



HAL
open science

Synthèse d'inhibiteurs du canal potassique SK3 - composés à visée antimétastatique et vectorisation d'ARN interférents

Charlotte Sevrain

► **To cite this version:**

Charlotte Sevrain. Synthèse d'inhibiteurs du canal potassique SK3 - composés à visée antimétastatique et vectorisation d'ARN interférents. Chimie analytique. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2013. Français. NNT : 2013BRES0052 . tel-01065085

HAL Id: tel-01065085

<https://theses.hal.science/tel-01065085>

Submitted on 17 Sep 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



université de bretagne
occidentale



THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Chimie Fine

École Doctorale SICMA

présentée par

Charlotte Sevrain

Préparée au CEMCA, UMR CNRS 6521

Synthèse d'inhibiteurs du canal potassique SK3 - composés à visée anti-métastatique et vectorisation d'ARN interférents

Soutenance prévue le 16 mai 2013

devant le jury composé de :

Didier Dubreuil

Professeur, Université de Nantes / *Rapporteur*

Vincent Ferrières

Professeur, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes / *Rapporteur*

Christophe Vandier

Professeur, Université François Rabelais de Tours / *Examineur*

Paul-Alain Jaffrès

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *Examineur*

Hélène Couthon-Gourvès

Maître de conférences, Université de Bretagne Occidentale /
Directrice de thèse

Jean-Pierre Haelters

Ingénieur de recherche, Université de Bretagne Occidentale /
Directeur de thèse

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Chimie Fine

École Doctorale SICMA

présentée par

Charlotte Sevrain

Préparée au CEMCA, UMR CNRS 6521

**Synthèse d'inhibiteurs du
canal potassique SK3 -
composés à visée anti-
métastatique et
vectorisation d'ARN
interférents**

Soutenance prévue le 16 mai 2013

devant le jury composé de :

Didier Dubreuil

Professeur, Université de Nantes / *Rapporteur*

Vincent Ferrières

Professeur, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes /
Rapporteur

Christophe Vandier

Professeur, Université François Rabelais de Tours / *Examineur*

Paul-Alain Jaffrès

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *Examineur*

Hélène Couthon-Gourvès

Maître de conférences, Université de Bretagne Occidentale /
Directrice de thèse

Jean-Pierre Haelters

Ingénieur de recherche, Université de Bretagne Occidentale /
Directeur de thèse

Cette thèse a été réalisée au laboratoire de Chimie, Electrochimie Moléculaire et Chimie Analytique (CEMCA, UMR CNRS 6521) de l'Université de Bretagne Occidentale et financée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Je tiens à remercier très chaleureusement le Pr. Paul-Alain Jaffrès pour m'avoir accueillie dans l'équipe « Phosphore et Vectorisation » ainsi que pour ses nombreux conseils et sa disponibilité en tout temps.

Je remercie le Pr. Didier Dubreuil et le Pr. Vincent Ferrières pour l'honneur qu'ils me font de juger ce travail.

Un grand merci au Dr. Jean-Pierre Haelters pour m'avoir encadrée pendant ces années, pour ses conseils, sa disponibilité et pour m'avoir permis de me construire tant sur le plan scientifique que culturel.

Un très grand merci également au Dr. Hélène Couthon-Gourvès, ma chère co-directrice, pour tous ses conseils et son soutien sans faille. Merci pour le super coaching qui m'a permis d'encaisser les difficultés jusqu'au bout.

Je remercie le Pr. Pierre Lehn et le Dr. Tristan Montier qui m'ont permis de travailler au sein de l'équipe « Thérapie Génique et Cellulaire » (unité INSERM U1078) durant quatre mois. Ce stage m'a donné l'opportunité de découvrir le milieu de la recherche du côté de la biologie. Un grand merci également au Dr. Tony Le Gall, au Dr Mathias Lindberg, à Nathalie Carmoy et à Caroline Denis pour leur soutien, leur patience et leur gentillesse, j'ai beaucoup appris à leur contact.

Je remercie le Pr. Christophe Vandier et toute l'équipe « Nutrition, Croissance et Cancer » (unité INSERM U1069) pour la réalisation des tests biologiques et pour les nombreux échanges qu'il y a eu. Merci au Dr. Aurélie Chantôme, au Dr. Alban Girault pour leur aide et leur disponibilité. Je ne peux m'empêcher de penser à Aurore Douaud-Lecaille, au Dr. Marie Potier-Cartereau, à Lucie, Maxime et Michelle pour la gentillesse dont ils ont fait preuve à mon égard.

Tous mes remerciements au Dr. Stéphane Cerantola, au Dr. Gaëlle Simon et à Medhi Taiya du Service Commun de l'Université. Un immense merci à Nelly Kervarrec qui, même quand j'étais « lazy » ou dans un creux m'a fait l'effet d'une cure de vitamines.

Il faudrait un certain nombre de pages supplémentaires pour remercier tous les gens qui ont contribué, de près ou de loin, à cette thèse donc je vais faire de mon mieux pour ne pas faire passer le mémoire en annexes.

Je souhaiterais remercier tous les membres de l'UMR CNRS 6521 qui m'ont vue arriver en première année de licence et qui me voient finir ce doctorat. Je pense tout particulièrement aux membres du CR8-équipe 3, le Dr. Mathieu Berchel, nous avons découvert l'équipe ensemble, le Dr. Jean-Yves Salaün pour ses conseils et ses pâtisseries espagnoles, le Dr. Jean-Jacques Yaouanc, pour nos discussions et ses contrepèteries, et Sylvie Hernot, pour ses conseils toujours avisés. A tous les échelons ils ont tous été disponibles et accueillants.

Un immense merci aux jeunes et moins jeunes pour tous les moments passés ensemble au laboratoire et en dehors. Je pense à Aurore et nos escapades au TDM, Jacky, Ronan, Nicolas, Jessika, Carine et Sophie qui ont, chacun, vécu un bout de ce périple. Un grand merci à Karine et Christophe, qui me connaissent depuis la Licence. Stéphanie, Solène, Laetitia et Damien, notre petit dernier, pour tous les bons moments passés ensemble. Méliissa et Wilfried pour tout ce que vous m'avez apporté et pour votre amour du sucre. Merci à ceux qui ont eu la gentillesse de me corriger. Merci à ceux de tous les niveaux qui sont passés entre les murs de notre couloir : Zakaria, Mustapha, Mathieu, Clément, Vincent, Karima, Assane, Céline, Mame, Arthur et Adeline. Une immense pensée pour mes étudiants de L3 Maxence et Amaury, qui ont accompagné la fin de ma thèse. Je pense à tous ceux qui sont passés par le club jeune et que j'oublie de citer.

Comme tous les thésards il y a eu des hauts et des bas et il est toujours plus facile de les surmonter à plusieurs. Donc je voudrais adresser un immense merci à tous les doctorants que j'ai pu côtoyer avec l'association Dakodoc. Les physiciens, les biologistes, les immunologistes, les mathématiciens, les électroniciens et surtout les filles d'électroniques Sandra et July. J'en profite pour remercier chaleureusement Michèle Kerleroux pour sa

disponibilité, tous les membres du circuit des Cordées de la Réussite, Antoine Le Faouder et tous ceux avec qui je suis intervenue pour les différentes manifestations.

Merci à tous les membres du personnel de l'UBO que j'ai côtoyé quotidiennement et qui ont toujours été adorables, je pense en particulier à Cathy et Françoise. Enfin, un grand merci à l'immense couloir d'électronique.

Une thèse n'étant rien sans un entourage solide, un grand merci à Julien et ses questions toujours pertinentes, Camille, Marie, Maïna, Laura, et j'en oublie tant. Un merci sans limite à Florent pour tout le réconfort et la douceur qu'il m'offre. Il n'y a pas de mots assez forts pour remercier mes petits frères David et Nicolas et ma grande sœur Morgane, j'y vais en premier si vous le permettez. Un grand, un immense merci à tata Marilou pour son soutien sans faille et son œil avisé de correctrice. Une grosse pensée pour papy, parti trop tôt pour voir la fin de tout ceci mais qui m'a toujours soutenue dans mes choix. Enfin, à mes parents qui m'ont offert la liberté de faire les choses comme je l'entends et cela depuis toujours, je voudrais vous dédier ce travail.

Sommaire

| | |
|---|----|
| Introduction générale..... | 17 |
| PARTIE 1 : SYNTHÈSE D'INHIBITEURS DU CANAL SK3 – COMPOSÉS À VISÉE ANTI-MÉTASTATIQUE | 21 |
| CHAPITRE 1 : GÉNÉRALITÉS..... | 23 |
| I - Généralités | 25 |
| II - Métastases et migration cellulaire..... | 25 |
| 1 - Le processus métastatique..... | 25 |
| 2 - La migration cellulaire | 26 |
| III - Rôle du calcium et des canaux SKCa | 29 |
| 1 - L'influence des ions Ca ²⁺ | 29 |
| 2 - Les canaux SKCa | 30 |
| 2.1. Les canaux ioniques..... | 30 |
| 2.2. Les canaux potassiques SKCa | 30 |
| 2.2.1. Structure et expression des canaux SKCa..... | 31 |
| 2.2.2. Implication des canaux SKCa dans la cascade métastatique..... | 33 |
| 2.2.3. Modulation des canaux SKCa : inhibiteurs et activateurs | 35 |
| IV - L'édelfosine | 38 |
| 1 - Les éthers de glycérol naturels..... | 38 |
| 2 - Les éthers de glycérol anticancéreux synthétiques | 40 |
| 2.1. Historique | 40 |
| 2.2. L'édelfosine | 42 |
| V - Recherche de nouveaux éthers de glycérol | 46 |
| 1 - Étude structure-activité..... | 46 |
| 1.1. Analogues ne possédant plus le squelette glycérol | 47 |
| 1.2. Analogues présentant des modifications sur la chaîne en <i>sn</i> -1 | 48 |
| 1.3. Analogues présentant des modifications sur le motif en <i>sn</i> -2..... | 48 |
| 1.4. Analogues présentant des modifications de la tête polaire en <i>sn</i> -3..... | 49 |
| 2 - L'ohmline | 50 |
| 2.1. Effets sur la viabilité cellulaire..... | 50 |
| 2.2. Effets sur la migration dépendante du canal SK3..... | 51 |
| 2.3. Effet de la stéréoisomérisation de l'ohmline | 52 |

| | |
|--|----|
| 2.4. Sélectivité de l'ohmline vis-à-vis des canaux KCa..... | 53 |
| 2.5. Mécanisme d'action de l'ohmline | 54 |
| VI - Objectifs | 57 |
| CHAPITRE 2 : SYNTHÈSE ET ÉVALUATION DE GLYCOGLYCÉROLIPIDES ANALOGUES DE L'ÉDELFOSSINE | 59 |
| I - Les glyco-glycérolipides | 61 |
| 1 - Historique | 62 |
| 2 - Le MonoGalactosylDiacylGlycérol et le DiGalactosylDiacylGlycérol | 63 |
| 3 - Descriptif des travaux menés | 64 |
| II - Synthèse de glyco-glycérolipides..... | 64 |
| 1 - La <i>O</i> -glycosylation..... | 64 |
| 1.1. Méthode enzymatique | 65 |
| 1.2. Méthode de Fischer..... | 65 |
| 1.3. Méthode de Koenigs-Knorr | 65 |
| 1.4. Méthode de Helferich | 66 |
| 1.5. Méthode du trichloroacétimide..... | 67 |
| 1.6. Stratégie de synthèse | 67 |
| 2 - Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxy-1-propanol 5 | 69 |
| 3 - Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-6- <i>O</i> - α -D-galactopyranosyl- β -D-galactopyranoside 17 <i>via</i> une protection par des groupements benzyles | 71 |
| 3.1. Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -benzyl- β -D-galactopyranoside 11 | 71 |
| 3.2. Synthèse du 6- <i>O</i> -acétyl-2,3,4-tri- <i>O</i> -benzyl-1-iodo- α -D-galactopyranose 14 | 73 |
| 3.3. Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-6- <i>O</i> - α -D-galactopyranosyl- β -D-galactopyranoside 17 | 74 |
| 4 - Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-6- <i>O</i> - α -D-galactopyranosyl- β -D-galactopyranoside 17 <i>via</i> une protection par silylation..... | 76 |
| 4.1. Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-2,3,4-tris- <i>O</i> -(triméthylsilyl)- α -D-galactopyranoside 19 | 76 |
| 4.2. Synthèse du 2,3,4,6-tetrakis- <i>O</i> -(triméthylsilyl)-1-iodo- α -D-galactopyranose 21 | 77 |
| 4.3. Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-6- <i>O</i> - α -D-galactopyranosyl- β -D-galactopyranoside 17 | 78 |
| 5 - Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-4- <i>O</i> - β -D-galactopyranosyl- α -D-glucopyranoside 24 | 78 |
| 6 - Évaluations biologiques des composés 17 et 24 | 80 |

| | |
|---|-----|
| 6.1. Etude de l'efficacité d'inhibition du courant du canal SK3 | 80 |
| 6.2. Etudes de l'efficacité d'inhibition de la migration cellulaire | 81 |
| 6.3. Etudes de la toxicité des analogues de l'édelfosine : essais au MTT | 81 |
| III - Conclusion | 82 |
| IV - Partie expérimentale..... | 87 |
| | |
| CHAPITRE 3 : SYNTHÈSE ET ÉVALUATION DE PHOSPHATES ANALOGUES DE L'ÉDELFOSSINE | 115 |
| | |
| I - Synthèse de glycophospholipides et de glycothiophospholipides disaccharidiques | 117 |
| 1 - Les glycolipides | 117 |
| 1.1. Généralités | 118 |
| 1.2. Descriptif des travaux menés | 119 |
| 2 - Différentes stratégies de synthèse..... | 120 |
| 2.1. Phosphochloridites..... | 120 |
| 2.2. Phosphoramidites..... | 121 |
| 2.3. <i>H</i> -phosphonates | 123 |
| 3 - Synthèse des glycophospholipides disaccharidiques 28 | 124 |
| 3.1. Préparation du glycosylphosphite 26 par la voie du <i>H</i> -phosphonate | 124 |
| 3.2. Réaction de condensation | 127 |
| 3.3. Réaction de déprotection des glycophospholipides | 128 |
| 4 - Synthèse du glycothiophospholipide disaccharidique 30 | 128 |
| 4.1. Généralités | 128 |
| 4.2. Synthèse du glycothiophospholipide 30 | 129 |
| 5 - Etudes physico-chimiques et évaluation biologique des composés | 131 |
| 5.1. Etudes de la solubilité des composés dans l'eau | 131 |
| 5.2. Évaluation biologique des composés | 132 |
| 5.2.1. Etude de l'efficacité d'inhibition du courant du canal SK3 : Patch-clamp..... | 132 |
| 5.2.2. Etudes de l'efficacité d'inhibition de la migration cellulaire | 133 |
| 5.2.3. Etudes de la toxicité des analogues de l'édelfosine : essais au MTT | 133 |
| 5.2.4. Tests de sélectivité vis-à-vis des canaux SKCa..... | 134 |
| 6 - Conclusion | 134 |
| | |
| II - Synthèse d'un phospholipide à tête inositol..... | 136 |
| 1 - Généralités | 136 |
| 2 - Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl (\pm)- <i>myo</i> -inosityl phosphate de triéthyl- ammonium 39 | 137 |

| | |
|--|-----|
| III – Synthèse du (3-octadécyloxy-2-méthoxypropyl) phosphate | 139 |
| 1 - Généralités | 139 |
| 2 - Synthèse du (3-octadécyloxy-2-méthoxypropyl)phosphate 41 | 139 |
| IV – Partie expérimentale..... | 143 |
| 1 - Procédure générale de protection des disaccharides 24 | 143 |
| 2 - Procédure générale de déprotection sélective des disaccharides 25 | 145 |
| 3 - Procédure générale de synthèse du phosphite disaccharidique 26 | 147 |
| 4 - Procédure générale de synthèse des glycophospholipides protégés 27 | 150 |
| 5 - Procédure générale de déprotection des glycophospholipides 28 | 155 |
| | |
| PARTIE 2 : SYNTHÈSE ET ÉVALUATION DE CO-LIPIDES NEUTRES À TÊTE CIBLANTE POUR LA VECTORISATION D'ARN INTERFERENTS | 173 |
| | |
| CHAPITRE 1 : GÉNÉRALITÉS..... | 175 |
| | |
| I - Le transfert de gènes..... | 177 |
| II - La vectorisation | 179 |
| 1 - Les vecteurs viraux | 179 |
| 2 - Les vecteurs synthétiques | 181 |
| 2.1. Les polymères cationiques | 181 |
| 2.2. Les lipides cationiques..... | 182 |
| 3 - Les liposomes | 183 |
| 4 - Les lipoplexes | 184 |
| 5 - Le transfert de gènes..... | 185 |
| III - L'évolution des lipides cationiques | 187 |
| IV - ARN interférents et récepteurs sigma | 190 |
| 1 - Les ARN interférents..... | 190 |
| 2 - Les récepteurs sigma | 192 |
| V - Objectifs | 195 |
| | |
| CHAPITRE 2 : SYNTHÈSE ET ÉVALUATION DE CO-LIPIDES NEUTRES À TÊTE CIBLANTE POUR LA VECTORISATION D'ARN INTERFERENTS | 197 |
| | |
| I - Synthèse des différents co-lipides neutres | 199 |
| 1 - Synthèse de phosphoramides : réaction d'Atherton et Todd..... | 200 |
| 2 - La « click-chemistry » : cycloaddition de Huisgen..... | 202 |

| | |
|--|-----|
| 3 - Synthèse des co-lipides neutres par la « click-chemistry » | 203 |
| 3.1. Stratégie de synthèse | 203 |
| 3.2. Synthèse du bis(3,7,11,15-tetraméthylhexadécyl)-2-{4-[15-(4-méthoxyphényl)-15-oxo-2,5,8,11-tetraoxa-14-azapentadéc-1-yl]-1 <i>H</i> -1,2,3-tri-azol-1-yl}-3,6,9-trioxaundécyl phosphoramidate 51 | 205 |
| 3.2.1. Synthèse du 11-azido-3,6,9-trioxaundécylphosphoramidate de bis-3,7,11,15-tetraméthylhexadécyle 45 | 205 |
| 3.2.2. Synthèse du 4-méthoxy- <i>N</i> -(3,6,9,12-tetraoxapentadéc-14-ynyl) benzamide 50 | 206 |
| 3.2.3. Synthèse du composé 51 | 207 |
| 3.3. Synthèse du bis(3,7,11,15-tetraméthylhexadécyl)-2-{4-[15-(4-méthoxyphényl)-15-oxo-5,8,11-trioxa-2,14-diazapentadéc-1-yl]-1 <i>H</i> -1,2,3-tri-azol-1-yl}-3,6,9-trioxaundécyl phosphoramidate 55 | 207 |
| 3.3.1. Synthèse du <i>N</i> -(13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azapentadéc-14-yn-1-yl)-4-méthoxybenzamide 54 | 207 |
| 3.3.2. Synthèse du composé 55 | 208 |
| 3.4. Synthèse du bis(3,7,11,15-tetraméthylhexadécyl)-13-(4-méthoxyphényl)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azatridéc-1-yl phosphoramidate 56 et du bis(oléyl)-(4-méthoxyphényl)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azatridéc-1-yl phosphoramidate 57 | 208 |
| II - Etudes physico-chimiques et évaluation biologique des composés | 209 |
| 1 - Formulation des composés | 209 |
| 2 - Mesures de taille et de potentiel zêta des liposomes..... | 210 |
| 3 - Evaluation de la complexation de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose et par fluorimétrie | 211 |
| 4 - Mesure de la toxicité cellulaire | 212 |
| 4.1. MDA-MB-435 sh rd..... | 214 |
| 4.2. SKMEL28..... | 214 |
| 4.3. HeLa..... | 215 |
| 5 - Révélation de l'efficacité de transfection des vecteurs | 216 |
| 5.1. MDA-MB-435 sh rd..... | 216 |
| 5.2. SKMEL28..... | 216 |
| 5.3. HeLa..... | 217 |
| III - Discussion et conclusion..... | 218 |
| IV - Partie expérimentale..... | 223 |
| Conclusion générale | 243 |
| ANNEXES..... | 249 |

Abbréviations et acronymes

Ac : acétyl

ADA : adénosine désaminase

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

AK : adénylate kinase

Alk : alkyl

APC : alkylphosphocholine

APL : alkylglycérophospholipides

ARN : acide ribonucléique

ARNi : acide ribonucléique interférent

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine triphosphate

ATR : Attenuated Total Reflectance

BET : Bromure d'éthidium

BKCa : big conductance calcium activated potassium channel

Bn : benzyle

CCM : chromatographie sur couche mince

CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CMV : Cytomégalovirus

DABCO : 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DGDG : digalactosyldiacylglycérol

DICS-X : déficit immunitaire combiné sévère lié au chromosome X

DIPEA : diisopropyléthylamine

DMF : diméthylformamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

DO : densité optique

DOPE : dioléylphosphatidyléthanolamine

DOSPA : trifluoroacétate de 2,3-dioléyloxy-N-[2-(spermine carboxamido)éthyl]-N,N-

diméthyl-1-propanammonium
DOTMA : chlorure de [1-(2,3-dioléoxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium
EGFR : epidermal growth factor receptor
ESI-TOF : Electrospray ionization-Time-of-flight
Gal : galactose
Glu : glucose
HRMS : High-resolution mass spectroscopy
IKCa : intermediate conductance calcium activated potassium channel
IP₃ : inositol triphosphate
IR : infra-rouge
IV : intravéineuse
KCa : calcium activated potassium channel
Lac : lactose
LFM : lipofectamine
MALDI TOF-TOF : Matrix-assisted laser desorption/ionization Time-of-flight-Time-of-flight
MEC : matrice extracellulaire
MGDG : monogalactosyldiacylglycerol
MMP : Matrix Metalloproteinases
MS : mass spectroscopy
MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltetrazolium
PAF : Platelet-Activating Factor
PEG : polyéthylène glycol
PEI : polyéthylènimines
PET : polyéthylènetéréphtalate
PLL : poly-L-lysine
PtdGlc : phosphatidylglucoside
RC : rapport de charge
RISC : RNAi Induced Silencing Complex
RLU : Relative Light Unit
RMN : résonnance magnétique nucléaire
siRNA : small interference ribonucleic acid

SK1 : small conductance calcium activated potassium channel 1

SK2 : small conductance calcium activated potassium channel 2

SK3 : small conductance calcium activated potassium channel 3

SK4 : small conductance calcium activated potassium channel 4

SKCa : small conductance calcium activated potassium channel

sn : stereochemical numbering

SVF : sérum de veau fœtal

TBAI : iodure de tetrabutylammonium

TEG : tétraéthylène glycol

THF : tétrahydrofurane

TMS : triméthylsilyle

TMSCl : chlorure de triméthylsilyle

TMSI : iodure de triméthylsilyle

TMSOAc : acétate de triméthylsilyle

TMSOTf : triflate de triméthylsilyle

Tr : trityl

UV : ultraviolet

Introduction générale

Le terme cancer est apparu dès l'Antiquité, donné par Hippocrate pour qui le cancer « a des veines étendues de tous côtés, de même que le crabe a des pieds », d'où la terminologie de « karkinos ». Il s'agit d'un dysfonctionnement caractérisé par une prolifération cellulaire anarchique au sein d'un tissu normal de l'organisme puis des tissus avoisinants pour, à terme, atteindre les tissus éloignés après échappement des cellules cancéreuses. Ces cellules ont acquis, outre leurs capacités à proliférer, de nouvelles capacités de résistance à la mort cellulaire et de migration.

Malgré l'avancée de la médecine moderne tant du point de vue du diagnostic que des moyens techniques, le cancer reste une pathologie encore extrêmement problématique en France et dans l'ensemble des pays développés. Le « 2^{ème} rapport d'étape au Président de la République » du Plan Cancer 2009-2013 communique les principales données concernant le cancer en France, il rapporte que l'incidence des cancers est en hausse mais qu'il y a une diminution de la mortalité. Il est également montré que, chez l'homme, les cancers de la prostate, des poumons et les cancers colorectaux sont les plus fréquents tandis que, chez la femme, le cancer du sein est majoritaire mais les cancers broncho-pulmonaires et colorectaux demeurent très fréquents. Le cancer reste la première cause de mortalité chez les hommes (84500 décès en 2010) et la deuxième chez les femmes (62000 décès) et 90% de cette mortalité est due à la formation de métastases (Figure 1). Prévenir leur apparition est donc un enjeu majeur.

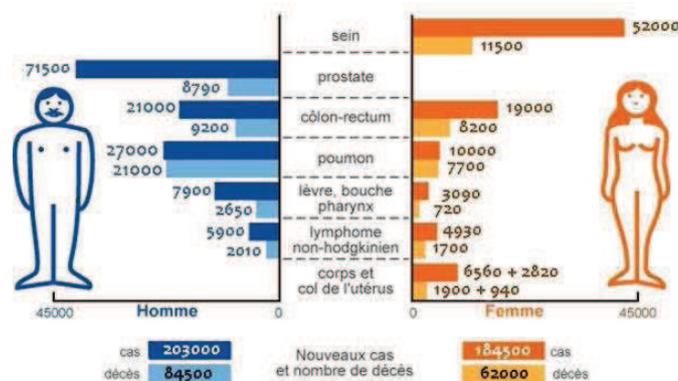


Figure 1 : Les chiffres du cancer en 2010 (source InVs)

Il a été récemment montré qu'un canal potassique, le canal SK3, participait à la migration de cellules cancéreuses mammaires à fort pouvoir métastatique¹. L'édelfosine, un glycérolipide déjà connu pour ses propriétés antitumorales, a montré des effets inhibiteurs sur l'activité de ce canal et sur la migration cellulaire à des concentrations de l'ordre du nanomolaire (Figure 2). Depuis, l'expression de ce canal SK3 dans d'autres lignées cellulaires très métastatiques du cancer du sein, de la prostate et du mélanome a été mise en évidence. Une étude structure-activité de l'édelfosine, menée au sein de notre laboratoire afin de trouver des analogues moins toxiques, a permis de sélectionner un premier composé que nous avons nommé ohmline (1-*O*-Hexadécyl-2-*O*-Méthyl-sn-glycéro-Lactose) (Figure 2). Contrairement à l'édelfosine, ce composé ne présente aucune toxicité tout en conservant la même activité inhibitrice de SK3 et sur la migration cellulaire que la molécule de référence. Une réduction du développement des métastases sans modification de la tumeur primaire a été observée lors des tests de l'ohmline sur un modèle murin de développement tumoral.

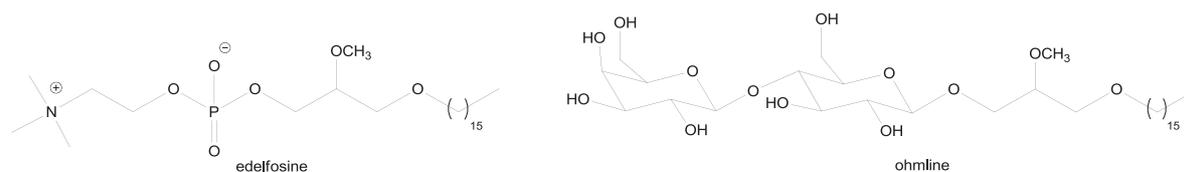


Figure 2 : Structures de l'édelfosine et de l'ohmline

Ces résultats font de la protéine SK3 une cible thérapeutique intéressante. Dans ce travail, deux stratégies sont mises en œuvre pour inhiber son activité.

La première, développée dans la première partie de ce mémoire, porte sur l'élaboration de nouveaux composés analogues de l'édelfosine et de l'ohmline dans le but de compléter l'étude structure-activité déjà réalisée. La synthèse de nouveaux glyco-glycérolipides et de glycopospho-glycérolipides ainsi que leurs applications seront décrites.

La deuxième stratégie, qui est abordée dans la deuxième partie de ce mémoire, vise à l'utilisation possible d'ARN interférents pour bloquer l'expression de la protéine SK3. Dans ce but, notre étude s'est concentrée sur la synthèse et la formulation de liposomes comportant un

¹ Potier, M. ; Joulin, V. ; Roger, S. ; Besson, P. ; Jourdan, M.L. ; Le Guennec, J.Y. ; Bougnoux, P. ; Vandier, C. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, 5, 2946-2953

motif de ciblage de type anisamide. Ce dernier peut être reconnu par les récepteurs sigma qui sont surexprimés dans les lignées cellulaires des tumeurs exprimant SK3. La synthèse de lipophosphoramides comportant un motif anisamide sera présentée suivi de leur utilisation dans des expériences de transfection modèles (vectorisation d'ADN plasmidique) visant à évaluer l'efficacité du ciblage engendré par le motif anisamide.

**PARTIE 1 : SYNTHÈSE D'INHIBITEURS DU
CANAL SK3 - COMPOSÉS À VISEE ANTI-
METASTATIQUE**

CHAPITRE 1 : GENERALITES

I - Généralités

Un cancer peut avoir plusieurs origines. Il peut être issu d'une mutation dans le génome ou avoir une origine héréditaire, être la conséquence du vieillissement ou encore être induit par des agents infectieux tels que les virus². Les facteurs environnementaux ont également un rôle déterminant dans le développement d'un cancer (mode de vie, exposition aux radiations ou à des substances dangereuses³). Dans la plupart des cas de cancers, il n'y a pas une seule et unique cause à son développement mais tout un ensemble (c'est un phénomène multiparamétrique).

Il a été montré que les cancers se développent en suivant trois étapes : l'initiation, la promotion et la progression⁴. Les travaux présentés ici ont pour but la synthèse de composés agissant sur la progression cellulaire, nous ne développerons donc que cette étape. En effet, les deux premières étapes consistent en l'apparition des modifications de l'ADN d'une cellule, au développement et à la multiplication de celle-ci. L'étape de progression consiste en un envahissement de l'environnement jusqu'à l'échappement de cellules cancéreuses vers des sites secondaires conduisant à la formation de micro-métastases puis de métastases.

II - Métastases et migration cellulaire

1 - Le processus métastatique

Bien que les progrès médicaux et techniques permettent de détecter et traiter de plus en plus rapidement les tumeurs primaires (tumeurs d'origine), les métastases (tumeurs secondaires) demeurent un problème majeur et la principale cause de décès liés au cancer. En effet, il s'agit de l'envahissement d'organes vitaux par les cellules issues de la tumeur primaire, entraînant parfois la mort du patient.

² a) Kao, J.H. ; Chen, P.J. ; Chen, D.S. *Adv. Cancer Res.* **2010**, *108*, 21-72. b) Rajcani, J. ; Asvanyi-Molnar, N. ; Szathmary S. *Acta Microbial Immunol. Hung* **2010**, *57*, 349-376

³ a) Pfeifer, G.P. ; Denissenko, M.F. ; Olivier, M. ; Tretyakova, N. ; Hecht, S.S. ; Hainaut, P. *Oncogene* **2002**, *21*, 7435-7451. b) Castronovo, V. *Rev. Med. Liege* **2003**, *58*, 231-239

⁴ a) Faber, A. *Cancer Res.* **1984**, *44*, 4217-4223. b) Harris, C.C. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 5023s-5044s. c) Jakobisiak, M. ; Lasek, W. ; Golab, J. *Immunol. Lett.* **2003**, *90*, 103-122

Cependant, pour pouvoir s'échapper de la tumeur primaire et atteindre d'autres sites, les cellules cancéreuses doivent acquérir certaines propriétés leur permettant de migrer mais aussi des propriétés invasives pour pouvoir circuler dans le corps et pénétrer les sites secondaires. Le développement des métastases (« métastatogénèse ») est un processus multifactoriel pouvant être décrit comme une cascade métastatique (Figure 3).

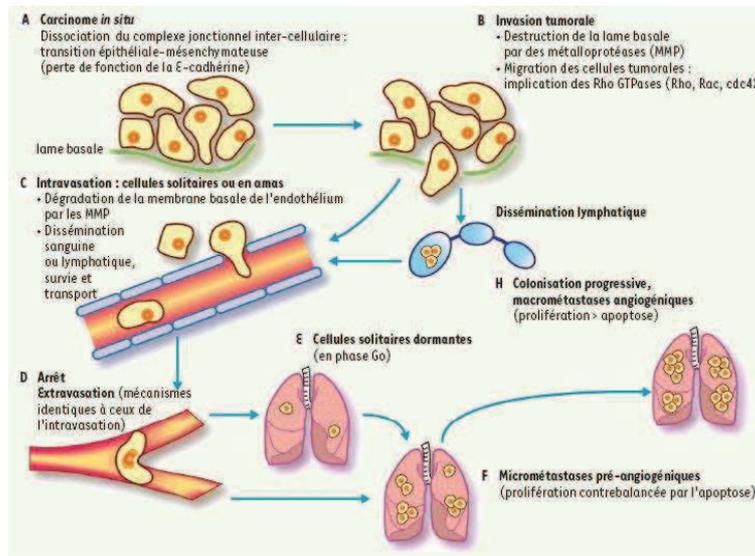


Figure 3 : Cascade métastatique
D'après Boissan, Poupon et Lacombe, 2007⁵

La cascade métastatique dépend donc de nombreux phénomènes mais surtout des propriétés intrinsèques des cellules cancéreuses et de leurs interactions avec les cellules stromales, ainsi que de la capacité de l'environnement tumoral à former une « niche » pour leur implantation. Un des éléments fondamentaux à cette cascade est la capacité de ces cellules tumorales à pouvoir migrer.

2 - La migration cellulaire

La migration cellulaire est un phénomène essentiel pour le développement et la survie de tout organisme. Dès l'embryogénèse, la formation des nouveaux organes nécessite une forte capacité des cellules à migrer. Cette capacité reste importante à l'âge adulte, ne serait-ce

⁵ Boissan, M. ; Poupon, M.F. ; Lacombe, M.L. *Med. Sci.* **2007**, *23*, 1115-1123

que pour le système immunitaire (par exemple, dans la réponse inflammatoire où les leucocytes doivent pouvoir atteindre le site touché pour réaliser la réponse immunitaire, où encore pour la phagocytose⁶). Les cellules tumorales, ayant la capacité à former des métastases, doivent pouvoir migrer de la tumeur primaire vers le système circulatoire puis vers de nouveaux tissus⁷. Pour cela, les cellules vont passer dans différents états de coordination entre adhésion et dégradation de la matrice extracellulaire (MEC). Ces phénomènes vont induire l'aide de différents partenaires tels que le cytosquelette composé d'actine, les protéines d'adhésion, les protéases.

Pour les cellules eucaryotes, il existe différents mécanismes de migration dépendant de la morphologie de la cellule.

Les cellules peu polarisées, peu adhésives et présentant un phénotype globalement rond, migreront suivant un mode dit « amiboïde », c'est-à-dire qu'elles se déplaceront par une série de contraction-relaxation du cytosquelette en s'appuyant sur les éléments environnants.

Les autres cellules suivront un mode de migration dit migration mésenchymateuse. Les cellules vont utiliser successivement des protéases et des intégrines afin de dégrader l'environnement ou de se fixer à lui. Une fois le front de migration fixé à la MEC, le cytosquelette va se contracter et rétracter la partie arrière qui s'est détachée du support. Ce processus peut être décomposé en quatre étapes (Figure 4)⁸ :

- La cellule va dans un premier temps s'étirer dans le sens du déplacement, les différents prolongements vont se former à la suite de la fixation de protéines d'adhésion à la MEC.
- Les protéines d'adhésion vont se regrouper et l'ensemble des interactions cellule-MEC va se stabiliser. Le cytosquelette va se contracter créant ainsi les forces de tension nécessaires au mouvement de la cellule dans le sens de la migration désiré.
- Les complexes de fixation à la MEC situés à l'arrière de la cellule vont se dissocier et se décrocher du support. La cellule va alors se rétracter, de part les forces de tensions créées par la contraction du cytosquelette, dans le sens du mouvement cellulaire désiré.

⁶ Wong, C.H. ; Heit, B. ; Kubes, P. *Cardiovasc. Res.* **2010**, *86*, 183-191

⁷ Yilmaz, M. ; Christofori, G. *Mol. Cancer Res.* **2010**, *8*, 629-642

⁸ Lauffenburger, D.A. ; Horwitz, A.F. *Cell* **1996**, *84*, 359-369

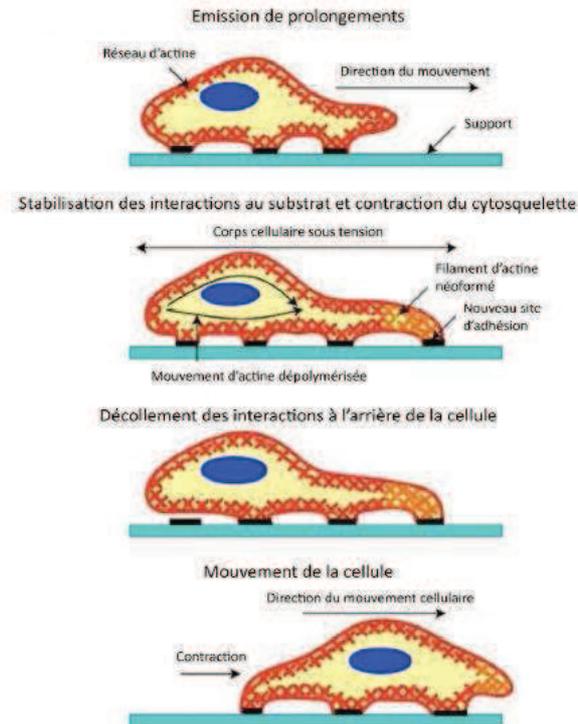


Figure 4 : Migration cellulaire
 Modifié d'après Ananthkrishnan & Erlicher, 2007⁹

Cette description convient parfaitement aux modèles en deux dimensions. Cependant, dans les modèles *in vivo* et certains modèles *in vitro*, les cellules sont dans un environnement en trois dimensions. Le processus peut alors avoir besoin d'utiliser des protéases afin de modeler ou dégrader la MEC pour pouvoir progresser¹⁰. Différentes études ont été menées sur les MMPs (« Matrix Metalloproteinases »), la présence et l'activité de ces enzymes sont bien plus importantes dans quasiment tous les cancers humains que dans les tissus sains. Elles régulent le microenvironnement tumoral (angiogénèse, etc) et jouent un rôle majeur dans la croissance, la différenciation, l'apoptose, la migration et l'invasion des cellules tumorales. De nombreux inhibiteurs de ces MMPs ont été étudiés. Malgré des premiers

⁹ Ananthkrishnan, R. ; Erlicher, A. *Int. J. Biol. Sci.* **2007**, *3*, 303-317

¹⁰ a) Morozevich, G. ; Kozlova, N. ; Cheglakov, I. ; Ushakova, N. ; Berman, A. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 2219-2225. b) Saito, Y. ; Sekine, W. ; Sano, R. ; Komatsu, S. ; Mizuno, H. ; Katabami, K. ; Shimada, K. ; Oku, T. ; Tsuji, T. *Clin. Exp. Metastasis* **2010**, *27*, 197-205. c) Sen, T. ; Dutta, A. ; Maity, G. ; Chatterjee, A. *Biochimie* **2010**, *92*, 1422-1434

essais *in vivo* très prometteurs, les tests cliniques ont montré trop d'effets secondaires et un manque de sélectivité trop important pour poursuivre dans cette voie¹¹.

III - Rôle du calcium et des canaux SKCa

1 - L'influence des ions Ca²⁺

Différents éléments entrent en jeu dans le mécanisme de migration cellulaire, tant d'un point de vue physique que chimique. L'un des principaux pré-requis de cette migration est la polarisation du cytosquelette qui modifie la forme de la cellule et la prépare à la migration¹². Au sein même de la cellule, les ions calcium Ca²⁺ jouent un rôle important de médiation. Ils peuvent, en effet, réguler la formation et le « turn-over » des filaments d'actine, l'assemblage et le renouvellement des points focaux d'adhésion, l'activité des enzymes et des canaux KCa. Il a été montré que l'inhibition de certaines enzymes, telles que la calpaïne (une enzyme dont l'activité est dépendante des ions Ca²⁺), entraînait un ralentissement du détachement de la partie arrière de la cellule ainsi qu'un renforcement des liens entre le cytosquelette et les intégrines¹³.

Les travaux réalisés par Hahn¹⁴ et son équipe en 1992 ont permis de mettre en évidence la présence d'un gradient de Ca²⁺ au sein même d'une cellule. La concentration en Ca²⁺ à l'arrière de la cellule étant plus importante qu'à l'avant, ceci permet le décrochage à l'arrière, la formation de points focaux d'adhésion à l'avant et la contraction du cytosquelette. Le Ca²⁺ peut provenir de la cellule en elle-même mais aussi du milieu extracellulaire¹⁵. La régulation de la concentration calcique est donc une stratégie thérapeutique envisageable.

Parmi les différents acteurs de l'homéostasie calcique, les canaux potassiques jouent un rôle majeur.

¹¹ Egeblad, M. ; Werb, Z. *Nature Rev. Cancer* **2002**, 2, 161-172

¹² Verkhovsky, A.B. ; Svitkina, T.M. ; Borisy, G.G. *Curr. Biol.* **1999**, 9, 11-20

¹³ Huttenlocher, A. ; Palecek, S.P. ; Lu, Q. ; Zhang, W. ; Mellgren, R.L. ; Lauffenburger, D.A. ; Ginsberg, M.H. ; Horwitz, A.F. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 32719-32722

¹⁴ Hahn, K. ; DeBiasio, R. ; Taylor, D.L. *Nature* **1992**, 359, 736-738

¹⁵ Rondé, P. ; Giannone, G. ; Gerasymova, I. ; Stoeckel, H. ; Takeda, K. ; Haiech, J. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1498, 273-280

2 - Les canaux SKCa

2.1. Les canaux ioniques

Les canaux ioniques sont des protéines membranaires capables de faire transiter une ou plusieurs espèces ioniques au travers de la membrane cellulaire de manière plus ou moins sélective. Il existe de nombreux canaux perméables à différents ions (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- ...). De nombreux phénomènes cellulaires impliquent ces canaux, aussi bien dans des cellules excitables, où elles permettent la formation et la propagation de potentiels d'action, mais également dans des cellules dites « non excitables ». Ainsi, par exemple, les canaux calciques interviennent dans la régulation de la motilité des ostéoclastes et la résorption osseuse¹⁶, ou bien dans l'activation ou la prolifération lymphocytaire¹⁷.

2.2. Les canaux potassiques SKCa

Les canaux potassiques sont les canaux les plus nombreux et les plus variés parmi les canaux ioniques. Dans les cellules excitables, l'activité de ces canaux joue un rôle crucial dans la génération et la fréquence des potentiels d'action ainsi que dans le contrôle de l'excitabilité membranaire. Chez l'homme, les canaux potassiques qu'on retrouve dans tous les tissus, sont impliqués dans divers processus physiologiques tels que la transmission synaptique, la contraction musculaire, la mémoire, la sécrétion de neurotransmetteurs ou la régulation du rythme cardiaque. Dans les cellules non excitables, les canaux potassiques sont impliqués dans le contrôle du volume cellulaire, la prolifération, la sécrétion d'hormones ou encore l'apoptose.

De nombreuses études ont montré de manière univoque que des canaux potassiques appartenant à différentes sous-familles sont également des éléments importants de la migration cellulaire. Une inhibition de ces canaux ralentit la migration cellulaire.

¹⁶ Robinson, L.J. ; Blair, H.C. ; Barnett, J.B. ; Zaidi, M. ; Huang, C.L. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2010**, *1192*, 351-357

¹⁷ a) Rajan, S. ; Aguilar-Bryan, L. ; Nelson, D.A. ; Yaney, G.C. ; Hsu, W.H. ; Kunze, D.L. ; Boyd III, A.E. *Diabetes Care* **1990**, *13*, 340-363. b) Panyi, G. ; Bagdany, M. ; Bodnar, A. ; Vamosi, G. ; Szentesi, G. ; Jenei, A. ; Varga, S. ; Waldmann, T.A. ; Gaspar, R. ; Damjanovich, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 2592-2597

L'implication dans de nombreux rôles physiologiques de ces canaux fait qu'une mutation génétique, une sous-expression, une surexpression ou une expression inédite accompagnent de nombreuses pathologies dont le cancer.

Plus de 70 gènes codent pour des canaux potassiques qui sont classés en différentes familles. Nous nous intéressons ici aux canaux potassiques SKCa appartenant à la famille des canaux KCa (« calcium activated potassium channel »). Cette dernière regroupe tous les canaux potassiques activés par les ions calcium : les canaux BKCa (big conductance KCa channel), IKCa (intermediate conductance KCa channel) et SKCa (small conductance KCa channel). Le rôle principal des canaux KCa est de réguler la concentration calcique intracellulaire en fonction du potentiel de membrane.

2.2.1. Structure et expression des canaux SKCa

Les canaux SKCa ont été mis en évidence par des études visant à caractériser la phase d'hyperpolarisation des potentiels d'action des canaux¹⁸. Ces canaux sont composés de différents types de sous-unités : les sous-unités α , principales, formant le pore et les sous-unités β , ayant un rôle de régulation.

La structure moléculaire de ces canaux a été découverte par l'équipe d'Adelman et c'est en 1996 qu'ils ont été clonés et caractérisés¹⁹. Trois protéines correspondant à trois isoformes des sous-unités α ont été mises en évidence et nommées SK1, SK2 et SK3. Ces protéines possèdent six domaines transmembranaires et un domaine pore. Les extrémités N- et C-terminales sont situées au niveau intracellulaire. Leur association en tétramère donne un canal fonctionnel (Figure 5).

L'activation des canaux SKCa s'effectue *via* une modification de conformation de la calmoduline après fixation d'ions Ca^{2+} (la désactivation étant due au décrochage de ces ions)²⁰. La calmoduline est une protéine ubiquitaire qui module l'activité des protéines auxquelles elle est associée en fonction de la concentration calcique.

¹⁸ Moolenaar, W.H. ; Spector, I. *J. Physiol.* **1979**, 292, 307-323

¹⁹ Kohler, M. ; Hirschberg, B. *Science* **1996**, 273, 1709-1715

²⁰ Xia, X.M. ; Fakler, B. ; Rivard, A. ; Wayman, G. ; Johnson-Pais, T. ; Keen, J.E. ; Ishii, T. ; Hirschberg, B. ; Bond, C.T. ; Lutsenko, S. ; Maylie, J. ; Adelman, J.P. *Nature* **1998**, 395, 503-507

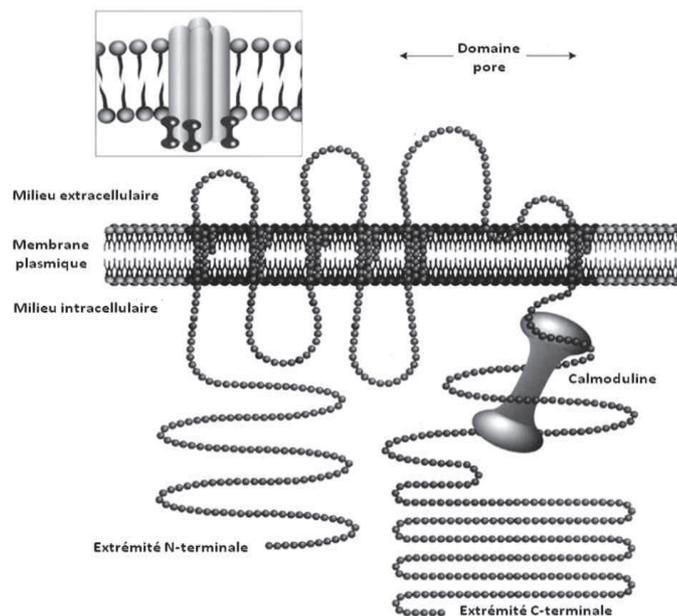


Figure 5 : Structure des canaux SKCa
 Modifié d'après Bond et coll., 1999²¹

Les travaux menés par Chen et coll.²² en 2004 présentent l'expression des ARNm codant pour les sous-unités α des canaux SKCa. Cette étude a été menée sur un large panel de tissus humains et l'étude de leurs expressions protéiques a également été développée au niveau du colon et du corps caverneux. Plusieurs éléments ressortent de cette étude (Figure 6) :

²¹ Bond, C.T. ; Maylie, J. ; Adelman, J.P. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1999**, 868, 370-378

²² Chen, M.X. ; Gorman, S.A. ; Benson, B. ; Singh, K. ; Hieble, J.P. ; Michel, M.C. ; Tate, S.N. ; Trezise, D.J. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2004**, 369, 602-615

Nombre de copies d'ARNm pour 50 ng d'ARN total

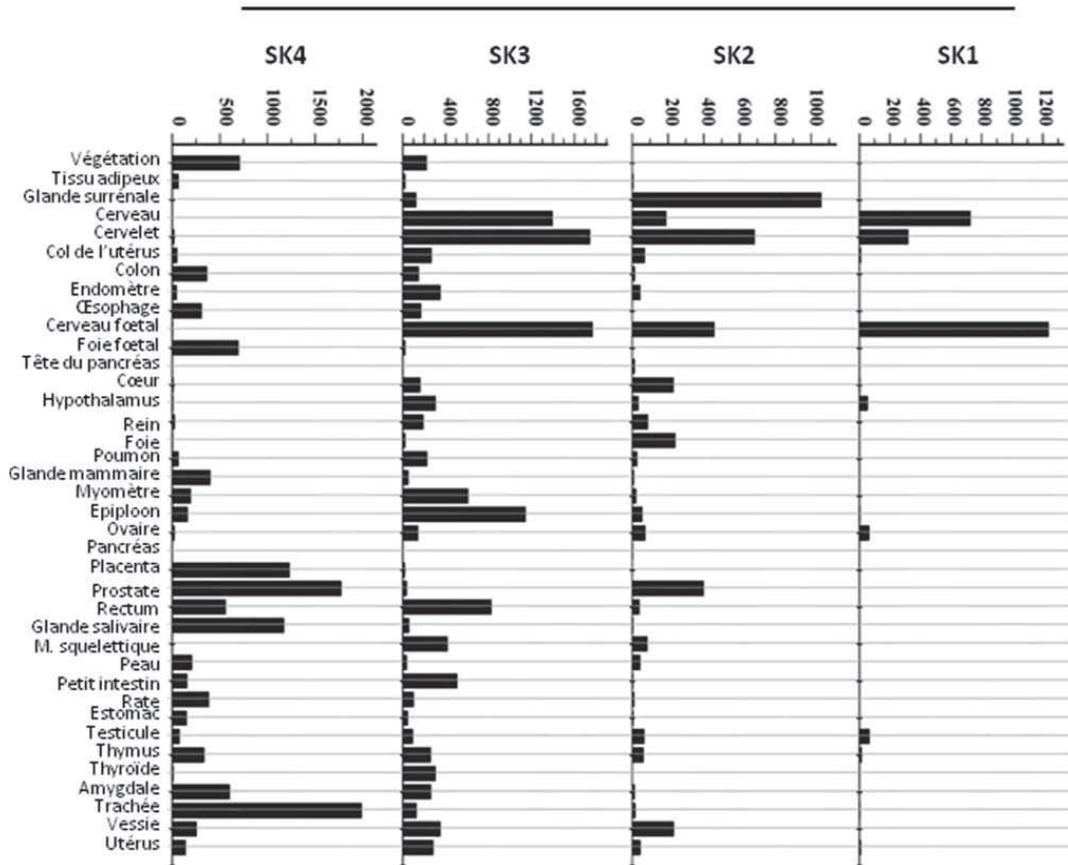


Figure 6 : Expression tissulaire des ARNm codant pour les canaux SK1-4
Modifié d'après Chen et coll., 2004²²

- Le canal SK1 est exprimé uniquement dans les cellules neuronales.
- Les canaux SK2 et SK3 sont présents dans la plupart des tissus.
- L'ARNm codant pour le canal SK3 est le plus ubiquitaire. Il est en effet présent dans tous les tissus testés hormis dans le pancréas.
- Le canal SK4 (IKCa) est totalement absent du système nerveux central.

