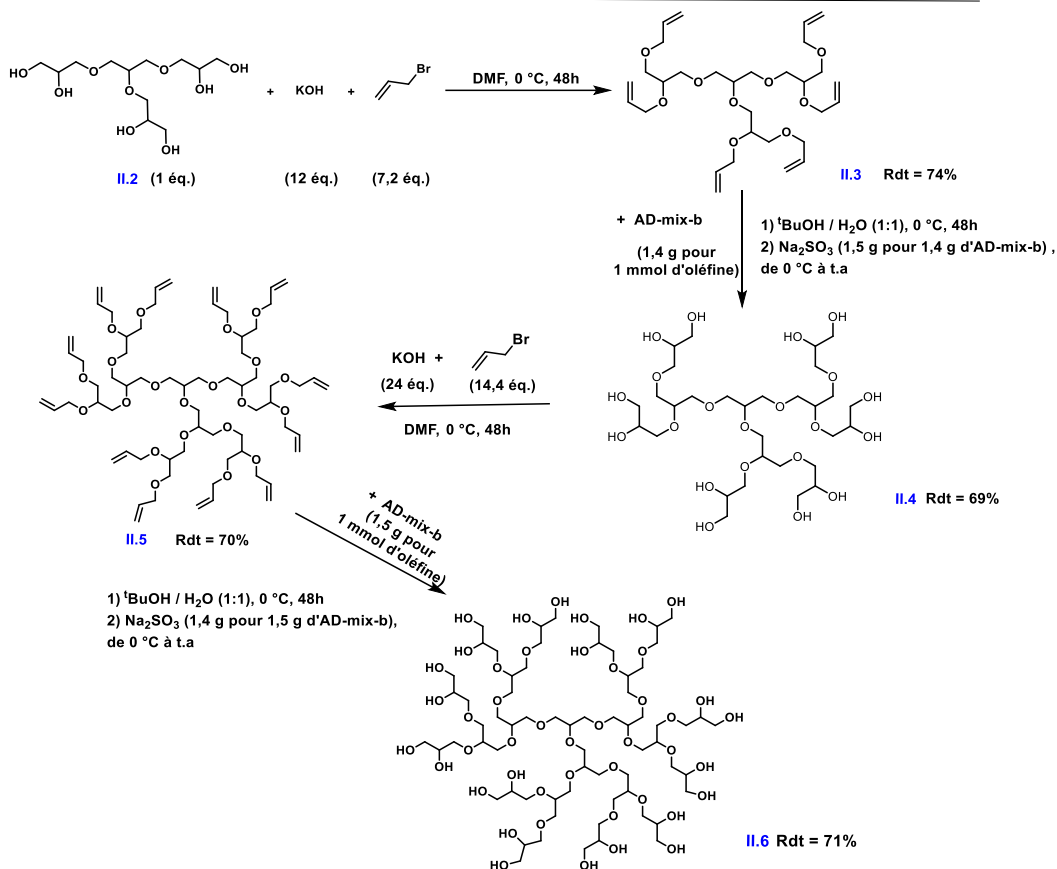
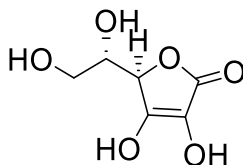


Schéma 6 : Synthèse des glycéroladendrimères de génération 2 et 3 (II.4 et II.6 = GAD-2 et GAD-3)

2. Encapsulation des molécules d'intérêt cosmétique par les dendrimères

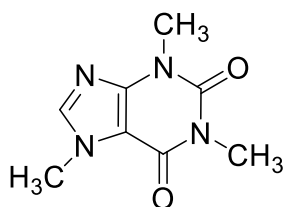
La capacité des dendrimères précédemment synthétisés à encapsuler des molécules d'intérêt cosmétique a été étudiée avec trois molécules actives, (i) la vitamine C (acide *L*-ascorbique) connue pour son effet antioxydant, la caféine pour son effet minceur et le dihydroxyacétone (DHA) pour son effet autobronzant. Ensuite, dans le but d'élargir un peu nos recherches, nous avons testé d'autres molécules telles que le *D*-érythrose (agent autobronzant), le difluorométhylornithine (DFMO) (agent utilisé pour réduire la pilosité) et l'acide thioglycolique (TGA) (utilisé dans des crèmes dépilatoires).

La vitamine C : (C₂H₈O₆)



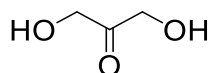
La vitamine C participe à de nombreux processus biologiques et physiologiques et elle est essentielle pour l'organisme [190]. La vitamine C possède de nombreuses propriétés. Connue pour ses actions toniques et anti-fatigue, elle participe aux défenses de l'organisme et joue un rôle dans la lutte contre les infections [191]. La vitamine C, nécessaire à la synthèse du collagène dans la peau, est aussi indispensable à la cicatrisation des plaies [192]. C'est également un puissant antioxydant et un agent anti-radicalaire qui protège l'organisme des radicaux libres, prévenant ainsi les dommages oxydatifs et le vieillissement [193]. Cependant, la vitamine C est un composé fragile, facilement dégradée en composés biologiquement inactifs tels que l'acide hydro-3-pyrone-1,2 et l'acide furoïque par l'action de la lumière, de la chaleur ou de l'oxygène de l'air [194].

La caféine : (C₈H₁₀N₄O₂)



La caféine est un composé amphiphile qui a un effet lipolytique important et est un agent très utilisé, principalement dans le secteur des cosmétiques [195]. La caféine est utilisée comme composé actif dans les produits anti-cellulite. Elle a une action lipolytique, elle agit sur la combustion des graisses [196]. Elle a des propriétés anti-oxydantes qui protègent les cellules contre les rayons UV en ralentissant le processus de photo-vieillessement de la peau en augmentant la microcirculation du sang dans la peau. Elle stimule aussi la croissance des cheveux [197].

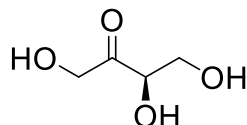
La dihydroxyacétone (DHA) :
C₃H₆O₃



La dihydroxyacétone (DHA), également appelée dihydroxy-2-propanone est un produit couramment utilisé en cosmétique comme agent de bronzage artificiel de la

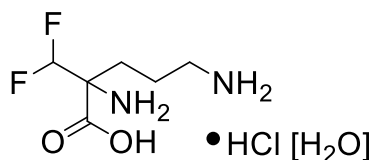
peau. Il s'agit d'un sucre à trois atomes de carbone, formellement un dérivé du glycérol, non toxique et qui ne s'adsorbe pas à travers la peau [198]. Ce composé permet d'obtenir un effet de bronzage d'apparence semblable à celui qui peut résulter d'une exposition prolongée au soleil (bronzage naturel) ou sous une lampe UV. La DHA est stable sous forme de poudre cristalline mais lorsqu'elle est dissoute dans l'eau, elle se tautomérise progressivement en glycéraldéhyde [198]. C'est la première étape d'un processus de dégradation qui augmente avec le pH et la température. Son interaction avec la plupart des ingrédients cosmétiques limite la durée de conservation des produits finis. En effet, la réaction de la DHA avec les acides aminés de la peau n'est pas immédiate et la coloration cutanée n'apparaît que quelques heures (environ 3 heures) après l'application [19].

Le *D*-érythrose ($C_4H_8O_4$)



Le *D*-érythrose est un type de sucre que l'on trouve dans les fruits rouges. Il est de couleur rougeâtre et de saveur acidulée et disponible dans le commerce sous forme d'un liquide clair, jaune et visqueux. C'est un produit qui est couramment utilisé en cosmétique comme agent de bronzage artificiel de la peau [199]. Il a tendance à retenir l'humidité ou les molécules d'eau et il hydrate la peau tout en lui donnant une action bronzante [200]. Il réagit avec les groupements amine des kératines et forme des mélanoides ou des polymères brunâtres sur la peau, qui donnent un bon effet bronzant sur la peau. Il est généralement utilisé en association avec le DHA pour un bronzage beaucoup plus attrayant et plus naturel [201].

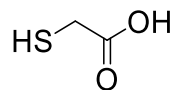
Le difluorométhylornithine (DFMO) : ($C_6H_{12}F_2N_2O_2 \cdot HCl \cdot H_2O$)



L'éflornithine ou (α -difluorométhylornithine, DFMO) est une molécule susceptible d'agir contre la maladie du sommeil appelée trypanosomiase africaine [202] qui est utilisé en dermatologie ou en cosmétique pour limiter la croissance pileuse (l'hirsutisme) [203]. Il agit comme un inhibiteur irréversible de la L-ornithine décarboxylase (ODC), une enzyme qui stimule la production de polyamines à partir

de l'ornithine ou de la lysine. Ces polyamines stimulent la prolifération des cellules matricielles dans le bulbe et la tige du follicule pileux, favorisant ainsi la croissance des cheveux [204]. Il a été aussi identifié comme un inhibiteur puissant de la croissance et la viabilité des cellules cancéreuses du côlon [205].

L'acide thioglycolique (TGA) :
(C₂H₄O₂S)



L'acide thioglycolique est un liquide incolore qui possède une odeur forte et désagréable. Il est utilisé dans les formulations cosmétiques comme modificateurs de structure de la kératine pour les produits de permanentes ou de décrêpage. Il est aussi présent dans de nombreuses formulations de crèmes dépilatoires [206], dans la production pharmaceutique pour la stabilisation de la solution de pémétréxed (anti-cancéreux) par exemple [207] et en tant que stabilisateur pour le polychlorure de vinyle (PVC) [208]. Il est également utilisé désormais comme agent stabilisant des nanoparticules de Cadmium/Telluride (Cd/Te) utilisées comme sondes fluorescentes pour la détermination quantitative de l'adénine et de la guanine [209]. Cependant, le TGA est un réducteur fort qui est facilement oxydé par exposition à l'air et donc, incompatible avec les oxydants forts, les bases et les métaux réactifs comme les alcalins et alcalino-terreux.

En s'inspirant des travaux précédents réalisés au laboratoire sur l'encapsulation des polluants organiques par B. Menot *et al.* en 2015 [4], plusieurs tests de capacité d'encapsulation de deux types de dendrimères, les GD-PPIs et les GD-PAMAMs, ont été réalisés dans l'eau à température ambiante selon le mode opératoire décrit sur le **schéma 7**. Le dendrimère et la molécule active sont solubilisés dans l'eau et agités pendant 0,5 à 48h. La solution résultante est ensuite filtrée au travers une membrane de dialyse. Le mélange restant dans la membrane de dialyse est enfin évaporé sous pression réduite. La quantité de substrat encapsulée est ensuite déterminée par gravimétrie et l'encapsulation est confirmée par RMN. Les tests d'encapsulation sont répétés trois fois.

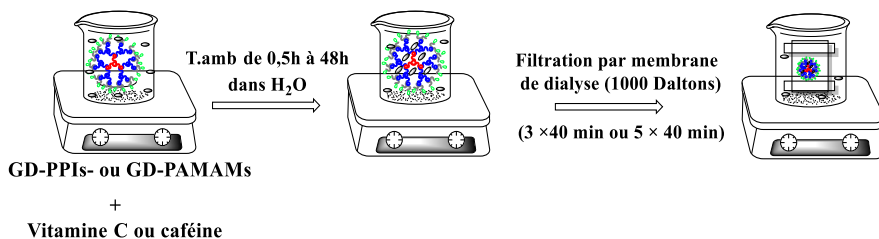


Schéma 7 : Procédé d'encapsulation d'actifs cosmétiques dans les dendrimères

2.1. Encapsulation de la vitamine C

Plusieurs tests d'encapsulation de la vitamine C dans les dendrimères GD-PPIs et GD-PAMAMs de générations différentes ont été réalisés dans l'eau à température ambiante selon le procédé décrit sur le schéma 7. Les résultats d'encapsulation de la vitamine C et la confirmation de celle-ci par RMN seront présentés dans l'article inclus dans le chapitre IV.

2.2. Encapsulation de la caféine

Plusieurs tests d'encapsulation de la caféine dans les dendrimères GD-PPIs et GD-PAMAMs de générations différentes ont été réalisés dans différentes conditions (Schéma 8) en suivant le même protocole que celui précédemment décrit. Les résultats de l'étude sont résumés dans le tableau 5. Le nombre d'équivalents encapsulés est calculé par gravimétrie après filtration au travers d'une membrane de dialyse de 1000 Daltons, qui permet d'éliminer la caféine non encapsulée.

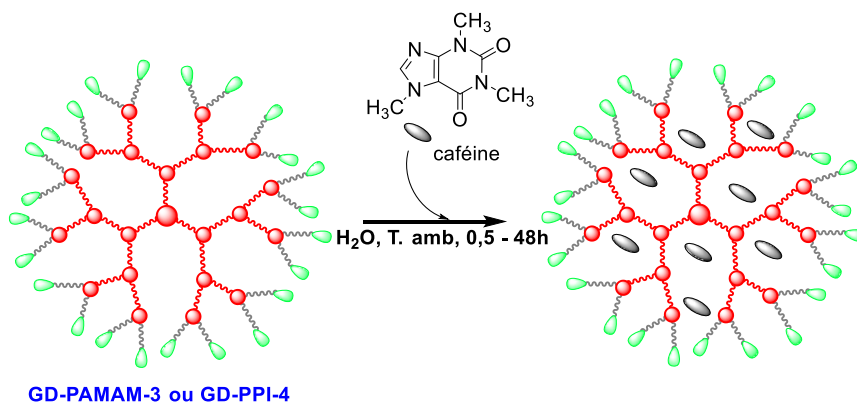


Schéma 8 : Encapsulation de la caféine dans les dendrimères

Tableau 5 : Résultats d'encapsulation de la caféine

Caféine C (mg)	Dendrimères (mg)	Nombre de fonctions 'N'	Caféine encapsulée (mg)	Caféine encapsulée (éq.)	Temps de contact (h)	Temps de dialyse (min)
537	<u>GD-PPI-2</u> (47)	14	14	3	20	6 x 60
186	<u>GD-PPI-4</u> (70)	62	3	2	20	6 x 60
99,7	<u>GD-PPI-4</u> (35,5)	62	33,5	35	20	5 x 40
99,7	<u>GD-PAMAM-3</u> (35,5)	122	26,5	27	20	5 x 40
56	<u>GD-PAMAM-3</u> (31)	122	5,6	10	20	6 x 60

Les résultats d'encapsulation obtenus par gravimétrie montrent que la caféine est encapsulée dans les deux familles de dendrimère GD-PPI et GD-PAMAM (35 éq. et 27 éq., respectivement) après une dialyse de 5 x 40 min. Elle est très peu encapsulée ou non encapsulée pour une dialyse de 6 x 60 min. Une dialyse de 5 x 40 min a été réalisée avec la même quantité de caféine seule (sans dendrimère) comme témoin pour s'assurer que la caféine libre sorte complètement de la membrane en absence de dendrimère pour ce temps de dialyse. Aucune trace de caféine n'a été trouvée dans la membrane après évaporation. Ces résultats peuvent suggérer donc deux hypothèses : soit la quantité de caféine obtenue pour 5 x 40 min de dialyse en présence du dendrimère est bien la caféine encapsulée et au bout de 6h de dialyse (en solution), elle se relargue et passe au travers de la membrane, ou bien cette quantité est due à celle de la caféine libre (non encapsulée) qui ne sort pas complètement de la membrane en présence de dendrimère à un temps réduit à cause de l'encombrement induit par le dendrimère.

Les analyses RMN 1D et 2D ne montrent pas non plus d'interaction qui pourrait confirmer l'encapsulation de la caféine. Comme les dendrimères piègent une quantité d'eau croissante selon les générations (pic d'eau important en RMN même après lyophilisation), les cavités internes sont donc moins disponibles à l'encapsulation.

2.3. Encapsulation de DHA et d'autres molécules d'intérêt cosmétique

Les résultats gravimétriques des tests d'encapsulation de la dihydroxyacétone (DHA) dans les GD-PPIs et GD-PAMAMs suivant le protocole précédent (**Schéma 7**), ne montrent aucune encapsulation dans aucun dendrimère testé et aucun déplacement en RMN n'est observé. D'autres pics par contre apparaissent en RMN ^1H et ^{13}C , probablement dû à la présence d'autres formes isomères ou dimères de DHA en milieu aqueux [210], [211].

L'encapsulation d'autres molécules d'intérêt cosmétique a aussi été testée. L'encapsulation du *D*-érythrose dans le GD-PAMAM-3 a été testée dans l'eau deutérée (Vortex à température ambiante pendant 30 min). L'analyse RMN ^1H ne montre aucun déplacement de signal pouvant correspondre à une interaction entre le dendrimère et cette molécule. Nous avons aussi testé l'encapsulation de difluorométhylornithine (DFMO) et l'acide thioglycolique (TGA) dans le dendrimère GD-PAMAM-3. Les encapsulations ont été réalisées dans l'eau à température ambiante et trois filtrations à travers une membrane de dialyse de 1000 Daltons (3×50 min) ont été réalisées. Les résultats d'encapsulation obtenus par gravimétrie montrent que 8 équivalents de DFMO et 58 équivalents de TGA ont été encapsulés. Les analyses RMN 1D et 2D ne confirment pas l'encapsulation de ces deux molécules car on n'observe aucun déplacement correspondant à l'interaction du dendrimère avec la DFMO, alors qu'avec le TGA, on observe une diminution de nombre de pics de carbones qui correspond au CO d'amides, probablement due à la rupture de liaisons amides par la présence de TGA ($\text{pK}_a = 3,8$). De nouveaux pics apparaissent effectivement en RMN ^1H et ^{13}C . Ils correspondent probablement aux produits de dégradation de l'acide en présence de l'air (**Figure 20**).

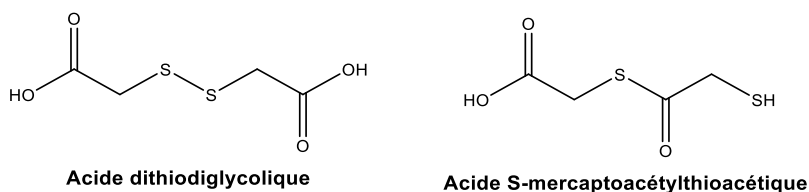


Figure 20 : Produits de dégradation de l'acide thioglycolique

Nous pouvons noter que la présence de dendrimère commercial PPI en solution avec de l'acide thioglycolique conduit à une réaction acido-basique entre les fonctions amines primaires terminales et la fonction acide. En effet, en infra-rouge, nous observons la disparition d'une bande forte ν_{CO} de TGA à 1701 cm^{-1} et l'apparition de

deux bandes fortes ν_{CO} d'acide ionisé vers $1650-1460\text{ cm}^{-1}$ et $1400-1300\text{ cm}^{-1}$. Cette observation pourrait contribuer à une nouvelle voie de fonctionnalisation de PPIs avec de l'acide thioglycolique (comme ce qui a été fait avec les acides phénoliques dans le chapitre 3).

3. Approche physico-chimique – compréhension des interactions lors de l'encapsulation (RMN)

La Spectroscopie de Résonance Magnétique (RMN) permet de déterminer la présence éventuelle d'interactions entre deux molécules. Les caractéristiques RMN (relaxation et diffusion) des molécules sont, en effet, différentes lorsqu'elles sont encapsulées ou libres [212]. Une variation de leurs déplacements chimiques montre également une interaction. Il peut y avoir aussi un échange lent, intermédiaire ou rapide, de petites molécules libres ou liées. Dans le cas d'échange rapide, la quantification d'interaction semble impossible ; c'est le cas avec un excès de vitamine C. Ainsi, plusieurs analyses ont été réalisées pour l'étude de l'encapsulation de la vitamine C dans le GD-PAMAM et GD-PPI, par RMN 1D et 2D. Ces résultats seront présentés dans l'article dans le chapitre IV.

4. Cytotoxicité des dendrimères

L'application ciblée de nos dendrimères étant la cosmétique, des fibroblastes dermiques humains ont été utilisés pour évaluer leur cytotoxicité. Le test WST1 a été utilisé pour mesurer la viabilité des cellules après traitement des quatre familles de dendrimères GD-PPIs, GD-PAMAMs, GlyeroClickDendrimers (GCDs) and GlycerolADendrimers (GADs) à différentes concentrations. Le test WST1 (Water Soluble Tetrazolium) est une méthode basée principalement sur la réduction du sel de tétrazolium en formazan par les enzymes oxydoréductases mitochondriales NADH dans les cellules vivantes [121]. La coloration des cellules par le test du cristal violet permet de mesurer la densité cellulaire pour confirmer les résultats du test WST1. Les résultats de cytotoxicité des deux familles de dendrimères GD-PAMAM-3 et GD-PPI G3 et G4 seront présentés dans l'article inclus dans le chapitre IV. Aucun effet cytotoxique n'a été observé avec les GCDs et GADs pour les différentes générations pour l'ensemble des concentrations testées (de $0,001\text{ }\mu\text{g/mL}$ à 1 mg/mL) (**Figure 21 (a), (b)**). Ces résultats suggèrent que ces dendrimères pourront être utilisés en cosmétique.

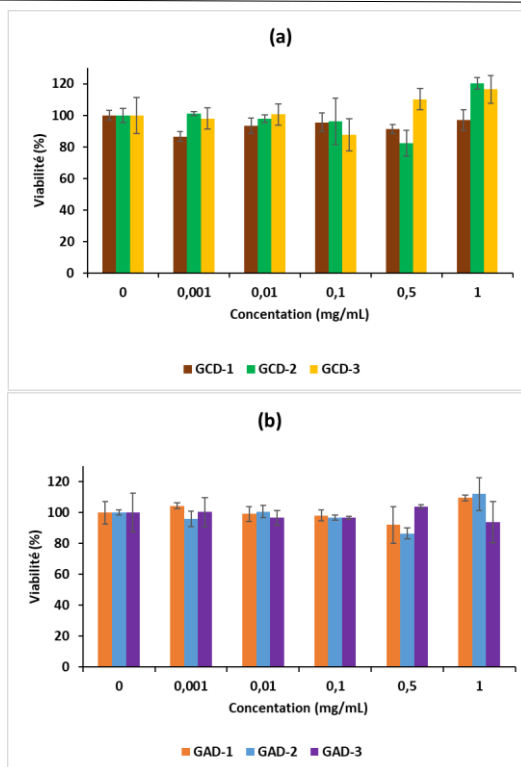


Figure 21 : Effet cytotoxique de (a) GCD-G1, G2 et G3), (b) GAD-G1, G2 et G3 sur des fibroblastes dermiques humains en utilisant la méthode de réduction WST1

II.3. Conclusion

Dans ce chapitre, la synthèse de quatre types de dendrimères biosourcés a été décrite selon des méthodes mises au point au laboratoire [1], [4], [50], [51], [6]. Les quatre premières générations de GlycéroDendrimère PolyPropylenImine (GD-PPI) et de GlycéroDendrimère AMidoAmine (GD-PAMAM) ont été obtenues avec des rendements supérieurs à 70 % par réaction de PAMAMs et PPIs commerciaux avec un excès du carbonate de glycérol. Les trois premières générations de GlycéroClickDendrimère (GCD) et de GlycérolADendrimère (GAD) ont été obtenues par une méthode divergente en utilisant le glycérol comme base.

La capacité de GD-PPIs et GD-PAMAMs à encapsuler la vitamine C a été étudiée et caractérisée par analyse RMN. Le GD-PAMAM-3 a une capacité d'encapsulation supérieure à celle du PAMAM-3 commercial et à celles des différents dendrimères de type GD-PPI. Plusieurs autres encapsulations de molécules d'intérêt cosmétique (Caféine, DHA, Difluoromethylornithine (DFMO), Acide Thioglycolique (TGA), et

D-érythrose) ont aussi été étudiées dans le GD-PAMAM-3 mais sans preuve (gravimétrie/RMN) d'encapsulation.

La cytotoxicité des quatre familles de dendrimères a été évaluée sur des fibroblastes dermiques humains selon deux méthodes : (i) la réduction d'un sel de tétrazolium (WST1) par les oxydo-réductases mitochondriales et (ii) la coloration des cellules avec du cristal violet. Les dendrimères GCDs, GADs et GD-PAMAM-3 n'ont aucune cytotoxicité, tandis que les GD-PPIs présentent un effet cytotoxique à des concentrations supérieures ou égales à 0,25 mg/mL.

II.4. Appareillages et partie expérimentale

1. Appareillages

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés sur un appareil BRUKER de type AVANCE NEO 500 équipé d'une sonde SP BB&19F/1H (^1H 500,13 MHz, ^{13}C 125,76 MHz). Les analyses RMN ^{13}C ont été réalisées avec découplage du proton. Les solvants utilisés sont le chloroforme deutéré (CDCl_3), l'eau deutérée (D_2O) ou le méthanol deutéré CD_3OD . Les déplacements chimiques sont notés en ppm; les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hertz. La multiplicité des signaux est donnée avec les abréviations suivantes : s singulet, d doublet, t triplet, q quadruplet, qt quintuplet, m multiplet, dd doublet de doublet, dq doublet de quadruplet, ddd doublet de doublet de doublet et ddt doublet de doublet de triplet.

Les dialyses sont réalisées en employant des membranes "Spectra/Por" de Spectrum Laboratories de seuil de coupure de 1000 Da conservées dans une solution d'azote de sodium à 0,05 %.

Les lyophilisations sont effectuées avec un lyophilisateur "Power Dry LL3000" de Heto.

Les schémas sont obtenus à l'aide d'un logiciel ChemDraw Professional 16.0.

2. Partie expérimentale

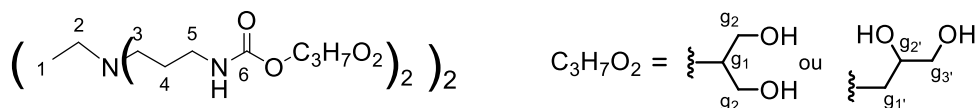
2.1. Synthèses des dendrimères

2.1.1. Synthèses du GlycéroDendrimère-Poly(PropylenImine) (GD-PPI) [1]

Dans un ballon bicol contenant 1 éq. de PPI-n dissous dans le méthanol ou l'éthanol (20 mL), du carbonate de glycérol (2,5 éq. par NH_2) et de la triéthylamine (2,5 éq. par

NH₂) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est porté à reflux, sous atmosphère inerte, pendant 20 heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit brut est dissous dans un minimum de Méthanol puis précipité 3 fois avec un excès d'un mélange de pentane / AcOEt 2 : 1 (v / v). Le résidu est séché sous pression réduite puis dissous de nouveau dans un minimum d'eau distillée puis purifié par dialyse (cutoff 1000 daltons) plusieurs fois dans de l'eau distillée. Le produit est obtenu sous forme d'une huile jaune orangé.

GD-PPI-1 C₃₂H₆₄N₆O₁₆, 788,88 g.mol⁻¹:

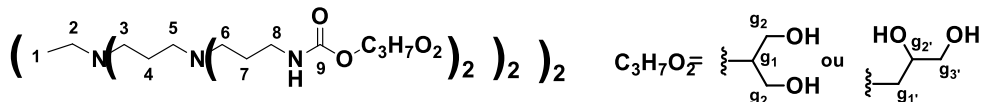


Rdt : 80%

RMN ¹H (500 MHz, D₂O, 298 K) : δ (ppm) = 1,34-1,35 (4H, m, H₁) ; 1,53-1,67 (8H, m, H₄) ; 2,40-2,61 (12 H, m, H₂, H₃) ; 2,99-3,12 (8 H, m, H₅) ; 3,41-4,15 (20 H, m, H groupement glycérol : 3,59 (11 H, m, g₁, g₂, g_{1'}) ; 3,91 (3 H, m, g₂) ; 4,04-4,15 (6 H, m, g_{3'})).

RMN ¹³C (125 MHz, D₂O, 298 K) : δ (ppm) = 22,8 (C₁) ; 25,0 (C₄) ; 38,4 (C₅) ; 50,2 (C₃) ; 60,4 (C₂) ; 62,1 (g₂) ; 65,6 (g_{3'}) ; 69,7 (g_{1'}) ; 72,0 (g₂) ; 75,5 (g₁) ; 158,1 (C₆) ; 158,3 (C_{6'}).

GD-PPI-2 C₇₂H₁₄₄N₁₄O₃₂, 1718 g.mol⁻¹:

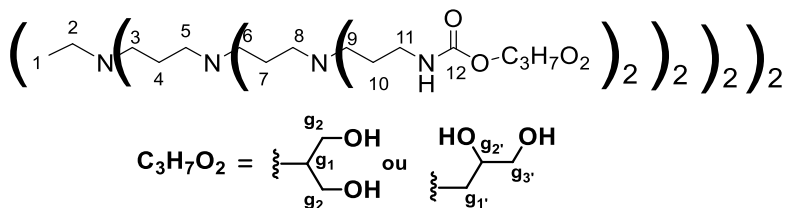


Rdt : 70%

RMN ¹H (500 MHz, D₂O, 298 K) : δ (ppm) = 1,46-1,57 (4H, m, H₁) ; 1,59-1,81 (24H, m, H₄, H₇) ; 2,39-2,69 (36 H, m, H₂, H₃, H₅, H₆) ; 3,08-3,23 (16 H, m, H₈) ; 3,49-4,20 (40 H, m, H groupement glycérol : 3,59 (22 H, m, g₁, g₂, g_{1'}) ; 3,91 (6 H, m, g₂) ; 4,04-4,20 (12 H, m, g_{3'}))

RMN ¹³C (125 MHz, D₂O, 298 K) : δ (ppm) = 22,6 (C₁) ; 25,3 (C₄, C₇) ; 38,4 (C₈) ; 50,4 (C₃, C₆) ; 60,5 (C₂, C₅) ; 62,2 (g₂) ; 65,7 (g_{3'}) ; 69,8 (g_{1'}) ; 72,0 (g₂) ; 75,5 (g₁) ; 158,1 (C₉) ; 158,4 (C_{9'}).

GD-PPI-3 C₁₅₂H₃₀₄N₃₀O₆₄, 3576 gmol⁻¹:

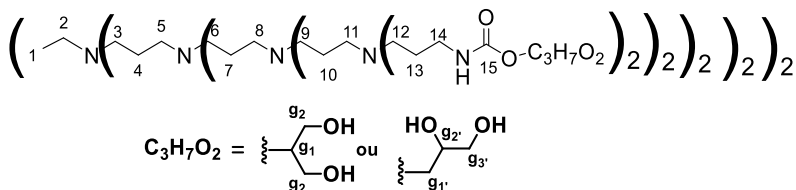


Rdt : 85%

RMN ¹H (500 MHz, D₂O, 298 K) : δ (ppm) = 1,32-1,45 (4H, m, H₁) ; 1,45-1,74 (56H, m, H₄, H₇, H₁₀) ; 2,14-2,68 (84 H, m, H₂, H₃, H₅, H₆, H₈, H₉) ; 2,88-3,21 (32 H, m, H₁₁) ; 3,41-4,17 (80 H, m, H groupement glycérol) ; 3,59 (44 H, m, g₁, g₂, g_{1'}) ; 3,91 (12 H, m, g₂) ; 3,9-4,17 (24 H, m, g_{3'}).

RMN ¹³C (125 MHz, D₂O, 298 K) : δ (ppm) = 21,8 (C₁) ; 25,5 (C₄, C₇, C₁₀) ; 38,8 (C₁₁) ; 50,4 (C₃, C₆, C₉) ; 51,2 (C₂, C₅, C₈) ; 60,5 (g₂) ; 62,2 (g_{3'}), 65,7 (g_{1'}) ; 69,8 (g_{2'}) ; 75,6 (g₁) ; 158,0 (C₁₂) ; 158,2 (C_{12'}).

GD-PPI-4 C₃₁₂H₆₂₄N₆₂O₁₂₈, 7293 gmol⁻¹:



Rdt : 75%

RMN ¹H (500 MHz, D₂O, 298 K) : δ (ppm) = 1,39-1,77 (124H, m, H₁, H₄, H₇, H₁₀, H₁₃) ; 2,20-2,62 (180 H, m, H₂, H₃, H₅, H₆, H₈, H₉, H₁₁, H₁₂) ; 2,91-3,16 (64 H, m, H₁₄) ; 3,41-4,15 (160 H, m, H groupement glycérol) ; 3,59 (84 H, m, g₁, g₂, g_{1'}) ; 3,91 (26 H, m, g₂) ; 3,92-4,15 (52 H, m, g_{3'}).

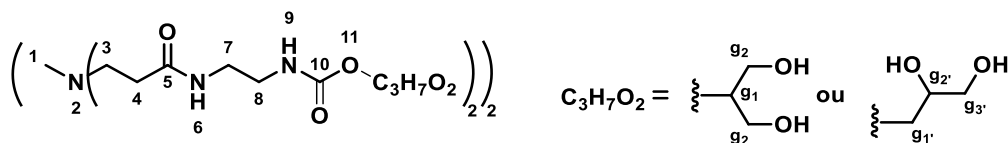
RMN ¹³C (125 MHz, D₂O, 298 K) : δ (ppm) = 21,7 (C₁) ; 25,5 (C₄, C₇, C₁₀, C₁₃) ; 38,8 (C₁₄) ; 50,4 (C₃, C₆, C₉, C₁₂) ; 51,2 (C₂, C₅, C₈, C₁₁) ; 60,5 (g₂) ; 62,2 (g_{3'}), 65,7 (g_{1'}) ; 69,8 (g_{2'}) ; 75,6 (g₁) ; 158,1 (C₁₅) ; 158,3 (C_{15'}).

2.1.2. Synthèses de GlycéroDendrimère-Poly(AMidoAMine) (GD-PAMAM) [4]

Dans un ballon bicol contenant 1éq. de PAMAM-n dissous dans le méthanol ou l'éthanol (20 mL), du carbonate de glycérol (2,5 éq. par NH₂) et de la triéthylamine (2,5 éq. par NH₂) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est porté à reflux, sous argon,

pendant 20 heures. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit brut est dissous dans un minimum de méthanol puis précipité 3 fois avec un excès d'un mélange de pentane / AcOEt 2 : 1 (v / v). Le résidu est séché sous pression réduite puis dissous de nouveau dans un minimum d'eau distillée puis purifié par dialyse (cutoff 1000 daltons) plusieurs fois dans de l'eau distillée. Le produit est obtenu sous forme d'une huile jaune.

GD-PAMAM-0 (C₃₈H₇₂N₁₀O₂₀, 989,04 g.mol⁻¹) :

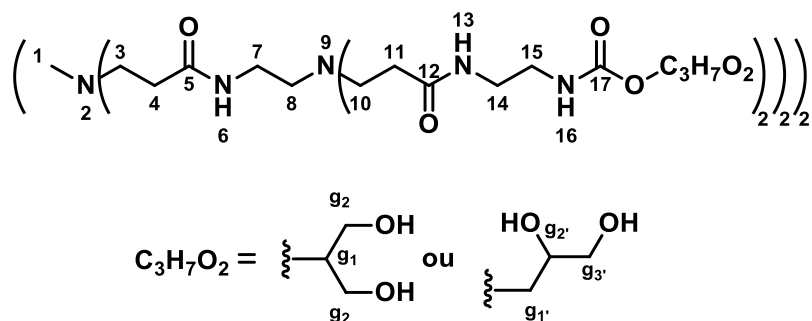


Rdt : 70%

RMN ¹H (500 MHz, D₂O, 298 K): δ (ppm) = 2,32-2,44 (8 H, m, H₄) ; 2,55-2,66 (4 H, m, H₁) ; 2,7-2,81 (8 H, m, H₃) ; 3,19-3,25 (16 H, m, H₈, H₇) ; 3,49-4,22 (20 H, m, H groupement glycérol: 3,62 (11 H, m, g₁, g₂, g₁') ; 3,91 (3 H, m, g₂') ; 4,04-4,15 (6 H, m, g₃')

RMN ¹³C (125 MHz, D₂O, 298 K): δ (ppm) = 32,6 (C₄) ; 39,0 (C₇) ; 39,7 (C₈) ; 49,0 (C₃) ; 51,1 (C₁) ; 62,1 (g₂) ; 62,4 (g₃') ; 65,7 (g₁') ; 69,7 (g₂') ; 72,0 (g₁) ; 158,3 (C₁₀) ; 174,7 (C₅).

GD-PAMAM-1 (C₉₄H₁₇₆N₂₆O₄₄, 2374,56 g.mol⁻¹) :

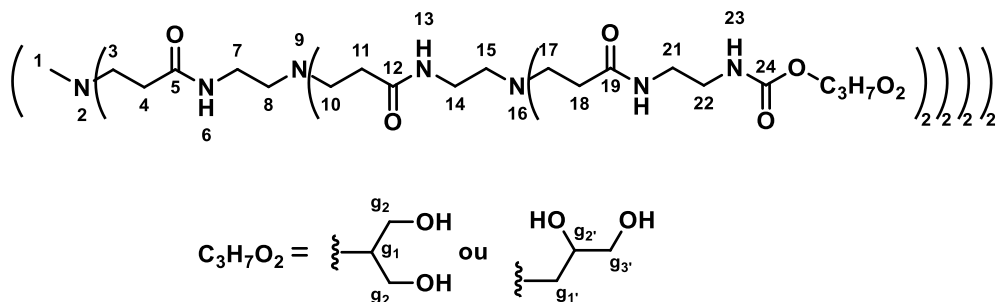


Rdt = 85%

RMN ¹H (500 MHz, D₂O, 298 K) : δ (ppm) = 2,30-2,49 (24 H, m, H₄, H₁₁) ; 2,50-2,68 (12 H, m, H₁, H₈) ; 2,73-2,92 (24 H, m, H₃, H₁₀) ; 3,17-3,43 (40 H, m, H₇, H₁₄, H₁₅) ; 3,50-4,22 (40 H, m, H groupement glycérol: 3,62 (22 H, m, g₁, g₂, g₁') ; 3,91 (6 H, m, g₂') ; 4,04- 4,15 (12 H, m, g₃').

RMN ^{13}C (125 MHz, D_2O , 298 K) : δ (ppm) = 32,6 (C_4 , C_{11}) ; 36,7 (C_7) ; 38,9 (C_{14}) ; 39,7 (C_{15}) ; 49,0 (C_3 , C_{10}) ; 51,1 (C_1 , C_8) ; 62,1 (g_2) ; 62,4 (g_3), 65,7 (g_1) ; 69,7 (g_2) ; 72,0 (g_1) ; 158,3 (C_{17}) ; 174,7 (C_5 , C_{12})

GD-PAMAM-2 ($\text{C}_{206}\text{H}_{384}\text{N}_{58}\text{O}_{92}$, 5145,61 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) :

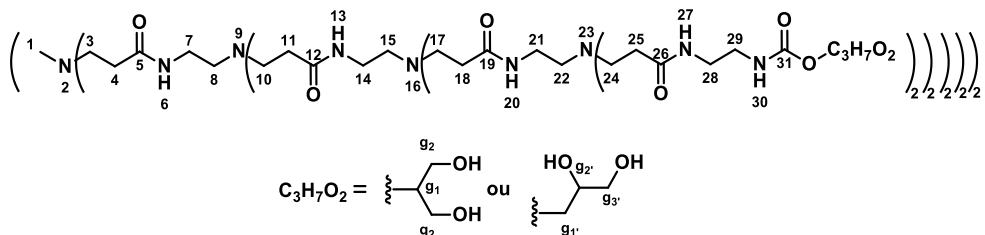


Rdt : 87%

RMN ^1H (500 MHz, D_2O , 298 K) : δ (ppm) = 2,27-2,42 (56 H, m, H_4 , H_{11} , H_{18}) ; 2,49-2,60 (28 H, m, H_1 , H_8 , H_{15}) ; 2,64-2,84 (56 H, m, H_3 , H_{10} , H_{17}) ; 3,11-3,34 (88 H, m, H_7 , H_{14} , H_{21} , H_{22}) ; 3,44-4,15 (80 H, m, H groupement glycérol) ; 3,43-3,72 (41 H, m, g_1 , g_2 , g_1') ; 3,91 (13 H, m, g_2) ; 3,92-4,15 (26 H, m, g_3)).

RMN ^{13}C (125 MHz, D_2O , 298 K) : δ (ppm) = 32,7 (C_4 , C_{11} , C_{18}) ; 36,5 (C_7) ; 39,0 (C_{14} , C_{21}) ; 39,8 (C_{22}) ; 49,0 (C_3 , C_{10} , C_{17}) ; 51,2 (C_1 , C_8 , C_{15}) ; 62,2 (g_2) ; 62,5 (g_3) ; 65,7 (g_1) ; 69,8 (g_2) ; 72,1 (g_1) ; 158,3 (C_{24}) ; 174,7 (C_5 , C_{12} , C_{19}).

GD-PAMAM-3 ($\text{C}_{430}\text{H}_{800}\text{N}_{122}\text{O}_{188}$, 10687,72 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)



Rdt : 90%

RMN ^1H (500 MHz, D_2O , 298 K) : δ (ppm) = 2,33-2,50 (120 H, m, H_4 , H_{11} , H_{18} , H_{25}) ; 2,56-2,68 (60 H, m, H_1 , H_8 , H_{15} , H_{22}) ; 2,74-2,94 (120 H, m, H_3 , H_{10} , H_{17} , H_{24}) ; 3,21-3,40 (184 H, m, H_7 , H_{14} , H_{21} , H_{28} , H_{29}) ; 3,55-4,20 (160 H, m, H groupement glycérol)

3,63 (100 H, m, g₁, g₂, g_{1'}) ; 3,90 (20 H, m, g_{2'}) ; 4,03 (20 H, m, g_{3'}) ; 4,13 (20 H, m, g_{3'}))

RMN ¹³C (125 MHz, D₂O, 298 K) : δ (ppm) = 31,8 (C₄, C₁₁, C₁₈, C₂₅) ; 35,9 (C₇) ; 38,2 (C₁₄, C₂₁, C₂₈) ; 38,9 (C₂₉) ; 48,2 (C₃, C₁₀, C₁₇, C₂₄) ; 50,4 (C₁, C₈, C₁₅, C₂₅) ; 61,3 (g₂) ; 61,6 (g_{3'}) ; 64,9 (g_{1'}) ; 68,9 (g_{2'}) ; 71,2 (g₁), 158,3 (C₃₁) ; 174,7 (C₅, C₁₂, C₁₉, C₂₆).

2.1.3. Synthèses du GlycéroClickDendrimère (GCD)[50]

- *Synthèse du composé I.2 (1,3-dioxolane-4-methanol-2,2-diméthyl-4-méthane sulfonate) (Schéma 3) :*

C₇H₁₄O₅S, 210,25 g.mol⁻¹

Dans un ballon bicol, le 1,2-isopropylidène-glycérol (I.1) dérivé de glycérol (1 éq., 7,57 .10⁻² mol) est dissous dans le dichlorométhane CH₂Cl₂ (100 mL) puis la triéthylamine Et₃N (1,2 éq., 9,08 .10⁻² mol) est ajoutée à 0 °C. Après 1 heure, le chlorure de méthanesulfonyle MeSOCl (1,15 éq., 8,7 .10⁻² mol) est ajouté goutte à goutte à 0 °C pendant 30 min puis le mélange est agité à température ambiante.

Après 18h de réaction, le mélange réactionnel est lavé 3 fois avec une solution saturée de bicarbonate de sodium NaHCO₃ (3 × 80 mL) puis avec de l'eau pure (3 × 80 mL) ; la phase organique est séchée sur le sulfate de magnésium MgSO₄, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Le produit est obtenu sous forme d'une huile jaunâtre avec un rendement de 85%.

- *Synthèse du composé I.3 (l'azoture du 1,2-isopropylidène-glycérol) (Schéma 3) :*

C₆H₁₁N₃O₂, 157,17 g.mol⁻¹

Dans un ballon bicol, le 1,3-dioxolane-4-methanol-2,2-diméthyl-4-méthane sulfonate (I.2) (1 éq., 2,57.10⁻¹ mol) est introduit en présence de de chlorure de triéthylbenzylamonium (0,2 éq., 5,15.10⁻² mol) ; ensuite, une solution aqueuse d'azoture de sodium (2 éq., 5,14.10⁻¹ mol dans 100 mL d'eau) est ajoutée. Le mélange est chauffé à reflux pendant 48h.

Le produit est obtenu par extraction à l'éther d'éthylique sous forme d'une huile jaunâtre avec un rendement de 88%.

- *Procédure générale pour la substitution des polyols, glycérol, I.6 et I.9 par du bromure de propargyle (synthèse de l'alcyne glycérol I.4, I.7 et I.10) (Schéma 3 et 4)*

Dans un ballon bicol, la potasse KOH broyée (2,5 éq. par fonction OH) est mis sous vide pendant 10 min puis sous argon, 1 éq. de polyol : glycérol, I.6 ou I.9 comportant respectivement 3, 6 et 12 fonctions alcools, préalablement dissous dans du DMF (30 mL) est ensuite ajouté.

Après 18h d'agitation à température ambiante, le bromure de propargyle (1,2 éq. / fonction OH) est ajouté goutte à goutte à 0 °C. Le mélange réactionnel est porté sous agitation pendant 48h à 0 °C sous atmosphère inerte.

❖ **Purification du composé I.4 : $C_{12}H_{14}O_3$, 206,24 g.mol⁻¹**

Après 48h de réaction, le mélange est transféré dans une ampoule à décantier, de l'eau distillée (150 mL) est ajoutée pour neutraliser l'excès de KOH et la phase organique est extraite avec du CH_2Cl_2 (3 x 100 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$, filtrées puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice en utilisant un mélange (EG/AcOEt 7:3) comme éluant. Le produit est obtenu sous la forme d'une huile jaune-orangée avec un rendement de 40%.

❖ **Purification des composés I.7 et I.10 : $C_{39}H_{47}N_9O_9$, 785,85 g.mol⁻¹ et $C_{93}H_{113}N_{27}O_{21}$, 1945,08 g.mol⁻¹**

Après 48h de réaction, le mélange est transféré dans une ampoule à décantier, de l'eau distillée (150 mL) est ajoutée pour neutraliser l'excès de KOH et la phase organique est extraite avec du CH_2Cl_2 (3 x 100 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$, filtrées puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est ensuite purifié par précipitation dans CH_2Cl_2 avec un excès de diéther Et_2O . Les produits I.7 et I.10 sont obtenus sous forme d'huile orange avec des rendements respectivement 70 et 53%.

• ***Procédure générale pour la synthèse "click" ; Synthèse de GlycéroClickDendrimères protégés I.5 ($C_{30}H_{47}N_9O_9$, 677,76 g.mol⁻¹), I.8 ($C_{75}H_{113}N_{27}O_{21}$, 1728,89 g.mol⁻¹) et I.11 ($C_{165}H_{245}N_{63}O_{45}$, 3831,15 g.mol⁻¹) (Schéma 3 et 4)***

Dans un ballon bicol, l'azoture du 1,2-isopropylidène-glycérol (I.3) (1,2 éq. par fonction alcyne), le tétrabutylammonium bromide TBAB (0,2 éq.) et l'ascorbate de sodium (0,2 éq.) sont introduits sous argon. Le polyol I.4, I.7 ou le I.10 (1 éq.) dissous dans un mélange de CH_2Cl_2 / $NaHCO_3$, (aq.) (1:1, v/v) est ensuite ajouté, suivi d'une solution aqueuse de $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ à 1 M (0,5 éq.) (en utilisant un bain de glace). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante sous atmosphère inerte.

Après 48h de réaction, une extraction au dichlorométhane est effectuée. La phase organique est lavée avec une solution de NH_4OH à 0,8 M jusqu'à l'obtention d'une phase aqueuse incolore, puis avec de l'eau.

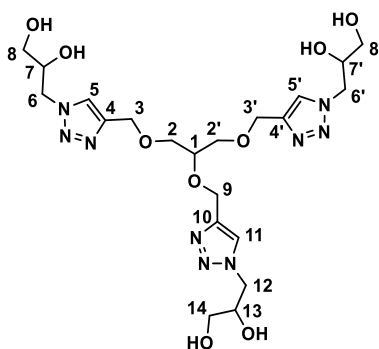
Après séchage sur MgSO_4 et filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit brut est ensuite précipité dans un minimum de CH_2Cl_2 en ajoutant un excès d'éther de pétrole. Les produits I.5, I.8 et I.11 sont obtenus sous la forme d'une résine marron avec des rendements respectivement de 70, 69 et 43%.

• **Procédure générale pour la déprotection ; synthèse de GlycéroClickDendrimères I.6, I.9 et I.12 (Schéma 3 et 4)**

Dans un ballon bicol, le GlycéroClickDendrimère protégé I.5, I.8 ou le I.11 est dissous dans un minimum d'eau puis une solution de HCl à 1 M est ajoutée (1,2 éq. par branche). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 18h.

Après 18h de réaction, une solution de NaOH à 1 M (1 éq. par éq. de HCl) est ajoutée. La solution est filtrée sur célite puis l'eau est évaporée sous pression réduite. Les produits attendus I.6, I.9 et I.12 appelés respectivement GCD-1, GCD-2 et GCD-3 sont obtenus sous la forme de cires marron avec des rendements $\geq 97\%$.

GCD-1 ou I.6 ($\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{N}_9\text{O}_9$, 557,56 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) :



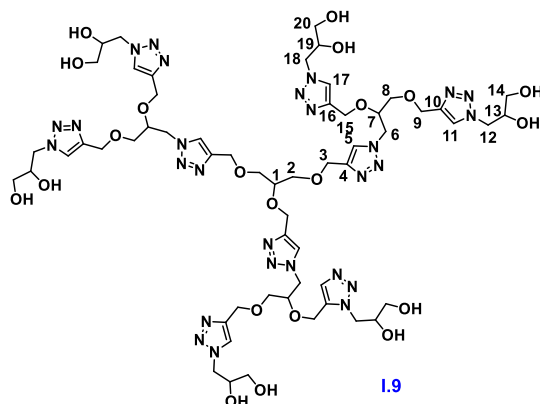
I.6

Rdt = 97%

RMN- ^1H (500 MHz, D_2O , 298 K): δ (ppm) = 3,40-3,65 (10H, m, H_2 , H_2' , H_8 , H_8' , H_{14}) ; 3,87 (1H, m, H_1) ; 4,15 (3H, m, H_7 , H_7' , H_{13}) ; 4,40-4,60 (6H, m, H_6 , H_6' , H_{12}) ; 4,64 (4H, s, H_3 , H_3') ; 4,73 (2H, s, H_9) ; 8,02 (1H, s, H_{11}) ; 8,04 (2H, s, H_5 , H_5').

RMN- ^{13}C (125 MHz, D_2O , 298 K): δ (ppm) = 52,7 (C_6 , C_6' , C_{12}) ; 62,1 (C_9) ; 62,7 (C_8 , C_8' , C_{14}) ; 63,3 (C_3 , C_3') ; 68,9 (C_2 , C_2') ; 70,3 (C_7 , C_7' , C_{13}) ; 76,7 (C_1) ; 125,8 (C_5 , C_5' , C_{11}) ; 143,8 (C_4 , C_4') ; 144,1 (C_{10}).

GCD-2 ou I.9 (C₅₇H₈₉N₂₇O₂₁, 1488,50 g.mol⁻¹) :

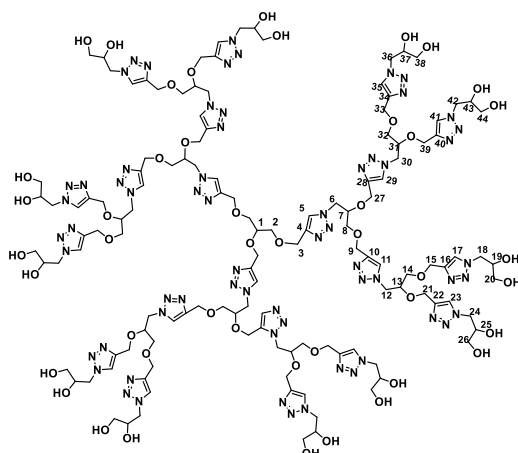


Rdt = 98%

RMN-¹H (500 MHz, D₂O, 298 K): δ (ppm) = 3,45-3,73 (16H, m, H₂, H₁₄, H₂₀) ; 3,89 (1H, m, H₁) ; 4,00-4,15 (9H, m, H₇, H₁₃, H₁₅, H₁₉) ; 4,30-4,70 (42H, m, H₃, H₆, H₈, H₉, H₁₂, H₁₅, H₁₈) ; 7,75-7,86 et 8,06 (6H, 3H, 2 × m, H₅, H₁₁, H₁₇).

RMN-¹³C (125 MHz, D₂O, 298 K): δ (ppm) = 50,9-52,6-62,0-63,2-63,4 (C₃, C₆, C₈, C₉, C₁₂, C₁₅, C₁₈) ; 62,7-68,5-68,9 (C₂, C₁₄, C₂₀) ; 70,2 (C₇, C₁₃, C₁₉) ; 75,9 (C₁) ; 125,6-125,8-125,9 (C₅, C₁₁, C₁₇) ; 143,3-143,5-143,7-143,8 (C₄, C₁₀, C₁₆).

GCD-3 ou I.12 (C₁₂₉H₁₉₇N₆₃O₄₅, 3350,37 g.mol⁻¹) :



I.12

Rdt = 98%

RMN-¹H (500 MHz, D₂O, 298 K): δ (ppm) = 3,44-3,85 (28H, m, H₂ + H₂₀ + H₂₆ + H₃₈ + H₄₄) ; 3,95-4,24 (22H, m, H₁, H₇, H₁₃, H₁₉, H₂₅, H₃₁, H₃₇, H₄₃) ; 4,30-4,73 (102H, m, H₃, H₆, H₈, H₉, H₁₂, H₁₄, H₁₅, H₁₈, H₂₁, H₂₄, H₂₇, H₃₀, H₃₂, H₃₃, H₃₆, H₃₉, H₄₂) ; 7,58-8,13 (21H, m, H₅, H₁₁, H₁₇, H₂₃, H₂₉, H₃₅, H₄₁).

RMN-¹³C (125 MHz, D₂O, 298 K): δ (ppm) = 51,0-52,7-62,1-63,5 (C₃, C₆, C₈, C₉, C₁₂, C₁₄, C₁₅, C₁₈, C₂₁, C₂₄, C₂₇, C₃₀, C₃₂, C₃₃, C₃₆, C₃₉, C₄₂) ; 62,7-68,6 (C₂, C₂₀, C₂₆, C₃₈, C₄₄) ; 70,8 (C₇, C₁₃, C₁₉, C₂₅, C₃₁, C₃₇, C₄₃) ; 75,9 (C₁) ; 125,7 (C₅, C₁₁, C₁₇, C₂₃, C₂₉, C₃₅, C₄₁) ; 143,6 (C₄, C₁₀, C₁₆, C₂₂, C₂₈, C₃₄, C₄₀).

2.1.4. Synthèse des GlycérolADendrimères (GAD) [51]

- *Procédure générale d'allylation des fonctions alcools, synthèse des alcènes glycérol II.1, II.3 et II.5 (Schéma 5 et 6)*

Dans un ballon bicol, la potasse KOH broyée (2 équ./ fonction OH) est mise sous vide pendant 10 min puis sous argon, le polyol : glycérol, II.2 ou II.4 comprenant respectivement 3, 6 ou 12 fonctions alcools (1 équ.) dissous dans de DMF (30 mL) est ensuite ajouté. Après 18h d'agitation à température ambiante, le bromure d'allyle (1,2 équ. / fonction OH) est ajouté goutte à goutte à l'aide d'une ampoule d'ajout à 0 °C (ou à température ambiante). Le mélange réactionnel est porté sous agitation pendant 48h à 0 °C sous atmosphère inerte.

❖ Purification du composé II.1 (C₁₂H₂₀O₃, 212,29 g.mol⁻¹) :

Après 48h de réaction, le mélange est transféré dans une ampoule à décanter, de l'eau distillée (150 mL) est ajoutée pour neutraliser l'excès de KOH et la phase organique est extraite avec de CH₂Cl₂ (3 x 100 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice en utilisant un mélange (EG/AcOEt 7:3) comme éluant. Le produit est obtenu sous la forme d'une huile jaune-orangée avec un rendement de 50%.

❖ Purification des composés II.3 et II.5 (C₃₀H₅₀O₉, 554,72 g.mol⁻¹ et C₆₆H₁₁₀O₂₁, 1239,57 g.mol⁻¹) :

Après 48h de réaction, le mélange est transféré dans une ampoule à décanter, de l'eau distillée (150 mL) est ajoutée pour neutraliser l'excès de KOH et la phase organique est extraite avec de CH₂Cl₂ (3 x 100 mL). Les phases organiques sont

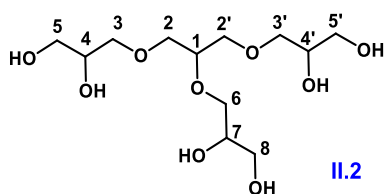
rassemblées, séchées sur MgSO_4 , filtrées sur coton. Après évaporation sous pression réduite, une précipitation est effectuée dans le dichlorométhane en utilisant un excès d' Et_2O . Le précipité est séché sous vide à température ambiante. Les deux composés II.3 et II.5 sont obtenus sous la forme d'une huile jaune-orangée avec des rendements respectivement de 74 et 70%.

• **Procédure générale pour la dihydroxylation des fonctions alcènes terminales : synthèse de GlycérolADendrimères II.2, II.4 et II.6 (Schéma 5 et 6)**

L'AD-mix- β ((1,4 g pour 1 mmol d'oléfine) \times nombre de double liaisons) est ajouté à un mélange *t*BuOH / H_2O (1:1) ; le mélange résultant est agité à température ambiante jusqu'à obtention de deux phases limpides puis refroidi à 0 °C. Après précipitation des sels dissous, l'alcène glycérol II.1, II.3 et II.5 est ajouté en une fois. Le mélange réactionnel est maintenu à 0 °C. Après 48h, le sulfite de sodium Na_2SO_3 (1,5 g pour 1,4 g d'AD-mix- β) est ajouté à 0°C et le mélange réactionnel est agité jusqu'à revenir à température ambiante. Le mélange réactionnel est alors amené à sec sous pression réduite. Les impuretés sont précipitées dans l'acétone pendant 36 h. Le produit est filtré puis évaporé sous pression réduite.

Le produit brut est solubilisé dans de l'eau distillée puis une extraction à l'acétate d'éthyle est effectuée. Après évaporation sous pression réduite, les composés II.2, II.4 et II.6 appelés respectivement GAD-1, GAD-2 et GAD-3 sont obtenus sous la forme d'une cire blanche avec des rendements respectivement de 74, 69 et 71%.

GAD-1 ou II.2 ($\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}_9$, 314,33 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) :

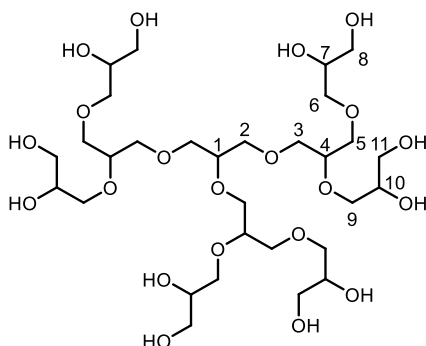


Rdt = 74%

RMN- ^1H (500,13 MHz, D_2O , 298 K) : δ (ppm) = 3,50-3,77 (16H, m, H_2 , H_2' , H_3 , H_3' , H_5 , H_5' , H_6 , H_8) ; 3,81 (1H, m, H_1) ; 3,89 (3H, m, H_4 , H_4' , H_7)

RMN- ^{13}C (125,76 MHz, CDCl_3 , 298 K) : δ (ppm) = 62,6 (C_5 , C_8) ; 70,3 (C_3) ; 70,3-70,7 (C_4 , C_7) ; 70,8 (C_6) ; 72,1 (C_2) ; 77,9 (C_1).

