

# **Adressage vers les hépatocytes**

### Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

La première partie de ce projet porte sur la synthèse d'un adresseur et de sa conjugaison avec la molécule antivirale, SRO91. Cet adresseur a été envisagé en tant que dérivé du galactose, fonctionnalisé en position anomère par un espaceur hydrophile. En effet, les galactosides sont souvent employés dans des stratégies de vectorisation pour cibler les hépatocytes grâce à leur forte interaction avec les récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGPRs). La conjugaison avec la molécule active se fait par l'utilisation d'un espaceur apportant de la flexibilité et limitant de possibles interactions entre une molécule cargo et les récepteurs, et dont la nature et la longueur influencent grandement l'affinité.

#### 1. ASGPR : structure, localisation, expression et ligands naturels

Les récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGPRs pour *asialoglycoprotein receptors*) sont les premiers récepteurs de types lectines à avoir été identifiés chez les mammifères. Ces glycoprotéines membranaires ont initialement été découvertes par Ashwell et Morell grâce à leur étude sur le métabolisme des glycoprotéines plasmiques chez les mammifères.<sup>114,115</sup> En effet, les ASGPRs permettent de maintenir l'homéostasie des glycoprotéines plasmiques grâce à la reconnaissance et l'endocytose des glycoprotéines désialylées, portant un résidu galactose (Gal) ou *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) terminal. Les glycoprotéines sont ainsi internalisées par endocytose clathrine-dépendante et se dissocient du récepteur dans le milieu acide de l'endosome. Elles migrent alors vers les lysosomes où elles sont dégradées.

Les ASGPRs sont principalement exprimés à la surface des cellules du foie, les hépatocytes, avec entre 100 000 et 500 000 sites d'interaction par cellules. De fait, ces récepteurs jouent un rôle primordial dans certaines pathologies comme les hépatites A et B ou les virus Marburg. Même si des études ont montré que le virus de l'hépatite C était capable de se lier efficacement aux récepteurs, cette voie n'a pas été clairement identifiée comme le mode d'action privilégié.<sup>116</sup>

Chez les mammifères, les ASGPRs sont composés de deux sous-unités nommées H1 et H2 de 46 et 50 kDa respectivement.<sup>117</sup> Ces sous-unités s'assemblent avec différents ratios pour former des homo- ou hétéro-oligomères donnant des récepteurs avec différentes configurations. Parmi toutes ces possibilités, le trimère comportant deux unités H1 et une unité H2 est la plus abondante<sup>118</sup> et celle qui montre la meilleure interaction avec des protéines désialylées telles que l'asialoorosomucoïde (ASOR), l'asialofétuine ou l'asialotransferrine.

Les sous-unités H1 et H2 sont des protéines transmembranaires de type II dont la structure est généralement composée d'un domaine intracellulaire d'environ 40 acides aminés en position *N*-terminale, un domaine transmembranaire d'environ 20 acides aminés, une tige extracellulaire de 80 acides aminés et enfin un domaine de reconnaissance du glycoside (CRD pour *carbohydrate recognition domain*) d'environ 140 acides aminés (Figure 42).

---

<sup>114</sup> Morell, A.; Ashwell, G.; Irvine, A.; Sternlieb, I.; Cheinberg, I. H. *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 155–159.

<sup>115</sup> Ashwell, G.; Hardford, J. *Annu. Rev. Biochem.* **1982**, *51* (2), 531–554.

<sup>116</sup> Cosset, F. *Virologie* **2006**, *10*, 179–191.

<sup>117</sup> Huang, X.; Leroux, J.-C.; Castagner, B. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *27* (2), 283–295.

<sup>118</sup> Massarelli, I.; Chiellini, F.; Chiellini, E.; Bianucci, A. M. *Int. J. Mol. Sci* **2010**, *11*, 3867–3884.



## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

Les ligands utilisés pour le ciblage des ASGPRs sont nombreux (Figure 44). Qu'ils soient naturels (asialoorosomucoïde, asialofétuine, asialocéruleplasmin, asialotransferrine, arabinogalactane, pullulane ou Sito-G) ou d'origine synthétique, ces composés présentent généralement un résidu galactoside terminal, GalNAc étant plus afin que Gal pour le récepteur (GalNAc présente une activité 10 à 50 fois supérieure que Gal dans des expériences d'inhibition de l'ASOR).<sup>120</sup>

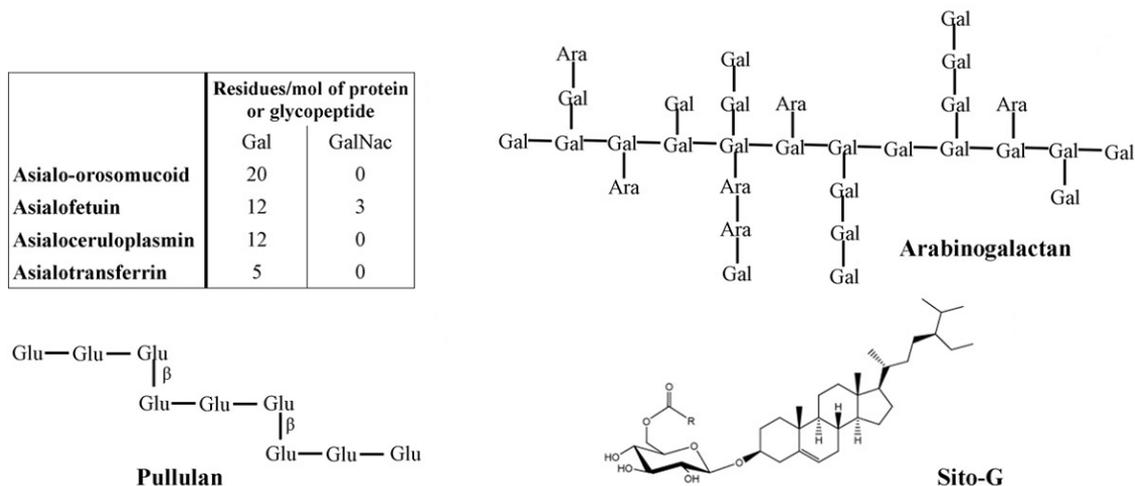


Figure 44: Différents ligands des ASGPRs<sup>120</sup>

### 2. Ligands synthétiques : galactoside, valence et espaceur

De nombreuses revues font état de l'intérêt porté aux ligands galactosides pour le ciblage des hépatocytes par leurs interactions avec les ASGPRs.<sup>117,120,121,122</sup> Les différents systèmes préparés comportent un ou plusieurs Gal ou GalNAc fonctionnalisés par un espaceur en vue de réaliser une conjugaison avec un cargo. Il est important de signifier l'influence de l'espaceur sur l'activité d'un tel conjugué. D'une part, l'utilisation de motifs hydrophiles tels que des glycols permet d'apporter de la solubilité et d'éloigner le ligand du cargo pouvant potentiellement gêner l'interaction avec le récepteur. D'autre part, dans le cas de conjugués multivalents, la longueur de l'espaceur et la nature du répartiteur déterminent l'angle et la distance entre les résidus galactoside afin de correspondre au mieux à la configuration du récepteur.

#### 2.1. Conjugués monovalents

Les hépatocytes peuvent ainsi être ciblés par des conjugués monovalents composés d'un motif galactoside et d'un cargo séparés par un espaceur.

Lee *et al.* ont synthétisé un conjugué Gal-Naphtalimide utilisé pour de l'imagerie intracellulaire.<sup>123</sup> Le système utilisé est composé d'un galactose et d'un naphtalimide séparés par un espaceur triéthylène glycol. Le naphtalimide est fonctionnalisé par le carbamate de 2,2'-dithioéthanol de manière à masquer le fluorophore.

<sup>120</sup> D'Souza, A. A.; Devarajan, P. V. *J. Control. Release* **2015**, *203*, 126–139.

<sup>121</sup> Ahmed, M.; Narain, R. *Nanomedicine* **2015**, *10* (14), 2263–2288.

<sup>122</sup> Deniaud, D.; Julienne, K.; Gouin, S. G. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 966–979.

<sup>123</sup> Lee, M. H.; Han, J. H.; Kwon, P. S.; Bhuniya, S.; Kim, J. Y.; Sessler, J. L.; Kang, C.; Kim, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (2), 1316–1322.

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

Ce conjugué permet ainsi de discriminer des cellules malades de cellules saines en utilisant le déséquilibre entre le glutathion sous sa forme réduite (GSH) et sa forme oxydée (GSSG) comme c'est le cas dans certaines pathologies (cancer, maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer, *etc.*). En effet, l'utilisation d'un tel système permet l'interaction avec les ASGPRs et donc l'internalisation du composé dans les hépatocytes par endocytose. Si la proportion de GSH est trop importante, le motif 2,2'-dithioéthanol sera réduit libérant le fluorophore, après cyclisation intramoléculaire. Il est alors possible de détecter par imagerie les hépatocytes présentant un défaut en GSH qui ne présente pas de fluorescence, par rapport aux cellules saines qui sont marquées (Schéma 31).

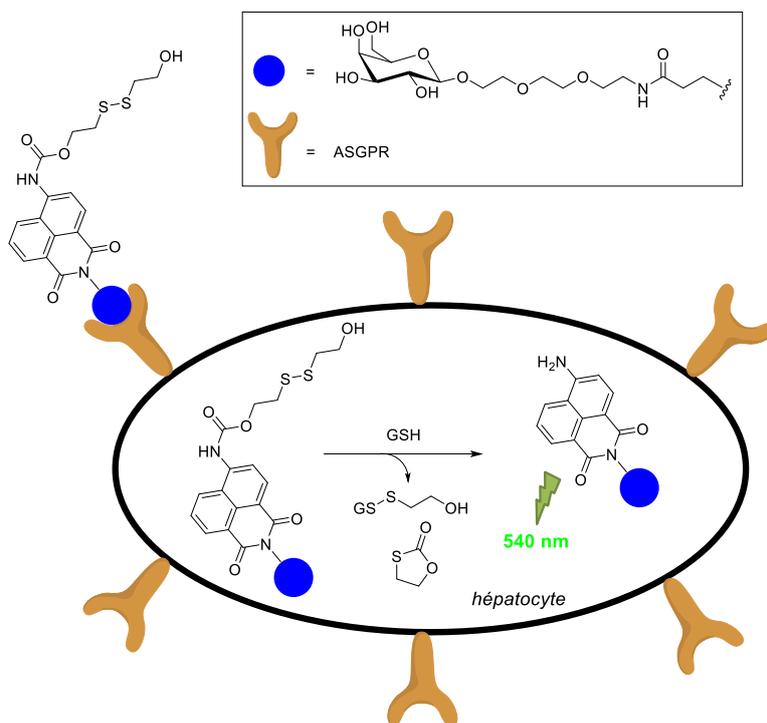


Schéma 31 : Schéma de fonctionnement du conjugué Gal-Naphthalimide pour du diagnostic

Ce système a ainsi permis de discriminer des hépatocytes avec un taux réduit de GSH et des cellules saines par microscopie confocale. De plus, l'injection du conjugué par voie intraveineuse chez le rat a montré une meilleure accumulation dans le foie que le fluorophore marqué ne portant pas de motif Gal.