2.2.2. Implication des canaux SKCa dans la cascade métastatique

Les canaux SKCa ont pour but de réguler la concentration calcique au sein d'une cellule en fonction du potentiel à la membrane. Leurs rôles au sein de l'organisme ont été largement étudiés ces vingt dernières années. Leurs implications dans diverses pathologies ont également fait l'objet de nombreuses études (phénomènes épileptiformes, ataxie, maladie de Parkinson, anorexie nerveuse, hypertension, trouble de l'accouchement). Plusieurs

études tendent à montrer l'implication des canaux SKCa dans les phénomènes de prolifération, de résistance à l'apoptose, de transition dans les phases du cycle cellulaire, de migration et d'invasion cellulaire²³.

Récemment, Vandier et coll. ont identifié le canal potassique SK3 comme étant un modulateur de la migration cellulaire de cellules cancéreuses épithéliales mammaires hautement métastatiques alors qu'il n'est pas présent dans le tissu mammaire sain¹. Ils ont montré par la suite que le canal SK3 est également présent dans certaines lignées de mélanomes particulièrement agressives²⁴ (Figure 7).

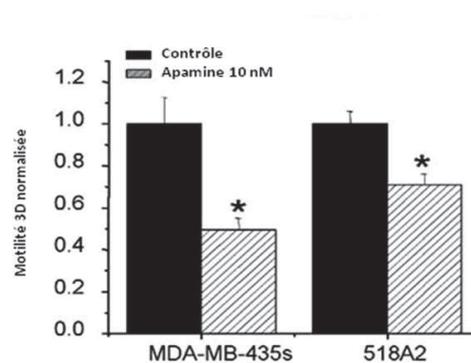


Figure 7 : Implication du canal SK3 dans la motilité des cellules cancéreuses mammaires et de mélanomes*
Modifié d'après Chantome et coll, 2009²⁴

L'implication du canal SK3 dans la motilité des cellules cancéreuses peut être résumée comme suit. L'activation du canal entraîne une hyperpolarisation de la membrane cellulaire entraînant une augmentation du gradient électrochimique du Ca^{2+} . Les ions calciques pénètrent donc dans la cellule par des canaux indépendants du voltage. Cette entrée d'ions calciques va exercer cependant un rétrocontrôle positif sur le canal, d'où une plus forte activation et une amplification du système (Figure 8).

²³ a) Le Guennec, J.Y. ; Ouadid-Ahidouch, H. ; Soriani, O. ; Besson, P. ; Ahidouch, A. ; Vandier, C. *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* **2007**, *2*, 189-202. b) Fraser, S.P. ; Pardo, L.A. *EMBO Rep* **2008**, *9*, 512-515. c) Arcangeli, A. ; Crociani, O. ; Lastraioli, E. ; Masi, A. ; Pillozzi, S. ; Becchetti, A. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 66-93. d) Prevarskaya, N. ; Shryma, R. ; Shuba, Y. *Trends Mol. Med.* **2010**, *16*, 107-121

²⁴ Chantome, A. ; Girault, A. ; Potier, M. ; Collin, C. ; Vaudin, P. ; Pagès, J.C. ; Vandier, C. ; Joulin, V. *Exp. Cell. Res.* **2009**, *315*, 3620-3630

* Effet de l'apamine sur la motilité de cellules cancéreuses mammaires (MDA-MB-435s) et de mélanomes (518A2). L'apamine appliquée à 10 nM diminue significativement la migration des cellules cancéreuses.

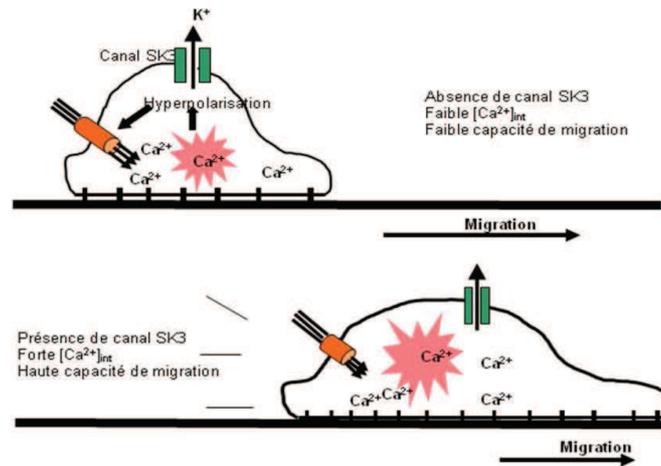


Figure 8 : Modèle proposé pour l'implication du canal SK3 dans la motilité des cellules cancéreuses
Modifié d'après Potier et coll., 2006¹

D'autres études ont montré que le canal SK3 est également impliqué dans le développement du cancer colorectal. Cependant, dans ce cas-là, c'est une diminution de l'activité et de l'expression du canal SK3 qui est à l'origine du dysfonctionnement. En effet, suite à une mutation, la protéine SK3 n'est plus fonctionnelle, ce qui a pour conséquence de diminuer la capacité des cellules à migrer et peut-être à se renouveler²⁵.

Le canal SK3 est donc une nouvelle cible thérapeutique dans le but de diminuer la motilité des cellules cancéreuses.

2.2.3. Modulation des canaux SKCa : inhibiteurs et activateurs

La régulation des canaux SKCa dépend de leur présence, leur nombre et leur localisation à la membrane. Différents facteurs permettent également de les réguler, ceux-ci varient en fonction de la nature du canal (par exemple, le canal SK3 peut être régulé par les œstrogènes). Cependant, tous ont en commun leur régulation par les ions Ca^{2+} . En effet, les canaux SKCa, en régulant le potentiel de membrane, vont modifier l'influx d'ions calciques qui, en retour, réguleront l'activité des canaux. Il existe plusieurs voies d'entrée des ions Ca^{2+} :

- Si l'entrée calcique n'est pas dépendante du voltage, l'activation va augmenter l'influx d'ions calciques en favorisant le gradient électrochimique.

²⁵ Potier, M. ; An Tran, T. ; Chantome, A. ; Girault, A. ; Joulin, V. ; Bougnoux, P. ; Vandier, C. ; Pierre, F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, 397, 42-47

- En revanche, si ce sont des canaux calciques dépendants du voltage qui réalisent l'entrée des ions Ca^{2+} , les canaux SKCa provoqueront leur fermeture par hyperpolarisation de leur membrane (ce mécanisme module notamment l'excitabilité des cellules nerveuses).

De part leur présence dans de nombreux tissus de l'organisme et leur rôle dans la régulation de nombreuses fonctions, les canaux SKCa ont fait l'objet de nombreuses études pharmacologiques. La modulation de ces canaux s'effectue suivant différents mécanismes²⁶ :

- Une modulation basée sur l'interaction entre une molécule, naturelle ou synthétique, avec le pore du canal. L'inhibiteur le plus connu et le plus utilisé est l'apamine, un peptide neurotoxique présent dans le venin d'abeille²⁷. D'autres peptides issus du venin de scorpion ont également montré des activités inhibitrices des canaux SKCa. Cependant, le manque de sélectivité de ces produits les rend inutilisables pour des études *in vivo*. Certains alcaloïdes cationiques présentent également la capacité de bloquer le pore des canaux SKCa. Ils peuvent être naturels, tels que la N-méthyl-laundosine, ou synthétiques, comme le dequalinium ou des dérivés portant des motifs bis-isoquinolinium séparés par des bras alkyles ou xylyles (Figure 9).

²⁶ Girault, A. ; Haelters, J.P. ; Potier-Cartereau, M. ; Chantôme, A. ; Jaffrès, P.A. ; Bougnoux, P. ; Joulin, V. ; Vandier, C. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 697-713

²⁷ Wulff, H. ; Kolski-Andreaco, A. ; Sankaranarayanan, A. ; Sabatier, J.M. ; Shakkottai, V. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 1437-1457

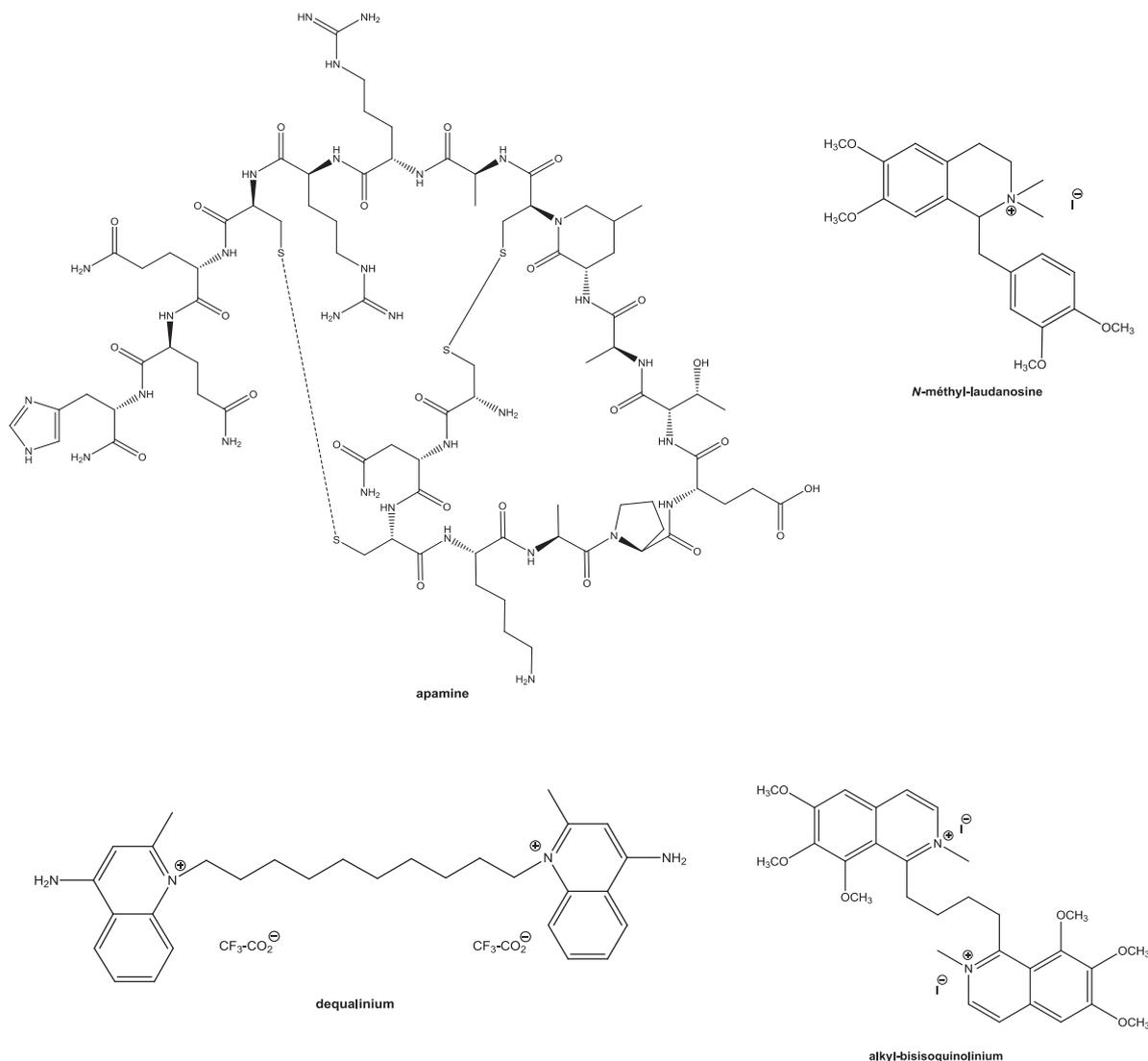


Figure 9 : Structures d'inhibiteurs des canaux SKCa par interaction avec leur pore

- Une modulation basée sur la modification de la sensibilité aux ions calciques. Diverses molécules ont montré un rôle d'activateur envers les canaux SKCa, c'est-à-dire qu'elles augmentent la sensibilité des canaux au Ca^{2+} . La plupart du temps ce sont des composés dérivés des benzimidazolines (Figure 10).

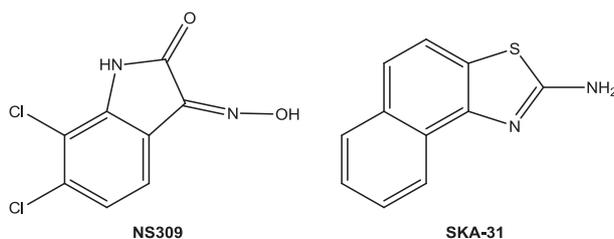


Figure 10 : Structures des activateurs des canaux SKCa via une modification de la sensibilité aux ions Ca^{2+}

Quelques composés possédant un squelette benzimidazole ont également été identifiés comme étant de bons inhibiteurs des canaux SKCa (Figure 11).

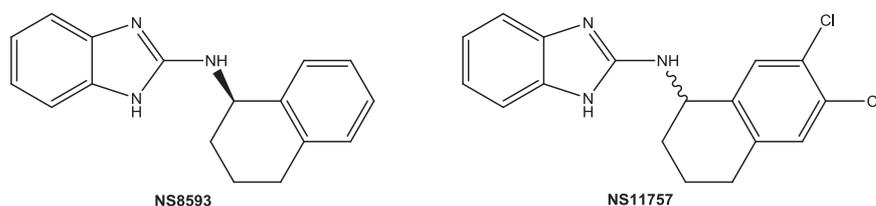


Figure 11 : Structures des inhibiteurs des canaux SKCa *via* une modification de la sensibilité aux ions Ca^{2+}

Récemment, un nouveau mécanisme d'action a été découvert par Vandier et coll.. Il s'agit de la modulation par insertion d'une molécule amphiphile dans la membrane plasmique de la cellule. La molécule de référence est l'édelfosine, un glycérophospholipide, connu pour modifier l'arrangement supramoléculaire des biomembranes²⁸ (Figure 12).

Cette découverte est à l'origine de notre travail.

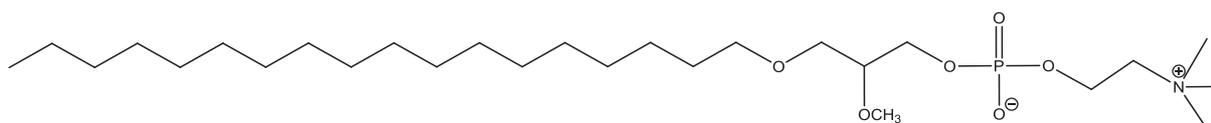


Figure 12 : Structure de l'édelfosine

IV - L'édelfosine

1 - Les éthers de glycérol naturels

Les éthers de glycérol ont été mis en évidence dans le foie de requin par Toyama et coll. en 1922²⁹. En effet, les requins possèdent un foie pouvant contenir près de 150 litres d'huile et représenter 30 % de leur masse corporelle. Cette huile peut contenir jusqu'à 50 % d'éthers de glycérol et confère à ces poissons une remarquable protection contre les infections et les

²⁸ a) Torrecillas, A. ; Aroca-Aguilar, J.D. ; Aranda, F. J. ; Gajate, C. ; Mollinedo, F. ; Corbalan-Garcia, S. ; de Godos, A. ; Gomez-Fernandez, J.C. *Int. J. Pharm.* **2006**, *318*, 28-40. b) Ausili, A. ; Torrecillas, A. ; Aranda, F. J. ; Mollinedo, F. ; Gajate, C. ; Corbalan-Garcia, S. ; de Godos, A. ; Gomez-Fernandez, J.C. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 11643-11654

²⁹ Tsujimoto, M. ; Toyama, Y. *Chemische Umschau auf dem Gebiet der Fette, Oele, Wachse und Harze* **1922**, *29*, 27-29

tumeurs³⁰ (Figure 13). Ces lipides sont également présents dans les membranes cellulaires mais de manière bien moins importante que les esters glycérolipidiques. De plus, leur répartition dans les différents tissus humains n'est pas homogène, le cœur et le cerveau comprennent entre 20 et 25 % de ces lipides dans leurs membranes³¹, les spermatozoïdes peuvent en contenir plus de 50 % dans les membranes de leur acrosome³², le lait maternel et la moelle osseuse sont également très riches en ces lipides.

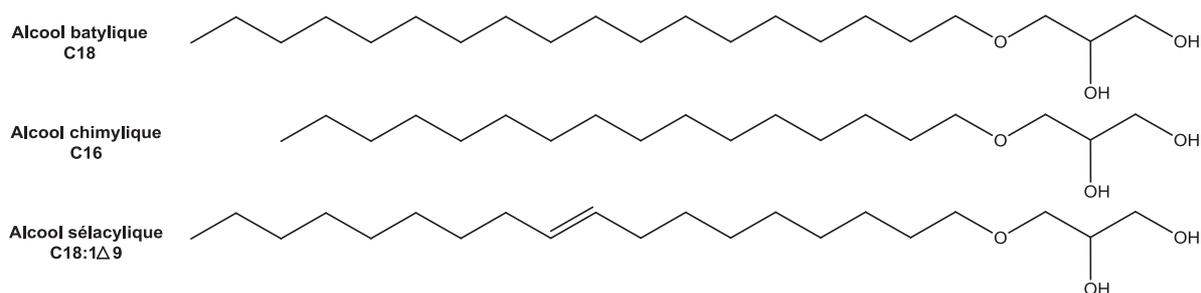


Figure 13 : Ethers de glycérol extraits de l'huile de foie d'élastombranches *

Les éthers de glycérol proviennent de l'alimentation (les animaux, marins ou terrestres en sont assez riches contrairement aux végétaux), mais cet apport est insuffisant pour palier aux besoins de l'organisme, comme le prouve le syndrome de Zellweger pour lequel la voie de biosynthèse (décrite ci-après) n'est plus fonctionnelle³³.

L'apport principal d'éthers de glycérol est issu de la synthèse endogène. C'est une synthèse à 6 ou 7 étapes, selon que le composé soit saturé ou insaturé, s'effectuant dans les peroxysomes puis dans le cytoplasme³⁴.

L'apport d'éthers de glycérol peut avoir diverses incidences sur l'organisme. Ils peuvent modifier la synthèse de médiateurs lipidiques tel que le PAF (Platelet-Activating Factor, un facteur d'activation plaquettaire), mais aussi être impliqués dans des phénomènes pathologiques, tels que la formation de thrombus par agrégation plaquettaire. Les éthers de glycérol peuvent également augmenter la motilité des spermatozoïdes mais également la

³⁰ Malins, D.C. ; Wekell, J.C. ; Houle, C.R. *J. Lipid Res.* **1965**, *6*, 100-105

³¹ Diagne, A. ; Fauvel, J. Record, M. ; Chap, H. ; Douste-Blazy, L. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *793*, 221-231

³² Evans, R. ; Weaver, D.E. ; Clegg, ED. *J. Lipid Res.* **1980**, *21*, 223-228.

* Alcool batylique : 1-O-octadecylglycérol ; Alcool chimylique : 1-O-hexadecylglycérol ; Alcool sélachylique : 1-O-octadec-9-énylglycérol

³³ Gorgas, K. ; Teiger, A. ; Komljenovic, D. ; Just, W.W. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1763*, 1511-1526

³⁴ Wanders, R.J.A. ; Waterham, H.R. *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 295-332

fertilité après traitement de ceux-ci par ces composés³⁵. D'autres études ont montré l'incidence de ces dérivés du glycérol sur la production d'anticorps³⁶, l'hématopoïèse et l'immunostimulation³⁷. Enfin chez des patientes atteintes d'un cancer du col de l'utérus, il a été observé une réduction de la croissance tumorale et une diminution de la mortalité lors de la prise d'éthers de glycérol issus d'huile de foie de requin avant la radiothérapie³⁸.

2 - Les éthers de glycérol anticancéreux synthétiques

2.1. Historique

Les propriétés anticancéreuses des éthers de glycérol naturels ont été montrées pour la première fois en 1958 par Brohult³⁹. La synthèse d'analogues de la lysophosphatidylcholine (molécule ayant la capacité de stimuler la phagocytose ou de changer les propriétés de surface des érythrocytes) a permis de mettre en évidence une série de composés stables présentant une forte action anti-tumorale. Initialement, le but était de synthétiser des composés immunostimulants plus stables mais aussi capables de stimuler les macrophages.

Deux types de structures ont été décrits :

- Les alkylglycérophospholipides (APL) : ils ont une structure proche du PAF et la molécule référence de cette classe de molécules est l'édelfosine (ou 1-O-octadécyl-2-O-méthyl-rac-glycéro-3-phosphocholine) (Figure 14).

- Les alkylphosphocholine (APC) : ils ne présentent pas de squelette glycérol. Le composé phare de cette classe est la miltéfosine (ou hexadécylphosphocholine) (Figure 14).

Après l'obtention de ces composés, de nombreuses études ont été réalisées dans le but de comprendre leur mode d'action et d'optimiser ces structures afin d'obtenir les meilleurs effets anti-tumoraux.

³⁵ Cheminade, C. ; Gautier, V. ; Hichami, A. ; Allaume, P. ; Le Lannou, D. ; Legrand, A.B. *Biol. Reprod.* **2002**, *66*, 421-428

³⁶ Ngwenya, B.Z. ; Foster, D.M. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1991**, *196*, 69-75

³⁷ Mitre, R. ; Etienne, M. ; Martinais, S. ; Salmon, H. ; Allaume, P. ; Legrand, P. ; Legrand, A.B. *Br. J. Nutr.* **2005**, *94*, 753-762

³⁸ Brohult, A. ; Brohult, J. ; Brohult, S. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **1978**, *57*, 79-83

³⁹ Brohult, A. *Nature* **1958**, *181*, 1484-1485

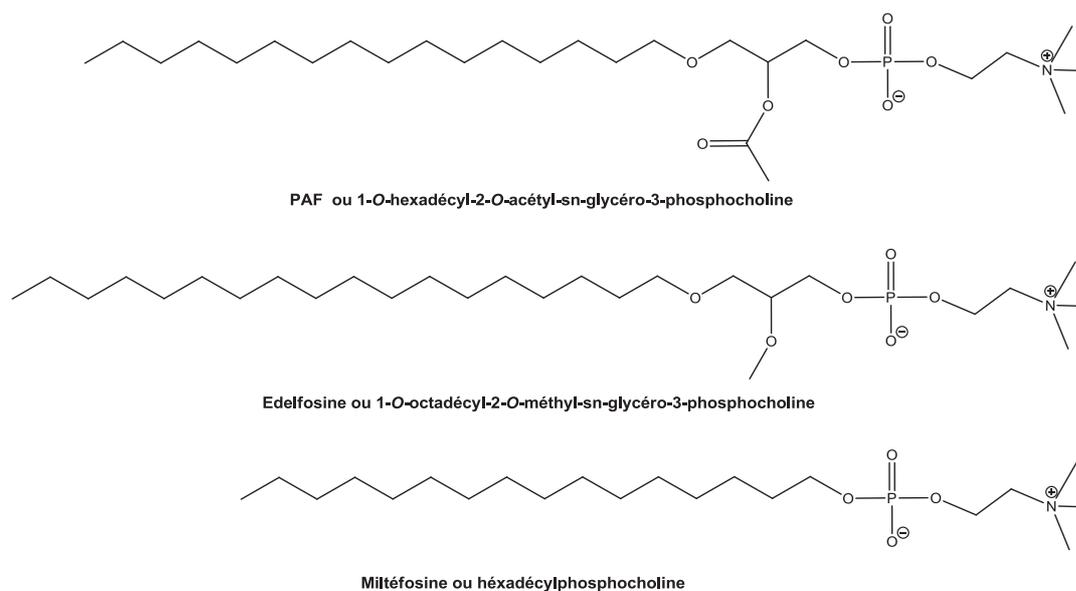


Figure 14 : Structures du PAF, de l'édelfosine et de la miltéfosine

Ces éthers de glycérol présentent plusieurs analogies de structures :

- Une chaîne aliphatique longue (C16, C18) en position *sn-1* qui facilite l'insertion dans la membrane plasmique.
- Une chaîne courte (méthyle ou éthyle) en position *sn-2*.
- Une tête polaire zwitterionique qui, avec la chaîne courte en position *sn-2*, confère des propriétés détergentes à ces molécules. Ceci explique leurs propriétés cytolytiques à hautes concentrations⁴⁰.

Cependant certaines études ont montré que ces propriétés détergentes n'ont rien à voir avec les effets anticancéreux de ces molécules. En effet, les concentrations utilisées en clinique sont beaucoup trop faibles pour provoquer cet effet détergent. Il est également intéressant de noter que ces éthers de glycérol agissent spécifiquement sur les cellules tumorales⁴¹.

Un des principaux mécanismes d'action de ces éthers de glycérol serait en lien avec la voie de biosynthèse de la phosphatidylcholine, phospholipide le plus abondant dans les cellules. En s'insérant dans la membrane plasmique, les éthers de glycérol bloqueraient la voie de

⁴⁰ Ahmad, I. ; Filep, J.J. ; Franklin, J.C. ; Janoff, A.S. ; Masters, G.R. ; Pattassery, J. ; Peters, A. ; Schupsky, J.J. ; Zha, Y. ; Mayhew, E. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 1915-1921

⁴¹ Mollinedo, F. ; Fernandez-Luna, J.L. ; Gajate, C., Martin-Martin, B. ; Benito, A. ; Martinez-Dalmau, R. ; Modolell, M. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 1320-1328

synthèse de ce lipide. Ce phénomène induirait un stress important à la cellule qui pourrait provoquer son apoptose⁴².

2.2. L'édelfosine

L'édelfosine (1-*O*-octadécyl-2-*O*-méthyl-sn-glycérol-3-phosphocholine) est le composé le plus étudié des APL. C'est une molécule dont le métabolisme est extrêmement lent. En effet 98 % de l'édelfosine est retrouvée 24h après son administration à des cellules cancéreuses leucémiques et du cancer du colon⁴³. Ceci s'explique par la grande stabilité de cette molécule liée à la présence des deux liaisons éther sur le motif glycérol. Il en ressort que l'édelfosine agit directement sur les cellules cancéreuses et non au travers d'un métabolite. Cependant, son activité est moins importante *in vivo* que dans les études sur des cellules en culture, il y a donc un processus de dégradation par un organe. Ceci fut confirmé par des cultures cellulaires d'hépatocytes qui, après incubation avec de l'édelfosine, ont dégradé plus de 50 % de cette molécule⁴³. Les cellules saines sont donc dans la capacité de dégrader l'édelfosine contrairement aux cellules tumorales, ce qui explique la différence d'efficacité entre les études *in vivo* et *in vitro*.

Les études, menées ces quinze dernières années par Mollinedo et coll., ont permis de mettre en évidence les mécanismes responsables de l'induction de l'apoptose par l'édelfosine dans les cellules cancéreuses. Après avoir montré que l'édelfosine était spécifique aux cellules cancéreuses leucémiques par rapport aux cellules saines⁴¹, il a été montré que cette molécule induisait l'apoptose par recrutement et activation des récepteurs de la mort cellulaire⁴⁴ ou encore par insertion dans la membrane du réticulum endoplasmique⁴⁵. Cette dernière étude montre que l'édelfosine peut induire l'apoptose en inhibant la synthèse de la phosphatidylcholine et de protéines. Elle provoque également le relargage du Ca²⁺ stocké

⁴² a) Tronchere, H. ; Terce, F. ; Record, M. ; Ribbes, G. ; Chap, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 176, 157-165. b) Boggs, K.P. ; Rock, C.O. ; Jackowski, S. *J. Biolol Chem.* **1995**, 270, 7757-7764. c) Cui, Z. ; Houweling, M. ; Chen, M.H. ; Record, M. ; Chap, H. ; Vance, D.E. ; Tercé, F. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 14668-14671

⁴³ Magistrelli, A. ; Villa, P. ; Benfenati, E. ; Modest, E.J. ; Salmona, M. ; Tacconi, M.T. *Drug Metab. Dispos.* **1995**, 23, 119-123

⁴⁴ Gajate, C. ; Gonzalez-Camacho, F. ; Mollinedo, F. *PLoS ONE* **2009**, 4, e5044

⁴⁵ Nieto-Miguel, T. ; Fonteriz, R.I. ; Vay, L. ; Gajate, C. ; Lopez-Hernandez, S. ; Mollinedo, F. *Cancer Res.* **2007**, 67, 10368-10378

dans le réticulum. Tous ces mécanismes engendrent un stress de cet organite qui, en réponse, active différents processus induisant l'apoptose.

D'autres travaux ont permis de montrer l'incidence de l'édelfosine sur l'angiogénèse et l'invasion des cellules tumorales. En effet, cette molécule est capable de réduire le développement du système de vascularisation d'une tumeur mais elle peut également diminuer la capacité des cellules tumorales à migrer et envahir la matrice extracellulaire⁴⁶.

L'édelfosine, en s'insérant dans les membranes cellulaires à l'instar des autres membres des APL, modifie les propriétés de ces membranes ainsi que l'activité des protéines qui y sont proches ou intégrées, notamment le canal SK3⁴⁷. En effet, l'édelfosine permet de diminuer la migration des MDA-MB-435s, une lignée cellulaire cancéreuse mammaire dont la capacité migratoire est dépendante du canal SK3 (Figure 15). En présence d'apamine, inhibiteur spécifique des canaux SKCa, il n'y a pas d'inhibition supplémentaire de la migration par l'édelfosine, ceci suggère que l'effet dû à cette molécule passe par l'inhibition des canaux SKCa.

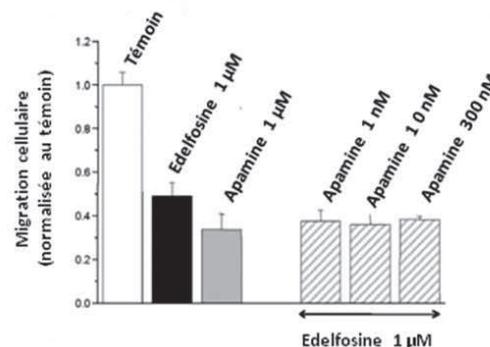


Figure 15 : Effet de l'édelfosine sur la migration des MDA-MB-435s
D'après Potier et coll., 2011⁴⁹

Afin de déterminer si l'édelfosine agit sur le canal SK3 une fois celui-ci effectif ou bien si elle diminue ou empêche l'adressage de celui-ci à la membrane, le niveau d'expression et l'adressage membranaire du canal SK3 ont été contrôlés en présence ou non d'édelfosine. Ces études ont été menées par des western blot et par l'utilisation de la protéinase K (enzyme clivant les protéines membranaires sur leur domaine extracellulaire, ce qui permet

⁴⁶ a) Vogler, W.R. ; Liu, J. ; Ades, E.W. ; Bouck, N. *Cancer Invest.* **1998**, *16*, 549-553. b) Haugland, H.K. ; Nygaard, S.J. ; Tysnes, O.B. *Anticancer Res.* **1999**, *19*, 149-156

⁴⁷ a) Zheng, B. ; Oishi, K. ; Shoji, M. ; Eibl, H. ; Berdel, W.E. ; Hajdu, J. ; Vogler, W.R. ; Kuo, J.F. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 3025-3031. b) Besson, P. ; Gore, J. ; Vincent, E. ; Hoinard, C. ; Bougnoux, P. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *51*, 1153-1158. c) Grosman, N. *Int. Immunopharmacol.* **2001**, *1*, 1321-1329

de comparer le pool membranaire et le pool cytoplasmique) (Figure 16). Ces tests montrent qu'après un traitement par de l'édelfosine, il n'y a pas de diminution de l'expression de la protéine SK3 et il n'y a aucune incidence quand à l'adressage à la membrane.

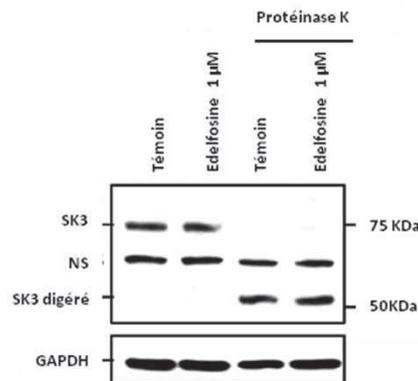


Figure 16 : Expression protéique du canal SK3 en présence ou non d'édelfosine *
D'après Potier et coll., 2011⁴⁹

Enfin, la protéine SK3 étant un canal ionique, la mesure du courant ionique en présence ou non d'édelfosine devait confirmer l'effet de cette molécule sur l'activité du canal. Ceci est réalisé par des mesures de patch-clamp, une technique développée par Neher et Sakmann⁴⁸ en 1976 (Prix Nobel en 1991), qui permet d'enregistrer des courants ioniques macro- ou microscopiques de cellule unique en réponse à un stimulus chimique ou physique (Figure 17). L'application d'édelfosine entraîne une diminution significative des courants ioniques et dépolarise le potentiel de membrane des cellules (environ 50 % d'inhibition).

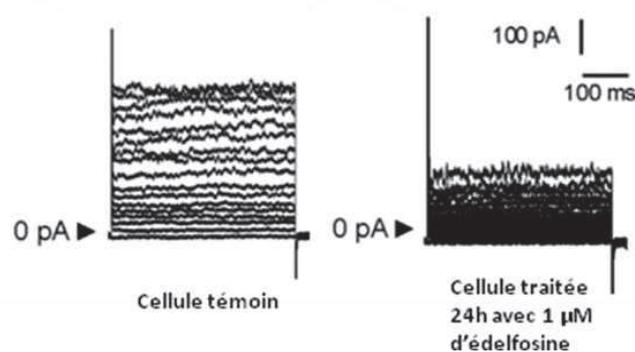


Figure 17 : Mesure du courant ionique des cellules MDA-MB-435s en présence ou non d'édelfosine
D'après Potier et coll., 2011⁴⁹

* N.S : non-spécifique, GAPDH : Glycéraldéhyde 3-phosphate dehydrogenase

⁴⁸ Neher, E. ; Sakmann, B. *Nature* **1976**, 260, 799-802

En résumé, les études menées ont montré pour la première fois l'inhibition d'un canal ionique impliqué dans la migration cellulaire par l'édelfosine⁴⁹. Un mécanisme d'action de cette molécule a été proposé (Figure 18) : l'édelfosine, en s'intégrant à la membrane, va modifier la sensibilité du canal au Ca²⁺ réduisant ainsi l'activité du canal. La membrane est plus dépolarisée ce qui entraîne la diminution du gradient électrochimique des ions calciques.

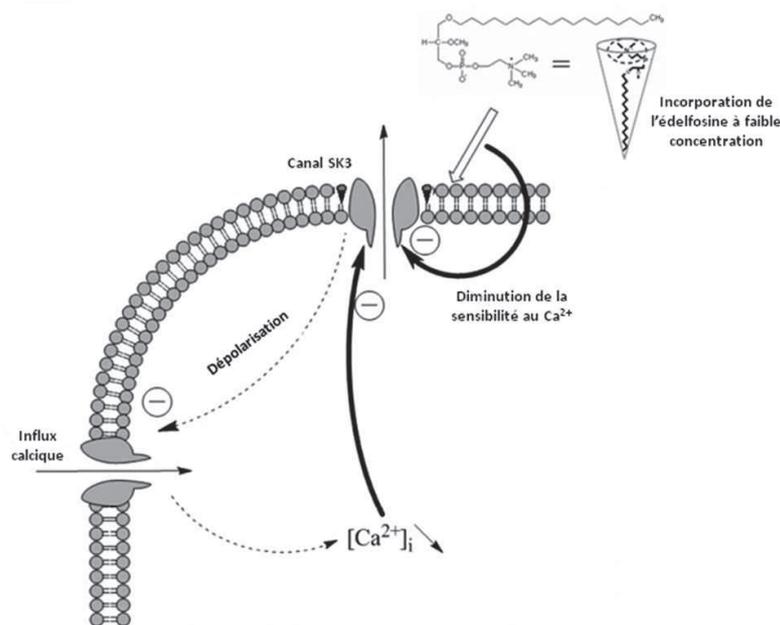


Figure 18 : Mécanisme proposé pour l'activité inhibitrice de l'édelfosine sur le canal SK3
D'après Potier et coll., 2011⁴⁹

Différents tests pré-cliniques sur l'animal ont été réalisés avec l'édelfosine afin de pouvoir juger de sa toxicité et de son efficacité. Ils ont permis de montrer que le mode d'injection (*per os*, injection intraveineuse ou intrapéritonéale) et la préparation (monomère dans une solution tampon ou couplé à des protéines du sérum) de ce produit étaient importants. De plus, divers effets secondaires ont été relevés (hémolyse pour les injections intraveineuses, irritations gastro-intestinales pour l'administration orale...). Globalement, une toxicité faible a été relevée pour des doses efficaces sur le développement de tumeurs primaires dans des modèles murins⁵⁰. Des essais cliniques phase I et II ont été réalisés. Les essais de phase I ont

⁴⁹ Potier, M. ; Chantome, A. ; Joulin, V. ; Girault, A. ; Roger, S. ; Besson, P. ; Jourdan, M.L. ; Le Guennec, J.Y. ; Bougnoux, P. ; Vandier, C. *British Journal of Pharmacology* **2011**, 162, 464-479

⁵⁰ Hardman, ; W.E. ; Barnes, C.J. ; Knight, C.W. ; Cameron, I.L. *Br. J. Cancer* **1997**, 76, 347-354

montré quelques bénéfiques (diminution des cellules cancéreuses circulantes, rémission sur quelques mois) mais aussi plusieurs effets secondaires indésirables (troubles gastro-intestinaux, pulmonaires et hépatiques)⁵¹.

Ces résultats *in vivo* nous conduisent à nous interroger sur l'exactitude du mécanisme d'action précédemment décrit. En effet, nous pouvions nous attendre à une toxicité et des effets secondaires bien plus importants de part la non-spécificité de ce mécanisme. Tous les canaux SK3 exprimés dans les tissus auraient dû être touchés. Il est donc probable que ce mécanisme soit incomplet et que d'autres facteurs doivent intervenir dans le cas de l'inhibition de SK3 par l'édelfosine.

En revanche, l'essai de phase II a été décevant. L'édelfosine a eu des effets bénéfiques sur moins de 2 % des personnes traitées et des effets secondaires tels que l'anorexie, des nausées et des vomissements ont pu être observés. De meilleurs résultats ont été obtenus avec de plus fortes doses, mais avec une augmentation prévisible des effets délétères⁵².

Dans le but de trouver des composés moins toxiques, une étude structure-activité sur le squelette de l'édelfosine a été menée au laboratoire.

V - Recherche de nouveaux éthers de glycérol

1 - Etude structure-activité

Afin de déterminer quelles sont les parties de l'édelfosine indispensables à conserver afin de maintenir son activité inhibitrice de la migration cellulaire et du canal SK3, nous nous sommes attachés, au sein du laboratoire, à réaliser des études structure-activité sur cette molécule. L'objectif était d'obtenir le composé le moins toxique en conservant la capacité d'inhibition de l'édelfosine. Nous avons suivi le schéma suivant (Figure 19) :

⁵¹ a) Berdel, W.E. ; Fink, U. ; Maubach, P.A. ; Permanetter, B. ; Rastetter, J. *Blut*. **1982**, *44*, 177-186. b) Berdel, W.E. ; Schlehe, H. ; Fink, U. ; Emmerich, B. ; Maubach, P.A. ; Emslander, H.P. ; Daum, S. ; Rastetter, J. *Cancer* **1982**, *50*, 2011-2015. c) Berdel, W.E. ; Fink, U. ; Rastetter, J. *Lipids* **1987**, *22*, 967-969

⁵² Drings, P. ; Gunther, I.U. ; Gatzemeier, U. ; Berdel, W. ; Stahl, M. ; Salewski, E. ; Edler, L. *Onkologie* **1990**, *13*, 180-184

- Retrait du squelette glycérol.
- Modification de la chaîne en *sn-1* : longueur de la chaîne, présence ou non d'insaturations, remplacement de la liaison éther par une liaison ester.
- Modification du groupement en *sn-2* : remplacement du groupement méthoxy par différentes fonctions.
- Modification de la tête polaire en *sn-3* : suppression ou remplacement du motif phosphocholine par des mono- ou des disaccharides.

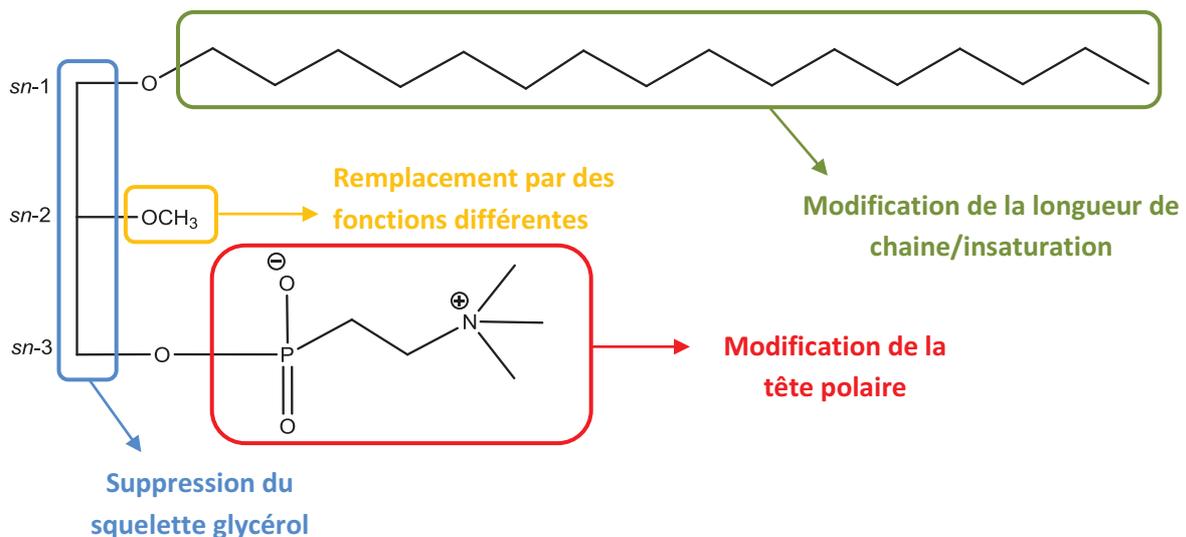


Figure 19 : Modifications de l'édelfosine

1.1. Analogues ne possédant plus le squelette glycérol

La miltéfosine (Figure 20) et son analogue possédant une chaîne à 20 carbones et une tête phosphocholine, présentent des toxicités plus importantes et des capacités d'inhibition plus faibles que l'édelfosine. Le squelette glycérol est donc important pour l'activité de ces molécules sur la migration.

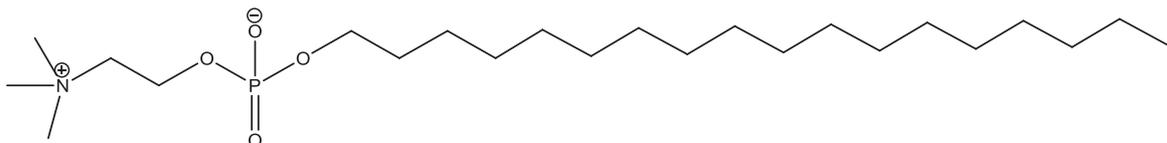
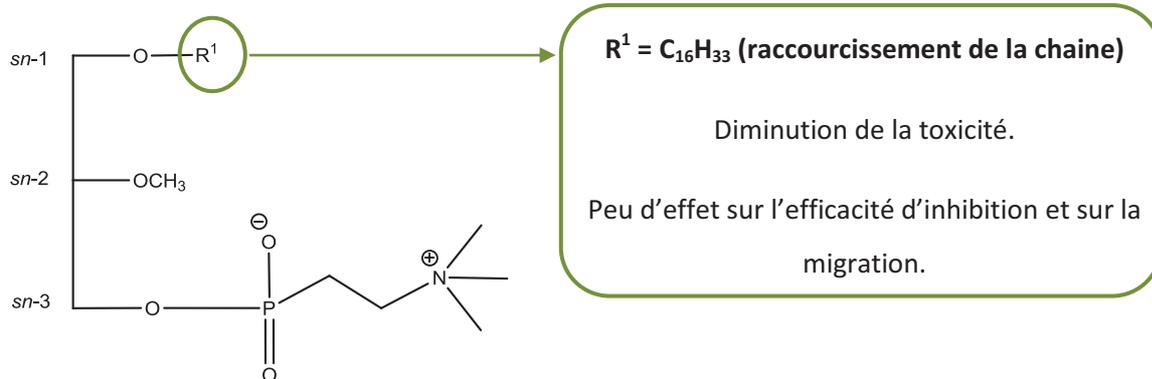


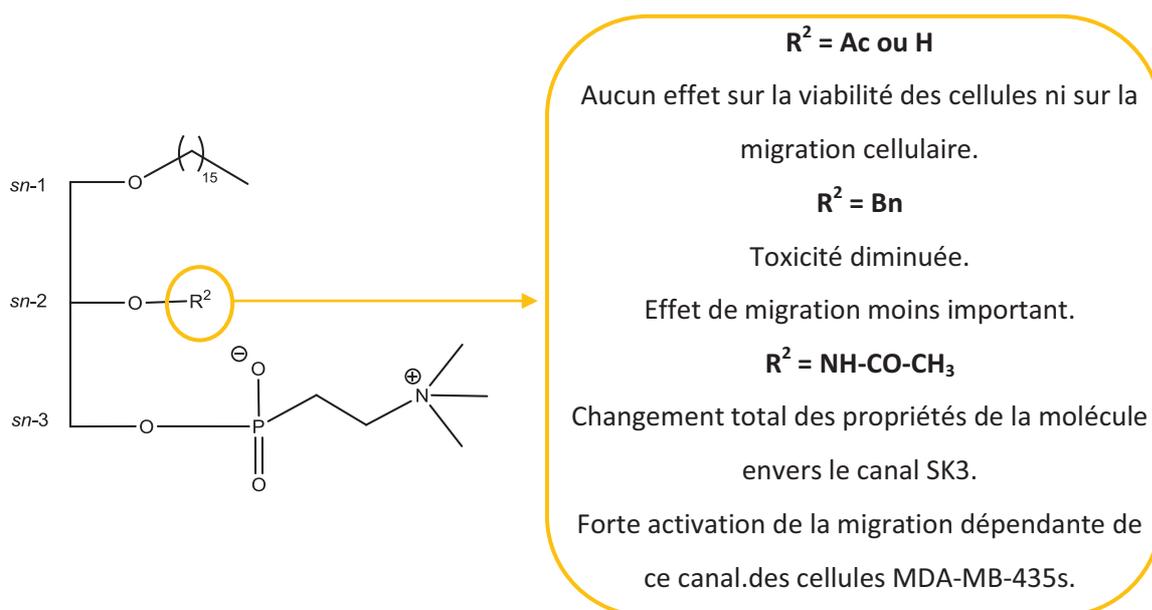
Figure 20 : Structure de la miltéfosine

1.2. Analogues présentant des modifications sur la chaîne en *sn*-1



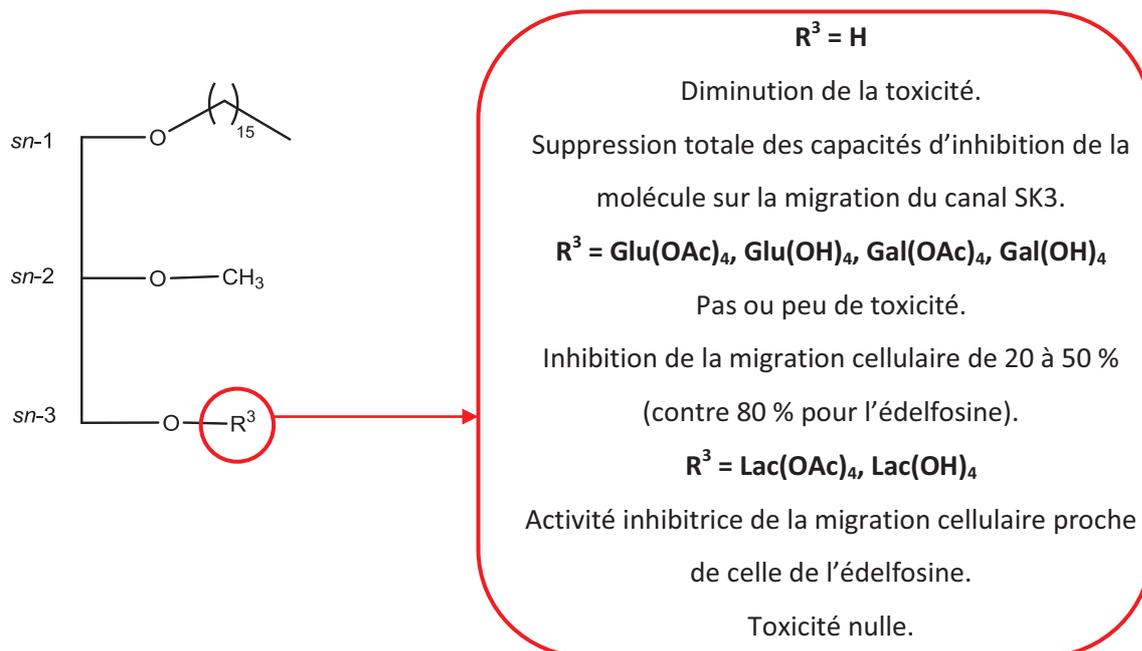
Il est nécessaire de conserver une chaîne grasse saturée à, au moins, 14 carbones.

1.3. Analogues présentant des modifications sur le motif en *sn*-2



Ce dernier composé, de part son effet activateur, pourrait être le point de départ d'autres études sur les activateurs de canaux SKCa (études sur l'hypertension ou l'hyperexcitabilité neuronale). Ces modifications ont montré que le groupement méthoxy initialement présent est essentiel pour obtenir des analogues compétitifs.

1.4. Analogues présentant des modifications de la tête polaire en *sn*-3



La substitution du motif phosphocholine par un groupement saccharidique de type mono- ou disaccharide a été choisie à partir de résultats d'études menées sur un autre canal potassique, le TREK-1. Ce canal est activé par des lipides ayant une forme de cône inversé et possédant une tête polaire volumineuse⁵³. Cette étude a montré que plus la tête polaire était volumineuse plus l'effet sur le canal était important. De plus, d'autres études avaient déjà montré les effets antiprolifératifs de la glucophosphocholine et du gluco-PAF (insertion d'un glucose en position *sn*-2 du glycérol)⁵⁴. Nous avons donc posé comme hypothèse que le remplacement de la tête phosphocholine par un groupement saccharide pourrait augmenter l'activité inhibitrice des analogues sur le canal SK3.

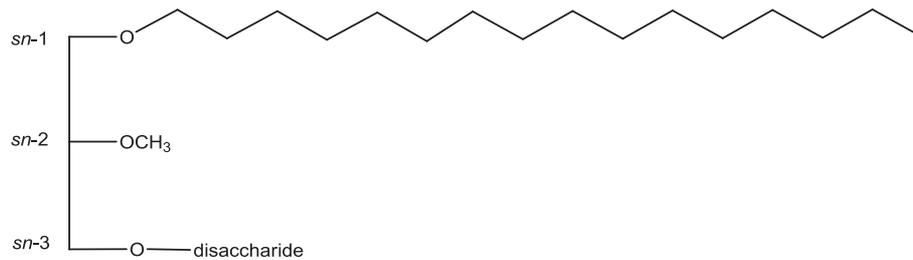
Les dérivés portant un motif β -lactose, acétylé ou déprotégé, montrent une activité inhibitrice de la migration cellulaire proche de celle de l'édelfosine pour une toxicité nulle. Ce composé inhibe plus de 50 % de la migration cellulaire à 300 nM et près de 75 % du courant ionique. D'autres tests ont été réalisés sur des analogues présentant des têtes β -mélbiose et β -maltose mais les meilleurs résultats demeurent pour le motif β -lactose.