GAD-2 ou II.4 (C₃₀H₆₂O₂₁, 758,80 g.mol⁻¹) :



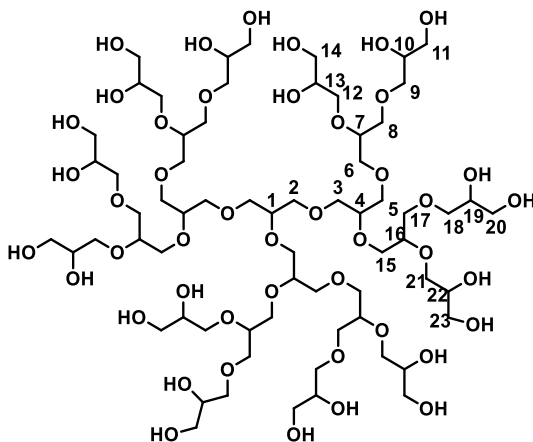
II.4

Rdt = 69%

RMN-¹H (500,16 MHz, D₂O, 298 K) : δ (ppm) = 3,49-3,77 (40H, m, H₂, H₅, H₆, H₈, H₉, H₁₁) ; 3,79 (4H, m, H₁, H₄) ; 3,89 (6H, m, H₇, H₁₀)

RMN-¹³C (125,76 MHz, D₂O, 298 K): δ (ppm) = 62,5-62,5 (C₈, C₁₁) ; 70,3-70,4-70,8 (C₃, C₅, C₆, C₉) ; 70,3-70,6 (C₇, C₁₀) ; 72,1 (C₂) ; 77,8-79,4 (C₁, C₄).

GAD-3 ou II.6 (C₆₆H₁₃₄O₄₅, 1647,74 g.mol⁻¹) :



II.6

Rdt = 71%

RMN-¹H (500,13 MHz, D₂O, 298 K) : δ (ppm) = 3,49-3,76 (88H, m, H₂, H₃, H₅, H₆, H₈, H₉, H₁₁, H₁₂, H₁₄, H₁₅, H₁₇, H₁₈, H₂₀, H₂₁, H₂₃) ; 3,79 (10H, m, H₁, H₄, H₇, H₁₆) ; 3,89 (12H, m, H₁₀, H₁₃, H₁₉, H₂₂)

RMN-¹³C (125,76 MHz, D₂O, 298 K): δ (ppm) = 62,4-62,5 (C₁₁, C₁₄, C₂₀, C₂₃) ; 70,9-70,4-70,8 (C₃, C₅, C₆, C₈, C₉, C₁₂, C₁₅, C₁₇, C₁₈, C₂₁) ; 70,3-70,7 (C₁₀, C₁₃, C₁₉, C₂₂) ; 72,1 (C₂) ; 77,8-79,4 (C₁, C₄, C₇, C₁₆).

2.2. Encapsulation des actifs cosmétiques

Procédure générale d'encapsulation de la caféine, la vitamine C, la difluoromethylornithine (DFMO) et l'acide thioglycolique (TGA)

L'encapsulation est réalisée en mélangeant 1 équivalent de dendrimère solubilisé dans de l'eau pure (5 mL) avec un excès de la molécule qu'on souhaite encapsuler (de 20 h à 48h) à température ambiante. Plusieurs dialyses au travers une membrane de 1000 Daltons dans l'eau pure sont réalisées pour éliminer ce qui n'a pas été encapsulé. Le mélange restant dans la membrane de dialyse est ensuite évaporé sous pression réduite. Le nombre d'équivalents est déterminé par gravimétrie, les détails techniques pour les encapsulations sont résumés dans le **tableau 6** ci-dessous.

Tableau 6 : Les détails techniques des encapsulations

Expérience	Dendrimère	Molécule à encapsulée	Temps de dialyse	Nombre d'éq. encapsulés
01	GD-PPI-2 1 éq., $2,03 \cdot 10^{-5}$ mol	Vitamine C 23 éq., $4,66 \cdot 10^{-4}$ mol	3 x 40 min	6 éq.
02	GD-PPI-3 1 éq., $1,01 \cdot 10^{-5}$ mol	Vitamine C 46,3 éq., $4,66 \cdot 10^{-4}$ mol	3 x 40 min	14 éq.
03	GD-PPI-4 1 éq., $4,66 \cdot 10^{-6}$ mol	Vitamine C 100 éq., $4,66 \cdot 10^{-4}$ mol	3 x 40 min	42 éq.
04	PPI-4 1 éq., $1,02 \cdot 10^{-5}$ mol	Vitamine C 50 éq., $5,12 \cdot 10^{-4}$ mol	3 x 40 min	43 éq.
05	PAMAM-3 1 éq., $5,21 \cdot 10^{-6}$ mol	Vitamine C 100 éq., $5,21 \cdot 10^{-4}$ mol	3 x 40 min	62 éq.
06	GD-PAMAM-3 1 éq., $2,03 \cdot 10^{-5}$ mol	Vitamine C 140 éq., $4,45 \cdot 10^{-4}$ mol	3 x 40 min	82 éq.

07	GD-PAMAM-3 1 éq., $5,14 \cdot 10^{-6}$ mol	Caféine 100 éq., $5,14 \cdot 10^{-4}$ mol	5 x 40 min	27 éq.
08	GD-PPI-4 1 éq., $4,87 \cdot 10^{-6}$ mol	Caféine 105 éq., $5,14 \cdot 10^{-4}$ mol	5 x 40 min	35 éq.
09	GD-PAMAM-3 1 éq., $1,37 \cdot 10^{-6}$ mol	DFMT 80 éq., $1,10 \cdot 10^{-4}$ mol	3 x 50 min	8 éq.
10	GD-PAMAM-3 1 éq., $1,06 \cdot 10^{-5}$ mol	TGA 100 éq., $1,06 \cdot 10^{-3}$ mol	3 x 50 min	58 éq.

2.3. Tests de cytotoxicité

Les tests de cytotoxicité des dendrimères ont été réalisés sur des cultures de fibroblastes dermiques achetés auprès de PromoCell et caractérisés par deux méthodes : la réduction d'un sel de tétrazolium (WST1) par les oxydo-réductases mitochondriales et la coloration des cellules au cristal violet. Les fibroblastes dermiques sont cultivés à confluence dans des flacons de culture de 75 cm² dans un milieu DMEM contenant de la glutamine (2 mM) et du sérum de veau fœtal (FCS) à 10% (v/v) sous une atmosphère humide avec 5% de CO₂ et à 37 °C. Les fibroblastes dermiques humains confluent sont déposés dans des plaques de culture de 24 puits et cultivés dans les mêmes conditions que ci-dessus. Le milieu de culture est retiré et remplacé par le même milieu DMEM avec FCS 0,5% pendant 24h. Les différents dendrimères sont dissous dans de l'eau distillée et testés à différentes concentrations (allant de 0,0001 à 1 mg/mL) pendant 48h dans le même milieu DMEM avec 0,5% de FCS (1 mL/puits).

Réduction de sel de tétrazolium WST1 : A la fin de la période d'incubation en présence des différents produits, les cellules sont rincées avec 1 mL de DMEM avec 0,5% FCS, et incubées avec 400 µL du même milieu DMEM contenant 10 µL d'une solution de WST1 dans 400 µL pendant 30 min à 37 °C. Les sels de tétrazolium sont transformés en formazan par le système succinate-tétrazolium réductase (EC 1.3.99.1) qui appartient à la chaîne respiratoire de la mitochondrie, et qui n'est actif que dans les cellules métaboliquement intactes. Un volume de 100 µl de chaque milieu d'incubation est transféré dans des plaques à 96 puits et l'absorbance à 450 nm est enregistrée avec un spectrophotomètre.

La coloration des cellules avec du cristal violet permet de mesurer la densité cellulaire. Après incubation avec WST1, les cellules sont lavées avec 1 mL de Phosphate Buffer Saline (PBS), puis fixées par incubation pendant 20 min avec 1 mL/puits de PBS contenant du glutaraldéhyde 1,1% (v/v). Après un rinçage abondant à l'eau distillée, les cellules sont colorées par addition de 400 µL/puits d'une solution de cristal dans un tampon HEPES à pH = 7,6 pendant 20 min. L'excès de cristal violet est éliminé, et les cellules sont abondamment rincées à l'eau distillée. La coloration est extraite avec 1 mL d'acide acétique à 10% (v/v). Des volumes de 100 µL de la solution colorée sont transférés dans des plaques de 96 puits. L'absorbance à 560 nm est enregistrée avec un spectrophotomètre.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm l'écart-type. Chaque expérience est réalisée en quadruple exemplaire.

Chapitre III

**Synthèse de nouveaux dendrimères
possédant des fonctions anti-oxydantes**

Chapitre III : Synthèse de nouveaux dendrimères possédant des fonctions anti-oxydantes

III.1. Contexte et objectifs

Les compositions de la plupart des produits cosmétiques contiennent des actifs sensibles et des conservateurs [213]. Ces derniers permettent d'assurer la conservation et la stabilité du produit dans le temps en protégeant l'actif des agents extérieurs comme les bactéries ou tout simplement l'air ou la lumière, mais aussi le consommateur de possibles contaminations [214]. Deux types de conservateurs sont souvent utilisés ; les conservateurs antimicrobiens [215] et les anti-oxydants [216]. Ces derniers vont protéger le produit cosmétique des agents physiques extérieurs qui pourraient modifier ses qualités organoleptiques (couleur, odeur et aspect) et limiter leur efficacité. C'est dans ce contexte que nous basons nos recherches. Dans ce chapitre, la synthèse de nouveaux dendrimères possédant des fonctions antioxydantes est envisagée. Ces macromolécules peuvent être employées à la fois comme conservateurs, anti-radicaux libres et vecteurs de molécules actives.

La première partie de ce chapitre est consacrée à la synthèse de nouveaux dendrimères ioniques dérivés de PAMAMs et PPIs et d'acides phénoliques tels que l'acide caféique (acide 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propénoïque), l'acide férulique (acide *trans*-4-Hydroxy-3-méthoxycinnamique) et l'acide phlorétique (acide 3-(4-hydroxyphenyl)propionique), puis à l'évaluation de leur activité antioxydante et de leur cytotoxicité. Ces travaux sont décrits dans l'article *Polymers* 2022, 14, 3513. L'autre partie est dédiée à la synthèse d'autres familles de dendrimères par une réaction d'amidation de PPIs avec les acides phlorétique et férulique, en présence de l'agent de couplage dicyclohexylcarbodiimide (DCC).

III.2. Résumé du premier article

La présente étude est consacrée à la préparation de nouveaux dendrimères ioniques qui présentent des propriétés antioxydantes. Ces nouvelles macromolécules sont destinées à une utilisation originale en tant que vecteur dans les produits cosmétiques. En encapsulant les composés actifs, ces dendrimères limiteront leur dégradation et le caractère ionique des dendrimères améliorera leur solubilité dans les solvants compatibles pour la cosmétique. Leur pouvoir antioxydant les protégera eux-mêmes

de la dégradation et renforcera leur effet protecteur vis-à-vis des composés actifs encapsulés.

Dans ce travail, six nouvelles familles de dendrimères ioniques ont été synthétisées à partir d'une simple réaction acido-basique entre des PAMAMs ou PPIs et des acides phénoliques.

La synthèse de trois nouvelles familles de PPIs fonctionnalisés avec les bases d'acides phénoliques, PPIs-PhA, PPIs-FA et PPIs-CA, a été réalisée par une réaction acido-basique de PPIs commerciaux avec l'acide férulique, l'acide phlorétique et l'acide caféïque, respectivement, dans le méthanol ou l'éthanol dans différentes conditions (**Schéma 9, Tableau 7 dans l'article ci-après**). Les produits sont obtenus par réaction des amines primaires terminales des dendrimères avec les fonctions carboxyliques des acides avec des rendements quantitatifs.

La synthèse de trois autres dendrimères dérivés de PAMAMs fonctionnalisés avec les bases d'acides phénoliques, PAMAMs-PhA, PAMAMs-FA et PAMAMs-CA a été réalisée de la même façon que celle précédemment utilisée pour la synthèse de dérivés de PPI. Cependant, il a été nécessaire d'augmenter le nombre d'équivalents d'acide phénolique (jusqu'à 1,5 éq. par fonction NH₂) et le temps de réaction (jusqu'à 16 ou 20h), probablement en raison de l'encombrement stérique causé par la morphologie des PAMAMs, qui empêche l'insertion des acides phénoliques et la formation de liaisons ioniques (**Schéma 10, Tableau 8 dans l'article ci-après**). Les produits ont été obtenus avec des rendements quantitatifs, caractérisés par la spectroscopie de résonance magnétique (RMN), l'infra-rouge (IR) et l'analyse élémentaire.

Ces synthèses ont été optimisées sous activation micro-ondes ou en microfluidique, ce qui a permis d'obtenir des rendements élevés (> 97%) avec des temps de réaction courts (5 min).

L'activité antioxydante des dendrimères ioniques a été évaluée en mesurant leur capacité à piéger un radical DPPH' [217]. Les dendrimères ioniques présentent des activités antioxydantes très intéressantes, voire supérieures à celles de la vitamine C, qui a été prise comme substance de référence. L'activité antioxydante dépend de la nature et de la génération du dendrimère et de l'acide phénolique utilisé (**Tableau 9 de l'article ci-après**). Les meilleures activités sont observées avec les dendrimères PAMAMs-1-3-CA, PPIs-1-3-CA et PAMAMs-1-3-FA.

La cytotoxicité des cinq dendrimères ioniques, PPI-3-FA, PPI-3-PhA, PAMAM-3-FA, PAMAM-3-PhA et PAMAM-3-CA, a été testée sur des fibroblastes dermiques humains par deux méthodes [218], le test WST1 et la coloration des cellules par le

cristal violet. Une toxicité cellulaire de tous les dendrimères a été observée à partir d'une concentration supérieure à 100 µg/mL, sauf dans le cas du PPI-3-PhA, où une toxicité a été observée dès 10 µg/mL. Il en ressort que les dendrimères dérivés de l'acide férulique sont moins toxiques que ceux dérivés des acides caféique et phlorétique et que le dendrimère PPI-3-PhA est le plus toxique.

Ainsi, à 100 µg/mL, PAMAM-3-FA et PPI-3-FA pourraient être utilisés en cosmétique comme agents d'encapsulation et antioxydants pour les ingrédients actifs.

La partie suivante est adaptée de l'article publié dans *Polymers* **2022**, *14*, 3513. Katia Bacha, Julien Estager, Sylvie Brassart-Pasco, Catherine Chemotti, Antony E. Fernandes, Jean-Pierre Mbakidi, Magali Deleu and Sandrine Bouquillon, <https://doi.org/10.3390/polym14173513>. Received: 21 July 2022, accepted: 23 August 2022, published: 27 August 2022.

Synthesis and Activity of Ionic Antioxidant Functionalized PAMAMs and PPIs Dendrimers

Abstract: For this study, new dendrimers were prepared from poly(propylene imine) (PPI) and polyamidoamine (PAMAM) dendrimers using an efficient acid-base reaction with various phenolic acids. The syntheses were also optimized in both microwave and microfluidic reactors. These ionic and hydrophilic dendrimers were fully characterized and showed excellent antioxidant properties. Their cytotoxic properties have been also determined in the case of fibroblast dermal cells.

Keywords: dendrimers; phenolic acids; antioxidant; microwave; flow chemistry

1. Introduction

Dendrimers are hyperbranched macromolecules having, in general, a three-dimensional, monodisperse and globular structure, most of the time with a perfect tree-like structure [10,11]. They are largely studied mainly for their encapsulation capacity, particularly in the biomedical field [219]. Recently, Kaur *et al.* presented an interesting review concerning a comparative study of poly(propyleneimine) (PPI) and polyamidoamine (PAMAM) dendrimers, some of the most-used dendrimers [220]. In recent years, we have developed various dendrimers containing biobased moieties to make these compounds more eco-compatible. These have been used in catalysis, medical imaging and depollution [6,221,222]. The present study is devoted to the preparation of new ionic dendrimers that present, moreover, antioxidant properties. Indeed, these new macromolecules are designed for original use as carriers in cosmetics; the encapsulation will limit active compound degradation, their ionic character will improve their solubility in compatible solvents for cosmetics, and their antioxidant power will protect the macromolecules themselves and reinforce their beneficial encapsulating role. To our knowledge, no dendrimers presenting both ionic and antioxidant characteristics have yet been described in the literature.

However, the synthesis of ionic dendrimers has previously been described in the literature, for example, dendronized pyridinium units surrounded by a shell of carboxylic acids [223] or water-soluble polyanionic dendrimers, presenting great potential applications as antiviral drugs [224]. Ionic dendrimers have also been used as a base for polyamide membranes for ion separation [225] or electrolytes for LiS batteries [226]. Their use in the form of liquid crystals has also been investigated alongside, for instance, ionic dendrimers as poly(ethylene imine) polymers functionalized by oxadiazole[227,228], or fluorinated and perhydrogenated chains [229].

Antioxidant dendrimers have been prepared using two approaches. The first approach consists of the synthesis of new dendritic structures presenting antioxidant properties; the second approach is based on the capacity of existing dendrimers to encapsulate antioxidant compounds. In the first approach, phenols could be used as the starting material of choice to build antioxidant moieties. Indeed, dendritic polyphenols have been prepared and evaluated as antioxidant compounds [230–232], for use either coupled with cis-platin as an anticancer agent [233] or mostly in polyolefin to avoid the peroxidation of the olefins [234,235]. Carbosilane, when functionalized by polyphenols, also presents antioxidant, antibacterial and anticancer properties [236,237]. The decoration of PAMAM [238–240], glycodendrimers [241] or original dendrimers (triazole-bridged, hyperbranched polyurethanes, with an enone or anthraquinone or melamine core) [242–247]; these are partnered with specific entities, such as polyphenols, Meldrum's acid derivatives, carbazole, fluorescein or Rhodamine that have also led to new dendritic molecules presenting, among others, good antioxidant properties. Decorated peptide dendrimers have also presented excellent antioxidant properties [248], as well as original radical dendrimers [249].

The second approach for preparing antioxidant dendrimers is related to their capacity to encapsulate various types of compounds (organic or organometallic compounds, salts and nanoparticles). Indeed, dendrimers or dendrimer nanoparticles have largely been used in therapeutic domains. Curcumin [250,251], gold nanoparticles [252], astragaloside [253], cis-platin[254] and sinomenine or minocycline [255,256] were encapsulated in different dendrimers (PAMAM, modified PAMAM and carbosilane dendrimers), leading to controlled release for targeted therapy. Gallic acid-modified PAMAM dendrimers were also explored as novel strategies to fight the chemoresistance of tumor cells [257,258]. These last compounds were also used as devices for the long-term preservation of essential oils [259]. Dendrimers such as PAMAM [260], chitosan-poly(amidoamine) dendrimer

[261], or dendrimer-like glucan [262] were also employed to stabilize antioxidants, such as carotene [262], coenzyme Q10 [263], resveratrol [264] or polyphenols [265], showing excellent antioxidant activities.

In the present study, we will describe the preparation of new ionic dendritic structures from a simple acid-base reaction between PAMAMs or PPIs and phenolic acids without a coupling agent. The nitrogen-based moieties are cationic, and the anion is the carboxylate form of the phenolic acids. The antioxidant properties are carried by ionic species; the electrostatic linkage can enhance the compounds' solubility in water and may influence the cytotoxic properties of the dendritic structures. These compounds have been synthesized in a swift and efficient way, using either microwave or microfluidic reactors. Both techniques—which are strongly linked to sustainable chemistry [238,266,267] are known to significantly accelerate the reaction kinetics, taking advantage of either very fast and homogeneous heating through dielectric loss, in the case of microwaves (MW) [268], or from very efficient mass and heat transfer, in the case of flow chemistry [269]. These techniques have been used for the synthesis of many chemicals, including, for example, active pharmaceutical ingredients [270] or biobased compounds [271,272].

2. Results and Discussion

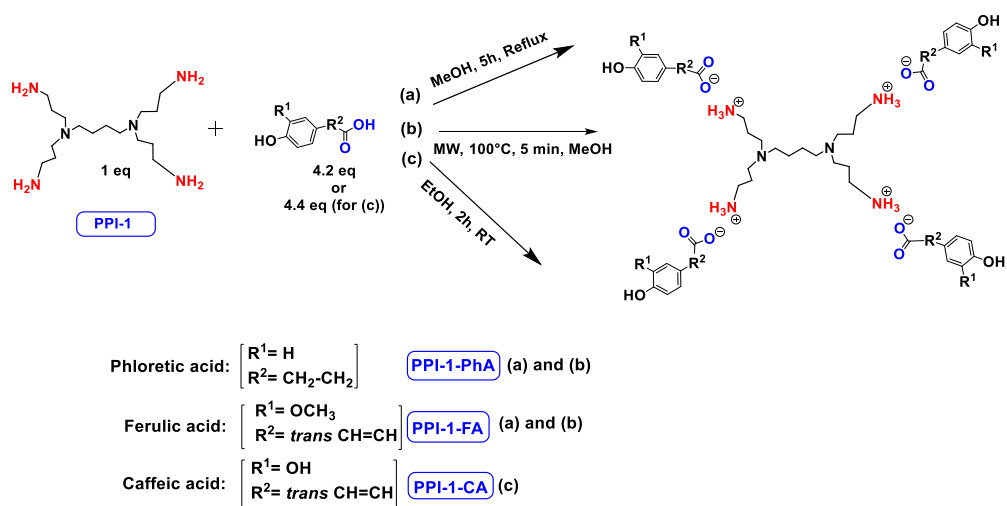
2.1. Synthesis of the Ionic Dendrimers

In this study, oligomers synthesized from 3 generations of PPI dendrimers and 3 biobased phenolic acids (phloretic, ferulic and caffeic acids) were first targeted.

Poly(propylene imine) (PPI) dendrimers [273] are also known as DAB-Am-x dendrimers (DAB, for the diaminobutane core, and $x = 4, 8, \text{ or } 16$, for the number of primary amine end groups associated with generations 1, 2, or 3, respectively). Phloretic acid (PhA), found, among others, in olives[274] or in the bran extracts of traditional rice cultivars[275], was used in a recent application as a biocompatibilizer for immiscible polymer blends [276]. Ferulic acid (FA) is widely present in plants in either its free or conjugated forms and is well known for many various applications in the medical field, thanks to its bioactivity, for the treatment of cancer, diabetes, and lung and cardiovascular diseases [277]. Ferulic acid has a protective role for the main skin structures (keratinocytes, fibroblasts, collagen and elastin); it inhibits melanogenesis, enhances angiogenesis, and accelerates wound healing [278]. Caffeic acid (CA), extracted from specific plants' biomass, is a dietary polyphenol that is also considered a promising drug candidate, thanks to its efficiency against inflammatory,

neurodegenerative, oncologic and metabolic disorders[279,280]. Caffeic acid also presents a photoprotective effect in irradiated lymphocytes [281] and could act as a potent chemopreventive agent against skin cancer [282].

The synthesis of these new families of functionalized PPIs with the phenolic acid derivatives, PPIs-PhA, PPIs-FA and PPIs-CA, was realized by an acid-base reaction of commercial PPIs with ferulic acid, phloretic acid and caffeic acid, respectively, in methanol or ethanol under various conditions (**Scheme 9, Table 7**). This reaction has the advantage of not requiring coupling agents when compared to the traditional amidation reaction, for instance.



Scheme 9 . The ionic functionalization of PPIs with phloretic, ferulic and caffeic acids

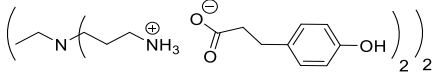
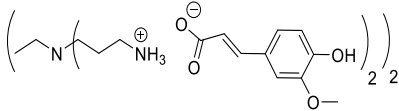
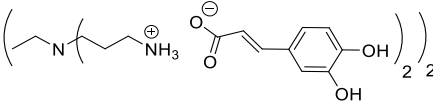
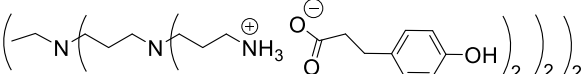
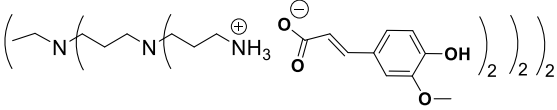
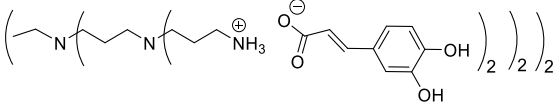
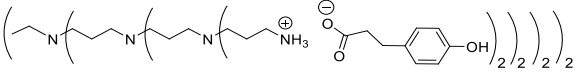
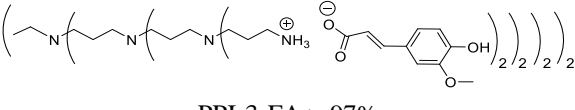
The first-generation dendrimers, PPI-1-PhA and PPI-1-FA, were obtained by a reaction between the terminal primary amines of first-generation PPI (PPI-1) with phloretic acid or ferulic acid, respectively, in refluxing methanol for 5h (**Scheme 9 (a)**). Reflux was necessary to obtain higher yields in lower times. This reaction was confirmed by ^1H NMR, focusing on the chemical shift of the protons of the CH_2 groups linked to the terminal primary amine functions (2.67 ppm for PPI-1, 2.91 ppm and 2.98 ppm, respectively, for PPI-1-PhA and PPI-1-FA in CD_3OD) and by ^{13}C NMR analyses, focusing on the chemical shift of the carbon from the carbonyl group (176.3 and 169.6 ppm, respectively, for phloretic acid and ferulic acid; 180.4 and 174.7 ppm, respectively, for PPI-1-PhA and PPI-1-FA in CD_3OD (see Section 3.1).

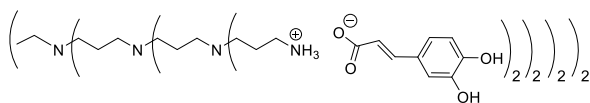
These shifts toward lower fields are consistent with salt formation between the amines and carboxylic acids [283].

Two-dimensional NMR analyses were also performed to prove that no formation of amide functions occurred instead of forming ionic compounds. Next, the disappearance of the strong ν (CO) bands of phloretic acid and ferulic acid using IR (1699 cm^{-1} and 1689 cm^{-1} , respectively), as well as the two new (ν CO) bands of ionized acids at 1540 cm^{-1} and 1396 cm^{-1} for PPI-1-PhA and at 1539 cm^{-1} and 1394 cm^{-1} for PPI-1-FA, confirmed the formation of the ionic dendrimers [283]. The purification of PPI-1-PhA and PPI-1-FA was performed by solubilizing the crude mixture in water, followed by extraction with ethyl acetate. Similarly, the second and third generations of PPIs-PhA and PPIs-FA were obtained in quantitative yields.

Concerning the preparation of PPIs-CA, the conditions were adapted because the mixture of the two reagents (PPI and caffeic acid) in methanol precipitates as a brown wax. First-generation PPI-1-CA was, therefore, obtained by reacting the terminal primary amines of a PPI-1 with caffeic acid in ethanol at room temperature under orbital stirring (280 rpm), with the dropwise addition of the caffeic acid ethanolic solution (**Scheme 9 (c)**). The formation of PPI-1-CA was investigated by NMR, focusing firstly on the chemical shift of the H5 protons (see Section 3.1) corresponding to the CH_2 groups that are linked to the terminal primary amine functions (2.53 ppm for PPI-1 and 2.73 ppm for PPI-1-CA in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), and secondly on the chemical shift of the C6 carbons (see Section 3.1) corresponding to the carbonyl groups (168.4 ppm for caffeic acid and 171.6 ppm for PPI-1-CA in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$). IR analyses confirmed the nature of the product through the disappearance of the strong ν CO band of caffeic acid at 1640 cm^{-1} and the appearance of two ν CO bands of ionized acid around 1507 cm^{-1} and 1372 cm^{-1} for PPI-1-CA, as previously described[283].The purification of PPI-1-CA was finally performed by washing the resulting precipitate with ethanol, followed by centrifugation. The second and third generations (PPI-2-CA and PPI-3-CA) were prepared following the same process and were obtained at yields above 90%.

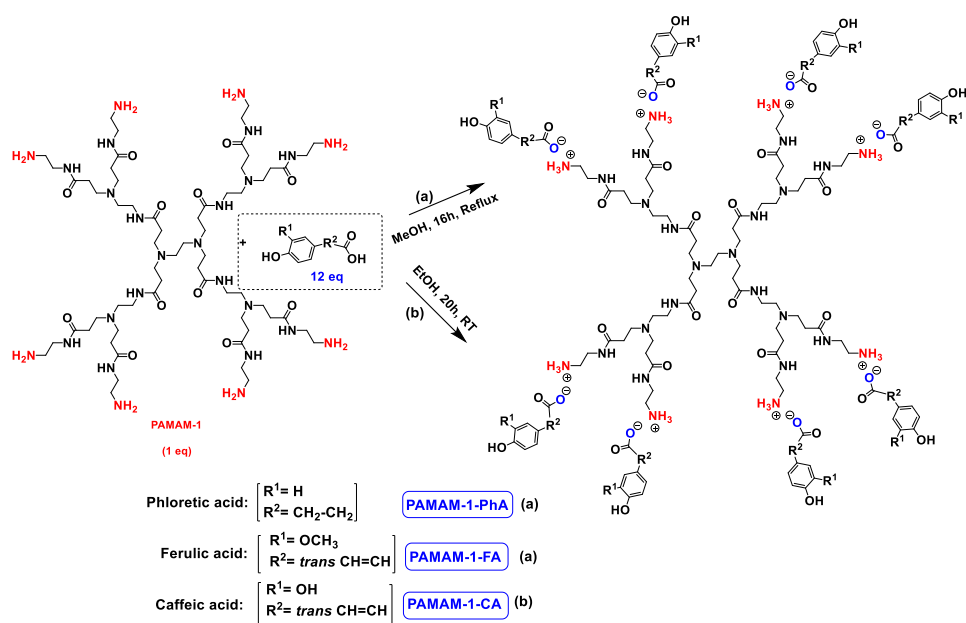
Table 7 . Ionic PPI-derived dendrimers.

Starting dendrimers	Ionic Dendrimers/Yields
PPI-1	 <p>PPI-1-PhA > 97%</p>
PPI-1	 <p>PPI-1-FA > 97%</p>
PPI-1	 <p>PPI-1-CA 90%</p>
PPI-2	 <p>PPI-2-PhA > 97%</p>
PPI-2	 <p>PPI-2-FA > 97%</p>
PPI-2	 <p>PPI-2-CA 90%</p>
PPI-3	 <p>PPI-3-PhA > 97%</p>
PPI-3	 <p>PPI-3-FA > 97%</p>



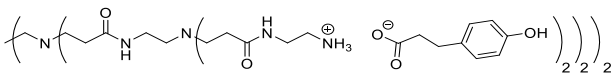
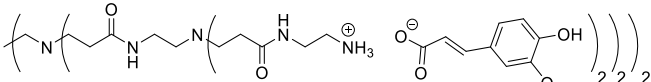
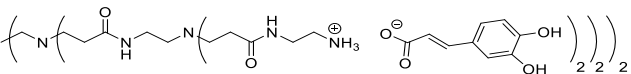
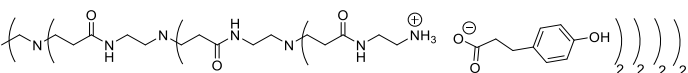
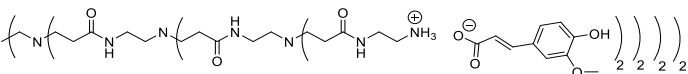
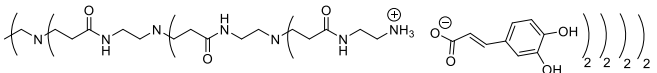
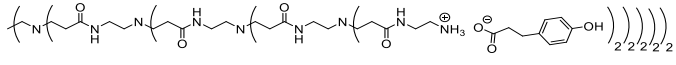
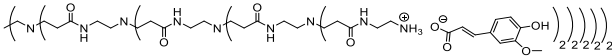
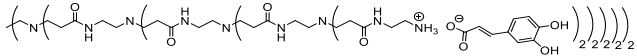
PPI-3-CA 92%

The synthesis of PAMAM dendrimers functionalized with phenolic acids, PAMAMs-PhA, PAMAMs-FA and PAMAMs-CA, were performed in the same way via the acid-base reaction of commercial PAMAMs with ferulic, phloretic and caffeic acids, respectively, in methanol or ethanol (**Scheme 10, Table 8**). However, it was necessary to increase the number of equivalents of phenolic acid (up to 1.5 equiv. per NH₂) and the reaction time (up to 16 or 20 h), probably because of the steric hindrance caused by the morphology of the PAMAMs, which prevents the insertion of phenolic acids and the formation of ionic bonds.



Scheme 10. Ionic functionalization of PAMAMs with phloretic, ferulic and caffeic acids.

Table 8 . Ionic PAMAM-derived dendrimers.

Starting dendrimers	Ionic dendrimers/Yields
	 PAMAM-1-PhA > 98%
PAMAM-1	 PAMAM-1-FA > 98%
	 PAMAM-1-CA > 99%
	 PAMAM-2-PhA > 98%
PAMAM-2	 PAMAM-2-FA > 98%
	 PAMAM-2-CA 92%
PAMAM-3	 PAMAM-3-PhA > 98%
	 PAMAM-3-FA > 98%
	 PAMAM-3-CA > 99%

The formation of PAMAM-1-PhA and PAMAM-1-FA was highlighted by ^1H NMR, focusing on the chemical shift of CH_2 groups linked to the terminal primary amine functions (2.75 ppm for PAMAM-1, 2.99 ppm and 3.1 ppm, respectively, for PAMAM-1-PhA and PAMAM-1-FA in CD_3OD). The ^{13}C NMR also shows a

chemical shift of the carbonyl carbons (176.3 ppm and 169.6 ppm, respectively, for phloretic acid and ferulic acid; 180.6 ppm and 174.6 ppm, respectively, for PAMAM-1-PhA and PAMAM-1-FA in CD₃OD (see Section 3.1)). Following the same procedure, the second and third generations of PAMAMs-PhA and PAMAMs-FA were prepared, with yields above 90%.

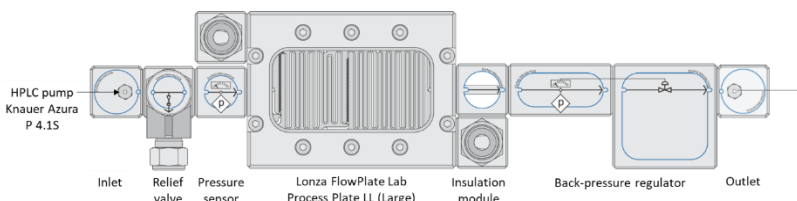
Once again, solubility issues occurred with caffeic acid; the formation of the first-generation PAMAM-1-CA was performed by reacting PAMAM-1 with caffeic acid in ethanol (instead of methanol) at room temperature, adding the caffeic acid solution dropwise (**Scheme 10 (b)**). In this case, no heating of the medium was required to obtain good yields. The formation of PAMAM-1-CA was followed by ¹H and ¹³C NMR, focusing on the chemical shift of the H11 protons corresponding to the CH₂ groups linked to the terminal primary amine functions (see Section 3.1) (2.55 ppm for PAMAM-1 and 2.78 ppm for PAMAM-1-CA in (CD₃)₂SO) and on the chemical shift of the C12 carbons corresponding to the carbonyl function (see Section 3.1) (168.4 ppm for caffeic acid, 172.5 ppm for PAMAM-1-CA in (CD₃)₂SO). The disappearance of a strong νCO band of caffeic acid, observed in IR at 1640 cm⁻¹, and the appearance of two νCO bands of ionized acid around 1522 at 1580 cm⁻¹ and 1376 cm⁻¹ for PAMAM-1-CA, confirm the formation of the ionic substrates. The second and third generations (PAMAM-2-CA and PAMAM-3-CA) were prepared similarly, with good yields of higher than 99%.

2.2. *Synthesis in MW and Microfluidic Reactors*

The feasibility of the reaction using microwave irradiation was demonstrated with PPI dendrimers, when the different syntheses were then optimized. Taking advantage of the fast and efficient heating induced by microwave organic synthesis, the formation of PPIs-PhA, PPIs-FA and PPIs-CA could be achieved in only 5 min at 100 °C (**Scheme 9 (b)**) with very high isolated yields. The different results obtained are summarized in Table 3.

Flow synthesis in a mesofluidic reactor was also investigated in the search for a process that is both time/energy-efficient and easily scalable. Considering the different results obtained in the batches, the feasibility of the methodology was tested using a commercial flow reactor of 1.2 mL (Lonza FlowPlate Lab used on an MMRS flow reactor from Ehrfeld). If compared to microwave irradiation technology, the use of a microfluidic device can lead to an easier scale-up, either by scaling up, sizing up or numbering up [284]. For this study, the system was designed to enable the continuous supply of a mixture containing either a PPI or a PAMAM precursor and carboxylic acid (PhA or FA) in methanol. The use of a back-pressure regulator (BPR)

enabled us to work above the boiling point of the solvent, thereby accelerating the overall process. It is noteworthy that caffeic acid was not tested, as the different salts obtained tended to precipitate, leading to clogging of the system. The set-up of the system used for these syntheses is presented in **Scheme 11** below.



Scheme 11. The setup used for the flow synthesis of antioxidant ionic dendrimers, based on various PPI and PAMAM

The high heat transfer provided by the microfluidic device, as well as this high temperature (100-120 °C) to perform the reaction within 5 min, as observed when microwave irradiation was used. This microwave/flow similarity is common and has been theorized to be the microwave-to-flow paradigm [285]. The different products were isolated as described in Section 3.1; in each case, yellowish solids were obtained, their purity being assessed by ¹H NMR. The different yields, as well as the experimental conditions, are summarized in **Table 9** below. Each test was duplicated.

Table 9. Synthesis of ionic dendrimers in MW and flow reactors

Ionic Dendrimer	Residence Time (Min.)	Temp. (°C)	Pressure (Bar)	Yields (%) (MW)	Yields (%) (Flow Reactors)
PPI-1-PhA	5	100	3.5	>97	>97
PPI-1-FA	5	100	3.5	>97	94
PPI-2-PhA	5	100	3.5	>97	>97
PPI-2-FA	5	100	3.5	>97	86
PPI-3-FA	5	100	3.5	>97	71
PAMAM-1-PhA	5	100	3.5	- ^a	98
PAMAM-1-FA	5	100	3.5	- ^a	82

^a The microwave-assisted reaction was not performed with PAMAM dendrimers.

2.3. Determination of the Antioxidant Properties

The antioxidant capacity of the ionic dendrimers was evaluated by measuring their ability to inhibit a DPPH radical. Several spectroscopic methods are described in the literature to measure the inhibition of the DPPH radical by an antioxidant [286], while UV-visible spectroscopy was used in another work [287]. The trapping of DPPH radicals by ionic dendrimers led to a color change from purple to yellow, relative to an H• transfer. This color change implies a decrease in the absorbance (A) of the DPPH radical at 515 nm. The results are expressed as a percentage of inhibition (I %), calculated according to the following formula:

$$I \% = \frac{A(\text{DPPH}) - A(\text{DPPH} + \text{antioxidant})}{A(\text{DPPH})} \times 100$$

where A(DPPH) is the absorbance of DPPH and A(DPPH + antioxidant) is the absorbance of the mixture of DPPH and substrate at 515 nm.

The evaluation of the antioxidant power was determined for 5 families of dendrimers, namely, PPIs-FA, PPIs-CA, PAMAMs-FA, PAMAMs-CA and PAMAMs-PhA and caffeic and ferulic acids, with ascorbic acid (vitamin C) used as the positive control [288].

The effect of dendrimer concentration is shown in **Figures 22 and 23**. From these curves, the IC₅₀ of each dendrimer, i.e., the concentration of an antioxidant to inhibit 50 percent of free radicals at a given concentration, was graphically determined (**Table 10**). The IC₅₀ curves in mg/L are given in the Supplementary Materials.

These results show that antioxidant activity depends on the generation of the dendrimer (**Table 10, entries 3–5, 6–8, 10–12 and 13–15**). Indeed, for higher generations, more phenolic carboxylates are present, leading to higher antioxidant molar activities (**Figure 22**).

Dendrimers derived from PAMAMs exhibit higher antioxidant activity, compared to PPI-based ones for the same generation. Once again, this observation can be ascribed to a larger number of phenolic carboxylates for PAMAM, compared to PPI (a ratio of 2) for a given generation. The level of antioxidant activity also depends on the nature of the antioxidant and is mainly linked to the number of hydroxyl functions present in the structures. Indeed, the best antioxidant activities are obtained for the caffeic acid derivatives, PPI-3-CA and PAMAM3-CA, where the IC₅₀ values are 3.5 ± 1.1 μmol/L and 1.0 ± 0.4 μmol/L (**Figure 23**), respectively, while the antioxidant activities of the ferulic acid derivatives are lower (**Table 10, entries 3–8**).

Furthermore, it is important to mention that caffeic acid not only possesses better antioxidant properties but is also more stable than vitamin C [289,290].

Table 10. Antioxidant activity of ionic dendrimers, determined as IC₅₀.

Entry	Samples	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)	Standard Deviation	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$) per Antioxidant Unit	Ratio IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$) per Antioxidant Unit/ IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$) (%)
1	Vitamin C	62.0	± 1.4	62.0	100
2	Ferulic acid	270.0	± 2.4	270.0	100
3	PPI-1-FA (4 FA units)	30.0	± 1.8	120	44
4	PPI-2-FA (8 FA units)	17.0	± 2.1	136	50
5	PPI-3-FA (16 FA units)	10.0	± 2.6	160	60
6	PAMAM-1-FA (8 FA units)	22.0	± 2.0	176	65
7	PAMAM-2-FA (16 FA units)	8.60	± 1.3	137.6	50
8	PAMAM-3-FA (32 FA units)	4.80	± 0.8	153.6	57
9	Caffeic acid	13.0	± 1.2	13	100
10	PPI-1-CA (4 CA units)	10.1	± 1.3	40.4	300
11	PPI-2-CA (8 CA units)	7.5	± 1.0	60	400
12	PPI-3-CA (16 CA units)	3.5	± 1.1	56	400
13	PAMAM-1-CA (8 CA units)	5.4	± 1.1	43.2	300
14	PAMAM-2-CA (16 CA units)	1.8	± 0.9	28.8	200
15	PAMAM-3-CA (32 CA units)	1.0	± 0.4	32	200
16	PAMAM-3-PhA	480.0	± 4.3	-	-

As the dendrimers contain several antioxidant units, a ratio between ionic dendrimers and the corresponding acid was calculated (**Table 10**). Thus, we observed that ionic PPIs or PAMAM ferulates are more strongly antioxidant than pure ferulic acid, while in the case of caffeic acid, the latter remains the most antioxidant. This

could be explained by a close interaction between OH groups of CA from the different arms of the dendrimer and/or OH and NH from the dendrimer itself; the solubility of the complex dendrimer/CA could also explain the difference in antioxidant activity.

In conclusion, dendrimers show good or even very good antioxidant activities and have the characteristic of being able to encapsulate various compounds of interest, particularly in the field of cosmetics.

For all ferulic and caffeic dendrimers, absorbance measurements at 515 nm were recorded every 90 s for 45 min and revealed no significant variation in absorbance as a function of time after 5 min of reaction with DPPH, meaning that their antioxidant activities appear quickly and are stable. On the other hand, a significant variation in the absorbance is observed for PAMAM-3-PhA with the passage of time (**Figure 24**). Indeed, after 5 min, the percentage of inhibition of 300 μ M DPPH by PAMAM-3-PhA at 5 mM concentration is 45%, while it increases to more than 90% for $t = 18$ min (**Figure 24**). For this reaction time, the IC_{50} of PAMAM-3-PhA is 480 μ mol/L. The antioxidant power of the latter is, thus, less important and takes more time to set up, compared to the other families of dendrimers derived from ferulic and caffeic acids.

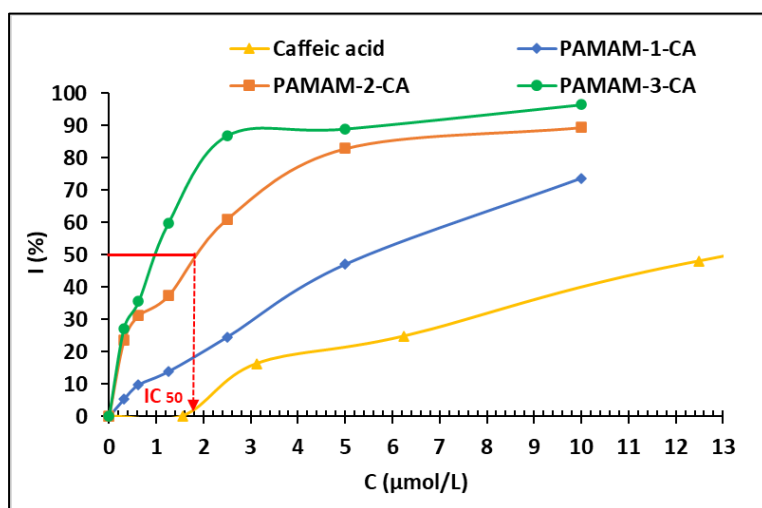


Figure 22. The inhibition of DPPH (300 μ M) by caffeic acid-derived PAMAM dendrimers.

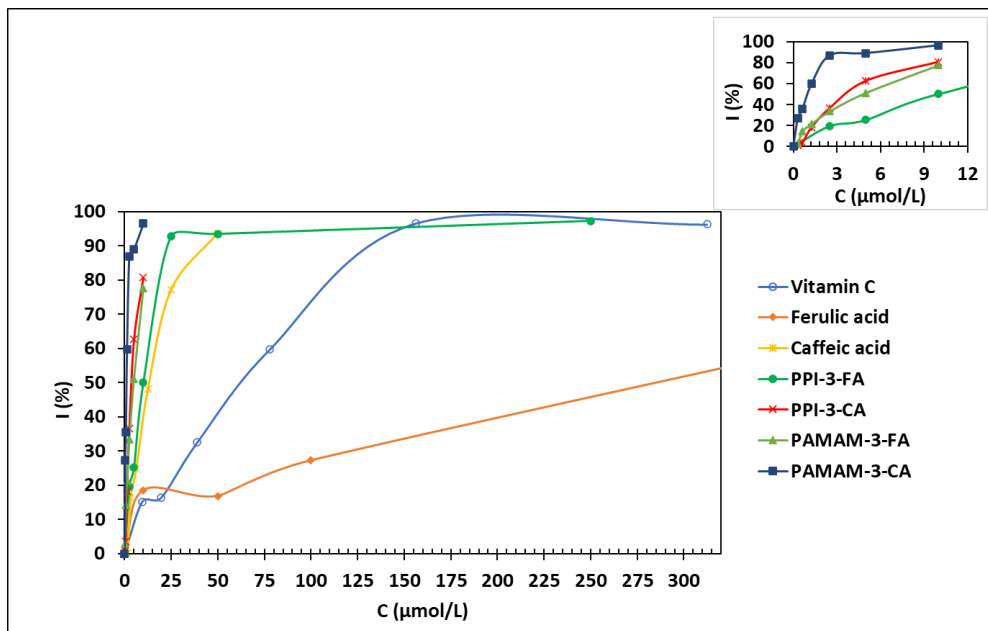


Figure 23. The inhibition of DPPH (300 μM) by ionic antioxidant dendrimers.

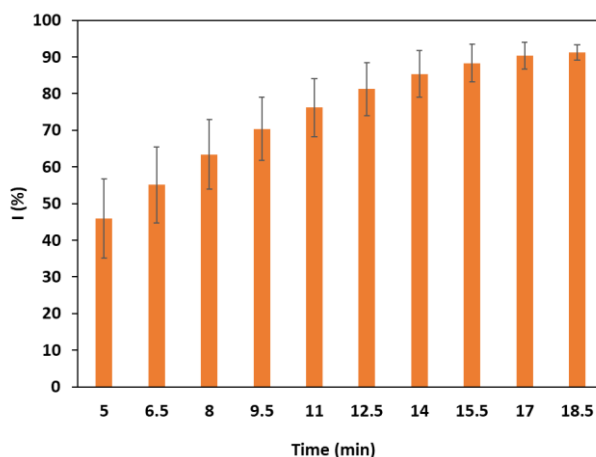


Figure 24. The inhibition of DPPH (300 μM) by PAMAM-3-PhA (5 mM).

2.4. Determination of Cytotoxic Properties

Based on the results of the toxicity tests performed on GD-PPI-4 and GD-PAMAM-3 dendrimers on human MRC5 fibroblasts [4], the cytotoxicity of five dendrimers, PPI-3-FA, PPI-3-PhA, PAMAM-3-FA, PAMAM-3-PhA, and PAMAM-3-CA was tested on human dermal fibroblasts using two methods, the WST1 assay and cell

staining with crystal violet, as described in Section 3.1. Dermal fibroblasts were incubated for 48 h in the presence of increasing concentrations of each dendrimer, while the number of living cells was established by a WST-1 reduction test. Cell toxicity with all dendrimers was observed as soon as a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was reached, except in the case of PPI-3-PhA, where toxicity was observed at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Figure 25 a,b**). At 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 80%, 67%, 60%, 13% and 2% of living cells were detected in the presence of PAMAM-3-FA, PPI-3-FA, PAMAM-3-PhA, PAMAM-3-CA and PPI-3-PhA, respectively. Above this concentration, cell viability decreased with an increase in concentration to about 2% at 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for all studied dendrimers. Dendrimers derived from ferulic acid remained less toxic than caffeic- and phloretic-derived ones, while the PPI-3-PhA dendrimer was the most toxic. **Figure 26** shows the images of human dermal fibroblast cells in the presence of different dendrimers using an EVOS XL Core inverted microscope, whereby the cytotoxicity is well highlighted. Hence, at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PAMAM-3-FA and PPI-3-FA could be used in cosmetics as encapsulating and antioxidant agents for active ingredients.

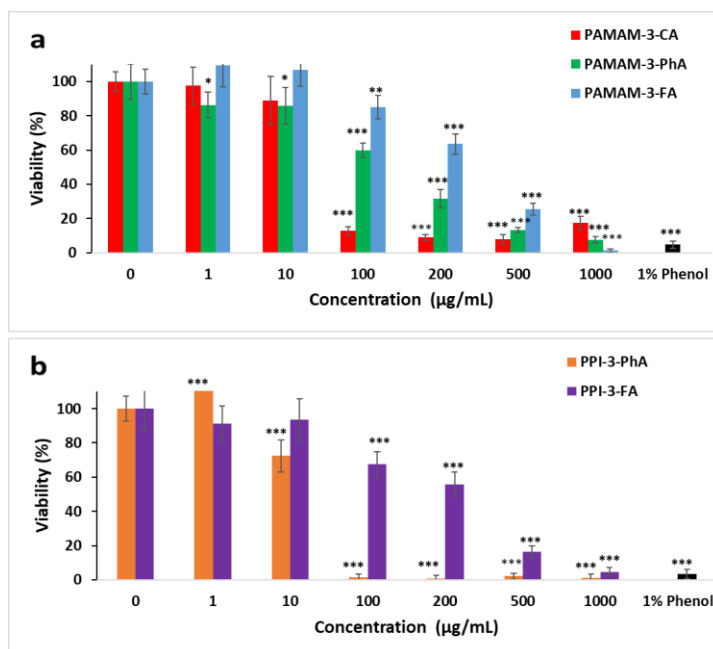


Figure 25. Cytotoxic effects of the phenolic acids (a) derived from PAMAM and (b) derived from PPI dendrimers on human dermal fibroblast cells, evaluated by a WST-1 assay (***: $p < 0.0001$).

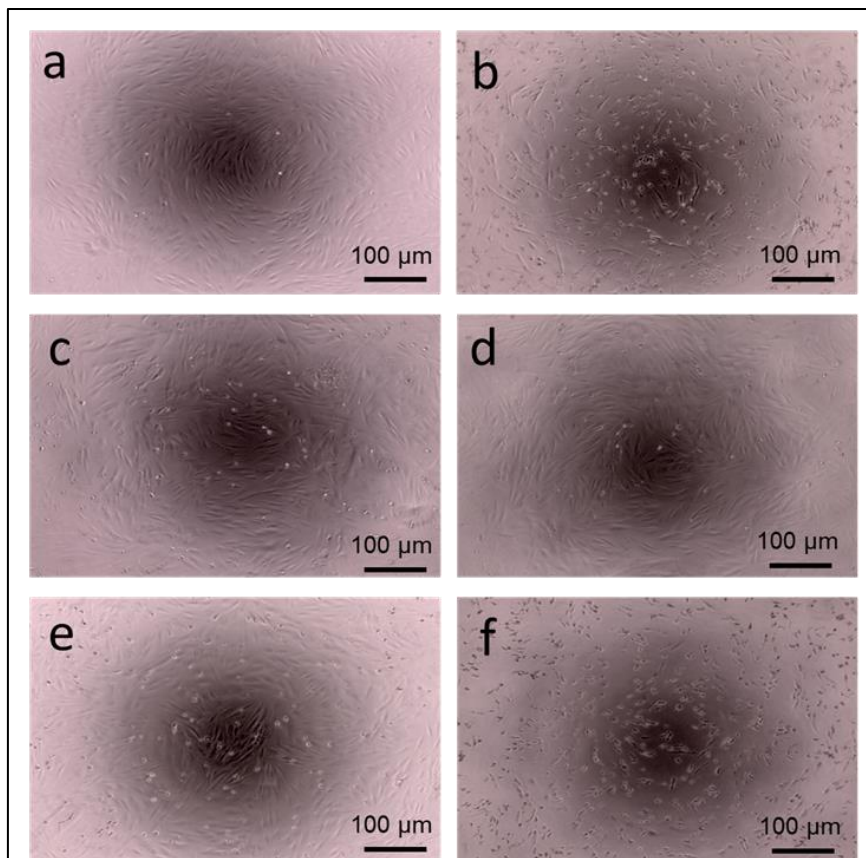


Figure 26. Cytotoxic effects of (b) PAMAM-3-CA, (c) PAMAM-3-FA, (d) PAMAM-3-PhA, (e) PPI-3-FA and (f) PPI-3-PhA at 100 $\mu\text{mol/L}$ on a human dermal fibroblast cell, compared with (a) a blank living cell. Cells were imaged using an EVOS XL Core inverted microscope ($\times 10$ magnification).

3. Conclusions

In the present work, 18 new ionic dendrimers have been easily prepared from PPI and PAMAM dendrimers and 3 biobased phenolic acids through a classical acid basic procedure. These syntheses were optimized under microwave activation and then transferred to a continuous flow microreactor, leading to high yields within short reaction times. The ionic dendrimers present very interesting antioxidant activities, even being superior to that of vitamin C, which was taken as the reference substance. These antioxidant activities depend on both the nature of the dendrimer and the phenolic acid used. The best antioxidant activities are observed with dendrimers PAMAMs-1-3-FA and PAMAMs-1-3-CA, both of these being stable compounds.

Hence, at 100 $\mu\text{g/mL}$, PAMAM-3-FA and PPI-3-FA could be used in cosmetics as encapsulating and antioxidant agents for active ingredients. Studies of encapsulation of bioactive compounds are in progress and the synergy of the antioxidant power of the dendrimer and its encapsulation capacity are now under investigation.

4. Materials and Methods

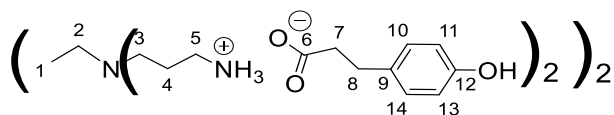
4.1. Experimental

PPIs, PAMAMs, phloretic acid, ferulic acid, caffeic and solvent were purchased from traditional chemical suppliers and used without further purification. NMR spectra (d: doublet, t: triplet and qt: quintuplet) were recorded at 298 K at 500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C on an Avance III Bruker spectrometer in CD_3OD or $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$. IR spectra (S: strong) were recorded on a Perkin Elmer Spectrum Two. Elemental analyses (C, H, N) were realized on a Flash EA-1112 Series. The microwave-assisted syntheses were performed on a CEM-focused microwave synthesis system in 20 mL vessels with septa at 90 Watts at 100 $^\circ\text{C}$ for 5 min. The absorbance measurements were realized on a FLUOstar Omega at 37 $^\circ\text{C}$ at 515 nm, taken every 90s for 45 min.

4.1.1. General Procedure for the Synthesis of PPI-PhA and PPI-FA Generations 1, 2 and 3

In a double-necked round-bottomed flask, phloretic acid (ferulic acid) (1.05 eq/ NH_2) and the dendrimer PPI-n (1 eq) were dissolved in methanol (20 mL). The reaction mixture was stirred at reflux (65 $^\circ\text{C}$) for 5 h; then, methanol was evaporated under reduced pressure. The residue obtained thereby was then dissolved in water (20 mL) and extracted with ethyl acetate (20 mL). The aqueous phase was then washed twice with ethyl acetate (2×50 mL) to remove excess phloretic acid (ferulic acid) and then evaporated under reduced pressure. The yellow solid salts were obtained in quantitative yields of $> 97\%$.

Data for PPI-1-PhA:



^1H NMR (500 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 1.42–1.44 (4H, H1, m); 1.76–1.78 (8H, H4, m); 2.41–2.49 (12H, H7, H2, m); 2.54 (8H, H3, t, $J = 6.98$ Hz); 2.82 (8H, H8, t, $J = 7.42$ Hz); 2.91 (8H, H5, t, $J = 7.24$ Hz); 6.71 (8H, H11, H13, d, $J = 8.61$ Hz); 7.05 (8H, H10, H14, d, $J = 8.61$ Hz).

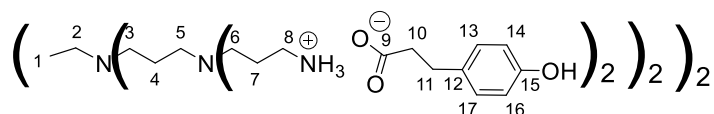
^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 24.0 (C1); 24.2 (C4); 31.4 (C8); 38.2 (C5); 39.8 (C7); 50.9 (C3); 53.2 (C2); 114.9 (C11, C13); 128.9 (C10, C14); 132.9 (C9); 155.1 (C12); 180.4 (C6).

IR (cm^{-1}): 1540 ($\nu\text{CO}_{\text{carboxylate}}$, S), 1396 ($\nu\text{CO}_{\text{carboxylate}}$, S), 1210–1235 ($\nu\text{C-O}_{\text{carboxylate}}$, S).

Calculated elemental analysis of $\text{C}_{52}\text{H}_{80}\text{N}_6\text{O}_{12}, 2\text{H}_2\text{O}$: C: 61.4%; H: 8.32%; N: 8.26%; O: 22.02%.

Experimental elemental analysis of $\text{C}_{52}\text{H}_{80}\text{N}_6\text{O}_{12}, 2\text{H}_2\text{O}$: C: 61.79%; H: 8.56%; N: 8.58%; O: 21.06%.

Data for PPI-2-PhA:



^1H NMR (500 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 1.49–1.53 (4H, H1, m); 1.60–1.80 (24H, H4, H7, m); 2.39–2.69 (52H, H10, H2, H5, H3, H6, m); 2.80–2.83 (16H, H11, t, $J = 7.42$ Hz); 2.88 (16H, H8, t, $J = 7.85$ Hz); 6.70 (16H, H14, H16, d, $J = 8.61$ Hz); 7.05 (16H, H13, H17, d, $J = 8.61$ Hz).

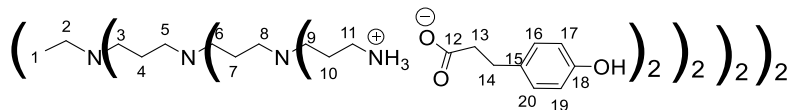
^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 22.41 (C4); 23.3 (C1); 24.6 (C7); 31.5 (C11); 38.1 (C8); 39.8 (C10); 50.7 (C6); 51.2 (C3); 51.3 (C5); 53.2 (C2); 114.8 (C14, C16); 128.9 (C13, C17); 132.9 (C12); 155.2 (C15); 180.5 (C9).

IR (cm^{-1}): 1540 ($\nu\text{CO}_{\text{carboxylate}}$, S), 1396 ($\nu\text{CO}_{\text{carboxylate}}$, S), 1210–1235 ($\nu\text{C-O}_{\text{carboxylate}}$, S).

Calculated elemental analysis of $\text{C}_{112}\text{H}_{176}\text{N}_{14}\text{O}_{24}, 5\text{H}_2\text{O}$: C: 61.35%; H: 8.55%; N: 8.94%; O: 21.16%.

Experimental elemental analysis of $\text{C}_{112}\text{H}_{176}\text{N}_{14}\text{O}_{24}, 5\text{H}_2\text{O}$: C: 61.42%; H: 8.61%; N: 8.69%; O: 21.27%.