Les EPT ciblant les lectines (*LEAPT pour lectin-directed enzyme-activated prodrug therapy*) sont également des exemples d'utilisation des galactosides conjugués monovalents. En effet, cette stratégie fait intervenir l'interaction sélective entre les galactosides et les ASGPRs afin de délivrer des drogues dans les hépatocytes en deux étapes. Dans un premier temps, un conjugué avec une enzyme est utilisé afin d'assurer sa délivrance spécifique dans les hépatocytes. Puis, dans un deuxième temps, la prodrogue est ajoutée afin d'entraîner son internalisation puis sa libération dans le milieu intracellulaire grâce à l'enzyme. Robinson *et al.* ont ainsi synthétisé des conjugués entre un galactose et une enzyme exogène, la rhamnosidase déglycosylée capable de dégrader une prodrogue de L-rhamnose (Rha).<sup>124</sup>

<sup>124</sup> Robinson, M. A.; Charlton, S. T.; Garnier, P.; Wang, X.; Davis, S. S.; Perkins, A. C.; Frier, M.; Duncan, R.; Savage, T. J.; Wyatt, D. A.; Watson, S. A.; Davis, B. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (40), 14527–14532.



## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

### 2.2.1. Ligands bivalents

Bien qu'assez peu représentés, il existe quelques études portant sur des ligands galactosides bivalents (LB) dans la littérature. Un premier exemple de ce type de composé est le ligand **LB1** utilisant un acétal benzylidène comme répartiteur. Un conjugué **LB1**-oligonucléotide a ainsi été préparé pour délivrer le facteur de transcription NFE2L2 (pour *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) vers le foie.<sup>125</sup> L'utilisation du ligand **LB1** a alors permis d'améliorer la pénétration cellulaire de l'oligonucléotide, mais l'utilisation d'un agent membranotrope hydrophobe a été nécessaire pour permettre une délivrance efficace de l'ON. Cette limitation a été imputée à la faible longueur de l'espaceur de **LB1** (11 Å d'après une modélisation en utilisant un modèle de minimisation d'énergie MM2). L'utilisation d'un répartiteur glutamate a permis d'obtenir des ligands bivalents **LB2** avec des espaceurs plus longs (15 Å et 12 Å). Dans cette structure, les deux galactosides sont espacés de 22 Å ce qui permet d'effectuer une interaction bivalente avec le récepteur (Figure 46). En effet, **LB2** a montré une IC<sub>50</sub> 10 fois supérieure à celle d'un ligand monovalent (0,47 mM contre 4 mM). Contrairement au ligand **LB1**, **LB2** a permis la délivrance efficace d'un cargo sans l'aide d'un autre agent de pénétration, ce qui semble montrer l'importance d'une longueur optimale de l'espaceur.

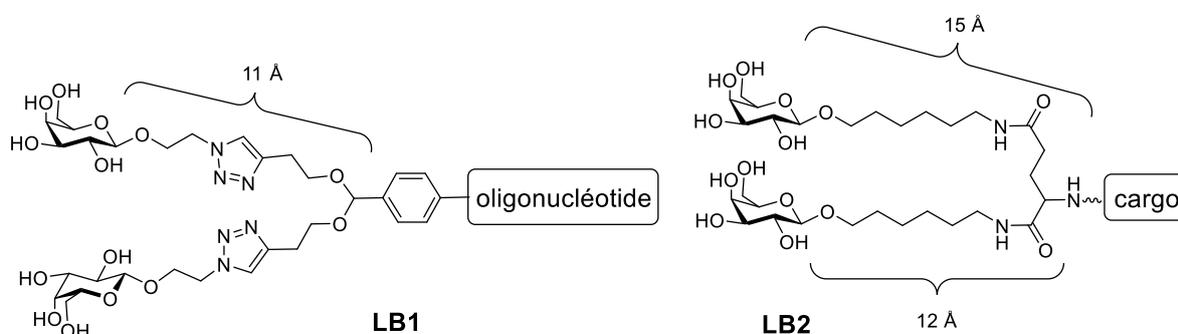


Figure 46: Exemples de ligands galactosides bivalent **LB1** et **LB2**

L'effet de la géométrie spatiale du répartiteur sur la reconnaissance des ligands multivalents par les ASGPRs a été investiguée par Zacco *et al.* en utilisant une superhélice alpha comme plateforme.<sup>126</sup> Le répartiteur a ainsi été préparé de manière à pouvoir fixer 2 ou 3 ligands sur des sites spécifiques le long de l'hélice et faire varier la distance entre les galactosides. Parmi les différents ligands préparés, le **LB3** a montré le plus de potentiel en terme de ciblage d'après des expériences de pénétration cellulaire sur des lignées HepG2. Pour ce composé, la distance entre les galactosides et le répartiteur était de 18 Å et celle entre les acides aminés fonctionnalisés était de 13 Å (Figure 47). Il est important de signifier que des modifications de ces longueurs, en passant à 0 ou 30 Å entre les motifs glycosylés et la chaîne peptidique entraînent une diminution de la pénétration cellulaire observée et donc de la reconnaissance supposée par les récepteurs. De plus, l'ajout d'un troisième résidu galactose au système ne change quasiment pas l'activité, certainement du fait d'une configuration « brush-like » ne permettant pas une coordination optimale au récepteur de configuration triangulaire en raison d'un arrangement parallèle des chaînes glycosylées.

<sup>125</sup> Lee, K.; Rafi, M.; Wang, X.; Aran, K.; Feng, X.; Lo Sterzo, C.; Tang, R.; Lingampalli, N.; Kim, H. J.; Murthy, N. *Nat. Mater.* **2015**, *14* (7), 701–706.

<sup>126</sup> Zacco, E.; Hütter, J.; Heier, J. L.; Mortier, J.; Seeberger, P. H.; Lepenies, B.; Kokschi, B. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (9), 2065–2072.

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

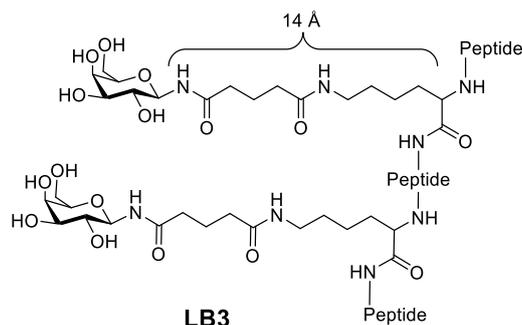


Figure 47: Structure du ligand LG3 développé par Zacco et al.

### 2.2.2. Ligands trivalents

Du fait de leur reconnaissance optimale par les ASGPRs, les ligands trivalents (LTs) sont les ligands les plus décrits dans la littérature.<sup>117</sup> Une des premières études portant sur ces composés a été menée par Biessen *et al.* en utilisant un répartiteur tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris).<sup>127</sup> Différents ligands trivalents ont ainsi été préparés avec des espaceurs de longueur plus ou moins importante. Des essais de compétition de ligands avec l'ASOR sur des cellules parenchymales de rat ont montré que le ligand **LT1** constitué d'un espaceur oligoéthylène glycol de 20 Å présentait la meilleure affinité pour le récepteur ( $K_i = 200$  nM) avec une distance de 32 Å entre les Gal permettant une interaction trivalente (Figure 48). L'affinité s'est révélée être 2 000 fois moins importante pour le conjugué utilisant un espaceur de 4 Å et 6 fois moins avec un espaceur de 10 Å.

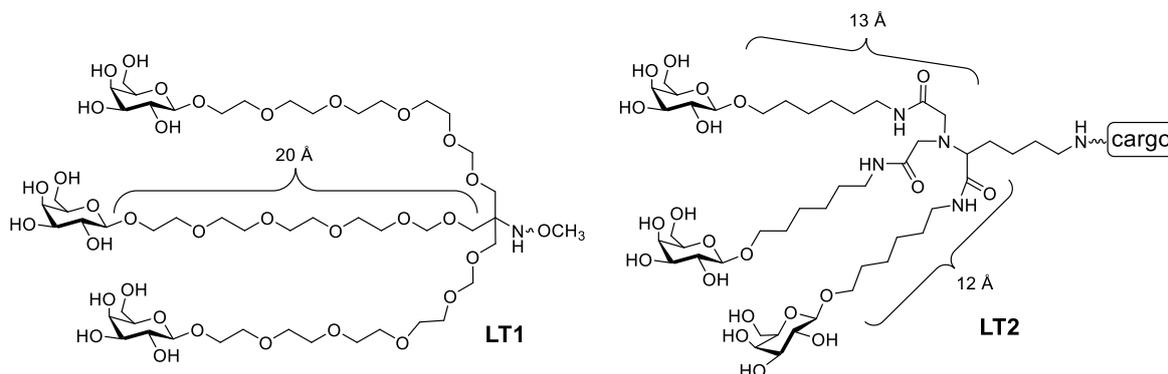


Figure 48: Exemples de structures de ligands galactosides trivalents

Ces résultats démontrent à nouveau l'importance cruciale d'une longueur d'espaceur adaptée pour permettre une reconnaissance efficace et l'existence d'une longueur « minimale » de l'espaceur. Néanmoins aucune hypothèse n'a été formulée concernant une longueur « maximale » pour ce ligand. Lai *et al.* ont ainsi investigué l'utilisation d'un LT basé sur la lysine comme répartiteur.<sup>128</sup> Le système comportant trois résidus Gal à l'extrémité des espaceurs de 12 et 13 Å de longueur, a alors été testé pour la délivrance de nanoparticules vers des cellules cancéreuses HepG2. Le ligand **LT2** (Figure 48) ainsi obtenu a permis la pénétration cellulaire des nanoparticules du fait de son interaction avec les ASGPRs. En effet, des expériences menées sur des cellules HeLa n'exprimant pas le récepteur ont montré l'absence de pénétration des particules. L'augmentation de la longueur de l'espaceur de 13 à

<sup>127</sup> Biessen, E. A. L.; Beuting, D. M.; Roelen, H. C. P. F.; van de Marel, G. A.; Van Boom, J. H.; van Berkel, T. J. C. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1538–1546.