⁵³ Maingret, F. ; Patel, A.J. ; Lesage, F. ; Lazdunski, M. ; Honore, E. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 10128-10133

⁵⁴ a) Mickleit, M. ; Wieder, T. ; Buchner, K. ; Geilen, C. ; Mulzer, J. ; Reutter, W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2267-2269. b) Mickleit, M. ; Wieder, T. ; Arnold, M. ; Geilen, C.C. ; Mulzer, J. ; Reutter, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 351-353

En conclusion de cette étude structure-activité, pour obtenir une molécule active sur le canal SK3 et sur la migration cellulaire tout en possédant une toxicité très faible il faut :

- Un squelette glycérol.
- Une chaîne à 16 ou 18 carbones liée au glycérol par une liaison éther en position *sn*-1.
- Un groupement méthoxy en position *sn*-2.
- Une tête polaire de type disaccharide en position *sn*-3.



Cette étude nous a permis de sélectionner un composé analogue de l'édelfosine ne présentant pas de toxicité et ayant une activité inhibitrice sur la migration et sur le canal SK3 proche de celle-ci. Ce composé, le 1-O-Hexadécyl-2-O-Méthyl-sn-glycéro-3-Lactose, a été baptisé ohmline.

2 - L'ohmline

L'ohmline est donc un éther de glycérol, possédant une tête lactose, qui a fait l'objet de nombreux tests afin de déterminer son mécanisme d'action (Figure 21).

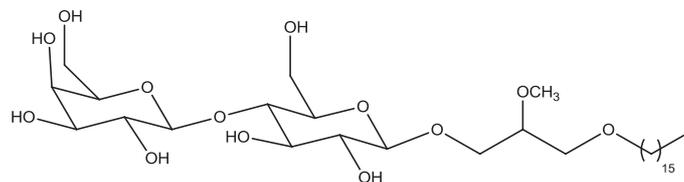


Figure 21 : Structure de l'ohmline

2.1. Effets sur la viabilité cellulaire

Dans un premier temps, il a été vérifié que l'ohmline n'entraînait aucun effet sur la viabilité cellulaire que ce soit sur des cellules cancéreuses de type MDA-MB-435s ou non cancéreuses

telles que les MCF-10A. La molécule ne présente aucun effet sur la viabilité cellulaire pour des doses allant jusqu'à 10 μM (Figure 22).

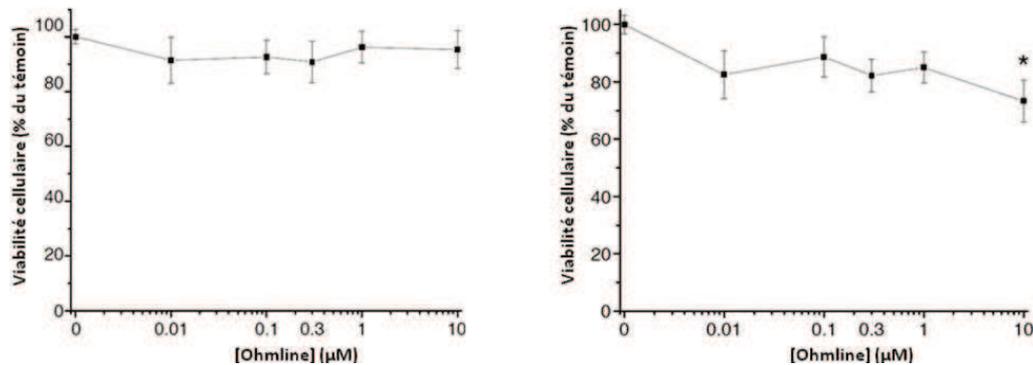


Figure 22 : Effet de l'ohmline sur la viabilité cellulaire des cellules cancéreuses et saines
D'après Girault, 2012⁵⁵

2.2. Effets sur la migration dépendante du canal SK3

L'ohmline réduit la migration cellulaire de façon dépendante à la dose. Pour les cellules saines, l'ohmline n'a aucun effet sur la migration cellulaire jusqu'à une dose de 1 μM où une diminution de près de 30 % est observée. Cela suggère un effet de l'ohmline non dépendant du canal SK3. Les tests réalisés sur une lignée cellulaire cancéreuse mammaire n'exprimant plus le canal SK3 (MDA-MB-435 shSK3 (SK3-)) ont permis de confirmer que l'ohmline inhibait bien la migration dépendante du canal SK3 (Figure 23).

⁵⁵ Girault, A. *Thèse de doctorat 2012*, Université François-Rabelais, Tours

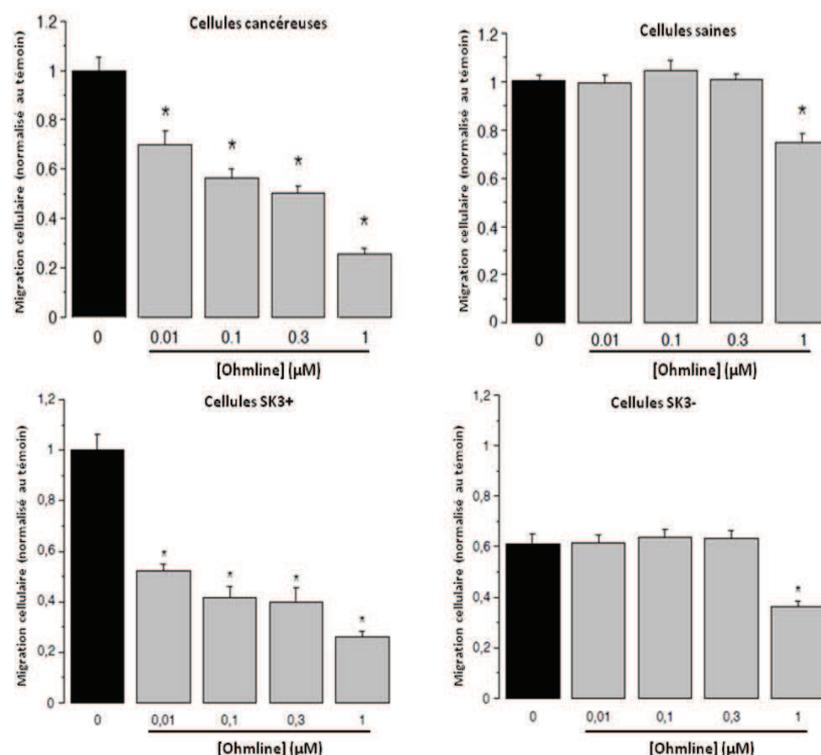


Figure 23 : Effet de l'ohmline sur la migration cellulaire de cellules cancéreuses, saines, surexprimant le canal SK3 ou n'exprimant plus le canal SK3*
D'après Girault, 2012⁵⁵

2.3. Effet de la stéréoisométrie de l'ohmline

L'ohmline présente un carbone asymétrique en position *sn*-2 du squelette glycérol ce qui nous amène à nous interroger quant à l'influence de la stéréoisométrie de ce composé sur la migration cellulaire et sur le canal SK3. Cependant, les études menées sur les différents énantiomères de l'édelfosine montrent qu'il n'y a aucune différence sur l'efficacité de la molécule que ce soit avec le mélange racémique ou avec l'énantiomère R ou S⁵⁶.

De même, aucune différence d'efficacité sur l'inhibition du canal n'a été constatée en fonction du stéréoisomère de l'ohmline (Figure 24). Par la suite, c'est le mélange racémique qui a été utilisé.

* Etude réalisée sur une lignée cellulaire cancéreuse mammaire MDA-MB-435s, une lignée cellulaire saine épithéliale MCF-10A, une lignée cellulaire cancéreuse mammaire surexprimant le canal SK3 MDA-MB-435 shRD (SK3+) et une lignée cellulaire cancéreuse mammaire n'exprimant plus le canal SK3 MDA-MB-435 shSK3 (SK3-).
* indique une différence significative $p < 0,05$

⁵⁶ Duclos, R.I. ; Jr. ; Chia, H.H. ; Abdelmageed, O.H. ; Esber, H. ; Fournier, D.J. ; Makriyannis, A. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 4147-4154

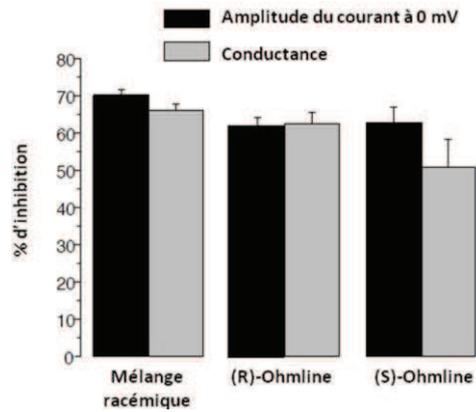


Figure 24 : Effet de la stéréoisométrie de l'ohmline sur l'inhibition du canal SK3
D'après Girault, 2012⁵⁵

2.4. Sélectivité de l'ohmline vis-à-vis des canaux KCa

La sélectivité de l'ohmline vis-à-vis des canaux KCa (ici SK1, SK2 et IKCa) a été évaluée. Les tests réalisés ont permis de montrer que l'ohmline est un inhibiteur exclusif de SK3. En effet, ce composé n'affecte en rien l'activité de SK2 et de IKCa et n'a qu'un léger effet inhibiteur sur SK1 (Figure 25). C'est, à notre connaissance, le premier inhibiteur des SKCa présentant un profil pharmacologique.

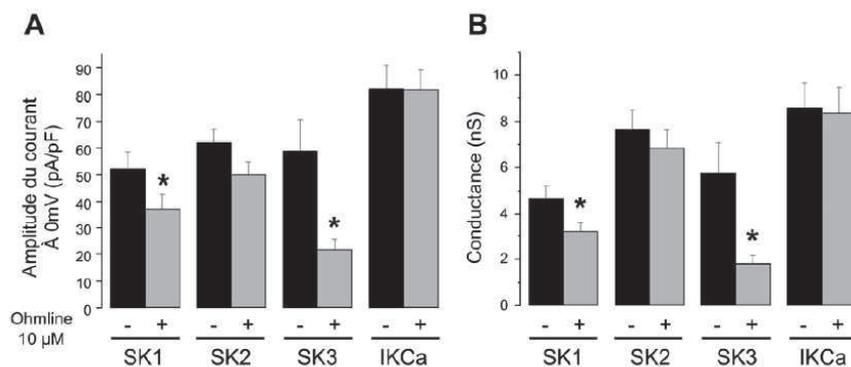


Figure 25 : Effets de l'ohmline sur l'amplitude et la conductance des courants SK1, SK2, SK3 et IKCa.
A) Effets de l'ohmline sur l'amplitude du courant. B) sur la conductance membranaire*.
D'après Girault, 2012⁵⁵

* indique une différence significative $p < 0,05$

2.5. Mécanisme d'action de l'ohmline

Afin de déterminer le mécanisme d'action de l'ohmline dans le cas de l'inhibition de la migration cellulaire, il est nécessaire de développer les études menées par Vandier et coll. qui ont permis d'identifier le canal calcique impliqué dans l'entrée des ions Ca^{2+} . Ils se sont penchés sur le canal calcique voltage indépendant Orai 1. En effet ce canal est connu pour son implication dans la migration de cellules cancéreuses et dans l'activation de la calpaïne. Dans le cas des cellules dont la migration est dépendante du canal SK3, une extinction de l'expression d'Orai 1 entraîne une diminution drastique de la migration cellulaire (Figure 26). Ces observations ont permis de conclure à un lien entre les canaux SK3 et Orai 1. Des études en immunofluorescence ont, par ailleurs, montré la présence de ces deux protéines dans les radeaux lipidiques alors que l'absence de SK3 entraîne la délocalisation de Orai 1 en dehors de ces zones.

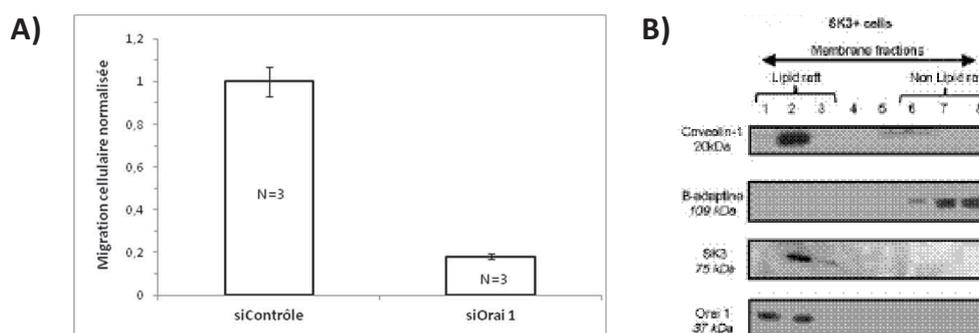


Figure 26 : A) Effet de l'extinction de Orai 1 sur la migration cellulaire des cellules SK3-dépendantes. B) Western blot de fraction de membrane de cellules SK3-dépendantes.

D'après Girault, 2012⁵⁵

L'action de l'ohmline sur les cellules SK3-dépendantes a eu pour effet de délocaliser les canaux SK3 et Orai 1 en dehors des radeaux lipidiques par son insertion dans la membrane plasmique (comme l'édelfosine) (Figure 27). Bien que SK3 soit exprimé de manière ubiquitaire dans l'organisme, le peu d'effets secondaires rencontrés lors des tests *in vivo* avec l'édelfosine s'explique donc par ce mécanisme : seuls les canaux SK3 intégrés dans des complexes avec Orai 1 sont les cibles de ces inhibiteurs, les canaux seuls ne sont pas perturbés par l'insertion membranaire de ces lipides.

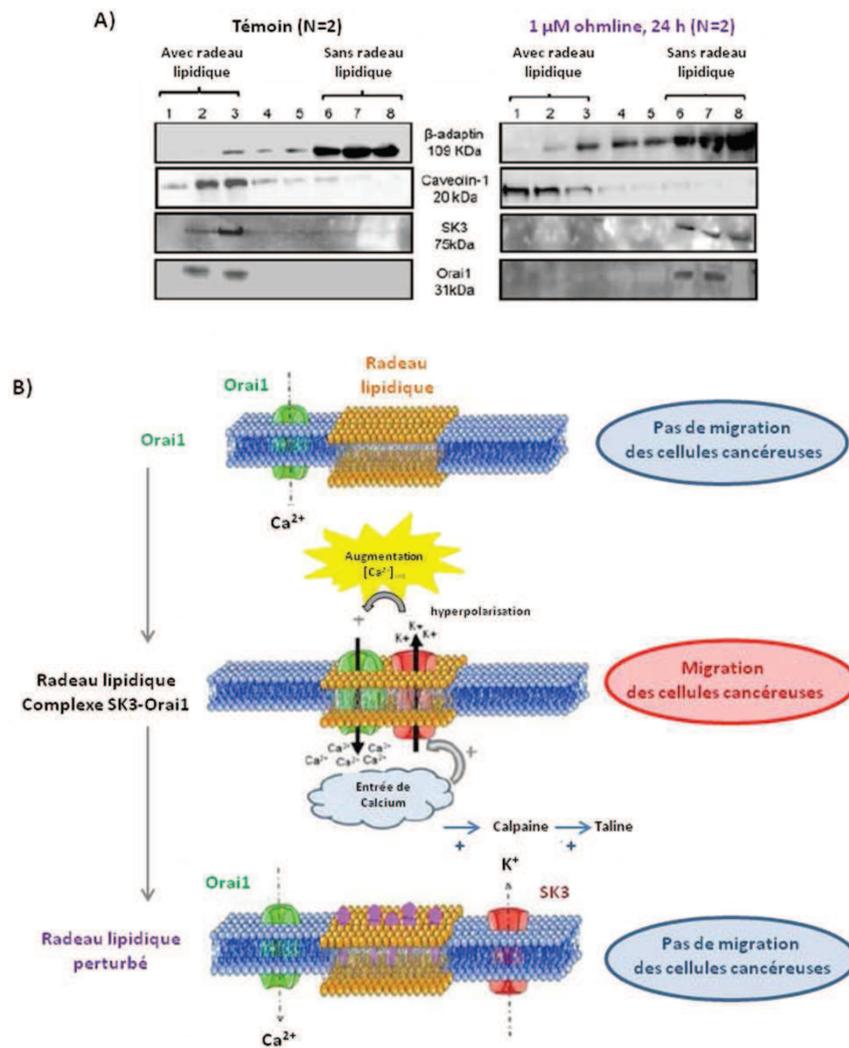


Figure 27 : Mécanisme d'action de l'édelfosine – A) Western blot de fraction de membrane de cellules SK3-dépendantes en présence ou non d'ohmlin. B) Mécanisme d'action proposé
D'après Girault, 2012⁵⁵

2.6. Etudes *in vivo* : effets de l'ohmlin sur le développement tumoral

L'activité de l'ohmlin a été testée dans un modèle de xéno greffe orthotopique, c'est-à-dire une greffe située à son emplacement anatomique habituel (orthotopique) mais dont le donneur est d'une espèce différente du receveur (xéno greffe). Ici, des cellules tumorales de type MDA-MB-435 shRD (SK3+) (cellules cancéreuses mammaires humaines), génétiquement modifiées pour exprimer la luciférase, ont été greffées à des souris.

Les cellules ont été prétraitées avec l'ohmlin avant d'être greffées au niveau du bourgeon mammaire en formation de la souris. Un groupe de souris témoins a reçu des injections de véhicule alors que l'autre groupe a reçu des injections d'ohmlin. Les suivis de poids des

souris ainsi que les mesures du poids des organes et la mesure par bioluminescence du volume de la tumeur a permis de montrer que l'ohmline n'a eu aucun effet sur le développement de la tumeur primaire.

L'étude a été poursuivie en étudiant le développement de métastases. La formation métastatique globale a été mesurée *ex vivo* par bioluminescence afin d'obtenir un score métastatique (qui tient compte du nombre de métastases et de la bioluminescence mesurée) (Figure 28). Le groupe de l'ohmline présente un score métastatique diminué par rapport au groupe témoin.

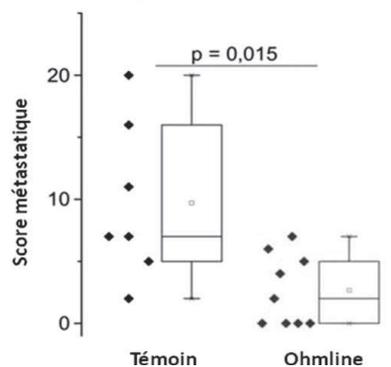


Figure 28 : Score métastatique des souris traitées ou non avec 15 mg.kg⁻¹ d'ohmline dans le modèle de xénogreffe orthotopique
D'après Girault, 2012⁵⁵

L'ohmline a également tendance à diminuer la fréquence des métastases osseuses et pulmonaires (sites préférentiellement colonisés) (Tableau 2).

| | Groupe Témoin | Groupe Ohmline |
|--------------------------------------|---------------|----------------|
| Fréquence des métastases pulmonaires | 85 % | 22 % |
| Fréquence de métastases osseuses | 42 % | 0 % |

Tableau 1 : Fréquence des métastases pulmonaires et osseuses pour des souris traitées ou non par l'Ohmline
D'après Girault, 2012⁵⁵

Cette étude a permis de montrer que l'ohmline était capable de diminuer le développement de métastases sans avoir d'effet sur la tumeur primaire. De plus, il n'y a aucune toxicité constatée sur la période de traitement avec ce composé.

VI - Objectifs

Les études précédentes ont montré que le canal potassique SK3 est une cible thérapeutique intéressante pour limiter le développement des métastases lié à certaines tumeurs malignes très envahissantes notamment du sein, du mélanome et de la prostate. Il a également été montré que l'édelfosine, un glycérolipide à tête phosphocholine, était un excellent candidat mais les effets secondaires induits par son application nous ont conduits à la recherche de nouvelles molécules. Une étude structure-activité faisant varier la nature des différents éléments de cette molécule a permis de sélectionner un nouvel inhibiteur de l'activité de SK3, l'ohmline, ne présentant aucune toxicité.

La première partie de ce travail s'inscrit dans la continuité de cette étude et porte spécifiquement sur la modularité de la tête hydrophile en sn3 du motif glycérol en faisant varier notamment la nature du disaccharide et la nature de sa jonction au squelette glycérol.

Ainsi, dans un premier chapitre la synthèse et l'évaluation de nouveaux glyco-glycérolipides sera décrite. Suite à des études faites sur les plantes par des biologistes laissant penser à une certaine similitude entre un motif α (1 \rightarrow 6) digalactosyle et le motif phosphocholine, nous synthétiserons le 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-6-O- α -D-galactopyranosyl- β -D-galactopyranoside. Utilisant une même approche synthétique, nous réaliserons également la synthèse de l'anomère α de l'ohmline afin d'étudier l'impact de la nature de la liaison anomérique.

Dans le but d'améliorer la solubilité des composés et d'étendre l'étude structure-activité autour des analogues de l'édelfosine et de l'ohmline, nous proposons, dans un second chapitre, d'insérer un groupement phosphate ou thiophosphate entre le motif disaccharidique et le motif glycérol. L'étude sera ensuite étendue, aux vues des résultats biologiques, à des composés portant une autre tête hydrophyle comme l'inositol phosphate ou tout simplement phosphate.

CHAPITRE 2 : SYNTHÈSE ET ÉVALUATION
DE GLYCOGLYCEROLIPIDES ANALOGUES
DE L'ÉDELFOSE

I - Les glyco-glycérolipides

Différents analogues de l'édelfosine ont déjà été synthétisés. Parmi tous ces produits, l'ohmline, un glyco-lipide à tête lactose est celui qui présente les meilleurs résultats *in vitro* et surtout *in vivo* sans avoir d'effets secondaires. Nous avons montré le rôle essentiel du squelette glycérol et de ses différents substituants en position *sn*-1 et *sn*-2 dans la capacité d'inhibition de la migration et sur l'action du produit sur le canal SK3. De plus la présence du motif disaccharidique à la place de la tête phosphocholine en position *sn*-3 permet d'éliminer le caractère toxique de la molécule. Dans la recherche de nouveaux composés plus performants, nous proposons de synthétiser un nouvel analogue glycosylé de l'édelfosine, le 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-6-*O*- α -D-galacto-pyranosyl- α -D-galacto-pyranoside. Cela fait suite à une constatation faite chez les plantes que ce motif digalactosylé présent dans le digalactosyldiacylglycérol (DGDG) pouvait remplacer le motif phosphocholine dans certaines circonstances, laissant supposer une certaine similitude de comportement de ces deux têtes hydrophiles (Figure 29).

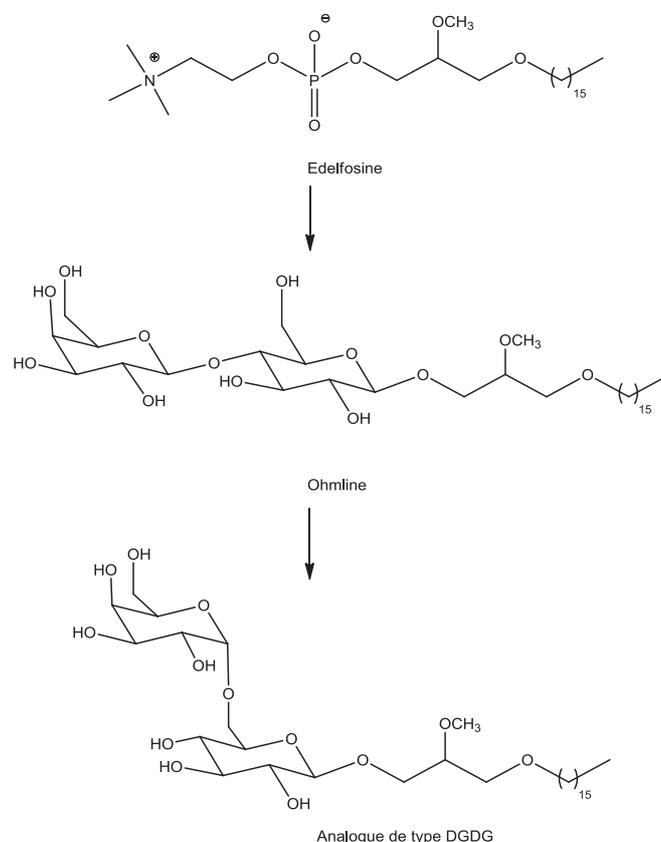


Figure 29 : Evolution des analogues de l'édelfosine

1 - Historique

De nombreux dérivés glycoconjugués sont présents à la surface des membranes cellulaires, ils sont divisés en deux groupes : les glycoprotéines et les glyco-lipides. Ces composés sont principalement dédiés à la reconnaissance de signaux intercellulaires, la partie protéique ou lipidique servant d'ancre pour fixer la chaîne glycosidique à la surface de la membrane. Il a fallu attendre les années 1930 pour que l'équipe d'Anderson isole le premier dérivé de glycérol contenant un motif glyco-lipide : le mannosylphosphatidylinositol⁵⁷. Ce composé a été isolé lors d'études sur le *Mycobacterium tuberculosis* dans le cadre de travaux sur la tuberculose⁵⁸, puis il a ensuite été classé dans la catégorie des « glycoglycérophospholipides »⁵⁹.

Il a fallu attendre 1956 et les travaux de Carter⁶⁰ pour que les premiers glycolipides soient isolés : le galactosyldiacylglycérol puis le digalactosyldiacylglycérol en 1961. Ces deux produits furent également les premiers glycolipides dont la structure et la stéréochimie furent entièrement élucidées⁶¹.

Les glycolipides, auxquels nous nous intéressons, sont généralement constitués d'une ou plusieurs unités monosaccharidiques liées à une chaîne grasse *via* un squelette glycérol, ceci leur conférant des propriétés amphiphiles (Figure 30).

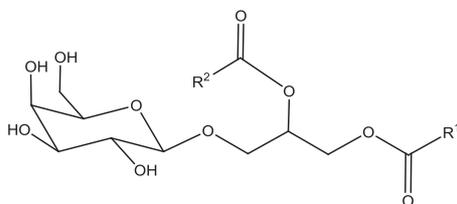


Figure 30 : Exemple de glycolipide

De nombreuses études ont montré que ces molécules présentent de multiples activités biologiques variant selon la nature du saccharide ; par exemple, les dérivés du galactose ou

⁵⁷ Anderson, R.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1930**, *52*, 1607-1608

⁵⁸ Ballou, C.E.; Vilkas, E.; Lederer, E. *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 69-76

⁵⁹ Fischer, W. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *487*, 74-88

⁶⁰ a) Carter, H.E. ; McCluer, R.H. ; Slifer, E.D. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 3735-3738. b) Carter, H.E. ; Ohno, K. ; Nojima, S. ; Tipton, C.L. ; Stanacev, N.Z. *J. Lipid Res.* **1961**, *2*, 215-222. c) Carter, H.E. ; Hendry, R.A. ; Stanacev, N.Z. *J. Lipid Res.* **1961**, *2*, 223-227

⁶¹ a) Sastry, P.S. *Adv. Lipid Res.* **1974**, *12*, 251-310. b) Hauksson, J.B. ; Berqvist, M.H.J. ; Rifors, L. *Chem. Phys. Lipids* **1995**, *78*, 98-102

du glucose ont des effets sur le système immunitaire des mammifères. Du fait de leurs faibles concentrations dans les différents organismes, leurs isollements ne sont pas envisageables. De plus, les études biologiques nécessitent l'utilisation d'une certaine quantité de produit pur, la synthèse de ces composés ou de leurs analogues est donc devenue essentielle.

2 - Le MonoGalactosylDiacylGlycérol et le DiGalactosylDiacylGlycérol

Le monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) puis le digalactosyldiacylglycerol (DGDG) furent les deux premiers glycolipides isolés et dont la structure et la stéréochimie furent entièrement élucidées. Chez les plantes, ils sont les constituants principaux (85 %) des membranes photosynthétiques⁶² et ils sont l'élément clé de la défense de ces organismes face aux carences en phosphates, macro-éléments essentiels à leur croissance et à leur développement⁶³. Il n'est donc pas rare dans ce type de configuration de voir les phosphatidylcholines substituées par des DGDG.

Que ce soit le MGDG ou le DGDG, leur composition exacte varie en fonction de l'organisme (plantes supérieures, angiospermes...). Globalement, le squelette glycérol de ces composés est constitué d'acides gras insaturés (majoritairement à trois insaturations, comme l'acide linoléique ou l'acide hexadécatriénoïque, mais des chaînes à une seule insaturation ont été isolées)⁶⁴ (Figure 31).

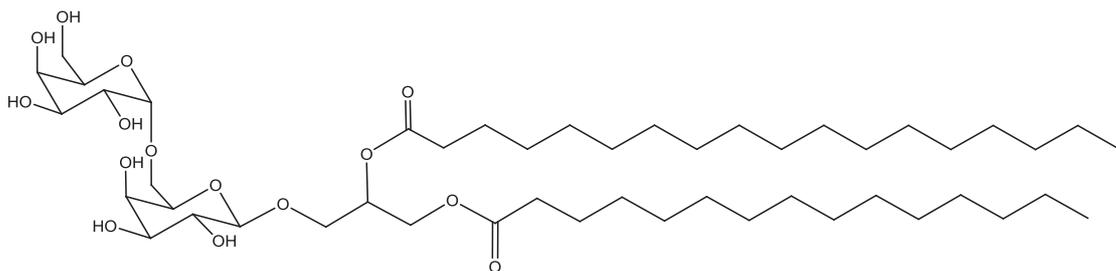


Figure 31 : Exemple de DGDG

⁶² Murata, M. ; Higashi, S.I. ; Fujimura, Y. *Biochim. Biophys. Acta.* **1990**, *1019*, 261-268

⁶³ a) Härtel, H. ; Benning, C. *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, *28*, 729-732. b) Andersson, M.X. ; Stridh, M.H. ; Larsson, K.E. ; Liljenberg, C. ; Sanderlius, A.S. *FEBS Letters* **2003**, *537*, 128-132. c) Andersson, M.X. ; Larsson, K.E. ; Tjellström, H. ; Liljenberg, C. ; Sandelius, A.S. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 27578-27586

⁶⁴ D'Ippolito, G. ; Tucci, S. ; Cutignano, A. ; Romano, G. ; Cimino, G. ; Miralto, A. ; Fontana, A. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1686*, 100-107

Diverses activités biologiques ont été attribuées aux MGDG et DGDG : propriétés anti-inflammatoires (inhibition de la migration des neutrophiles), antivirales, antifongiques, induction de l'apoptose⁶⁵.

3 - Descriptif des travaux menés

Dans le but d'obtenir des inhibiteurs de l'activité du canal SK3 et de la migration cellulaire, nos études nous ont menés à nous intéresser à la synthèse de molécules de type DGDG. Nous avons donc travaillé avec un dérivé du glycérol répondant aux critères précédemment établis lors de l'étude structure-activité pour aboutir au composé ci-dessous (Figure 32).

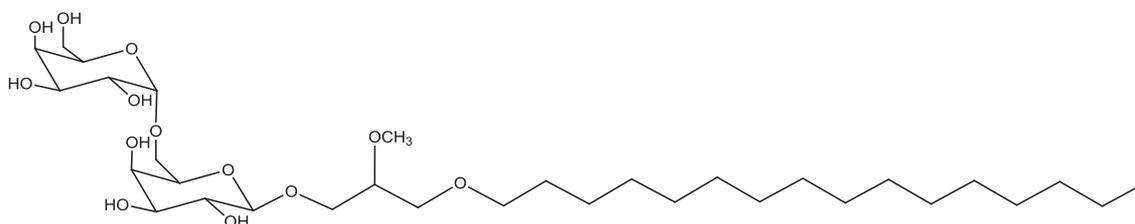


Figure 32 : Analogue de l'édelfosine

II - Synthèse de glycérolipides

1 - La O-glycosylation

De nombreuses études biosynthétiques ont été réalisées afin de déterminer les différentes voies de synthèses des MGDG et DGDG. En ce qui concerne les synthèses par voie chimique, elles sont les mêmes que celles des glyco-lipides en général. L'étape clé de ces synthèses est l'étape dite de glycosylation⁶⁶. C'est une étape essentielle à la synthèse d'oligosaccharides ou de glyco-lipides « simples ». Plusieurs stratégies de glycosylation peuvent être utilisées.

⁶⁵ a) Larsen, E. ; *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 994-995. b) Janwitayanuchit, W. ; Suwanborirux, K. ; Patarapanich, C. ; Pummangura, S. ; Lipipun, V. ; Vilaivan, T. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 1253-1264. c) Plougerné, E. ; Ioannou, E. ; Georgantea, P. ; Vagias, C. ; Roussis, V. ; Hellio, C. ; Kraffe, E. ; Stiger-Pouvreau, V. *Mar. Biotechnol.* **2010**, *12*, 52-61. d) Andrianasolo, E.H. ; Haramaty, L. ; Vardi, A. ; White, E. ; Lutz, R. ; Falkowski, P. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1197-1201

⁶⁶ Lindhorst, T.K. "Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry", Wiley 27^{ème} ed., Weinheim **2002**

1.1. Méthode enzymatique

C'est une méthode qui a été extrêmement étudiée car c'est par cette voie que se réalise la biosynthèse des protéoglycanes dans l'appareil de Golgi. La voie chimique par méthode enzymatique présente le net avantage de n'avoir aucune étape de protection ou d'activation à effectuer du fait que la sélectivité de la réaction est déterminée par l'enzyme employée. La limite de cette méthode est son coût élevé. En effet pour obtenir des rendements proches des rendements de synthèses par voie chimique, il faut déboursier jusqu'à 6 fois le prix de l'enzyme généralement utilisée : la β -D-glycosidase, l'enzyme la moins chère mais aussi la moins efficace (10 à 20 % de rendement)⁶⁷.

1.2. Méthode de Fischer

Il s'agit de la méthode de *O*-glycosylation la plus ancienne⁶⁸. Elle consiste en la réaction d'un alcool sur un saccharide non protégé en milieu acide. L'alcool servant à la fois de réactif et de solvant, cette méthode n'est utilisée que pour les réactions entre un saccharide et un alcool peu coûteux tels que le méthanol, l'alcool benzylique ou l'alcool allylique.

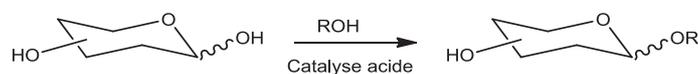


Figure 33 : *O*-glycosylation de Fischer

1.3. Méthode de Koenigs-Knorr

La méthode de Koenigs-Knorr, qui fait appel à des glycosides halogénés, est la plus utilisée pour la synthèse stéréospécifique des 1,2-*trans*-glycosides⁶⁹. Cette réaction s'effectue à l'origine à l'aide de sels d'argent, puis avec des sels de mercure (on parle alors de la méthode de Helferich), qui servent de support à la réaction et qui permettent de protéger la position en α afin de réaliser la *trans*-glycosylation. Cette réaction en *trans* est également

⁶⁷ Kobayashi, T.; Adachi, S.; Nakanishi, K. et Matsuno, R. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *11*, 13-21

⁶⁸ Fischer, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1893**, *26*, 2400-2412

⁶⁹ Koenigs, W. ; Knorr, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 957-981

favorisée par la présence d'un groupement protecteur participant en C₂ (généralement des esters comme les groupements acétyles ou benzoyles).

Cette méthode fut, pendant de nombreuses années, la seule méthode utilisée pour faire une glycosylation. Elle présente le net avantage de passer par un intermédiaire halogéné très facile à obtenir (à partir du glycoside peracétylé pour les dérivés bromés et chlorés, *via* le glycoside déprotégé en position anomérique pour les dérivés fluorés). Cependant, elle présente quelques désavantages : la labilité du groupement halogéné du fait de sa position anomérique et l'utilisation de sels de métaux lourds en proportion équimolaire afin de promouvoir la réaction.

L'évolution de cette méthode a néanmoins conduit à l'élimination des sels d'argent ou de mercure comme promoteurs de la réaction. Ils ont été remplacés par des sels de cadmium⁷⁰ ou par des halogénures tels que le bromure de tétraéthylammonium⁷¹.

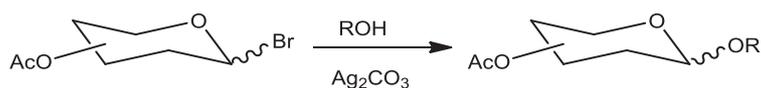


Figure 34 : O-glycosylation de Koenigs-Knorr

1.4. Méthode de Helferich

Elle fut pour la première fois utilisée par Helferich et coll.⁷² en 1933. Il s'agit de la glycosylation *via* un saccharide acétylé en position anomérique. Cette méthode nécessite l'utilisation d'un acide de Lewis comme promoteur (ZnCl₂, SnCl₄, BF₃·Et₂O, TMSOTf, acide *p*-toluenesulfonique...).

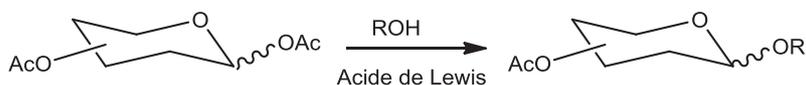


Figure 35 : O-glycosylation de Helferich

⁷⁰ Wimmer, Z.; Romaňuk, M. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1982**, *47*, 1878-1883

⁷¹ Lemieux, R. U. ; Hendriks, K.B. ; Stick, R.V. ; James, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 4056-4062

⁷² Helferich, B. ; Schmitz-Hillebrecht, E. *Ber.* **1933**, *66*, 378

1.5. Méthode du trichloroacétimide

La méthode du trichloroacétimide fut proposée pour la première fois par Schmidt et coll.⁷³ en 1984. C'est l'alternative à la méthode Koenigs-Knorr la plus souvent employée. Le trichloroacétimide, un très bon groupe partant, est inséré sur la position anomérique. Ceci a pour but d'obtenir un très bon glycoside donneur qui pourra être activé par des quantités catalytiques d'acides de Lewis. Les activateurs les plus fréquemment utilisés sont le trifluorure de bore complexé à de l'éther diéthylique ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) ou le triflate de triméthylsilyle (TMSOTf). Cette méthode présente des rendements très corrects pour une glycosylation et une excellente stéréosélectivité *trans* en présence d'un groupement protecteur participant en C₂.

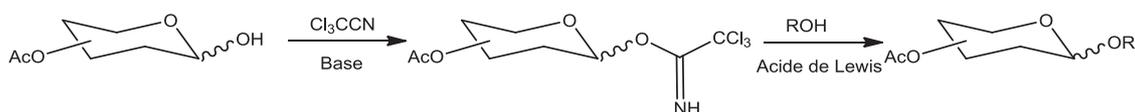


Figure 36 : O-glycosylation *via* le trichloroacétimide

1.6. Stratégie de synthèse

Nous avons choisi de réaliser la synthèse de notre glycolipide analogue du DGDG en comparant deux stratégies de protection de nos unités galactose. La première approche consiste à suivre la voie généralement employée pour réaliser une *O*-glycosylation α , c'est-à-dire en se basant sur une protection *via* des groupements benzyles. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la protection des galactoses par des groupements triméthylsilyles, une stratégie qui n'a pas encore été employée, à notre connaissance, pour synthétiser des disaccharides (Figure 37).

⁷³ Schmidt, R.R. ; Michel, J. *Tetrahedron. Lett.* **1984**, 25, 821-824

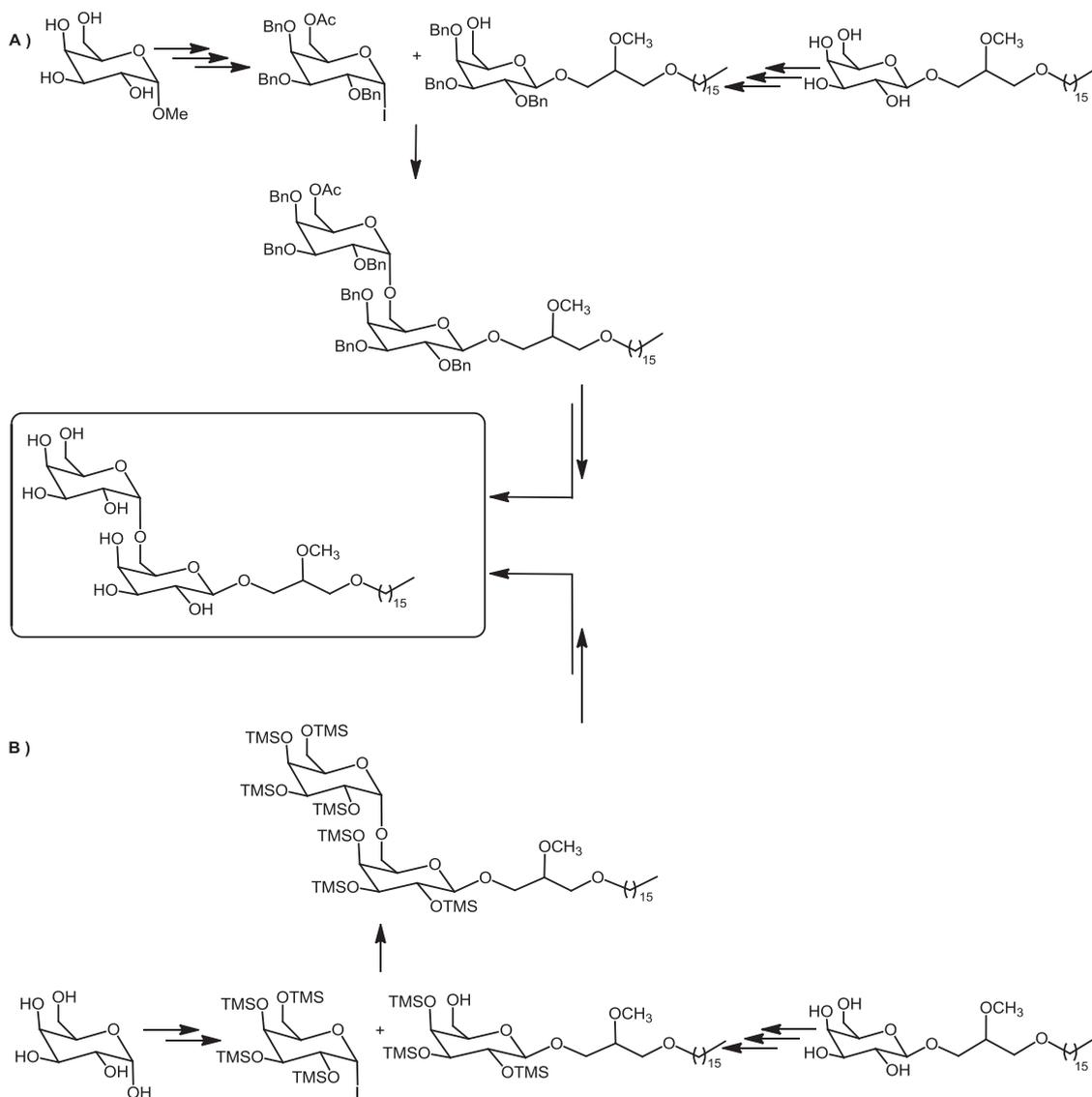


Figure 37 : Stratégies de synthèse

Quelle que soit la voie de synthèse, les premières étapes consistent en l'obtention d'une première unité galactose sur laquelle nous avons greffé le 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxy-1-propanol **5**. Pour cela il est nécessaire de réaliser une première glycosylation entre le trichloroacétimidate de galactose tétra-*O*-acétylé **7** et l'alcool lipidique **5**, composés que nous avons préalablement synthétisés. Nous avons choisi de suivre la méthode de Schmidt pour cette glycosylation. En effet, ce groupement est connu pour être un très bon groupe partant, ce qui permet d'augmenter considérablement la cinétique de réaction en comparaison de la glycosylation à partir de galactose pentaacétylé (méthode de Helferich) et

elle est connue pour permettre d'effectuer les réactions de glycosylation avec une bonne stéréosélectivité β (Figure 38).

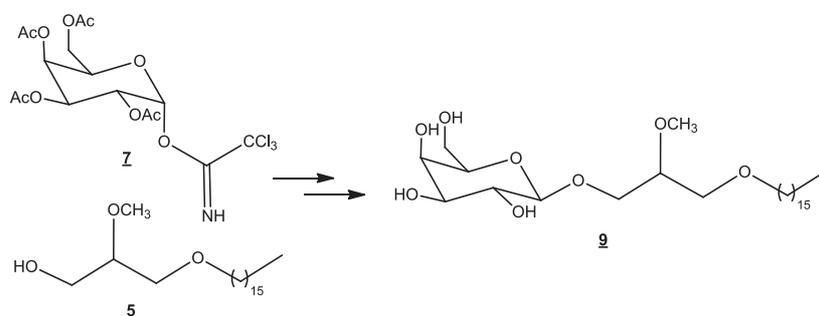


Figure 38 : Première réaction de glycosylation

Nous avons ensuite réalisé la seconde réaction de glycosylation entre l'alcool primaire de notre saccharide avec le carbone anomérique d'un second galactose. La difficulté de ce travail réside en la formation de la liaison galactose-galactose α (1 \rightarrow 6). Pour ce faire nous avons utilisé la méthode dérivée de Koenigs et Knorr se basant sur un glycoside donneur halogéné (Figure 39).

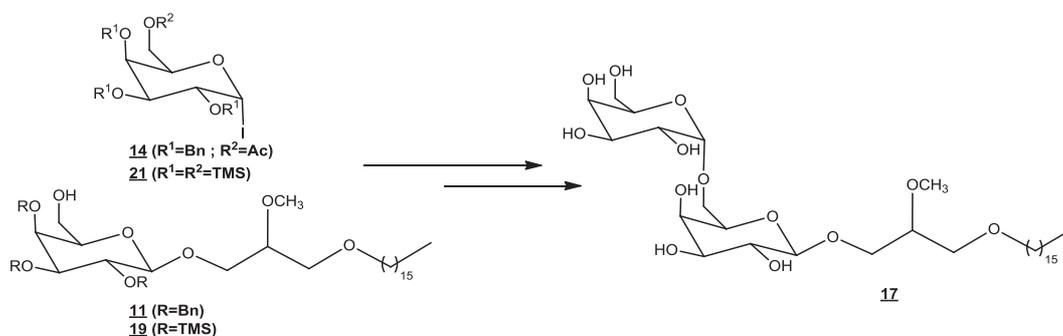


Figure 39 : Seconde glycosylation

2 - Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxy-1-propanol 5

Avant de réaliser la synthèse de notre glyco-lipide, il nous faut obtenir le dérivé du glycérol que nous souhaitons condenser sur un galactose. Les études structures-activités réalisées en amont de ce travail nous ont permis de déterminer quelle structure de lipide serait la mieux adaptée pour avoir une action sur le canal SK3. Il s'agit d'un dérivé du glycérol possédant

une chaîne grasse de type cétylique (C16) ou stéarylique (C18) en position *sn*-1, un groupement méthoxy en position *sn*-2 et la position *sn*-3 sera réservée à la glycosylation (Figure 40). D'après ces mêmes études, la stéréoisomérie du carbone en position *sn*-2 de l'ohmline n'influence pas l'efficacité d'inhibition de la migration cellulaire. Nous avons donc décidé de travailler sur le mélange racémique du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxy-1-propanol. La synthèse suit le protocole initialement établi par Kates et coll.⁷⁴.

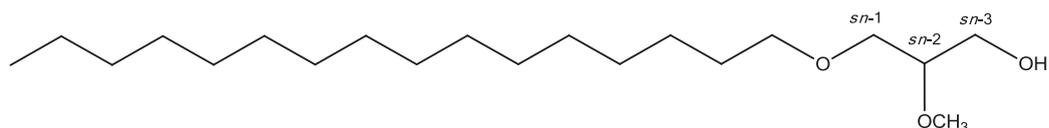


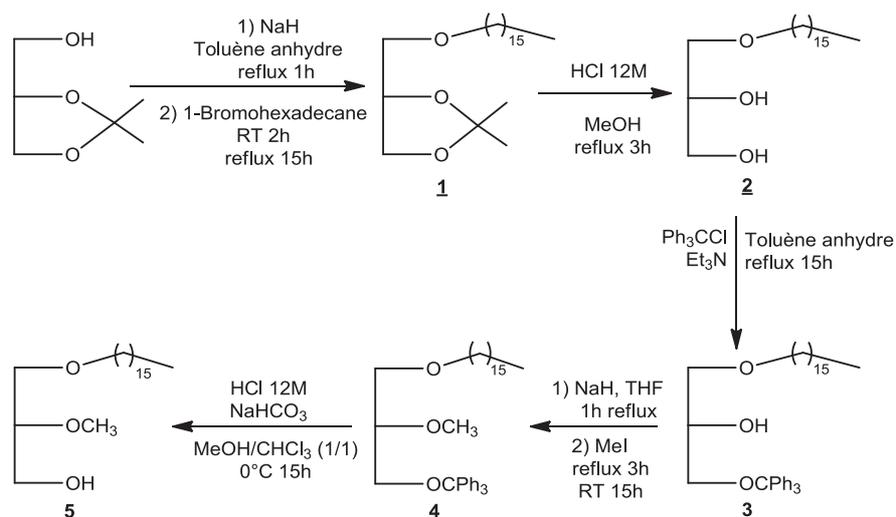
Figure 40 : Structure du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxy-1-propanol

Pour réaliser la synthèse de ce lipide, nous sommes partis du solketal, ou 2,3-*O*-(2',2'-diméthyl-1',3'-dioxolanyl)-glycérol (Figure 41). Après une réaction de substitution nucléophile de type 2 entre le solketal et le 1-bromohexadécane en présence d'hydrure de sodium⁷⁵, le produit **1** est mis au reflux dans un mélange acide chlorhydrique/méthanol pour obtenir le diol correspondant **2**. La position *sn*-3 du glycérol est alors protégée par réaction de l'alcoolate sur le chlorure de triphénylméthane ou chlorure de trityle, au reflux dans le toluène⁷⁶. Une réaction de substitution nucléophile de type 2 est alors réalisée entre la fonction alcool présente en position *sn*-2 du dérivé **3** et de l'iodométhane et enfin la position *sn*-3 est déprotégée en présence d'acide chlorhydrique concentré dans un mélange méthanol/chloroforme au reflux. Le produit **5** est alors purifié sur colonne chromatographique pour donner une cire blanche avec un rendement global de 52 %.