Data for PPI-3-PhA:



^1H NMR (500 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 1.43–1.47 (4H, H1, m); 1.58–1.80 (56H, H4, H7, H10, m); 2.30–2.68 (116H, H13, H2, H5, H8, H3, H6, H9, m); 2.76–2.97 (64H, H14, H11, m); 6.72 (32H, H17, H19, d, $J = 8.5$ Hz); 7.05 (32H, H16, H20, d, $J = 8.5$ Hz).

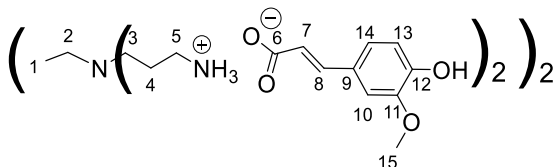
^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 22.4 (C4); 23.26 (C1); 24.6–24.6 (C7, C10); 31.5 (C14); 38.1 (C11); 39.8 (C13); 50.7 (C6, C9); 51.2 (C3); 51.3 (C5, C8); 53.2 (C2); 114.8 (C17, C19); 128.9 (C16, C20); 132.9 (C15); 155.2 (C18); 180.5 (C12)

IR (cm^{-1}): 1540 ($\nu\text{CO}_{\text{carboxylate}}$, S), 1396 ($\nu\text{CO}_{\text{carboxylate}}$, S), 1210–1235 ($\nu\text{C-O}_{\text{carboxylate}}$, S).

Calculated elemental analysis of $\text{C}_{232}\text{H}_{368}\text{N}_{30}\text{O}_{48}, 9\text{H}_2\text{O}$: C: 61.82%; H: 8.63%; N: 9.32%; O: 20.23%.

Experimental elemental analysis of $\text{C}_{232}\text{H}_{368}\text{N}_{30}\text{O}_{48}, 9\text{H}_2\text{O}$: C: 62.14%; H: 8.62%; N: 9.32%; O: 20.40%.

Data for PPI-1-FA:



^1H NMR (500 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 1.31–1.33 (4H, H1, m); 1.76–1.80 (8H, H4, m); 2.43–2.45 (4H, H2, m); 2.54 (8H, H3, t, $J = 7.35$ Hz); 2.98 (8H, H5, t, $J = 7.35$ Hz); 3.86 (12H, H15, s); 6.36 (4H, H7, d, $J = 15.82$ Hz); 6.82 (4H, H13, d, $J = 8.11$ Hz); 6.98 (4H, H14, dd, $J = 1.90$ Hz and $J = 8.11$ Hz); 7.09 (4H, H10, d, $J = 1.90$ Hz); 7.35 (4H, H8, d, $J = 15.82$ Hz).

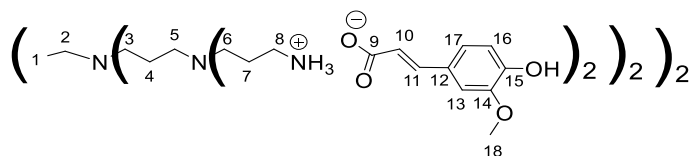
^{13}C RMN (125 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 24.1 (C1); 24.8 (C4); 38.4 (C5); 51.0 (C3); 53.2 (C2); 55.0 (C15); 109.9 (C10); 115.0 (C13); 121.4 (C14); 121.8 (C7); 127.7 (C9); 140.3 (C8); 147.9 (C11); 147.9 (C12); 174.7 (C6).

IR (cm^{-1}): 1634 ($\nu\text{CO}_{\text{carboxylate}}$, S), 1372 ($\nu\text{CO}_{\text{carboxylate}}$, S), 1211 ($\nu\text{C-O}_{\text{carboxylate}}$, S)

Calculated elemental analysis of $\text{C}_{56}\text{H}_{84}\text{N}_6\text{O}_{16}, 2\text{H}_2\text{O}$: C: 59.56%; H: 7.50%; N: 7.40%; O: 25.5%.

Experimental elemental analysis of $C_{56}H_{84}N_6O_{16}, 2H_2O$: C: 58.80%; H: 7.77%; N: 8.08%; O: 25.34%.

Data for PPI-2-FA:



1H NMR (500 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 1.40–1.43 (4H, H1, m); 1.59–1.62 (8H, H4, m); 1.79 (16H, H7, m); 2.32–2.67 (36H, H2, H5, H3, H6, m); 2.94 (16H, H8, t, $J = 7.08$ Hz); 3.85 (24H, H18, s); 6.36 (8H, H10, d, $J = 15.8$ Hz); 6,81 (8H, H16, d, $J = 8.13$ Hz); 6,98 (8H, H17, dd, $J = 8.13$ Hz, $J = 1.91$ Hz); 7.09 (8H, H13, d, $J = 1.91$ Hz); 7.35 (8H, H11, d, $J = 15.8$ Hz).

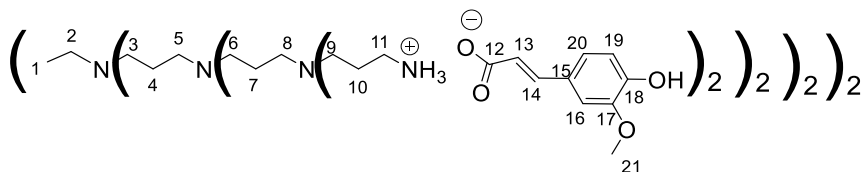
^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 22.4 (C4); 23.2 (C1); 24.6 (C7); 38.2 (C8); 50.8 (C6); 51.1 (C3); 51.2 (C5); 53.2 (C2); 55.1 (C18); 109.9 (C13); 115.3 (C16); 121.5 (C17); 121.9 (C10); 127.4 (C12); 140.3 (C11); 148.0 (C14); 148.3 (C15); 174.8 (C9).

IR (cm^{-1}): 1635 (ν_{CO} carboxylate, S), 1371 (ν_{CO} carboxylate, S), 1211 (ν_{C-O} carboxylate, S)

Calculated elemental analysis of $C_{120}H_{176}N_{14}O_{32}, 5H_2O$: C: 59.64%; H: 7.76%; N: 8.11%; O: 24.49%.

Eexperimental elemental analysis of $C_{120}H_{176}N_{14}O_{32}, 5H_2O$: C: 58.9%; H: 7.99%; N: 8.61%; O: 24.5%.

Data for PPI-3-FA:



1H NMR (500 MHz, CD_3OD), δ (ppm) : 1.42–1.46 (4H, H1, m); 1.50–1.81 (56H, H4, H7, H10, m); 2.27–2.62 (84H, H2, H5, H8, H3, H6, H9, m); 2.92–2.96 (32H, H11, m); 3.87 (48H, H21, s); 6.35 (16H, H13, d, $J = 15.83$ Hz); 6.80 (16H, H19, d, $J = 8.13$ Hz); 6.98 (16H, H20, dd, $J = 1.9$ Hz and $J = 8.13$ Hz); 7.10 (16H, H16, d, $J = 1.9$ Hz); 7.34 (16H, H14, d, $J = 15.83$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 18.5 (C7); 22.9 (C4); 24,8 (C1, C10); 38.3 (C11); 50.8 (C6, C9, C3); 51.2 (C8, C5, C2); 55.1 (C21); 109.9 (C16); 115.3 (C19); 121.5 (C20); 121.9 (C13); 127.4 (C15); 140.2 (C14); 148.1 (C17); 148.1 (C18); 174.6 (C12).

IR (cm^{-1}): 1635 ($\nu\text{CO}_{\text{carboxylate}}$, S), 1373 ($\nu\text{CO}_{\text{carboxylate}}$, S), 1211 ($\nu\text{C-O}_{\text{carboxylate}}$, S

Calculated elemental analysis of $\text{C}_{248}\text{H}_{368}\text{N}_{30}\text{O}_{64}, 13\text{H}_2\text{O}$: C: 59.24%; H: 7.9%; N: 8.36%; O: 24.5%.

Experimental elemental analysis of $\text{C}_{248}\text{H}_{368}\text{N}_{30}\text{O}_{64}, 13\text{H}_2\text{O}$: C: 58.88%; H: 8.05%; N: 8.87%; O: 24.2%.

4.1.2. General Procedure for the Microwave-Assisted Synthesis of PPI-PhA and PPI-FA Generations 1, 2 and 3

Phloretic acid (ferulic acid) (1.05 eq/ NH_2) and PPI-n dendrimer (1 eq), dissolved in methanol (7 mL), were introduced to a CEM microwave oven; the mixture was heated at 100 °C for 5 min at a maximal power of 90 W. The mixture was then transferred to a flask and methanol was evaporated under reduced pressure. The residue obtained thereby was then dissolved in water (20 mL) and extraction with ethyl acetate (20 mL) was performed. The aqueous phase was then washed twice with ethyl acetate (2×50 mL) to remove excess phloretic acid (ferulic acid) and evaporated under reduced pressure. The yellow solid salts were obtained with quantitative yields of > 98%.

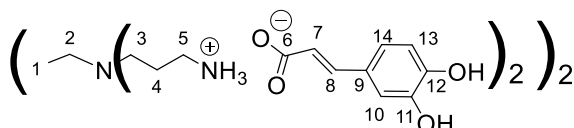
4.1.3. General Procedure for the Flow Synthesis of Ionic Dendrimers

A mixture containing 2.0 g of PPI, the adequate number of carboxylic acid (1 eq/ NH_2) and methanol (33.3 g) was prepared in a flask and stirred at room temperature for about 1 min until a homogeneous liquid was obtained. The mixture was then pumped into the Ehrfeld MMRS system at 0.24 mL/min using a Knauer Azura P4.15 HPLC pump. The flow reactor is represented in Scheme 3 and consists of a FlowPlate lab with a process plate LL, an insulation module and a backpressure regulator (Bronkhorst EL-Press). The temperature was settled to 150 °C using a Pilot One Ministat 230; a pressure of 3.5 bars was maintained via the BPR to prevent the evaporation of the medium. The residence time was confirmed by weighting the mixture obtained for a set amount of time (20 min). Each sample was then evaporated under vacuum at 45 °C, dissolved in methanol, washed three times with pentane/ethyl acetate (7/3) and dried under vacuum to obtain yellowish solids.

4.1.4. General Procedure for the Synthesis of PPI-CA Generations 1, 2 and 3

Caffeic acid (1.1 eq/NH₂), dissolved in the ethanol (15 mL), was added dropwise in a round-bottomed flask containing the PPI-n dendrimer (1 eq.) dissolved in ethanol (10 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2h using orbital stirring. The mixture was transferred to a centrifuge tube; the precipitation was recovered and washed 3 times with ethanol (3 × 30 mL) to remove excess caffeic acid before being dried under reduced pressure. The yellow solid salts were obtained, with yields of 90%, 90% and 92%, respectively, for generations 1, 2 and 3.

Data for PPI-1-CA:



¹H NMR (500 MHz, (CD₃)₂SO), δ (ppm): 1.30–1.34 (4H, H1, m); 1.60–1.64 (8H, H4, m); 2.27–2.30 (4H, H2, m); 2.37 (8H, H3, t, *J* = 6.87 Hz); 2.73 (8H, H5, t, *J* = 7.26 Hz); 6.14 (4H, H7, d, *J* = 15.76 Hz); 6.69 (4H, H13, d, *J* = 8.08 Hz); 6.80 (4H, H14, dd, *J* = 2.04 Hz and *J* = 8.08 Hz); 7.00 (4H, H10, d, *J* = 2.04 Hz); 7.13 (4H, H8, d, *J* = 15.76 Hz).

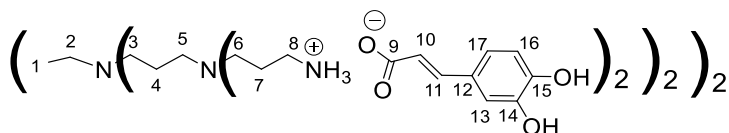
¹³C NMR (125 MHz, (CD₃)₂SO), δ (ppm): 24.9 (C1); 26.9 (C4); 38.6 (C5); 51.4 (C3); 53.6 (C2); 114.7 (C10); 116.3 (C13); 120.3 (C14); 122.4 (C7); 127.3 (C9); 140.1 (C8); 146.4 (C11); 147.9 (C12); 171.6 (C6).

IR (cm⁻¹): 1504–1600 (νCO _{carboxylate}, S), 1375 (νCO _{carboxylate}, S), 1204–1230 (νC-O _{carboxylate}, S).

Calculated elemental analysis of C₅₂H₇₂N₆O₁₆·2H₂O: C: 58.2%; H: 7.14%; N: 7.83%; O: 26.83%.

Experimental elemental analysis of C₅₂H₇₂N₆O₁₆·2H₂O: C: 57.4%; H: 7.46%; N: 8.55%; O: 26.59%.

Data for PPI-2-CA:



^1H NMR (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), δ (ppm): 1.27–1; 32 (4H, H1, m); 1.39–1.44 (8H, H4, m); 1.59–1.63 (16H, H7, m); 2.2–2.41 (36H, H2, H5, H3, H6, m); 2.74 (16H, H8, t, $J = 6.95$ Hz); 6.15 (8H, H10, d, $J = 15.76$ Hz); 6,71 (8H, H16, d, $J = 8.09$ Hz); 6.85 (8H, H17, dd, $J = 8.09$ Hz and $J = 1.95$ Hz); 7,00 (8H, H13, d, $J = 1.95$ Hz); 7.23 (8H, H11, d, $J = 15.76$ Hz).

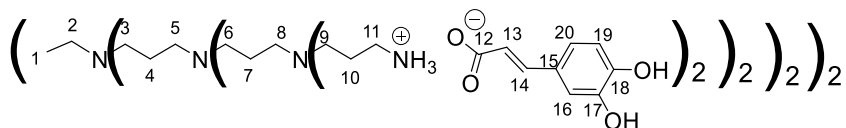
^{13}C NMR (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), δ (ppm): 24.8 (C1); 26,8 (C4); 27.1 (C7); 38.6 (C8); 49.9 (C6); 50.1 (C3); 51.3 (C5); 53.1 (C2); 109.1 (C13); 114.8 (C16); 116.3 (C17); 120.7 (C10); 126.9 (C12); 141.9 (C11); 146.3 (C14); 148.2 (C15); 171.6 (C9).

IR (cm^{-1}): 1504–1600 ($\nu\text{CO}_{\text{carboxylate}}$, S), 1375 ($\nu\text{CO}_{\text{carboxylate}}$, S), 1204–1230 ($\nu\text{C-O}_{\text{carboxylate}}$, S).

Calculated elemental analysis of $\text{C}_{112}\text{H}_{160}\text{N}_{14}\text{O}_{32}, 5\text{H}_2\text{O}$: C: 58.37%; H: 7.72%; N: 9.15%; O: 25.39%.

Experimental elemental analysis of $\text{C}_{112}\text{H}_{160}\text{N}_{14}\text{O}_{32}, 5\text{H}_2\text{O}$: C: 57.21%; H: 7.9%; N: 9.72%; O: 25.16%.

Data for PPI-3-CA:



^1H NMR (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), δ (ppm): 1.25–1.73 (60H, H1, H4, H7, H10, m); 2.16–2.43 (84H, H2, H5, H8, H3, H6, H9, m); 2.74 (32H, H11, m); 6.15 (16H, H13, d, $J = 15.75$ Hz); 6.73 (16H, H19, d, $J = 8.14$ Hz); 6.87 (16H, H20, d, $J = 8.14$ Hz); 7.01 (16H, H16, s); 7.27 (16H, H14, d, $J = 15.75$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), δ (ppm): 24.8 (C1); 26.1 (C4); 27.0 (C7, C10); 38.6 (C11); 49.8 (C6, C9, C3); 51.3 (C8, C5, C2); 111.7 (C16); 114.9 (C19); 116.2 (C20); 120.9 (C13); 126.7 (C15); 140.2 (C14); 146.4 (C17); 148.0 (C18); 170.7 (C12).

IR (cm^{-1}): 1504–1600 ($\nu\text{CO}_{\text{carboxylate}}$, S), 1375 ($\nu\text{CO}_{\text{carboxylate}}$, S), 1204–1230 ($\nu\text{C-O}_{\text{carboxylate}}$, S).

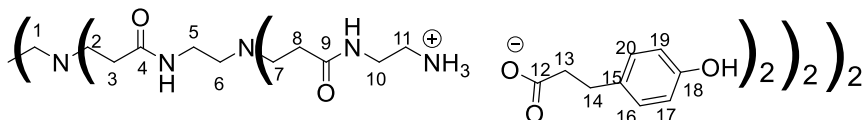
Calculated elemental analysis of $\text{C}_{196}\text{H}_{316}\text{N}_{30}\text{O}_{54}, 7\text{H}_2\text{O}$: C: 57.66%; H: 8.15%; N: 10.29%; O: 23.9%.

Experimental elemental analysis of $\text{C}_{196}\text{H}_{316}\text{N}_{30}\text{O}_{54}, 7\text{H}_2\text{O}$: C: 57.05%; H: 8.26%; N: 10.75%; O: 23.94%.

4.1.5. General Procedure for the Synthesis of PAMAM-PhA and PAMAM-FA Generations 1, 2 and 3

Phloretic acid (ferulic acid) (1.5 equiv. per NH₂) and PAMAM-n dendrimer (1 equiv.), dissolved in methanol (20 mL), were introduced to a double-necked round-bottomed flask. The mixture was stirred at reflux (65 °C) for 16h and the methanol was evaporated under reduced pressure. The residue obtained thereby was then dissolved in water (20 mL) and extracted with ethyl acetate (20 mL). The aqueous phase was then washed twice with ethyl acetate (2 × 50 mL) to remove the excess phloretic acid (ferulic acid). After evaporation, the yellow solid salts were obtained, with quantitative yields of > 98%.

Data for PAMAM-1-PhA:



¹H NMR (500 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 2.29–2.49 (40H, H3, H8, H13, m); 2.5–2.61 (12H, H1, H6, m); 2.64–2.95 (40H, H2, H7, H14, m); 2.97–3.1 (16H, H11, m); 3.26 (8H, H5, m); 3.47– 3.49 (16H, H10, m); 6.72 (16H, H16, H20, d, *J* = 8.46 Hz) 7.05 (16H, H17, H19, d, *J* = 8.46 Hz).

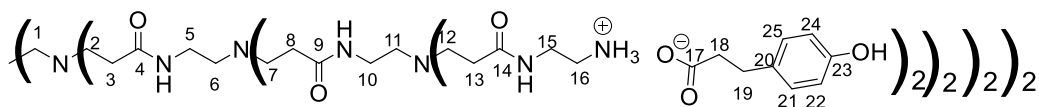
¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 31.5 (C14); 33.1 (C3, C8); 37.3 (C5, C10); 39.3 (C11); 39.8 (C13); 49.5 (C2, C7); 52.0 (C1, C6); 114.9 (C16, C20); 128.9 (C17, C19); 132.8 (C15); 155.1 (C18); 173.3 (C4); 174.4 (C9); 180.6 (C12).

IR (cm⁻¹): 1540 (νCO _{carboxylate}, S), 1394 (νCO _{carboxylate}, S), 1211–1236 (νC-O _{carboxylate}, S).

Calculated elemental analysis of C₁₃₄H₂₀₈N₂₆O₃₆·3H₂O: C: 53.77%; H: 7.88%; N: 12.17%; O: 26.19%.

Experimental elemental analysis of C₁₃₄H₂₀₈N₂₆O₃₆·13H₂O: C: 54.1%; H: 8.32%; N: 11.34%; O: 26.23%.

Data for PAMAM-2-PhA:



^1H NMR (500 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 2.29–2.50 (88H, H 3, H8, H13, H18, m); 2.51–2.63 (28H, H1, H6, H11, m); 2.67–2.92 (88H, H2, H7, H12, H19, m); 2.94–3.1 (32H, H16, m); 3.26 (24H, H5, H10, m); 3.38–3.48 (32H, H15, m); 6.72 (32H, H16, H20, d, $J = 8.27$ Hz) 7.05 (32H, H17, H19, d, $J = 8.27$ Hz);

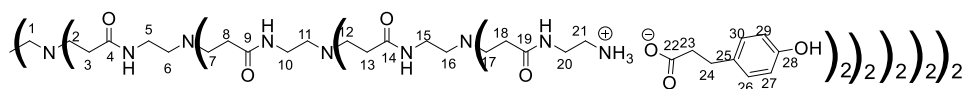
^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 31.52 (C19); 33.1 (C3, C8, C13); 37.3 (C5, C10, C15); 39.3 (C16); 39.8 (C18); 49.5 (C2, C7, C12); 52.0 (C1, C6, C11); 114.9 (C21, C25); 128.9 (C22, C24); 132.8 (C20); 155.1 (C23); 173.3 (C4, C9); 174.4 (C14); 180.6 (C17).

IR (cm^{-1}): 1540 (vCO_{carboxylate}, S), 1394 (vCO_{carboxylate}, S), 1211–1236 (vC-O_{carboxylate}, S).

Calculated elemental analysis of $\text{C}_{286}\text{H}_{448}\text{N}_{58}\text{O}_{76}, 32\text{H}_2\text{O}$: C: 52.92%; H: 7.95%; N: 12.51%; O: 26.62%.

Experimental elemental analysis of $\text{C}_{286}\text{H}_{448}\text{N}_{58}\text{O}_{76}, 32\text{H}_2\text{O}$: C: 53.24%; H: 7.99%; N: 11.75%; O: 27.01%.

Data for PAMAM-3-PhA:



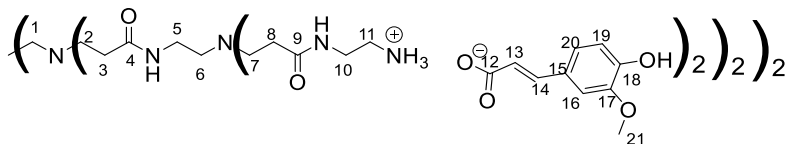
^1H NMR (500 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 2.25–2.49 (184H, H3, H8, H13, H18, H23, m); 2.50–2.62 (60H, H1, H6, H11, H16, m); 2.7–2.89 (184H, H2, H7, H12, H17, H24, m); 2.98–3.09 (64H, H21, m); 3.19–3.30 (56H, H5, H10, H15, m); 3.44 (64H, H20, m); 6.71 (64H, H26, H30, d, $J = 8.3$ Hz); 7.05 (64H, H27, H29, d, $J = 8.3$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 31.5 (C24); 33.1 (C3, C8, C13); 33.3 (C18); 37.1–37.4 (C5, C10, C15, C20); 39.3 (C21); 39.8 (C23); 49.5 (C2, C7, C12, C17); 52.0 (C1, C6, C11, C16); 114.9 (C26, C30); 128.9 (C27, C29); 132.8 (C25); 155.1 (C28); 173.3 (C4, C9, C14); 174.4 (C19); 180.6 (C22).

IR (cm^{-1}): 1540 (vCO_{carboxylate}, S), 1394 (vCO_{carboxylate}, S), 1211–1236 (vC-O_{carboxylate}, S).

Calculated elemental analysis of $\text{C}_{590}\text{H}_{926}\text{N}_{122}\text{O}_{156}, 98\text{H}_2\text{O}$: C: 50.65%; H: 8.08%; N: 12.21%; O: 29.05%.

Experimental elemental analysis of $\text{C}_{590}\text{H}_{926}\text{N}_{122}\text{O}_{156}, 98\text{H}_2\text{O}$: C: 51.04%; H: 8.00%; N: 11.40%; O: 29.04%.

Data for PAMAM-1-FA:


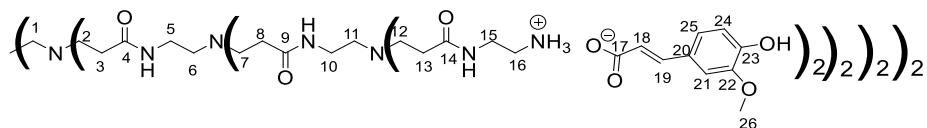
^1H NMR (500 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 2.29–2.43 (24H, H3, H8, m); 2.48–2.61 (12H, H1, H6, m); 2.64–2.87 (24H, H2, H7, m); 3–3.13 (16H, H11, m); 3.23 (8H, H5, m); 3.47 (16H, H10, m); 3.86 (24H, H21, s) 6,38 (8H, H13, d, $J = 15.85$ Hz); 6.82 (8H, H19, d, $J = 8.26$ Hz); 6,99(8H, H20, dd, $J = 1.95$ Hz, $J = 8.26$ Hz); 7.11 (8H, H16, d, $J = 1.95$ Hz); 7.35 (8H, H14, d, $J = 15.85$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 33.2 (C3, C8); 37.2 (C5); 38.3 (C10); 39.7 (C11); 49.6 (C2, C7); 50.8 (C1); 52.0 (C6); 55.0 (C21); 109.9 (C16); 115.0 (C19); 121.5 (C13); 121.7 (C20); 127.7 (C15); 140.4 (C14); 147.9 (C17, C18); 173.2 (C4); 174.3 (C9); 174.6 (C12).

IR (cm^{-1}): 1511–1590 ($\nu\text{CO}_{\text{carboxylate}}$, S), 1373 ($\nu\text{CO}_{\text{carboxylate}}$, S), 1220–1264 ($\nu\text{C-O}_{\text{carboxylate}}$, S).

Calculated elemental analysis of $\text{C}_{142}\text{H}_{208}\text{N}_{26}\text{O}_{44}, 16\text{H}_2\text{O}$: C: 52.13%; H: 7.39%; N: 11.13%; O: 29.34%.

Experimental elemental analysis of $\text{C}_{142}\text{H}_{208}\text{N}_{26}\text{O}_{44}, 16\text{H}_2\text{O}$: C: 52.21%; H: 7.79%; N: 11.13%; O: 28.87%.

Data for PAMAM-2-FA:


^1H NMR (500 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 2.20–2.46 (56H, H3, H8, H13, m); 2.48–2.60 (28H, H1, H6, H11, m); 2.66–2.92 (56H, H2, H7, H12, m); 3.00–3.16 (32H, H16, m); 3.23 (24H, H5, H10, m); 3.50 (32H, H15, m); 3.86 (48H, H26, s) 6.37 (16H, H18, d, $J = 15.8$ Hz); 6.81 (16H, H24, d, $J = 8.2$ Hz); 6.99 (16H, H25, dd, $J = 1.95$ Hz, $J = 8.2$ Hz); 7.11 (16H, H21, d, $J = 1.95$ Hz); 7.35 (16H, H19, d, $J = 15.8$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 33.2 (C3, C8, C13); 37.5 (C5, C10); 38.3 (C15); 39.7 (C16); 49.6 (C2, C7, C12); 51.0 (C1, C6, C11); 55.0 (C26); 109.9 (C21);

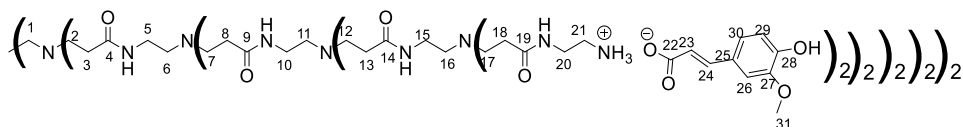
115.0 (C24); 121.5 (C18, C25); 127.7 (C20); 140.4 (C19); 147.9 (C22, C23); 174.2 (C4, C9, C14); 174.6 (C17).

IR (cm⁻¹): 1511–1590 (νCO_{carboxylate}, S), 1373 (νCO_{carboxylate}, S), 1220–1264 (νC-O_{carboxylate}, S)

Calculated elemental analysis of C₃₀₂H₄₄₈N₅₈O₉₂.40H₂O: C: 51.21%; H: 7.51%; N: 11.47%; O: 29.81%.

Experimental elemental analysis of C₃₀₂H₄₄₈N₅₈O₉₂.40H₂O: C: 51.53%; H: 7.68%; N: 10.93%; O: 29.84%.

Data for PAMAM-3-FA:



¹H NMR (500 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 2.23–2.48 (120H, H3, H8, H13, H18, m); 2.47–2.61 (60H, H1, H6, H11, H16, m); 2.63–2.95 (120H, H2, H7, H12, H17, m); 3.02–3.17 (64H, H21, m); 3.17–3.28 (56H, H5, H10, H15, m); 3.40–3.56 (64H, H20, m); 3.86 (96H, H31, s); 6.37 (32H, H23, d, *J* = 15.8 Hz); 6.82 (32H, H29, d, *J* = 8.27 Hz); 6.99 (32H, H30, dd, *J* = 1.95 Hz, *J* = 8.27 Hz); 7.11 (32H, H26, d, *J* = 1.95 Hz); 7.36 (32H, H24, d, *J* = 15.8 Hz).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 33.2 (C3, C8, C13, C18); 37.17 (C5, C10, C15); 38.0 (C20); 39.6 (C21); 49.5 (C2, C7, C12, C17); 51.9 (C1, C6, C11, C16); 55.16 (C31); 110.0 (C26); 115.3 (C29); 121.5 (C30); 122.0 (C23); 127.6 (C25); 140.4 (C24); 148.0 (C27, C28); 174.4 (C4, C9, C14, C19); 174.9 (C22).

IR (cm⁻¹): 1511–1590 (νCO_{carboxylate}, S), 1373 (νCO_{carboxylate}, S), 1220–1264 (νC-O_{carboxylate}, S).

Calculated elemental analysis of C₆₂₂H₉₂₈N₁₂₂O₁₈₈.95H₂O: C: 50.36%; H: 7.60%; N: 11.52%; O: 30.52%.

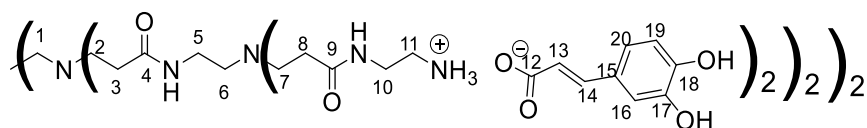
Experimental elemental analysis of C₆₂₂H₉₂₈N₁₂₂O₁₈₈.95H₂O: C: 50.24%; H: 7.61%; N: 10.94%; O: 29.82%.

4.1.6. General Procedure for the Synthesis of PAMAM-CA Generations 1, 2 and 3

Caffeic acid (1.5 equiv. per NH₂), dissolved in ethanol (15 mL), was introduced dropwise to a round-bottomed flask containing the PAMAM-*n* dendrimer (1 eq.),

which had been previously dissolved in ethanol (10 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 20h using orbital stirring. The mixture was then transferred to a centrifuge. The residue recovered by filtration was then washed 3 times with ethanol (3 × 30 mL) to remove the excess caffeic acid. The product obtained thereby after evaporation under reduced pressure consisted of a white solid salt, with quantitative yields of > 99% for generations 1 and 3 and 90% for generation 2.

Data for PAMAM-1-CA:



^1H NMR (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), δ (ppm): 2.14–2.99 (24H, H3, H8, m); 2.36–2.46 (12H, H1, H6, m); 2.56–2.7 (24H, H2, H7, m); 2.72–2.81 (16H, H11, m); 3.06–3.15 (8H, H5, m); 3.23 (16H, H10, m); 6.15 (8H, H13, d, $J = 15.79$ Hz); 6.71 (8H, H19, d, $J = 8.22$ Hz); 6.83 (8H, H20, dd, $J = 2.08$ Hz, $J = 8.22$ Hz); 6.98 (8H, H16, d, $J = 2.08$ Hz); 7.20 (8H, H14, d, $J = 15.79$ Hz).

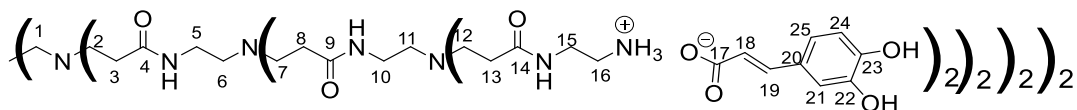
^{13}C NMR (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), δ (ppm): 33.8 (C3, C8); 37.4 (C5, C10); 39.0 (C11); 50.0 (C2, C7); 52.6 (C1, C6); 114.8 (C16); 116.3 (C19); 120.6 (C13); 121.0 (C20); 127.1 (C15); 141.1 (C14); 146.3 (C17); 148.0 (C18); 171.2 (C4, C9); 172.5 (C12).

IR (cm^{-1}): 1522–1580 ($\nu\text{CO}_{\text{carboxylate}}$, S), 1376 ($\nu\text{CO}_{\text{carboxylate}}$, S), 1200–1220 ($\nu\text{C-O}_{\text{carboxylate}}$, S).

Calculated elemental analysis of $\text{C}_{134}\text{H}_{192}\text{N}_{26}\text{O}_{44}, 11\text{H}_2\text{O}$: C: 52.44%; H: 7.03%; N: 11.87%; O: 28.67%.

Experimental elemental analysis of $\text{C}_{134}\text{H}_{192}\text{N}_{26}\text{O}_{44}, 11\text{H}_2\text{O}$: C: 52.64%; H: 7.41%; N: 11.63%; O: 28.31%.

Data for PAMAM-2-CA:



^1H NMR (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), δ (ppm): 2.02–2.29 (56H, H3, H8, H13, m); 2.34–2.47 (28H, H1, H6, H11, m); 2.56–2.79 (88H, H2, H7, H12, H15, m); 2.99–3.24 (56H,

H5, H10, H15, m); 6.15 (13H, H18, d, $J = 15.74$ Hz); 6.73 (13H, H24, d, $J = 8.17$ Hz); 6.86 (13H, H25, dd, $J = 2.14$ Hz, $J = 8.17$ Hz); 6.98 (13H, H21, d, $J = 2.14$ Hz); 7.26 (13H, H19, d, $J = 15.74$ Hz).

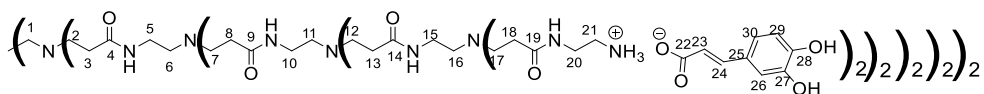
^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 33.7 (C3, C8, C13); 37.4 (C5, C10, C15); 39.0 (C16); 50.0 (C2, C7, C12); 52.5 (C1, C6, C11); 114.7 (C21); 116.3 (C24); 120.6 (C23); 121.0 (C25); 127.0 (C18); 141.1 (C19); 146.2 (C22, C23); 171.2 (C4, C9, C14); 172.7 (C17).

IR (cm^{-1}): 1522–1580 ($\nu\text{CO}_{\text{carboxylate}}$, S), 1376 ($\nu\text{CO}_{\text{carboxylate}}$, S), 1200–1220 ($\nu\text{C-O}_{\text{carboxylate}}$, S).

Calculated elemental analysis of $\text{C}_{286}\text{H}_{416}\text{N}_{58}\text{O}_{92}, 20\text{H}_2\text{O}$: C: 52.86%; H: 7.07%; N: 12.50%; O: 27.57%.

Experimental elemental analysis of $\text{C}_{286}\text{H}_{416}\text{N}_{58}\text{O}_{92}, 20\text{H}_2\text{O}$: C: 52.21%; H: 7.09%; N: 12.87%; O: 27.83%.

Data for PAMAM-3-CA:



^1H NMR (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), δ (ppm): 2.10–2.34 (120H, H3, H8, H13, H18, m); 2.35–2.48 (60H, H1, H6, H11, H16, m); 2.55–2.87 (184H, H2, H7, H12, H17, H21, m); 2.95–3.33 (120H, H5, H10, H15, H20, m); 6.16 (32H, H23, d, $J = 15.79$ Hz); 6.72 (32H, H29, d, $J = 8.24$ Hz); 6.85 (32H, H30, dd, $J = 2.03$ Hz, and $J = 8.24$ Hz); 6.98 (32H, H26, d, $J = 2.03$ Hz); 7.24 (32H, H24, d, $J = 15.79$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), δ (ppm): 33.8 (C3, C8, C13, C18); 37.4 (C5, C10, C15, C20); 39.1 (C21); 50.0 (C2, C7, C12, C17); 52.6 (C1, C6, C11, C16); 114.8 (C26); 116.4 (C29); 120.6 (C23); 121.1 (C30); 127.1 (C25); 141.1 (C24); 146.3 (C27, C28); 171.2 (C4, C9, C14, C19); 172.6 (C22).

IR (cm^{-1}): 1522–1580 ($\nu\text{CO}_{\text{carboxylate}}$, S), 1376 ($\nu\text{CO}_{\text{carboxylate}}$, S), 1200–1220 ($\nu\text{C-O}_{\text{carboxylate}}$, S).

Calculated elemental analysis of $\text{C}_{590}\text{H}_{863}\text{N}_{122}\text{O}_{188}, 26\text{H}_2\text{O}$: C: 53.92%; H: 7.02%; N: 13.00%; O: 26.05%.

Experimental elemental analysis of $\text{C}_{590}\text{H}_{863}\text{N}_{122}\text{O}_{188}, 26\text{H}_2\text{O}$: C: 53.16%; H: 7.50%; N: 13.75%; O: 25.58%.

4.2. Antioxidant Activity Evaluation of Synthesized Dendrimers

In a volumetric flask, a solution of 2,2-diphenyl 1-picrylhydrazyl (DPPH•) at 6×10^{-4} mol/L was prepared (2.37 mg in 25 mL of methanol). Then, a solution of the desired antioxidant ionic dendrimers was prepared, either in methanol for the phloretic and ferulic acid-based dendrimers or in a methanol/water/DMSO ((3:1:1) v/v/v) mixture for the caffeic acid-based dendrimers. The solution was diluted to different concentrations in microplate wells. An equivalent volume of DPPH• solution (100 μ L/100 μ L) was added to each well.

The absorbance measurements were realized using a FLUOstar Omega device at 515 nm every 90s for 45 min to control the kinetics of the reaction. The curve of the percentage inhibition as a function of the concentrations ($I (\%) = f ([C])$) gave the IC₅₀ values (the concentration of the antioxidant necessary to inhibit 50% of DPPH) for each compound.

4.3. Cytotoxicity Experiment

4.3.1. Cell Culture

Normal human dermal fibroblasts were purchased from Promocell (Heidelberg, Germany). They were grown in DMEM, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) according to the manufacturer's specifications, in Nunclon[®] 75 cm² flasks (Dutscher Brumath, France) at 37 °C in a humid atmosphere containing 5% CO₂.

4.3.2. Cell Viability Assay

Cells were seeded in sterile 96-well microtiter plates (1 \times 10,000 cells/well) and were allowed to settle for 24h. Dendrimers were added to the cells at final concentrations of 0, 1, 10, 200, 500 and 1000 μ g/mL in DMEM supplemented with 1% FBS. The cells were incubated for 48h and imaged using an EVOS XL Core (Invitrogen) inverted microscope (x 10 magnification) (Figure 5). Then, the medium was replaced by fresh medium containing 10% Wst-1 reagent. Absorbance was measured at 450 nm using a microplate spectrophotometer (SPECTROstar[®] Nano, BMG Labtech, Champsigny-sur-Marne, France). Statistical analysis was performed using Student's *t*-test. The results are expressed as the mean \pm standard deviation.

Supplementary Materials: (Annexe 1) The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/polym14173513/s1>, Figure S1: ^1H NMR of PPI-1-PhA in CD_3OD ; Figure S2 : ^{13}C NMR of PPI-1-PhA in CD_3OD ; Figure S3 : COSY NMR of PPI-1-PhA in CD_3OD ; Figure S4: HSQC NMR of PPI-1-PhA in CD_3OD ; Figure S5: HMBC NMR of PPI-1-PhA in CD_3OD ; Figure S6: ^1H NMR of PPI-2-PhA in CD_3OD ; Figure S7: ^{13}C NMR of PPI-2-PhA in CD_3OD ; Figure S8: ^1H NMR of PPI-3-PhA in CD_3OD ; Figure S9: ^1H NMR of PPI-1-FA in CD_3OD ; Figure S10: ^{13}C NMR of PPI-1-FA in CD_3OD ; Figure S11: COSY NMR of PPI-1-FA in CD_3OD ; Figure S12: HSQC NMR of PPI-1-FA in CD_3OD ; Figure S13: HMBC NMR of PPI-1-FA in CD_3OD ; Figure S14: ^1H NMR of PPI-2-FA in CD_3OD ; Figure S15: ^{13}C NMR of PPI-2-FA in CD_3OD ; Figure S16: ^1H NMR of PPI-3-FA in CD_3OD ; Figure S17: ^{13}C NMR of PPI-3-FA in CD_3OD ; Figure S18: IR of PPI-3-FA; Figure S19: ^1H NMR of PPI-1-CA in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$; Figure S20: ^{13}C NMR of PPI-1-CA in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$; Figure S21: ^1H NMR of PPI-2-CA in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$; Figure S22: ^{13}C NMR of PPI-2-CA in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$; Figure S23: ^1H NMR of PPI-3-CA in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (weak solubility); Figure S24: ^{13}C NMR of PPI-3-CA in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (weak solubility); Figure S25: IR of PPI-3-CA; Figure S26: IR of Caffeic acid; Figure S27: ^1H NMR of PAMAM-1-PhA in CD_3OD ; Figure S28: ^{13}C NMR of PAMAM-1-PhA in CD_3OD ; Figure S29: COSY NMR of PAMAM-1-PhA in CD_3OD ; Figure S30: IR of PAMAM-1-PhA; Figure S31: IR of Phloretic acid; Figure S32: ^1H NMR of PAMAM-2-PhA in CD_3OD ; Figure S33: IR of PAMAM-2-PhA; Figure S34: ^1H NMR of PAMAM-3-PhA in CD_3OD ; Figure S35: ^{13}C NMR of PAMAM-3-PhA in CD_3OD ; Figure S36: HMBC NMR of PAMAM-3-PhA in CD_3OD ; Figure S37: ^1H NMR of PAMAM-1-FA in CD_3OD ; Figure S38: ^{13}C NMR of PAMAM-1-FA in CD_3OD ; Figure S39: ^1H NMR of PAMAM-2-FA in CD_3OD ; Figure S40: IR of PAMAM-2-FA; Figure S41: ^1H NMR of PAMAM-1-CA in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$; Figure S42: ^{13}C NMR of PAMAM-1-CA in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$; Figure S43: IR of PAMAM-1-CA; Figure S44: ^1H NMR of PAMAM-2-CA in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$; Figure S45: IR of PAMAM-2-CA; Figure S46: ^1H NMR of PAMAM-3-CA in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$; Figure S47: IR of PAMAM-3-CA; IR of PAMAM-3-CA; Figure S48: Inhibition of DPPH (300 μmol or 118.3mg/L) by caffeic acid derived-PAMAM dendrimers; Figure S49: Inhibition of DPPH (300 μmol or 118.3mg/L) by ionic antioxidant dendrimers; Table S1: IC_{50} (mg/L).

III.3. Evaluation de l'activité antioxydante

Les antioxydants sont des molécules ou enzymes capables de prévenir ou ralentir l'oxydation d'une substance. Ils sont capables de neutraliser les formes actives de l'oxygène et permettent de piéger les radicaux libres au niveau de l'organisme [291]. Les antioxydants jouent un rôle important pour notre santé et notre vitalité, ils luttent contre l'oxydation de l'organisme mais également contre le vieillissement [292]. Il existe plusieurs antioxydants de nature synthétique ou naturels parmi ceux-ci on peut citer les vitamines A, E et C, les polyphénols dont les acides phénoliques [291,293].

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour évaluer l'activité antioxydante, le **tableau 11** en présente quelques-unes.

Tableau 11 : Quelques méthodes d'évaluation du pouvoir antioxydant

Méthode	Principe	Avantages	Inconvénients	Références
Test d'ABTS (acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique))	<ul style="list-style-type: none"> - Décoloration d'un radical cationique ABTS^{•+} coloré bleu vert lorsqu'il est réduit par un antioxydant, par suite d'un transfert d'électron. - Mesure de l'adsorption par spectrophotométrie à 734 nm 	<ul style="list-style-type: none"> - Très facile à mettre en œuvre - Cinétique de la réaction très rapide - Peu coûteux 	<ul style="list-style-type: none"> - Produit de dégradation antioxydant - Radical inexistant <i>in vivo</i> 	[294–296]

<p>Test de décoloration du β-carotène</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Mesure de l'inhibition de la dégradation oxydative du β-carotène par les produits d'oxydation de l'acide linoléique en présence d'un anti - oxydant. - β-carotène anti - oxydant lipophile protège les acides gras de l'oxydation. - L'ajout de l'anti - oxydant à la solution aqueuse de β-carotène permet sa préservation. - Protection mesurée à 470 nm par spectrophotométrie 	<ul style="list-style-type: none"> - Très facile à mettre en œuvre - Sensible - Utilisation de composés naturels - Peut être couplé à la chromatographie sur couche mince 	<ul style="list-style-type: none"> - L'oxydation induite par voie thermique est non contrôlée et donc non spécifique, ce qui conduit bien souvent à une variabilité des résultats 	<p>[297–299]</p>
<p>ORAC (Oxygen-Radical Absorbance Capacity)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Basé sur l'oxydation d'une protéine fluorescente (β Phycoérythrine) <i>via</i> un transfert de proton par des radicaux libres (peroxyl). - Diminution de l'intensité de la fluorescence. - Contact avec l'anti- oxydant qui 	<ul style="list-style-type: none"> - Facile à mettre en œuvre - Reproductible 	<ul style="list-style-type: none"> - Couteux - Mécanismes de génération des ROO• non physiologique 	<p>[296,300–302]</p>

	prolonge la fluorescence. - Mesure de l'aire sous la courbe de l'échantillon testé et comparaison à un autre anti-oxydant de référence (Trolox)			
Test de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)	- Mesure de la capacité d'un antioxydant à piéger un radical libre de DPPH• - La réduction des radicaux DPPH• par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution - Mesure de l'adsorption par spectrophotométrie à 515 nm	- Simple à mettre en œuvre, rapide, reproductible et peu coûteux. - Température ambiante ce qui permet d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules	- Radical synthétique - Diminution de l'absorbance du radical par effet de la lumière, de l'oxygène et du pH	[286,296,303–307]

La capacité antioxydante des dendrimères ioniques synthétisés dans ce chapitre a été évaluée en mesurant leur capacité à piéger un radical de DPPH•. Le piégeage des radicaux DPPH• par un antioxydant conduit à une décoloration de la solution violette, résultant d'un transfert de H• (**Schéma 12**). Ce changement de couleur implique une diminution de l'absorbance du radical DPPH• à 515 nm. Cette méthode est simple à mettre en œuvre, rapide, reproductible et peu coûteuse [286,303,304,307]. Cependant une autre méthode d'évaluation sera ultérieurement utilisée pour confirmer les résultats obtenus.

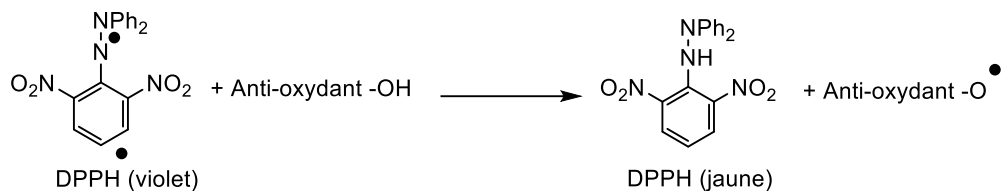


Schéma 12 : Principe de la méthode de DPPH

III.4. Synthèse de dendrimères antioxydants dérivés de PPIs

1. Rappel bibliographique : les réactions d'amidations

Un amide est un dérivé carbonylé qui se caractérise par une double liaison carbone oxygène (C=O) et une liaison simple carbone azote (C-N) [308]. Les amides peuvent être classés en trois sous-catégories selon le nombre de groupes R portés par l'atome d'azote : les amides primaires (NH₂), secondaires (NHR) et tertiaires (NR₁R₂). Les amides sont connus particulièrement par leur grande polarité due à leur capacité à former des ponts hydrogènes qui sont responsables de la stabilité exceptionnelle des amides (points d'ébullition élevés) [309]. La liaison amide est extrêmement répandue dans la nature et essentielle à la vie. En effet, l'enchaînement d'acides aminés liés entre eux par des liaisons amides qu'on appelle liaisons peptidiques, constitue la structure primaire des protéines [310].

Il existe plusieurs méthodes pour la synthèse d'un amide. La méthode classique est la condensation directe entre un acide et une amine en présence de tamis moléculaires à haute température pour former un carboxylate d'ammonium stable qui entraîne ensuite la formation d'amide [311,312]. Cependant, dans certains cas, cette méthode ne peut pas être utilisée à cause de la sensibilité des produits à haute température. Ainsi, de nombreuses méthodes ont été développées, qui sont généralement appelées divers réactifs de couplage [313,314]. Ces réactifs activent ainsi l'acide carboxylique en les transformant en chlorures d'acide, anhydrides, amides activés ou esters, substituant ainsi le groupe hydroxy libre par un groupement partant. Parmi ces agents de couplage, on peut citer les sels de phosphonium [315] ou de guanidinium/uronium [316] et les carbodiimides [317,318]. Ces derniers sont la classe d'agents de couplage les plus utilisés pour la formation de liaisons amides.

Le N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) joue un rôle essentiel dans la chimie organique. Il est largement employé en tant qu'agent d'activation/déshydratation dans la synthèse de divers composés organiques [319] mais également pour les réactions d'estérification [320] et d'amidation [321] ; en effet, il a été utilisé pour la première fois comme agent de couplage pour former les liaisons peptidiques par Sheehan *et al.* [322] en 1955. Il a également été rapporté comme donneur de cyclohexylamine lors de l'amidation d'acides carboxyliques [323].

En 1998, le DCC a été efficacement utilisé comme agent de couplage d'une réaction d'estérification pour former des dendrimères à base de l'acide 2,2-bis(hydroxyméthyl)propionique [324]. Cette méthode a été également employée par Pahovnik *et al.* pour former le dendrimère poly(ester-amide) par une réaction d'amidation suivie d'une estérification successive à partir de l'acide 2,2-bis(hydroxyméthyl)propionique et la glycine (**Figure 27**) [325].

En outre, une nouvelle famille de dendrimère chiral polyaromatique contenant une fonction amide a été développée à partir de 1,3-diamino-2-hydroxypropane et le 4-carboxybenzaldéhyde en présence de DCC comme agent de couplage [326].

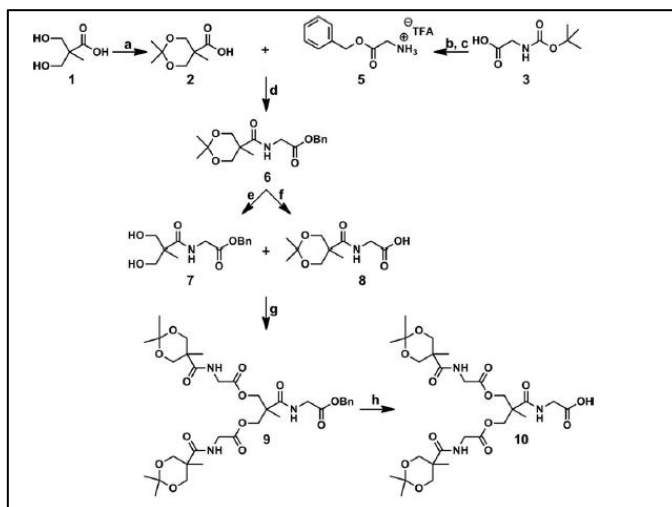


Figure 27 : [100] : Synthèse de dendron poly(ester-amide) par une réaction d'amidation suivi d'une estérification à partir de bis-MPA et de glycine: Réactifs et conditions : (a) 2,2-diméthoxypropane, acétone, 85% ; (b) BnOH, DCC, DPTS, DCM, 87% ; (c) TFA, DCM ; (d) Méthode A : TEA, DCC, DPTS, DCM, 79% ; Méthode B : TEA, EDC, DMAP, DCM, 99% ; (e) Dowex, CH₃CN, 99% ; (f) H₂, Pd/C, EtOAc, 99% ; (g) Méthode A : DCC, DPTS, DCM, 90% ; Méthode B : EDC, DMAP, DCM, 79% ; (h) H₂, Pd/C, EtOAc, 99%.

C'est en se basant sur ces conditions de synthèse d'amide, en présence de DCC comme agent de couplage, que nous avons développé un protocole adapté à la synthèse de nouvelles familles de dendrimères dérivés de PPI et d'acides phénoliques.

2. Résultats et discussions

2.1. Réaction de couplage de PPIs avec l'acide Phlorétique

La synthèse d'une nouvelle famille de dendrimère possédant des fonctions antioxydantes (PhA-PPI) a été réalisée par réaction de PPIs commerciaux avec un excès d'acide phlorétique (PhA) (l'acide 3(4-hydroxyphenyl) propionique) en présence d'un agent de couplage DCC. Après avoir testé plusieurs conditions (**Tableau 12**), un greffage complet est obtenu uniquement pour la première génération en présence d'un large excès d'acide et de DCC dans le DMF sous vide à température ambiante pendant 36 à 48h.

Afin de mettre au point un protocole pour le couplage, nous avons joué sur plusieurs facteurs : le temps, le solvant, l'air, le nombre d'équivalents et aussi l'ordre d'ajout des réactifs. Nous avons constaté que le greffage était complet pour la première génération dans le DMF sous vide pendant 36 à 48h, avec un nombre d'équivalents en acide et en DCC égal à 3 par fonction amine dans le DMF. En prenant exemple sur cette première génération, nous avons testé ces conditions optimisées avec les générations 2 et 3 mais nous n'avons pas abouti à un greffage complet (même en augmentant les équivalents d'acide et d'agent de couplage).

Nous avons alors cherché à optimiser les rendements de réaction en utilisant les micro-ondes. Les greffages se sont avérés complets pour les trois premières générations de PPI (**Schéma 13**). Les résultats de couplage sont compilés dans le **tableau 13**.

Tableau 12 : Conditions de réaction de PPI de générations 1,2 et 3 avec l'acide 3(4-hydroxyphényl) propionique. La ligne rouge correspond aux conditions de réaction pour lesquelles le greffage est complet

<i>Dendrimère</i>	<i>PhA</i>	<i>DCC</i>	<i>solvant</i>	<i>Temps (h)</i>	<i>Température (°C)</i>	<i>Environnement réactionnel</i>	<i>Conclusion</i>
PPI-1	4 éq.	4 éq.	DMF	24	0 °C pendant 10 min puis à T.amb 0 °C pendant 30 min puis à T.amb	–	Pas de greffage
	5,6 éq.	5,6 éq.		48		–	Pas de greffage
	8 éq.	8 éq.		48		–	Greffage partiel
	10 éq.	10 éq.		48		Sous vide	Greffage partiel
	12 éq.	12 éq.		48		Sous argon	Greffage partiel
	12 éq.	12 éq.		48		Sous vide	Greffage complet
	12 éq.	12 éq.	EtOH, Et ₃ N	48		–	Pas de greffage
	10 éq.	10 éq.	ACN	24		–	Greffage partiel
	12 éq.	12 éq.	2-méthylbutan 2-ol/DMF	48		–	Pas de greffage
PPI-2	24 éq.	24 éq.	DMF	48	0 °C pendant 1h puis à T.amb	Sous vide	Greffage partiel
	24 éq.	24 éq.		72	0 °C pendant 1h puis à T.amb	Sous vide	Greffage partiel
PPI-3	48 éq.	48 éq.	DMF	48	0 °C pendant 1h puis à T.amb	Sous vide	Greffage partiel
	56 éq.	56 éq.		72	0 °C pendant 1h puis à T.amb	Sous vide	Greffage partiel

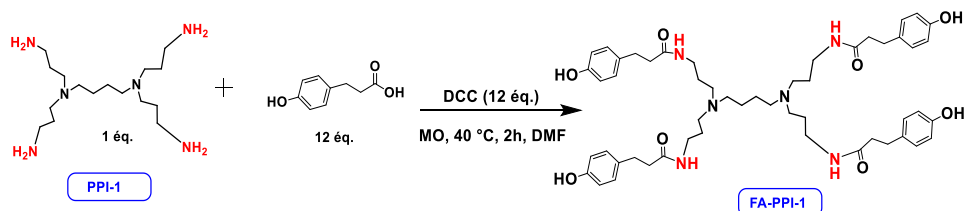

Schéma 13 : Synthèse de PhA-PPI-1

Tableau 13 : Résultats de couplage des PPI générations 1,2 et 3 avec l'acide phlorétique sous micro-ondes. La ligne rouge correspond aux conditions de réaction pour lesquelles le greffage est complet

<i>Dendrimères</i>	<i>PhA</i>	<i>DCC</i>	<i>Solvant</i>	<i>Temps (min)</i>	<i>Température (°C)</i>	<i>Résultats</i>
PPI-1	1 éq. / NH ₂	×	MeOH	15	40	Pas de greffage
	1 éq. / NH ₂	1 éq. / NH ₂	ACN/MeOH (3/1)	20	40	Greffage partiel + sous-produit
	2,5 éq. / NH ₂	2,5 éq. / NH ₂	DMF	40	40	Greffage partiel
	3 éq. / NH ₂	3 éq. / NH ₂	DMF	120	40	Greffage complet
PPI-2	3 éq. / NH ₂	3 éq. / NH ₂	DMF	120	40	Greffage partiel
	3,5 éq. / NH ₂	3,5 éq. / NH ₂	DMF	120	40	Greffage complet
PPI-3	3,5 éq. / NH ₂	3,5 éq. / NH ₂	DMF	120	40	Greffage partiel
	4 éq. / NH ₂	4 éq. / NH ₂	DMF	120	40	Greffage partiel
	4 éq. / NH ₂	4 éq. / NH ₂	DMF	140	40	Greffage complet

Pour obtenir le greffage complet des trois premières générations, les conditions ont été modifiées (augmentation de la quantité d'acide de 0,5 éq./NH₂ pour chaque génération supérieure, 3 éq., 3,5 éq. et 4 éq., respectivement pour PPI-1, PPI-2 et PPI-3) et la réaction a été réalisée sous micro-ondes à 60 W et 40 °C pendant 120 min dans le DMF, sauf dans le cas de PPI-3 où il a fallu augmenter le temps de réaction jusqu'à 140 min avec un temps de contact du DCC avec l'acide phlorétique de 2 heures, avant de rajouter le PPI-3.

Cette réaction a été clairement mise en évidence par RMN ¹H en se focalisant notamment sur les déplacements chimiques des protons correspondants aux groupements CH₂ liés aux fonctions amines primaires terminales (2,67 ppm pour PPI-1 et 3,17 ppm pour AF-PPI-1 dans CD₃OD). De même, la RMN HMBC a montré une tache de corrélation entre les CO d'amides et les protons correspondants aux groupements CH₂ liés aux fonctions amines primaires terminales.

Les difficultés de purification causées par l'excès de l'acide de départ n'ont pas permis d'obtenir les composés de façon pure et isolée afin de pouvoir déterminer les rendements.

2.2. Réaction de couplage de PPIs avec l'acide Férulique

En se basant sur les résultats de couplage de PPIs avec l'acide phlorétique obtenus par les micro-ondes, nous avons optimisé le protocole pour le couplage de PPIs avec l'acide férulique (FA). Ainsi, une réaction de couplage du dendrimère PPI avec un excès d'acide férulique a été réalisée en présence d'un excès d'agent de couplage (DCC) dans le DMF à 100 W et 60 °C pendant seulement 15 min (**Schéma 14**).

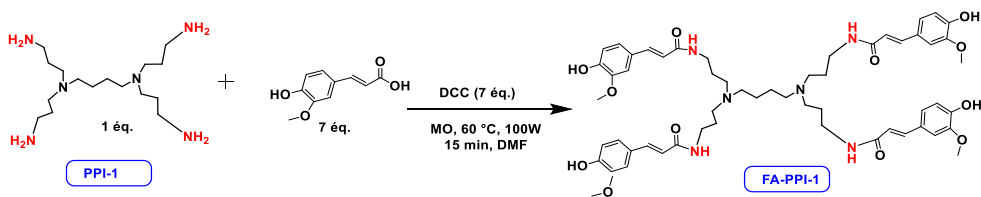


Schéma 14 : Synthèse de FA-PPI-1 par une réaction d'amidation

Nous avons joué sur plusieurs facteurs : le temps, la température, la puissance et le nombre d'équivalents d'acide et de DCC. Nous avons donc obtenu un greffage

complet pour les deux premières générations du PPI sous micro-ondes dans le DMF à 60 °C et 100 W pendant 15 min pour un nombre d'équivalent d'acide et de DCC égal à 7, 15 ou 30 éq. respectivement pour PPI-1, PPI-2 et PPI-3. Cette réaction a été clairement mise en évidence par RMN ¹H en se focalisant notamment sur les déplacements chimiques des protons correspondants aux groupements CH₂ liés aux fonctions amines primaires terminales (2,67 ppm pour PPI-1 et 3,36 ppm pour AF-PPI-1 dans CD₃OD). De même, la RMN HMBC a montré une tache de corrélation entre les CO d'amides et les protons correspondants aux groupements CH₂ liés aux fonctions amines primaires terminales.