<sup>128</sup> Lai, C.-H.; Lin, C.-Y.; Wu, H.-T.; Chan, H.-S.; Chuang, Y.-J.; Chen, C.-T.; Lin, C.-C. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20* (22), 3948–3958.

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

19 Å a entraîné une baisse significative de la pénétration cellulaire du ligand, montrant finalement l'existence d'une limite maximale pour ce type de répartiteur.

L'importance du ratio hydrophile/hydrophobe de l'espaceur est également un paramètre important pour l'activité des ligands multivalents. Biessen *et al.* ont ainsi synthétisé un ligand trivalent utilisant un espaceur composé d'une chaîne alkyle, comportant deux fonctions amide, et lié au répartiteur par une fonction éther.<sup>129</sup> Le ligand **LT3** ainsi obtenu (Figure 49) a montré une activité légèrement supérieure à celle de **LT1** dans des tests de compétition de ligands avec l'ASOR ( $K_i = 93$  nM contre 200 nM). De plus, des conjugués **LT3**-liposomes ont montré une pénétration cellulaire efficace dans le foie chez la souris. L'hypothèse d'une reconnaissance par les ASGPRs a alors été proposée, puisque l'injection préalable d'asialofétuine inhibait presque complètement cette activité.

Ainsi, il semble que les ligands comportant des espaceurs avec une balance hydrophile/hydrophobe adaptée soient mieux reconnus par les récepteurs que ceux ne comportant que des motifs très hydrophiles comme des oligoglycols. En effet, la présence d'une partie hydrophobe dans l'espaceur pourrait favoriser une interaction avec la surface de la protéine ou encore empêcher la formation d'agrégats pouvant être observée lors de l'utilisation d'oligoglycols.

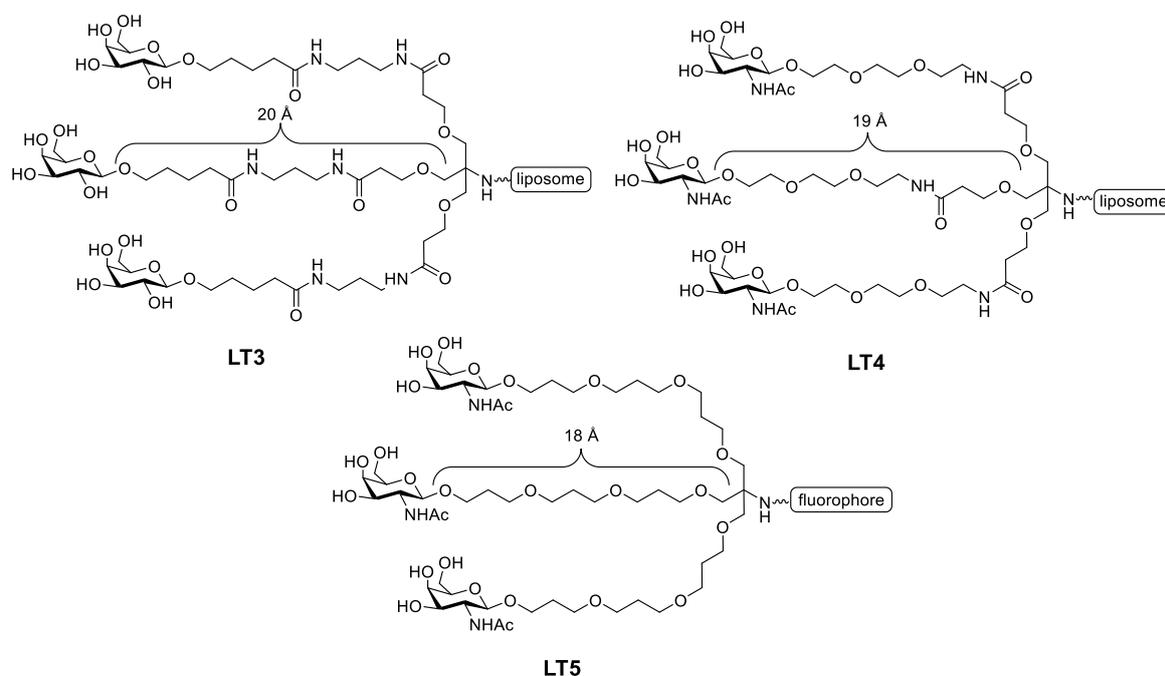


Figure 49: Exemples de LTs avec espaceurs hydrophile/hydrophobe

Par la suite, la même équipe a développé le ligand **LT4** composé de 3 motifs GalNAc et d'un espaceur comportant une courte chaîne oligoéthylène glycol et une liaison amide. Ce ligand a présenté une affinité 50 fois supérieure à celle du **LT3** ( $K_i = 2$  nM contre 93 nM). De même, ce ligand a été conjugué à des liposomes dont la pénétration dans les hépatocytes par l'association avec les ASGPRs s'est trouvée augmentée.

<sup>129</sup> Sliedregt, L. A. J. M.; Rensen, P. C. N.; Rump, E. T.; van Santbrink, P. J.; Bijsterbosch, M. K.; Valentijn, A. R. P. M.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H.; van Berkel, T. J. C.; Biessen, E. A. L. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (4), 609–618.



## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

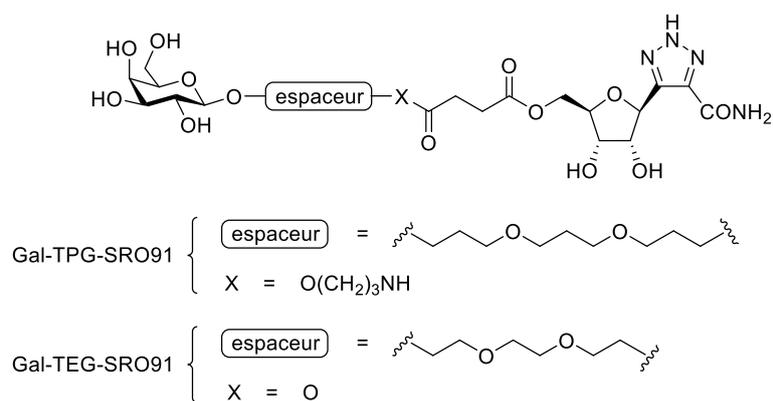


Figure 51: Structures envisagées pour le conjugué Gal-SRO91 1-1

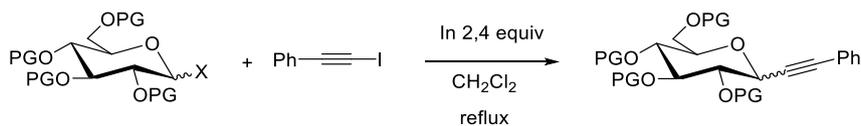
### 3.1. Alcynylation médiée à l'indium

Comme expliqué précédemment, l'obtention de C-nucléosides peut être réalisée grâce à une réaction d'alcynylation médiée à l'indium dans les conditions de Barbier, suivie d'une cycloaddition 1,3-dipolaire permettant de créer un hétérocycle 1,2,3-triazole analogue du 1,2,4-triazole de la ribavirine.

La réaction d'alcynylation médiée à l'indium a d'abord été développée sur des glycopyranosides tels que des glucosides et galactosides protégés et activés.<sup>57</sup> De manière générale, la réaction a donné préférentiellement les glycosides de configuration  $\alpha$ , et ce quel que soit le groupement en position 2 (2-désoxy, benzyle en série glucose, ou acétal en série mannose).

Il est important de noter que l'utilisation de groupements participants tels que des acétates ou des benzoates ne permettent pas d'obtenir l'isomère  $\beta$  mais un produit d'addition sur l'acétoxonium intermédiairement formé lors de la réaction (Tableau 2).

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

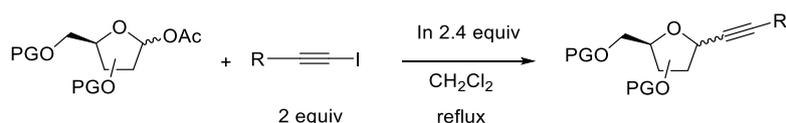


Glycoside de départ	Ratio anomères	temps	rendement (%)	Produit final	Configuration C <sub>1</sub>
	$\alpha/\beta = 20/80$ $\alpha/\beta = 95/5$	24 h 24 h	86 0		$\alpha/\beta > 98/2$ dr = 98/2
	$\alpha/\beta > 2/98$	26 h	92		$\alpha/\beta > 98/2$ dr = 89/11
	$\alpha/\beta = 25/75$ $\alpha/\beta = 88/12$	16 h 48 h	70 71		$\alpha/\beta > 98/2$
	$\alpha/\beta > 98/2$	24 h	66		$\alpha/\beta > 98/2$
	$\alpha/\beta = 25/75$	48 h	60		$\alpha/\beta = 75/25$
	$\alpha/\beta = 10/90$	16 h	52		$\alpha/\beta = 80/20$

Tableau 2 : Alcylation des hexopyranoses protégés<sup>37</sup>

Cette observation est également valable en série furanose mais dans ce cas l'alcylation n'est pas orientée puisque l'utilisation de groupements benzyle donne un mélange  $\alpha/\beta$  50/50. Avec des groupements isopropylidène en position 2 et 3, la stéréochimie du produit d'alcylation est fortement influencée. Ainsi, en série ribose le composé  $\beta$  est obtenu très majoritairement alors que l'isomère  $\alpha$  est principalement formé lors de l'utilisation de mannofuranose, probablement du fait de la gêne stérique induite par le groupement protecteur (Tableau 3).

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes



Glycoside de départ	Ratio anomères	R	Temps	Rendement (%)	Produit final	Configuration C <sub>1</sub>
	$\alpha/\beta = 30/70$	Ph	27 h	68		$\alpha/\beta > 98/2$ dr = 98/2
	$\alpha/\beta = 40/60$	Ph	3 h	96		dr = 32/68
	$\alpha/\beta = 14/86$	Ph	24 h	60		$\alpha/\beta = 3/97$ $\alpha/\beta = 10/90$
	$\alpha/\beta = 90/10$	Ph	24 h	53		
	$\alpha/\beta = 10/90$	Ph	48 h	44		$\alpha/\beta = 94/6$
	$\alpha/\beta < 5/95$	SiMe <sub>3</sub>	16 h	67		$\alpha/\beta = 50/50$

Tableau 3 : Alcylation des furanoses protégés<sup>57</sup>

Le mécanisme de la réaction d'alcylation n'est pas réellement connu, mais les résultats obtenus sur les hexopyranoses indiqueraient la formation d'un intermédiaire oxonium par départ du groupe partant. L'addition nucléophile de l'organoindium donnerait alors préférentiellement l'isomère  $\alpha$  par attaque axiale sur l'oxonium.