⁷⁴ Kates, M. ; Adams, G.A. ; Blankc, M.L. ;Snyder, F. *Lipids* **1991**, *26*, 1095-1101

⁷⁵ Baumann, W.J. ; Mangold, H.K. *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 3055-3057

⁷⁶ Godfroid, J.J. ; Broquet, C. ; Jouquey, S. ; Lobbar, M. ; Heymanns, F. ; Redeuith, C. ; Steiner, E. ; Michel, E. ; Coeffier, E. ; Fichelle, J. ; Worcel, M. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 792-797



Rendement global de synthèse : 52 %

Figure 41 : Schéma réactionnel de formation du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxy-1-propanol 5

3 - Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-6-O- α -D-galactopyranosyl- β -D-galactopyranoside 17 via une protection par des groupements benzyles

3.1. Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-2,3,4-tri-O-benzyl- β -D-galactopyranoside 11

Le galactoglycérolipide 11 obtenu dans un premier temps a été synthétisé en suivant principalement les travaux de Lindhorst⁶⁶. Le pentaacétate de galactose commercial a été déprotégé sélectivement en position anomérique à l'aide d'acétate d'ammonium dans le DMF anhydre à température ambiante⁷⁷. Le produit 6, obtenu avec un rendement de 85 %, est alors mis en présence de trichloroacétonitrile et de carbonate de césium⁷⁸ dans le THF anhydre pour donner le produit activé 7 avec un rendement de 88 %. La réaction de glycosylation entre le composé 7 et l'alcool 5 s'effectue à l'aide de BF₃.Et₂O dans le CH₂Cl₂ anhydre et le β -galactoside 8 est obtenu avec un rendement de 53 %. Ce rendement s'explique par la formation de l'acétate de 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyle, produit

⁷⁷ Chittaboina, S. ; Hodges, B. ; Wang, Q. *Lett. Org. Chem.* **2006**, *3*, 35-38

⁷⁸ De la Fuente, J.M. ; Penadès, S. *Tetrahedron : Asymmetr.* **2002**, *13*, 1879-1888

secondaire de la réaction (près de 40 %) ⁷⁹. La déacétylation des groupements hydroxyles est alors réalisée avec un rendement de 86 %, d'après la méthodologie de Plattner et coll. ⁸⁰, par réaction avec le carbonate de potassium dans le méthanol anhydre. Le composé **9** déacétylé est protégé sélectivement en position 6 par du chlorure de trityle en présence de DABCO en adaptant la méthode de Gadakh et coll. ⁸¹ dans du CH₂Cl₂ anhydre et le produit **10** est isolé avec un rendement de 74 %. Les groupements hydroxyles sont activés sous forme d'alcoolates par de l'hydrure de sodium puis ils sont protégés par des groupements benzyles. La position 6 est alors déprotégée en milieu acide selon la méthodologie de Dorgeret ⁸² et le composé **11** est obtenu avec un rendement de 67 % (Figure 42).

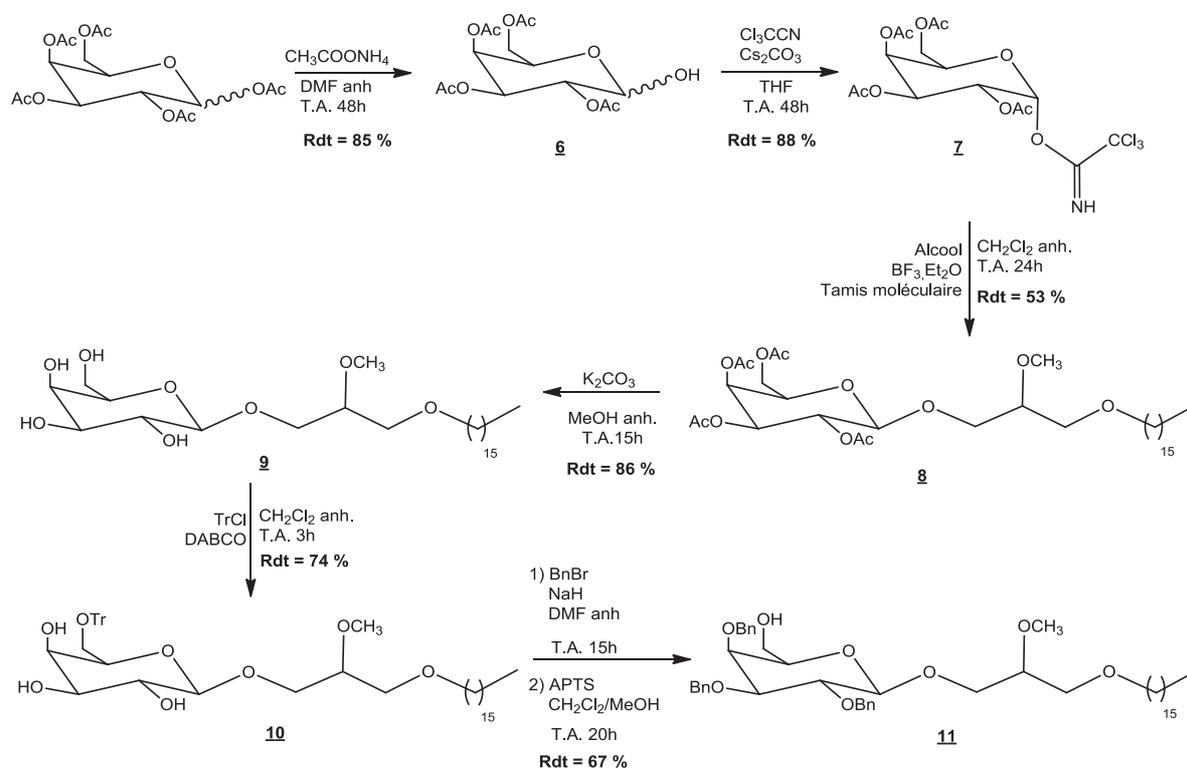


Figure 42 : Schéma de synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-2,3,4-tri-O-benzyl-β-D-galactopyranoside **11**

⁷⁹ Murakami, T. ; Hirono, R. ; Sato, Y. ; Furusawa, K. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 1009-1020

⁸⁰ Plattner, J.J. ; Gless, R.D. ; Rapoport, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 8613-8615

⁸¹ Gadakh, B.K. ; Patil, P.R. ; Malik, S. ; Kartha, K.P.R. *Synthetic Commun.* **2009**, *39*, 2430-2438

⁸² Dorgeret, B. ; Khemtémourian, L. ; Correia, I. ; Soulier, J.L. ; Lequin, O. ; Onger, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 5959-5969

N.B. : Nous avons mené différents essais de glycosylation, notamment en nous basant sur les travaux de Marino-Albernas et coll.⁸³ qui utilisent du TMSOTf comme acide de Lewis, mais nous obtenons les mêmes rendements que précédemment et cela en accord avec les travaux de Murakami et coll.⁷⁹. Les rendements de glycosylation annoncés par Marino-Albernas (85 %) s'expliquent par l'absence du groupement participant en C₂.

3.2. Synthèse du 6-O-acétyl-2,3,4-tri-O-benzyl-1-iodo- α -D-galactopyranose 14

C'est dans les années 1970 que les travaux sur les réactions de glycosylation *via* un donneur iodé ont été développés. En effet, si la synthèse des glycosides iodés ainsi que leur propension à favoriser les synthèses d' α -glycosides était connue depuis des années⁸⁴, ce sont les dérivés bromés et chlorés qui leur ont été préférés. Les travaux des équipes de Schuerch et de Lemieux ont montré le net avantage à utiliser un glycoside iodé par rapport à leurs analogues chloré et bromé^{71,85}. Bien qu'ils aient de fortes similitudes avec les glycosides bromés lors de leur réaction avec des alcools, les glycosides iodés sont nettement plus réactifs, ce qui permet d'effectuer la réaction avec un excès d'alcool minime sans avoir recours à des sels de métaux lourds pour la catalyser. Il y a relativement peu de réactions secondaires et les rendements sont meilleurs. La stéréosélectivité α de la réaction est également meilleure avec les donneurs iodés, ceci étant probablement dû à une meilleure anomérisation de l'halogénure lors de la glycosylation.

Nous nous sommes basés ici sur les travaux de Gervay-Hague et coll.⁸⁶ qui réalisent la synthèse d'oligosaccharides *via* le synthon saccharidique 6-O-acétyl-2,3,4-tri-O-benzyl-1-iodo- α -D-galactopyranose 14. La présence d'un groupement acétyle en position 6 de cet oside, à la place de groupement benzyle protégeant toutes les autres fonctions hydroxyles permet, par une déprotection sélective de cette position, de réaliser la synthèse de chaînes saccharidiques beaucoup plus longues.

⁸³ Marino-Albernas, J.R. ; Bittman, R. ; Peters, A. ; Mayhew, E. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3241-3247

⁸⁴ Helferich, B. ; Gootz, R. *Ber. dtsch. chem. Ges.* **1929**, *62*, 2788-2792

⁸⁵ Kronzer, F.J. ; Schuerch, C. *Carbohydr. Res.* **1974**, *34*, 71-78

⁸⁶ a) Lam, S.N. ; Gervay-Hague, J. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2039-2042. b) Lam, S.N. ; Gervay-Hague, J. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 1953-1965. c) Du, W. ; Gervay-Hague, J. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2063-2065

Le 1-*O*-méthyl- α -D-galactopyranose commercial est protégé par réaction avec du bromure de benzyle en présence d'hydrure de sodium dans du DMF anhydre⁸⁷. Le produit **12** est obtenu avec un rendement de 87 % et mis en présence d'un mélange acide acétique/anhydride acétique (1 : 1) et d'acide sulfurique concentré⁸⁸. Wong et coll. expliquent l'acétylation sélective par le passage par un acétal intermédiaire⁸⁹. Le composé **13** est obtenu avec un rendement de 64 %. Le produit est mélangé à de l'iodure de triméthylsilyle dans du CH₂Cl₂ anhydre, suivant la méthodologie de Gervay-Hague et coll.⁸⁶, et le produit obtenu **14** est utilisé tel quel pour la seconde réaction de glycosylation.

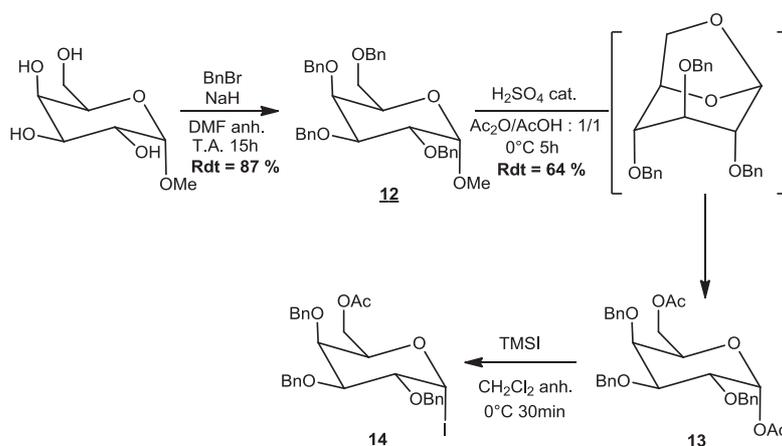


Figure 43 : Schéma de synthèse du 6-*O*-acétyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-1-iodo- α -D-galactopyranose

3.3. Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-6-*O*- α -D-galactopyranosyl- β -D-galactopyranoside **17**

La réaction de glycosylation entre les composés **11** et **14** s'effectue, en adaptant la méthodologie de Gervay-Hague et coll.⁸⁶, en présence de DIPEA et de TBAI dans du benzène anhydre selon un mécanisme de type S_N2. La stéréosélectivité α est obtenue grâce à la présence de TBAI qui va permettre une anomérisation *in situ* du dérivé iodé donnant l'anomère β beaucoup plus réactif⁷¹ (Figure 44).

⁸⁷ Nishida, Y. ; Takamori, Y. ; Matsuda, K. ; Ohru, H. ; Yamada, T. ; Kobayashi, K. *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, *18*, 985-997

⁸⁸ Tennant-Eyles, R.J. ; Davis, B.G. ; Fairbanks, A.J. *Tetrahedron Asymmetry* **2000**, *11*, 231-243

⁸⁹ Hung, S.C. ; Lin, C.C. ; Wong, C.H. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5419-5422

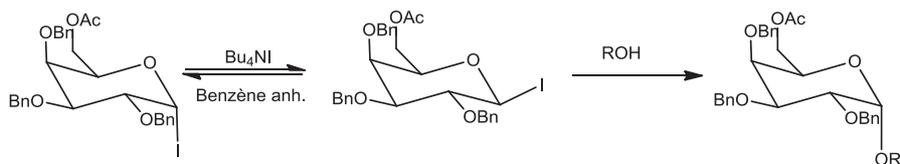


Figure 44 : Glycosylation en α *via* le galactose iodé

Le produit **15**, obtenu avec un rendement de 65 %, est alors déacétylé en position 6 par du carbonate de potassium dans du méthanol pour donner le composé **16** avec un rendement de 47 %⁸⁰. La débenzylation du composé s'effectue en présence de palladium sur charbon dans un autoclave sous une pression de H₂ de 20 bars pour donner le produit **17** avec un rendement de 56 %.

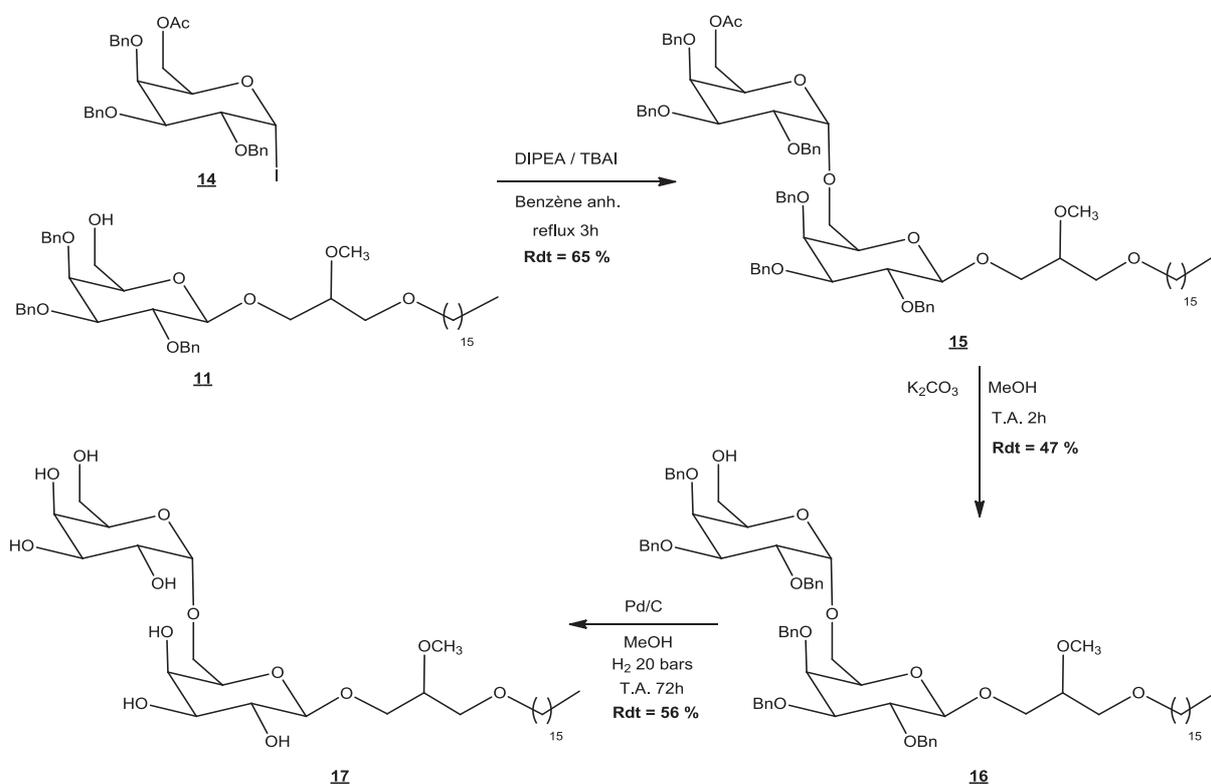


Figure 45 : Schéma de synthèse du 3-(hexadecyloxy)-2-méthoxypropyl-6-O- α -D-galactopyranosyl- β -D-galactopyranoside **17**

4 - Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-6-O- α -D-galactopyranosyl- β -D-galactopyranoside **17** via une protection par silylation

Si dans la stratégie de synthèse précédente la présence d'un groupement non-participant benzyle en C₂ favorise l' α -glycosylation, l'étape finale de déprotection par hydrogénation présente l'inconvénient de pouvoir affecter également le bras fixé en position anomérique (chaines insaturées, etc...). Aussi, nous avons envisagé une deuxième voie de synthèse faisant appel à des motifs triméthylsilyles comme groupements protecteurs. Ces derniers présentent le net avantage d'être très facilement éliminés, la déprotection sélective des hydroxyles primaires est aisément réalisable⁹⁰ et ils confèrent au sucre donneur protégé une activation lors des réactions de glycosylation⁹¹.

4.1. Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-2,3,4-tris-O-(triméthylsilyl)- α -D-galactopyranoside **19**

Le 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl- β -D-galactoside **9** précédemment obtenu est per-triméthylsilylé, en adaptant les travaux de Uchiyama et coll.⁹², par du chlorotriméthylsilane en présence de triéthylamine dans du DMF anhydre pour donner le composé **18** avec un rendement de 92 %. La déprotection sélective de l'hydroxyle en position 6 s'effectue, en adaptant la méthodologie de Fernandez et coll.^{90a}, en présence d'acide acétique dans un mélange acétone/méthanol et le produit **19** est obtenu avec un rendement de 53 %.

⁹⁰ a) Fernandez, C. ; Nieto, O. ; Rivas, E. ; Montenegro, G. ; Fontenla, J.A. ; Fernandez-Mayoralas, A. *Carbohydr. Res.* **2000**, *327*, 353-365. b) Jervis, P.J. ; Cox, L.R. ; Besra, G.S. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 320-323

⁹¹ a) Mootoo, D.R. ; Konradsson, P. ; Udodong, U. ; Fraser-Reid, B. *J. Am. Chem.Soc.* **1988**, *110*, 5583-5584. b) Crich, D. ; Li, M. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4115-4118

⁹² Uchiyama, T. ; Hindsgaul, O. *Synlett.* **1996**, *6*, 499-501

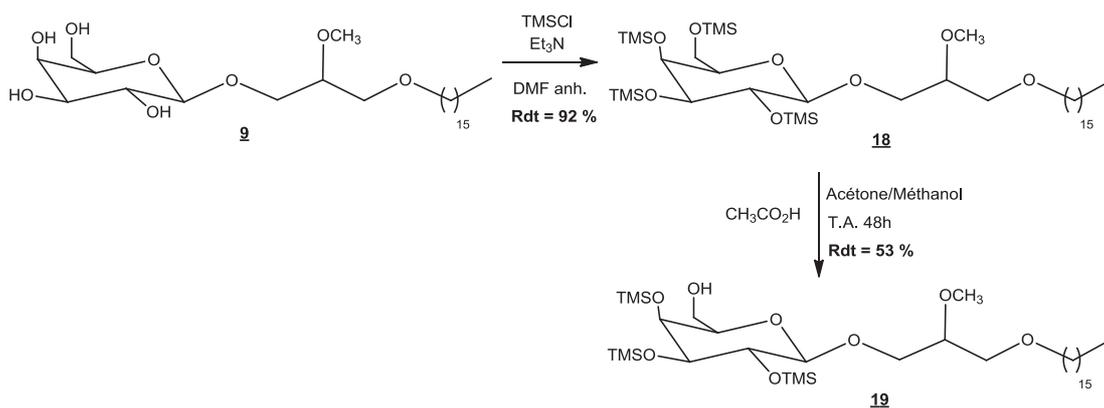


Figure 46 : Schéma de synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-2,3,4-tris-O-(triméthylsilyl)- α -D-galactopyranoside 19

4.2. Synthèse du 2,3,4,6-tetrakis-O-(triméthylsilyl)-1-iodo- α -D-galactopyranose 21

L'utilisation d'un galactoside iodé afin de réaliser une seconde réaction de glycosylation stéréosélective en α est une stratégie efficace. Gervay-Hague et coll.⁹³ ont développé cette méthode avec les glycosides per-triméthylsilylés, ceci permettant de diminuer le nombre d'étapes de protection/déprotection en comparaison avec la méthode *via* les groupements benzyles.

L' α -D-galactopyranose commercial est protégé par réaction avec du chlorotriméthylsilane en présence de triéthylamine dans du DMF anhydre. Le produit 20, obtenu avec un rendement de 83 %, est sélectivement iodé en C₁ par de l'iodure de triméthylsilyle dans du CH₂Cl₂ anhydre. Le produit 21 est utilisé sans purification préalable pour la seconde réaction de glycosylation (Figure 47).

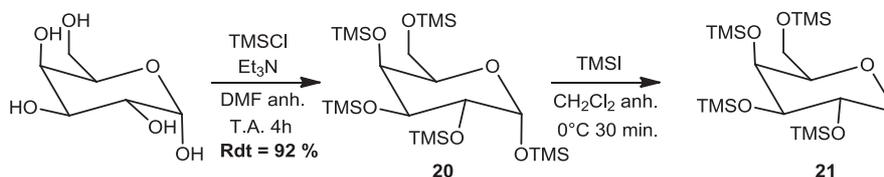


Figure 47 : Schéma de synthèse du 2,3,4,6-tetrakis-O-(triméthylsilyl)-1-iodo- α -D-galactopyranose 21

⁹³ a) Du, W. ; Kulkarni, S.S. ; Gervay-Hague, J. *ChemComm.* **2007**, 23, 2336-2338. b) Schombs, M. ; Park, F.E. ; Du, W. ; Kulkarni, S.S. ; Gervay-Hague, J. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 4891-4898

4.3. Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-6-O- α -D-galactopyranosyl- β -D-galactopyranoside 17

La seconde réaction de glycosylation entre les composés 19 et 21 s'effectue, en se basant sur les travaux de Gervay-Hague et coll.⁹³, en présence de DIPEA et de TBAI dans du CH₂Cl₂ anhydre. Le produit per-triméthylsilylé 22 est obtenu avec un rendement de 72 % puis il est totalement déprotégé par action d'une résine acide dans du méthanol. Le produit final 17 est obtenu avec un rendement de 77 % (Figure 48).

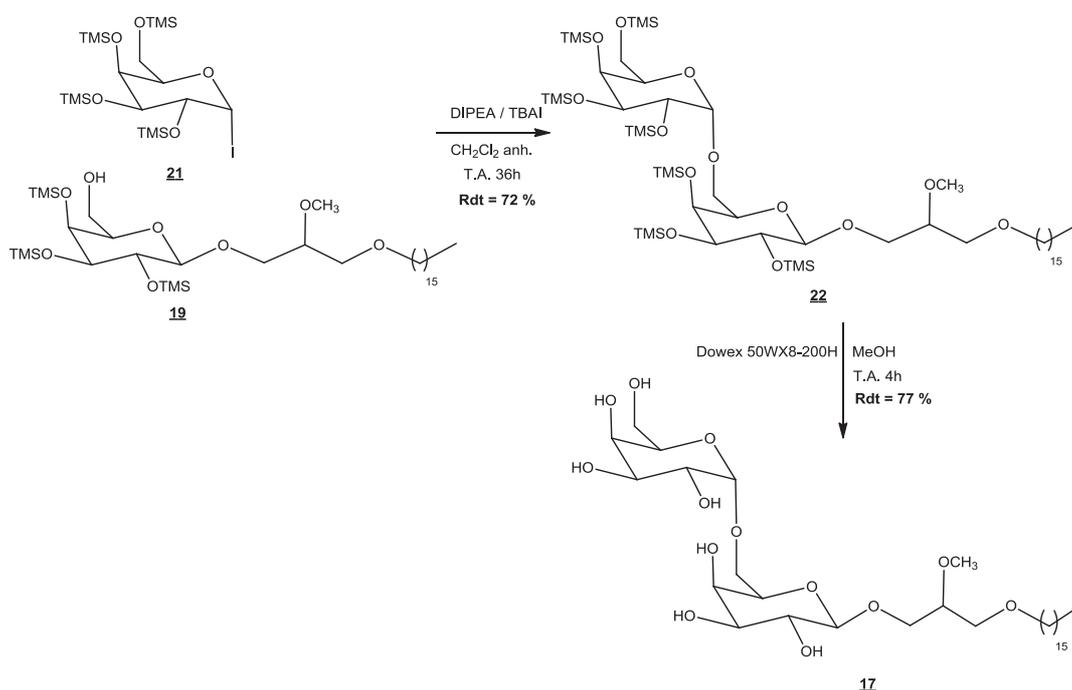


Figure 48 : Schéma de synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-6-O- α -D-galactopyranosyl- β -D-galactopyranoside 17

5 - Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-4-O- β -D-galactopyranosyl- α -D-glucopyranoside 24

Nous avons vu que la méthode de glycosylation en α *via* un composé iodé est une voie efficace de synthèse de glyco-lipides avec un très bon contrôle de la stéréosélectivité. Nous nous sommes donc penchés sur la synthèse du dérivé α de l'ohmline afin d'étudier

l'influence de l'anométrie sur les propriétés d'inhibition de SK3. La synthèse de ce composé a été réalisée en se basant ici encore sur les travaux de Gervay-Hague^{93,94}.

Le β -D-lactose commercial est protégé par réaction avec du chlorotriméthylsilane en présence de triéthylamine dans du DMF anhydre. Le produit **23** est obtenu avec un rendement de 72 % et mis en présence d'un mélange d'iodure de triméthylsilyle dans du CH_2Cl_2 anhydre. Le dérivé iodé est immédiatement utilisé pour réaliser la réaction de glycosylation avec le composé **5** dans du CH_2Cl_2 anhydre. Le produit est entièrement déprotégé par action de la résine Dowex 50WX8-200H (résine acide) dans du méthanol pour donner le composé **24** avec un rendement de 21 % que nous n'avons pas cherché à optimiser (Figure 49).

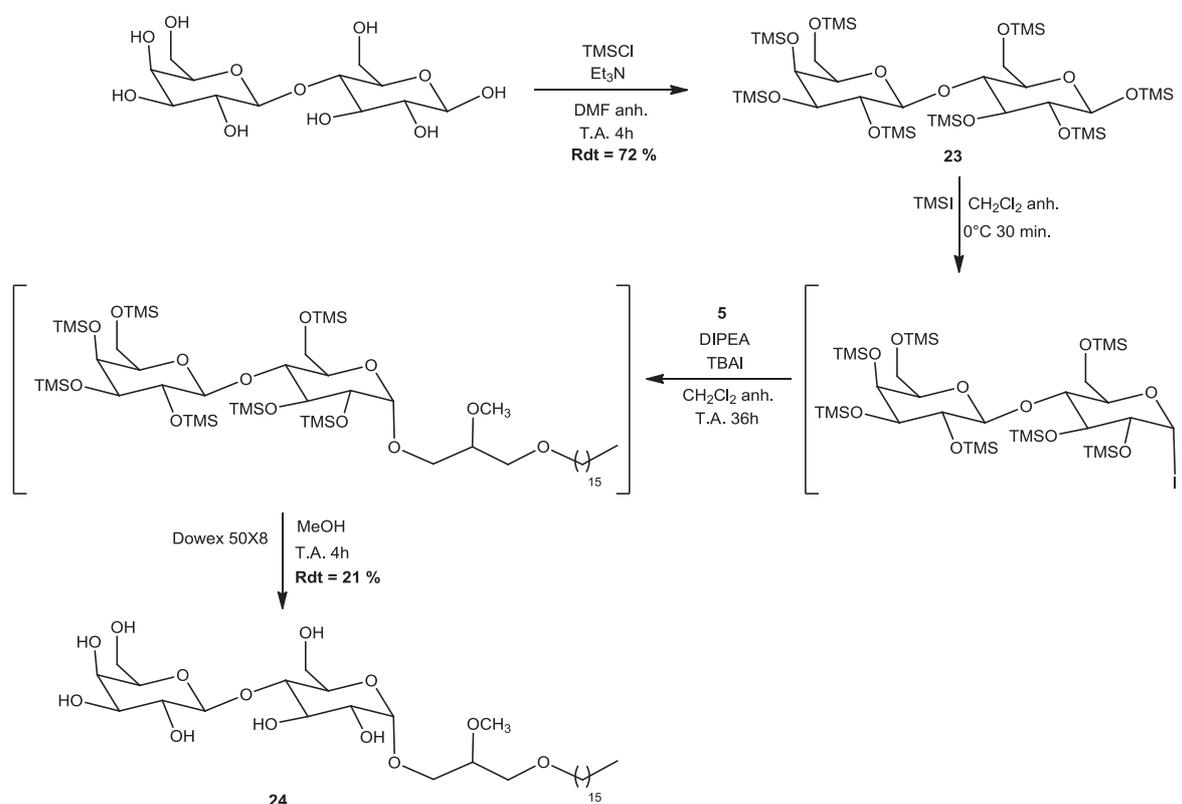


Figure 49 : Schéma de synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-4-O- β -D-galactopyranosyl- α -D-glucopyranoside **24**

Les différents produits obtenus ont été caractérisés par RMN ^1H , ^{13}C Jmod, ^{31}P et, si besoin est, par RMN 2D COSY, HMBC, HMQC, ainsi que par spectrométrie de masse MALDI TOF-TOF et infra-rouge.

⁹⁴ Bhat, A.S. ; Gervay-Hague, J. *Org. Lett.* **2001**, 3, 2081-2084

6 - Evaluations biologiques des composés 17 et 24

Les essais biologiques ont été réalisés dans l'unité INSERM U1069 par l'équipe du Pr. Bougnoux. Les différentes études ont été réalisées sur les lignées cellulaires embryonnaires de rein humain exprimant le canal SK3 : les HEK293T-SK3, et n'exprimant pas ce canal : les HEK293T. Le produit de référence utilisé lors de ces tests est l'ohmline. Les mesures de l'inhibition du courant du canal ont été réalisées en utilisant la technique du patch-clamp, la capacité à inhiber la migration des cellules dépendantes du canal SK3 a ensuite été étudiée. Enfin, la toxicité de nos composés a été évaluée en réalisant des essais au MTT. Les détails des expérimentations seront donnés dans la partie expérimentale.

6.1. Etude de l'efficacité d'inhibition du courant du canal SK3

Des études de patch-clamp ont été réalisées afin d'évaluer les effets de nos molécules sur l'inhibition du courant dû au canal SK3 d'une cellule. La technique du patch-clamp, ou électrophysiologie moléculaire, est la technique de référence pour l'étude électrophysiologique des canaux ioniques. Elle consiste en l'enregistrement de l'activité électrique d'un fragment de membrane cellulaire, ou d'une cellule entière. Ici, les expériences ont été menées sur des cellules entières (« whole-cell configuration »).

Ces études ont montré que l'amplitude du courant dû au canal SK3, mesurée à 0 mV, 3 minutes après l'application des produits à une concentration de 5 μM , est diminuée de 28 % pour le composé 17 ce qui constitue une capacité d'inhibition largement inférieure à celle de l'ohmline à 10 μM (73 %) mais proche de l'ohmline à 1 μM ²⁶. Nous pouvons également constater que l'application de 10 μM du composé 24 n'a aucune incidence sur l'amplitude du courant dû au canal SK3 (Tableau 1). Ces résultats tendent à montrer que la nature du disaccharide ainsi que l'anomérie jouent un rôle essentiel pour l'inhibition du courant dû au canal SK3.

| Composés | Inhibition du canal SK3 (%) |
|-------------------------|-----------------------------|
| Ohmline | 73 +/- 5 |
| 17 | 28 +/- 2 |
| 24 (α -ohmline) | 5 +/- 2 |

Tableau 1 : Action des analogues de l'édelfosine sur l'activité du canal SK3

6.2. Etudes de l'efficacité d'inhibition de la migration cellulaire

Après avoir étudié l'impact de nos composés sur le courant induit par les canaux SK3, il est intéressant d'étudier leur influence sur la migration des cellules exprimant, ou non, cette protéine. Pour ce faire, des cellules HEK293T (n'exprimant pas SK3) et HEK293T-SK3 (exprimant SK3) sont mises en culture sur une membrane poreuse en présence de nos produits. Le taux de cellules franchissant la membrane permet de déterminer l'incidence des composés sur la capacité qu'ont les cellules à migrer. Cette étude a été menée uniquement sur le composé **17**, le composé **24** n'ayant montré aucune action sur l'inhibition du courant dû au canal SK3.

Nous pouvons constater qu'après le traitement des cellules exprimant le canal SK3 par le composé **17** à 100 nM, il n'y a aucun effet sur la migration cellulaire. En revanche lors de l'application d'une dose à 300 nM il y a une diminution significative de la migration des HEK293T-SK3. Cette capacité à diminuer la migration cellulaire est plus faible que celle de l'ohmline (près de 50 % après l'application de 100 nM d'ohmline)⁹⁵ (Figure 50).

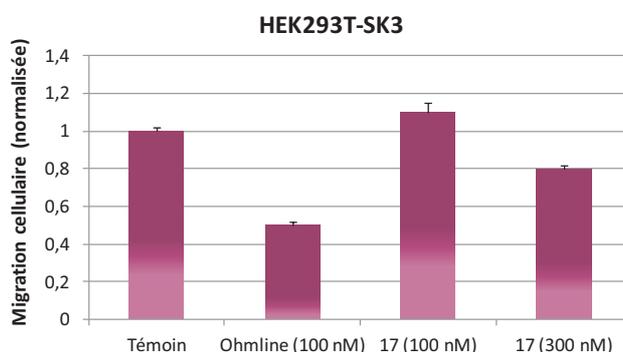


Figure 50 : Effet du composé **17** sur la migration de cellules exprimant le canal SK3

6.3. Etudes de la toxicité des analogues de l'édelfosine : essais au MTT

La toxicité de nos composés a été évaluée en se basant sur le test MTT. Il s'agit d'un test colorimétrique permettant de calculer le nombre de cellules viables après incubation avec la molécule testée (plus l'intensité est importante, plus il y a de cellules viables). La toxicité a été évaluée sur des doses de 1 μ M et 10 μ M après 48 heures d'incubation.

⁹⁵ Sevrain, C.M. ; Haelters, J.P. ; Chantome, A. ; Couthon-Gourves, H. ; Girault, A. ; Vandier, C. ; Jaffres, P.A. *MedChemComm* **2012**, 3, 1471-1478

Nous pouvons constater que le composé **17** induit une toxicité notable pour les doses à 10 μM alors qu'aucune toxicité n'a été détectée à 1 μM (Figure 51).

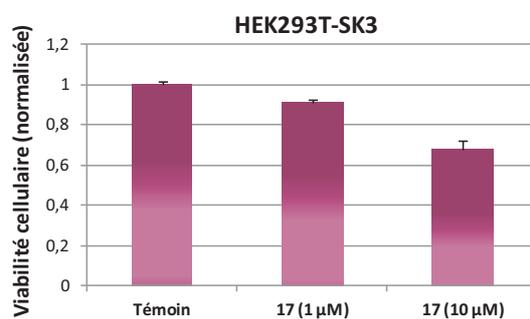


Figure 51 : Etude de la toxicité des composés

III - Conclusion

Afin d'obtenir des analogues de l'édelfosine moins toxiques mais toujours efficaces, nous nous sommes focalisés sur une famille de molécules membranaires : les digalactosyldiacylglycérols. La substitution de la tête phosphocholine de l'édelfosine par un motif digalactosidique n'est pas sans rappeler le phénomène biologique de substitution des phospholipides par des DGDG lors d'une carence en phosphate.

Nous avons, dans un premier temps, effectué la synthèse du digalactoside en suivant la voie « classique », c'est-à-dire en utilisant des groupements benzyles pour protéger les galactopyranoses. Cette méthode s'est révélée efficace mais nécessite de nombreuses étapes de protection/déprotection (8 étapes, rendement global de la synthèse : 5 %). Nous avons ensuite suivi une méthode utilisant une protection par des groupements triméthylsilyles. Cette dernière voie s'est avérée plus rapide et plus efficace que la précédente (5 étapes, rendement global de la synthèse : 25 %), ce qui constitue une alternative intéressante aux méthodes déjà décrites pour la synthèse d'oligosaccharides.

Afin de compléter les études menées, nous avons également réalisé la synthèse de l' α -ohmline en utilisant une protection par des groupements triméthylsilyles du lactose.

Les capacités inhibitrices de nos glyco-lipides **17** et **24** sur l'activité du canal SK3 ont, dans un premier temps, été évaluées par patch-clamp. Les études ont montré que le composé **17** inhibe le courant induit par le canal mais de manière moins efficace que l'ohmline, en revanche l' α -ohmline ne présente aucune activité sur le courant. Ceci laisse à penser que la configuration de la position anomérique joue un rôle clé dans l'action de nos molécules vis-à-vis du canal SK3. L'étude de la migration cellulaire a été réalisée uniquement avec le produit **17** et, là encore, nous avons pu observer une diminution de la migration cellulaire mais à moindre échelle que pour l'ohmline. Ces études nous ont permis de poursuivre l'enrichissement de notre pool d'inhibiteurs du canal potassique SK3 et de noter l'incidence de la nature du disaccharide employé sur son action vis-à-vis de la protéine en plus des constatations faites sur l'influence de l'anomérisation.

PARTIE EXPERIMENTALE

IV - Partie expérimentale

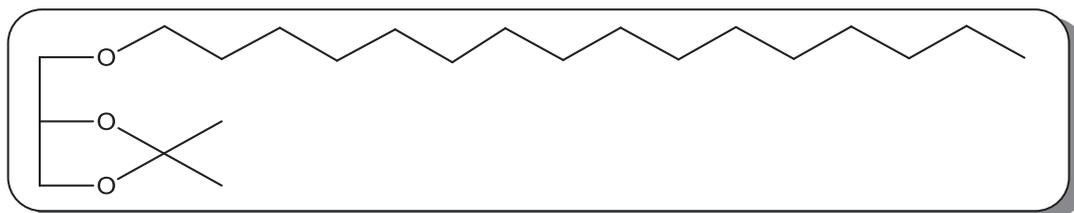
Solvants et réactifs (communs pour toutes les parties expérimentales de ce travail)

Les solvants sont séchés par un système de purification MBraun-SPS (DMF, THF, CH₃CN, CH₂Cl₂) ou distillés sur les desséchants appropriés. Les réactifs commerciaux sont utilisés tels quels hormis la pyridine, le PCl₃ et le TMSI qui sont préalablement distillés.

Analyses (commun pour toutes les parties expérimentales de ce travail)

Tous les composés sont caractérisés par spectroscopie RMN ¹H, ¹³C et ³¹P (spectromètres Bruker AC 300, Advance DRX 400 et Advance DRX 500). Les constantes de couplage J sont données en Hertz et les déplacements chimiques en partie-par-million (ppm). Les abréviations suivantes ont été utilisées : s pour singulet, d pour doublet, t pour triplet, q pour quadruplet, qt pour quintuplet, m pour multiplet, s large pour singulet large, dd pour doublet de doublet et ddd pour doublet de doublet de doublet. Si nécessaire, les spectres COSY, HMBC et HMQC ont été réalisés pour établir les structures. Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées par le Service Commun de Spectrométrie de Masse de Brest (Bruker Autoflex MALDI TOF-TOF III LRF200 CID) ou par le CRMPO de Rennes (MS/MS haute résolution Micromass ZABSpecTOF). Les analyses par spectrométrie infra-rouge ont été réalisées sur un Nicolet Nexus à transformée de Fourier balayant une fenêtre spectrale allant de 200 à 4000 cm⁻¹. Les points de fusion ont été obtenus avec un banc de Kofler et les pouvoirs rotatoires ont été mesurés avec un polarimètre JASCO P-1010 dans une cuve de 100 mm.

Synthèse du 4-[(hexadécyloxy)méthyl]-2,2-diméthyl-1,3-dioxolane 1⁷⁵



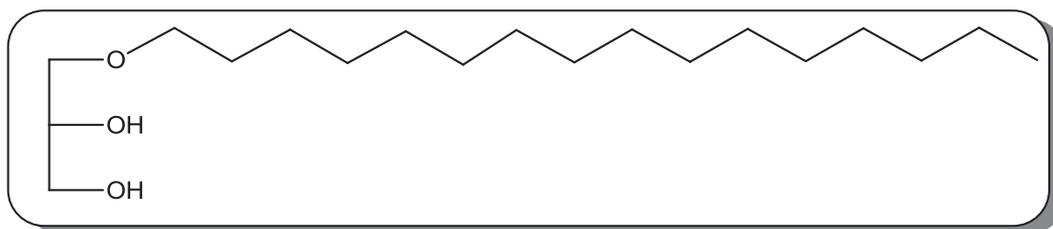
A une solution d'hydrure de sodium (7,92 g, 0,33 mol) dans du toluène anhydre (400 mL) est ajouté du 2,3-O-(2',2'-diméthyl-1',3'dioxolanyl)-glycérol (36,3 g, 275 mmol) au goutte-à-goutte. Le mélange est porté au reflux pendant 1 heure puis une solution de 1-bromohexadecane (84,0 mL, 275 mmol) est ajoutée au goutte-à-goutte. Le mélange est agité à température ambiante pendant 2 heures puis à reflux pendant 15 heures. Après avoir ajouté de l'eau (400 mL) au mélange, la phase aqueuse est extraite par 3 fois à l'éther diéthylique (100 mL). Les phases organiques combinées sont séchées sur MgSO₄ puis concentrées. Le liquide jaune obtenu est utilisé sans autre purification avec un rendement quantitatif.

Rf (acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 10)) : 0,80

RMN ¹H (400,045 MHz, CDCl₃) : 0,87 (t, 3H, ³J_{HH}=6,8, CH₃ chaîne grasse) ; 1,19-1,34 (m, 26H, CH₂ chaîne grasse) ; 1,35 (s, 3H, CH₃ acétal) ; 1,41 (s, 3H, CH₃ acétal) ; 1,55 (qt, 2H, ³J_{HH}=6,8, CH₂ β chaîne grasse) ; 3,38-3,52 (m, 4H, CH₂ α chaîne grasse et CH₂ sn-1) ; 3,71 (dd, 1H, ²J_{HH}=8,4, ³J_{HH}=6,4, H_a-CH sn-3) ; 4,04 (dd, 1H, ²J_{HH}=8,4, ³J_{HH}=6,4, H_b-CH sn-3) ; 4,25 (qt, 1H, ³J_{HH}=6,4, CH sn-2)

RMN ¹³C (100,602 MHz, CDCl₃) : 14,0 (CH₃ chaîne grasse) ; 22,6 (CH₂ chaîne grasse) ; 25,3 (CH₃) ; 26,0 (CH₂ chaîne grasse) ; 26,6 (CH₃) ; 29,3 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,4 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,5 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,6 (CH₂ chaîne grasse) ; 31,9 (CH₂ chaîne grasse) ; 66,8 (CH₂ sn-1 et sn-3) ; 71,7 (CH₂ α chaîne grasse) ; 74,7 (CH sn-2) ; 109,1 (C quaternaire acétal)

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-1,2-propanediol 2⁷⁵



A une solution d'acide chlorhydrique concentré (42,7 mL, 512 mmol) dans du méthanol (200 mL) est ajouté le composé **1** (95,1 g, 275 mmol) en solution dans du méthanol (200 mL). Le mélange est porté au reflux pendant 3 heures puis concentré. Le résidu est repris dans du chloroforme (300 mL) et la phase organique est lavée par de l'eau (100 mL). La phase aqueuse est extraite par 3 fois au chloroforme (150 mL). Les phases organiques combinées sont lavées par une solution de K_2CO_3 (1M), séchées sur $MgSO_4$ et concentrées. Le solide blanc obtenu est utilisé sans purification avec un rendement quantitatif.

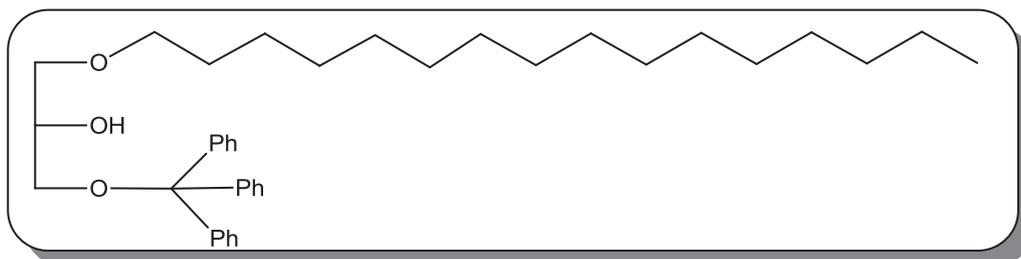
Rf (acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 10)) : 0,35

T_{fus} : 65°C

RMN ¹H (400,113 MHz, $CDCl_3$) : 0,87 (t, 3H, $^3J_{HH}=6,0$, CH_3 chaîne grasse) ; 1,20-1,38 (m, 26H, CH_2 chaîne grasse) ; 1,57 (qt, 2H, $^3J_{HH}=6,0$, CH_2 β chaîne grasse) ; 2,41 (s large, 1H, OH) ; 2,79 (s large, 1H, OH) ; 3,44-3,54 (m, 4H, CH_2 α chaîne grasse + CH_2 sn-3) ; 3,66 (ddd, 2H, $^2J_{HH}=32,0$, $^3J_{HH}=10,0$, $^3J_{HH}=8,0$, CH_2 sn-1) ; 3,85-3,88 (m, 1H, CH sn-2)

RMN ¹³C (400,113 MHz, $CDCl_3$) : 14,1 (CH_3 chaîne grasse) ; 22,7 (CH_2 chaîne grasse) ; 26,1 (CH_2 chaîne grasse) ; 29,3 (CH_2 chaîne grasse) ; 29,4 (CH_2 chaîne grasse) ; 29,7 (CH_2 chaîne grasse) ; 31,9 (CH_2 chaîne grasse) ; 31,8 (CH_2 chaîne grasse) ; 64,2 (CH_2 sn-3) ; 70,5 (CH sn-2) ; 71,8 (CH_2 α chaîne grasse) ; 72,4 (CH_2 sn-1)

Synthèse du 1-(hexadécyloxy)-3-(trityloxy)-2-propanol 3⁷⁶



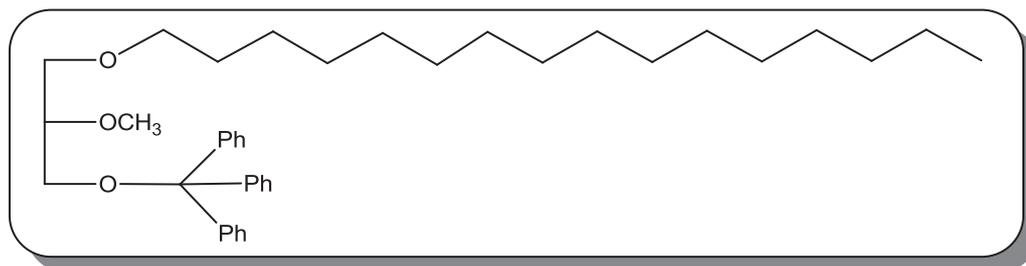
A une solution de **2** (74,7 g, 237 mmol) dans du toluène anhydre (200 mL) est ajouté du chlorure de trityle (79,3 g, 284 mmol) puis de la triéthylamine (80,4 mL, 569 mmol) au goutte-à-goutte. Le mélange est porté au reflux pendant 15 heures puis il est filtré et concentré. L'huile obtenue est reprise dans l'éther de pétrole (200 mL) et le mélange est filtré et concentré. L'huile brune obtenue avec un rendement quantitatif est utilisée sans purification.

Rf (acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 10)) : 0,55

RMN ¹H (400,113 MHz, CDCl₃) : 0,89 (t, 3H, ³J_{HH}=6,8, CH₃ chaîne grasse) ; 1,23-1,35 (m, 26H, CH₂) ; 1,54 (qt, 2H, ³J_{HH}=6,8, CH₂ β chaîne grasse) ; 2,37 (d, 1H, ³J_{HH}=4,8, OH) ; 3,20 (qt, 2H, ³J_{HH}=4,0, CH₂ sn-3) ; 3,42-3,56 (m, 4H, CH₂ α chaîne grasse et CH₂ sn-1) ; 3,96 (qt, 1H, ³J_{HH}=4,0, CH sn-2) ; 7,20-7,49 (m, 15H, CH (Ph))

RMN ¹³C (75,478 MHz, CDCl₃) : 14,5 (CH₃ chaîne grasse) ; 23,1 (CH₂ chaîne grasse) ; 26,5 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,8 (CH₂ chaîne grasse) ; 30,1 (CH₂ chaîne grasse) ; 32,3 (CH₂ chaîne grasse) ; 65,0 (CH₂ α chaîne grasse) ; 70,2 (CH sn-2) ; 72,0 (CH₂ sn-3) ; 72,9 (CH₂ sn-1) ; 92,5 (OC-(Ph)₃) ; 127,4 (CH (Ph)) ; 128,3 (CH (Ph)) ; 129,0 (CH (Ph)) ; 144,3 (C_{ipso} (Ph))

Synthèse du [3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropoxy](diphényl)méthyl]benzène 4⁷⁶



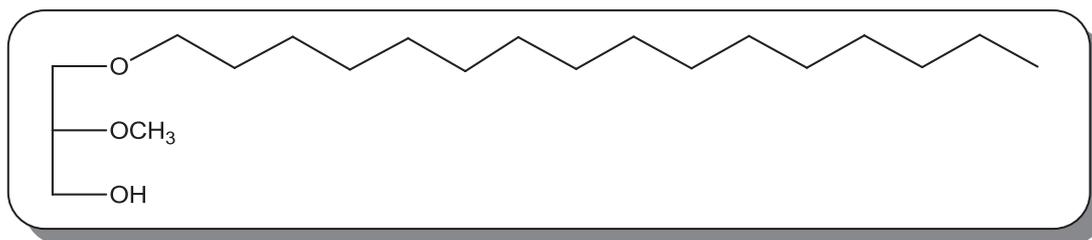
A une solution d'hydrure de sodium (1,10 g, 45,2 mmol) dans du THF anhydre (100 mL) est ajouté le composé **3** (21,0 g, 37,7 mmol) en solution dans du THF anhydre (50 mL) au goutte-à-goutte. Le mélange est agité 2 heures à température ambiante puis de l'iodure de méthyle (4,7 mL, 75,4 mmol) en solution dans du THF anhydre (50 mL) est ajouté au goutte-à-goutte et le mélange est porté au reflux pendant 3 heures. La solution est ramenée à température ambiante et est laissée sous agitation pendant 15 heures. Le mélange est concentré. L'huile obtenue est reprise dans l'eau (100 mL) et elle est extraite par 3 fois à l'éther diéthylique (50 mL). La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée sur coton et concentrée pour donner une cire brune avec un rendement quantitatif qui sera utilisée sans autre purification.

Rf (acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 10)) : 0,82

RMN ¹H (400,113 MHz, $CDCl_3$) : 0,87 (t, 3H, $^3J_{HH}=8,0$, CH_3 chaine grasse) ; 1,18-1,33 (m, 26H, CH_2 chaine grasse) ; 1,52-1,59 (m, 2H, CH_2 β chaine grasse) ; 3,18 (t, 2H, $^3J_{HH}=6,0$, CH_2 α chaine grasse) ; 3,38-3,42 (m, 5H, OCH_3 et CH_2 $sn-3$) ; 3,46-3,57 (m, 3H, CH_2 $sn-1$ et CH $sn-2$) ; 7,17-7,46 (m, 15H, CH (Ph))

RMN ¹³C (75,478 MHz, $CDCl_3$) : 14,6 (CH_3 chaine grasse) ; 23,1 (CH_2 chaine grasse) ; 26,5 (CH_2 chaine grasse) ; 29,3 (CH_2 chaine grasse) ; 29,8 (CH_2 chaine grasse) ; 30,1 (CH_2 chaine grasse) ; 32,4 (CH_2 chaine grasse) ; 58,5 (OCH_3) ; 63,3 (CH_2 α chaine grasse) ; 71,3 (CH_2 $sn-3$ glycérol) ; 72,1 (CH_2 $sn-1$) ; 80,3 (CH $sn-2$) ; 87,0 ($OC-(Ph)_3$) ; 127,2 (CH (Ph)) ; 128,1 (CH (Ph)) ; 129,3 (CH (Ph)) ; 144,5 (C_{ipso} (Ph))

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxy-1-propanol ⁷⁶



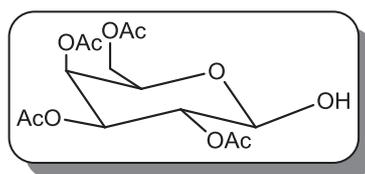
A un mélange de MeOH/CHCl₃ (1 : 1) (150 mL) est ajouté de l'acide chlorhydrique concentré (1,84 mL, 22,1 mmol). Le mélange est refroidi à 0°C et **4** (12,6 g, 22,1 mmol) en solution dans un mélange MeOH/CHCl₃ (1 : 1) (150 mL) est ajouté au goutte-à-goutte. Le mélange est agité à froid pendant 15 heures puis une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ (50 mL) est ajoutée et le mélange est agité pendant 15 minutes à température ambiante. La phase aqueuse est extraite par 3 fois au CHCl₃ (150 mL) puis la phase organique est lavée 3 fois par une solution de NaCl saturée (50 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée sur coton et concentrée. L'huile brune obtenue est purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 5)) pour donner une cire beige avec un rendement de 52 %.