Les difficultés de purification causées par l'excès de l'acide de départ n'ont pas permis d'obtenir les composés de façon pure et isolée afin de pouvoir déterminer les rendements.

En effet, des liaisons ioniques entre les fonctions amines tertiaires présentent au cœur des PPIs et les phénolates de l'acide férulique ont été formées. Plusieurs tests ont été réalisés dans des milieux acides pour protoner le férulate pour ensuite rompre les liaisons ioniques, mais à chaque fois dans ces conditions, elles provoquent au moins une rupture de liaison amide.

3. Conclusion

La synthèse de deux nouvelles familles de dendrimères antioxydants (PhA-PPIs et FA-PPIs) a été développée par couplage de l'acide phlorétique (PhA) ou de l'acide férulique (FA) avec les trois premières générations de PPI en présence de DCC sous micro-ondes. Les difficultés de purification causées par l'excès de l'acide de départ n'ont pas permis d'obtenir les composés de façon pure et isolée afin de pouvoir déterminer les rendements. Une optimisation des réactions notamment en termes de purification est prévue dans les perspectives.

4. Protocoles

4.1. Procédure générale de synthèse de PhA-PPIs

4.1.1. Synthèse de PhA-PPI-1

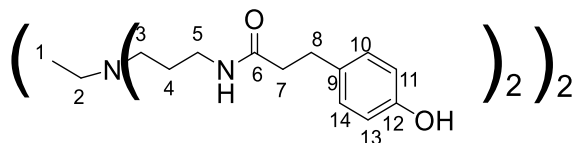
Dans un ballon bicol, l'acide phlorétique (acide 3(4-hydroxyphényl)propionique) (12 éq., 3 éq. /NH₂) dissous dans le DMF (20 mL), puis la DCC (12 éq., 3 éq. /NH₂) sont ajoutés à 0 °C. Après 30 min d'agitation, le dendrimère PPI-1 (1 éq.) est ajouté. Le mélange réactionnel est porté sous agitation à température ambiante pendant 48h puis une extraction avec de l'acétate d'éthyle /eau (30/30 mL) est effectuée. La phase

aqueuse lavée 3 fois avec l'acétate d'éthyle (3 x 80 mL) puis avec l'éther (100 mL), est évaporée sous pression réduite. Le produit obtenu est solubilisé dans un minimum de MeOH puis un excès d'acétate d'éthyle froid est ajouté ; le produit recristallisé est enfin séché sous pression réduite.

4.1.2. Synthèse de PhA-PPI générations 1,2 et 3 sous micro-ondes

Dans un réacteur pour four à micro-ondes, l'acide phlorétique (acide 3(4-hydroxyphényl) propionique) et la DCC (3 éq. /NH₂, 3,5 éq. /NH₂ et 4 éq. /NH₂ respectivement pour G1, G2 et G3) dissoute dans du DMF (7 mL) sont ajoutés à température ambiante. Après 1 à 2h d'agitation, le dendrimère PPI-n (1 éq.) est ajouté. Le mélange réactionnel est porté sous micro-ondes à 40 °C pendant 2h. Une extraction avec un mélange acétate d'éthyle/eau (30/30 mL) est effectuée. La phase aqueuse lavée 3 fois avec l'acétate d'éthyle (3 x 80 mL) puis avec l'éther (100 mL), est évaporée sous pression réduite. Le produit obtenu est solubilisé dans un minimum de MeOH puis un excès d'acétate d'éthyle froid est ajouté ; le produit recristallisé est enfin séché sous pression réduite.

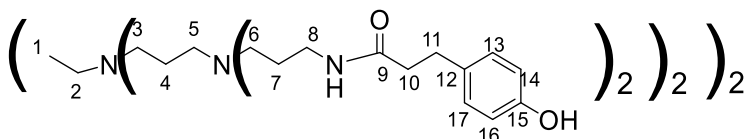
PhA-PPI-1



RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD), δ (ppm) : 1,45-1,54 (4H, H1, m) ; 1,60-1,70 (8H, H4, m) ; 2,40-2,51 (8H, H7, m) ; 2,55-2,64 (8H, H3, m) ; 2,63-2,71 (4H, H2, m) ; 2,78-2,84 (8H, H8, m) ; 3,17 (8H, H5, t, *J* = 7.24 Hz) ; 6,75 (8H, H11, H13, d, *J* = 8,61 Hz) ; 7,04 (8H, H10, H14, d, *J* = 8,61 Hz).

RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD), δ (ppm) : 22,7 (C1) ; 25,1 (C4) ; 30,6 (C8) ; 36,8 (C5) ; 37,8 (C7) ; 50,7 (C3) ; 52,6 (C2) ; 114,9 (C11, C13) ; 129,1 (C10, C14) ; 131,4 (C9) ; 155,5 (C12) ; 174,1 (C6).

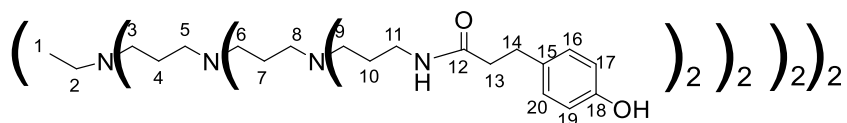
PhA-PPI-2



RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD), δ (ppm) : 1,44-1,71 (28H, H1, H4, H7, m) ; 2,23-2,50 (40H, H10, H3, H6, m) ; 2,53-2,73 (12H, H2, H5, m) ; 2,76-2,86 (16H, H11, m); 3,15 (16H, H8, m); 6,72 (16H, H14, H16, d, $J = 8.61$ Hz); 7,01 (16H, H13, H17, d, $J = 8.61$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD), δ (ppm) : 22,7 (C1) ; 25,2 (C4, C7) ; 30,7 (C11) ; 36,8 (C8) ; 37,8 (C10) ; 50,7 (C6, C3) ; 52,7 (C2, C5) ; 114,9 (C14, C16) ; 129,1 (C13, C17) ; 131,4 (C12) ; 155,5 (C15) ; 174,1 (C9).

PhA-PPI-3



RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD), δ (ppm) : 1,43-1,74 (60H, H1 H4, H7, H10, m) ; 2,23-2,68 (116H, H13, H2, H5, H8, H3, H6, H9, m) ; 2,76-2,84 (32H, H14, m) ; 3,14 (32H, H11, m) ; 6,71 (32H, H17, H19, d, $J = 8.5$ Hz) ; 7,01 (32H, H16, H20, d, $J = 8.5$ Hz).

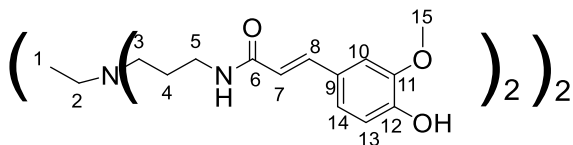
RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD), δ (ppm) : 22, 6 (C1) ; 25,1–24.2 (C4, C7, C10) ; 30,7 (C14) ; 36,8 (C11) ; 37, 8 (C13) ; 50,7 (C3, C6, C9) ; 52,6-52,7 (C2, C5, C8) ; 114,9 (C17, C19) ; 129,1 (C16, C20); 131,4 (C15) ; 155,5 (C18) ; 174,1 (C12)

4.2. Procédure générale de synthèse de FA-PPIs

Dans un réacteur pour four à micro-ondes sont ajoutés à température ambiante l'acide férulique et le DCC (7 éq. et 15 éq., respectivement pour G1 et G2) dissous dans du DMF (7 mL). Après une heure d'agitation, le dendrimère PPI-1 ou PPI-2 (1 éq.) est ajouté. Le mélange réactionnel est porté sous micro-ondes à 60 °C sous 100 W pendant 15 min. Une extraction avec un mélange acétate d'éthyle/eau (30/30 mL) est effectuée. La phase aqueuse est ensuite lavée 3 fois avec l'acétate d'éthyle (3 x 80 mL) ; la phase aqueuse est évaporée sous pression réduite. Le produit obtenu est solubilisé dans un minimum de méthanol puis un excès d'acétate d'éthyle froid est ajouté ; le produit recristallisé est enfin séché sous pression réduite pour donner une cire jaune visqueuse.

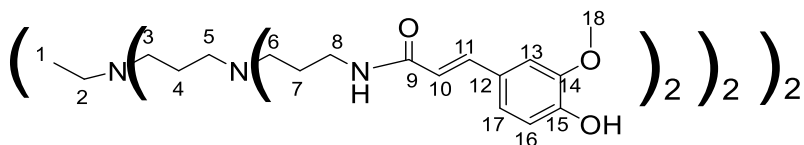
Les spectres RMN sont traités sans tenir en compte des acides liés au amines tertiaires par des liaisons ioniques

FA-PPI-1



RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD), δ (ppm) : 1,47 (4H, H1, m) ; 1,71 (8H, H4, m Hz) ; 2,44 (4H, H2, m) ; 2,50 (8H, H3, m) ; 3,35 (8H, H5, m) ; 3,84 (12H, H15, s) ; 6,48 (4H, H7, d, $J = 15,63$ Hz) ; 6,78 (4H, H13, d, $J = 8,15$) ; 7,01 (4H, H14, dd, $J = 2,02$ Hz et $J = 8,23$ Hz) ; 7,09 (4H, H10, d, $J = 2,02$ Hz) ; 7,45 (4H, H8, d, $J = 15,61$ Hz).
 RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD), δ (ppm) : 24,4 (C1) ; 26,2 (C4) ; 37,6 (C5) ; 51,2 (C3) ; 55,0 (C2) ; 56,9 (C15) ; 110,1 (C10) ; 115,4 (C13) ; 117,1 (C14) ; 122,0 (C7) ; 126,2 (C9) ; 140,7 (C8) ; 148,2 (C11) ; 149,5 (C12) ; 167,9 (C6).

FA-PPI-2



RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD), δ (ppm) : 1,52-1,89 (28H, H1, H4, H7, m) ; 2,34-2,65 (36H, H2, H5, H3, H6, m) ; 3,38 (16H, H8, m) ; 3,85 (24H, H18, s) ; 6,58 (8H, H10, d, $J = 15,43$ Hz) ; 6,85 (8H, H16, d, $J = 8,15$) ; 7,02 (8H, H17, dd, $J = 8,15$ Hz, $J = 2,05$ Hz) ; 7,13 (8H, H13, s) ; 7,50 (8H, H11, d, $J = 15,43$ Hz).
 RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD), δ (ppm) : 24,4 (C1) ; 26,3 (C4, C7) ; 37,6 (C8) ; 51,2 (C3, C6) ; 55,0 (C2, C5) ; 57,0 (C18) ; 110,1 (C13) ; 115,4 (C16) ; 117,1 (C17) ; 122,0 (C10) ; 126,2 (C12) ; 140,7 (C11) ; 148,2 (C14) ; 149,4 (C15) ; 167,8 (C9).

Chapitre IV

**Etude des interactions des dendrimères
avec des membranes biomimétiques du SC**

Chapitre IV : Etude des interactions des dendrimères avec des membranes biomimétiques du SC

IV.1. Contexte et objectifs

Le SC est connu pour sa propriété barrière [21,139]. De ce fait, l'administration des principes actifs au travers de celui-ci est limitée. Seules les molécules à faible poids moléculaire (<500 Da) ayant des propriétés physico-chimiques optimales ($1 \leq \log P \leq 3$) peuvent être transportées passivement par le SC [151]. Ces dernières années, certains dendrimères ont montré leur potentiel pour améliorer l'administration cutanée de diverses molécules avec un faible effet d'irritation cutanée et une capacité de délivrance des substances actives élevée [150]. Pour une application réussie, il est important de comprendre le mécanisme d'action des dendrimères avec la peau. C'est l'objet de ce chapitre qui va s'attacher à comprendre l'effet des dendrimères synthétisés dans les chapitres II et III sur des modèles membranaires de SC.

La première partie de ce chapitre décrite dans l'article « *Molecules* **2022**, 27, 8022 », est consacrée à l'évaluation de la capacité du GD-PPI et GD-PAMAM synthétisés dans la chapitre II à encapsuler la vitamine C ainsi que l'évaluation de leur cytotoxicité sur des fibroblastes dermiques. L'interaction de GD-PAMAM-3 avec ou sans la vitamine C avec deux modèles de membranes biomimétiques constitués des principaux constituants lipidiques du SC de peau a été ensuite étudiée. L'utilisation du modèle monocouche lipidique a permis de comprendre le comportement du GD-PAMAM-3 (avec ou sans vitamine C) envers les lipides du SC puis l'effet du pH sur la libération de la molécule active. L'autre modèle, les liposomes, a d'abord nécessité une étape d'optimisation pour les former puis l'effet du GD-PAMAM-3 sur la perméabilité et la fluidité membranaire de ce modèle a pu être observé.

La deuxième partie est dédiée à l'étude de l'interaction d'autres types de dendrimères, le GD-PPI-4 et le PAMAM-3-FA avec les deux modèles membranaires.

IV.2. Résumé du deuxième article

Dans ce travail, nous avons synthétisé deux familles de dendrimères dérivés du glycérol avec de bons dendements (> 70%), les GD-PAMAMs et les GD-PPIs sur la base de nos travaux précédents [1,4]. Nous avons évalué leur capacité à encapsuler la vitamine C et leur cytotoxicité sur des fibroblastes dermiques humains. Leur interaction (avec ou sans vitamine C encapsulée) avec deux modèles membranaires mimant le SC humain a été étudiée par une approche biophysique, afin d'évaluer leur potentiel à délivrer la vitamine C dans la couche la plus externe de la peau.

Plusieurs tests d'encapsulation de la vitamine C par les dendrimères GD-PAMAM et GD-PPI ont été réalisés dans l'eau à température ambiante (**Schéma 15 et tableau 14 dans l'article ci-dessous**). Les résultats d'encapsulation ont montré que les générations les plus élevées ont une bonne capacité d'encapsulation par rapport aux générations inférieures. Cela est dû à la multiplication des groupements périphériques et de l'augmentation du nombre de cavités. La comparaison des deux familles GD-PPIs et GD-PAMAMs montre une meilleure encapsulation de la vitamine C avec les GD-PAMAMs, ce phénomène probablement dû à la présence de nombreuses fonctions amides et à la présence d'une grande quantité d'hétéroatomes, deux facteurs favorisant les interactions électrostatiques. La capacité d'encapsulation de la vitamine C par les dendrimères a été confirmée par RMN 1D (¹RMN) et 2D (NOESY et la mesure de temps de relaxation T₂).

La cytotoxicité des dendrimères a été testée sur des fibroblastes dermiques humains par deux méthodes, le test WST1 et la coloration des cellules par le cristal violet. Aucun effet cytotoxique n'a été constaté avec le GD-PAMAM-3 (de 0,001 µg/mL à 1 mg/mL) (**Figure 28-a dans l'article ci-dessous**), alors qu'une toxicité cellulaire des dendrimères GD-PPI générations de 3 et 4 a été observée pour des concentrations ≥ à 0,25 mg/ml. La viabilité cellulaire a diminué avec l'augmentation de la concentration de GD-PPI (**Figure 28-b dans l'article ci-dessous**). Les résultats montrent également que la GD-PPI-4 est moins toxique que la GD-PPI-3. Ceci est probablement dû au nombre de fonctions hydroxyles présentes aux périphéries (32 et 64 fonctions hydroxyle respectivement pour GD-PPI-3 et GD-PPI-4). Un nombre plus élevé de groupements hydroxyles favorise la répulsion électrostatique qui limite la toxicité.

L'interaction du GD-PAMAM-3 encapsulant ou non la vitamine C avec deux types de modèles de membranes : les monocouches lipidiques et les liposomes constituées de *N*-Lignoceroyl-*D*-sphingosine (C24Cer2), de cholest-5-èn-3-ol (Chol) et d'acide lignocérique (C24FA) (rapport molaire 1:1:1), représentant des principales classes de lipides présents dans le SC a été étudiée.

L'étude sur la monocouche biomimétique de SC a été réalisée à l'aide de la technique de balance à film de Langmuir. Cette étude a montré que le GD-PAMAM-3 (encapsulant ou non la vitamine C) est capable d'interagir avec la monocouche lipidique de SC à différents pHs (7,4, 6 et 5). Une attractivité lipidique plus élevée à pH 5 est observée en présence de la vitamine C (**Figure 30 dans l'articles ci-dessous**). Ceci suggère que la vitamine C est libérée au niveau de la monocouche à ce pH.

Des liposomes mimant le SC, comprenant un compartiment interne aqueux à pH 7.4 et un environnement externe aqueux à pH 5 et encapsulant la sonde HPTS et son quencher DPX ou décorés avec du Laurdan ont été mis au point afin de mieux mimer les conditions réelles de la peau et d'étudier l'effet des dendrimères, sur la perméabilité et la fluidité/rigidité de la membrane cutanée, respectivement, à l'aide de la technique de spectroscopie de fluorescence. L'effet de GD-PAMAM-3 avec ou sans vitamine C sur la perméabilité de ces liposomes a été déterminé en mesurant la fuite de la sonde fluorescente HPTS et de son quencher DPX préalablement encapsulés et libérés par l'action du dendrimère. L'étude a démontré que le GD-PAMAM-3 (avec ou sans vitamine C) n'a aucun effet sur la perméabilité de la membrane biomimétique de SC à de faibles ratios molaires de GD-PAMAM-3/liposomes et a un effet de perméabilisation limité $\leq 35\%$ à des ratios plus élevés (**Figure 31 dans l'article ci-dessous**), conformément à l'absence de cytotoxicité. Le faible effet perméabilisant peut-être expliqué par le phénomène d'agrégation des liposomes visualisé par Cryo-TEM. En outre, aucune variation d'intensité de fluorescence n'a été observée ni avec l'augmentation de la concentration de vitamine C ni avec le temps, ce qui indique que la vitamine C ne perméabilise pas la membrane.

L'effet de GD-PAMAM-3 avec ou sans vitamine C sur la fluidité de la membrane biomimétique de SC a été déterminé en mesurant la variation de la polarisation généralisée (GP) du Laurdan inséré dans la bicouche lipidique après l'ajout de dendrimères. Cette étude a montré que le GD-PAMAM-3 et le VitC@GD-PAMAM-3 augmentent la rigidité de la membrane, avec un effet immédiat plus important en présence de la vitamine C (**Figure 32 dans l'article ci-dessous**). Cela suggère un renforcement de la propriété barrière du SC par GD-PAMAM-3 avec un effet immédiat et plus intense en présence de vitamine C.

La partie suivante est adaptée de l'article publié dans *Molécules* 2022, 27, 8022. Katia Bacha, Catherine Chemotti, Jean Claude Monboisse, Anthony Robert, Aurélien Furlan, Willy Smeralda, Christian Damblon, Julien Estager, Sylvie Brassart-Pasco, Jean-Pierre Mbakidi, Jelena Prsic, Sandrine Bouquillon, Magali Deleu. <https://doi.org/10.3390/molecules27228022>, Received: 18 October 2022, accepted: 15 November 2022, published: 18 November 2022.

Encapsulation of vitamin C by glycerol-derived dendrimers, their interaction with biomimetic models of *stratum corneum* and their cytotoxicity

Abstract: Vitamin C is one of the most sensitive cosmetic active ingredients. To avoid its degradation, its encapsulation into biobased carriers such as dendrimers is one alternative of interest. In this work, we wanted to evaluate the potential of two biobased glycerodendrimer families (GlyceroDendrimers-Poly(AMidoAMine) (GD-PAMAMs) or GlyceroDendrimers-Poly(Propylene Imine) (GD-PPIs)) as a vitamin C carrier for topical application. The higher encapsulation capacity of GD-PAMAM-3 compared to commercial PAMAM-3 and different GD-PPIs, and its absence of cytotoxicity towards dermal cells, make it a good candidate. Investigation of its mechanism of action was done by using two kinds of biomimetic models of stratum corneum (SC), lipid monolayers and liposomes. GD-PAMAM-3 and VitC@GD-PAMAM-3 (GD-PAMAM-3 with encapsulated vitamin C) can both interact with the lipid representatives of the SC lipid matrix, whichever pH is considered. However, only pH 5.0 is suggested to be favorable to release vitamin C into the SC matrix. Their binding to SC-biomimetic liposomes revealed only a slight effect on membrane permeability in accordance with the absence of cytotoxicity but an increase in membrane rigidity, suggesting a reinforcement of the SC barrier property. Globally, our results suggest that the dendrimer GD-PAMAM-3 could be an efficient carrier for cosmetic applications.

Keywords: dendrimers, glycerol, vitamin C, encapsulation, membrane interactions, *stratum corneum* biomimetic membranes, liposomes, cytotoxicity,

1. Introduction

The vectorization of active molecules is currently a major challenge in many research fields such as pharmaceuticals, food and cosmetics. In the pharmaceutical field, synthetic or bio-inspired nanocarriers are mainly developed to specifically deliver drugs such as anti-cancer agents [327–331] or therapeutic proteins [332]. In this area, genetically engineered organic, inorganic and virus-like nanostructures [333] or nanocarriers synthesized from ionic liquids [334] have increasing interest

compared with conventional drug delivery systems. Some of them are particularly interesting for transdermal drug delivery [335–337].

The interest of nanovectorization for food [338–340] and cosmetic [106,341–343] sectors has also been increasing for several years. The vectorization allows for protection and delivery of active substances with low bioavailability, from their environment into the ones they are being introduced into by avoiding their metabolization or degradation along the way. In this context, symmetrical and branched macromolecules, called dendrimers, are one of the most promising vectorization systems [7].

Dendrimers are nanosized, hyper-branched, radially symmetrical molecules with a well-defined, homogeneous and monodisperse structure composed of branches that form internal tree-like cavities [9–11]. These compounds have many advantageous properties such as versatility, capacity to self-assemble and to participate in electrostatic interactions, chemical stability, low cytotoxicity and high aqueous solubility [12]. These specific properties are the key features making them advantageous for application in biomedical and industrial sectors[4,13,14] . In our previous works, we have developed a method for glycerol-based dendrimers synthesis and optimized their use as encapsulating agents of organic pollutants [4], contrast imaging agents [3], catalytic agents [1] and, recently, essential oils [5,6].

In recent years, the favorable properties of dendrimers has aroused the interest of researchers for the optimization of production and application of these molecules and their implementation as a strategy in cosmetics. For instance, dendrimers are a good alternative for replacement of other conventional high molecular weight polymers in various cosmetic compositions [111,113,343]. Additionally, they also have a good potency to encapsulate sensitive cosmetical active substances in order to protect them and to ensure their release and a better efficiency [20,112,114] .

Vitamin C is one of the most delicate cosmetic active ingredients and thus far there is no solution to limit its degradation in cosmetic products. Vitamin C is involved in many biological and physiological processes and is essential for normal body functioning [191,288]. It is necessary for the synthesis of collagen in the skin and for the healing of wounds [344]. It is also a powerful antioxidant and an anti-free radical agent that protects the epidermis from free radicals, thereby preventing oxidative damage and aging [193]. Nevertheless, vitamin C is a fragile compound and is easily decomposed into biologically inactive compounds by action of light, heat or oxygen [194]. To prevent this instability issue, different formulations have been developed for its vectorization and its controlled release. PPI and PAMAM dendrimers were

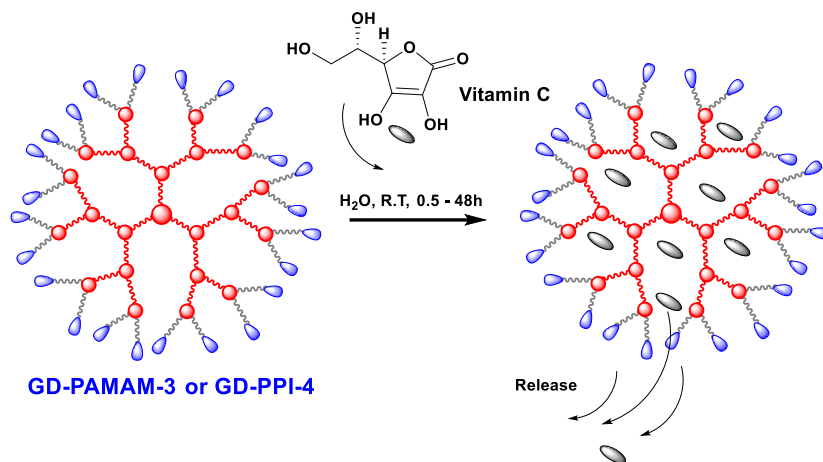
tested to encapsulate vitamin C and other sensitive vitamins such as B3 and B6 [17]. Moreover, several kinds of water-soluble dendrimers have been used to encapsulate vitamin C in order to be incorporated into cosmetic or pharmaceutical products [20]. PPI dendrimers functionalized with polyethylene glycol entities seem to be suitable for the transport of vitamin C molecules in cosmetics and PAMAM dendrimers encapsulating vitamin C are used in dermatological applications [17,20,109,193,194].

In this work, after the synthesis of two families of glycerol-functionalized dendrimers, GD-PAMAMs and GD-PPIs, based on our previous works [1,3,4], we evaluated their capacity to encapsulate vitamin C and their cytotoxicity on human dermal fibroblasts. For the most promising candidate, GD-PAMAM-3, we further investigated its potential to deliver vitamin C into the uppermost layer of the skin by studying its interaction with biomimetic models of human SC using a biophysical approach. Two kinds of SC models were considered, lipid monolayers and liposomes. The first model was used to characterize the kinetics of adsorption and the interaction power of the dendrimer to the SC models, and the attractivity effect of the SC lipids on the dendrimer. The influence of dendrimers on SC fluidity and permeability [159] was characterized using SC mimicking liposomes that were preliminary optimized for these kinds of experiments. All lipid systems were composed of the three major lipid constituents of the SC extracellular lipid matrix (C24-ceramide-2, cholesterol and lignoceric acid) [21,141]. The effect of vitamin C was analyzed by comparing data on dendrimers alone and dendrimers encapsulating vitamin C. In addition, the influence of the pH on interaction and delivery properties was also evaluated.

2. Results and Discussion

2.1. Encapsulation of vitamin C

The ability of GD-PPIs and GD-PAMAMs to encapsulate vitamin C was evaluated by gravimetry after dialysis through a 1 kDa membrane, based on our previous works with organic pollutants [4]. Several encapsulation tests of vitamin C in GD-PPIs and GD-PAMAMs were performed in water at room temperature (Scheme 15). The encapsulation results are summarized in **Table 14**.



Scheme 15. Encapsulation of vitamin C in GD-PPIs or GD-PAMAMs

As expected, the highest encapsulation is observed for the largest generations due to the multiplication of the peripheral groups and the increase in the number of cavities (**Table 14**, entry 3 versus entries 1 and 2). By comparing the two families derived from PPI and PAMAM (**Table 14**, entry 6 versus entries 1–4), we observed a better encapsulation of vitamin C with PAMAM-derived dendrimers. This is probably due to the presence of many amide functions and the presence of high amounts of heteroatoms, both of which favor electrostatic interactions. We also observed that glycerol-based PAMAM-3 encapsulates vitamin C better than commercial PAMAM-3. This is due to the presence of the hydroxyl groups in the molecule periphery. The encapsulation ability of GD-PAMAM-3 and GD-PPI-4 was supported by liquid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) experiments. In ^1H NMR, a chemical shift variation was observed for the proton corresponding to the CH-O-CO of L-ascorbic acid in the presence of dendrimers (from 4.97 ppm for free vitamin C to 4.55 and 4.64 ppm for vitamin C encapsulated, respectively in GD-PAMAM-3 and GD-PPI-4) (**Figures S50 and S51 in Supplementary**). This chemical shift can be due to an aggregation or an encapsulation of vitamin C. A 2D NOESY NMR experiment showed cross peaks between the protons of vitamin C and those of GD-PAMAM-3 and GD-PPI-4 dendrimers (CH_2 in α of the carbamates and CH_2 in α of the tertiary amines, respectively) (**Figure S52 in Supplementary**). These peaks are caused by NOE interactions between protons that are in spatial proximity (distance lower than 5–6 Å). This last experiment confirms vitamin C encapsulation in GD-PAMAM-3 and GD-PPI-4.

Table 14. Encapsulation of vitamin C in glycerol-based dendrimers. Vitamin C (mg) corresponds to the initially added weight of vitamin C, Dendrimers corresponds to initial weight of different generations of dendrimers, Function numbers or ‘N’ nbr corresponds to the number of nitrogen atoms present in the structure (amine and/or amide functions), Encapsulated VitC (mg) corresponds to the weight of the encapsulate vitamin C and Encapsulated VitC (equiv) corresponds to the equivalents number of the vitamin C encapsulated in 1 equivalent of dendrimer.

<i>Entry</i>	<i>Vitamin C (mg)</i>	<i>Dendrimers</i>	<i>Function numbers ‘N’ nbr</i>	<i>Encapsulated VitC (mg)</i>	<i>Encapsulated VitC (equiv)</i>
1	82 mg	GD-PPI-2 35 mg	14	20	6
2		GD-PPI-3 36 mg	30	24	14
3		<u>GD-PPI-4</u> 34 mg	62	34	42
4	85 mg	<u>GD-PPI-4</u> 35 mg	62	33	39
5	90 mg	<u>PPI-4</u> 36 mg	62	78	43
6	78 mg	<u>GD-PAMAM-3</u> 34 mg	122	46	82
7	92 mg	<u>PAMAM-3</u> 36 mg	122	57	62

Transverse relaxation time T_2 measurements [212] were performed to confirm the interaction between vitamin C and GD-PAMAM-3. The conclusions were made based on transverse relaxation time values, since a small molecule binding to a larger one will have a shorter transverse relaxation time compared to when it is unbound. We observed a big difference in T_2 between free vitamin C ($T_2 \approx 1$ s) and vitamin C encapsulated in GD-PAMAM-3 or vitamin C encapsulated in GD-PPI-4 (respectively $T_2 \approx 0.3$ s and $T_2 \approx 0.2$ s), confirming the interaction between vitamin C and GD-PAMAM-3 or GD-PPI-4 (**Figures S56–S58 in Supplementary**).

2.2. Cytotoxicity of dendrimers

As the targeted application of our dendrimers is found in cosmetics, human dermal fibroblasts were used to evaluate their cytotoxicity. WST1 assays were performed to measure the viability of cells after dendrimer treatment at different concentrations.

Cell staining with crystal violet assays allowing cell density measurements were carried out to confirm the results of the WST1 assay.

No cytotoxic effect was observed with GD-PAMAM-3 (from 0.001 $\mu\text{g/mL}$ to 1 mg/mL) (**Figure 28a**), whereas the cell toxicity of dendrimers GD-PPI generations 3 and 4 was observed for concentrations equal or above 0.25 mg/mL . The viability percentage decreased with the increase of GD-PPI concentration (**Figure 28b**). The results show that GD-PPI-4 is less toxic than GD-PPI-3. This is probably due to the number of hydroxyl moieties present at the periphery (32 and 64 hydroxyl functions for GD-PPI-3 and GD-PPI-4, respectively). A higher number of hydroxyl groups favors electrostatic repulsion which limits the toxicity. Our results are in accordance with cytotoxicity data obtained previously with the same dendrimers on Human MRC5 fibroblasts from the lungs [3,4].

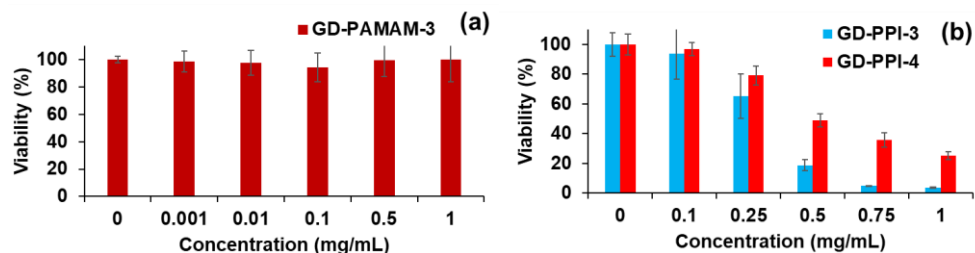


Figure 28. Cytotoxicity of (a) GD-PAMAM-3, (b) GD-PPI- G3 and G4, towards human dermal fibroblasts using WST1 reduction method

As GD-PAMAM-3 exhibits a high capacity to encapsulate vitamin C and presents weak cytotoxicity on human dermal fibroblasts, it is the best candidate for vitamin C delivery to the skin. To better understand its mechanism of action, its interaction with biomimetic models of SC was studied.

2.3. Interaction with Biomimetic Models of Stratum Corneum

Studies on the interaction of PAMAM-based dendrimers with skin using human [176–178] or animal skin tissues [179,180] showed that the concentration, charge and weight of PAMAM dendrimers influence both skin penetration and drug delivery [182,345]. Moreover, high generations of PAMAM dendrimers (above generation 4) caused pore formation [181]. It was also shown by fluorescence lifetime imaging microscopy that tecto-dendrimers penetrate the SC of human skin but do not cross the tight junction barrier [187]. In our work, we investigated the interaction of GD-

PAMAM dendrimer with two SC biomimetic models: lipid monolayers and liposomes.

2.3.1. Study on the lipid monolayer model

Lipid monolayers, the simplest membrane models, are used to study the ability of compounds to adsorb into the outer layer of membranes directly in contact with the external environment. In our study, lipid monolayers were made of *N*-Lignoceroyl-*D*-sphingosine (C24Cer2), cholest-5-en-3-ol (Chol) and lignoceric acid (C24FA) (molar ratio 1:1:1), representatives of the major classes of lipids found in human SC. Three pH values (pH 5.0, pH 6.0 and pH 7.4) were considered for the subphase in order to mimic the different pH conditions of the skin that has an acidic pH in its external part and a gradual increasing pH reaching pH 7.4 in its inner part.

In the first step, the adsorption of the three components GD-PAMAM-3, vitamin C and the complex VitC@GD-PAMAM-3 was studied at a bare interface without lipids in order to evaluate their amphiphilic character at different pH values.

After injection of GD-PAMAM-3 into the subphase at pH 7.4, the surface pressure versus time curves increased and reached a plateau after 100 min (**Figure 29a—blue curve**), indicating that GD-PAMAM-3 is able to adsorb at the interface even if it is not as pronounced as conventional surfactants [163,346,347]. At the concentration of 0.08 μM of GD-PAMAM-3, the surface pressure reached its maximum (4 mN/m) and remained stable even at higher concentrations, revealing that GD-PAMAM-3 saturated the interface (**Figure 29b**). At pH 6.0, the maximum surface pressure at the equilibrium was 2 mN/m and at pH 5.0, there was no adsorption of the dendrimers at the air/water interface (data not shown), indicating that acid pHs are not favorable for the adsorption of the dendrimers.

In Vitamin C did not adsorb at the interface even at a high concentration (11 μM) corresponding to its concentration in its encapsulated form and at any pH condition tested, likely because of its high hydrophilicity. The complex VitC@GD-PAMAM-3 had the same adsorption behavior at a lipid-free interface as the dendrimers alone, regardless of the pH.

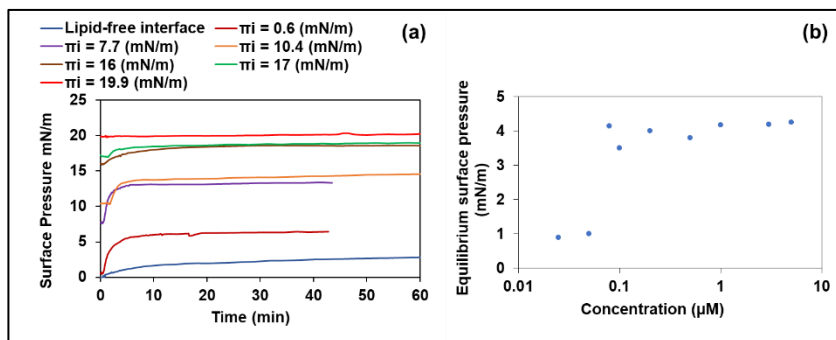


Figure 29. (a) Kinetics of GD-PAMAM-3 ($0.2 \mu\text{M}$ in the subphase at pH 7.4) adsorption to a bare interface or to a SC mimicking lipid monolayer (C24Cer2/Chol/C24FA 1:1:1 molar ratio). The time zero indicates the time of GD-PAMAM injection underneath the bare interface or the lipid monolayer at different initial surface pressures (Π_i); (b) Evolution of the equilibrium surface pressure further to the adsorption of GD-PAMAM-3 at a bare interface as a function of GD-PAMAM-3 concentration in the subphase at pH 7.4.

In the next step, the adsorption of the three components into the SC-mimicking lipid monolayer was monitored by measuring the surface pressure over time for different initial surface pressures of the monolayer in order to evaluate the interaction power of the dendrimer and the attractivity effect of the lipids at pH 7.4, pH 6.0 or pH 5.0. For the three pHs, an increase in the surface pressure over time is directly observed (example at pH 7.4 in **Figure 29a**). This indicates that the dendrimers are able to adsorb into the lipid monolayer. The time to reach the surface pressure plateau was much shorter (30–40 min) in the presence of the lipid monolayer than at the bare interface (>100 min). This suggests that SC- lipids promote the adsorption of GD-PAMAM-3 at the interface. From these data, the plot of the variation of the surface pressure at equilibrium ($\Delta\Pi$) following adsorption of GD-PAMAM-3 versus the initial surface pressure (Π_i) of the SC mimicking monolayer was established (**Figure 30**).

A decrease of $\Delta\Pi$ over Π_i increase is observed. The intersection of the linear regression with the x -axis allows for determining the maximum insertion pressure (MIP), which is related to the insertion power of the dendrimers in the lipid monolayer. Its intersection with the y -axis allows for determining the maximum surface pressure variation ($\Delta\Pi_0$). By subtracting to $\Delta\Pi_0$, the equilibrium surface pressure reached by the same concentration of GD-PAMAM-3 at a bare interface, the differential $d\Pi_0$ can be determined. It reflects the attractive effect of the lipids for dendrimers [163,348–350].

The values of MIP and $d\Pi_0$ for the three pHs are presented in **Table 15**. The MIP values of GD-PAMAM with or without vitamin C are close to 25 mN/m, which is in the range of the estimated surface pressure in native biological membranes. This suggests that dendrimers are able to penetrate into the lipid matrix of the SC. The pH does not influence the MIP values. The values of $d\Pi_0$ are positive at all pH values, indicating that the ternary mixture of lipids has an attractive effect on GD-PAMAM-3 dendrimers. This effect is accentuated at lower pH values (pH 5.0 and pH 6.0 compared to pH 7.4). At pH 6.0 and pH 7.4, there is no difference of $d\Pi_0$ values between GD-PAMAM-3 and VitC@GD-PAMAM-3, whereas at pH 5.0, a higher $d\Pi_0$ is observed for VitC@GD-PAMAM-3 than for GD-PAMAM-3. This indicates that at pH 5.0, encapsulated vitamin C increases the tendency of dendrimers to interact with the lipid monolayer. Additionally, it could suggest that vitamin C is released from the dendrimer and penetrates into the SC lipid monolayer. In skin conditions, vitamin C would thus be released in the external skin layers.

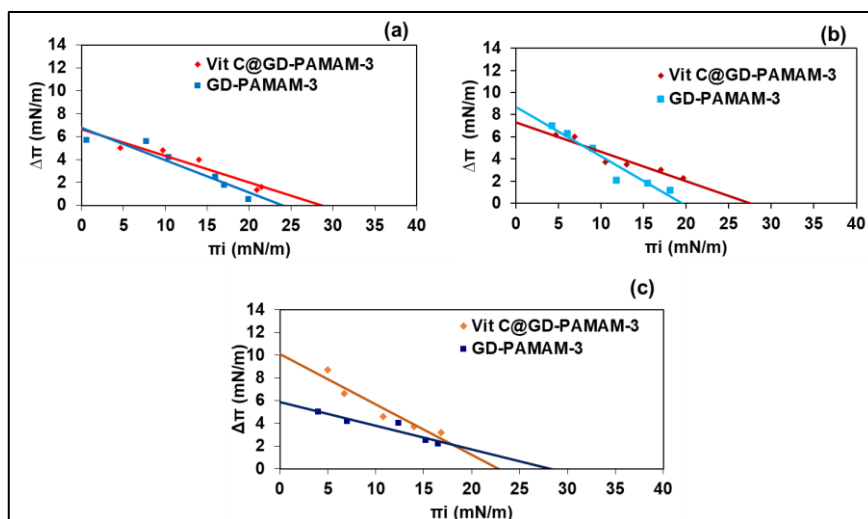


Figure 30. Surface pressure variation following adsorption of GD-PAMAM-3 (0.2 μM) and VitC@GD-PAMAM-3 (11.33 μM) versus initial surface pressure (Π_i) of the lipid monolayer (C24Cer2/Chol/C24FA 1:1:1 molar ratio) at 22 $^{\circ}\text{C}$; (a) at pH 7.4, (b) at pH 6.0 (c) at pH 5.0.

Table 15. Values of MIP and $d\Pi_0$ of GD-PAMAM-3 and VitC-GD-PAMAM-3 at different pH values determined graphically from Figure 3. $d\Pi_0$ (mN/m): the differential surface pressure variation, corresponding to the difference between the maximum surface pressure variation and the surface pressure value at lipid-free interface for the same concentration, MIP (mN/m): the maximum insertion pressure (for $\Delta\Pi = 0$ mN/m)

<i>pH</i>	<i>MIP (mN/m)</i>		<i>dΠ₀ (mN/m)</i>	
	<i>GD-PAMAM-3</i>	<i>VitC-GD-PAMAM-3</i>	<i>GD-PAMAM-3</i>	<i>VitC-GD-PAMAM-3</i>
pH 5.0	28.2 ± 7.3	22.9 ± 7.2	5.9 ± 0.5	9.6 ± 1.4
pH 6.0	19.5 ± 2.8	27.4 ± 5.1	6.7 ± 0.7	5.3 ± 0.6
pH 7.4	23.9 ± 4.7	28.6 ± 5.5	2.7 ± 0.7	2.6 ± 0.6

2.3.2. Study on the Liposome Model

In order to work with a biomimetic model that has physico-chemical features closer to those of cell membranes [153], liposomes mimicking the lipid composition of the SC had to be optimized preliminary. Two kinds of liposomes were developed, one adapted to the measurement of the SC permeability and another one suitable for analyzing the SC fluidity.

Development and characterization of HPTS-DPX-loaded liposomes

In order to perform permeability assays, the formulation of stable large uni-lamellar vesicles (LUVs) with the lipid composition C24Cer2/Chol/C24FA (1:1:1 molar ratio) and encapsulating a fluorescent probe and its quencher in their inner compartment was optimized. Formation of liposomes was possible at pH 7.4 but not at pH 5.0 and pH 6.0. At pH 7.4, one population of liposomes with a diameter of 180 ± 82 nm and that was stable over 5 days was obtained. An HPTS probe coupled with a DPX quencher (HPTS/DPX (8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid/p-xylene bis pyrimidium bromide)) was used, as it is the most appropriate fluorescent system for avoiding liposomes destabilization, which is observed with calcein-loaded liposomes (data now shown). In addition, the HPTS probe can be used at different pHs without any solubility concern. In order to better mimic real skin conditions, we ultimately formed liposomes with an internal core at pH 7.4 and an external environment at pH 5.0. For this purpose, a dialysis through a 20 kDa membrane in an acetate buffer at pH 5.0 was performed after formulation of the liposomes at pH 7.4. The change of the external pH did not affect the size and stability of the liposomes.

Development and characterization of Laurdan-stained liposomes

In order to measure the fluidity of the liposome bilayer, we formulated liposomes according to the protocol described in section 3.8. After the formation of liposomes with a core at pH 7.4 and an outer environment at pH 5.0, Laurdan (1 μ M) was added and incubated for 90 min at room temperature in the darkness. The size of these liposomes was 151 nm \pm 42 nm and they were stable for 5 days.

Effect of GD-PAMAM-3 on liposome permeability

The percentage of liposome permeability was determined by measuring the leakage of the fluorescent probe and its quencher previously encapsulated and released by action of a given molecule. In this work, we performed leakage assays of HPTS-DPX-loaded liposomes upon treatment with three compounds, GD-PAMAM-3, vitamin C and VitC@GD-PAMAM-3.

The leakage upon the addition of GD-PAMAM-3 at T_0 decreases with the decrease of GD-PAMAM-3:liposome molar ratio (**Figure 31a**). No permeabilizing effect at low molar ratios and limited permeabilizing effect (lower or equal 35%) at higher ratios was observed, which is in agreement with the low cytotoxicity observed on dermal cells. The permeabilizing effect appears upon the contact at T_0 between the dendrimers and the liposomes and does not change over time (T 3h30). The small permeabilizing effect of GD-PAMAM-3 on the liposomes can be explained by the liposome aggregation phenomenon observed by cryo-TEM (see **Figure S59 in Supplementary**), such as it was already detected for PAMAM-6 on other liposomes [351]. By comparing leakages induced upon GD-PAMAM-3 and VitC@GD-PAMAM-3 treatment, we noticed that there is no marked difference between the two (**Figure 31a,b**).

The permeability of the liposome by vitamin C was studied under the same conditions and the same concentration as it is in the VitC@GD-PAMAM-3 complex. There was no variation of fluorescence intensity neither with the increased concentration of vitamin C (from 0.0037 mM to 0.59 mM) nor with time (data not shown), indicating that vitamin C does not permeabilize the membrane.

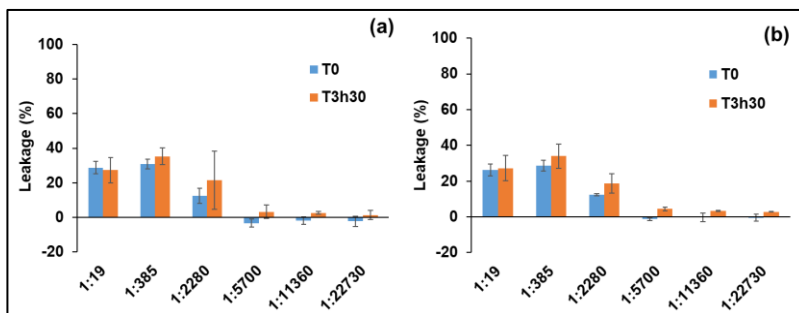


Figure 31. Release of HPTS and DPX from SC biomimetic liposomes, upon addition of GD-PAMAM-3 (a) or VitC@GD-PAMAM-3 complex (56:1 molar ratio) (b) at different GD-PAMAM-3:liposome molar ratios and 2 incubation periods. T_0 corresponds to the time when the dendrimers are added to the liposomes. The leakage corresponds to the amount of HPTS-DPX released in the presence of the dendrimers expressed as a percentage of the total amount released by Triton X-100 and taking into consideration the re-encapsulation phenomenon (see Section 3.10).

Effect of GD-PAMAM-3 on membrane fluidity

The effect of GD-PAMAM-3 in absence or presence of vitamin C on the fluidity/rigidity of SC biomimetic liposomes was determined by measuring the variation of the generalized polarization (ΔGP) of Laurdan, staining the lipid bilayer, after the addition of the dendrimers (**Figure 32**). Namely, when the membrane phase (ordered/fluid) changes in the vicinity of the probe, the mobility of the lipid headgroup will change and will induce an emission spectral shift of Laurdan fluorescence [352]. Thus, before and after adding the dendrimers, the change of lipid order is monitored thanks to these spectral changes, which are expressed as the variation of the ΔGP . An increase of ΔGP corresponds to a rigidification of the bilayer.

Upon addition of GD-PAMAM-3 or VitC@GD-PAMAM-3 at a 1:2500 dendrimers:liposomes molar ratio, an immediate rigidifying effect of SC biomimetic liposomes was observed ($\Delta GP = 0.04$ and 0.08 , respectively) (**Figure 32**). This indicates an increase in bilayer rigidity, which is more pronounced in the presence of vitamin C. However, whereas an increase of ΔGP after 3h30 of incubation is observed with GD-PAMAM-3, a similar value is obtained for VitC@GD-PAMAM-3 at T_0 and T_{3h30} . It suggests that the presence of vitamin C accelerates the rigidity increasing process. It is important to note that when added alone, VitC has no effect on bilayer fluidity, likely because it does not reach the liposomes due its high hydrophilicity.

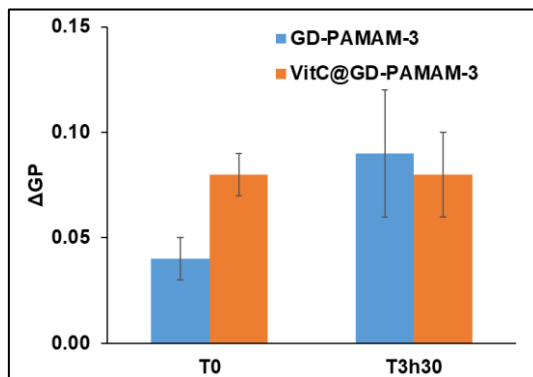


Figure 32. Change in Laurdan-generalized polarization (ΔGP) in SC biomimetic liposomes following addition of GD-PAMAM-3 or VitC@GD-PAMAM-3 (56:1 VitC:dendrimers molar ratio) at a 1:2500 GD-PAMAM-3:liposome molar ratio. T₀ corresponds to the time when the GD-PAMAM is added to the liposomes.

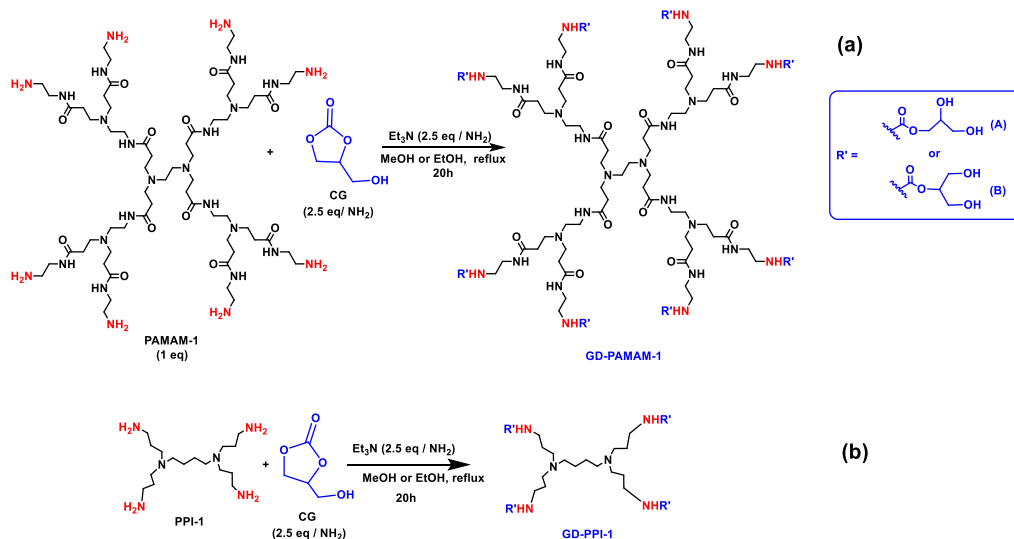
3. Materials And Methods

3.1. Chemicals

All generations of Poly(propylene imine) (PPI) were purchased from SyMOChem, all generations of Poly(amidoamine) (PAMAMs), glycerol carbonate, L-Ascorbic acid, Lignoceric acid (C24FA), 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid (HPTS), *p*-xylene-bispyrimidium bromide (DPX), Triton-X100, Laurdan and Glutaraldehyde were purchased from Sigma-Aldrich. *N*-Lignoceroyl-D-sphingosine (C24Cer2) and cholest-5-en-3-ol (Chol) were purchased from Avanti Polar Lipids. Triethylamine (Et₃N) was purchased from Fisher Scientific. Tetrazolium salt (WST1) was purchased from Roche. 3-(Trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3-d₄ acid sodium salt (TMSP), deuterium oxide (D₂O) and methanol d₄ (CD₃OD) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All these chemical products were used without further purification. The buffer used in this work was a phosphate-buffered saline (PBS) comprised of sodium dihydrogen phosphate monohydrate (NaH₂PO₄·H₂O)/disodium hydrogen phosphate (Na₂HPO₄)/sodium chloride (NaCl) (20/20/150 mM) at pH 7.4 and pH 6.0, an acetate buffer CH₃COOH/CH₃COO⁻ (5 mM) at pH 5.0 and an hydroxyethyl-piperazineethane-sulfonic acid buffer (HEPES) at pH = 7.6. The adjustment of the pH was done by adding an adequate amount of 3 M sodium hydroxide (NaOH).

3.2. Synthesis of glycerol derived dendrimers

The synthesis of Glycerol-functionalized PAMAMs (glyceroDendrimer Poly(AMidoAMine) (GD-PAMAMs)) and glycerol-functionalized PPIs (glyceroDendrimer Poly(PropyleneImines) (GD-PPIs)) was performed as previously described [1,4]. It was done by reaction of commercial PPIs (generations 1–4) and PAMAMs (generations 1–3) with glycerol carbonate, (CG) in methanol/ethanol in the presence of Et_3N (**Scheme 16a,b**). To a bicol flask containing 1 eq of PPIs or PAMAMs dissolved in Methanol (MeOH) or (Ethanol) EtOH (20 mL), glycerol carbonate (2.5 equiv per NH_2) and triethylamine (2.5 equiv per NH_2) were added. The reaction mixture was refluxed under an inert atmosphere for 20h. The solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was dissolved in a minimum of MeOH and then precipitated 3 times with an excess of a 2:1 (v/v) pentane/Ethyl acetate (AcOEt) mixture. The residue was dried under reduced pressure then dissolved again in a minimum of distilled water and purified by dialysis (cutoff 1 KDa) several times in distilled water. The product was obtained in a form of a yellow wax. NMR spectra were recorded at 298 K at 500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C on an Avance NEO Bruker spectrometer equipped with a SP BB&19F/1H Iprobe CD_3OD or D_2O . The synthesis results are presented in the **Table 16**.



Scheme 16. Synthesis of (a) GD-PAMAM1 and (b) GD-PPI-1. All schemes were obtained using ChemDraw Professional 16.0.

Table 16. GD-PAMAMs and GD-PPIs synthesis using 2.5 equivalents of Glycerol Carbonate (CG) per NH_2 function, 2.5 equivalents of triethylamine per NH_2 function in refluxing Methanol for 20h. Terminal OH moieties correspond to the hydroxyl functions present in periphery.

Dendrimers	Generation Number	Yields (%)	Terminal OH Moieties
GD-PAMAM	G0	70	8
	G1	85	16
	G2	87	32
	G3	90	64
GD-PPI	G1	80	8
	G2	70	16
	G3	85	32
	G4	75	64

3.3. Encapsulation procedure

GD-PPIs and GD-PAMAMs (1 equiv.) were dissolved in H_2O (5 mL). Then, L-ascorbic acid (100 equiv.) was added, and the mixture was stirred 24h at room temperature. The crude mixture was purified by dialysis (cutoff 1 KDa) three times (3×40 min) against distilled water (1000 mL) to eliminate the vitamin C excess. Finally, the water was removed by lyophilization to obtain a yellow wax.

NMR spectra were recorded at 298 K at 500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C on an Avance NEO Bruker spectrometer equipped with a SP BB&19F/1H Iprobe in D_2O .

3.4. NMR T_1 and T_2 Measurement:

Longitudinal relaxation time T_1 was determined with inversion-recovery pulse sequence (**Figures S4–S6 in Supplementary**). The delay between the inversion pulse and the read pulse and the relaxation delay were adjusted depending on its values (relaxation delay should be with a minimum 5 times the highest T_1 in the sample). The number of scans was set at 8. Transversal relaxation time T_2 was determined by the Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence. The delay between 180 degrees pulse in the CPMG block was 2 ms for the dendrimers with vitamin C and 1.4 ms for

free vitamin C. The number of loops and the relaxation delay were adjusted depending on the values of relaxation time. The number of scans was set at 8.

3.5. Cytotoxicity assays

Cytotoxicity assays of the dendrimers were performed on human dermal fibroblast cultures purchased from PromoCell. Two different methods were used: (i) Reduction of a tetrazolium salt (WST1) by mitochondrial oxido-reductases and (ii) staining of cells with crystal violet. Human dermal fibroblasts were cultivated at a confluence in 75 cm² culture flasks (Falcon) in DMEM medium containing glutamine (2 mM) and Fetal Calf Serum (FCS) at 10% (v/v) under a humid atmosphere with 5% CO₂ and at 37 °C. Confluent human dermal fibroblasts (20,000 cells/mL) were deposited in 24 well-culture plates (Falcon) and cultured in the same conditions above. Culture medium is removed and replaced by the same DMEM medium with FCS 0.5% for 24h. The different dendrimers were dissolved in distilled water and tested at various concentrations (ranging from 0.0001 to 1 mg/mL) for 48h in the same DMEM medium with 0.5% FCS (1 mL/well).

WST1 reduction: At the end of the incubation period in the presence of different products, cells were rinsed with 1 mL of DMEM containing 0.5% FCS, and incubated with 400 µL of the same DMEM medium containing 10 µL of a WST1 solution in 400 µL, for 30 min at 37 °C. Tetrazolium salts were cleaved to formazan by the succinate-tetrazolium reductase system (EC 1.3.99.1), which belongs to the respiratory chain of the mitochondria, and is only active in metabolically intact cells. Volume of 100 µL of cell solutions from different treatments tested was transferred in 96 well-plates and absorbance at 450 nm was recorded with a spectrophotometer.

Cell staining with crystal violet allows to measure the cell density. After incubation with WST1, cells were washed with 1 mL of Phosphate Buffered Saline (PBS), then fixed by incubation for 20 min with 1 mL/well of PBS containing glutaraldehyde 1.1% (v/v). After abundant rinsing with distilled water, cells were stained by addition of 400 µL/well of a solution of crystal in a HEPES buffer at pH = 7.6 for 20 min. The excess of crystal violet was removed, and cells were extensively rinsed with distilled water. Staining was extracted with 1 mL of acetic acid 10% (v/v). Volumes of 100 µL of the colored solution were transferred onto 96 well-plates. Absorbance at 560 nm was recorded with a spectrophotometer.

Results are expressed as the mean ± standard deviation. Each experiment is done in quadruplicate.

3.6. Study on lipid monolayer models by Langmuir film balance technique

The experiments were performed at 22 ± 1 °C with an automated LB system (KSV minitrough, KSV instruments Ltd., Helsinki, Finland). The adsorption area (75×160 mm²) is delimited by two symmetrical barriers held stationary at the edges of the trough for the duration of the measurement. For the study of adsorption in the absence of lipids, solutions containing the vitamin C, GD-PAMAM-3 or VitC@GD-PAMAM-3 (GD-PAMAM-3 with encapsulated vitamin C) were prepared in ultra-pure water and then injected into the PBS at pH 7.4 or 6.0 or an acetate subphase at pH 5.0 at different concentrations (from 1 µM to 50 µM), (from 0.025 µM to 5 µM) and (11.33 µM), respectively, for Vitamin C, GD-PAMAM-3 and VitC@GD-PAMAM-3), using a Hamilton syringe and two custom-made devices allowing the injection of products without disturbing the air–water interface. These devices were placed at two fixed positions on the trough to ensure a reproducible injection process. Furthermore, during the entire duration of the experiment, the subphase was stirred using two cylindrical micromagnetic rods (8×1.5 mm²) and two electronic stirrer heads located beneath the trough (model 300, Rank Brothers, Bottisham, UK). An auto-reversing mode with slow acceleration and a stirring speed of 100 rpm were selected. After the injection of the products, the increase of the surface pressure was measured by means of a Wilhelmy plate connected to the measuring system of the device. The surface pressure was recorded as a function of the time until reaching a plateau.