En revanche, en série furanose, cet effet semble minime, puisque l'on obtient un mélange de composés. L'orientation ne se fait que par la gêne stérique apportée par des groupements protecteurs en 2 et 3.

### 3.2. Synthèse du building-block SRO91

Le C-nucléoside anti-VHC (SRO91) utilisé dans cette étude a ainsi été synthétisé comme décrit dans la littérature, par une C-alcylation médiée à l'indium sur la position anomère du D-ribose protégé en position 2 et 3 sous forme d'un acétal, puis une cycloaddition alcyne-azoture avec l'azoture de benzyle (Schéma 33).

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

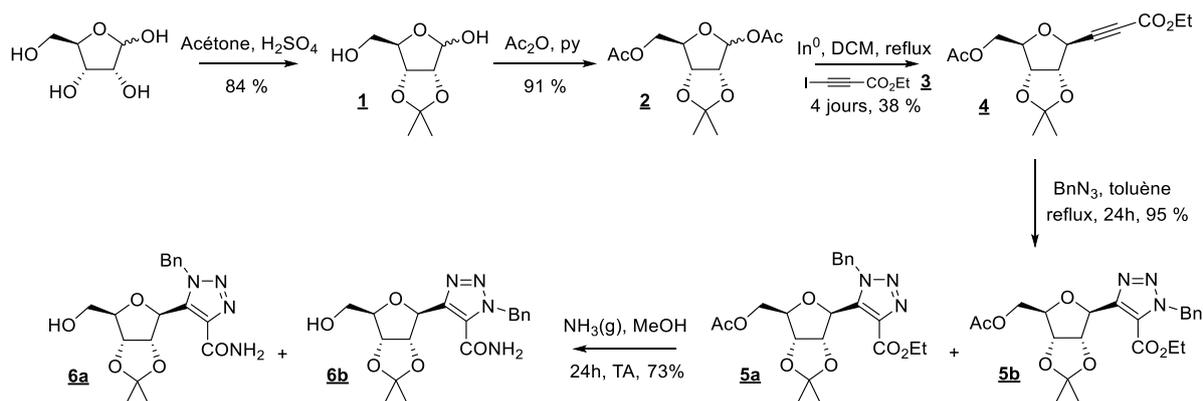


Schéma 33 : Schéma de synthèse de SRO-91 protégé

Le mélange d'isomères **6a/6b** (77/23) a ensuite été mis en réaction avec l'anhydride succinique (Schéma 34) afin d'obtenir les isomères **7a** et **7b** (86/14) dont la fonction acide carboxylique introduite en position 5' du ribose permettra la formation de conjugués avec des dérivés du galactose. Il est intéressant de noter que les isomères **7a** et **7b** présentent des propriétés et des réactivités différentes. En effet, durant la synthèse, le composé **7a** a précipité lors du traitement du brut réactionnel par de l'AcOEt. Une simple filtration permet alors d'obtenir le composé pur dans sa quasi-totalité, alors que son isomère **7b** a été isolé après purification par chromatographie sur gel de silice.

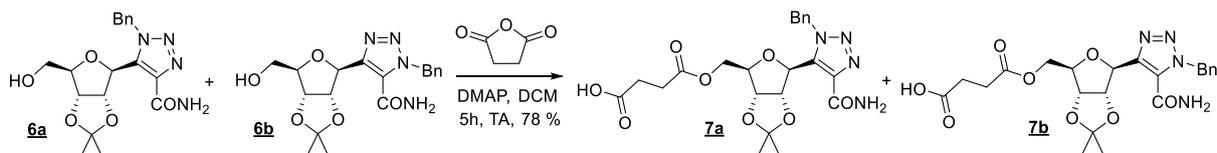


Schéma 34 : Ouverture de l'anhydride succinique par SRO-91 protégé

Ces composés pourront également être conjugués aux peptides de fusion étudiés pour la pénétration membranaire. Dans cette optique et afin de se prémunir d'éventuelles difficultés lors de l'hydrogénation catalysée au palladium sur charbon en présence de la séquence peptidique, les composés **7a/7b** sont déprotégés par hydrogénolyse à ce stade (Schéma 35), donnant le composé **8** qui sera engagé dans la réaction de conjugaison. Cette déprotection s'est révélée relativement difficile du fait de la faible solubilité du composé **7a** dans le méthanol ou l'éthanol et de sa cinétique. Il a ainsi été nécessaire de réaliser la déprotection en deux fois, sur 4 jours et en rajoutant du catalyseur régulièrement (1 équivalent au total) pour obtenir le building-block final avec un rendement de 75 %.

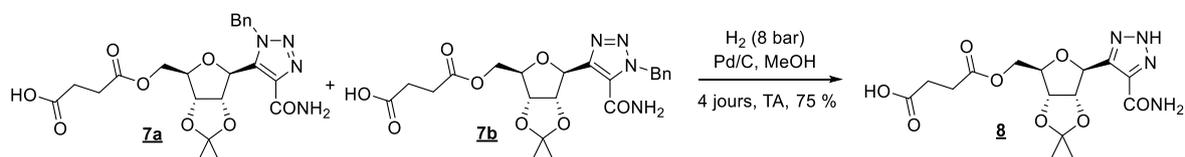


Schéma 35 : Synthèse du building-block débenzylé **8**

Outre la faible solubilité du réactif dans les solvants utilisés, une hypothèse plausible qui expliquerait ces résultats serait un empoisonnement du catalyseur par le NH du triazole débenzylé ou du carboxamide.

Cette stratégie a finalement été préférée à la déprotection des benzyles des composés **6a** et **6b** suivie de l'ouverture de l'anhydride succinique, car le produit ainsi formé étant très polaire, il a été difficile

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

de l'isoler après traitement ou purification sur gel de silice. Cette stratégie n'a ainsi permis d'obtenir le building-block **8** qu'avec un rendement de 17 % (Schéma 36).

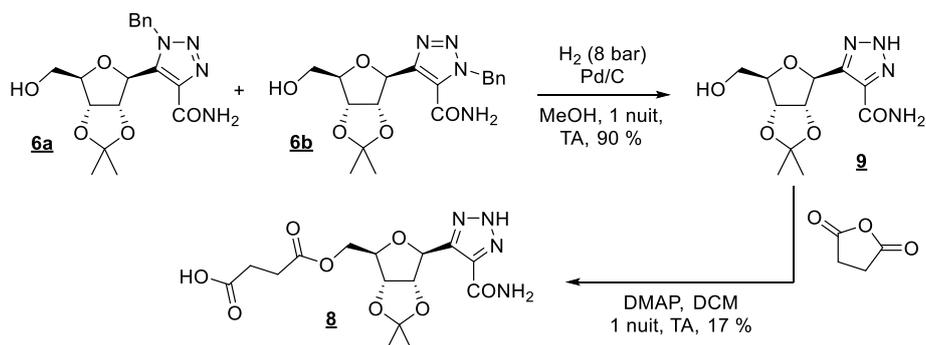


Schéma 36 : Deuxième stratégie de synthèse du building-block envisagée

Afin de vérifier la compatibilité du composé **8** avec la synthèse peptidique en phase solide (SPPS) pour préparer des conjugués peptide/nucléoside, le building-block a été placé en solution dans les conditions de clivage TFA/ $H_2O$ /Phénol/TIS 90/5/3/2 (v/v/v/v). Un aliquot est réalisé toutes les 30 min pendant 5 h, puis analysé par RMN  $^1H$  dans le méthanol deutérié après évaporation du TFA par flux d'azote. Les spectres ainsi obtenus (Figure 52) montrent la disparition des pics caractéristiques de l'acétal (singulet, 1,54 et 1,34 ppm, non représentés) dès 30 min. En revanche, aucune modification des signaux correspondant aux protons  $H_5$  (multiplet, 4,33-4,10 ppm) du ribose estérifié n'est observée, prouvant ainsi la stabilité du lien ester en conditions de clivage.

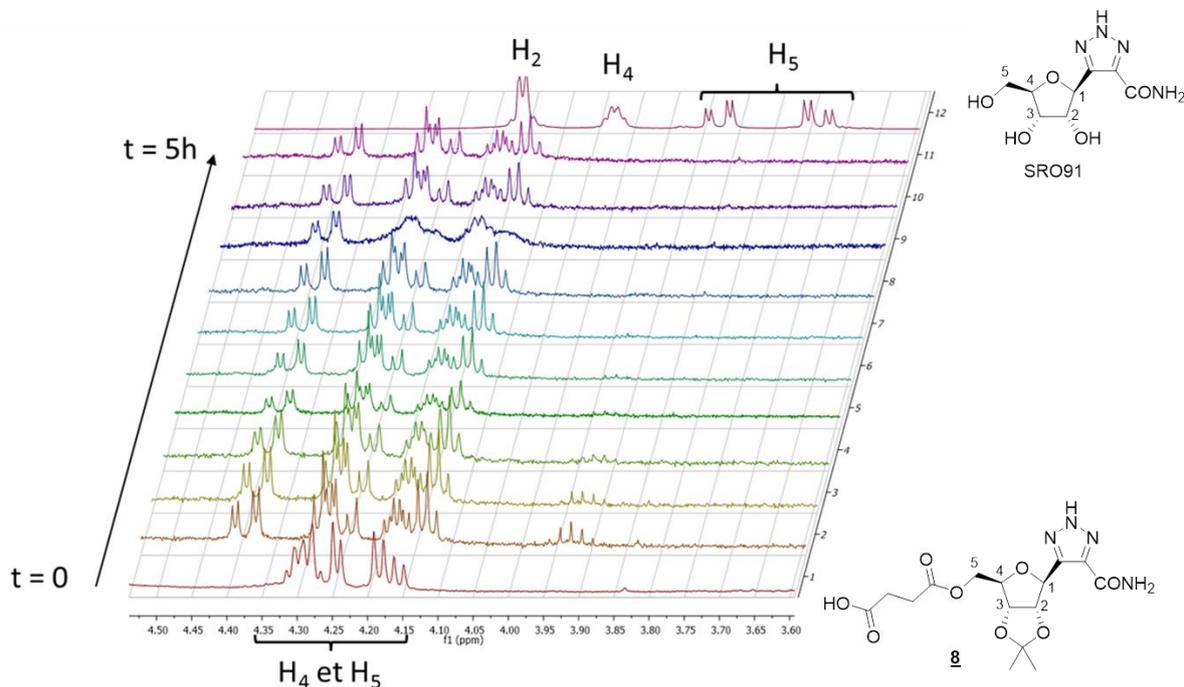


Figure 52: Spectres RMN  $^1H$  du test de stabilité du composé **8** dans les conditions de clivage peptidique

### 3.3. Synthèse de l'adresseur

#### 3.3.1. Synthèse des adresseurs Gal-TPG

Le premier système d'adresseur envisagé (Gal-TPG) est un dérivé du galactose fonctionnalisé en position anomère par un espaceur dérivé du tripropylène glycol TPG (Figure 53).