Rf (acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 5)) : 0,16

RMN ¹H (400,092 MHz, CDCl₃) : 0,88 (t, 3H, ³J_{HH}=7,0, CH₃ chaîne grasse) ; 1,24-1,40 (m, 26H, CH₂ chaîne grasse) ; 1,56 (qt, 2H, ³J_{HH}=7,0, CH₂ β chaîne grasse) ; 2,17 (s large, 1H, OH) ; 3,40-3,48 (m, 3H, CH₂ α chaîne grasse + CH *sn*-2) ; 3,48 (s, 3H, OCH₃) ; 3,50-3,58 (m, 2H CH₂ *sn*-1) ; 3,62-3,77 (m, 2H, CH₂ *sn*-3)

RMN ¹³C (75,478 MHz, CDCl₃) : 14,4 (CH₃ chaîne grasse) ; 21,7 (CH₂ chaîne grasse) ; 23,0 (CH₂ chaîne grasse) ; 26,4 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,7 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,8 (CH₂ chaîne grasse) ; 30,0 (CH₂ chaîne grasse) ; 32,2 (CH₂ chaîne grasse) ; 58,0 (OCH₃) ; 62,5 (CH₂ α chaîne grasse) ; 70,7 (CH₂ *sn*-3) ; 72,1 (CH₂ *sn*-1) ; 80,6 (CH *sn*-2)

Synthèse du 2,3,4,6-tetra-O-acétyl-β-D-galactopyranose **6**⁷⁷



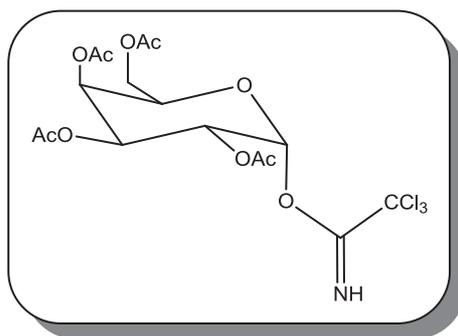
A une solution de pentaacétate de galactose (15,0 g, 38,4 mmol) dans du DMF anhydre (60 mL) est ajouté de l'acétate d'ammonium (5,9 g, 76,9 mmol). La solution est agitée pendant 48 heures à température ambiante puis concentrée. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/éther de pétrole (2 : 3)) et le composé **6** est obtenu sous forme d'une huile incolore avec un rendement de 88 %.

R_f (acétate d'éthyle/éther de pétrole (2 : 3)) : 0,20

RMN ¹H (400,113 MHz, CDCl₃) : 1,96-2,17 (m, 12H, CH₃ acétate) ; 4,06-4,11 (m, 2H, H₅ + H_{6a}) ; 4,45 (t, 1H, ³J_{HH}=6,0, H_{6b}) ; 5,05-5,15 (m, 2H, H₂ + H₄) ; 5,39-5,50 (m, 2H, H₁ + H₃)

RMN ¹³C (75,478 MHz, CDCl₃) : 20,8 (CH₃) ; 62,0 (C₆) ; 67,6 (C₄) ; 68,0 (C₅) ; 68,7 (C₃) ; 71,0 (C₂) ; 90,7 (C₁) ; 170,6 (CO)

Synthèse du 2,3,4,6-tetra-O-acétyl-1-O-(2,2,2-trichloroacétimidoyl) α -D-galactopyranose 7⁷⁸



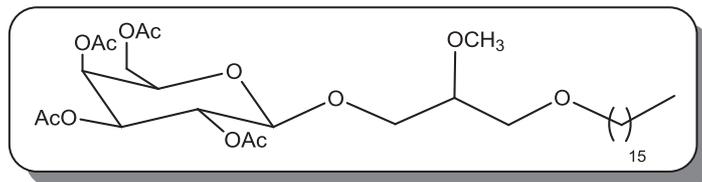
Le composé **6** (11,3 g, 32,4 mmol) est dissous dans du CH_2Cl_2 anhydre (100 mL) et du tamis moléculaire 4 Å est ajouté au milieu. La solution est laissée sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante puis du trichloroacétonitrile (16,3 mL, 162 mmol) est ajouté au goutte-à-goutte suivi par du carbonate de césium (11,6 g, 35,7 mmol). Le mélange est agité pendant 3 heures à température ambiante puis il est filtré sur célite et concentré. Le produit est purifié par filtration sur gel de silice (éluant : acétate d'éthyle pur) et le produit **7** est obtenu sous la forme d'un solide beige avec un rendement de 83 %.

Rf (acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 2)) : 0,22

RMN ^1H (400,045 MHz, CDCl_3) : 1,98-2,17 (m, 12H, CH_3 acétate) ; 4,07-4,18 (m, 2H, H_6) ; 4,42 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}}=6,0$, H_5) ; 5,36-5,41 (m, 2H, $H_2 + H_3$) ; 5,55 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}}=4,0$, H_4) ; 6,59 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}}=2,4$, H_1) ; 8,66 (s large, 1H, NH)

RMN ^{13}C (75,478 MHz, CDCl_3) : 20,4 (CH_3) ; 61,1 (C_6) ; 66,7 (C_4) ; 67,2 (C_5) ; 67,3 (C_2) ; 68,8 (C_3) ; 91,1 ($\text{C}-\text{Cl}_3$) ; 93,3 (C_1) ; 160,8 ($\text{C}=\text{NH}$) ; 169,8 (CO) ; 169,9 (CO) ; 170,2 (CO)

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-2,3,4,6-tetra-O-acétyl-β-D-galactopyranoside 8⁶⁶



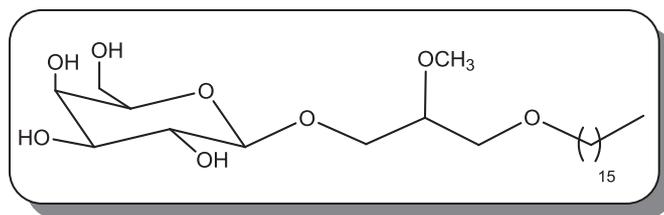
A une solution de **7** (5,00 g, 10,2 mmol) dans du CH₂Cl₂ anhydre (25 mL) sur tamis moléculaire 4 Å est ajouté le composé **5** (3,20 g, 9,68 mmol). Le milieu est agité 1 heure à température ambiante. La solution est amenée à 0°C et le BF₃.Et₂O (12,5 mL, 96,8 mmol) est ajouté au goutte-à-goutte. Le milieu est ramené à température ambiante et est agité pendant 24 heures. La solution est diluée par ajout de CH₂Cl₂ (25 mL) et lavée par une solution aqueuse de NaHCO₃ saturée (20 mL) puis de NaCl saturée (20 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 2)) et le composé pur est obtenu sous la forme d'une cire jaune pâle avec un rendement de 53 %.

Rf (acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 2)) : 0,32

RMN ¹H (400,045 MHz, CDCl₃) : 0,86 (t, 3H, ³J_{HH}=8,5, CH₃ chaîne grasse) ; 1,20-1,35 (m, 26H, CH₂ chaîne grasse) ; 1,52-1,57 (m, 2H, CH₂ β chaîne grasse) ; 1,97-2,16 (m, 12H, CH₃ (OAc)) ; 3,38-3,64 (m, 7H, CH₂ sn-1 + CH₂ sn-3 + CH sn-2 + CH₂ α chaîne grasse) ; 3,41 (s, 3H, OCH₃) ; 3,89 (t, 1H, ³J_{HH}=8,0, H₅) ; 4,14 (t, 2H, ³J_{HH}=8,0, H₆) ; 4,51 (t, 1H, ³J_{HH}=10,0, H₁) ; 5,00 (dd, 1H, ³J_{HH}=4,0, ³J_{HH}=13,0, H₃) ; 5,19 (q, 1H, ³J_{HH}=9,2, H₂) ; 5,37 (d, 1H, ³J_{HH}=4,0, H₄)

RMN ¹³C (125,816 MHz, CDCl₃) : 14,4 (CH₃ chaîne grasse) ; 20,7 (CH₃ (OAc)) ; 22,7 (CH₂ chaîne grasse) ; 26,1 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,4 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,5 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,6 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,7 (CH₂ chaîne grasse) ; 31,9 (CH₂ chaîne grasse) ; 58,3 (OCH₃) ; 61,3 (C₆) ; 67,1 (C₄) ; 68,9 (C₂) ; 69,9 (CH₂ sn-3) ; 70,5 (CH₂ sn-1) ; 70,6 (C₅) ; 70,7 (C₃) ; 71,9 (CH₂ α chaîne grasse) ; 79,0 (CH sn-2) ; 101,7 (C₁) ; 170,4 (CO)

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-β-D-galactopyranoside **9**⁸⁰



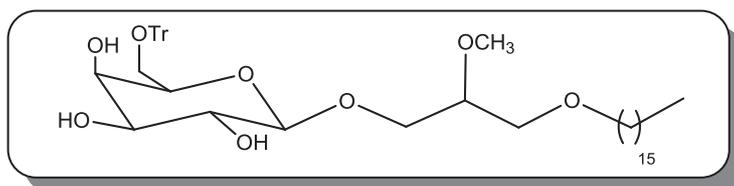
A une solution de **8** (1,36 g, 2,06 mmol) dans du méthanol anhydre (10 mL) est ajouté du carbonate de potassium (142 mg, 1,03 mmol). La solution est agitée 15 heures à température ambiante et une pointe de spatule d'amberlite IR-120H est ajoutée. Le mélange est agité 30 minutes à température ambiante, filtré sur célite, concentré et purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH (9 : 1)). Le produit pur est obtenu sous la forme d'une mousse blanche avec un rendement de 86 %.

Rf (CH₂Cl₂/MeOH (9 : 1)) : 0,64

RMN ¹H (300,131 MHz, CDCl₃) : 0,87 (t, 3H, ³J_{HH}=8,5, CH₃ chaîne grasse) ; 1,22-1,40 (m, 26H, CH₂ chaîne grasse) ; 1,53-1,57 (m, 2H, CH₂ β chaîne grasse) ; 3,41-3,54 (m, 2H, CH₂ α chaîne grasse) ; 3,47 (s, 3H, OCH₃) ; 3,54-3,93 (m, 9H, CH₂ sn-1 + CH₂ sn-3 + CH sn-2 + H₃ + H₅ + H₆) ; 3,98-4,10 (m, 2H, H₂ + H₄) ; 4,25-4,29 (m, 1H, H₁)

RMN ¹³C (100,603 MHz, CDCl₃) : 13,8 (s, CH₃ chaîne grasse) ; 22,7 (CH₂ chaîne grasse) ; 26,1 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,4 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,5 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,7 (CH₂ chaîne grasse) ; 31,9 (CH₂ chaîne grasse) ; 57,8 (OCH₃) ; 61,3 (C₆) ; 68,8 (C₄) ; 69,6 (CH₂ sn-3) ; 70,1 (CH₂ sn-1) ; 71,2 (C₂) ; 71,9 (CH₂ α chaîne grasse) ; 73,6 (C₃) ; 74,5 (C₅) ; 79,4 (CH sn-2) ; 104,0 (C₁)

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-6-O-trityl-β-D-galactopyranoside 10⁸¹



A une solution de **9** (1,00 g, 2,03 mmol) dans du CH_2Cl_2 anhydre (10 mL) est ajouté du chlorure de trityle (1,40 g, 5,07 mmol) et du DABCO (569 mg, 5,07 mmol). Le mélange est agité à température ambiante pendant 2 heures. Le produit est filtré, concentré puis purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle). Une huile incolore est obtenue avec un rendement de 74 %.

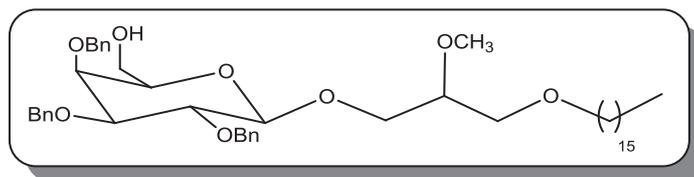
Rf (acétate d'éthyle/éther de pétrole (2 : 1)) : 0,27

RMN ¹H (300,131 MHz, CDCl_3) : 0,88 (t, 3H, $^3J_{\text{HH}}=7,5$, CH_3 chaîne grasse) ; 1,24-1,40 (m, 26H, CH_2 chaîne grasse) ; 1,51-1,60 (m, 2H, CH_2 β chaîne grasse) ; 3,34-3,71 (m, 14H, CH_2 α chaîne grasse + OCH_3 + CH_2 sn-1 et sn-3 + CH sn-2 + H_3 + H_5 + H_6) ; 3,93-4,02 (m, 2H, H_2 + H_4) ; 4,21-4,25 (m, 1H, H_1) ; 7,20-7,44 (m, 15H, CH (Ph))

RMN ¹³C (75,475 MHz, CDCl_3) : 14,1 (s, CH_3 chaîne grasse) ; 22,7 (CH_2 chaîne grasse) ; 26,1 (CH_2 chaîne grasse) ; 29,4 (CH_2 chaîne grasse) ; 29,5 (CH_2 chaîne grasse) ; 29,7 (CH_2 chaîne grasse) ; 31,9 (CH_2 chaîne grasse) ; 57,9 (OCH_3) ; 62,6 (C_6) ; 69,0 (C_4) ; 69,2 (CH_2 sn-3) ; 70,2 (CH_2 sn-1) ; 71,7 (C_2) ; 71,9 (CH_2 α chaîne grasse) ; 73,6 (C_3) ; 73,8 (C_5) ; 79,3 (CH sn-2) ; 86,9 (O-C-(Ph)₃) ; 103,7 (C_1) ; 127,1 (CH_{para}) ; 127,9 ($\text{CH}_{\text{méta}}$) ; 128,7 (CH_{ortho}) ; 143,7 (C_{ipso})

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-2,3,4-tri-O-benzyl-β-D-galactopyranoside

11⁸²



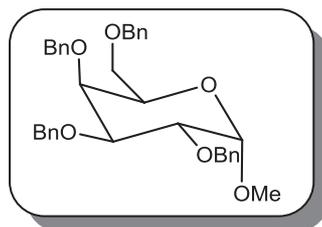
A une solution d'hydrure de sodium (162 mg, 6,73 mmol) dans du DMF anhydre (20 mL) est ajouté le produit **10** (1,00 g, 1,50 mmol). Le mélange est agité à température ambiante pendant 2 heures puis il est amené à 0°C avant l'ajout de bromure de benzyle (0,81 mL, 6,73 mmol). Le mélange est agité à température ambiante pendant 15 heures puis quelques millilitres de MeOH sont ajoutés. La solution est diluée dans de l'éther diéthylique (30 mL) et lavée à l'eau (15 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. L'huile obtenue est reprise dans un mélange CH₂Cl₂/MeOH (1 : 2) (30 mL) et de l'acide paratoluènesulfonique (36 mg, 0,21 mmol) est ajouté. Le mélange est agité pendant 20 heures à température ambiante puis il est concentré. L'huile obtenue est reprise dans du CH₂Cl₂ (30 mL) et lavée par deux fois à l'eau (10 mL), puis avec une solution à 10 % de Na₂CO₃ (10 mL) et par une solution saturée en NaCl (10 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. Le produit est chromatographié sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 2)) pour donner une poudre blanche avec un rendement de 67 %.

Rf (acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 5)) : 0,21

RMN ¹H (400,012 MHz, CDCl₃) : 0,89 (t, 3H, ³J_{HH}=7,0, CH₃) ; 1,22-1,32 (m, 26H, CH₂ chaîne grasse) ; 1,53-1,56 (m, 2H, CH₂ β chaîne grasse) ; 3,36-3,42 (m, 3H, CH₂ α chaîne grasse + H₅) ; 3,42 (s, 3H, OCH₃) ; 3,44-3,67 (m, 6H, H_a-CH sn-1 + CH₂ sn-3 + CH sn-2 + H₃ + H_{6a}) ; 3,75-3,79 (m, 2H, H₄ + H_{6b}) ; 3,83-3,87 (m, 1H, H₂) ; 3,97-4,10 (m, 1H, H_b-CH sn-1) ; 4,39 (t, 1H, ³J_{HH}=7,5, H₁) ; 4,65-4,98 (m, 6H, CH₂-Ph) ; 7,29-7,38 (m, 15H, CH (Ph))

RMN ¹³C (100,592 MHz, CDCl₃) : 14,2 (CH₃ chaîne grasse) ; 22,7 (CH₂ chaîne grasse) ; 26,1 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,4 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,5 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,7 (CH₂ chaîne grasse) ; 32,0 (CH₂ chaîne grasse) ; 58,0 (OCH₃) ; 62,1 (C₆) ; 68,7 (CH₂ sn-3) ; 70,3 (CH₂ sn-1) ; 71,8 (CH₂ α chaîne grasse) ; 73,0 (C₄) ; 73,5 (CH₂-Ph) ; 74,2 (CH₂-Ph) ; 74,7 (C₅) ; 75,1 (CH₂-Ph) ; 79,3 (C₂) ; 79,6 (CH sn-2) ; 82,3 (C₃) ; 104,4 (C₁) ; 127,4 (CH (Ph)) ; 127,9 (CH (Ph)) ; 128,5 (CH (Ph)) ; 129,1 (CH (Ph)) ; 138,3 (C_{ipso}) ; 138,5 (C_{ipso}) ; 138,7 (C_{ipso}) ; 138,8 (C_{ipso})

Synthèse du méthyl-2,3,4,6-tetra-O-benzyl- α -D-galactopyranoside 12⁸⁷



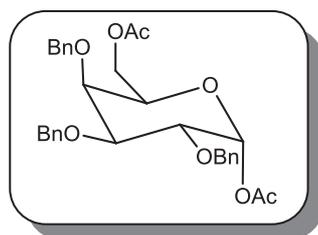
A une solution d'hydrure de sodium (2,23 g, 93,0 mmol) dans du DMF anhydre (60 mL) est ajouté du méthyl- α -D-galactopyranose (3,00 g, 15,0 mmol). Le mélange est agité à température ambiante pendant 30 minutes à 0°C avant l'ajout de bromure de benzyle (9,2 mL, 77,0 mmol). Le mélange est agité à 0°C pendant 2 heures puis pendant 15 heures à température ambiante puis l'excès d'hydrure est neutralisé par un ajout de méthanol. La solution est diluée dans de l'éther diéthylique (200 mL) et lavée à l'eau (150 mL). La phase aqueuse est extraite par deux fois à l'éther diéthylique (100 mL) puis la phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 4)) pour donner une huile incolore avec un rendement de 87 %.

Rf (acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 4)) : 0,30

RMN ¹H (400,012 MHz, CDCl₃) : 3,40 (s, 3H, OCH₃) ; 3,55 (d, 2H, ³J_{HH}=6,4, H₆) ; 3,92-4,07 (m, 4H, H₂ + H₃ + H₄ + H₅) ; 4,41-4,99 (m, 8H, CH₂-Ph) ; 4,72-4,73 (m, 1H, H₁) ; 7,26-7,44 (m, 20H, CH (Ph))

RMN ¹³C (125,816 MHz, CDCl₃) : 55,4 (CH₃) ; 69,1 (C₆) ; 69,3 (C₅) ; 73,3 (CH₂-Ph) ; 73,5 (CH₂-Ph) ; 73,6 (CH₂-Ph) ; 74,8 (CH₂-Ph) ; 75,2 (C₄) ; 76,5 (C₃) ; 79,1 (C₂) ; 98,9 (C₁) ; 126,8 (CH (Ph)) ; 127,2 (CH (Ph)) ; 127,6 (CH (Ph)) ; 128,4 (CH (Ph)) ; 138,1 (C_{ipso}) ; 138,4 (C_{ipso}) ; 138,5 (C_{ipso})

Synthèse du 1,6-di-O-acétyl-2,3,4,-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranose 13⁸⁸



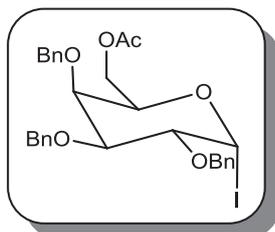
A une solution de **19** (5,86 g, 10,6 mmol) dans un mélange acide acétique/anhydride acétique (1 : 1) (70 mL) à 0°C est ajouté, au goutte-à-goutte, de l'acide sulfurique concentré (1,3 mL, 23,4 mmol). Le mélange est agité à 0°C pendant 5 heures puis il est lavé à froid par une solution saturée de NaHCO₃ (60 mL) puis par de l'eau (30 mL). La phase aqueuse est extraite au CH₂Cl₂ (100 mL) puis la phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 4)) et le composé pur est obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 64 %.

Rf (acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 3)) : 0,14

RMN ¹H (400,012 MHz, CDCl₃) : 1,99 (s, 3H, CH₃) ; 2,13 (s, 3H, CH₃) ; 3,71-4,20 (m, 6H, H₂ + H₃ + H₄ + H₅ + H₆) ; 4,64-5,02 (m, 6H, CH₂-Ph) ; 6,40-6,46 (m, 1H, H₁) ; 7,26-7,41 (m, 15H, CH(Ph))

RMN ¹³C (75,475 MHz, CDCl₃) : 20,8 (OCH₃) ; 21,1 (OCH₃) ; 63,1 (C₆) ; 70,8 (C₅) ; 73,4 (CH₂-Ph) ; 74,2 (C₄) ; 74,7 (CH₂-Ph) ; 75,4 (C₂) ; 78,6 (C₃) ; 90,7 (C₁) ; 127,4 (CH (Ph)) ; 127,7 (CH (Ph)) ; 127,8 (CH (Ph)) ; 128,1 (CH (Ph)) ; 128,4 (CH (Ph)) ; 137,9 (C_{ipso}) ; 138,0 (C_{ipso}) ; 138,5 (C_{ipso}) ; 169,4 (CO) ; 170,6 (CO)

Synthèse du 6-O-acétyl-2,3,4-tri-O-benzyl-1-iodo- α -D-galactopyranose 14⁸⁶

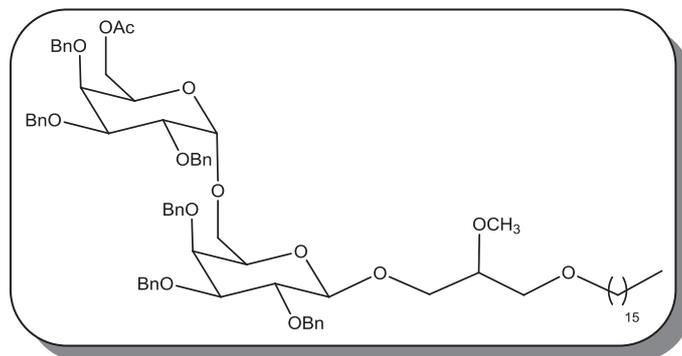


A une solution de **13** (700 mg, 1,31 mmol) dans du CH_2Cl_2 anhydre (4 mL) sous argon est ajouté du TMSI (178 μL , 1,31 mmol) à 0°C . Le mélange est agité pendant 30 minutes puis quelques millilitres de toluène distillé sont ajoutés et le mélange est concentré à 0°C . Les azéotropes au toluène sont poursuivis jusqu'à disparition du signal du TMSOAc en RMN ^1H . Le produit est concentré et utilisé sans autre purification.

Rf (acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 5)) : 0,47

RMN ^1H (400,012 MHz, CDCl_3) : 2,23 (s, 3H, CH_3) ; 3,48 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}}=9,8$, $^3J_{\text{HH}}=4,0$, H_2) ; 4,07-4,12 (m, 1H, H_3) ; 4,15-4,22 (m, 1H, H_4) ; 4,35-4,50 (m, 3H, $H_5 + H_6$) ; 4,80-5,19 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$) ; 7,12 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}}=3,7$, H_1) ; 7,34-7,57 (m, 15H, CH (Ph))

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-6-O-(6-O-acétyl-2,3,4-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-2,3,4-tri-O-benzyl- β -D-galactopyranoside 15⁸⁶



A une solution de **14** (170 mg, 0,22 mmol) dans du benzène distillé (3 mL) est ajouté du TBAI (411 mg, 1,11 mmol), de la DIPEA (72 mg, 0,56 mmol) et du tamis moléculaire 4 Å. Le mélange est agité pendant 30 minutes à température ambiante. Le composé **14** (154 mg, 0,67 mmol) est ajouté et le mélange est porté au reflux pendant 3 heures. Le mélange est filtré, concentré et purifié par chromatographie en mode flash (éluant : acétate d'éthyle/éther de pétrole) pour donner une huile incolore avec un rendement de 65 %.

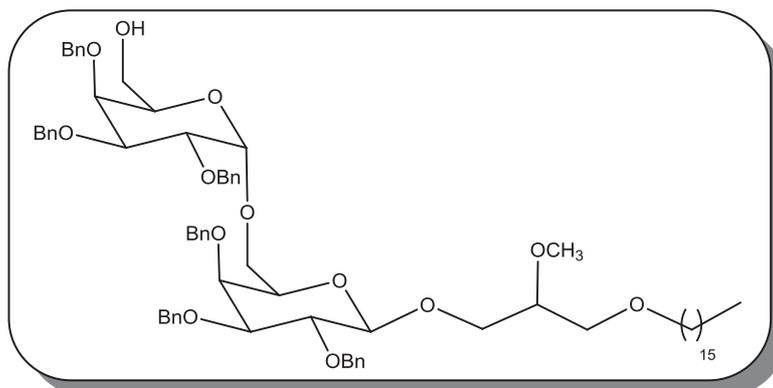
Rf (acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 5)) : 0,47

RMN ¹H (400,012 MHz, CDCl₃) : 0,90 (t, 3H, ³J_{HH}=7,0, CH₃) ; 1,22-1,30 (m, 26H, CH₂ chaîne grasse) ; 1,52-1,63 (m, 2H, CH₂ β chaîne grasse) ; 1,95 (s, 3H, OCH₃) ; 3,39-3,45 (m, 2H, CH₂ α chaîne grasse) ; 3,43 (s, 3H, OCH₃) ; 3,53-3,61 (m, 6H, CH₂ *sn*-1 + CH₂ *sn*-3 + CH *sn*-2 + H₅) ; 3,75-4,14 (m, 11H, H₂ + H₃ + H₄ + H₆ + H_{2'} + H_{3'} + H_{4'} + H_{5'} + H_{6'}) ; 4,39 (t, 1H, ³J_{HH}=7,5, H₁) ; 4,61-4,96 (m, 13H, CH₂-Ph + H_{1'}) ; 7,25-7,40 (m, 30H, CH (Ph))

RMN ¹³C (75,475 MHz, CDCl₃) : 14,1 (CH₃ chaîne grasse) ; 20,8 (OCH₃) ; 22,7 (CH₂ chaîne grasse) ; 26,1 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,4 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,5 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,7 (CH₂ chaîne grasse) ; 31,9 (CH₂ chaîne grasse) ; 58,1 (OCH₃) ; 63,4 (C_{6'}) ; 66,9 (C₆) ; 68,6 (C_{5'}) ; 69,5 (CH₂ *sn*-3) ; 70,6 (CH₂ *sn*-1) ; 71,8 (CH₂ α chaîne grasse) ; 73,0 (C_{4'}) ; 73,2 (CH₂-Ph) ; 73,6 (CH₂-Ph) ; 74,0 (C₄) ; 74,4 (C_{2'}) ; 74,5 (CH₂-Ph) ; 75,0 (CH₂-Ph) ; 76,2 (C₅) ; 79,1 (C₂) ; 79,3 (C_{3'}) ; 79,4 (CH *sn*-2) ; 82,1 (C₃) ; 98,1 (C_{1'}) ; 104,2 (C₁) ; 127,4 (CH (Ph)) ; 127,5 (CH (Ph)) ; 127,6 (CH (Ph)) ; 127,8 (CH (Ph)) ; 128,0 (CH (Ph)) ; 128,3 (CH (Ph)) ; 128,4 (CH (Ph)) ; 138,2 (C_{ipso}) ; 138,7 (C_{ipso}) ; 170,5 (CO)

Masse (MALDI-TOF) : m/z calculé pour C₇₆H₁₀₀O₁₄ (M+Na) 1259,701, trouvé 1259,698

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-2,3,4-tri-O-benzyl-6-O-(2,3,4-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)- β -D-galactopyranoside 16⁸⁰



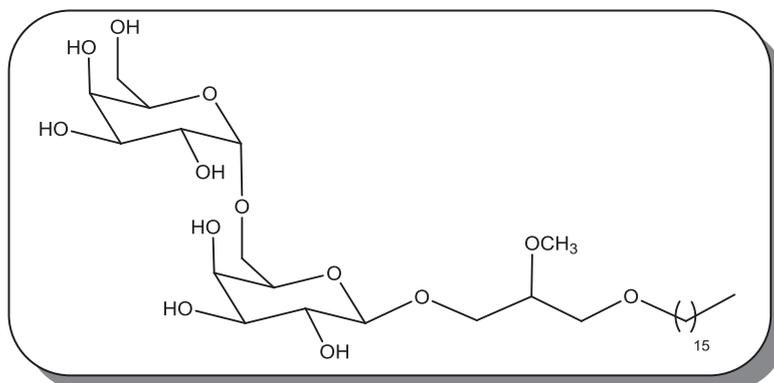
A une solution de **15** (180 mg, 0,15 mmol) dissous dans du méthanol (10 mL) est ajouté du carbonate de potassium (10 mg, 0,08 mmol), la solution est agitée 2 heures à température ambiante. Une pointe de spatule d'amberlite IR120-H est ajoutée au milieu qui est agité 30 minutes à température ambiante. La solution est filtrée sur célite et concentrée. Le produit est purifié par chromatographie en mode flash (éluant : acétate d'éthyle/hexane) pour donner une huile incolore avec un rendement de 47 %.

Rf (acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 2)) : 0,42

RMN ¹H (400,012 MHz, CDCl₃): 0,89 (t, 3H, ³J_{HH}=7,0, CH₃) ; 1,22-1,35 (m, 26H, CH₂ chaîne grasse) ; 1,52-1,62 (m, 2H, CH₂ β chaîne grasse) ; 1,95 (s, 3H, OCH₃) ; 3,36-3,42 (m, 2H, CH₂ α chaîne grasse) ; 3,43 (s, 3H, OCH₃) ; 3,48-3,62 (m, 8H, CH₂ sn-1 + CH₂ sn-3 + CH sn-2 + H₃ + H_{4'} + H_{5'}) ; 3,75-3,92 (m, 8H, H₂ + H₄ + H₅ + H₆ + H_{3'} + H_{6'}) ; 4,02-4,06 (m, 1H, H_{2'}) ; 4,36 (dd, 1H, ³J_{HH}=18,0, ³J_{HH}=9,0, H₁) ; 4,58-4,98 (m, 13H, CH₂-Ph + H_{1'}) ; 7,20-7,33 (m, 30H, CH (Ph))

RMN ¹³C (75,475 MHz, CDCl₃) : 14,1 (CH₃ chaîne grasse) ; 22,7 (CH₂ chaîne grasse) ; 26,0 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,3 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,7 (CH₂ chaîne grasse) ; 31,9 (CH₂ chaîne grasse) ; 58,1 (OCH₃) ; 61,6 (C_{6'}) ; 67,6 (C₆) ; 69,4 (CH₂ sn-3) ; 70,4 (CH₂ sn-1) ; 70,6 (C_{5'}) ; 71,8 (CH₂ α chaîne grasse) ; 73,1 (CH₂-Ph) ; 73,2 (C_{4'}) ; 73,6 (CH₂-Ph) ; 74,0 (C₄) ; 74,4 (CH₂-Ph) ; 74,5 (CH₂-Ph) ; 74,8 (C₅) ; 75,0 (CH₂-Ph) ; 76,3 (C_{2'}) ; 79,1 (C₂) ; 79,2 (C_{3'}) ; 79,3 (CH sn-2) ; 82,1 (C₃) ; 98,1 (C_{1'}) ; 104,0 (C₁) ; 127,4 (CH (Ph)) ; 127,5 (CH (Ph)) ; 127,8 (CH (Ph)) ; 128,1 (CH (Ph)) ; 128,2 (CH (Ph)) ; 128,4 (CH (Ph)) ; 138,5 (C_{ipso}) ; 138,6 (C_{ipso})

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-6-O- α -D-galactopyranosyl- β -D-galactopyranoside 17



A une solution de **26** (100 mg, 0,08 mmol) dans du méthanol (5 mL) est ajouté du palladium 10 % sur charbon (150 mg, 0,14 mmol). Le réacteur est placé sous 20 bars de pression de dihydrogène pendant 72 heures à température ambiante. Le mélange est filtré sur célite et concentré pour donner le produit attendu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 56 %.

$[\alpha]_D^{20} +51$ (c 0,83 ; MeOH)

Rf (CH₂Cl₂/MeOH (8 : 2)) : 0,27

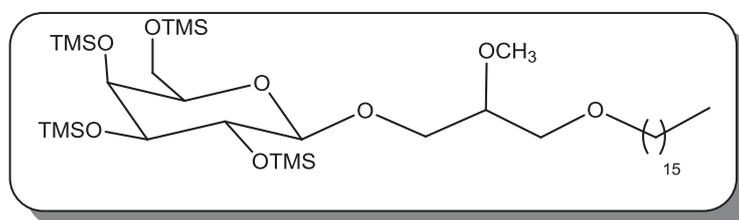
IR (ATR, cm⁻¹) : 1031 (C-O) ; 2850-2917 (C-H) ; 3337 (O-H)

RMN ¹H (500,113 MHz, CD₃OD) : 0,89 (t, 3H, ³J_{HH}=7,0, CH₃) ; 1,26-1,38 (m, 26H, CH₂ chaîne grasse) ; 1,55 (qt, 2H, ³J_{HH}=7,0, CH₂ β chaîne grasse) ; 3,39-3,50 (m, 5H, OCH₃ + CH₂ α chaîne grasse) ; 3,51-3,73 (m, 8H, CH₂ sn-1 + CH₂ sn-3 + CH sn-2 + H₃ + H_{4'} + H_{5'}) ; 3,75-3,92 (m, 8H, H₂ + H₄ + H₅ + H₆ + H_{2'} + H_{3'} + H_{6'}) ; 4,23 (dd, 1H, ³J_{HH}=18,0, ³J_{HH}=9,0, H₁) ; 4,86 (d, 1H, ³J_{HH}=9,0, H_{1'})

RMN ¹³C (125,771 MHz, CD₃OD) : 14,4 (CH₃ chaîne grasse) ; 23,7 (CH₂ chaîne grasse) ; 27,2 (CH₂ chaîne grasse) ; 30,4 (CH₂ chaîne grasse) ; 30,6 (CH₂ chaîne grasse) ; 30,7 (CH₂ chaîne grasse) ; 30,8 (CH₂ chaîne grasse) ; 33,0 (CH₂ chaîne grasse) ; 58,1 (OCH₃) ; 62,7 (C_{6'}) ; 67,7 (C₆) ; 69,7 (CH₂ sn-3) ; 70,0 (C₄) ; 70,2 (C_{2'}) ; 71,0 (C_{4'}) ; 71,3 (CH₂ sn-1) ; 71,4 (C_{3'}) ; 72,2 (C₂) ; 72,5 (C_{5'}) ; 72,7 (CH₂ α chaîne grasse) ; 74,4 (C₃) ; 74,7 (C₅) ; 80,6 (CH sn-2) ; 100,5 (C_{1'}) ; 105,2 (C₁)

Masse (MALDI-TOF) : m/z calculé pour C₃₂H₆₂O₁₃ (M+Na) 677,408, trouvé 677,389

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-2,3,4,6-tetrakis-O-(triméthylsilyl)- α -D-galactopyranoside **18**⁹²



A une solution du composé **9** (1,0 g, 2,0 mmol) et de triéthylamine (1,0 g, 10,0 mmol) dans du DMF anhydre (10 mL) est ajouté goutte à goutte à 0°C du chlorotriméthylsilane (1,1 g, 10,0 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 16 heures. De l'éther diéthylique (40 mL) est ajouté puis le mélange est versé sur de la glace. La phase organique est isolée et la phase aqueuse est extraite par deux fois par de l'éther diéthylique (20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées successivement par de l'eau glacée (10 mL) puis par une solution saturée de NaCl (10 mL), séchées sur MgSO₄ et concentrées pour donner le produit attendu sous forme d'huile avec un rendement de 92 %.

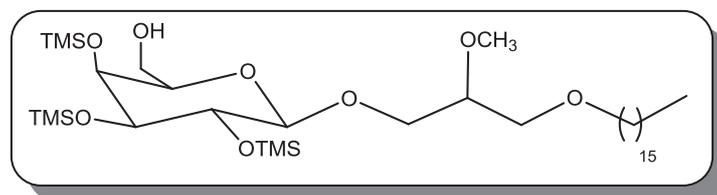
Rf (acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 5)) : 0,42

RMN ¹H (400,012 MHz, CDCl₃) : 0,10-0,15 (m, 36H, CH₃ (OTMS)) ; 0,87 (t, 3H, ³J_{HH}=6,8, CH₃) ; 1,20-1,35 (m, 26H, CH₂ chaîne grasse) ; 1,53-1,58 (m, 2H, CH₂ β chaîne grasse) ; 3,36-3,44 (m, 5H, CH₂ α chaîne grasse + CH₂ sn-1 + CH sn-2) ; 3,43 (s, 3H, OCH₃) ; 3,45-3,52 (m, 6H, H₃ + H₅ + H₆ + CH₂ sn-3) ; 3,80-3,95 (m, 2H, H₂ + H₄) ; 4,17 (t, 1H, ³J_{HH}= 8,4, H₁)

RMN ¹³C (125,816 MHz, CDCl₃) : -0,45 (CH₃Si) ; 045 (CH₃Si) ; 0,7 (CH₃Si) ; 14,1(CH₃) ; 22,7 (CH₂ chaîne grasse) ; 26,1 (CH₂ chaîne grasse) ; 26,2 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,4 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,5 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,7 (CH₂ chaîne grasse) ; 31,4 (CH₂ chaîne grasse) ; 57,8 (OCH₃) ; 67,2 (C₆) ; 68,7 (CH₂ sn-3) ; 70,7 (CH₂ sn-1) ; 71,7 (CH₂ α chaîne grasse) ; 71,5 ; 71,6 ; 75,2 ; 75,4 (C₂ + C₃ + C₄ + C₅) ; 79,5 (CH sn-2) ; 101,3 (C₁)

Masse (MALDI-TOF) : m/z calculé pour C₃₈H₈₄O₈Si₄ (M-SiMe₃+Na) 731,474, trouvé 731,427

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-2,3,4-tris-O-(triméthylsilyl)- α -D-galactopyranoside **19^{90a}**



A une solution du composé **18** (1,0 g, 1,3 mmol) dans un mélange acétone/méthanol (3 : 4) (14 mL) à 0°C est ajouté de l'acide acétique (153 mg, 2,6 mmol). Le milieu réactionnel est agité 36 heures à température ambiante. De l'hydrogénocarbonate de sodium (450 mg, 5,4 mmol) est ajouté pour neutraliser l'acide. Le mélange est filtré puis concentré. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/hexane (1 : 3)) pour donner une huile incolore avec un rendement de 53 %.

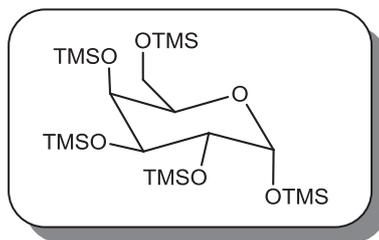
Rf (acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 3)) : 0,29

RMN ¹H (400,012 MHz, CDCl₃) : 0,09-0,14 (m, 27H, CH₃ (OTMS)) ; 0,88 (t, 3H, ³J_{HH}=6,8, CH₃) ; 1,15-1,32 (m, 26H, CH₂ chaîne grasse) ; 1,48-1,65 (m, 2H, CH₂ β chaîne grasse) ; 3,33-3,46 (m, 5H, CH₂ α chaîne grasse + CH₂ sn-3 + H₅) ; 3,41 (s, 3H, OCH₃) ; 3,46-3,68 (m, 5H, H₃ + H₄ + H₆ + H_α-CH sn-1) ; 3,69-3,72 (m, 1H, H₄) ; 3,77-3,89 (m, 2H, H₂ + H_b-CH sn-1) ; 4,21 (t, ³J_{HH}=8,2, 1H)

RMN ¹³C (75,475 MHz, CDCl₃) : 0,46 (CH₃Si) ; 0,75 (CH₃Si) ; 14,2 (CH₃) ; 22,7 (CH₂ chaîne grasse) ; 26,1 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,4 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,5 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,7 (CH₂ chaîne grasse) ; 32,0 (CH₂ chaîne grasse) ; 57,8 (OCH₃) ; 62,9 (C₆) ; 69,0 (CH₂ sn-3) ; 70,7 (CH₂ sn-1) ; 71,9 (CH₂ α chaîne grasse) ; 71,8 ; 72,5 ; 75,2 ; 75,3 (C₂ + C₃ + C₄ + C₅) ; 79,7 (CH sn-2) ; 104,6 (C₁)

Masse (MALDI-TOF) : m/z calculé pour C₃₅H₇₆O₈Si₃ (M-SiMe₃+Na) 731,474, trouvé 731,429

Synthèse du 1,2,3,4,6-pentakis-O-(triméthylsilyl)- α -D-galactopyranose 20⁹²



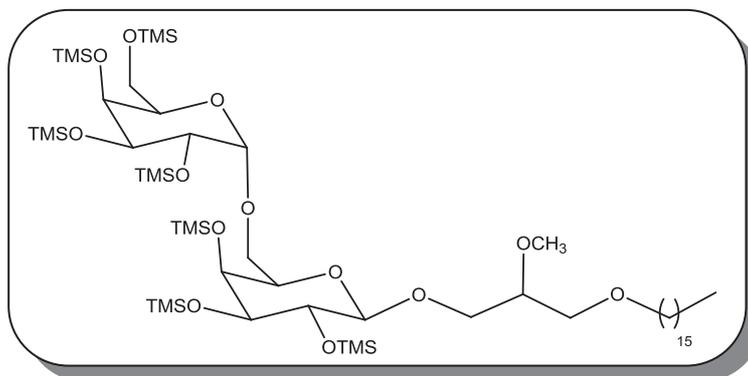
A une solution de D-galactose (1,8 g, 10,0 mmol) et de triéthylamine (5,56 g, 55,0 mmol) dans du DMF anhydre (50 mL) est ajouté goutte à goutte à 0°C du chlorotriméthylsilane (5,97 g, 55,0 mmol) et le milieu réactionnel est agité 4 heures à température ambiante. Du *n*-pentane (150 mL) est ajouté et le mélange est ensuite versé sur de la glace pilée. La phase organique est lavée par trois fois avec de l'eau glacée (50 mL), séchée sur MgSO₄ et concentrée pour donner le produit sous forme d'une huile avec un rendement de 92 %.

Rf (CH₂Cl₂/MeOH (5 : 1)) : 0,87

RMN ¹H (400,045 MHz, CDCl₃) : 0,10-0,16 (m, 45H, CH₃ (OTMS)) ; 3,51-3,65 (m, 2H, H₆) ; 3,79-3,92 (m, 4H, H₂ + H₃ + H₄ + H₅) ; 5,04 (d, 1H, ³J_{HH}=2,4Hz, H₁)

RMN ¹³C (125,816 MHz, CDCl₃) : -0,45 (CH₃Si) ; 0,2 (CH₃Si) ; 0,3 (CH₃Si) ; 0,5 (CH₃Si) ; 0,7 (CH₃Si) ; 61,2 (C₆) ; 70,0 (C₅) ; 70,5 (C₃) ; 71,2 (C₂) ; 72,3 (C₄) ; 94,6 (C₁)

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-6-O-[2,3,4-tris-O-(triméthylsilyl)- α -D-galactopyranosyl]-2,3,4-tris-O-(triméthylsilyl)- α -D-galactopyranoside **22⁹³**



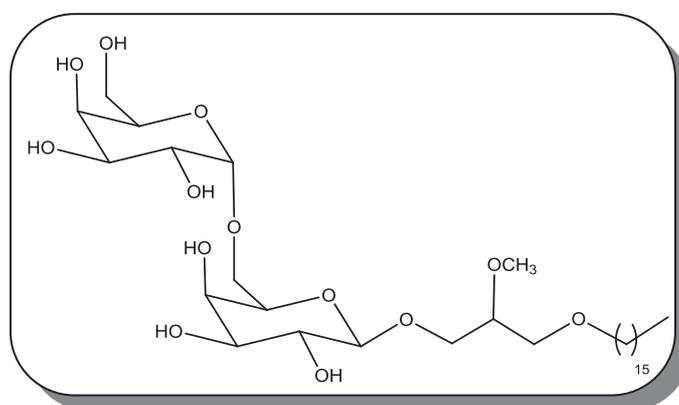
A une solution de **20** (454 mg, 0,84 mmol) dans CH_2Cl_2 anhydre refroidie (5 mL) à 0°C est additionné du TMSI (131 μL , 0,92 mmol). Le milieu réactionnel est agité pendant 20 minutes à 0°C . Quelques millilitres de benzène sont ajoutés et le milieu est concentré à froid pour donner le dérivé iodé **21**. Ce dernier est repris dans du CH_2Cl_2 anhydre (5 mL) et gardé sous atmosphère d'argon. Dans un autre réacteur, du TBAI (465 mg, 1,26 mmol), de la DIPEA (163 mg, 1,26 mmol) et le composé **19** (200 mg, 0,28 mmol) sont dissous dans du CH_2Cl_2 anhydre (5 mL) et le mélange est agité à température ambiante sous argon. La solution contenant le dérivé iodé est ajoutée au goutte-à-goutte et le mélange réactionnel est agité pendant 36 heures à température ambiante. La solution est concentrée et le résidu est repris dans de l'éther diéthylique anhydre (20 mL) pour précipiter les sels, filtré et concentré. L'huile obtenue est chromatographiée sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle / éther de pétrole (1 : 9)) pour donner une huile incolore avec un rendement de 72 %.

Rf (acétate d'éthyle/éther de pétrole (2 : 1)) : 0,27

RMN ^1H (400,012 MHz, CDCl_3) : 0,06-0,17 (m, 63H, CH_3 (OTMS)) ; 0,87 (t, 3H, $^3J_{\text{HH}}=6,8$, CH_3) ; 1,15-1,32 (m, 26H, CH_2 chaîne grasse) ; 1,51-1,58 (m, 2H, CH_2 β chaîne grasse) ; 3,35-3,58 (m, 10H, OCH_3 + CH_2 α chaîne grasse + CH_2 *sn*-1 + CH_2 *sn*-3 + CH *sn*-2) ; 3,59-3,90 (m, 12H, H_2 + H_3 + H_4 + H_5 + H_6 + $H_{2'}$ + $H_{3'}$ + $H_{4'}$ + $H_{5'}$ + $H_{6'}$) ; 4,18 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}}=7,5$, $^3J_{\text{HH}}=9,6$, H_1) ; 4,69 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}}=3,6$, $H_{1'}$)

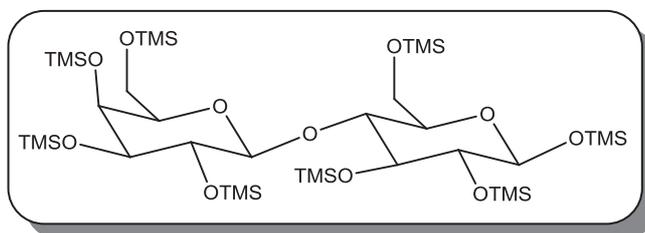
RMN ^{13}C (125,816 MHz, CDCl_3) : -0,9 (CH_3 (OTMS)) ; -0,1 (CH_3 (OTMS)) ; 0,1 (CH_3 (OTMS)) ; 0,2 (CH_3 (OTMS)) ; 0,3 (CH_3 (OTMS)) ; 13,6 (CH_3 chaine grasse) ; 22,2 (CH_2 chaine grasse) ; 25,6 (CH_2 chaine grasse) ; 28,9 (CH_2 chaine grasse) ; 31,4 (CH_2 chaine grasse) ; 57,3 (OCH_3) ; 61,0 ($\text{C}_{6'}$) ; 64,8 (C_6) ; 68,1 (CH_2 *sn*-3) ; 70,3 (CH_2 *sn*-1) ; 71,2 (CH_2 α chaine grasse) ; 68,7 ; 70,2 ; 70,9 ; 71,0 ; 71,3 ; 71,9 ; 72,6 ; 74,8 ($\text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_4 + \text{C}_5 + \text{C}_{2'} + \text{C}_{3'} + \text{C}_{4'} + \text{C}_{5'}$) ; 78,8 (CH *sn*-2) ; 99,6 ($\text{C}_{1'}$) ; 103,9 (C_1)

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-6-O- α -D-galactopyranosyl- α -D-galactopyranoside 17⁹³



A une solution de **22** (235 mg, 0,20 mmol) dans du méthanol (15 mL) est ajoutée de la résine Dowex 50WX8-200 (300 mg) et le mélange est agité 4 heures à température ambiante. Après filtration, le solvant est évaporé et le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (8 : 2)) pour donner le produit attendu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 77 %.

Synthèse du 4-O-[2,3,4,6-tetrakis-O-(triméthylsilyl)]-β-D-galactopyranosyl]-1,2,3,6-tetrakis-O-(triméthylsilyl)-α-D-glucopyranose 23⁹²

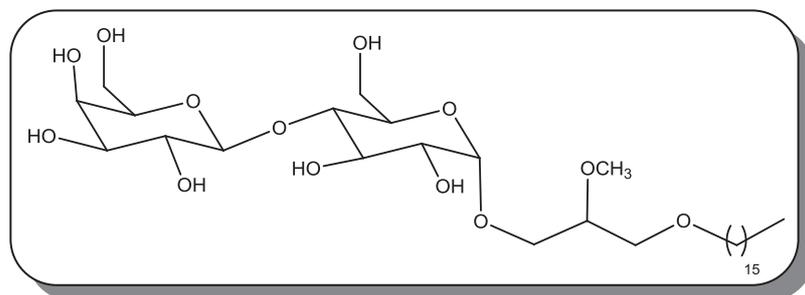


A une solution de D-lactose (650 mg, 1,9 mmol) et de triéthylamine (1,37 mL, 10,2 mmol) dans du DMF anhydre (10 mL) à 0°C, est ajouté du chlorotriméthylsilane (1,29 mL, 10,2 mmol) au goutte-à-goutte et le milieu réactionnel est agité 4 heures à température ambiante. Du *n*-pentane (30 mL) est ajouté et le mélange est ensuite versé sur de la glace pilée. La phase organique est lavée avec de l'eau glacée (10 mL), séchée sur MgSO₄ et concentrée pour donner le produit sous forme d'une huile avec un rendement de 81 %.