For the study of the adsorption in the presence of lipids, a precise volume of lipid mixture (C24Cer2/Chol/C24FA) (1:1:1), prepared in chloroform/methanol (2:1 v/v), was spread on the surface of the buffer until the desired initial surface pressure. As soon as the initial surface pressure was stabilized (20 min to 45 min), solutions of vitamin C, GD-PAMAM-3 or VitC@GD-PAMAM-3 (20 µL) were injected into the buffer subphase at final concentrations of 11.13, 0.2 and 11.33 µM and the increase in surface pressure was recorded as a function of time.

3.7. Formulation of fluorescent probe-encapsulated liposomes

In a round bottom flask, the three lipids, C24Cer2, Chol and C24FA were weighted in equimolar amounts. The lipids were solubilized in chloroform/methanol (2/1, v/v) and the solvent removed under reduced pressure. The resulting lipid film was then dried in a vacuum desiccator overnight to remove the remaining solvent. The lipid film was then rehydrated with a PBS buffer at pH 7.4 (1 mL) containing the

fluorescent probe, 8-hydroxypyrene-1,3,6 trisulfonic acid (HPTS 6 mM) and its quencher, p-xylene-bis-pyridinium bromide (DPX 10 mM), previously heated to 90 °C to obtain an initial concentration of 3 mM of liposomes. The flask was vortexed to solubilize the lipid film and was placed in a water bath at 90 °C, which corresponds to a temperature above the lipid transition temperature. The mixture was vortexed every 10 min for one hour, and the content of the flask was transferred to a polypropylene tube. Seven cycles of freezing (in liquid nitrogen) and heating (in a water bath at 90 °C) were then performed. The heat shock allows the formation of homogeneous multi-lamellar vesicles (MLVs). MLVs are extruded 21 times through polycarbonate filters with a pore diameter of 100 nm to obtain large uni-lamellar vesicles (LUVs). A Sephadex-G75 gel purification step was performed to remove the unencapsulated probe. The Sephadex gel was obtained by hydrating 1.7 g of Sephadex G75 with 60 mL of PBS buffer at pH 7.4 at 150 °C for 2 h. Finally, a dialysis with a 20 kDa membrane in 500 mL of acetate buffer at pH 5.0 was performed for 1 h in order to equilibrate the pH value, inside and outside the dialysis membrane. The objective of this step is to form liposomes with a core at pH 7.4 and an external environment at pH 5.0 to better mimic the real conditions of the skin. The liposomes were then stored in the dark at 40 °C. The concentration of HPTS/DPX-loaded liposomes has been determined by NMR analysis.

3.8. Formulation of laurdan-stained liposomes

The lipid film (C24Cer2/Chol/C24FA) (1:1:1), formed by the method described above, was rehydrated with a PBS buffer at pH 7.4, previously heated to 90 °C to obtain an initial concentration of 3 mM of liposomes. The flask was placed in a water bath at 90 °C. The next steps were carried out in the same way as described for fluorescent probe-encapsulated liposomes, except the Sephadex gel purification step was not performed. After liposomes formation, a solution of Laurdan at 1 mM was added to the liposome solution to obtain a solution with 1 μM of Laurdan, which was incubated for 90 min at room temperature in the darkness. The Laurdan solution (1 mM) was prepared by adding 0.35 mg of Laurdan in 1 mL of DMSO.

3.9. Liposomes characterization: size and quantification

3.9.1. Size determination - DLS measurement

Liposome sizes were determined by Dynamic Light Scattering with a Zetasizer Nano ZS apparatus (Malvern Instrument SA, Worcestershire, UK) equipped with a

laser emitting at 632 nm. Acquisitions were measured at 25 °C (equilibration duration of 15 min) using a lipid concentration of 1.5 mM. For each sample, from 10 to 20 acquisitions were carried out with an acquisition time of 10 s. Autocorrelation functions obtained were fitted with a CONTIN algorithm as provided in the software in order to obtain the precise values of the liposomes' diameter and size distribution. In all cases, measurements were repeated three times.

3.9.2. Morphology Characterization—Cryo-TEM

The samples were prepared in the same way as described in the Laurdan-stained liposomes preparation without adding Laurdan.

A 4- μ L aliquot of sample was deposited on an EM grid coated with a perforated carbon film. After draining the excess liquid with a filter paper, grids were plunge-frozen into liquid ethane cooled by liquid nitrogen using a Leica EMCPC cryo-chamber (Leica Mi-crosystems, Wetzlar, Germany). For cryo-TEM observation, grids were mounted onto a Gatan 626 cryoholder and transferred to a Tecnai F20 microscope (Thermo Fisher Scientific) operated at 200 kV. Images were recorded with an Eagle 2k CCD camera (FEI, Hills-boro, OR, USA).

3.9.3. Lipid concentration quantification - NMR spectroscopy

The lipid concentration of the LUVs was quantified by ^1H NMR spectroscopy following a protocol from Hein *et al.* (2016) [353] and Smeralda *et al.* (2019) [354]. TMSP was used as an internal standard ($\delta = 0$ ppm). ^1H NMR measurements were performed at 50 °C on a Bruker Avance III HD spectrometer (Bruker) equipped with a 5 mm TCI CryoProbe operating at 700 MHz. The large H_2O signal was attenuated thanks to a pulse program with presaturation using a composite pulse (zgcppr). The instrument's standard settings were: 90° pulse angle, 1.47 s acquisition time, 2 s relaxation delay and 16 ppm spectral width. Locking and shimming were performed on the signal of the exchangeable deuterium atoms of the $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ mixtures. In total, 128 scans were performed leading to a total acquisition time of 7 min 30 s. Data processing was performed with Topspin 3.5. After zerofilling to 64 k data points, apodization (exponential and Gaussian functions, 1 Hz), Fourier transformation, phase- and baseline correction and the peak areas were determined by integration.

3.10. *Leakage assays*

The measurements were performed on a PerkinElmer–LS 55 fluorometer, at an excitation wavelength of 412 nm and an emission wavelength of 513 nm with a slit value around three for both. In an aluminum-coated Falcon, a solution of liposomes enclosing the fluorescent probe was prepared at 15 μM . In addition, a 1% TritonX-100 solution was prepared. A cuvette of 10 μL of solvent (ultra-pure water) was added to 750 μL of the liposome solution and the content of the cuvette was gently mixed to homogenize the content without forming air bubbles. The fluorescence intensity measurement was performed and corresponds to F_0 . Keeping the same parameters used for the first measurement (slit value), a measurement with the addition of 10 μL of 1% Triton-X100 in 750 μL of the liposome solution was performed. The intensity value obtained corresponds to the F_{Triton} value. Similarly, measurements were performed for GD-PAMAM-3, VitC@GD-PAMAM-3 (56:1, VitC: dendrimer molar ratio) and vitamin C samples for a range of concentrations by adding 10 μL of the sample to 750 μL of the liposome solution. The values obtained correspond to the F_{sample} . The absence of fluorescence emitted by the sample was controlled by adding 10 μL of the sample to 750 μL of buffer.

At higher dendrimers:liposomes molar ratios, negative values were observed and were attributed to the capacity of the dendrimers to re-encapsulate the HPTS/DPX released from the liposomes. The percentage of re-encapsulated HPTS/DPX was determined in independent experiments performed at the same dendrimer concentrations as in initial experiments and with a concentration of HPTS/DPX corresponding to the fluorescence intensity obtained in the initial experiments in the presence of Triton X-100. For each dendrimer:liposome molar ratio, the value of the re-encapsulated HPTS/DPX percentage was added to the initial value of leakage to obtain the final Leakage (%) according to Equation (1):

$$\text{Leakage (\%)} = [(F_{\text{sample}} - F_0) / (F_{\text{triton}} - F_0) \times 100] + \% \text{ re-encapsulated HPTS/DPX} \quad (1)$$

3.11. *Fluidity measurement*

The measurements were performed using a microplate reader (Spark, Tecan) at 32 $^{\circ}\text{C}$ at an emission wavelength from 405 nm to 520 nm. The measurements were

recorded every 10 min for one hour. The mixture was stirred after each measurement cycle for about 3 min.

Two solutions of liposomes were prepared. The first one contained liposomes stained with the LLaurdan (see above in Laurdan-stained liposomes experiment) at 62.5 μM to obtain a final concentration of 50 μM /1 μM (liposomes/LLaurdan) after the addition of the sample. The second one contained liposomes with DMSO, the same amount (50 μM μL) as in the treated ones and is used as a control. On the other hand, solutions of GD-PAMAM-3, vitamin C and VitC@GD-PAMAM-3 (56:1 VitC:dendrimer molar ratio) were prepared in ultra-pure water to obtain final concentrations of 0.02 μM , 1.11 μM and 01.13 μM , respectively, in the mixtures of the liposome sample. The VitC@GD-PAMAM-3 complex contained the same concentration of GD-PAMAM-3. The microplate wells were filled with liposome solution with or without Laurdan (100 μL). A first measurement was made before the addition of dendrimers to compare the intensity before and after the addition. Then, 25 μL of each sample was added to the liposomes with DMSO or to the Laurdan-stained liposomes. The blank one was obtained by adding the same volume of ultra-pure water (25 μL). Three replicates for each sample were performed. The measurements were recorded every 10 min for one hour. An emission spectrum was recorded from 405 to 520 nm, but only the wavelengths of 440 and 490 nm were taken into account for calculating the Generalized Polarization (GP_{ex}) parameter (Equation (2)):

$$\text{GP}_{\text{ex}} = (I_{440} - I_{490}) / (I_{440} + I_{490}) \quad (2)$$

where I_{440} and I_{490} are the emission intensities subtracted from the blank at 440 and 490 nm, respectively. Each experiment has been repeated three times under the same conditions with a new batch of liposomes.

4. Conclusion

The aim of our work was to evaluate the potential of different generations of two biobased glycerodendrimer families GlyceroDendrimers-Poly-(AMidoAMine) (GD-PAMAMs) or GlyceroDendrimers-Poly(Propylene Imine) (GD-PPIs) as vitamin C carriers for topical application. For that purpose, we first investigated their capacity to encapsulate vitamin C. The results showed that our system GD-PAMAM-3 has a higher encapsulating capacity than commercial PAMAM-3 and different GD-PPIs dendrimers. Additionally, our best candidate, GD-PAMAM-3, has no cytotoxicity on

human dermal fibroblasts, whereas GD-PPIs have a cytotoxic effect at concentrations higher or equal to 0.25 mg/mL, which renders GD-PAMAM-3 another favorable property.

To better understand its mechanism of action and its use in the cosmetics, the interaction of the best candidate, GD-PAMAM-3, encapsulating vitamin C or not, with SC biomimetic models, was investigated by using two kinds of SC models, lipid monolayers and liposomes. The study with the lipid monolayer model has shown that the dendrimer encapsulating vitamin C or not is able to interact with the main lipids of the SC at all pH setups tested. However, it is suggested that only pH 5.0 is favorable for release of vitamin C into the SC matrix. Development of liposomes mimicking SC lipid composition and with an internal core at pH 7.4 and an external environment of pH 5.0 to better mimic real skin conditions was performed for investigating the effect of dendrimers on SC permeability and fluidity/rigidity. The binding of GD-PAMAM-3 or VitC@GD-PAMAM-3 to the SC-mimicking liposomes does not affect their permeability at low molar ratios of GD-PAMAM-3:liposome and has a limited permeabilizing effect at higher ratios, in accordance with the absence of cytotoxicity on dermal cells. The binding of GD-PAMAM-3 and VitC@GD-PAMAM-3 increases the rigidity of the liposome bilayer, with a higher immediate effect in the presence of VitC. It suggests a reinforcement of the SC barrier property by GD-PAMAM-3 with a more intense immediate effect in the presence of VitC.

In conclusion, our results suggest that GD-PAMAM-3 is the best dendrimer candidate for VitC encapsulation for topical application. It has high encapsulating ability, low cytotoxicity and is suggested to be able to deliver vitamin C to the SC. However, additional assays have to be performed to confirm this last property.

Supplementary Materials (Annexe 2) : The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules27228022/s1>

Figure S50: ^1H NMR of GD-PAMAM-3 (green), Vitamin C (blue) and Vit C@GD-PAMAM-3 (red) in D_2O ; Figure S51: ^1H NMR of Vit C@GD-PPI-4 in D_2O ; Figure S52: Vit C@GD-PPI-4 NOESY NMR; Figure S53: T1 measurements of free Vitamin C; Figure S54: T1 measurements of Vitamin C with GD-PAMAM3; Figure S55: T1 measurements of Vitamin C with GD-PPI4; Figure S56: T2 measurements of free Vitamin C; Figure S57: T2 measurements of Vitamin C with GD-PAMAM3; Figure S58: T2 measurements of Vitamin C with GD-PPI4; Figure S59: Cryo-TEM images of liposomes at 1.2 mM: (a) and (b) in absence of GD-PAMAM-3 showing few and

isolated Large unilamellar vesicles (LUVs), (c) and (d) in presence of GD-PAMAM-3 at 0.48 μM showing some liposome aggregation..

IV.3. Interaction du GD-PPI-4 et du PAMAM-3-FA avec les membranes biomimétiques du SC

1. Résultats et discussions

L'étude de l'interaction de deux autres familles de dendrimères GD-PPI-4 et PAMAM-3-FA avec les modèles biomimétiques de SC, a été effectuée dans les mêmes conditions que précédemment, pour comprendre l'effet de la structure du dendrimère sur son comportement sur le SC par comparaison avec les résultats précédemment obtenus avec le GD-PAMAM-3.

Deux modèles membranaires sont utilisés : les monocouches lipidiques et les liposomes constitués chacun de *N*-Lignoceroyl-*D*-sphingosine (C24Cer2), du cholest-5-èn-3-ol (Chol) et de l'acide lignocérique (C24FA) (1:1:1), représentant des principales classes de lipides présents dans le SC humain.

1.1. Etude sur le modèle monocouche de stratum corneum

L'étude sur la monocouche (C24Cer2/Chol/C24FA) (1:1:1) a été réalisée à 22 °C dans le tampon acétate à pH 5, pH imitant la partie externe de la peau et sélectionné comme un pH favorisant le relargage de la molécule active (vitamine C) dans la première partie de ce chapitre.

Après l'injection du GD-PPI-4 et du PAMAM-3-FA à 0,2 μ M (même concentration que pour le GD-PAMAM-3) dans la sous-phase acétate dépourvue de lipides, aucune variation de pression de surface n'a été observée en fonction du temps. Ceci indique que le pH 5 ne favorise pas l'adsorption des dendrimères, en accord avec ce qui a été observé avec la GD-PAMAM-3. En présence de la monocouche lipidique à différentes pressions de surface initiales, la pression de surface du GD-PPI-4 et PAMAM-3-FA augmente avec le temps et atteint un plateau après 50 min et 30 min respectivement (**Figure 33**). Ceci indique que la monocouche lipidique favorise l'adsorption des dendrimères à l'interface.

Le graphique de la variation de pression de surface $\Delta\Pi$ en fonction de la pression de surface initiale Π_i montre une diminution de $\Delta\Pi$ avec Π_i (**Figure 34**). Les valeurs de MIP et $d\Pi_0$ du GD-PPI-4 et PAMAM-3-FA déterminées à partir du graphique (**Figure 34**) sont présentées dans le **tableau 17**. Les valeurs de MIP sont similaires à celle du GD-PAMAM-3 (si on tient compte des écart-types) et sont dans l'intervalle

de 25-30 mN/m (gamme de la pression de surface estimée dans les membranes biologiques). Ceci suggère que ces dendrimères sont capables de pénétrer dans la matrice lipidique du SC. Il est aussi à noter que les valeurs de $d\Pi_0$ du GD-PPI-4 et PAMAM-3-FA sont positives et sont supérieures à celle du GD-PAMAM-3, ce qui indique que le mélange ternaire lipidique de SC a un effet attractif plus important pour GD-PPI-4 et PAMAM-3-FA que pour GD-PAMAM-3. Ceci pourrait être la raison pour laquelle GD-PPI-4 et PAMAM-3-FA présentent une cytotoxicité. En effet, une attractivité excessive pourrait engendrer un endommagement des cellules. Des mesures de l'effet du GD-PPI-4 et PAMAM-3-FA sur la perméabilité et la fluidité membranaires ont donc été entreprises pour mieux comprendre cet effet cytotoxique.

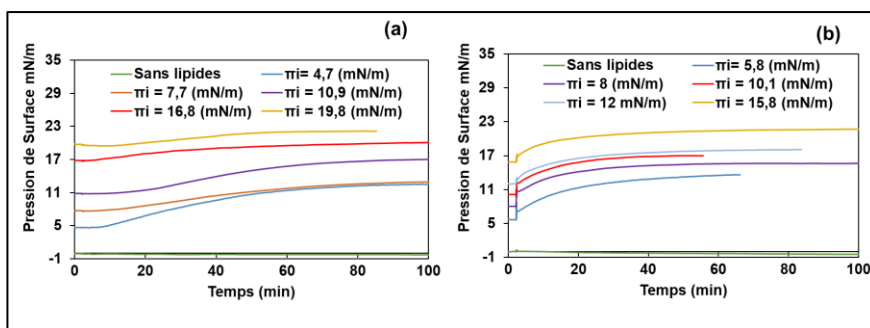


Figure 33 : Cinétique de l'adsorption du GD-PPI-4 (a) et du PAMAM-3-FA (b) ($0,2 \mu\text{M}$ dans la sous-phase à pH 5) à une interface dépourvue de lipides ou recouverte de monocouche lipidique imitant le SC (C24Cer2/Chol/C24FA 1:1:1). Le temps zéro correspond au temps d'injection du dendrimère sous une interface dépourvue de lipides ou recouverte de monocouche lipidique à différentes pressions de surface initiales Π_i

Tableau 17 : Les valeurs de MIP et de $d\Pi_0$ du GD-PPI-4, PAMAM-3-FA et du GD-PAMAM-3 déterminées graphiquement à partir de la Figure 6. $d\Pi_0$ (mN/m): variation de pression de surface différentielle, qui correspond à la différence entre la variation de pression de surface maximale et la valeur de pression de surface à une interface dépourvue de lipides à la même concentration, MIP (mN/m): la pression d'insertion maximale (pour $\Delta\Pi = 0$ mN/m)

	<i>GD-PAMAM-3</i>	<i>GD-PPI-4</i>	<i>PAMAM-3-FA</i>
<i>MIP (mN/m)</i>	$28,2 \pm 7,3$	$27,7 \pm 6,1$	$41,7 \pm 11,4$
<i>$d\Pi_0$ (mN/m)</i>	$5,9 \pm 0,5$	$9,1 \pm 0,4$	$9,1 \pm 0,9$

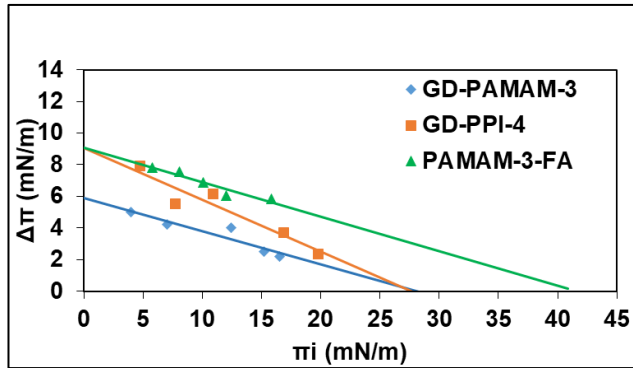


Figure 34 : Variation de la pression de surface $\Delta\Pi$ après injection du GD-PAMAM-3, GD-PPI-4 et PAMAM-3-FA à $0,2 \mu\text{M}$ en fonction de la pression de surface initiale Π_i de la monocouche lipidique (C24Cer2/Chol/C24FA 1:1:1) à 22°C à pH 5.

1.2. Effet des dendrimères GD-PPI-4 et PAMAM-3-FA sur la perméabilité de liposomes

Dans cette étude, le pourcentage de perméabilité des liposomes a été déterminé en mesurant la fuite de la sonde fluorescente HPTS et de son quencher DPX préalablement encapsulés (voir la partie expérimentale de l'article ci-dessus) et libérés par l'action du dendrimère GD-PPI-4 ou PAMAM-3-FA.

Aucun effet perméabilisant n'a été observé au moment du contact du GD-PPI-4 même avec des ratios molaires dendrimère:liposome élevés. Cependant un effet faible limité ($\leq 20\%$) est apparu au cours du temps (T3h30) pour des ratios plus élevés (**Figure 35-a**). Pour le PAMAM-3-FA, un très faible effet ($\leq 10\%$) pour des ratios plus élevés est observé dès le contact à T0 et il demeure ensuite au cours du temps (**Figure 35-b**).

En comparant avec les résultats obtenus pour le GD-PAMAM-3, nous pouvons constater qu'il n'y a pas de différence marquée de comportements des dérivés de PAMAM (effets légers immédiats). Tandis que le comportement de GD-PPI-4 est légèrement différent (un effet apparu au cours du temps). Le faible effet perméabilisant des dendrimères sur les liposomes pourrait s'expliquer par un phénomène d'agrégation des liposomes (comme observé dans le cas du GD-PAMAM-3), mais qui serait plus lent dans le cas du GD-PPI-4 du fait de sa taille moins importante par comparaison aux GD-PAMAMs.

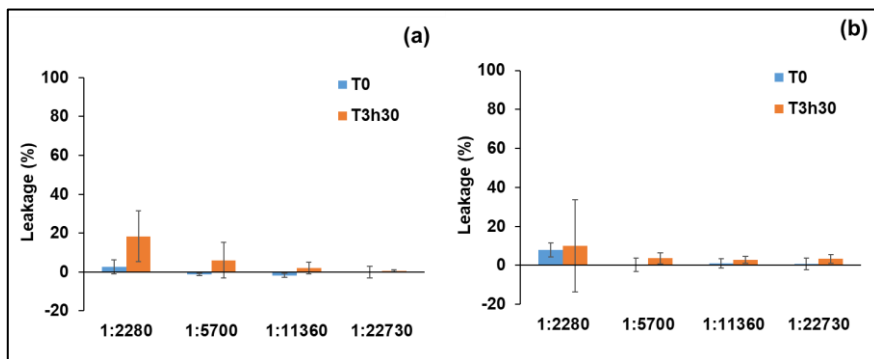


Figure 35 : Libération de HPTS et DPX des liposomes biomimétiques du SC, après l'ajout de GD-PPI-4 (a) ou du PAMAM-3-FA (b) à différents rapports molaires dendrimère:liposome et 2 périodes d'incubation. T0 correspond au moment où les dendrimères sont ajoutés aux liposomes. Le leakage correspond à la quantité de HPTS-DPX libérée en présence des dendrimères, exprimée en pourcentage de la quantité totale libérée par le Triton X-100 et en prenant en considération le phénomène de la réencapsulation

1.3. Effet des dendrimères GD-PPI-4 et PAMAM-3-FA sur la fluidité de la membrane

L'effet du GD-PPI-4 et du PAMAM-3-FA sur la fluidité/rigidité de la membrane biomimétique du SC a été déterminé en mesurant la variation de la polarisation généralisée (ΔGP) du laurdan dans la bicouche lipidique (C24Cer2/Chol/C24FA) (1:1:1) après l'ajout de dendrimères dans le même ratio molaire dendrimère : liposome (1 : 2500) utilisé lors de l'étude du GD-PAMAM-3. La formulation de bicouche lipidique (liposome) décorée avec du laurdan a été décrite dans l'article ci-dessus. Pour rappel : un ΔGP positif correspond à une rigidification de la membrane alors que qu'un ΔGP négatif correspond à une fluidification.

En présence de GD-PPI-4, un effet de rigidification marqué et immédiat ($\Delta GP = 0,1$ à $T=0$) de la bicouche biomimétique de SC est observé (**Figure 36**) ; il diminue ensuite avec le temps ($\Delta GP = -0,08$ à $T = 3h30$). En présence de PAMAM-3-FA, un effet fluidifiant ($\Delta GP = -0,125$ à $T = 0,5h$) puis un effet rigidifiant progressif ($\Delta GP = 0,06$ à $T = 3h30$) sont successivement observés (**Figure 36**). Ces deux effets physiques n'avaient pas été observés pour le GD-PAMAM-3. Une réorganisation progressive de la membrane au fur et à mesure de l'adsorption et de la pénétration des dendrimères peut être à l'origine de ce phénomène. Une agrégation des dendrimères au sein de la membrane pourrait également se produire. Dans le cas du PAMAM-3-FA, des échanges d'ions du dendrimère avec le tampon et la bicouche, pourrait aussi

entraîner des modifications de l'organisation de la membrane. Après 3h30 d'incubation, les GD-PAMAM-3 et PAMAM-3-FA ont un effet de renforcement de la barrière du SC alors que le GD-PPI-4 semble plutôt affaiblir celle-ci ; ceci pourrait donc expliquer son effet cytotoxique accru.

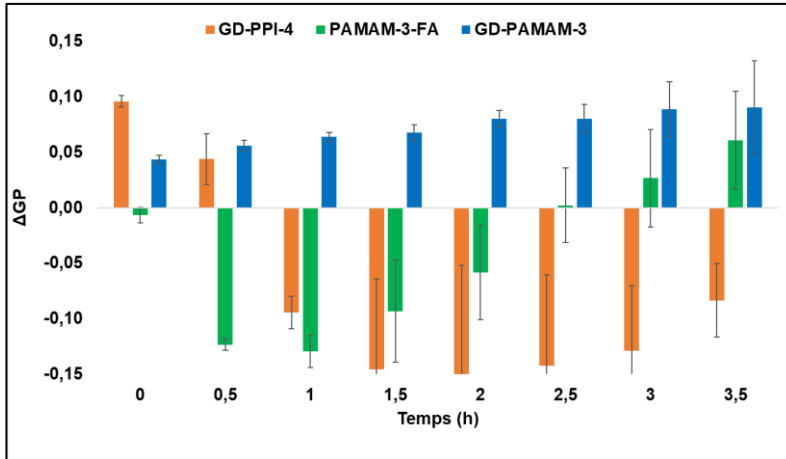


Figure 36 : Variation de la polarisation généralisée (ΔGP) du lauridan dans la bicouche biomimétique de SC après l'ajout de GD-PAMAM-3, GD-PPI-4 ou PAMAM-3-FA à un ratio molaire dendrimère : liposomes 1 : 2500 au cours du temps

2. Conclusion

L'interaction du GD-PPI-4 et du PAMAM-3-FA avec les modèles de monocouche lipidique et de liposome biomimétique de SC a été étudiée.

L'étude sur le modèle de monocouche lipidique a montré que le GD-PPI-4 et le PAMAM-3-FA sont capables d'interagir avec les lipides de la monocouche et de pénétrer le SC à pH5. L'attractivité des lipides envers GD-PPI-4 et PAMAM-3-FA est supérieure à celle du GD-PAMAM-3.

L'étude du modèle liposome a montré que les dendrimères étudiés n'ont aucun effet perméabilisant à des faibles ratios molaires dendrimère : liposomes alors qu'il est limité à des ratios plus élevés. Les GD-PAMAM-3 et PAMAM-3-FA ont un effet rigidifiant après 3h30 d'incubation ce qui suggère le renforcement de la barrière du SC, alors qu'avec le GD-PPI-4, un effet fluidifiant est constaté, affaiblissant la barrière du SC, ce qui peut expliquer son effet cytotoxique accru.

Pour conclure, tous ces résultats suggèrent que les GD-PAMAM-3 et PAMAM-3-FA sont les meilleurs candidats pour une application cosmétique.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Conclusions générales et perspectives

L'objectif principal de la thèse était double, l'un plus appliqué visant à évaluer le potentiel de dendrimères biosourcés comme supports d'actifs cosmétiques et l'autre plus fondamental, focalisé sur la compréhension de leur mécanisme d'action sur la peau.

D'un point de vue appliqué, la thèse s'est attachée à déterminer le pouvoir d'encapsulation de principes actifs cosmétiques et la cytotoxicité sur les cellules de peau de dendrimères déjà optimisés au sein du laboratoire, mais aussi à mettre au point de nouvelles structures de dendrimères présentant des activités antioxydantes, propriétés particulièrement recherchées en cosmétique.

* Quatre familles de dendrimères biosourcés ont été préparées selon une méthodologie développée précédemment au laboratoire. Les quatre premières générations de GlycéroDendrimère PolyPropylenImine (GD-PPI) et de GlycéroDendrimère AMidoAmine (GD-PAMAM) ont été obtenues avec de bons rendements par greffage du carbonate de glycérol sur les dendrimères de type PAMAM et PPI commerciaux. Les trois premières générations de GlyceroClickDendrimère (GCD) et de GlycerolADendrimère (GAD) ont été obtenues avec des rendements corrects par une méthode divergente en utilisant le glycérol comme composé de départ et en suivant plusieurs étapes de synthèses. Certains réactifs sont utilisés avec un large excès dans le but de favoriser un greffage complet des groupements périphériques.

- La cytotoxicité de ces quatre familles de dendrimères a été testée sur des fibroblastes dermiques humains. Les résultats ont montré que les dendrimères GCDs, GADs et GD-PAMAM-3 n'ont aucune cytotoxicité en dessous de 1 mg/mL, tandis que les GD-PPIs présentent un léger effet cytotoxique au-delà de 0,25 mg/mL.

- La capacité des dendrimères dérivés du glycérol à encapsuler un principe actif, principalement la vitamine C, dépend de la nature et de la taille des dendrimères. De meilleurs résultats ont été obtenus pour les générations les plus élevées possédant donc plus de cavités mais aussi pour les dendrimères ayant plus d'hétéroatomes qui favorisent les interactions. Ainsi, les meilleurs résultats d'encapsulation ont été obtenus avec le GD-PAMAM-3.

* Six nouvelles familles de dendrimères ioniques et trois générations pour chaque famille ont été préparées à partir des dendrimères commerciaux de type PPI et PAMAM et de trois acides phénoliques biosourcés (acide phlorétique, acide férulique et acide caféique) par un procédé acido-basique classique. Ces synthèses ont été optimisées sous activation de micro-ondes, puis transférées dans un microréacteur à flux continu, ce qui a permis d'obtenir des rendements quantitatifs avec des temps de réaction courts.

- Les dendrimères ioniques présentent des activités antioxydantes très intéressantes, voire supérieures à celles des agents antioxydants communément utilisés dans le domaine cosmétique. Leur pouvoir antioxydant dépend de leur nombre de groupements fonctionnels et de la nature des acides phénoliques utilisés. Les dendrimères de générations élevées possédant un nombre important de phénolates ont une activité plus importante. Les dendrimères dérivés d'acide caféique présentent une meilleure activité, par la présence de deux fonctions hydroxyles sur la structure de l'acide caféique. Ainsi, les meilleures activités antioxydantes sont observées avec les dérivés du PAMAM et de l'acide caféique ou férulique.

- Les résultats de cytotoxicité sur des fibroblastes dermiques ont montré que les dérivés de l'acide férulique sont moins toxiques. La cytotoxicité dépend fortement de la nature, du nombre et de la charge des groupements fonctionnels des dendrimères. La décoration des dendrimères commerciaux par des entités neutres dérivées du glycérol a permis d'augmenter la solubilité et de diminuer la toxicité. La décoration des dendrimères avec des acides phénoliques a également permis d'augmenter la solubilité des acides dans l'eau et le pouvoir antioxydant au détriment de la cytotoxicité accrue en présence de charges positives à la surface et de noyaux aromatiques. Ce sont les dendrimères dérivés d'acide férulique qui sont le moins toxiques pour des concentrations qui ne dépassent pas 100 µg/mL.

Ainsi, les PAMAM-3-FA et PPI-3-FA à 100 µg/mL peuvent être sélectionnés comme agents d'encapsulation et antioxydants d'ingrédients actifs en cosmétique. En encapsulant les composés actifs à pH neutre, pour ne pas déstabiliser les liaisons ioniques, ces dendrimères peuvent empêcher leur dégradation et le caractère ionique des dendrimères peut améliorer leur solubilité dans les solvants compatibles pour la

cosmétique. Leur pouvoir antioxydant les stabilise et peut renforcer leur effet protecteur vis-à-vis des composés actifs encapsulés.

* Deux autres familles de dendrimères neutres – comportant des fonctions amides – ont été obtenues par réaction de couplage de PPI avec les acides phlorétique et férulique. Néanmoins, des difficultés de purification n’ont pas permis d’obtenir ces composés de façon pure et isolée. Les acides phlorétique et férulique sont utilisés en large excès dans l’objectif de favoriser un greffage complet des fonctions amines terminales.

Au vu de l’intérêt des dendrimères démontré dans ce volet pour une application cosmétique, de nombreuses études pourraient s’ensuivre.

- *L’étude de la taille des cavités et de quelques propriétés des dendrimères telles que l’hydrophobicité pourraient être envisagées afin d’identifier la nature et la taille des molécules qui pourrait être encapsulées au mieux dans ces dendrimères. En effet, des études de modélisation moléculaire ont été déjà amorcées au sein du laboratoire, une poursuite de cette étude est à envisager.*
- *Les encapsulations dans le dendrimère GD-PAMAM-3 pourraient être étendues à d’autres molécules à caractère hydrophobe telles que le resvératrol ou la curcumine pour des applications cosmétiques ou pharmaceutiques. En effet, ces molécules possèdent de nombreuses propriétés biologiques. Elles sont connues notamment pour leurs effets antioxydant, anti-inflammatoire et anti-cancéreux. Cependant, leur hydrophobicité diminue leur biodisponibilité. Cette dernière pourrait être améliorée en augmentant leur solubilité dans des solvants compatibles à leur application par le biais de GD-PAMAM-3 par exemple.*
- *Lors d’une encapsulation, une ou plusieurs interactions (électrostatiques, Van Der Waals, liaisons hydrogène) peuvent exister entre les molécules actives et les dendrimères. La rupture de ces interactions pour favoriser le relargage de la molécule active dépend de plusieurs facteurs comme le pH, la température et la composition du milieu. La caractérisation de la cinétique de relargage est donc à envisager pour déterminer les facteurs influençant le relargage en utilisant des techniques analytiques adaptées pour quantifier la molécule active telles que la RMN, la spectrophotométrie, l’HPLC ou la GC.*

- *Des tests d'encapsulation et de relargage d'autres actifs cosmétiques telles que la caféine et les huiles essentielles pourraient être envisagés avec les dendrimères ioniques. En effet, l'intérêt de l'encapsulation des huiles essentielles par les dendrimères dérivés du glycérol a été récemment démontré au laboratoire, il serait donc intéressant d'étendre ces encapsulations aux dendrimères ioniques.*
- *L'activité antioxydante des dendrimères doit être évaluée en utilisant d'autres méthodes pour confirmer les résultats obtenus par la méthode de DPPH et le transposer à un système biologique.*
- *D'autres familles de dendrimères ioniques pourraient aussi être préparées avec d'autres acides phénoliques dérivés d'acide cinnamique connus pour leur effet antioxydant tout comme les acides férulique et caféique. Ces dendrimères peuvent être utilisés comme agents antibactériens ou antifongiques dans le domaine de la cosmétique mais aussi dans d'autres domaines comme la pharmacie [355]. Leur caractère ionique et leur légère cytotoxicité pourraient augmenter leurs propriétés antifongique et/ou antibactérienne [356,357].*
- *Les dendrimères ioniques pourraient également être préparés avec de l'acide thioglycolique (actif dans les crèmes dépilatoires) pour une application en cosmétique, ce qui pourrait protéger cet acide de la dégradation et diminuer sa forte odeur.*
- *Les conditions réactionnelles des dendrimères dérivés de PPI comportant des fonctions amides restent à être optimisées (activation par les micro-ondes, sans agent de couplage, purification) pour augmenter les rendements obtenus et étendre cette méthodologie de synthèse aux PAMAMs.*

D'un point de vue fondamental, cette thèse s'est attachée à mieux comprendre le mécanisme d'action des dendrimères sur la peau et l'effet de leur structure sur celui-ci.

* L'interaction des dendrimères avec le SC a été étudiée en utilisant deux types de modèles biomimétiques de SC : les monocouches lipidiques et les liposomes.

- L'étude sur le modèle de monocouche lipidique a permis de déterminer la cinétique d'adsorption des dendrimères et leur pouvoir de pénétration dans le SC ainsi que l'attractivité des lipides du SC vis-à-vis des dendrimères.

Le GD-PAMAM-3, qui est le meilleur candidat pour encapsuler la vitamine C et le moins cytotoxique envers les fibroblastes dermiques, est capable d'interagir, seul ou avec de la vitamine C encapsulée, avec les lipides du SC quel que soit le pH (5,0 - 6,0 et 7,4). Cependant, seul le pH de 5,0, proche de celui la peau, serait favorable à la libération de la vitamine C dans la matrice du SC.

Les dendrimères GD-PPI-4 et PAMAM-3-FA sont capables d'interagir avec les lipides du SC à pH5 tout comme le GD-PAMAM-3. Cependant l'attractivité des lipides envers ces dendrimères est supérieure à celle du GD-PAMAM-3, ce qui pourrait expliquer leur effet cytotoxique.

- L'étude sur les liposomes biomimétiques du SC a montré que le GD-PAMAM-3, seul ou avec la vitamine C encapsulée, n'a aucun effet sur la perméabilité de la membrane pour des faibles concentrations de GD-PAMAM-3 et un effet de perméabilisation limité à des concentrations plus élevées, ce qui est cohérent avec l'absence de cytotoxicité. Le faible effet de perméabilité observé peut s'expliquer par un phénomène d'agrégation des liposomes. L'interaction du GD-PAMAM-3 avec les liposomes augmente la rigidité de leur bicouche. Cela suggère que le dendrimère renforce la propriété de barrière du SC et cet effet est accéléré en présence de vitamine C encapsulée.

Les dendrimères GD-PPI-4 et PAMAM-3-FA n'ont également aucun effet perméabilisant à des faibles ratios molaires dendrimère : liposomes alors qu'il est limité à des ratios plus élevés, comme observé pour le GD-PAMAM-3. En outre, l'interaction du PAMAM-3-FA avec les liposomes après 3h30 du contact, augmente la rigidité de la membrane ce qui suggère le renforcement de la barrière du SC, alors qu'avec le GD-PPI-4 un effet fluidifiant est constaté, affaiblissant la barrière du SC.

Les modèles biomimétiques du SC ont été utiles pour obtenir des informations sur le mécanisme d'interaction des dendrimères avec la couche externe de la peau et étudier l'influence de facteurs externes comme le pH sur ce mécanisme. Au-delà de cette thèse, ces systèmes pourraient aussi être exploités pour tester d'autres produits cosmétiques en s'affranchissant d'essais sur animaux ou sur humains et donc éviter les problèmes d'éthique. Les liposomes mis au point dans le cadre de cette thèse, présentant un compartiment aqueux interne à pH 7,4 et un environnement aqueux externe à pH 5.0, semblent particulièrement bien adaptés à cette application du fait de leur stabilité sur plusieurs jours.

Pour faire suite aux résultats démontrés dans le volet fondamental, d'autres études pourraient être envisagées.

- *Outre l'effet du pH sur les interactions dendrimères-modèles de peau, l'effet de la température pourrait aussi être étudié.*
- *Il serait intéressant d'étudier l'effet des dendrimères sur l'organisation et la structure des lipides du SC à l'aide de différentes techniques telles que la differential scanning calorimetry (DSC), l'imagerie de fluorescence avec des sondes qui marquent spécifiquement les domaines ordonnés ou désordonnés de la membrane comme par exemple la NBD-DPPE (N-7-nitro-2-1-3-benzoxadiazol-4-yl-dipalmitoylphosphatidyléthanolamine) et la TR-DPPE (Texas-red dipalmitoylphosphatidyl-éthanolamine) respectivement, la microscopie à force atomique (AFM) ou encore la cryo-TEM comme amorcé lors de cette thèse pour visualiser l'effet du GD-PAMAM-3 sur la morphologie des liposomes biomimétiques de SC.*
- *D'autres études permettant de déterminer où se localisent les dendrimères au niveau de la peau et de contrôler la libération et la diffusion des principes actifs délivrés par les dendrimères pourraient être envisagées notamment à l'aide du dispositif de Franz ou la fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) par exemple, en utilisant soit la peau des animaux, soit des membranes synthétiques qui miment la peau ou encore des multicouches lamellaires de lipides représentatifs de la peau.*

En conclusion finale, cette thèse a, non seulement, permis des avancées, dans le domaine d'application des dendrimères en cosmétiques en proposant des nouvelles structures de dendrimères non cytotoxiques et adaptées à l'encapsulation de principes actifs délicats, mais aussi sur le plan fondamental, dans la compréhension du mécanisme d'action de ces dendrimères au niveau de la peau.

VALORISATIONS SCIENTIFIQUES

Valorisations scientifiques

Publications :

-**Bacha, K.**; Chemotti, C.; Monboisse, J.C.; Robert, A.; Furlan, A.; Smeralda, W.; Damblon, C.; Estager, J.; Brassart-Pasco, S.; Mbakidi, J-P.; Prsic, J.; Bouquillon, S.; Deleu, M. Encapsulation of vitamin C by glycerol-derived dendrimers, their interaction with biomimetic skin membrane and their cytotoxicity. *Molecules* 2022, 27, 8022.

-**Bacha, K.**; Estager, J.; Brassart-Pasco, S.; Chemotti, C.; Fernandes, A.E.; Mbakidi, J.-P.; Deleu, M.; Bouquillon, S. Antioxidant-Functionalized PAMAMs and PPIs Dendrimers. *Polymers* 2022, 14, 3513.

-**Bacha, K.**; Aguiabi, K.; Mbakidi, J-P.; Bouquillon, S. Beneficial Contribution of Biosourced Ionic Liquids and Microwaves in the Michael Reaction. *Catalysts* 2020, 10, 814.

- Fahri, F.; **Bacha, K.**; Chiki, F.F.; Mbakidi, J-P.; Panda, S.; Bouquillon, S.; Fourmentin, S. Air pollution: new bio-based ionic liquids absorb both hydrophobic and hydrophilic volatile organic compounds with high efficiency. *Environmental Chemistry Letters* 2020, 18, 1403.

Communications orales :

Congrès et Webinaire :

- ✓ **Bacha, K.** ; Robert, A. ; Mbakidi, J-P. ; Deleu, M . ; Bouquillon, S. New Bio-Based Dendrimers For Encapsulation Of Cosmetic Agents -Congrès ISGC; du 16 au 20 mai 2022- La Rochelle.
- ✓ **Bacha, K.** ; Robert, A. ; Mbakidi, J-P. ; Deleu, M . ; Bouquillon, S. Apport des dendrimères Biosourcés dans le domaine de la cosmétique. Congrès "Les journées Jeunes Chercheures Condorcet.J2C2", les 14 et 15 janvier 2021 à Reims (Visio).
- ✓ **Bacha, K.** ; Robert, A. ; Mbakidi, J-P. ; Deleu, M . ; Bouquillon, S. Apport des dendrimères biosourcés dans le domaine de la cosmétique. Webinaire

RJ'21 Réseau des jeunes chimistes- société chimique de France RJ-SCF, le 01 juillet 2021 (visio).

Communications et activités à destination du grand et jeune public :

- ✓ **Katia Bacha.** Apport des dendrimères Biosourcés dans le domaine de la cosmétique. La finale territoriale du concours ma thèse en 180 seconds « MT180 », 22 mars 2022-Reims.
- ✓ **Katia Bacha, Magali Deleu, Sandrine Bouquillon.** Et si on parlait innovation « verte » en cosmétique? Conférence Eurêka, 20 janvier 2022 - Médiathèque J. Falala REIMS.
- ✓ **Katia Bacha, Magali Deleu, Sandrine Bouquillon.** Des molécules cargo biosourcées pour diffuser des principes actifs. Conférence Olympiades de la Chimie, 10 novembre 2021 - Centre de Troyes.
- ✓ **Katia Bacha, Magali Deleu, Sandrine Bouquillon** Cargos for green cosmetics. Rencontres lycéens-chercheurs, le 11 mars 2021 à Reims
- ✓ Des recherches en cosmétique pour INTICOSM. Interview, le 30 octobre 2020 à ULiège Gembloux. (Article publié sur le site ULiège : https://www.gembloux.uliege.be/cms/c_6308960/fr/katia-bacha-des-recherches-en-cosmetique-pour-inticosm)
- ✓ Capsule Vidéo - Projet INTICOSM, le 22 août 2022- Université de Lille. (Lien de la vidéo <https://we.tl/t-nWddO1aCBw>).
- ✓ Du colza au cosmétique. Création d'un cartel pour le projet IntiCosm et animation des ateliers scientifiques pour le jeune public. Accustica, janvier-mars 2020, Reims.

Séminaires scientifiques :

- ✓ **Katia Bacha, Magali Deleu, Sandrine Bouquillon.** Apport des dendrimères Biosourcés dans le domaine de la cosmétique. Séminaire, 07 mars 2022 à CERTECH- Seneffe- Belgique.

- ✓ **Katia Bacha**, Magali Deleu, Sandrine Bouquillon. Dendrimers and biomass: Synthesis, Catalysis and Encapsulation. Séminaire de Master CMI, le 01 décembre 2020 à Reims
- ✓ **Katia Bacha**, Magali Deleu, Sandrine Bouquillon. Préparation et caractérisation de cargos verts. Avancement du projet Interreg Copil/COMAC, 31 mars 2021, 13 décembre 2021 et le 28 avril 2022, (Visio).
- ✓ **Katia Bacha**, Magali Deleu, Sandrine Bouquillon. Contribution of Biobased Dendrimers in the field of Cosmetics. Séminaire Chimie de coordination, le 22 mars 2021, ICMR- Reims.
- ✓ **Katia Bacha**, Magali Deleu, Sandrine Bouquillon. Apport des dendrimères biosourcés dans le domaine de la cosmétique. Séminaire ICMR, le 13 décembre 2019, Reims.

Formations doctorales :

202 /160 heures de formation validées par l'ED ABIES, équivalents de 84 crédits validés par le collège de ULiège.

REFERENCES

Références

1. Balieu, S.; Zein, A. el; de Sousa, R.; Jérôme, F.; Tatibouët, A.; Gatard, S.; Pouilloux, Y.; Barrault, J.; Rollin, P.; Bouquillon, S. One-Step Surface Decoration of Poly(Propyleneimines) (PPIs) with the Glyceryl Moiety: New Way for Recycling Homogeneous Dendrimer-Based Catalysts. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 1826–1833.
2. Menot, B.; Salmon, L.; Bouquillon, S. Platinum Nanoparticles Stabilized by Glycerodendrimers: Synthesis and Application to the Hydrogenation of α,β -Unsaturated Ketones under Mild Conditions. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, *2015*, 4518–4523.
3. Balieu, S.; Cadiou, C.; Martinez, A.; Nuzillard, J.M.; Oudart, J.B.; Maquart, F.X.; Chuburu, F.; Bouquillon, S. Encapsulation of Contrast Imaging Agents by Polypropyleneimine-Based Dendrimers. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2013**, *101*, 613–621.
4. Menot, B.; Stopinski, J.; Martinez, A.; Oudart, J.B.; Maquart, F.X.; Bouquillon, S. Synthesis of Surface-Modified PAMAMs and PPIs for Encapsulation Purposes: Influence of the Decoration on Their Sizes and Toxicity. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 3439–3446.
5. Maes, C. d.; Brostaux, Y.; Bouquillon, S.; Fauconnier, M.L. Use of New Glycerol-Based Dendrimers for Essential Oils Encapsulation: Optimization of Stirring Time and Rate Using a Plackett-Burman Design and a Surface. *Foods* **2021**, *10*, 207–221.
6. Maes, C.; Menot, B.; Hayouni, S.; Martinez, A.; Fauconnier, M.L.; Bouquillon, S. Preparation of New Glycerol-Based Dendrimers and Studies on Their Behavior toward Essential Oil Encapsulation. *ACS. Omega* **2022**, *7*, 10277–10291.
7. Kumari, A.; Yadav, S.K.; Yadav, S.C. Biodegradable Polymeric Nanoparticles Based Drug Delivery Systems. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2010**, *75*, 1–18.
8. Hodge, P. Polymer Science Branches Out. *Am. Nat.* **1993**, *362*, 18–19.
9. Tomalia, D.A.; B.H.; H.M.; Dewald, J.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Smith, P. Dendritic Macromolecules: Synthesis of Starburst Dendrimers. *Macromolecules* **1986**, *19*, 2466–2468.
10. Tomalia, D.A. The Dendritic State. *Mater. Today* **2005**, *8*, 34–46.
11. Newkome, G.R.; Yao, Z.-Q.; Baker, G.R.; Gupta, V.K. Cascade Molecules: A New Approach to Micelles. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2003–2004.

12. Abbasi, E.; Aval, S.F.; Akbarzadeh, A.; Milani, M.; Nasrabadi, H.T.; Joo, S.W.; Hanifehpour, Y.; Nejati-Koshki, K.; Pashaei-Asl, R. Dendrimers: Synthesis, Applications, and Properties. *Nanoscale Res. Lett.* **2014**, *9*, 1–10.
13. Klajnert, B.; Bryszewska, M. Dendrimers: Properties and Applications. *Acta Biochem.* **2001**, *48*, 199–208.
14. Srinivasa-Gopalan, S.; Kevin, J.Y.; Kumar, C.S.S.R. (Challa S.S.R.) Dendrimers in Cancer Treatment and Diagnosis. In *Nanotechnologies for the Life Sciences*; Wiley-VCH: New York, 2007; p. 1-43 ISBN 9783527313877.
15. Suganya, V.; Anuradha, V. Microencapsulation and Nanoencapsulation: A Review. In *J. Pharm. Clinical. Res.* **2017**, *9*, 233–239.
16. Tournilhac, F.; Simon, P. Cosmetic or Dermatological Topical Compositions Comprising dendritic Polyesters U.S. Patent 6,287,552 B1, 11 Sep. 2001.
17. Boisselier, E.; Liang, L.; Dalko-Csiba, M.; Ruiz, J.; Astruc, D. Interactions and Encapsulation of Vitamins C, B3, and B 6 with Dendrimers in Water. *Chem. A. Eur. J.* **2010**, *16*, 6056–6068.
18. Wolf, B.A.; Snyder, F. Cosmetic Compositions Having Keratolytic And Anti-Acne Activity. U.S Patent 5,449,519, 12 Sept.2001.
19. Allard, D.; Forestier, S. Compositions Cosmétiques Autobronzantes. E Patent 0868906A1, 7 Oct. 1998.
20. Astruc, D.; Ruiz, J.; Boisselier, E. Encapsulation de La Vitamine C Dans Des Dendrimères Solubles Dans l'eau. PCT. WO 2009/112682A1, 17 Sep.2009.
21. Wertz, P.W.; van den Bergh, B. The Physical, Chemical and Functional Properties of Lipids in the Skin and Other Biological Barriers. *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *2*, 85–96.
22. Christophers, E.; Kligman, A. M. Visualization of the Cell Layers of the Stratum Corneum. *J. Invest. Dermatol.* **1964**, *42*, 407–409.
23. Wertz, P.W.; Abraham, W.; Landmann, L.; Downing, D.T. Preparation of Liposomes from Stratum Corneum Lipids. *Soc. Invest. Dermatol. Inc.* **1986**, *87*, 582–584.
24. Les Dendrimères: Des Nanomolécules Pour Le Transport de Médicaments. Available Online: <https://www.cinam.univ-mrs.fr/cinam/Evenements/Science-Pour-Tous/Les-Dendrimères-Des-Nano-Molécules-Pour-Le-Transport-de-Médicaments>. Accessed on 25 Nov. 2022.
25. Buhleier, E.; Wehner, W.; Vögtle, F. Cascade-and Nonskid-Chain-like Syntheses of Molecular Cavity Topologies. *Synthesis* **1978**, *02*, 155–158.

26. 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 Macromolecules. *Polym. J.* **1985**, *17*, 117–132.
27. Cheng, Y.; Shao; Zhang; Hu; Zhang; Zhang Comparison of Generation 3 Polyamidoamine Dendrimer and Generation 4 Polypropylenimine Dendrimer on Drug Loading, Complex Structure, Release Behavior, and Cytotoxicity. *Int. J. Nanomedicine* **2011**, *6*, 3361–3372.
28. 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*, 7638–7647.
29. Menot, B. Dendrimères Dérivés Du Glycérol : Synthèses et Applications. Thèse, Université de Reims Champagne Ardenne: France, 2015.
30. Brabander-van den Berg, E.M.M.; Meijer, E.W. Poly(Propylene Imine) Dendrimers: Large-Scale Synthesis by Heterogeneously Catalyzed Hydrogenation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *32*, 1308–1311.
31. Worner, C.; Mülhaupt, R. Polynitrile-and Polyamine-Functional Poly(Trimethylene Imine) Dendrimers". *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *32*, 1306–1308.
32. Tomalia, D.A.; Naylor, A.M.; Goddard, W.A. Starburst Dendrimers: Molecular-Level Control of Size, Shape, Surface Chemistry, Topology, and Flexibility from Atoms Macroscopic Matter. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, *29*, 138–175.
33. Zhuo, R.X.; Du, B.; Lu, Z.R. In Vitro Release of 5-Fluorouracil with Cyclic Core Dendritic Polymer. *J. Control. Reles.* **1999**, *57*, 249–257.
34. Lee, J.W.; Kim, J.H.; Kim, B.K.; Kim, J.H.; Shin, W.S.; Jin, S.H. Convergent Synthesis of PAMAM Dendrimers Using Click Chemistry of Azide-Functionalized PAMAM Dendrons. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 9193–9200.
35. Boas, U.; Christensen, J.B.; Heegaard, P.M.H. Dendrimers: Design, Synthesis and Chemical Properties. *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 3785–3798.
36. Gupta, U.; Gupt, U.; Agashe, H.B.; Jain, N.K. Polypropylene Imine Dendrimer Mediated Solubility Enhancement: Effect of PH and Functional Groups of Hydrophobes. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2007**, *10*, 358–367.
37. Gupta, U.; Dwivedi, S.K.D.; Bid, H.K.; Konwar, R.; Jain, N. Ligand Anchored Dendrimers Based Nanoconstructs for Effective Targeting to Cancer Cells. *Int. J. Pharm.* **2010**, *393*, 185–196.

38. Kaur, D.; Jain, K.; Mehra, N.K.; Kesharwani, P.; Jain, N.K. A Review on Comparative Study of PPI and PAMAM Dendrimers. *J. Nanopart. Res.* **2016**, *18*, 164–159.
39. Jevprasesphant, R.; Penny, J.; Jalal, R.; Attwood, D.; Mckeown, N.B.; D’emanuele, A. The Influence of Surface Modification on the Cytotoxicity of PAMAM Dendrimers. *Int. J. Pharm.* **2003**, *252*, 263–266.
40. Stasko, N.A.; Johnson, C.B.; Schoenfisch, M.H.; Johnson, T.A.; Holmuhamedov, E.L. Cytotoxicity of Polypropylenimine Dendrimer Conjugates on Cultured Endothelial Cells. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3853–3859.
41. Tack, F.; Bakker, A.; Maes, S.; Dekeyser, N.; Bruining, M.; Elissen-Roman, C.; Janicot, M.; Brewster, M.; Janssen, H.M.; de Waal, B.F.M.; et al. Modified Poly(Propylene Imine) Dendrimers as Effective Transfection Agents for Catalytic DNA Enzymes (DNAzymes). *J. Drug. Target.* **2006**, *14*, 69–86.
42. Kojima, C.; Toi, Y.; Harada, A.; Kono, K. Preparation of Poly (Ethylene Glycol)-Attached Dendrimers Encapsulating Photosensitizers for Application to Photodynamic Therapy. *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18*, 663–670.
43. Gajbhiye, V.; Kumar, P.V.; Kumar Tekade, R. Novel PEGylated Nanoparticulate Architectures for Sustained Delivery of H2 Receptor Antagonist. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 1155–1166.
44. Choi, Y.; Thomas, T.; Kotlyar, A.; Islam, M.T.; Baker, J.R. Synthesis and Functional Evaluation of DNA-Assembled Polyamidoamine Dendrimer Clusters for Cancer Cell-Specific Targeting. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 35–43.
45. Luan, L.; Tang, B.; Liu, Y.; Xu, W.; Liu, Y.; Wang, A.; Niu, Y. Direct Synthesis of Sulfur-Decorating PAMAM Dendrimer/Mesoporous Silica for Enhanced Hg(II) and Cd(II) Adsorption. *Langmuir* **2022**, *38*, 698–710.
46. Mekuria, S.L.; Song, C.; Ouyang, Z.; Shen, M.; Janaszewska, A.; Klajnert-Maculewicz, B.; Shi, X. Synthesis and Shaping of Core-Shell Tecto Dendrimers for Biomedical Applications. *Bioconjug. Chem.* **2021**, *32*, 225–233.
47. Uppuluri, S.; Swanson, D.R.; Piehler, L.T.; Li, J.; Hagnauer, G.L.; Tomalia, D.A. Core-Shell Tecto(Dendrimers): I. Synthesis and Characterization of Saturated Shell Models. *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 796–800.
48. Song, C.; Ouyang, Z.; Guo, H.; Qu, J.; Gao, Y.; Xia, J.; Shen, M.; Shi, X. Core-Shell Tecto Dendrimers Enable Enhanced Tumor MR Imaging through an Amplified EPR Effect. *Biomacromolecules* **2021**, *22*, 2181–2188.

49. Song, C.; Wang, D.-Y.; Shen, M.; Shi, X. Design and Biomedical Applications of Core-Shell Tecto Dendrimers. *J. Basic. Clin. Med.* **2022**, *42*, 15–25.
50. Bouquillon, S.; Hayouni, S.; Menot, B. Dendrimer-Type Compounds, Methods for Producing Same and Uses Thereof. PCT. Patent WO 2020/021032A1, 30 Jan. 2020.
51. Bouquillon, S.; Hayouni, S.; Menot, B. Composes de Type Dendrimère, Leurs Procèdes de Préparation et Leurs Utilisations. E. Patent WO 2020/021034A1, 30 Jan. 2020.
52. De La Mata, F.J.; Gómez Ramírez, R.; Ortega Ló-Pez, P.; Mencía Berlinches, G.; Maroto Díaz, M.; Natalia, S.D.O. Carbosilane Dendrimers Comprising Polyphenol Groups, And Uses Thereof. PCT. Patent WO 2017/220831A1, 28 Dec. 2017.
53. Nnadiékwe, C.C.; Nada, A.; Abdulazeez, I.; Imam, M.R.; Janjua, M.R.S.A.; Al-Saadi, A.A. UV-Absorbing Benzamide-Based Dendrimer Precursors: Synthesis, Theoretical Calculation, and Spectroscopic Characterization. *New J. Chem.* **2022**, *46*, 75–85.
54. Sadler, K.; Tam, J.P. Peptide Dendrimers: Applications and Synthesis. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90*, 195–229.
55. Niederhafner, P.; Šebestík, J.; Ježek, J. Peptide Dendrimers. *J. Pept. Sci.* **2005**, *11*, 757–788.
56. Xie, F.; Li, R.; Shu, W.; Zhao, L.; Wan, J. Self-Assembly of Peptide Dendrimers and Their Bio-Applications in Theranostics. *Mater. Today Bio* **2022**, *14*, 100239–100247.
57. Sapra, R.; Verma, R.P.; Maurya, G.P.; Dhawan, S.; Babu, J.; Haridas, V. Designer Peptide and Protein Dendrimers: A Cross-Sectional Analysis. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 11391–11441.
58. Cheng, Y.; Zhao, L.; Li, Y.; Xu, T. Design of Biocompatible Dendrimers for Cancer Diagnosis and Therapy: Current Status and Future Perspectives. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2673–2703.
59. Irfan, M.; Seiler, M. Encapsulation Using Hyperbranched Polymers: From Research and Technologies to Emerging Applications. In Proceedings of the Industrial and Engineering Chemistry Research; February 3, 2010; Vol. 49, pp. 1169–1196.
60. Márquez-Miranda, V.; Araya-Durán, I.; Camarada, M.B.; Comer, J.; Valencia-Gallegos, J.A.; González-Nilo, F.D. Self-Assembly of Amphiphilic

- Dendrimers: The Role of Generation and Alkyl Chain Length in SiRNA Interaction. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–15.
61. Lin, Q.; Jiang, G.; Tong, K. Dendrimers in Drug-Delivery Applications. *Des. Monomers Polym.* **2010**, *13*, 301–324.
 62. Yousefi, M.; Narmani, A.; Jafari, S.M. Dendrimers as Efficient Nanocarriers for the Protection and Delivery of Bioactive Phytochemicals. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2020**, *278*, 102125–102137.
 63. Tomalia, D.A.; Nixon, L.S.; Hedstrand, D.M. The Role of Branch Cell Symmetry and Other Critical Nanoscale Design Parameters in the Determination of Dendrimer Encapsulation Properties. *Biomolocule* **2020**, *10*, 642–699.
 64. Moseley, M.E.; Chew, W.M.; White, D.L.; Kucharczyk, J.; Litt, L.; Derugin, N.; Dupon, J.; Brasch, R.C.; Norman, D. Hypercarbia-Induced Changes in Cerebral Blood Volume in the Cat: A ¹H MRI and Intravascular Contrast Agent Study. *Magn. Reason. Med.* **1992**, *23*, 21–30.
 65. Wiener, E.C.; Auteri, F.P.; Chen, J.W.; Brechbiel, M.W.; Gansow, O.A.; Schneider, D.S.; Belford, R.L.; Clarkson, R.B.; Lauterbur, P.C. Molecular Dynamics of Ion-Chelate Complexes Attached to Dendrimers. *Am. Chem. Soc. J.* **1996**, *118*, 7774–7782.
 66. Bryant, L.H.; Brechbiel, M.W.; Wu, C.; Bulte, J.W.M.; Herynek, V.; Frank, J.A. Synthesis and Relaxometry of High-Generation (G 5, 7, 9, and 10) PAMAM Dendrimer-DOTA-Gadolinium Chelates. *J. Magn. Reason. Imag.* **1999**, *9*, 348–352.
 67. Anwaier, G.; Chen, C.; Cao, Y.; Qi, R. A Review of Molecular Imaging of Atherosclerosis and the Potential Application of Dendrimer in Imaging of Plaque. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *12*, 7681–7693.
 68. Trzypiński, P.; Klajnert-Maculewicz, B. Dendrimers for Fluorescence-Based Bioimaging. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **2017**, *92*, 1157–1166.
 69. Deng, J.; Xu, J.; Ouyang, M.; Zou, Z.; Lei, Y.; Li, J.; Qing, Z.; Yang, R. Target-Triggered Hairpin-Free Chain-Branching Growth of DNA Dendrimers for Contrast-Enhanced Imaging in Living Cells by Avoiding Signal Dispersion. *Chinese Chem. Let* **2022**, *33*, 773–777.
 70. Hudde, T.; Rayner, S.A.; Comer, R.M.; Weber, M.; Isaacs, J.D.; Waldmann, H.; Larkin, D.F.P.; George, A.J.T. Activated Polyamidoamine Dendrimers, a Non-Viral Vector for Gene Transfer to the Corneal Endothelium. *Gene Ther.* **1999**, *6*, 939–943.