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

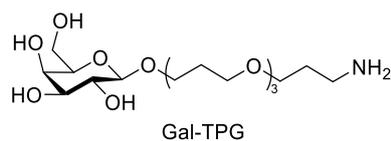


Figure 53: Structure de l'adresseur Gal-TPG

En effet, ce type d'espaceur a déjà été utilisé pour des conjugués ciblant les ASGPRs développés par Khorev *et al.*<sup>130</sup> Dans cette étude, deux ligands trifonctionnels (l'un avec 3 Gal et l'autre avec 3 GalNAc) ont été préparés en utilisant des espaceurs TPGs (Figure 54). Ces ligands ont été conjugués à un fluorophore, l'Alexa Fluor® 488, afin de vérifier la pénétration cellulaire de ces conjugués par microscopie à fluorescence sur des cellules hépatiques HepG2 exprimant l'ASGPR et des cellules SK-Hep1 ne l'exprimant pas.

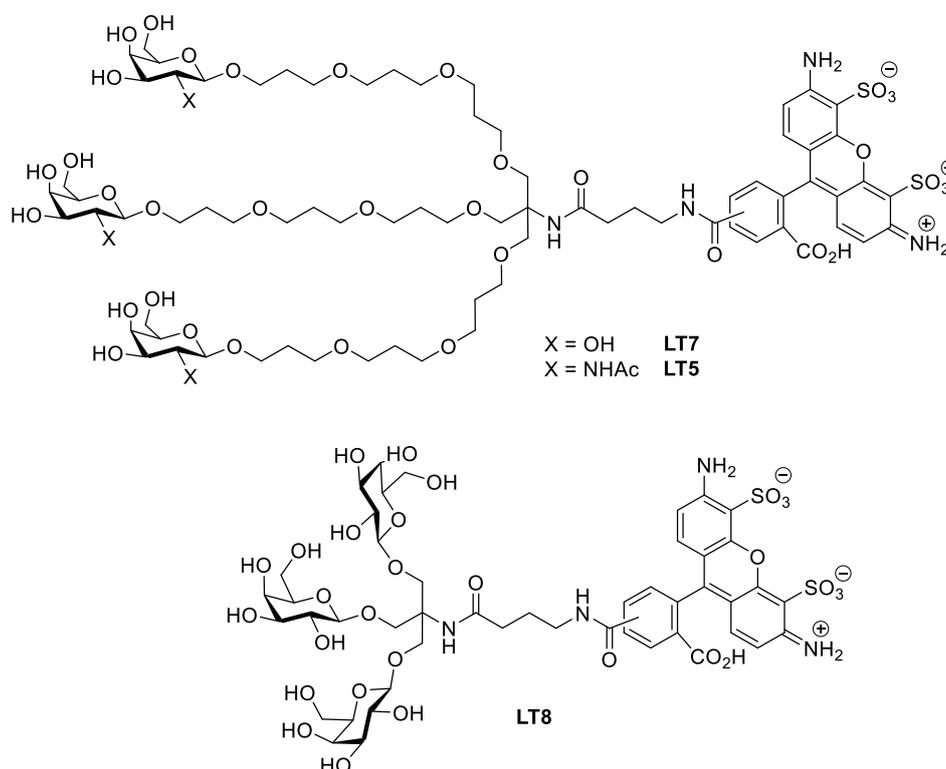


Figure 54: Conjugués synthétisés et étudiés par Khorev *et al.*

Il a ainsi été montré que les conjugués **LT7** et **LT5** pénétraient efficacement dans les cellules HepG2 exprimant les ASGPRs mais pas dans les cellules SK-Hep1, montrant la spécificité de ces ligands. Sur les clichés présentés dans cet article, il est clairement possible de constater la formation de vésicules d'endocytose dans le cytosol traduisant l'internalisation (Figure 55). De plus, il est intéressant de noter que le conjugué **LT8** n'a pas été internalisé dans les cellules, probablement du fait d'une longueur insuffisante entre le Gal et le cargo.

La pénétration cellulaire de ces conjugués GalNAc (**LT5**) dans les cellules HepG2 a été inhibée lors de l'ajout de ligands connus de l'ASGPR à savoir la GalNAc et l'asialofétuine. En revanche l'ajout d'asialofétuine n'a pas eu d'effet sur la pénétration du conjugué dans les cellules SK-Hep1, montrant que l'internalisation spécifique est bien due à l'interaction avec les ASGPRs.

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

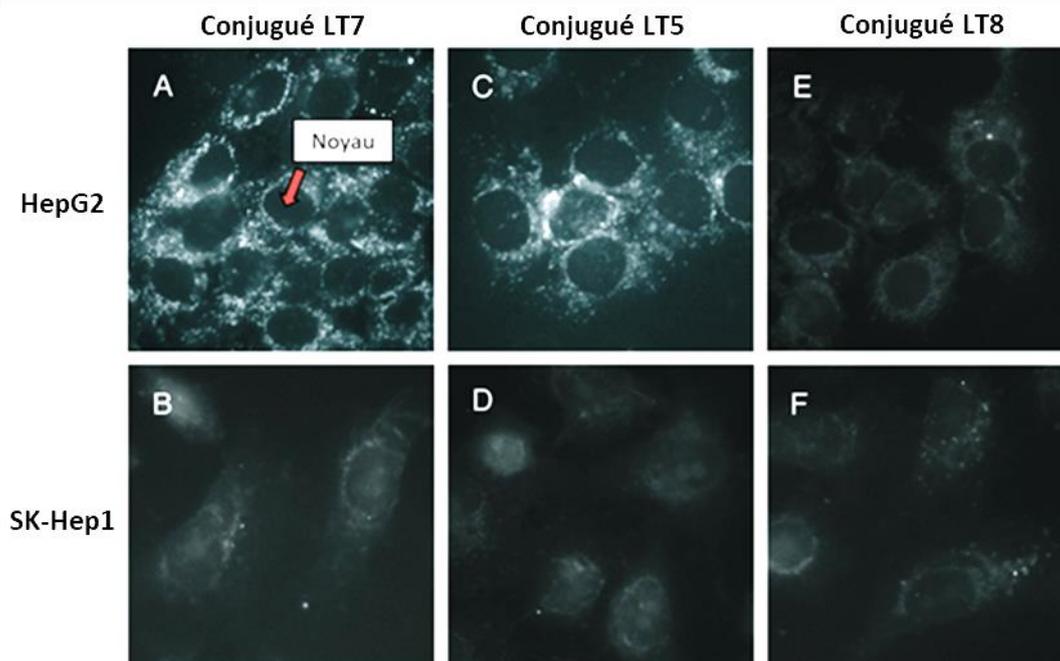


Figure 55: Microscopie à fluorescence des conjugués Gal-TPG (LT7), GalNAc-TPG (LT5) et Gal sans TPG (LT8)<sup>130</sup>

Dans cette étude, la synthèse des conjugués a été initiée à partir du tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris) dont l'amine est protégée par un groupement Boc. Il s'en suit alors une succession de réactions d'allylation utilisant le bromure d'allyle et de réactions d'hydroboration/oxydation en présence de 9-BBN et de peroxyde d'hydrogène en milieu basique. Il est ainsi possible d'effectuer l'élongation de la chaîne polypropylène glycol (Schéma 37).

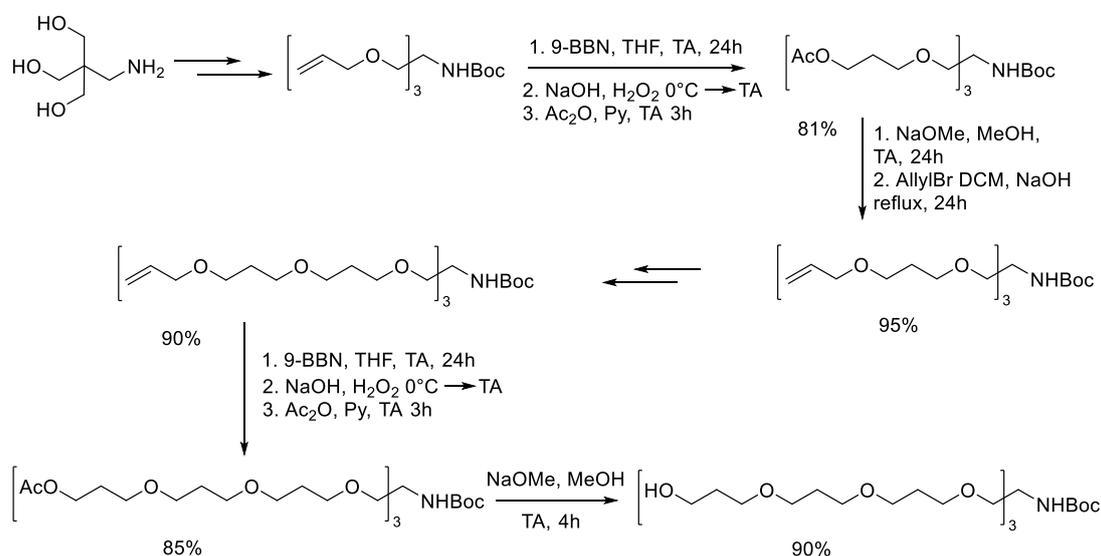


Schéma 37 : Elongation des chaînes propylène glycol par allylation et hydroboration itératives

Après l'obtention des trois motifs propylène glycol, l'alcool en fin de chaîne est mis en réaction de glycosylation avec des thioéthylglycosides en présence de trifluorométhanesulfonate de diméthyl(méthylthio)sulfonium (DMTST, Schéma 38). La fonctionnalisation de l'amine et les différentes déprotections permettent alors d'obtenir les conjugués attendus. Il est également important de signifier que, étant donné la forte polarité et l'hydrophilie des composés, ces derniers sont systématiquement acétylés après hydroboration pour faciliter leur purification.