Rf (acétate d'éthyle/éther de pétrole (1:9)) : 0,77

RMN ¹H (400,012 MHz, CDCl₃) : 0,06-0,16 (m, 72H, CH₃ (OTMS)) ; 3,14-3,21 (m, 1H, H₂) ; 3,23-3,32 (m, 3H, H₄ + H_{6'}) ; 3,40-3,82 (m, 7H, H₅ + H₆ + H_{2'} + H_{3'} + H_{4'} + H_{5'}) ; 3,88-3,94 (dd, 1H, ³J_{HH}=10,8, ³J_{HH}=3,6, H₃) ; 4,27 (d, 1H, ³J_{HH}=7,5, H_{1'}) ; 4,44 (d, 1H, ³J_{HH}=7,5, H₁)

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-4-O-β-D-galactopyranosyl-α-D-glucopyranoside **24**^{93,94}



A une solution de **23** (1,38 g, 1,50 mmol) dans du CH₂Cl₂ anhydre (5 mL) est ajouté du TMSI (300 mg, 1,50 mmol). Le milieu réactionnel est agité 30 minutes à température ambiante et quelques millilitres de benzène sont ajoutés. La solution est concentrée pour donner le dérivé iodé qui est repris dans du CH₂Cl₂ anhydre (5 mL) et gardé sous atmosphère d'argon. Dans un autre réacteur, du TBAI (828 mg, 2,25 mmol), de la DIPEA (291 mg, 2,25 mmol) et le composé **5** (165 mg, 0,50 mmol) sont dissous dans du CH₂Cl₂ anhydre (5 mL) et le mélange est agité à température ambiante sous argon. La solution contenant le dérivé iodé est ajoutée au goutte-à-goutte et le mélange réactionnel est agité pendant 36 heures à température ambiante. La solution est concentrée et le résidu est repris dans de l'éther diéthylique anhydre pour précipiter les sels, filtré et concentré. L'huile obtenue est reprise dans du méthanol (5 mL) et de la résine acide Dowex 50WX8-200 est ajoutée. Le milieu est agité pendant 4 heures à température ambiante puis il est filtré et concentré. L'huile obtenue est chromatographiée sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH (8 : 2)) pour donner une poudre blanche avec un rendement de 21 %.

$[\alpha]_D^{20} +50$ (c 0,42 ; MeOH)

Rf (CHCl₃/MeOH (8 : 2)) : 0,25

IR (ATR, cm⁻¹) : 1031 (C-O) ; 2850-2916 (C-H) ; 3337 (O-H)

RMN ¹H (400,012 MHz, CD₃OD) : 0,85 (t, 3H, ³J_{HH}= 7,5, CH₃) ; 1,18-1,35 (m, 26H, CH₂ chaîne grasse) ; 1,51 (qt, 2H, ³J_{HH}=7,0, CH₂ β chaîne grasse) ; 3,35-3,86 (m, 19H, CH₂ α chaîne grasse + CH₂ sn-1 + CH₂ sn-3 + CH sn-2 + H₂ + H₃ + H₄ + H₅ + H₆ + H_{2'} + H_{3'} + H_{4'} + H_{5'} + H_{6'}) ; 3,42 (s, 3H, CH₃O) ; 4,29 (d, 1H, ³J_{HH}=7,5, H_{1'}) ; 4,72 (m, 1H, H₁)

RMN ^{13}C (125,816 MHz, CD_3OD): 14,4 (CH_3) ; 23,7 (CH_2 chaine grasse) ; 27,2 (CH_2 chaine grasse) ; 30,4 (CH_2 chaine grasse) ; 30,6 (CH_2 chaine grasse) ; 30,7 (CH_2 chaine grasse) ; 33,0 (CH_2 chaine grasse) ; 58,4 (OCH_3) ; 61,8 (C_6) ; 62,5 ($\text{C}_{6'}$) ; 68,3 (CH_2 *sn*-3) ; 71,1 (CH_2 *sn*-1) ; 72,7 (CH_2 α chaine grasse) ; 70,3 ; 72,2 ; 72,6 ; 73,4 ; 73,5 ; 74,9 ; 77,1 ($\text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_5 + \text{C}_{2'} + \text{C}_{3'} + \text{C}_{4'} + \text{C}_{5'}$) ; 80,6 (CH *sn*-2) ; 80,9 (C_4) ; 100,5 (C_1) ; 105,1 ($\text{C}_{1'}$).

Masse (MALDI-TOF) : m/z calculé pour $\text{C}_{32}\text{H}_{62}\text{O}_{13}$ (M+Na) 677,408, trouvé 677,386

Etudes de l'efficacité d'inhibition du courant du canal SK3 : Patch-clamp

Les études de l'efficacité d'inhibition du courant du canal SK3 ont été réalisées par patch-clamp en configuration « whole-cell » à l'aide de cellules HEK-293T surexprimant stablement le canal SK3 recombinant. L'incidence des composés a été mesurée en suivant un protocole de rampe. Le potentiel imposé va varier progressivement de + 100 mV à - 100 mV en 500 ms à partir d'un potentiel de maintien (« holding ») de 0 mV toutes les 4 secondes. Chaque expérience dure 3 minutes.

Etudes de l'efficacité d'inhibition de la migration cellulaire

Les tests d'efficacité d'inhibition de la migration cellulaire ont été réalisés par comptage des cellules ayant migrées d'un compartiment à un autre au travers du filtre poreux d'un insert. Les inserts utilisés ont des pores de 8 μm et sont recouverts d'une membrane en polyéthylènetéréphthalate (PET), ils sont placés dans des plaques 24 puits. Les cellules ($8 \cdot 10^4$ cellules par puits) sont placées dans le compartiment supérieur et leur adhésion est assurée par la fibronectine présente dans le SVF ($1,6 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$). Les composés à tester sont placés dans les deux compartiments et après 15 heures d'incubation, les cellules qui n'ont pas migrées sont enlevées de la face supérieure de la membrane alors que les cellules ayant migrées se trouveront sur la face inférieure de cette membrane. Les noyaux ont été colorés au DAPI et comptés. Chaque expérience est réalisée en triplicat.

Etudes de la toxicité des analogues de l'édelfosine : essais au MTT

Les études de la toxicité de nos composés ont été réalisées en suivant le test au MTT. Il s'agit de la réduction du sel de tetrazolium en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives (Figure 52).

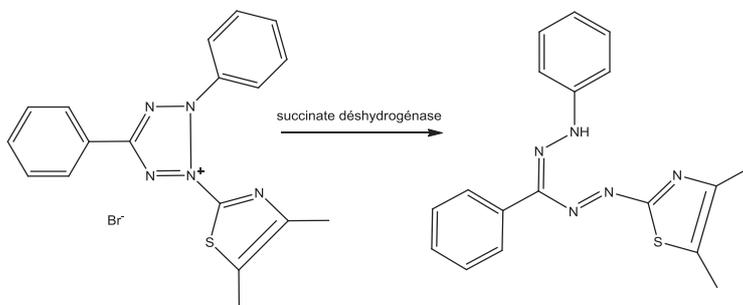


Figure 52 : Réaction de formation du formazan

Les cellules sont placées dans des plaques 24 puits ($4 \cdot 10^4$ cellules par puits) et sont mises en présence des molécules à tester pendant 48 heures. Une fois la période test terminée, le milieu cellulaire est retiré et remplacé par du MTT ($0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Après incubation, la solution de MTT est retirée et les cristaux de formazan sont dissous dans du DMSO et la DO est mesurée à 520 nm. Chaque expérience est réalisée en triplicat.

**CHAPITRE 3 : SYNTHÈSE ET ÉVALUATION
DE PHOSPHATES ANALOGUES DE
L'ÉDELFOSE**

I - Synthèse de glycophospholipides et de glycothiophospholipides disaccharidiques

1 - Les glycoglycérolipides

L'ohmline est limitée par sa solubilité (6 mg.mL^{-1}) qui permet de faire des tests *in vivo* sur le modèle murin mais qui est trop faible pour des études sur d'autres animaux et des tests de toxicité aiguë. Dans le but d'améliorer ce facteur solubilité et d'étendre l'étude structure-activité autour des analogues de l'édelfosine et de l'ohmline, nous proposons d'insérer un groupement phosphate entre le disaccharide et le motif glycérol (Figure 53).

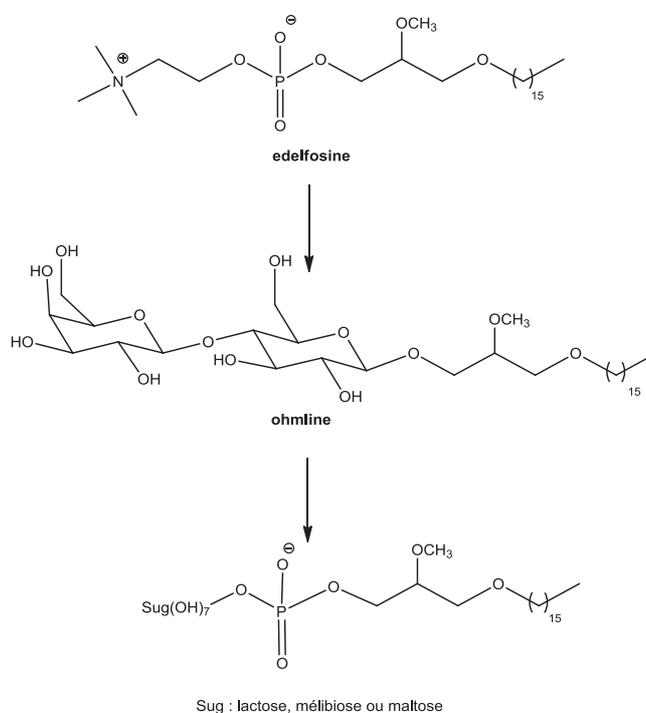


Figure 53 : Evolution des analogues de l'édelfosine

L'introduction de cette fonction permettra de se rapprocher de la structure de l'édelfosine. Nous partons du principe que la présence du groupement disaccharidique à la place de la tête ammonium présente dans l'édelfosine permettra de limiter la toxicité de ces composés à l'instar de l'ohmline. De plus, ces composés nous permettront d'étudier l'incidence de la charge de la molécule sur l'activité du canal SK3, sur la migration cellulaire et sur la toxicité de nos composés. Les produits que nous désirons synthétiser sont des anions par leur motif

phosphate, contrairement à l'édelfosine qui est un composé zwitterionique et l'ohmline qui est neutre.

1.1. Généralités

Les glycophospholipides sont, comme le suggère leur nom, des composés comprenant à la fois un motif phosphate et un motif saccharidique dans leur structure. Ces molécules sont majoritairement présentes dans les membranes plasmiques des organismes vivants, animaux ou végétaux. Il existe différents types de glycophospholipides, les différences se faisant principalement au niveau de la position des différents groupements. Par exemple, les phosphoglyco-lipides, qui sont des éléments extrêmement importants de la paroi bactérienne⁹⁶, possèdent une partie lipidique constituée du glyco-lipide et un résidu glycophosphate, di-(glycérophosphate) ou phosphatidique⁹⁷ (Figure 54).

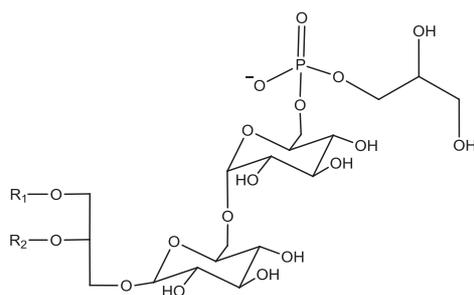


Figure 54 : Exemple de phosphoglyco-lipide

Ici, nous nous intéresserons aux glycophospholipides constitués d'un glycérophosphate lié à un motif saccharidique via l'atome de phosphore. Ce sont des structures plutôt rares dans la nature. En 1970, Short et coll.⁹⁸ ont identifié dans la partie lipidique du *Staphylococcus aureus* un phosphatidylglucoside (PtdGlc) dont ils ont élucidé la structure globale par action de la phospholipase C. Il a fallu attendre 30 années supplémentaires et les travaux de Nagatsuka et coll. pour en trouver dans les globules rouges humains⁹⁹ puis dans les

⁹⁶ Fischer W. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1970**, *41*, 731-736

⁹⁷ Fischer, W. *Handbook of Lipid Research* **1990**, *6*, 123-217

⁹⁸ Short, S.A. ; White, D.C. *J. Bacteriol.* **1970**, *104*, 126-131

⁹⁹ Nagatsuka, Y. ; Kasama, T. ; Ohashi, Y. ; Uzawa, J. ; Ono, Y. ; Shimizu, K. ; Hirabayashi, Y. *FEBS Lett.* **2001**, *497*, 141-147

membranes des leucocytes promyélocyiques¹⁰⁰. Ce n'est qu'en 2006 que Nagatsuka et coll.¹⁰¹ ont montré la présence de PtdGlc dans le tissu cérébral embryonnaire de rat et élucidé sa structure chimique exacte (Figure 55). Différentes études ont ensuite permis de mettre en évidence la présence de cette molécule dans divers organes¹⁰². Une des grandes questions a alors été de déterminer les fonctions biologiques que peut avoir cette molécule, à la structure atypique dans le monde animal, au sein de la membrane. Plusieurs hypothèses ont été proposées : un rôle de plate-forme signalétique dans le processus de différenciation des astrocytes¹⁰³, un rôle de second messenger lors de l'hydrolyse de la molécule par les phospholypases A, C ou D, ou encore un rôle dans l'apoptose des neutrophiles¹⁰⁴.

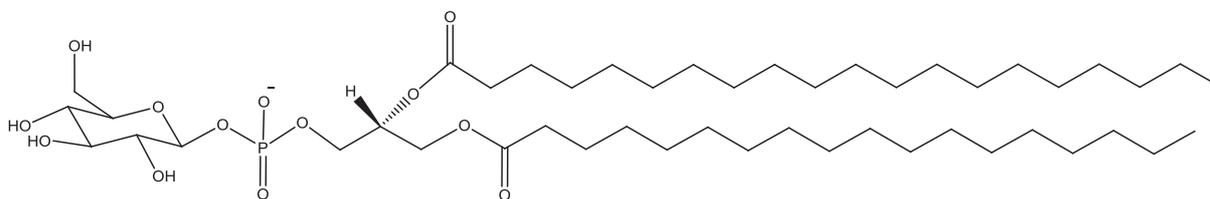


Figure 55 : Exemple de phosphatidylglucoside (PtdGlc)

1.2. Descriptif des travaux menés

Dans le but de développer d'autres analogues de l'édelfosine, nous nous proposons d'étudier différents glycophospholipides disaccharidiques dont la structure, très proche de celle des PtdGlc, répond aux critères que nous avons mis en place lors de l'étude structure-activité précédemment mentionnée (Figure 56) :

¹⁰⁰ Nagatsuka, Y. ; Hara-Yokoyama, M. ; Kasama, T. ; Takakoshi, M. ; Maeda, F. ; Ihara, S. ; Fujiwara, S. ; Ohshima, E. ; Ishii, K. ; Kobayashi, T. ; Shimizu, K. ; Hirabayashi, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 7454-7459

¹⁰¹ Nagatsuka, Y. ; Horibata, Y. ; Yamazaki, Y. ; Kinoshita, M. ; Shinoda, Y. ; Hashikawa, T. ; Koshino, H. ; Nakamura, T. ; Hirabayashi Y. *Biochemistry.* **2006**, *45*, 8742-8875

¹⁰² a) Kitamura, Y. ; Okazaki, T. ; Nagatsuka, Y. ; Hirabayashi, Y. ; Kato, S. ; Hayashi, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *362*, 252-255. b) Kaneko, J. ; Kinoshita, M.O. ; Machida, T. ; Shinoda, Y. ; Nagatsuka, Y. ; Hirabayashi, Y. *J. Neurochem.* **2011**, *116*, 840-844

¹⁰³ Kinoshita, M.O. ; Furuya, S. ; Ito, S. ; Shinoda, Y. ; Yamazaki, Y. ; Greimel, P. ; Ito, Y. ; Hashikawa, T. ; Machida, T. ; Nagatsuka, Y. ; Hirabayashi, Y. *Biochem. J.* **2009**, *419*, 565-575

¹⁰⁴ Kina, K. ; Masuda, H. ; Nagatsuka, Y. ; Nabetani, T. ; Hirabayashi, Y. ; Takahashi, Y. ; Shimada, K. ; Daida, H. ; Ogawa, H. ; Takamori, K. ; Iwabuchi, K. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 5323-5332

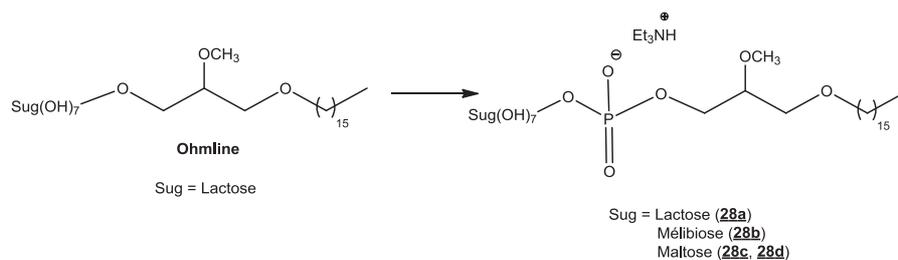


Figure 56 : Glycophospholipides analogues de l'édelfosine

Nous avons voulu mesurer l'impact de la structure du disaccharide et pour cela nous avons synthétisé trois glycophospholipides avec des têtes polaires lactose, mélibiose ou maltose. Ces composés sont des mélanges des anomères α et β . Afin de déterminer l'incidence de la configuration de ces disaccharides, nous avons réalisé la synthèse stéréosélective d'un glycophospholipide (obtention de l'anomère α seul).

2 - Différentes stratégies de synthèse

Il existe différentes méthodes permettant de synthétiser des glycophospholipides. Généralement cela consiste en la phosphorylation du saccharide puis en la condensation du dérivé du glycérol. La différence significative entre ces différentes méthodes est la nature du groupement phosphoré lié au saccharide. Il peut s'agir des méthodes conduisant à des phosphites à partir de phosphochloridites comme décrites par Ogawa et coll.¹⁰⁵ ou des phosphoramidites comme développé par van Boom et coll.¹⁰⁶ ou encore de la méthode dite du *H*-phosphonate également mise en place par Ogawa et coll.¹⁰⁷. Nous nous sommes basés sur cette dernière méthode pour réaliser la synthèse de nos glycophospholipides.

2.1. Phosphochloridites

Les travaux d'Ogawa et coll. ont rapporté la première utilisation des composés de type P(III) pour former des phosphites de glycosyle et des phosphosaccharides de glycosyle. Ils ont utilisé le phosphorodichloridite de 2,2,2-trichloroéthyle comme réactif pour la

¹⁰⁵ Ogawa, T. ; Seta, A. *Carbohydr. Res.* **1982** 110, C1-4

¹⁰⁶ Westerduin, P. ; Veeneman, G.H. ; Marugg, J.E. ; van der Marel, G.A. ; van Boom, J.H. *Tetrahedron Lett.* **1986** 27, 1211-1214

¹⁰⁷ Ogawa, T. ; Seta, A. *Carbohydr. Res.* **1982** 110, C1-4

phosphorylation du 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-hydroxyglucose. Le phosphochloridite de glycosyle formé peut alors réagir avec un autre dérivé monosaccharidique pour former le phosphite de triester avec de très bons rendements. Le composé formé est ensuite oxydé pour donner le phosphate correspondant (Figure 57). Cette méthode a également été utilisée pour la synthèse de cyclopeptides¹⁰⁸. Cependant les mauvais rendements obtenus par cette voie (moins de 20 % en rendement global) ont conduit à la recherche d'autres réactifs phosphorés.

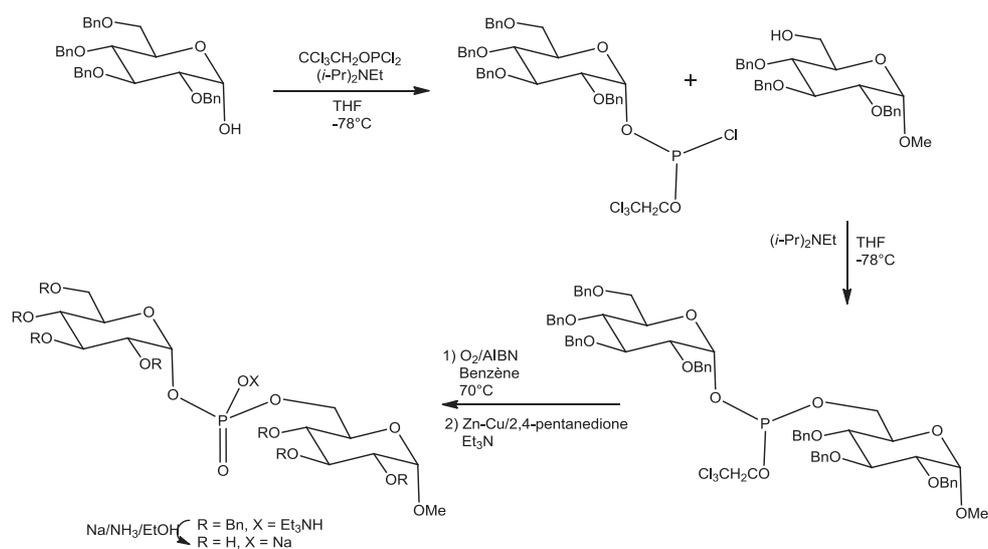


Figure 57 : Exemple de synthèse de glycosylphosphosaccharides *via* la méthode des phosphochloridites

2.2. Phosphoramidites

L'utilisation des composés phosphorés de valence (III) a été poursuivie par van Boom et coll.¹⁰⁹ qui ont montré que l'une des stratégies envisageable pour la formation de saccharides phosphorylés était de passer par un intermédiaire de type phosphoramidite. Pour ce faire, ils ont utilisé le 2-cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidochloridite qui, par action d'un motif saccharidique, a permis de former le phosphoramidite attendu. Ce composé réagit ensuite avec une deuxième entité saccharidique pour donner un phosphite de triester qui est oxydé en phosphate correspondant (Figure 58).

¹⁰⁸ Lowbridge, J. ; Mtetwa, E. ; Ridge, R.J. ; Drey, C.N.C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1986**, 155-156

¹⁰⁹ Westerduin, P. ; Veeneman, G.H. ; Marugg, J.E. ; van der Marel, G.A. ; van Boom, J.H. *Tetrahedron Lett.* **1986** 27, 1211-1214

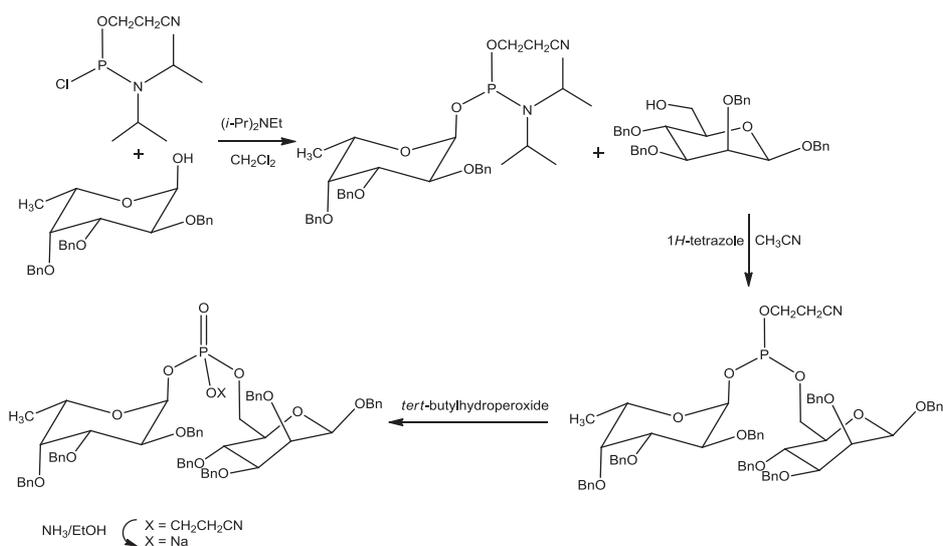


Figure 58 : Exemple de synthèse de glycosylphosphosaccharides *via* la méthode des phosphoramidites

Cette méthode a notamment été développée afin de donner une alternative à la méthode du *H*-phosphonate, la plus fréquemment utilisée pour la synthèse de petits phosphoglycane mais présentant des résultats mitigés lors de la synthèse de phosphoglycane possédant plus de quatre unités¹¹⁰. Les phosphoramidites sont les composés les plus fréquemment utilisés pour synthétiser les biomolécules contenant des fonctions phosphorées, notamment les oligonucléotides¹¹¹. Il y a très peu d'études concernant la synthèse de glycophosphates par cette voie qui ont été réalisées¹¹². Cela s'explique par plusieurs raisons : l'absence d'une méthode de synthèse des diastéréoisomères α et β purs et la dégradation des intermédiaires par les acides présents dans le milieu réactionnel ou survenant lors de la purification sur colonne chromatographique¹¹³.

¹¹⁰ Nikolaev, A.V. ; Ivanova, I.A. ; Shibaev, V.N. *Carbohydr. Res.* **1993**, *242*, 91-107

¹¹¹ Beaucage, S.L. ; Iyer, R.P. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 2223-2311

¹¹² a) Westerduin, P. ; Veenemant, G.H. ; van der Marel, G.A. ; van Boom, J.H. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 6271-6274. b) Westerduin, P. ; Veeneman, G.H. ; Marugg, J.E. ; van der Marel, G.A. ; van Boom, J.H. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 1211-1214. c) Kondo, H. ; Ichikawa, Y. ; Wong, C.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8748-8750. d) Majumdar, D. ; Elsayed, G.A. ; Buskas, T. ; Boons, G.J. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1691-1697

¹¹³ a) Nikolaev, A.V. ; Botvinko, I.V. ; Ross, A.J. *Carbohydrate Res.* **2007**, *342*, 297-344. b) Watanabe Y. ; Nakamoto, C. ; Yamamoto, T. ; Ozaki, S. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 6523-6536

2.3. H-phosphonates

La méthode dite du *H*-phosphonate a été décrite pour la première fois par Todd et coll.¹¹⁴ en 1957 et optimisée, plus tard, par les équipes de Garegg, Stawinsky ou encore Froehler¹¹⁵. Cette méthode présentait l'avantage d'être une voie extrêmement efficace pour la formation de différents glycosylphosphosaccharides, notamment certains fragments de phosphoglycane présents dans des membranes cellulaires et certains glycopolymères de capsules bactériennes. Cette voie de synthèse est également à l'origine des premières synthèses de différents fragments extrêmement complexes de phosphoglycane composés de phosphates d'oligosaccharides. Il s'agit d'une méthode rapide et efficace pour obtenir des dérivés phosphosaccharidiques. En effet, trois étapes suffisent à l'obtention du phosphodiester d'intérêt (Figure 59) :

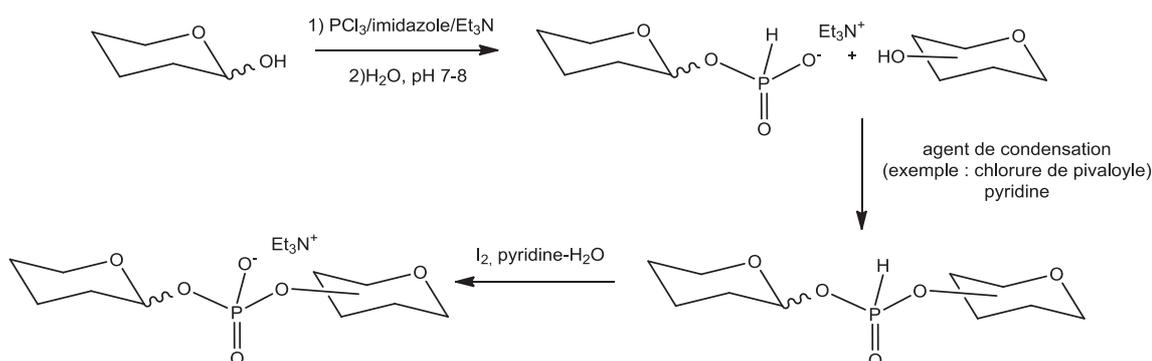


Figure 59 : Exemple de synthèse de glycosylphosphosaccharides *via* la méthode des *H*-phosphonates

Etape 1 : formation du phosphite (ou *H*-phosphonate) par réaction de PCl_3 ou de salicylchlorophosphate¹¹⁶.

Etape 2 : condensation avec un composé monohydroxylé.

Etape 3 : oxydation du phosphite formé par traitement au diiode (obtention d'un phosphate) ou par du soufre natif (obtention d'un thiophosphate).

¹¹⁴ Hall, R.H. ; Todd A. ; Webb, R.F. *Nucleotides* **1957**, Part XLI, 3291-3296

¹¹⁵ a) Garegg, P.J. ; Regberg, T. ; Stawinski, J. ; Strömberg, R. *Chemica Scr.* **1985**, 25, 280–282. b) Stawinski, J. ; Strömberg, R. *Trends Org. Synth.* **1993**, 4, 31–67. c) Froehler, B.C. ; Matteucci, M.D. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 469-472

¹¹⁶ Hermans, J.P.G. ; de Vroom, E. ; Elie, C.J.J. ; van der Marel, G.A. ; van Boom, J.H. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1986**, 105, 510-511

Les étapes 2 et 3 peuvent être effectuées « one-pot » et suivies par RMN du phosphore. L'avantage non négligeable de la méthode du *H*-phosphonate, en comparaison des deux méthodes précédemment citées, est qu'elle ne nécessite pas l'utilisation d'un groupement P-protecteur. En effet, ces groupements peuvent former des phosphites de diester ou des phosphates de diester qui sont d'excellents groupes partants lorsqu'ils sont liés au carbone anomérique du saccharide, ce qui réduit considérablement la stabilité des phosphites de triester et des phosphates de triesters correspondants¹¹⁷. Ces propriétés des dérivés de phosphites d'alkyle et de phosphates d'alkyle ont été bien décrites notamment pour leur rôle de donneur de fragment glycosidique dans la réaction de glycosylation¹¹⁸.

3 - Synthèse des glycophospholipides disaccharidiques 28

3.1. Préparation du glycosylphosphite 26 par la voie du *H*-phosphonate

Afin de voir l'influence de la nature du disaccharide sur l'efficacité d'inhibition de la migration cellulaire et sur l'activité du canal SK3, nous avons décidé de réaliser les synthèses de glycophospholipides avec successivement du lactose, du maltose et du mélbiose. Ces disaccharides sont achetés sous leur forme hydroxylée et quelques étapes préliminaires de protection-déprotection sont nécessaires avant d'obtenir le produit phosphorylé.

Dans un premier temps le disaccharide est acétylé par l'anhydride acétique dans l'acide acétique en présence d'une quantité catalytique d'acide perchlorique pour donner le disaccharide octaacétylé 24 avec un rendement quantitatif¹¹⁹. La position anomérique du composé est déprotégée par l'action d'acétate d'ammonium dans du DMF pour conduire au produit 25 avec un rendement de 85 %⁷⁷ (Figure 60).

¹¹⁷ a) Van Boeckel, C.A.A. ; Hermans, J.P.G. ; Westerduin, P. ; Oltvoort, J.J. ; van der Marel, G.A. ; van Boom, J.H. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1983**, *102*, 438-449. b) Veeneman, G.H. in *Carbohydrate Chemistry* Boons, G.J., Ed. ; Blackie Academic et Professional (Thomson Science) : London, 1998 ; pp117-118

¹¹⁸ Plante, O.J. ; Andrade, R.B. ; Seeberger, P.H. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 211-214

¹¹⁹ Hunsen, M. ; Long, D.A. ; D'Ardenne, C.R. ; Smith, A.L. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 2670-2674

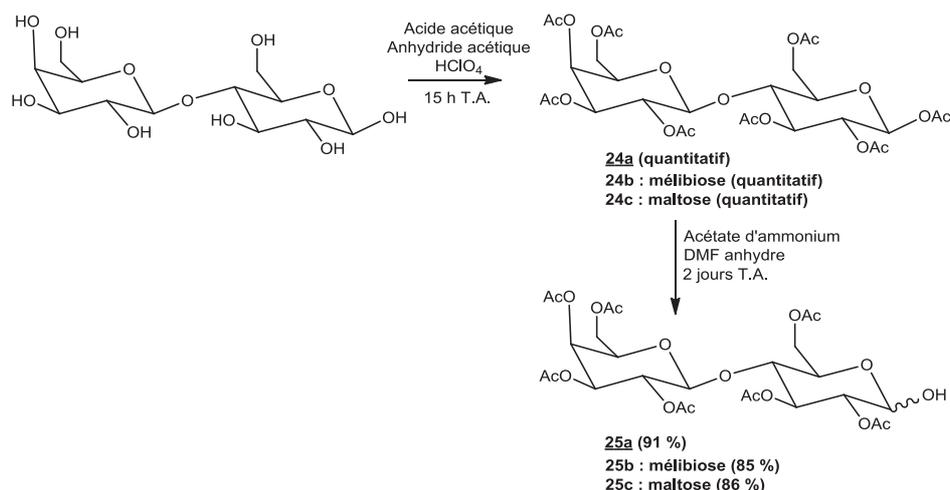


Figure 60 : Schéma réactionnel de préparation du disaccharide **25**

Par soucis de clarté, les schémas réactionnels ne présenteront que les synthèses à partir du lactose (produits nommés **a**), les dérivés du mélibiose seront les produits **b** et ceux du maltose **c** (mélange d'anomères) et **d** (anomère α seul).

L'étape de phosphorylation répond au protocole de Garegg et coll.¹²⁰ et nous nous sommes basés sur les études de Nikolaev et coll.¹²¹. Il s'agit de la méthode du *H*-phosphonate où le disaccharide heptaacétylé **25** est mis en présence d'imidazole et de PCl₃ en milieu basique (triéthylamine) dans l'acétonitrile. Le mélange imidazole/PCl₃ conduit à la formation *in situ* de tri-(imidazol-1yl)phosphine activant la réaction. L'intermédiaire saccharidique formé est alors hydrolysé et le produit **26** obtenu est utilisé sans autre forme de purification avec des rendements variant de 84 % à 87 % (Figure 61).

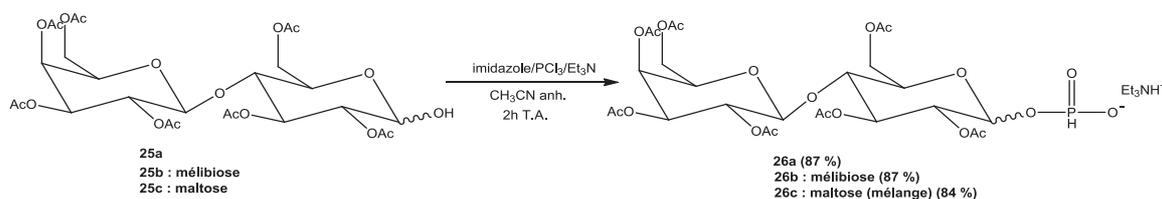


Figure 61 : Schéma réactionnel de formation du phosphite **26**

¹²⁰ Garegg, P.J. ; Regberg, T. ; Stawinski, J. ; Strömberg, R. *Chem. Scr.* **1986**, 26, 59-62

¹²¹ a) Ross, A.J. ; Ivanova, I.A. ; Ferguson, M.A.J. ; Nikolaev, A.V. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **2001**, 72-81. b) Nikolaev, A.V. ; Botvinko, I.V. ; Ross, A.J. *Carbohydr. Res.* **2007**, 342, 297-344

Cette étape est contrôlée par RMN du phosphore ^{31}P qui nous permet également de déterminer le ratio d'anomères α/β obtenu pour cette étape de phosphorylation.

Afin d'étudier l'influence de la stéréochimie de la position anomérique sur les effets biologiques, nous avons synthétisé, pour le maltose, l'anomère α seul. Pour cela le produit **26c** est traité par de l'acide phosphonique dans du CH_3CN anhydre formant ainsi le composé **26d** avec un rendement de 70 %^{121a} (Figure 62).

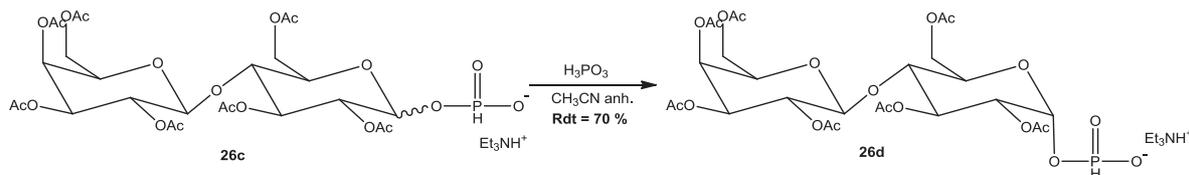


Figure 62 : Obtention de l'anomère alpha seul **26d**

Cette réaction a été suivie par RMN ^{31}P ce qui nous a permis d'observer la conversion de l'anomère β en anomère α comme cela a été décrit par Nikolaev et coll.^{121a}. Le rendement de la réaction s'explique par la possibilité de formation de l'hémiacétal issu du clivage du phosphite par catalyse acide.

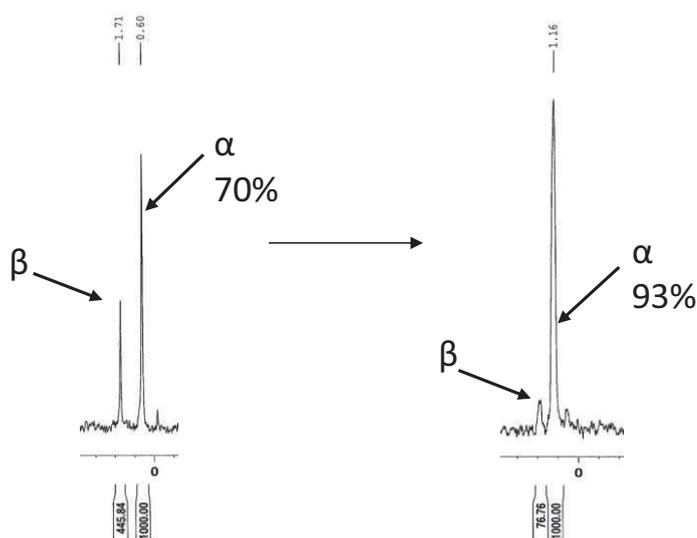


Figure 63 : Evolution de la RMN ^{31}P par traitement du phosphite par H_3PO_3

3.2. Réaction de condensation

L'étape suivante consiste en la condensation du bloc lipidique avec le glycosylphosphite **26**. Nous nous sommes basés sur les travaux initiés par Todd pour réaliser cette synthèse¹²² et reprise dans les années 1980 notamment par Garegg et coll.¹²⁰. Le phosphite **26** est mis en solution dans du THF anhydre en présence d'un large excès de pyridine, destinée à substituer le contre-ion triéthylammonium. A ce mélange est ajouté l'alcool lipidique **5** et du chlorure de pivaloyle. Cette réaction se fait via l'intermédiaire d'un anhydride mixte. Une fois le bloc lipidique fixé, le phosphite est oxydé par du diiode en solution dans un mélange pyridine/eau et le produit est obtenu sous forme d'une poudre jaune avec un rendement allant de 54 à 85 % (Figure 64).

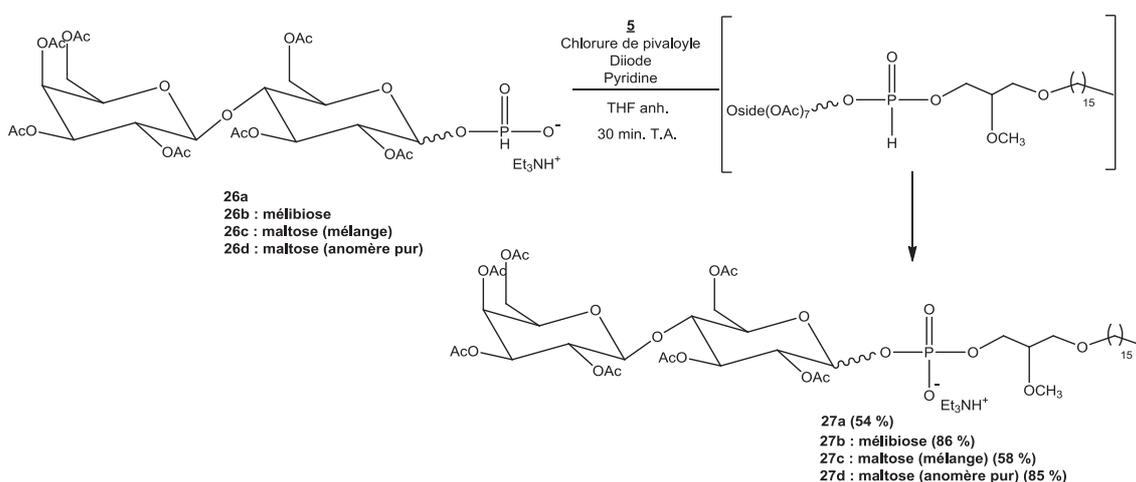


Figure 64 : Schéma réactionnel de formation des phosphates **27**

N.B. : Nous avons, dans un premier temps, réalisé cette synthèse avec le chlorure d'adamantanoyle mais suite à des problèmes de purification et dans le but d'optimiser la réaction, nous avons opté pour le chlorure de pivaloyle qui est le chlorure d'acide généralement utilisé.

¹²² Hall, R.H. ; Todd A. ; Webb, R.F. *Nucleotides* **1957**, Part XLI, 3291-3296

3.3. Réaction de déprotection des glycophospholipides

Une fois les glycophospholipides obtenus, il reste à déprotéger les disaccharides et pour cela ils sont traités par du carbonate de potassium afin de les déacétyler. Nous nous sommes basés sur les travaux de Plattner et coll.⁸⁰ qui déprotège ses analogues de la camptothécine à l'aide de K_2CO_3 dans du méthanol. Les produits, obtenus sous forme de solides blancs, ne nécessitent pas d'autre purification. Les rendements vont de 80 à 100 % (Figure 65).

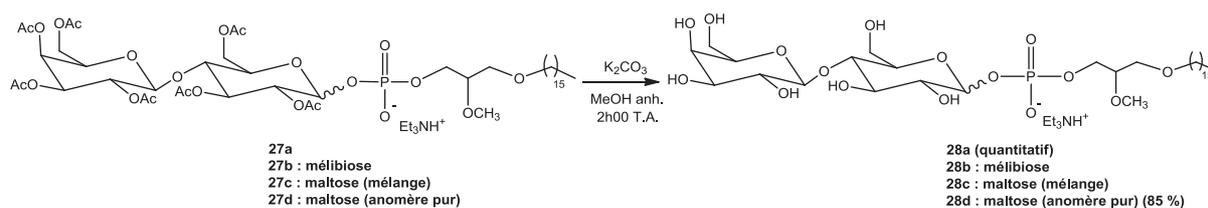


Figure 65 : Schéma réactionnel de déprotection des disaccharides **28**

Afin de caractériser les différents produits obtenus, ainsi que leurs formes protégées, nous nous sommes basés sur les spectres RMN 1H , ^{13}C Jmod, ^{31}P , COSY, HMBC, HMQC, ainsi que sur les études menées en spectrométrie de masse ESI-TOF et en infra-rouge.

4 - Synthèse du glycothiophospholipide disaccharidique **30**

4.1. Généralités

Les thiophosphates, ou phosphorothioates, sont des composés qui pendant de longues années ont été considérés comme « artificiels » et « non-naturels » car ils résultaient tous de la synthèse organique, d'abord comme pesticides mais, plus récemment, comme composés thérapeutiques (notamment comme analogues de nucléotides)¹²³. Ce sont également des composés utilisés comme agents mimétiques des acides nucléiques afin d'étudier les mécanismes biologiques¹²⁴. La plupart du temps, ces composés sont synthétisés dans le but d'obtenir des produits plus résistants à l'hydrolyse, notamment face aux nucléases, d'augmenter l'affinité avec les protéines et de retarder la clairance plasmique tout en conservant certaines propriétés de leurs analogues phosphates (perméabilité à la

¹²³ Uhlman, E. ; Peyman, A. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 543-584

¹²⁴ Guga, P. ; Koziolkiewicz, M. *Chem. Biodiv.* **2011**, *8*, 1642-1681

membrane, pharmacocinétique, etc)¹²⁵. Il a fallu attendre 2007 et les travaux de Wang et coll. pour que soit mis en évidence le premier phosphorothioate naturel dans un fragment d'ADN de bactérie¹²⁶.

Dans le but de stabiliser nos produits face à l'activité enzymatique des organismes, nous avons réalisé la synthèse de glycothiophospholipides, analogues de nos précédents composés mais présentant un motif P-S au lieu du motif P-O (Figure 66). Ces composés devraient présenter une solubilité légèrement plus faible que les dérivés phosphates (augmentation du domaine hydrophobe), mais être moins sensibles à la dégradation par les phospholipases présentes dans les différents organismes.

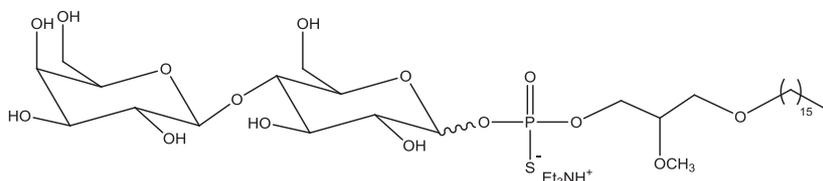


Figure 66 : Glycothiophospholipide synthétisé **30**

4.2. Synthèse du glycothiophospholipide **30**

Pour cette synthèse nous avons suivi la méthode du *H*-phosphonate. Comme nous l'avons précédemment décrit, cette voie nécessite le passage par un phosphite intermédiaire après l'activation de la molécule par un chlorure d'acide (chlorure de pivaloyle, chlorure d'adamantanoyle, etc). Ce phosphite mis en présence d'une solution de diiode nous a permis d'obtenir les glycothiophospholipides précédemment étudiés. Afin de synthétiser un thiophosphate, plusieurs études montrent la possibilité de réaliser une sulfuration directe à l'aide de soufre natif en lieu et place de l'oxydation par le diiode¹²⁷ (Figure 67).

¹²⁵ a) Brown, D.A. ; Kang, S.H. ; Gryaznov, S.M. ; DeDionisio, L. ; Heidenreich, O. ; Sullivan S. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 26801-26805. b) Graham, M.J. ; Croke, S.T. ; Monteith, D.K. ; Cooper, S.R. ; Lemonidis, K.M. ; Stecker, K.K. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *286*, 447-458. c) Butler, M. ; Croke, R.M. ; Graham, M.J. ; Lemonidis, K.M. ; Loughheed, M. ; Murray, S.F. ; Witchell, D. ; Steinbrecher, U.R.S. ; Bennet, C.F. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *292*, 489-496

¹²⁶ Wang, L. ; Chen, S. ; Xu, T. ; Taghizadeh, K. ; Wishnok, J.S. ; Zhou, X. ; You, D. ; Deng, Z. ; Dedon, P.C. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 709-710

¹²⁷ Vieira de Almeida, M. ; Cleophax, J. ; Gateau-Olesker, A. ; Prestat, G. ; Dubreuil, D. ; Gero, S.D. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 12997-13010

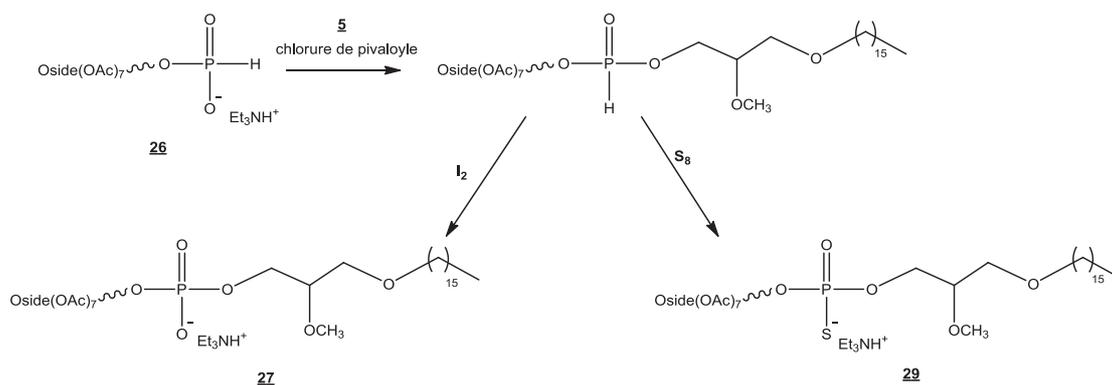


Figure 67 : Oxydation et Sulfuration du phosphite intermédiaire

Dans notre cas, nous avons décidé d'utiliser le réactif de Beaucage, ou 3*H*-1,2-benzodithiol-3-one 1,1-dioxyde¹²⁸, réactif largement utilisé lors de synthèses d'analogues d'oligonucléotides.

Nous nous sommes basés sur les travaux de Greimel et coll.¹²⁹. En partant du phosphite de glycosyle **26a** nous avons condensé l'alcool lipidique **5** comme précédemment puis nous avons réalisé la sulfuration par le réactif de Beaucage afin d'obtenir, après purification par chromatographie, le produit **29** sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 60 %. Ce dernier est alors déprotégé par la méthode classique au carbonate de potassium pour donner le glycothiophospholipide **30** avec un rendement de 72 % (Figure 68). Les différents produits obtenus ont été caractérisés par RMN 1H , ^{13}C Jmod, ^{31}P et, si besoin est, par RMN 2D COSY, HMBC, HMQC, ainsi que par spectrométrie de masse ESI-TOF et infra-rouge.

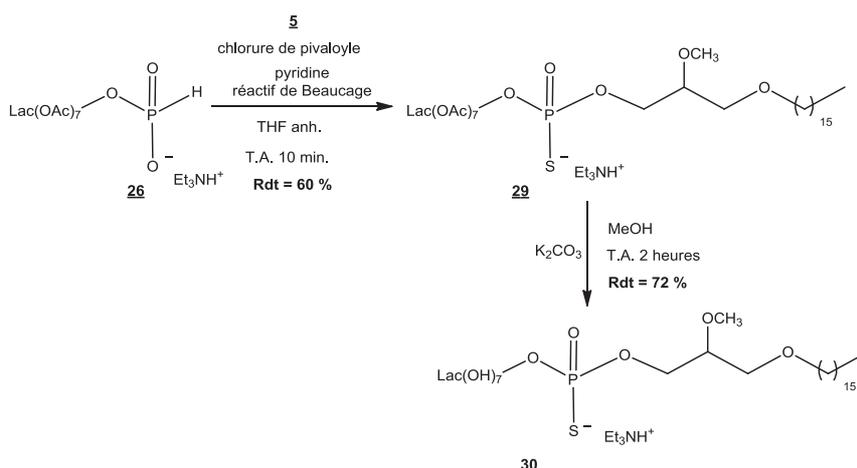


Figure 68 : Schéma réactionnel de synthèse du glycothiophosphate **30**

¹²⁸ Iyer, R.P.; Egan, W.; Regan, J.B.; Beaucage, S.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1253–1254

¹²⁹ Greimel, P. ; Ito, Y. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3562-3566

5 - Etudes physico-chimiques et évaluation biologique des composés

5.1. Etudes de la solubilité des composés dans l'eau

L'un des objectifs de la synthèse de ces glycophospholipides était d'augmenter la solubilité des analogues de l'édelfosine en gardant une structure proche de l'ohmline. Pour cela, nous avons inséré un groupement phosphate entre le disaccharide et le squelette glycérol. Les tests de solubilité dans l'eau ont été réalisés et ils ont montré que l'inclusion d'un groupement phosphate augmente significativement la solubilité des analogues, comme nous nous y attendions. En effet, dans les mêmes conditions, le composé **28a** présente une solubilité quasiment deux fois supérieure à celle de l'ohmline.