71. Ward, M.A.; Georgiou, T.K. Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications. *Polymers* **2011**, *3*, 1215–1242.
72. Lajiness, M.S.; Vieth, M.; Erickson, J. Molecular Properties That Influence Oral Drug-like Behavior. *Curr. opin. drug. disco. dev.* **2004**, *7*, 470–477.
73. Singh, V.; Sahebkar, A.; Kesharwani, P. Poly (Propylene Imine) Dendrimer as an Emerging Polymeric Nanocarrier for Anticancer Drug and Gene Delivery. *Eur. Polym. J.* **2021**, *158*, 110683–110697.
74. Mollazade, M.; Nejati-Koshki, K.; Akbarzadeh, A.; Zarghami, N.; Nasiri, M.; Jahanban-Esfahlan, R.; Alibakhshi, A. PAMAM Dendrimers Augment Inhibitory Effects of Curcumin on Cancer Cell Proliferation: Possible Inhibition of Telomerase. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2013**, *14*, 6925–6928.
75. Fatima, M.; Sheikh, A.; Hasan, N.; Sahebkar, A.; Riadi, Y.; Kesharwani, P. Folic Acid Conjugated Poly(Amidoamine) Dendrimer as a Smart Nanocarriers for Tracing, Imaging, and Treating Cancers over-Expressing Folate Receptors. *Eur. Polym. J.* **2022**, *170*, 111156–111170.
76. Kojima, C.; Kono, K.; Maruyama, K.; Takagishi, T. Synthesis of Polyamidoamine Dendrimers Having Poly(Ethylene Glycol) Grafts and Their Ability to Encapsulate Anticancer Drugs. *Bioconjug. Chem.* **2000**, *11*, 910–917.
77. Wang, Y.; Gong, N.; Ma, C.; Zhang, Y.; Tan, H.; Qing, G.; Zhang, J.; Wang, Y.; Wang, J.; Chen, S.; et al. An Amphiphilic Dendrimer as a Light-Activable Immunological Adjuvant for in Situ Cancer Vaccination. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 4964–4979.
78. Vandamme, T.F.; Brobeck, L. Poly(Amidoamine) Dendrimers as Ophthalmic Vehicles for Ocular Delivery of Pilocarpine Nitrate and Tropicamide. *J. Control. Release* **2005**, *102*, 23–38.
79. Namazi, H.; Adeli, M. Dendrimers of Citric Acid and Poly (Ethylene Glycol) as the New Drug-Delivery Agents. *Biomaterials* **2005**, *26*, 1175–1183.
80. Namazi, H.; Heydari, A. Synthesis of β -Cyclodextrin-Based Dendrimer as a Novel Encapsulation Agent. *Polym. Int.* **2013**, *63*, 1447–1455.
81. Liu, M.; Kono, K.; J Fréchet, J.M. Water-Soluble Dendrimer-Poly(Ethylene Glycol) Starlike Conjugates as Potential Drug Carriers. *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* **1999**, *37*, 3492–3503.

82. Gatard, S.; Salmon, L.; Deraedt, C.; Ruiz, J.; Astruc, D.; Bouquillon, S. Palladium Nanoparticles Stabilized by Glycodendrimers and Their Application in Catalysis. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, 4369–4375.
83. Niu, Y.; Crooks, R.M. Dendrimer-Encapsulated Metal Nanoparticles and Their Applications to Catalysis. *Comptes Rendus Chimie* **2003**, *6*, 1049–1059.
84. Karakhanov, E.; Maximov, A.; Zolotukhina, A. Heterogeneous Dendrimer-Based Catalysts. *Polymers (Basel)* **2022**, *14*, 891–1079.
85. Ou, G.; Xu, L.; He, B.; Yuan, Y. Enhanced Stability of Charged Dendrimer-Encapsulated Pd Nanoparticles in Ionic Liquids. *Chem. Comm.* **2008**, 4210–4212.
86. Wang, W.; Ornelas, C.; Diallo, A.K.; Deraedt, C.; Wang, Y.; Lu, F.; Gu, H.; Astruc, D. Ferrocene-Based Dendritic Macromolecules as Efficient Supports in Nanocatalysis. *Polymer* **2022**, *246*, 124714–124722.
87. Niakan, M.; Masteri-Farahani, M. Pd–Ni Bimetallic Catalyst Supported on Dendrimer-Functionalized Magnetic Graphene Oxide for Efficient Catalytic Suzuki-Miyaura Coupling Reaction. *Tetrahedron* **2022**, *108*, 132655–132665.
88. Niakan, M.; Masteri-Farahani, M.; Karimi, S.; Shekaari, H. Sulfonic Acid Functionalized Dendrimer-Grafted Cellulose as a Solid Acid Catalyst for the High-Yield and Green Production of 5-Hydroxymethylfurfural. *Sustain. Energy Fuels* **2022**, *6*, 2514–2522.
89. Tiwari, D.K.; Behari, J.; Sen, P. Application of Nanoparticles in Waste Water Treatment. *World Appl. Sci. J* **2008**, *3*, 417–433.
90. Diallo, M.S.; Christie, S.; Swaminathan, P.; Johnson, J.H.; Goddard, W.A. Dendrimer Enhanced Ultrafiltration. 1. Recovery of Cu(II) from Aqueous Solutions Using PAMAM Dendrimers with Ethylene Diamine Core and Terminal NH₂ Groups. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 1366–1377.
91. Xu, Y.; Zhao, D. Removal of Copper from Contaminated Soil by Use of Poly(Amidoamine) Dendrimers. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 2369–2375.
92. Viltres, H.; López, Y.C.; Leyva, C.; Gupta, N.K.; Naranjo, A.G.; Acevedo-Peña, P.; Sanchez-Diaz, A.; Bae, J.; Kim, K.S. Polyamidoamine Dendrimer-Based Materials for Environmental Applications: A Review. *J. Mol. Liq.* **2021**, *334*, 116017–116040.
93. Kurczewska, J.; Cegłowski, M.; Schroeder, G. PAMAM-Halloysite Dunino Hybrid as an Effective Adsorbent of Ibuprofen and Naproxen from Aqueous Solutions. *Appl. Clay. Sci.* **2020**, *190*, 105603–105612.

94. Cao, V.; Yunessnia lehi, A.; Bojaran, M.; Fattahi, M. Treatment of Lasalocid A, Salinomycin and Semduramicin as Ionophore Antibiotics in Pharmaceutical Wastewater by PAMAM-Coated Membranes. *Environ. Technol. Innov.* **2020**, *20*, 101103–101113.
95. Hayouni, S.; Robert, A.; Maes, C.; Conreux, A.; Marin, B.; Mohamadou, A.; Bouquillon, S. New Dendritic Ionic Liquids (DILs) for the Extraction of Metallic Species from Water. *New. J. Chem.* **2018**, *42*, 18010–18020.
96. Tian, N.; Ni, X.; Shen, Z. Synthesis of Main-Chain Imidazolium-Based Hyperbranched Polymeric Ionic Liquids and Their Application in the Stabilization of Ag Nanoparticles. *React. Funct. Polym.* **2016**, *101*, 39–46.
97. Qin, T.; Li, X.; Chen, J.; Zeng, Y.; Yu, T.; Yang, G.; Li, Y. Dendritic Ionic Liquids Based on Imidazolium-Modified Poly(Aryl Ether) Dendrimers. *Chem. Asian J.* **2014**, *9*, 3641–3649.
98. Yousefi, M.; Orojzadeh, P.; Jafari, S.M. Nanoencapsulation of Food Ingredients by Dendrimers. In *Biopolymer Nanostructures for Food Encapsulation Purposes*; Elsevier, **2019**; Vol. 20, pp. 607–625 ISBN 9780128156636.
99. Assadpour, E.; Jafari, S.M. An Overview of Biopolymer Nanostructures for Encapsulation of Food Ingredients. In *Biopolymer Nanostructures for Food Encapsulation Purposes*; Elsevier, 2019; Vol. 1, pp. 1–35 ISBN 9780128156636.
100. Shatrohan Lal, R.K. Synthesis of Organic Nanoparticles and Their Applications in Drug Delivery and Food Nanotechnology: A Review. *J. Nanomat. Mol. Nanotech.* **2014**, *03*, 4–14.
101. Đorđević, V.; Balanč, B.; Belščak-Cvitanović, A.; Lević, S.; Trifković, K.; Kalušević, A.; Kostić, I.; Komes, D.; Bugarski, B.; Nedović, V. Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Engin. Rev.* **2014**, *7*, 452–490.
102. Nedovic, V.; Kalusevic, A.; Manojlovic, V.; Levic, S.; Bugarski, B. An Overview of Encapsulation Technologies for Food Application. *Procedia Food Sci.* **2011**, *1*, 1806–1815.
103. Shi, Y.; Ye, F.; Zhu, Y.; Miao, M. Development of Dendrimer-like Glucan-Stabilized Pickering Emulsions Incorporated with β -Carotene. *Food Chem.* **2022**, *385*, 132626–132633.

104. Shi, Y.; Ye, F.; Chen, Y.; Hui, Q.; Miao, M. Dendrimer-like Glucan Nanoparticulate System Improves the Solubility and Cellular Antioxidant Activity of Coenzyme Q10. *Food Chem.* **2020**, *333*, 127510–127517.
105. Ammala, A. Biodegradable Polymers as Encapsulation Materials for Cosmetics and Personal Care Markets. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2013**, *35*, 113–124.
106. Dubey, S.K.; Dey, A.; Singhvi, G.; Pandey, M.M.; Singh, V.; Kesharwani, P. Emerging Trends of Nanotechnology in Advanced Cosmetics. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2022**, *214*, 112440–112458.
107. Allard, D.; Forestier, S. Self-Tanning Cosmetic Compositions. U.S. Patent 6, 399, 048 B1, 4 Jun. 2002.
108. Forestier, S.; Rollat-Corvol, I.; Rollat, C.I. Deodorant Composition and Use Thereof. U.S. Patent 6, 001 342, 14 Dec. 1999.
109. Wołowiec, S.; Laskowski, M.; Laskowska, B.; Magoń, A.; Mysliwiec, B.; Pyda, M. Dermatological Application of PAMAM-Vitamin Bioconjugates and Host-Guest Complexes-Vitamin C Case Study. In *Stoichiometry and Research – The Importance of Quantity in Biomedicine*; **2012**; Vol. 8, pp. 195–210.
110. Iimura, T.; Furukawa, H. Copolymer Having Carbosiloxane Dendrimer Structure, and Composition and Cosmetic Containing the Same. US. Patent 2012/0263662 A 1, 18 Oct. 2012.
111. Souda, T.; Sugiura, T.; Kennoki, M.; Matsuba, M. Copolymère Ayant Une Structure de Dendrimère de Carbosiloxane, et Composition, Ingrédient Cosmétique, Agent de Formation de Revêtement et Produit Cosmétique Le Contenant. PCT.WO 2020/203145 A1, 8 Oct. 2020.
112. Madaan, K.; Lather, V.; Pandita, D. Evaluation of Polyamidoamine Dendrimers as Potential Carriers for Quercetin, a Versatile Flavonoid. *Drug. Deliv.* **2016**, *23*, 254–262.
113. Guzman, L.; Castro, R.; Saffie, C.; Mandujano, P. Agent Nanocicatrisant Pour Soigner Des Blessures. PCT. Patent WO 2020/232561 A1, 26 Nov. 2020.
114. Chauhan, A.S. Dendrimer Nanotechnology for Enhanced Formulation and Controlled Delivery of Resveratrol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2015**, *1348*, 134–140.
115. Souto, E.B.; Fernandes, A.R.; Martins-Gomes, C.; Coutinho, T.E.; Durazzo, A.; Lucarini, M.; Souto, S.B.; Silva, A.M.; Santini, A. Nanomaterials for Skin Delivery of Cosmeceuticals and Pharmaceuticals. *Applied Sci.* **2020**, *10*, 1594–1617.

116. La Toxicité. Available Online: <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/medecine-toxicite-6517/>. Accessed on 26 Nov. 2022.
117. Arome, D.; Chinedu, E. The Importance of Toxicity Testing. *J. Pharm. Bio. Sci.* **2013**, *4*, 146–148.
118. La Cytotoxicité. Available Online: <https://www.eurofins.fr/pharma/accueil/services/prestations-analytiques/dispositifs-medicaux/evaluation-biologique/cytotoxicite>. Accessed on 26 Nov. 2022.
119. Adan, A.; Kiraz, Y.; Baran, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current. Biotechnol. Pharm.* **2016**, *17*, 1213–1221.
120. Berridge, M. v.; Tan, A.S. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *303*, 474–482.
121. Ishiyama, M.; T.H.; Shiga, M.; Sasamoto, K.; Ohkura, Y.; Ueno, K. A Combined Assay of Cell Viability and in Vitro Cytotoxicity with a Highly Water-Soluble Tetrazolium Salt, Neutral Red and Crystal Violet. *Biol. Pharm. Bull.* **1996**, *19*, 1518–1520.
122. Janaszewska, A.; Lazniewska, J.; Trzepiński, P.; Marcinkowska, M.; Klajnert-Maculewicz, B. Cytotoxicity of Dendrimers. *Biomolecules* **2019**, *9*, 330–352.
123. Malik, N.; Wiwattanapatapee, R.; Klopsch, R.; Lorenz, K.; Frey, H.; Weener, J.W.; Meijer, E.W.; Paulus, W.; Duncana, R. Dendrimers: Relationship between Structure and Biocompatibility in Vitro, and Preliminary Studies on the Biodistribution of I-Labelled Polyamidoamine Dendrimers in Vivo. *J. Control. Release* **2000**, *65*, 133–148.
124. Roberts, J.C.; Bhalgat, M.K.; Zera, R.T. Preliminary Biological Evaluation of Polyamidoamine (PAMAM) Starburst™ Dendrimers. *J. Biomed. Mater. Res.* **1996**, *30*, 53–65.
125. Mishra, V.; Gupta, U.; Jain, N.K. Influence of Different Generations of Poly(Propylene Imine) Dendrimers on Human Erythrocytes. *Pharmazie* **2010**, *65*, 891–895.
126. Ciolkowski, M.; Petersen, J.F.; Ficker, M.; Janaszewska, A.; Christensen, J.B.; Klajnert, B.; Bryszewska, M. Surface Modification of PAMAM Dendrimer Improves Its Biocompatibility. *Nanomedicine* **2012**, *8*, 815–817.

127. Ziemba, B.; Halets, I.; Shcharbin, D.; Appelhans, D.; Voit, B.; Pieszynski, I.; Bryszewska, M.; Klajnert, B. Influence of Fourth Generation Poly(Propyleneimine) Dendrimers on Blood Cells. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2012**, *100 A*, 2870–2880.
128. Albertazzi, L.; Serresi, M.; Albanese, A.; Beltram, F. Dendrimer Internalization and Intracellular Trafficking in Living Cells. *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 680–688.
129. Padilla De Jesús, O.L.; Ihre, H.R.; Gagne, L.; Fréchet, J.M.J.; Szoka, F.C. Polyester Dendritic Systems for Drug Delivery Applications: In Vitro and in Vivo Evaluation. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 453–461.
130. Lazniewska, J.; Milowska, K.; Zablocka, M.; Mignani, S.; Caminade, A.M.; Majoral, J.P.; Bryszewska, M.; Gabryelak, T. Mechanism of Cationic Phosphorus Dendrimer Toxicity against Murine Neural Cell Lines. *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 3484–3496.
131. Mukherjee, S.P.; Davoren, M.; Byrne, H.J. In Vitro Mammalian Cytotoxicological Study of PAMAM Dendrimers - Towards Quantitative Structure Activity Relationships. *Toxicol. in Vitro* **2010**, *24*, 169–177.
132. Janaszewska, A.; Ciolkowski, M.; Wróbel, D.; Petersen, J.F.; Ficker, M.; Christensen, J.B.; Bryszewska, M.; Klajnert, B. Modified PAMAM Dendrimer with 4-Carbomethoxypyrrolidone Surface Groups Reveals Negligible Toxicity against Three Rodent Cell-Lines. *Nanomedicine* **2013**, *9*, 461–464.
133. Agache, P.; Lihoreau, T.; Mac-Mary, S.; Fanian, F.; Humbert, P. The Human Skin: An Overview. In *Agache's Measuring the Skin Non-invasive Investigations, Physiology, Normal Constants*; Humbert, P., Fanian, F., Maibach, H.I., Agache, P., Eds.; Springer Nature: Gewerbestrasse, 2016; Vol. 1, pp. 1–4.
134. Structures et Rôles de La Peau. Available Online: <https://Sante.Lefigaro.Fr/Mieux-Etre/Beaute/Structures-Roles-Peau>. Accessed on 27 Nov. 2022.
135. Méliissopoulos, A.; Levacher, C.; Robert, L.; Ballotti, R. *La Peau Structure et Physiologie*; Méliissopoulos, A., Levacher, C., Eds.; 2nd ed.; Lavoisier: Paris, 2012; Vol. 1; ISBN 9782743013691.
136. Elias, P.M. Epidermal Lipids, Barrier Function, and Desquamation. *J. Investig. Dermatol.* **1983**, *80*, 44–49.

137. Structure et Fonction de La Peau. Available Online: <https://www.eucerin.fr/a-propos-de-la-peau/comprendre-la-peau/structure-et-fonction-de-la-peau>. Accessed on 27 Nov. 2022.
138. La Peau: Available Online: https://www.3trois3.com/articles/le-systeme-immunitaire-et-limmunit%C3%A9-ch%C3%A9z-le-porc-la-peau_12873/. Accessed on 27 Nov. 2022.
139. Elias, P.M. Lipids and the Epidermal Permeability Barrier. *Arch. Dermatol. Res.* **1981**, *270*, 95–117.
140. Nemes, Z.; Steinert, P.M. Bricks and Mortar of the Epidermal Barrier. *Exp. Mol. Med.* **1999**, *31*, 5–19.
141. Law, S.; Wertz, P.W.; Swartzendruber, D.C.; Squier, C.A. Regional Variation in Content, Composition and Organization of Porcine Epithelial Barrier Lipids Revealed by Thin-Layer Chromatography and Transmission Electron Microscopy. *Archs. Oral. Biol.* **1995**, *40*, 1085–1091.
142. Menon, G.K.; Cleary, G.W.; Lane, M.E. The Structure and Function of the Stratum Corneum. *Int. J. Pharm.* **2012**, *435*, 3–9.
143. Bouwstra, J.A.; Dubbelaar, F.E.R.; Gooris, G.S.; Ponc, M. The Lipid Organisation in the Skin Barrier. *Acta. Derm. Venereol.* **2000**, *208*, 23–30.
144. Madison, K.C. Barrier Function of the Skin: “La Raison d’Etre” of the Epidermis. *J. Inv. Dermatol.* **2003**, *121*, 231–241.
145. Cannon, J.B. Lipids in Transdermal and Topical Drug Delivery. *Am. Pharm. Rev.* **2014**, *17*, 1–11.
146. Banker, G.S.; Rhodes, C.T. *Modern Pharmaceutics*; Banker, G.S., Rhodes, C.T., Eds.; 4th ed.; Marcel Dekker: New York, 2002; Vol. 1; ISBN 0824706749.
147. Elias, P.-M.; Friend, D.S. The Permeability Barrier in Mammalian Epidermis. *J. Cell. Bio.* **1975**, *65*, 180–191.
148. Williams, A.C.; Barry, B.W. Penetration Enhancers. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 603–618.
149. Chen, Y.; Wang, M.; Fang, L. Biomaterials as Novel Penetration Enhancers for Transdermal and Dermal Drug Delivery Systems. *Drug. Deliv.* **2013**, *20*, 199–209.
150. Dave, K.; Krishna Venuganti, V.V. Dendritic Polymers for Dermal Drug Delivery. *Ther. Deliv.* **2017**, *8*, 1077–1096.

151. Prausnitz, M.R.; Mitragotri, S.; Langer, R. Current Status and Future Potential of Transdermal Drug Delivery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2004**, *3*, 115–124.
152. Géa, A.; Banel, P. *Physiologie et Huiles Essentielles*; Dunod, Ed.; 1st ed.; 2022.
153. Eeman, M.; Deleu, M. From Biological Membranes to Biomimetic Model Membranes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2010**, *14*, 691–708.
154. Clifton, L.A.; Campbell, R.A.; Sebastiani, F.; Campos-Terán, J.; Gonzalez-Martinez, J.F.; Björklund, S.; Sotres, J.; Cárdenas, M. Design and Use of Model Membranes to Study Biomolecular Interactions Using Complementary Surface-Sensitive Techniques. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2020**, *277*, 102118–102139.
155. Brockman, H. Lipid Monolayers: Why Use Half a Membrane to Characterize Protein-Membrane Interactions. *Curr. Opin. Struct. Biology* **1990**, *9*, 438–443.
156. Basit, H.; Lopez, S.G.; Keyes, T.E. Fluorescence Correlation and Lifetime Correlation Spectroscopy Applied to the Study of Supported Lipid Bilayer Models of the Cell Membrane. *Methods* **2014**, *68*, 286–299.
157. Hoebeke, M. The Importance of Liposomes as Models and Tools in the Understanding of Photosensitization Mechanisms. *J. Photochem. Photobio. B: Biology* **1995**, *28*, 189–196.
158. Rideau, E.; Dimova, R.; Schwille, P.; Wurm, F.R.; Landfester, K. Liposomes and Polymersomes: A Comparative Review towards Cell Mimicking. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 8572–8610.
159. Deleu, M.; Crowet, J.M.; Nasir, M.N.; Lins, L. Complementary Biophysical Tools to Investigate Lipid Specificity in the Interaction between Bioactive Molecules and the Plasma Membrane: A Review. *Biochim. Biophys. Acta. Biomembrane* **2014**, *1838*, 3171–3190.
160. Gupta, R.; Dwadasi, B.S.; Rai, B. Molecular Dynamics Simulation of Skin Lipids: Effect of Ceramide Chain Lengths on Bilayer Properties. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 12536–12546.
161. Gray, G.M.; Yardley, H.J. Lipid Compositions of Cells Isolated from Pig, Human, and Rat Epidermis. *J. Lipid. Res.* **1975**, *16*, 434–440.
162. Yang, M.; Zhou, M.; Song, L. A Review of Fatty Acids Influencing Skin Condition. *J. Cosmet. Dermatol.* **2020**, *19*, 3199–3204.
163. Eeman, M.; Francius, G.; Dufrière, Y.F.; Nott, K.; Paquot, M.; Deleu, M. Effect of Cholesterol and Fatty Acids on the Molecular Interactions of

- Fengycin with Stratum Corneum Mimicking Lipid Monolayers. *Langmuir* **2009**, *25*, 3029–3039.
164. Eeman, M.; Deleu, M.; Paquot, M.; Thonart, P.; Dufrêne, Y.F. Nanoscale Properties of Mixed Fengycin/Ceramide Monolayers Explored Using Atomic Force Microscopy. *Langmuir* **2005**, *21*, 2505–2511.
 165. Strati, F.; Neubert, R.H.H.; Opálka, L.; Kerth, A.; Brezesinski, G. Non-Ionic Surfactants as Innovative Skin Penetration Enhancers: Insight in the Mechanism of Interaction with Simple 2D Stratum Corneum Model System. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2021**, *157*.
 166. Blume, A.; Jansen, M.; Ghyczy, M.; Gareiss, J. Interaction of Phospholipid Liposomes with Lipid Model Mixtures for Stratum Corneum Lipids. *Int. J. Pharm.* **1993**, *99*, 219–228.
 167. Mueller, J.; Trapp, M.; Neubert, R.H.H. The Effect of Hydrophilic Penetration/Diffusion Enhancer on Stratum Corneum Lipid Models: Part II*: DMSO. *Chem. Phys. Lipids* **2019**, *225*, 104816–104823.
 168. Školová, B.; Jandovská, K.; Pullmannová, P.; Tesař, O.; Roh, J.; Hrabálek, A.; Vávrová, K. The Role of the Trans Double Bond in Skin Barrier Sphingolipids: Permeability and Infrared Spectroscopic Study of Model Ceramide and Dihydroceramide Membranes. *Langmuir* **2014**, *30*, 5527–5535.
 169. Barry, B.W. Mode of Action of Penetration Enhancers in Human Skin. *J. Control. Release* **1987**, *6*, 85–97.
 170. Kim, C.-K.; Hong, M.-S.; Kim, Y.-B.; Han, S.-K. Effect of Penetration Enhancers (Pyrrolidone Derivatives) on Multilamellar Liposomes of Stratum Corneum Lipid: A Study by UV Spectroscopy and Differential Scanning Calorimetry. *Int. J. Pharm.* **1993**, *95*, 43–50.
 171. Hatziantoniou, S.; Nezis, I.P.; Margaritis, L.H.; Demetzos, C. Visualisation of Liposomes Prepared from Skin and Stratum Corneum Lipids by Transmission Electron Microscopy. *Micron* **2007**, *38*, 777–781.
 172. Downing, D.T.; Abraham, W.; Wegner, B.K.; Willman, K.W.; Marshall, J.L. Partition of Sodium Dodecyl Sulfate into Stratum Corneum Lipid Liposomes. *Arch. Dermatol. Res.* **1993**, *285*, 151–157.
 173. Zbytovská, J.; Kiselev, M.A.; Funari, S.S.; Garamus, V.M.; Wartewig, S.; Palát, K.; Neubert, R. Influence of Cholesterol on the Structure of Stratum Corneum Lipid Model Membrane. *Colloids Surf. A. Physicochem. Eng. Asp.* **2008**, *328*, 90–99.

174. Kiselev, M.A. Conformation of Ceramide 6 Molecules and Chain-Flip Transitions in the Lipid Matrix of the Outermost Layer of Mammalian Skin, the Stratum Corneum. In Proceedings of the Crystallography Reports; May 2007; Vol. 52, pp. 525–528.
175. Bandaru, R.; Sanket, A.S.; Rekha, S.; Kamble, O.; Dewangan, R.P.; Kesharwani, P.; Samal, S.K.; Dandela, R. Biological Interaction of Dendrimers. In *Dendrimer-Based Nanotherapeutics*; Elsevier, 2021; Vol. 5, pp. 63–74 ISBN 9780128212509.
176. Mutalik, S.; Nayak, U.Y.; Kalra, R.; Kumar, A.; Kulkarni, R. v.; Parekh, H.S. Sonophoresis-Mediated Permeation and Retention of Peptide Dendrimers across Human Epidermis. *Skin. Res.Tech.* **2012**, *18*, 101–107.
177. Mutalik, S.; Shetty, P.K.; Kumar, A.; Kalra, R.; Parekh, H.S. Enhancement in Deposition and Permeation of 5-Fluorouracil through Human Epidermis Assisted by Peptide Dendrimers. *Drug. Deliv.* **2014**, *21*, 44–54.
178. Mutalik, S.; Parekh, H.S.; Anissimov, Y.G.; Grice, J.E.; Roberts, M.S. Iontophoresis-Mediated Transdermal Permeation of Peptide Dendrimers across Human Epidermis. *Skin. Pharmacol. Physiol.* **2013**, *26*, 127–138.
179. Borowska, K.; Wołowiec, S.; Rubaj, A.; Głowniak, K.; Sieniawska, E.; Radej, S. Effect of Polyamidoamine Dendrimer G3 and G4 on Skin Permeation of 8-Methoxypsoralene - In Vivo Study. *Int. J. Pharm.* **2012**, *426*, 280–283.
180. Manikkath, J.; Hegde, A.R.; Kalthur, G.; Parekh, H.S.; Mutalik, S. Influence of Peptide Dendrimers and Sonophoresis on the Transdermal Delivery of Ketoprofen. *Int. J. Pharm.* **2017**, *521*, 110–119.
181. Fox, L.J.; Richardson, R.M.; Briscoe, W.H. PAMAM Dendrimer - Cell Membrane Interactions. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2018**, *257*, 1–18.
182. Venuganti, V.V.K.; Perumal, O.P. Poly(Amidoamine) Dendrimers as Skin Penetration Enhancers: Influence of Charge, Generation, and Concentration. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 2345–2356.
183. Venuganti, V.V.; Sahdev, P.; Hildreth, M.; Guan, X.; Perumal, O. Structure-Skin Permeability Relationship of Dendrimers. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 2246–2260.
184. Yang, Y.; Sunoqrot, S.; Stowell, C.; Ji, J.; Lee, C.W.; Kim, J.W.; Khan, S.A.; Hong, S. Effect of Size, Surface Charge, and Hydrophobicity of Poly(Amidoamine) Dendrimers on Their Skin Penetration. *Biomacromolecule* **2012**, *13*, 2154–2162.

185. Venuganti, V.V.K.; Perumal, O.P. Effect of Poly(Amidoamine) (PAMAM) Dendrimer on Skin Permeation of 5-Fluorouracil. *Int. J. Pharm.* **2008**, *361*, 230–238.
186. Yiyun, C.; Na, M.; Tongwen, X.; Rongqiang, F.; Xueyuan, W.; Xiaomin, W.; Longping, W. Transdermal Delivery of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Mediated by Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimers. *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 595–602.
187. Volz, P.; Schilrreff, P.; Brodewolf, R.; Wolff, C.; Stellmacher, J.; Balke, J.; Morilla, M.J.; Zoschke, C.; Schäfer-Korting, M.; Alexiev, U. Pitfalls in Using Fluorescence Tagging of Nanomaterials: Tecto-Dendrimers in Skin Tissue as Investigated by Cluster-FLIM. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2017**, *1405*, 202–214.
188. Hegde, A.R.; Rewatkar, P. v.; Manikkath, J.; Tupally, K.; Parekh, H.S.; Mutalik, S. Peptide Dendrimer-Conjugates of Ketoprofen: Synthesis and Ex Vivo and in Vivo Evaluations of Passive Diffusion, Sonophoresis and Iontophoresis for Skin Delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *102*, 237–249.
189. Shetty, P.K.; Manikkath, J.; Tupally, K.; Kokil, G.; Hegde, A.R.; Raut, S.Y.; Parekh, H.S.; Mutalik, S. Skin Delivery of EGCG and Silibinin: Potential of Peptide Dendrimers for Enhanced Skin Permeation and Deposition. *AAPS. Pharm. Sci. Tech.* **2017**, *18*, 2346–2357.
190. Pehlivan, F.E. Vitamin C: An Antioxidant Agent. In *Vitamin C*; Hamza, A.H., Ed.; Intech Open: Rijeka, 2017.
191. Buxeraud, J.; Faure, S. Vitamin C. *Actual. Pharm.* **2021**, *60*, S24–S26.
192. Pullar, J.M.; Carr, A.C.; Vissers, M.C.M. The Roles of Vitamin C in Skin Health. *Nutrients* **2017**, *9*, 866–892.
193. Padayatty, S.J.; Katz, A.; Wang, Y.; Eck, P.; Kwon, O.; Lee, J.H.; Chen, S.; Corpe, C.; Levine, M.; Dutta, A.; et al. Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *J. Am. Colloids. Nutr.* **2003**, *22*, 18–35.
194. Stevanović, M.; Savić, J.; Jordović, B.; Uskoković, D. Fabrication, in Vitro Degradation and the Release Behaviours of Poly(DI-Lactide-Co-Glycolide) Nanospheres Containing Ascorbic Acid. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2007**, *59*, 215–223.
195. Liédana, N.; Galve, A.; Rubio, C.; Téllez, C.; Coronas, J. CAF@ZIF-8: One-Step Encapsulation of Caffeine in MOF. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4*, 5016–5021.

196. Rodrigues, F.; Alves, A.C.; Nunes, C.; Sarmiento, B.; Amaral, M.H.; Reis, S.; Oliveira, M.B.P.P. Permeation of Topically Applied Caffeine from a Food by—Product in Cosmetic Formulations: Is Nanoscale in Vitro Approach an Option. *Int. J. Pharm.* **2016**, *513*, 496–503.
197. Herman, A.; Herman, A.P. Caffeine's Mechanisms of Action and Its Cosmetic Use. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2012**, *26*, 8–14.
198. Pantini, G.; Ingoglia, R.; Brunetta, F.; Brunetta, A.; Pantini, G. Sunless Tanning Products Containing Dihydroxyacetone in Combination with a Perfluoropolyether Phosphate. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2007**, *29*, 201–209.
199. Jermann, R.; Toumiat, M.; Imfeld, D. Development of an in Vitro Efficacy Test for Self-Tanning Formulations. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2002**, *24*, 35–42.
200. D-Erythrulose. Available on: <https://www.lesielle.com/fr/d-erythrulose-647>. Accessed on 13 Nov. 2022.
201. Turner, J.; O'Loughlin, D.A.; Green, P.; McDonald, T.O.; Hamill, K.J. In Search of the Perfect Tan: Chemical Activity, Biological Effects, Business Considerations, and Consumer Implications of Dihydroxyacetone Sunless Tanning Products. *J. Cosmet. Dermatol.* **2022**, *1*, 1–10.
202. Pepin, J.; Guern, C.; Milord, F.; Schechter, P.J. Pepin,J.; Guern Difluorométhylornithine for Arseno-Resistant Trypanosoma Brucei Gambiense Sleeping Sickness . *The Lancet* **1987**, *330*, 1431–1433.
203. Wolf Jr, J.E.; Shander, D.; Huber, F.; Jackson, J.; Lin, C.-S.; Mathes, B.M.; Schrode, K.; the Eflornithine HCl Study Group Randomized, Double-Blind Clinical Evaluation of the Efficacy and Safety of Topical Eflornithine HCl 13.9% Cream in the Treatment of Women with Facial Hair. *Int J Dermatol* **2007**, *46*, 94–98.
204. Ricardo, A.; Hill, E. Advances in the Evaluation and Treatment of Unwanted Hair Growth. *Contemp. Ob. Gyn.* **2002**, *47*, 98–98.
205. Lawson, K.R.; Ignatenko, N.A.; Piazza, G.A.; Cui, H.; Gerner, E.W. Influence of K-Ras Activation on the Survival Responses of Caco-2 Cells to the Chemopreventive Agents Sulindac and Difluoromethylornithine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2000**, *9*, 1155–1162.
206. Chorfi, R. Procédé Cosmetique Pour Éliminer Les Poils Du Corps Utilisant Une Composition Épilatoire Se Presentant Sous Forme de Poudre. E. Patent, 1 902 752 A1, 28 Mar. 2008.

207. Kemken, J.; RIEBESEHL, B.U. Pharmaceutical Composition Comprising Pemetrexed Together With Monothioglycerol L-Cystein Or Thioglycolic Acid. 2001.
208. Omrani, I.; Ahmadi, A.; Farhadian, A.; Shendi, H.K.; Babanejad, N.; Nabid, M.R. Synthesis of a Bio-Based Plasticizer from Oleic Acid and Its Evaluation in PVC Formulations. *Polym. Test.* **2016**, *56*, 237–244.
209. Li, L.; Lu, Y.; Ding, Y.; Zhang, F.; Wang, Y. Facile Aqueous Synthesis of Functionalized CdTe Nanoparticles and Their Application as Fluorescence Probes for Determination of Adenine and Guanine. *Canadian J. Chem.* **2012**, *90*, 173–179.
210. Belfleur, L.; Sonavane, M.; Hernandez, A.; Gassman, N.R.; Migaud, M.E. Solution Chemistry of Dihydroxyacetone and Synthesis of Monomeric Dihydroxyacetone. *Chem. Res. Toxicol.* **2022**, *35*, 616–625.
211. Pantini, G.; Ingoglia, R.; Brunetta, F.; Brunetta, A. Sunless Tanning Products Containing Dihydroxyacetone in Combination with a Perfluoropolyether Phosphate. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2007**, *29*, 201–209.
212. Hajduk, P.J.; Olejniczak, E.T.; Fesik, S.W. One-Dimensional Relaxation-and Diffusion-Edited NMR Methods for Screening Compounds That Bind to Macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12257–12261.
213. <https://www.cosmebio.org/fr/nos-dossiers/decrypter-liste-inc/>. Accessed on 13 Nov. 2022.
214. Polati, S.; Gosetti, F.; Gennaro, M.C. Preservatives in Cosmetics. Analytical Methods. In *Analysis of cosmetic products*; 2007; Vol. 5, pp. 211–241.
215. Halla, N.; Fernandes, I.P.; Heleno, S.A.; Costa, P.; Boucherit-Otmani, Z.; Boucherit, K.; Rodrigues, A.E.; Ferreira, I.C.F.R.; Barreiro, M.F. Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies. *Molecules* **2018**, *23*, 1571–1611.
216. Fernandez, X.; Merck, F.; Kerdudo, A. Conservateurs Pour Cosmétiques Antioxydants et Anti-UV Available online: <https://doi.org/10.51257/a-v1-j2285> (accessed on 15 November 2022).
217. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT. Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30.
218. Huang, Y.; Lü, X.; Ma, J. Toxicity of Silver Nanoparticles to Human Dermal Fibroblasts on MicroRNA Level. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 3304–3317.

219. Aurelia Chis, A.; Dobrea, C.; Morgovan, C.; Arseniu, A.M.; Rus, L.L.; Butuca, A.; Juncan, A.M.; Totan, M.; Vonica-Tincu, A.L.; Cormos, G.; et al. Applications and Limitations of Dendrimers in Biomedicine. *Molecules* **2020**, *25*, 3982–4022.
220. Kaur, D.; Jain, K.; Mehra, N.K.; Kesharwani, P.; Jain, N.K. A Review on Comparative Study of PPI and PAMAM Dendrimers. *J. Nanopart. Res.* **2016**, *18*, 146–159.
221. Menot, B.; Stopinski, J.; Martinez, A.; Oudart, J.B.; Maquart, F.X.; Bouquillon, S. Synthesis of Surface-Modified PAMAMs and PPIs for Encapsulation Purposes: Influence of the Decoration on Their Sizes and Toxicity. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 3439–3446.
222. Mbakidi, J.P.; Barjhoux, I.; Aguib, K.; Geffard, A.; Rioult, D.; Palos Ladeiro, M.; Bouquillon, S. Synthesis of New Betaine-Based Ionic Liquids by Using a “One-Pot” Amidation Process and Evaluation of Their Ecotoxicity through a New Method Involving a Hemocyte-Based Bioassay. *ACS. Sustain. Chem. Eng.* **2021**, *9*, 15427–15441.
223. Schunk, T.; Hirsch, A. Dendritic Architectures with Positively Charged Cores and Negatively Charged Shells. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 1130–1137.
224. Salamończyk, G.M. A Fast and Convenient Synthesis of New Water-Soluble, Polyanionic Dendrimers. *Molecules* **2021**, *26*, 4754–4767.
225. Qiu, Z.L.; Fang, L.F.; Shen, Y.J.; Yu, W.H.; Zhu, B.K.; Hélix-Nielsen, C.; Zhang, W. Ionic Dendrimer Based Polyamide Membranes for Ion Separation. *ACS. Nano.* **2021**, *15*, 7522–7535.
226. Leberherz, T.; Weldin, D.L.; Hintennach, A.; Buchmeiser, M.R. Synthesis of Ionic Dendrimers and Their Potential Use as Electrolytes for Lithium–Sulfur Batteries. *Macromol. Chem. Phys.* **2020**, *221*, 1900436–1900441.
227. Concellón, A.; Hernández-Ainsa, S.; Barberá, J.; Romero, P.; Serrano, J.L.; Marcos, M. Proton Conductive Ionic Liquid Crystalline Poly(Ethyleneimine) Polymers Functionalized with Oxadiazole. *RSC. Adv.* **2018**, *8*, 37700–37706.
228. Hernández-Ainsa, S.; Barberá, J.; Marcos, M.; Serrano, J.L. Liquid Crystalline Ionic Dendrimers Containing Luminescent Oxadiazole Moieties. *Macromolecules* **2012**, *45*, 1006–1015.
229. Hernández-Ainsa, S.; Barberá, J.; Marcos, M.; Serrano, J.L. Effect of the Phobic Segregation between Fluorinated and Perhydrogenated Chains on the Supramolecular Organization in Ionic Aromatic Dendrimers. *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 4762–4768.

230. Li, C.; Wei, Y.; Shi, W.; Wang, J.; Wang, B. Antioxidant Capacity and Kinetics of Dendritic Hindered Phenols Using DPPH Assay. *Prog. React. Kinet. Mech.* **2015**, *40*, 279–290.
231. Pocoví-Martínez, S.; Kemmer-Jonas, U.; Pérez-Prieto, J.; Frey, H.; Stiriba, S.-E. Supramolecular Antioxidant Assemblies of Hyperbranched Polyglycerols and Phenols. *Macromol. Chem. Phys.* **2014**, *215*, 2311–2317.
232. Lee, C.Y.; Sharma, A.; Cheong, J.E.; Nelson, J.L. Synthesis and Antioxidant Properties of Dendritic Polyphenols. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6326–6330.
233. Abderrezak, A.; Bourassa, P.; Mandeville, J.S.; Sedaghat-Herati, R.; Tajmir-Riahi, H.A. Dendrimers Bind Antioxidant Polyphenols and Cisplatin Drug. *PLoS One* **2012**, *7*, e33102–e33113.
234. Li, C.Q.; Guo, S.Y.; Wang, J.; Shi, W.G.; Zhang, Z.Q.; Wang, P.X. Kinetics and Structure-Activity Relationship of Dendritic Bridged Hindered Phenol Antioxidants to Protect Styrene against Free Radical Induced Peroxidation. *Russian J. Phys. Chem. A* **2017**, *91*, 2350–2360.
235. Li, C.; Zhai, X.; Guo, S.; Li, H.; Sun, P.; Wang, H.; Wang, J. Antiradical Ability of Dendrimer-Bridged Hindered Phenol and Its Antioxidant Property in Polyolefin. *Chem. Select.* **2017**, *2*, 7202–7209.
236. Mencia, G.; del Olmo, N.S.; Muñoz-Moreno, L.; Maroto-Díaz, M.; Gomez, R.; Ortega, P.; José Carmena, M.; Javier de la Mata, F. Polyphenolic Carbosilane Dendrimers as Anticancer Agents against Prostate Cancer. *New J. Chem.* **2016**, *40*, 10488–10497.
237. del Olmo, N.S.; González, C.E.P.; Rojas, J.D.; Gómez, R.; Ortega, P.; Escarpa, A.; de la Mata, F.J. Antioxidant and Antibacterial Properties of Carbosilane Dendrimers Functionalized with Polyphenolic Moieties. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 1–16.
238. Soto-Castro, D.; Santillan, R.; Guadarrama, P.; Farfán, N.; González-Herrera, I.G.; Cruz-Méndez, A.C. PAMAM-Dendrimer Bearing 1,2-Diphenylethyne Core Obtained by Palladium-Catalyzed Coupling Assisted by Silver Oxide: In Vitro Evaluation of Antioxidant Properties. *Monatsh. Chem.* **2016**, *147*, 1839–1847.
239. Li, C.; Sun, P.; Yu, H.; Zhang, N.; Wang, J. Scavenging Ability of Dendritic PAMAM Bridged Hindered Phenolic Antioxidants towards DPPH• and ROO• Free Radicals. *RSC. Adv.* **2017**, *7*, 1869–1876.

240. Wang, Y.; Shen, W.; Shi, X.; Fu, F.; Fan, Y.; Shen, W.; Cao, Y.; Zhang, Q.; Qi, R. Alpha-Tocopheryl Succinate-Conjugated G5 PAMAM Dendrimer Enables Effective Inhibition of Ulcerative Colitis. *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, *6*, 1700276–1700285.
241. Kannan, A.; Saravanan, V.; Rajakumar, P. Synthesis, Photophysical, Electrochemical Studies, and Antioxidant Properties of Fluorescein-Linked Glycodendrimers. *Asian J. Org. Chem.* **2016**, *5*, 1155–1163.
242. Mieriņa, I.; Peipiņa, E.; Aišpure, K.; Jure, M. 1st Generation Dendrimeric Antioxidants Containing Meldrum's Acid Moieties as Surface Groups. *New J. Chem.* **2022**, *46*, 607–620.
243. Balu, P.; Asharani, I.V.; Thirumalai, D. Synthesis of Melamine Core Starburst Polyamide G1 Dendrimer and Its Antibacterial and Antioxidant Activities. *Asian J. Chem.* **2021**, *33*, 185–189.
244. Savithri, J.S.; Rajakumar, P. Synthesis, Photophysical, and Antioxidant Properties of Rhodamine B Decorated Novel Dendrimers. *Australian J. Chem.* **2018**, *71*, 399–406.
245. Sathiyaraj, S.; Shanavas, A.; Kumar, K.A.; Sathiyaseelan, A.; Senthilselvan, J.; Kalaichelvan, P.T.; Nasar, A.S. The First Example of Bis(Indolyl)Methane Based Hyperbranched Polyurethanes: Synthesis, Solar Cell Application and Anti-Bacterial and Anti-Oxidant Properties. *Eur. Polym. J.* **2017**, *95*, 216–231.
246. Rajakumar, P.; Venkatesan, N.; Sekar, K.; Nagaraj, S.; Rengasamy, R. Synthesis, Optical, and Antioxidant Studies of Anthraquinone-Core-Based Dendrimers with *N*-Phenylcarbazole as Surface Group. *Australian J. Chem.* **2014**, *67*, 636–643.
247. Rajakumar, P.; Venkatesan, N.; Sekar, K.; Nagaraj, S.; Rengasamy, R. Synthesis and Antioxidant Properties of Enone Core Based Dendrimers with Carbazole as Surface Group. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 1220–1224.
248. Sowinska, M.; Morawiak, M.; Bochyńska-Czyż, M.; Lipkowski, A.W.; Ńska, E.Z.; Zabłocka, B.; Urbanczyk-Lipkowska, Z. Molecular Antioxidant Properties and in Vitro Cell Toxicity of the P-Aminobenzoic Acid (PABA) Functionalized Peptide Dendrimers. *Biomolecules* **2019**, *9*, 89–109.
249. Mohamad Ali, B.; Velavan, B.; Sudhandiran, G.; Sridevi, J.; Sultan Nasar, A. Radical Dendrimers: Synthesis, Anti-Tumor Activity and Enhanced Cytoprotective Performance of TEMPO Free Radical Functionalized Polyurethane Dendrimers. *Eur. Polym. J.* **2020**, *122*, 109354–109364.

250. Gallien, J.; Srinageshwar, B.; Gallo, K.; Holtgreffe, G.; Koneru, S.; Otero, P.S.; Bueno, C.A.; Mosher, J.; Roh, A.; Kohtz, D.S.; et al. Curcumin Loaded Dendrimers Specifically Reduce Viability of Glioblastoma Cell Lines. *Molecules* **2021**, *26*, 6050–6065.
251. Falconieri, M.C.; Adamo, M.; Monasterolo, C.; Bergonzi, M.C.; Coronello, M.; Bilia, A.R. New Dendrimer-Based Nanoparticles Enhance Curcumin Solubility. *Planta. Med.* **2017**, *83*, 420–425.
252. Li, J.; Chen, L.; Xu, X.; Fan, Y.; Xue, X.; Shen, M.; Shi, X. Targeted Combination of Antioxidative and Anti-Inflammatory Therapy of Rheumatoid Arthritis Using Multifunctional Dendrimer-Entrapped Gold Nanoparticles as a Platform. *Small* **2020**, *16*, 2005661–2005671.
253. Zhang, D.; Huang, Q. Encapsulation of Astragaloside with Matrix Metalloproteinase-2-Responsive Hyaluronic Acid End-Conjugated Polyamidoamine Dendrimers Improves Wound Healing in Diabetes. *J Biomed Nanotechnologie* **2020**, *16*, 1229–1240.
254. Ambrosio, L.; Argenziano, M.; Cucci, M.A.; Grattarola, M.; de Graaf, I.A.M.; Dianzani, C.; Barrera, G.; Nieves, J.S.; Gomez, R.; Cavalli, R.; et al. Carbosilane Dendrimers Loaded with Sirna Targeting Nrf2 as a Tool to Overcome Cisplatin Chemoresistance in Bladder Cancer Cells. *Antioxidants* **2020**, *9*, 1–16.
255. Sharma, R.; Kambhampati, S.P.; Zhang, Z.; Sharma, A.; Chen, S.; Duh, E.I.; Kannan, S.; Tso, M.O.M.; Kannan, R.M. Dendrimer Mediated Targeted Delivery of Sinomenine for the Treatment of Acute Neuroinflammation in Traumatic Brain Injury. *J. Control. Release* **2020**, *323*, 361–375.
256. Sharma, R.; Kim, S.Y.; Sharma, A.; Zhang, Z.; Kambhampati, S.P.; Kannan, S.; Kannan, R.M. Activated Microglia Targeting Dendrimer-Minocycline Conjugate as Therapeutics for Neuroinflammation. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28*, 2874–2886.
257. Alfei, S.; Marengo, B.; Zuccari, G.; Turrini, F.; Domenicotti, C. Dendrimer Nanodevices and Gallic Acid as Novel Strategies to Fight Chemoresistance in Neuroblastoma Cells. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1–30.
258. Alfei, S.; Catena, S.; Turrini, F. Biodegradable and Biocompatible Spherical Dendrimer Nanoparticles with a Gallic Acid Shell and a Double-Acting Strong Antioxidant Activity as Potential Device to Fight Diseases from “Oxidative Stress”. *Drug. Deliv. Transl. Res.* **2020**, *10*, 259–270.

259. Alfei, S.; Oliveri, P.; Malegori, C. Assessment of the Efficiency of a Nanospherical Gallic Acid Dendrimer for Long-Term Preservation of Essential Oils: An Integrated Chemometric-Assisted FTIR Study. *Chem. Select.* **2019**, *4*, 8891–8901.
260. Bi, J.; Li, Y.; Zhuang, Q.; Leng, Z.; Jia, H.; Liu, Y.; Zhou, J.; Du, L. Hydroxy-Terminated Poly(Amidoamine) Dendrimers as Nanocarriers for the Delivery of Antioxidants. *J. Nano Res.* **2013**, *23*, 66–73.
261. Sadeghi-Kiakhani, M.; Safapour, S.; Golpazir-Sorkheh, Y. Sustainable Antimicrobial and Antioxidant Finishing and Natural Dyeing Properties of Wool Yarn Treated with Chitosan-Poly(Amidoamine) Dendrimer Hybrid as a Biomordant. *J. Natural Fibers* **2021**, *1*, 1–13.
262. Shi, Y.; Ye, F.; Zhu, Y.; Miao, M. Development of Dendrimer-like Glucan-Stabilized Pickering Emulsions Incorporated with β -Carotene. *Food Chem.* **2022**, 132626–132632.
263. Shi, Y.; Ye, F.; Chen, Y.; Hui, Q.; Miao, M. Dendrimer-like Glucan Nanoparticulate System Improves the Solubility and Cellular Antioxidant Activity of Coenzyme Q10. *Food Chem.* **2020**, *333*, 175510–175517.
264. Pentek, T.; Newenhouse, E.; O'Brien, B.; Singh Chauhan, A. Development of a Topical Resveratrol Formulation for Commercial Applications Using Dendrimer Nanotechnology. *Molecules* **2017**, *22*, 137–152.
265. Chanphai, P.; Tajmir-Riahi, H.A. Binding Analysis of Antioxidant Polyphenols with PAMAM Nanoparticles. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2018**, *36*, 3487–3495.
266. de la Hoz, A.; Díaz-Ortiz, A.; Prieto, P. CHAPTER 1 Microwave-Assisted Green Organic Synthesis. In *Alternative Energy Sources for Green Chemistry*; The Royal Society of Chemistry, 2016; pp. 1–33 ISBN 978-1-78262-140-9.
267. Hessel, V.; Escribà-Gelonch, M.; Bricout, J.; Tran, N.N.; Anastasopoulou, A.; Ferlin, F.; Valentini, F.; Lanari, D.; Vaccaro, L. Quantitative Sustainability Assessment of Flow Chemistry-From Simple Metrics to Holistic Assessment. *ACS. Sustain. Chem. Eng.* **2021**, *9*, 9508–9540.
268. Stuerger, Didier. Microwave-Material Interaction and Dielectric Properties, Key Ingredients for Mastery of Chemical Microwave Process. In *Microwave in organic synthesis*; Wiley-VCH, 2006; pp. 1–61 ISBN 3527314520.
269. Plutschack, M.B.; Pieber, B.; Gilmore, K.; Seeberger, P.H. The Hitchhiker's Guide to Flow Chemistry. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 11796–11893.

270. Kar, S.; Sanderson, H.; Roy, K.; Benfenati, E.; Leszczynski, J. Green Chemistry in the Synthesis of Pharmaceuticals. *Chem. Rev.* **2022**, *122*, 3637–3710.
271. Gérardy, R.; Debecker, D.P.; Estager, J.; Luis, P.; Monbaliu, J.C.M. Continuous Flow Upgrading of Selected C2-C6 Platform Chemicals Derived from Biomass. *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 7219–7347.
272. Mohamad Aziz, N.A.; Yunus, R.; Kania, D.; Abd Hamid, H. Prospects and Challenges of Microwave-Combined Technology for Biodiesel and Biolubricant Production through a Transesterification: A Review. *Molecules* **2021**, *26*, 788–808.
273. Bosman, A.W.; Janssen, H.M.; Meijer, E.W. About Dendrimers: Structure, Physical Properties, and Applications. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1665–1688.
274. Owen, R.W.; Haubner, R.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. Isolation, Structure Elucidation and Antioxidant Potential of the Major Phenolic and Flavonoid Compounds in Brined Olive Drupes. *Food Chem. Toxicol.* **2003**, *41*, 703–717.
275. Bhat, F.M.; Riar, C.S. Extraction, Identification and Assessment of Antioxidative Compounds of Bran Extracts of Traditional Rice Cultivars: An Analytical Approach. *Food Chem.* **2017**, *237*, 264–274.
276. Iyer, K.A.; Zhang, L.; Torkelson, J.M. Direct Use of Natural Antioxidant-Rich Agro-Wastes as Thermal Stabilizer for Polymer: Processing and Recycling. *ACS. Sustain. Chem. Eng.* **2016**, *4*, 881–889.
277. Meghna, D.; Akshaya, G. Ferulic Acid: A Natural Essential Compound Having Potential Industrial and Medicinal Properties. 2022, *13*, 603–611. *Int. J. Pharm. Sci.* **2022**, *13*, 603–611.
278. Zduńska, K.; Dana, A.; Kolodziejczak, A.; Rotsztein, H. Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2018**, *31*, 332–336.
279. Reitz, L.K.; Schroeder, J.; Longo, G.Z.; Boaventura, B.C.B.; di Pietro, P.F. Dietary Antioxidant Capacity Promotes a Protective Effect against Exacerbated Oxidative Stress in Women Undergoing Adjuvant Treatment for Breast Cancer in a Prospective Study. *Nutrients* **2021**, *13*, 4324–4340.
280. Maity, S.; Kinra, M.; Nampoothiri, M.; Arora, D.; Pai, K.S.R.; Mudgal, J. Caffeic Acid, a Dietary Polyphenol, as a Promising Candidate for Combination Therapy. *Chem.Pap.* **2022**, *76*, 1271–1283.

281. Prasad, N.R.; Jeyanthimala, K.; Ramachandran, S. Caffeic Acid Modulates Ultraviolet Radiation-B Induced Oxidative Damage in Human Blood Lymphocytes. *J. Photochem. Photobiol. B* **2009**, *95*, 196–203.
282. Kang, N.J.; Lee, K.W.; Shin, B.J.; Jung, S.K.; Hwang, M.K.; Bode, A.M.; Heo, Y.S.; Lee, H.J.; Dong, Z. Caffeic Acid, a Phenolic Phytochemical in Coffee, Directly Inhibits Fyn Kinase Activity and UVB-Induced COX-2 Expression. *Carcinogenesis* **2009**, *30*, 321–330.
283. Marcos, M.; Martín-Rapún, R.; Omenat, A.; Barberá, J.; Serrano, J.L. Ionic Liquid Crystal Dendrimers with Mono-, Di- and Trisubstituted Benzoic Acids. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 1206–1212.
284. Dong, Z.; Wen, Z.; Zhao, F.; Kuhn, S.; Noël, T. Scale-up of Micro- and Milli-Reactors: An Overview of Strategies, Design Principles and Applications. *Chem. Engin. Sci. X* **2021**, *10*, 100097–100128.
285. Glasnov, T.N.; Kappe, C.O. The Microwave-to-Flow Paradigm: Translating High-Temperature Batch Microwave Chemistry to Scalable Continuous-Flow Processes. *Chem. A. Eur. J.* **2011**, *17*, 11956–11968.
286. Popovici, C.; Saykova, I.; Tylkowski, B. Evaluation de l'activité Antioxydant Des Composés Phénoliques Par La Réactivité Avec Le Radical Libre DPPH. *Rev. Génie Ind.* **2009**, *4*, 25–39.
287. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT. Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30.
288. Pehlivan, F.E. Vitamin C: An Antioxidant Agent. In *Vitamin C*; InTech, 2017; Vol. 1, pp. 23–36.
289. Gómez Ruiz, B.; Roux, S.; Courtois, F.; Bonazzi, C. Spectrophotometric Method for Fast Quantification of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in Simple Matrix for Kinetics Measurements. *Food Chem.* **2016**, *211*, 583–589.
290. Yanez, E.; Santander, P.; Contreras, D.; Yanez, J.; Cornejo, L.; Mansilla, H.D. Homogeneous and Heterogeneous Degradation of Caffeic Acid Using Photocatalysis Driven by UVA and Solar Light. *J. Environ. Sci. Health, Part A* **2016**, *51*, 78–85.
291. Maxwell, S.R.J. Prospects for the Use of Antioxidant Therapies. *Drugs* **1995**, *49*, 345–361.