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

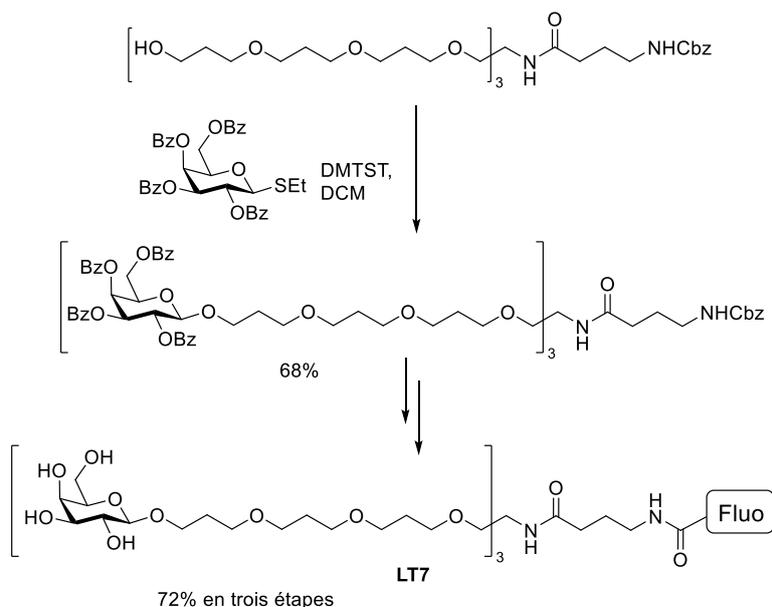


Schéma 38 : Glycosylation en présence de DMTST pour l'obtention du conjugué LT7

En se basant sur cette étude et dans l'optique d'obtenir un premier conjugué monovalent Gal-TPG-SRO91, nous avons synthétisé des espaceurs polypropylène glycol de différentes longueurs à partir du 1-aminopropanol protégé sous forme de carbamate **10**, et suivant une succession de réactions d'allylation et d'hydroboration/oxydation (Schéma 39).

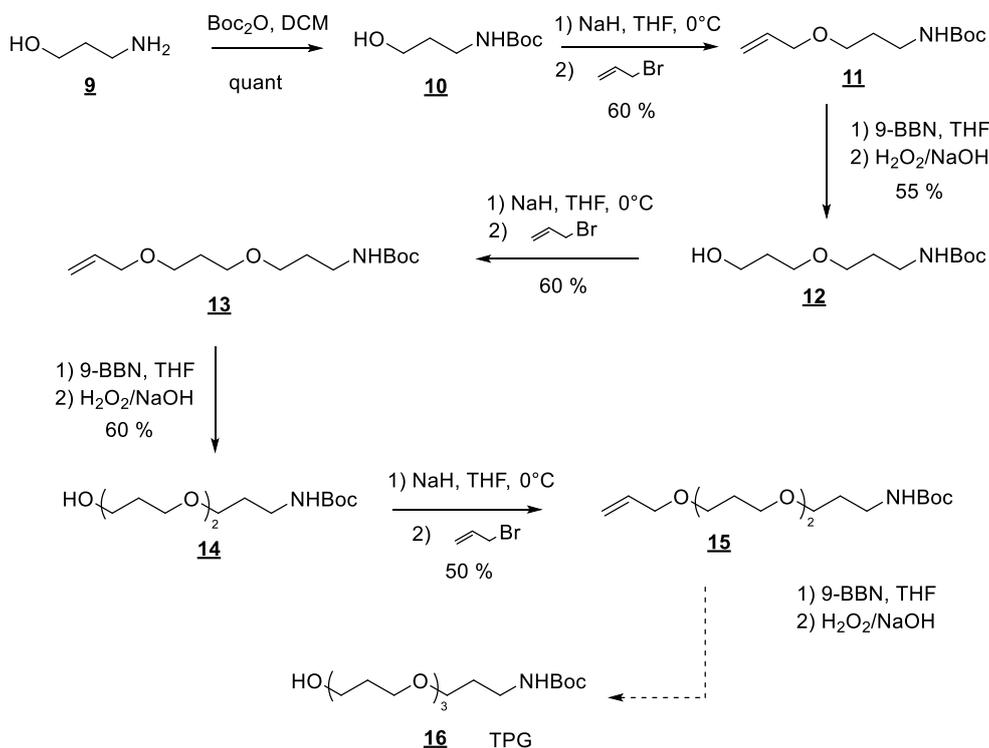


Schéma 39 : Synthèse de l'espaceur TPG

La première réaction d'allylation a été réalisée dans des conditions douces en utilisant  $K_2CO_3$  et l'iodure de tétrabutylammonium (TBAI) dans le THF distillé, en présence de bromure d'allyle. L'utilisation de cette base a permis d'obtenir le produit désiré avec une conversion faible et un rendement médiocre de 32 %. Pour cette raison, une base plus forte telle que NaH lui a été préférée et

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

a permis de synthétiser le composé **11** avec un rendement de 60 %. Les composés n'étant pas aussi hydrophiles que les structures trivalentes synthétisées par Khorev *et al.*, les étapes d'acétylation après hydroboration n'ont pas été effectuées.

Bien que les rendements de ces étapes successives soient corrects (50 – 60 %), la purification des produits, notamment après l'étape d'hydroboration s'est avérée difficile du fait de la présence de *cis*-1,5-cyclooctanediol issu de l'oxydation du 9-BBN en excès, ayant une polarité similaire aux espaceurs (Figure 56). Dans le cas du composé **16**, la séparation du produit et du *cis*-1,5-cyclooctanediol par chromatographie sur gel de silice a été impossible dans les systèmes d'éluant utilisés (Cy/AcOEt 1/1 et DCM/Acétone 9/1).

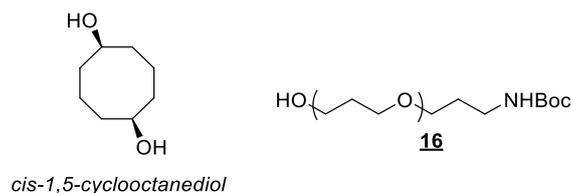


Figure 56: Structure du *cis*-1,5-cyclooctanediol de polarité proche du composé **16**

En effet, une CCM montre l'apparition d'un unique composé révélant à la fois à la ninhydrine et à l'acide phosphomolybdique montrant la présence d'amine et d'alcool dans le produit. Bien que l'analyse RMN  $^1\text{H}$  du composé obtenu après purification (Figure 57) montre la disparition des signaux correspondant aux protons allyliques (un multiplet à 5,90 ppm, 3 dd à 5,25, 5,15 et 3,95 ppm) signifiant que l'hydroboration a bien été réalisée, on distingue également les signaux du *cis*-1,5-cyclooctanediol qui est à priori majoritaire (3,79, 1,87, 1,62 et 1,43 ppm).

L'emploi d'autres boranes utilisés classiquement pour des réactions d'hydroboration n'a pas non plus permis l'obtention du produit, mais uniquement l'allyle de départ (avec le catecholborane) ou bien un mélange de régioisomères (dans le cas de  $\text{BH}_3$ ). De fait, seul l'espaceur comportant 2 motifs propylène glycol (**14**) a pu être synthétisé.

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

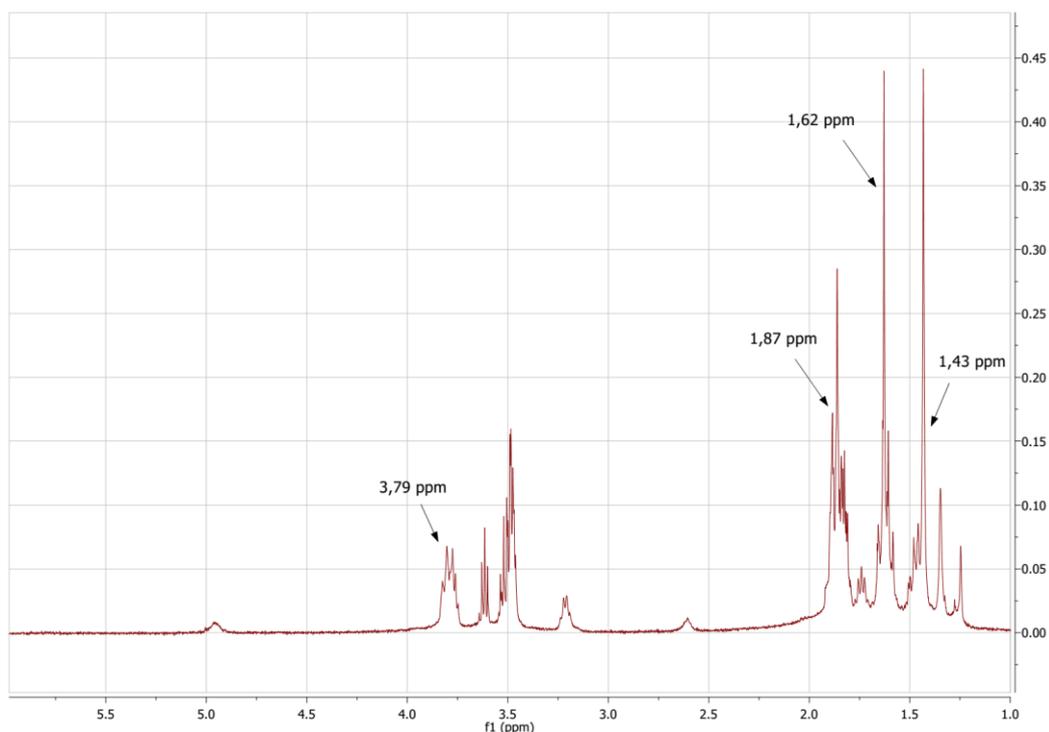


Figure 57: Spectre RMN <sup>1</sup>H du mélange composé **16** et *cis*-1,5-cyclooctanediol

### 3.3.2. Synthèse de l'adresseur Gal-TEG

A cause de la difficulté de synthèse des linkers polypropylène glycol, un autre système d'adressage a été envisagé (Gal-TEG), utilisant cette fois un espaceur triéthylène glycol (Figure 58) commercial. Comme expliqué précédemment, ce type d'espaceur couplé à un bras succinique a déjà été utilisé avec succès dans le ligand **LT4**.

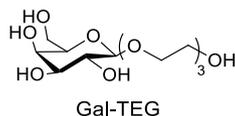


Figure 58: Structure de l'adresseur Gal-TEG

Bien que cet espaceur soit légèrement plus court que le TPG initialement envisagé (15 Å contre 18 Å, Figure 59), il devrait comporter un ratio hydrophile/hydrophobe suffisant et apporter une distance compatible avec l'interaction Gal-ASGPRs.