A l'instar des glycophospholipides, nous avons étudié la solubilité dans l'eau du glycothiophospholipide que nous avons synthétisé. Ces résultats montrent bien que le changement du motif phosphate par un groupement thiophosphate diminue significativement la solubilité du composé, comme nous nous y attendions. En revanche, elle reste supérieure à celle de l'ohmline (Tableau 2) :

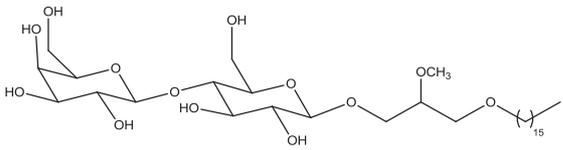
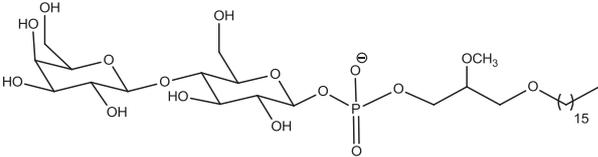
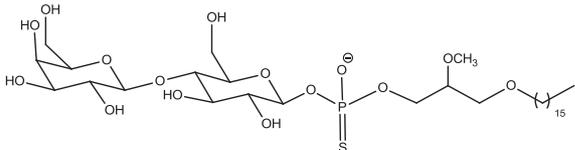
| Composés | Solubilité (mg.mL ⁻¹) | Solubilité (μmol.mL ⁻¹) |
|---|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Ohmline  | 6 | 9 |
| 28a  | 13 | 16 |
| 30  | 8 | 10 |

Tableau 2 : Etude de solubilité

5.2. Evaluation biologique des composés

Les essais biologiques ont été réalisés dans l'unité INSERM U1069 par l'équipe du Pr. Bougnoux. Les différentes études ont été réalisées sur les produits **28** et **30** sur les lignées cellulaires embryonnaires de rein humain exprimant le canal SK3 : les HEK293T-SK3, et n'exprimant pas ce canal : les HEK293T. Le produit de référence utilisé lors de ces tests est l'ohmline. Les mesures de l'inhibition du courant du canal ont été réalisées en utilisant la technique du patch-clamp, la capacité à inhiber la migration des cellules dépendantes du canal SK3 a ensuite été étudiée. La toxicité de nos composés a été évaluée en réalisant des essais au MTT. Enfin, les tests de sélectivité ont été réalisés en utilisant la technique du patch-clamp sur les lignées cellulaires HEK293T-SK1, HEK293T-SK2 et HEK293T-SK4. Les détails des expérimentations seront donnés dans la partie expérimentale.

5.2.1. Etude de l'efficacité d'inhibition du courant du canal SK3 : Patch-clamp

Dans un premier temps, et dans le but d'éliminer les composés inactifs, des études de patch-clamp ont été réalisées afin d'évaluer les effets de nos molécules sur l'inhibition du courant dû au canal SK3 d'une cellule. Ici, les expériences ont été menées sur des cellules entières (« whole-cell configuration »).

Ces études ont montré que l'amplitude du courant dû au canal SK3, mesurée à 0 mV, 3 minutes après l'application des produits à une concentration de 10 μ M, est diminuée de manière similaire pour tous les composés. Nous pouvons également noter que la pureté anomérique du composé **28d** n'influe en rien sur l'efficacité d'inhibition en comparaison du mélange d'énantiomères (Tableau 3) :

| Composés | Inhibition du canal SK3 (%) |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| Ohmline | 73 +/- 5 |
| 28a (lactose) | 69 +/- 4 |
| 28b (mélibiose) | 66 +/- 7 |
| 28c (maltose) | 71 +/- 9 |
| 28d (maltose α/β : 1 : 0) | 60 +/- 11 |

Tableau 3 : Action des analogues de l'édelfosine sur l'activité du canal SK3

5.2.2. Etudes de l'efficacité d'inhibition de la migration cellulaire

L'influence de nos composés sur la migration des cellules exprimant, ou non, cette protéine a ensuite été étudiée. Comme précédemment, des cellules HEK293T (n'exprimant pas SK3) et HEK293T-SK3 (exprimant SK3) sont mises en culture sur une membrane poreuse en présence de nos produits. Le taux de cellules franchissant la membrane permet de déterminer l'incidence des composés sur la capacité qu'ont les cellules à migrer.

Nous pouvons constater qu'il n'y a aucun effet de nos glycophospholipides ou de l'ohmline sur la migration des cellules n'exprimant pas la protéine SK3. En revanche, pour les cellules exprimant ce canal, la migration cellulaire diminue de manière significative en présence de nos produits ou de l'ohmline. En effet, nous pouvons constater une diminution allant de 40 à 50 % de la migration cellulaire. Il n'y a pas de différences significatives entre nos produits et l'ohmline et il ne semble pas avoir d'incidence quant à la pureté anomérique des composés (**28c** et **28d**) (Figure 69).

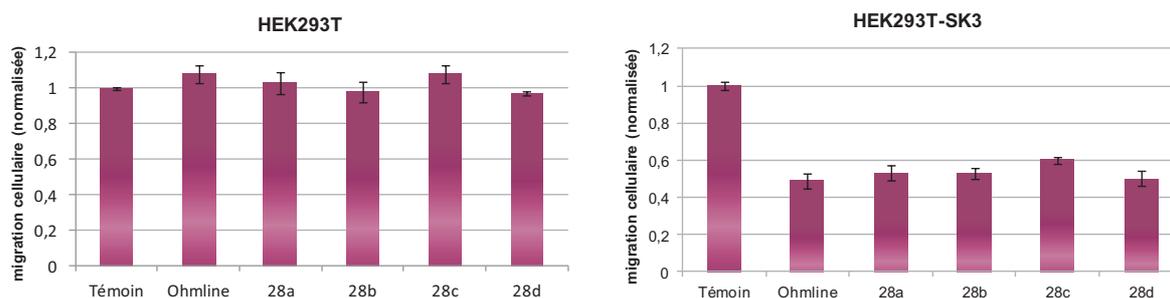


Figure 69 : Effet de nos composés sur la migration de cellules exprimant ou non le canal SK3

5.2.3. Etudes de la toxicité des analogues de l'édelfosine : essais au MTT

La toxicité de nos composés a été évaluée en se basant sur le test MTT.

Nous pouvons constater qu'aucun de nos produits ne présente de toxicité à la concentration testée (10 μ M) après 48 heures d'incubation (Figure 70).

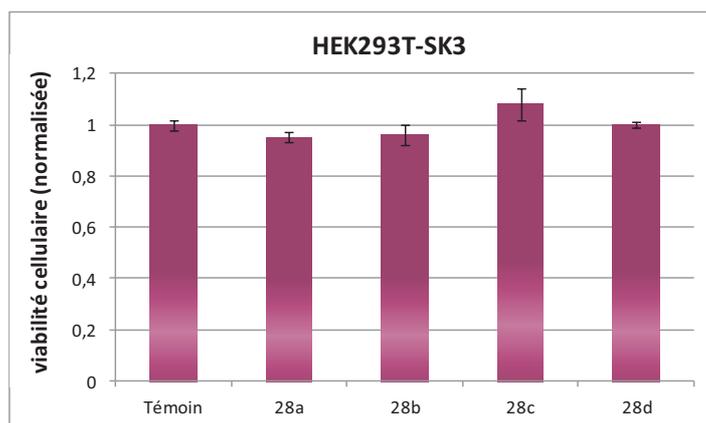


Figure 70 : Etude de la toxicité des composés

5.2.4. Tests de sélectivité vis-à-vis des canaux SKCa

Enfin, des tests de sélectivité vis-à-vis des canaux SKCa ont été réalisés. L'objectif de ce test est de vérifier si nos composés sont uniquement spécifiques au canal SK3 ou s'ils ont une incidence sur l'activité des autres canaux SKCa.

L'étude a été réalisée avec le composé à tête lactose (**28a**) et nous pouvons constater que bien qu'étant un inhibiteur du canal SK3, cette molécule est un activateur des autres canaux SKCa (Figure 71).

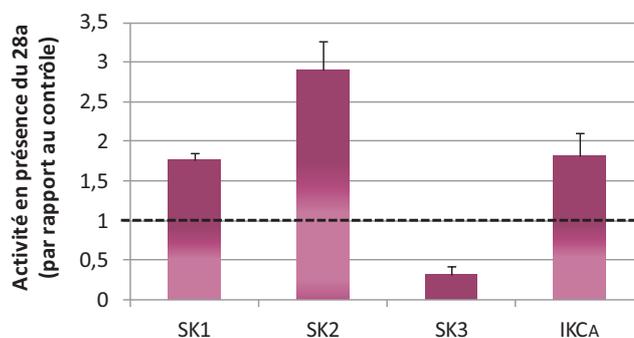


Figure 71 : Tests de sélectivité du composé 28a vis-à-vis des canaux KCa

6 - Conclusion

Les travaux réalisés dans cette partie ont permis de compléter notre étude structure-activité des analogues de l'édelfosine.

Différents disaccharides présentant un motif phosphate lié au squelette glycérol ont pu être obtenus en suivant la voie du *H*-phosphonate ainsi qu'un glycothiophospholipide à tête lactose.

Comme nous nous y attendions les composés obtenus présentent de meilleures solubilités que l'ohmline, notre référence.

Les résultats biologiques montrent qu'il n'y a aucune toxicité de nos produits aux concentrations testées. Ils présentent une efficacité d'inhibition de la migration cellulaire et une inhibition du courant lié à SK3 équivalentes à celles de l'ohmline aux mêmes concentrations. La charge n'induit donc aucun effet sur l'efficacité d'inhibition du canal SK3. Ces résultats ne sont pas sans rappeler ceux obtenus dans les études de Honoré et coll.¹³⁰ qui ont montré que l'activation des canaux potassiques TREK et TRAAK par des lysophospholipides était dépendante non de la charge des lipides mais de la taille de leur tête polaire.

En revanche, l'étude de la sélectivité des glycothiophospholipides pour les autres canaux KCa met en évidence une activation des canaux SK1, SK2 et IKCa lorsqu'ils sont mis en présence de notre glycothiophospholipide dérivé du lactose. Ce résultat surprenant laisserait entendre que la charge de la molécule pourrait jouer un rôle important dans l'activité de ces protéines, l'ohmline n'ayant montré aucune activité sur SK2 et IKCa et une très légère inhibition de SK1.

Nous avons donc synthétisé une gamme de composés extrêmement intéressante quant à sa capacité à inhiber exclusivement SK3.

Dans le but de poursuivre cette étude structure-activité et en nous basant sur les travaux de Honoré et coll.¹³⁰, nous avons décidé de synthétiser un phospholipide portant une tête polaire inositol. En effet, les études sur TREK et TRAAK ont permis de montrer que les lysophospholipides portant une tête polaire très grosse telle que l'inositol étaient les activateurs les plus efficaces de ces protéines (ceci est imputé à la structure globale de la molécule qui est conique par la présence d'une seule chaîne grasse et d'une grosse tête polaire, ce qui déformerait la membrane cellulaire et activerait les canaux TREK et TRAAK).

¹³⁰ a) Maingret, F. ; Patel, A.J. ; Lesage, F. ; Lazdunski, M. ; Honoré, E. *J. Biol. Chem.* **1999**, *275*, 10128-10133. b) Patel, A.J. ; Lazdunski, M. ; Honoré, E. *Curr. Opin. Cell Biol* **2001**, *13*, 422-427

II - Synthèse d'un phospholipide à tête inositol

1 - Généralités

Le *myo*-inositol et ses dérivés phosphorylés sont des molécules bien connues pour leur rôle essentiel dans le métabolisme cellulaire des animaux, des plantes et des microorganismes. Après leur découverte dans les années 1850 par Scherer, ces cyclitols sont rapidement apparus comme des éléments clés de la croissance et du développement des organismes vivants¹³¹. Le phosphatidylinositol est un phospholipide extrêmement abondant dans les membranes cellulaires. Son activation par l'ATP entraîne la formation de phosphatidylinositol-4,5-diphosphate qui va être clivé par la phospholipase C. Cette réaction permet la libération de diacylglycérol (activateur des protéines kinase C, agent de phosphorylation de diverses protéines) et d'inositol triphosphate (IP₃) qui est un activateur des canaux calciques du réticulum endoplasmique (l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire pouvant entraîner l'activation des canaux calciques membranaires). L'inositol et ses dérivés phosphorylés jouent un rôle essentiel dans le contrôle de nombreux signaux de transduction (régulation de l'insuline, d'hormones, de la concentration calcique intracellulaire etc...)¹³² (Figure 72). Plusieurs études ont établi leur capacité à inhiber la prolifération cellulaire et des effets anti-tumoraux leur ont clairement été imputés¹³³.

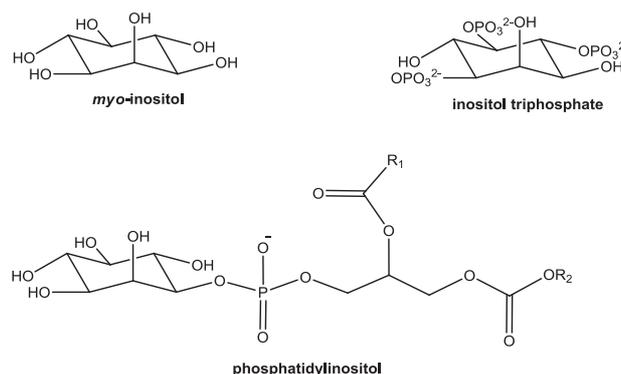


Figure 72 : Structures du *myo*-inositol, du phosphatidylinositol et de l'inositol triphosphate

¹³¹ Loewus, F.A. ; Loewus, M.W. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1983**, *34*, 137-161

¹³² a) Larner, J. *Int. Jnl. Experimental Diab. Res.* **2002**, *3*, 47-60. b) Rapiejko, P.J. ; Northup, J.K. ; Evans, T. ; Brown, J.E. ; Malbon, C.C. *Biochem. J.* **1986**, *240*, 35-40. c) Kishimoto, A. ; Takai, Y. ; Mori, T. ; Kikkawa, U. ; Nishizuka, Y. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 2273-2276. d) Kukuljan, M. ; Vergara, L. ; Stojilkovic, S.S. *Biophys. J.* **1997**, *72*, 698-707

¹³³ Vucenik, I. ; Shamsuddin, A.M. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 3778S-3784S

Suite aux résultats obtenus avec les glycophospholipides, notamment sur la sélectivité vis-à-vis des différents canaux SKCa, nous nous sommes intéressés à la synthèse de phospholipides portant une tête polaire de type *myo*-inositol. L'analogie structurale entre l'édelfosine et les phosphatidylinositols a déjà fait l'objet d'études visant à comparer leurs activités biochimiques et biologiques ainsi que leur potentiel anti-tumoral¹³⁴. Elles ont montré que la tête phosphocholine n'était pas essentielle notamment pour l'inhibition des protéines kinases C et que les dérivés du *myo*-inositol présentaient une alternative intéressante et très peu toxique. Nous avons donc réalisé la synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl (\pm)-*myo*-inosityl phosphate de triéthylammonium **39** afin de comparer l'efficacité de ce produit à celle de nos composés (Figure 73).

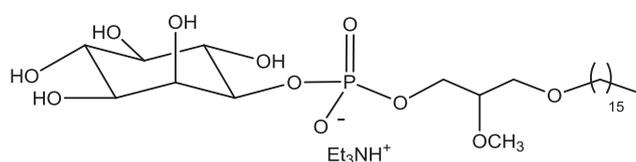


Figure 73 : Structure du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl-(\pm)-*myo*-inosityl phosphate de triéthylammonium **39**

2 - Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl (\pm)-*myo*-inosityl phosphate de triéthylammonium **39**

La protection du cis diol du *myo*-inositol commercial est réalisée par action de 2,2-diméthoxypropane dans du DMSO anhydre¹³⁵ pour donner le composé **31** avec un rendement de 40 %. Les hydroxyles libres sont à leur tour protégés par réaction avec du bromure de benzyle en présence d'hydrure de sodium dans du DMF anhydre⁸⁷. Le produit **32** est obtenu avec un rendement de 69 %. L'acétal est hydrolysé par action d'acide chlorhydrique concentré¹³⁵ pour donner le composé **33** avec un rendement quantitatif. Une allylation régiosélective est effectuée par action d'oxyde de dibutylétain dans du méthanol,

¹³⁴ a) Nosedaa, A. ; Berens, M.E. ; Piantadosi, C. ; Modest, E.J. *Lipids* **1987**, *22*, 878-883. b) Ishaq, K.S. ; Capobianco, M. ; Piantadosi, C. ; Nosedaa, A. ; Daniel, L.W. ; Modest, E.J. *Pharmaceut. Res.* **1989**, *6*, 216-224

¹³⁵ a) Gigg, R. ; Warren, C. D. *J. Chem. Soc. (C)* **1969**, *19*, 2367-2371. b) Gigg, J. ; Gigg, R. ; Payne, S. ; Conant, R. *Carbohydr. Res.* **1985**, *142*, 132-134

suivie d'un ajout de bromure d'allyle et de fluorure de césium dans du DMF¹³⁶. Le produit **34** est isolé avec un rendement de 75 %. L'hydroxyle libre est protégé par réaction avec du bromure de benzyle en présence d'hydruure de sodium dans du DMF anhydre⁸⁷ et le composé **35** est obtenu avec un rendement de 71 %. Le groupement allyle est isomérisé par du tertibutylate de potassium dans du DMSO pour donner le prop-1-ényle correspondant qui est hydrolysé par ajout d'acide chlorhydrique 0,1 M dans de l'acétone¹³⁷ pour donner le produit **36** avec un rendement de 72 % (Figure 74).

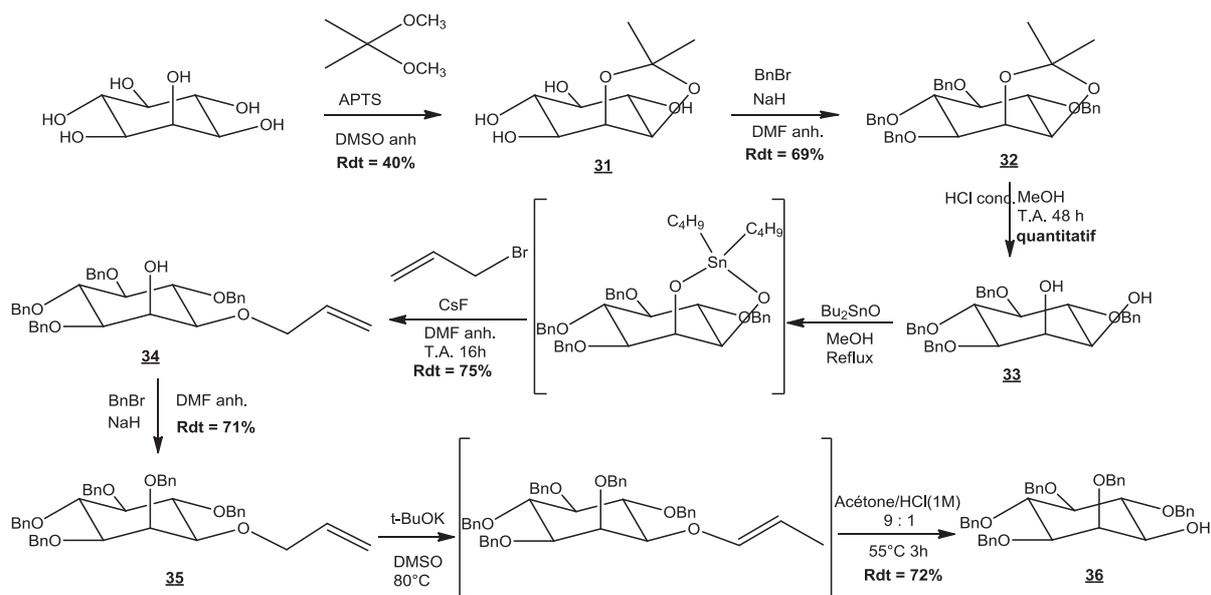


Figure 74 : Schéma de synthèse du (±)-2,3,4,5,6-penta-O-benzyl-myoinositol **36**

Nous nous sommes basés sur la méthode du *H*-phosphonate précédemment employée pour réaliser la synthèse du composé **39**. Dans un premier temps le phosphite **37** est formé quantitativement par action d'imidazole, de PCl_3 et de Et_3N dans de l'acétonitrile¹²¹. La condensation avec le composé **5** *via* l'anhydride mixte formé avec le chlorure de pivaloyle est réalisée et le produit est oxydé par du diiode¹²¹ pour donner le composé **38** avec un rendement de 38 %. L'étape finale de déprotection reste à réaliser pour nous donner le glycérophospholipide attendu (Figure 75). Les différents produits obtenus ont été caractérisés par RMN ^1H , ^{13}C Jmod, ^{31}P et, si besoin est, par RMN 2D COSY, HMBC, HMQC.

¹³⁶ Elie, C. J. J. ; Dreef, C. E. ; Verduyn, R. ; Van Der Marel, G. A. ; Van Boom, J. H. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 3477-3486

¹³⁷ Zhang, F. ; Vasella, A. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 2546-2556

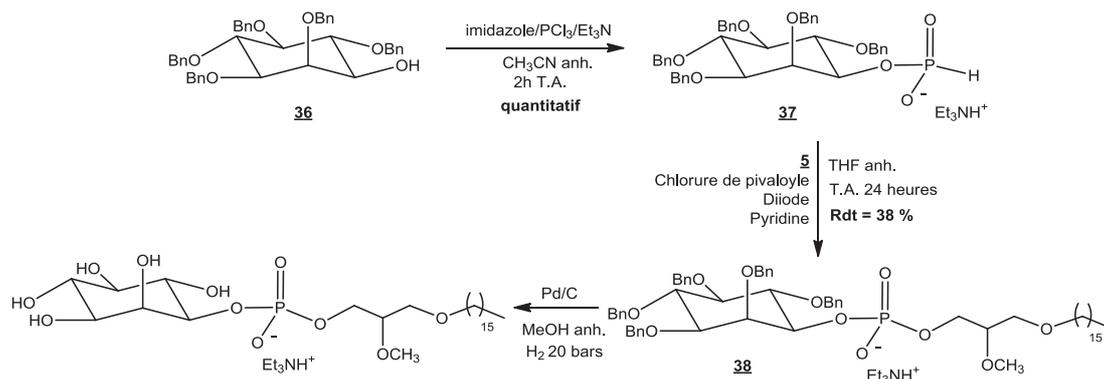


Figure 75 : Schéma de synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl (±)-*myo*-inosityl phosphate de triéthylammonium **39**

III – Synthèse du (3-octadécyloxy-2-méthoxypropyl) phosphate

1 - Généralités

Les composés que nous avons jusqu'alors synthétisés présentent tous une tête polaire visant à substituer le motif choline ou phosphocholine de l'édelfosine. Nous avons voulu voir l'incidence de la suppression de la tête polaire mais en conservant un motif phosphate (les études structure-activité ayant montré que la suppression totale de la tête entraînait une perte de l'activité inhibitrice de la molécule). De plus, à pH physiologique, le groupement phosphate est totalement déprotoné, nous pouvons donc également visualiser l'incidence de la charge, notamment sur la toxicité cellulaire de ces molécules.

2 - Synthèse du (3-octadécyloxy-2-méthoxypropyl)phosphate **41**

La synthèse du composé **41** se déroule suivant la méthode des phosphoramidites. Le composé **40** a été obtenu à partir du diisopropylphosphoramidite de dibenzyle commercial mis en présence de 1*H*-tetrazole et du composé **5** dans du THF anhydre. Le phosphite intermédiaire est oxydé par tBuOOH en présence de Et₃N pour donner le composé **40** avec un rendement de 82 %¹³⁸. Le phosphate est débenzylé en présence de palladium sur charbon sous pression de dihydrogène dans le méthanol pour donner quantitativement le composé **41** (Figure 76). Les différents produits obtenus ont été caractérisés par RMN ¹H, ¹³C Jmod, ³¹P

¹³⁸ Chen, K.H. ; Yang, J.S. ; Hwang, C.Y. ; Fang, J.J. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4401-4404

et, si besoin est, par RMN 2D COSY, HMBC, HMQC, ainsi que par spectrométrie de masse MALDI TOF-TOF et infra-rouge. Le produit a été envoyé à l'équipe « Nutrition, Croissance et Cancer » du Pr. P. Bougnoux de Tours afin que les différents tests biologiques soient réalisés.

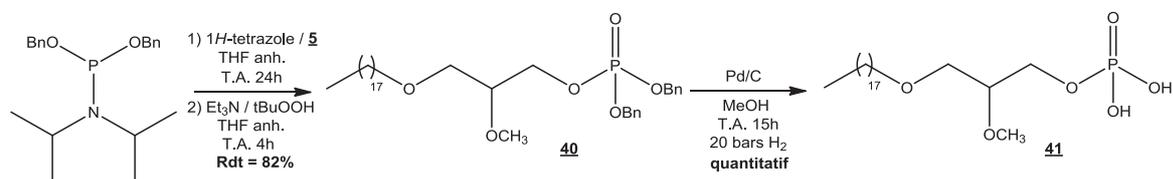


Figure 76 : Schéma de synthèse du (3-octadécyloxy-2-méthoxypropyl)phosphate 41

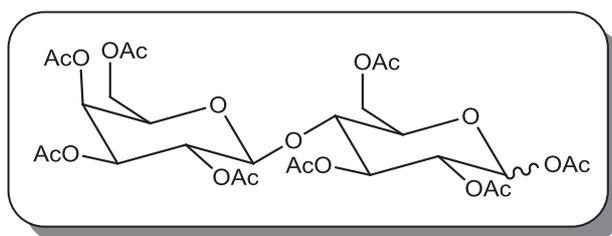
PARTIE EXPERIMENTALE

IV – Partie expérimentale

1 - Procédure générale de protection des disaccharides 24¹¹⁹

A une solution de dissaccharide (6,8 g, 20 mmol) dans de l'acide acétique (60 mL) sont ajoutés de l'anhydride acétique (22,7 mL, 240 mmol) et de l'acide perchlorique (8 gouttes). Le mélange est agité pendant 15 heures à température ambiante et concentré. L'huile obtenue est purifiée par filtration sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/hexane (2 : 1)). Par soucis de clarté, les données RMN ¹H ne prendront en compte que l'anomère α .

Synthèse du 1,2,3,6-tetra-O-acétyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acétyl- β -D-galactopyranosyl)- α , β -D-glucopyranose 24a

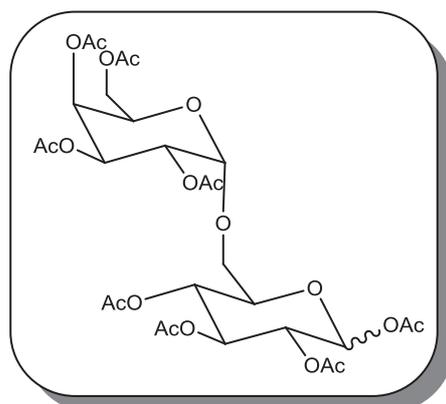


Le produit est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement quantitatif.

Rf (acétate d'éthyle/hexane (2 : 1)) : 0,31

RMN ¹H (400,113 MHz, CDCl₃) : 1,95-2,17 (m, 24H, CH₃) ; 3,72-3,88 (m, 3H, H₄ + H₅ + H_{5'}) ; 4,03-4,14 (m, 3H, H_{6a} + H_{6'}) ; 4,41-4,48 (m, 2H, H_{6a} + H_{1'}) ; 4,94 (dd, 1H, ³J_{HH}=3,6, ³J_{HH}=10,4, H_{3'}) ; 5,00-5,11 (m, 2H, H₂ + H_{2'}) ; 5,23 (t, 1H, ³J_{HH}=9,2, H₃) ; 5,32 (d, 1H, ³J_{HH}=3,2, H_{4'}) ; 5,64 (d, 1H, ³J_{HH}=8,1, H₁)

Synthèse du 1,2,3,4-tetra-O-acétyl-6-O-(2,3,4,6-tetra-O-acétyl- α -D-galactopyranosyl)- α,β -D-glucopyranose 24b

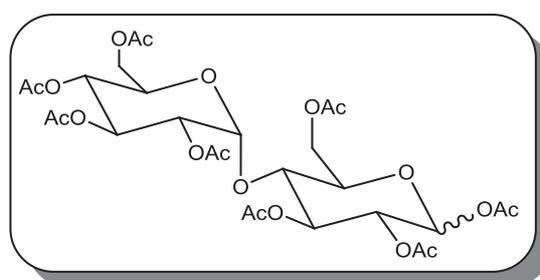


Le produit est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement quantitatif.

Rf (acétate d'éthyle/hexane (2 : 1)) : 0,38

RMN ^1H (300,135 MHz, CDCl_3) : 1,92-2,13 (m, 24H, CH_3) ; 3,54-3,65 (m, 2H, H_6) ; 4,00-4,15 (m, 4H, $H_5 + H_5' + H_6'$) ; 4,98-5,12 (m, 4H, $H_2 + H_4 + H_1' + H_2'$) ; 5,20-5,26 (m, 1H, H_4') ; 5,32-5,41 (m, 2H, $H_3 + H_3'$) ; 6,21 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}}=3,5$, H_1)

Synthèse du 1,2,3,6-tetra-O-acétyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acétyl- α -D-glucopyranosyl)- α,β -D-glucopyranose 24c



Le produit est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement quantitatif.

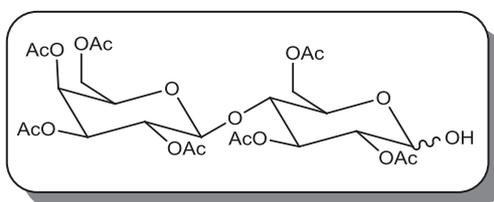
Rf (acétate d'éthyle/hexane (1 : 2)) : 0,60

RMN ^1H (300,135 MHz, CDCl_3) : 1,91-2,14 (m, 24H, CH_3) ; 3,93-3,97 (m, 1H, H_4) ; 4,99-4,05 (m, 2H, $H_5 + H_5'$) ; 4,13-4,18 (m, 3H, $H_{6a} + H_6'$) ; 4,28-4,36 (m, 1H, H_{6b}) ; 4,80 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}}=4,0$, $^3J_{\text{HH}}=11,0$, H_2) ; 4,88 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}}=4,0$, $^3J_{\text{HH}}=11,0$, H_2') ; 4,99 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}}=9,7$, H_4') ; 5,25-5,36 (m, 2H, $H_1' + H_3'$) ; 5,42 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}}=9,7$, H_3) ; 6,15 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}}=3,6$, H_1)

2 - Procédure générale de déprotection sélective des disaccharides 25⁷⁷

A une solution de **24** (6,80 g, 10,0 mmol) dans du DMF anhydre (15 mL) est ajouté de l'acétate d'ammonium (1,70 g, 22,0 mmol). Le mélange est agité pendant 48 heures à température ambiante et l'avancement de la réaction est contrôlé par CCM (éluant : acétate d'éthyle/hexane (2 : 1)). Le mélange est concentré et l'huile obtenue est purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/hexane (2 : 1)). Par soucis de clarté, les données RMN ¹H ne prendront en compte que l'anomère α .

Synthèse du 2,3,6-tri-O-acétyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acétyl- β -D-galactopyranosyl)- α , β -D-glucopyranose 25a

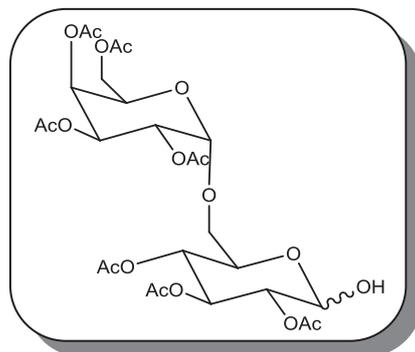


Le produit est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 91 %.

Rf (acétate d'éthyle/hexane (2 : 1)) : 0,43

RMN ¹H (400,113 MHz, CDCl₃) : 1,94-2,13 (m, 21H, CH₃) ; 3,13 (s large, 1H, OH) ; 3,76 (t, 1H, ³J_{HH}=10,0, H₄) ; 3,88 (t, 1H, ³J_{HH}=6,0, H_{5'}) ; 4,08-4,20 (m, 4H, H₅ + H_{6a} + H_{6'}) ; 4,46-4,54 (m, 2H, H_{6b} + H_{1'}) ; 4,84 (dd, 1H, ³J_{HH}=4,0, ³J_{HH}=10,0, H₂) ; 4,93-4,97 (m, 1H, H_{3'}) ; 5,08-5,13 (m, 1H, H_{2'}) ; 5,34-5,40 (m, 2H, H₁ + H_{4'}) ; 5,53 (t, 1H, ³J_{HH}= 10,0, H₃)

Synthèse du 2,3,4-tri-O-acétyl-6-O-(2,3,4,6-tetra-O-acétyl- α -D-galactopyranosyl)- α,β -D-glucopyranose 25b

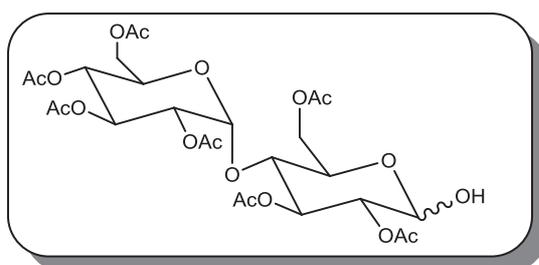


Le produit, obtenu avec un rendement de 85 %, se présente sous la forme d'un solide blanc.

Rf (acétate d'éthyle/hexane (2 : 1)) : 0,52

RMN ^1H (300,135 MHz, CDCl_3) : 1,97-2,13 (m, 21H, CH_3) ; 3,60-3,75 (m, 2H, H_6) ; 4,01-4,18 (m, 3H, $H_5 + H_{6'}$) ; 4,24-4,32 (m, 1H, $H_{5'}$) ; 4,40 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}}=3,6$, H_1) ; 4,80-4,87 (m, 1H, H_2) , 4,93 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}}=10,0$, H_4) ; 5,05-5,10 (m, 1H, $H_{1'}$) ; 5,14 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}}=3,5$, H_2') ; 5,29-5,34 (m, 1H, H_3') ; 5,38-5,42 (m, 2H, $H_1 + H_{4'}$) ; 5,54 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}}=10,0$, H_3)

Synthèse du 2,3,6-tri-O-acétyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acétyl- α -D-glucopyranosyl)- α,β -D-glucopyranose 25c



Le produit est obtenu avec un rendement de 86 % et se présente sous forme d'un solide blanc.

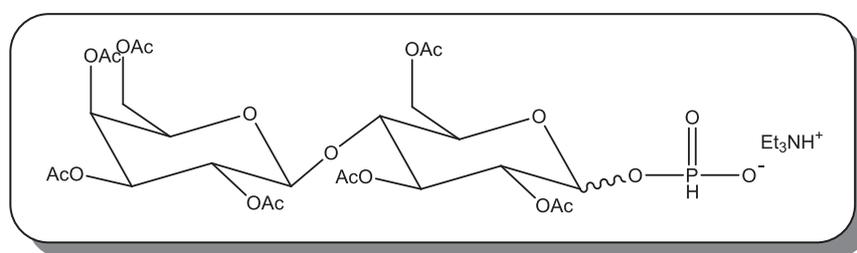
Rf (acétate d'éthyle/hexane (2 : 1)) : 0,52

RMN ^1H (400,089 MHz, CDCl_3) : 2,00-2,17 (m, 21H, CH_3) ; 3,73-3,76 (m, 1H, H_4) ; 3,96-4,07 (m, 2H, $H_5 + H_{6a}$) ; 4,17-4,27 (m, 3H, $H_{5'} + H_{6'}$) ; 4,47-4,52 (m, 1H, H_{6b}) ; 4,76-4,88 (m, 2H, $H_2 + H_{2'}$) ; 5,03-5,09 (m, 1H, $H_{4'}$) ; 5,35-5,47 (m, 3H, $H_1 + H_{1'} + H_{3'}$) ; 5,58 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}}=10,0$, H_3)

3 - Procédure générale de synthèse du phosphite disaccharidique **26**¹²¹

A une solution d'imidazole (1,41 g, 20,7 mmol) dans de l'acétonitrile anhydre (30 mL) à 0°C sont ajoutés, au goutte-à-goutte, du trichlorure de phosphore (1,93 mL, 6,20 mmol) et de la triéthylamine (3,12 mL, 23,1 mmol). Le milieu est agité pendant 20 minutes à 0°C puis le composé **25** (900 mg, 1,42 mmol) en solution dans de l'acétonitrile anhydre (30 mL) est ajouté au goutte-à-goutte. La solution est agitée à température ambiante pendant 2 heures après quoi quelques millilitres d'eau sont ajoutés. Le milieu est agité pendant 15 minutes puis du CH₂Cl₂ (100 mL) est ajouté. La phase organique est lavée par trois fois à l'eau (25 mL) et la phase aqueuse est extraite par trois fois au CH₂Cl₂ (25 mL). Les phases organiques rassemblées sont séchées sur MgSO₄, filtrées et concentrées. L'huile brune obtenue est utilisée sans autre purification. Par soucis de clarté, les données RMN ¹H et ¹³C ne prendront en compte que l'anomère α.

Synthèse du 2,3,6-tri-O-acétyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acétyl-β-D-galactopyranosyl)-α,β-D-glucopyranosyl phosphite de triéthylammonium **26a**

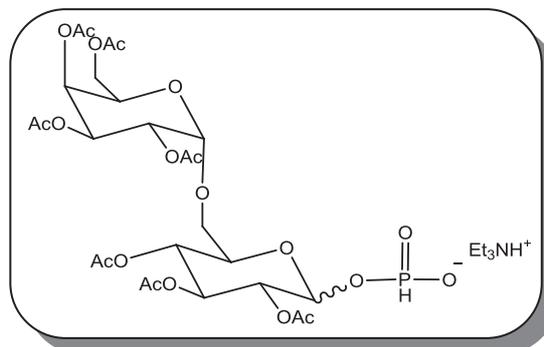


Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre jaune avec un rendement de 87 %.

RMN ³¹P (161,958 MHz, CDCl₃) : 0,63 (anomère α); 1,68 (anomère β) (α : β= 7 : 3)

RMN ¹H (400,082 MHz, CDCl₃) : 1,28 (t, 9H, ³J_{HH}=7,2, CH₃ (Et₃NH⁺)) ; 1,92-2,14 (m, 21H, CH₃) ; 3,00 (q, 6H, ³J_{HH}=7,2, CH₂ (Et₃NH⁺)) ; 3,76 (t, 1H, ³J_{HH}=9,6, H₄) ; 3,80-3,86 (m, 1H, H_{5'}) ; 4,04-4,13 (m, 3H, H₅ + H_{6'}) ; 4,41-4,48 (m, 3H, H₆ + H_{1'}) ; 4,82-4,84 (m, 1H, H₂) ; 4,91-4,96 (m, 1H, H_{3'}) ; 5,06 (t, 1H, ³J_{HH}=9,0, H_{2'}) ; 5,30-5,33 (m, 1H, H_{4'}) ; 5,45 (t, 1H, ³J_{HH}=9,6, H₃) ; 5,72 (dd, 1H, ³J_{HH}=3,2, ³J_{HH}=8,8, H₁) ; 6,17 (d, 1H, ¹J_{PH}=636, PH)

Synthèse du 2,3,4-tri-O-acétyl-6-O-(2,3,4,6-tetra-O-acétyl- α -D-galactopyranosyl)- α,β -D-glucopyranosyl phosphite de triéthylammonium 26b

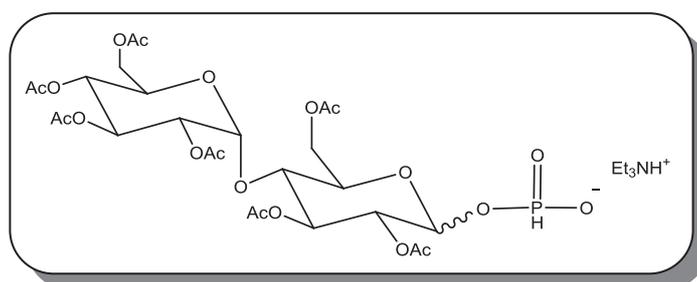


Le produit est obtenu sous forme d'une poudre jaune avec un rendement de 87 %.

RMN ^{31}P (161,970 MHz, CDCl_3) : 0,21 (anomère α) ; 1,27 (anomère β) (α : β = 7 : 3)

RMN ^1H (400,133 MHz, CDCl_3) : 1,31 (t, 9H, $^3J_{\text{HH}}=7,2$, CH_3 (Et_3NH^+)) ; 1,95-2,11 (m, 21H, CH_3) ; 3,04 (q, 6H, $^3J_{\text{HH}}=7,2$, CH_2 (Et_3NH^+)) ; 3,52-3,55 (m, 1H, H_{6b}) ; 3,69-3,72 (m, 1H, H_{6a}) ; 4,03-4,07 (m, 2H, H_6') ; 4,17-4,26 (m, 2H, H_5 , H_5') ; 4,86 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}}=7,0$, $^3J_{\text{HH}}=4,0$, H_2) ; 5,06-5,20 (m, 3H, H_4 , $H_{1'}$, H_2') ; 5,25 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}}=7,0$, $^3J_{\text{HH}}=4,0$, H_3') ; 5,43 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}}=4,0$, H_4') ; 5,52 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}}=7,0$, H_3) ; 5,74 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}}=7,0$, $^3J_{\text{HH}}=4,0$, H_1) ; 6,12 (d, 1H, $^1J_{\text{PH}}=640$ Hz, PH) ; 7,99 (s, 1H, NH (Et_3NH^+))

Synthèse du 2,3,6-tri-O-acétyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acétyl- α -D-glucopyranosyl)- α,β -D-glucopyranosyl phosphite de triéthylammonium 26c

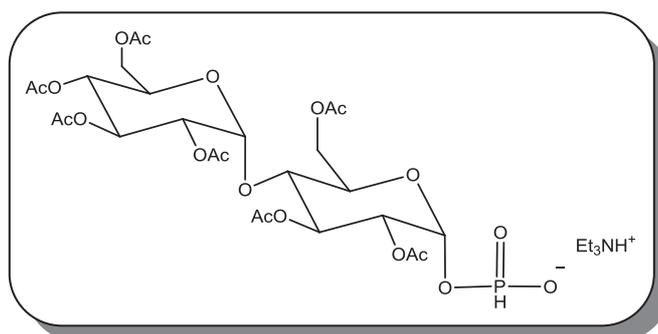


Le produit est obtenu sous forme d'une poudre jaune avec un rendement de 84 %.

RMN ^{31}P (161,970 MHz, CDCl_3) : 1,14 (anomère α) ; 1,77 (anomère β) (α : β = 7 : 3)

RMN ^1H (400,133 MHz, CDCl_3) : 1,32 (t, 9H, $^3J_{\text{HH}}=7,2$, CH_3 (Et_3NH^+)) ; 1,95-2,10 (m, 21H, CH_3) ; 3,03 (q, 6H, $^3J_{\text{HH}}=7,2$, CH_2 (Et_3NH^+)) ; 3,92-4,03 (m, 4H, $H_4 + H_{5'} + H_{6'}$) ; 4,17-4,25 (m, 2H, $H_5 + H_{6a}$) ; 4,33-4,48 (m, 1H, H_{6b}) ; 4,78-4,88 (m, 2H, $H_2, H_{2'}$) ; 5,01-5,07 (m, 1H, $H_{4'}$) ; 5,30-5,41 (m, 2H, $H_{1'} + H_{3'}$) ; 5,59 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}}=7,0$, H_3) ; 5,72 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}}=7,0$, $^3J_{\text{HH}}=4,0$, H_1) ; 6,19 (d, 1H, $^1J_{\text{PH}}=640$, PH) ; 7,95 (s, 1H, NH (Et_3NH^+))

Synthèse du 2,3,6-tri-O-acétyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acétyl- α -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranosyl phosphite de triéthylammonium 26d



Dans le but d'obtenir l'anomère α pur, le composé **26c** est dissous dans du CH_3CN anhydre et du H_3PO_3 (20 équivalents) est ajouté. La solution est agitée pendant 20 heures à température ambiante. La phase organique est lavée 2 fois par une solution saturée en hydrogénocarbonate de sodium puis deux fois par une solution tampon d'hydrogénocarbonate de triéthylammonium (0,1 M ; pH = 8,4). La phase aqueuse est extraite 4 fois au CH_2Cl_2 et les phases organiques rassemblées sont séchées sur MgSO_4 , filtrées sur coton et concentrées. Le produit **26d** est obtenu sous la forme d'une poudre jaune pâle avec un rendement de 70 %.

RMN ^{31}P (161,958 MHz, CDCl_3) : 1,31 (anomère α)

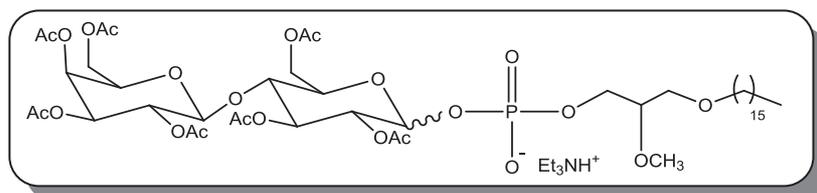
RMN ^1H (400,133 MHz, CDCl_3) : 1,32 (t, 9H, $^3J_{\text{HH}}=7,2$, CH_3 (Et_3NH^+)) ; 1,95-2,10 (m, 21H, CH_3) ; 3,03 (q, 6H, $^3J_{\text{HH}}=7,2$, CH_2 (Et_3NH^+)) ; 3,92-4,03 (m, 4H, $H_4 + H_{5'} + H_{6'}$) ; 4,17-4,25 (m, 2H, $H_5 + H_{6a}$) ; 4,33-4,48 (m, 1H, H_{6b}) ; 4,78-4,88 (m, 2H, $H_2, H_{2'}$) ; 5,01-5,07 (m, 1H, $H_{4'}$) ; 5,30-5,41 (m, 2H, $H_{1'} + H_{3'}$) ; 5,59 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}}=7,0$, H_3) ; 5,72 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}}=7,0$, $^3J_{\text{HH}}=4,0$, H_1) ; 6,19 (d, 1H, $^1J_{\text{PH}}=640$, PH) ; 7,95 (s, 1H, NH (Et_3NH^+))

4 - Procédure générale de synthèse des glycophospholipides protégés

27¹²¹

A une solution de **26** (120 mg, 0,15 mmol) dans du THF anhydre (3,2 mL) sur tamis moléculaire 4 Å est ajoutée de la pyridine (0,61 mL, 7,50 mmol), la solution est agitée 30 minutes à température ambiante. Le milieu est amené à 0°C et le composé **5** (49 mg, 0,15 mmol) en solution dans du THF anhydre (2,7 mL) est ajouté en une fois immédiatement suivi de chlorure de pivaloyle (0,05 mL, 0,37 mmol). La solution est agitée pendant 30 minutes à température ambiante puis une solution de diiode (76 mg, 0,30 mmol, 0,197 M) dans un mélange pyridine-eau (95 : 5) est ajoutée. Après 30 minutes, l'excès de diiode est réduit par une solution de Na₂S₂O₃ (1M) (5 mL) et la phase aqueuse est extraite par trois fois au CH₂Cl₂ (5 mL). Les phases organiques combinées sont lavées successivement à l'eau (3 mL) puis deux fois par une solution tampon d'hydrogénocarbonate de triéthylammonium (0,1 M, pH = 8,4) (5 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂-MeOH-Et₃N (99 : 0 : 1) → (94 : 5 : 1)) pour obtenir un solide amorphe. Afin d'ôter l'excès de sel de triéthylammonium, le produit est repris dans le toluène, filtré et concentré pour donner le produit pur. Par soucis de clarté, les données RMN ¹H et ¹³C ne prendront en compte que l'anomère α.

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl 2,3,6-tri-O-acétyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acétyl-β-D-galactopyranosyl)-α,β-D-glucopyranosyl phosphate de triéthylammonium 27a



Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre jaune avec un rendement de 54 %.

Rf (CH₂Cl₂/MeOH/Et₃N (89 : 10 : 1)) : 0,14

IR (ATR, cm⁻¹) : 1044 (P-O) ; 1226 (P=O) ; 1717 (C=O) ; 2292-2852 (C-H)

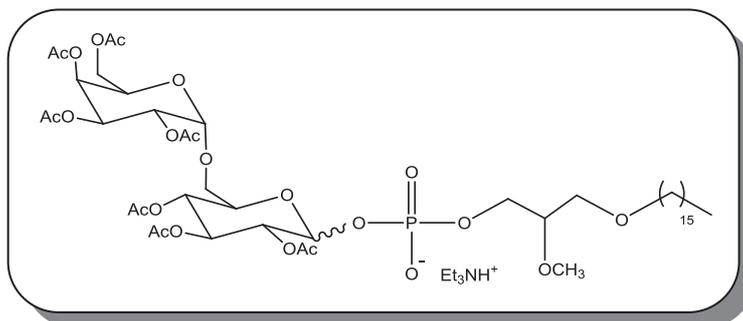
RMN ³¹P (161,970 MHz, CDCl₃) : -1,91 (anomère α), 1,89 (anomère β) (α : β = 7: 3)

RMN ¹H (400,082 MHz, CDCl₃) : 0,86 (t, 3H, ³J_{HH}=6,4, CH₃ chaîne grasse) ; 1,17-1,25 (m, 26H, CH₂ chaîne grasse) ; 1,31 (t, 9H, ³J_{HH}=7,2, CH₃ (Et₃NH⁺)) ; 1,48-1,54 (m, 2H, CH₂ β chaîne grasse) ; 1,94-2,13 (m, 21H, CH₃ (OAc)) ; 3,08 (q, 6H, ³J_{HH}=7,2, CH₂ (Et₃NH⁺)) ; 3,39-3,57 (m, 5H, CH₂ α chaîne grasse + CH sn-2 + CH₂ sn-1) ; 3,43 (s, 3H, OCH₃) ; 3,79 (t, 1H, ³J_{HH}=9,6, H₄) ; 3,85 (t, 1H, ³J_{HH}=6,8, H_{5'}) ; 3,91-3,98 (m, 2H, CH₂ sn-3) ; 4,04-4,15 (m, 4H, H₅, H_{6a}, H_{6'}) ; 4,44-4,50 (m, 2H, H_{6b}, H_{1'}) ; 4,83 (d, 1H, ³J_{HH}=10,4, H₂) ; 4,93 (dd, 1H, ²J_{HH}=10,4, ³J_{HH}=3,2, H₃) ; 5,05 (t, 1H, ³J_{HH}=9,2, H_{2'}) ; 5,31-5,34 (m, 1H, H_{4'}) ; 5,45 (t, 1H, ³J_{HH}=9,8, H₃) ; 5,64-5,67 (m, 1H, H₁)

RMN ¹³C (75,480 MHz, CDCl₃) : 9,0 (CH₃ (Et₃NH⁺)) ; 14,4 (CH₃ chaîne grasse), 20,9 (CH₃ (OAc)) ; 21,2 (CH₃ (OAc)) ; 22,9 (CH₂ chaîne grasse) ; 26,3 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,6 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,9 (CH₂ chaîne grasse) ; 32,1 (CH₂ chaîne grasse) ; 46,2 (CH₂ (Et₃NH⁺)) ; 58,1 (OCH₃) ; 61,1 (C_{6'}) ; 61,8 (C₆) ; 65,2 (CH₂ sn-3) ; 66,9 (C_{4'}) ; 69,3 (C₅, C_{2'}) ; 70,0 (C₃) ; 70,8 (CH₂ sn-1) ; 72,0 (CH₂ α chaîne grasse) ; 76,1 (C₄) ; 79,8 (CH sn-2) ; 92,1 (C₁) ; 101,3 (C_{1'}) ; 169,2 (CO) ; 170,0 (CO) ; 170,4 (CO) ; 170,6 (CO)

HRMS (ESI-TOF): m/z calculé pour C₄₆H₇₆O₂₃P [M-Et₃N-2H] 1027,45205 ; trouvé 1027,4518

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl 2,3,4-tri-O-acétyl-6-O-(2,3,4,6-tetra-O-acétyl- α -D-galactopyranosyl)- α,β -D-glucopyranosyl phosphate de triéthylammonium 27b



Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre jaune avec un rendement de 86 %.