292. Rice-Evans, C. Implications of the Mechanisms of Action of Tea Polyphenols as Antioxidants in Vitro for Chemoprevention in Humans (44377). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1999**, *220*, 262–266.
293. Rice-Evans, C.A.; Miller', N.J.; Bolwell', P.G.; Bramley2, P.M.; Pridham', J.B. The Relative Antioxidant Activities of Plant-Derived Polyphenolic Flavonoids. *Free Rad. Res.* **1995**, *22*, 375–383.
294. Lien, E.J.; Ren, S.; Bui, H.-H.; Wang, R. Original Contribution Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis of Phenolic Antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *26*, 285–294.
295. Floegel, A.; Kim, D.O.; Chung, S.J.; Koo, S.I.; Chun, O.K. Comparison of ABTS/DPPH Assays to Measure Antioxidant Capacity in Popular Antioxidant-Rich US Foods. *J. Food Compos. Anal.* **2011**, *24*, 1043–1048.
296. Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L.; Hawkins Byrne, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC Assays for Estimating Antioxidant Activity from Guava Fruit Extracts. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 669–675.
297. Duarte-Almeida, J.M.; Salatino, A.; Genovese, M.I.; Lajolo, F.M. Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Culms and Sugarcane (*Saccharum Officinarum* L.) Products. *Food Chem.* **2011**, *125*, 660–664.
298. Pratt, D.E.; Miller, E.E. A Flavonoid Antioxidant in Spanish Peanuts(*Arachia Hypogoea*). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1984**, *61*, 1064–1067.
299. Koleva, I.I.; van Beek, T.A.; Linssen, J.P.H.; Groot, A. de; Evstatieva, L.N. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: A Comparative Study on Three Testing Methods. *Phytochem. Anal.* **2002**, *13*, 8–17.
300. Cao, G.; Alessio, H.M.; Cutler, R.G. Oxygen-Radical Absorbance Capacity Assay for Antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **1993**, *14*, 303–311.
301. Atala, E.; Aspée, A.; Speisky, H.; Lissi, E.; López-Alarcón, C. Antioxidant Capacity of Phenolic Compounds in Acidic Medium: A Pyrogallol Red-Based ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) Assay. *J. Food Compos. Anal.* **2013**, *32*, 116–125.
302. Prior, R.L. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC): New Horizons in Relating Dietary Antioxidants/Bioactives and Health Benefits. *J. Funct. Foods* **2015**, *18*, 797–810.
303. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30.

304. Parejo, I.; Viladomat, F.; Bastida, J.; Rosas-Romero, A.; Flerlage, N.; Burillo, J.; Codina, C. Comparison between the Radical Scavenging Activity and Antioxidant Activity of Six Distilled and Nondistilled Mediterranean Herbs and Aromatic Plants. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6882–6890.
305. Kedare, S.B.; Singh, R.P. Genesis and Development of DPPH Method of Antioxidant Assay. *J. Food Sci. Technol.* **2011**, *48*, 412–422.
306. Sharma, O.P.; Bhat, T.K. DPPH Antioxidant Assay Revisited. *Food Chem.* **2009**, *113*, 1202–1205.
307. Mishra, K.; Ojha, H.; Chaudhury, N.K. Estimation of Antiradical Properties of Antioxidants Using DPPH- Assay: A Critical Review and Results. *Food Chem.* **2012**, *130*, 1036–1043.
308. Chalk, S.J. *Compendium of Chemical Terminology*; McNaught, A.D., Wilkinson, A., Eds.; UPAC Gold Book 2nd.; 1997.
309. Hart, H.; Hadad, C.M.; Craine, L.E.; Hart, D.J. *Organic Chemistry: A Short Course*; 13th ed.; 2011.
310. Kastin, A. *Handbook of Biologically Active Peptides*; 2nd ed.; 2013.
311. Cossy, J.; Pale-Grosdemange, C. Convenient Synthesis Of Amides From Carboxylic Acids And Primary Amines. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2771–2774.
312. Goößen, L.J.; Ohlmann, D.M.; Lange, P.P. The Thermal Amidation of Carboxylic Acids Revisited. *Synthesis* **2009**, 160–164.
313. Albericio, F.; El-Faham, A. Choosing the Right Coupling Reagent for Peptides: A Twenty-Five-Year Journey. *Org. Process Res. Dev.* **2018**, *22*, 760–772.
314. Klausner, Y.S.; BODANSKY, M. “Coupling Reagents in Peptide Synthesis.” *Synthesis* **1972**, *1972*, 453–463.
315. Coste, J.; Frerot, E.; Joulm, P.; Castro, B. Oxybenzotriazole Free Peptide Coupling Reagents for N-Methylated Amino Acids. *Tetrahedron Lett.* **1967**, *32*, 1967–1970.
316. Carpino, L.A.; Imazumi, H.; El-Faham, A.; Ferrer, F.J.; Zhang, C.; Lee, Y.; Foxman, B.M.; Henklein, P.; Hanay, C.; Mügge, C.; et al. The Uronium/Guanidinium Peptide Coupling Reagents: Finally the True Uronium Salts. *Angew. Chem. Inter. Ed.* **2002**, *41*, 441–445.
317. Gibson, F.S.; Park, M.S.; Rapoport, H. Bis t [4-(2,2-Dimethyl-1,3-Dioxolyl) Methyl]-Carbodiimide (BDDC) and Its Application to Residue-Free

- Esterifications, Peptide Couplings, and Dehydrations. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7503–7507.
318. Ito, H.; Takamatsu, N.; Ichikizaki, I. The Peptide Synthesis Using Unsymmetrical Carbodiimides. *Chem. Lett.* **1977**, *6*, 539–542.
319. Vanhaecht, B.; Teeranstru, M.N.; Suwier, D.; Koning, C.E. DCC Assisted Synthesis of Aliphatic Polyester at Room Temperature. *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.* **2000**, *A37*, 633–643.
320. Rauf, A.; Parveen, H. Direct Esterification of Fatty Acids with Phenylalkanols by Using Dicyclohexylcarbodiimide. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2004**, *106*, 97–100.
321. Handford, B.O.; Jones, J.H.; Young, G.T.; Johnson, T.F.N. Peptide Synthesis and as Selective Acylating Agents. *J. Chem. Soc.* **1955**, 6814–6827.
322. Sheehan, J.C.; Hess, G.P. A New Method of Forming Peptide Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067–1068.
323. Roy, K.; Bhaduri, A.P. DCC as Donor of Cyclohexyl Amine during Amidation of Carboxylic Acids. *Indian J. Chem. Sect.* **1994**, *33B*, 489–490.
324. Ihre, H.; Hult, A.; Fré, J.M.J.; Gitsov, I. Double-Stage Convergent Approach for the Synthesis of Functionalized Dendritic Aliphatic Polyesters Based on 2,2-Bis(Hydroxymethyl)Propionic Acid. *Macromolecules* **1998**, *31*, 4061–4086.
325. Pahovnik, D.; Čusak, A.; Reven, S.; Žagar, E. Synthesis of Poly(Ester-Amide) Dendrimers Based on 2,2-Bis(Hydroxymethyl) Propanoic Acid and Glycine. *J. Polym. Sci. A. Polym. Chem.* **2014**, *52*, 3292–3301.
326. Romagnoli, B.; Harwood, L.M.; Hayes, W. Synthesis of a Novel Class of Chiral Polyaromatic Amide Dendrimers Bearing an Amino Acid Derived C₃-Symmetric Core. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 37–40.
327. Briolay, T.; Petithomme, T.; Fouet, M.; Nguyen-Pham, N.; Blanquart, C.; Boisgerault, N. Delivery of Cancer Therapies by Synthetic and Bio-Inspired Nanovectors. *Mol. Cancer* **2021**, *20*, 1–24.
328. Stecanella, L.A.; Bitencourt, A.P.R.; Richter Vaz, G.; Quarta, E.; Júnior, J.O.C.S.; Rossi, A.; Bitencourt, A.A.; P.R.; Vaz, G.R.; Quarta, E.; Júnior, S.; et al. Pharmaceuticals Glycyrrhizic Acid and Its Hydrolyzed Metabolite 18 β -Glycyrrhetic Acid as Specific Ligands for Targeting Nanosystems in the Treatment of Liver Cancer Citation: Stecanella, L. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1792–1814.

329. Rečnik, L.M.; Cantelli, C.; Fersing, C.; Gongora, C.; Pouget, J.P.; Lisowski, V. Synthesis and in Vitro Antitumour Activity of Carboplatin Analogues Containing Functional Handles Compatible for Conjugation to Drug Delivery Systems. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30*, 127527–127530.
330. Perez-Surio, A.F.; Alcacera-Lopez, M.A. Drug Vectoring Systems to Target Drug Delivery Using Nanotechnologies. *Curr. Nanomedicine* **2017**, *8*, 1–6.
331. Dey, A.D.; Bigham, A.; Esmaeili, Y.; Ashrafizadeh, M.; Moghaddam, F.D.; Tan, S.C.; Yousefiasl, S.; Sharma, S.; Maleki, A.; Rabiee, N.; et al. Dendrimers as Nanoscale Vectors: Unlocking the Bars of Cancer Therapy. *Semin. Cancer Biol.* **2022**, *86*, 396–419.
332. le Saux, S.; Aubert-Pouëssel, A.; Mohamed, K.E.; Martineau, P.; Guglielmi, L.; Devoisselle, J.M.; Legrand, P.; Chopineau, J.; Morille, M. Interest of Extracellular Vesicles in Regard to Lipid Nanoparticle Based Systems for Intracellular Protein Delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2021**, *176*, 113837–113856.
333. Hajebi, S.; Yousefiasl, S.; Rahimmanesh, I.; Dahim, A.; Ahmadi, S.; Kadumudi, F.B.; Rahgozar, N.; Amani, S.; Kumar, A.; Kamrani, E.; et al. Genetically Engineered Viral Vectors and Organic-Based Non-Viral Nanocarriers for Drug Delivery Applications. *Adv. Healthc. Mater.* **2022**, *11*, 2201583–2201613.
334. Hassanpour, M.; Shahavi, M.H.; Heidari, G.; Kumar, A.; Nodehi, M.; Moghaddam, F.D.; Mohammadi, M.; Nikfarjam, N.; Sharifi, E.; Makvandi, P.; et al. Ionic Liquid-Mediated Synthesis of Metal Nanostructures: Potential Application in Cancer Diagnosis and Therapy. *J. Ionic Liq.* **2022**, *2*, 100033–100048.
335. Deka Dey, A.; Yousefiasl, S.; Kumar, A.; Dabbagh Moghaddam, F.; Rahimmanesh, I.; Samandari, M.; Jamwal, S.; Maleki, A.; Mohammadi, A.; Rabiee, N.; et al. MiRNA-Encapsulated Abiotic Materials and Biovectors for Cutaneous and Oral Wound Healing: Biogenesis, Mechanisms, and Delivery Nanocarriers. *Bioeng. Transl. Med.* **2022**, *8*, e10343–e10370.
336. Concepción Peña-Juárez, M.; Omar, &; Guadarrama-Escobar, R.; Juan Escobar-Chávez, J. Transdermal Delivery Systems for Biomolecules. *J. Pharm. Innov.* **2022**, *17*, 319–332.
337. Chen, Y.; Feng, X. Gold Nanoparticles for Skin Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2022**, *625*, 122122–122136.

338. Reis, D.R.; Ambrosi, A.; Luccio, M. di Encapsulated Essential Oils: A Perspective in Food Preservation. *Future Foods* **2022**, *5*, 100126–100140.
339. Okagu, O.D.; Wang, B.; Udenigwe, C.C. Food Proteins as Biomaterial for Delivery Functions. In *Food Proteins and Peptides: Emerging Biofunctions, Food and Biomaterial Applications*; The Royal Society of Chemistry, 2021; Vol. 1, pp. 97–126 ISBN 978-1-78801-859-3.
340. Zhang, J.; Hassane Hamadou, A.; Chen, C.; Xu, B. Encapsulation of Phenolic Compounds within Food-Grade Carriers and Delivery Systems by PH-Driven Method: A Systematic Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, *3*, 1–22.
341. Richart, P.; Simonnet, J.T. Nanocapsules: The Carrier of Choice for Lipophilic Cosmetic Molecules. *Pharma. Prat.* **2003**, *13*, 3–7.
342. Munnier, E.; al Assaad, A.; David, S.; Mahut, F.; Vayer, M.; van Gheluwe, L.; Yvergnaux, F.; Sinturel, C.; Soucé, M.; Chourpa, I.; et al. Homogeneous Distribution of Fatty Ester-Based Active Cosmetic Ingredients in Hydrophilic Thin Films by Means of Nanodispersion. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2020**, *42*, 512–519.
343. Nery, É.M.; Martinez, R.M.; Velasco, M.V.R.; Baby, A.R. A Short Review of Alternative Ingredients and Technologies of Inorganic UV Filters. *J. Cosmet. Dermatol.* **2021**, *20*, 1061–1065.
344. Pullar, J.M.; Carr, A.C.; Vissers, M.C.M. The Roles of Vitamin C in Skin Health. *Nutrients* **2017**, *9*, 866–892.
345. Venuganti, V.V.; Sahdev, P.; Hildreth, M.; Guan, X.; Perumal, O. Structure-Skin Permeability Relationship of Dendrimers. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 2246–2260.
346. Franche, A.; Fayeulle, A.; Lins, L.; Billamboz, M.; Pezron, I.; Deleu, M.; Léonard, E. Amphiphilic Azobenzenes: Antibacterial Activities and Biophysical Investigation of Their Interaction with Bacterial Membrane Lipids. *Bioorg. Chem.* **2019**, *94*, 103399–103407.
347. Eeman, M.; Berquand, A.; Dufrière, Y.F.; Paquot, M.; Dufour, S.; Deleu, M. Penetration of Surfactin into Phospholipid Monolayers: Nanoscale Interfacial Organization. *Langmuir* **2006**, *22*, 11337–11345.
348. Deboever, E.; Lins, L.; Ongena, M.; de Clerck, C.; Deleu, M.; Fauconnier, M.-L. Linolenic Fatty Acid Hydroperoxide Acts as Biocide on Plant Pathogenic Bacteria: Biophysical Investigation of the Mode of Action. *Bioorg. Chem.* **2020**, *100*, 103877–103886.

349. Boisselier, É.; Demers, É.; Cantin, L.; Salesse, C. How to Gather Useful and Valuable Information from Protein Binding Measurements Using Langmuir Lipid Monolayers. *Adv. Coll. Interface Sci.* **2017**, *243*, 60–76.
350. Schmidt, T.F.; Riske, K.A.; Caseli, L.; Salesse, C. Dengue Fusion Peptide in Langmuir Monolayers: A Binding Parameter Study. *Biophys. Chem.* **2021**, *271*, 106553–106560.
351. Åkesson, A.; Bendtsen, K.M.; Beherens, M.A.; Pedersen, J.S.; Alfredsson, V.; Gómez, M.C. The Effect of PAMAM G6 Dendrimers on the Structure of Lipid Vesicles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 12267–12272.
352. Amaro, M.; Šachl, R.; Jurkiewicz, P.; Coutinho, A.; Prieto, M.; Hof, M. Time-Resolved Fluorescence in Lipid Bilayers: Selected Applications and Advantages over Steady State. *Biophys. J.* **2014**, *107*, 2751–2760.
353. Hein, R.; Uzundal, C.B.; Hennig, A. Simple and Rapid Quantification of Phospholipids for Supramolecular Membrane Transport Assays. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 2182–2185.
354. Smeralda, W.; Since, M.; Corvaisier, S.; Legay, R.; Voisin-Chiret, A.S.; Malzert-Freon, A. Microplate Assay for Lipophilicity Determination Using Intrinsic Fluorescence of Drugs: Application to a Promising Anticancer Lead, Pyridoclox. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *131*, 75–83.
355. Ruwizhi, N.; Blessing, A.A. "Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy." *Int. J. Molecular Sci.* **2020**, *21*, 5712–5745.
356. Calabretta, M.K.; Kumar, A.; McDermott, A.M.; Cai, C. Antibacterial activities of poly (amidoamine) dendrimers terminated with amino and poly (ethylene glycol) groups. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1807–1811.
357. Schito, A.M.; Gian, C.C.; Silvana, A. "Synthesis and Antibacterial Activity of Cationic Amino Acid-Conjugated Dendrimers Loaded with a Mixture of Two Triterpenoid Acids". *Polymers* **2021**, *13*, 521–536.

ANNEXES

Annexe 1

Supplementary Materials: Polymers 2022, 14, 3513,

<https://doi.org/10.3390/polym14173513>

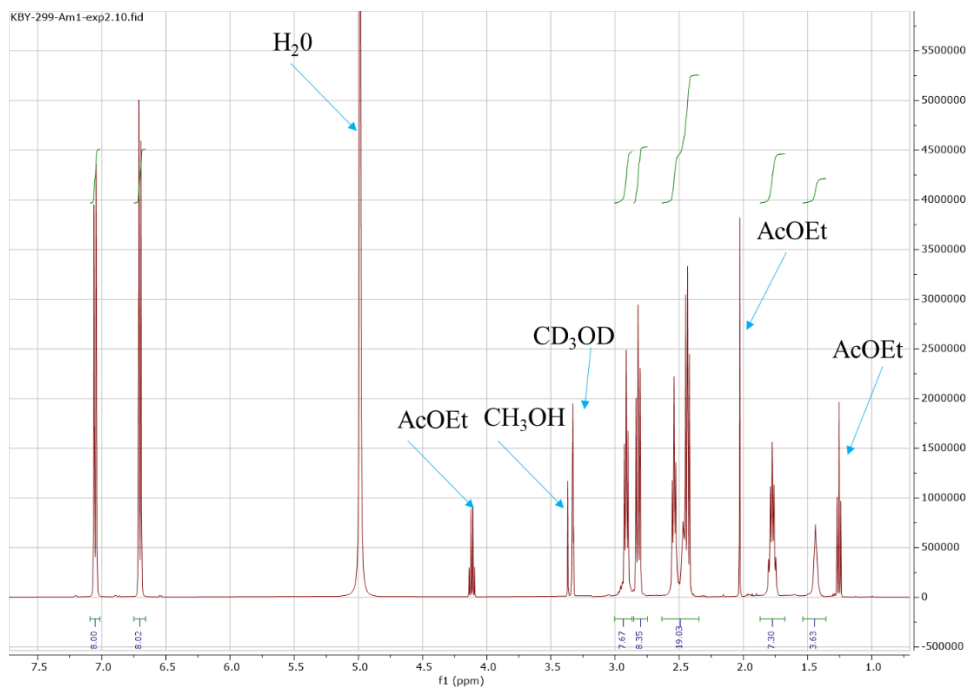


Figure S1. ¹H NMR of PPI-1-PhA in CD₃OD

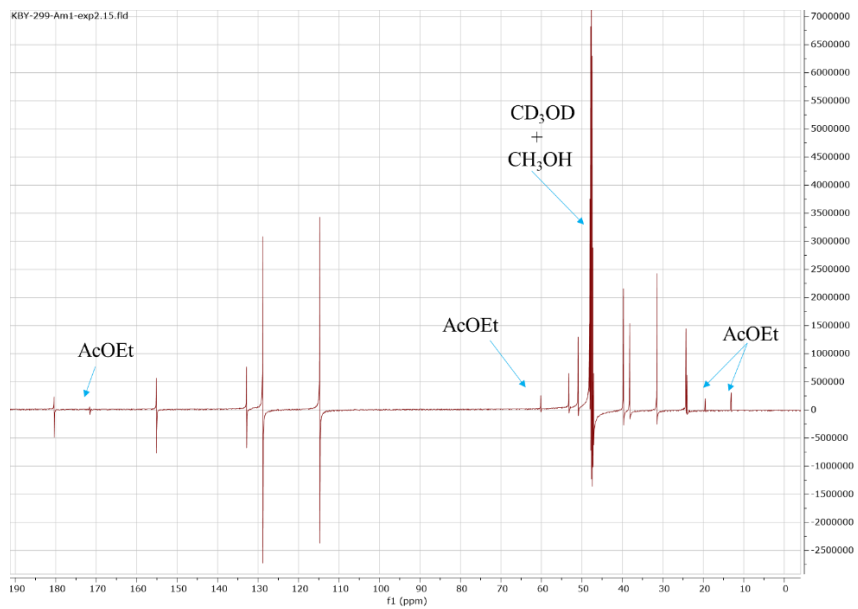


Figure S2. ¹³C NMR of PPI-1-PhA in CD₃OD

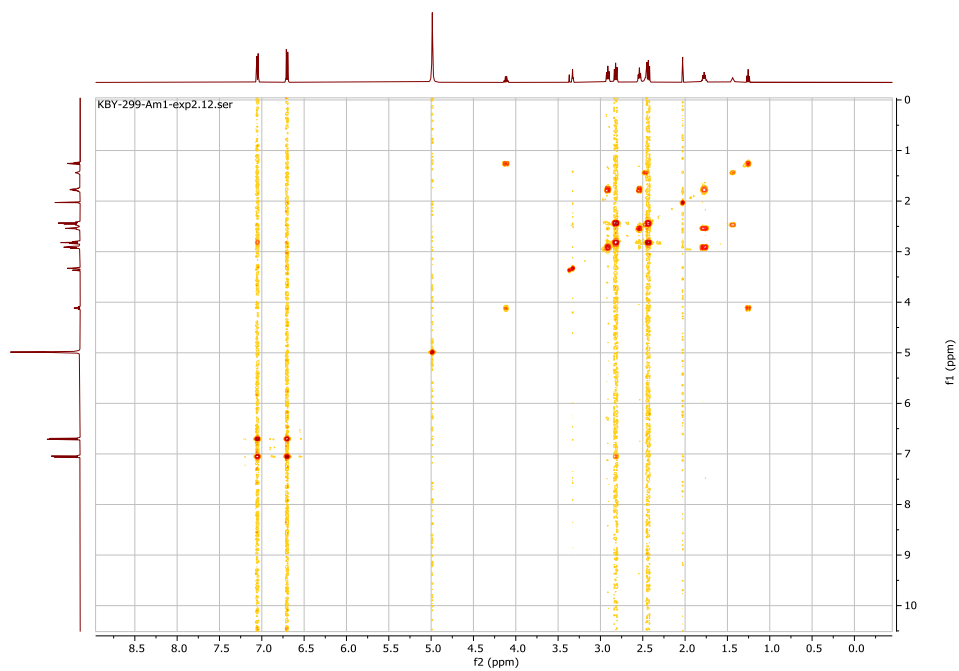


Figure S3. COSY NMR of PPI-1-PhA in CD₃OD

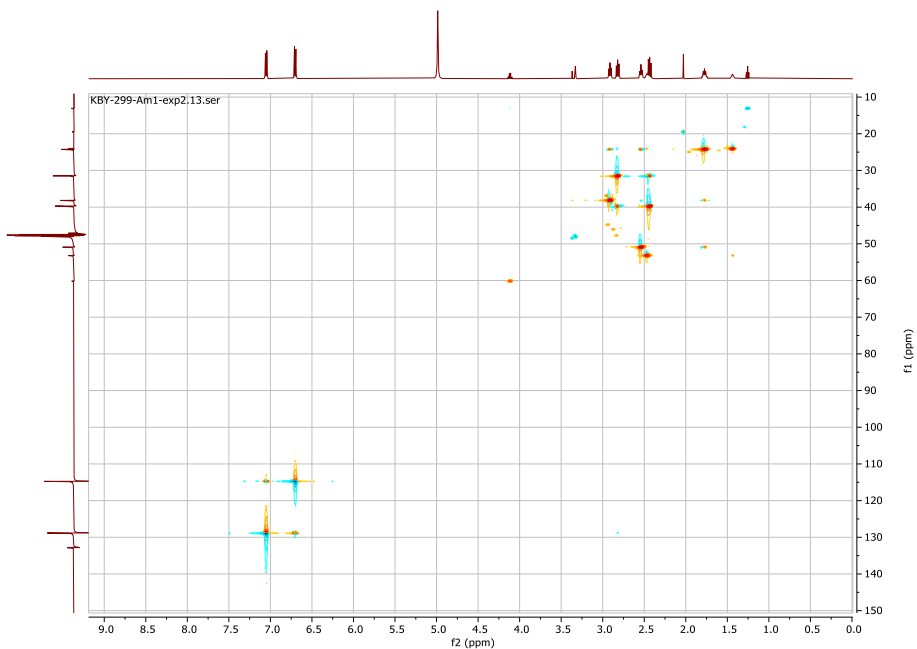


Figure S4. HSQC NMR of PPI-1-PhA in CD₃OD

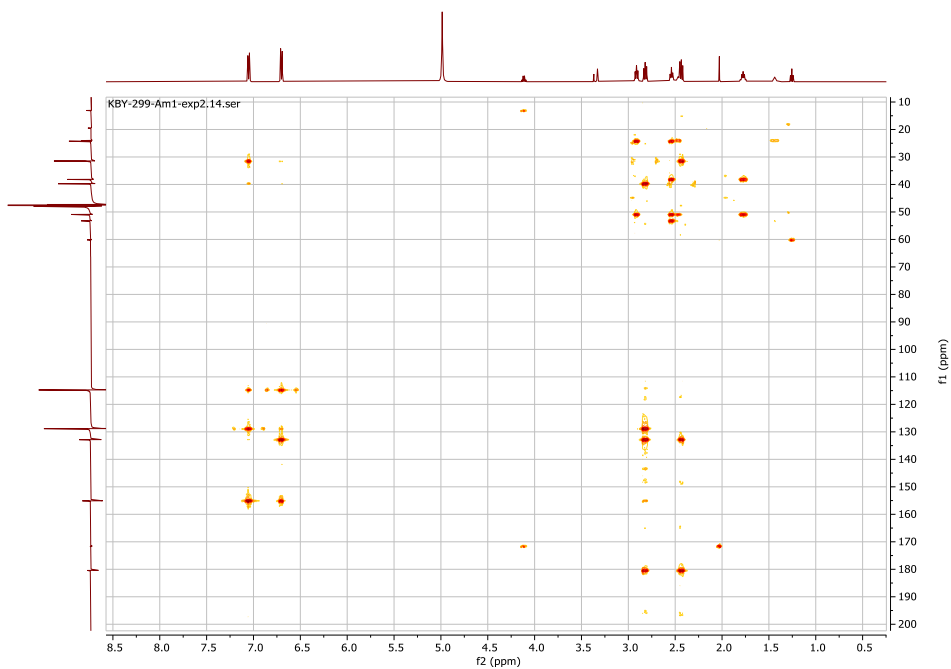


Figure S5. HMBC NMR of PPI-1-PhA in CD₃OD

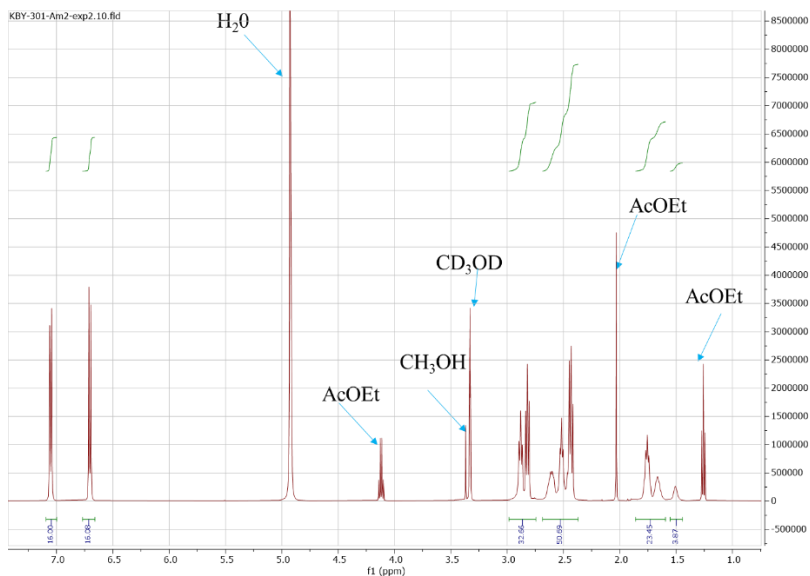


Figure S6. ^1H NMR of PPI-2-PhA in CD_3OD

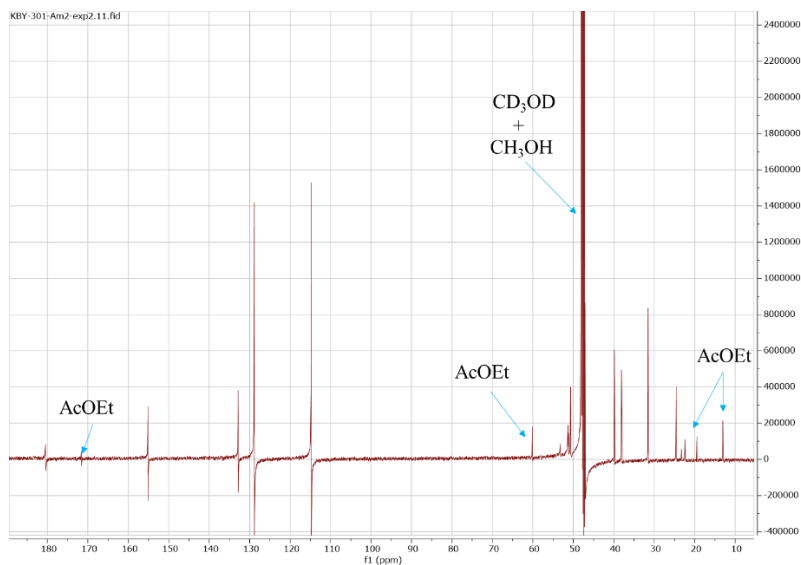


Figure S7. ^{13}C NMR of PPI-2-PhA in CD_3OD

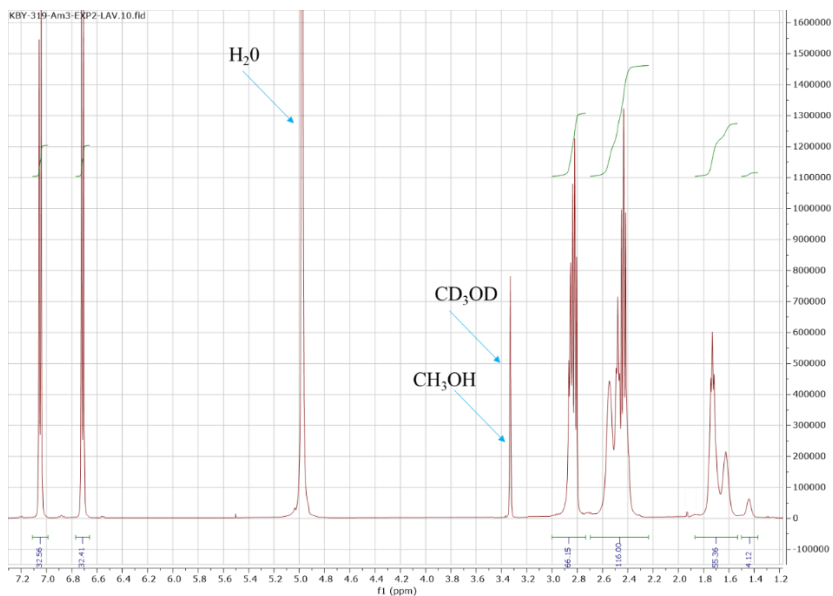


Figure S8. ¹H NMR of PPI-3-PhA in CD₃OD

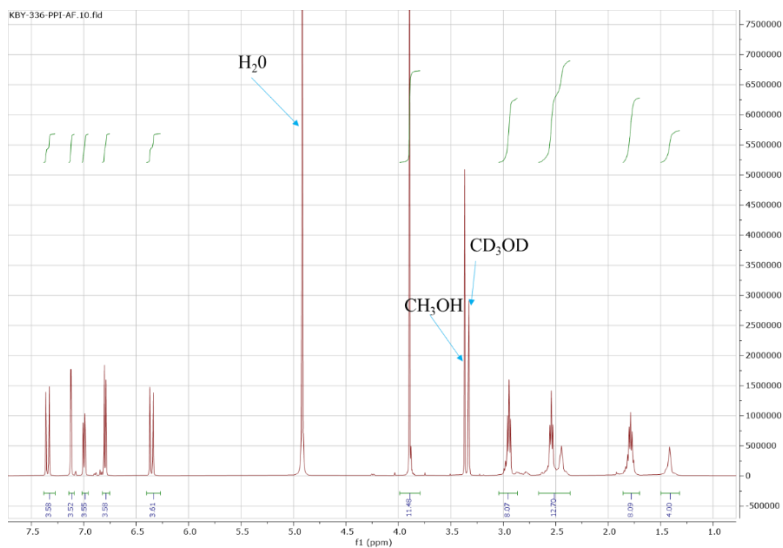


Figure S9. ¹H NMR of PPI-1-FA in CD₃OD

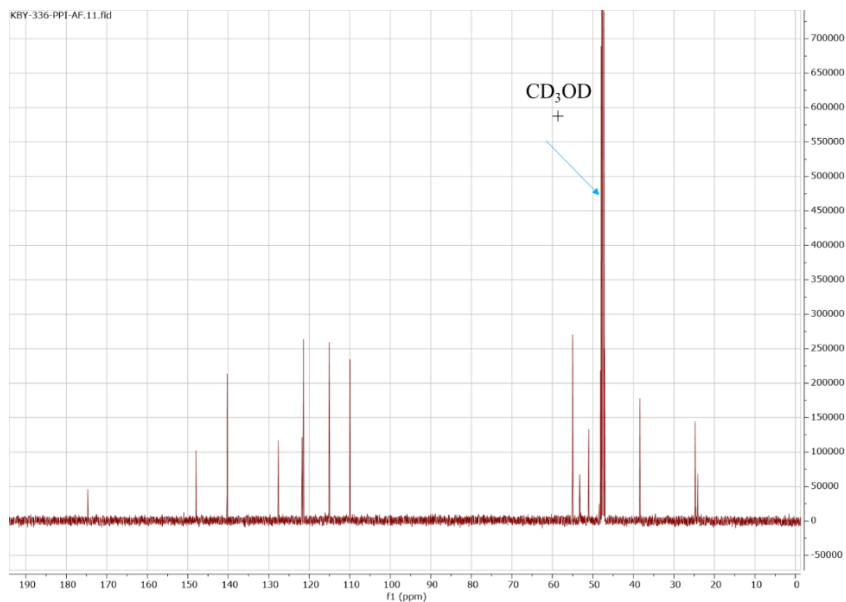


Figure S10. ¹³C NMR of PPI-1-FA in CD₃OD

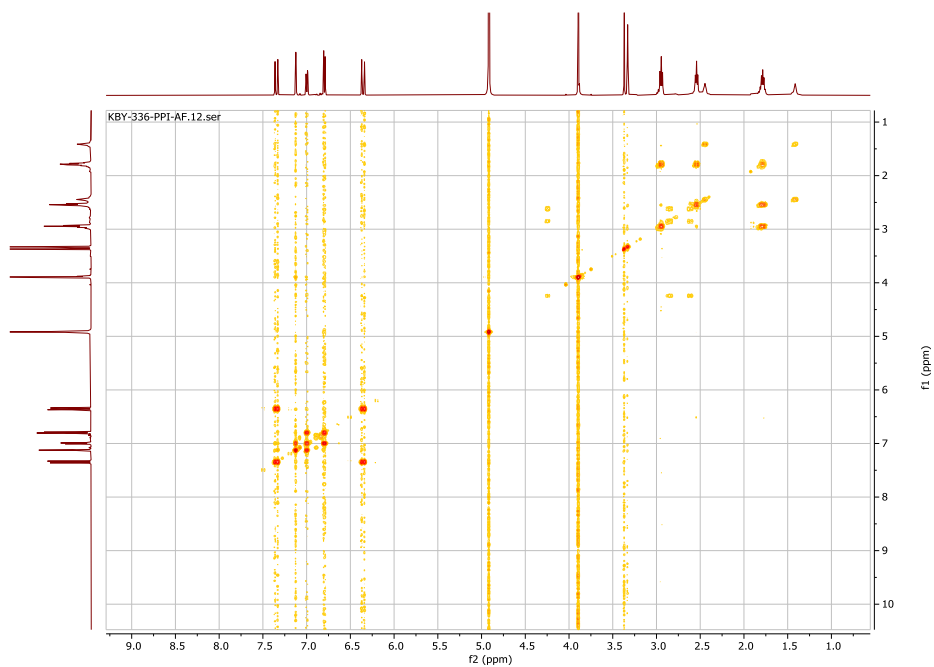


Figure S11. COSY NMR of PPI-1-FA in CD₃O

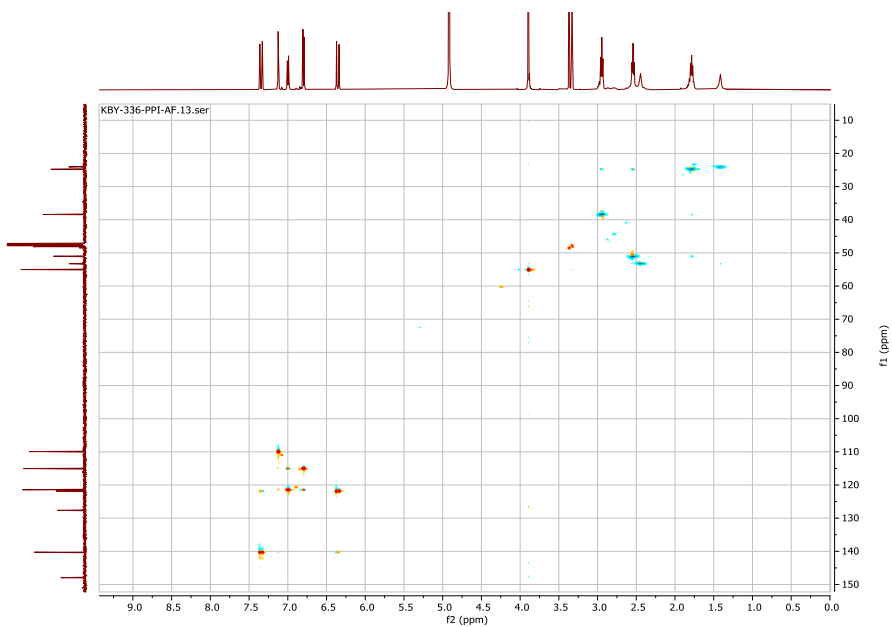


Figure S12. HSQC NMR of PPI-1-FA in CD₃OD

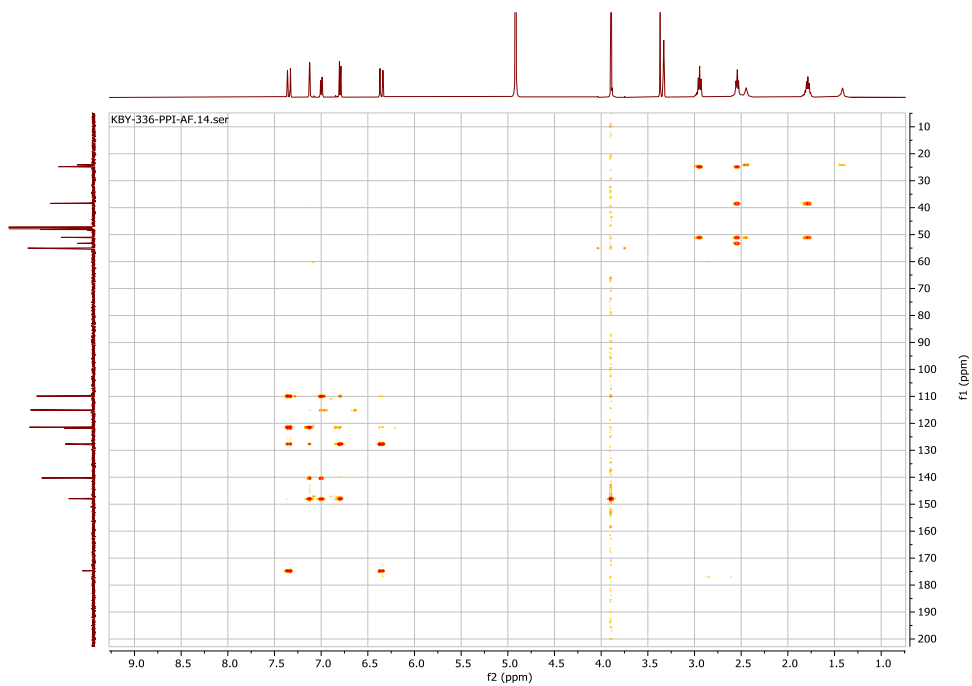


Figure S13. HMBC NMR of PPI-1-FA in CD₃OD

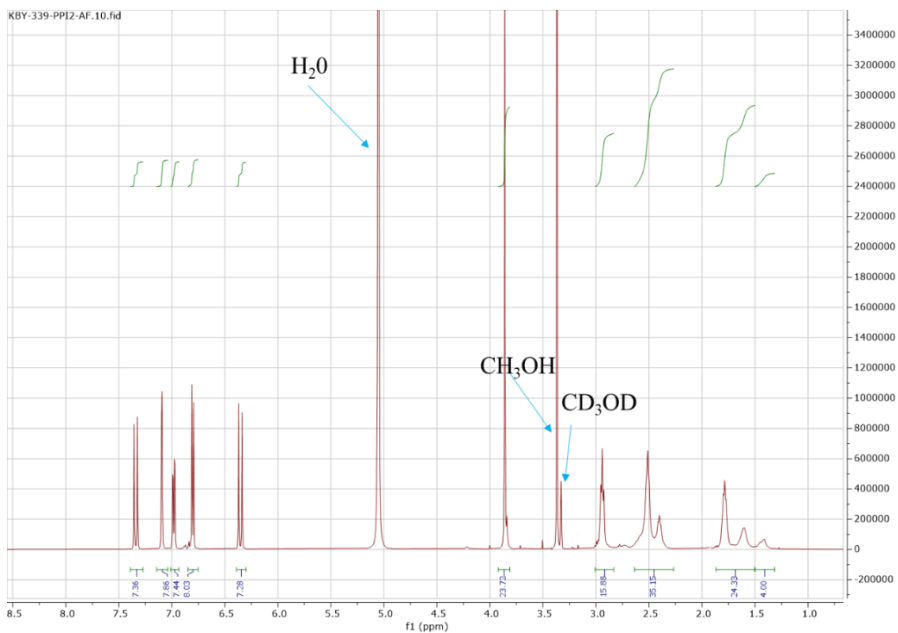


Figure S14. ¹H NMR of PPI-2-FA in CD₃OD

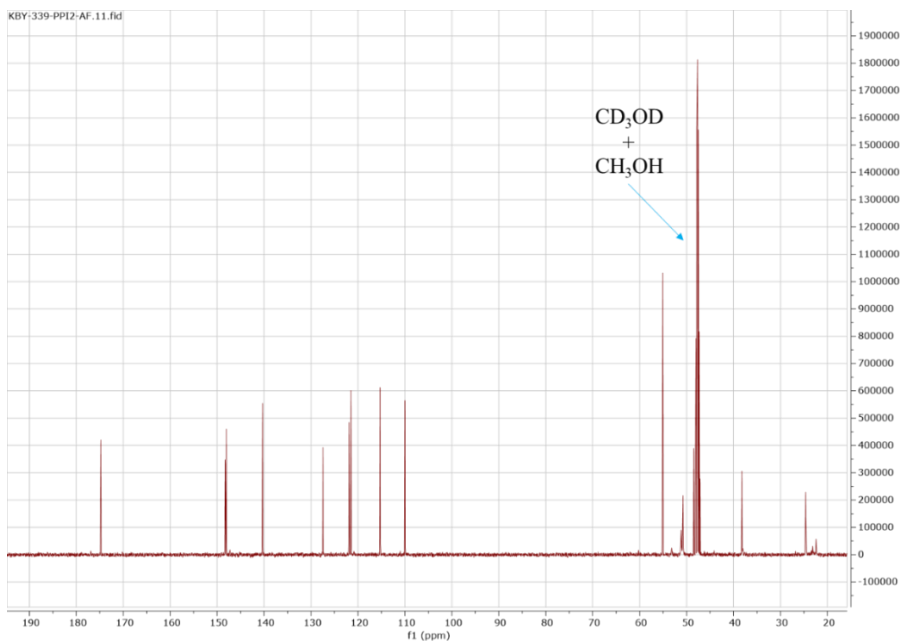


Figure S15. ¹³C NMR of PPI-2-FA in CD₃OD

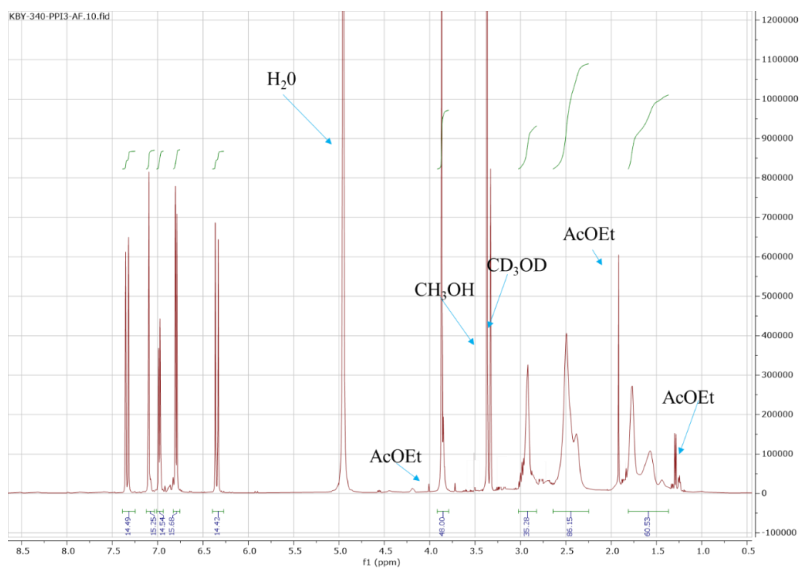


Figure S16. ^1H NMR of PPI-3-FA in CD_3OD

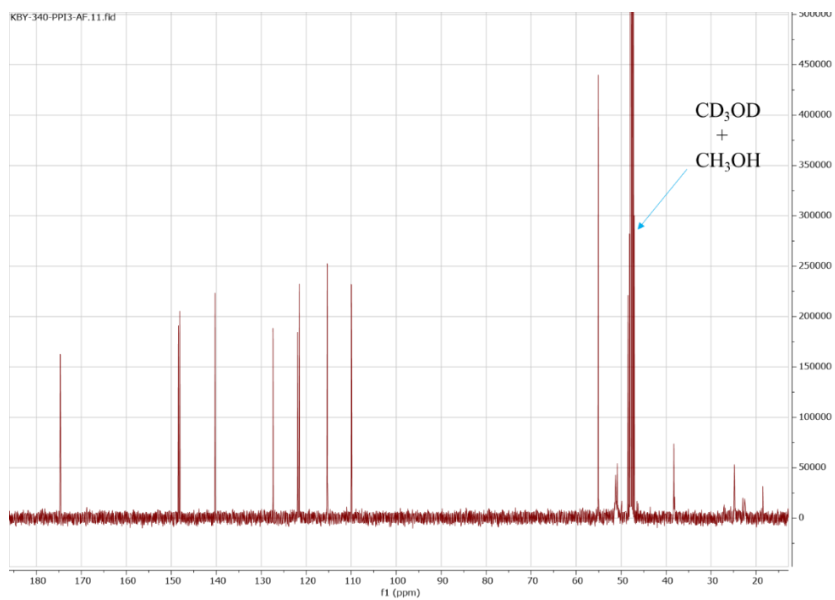


Figure S17. ^{13}C NMR of PPI-3-FA in CD_3OD

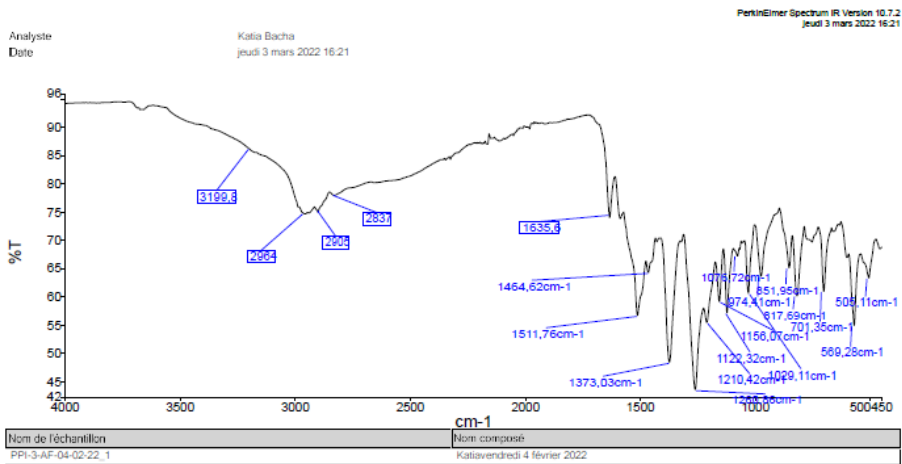


Figure S18. IR of PPI-3-FA

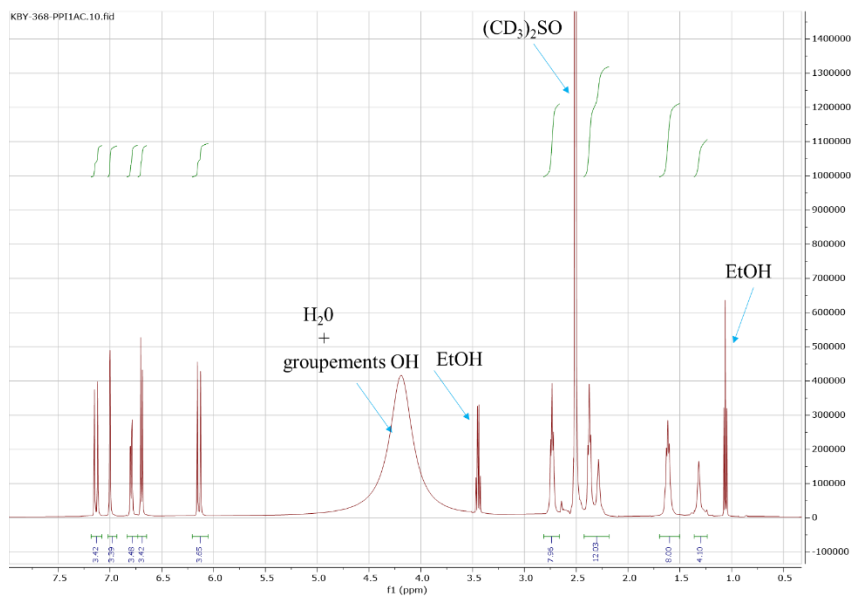


Figure S19. ¹H NMR of PPI-1-CA in $(CD_3)_2SO$

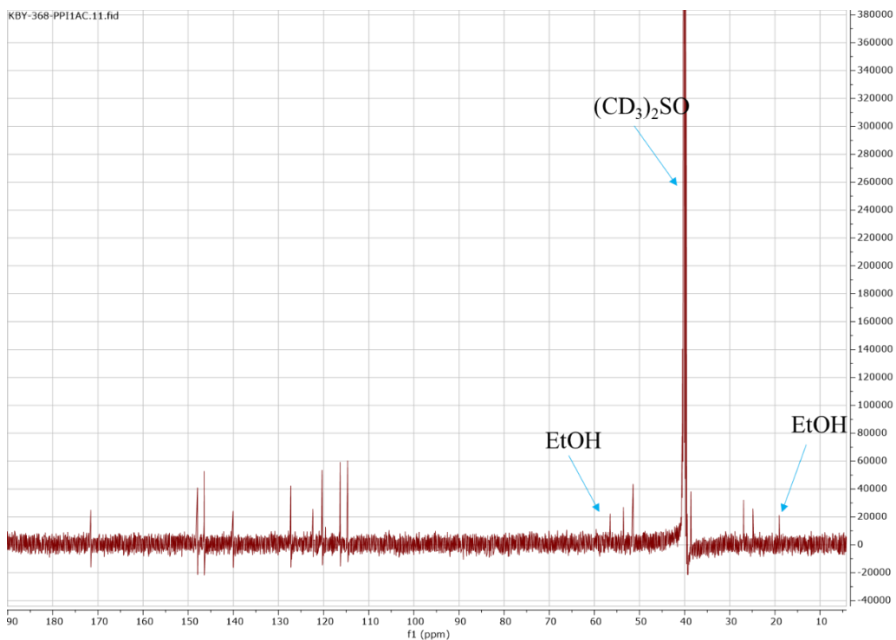


Figure S20. ^{13}C NMR of PPI-1-CA in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$

Nous pouvons noter que les dendrimères dérivés de l'acide caféique sont très peu solubles dans l'eau et le DMSO. Le shim observé est dû à la faible solubilité des produits.