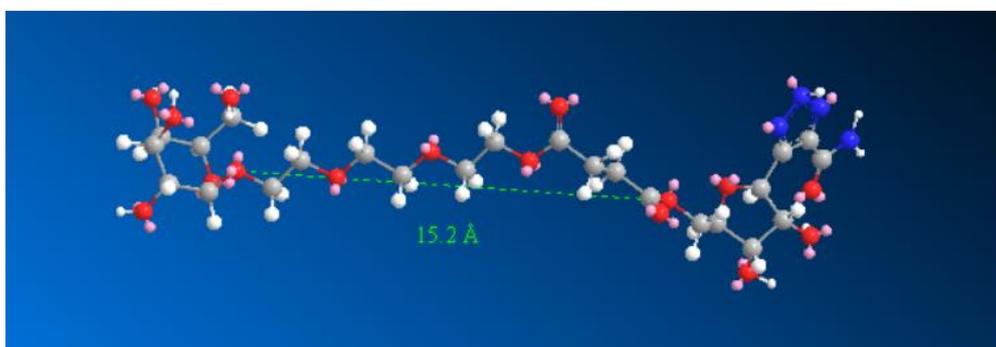


Figure 59: Modélisation du conjugué en utilisant un modèle de minimisation d'énergie MM2 sur le logiciel ChemBioDraw

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

L'adresseur final Gal-TEG-SRO91 peut être obtenu, après déprotection finale, par estérification entre le galactoside benzylé **28** et le composé **7b**, correspondant au SRO91 protégé dont la fonction alcool en position 5' a été fonctionnalisée par un bras succinique. Le galactoside **28** est lui-même obtenu à partir d'un 2,3,4,5-*O*-acétyl- $\beta$ -galactoside après changement de groupement protecteur, suivie d'une déprotection sélective de la fonction alcool du triéthylène glycol (Gp). En effet, le lien ester formé lors de la conjugaison avec le composé **7b** n'étant pas stable dans les conditions de déprotection des groupements acétate, ces derniers doivent être remplacés par des groupements benzyle avant la réaction d'estérification. Le 2,3,4,5-*O*-acétyl- $\beta$ -galactoside utilisé est, quant à lui, obtenu suite à une réaction de glycosylation entre un 2,3,4,5-*O*-acétylgalactoside activé et l'espaceur triéthylène glycol monoprotégé. La présence des groupements acétate est nécessaire puisqu'elle permet l'obtention sélective de l'anomère  $\beta$  par assistance anchimérique (Schéma 40).

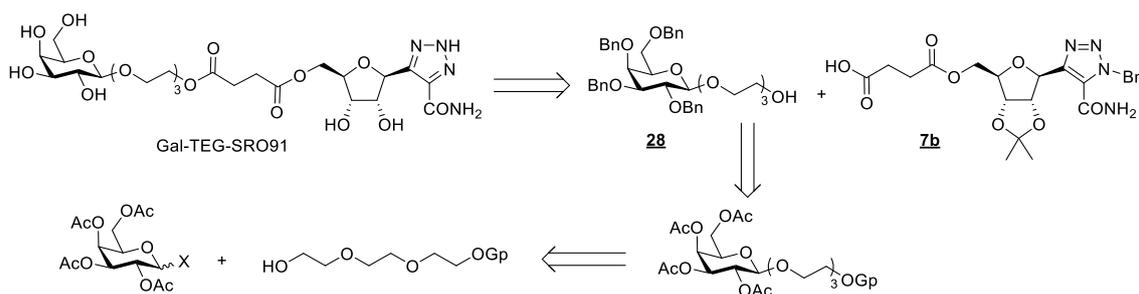


Schéma 40 : Schéma retrosynthétique de l'obtention du conjugué Gal-TEG-SRO91

Le groupement protecteur de l'espaceur devant être orthogonal aux groupements acétate et déprotégé sélectivement par rapport aux groupements benzyle, différentes possibilités ont été envisagées. Les premiers groupements utilisés étaient des éthers silylés (Schéma 41) avec le *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS) et le *tert*-butyldiphénylsilyle (TBDPS) obtenus avec des rendements de 73 et 78 % respectivement. Ces groupements sont théoriquement stables dans des conditions acides (TBDMS étant plus sensible que TBDPS) et basiques et sont déprotégés sélectivement par des ions fluorure.<sup>132</sup>

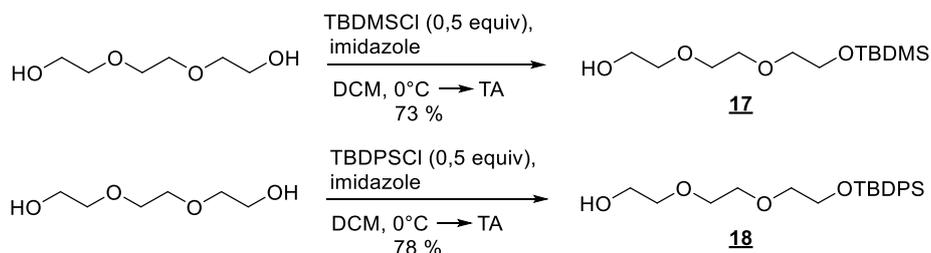
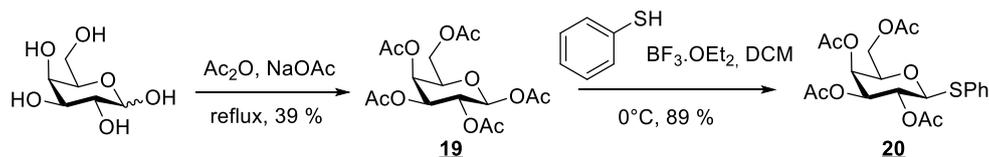


Schéma 41 : Synthèse des espaceurs TEG monoprotégés par des silanes

En vue de réaliser une réaction de glycosylation, un thiophénylgalactoside peracétylé a été préparé (Schéma 42). Pour cela, le D-galactose est peracétylé en présence d'acétate de sodium dans l'anhydride acétique à reflux. Après traitement, une recristallisation dans un mélange hexane/AcOEt 2/1 permet d'obtenir le  $\beta$ -acétogalactoside **19** avec un rendement de 39 %. Ce dernier est alors soumis à une thioglycosylation par le thiophénol en présence d'éthérate de BF<sub>3</sub> pour donner le  $\beta$ -thiogalactoside **20** avec un rendement de 89 %.

<sup>132</sup> Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. In *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2006; 165–221.

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes



Les premiers essais de glycosylation ont été effectués à partir du composé **19** et l'espaceur **17** monoprotégé par TBDMS dans des conditions classiques, en présence d'éthérate de  $\text{BF}_3$  et de tamis moléculaire dans le DCM à  $0^\circ\text{C}$ . Il s'est avéré que le groupement silylé n'était pas stable dans les conditions utilisées puisqu'une analyse par CCM du milieu réactionnel a montré la formation d'un produit beaucoup plus polaire. Cette observation a ensuite été confirmée par analyse RMN  $^1\text{H}$  après purification sur gel de silice du composé obtenu, avec la disparition des signaux caractéristiques du groupement silylé. Le composé obtenu avec un rendement de 30 % est donc bien le produit de glycosylation dont le groupement TBDMS a été déprotégé (Schéma 43).

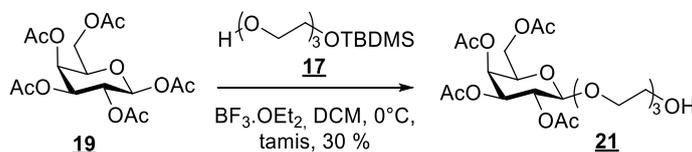


Schéma 43 : Produits de glycosylation entre les composés **19** et **17** en présence de  $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$

La réaction a également été effectuée en utilisant TMSOTf comme autre acide de Lewis.<sup>133</sup> Malheureusement, un suivi par CCM a montré que le glycoside de départ n'était pas converti même après 4 h de réaction.

Il a donc été décidé d'utiliser un éther silylé théoriquement moins sensible aux conditions acides, le TBDPS. La stabilité de l'espaceur monoprotégé a ainsi été testée dans différentes conditions de glycosylation :  $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ , TMSOTf et tétrafluoroborate de diméthyl(méthylthio)sulfonium (DMTSF). Dans l'hypothèse où la déprotection du silylé viendrait d'une acidité trop importante, ces conditions ont également été testées en présence d'une base, le 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU). Un suivi par CCM est effectué après 4 h et 1 nuit en prenant le composé **18** comme référence.

Expérience	Conditions	Stabilité 4 h	Stabilité 1 nuit
A	$\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ 48 % (1,5 eq)	Non	Non
B	TMSOTf (0,5 eq)	Oui	Non
C	TMSOTf (0,5 eq) DBU (1 eq)	Oui	Oui
D	DMTSF (2 eq)	Oui	Oui
E	DMTSF (2 eq) DBU (2,3 eq)	Oui	Oui

Tableau 4: Résultats des tests de stabilité du composé **18** en conditions de glycosylation

<sup>133</sup> Durham, T. B.; Roush, W. R. *Org. Lett.* **2003**, 5 (11), 1871–1874.

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

Les résultats obtenus (Tableau 4) montrent que le groupement TBDPS n'est durablement stable que dans les conditions C, D et E.

Afin de mettre en pratique ces résultats, le peracétate galactose **19** et l'espaceur TBDPS-protégé **18** sont mis en réaction en présence de TMSOTf et DBU dans le DCM. Si le suivi de cette réaction par CCM montre qu'il n'y a pas de dégradation de l'espaceur, il ne semble pas y avoir de conversion du glycoside de départ.

Par la suite, des essais de glycosylation entre le thioglycoside **20** et l'espaceur **18** ont été effectués en présence de DMTSF dans les conditions utilisées par Khorev *et al.* Un suivi par CCM a permis de vérifier la disparition du thioglycoside de départ mais une analyse RMN  $^1\text{H}$  a montré l'absence de signaux correspondant au silane indiquant que le groupement TBDPS a été dégradé dans ces conditions. Même si les composés n'ont pas été isolés, cela a été confirmé par spectrométrie de masse puisque la masse correspondant à l'attendu **20** ( $M = 719$  Da) n'a pas été observée contrairement à celles du produit de déprotection **21** ( $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 502,3$  Da) et du produit de diglycosylation ( $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 833,6$  Da) (Schéma 44).

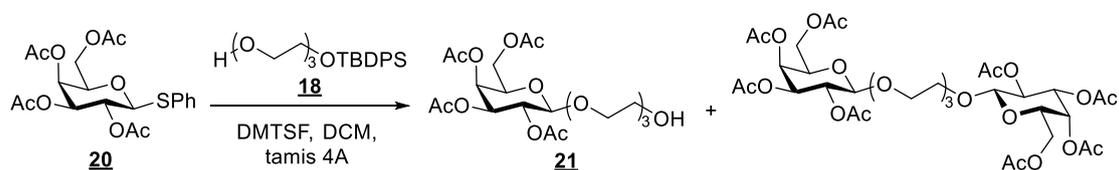


Schéma 44 : Produits obtenus après glycosylation du thioglycosides par le composé **18**

Ces difficultés semblant provenir des conditions acides utilisées pour la glycosylation, il a été décidé d'utiliser des réactions en présence de sels métalliques. Le galactoside **22** a ainsi été obtenu avec un rendement de 89 % en réalisant une glycosylation d'Helferich à partir de l'acétobromogalactose en utilisant du cyanure de mercure<sup>134</sup> sous ultrasons (Schéma 45).<sup>135</sup>

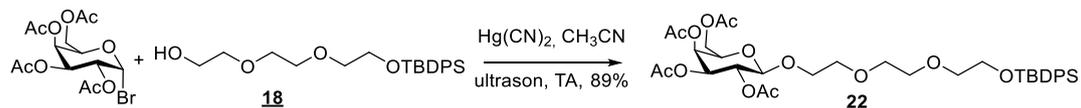


Schéma 45 : Préparation du galactoside **22** à partir de l'acétobromogalactose dans les conditions d'Helferich

La déprotection des acétates peut alors être effectuée dans les conditions de Zemplén en présence de méthanolate de sodium dans le méthanol.<sup>136</sup> Le composé désacétylé **23** est ainsi obtenu avec un rendement de 67%. Afin de n'avoir qu'une seule fonction réactive présente lors de la conjugaison, les fonctions alcool sont reprotégées par des groupements benzyle en présence de NaH et de bromure de benzyle. Cependant, l'efficacité de la protection s'est révélée moyenne puisqu'un mélange de produits di, tri et perbenzylé a été obtenu (Schéma 46).

<sup>134</sup> Helferich, B.; Zirner, J. *Chem. Ber.* **1962**, 95 (11), 2604–2611.

<sup>135</sup> Wathier, M.; Polidori, A.; Ruiz, K.; Fabiano, A.-S.; Pucci, B. *New J. Chem.* **2001**, 25 (12), 1588–1599.

<sup>136</sup> Zemplén, G.; Kuntz, A. *Chem. Ber.* **1924**, 57B, 1357.



## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

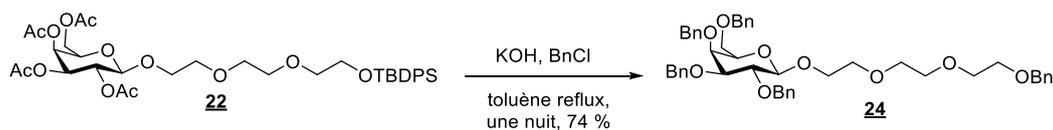


Schéma 47 : Perbenzylation du composé **22** en présence de potasse et BnCl

Afin d'obtenir le galactoside désiré en réalisant le changement de groupement protecteur dans ces mêmes conditions, un autre espaceur TEG a été préparé en le protégeant sous la forme d'un éther de *p*-méthoxybenzyle (PMB), stable dans ces conditions et qui peut être déprotégé sélectivement par des sels de cérium en présence de groupements benzyle. Le composé **25** a ainsi été obtenu avec un rendement de 64 % à partir du TEG en présence de PMBCl (addition lente au pousse-seringue) et de soude à 100°C pendant une nuit. Afin d'éviter l'utilisation de sels toxiques, la réaction de glycosylation a été réalisée selon les conditions de Koenigs-Knorr impliquant le carbonate d'argent, pour donner le galactoside **26** avec un rendement de 64 %.<sup>138</sup> Le changement de groupement protecteur en présence de soude et chlorure de benzyle permet ensuite d'obtenir le galactoside benzylé **27** avec un rendement de 64 % (Schéma 48).

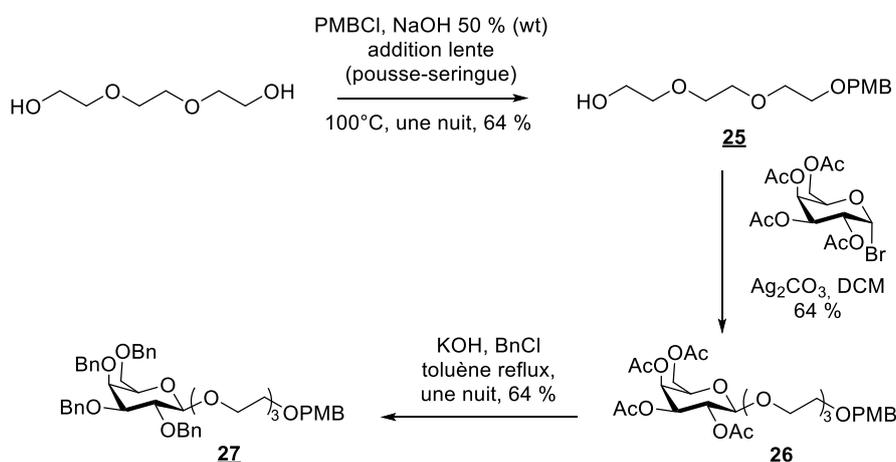


Schéma 48 : Synthèse du galactoside **27** par glycosylation de Koenigs-Knorr

En vue de réaliser une réaction de conjugaison, l'alcool primaire du composé **27** est déprotégé par du nitrate de cérium et d'ammonium (CAN) pour donner le galactoside **28** avec un rendement de 71 %. Ce dernier est ensuite mis en réaction avec le composé **7b** afin d'obtenir le conjugué Gal-TEG-SRO protégé, par formation d'un lien ester. Plusieurs conditions ont ainsi été testées, utilisant différents agents de couplage (DCC, EDC, HBTU, TBTU) mais aucune n'a permis d'obtenir le produit désiré (Schéma 49).

<sup>138</sup> Koenigs, W.; Knorr, E. *Chem. Ber.* **1901**, *34* (1), 957–981.

## Chapitre II : Adressage vers les hépatocytes

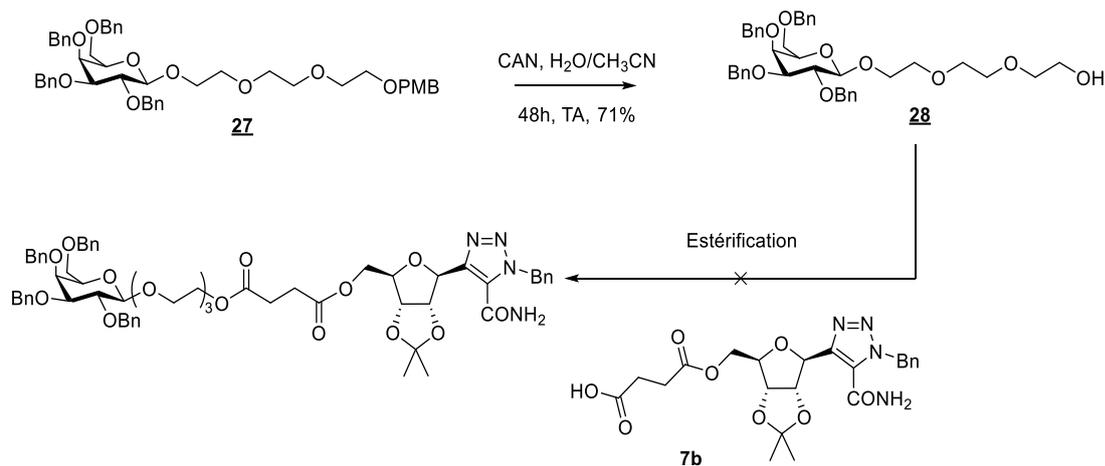


Schéma 49 : Première voie de synthèse du conjugué Gal-TEG-SRO protégé

L'hypothèse retenue était alors que l'alcool du composé **28** n'était pas assez nucléophile, peut-être à cause d'un repliement de la chaîne hydrophile. Une autre voie de synthèse a ainsi été envisagée (Schéma 50), commençant par l'ouverture de l'anhydride succinique par le composé **28** pour obtenir le composé **29** avec un rendement de 66 %. Le lien ester est alors formé en faisant réagir la fonction alcool du composé **6b**, donnant le conjugué **30** avec un rendement de 45 %. Le conjugué **30** attendu est finalement obtenu avec un rendement de 40 % après déprotection complète par hydrogénation catalytique avec du palladium sur charbon.

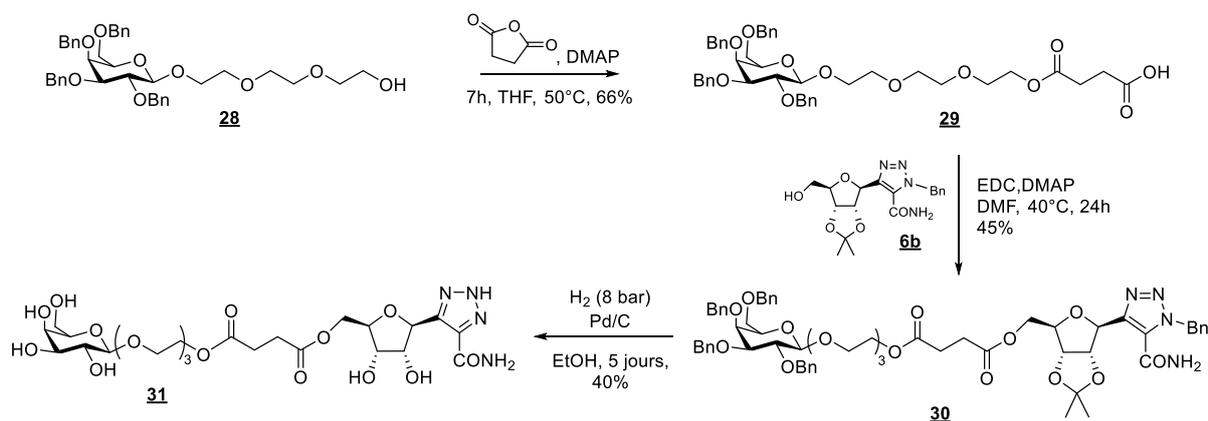


Schéma 50 : Deuxième voie de synthèse du conjugué Gal-TEG-SRO protégé

### 4. Conclusion sur la synthèse du conjugué Gal/SRO91

Le conjugué galactoside **31** a ainsi été obtenu en 6 étapes avec un rendement global de 3,5 % à partir de l'acétobromogalactose et le triéthylène glycol monoprotégé par un groupement PMB. Ce faible rendement peut s'expliquer par deux propriétés induites par la chaîne hydrophile TEG. En effet, la présence de cet espaceur a beaucoup limité les étapes de conjugaison par estérification certainement du fait d'une réactivité faible. De plus, la forte hydrophilie apportée par ce motif a rendu les purifications délicates, notamment dans le cas des derniers composés. Dans la mesure où la fonction amine est plus réactive que la fonction alcool, il serait intéressant de conjuguer le galactoside et le nucléoside succinique **7b** par une réaction d'amidification au lieu d'une estérification.

Néanmoins, le conjugué ainsi obtenu remplit les critères indispensables pour assurer une interaction avec les ASGPRs (taille, flexibilité, hydrophilie) et sera donc testé sur des lignées cellulaires hépatiques HepG2 ou Huh7.