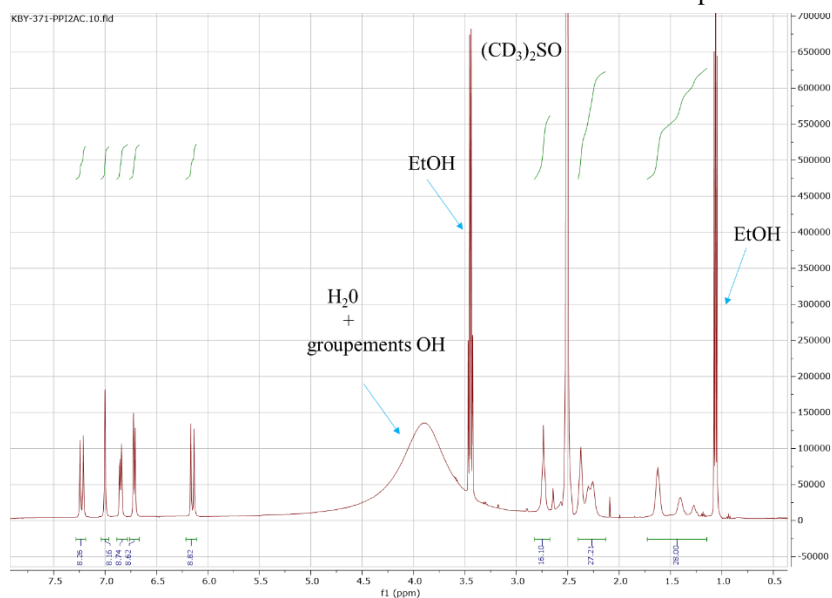


Figure S21. ^1H NMR of PPI-2-CA in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$

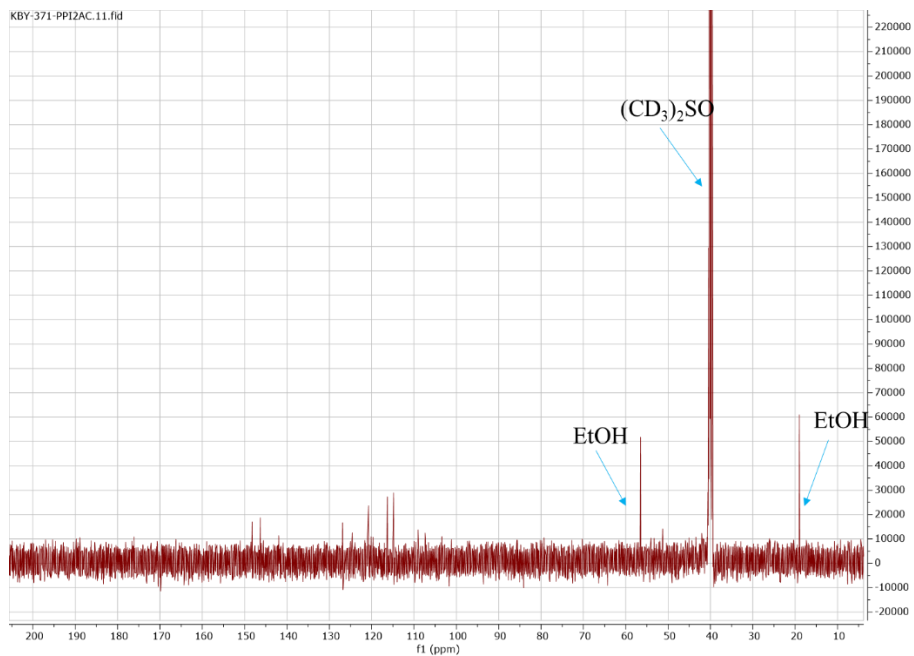


Figure S22. ¹³C NMR of PPI-2-CA in (CD₃)₂SO

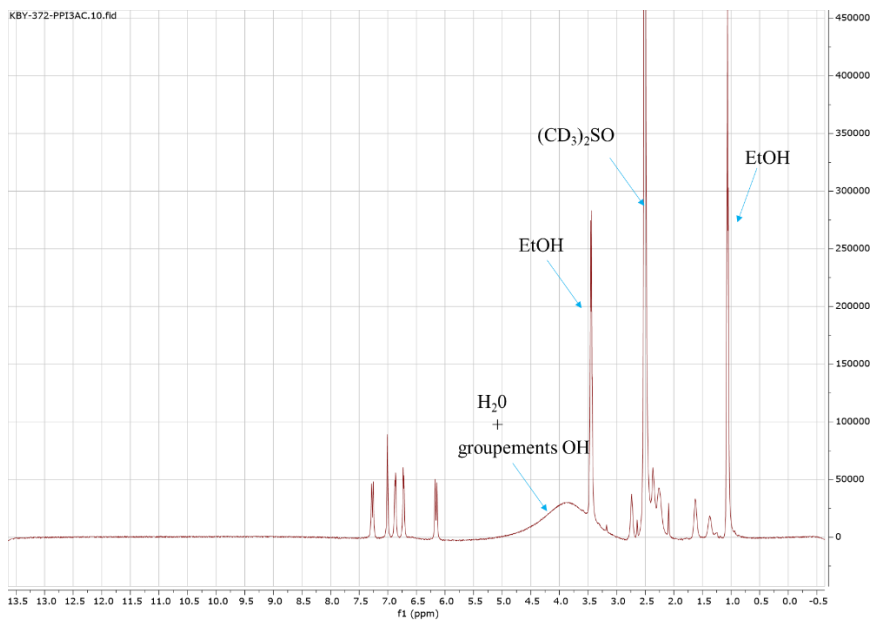


Figure S23. ¹H NMR of PPI-3-CA in (CD₃)₂SO (weak solubility)

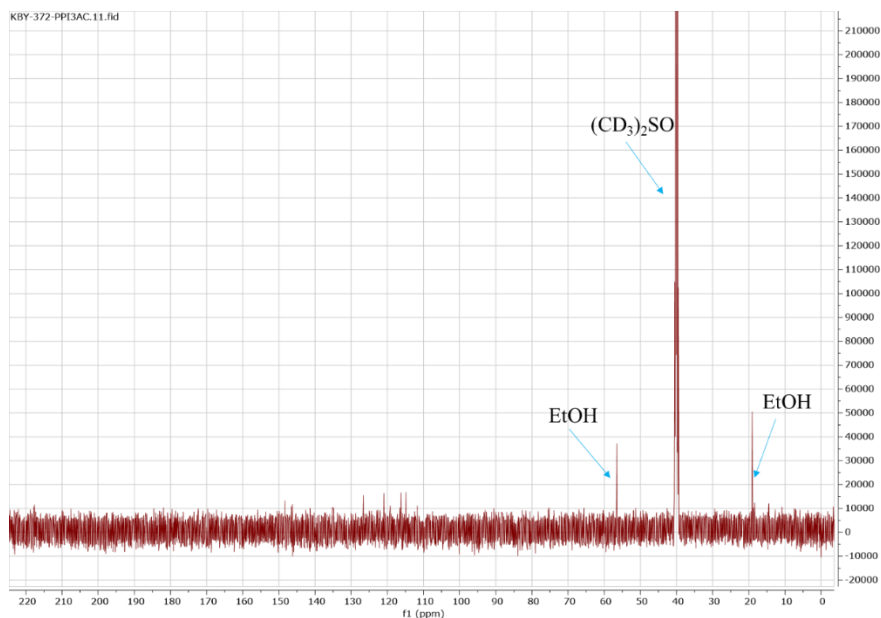


Figure S24. ¹³C NMR de PPI-3-CA in (CD₃)₂SO (weak solubility)

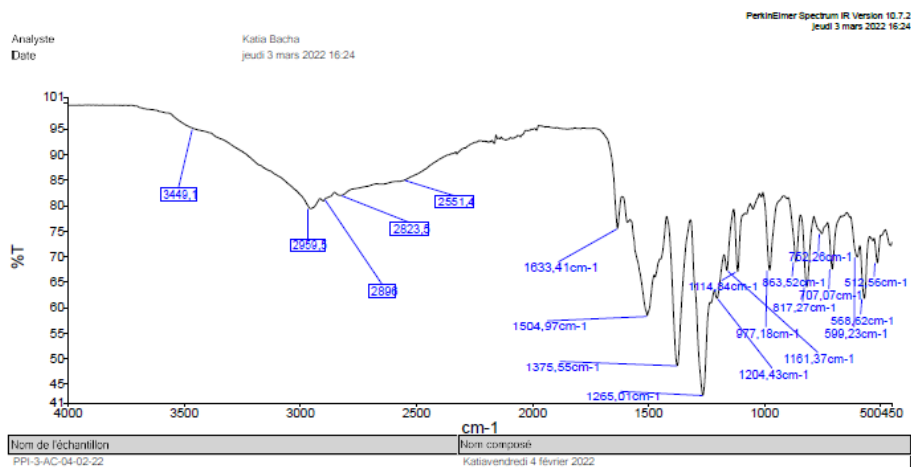


Figure S25. IR of PPI-3-CA

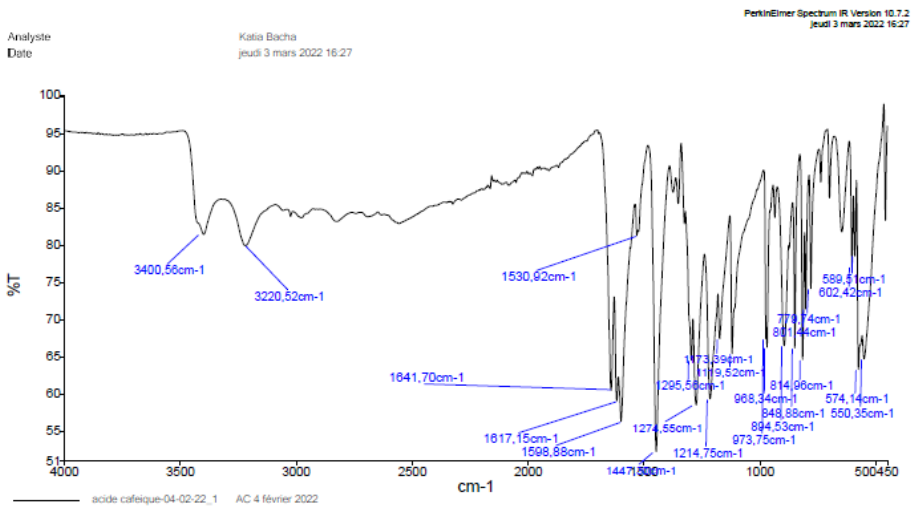


Figure S26. IR of Caffeic acid

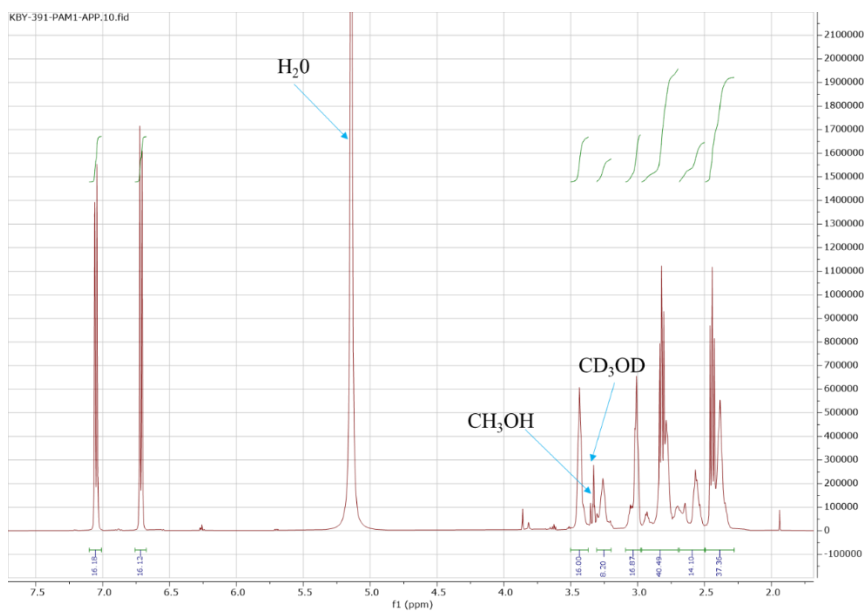


Figure S27. ¹H NMR of PAMAM-1-PhA in CD₃OD

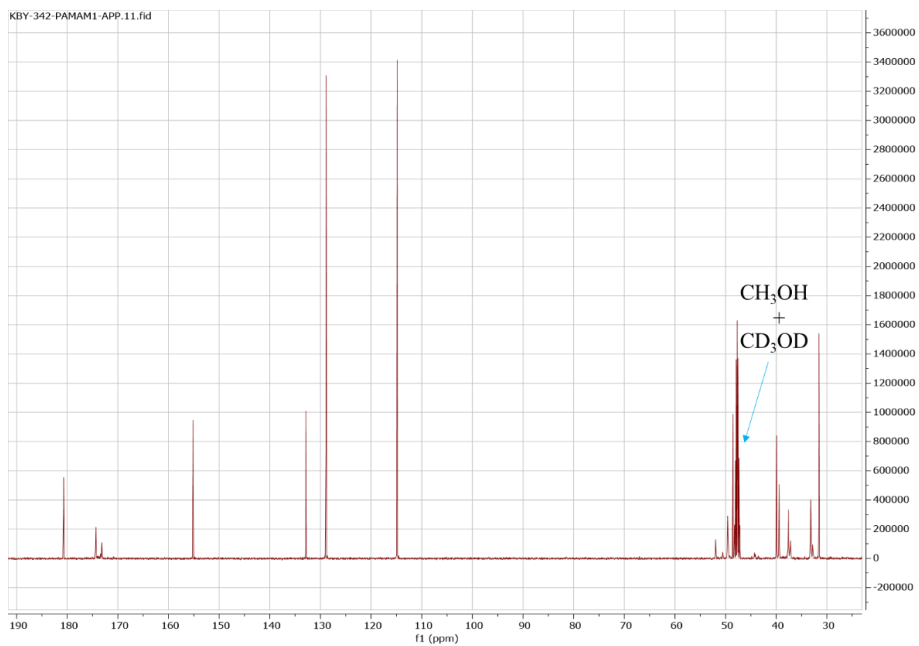


Figure S28. ¹³C NMR of PAMAM-1-PhA in CD₃OD

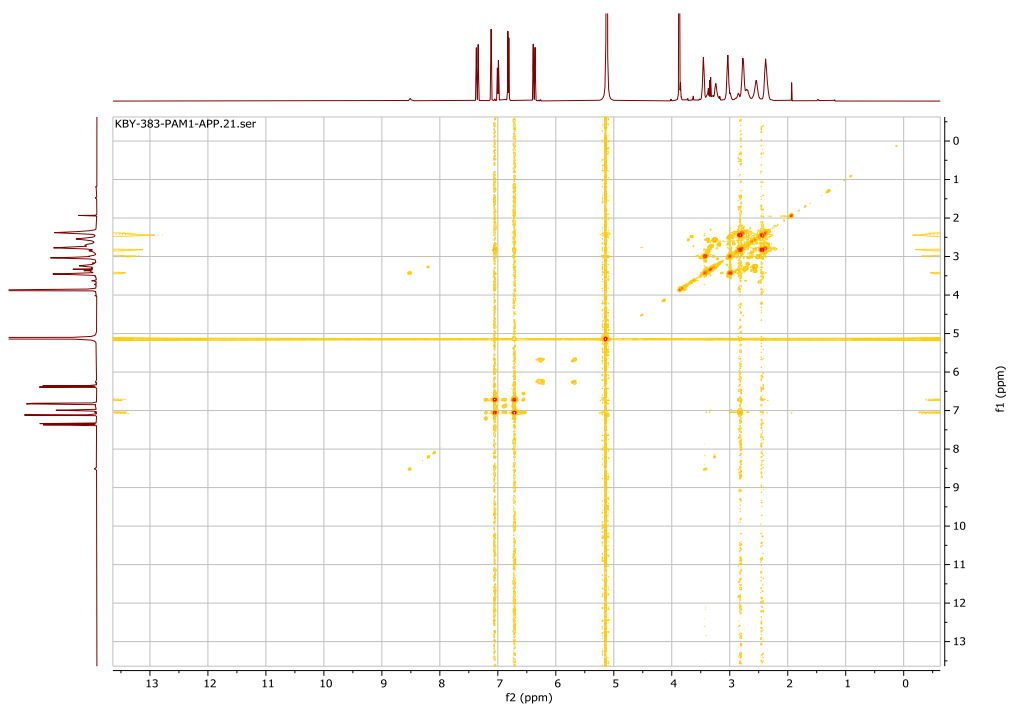


Figure S29. COSY NMR of PAMAM-1-PhA in CD₃OD

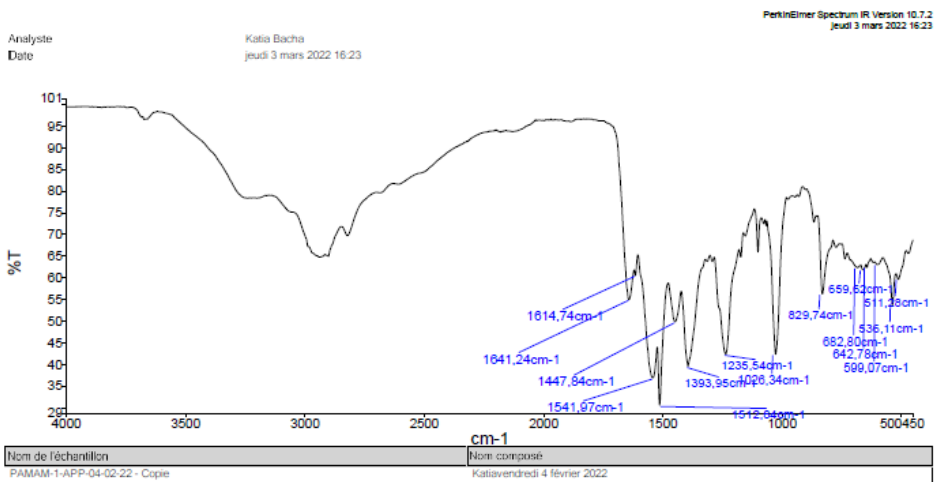


Figure S30. IR of PAMAM-1-PhA

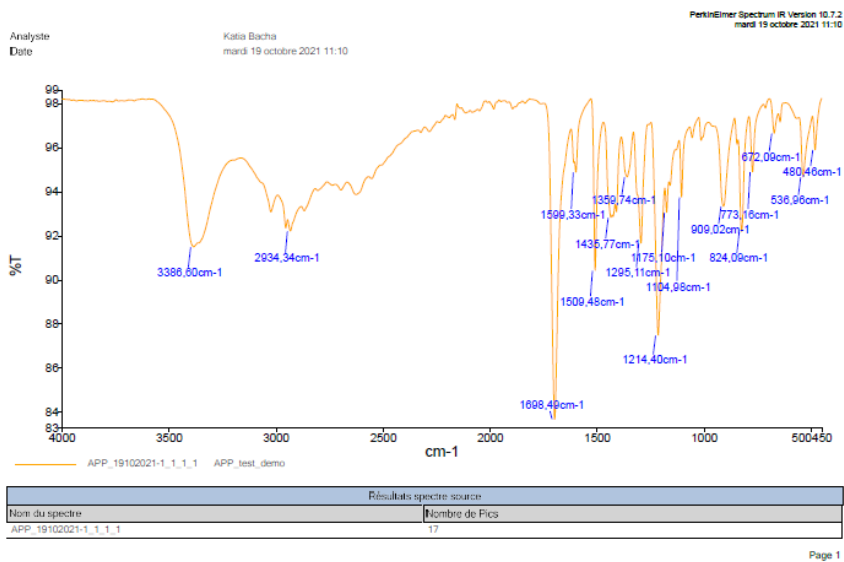


Figure S31. IR of Phloretic acid

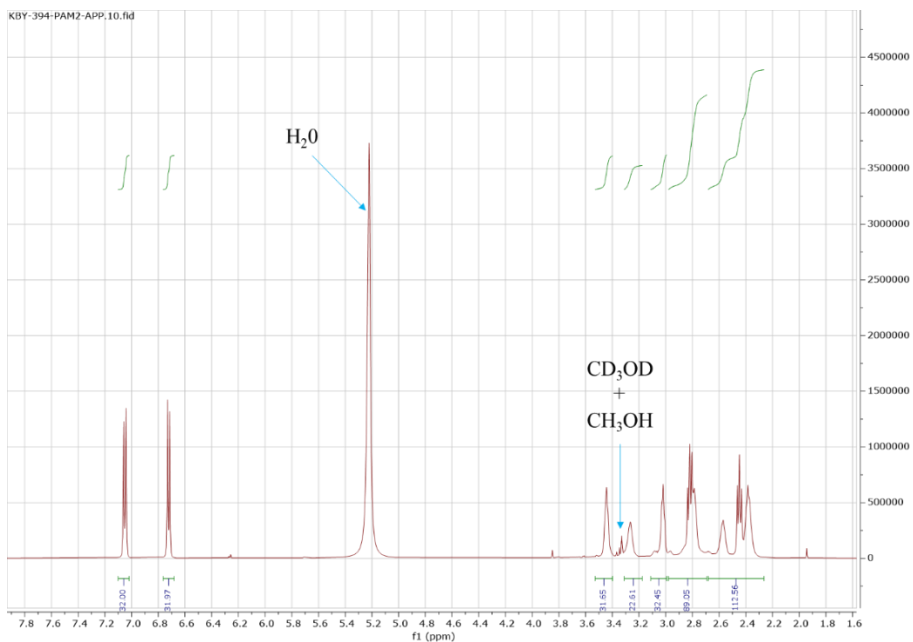


Figure S32. ^1H NMR of PAMAM-2-PhA in CD_3OD

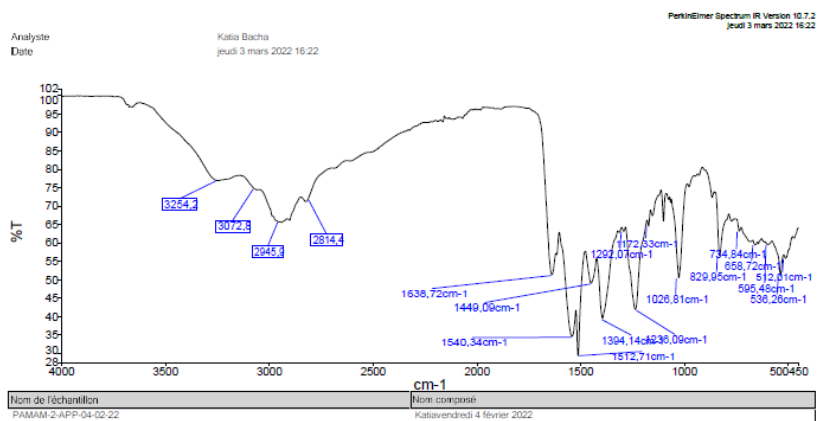


Figure S33. IR of PAMAM-2-PhA

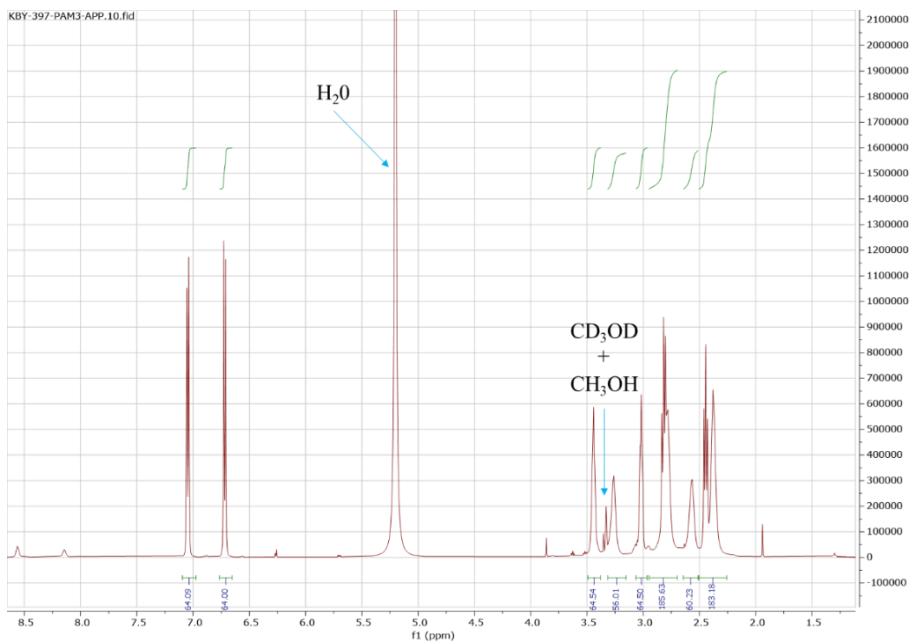


Figure S34. ^1H NMR of PAMAM-3-PhA in CD_3OD

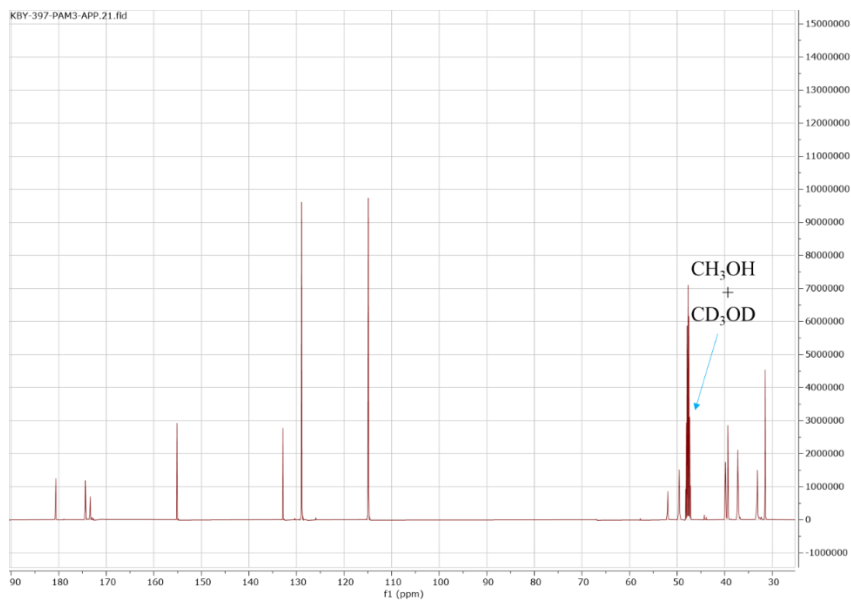


Figure S35. ^{13}C NMR of PAMAM-3-PhA in CD_3OD

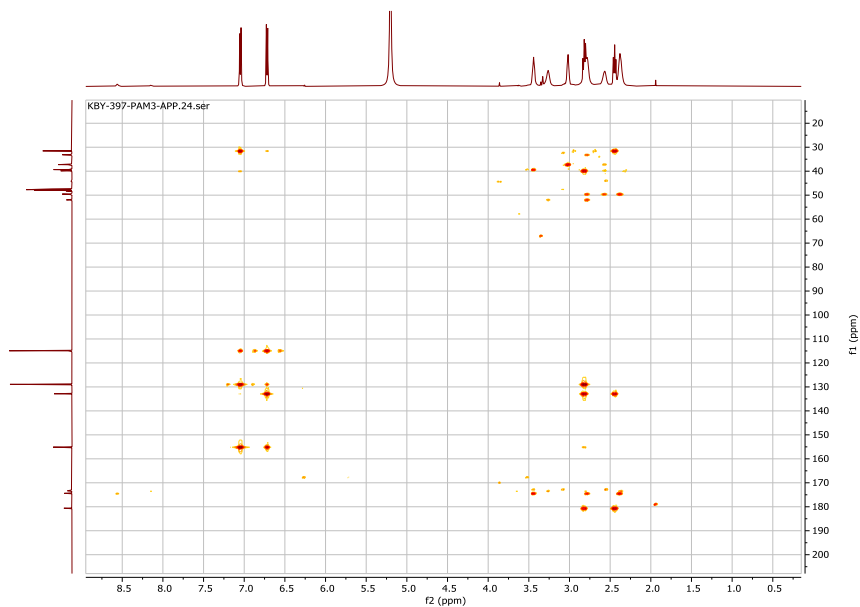


Figure S36. HMBC NMR of PAMAM-3-PhA in CD₃OD

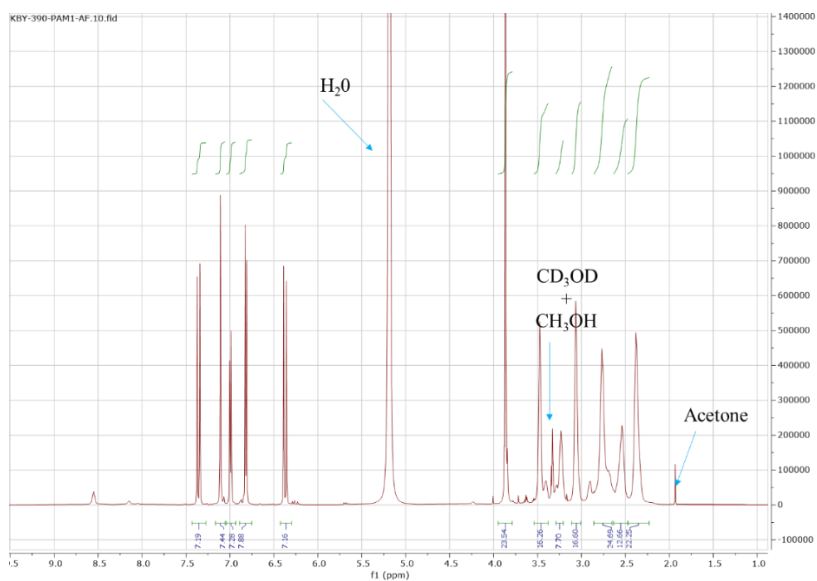


Figure S37. ¹H NMR of PAMAM-1-FA in CD₃OD

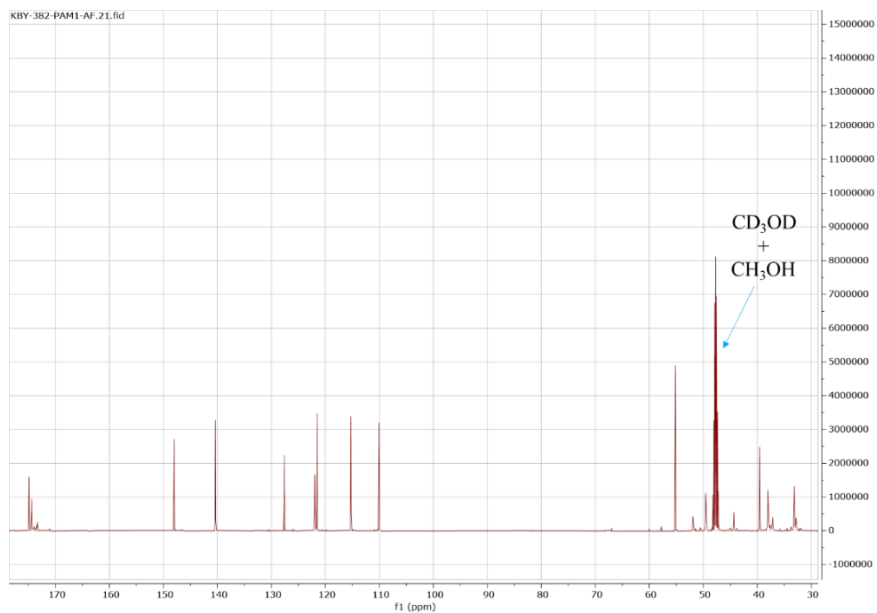


Figure S38. ¹³C NMR of PAMAM-1-FA in CD₃OD

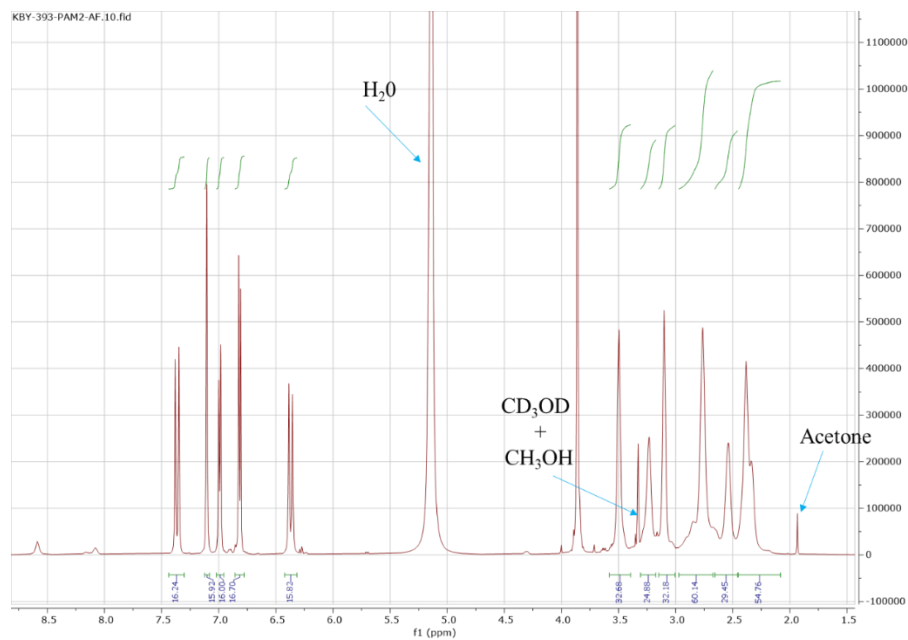


Figure S39. ¹H NMR of PAMAM-2-FA in CD₃OD

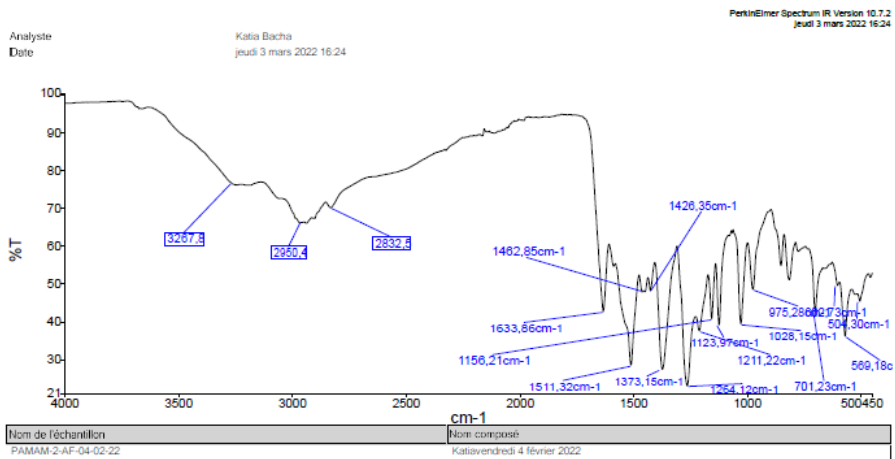


Figure S40. IR of PAMAM-2-FA

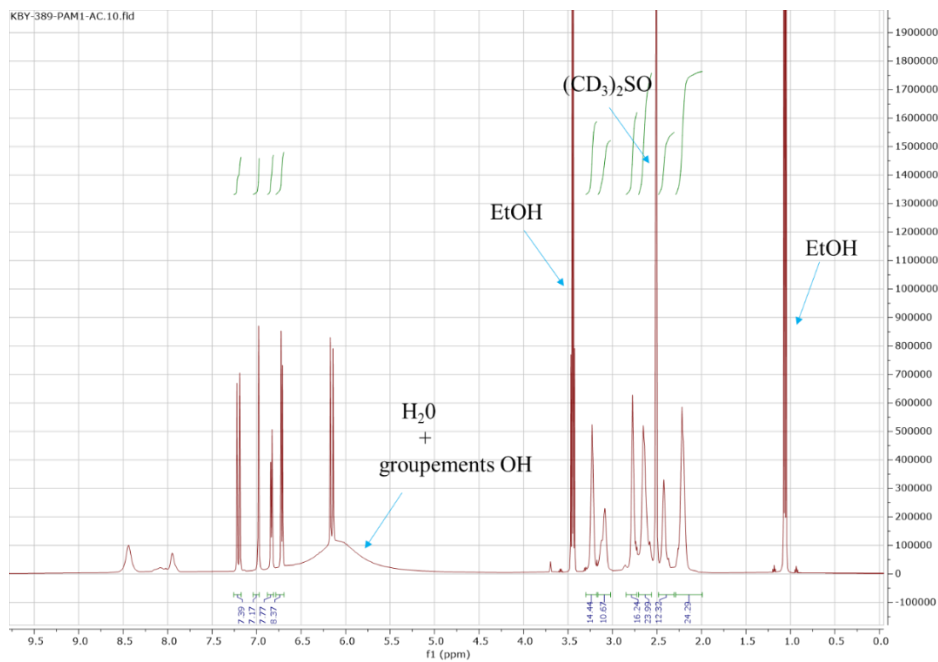


Figure S41. ¹H NMR of PAMAM-1-CA in (CD₃)₂SO

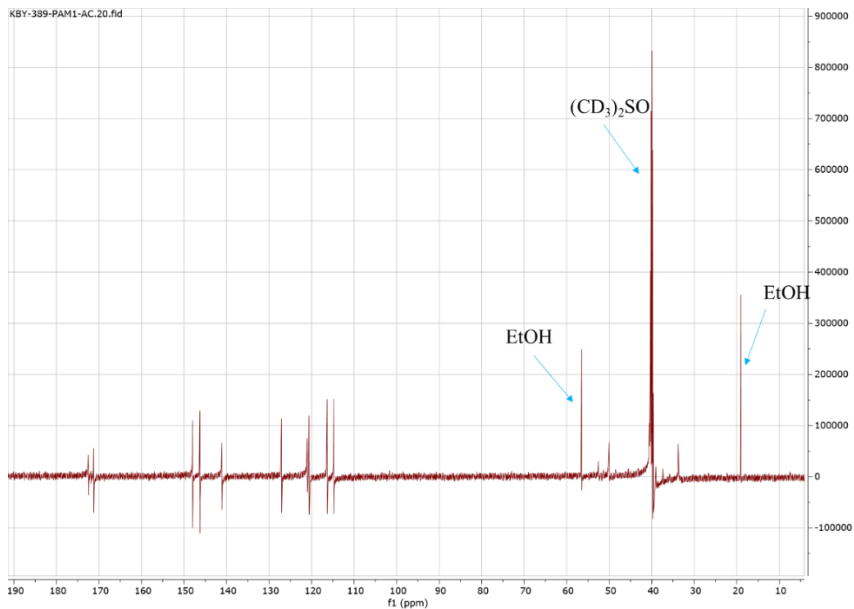


Figure S42. ^{13}C NMR of PAMAM-1-CA in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$

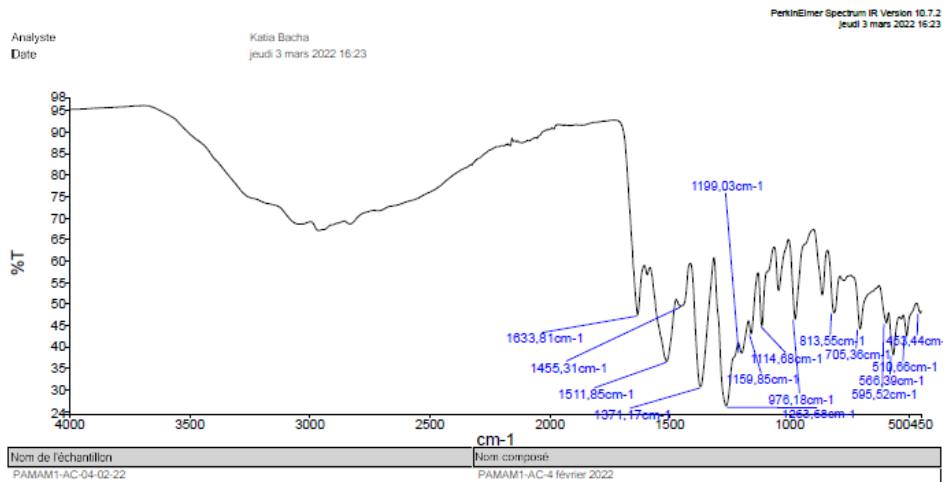


Figure S43. IR of PAMAM-1-CA

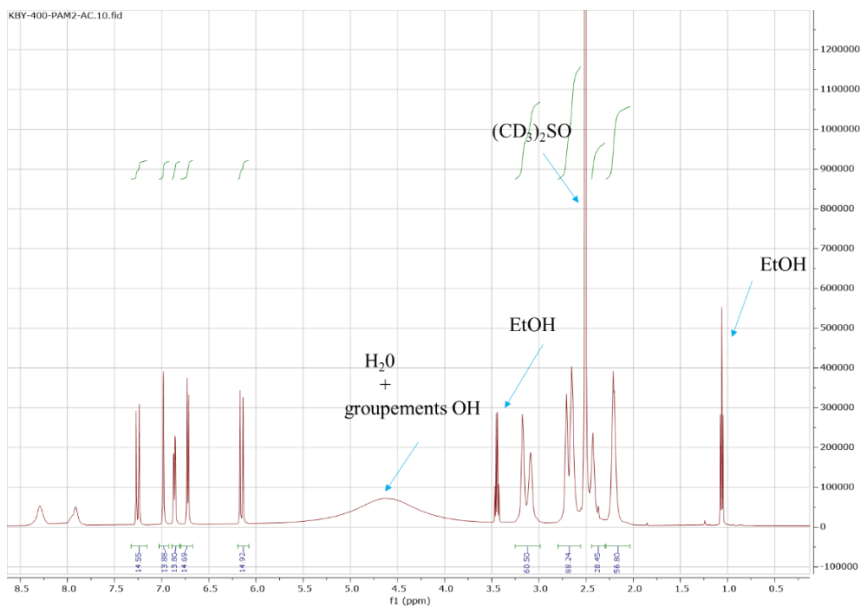


Figure S44. ¹H NMR of PAMAM-2-CA in (CD₃)₂SO

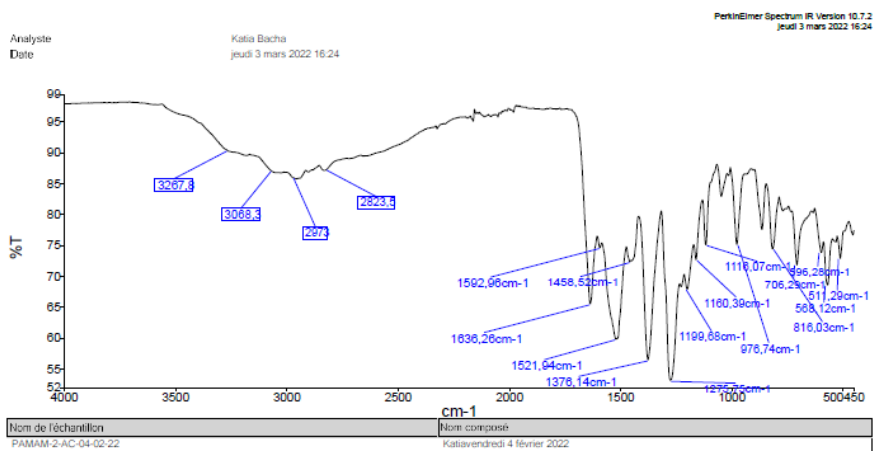


Figure S45. IR of PAMAM-2-CA

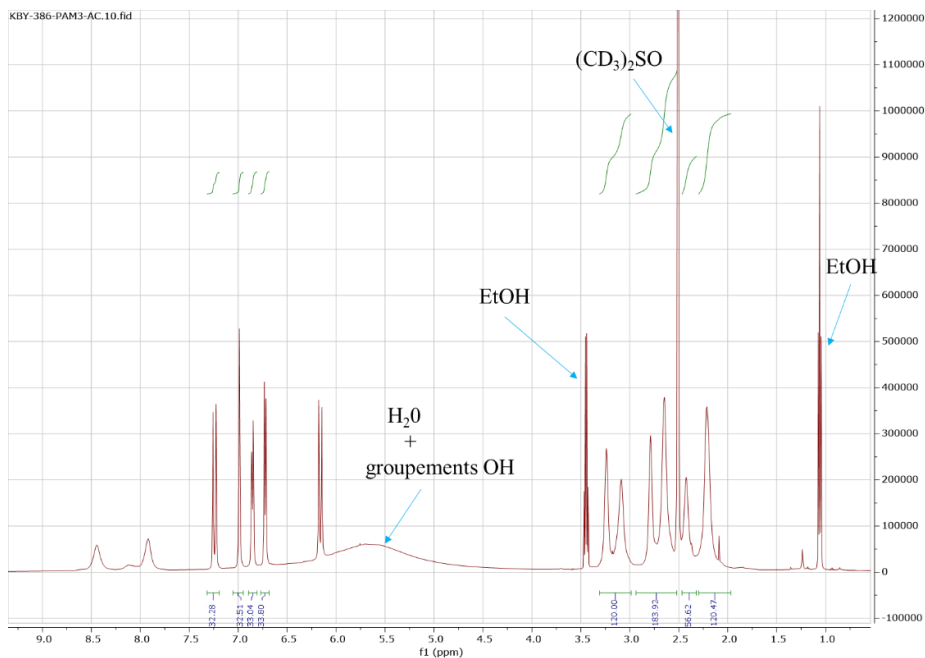


Figure S46. ^1H NMR of PAMAM-3-CA in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$

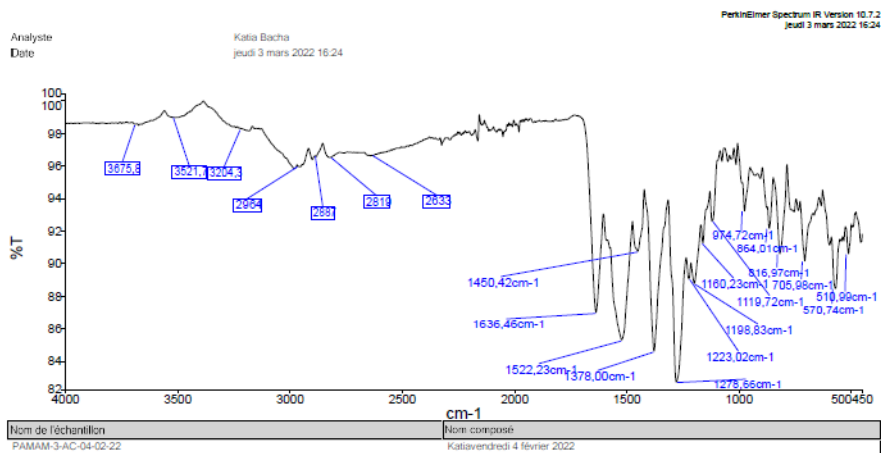


Figure S47. IR of PAMAM-3-CA

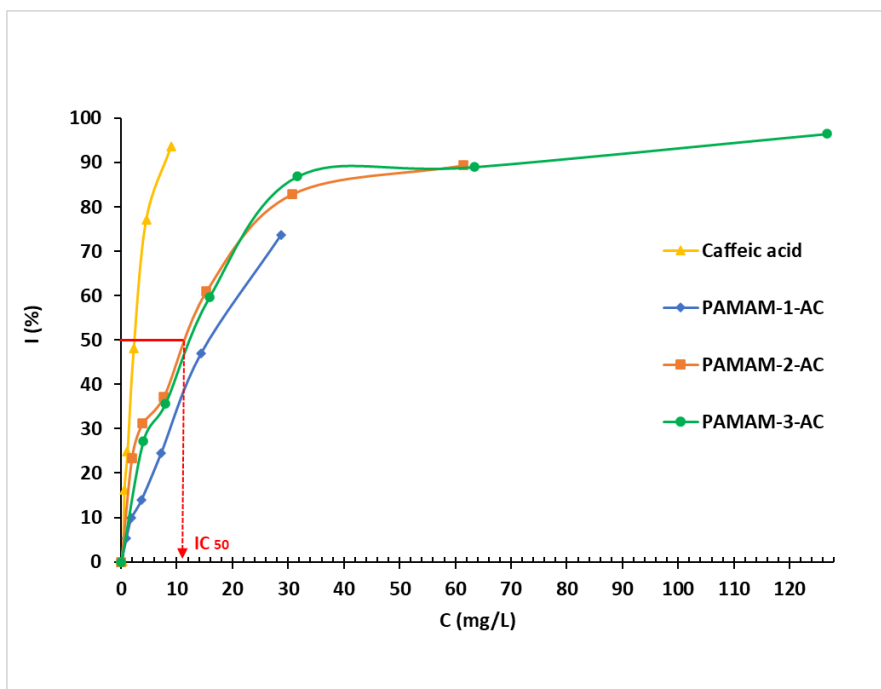


Figure S 48. Inhibition of DPPH (300 μ mol or 118.3 mg/L) by caffeic acid derived-PAMAM dendrimers

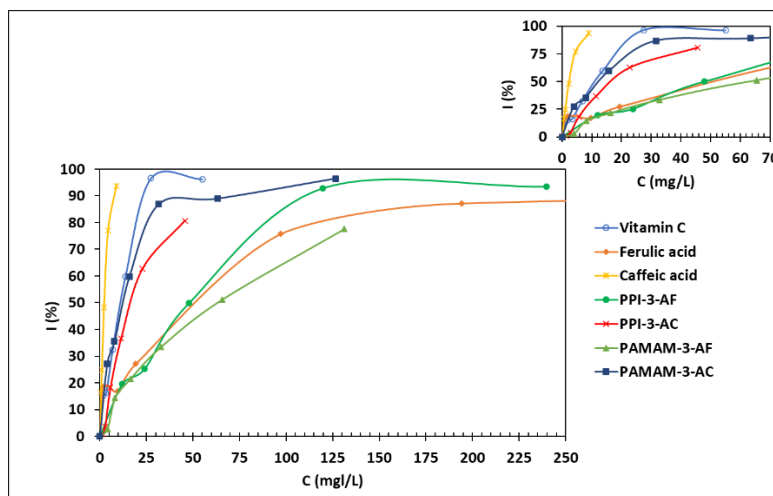


Figure S49. Inhibition of DPPH (300 μ mol or 118.3 mg/L) by ionic antioxidant dendrimers

Table S1. IC₅₀ (mg/L)

Entry	Samples	IC₅₀ (mg/L)	Standard deviation
1	Vitamin C	10.92	± 0.3
2	Ferulic acid	52.42	± 4.6
3	PPI-1-FA (4 FA units)	32.79	± 1.9
4	PPI-2-FA (8 FA units)	39.61	± 4.9
5	PPI-3-FA (16 FA units)	47.92	± 12.4
6	PAMAM-1-FA (8 FA units)	65.63	± 5.9
7	PAMAM-2-FA (16 FA units)	54.72	± 8.3
8	PAMAM-3-FA (32 FA units)	62.99	± 10.5
9	Caffeic acid	2.34	± 0.2
10	PPI-1-CA (4 CA units)	10.47	± 1.3
11	PPI-2-CA (8 CA units)	16.64	± 2.2
12	PPI-3-CA (16 CA units)	15.99	± 5.0
13	PAMAM-1-CA (8 CA units)	15.50	± 3.1
14	PAMAM-2-CA (16 CA units)	11.04	± 5.5
15	PAMAM-3-CA (32 CA units)	12.67	± 5.1
16	PAMAM-3-PhA	5868.44	± 52.6

Annexes 2:

Supplementary Materials: *Molecules* 2022, 27, 8022,
<https://doi.org/10.3390/molecules27228022>

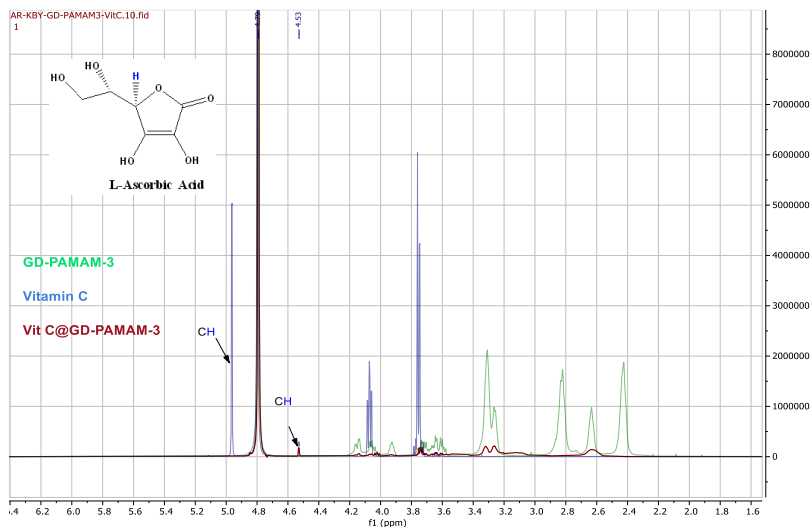


Figure S50. ¹H NMR of GD-PAMAM-3 (green), Vitamin C (blue) and Vit C@GD-PAMAM-3 (red) in D₂O

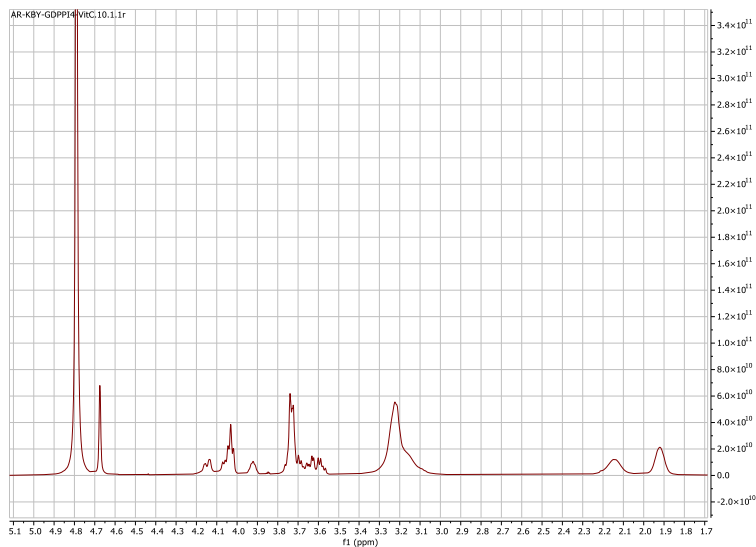


Figure S51. ¹H NMR of Vit C@GD-PPI-4 in D₂O

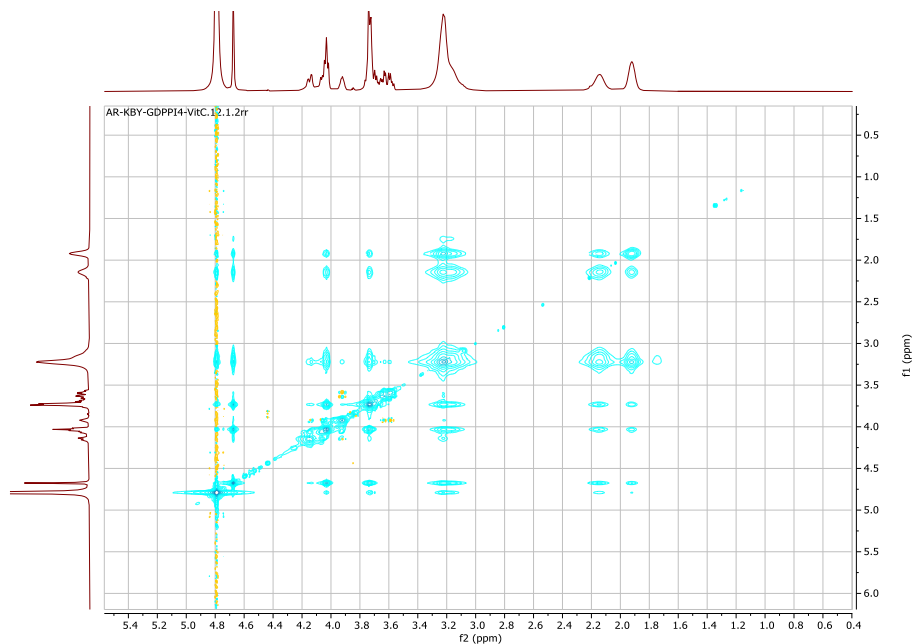


Figure S52. Vit C@GD-PPI-4 NOESY NMR shows NOE interactions between the protons of vitamin C (3.73, 4.03 and 4.64 ppm) with those of the GD-PPI-4 (1.92, 2.14 and 3.22 ppm) in D₂O

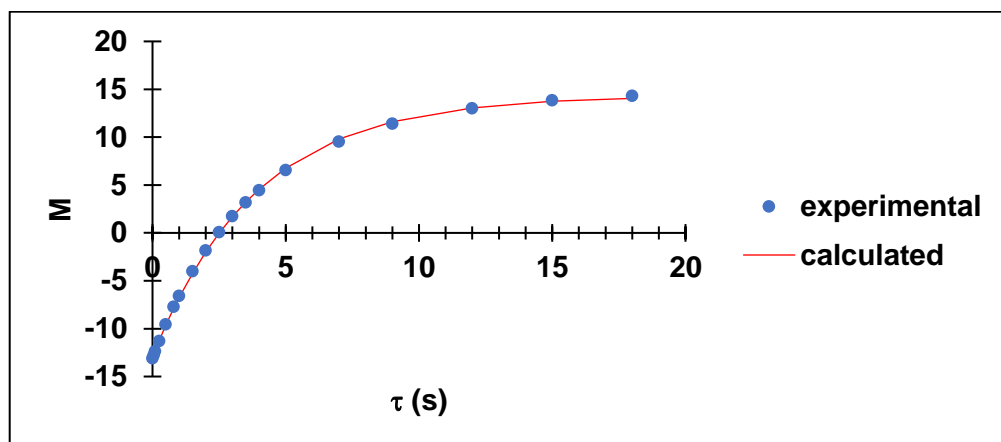


Figure S53. T₁ measurements of free Vitamin C.

Experimental (blue dot) and calculated (red line) determination of T₁ for the ¹H (at 4.95ppm which have the biggest value of T₁) of free Vitamin C by inversion-recovery pulse sequence.

We fit the curve by $M = M_0 \left(1 - k \exp\left(\frac{-\tau}{T_1}\right) \right)$ where M is the magnetization, M_0 is the magnetization at $\tau = 0$ s, τ is the delay between the 180° and 90° pulses, and k is the efficiency of 180° pulse (if we have 180° pulse, we must have $k = 2$).

We find $M_0 = 14.3$, $k = 1.9$ and $T_1 = 3.9$ s by this NMR sequence with 30s of recycle delay (delay $> 5 \times T_1$).

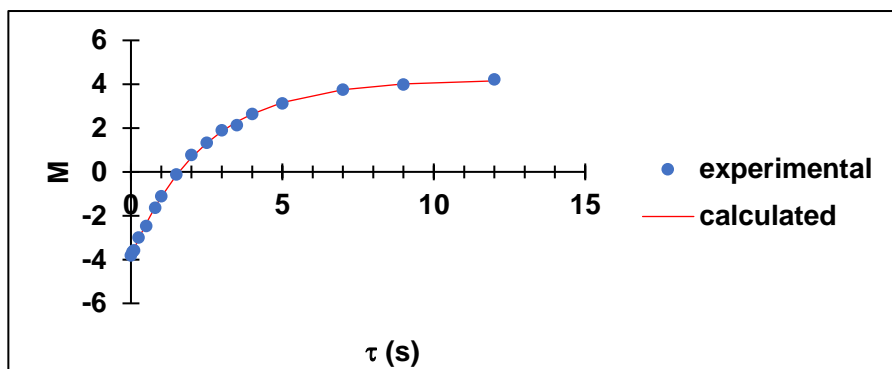


Figure S54. T_1 measurements of Vitamin C with GD-PAMAM3.

Experimental (blue dot) and calculated (red line) determination of T_1 for the ^1H (at 4.53ppm which have the biggest value of T_1) of Vitamin-C with GD-PAMAM3 by inversion-recovery pulse sequence. We find $M_0 = 4.2$, $k = 1.91$ and $T_1 = 2.45$ s by this NMR sequence with 40s of recycle delay (delay $> 5 \times T_1$).

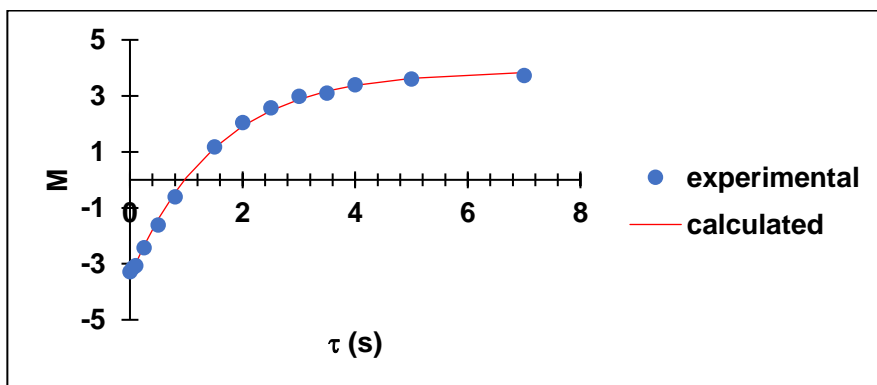


Figure S55. T_1 measurements of Vitamin C with GD-PPI4.

Experimental (blue dot) and calculated (red line) determination of T_1 for the ^1H (at 4.68ppm which have the biggest value of T_1) of Vitamin C with GD-PPI4 by inversion-recovery pulse

sequence. We find $M_0 = 3.9$, $k = 1.89$ and $T_1 = 1.5$ s by this NMR sequence with 40s of recycle delay (delay $> 5 \times T_1$).

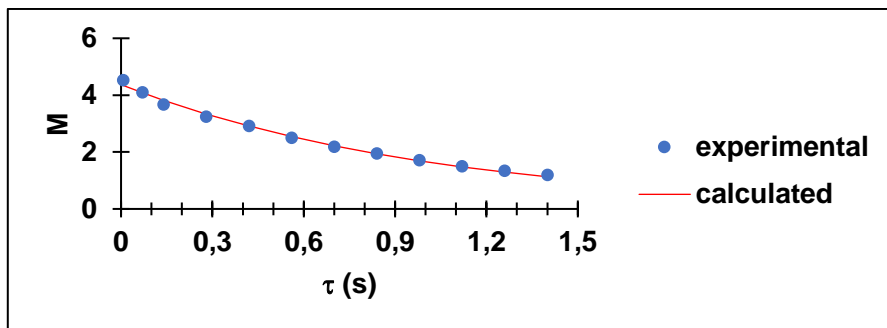


Figure S56. T2 measurements of free Vitamin C.

Experimental (blue dot) and calculated (red line) determination of T_1 for the ^1H (at 4.08ppm) of free Vitamin C by CPMG pulse sequence. We fit the curve by $M = M_0 \exp\left(\frac{-\tau}{T_2}\right)$ where M is the magnetization, M_0 is the magnetization at $\tau = 0$ s, and τ is the delay between the 90° pulse and the beginning of signal acquisition. We find $M_0 = 4.37$ and $T_2 = 1.0$ s by this NMR sequence with 40s of recycle delay

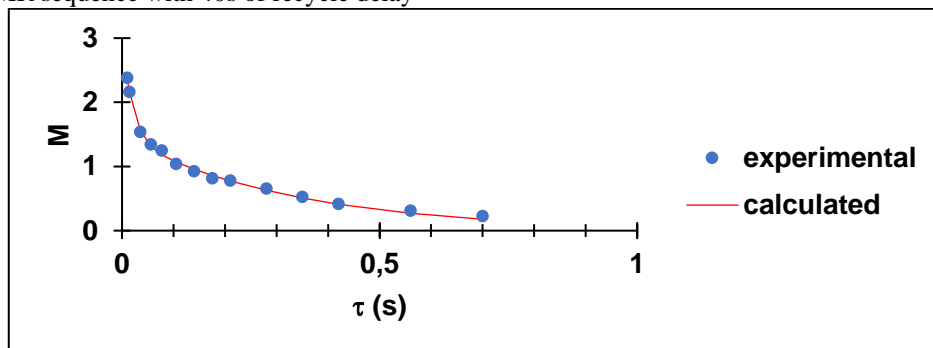


Figure S57. T2 measurements of Vitamin C with GD-PAMAM3.

Experimental (blue dot) and calculated (red line) determination of T_2 for the ^1H (at 4.05ppm) of Vitamin C with GD-PAMAM3 by CPMG pulse sequence. There are two kind of signal (dendrimer and Vitamin-C) so we fit the curve by $M = k_d \times M_{0d} \times \exp\left(\frac{-\tau}{T_{2d}}\right) + k_v \times M_{0v} \times \exp\left(\frac{-\tau}{T_{2v}}\right)$ where subscripts d and v designate dendrimer and vitamin-C respectively. Finally, we find $k_v \times M_{0v} = 1.45$, and $T_2 = 0.33$ s by this NMR sequence with 40s of recycle delay

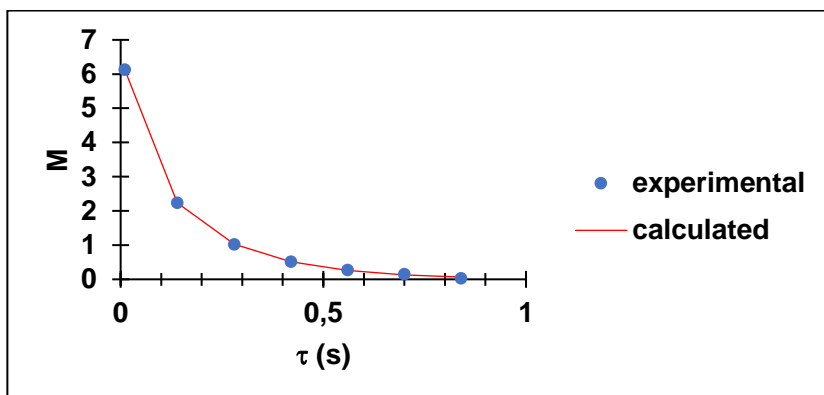


Figure S58. T₂ measurements of Vitamin C with GD-PPI4.

Experimental (blue dot) and calculated (red line) determination of T₂ for the ¹H (at 4.15ppm) of Vitamin-C with GD-PPI4 by CPMG pulse sequence. There are two kinds of signal (dendrimer and Vitamin-C). Finally, we find $k_v \times M_{0v} = 3.87$, and T₂ = 0.20s by this NMR sequence with 10s of recycle delay.

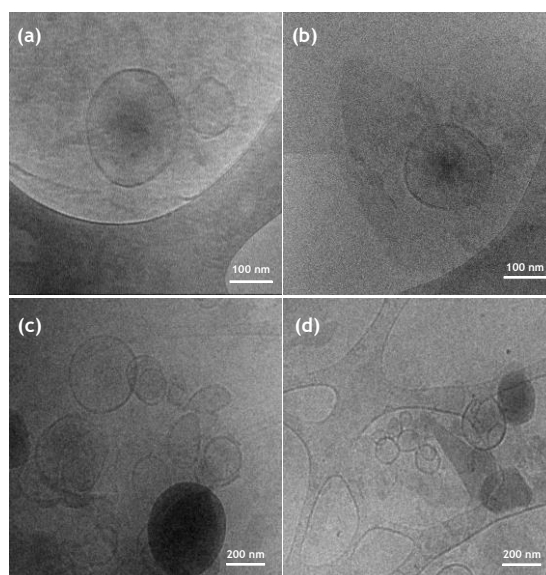


Figure S59. Cryo-TEM images of liposomes at 1.2 mM: (a) and (b) in absence of GD-PAMAM-3 showing few and isolated Large unilamellar vesicles (LUVs), (c) and (d) in presence of GD-PAMAM-3 at 0.48 μ M showing some liposome aggregation.