Rf (CH₂Cl₂/MeOH/Et₃N (89 : 10 : 1)) : 0,44

IR (ATR, cm⁻¹) : 1035 (P-O) ; 1247 (P=O) ; 1750 (C=O) ; 2922-2852 (C-H)

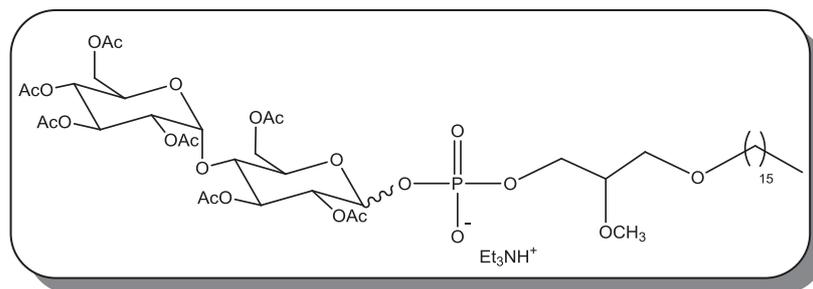
RMN ³¹P (161,970 MHz, CDCl₃) : -2,42 (anomère α) ; 0,22. (anomère β), (α : β = 8 : 2)

RMN ¹H (400,052 MHz, CDCl₃) : 0,81 (t, 3H, ³J_{HH}=6,4, CH₃ chaîne grasse) ; 1,19-1,25 (m, 26H, CH₂ chaîne grasse) ; 1,28 (t, 9H, ³J_{HH}=7,0, CH₃ (Et₃NH⁺)) ; 1,47-1,53 (m, 2H, CH₂ β chaîne grasse) ; 1,93-2,14 (m, 21H, CH₃ (OAc)) ; 3,03 (q, 6H, ³J_{HH}=7,0, CH₂ (Et₃NH⁺)) ; 3,35-3,46 (m, 8H, CH₂ sn-1 + CH₂ sn-3 + CH sn-2 + OCH₃) ; 3,47-3,54 (m, 2H, H_{6a}) ; 3,65-3,72 (m, 1H, H_{6b}) ; 3,86-3,93 (m, 2H, CH₂ α chaîne grasse) ; 4,00-4,04 (m, 2H, H_{6'}) ; 4,15 (q, 1H, ³J_{HH}=6,4 Hz, H_{5'}) ; 4,19-4,22 (m, 2H, H₅) ; 4,82-4,85 (m, 1H, H₂) ; 4,91 (t, 1H, ³J_{HH}=6,4, H_{2'}) ; 5,03 (dd, 1H, ²J_{HH}=11,2, ³J_{HH}=3,6, H_{1'}) ; 5,15-5,20 (m, 1H, H₄) ; 5,25-5,30 (m, 1H, H_{3'}) ; 5,41-5,44 (m, 1H, H_{4'}) ; 5,48 (t, 1H, ³J_{HH}=6,4, H₃) ; 5,65-5,70 (m, 1H, H₁) ; 7,26 (s, 1H, NH (Et₃NH⁺))

RMN ¹³C (125,816 MHz, CDCl₃) : 8,5 (CH₃ (Et₃NH⁺)) ; 13,8 (CH₃ chaîne grasse) ; 20,4 (CH₃ (OAc)) ; 20,5 (CH₃ (OAc)) ; 22,4 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,1 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,2 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,3 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,4 (CH₂ chaîne grasse) ; 31,6 (CH₂ chaîne grasse) ; 45,8 (CH₂ (Et₃NH⁺)) ; 57,5 (OCH₃) ; 61,4 (C_{6'}) ; 64,8 (C₆) ; 65,1 (CH₂ sn-3) ; 65,9 (C_{5'}) ; 67,3 (C_{3'}) ; 67,7-67,8 (C_{2'} + C_{4'} + C₄) ; 69,1 (C₅) ; 69,8 (C₃) ; 70,0 (CH₂ sn-1) ; 70,1 (C₂) ; 71,5 (CH₂ α chaîne grasse) ; 79,1 (CH sn-2) ; 91,7 (C₁) ; 96,4 (C_{1'}) ; 169,0 (CO) ; 169,5 (CO) ; 169,8 (CO) ; 169,9 (CO) ; 170,1 (CO) ; 170,3 (CO)

HRMS (ESI-TOF) : m/z calculé pour C₄₆H₇₆O₂₃P [M-Et₃N-2H] 1027,45205 ; trouvé 1027,4524

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl 2,3,6-tri-O-acétyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acétyl- α -D-glucopyranosyl)- α,β -D-glucopyranosyl phosphate de triéthylammonium 27c



Le produit est obtenu sous la forme d'une poudre jaune avec un rendement de 58 %.

Rf (CH₂Cl₂/MeOH/Et₃N (89 : 10 : 1)) : 0,43

IR (ATR, cm⁻¹) : 1054 (P-O) ; 1235 (P=O) ; 1751 (C=O) ; 2850-2917 (C-H)

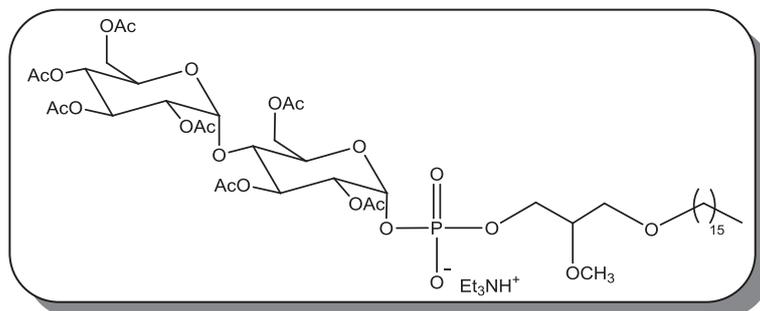
RMN ³¹P (161,970 MHz, CDCl₃) : -2,30 (anomère α) ; -2,08 (anomère β), (α : β = 1 : 1)

RMN ¹H (400,082 MHz, CDCl₃) : 0,85 (t, 3H, ³J_{HH}=6,8, CH₃ chaîne grasse) ; 1,18-1,30 (m, 26H, CH₂ chaîne grasse) ; 1,31 (t, 9H, ³J_{HH}=7,4, CH₃ (Et₃NH⁺)) ; 1,48-1,54 (m, 2H, CH₂ β chaîne grasse) ; 1,98-2,11 (m, 21H, CH₃ (OAc)) ; 3,06 (q, 6H, ³J_{HH}=7,4, CH₂ (Et₃NH⁺)) ; 3,38-3,56 (m, 5H, CH₂ α chaîne grasse + CH *sn*-2 + CH₂ *sn*-1) ; 3,44 (s, 3H, OCH₃ glycérol) ; 3,92-4,06 (m, 5H, H₄ + H_{5'} + H_{6'a} + CH₂ *sn*-3) ; 4,13-4,31 (m, 3H, H₅ + H_{6a} + H_{6'b}) ; 4,47-4,52 (m, 1H, H_{6b}) ; 4,82-4,86 (m, 1H, H₂ + H_{2'}) ; 5,06 (t, 1H, ³J_{HH}=10,0, H_{4'}) ; 5,33 (t, 1H, ³J_{HH}=10,0, H_{3'}) ; 5,40 (d, 1H, ³J_{HH}=4,0, H_{1'}) ; 5,58 (t, 1H, ³J_{HH}=10,0, H₃) ; 5,58-5,64 (m, 1H, H₁) ; 11,62 (s, 1H, NH (Et₃NH⁺))

RMN ¹³C (75,480 MHz, CDCl₃) : 8,5 (CH₃ (Et₃NH⁺)) ; 14,1 (CH₃ chaîne grasse) ; 20,6 (CH₃ (OAc)) ; 20,7 (CH₃ (OAc)) ; 20,8 (CH₃ (OAc)) ; 20,9 (CH₃ (OAc)) ; 22,7 (CH₂ chaîne grasse) ; 26,1 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,3 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,5 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,6 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,7 (CH₂ chaîne grasse) ; 31,9 (CH₂ chaîne grasse) ; 45,7 (CH₂ (Et₃NH⁺)) ; 57,8 (OCH₃) ; 61,3 (C_{6'}) ; 62,5 (C₆) ; 65,0 (CH₂ *sn*-3) ; 68,0 (C_{4'}) ; 68,3 (C₅) ; 68,6 (C_{5'}) ; 69,4 (C_{3'}) ; 70,1 (C₂) ; 70,4 (CH₂ *sn*-1) ; 70,7 (C_{2'}) ; 71,8 (CH₂ α chaîne grasse) ; 72,3 (C₄) ; 72,4 (C₃) ; 79,3 (CH *sn*-2) ; 91,7 (C₁) ; 95,5 (C_{1'}) ; 169,5 (CO) ; 169,8 (CO) ; 170,3 (CO) ; 170,5 (CO) ; 170,6 (CO)

HRMS (ESI-TOF) : m/z calculé pour C₄₆H₇₆O₂₃P [M-Et₃N-2H] 1027,45205 ; trouvé 1027,4527

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl 2,3,6-tri-O-acétyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acétyl- α -D-glucopyranosyl)- α -D-glucopyranosyl phosphate de triéthylammonium 27d



Le produit est obtenu sous la forme d'un solide jaune avec un rendement de 85 %.

Rf (CH₂Cl₂/MeOH/Et₃N (89 : 10 : 1)) : 0,42

IR (ATR, cm⁻¹) : 1030 (P-O) ; 1219 (P=O) ; 1750 (C=O) ; 2853-2923 (C-H).

RMN ³¹P (161,970 MHz, CDCl₃) : -2,17 (anomère α)

RMN ¹H (400,082 MHz, CDCl₃) : 0,85 (t, 3H, ³J_{HH}=6,8, CH₃ chaîne grasse) ; 1,18-1,30 (m, 26H, CH₂ chaîne grasse) ; 1,31 (t, 9H, ³J_{HH}=7,4, CH₃ (Et₃NH⁺)) ; 1,48-1,54 (m, 2H, CH₂ β chaîne grasse) ; 1,98-2,11 (m, 21H, CH₃ (OAc)) ; 3,06 (q, 6H, ³J_{HH}=7,4, CH₂ (Et₃NH⁺)) ; 3,38-3,56 (m, 5H, CH₂ α chaîne grasse + CH *sn*-2 + CH₂ *sn*-1) ; 3,44 (s, 3H, OCH₃ glycérol) ; 3,92-4,06 (m, 5H, H₄ + H_{5'} + H_{6'a} + CH₂ *sn*-3) ; 4,13-4,31 (m, 3H, H₅ + H_{6a} + H_{6'b}) ; 4,47-4,52 (m, 1H, H_{6b}) ; 4,82-4,86 (m, 1H, H₂ + H_{2'}) ; 5,06 (t, 1H, ³J_{HH}=10,0, H_{4'}) ; 5,33 (t, 1H, ³J_{HH}=10,0, H_{3'}) ; 5,40 (d, 1H, ³J_{HH}=4,0, H_{1'}) ; 5,58 (t, 1H, ³J_{HH}=10,0, H₃) ; 5,58-5,64 (m, 1H, H₁) ; 11,62 (s, 1H, NH (Et₃NH⁺))

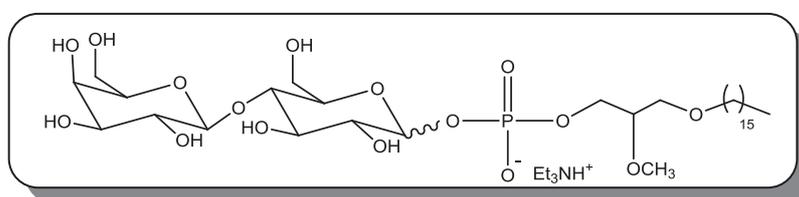
RMN ¹³C (75,480 MHz, CDCl₃) : 8,5 (CH₃ (Et₃NH⁺)) ; 14,1 (CH₃ chaîne grasse) ; 20,6 (CH₃ (OAc)) ; 20,7 (CH₃ (OAc)) ; 20,8 (CH₃ (OAc)) ; 20,9 (CH₃ (OAc)) ; 22,7 (CH₂ chaîne grasse) ; 26,1 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,3 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,5 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,6 (CH₂ chaîne grasse) ; 29,7 (CH₂ chaîne grasse) ; 31,9 (CH₂ chaîne grasse) ; 45,7 (CH₂ (Et₃NH⁺)) ; 57,8 (OCH₃) ; 61,3 (C_{6'}) ; 62,5 (C₆) ; 65,0 (CH₂ *sn*-3) ; 68,0 (C_{4'}) ; 68,3 (C₅) ; 68,6 (C_{5'}) ; 69,4 (C_{3'}) ; 70,1 (C₂) ; 70,4 (CH₂ *sn*-1) ; 70,7 (C_{2'}) ; 71,8 (CH₂ α chaîne grasse) ; 72,3 (C₄) ; 72,4 (C₃) ; 79,3 (CH *sn*-2) ; 91,7 (C₁) ; 95,5 (C_{1'}) ; 169,5 (CO) ; 169,8 (CO) ; 170,3 (CO) ; 170,5 (CO) ; 170,6 (CO)

HRMS (ESI-TOF) : m/z calculé pour C₄₆H₇₆O₂₃P [M-Et₃N-2H] 1027,45205; trouvé 1027,4523

5 - Procédure générale de déprotection des glycophospholipides 28⁸⁰

A une solution de 27 (150 mg, 0,13 mmol) dans du méthanol (15 mL) est ajouté du carbonate de potassium (9 mg, 0,065 mmol), la solution est agitée 2 heures à température ambiante. Une pointe de spatule d'amberlite IR120-H est ajoutée au milieu qui est agité 30 minutes à température ambiante. La solution est filtrée sur célite et concentrée pour donner un solide blanc cassé ne nécessitant pas de purification. Par soucis de clarté, les RMN ¹H et ¹³C ne prendrons en compte que l'anomère α .

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl 4-O- β -D-galactopyranosyl- α , β -D-glucopyranosyl phosphate de triéthylammonium 28a



Le produit est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement quantitatif.

$[\alpha]_D^{20} +52$ (*c* 1,0 ; MeOH)

IR (ATR, cm⁻¹) : 1050 (P-O) ; 1222 (P=O) ; 2852-2922 (C-H) ; 3325 (O-H)

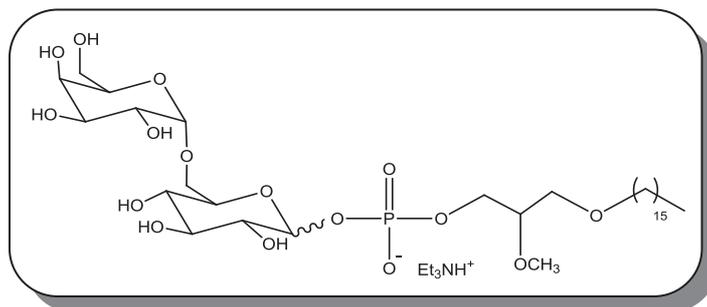
RMN ³¹P (161,970 MHz, CD₃OD) : -1,24 (anomère α) ; 0,33 (anomère β)

RMN ¹H (500,303 MHz, CD₃OD) : 0,84 (t, 3H, ³J_{HH}=6,8, CH₃ chaîne grasse) ; 1,34-1,36 (m, 26H, CH₂ chaîne grasse) ; 1,55 (qt, 2H, ³J_{HH}=6,8, CH₂ β chaîne grasse) ; 3,40-3,62 (m, 10H, CH₂ α chaîne grasse + OCH₃ + CH *sn*-2 + CH₂ *sn*-1 + CH₂ *sn*-3) ; 3,71-3,96 (m, 14H, H₂ + H₃ + H₄ + H₅ + H₆ + H_{2'} + H_{3'} + H_{4'} + H_{5'} + H_{6'}) ; 4,34 (d, 1H, ³J_{HH}=7,5, H_{1'}) ; 5,47-5,49 (m, 1H, H₁) ; 6,97 (s, 1H, NH (Et₃NH⁺))

RMN ¹³C (125,816 MHz, CD₃OD) : 8,5 (CH₃ (Et₃NH⁺)) ; 14,5 (CH₃ chaîne grasse) ; 23,7 (CH₂ chaîne grasse) ; 27,2 (CH₂ chaîne grasse) ; 30,5 (CH₂ chaîne grasse) ; 30,6 (CH₂ chaîne grasse) ; 30,7 (CH₂ chaîne grasse) ; 30,8 (CH₂ chaîne grasse) ; 33,1 (CH₂ chaîne grasse) ; 45,7 (CH₂ (Et₃NH⁺)) ; 58,3 (OCH₃) ; 61,6 (C_{6'}) ; 62,5 (C₆) ; 67,6 (CH₂ *sn*-3) ; 70,3 (C_{4'}) ; 71,5 (CH₂ *sn*-1) ; 72,5 (C_{2'} + C₂) ; 72,7 (CH₂ α chaîne grasse) ; 73,3 (C_{3'}) ; 73,4 (C₅) ; 74,7 (C₃) ; 77,1 (C_{5'}) ; 80,7 (CH *sn*-2) ; 81,0 (C₄) ; 96,5 (C₁) ; 105,2 (C_{1'})

HRMS (ESI-TOF) : m/z calculé pour C₃₂H₆₂O₁₆P [M-Et₃N-2H] 733,3781; trouvé 733,3778

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl 6-O- α -D-galactopyranosyl- α,β -D-glucopyranosyl phosphate de triéthylammonium 28b



Le produit est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 82 %.

$[\alpha]_D^{20} +52$ (c 1,0 ; MeOH)

IR (ATR, cm^{-1}) : 1053 (P-O) ; 1221 (P=O) ; 2851-2920 (C-H) ; 3293 (O-H)

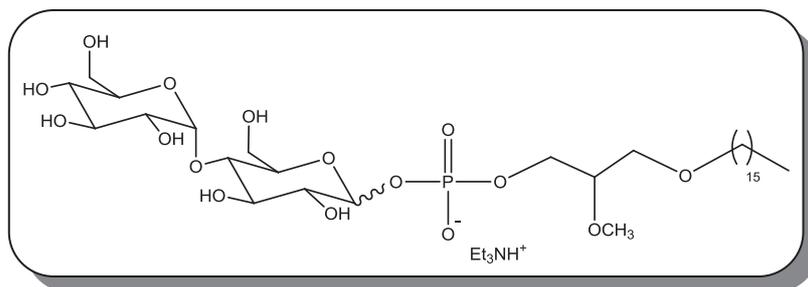
RMN ^{31}P (161,970 MHz, CD_3OD) : -1,32 (anomère α) ; -1,21 (anomère β) ($\alpha : \beta = 7 : 3$)

RMN ^1H (400,052 MHz, CD_3OD) : 0,82 (t, 3H, $^3J_{\text{HH}}=6,8$, CH_3 chaîne grasse) ; 1,13-1,25 (m, 26H, CH_2 chaîne grasse) ; 1,36-1,48 (m, 2H, CH_2 β chaîne grasse) ; 3,35 (s, 3H, OCH_3 glycérol) ; 3,30-3,90 (m, 19H, $H_2 + H_3 + H_4 + H_5 + H_6 + H_{2'} + H_{3'} + H_{4'} + H_{5'} + H_{6'} + \text{CH}_2$ α chaîne grasse + CH $sn-2$ + CH_2 $sn-1$ + CH_2 $sn-3$) ; 4,90-4,92 (m, 1H, $H_{1'}$) ; 5,32-5,36 (m, 1H, H_1)

RMN ^{13}C (125,816 MHz, CD_3OD): 14,4 (CH_3 chaîne grasse) ; 23,7 (CH_2 chaîne grasse) ; 27,2 (CH_2 chaîne grasse) ; 30,5 (CH_2 chaîne grasse) ; 30,6 (CH_2 chaîne grasse) ; 30,8 (CH_2 chaîne grasse) ; 33,1 (CH_2 chaîne grasse) ; 58,3 (OCH_3) ; 62,6 (C_6) ; 65,9 ($\text{C}_{6'}$) ; 69,0 (CH_2 $sn-3$) ; 71,5 (CH_2 $sn-1$) ; 72,4 (CH_2 α chaîne grasse) ; 70,1 ; 70,9 ; 71,2 ; 71,4 ; 71,5 ; 72,4 ; 75,6 ($\text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_4 + \text{C}_{2'} + \text{C}_{3'} + \text{C}_{4'} + \text{C}_{5'}$) ; 71,5 (CH_2 $sn-1$) ; 77,7 (C_5) ; 80,8 (CH $sn-2$) ; 95,9 (C_1) ; 99,7 ($\text{C}_{1'}$)

HRMS (ESI-TOF) : m/z calculé pour $\text{C}_{32}\text{H}_{62}\text{O}_{16}\text{P}$ [M- $\text{Et}_3\text{N}-2\text{H}$] 733,3781; trouvé 733,3778

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl 4-O- α -D-glucopyranosyl- α,β -D-glucopyranosylphosphate de triéthylammonium 28c



Le produit est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement quantitatif.

$[\alpha]_D^{20}$ -55 (c 1,0 ; MeOH)

IR (ATR, cm^{-1}) : 1055 (P-O) ; 1222 (P=O) ; 2851-2918 (C-H) ; 3310 (O-H)

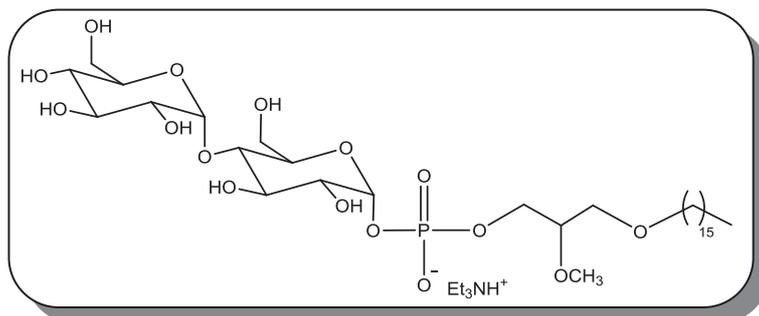
RMN ^{31}P (161,970 MHz, CD_3OD) : 0,03 (anomère α) ; 0,09 (anomère β) ($\alpha : \beta = 1 : 1$)

RMN ^1H (400,052 MHz, CD_3OD) : 0,78 (t, 3H, $^3J_{\text{HH}}=6,8$, CH_3 chaîne grasse) ; 1,17-1,25 (m, 26H, CH_2 chaîne grasse) ; 1,40-1,48 (m, 2H, CH_2 β chaîne grasse) ; 3,36 (s, 3H, OCH_3 glycérol) ; 3,33-3,90 (m, 19H, $H_2 + H_3 + H_4 + H_5 + H_6 + H_{2'} + H_{3'} + H_{4'} + H_{5'} + H_{6'} + \text{CH}_2$ α chaîne grasse + CH $sn-2$ + CH_2 $sn-1$ + CH_2 $sn-3$) ; 5,05-5,07 (m, 1H, $H_{1'}$) ; 5,36-5,40 (m, 1H, H_1)

RMN ^{13}C (75,480 MHz, CD_3OD) : 7,6 (CH_3 (Et_3NH^+)) ; 14,3 (CH_3 chaîne grasse) ; 23,7 (CH_2 chaîne grasse) ; 27,2 (CH_2 chaîne grasse) ; 30,5 (CH_2 chaîne grasse) ; 30,6 (CH_2 chaîne grasse) ; 30,7 (CH_2 chaîne grasse) ; 30,8 (CH_2 chaîne grasse) ; 33,1 (CH_2 chaîne grasse) ; 58,3 (OCH_3) ; 61,9 (C_6) ; 62,7 ($\text{C}_{6'}$) ; 65,9 (CH_2 $sn-3$) ; 71,5 (CH_2 $sn-1$) ; 72,7 (CH_2 α chaîne grasse) ; 71,5 ; 73,2 ; 73,6 ; 74,3 ; 74,8 ; 75,1 ($\text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_{2'} + \text{C}_{3'} + \text{C}_{4'} + \text{C}_{5'}$) ; 76,7 (C_5) ; 80,3 (CH $sn-2$) ; 81,6 (C_4) ; 95,9 (C_1) ; 102,5 ($\text{C}_{1'}$)

HRMS (ESI-TOF) : m/z calculé pour $\text{C}_{32}\text{H}_{62}\text{O}_{16}\text{P}$ [M- $\text{Et}_3\text{N}-2\text{H}$] 733,3781; trouvé 733,3780

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl 4-O- α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranosylphosphate de triéthylammonium 27d



Le produit est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement quantitatif.

$[\alpha]_D^{20}$ -53 (c 1,0 ; MeOH)

IR (ATR, cm^{-1}) : 1052 (P-O) ; 1223 (P=O) ; 2850-2917 (C-H) ; 3307 (O-H)

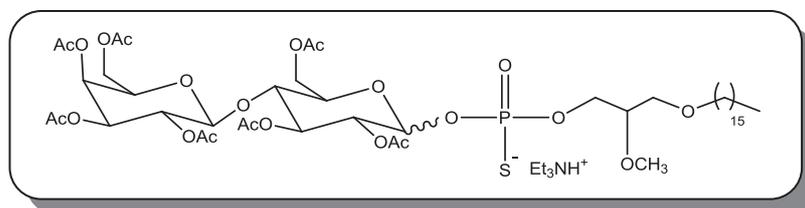
RMN ^{31}P (161,970 MHz, CD_3OD) : -1,91 (anomère α)

RMN ^1H (400,052 MHz, CD_3OD) : 0,78 (t, 3H, $^3J_{\text{HH}}=6,8$, CH_3 chaîne grasse) ; 1,17-1,25 (m, 26H, CH_2 chaîne grasse) ; 1,40-1,48 (m, 2H, CH_2 β chaîne grasse) ; 3,36 (s, 3H, OCH_3 glycérol) ; 3,33-3,90 (m, 19H, $H_2 + H_3 + H_4 + H_5 + H_6 + H_{2'} + H_{3'} + H_{4'} + H_{5'} + H_{6'} + \text{CH}_2$ α chaîne grasse + $\text{CH}_{sn-2} + \text{CH}_2_{sn-1} + \text{CH}_2_{sn-3}$) ; 5,05-5,07 (m, 1H, $H_{1'}$) ; 5,36-5,40 (m, 1H, H_1)

RMN ^{13}C (75,480 MHz, CD_3OD) : 7,6 (CH_3 (Et_3NH^+)) ; 14,3 (CH_3 chaîne grasse) ; 23,7 (CH_2 chaîne grasse) ; 27,2 (CH_2 chaîne grasse) ; 30,5 (CH_2 chaîne grasse) ; 30,6 (CH_2 chaîne grasse) ; 30,7 (CH_2 chaîne grasse) ; 30,8 (CH_2 chaîne grasse) ; 33,1 (CH_2 chaîne grasse) ; 58,3 (OCH_3) ; 61,9 (C_6) ; 62,7 (C_6') ; 65,9 (CH_2_{sn-3}) ; 71,5 (CH_2_{sn-1}) ; 72,7 (CH_2 α chaîne grasse) ; 71,5 ; 73,2 ; 73,6 ; 74,3 ; 74,8 ; 75,1 ($\text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_{2'} + \text{C}_{3'} + \text{C}_{4'} + \text{C}_{5'}$) ; 76,7 (C_5) ; 80,3 (CH_{sn-2}) ; 81,6 (C_4) ; 95,9 (C_1) ; 102,5 ($\text{C}_{1'}$)

HRMS (ESI-TOF) : m/z calculé pour $\text{C}_{32}\text{H}_{62}\text{O}_{16}\text{P}$ [$\text{M}-\text{Et}_3\text{N}-2\text{H}$] 733,3781; trouvé 733,3782

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl 2,3,6-tri-O-acétyl-4-O-(2,3,4,6-tetra-O-acétyl-β-D-galactopyranosyl)-α,β-D-glucopyranosylthiophosphate de triéthylammonium
29



A une solution de **26a** (900 mg, 1,12 mmol) dans du THF anhydre (24,3 mL) sur tamis moléculaire 4 Å est ajoutée de la pyridine (4,53 mL, 56,2 mmol) et la solution est agitée 2 heures à T.A.. Le milieu est amené à 0°C et le composé **5** (370 mg, 1,12 mmol) en solution dans du THF anhydre (20,4 mL) est ajouté en une fois immédiatement suivi de chlorure de pyvaloyle (0,35 mL, 2,81 mmol). La solution est agitée pendant 20 minutes à température ambiante puis une solution de réactif de Beaucage (450 mg, 2,25 mmol, 0,2M dans du THF anhydre) est ajoutée. Après 10 minutes les phases organiques combinées sont lavées successivement à l'eau puis par une solution tampon d'hydrogénocarbonate de triéthylammonium (0,1 M, pH=8,4). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée sur coton et concentrée. Le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : éther de pétrole-CH₂Cl₂-MeOH-Et₃N (99 : 0 : 0 : 1) → (0 : 95 : 4 : 1)) pour obtenir une cire. Afin d'ôter l'excès de sel de triéthylammonium, le produit est repris dans le toluène, filtré sur coton et concentré. Le produit est obtenu sous la forme d'une cire jaune pâle avec un rendement de 60 %.

Rf (CH₂Cl₂/MeOH/Et₃N (95 : 4 : 1)) : 0,33

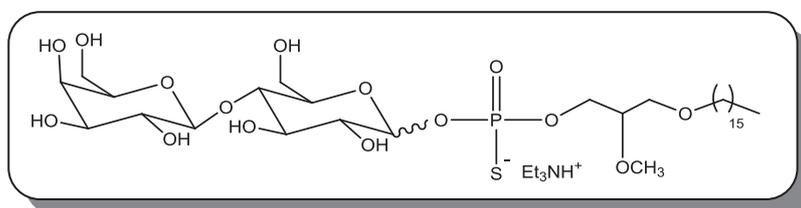
RMN ³¹P (161,946 MHz, CDCl₃) : 57,67 (anomère α) ; 58,37 (anomère β) (α : β = 1 : 1)

RMN ¹H (400,045 MHz, CDCl₃) : 0,84 (t, 3H, ³J_{HH}=6,4, CH₃ chaine grasse) ; 1,20-1,32 (m, 26H, CH₂ chaine grasse) ; 1,34 (t, 9H, ³J_{HH}=7,2, CH₃ (Et₃NH⁺)) ; 1,48-1,56 (m, 2H, CH₂ β chaine grasse) ; 1,94-2,13 (m, 21H, CH₃ (OAc)) ; 3,08 (q, 6H, ³J_{HH}=7,2, CH₂ (Et₃NH⁺)) ; 3,37-3,59 (m, 8H, CH₂ α chaine grasse + CH sn-2 + CH₂ sn-1 + OCH₃) ; 3,79-3,98 (m, 4H, H₄ + H_{5'} + CH₂ sn-3) ; 4,04-4,15 (m, 4H, H₅ + H_{6a} + H_{6'}) ; 4,44-4,50 (m, 2H, H_{6b} + H_{1'}) ; 4,83-4,95 (m, 2H, H₂ + H_{3'}) ; 5,08(t, 1H, ³J_{HH}=9,2, H_{2'}) ; 5,31-5,34 (m, 1H, H_{4'}) ; 5,45 (m, 1H, H₃) ; 5,82-5,90 (m, 1H, H₁)

RMN ^{13}C (100,603 MHz, CDCl_3) : 8,4 (CH_3 (Et_3NH^+)) ; 13,9 (CH_3 chaine grasse) ; 20,3 (CH_3 (OAc)) ; 20,4 (CH_3 (OAc)) ; 20,6 (CH_3 (OAc)) ; 20,7 (CH_3 (OAc)) ; 22,5 (CH_2 chaine grasse) ; 25,9 (CH_2 chaine grasse) ; 29,2 (CH_2 chaine grasse) ; 29,5 (CH_2 chaine grasse) ; 31,7 (CH_2 chaine grasse) ; 45,4 (CH_2 (Et_3NH^+)) ; 58,1 (OCH_3) ; 60,6 (C_6') ; 61,3 (C_6) ; 65,2 (CH_2 *sn*-3) ; 66,5 (C_4') ; 68,9 (C_5 , C_2') ; 70,6 (CH_2 *sn*-1) ; 70,9 (C_3) ; 71,5 (CH_2 α chaine grasse) ; 75,7 (C_4), 79,1 (CH *sn*-2) ; 92,1 (C_1) ; 100,9 (C_1') ; 169,0 (CO) ; 170,0 (CO) ; 170,2 (CO)

HRMS (ESI-TOF) : m/z calculé pour $\text{C}_{46}\text{H}_{76}\text{O}_{22}\text{PS}$ [M- Et_3N -2H] 1043,42921 ; trouvé 1027,4290

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl 4-O- β -D-galactopyranosyl- α , β -D-glucopyranosylthiophosphate de triéthylammonium 30



A une solution de **29** (150 mg, 0,13 mmol) dans du méthanol (15 mL) est ajouté du carbonate de potassium (43 mg, 0,07 mmol), la solution est agitée 2 heures à température ambiante. Une pointe de spatule d'Amberlyste IR120-H est ajoutée au milieu qui est agité 30 minutes à température ambiante. La solution est filtrée sur célite, concentrée et chromatographiée sur colonne de gel de silice (éluant : CH_2Cl_2 -MeOH- Et_3N (99 : 0 : 1) \rightarrow (70 : 29 : 1)) pour donner un solide blanc cassé avec un rendement de 72 %.

Rf (CH_2Cl_2 /MeOH/ Et_3N (90 : 9 : 1)) : 0,26

IR (ATR, cm^{-1}) : 1057 (P-O) ; 1392 (P=O) ; 2852-2922 (C-H) ; 3190 (O-H)

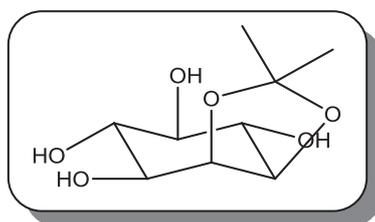
RMN ^{31}P (161,970 MHz, CD_3OD) : 57,9 (anomère α) ; 58,7 (anomère β)

RMN ^1H (400,012 MHz, CD_3OD) : 0,83 (t, 3H, $^3J_{\text{HH}}=6,8$, CH_3 chaine grasse) ; 1,34-1,36 (m, 26H, CH_2 chaine grasse) ; 1,55 (qt, 2H, $^3J_{\text{HH}}=6,8$, CH_2 β chaine grasse) ; 3,40-3,62 (m, 10H, CH_2 α chaine grasse + OCH_3 + CH *sn*-2 + CH_2 *sn*-1 + CH_2 *sn*-3) ; 3,71-3,96 (m, 14H, H_2 + H_3 + H_4 + H_5 + H_6 + H_2' + H_3' + H_4' + H_5' + H_6') ; 4,34 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}}=7,5$, H_1') ; 5,47-5,49 (m, 1H, H_1)

RMN ¹³C (100,593 MHz, CD₃OD) : 15,4 (CH₃ chaine grasse) ; 24,2 (CH₂ chaine grasse) ; 27,5 (CH₂ chaine grasse) ; 30,5 (CH₂ chaine grasse) ; 30,7 (CH₂ chaine grasse) ; 30,9 (CH₂ chaine grasse) ; 31,1 (CH₂ chaine grasse) ; 33,5 (CH₂ chaine grasse) ; 58,3 (OCH₃) ; 61,6 (C_{6'}) ; 62,5 (C₆) ; 67,6 (CH₂ *sn*-3) ; 70,0 (C_{4'}) ; 71,5 (CH₂ *sn*-1) ; 72,4 (C_{2'} + C₂) ; 72,9 (CH₂ α chaine grasse) ; 75,3 (C_{3'}) ; 75,8 (C₅) ; 76,2 (C₃) ; 76,8 (C_{5'}) ; 79,8 (CH *sn*-2) ; 81,0 (C₄) ; 97,3 (C₁) ; 104,4 (C_{1'})

HRMS (ESI-TOF) : m/z calculé pour C₃₂H₆₂O₁₅PS [M-Et₃N-2H] 749,35526 ; trouvé 733,3560

Synthèse du (±)-1,2-O-isopropylidene-*myo*-inositol 31¹³⁵



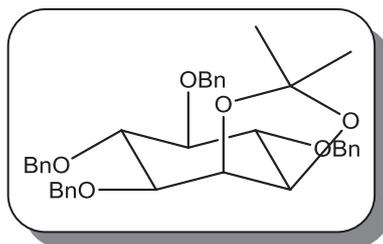
A une solution de *myo*-inositol (18,0 g, 100 mmol) dans du DMSO anhydre (75 mL) sont ajoutés du 2,2-méthoxypropane (30,6 mL, 250 mmol) et de l'acide paratoluènesulfonique (190 mg, 1,00 mmol). Le milieu est amené à 100°C jusqu'à obtention d'une solution limpide. Le mélange est refroidi et quelques millilitres de Et₃N sont ajoutés suivi d'un mélange éther diéthylique/éthanol (5 : 1) (450 mL). La solution est agitée pendant 4 heures à température ambiante et le produit cristallisé est filtré sur Büchner, lavé avec un mélange éther diéthylique/éthanol (5 : 1) (100 mL) et séché au dessiccateur. Le produit est obtenu sous la forme d'un solide beige avec un rendement de 40 %.

Rf (acétate d'éthyle/éther de pétrole (2 : 1)) : 0,33

T_{fus} : 182°C

RMN ¹H (400,012 MHz, CD₃OD) : 1,31 (s, 3H, CH₃) ; 1,46 (s, 3H, CH₃) ; 3,08 (t, ³J_{HH}=9,2, 1H, H₅) ; 3,50 (dd, 1H, ³J_{HH}=10,0, ³J_{HH}=7,6, H₃) ; 3,52 (dd, 1H, ³J_{HH}=10,0, ³J_{HH}=9,2, H₆) ; 3,63 (dd, 1H, ³J_{HH}=9,6, ³J_{HH}=4,0, H₁) ; 3,89 (dd, 1H, ³J_{HH}=7,2, ³J_{HH}=4,8, H₃) ; 4,33 (dd, 1H, ³J_{HH}=4,8, ³J_{HH}=4,4, H₂)

Synthèse du (±)-1,2-*O*-isopropylidene-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol **32**¹³⁵



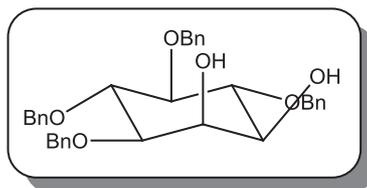
A une suspension de NaH (4,60 g, 200 mmol) dans du DMF anhydre (50 mL) est ajoutée une solution de **31** (8,80 g, 40 mmol) dans du DMF anhydre (50 mL) au goutte-à-goutte. Le milieu est agité à température ambiante pendant 30 minutes puis une solution de bromure de benzyle (23,7 mL, 200 mmol) dans du DMF anhydre (50 mL) est ajoutée au goutte-à-goutte à 0°C. La solution est agitée pendant 15 heures à température ambiante. Le mélange réactionnel est versé dans une solution glacée de NH₄Cl (100 mL) et la phase aqueuse est extraite par trois fois à l'acétate d'éthyle (250 mL). La phase organique est lavée par une solution saturée de NaCl (150 mL), séchée et concentrée. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/hexane (1 : 5)) et le produit attendu est obtenu sous forme d'une huile jaune pâle avec une pureté de 95 % (5% de bromure de benzyle) avec un rendement de 66 %.

Rf (acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 5)) : 0,21

RMN ¹H (400,133 MHz, CDCl₃) : 1,38 (s, 3H, CH₃) ; 1,54 (s, 3H, CH₃) ; 3,45 (dd, 1H, ³J_{HH}=9,2, ³J_{HH}=8,8, H₅) ; 3,73 (dd, 1H, ³J_{HH}=8,8, ³J_{HH}=4,0, H₃) ; 3,82 (dd, 1H, ³J_{HH}=9,6, ³J_{HH}=6,8, H₆) ; 3,97 (dd, 1H, ³J_{HH}=8,8, ³J_{HH}=8,4, H₄) ; 4,13 (dd, 1H, ³J_{HH}=6,4, ³J_{HH}=6,0, H₁) ; 4,30 (dd, 1H, ³J_{HH}=5,2, ³J_{HH}=4,0, H₂) ; 4,73-4,91 (m, 8H, CH₂-Ph) ; 7,25-7,45 (m, 20H, CH (Ph))

RMN ¹³C (75,475 MHz, CDCl₃) : 25,8 (CH₃) ; 27,7 (CH₃) ; 72,1 (CH₂-Ph) ; 73,3 (CH₂-Ph) ; 73,9 (C₂) ; 74,6 (CH₂-Ph) ; 77,2 (C₁) ; 79,1 ; 80,9 ; 81,7 ; 82,2 ; 82,5 (C₃ + C₄ + C₅ + C₆) ; 109,8 (C(CH₃)₂) ; 127,5 (CH (Ph)) ; 127,6 (CH (Ph)) ; 127,8 (CH (Ph)) ; 128,0 (CH (Ph)) ; 128,3 (CH (Ph)) ; 128,4 (CH (Ph)) ; 129,7 (CH (Ph)) ; 138,2 (C_{ipso}) ; 138,6 (C_{ipso})

Synthèse du (±)-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinositol **33**¹³⁵



A une solution de **32** (16,0 g, 27,5 mmol) dans du méthanol (50 mL) est ajouté de l'acide chlorhydrique concentré (150 μ L, 1,8 mmol). Le milieu réactionnel est agité 48 heures à température ambiante. Le mélange est concentré et le solide obtenu est lavé à l'éther de pétrole (100 mL) et séché au dessiccateur. Le produit est obtenu sous la forme d'un solide beige avec un rendement de 92 %.

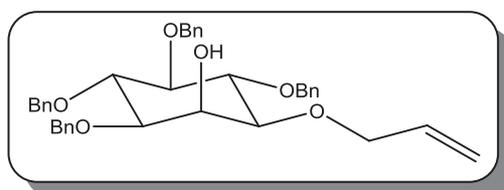
Rf (acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 1)) : 0,56

T_{fus} : 111°C

RMN ¹H (400,012 MHz, CDCl₃) : 3,43-3,51 (m, 5H, $H_1 + H_3 + H_5 + OH + OH$) ; 3,84 (t, 1H, $^3J_{HH}=9,6, H_4$) ; 3,97 (t, 1H, $^3J_{HH}=9,6, H_6$) ; 4,21 (t, 1H, $^3J_{HH}=2,4, H_2$) ; 4,68-4,97 (m, 8H, CH₂-Ph) ; 7,20-7,40 (m, 20H, CH (Ph))

RMN ¹³C (75,475 MHz, CDCl₃) : 69,2 (C₂) ; 71,8 (C₁) ; 72,8 (CH₂-Ph) ; 75,6 (CH₂-Ph) ; 75,7 (CH₂-Ph) ; 76,0 (CH₂-Ph) ; 80,1 ; 81,4 ; 81,7 ; 83,3 (C₃ + C₄ + C₅ + C₆) ; 127,7 (CH (Ph)) ; 127,9 (CH (Ph)) ; 128,0 (CH (Ph)) ; 128,4 (CH (Ph)) ; 128,6 (CH (Ph)) ; 137,8 (C_{ipso}) ; 138,6 (C_{ipso}) ; 138,7 (C_{ipso})

Synthèse du (±)-1-O-allyl-3,4,5,6-tetra-O-benzyl-myoinositol **34**¹³⁶



Une solution de **33** (5,40 g, 10,0 mmol) et d'oxyde de dibutylétain (2,74 g, 11,0 mmol) dans du méthanol anhydre (75 mL) est portée au reflux pendant 3 heures et concentrée. Des azéotropes au toluène sont réalisés et le résidu est dissous dans du DMF anhydre (60 mL).

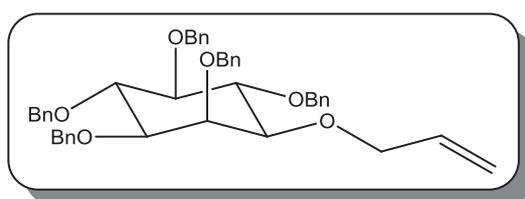
Du fluorure de césium (2,05 g, 13,5 mmol) et du bromure d'allyle (1,78 g, 14,8 mmol) sont ajoutés et le milieu réactionnel est agité 15 heures à température ambiante. Le mélange est concentré et l'huile obtenue est reprise dans de l'éther diéthylique (200 mL). La phase organique est lavée par de l'eau (100 mL), puis par une solution aqueuse de Na₂CO₃ à 10 % (100 mL) et de nouveau par de l'eau (100 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/hexane (1 : 3)) pour donner une cire blanche avec un rendement de 75 %.

Rf (acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 1)) : 0,56

RMN ¹H (400,012 MHz, CDCl₃) : 2,49 (s, 1H, OH); 3,32 (dd, 1H, ³J_{HH}=9,6, ³J_{HH}=2,4, H₁) ; 3,43 (dd, 1H, ³J_{HH}=9,6, ³J_{HH}=2,4, H₃) ; 3,46 (t, 1H, ³J_{HH}=9,6, H₅) ; 3,97 (t, 1H, ³J_{HH}=9,6, H₄) ; 4,01 (t, 1H, ³J_{HH}=9,6, H₆) ; 4,18-4,21 (m, 2H, OCH₂ allyl) ; 4,24 (t, 1H, ³J_{HH}=2,4, H₂) ; 4,71-4,94 (m, 8H, CH₂-Ph) ; 5,18-5,35 (m, 2H, CH₂ allyl) ; 5,90-6,02 (m, 1H, CH allyl) ; 7,26-7,37 (m, 20H, CH (Ph))

RMN ¹³C (75,475 MHz, CDCl₃) : 67,7 (C₂) ; 71,9 (CH₂O allyl) ; 72,8 (CH₂-Ph) ; 76,0 (CH₂-Ph) ; 79,6 ; 79,9 ; 81,2 ; 83,1 (C₁ + C₃ + C₄ + C₅ + C₆) ; 117,5 (CH₂ allyl) ; 127,6 (CH (Ph)) ; 127,9 (CH (Ph)) ; 128,0 (CH (Ph)) ; 128,1 (CH (Ph)) ; 128,4 (CH (Ph)) ; 128,5 (CH (Ph)) ; 128,9 (CH (Ph)) ; 134,7 (CH allyl) ; 138,8 (C_{ipso}) ; 139,2 (C_{ipso})

Synthèse du (±)-1-O-allyl-2,3,4,5,6-penta-O-benzyl-myoinositol **35**¹³⁵



A une suspension de NaH (900 mg, 37,5 mmol) dans du DMF anhydre (20 mL) est ajouté le composé **34** (4,35 g, 7,49 mmol) en solution dans du DMF anhydre (20 mL) au goutte-à-goutte. Le milieu est agité à température ambiante pendant 30 minutes puis une solution de bromure de benzyle (4,4 mL, 37,5 mmol) dans du DMF anhydre (20 mL) est ajoutée au goutte-à-goutte à 0°C. La solution est agitée pendant 15 heures à température ambiante. Le mélange réactionnel est versé dans une solution aqueuse glacée de NH₄Cl (50 mL) et la phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (150 mL). La phase organique est lavée par

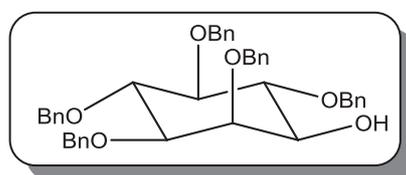
une solution saturée de NaCl (100 mL), séchée sur MgSO₄ et concentrée. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/hexane (1 : 5)) et le produit attendu est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 71 %.

Rf (acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 2)) : 0,40

RMN ¹H (400,133 MHz, CDCl₃) : 3,28 (dd, 1H, ³J_{HH}=10,0, ³J_{HH}=2,4, H₁) ; 3,39 (dd, 1H, ³J_{HH}=10,0, ³J_{HH}=2,4, H₃) ; 3,48 (t, 1H, ³J_{HH}=9,2, H₅) ; 4,01-4,17 (m, 5H, OCH₂ allyl + H₂ + H₄ + H₆) ; 4,58-4,95 (m, 10H, CH₂-Ph) ; 5,17-5,35 (m, 2H, CH₂ allyl) ; 5,89-5,97 (m, 1H, CH allyl) ; 7,25-7,35 (m, 25H, CH (Ph))

RMN ¹³C (75,480 MHz, CDCl₃) : 71,2 (OCH₂ allyl) ; 72,3 (CH₂-Ph) ; 73,8 (CH₂-Ph) ; 73,9 (C₁) ; 76,1 (CH₂-Ph) ; 80,2 ; 80,3 ; 81,2 ; 83,2 (C₂ + C₃ + C₄ + C₅ + C₆) ; 116,2 (CH₂ allyl) ; 126,8 (CH (Ph)) ; 127,0 (CH (Ph)) ; 127,1 (CH (Ph)) ; 127,3 (CH (Ph)) ; 127,4 (CH (Ph)) ; 127,6 (CH (Ph)) ; 127,7 (CH (Ph)) ; 127,8 (CH (Ph)) ; 134,7 (CH allyl) ; 138,3 (C_{ipso}) ; 138,4 (C_{ipso})

Synthèse du (±)-2,3,4,5,6-penta-O-benzyl-myo-inositol **36**^{135,137}



A une solution de **35** (1,48 g, 2,20 mmol) dans du DMSO (15 mL) est ajouté du *t*-BuOK (0,50 g, 4,40 mmol) et le milieu réactionnel est porté à 80°C pendant 3 heures. Après ajout d'eau glacée (15 mL), le produit est extrait par trois fois à l'éther diéthylique (50 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée pour donner l'éther d'énol attendu. Ce dernier est ensuite dissous dans un mélange acétone/HCl (1 M) (9 : 1, 100ml) et chauffé à 55°C pendant 3 heures. Le milieu est concentré et le résidu est dissous dans de l'acétate d'éthyle (100 mL), lavé par une solution saturée de NaCl (50 mL), séché sur MgSO₄ et concentré. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/hexane (1 : 3)) pour donner un solide blanc avec un rendement de 72 %.

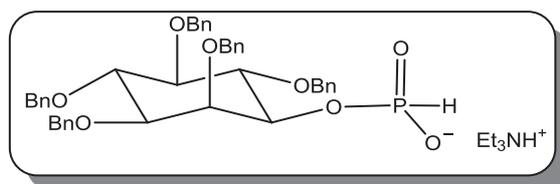
Rf (acétate d'éthyle/éther de pétrole (1 : 1)) : 0,45

T_{fus} : 94°C

RMN ^1H (400,012 MHz, CDCl_3) : 2,23 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}}=6,0$, OH) ; 3,45-3,51 (m, 3H, $H_1 + H_3 + H_5$); 3,83 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}}=9,2$, H_6) ; 4,03-4,12 (m, 2H, $H_2 + H_4$) ; 4,68-5,03 (m, 10H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$) ; 7,25-7,40 (m, 25H, CH (Ph))

RMN ^{13}C (75,475 MHz, CDCl_3) : 73,9 (C_1) ; 74,5 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$) ; 76,3 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$) ; 77,1 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$) ; 77,3 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$) ; 77,4 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$) ; 78,6 ; 82,6 ; 83,4 ; 83,7 ; 85,1 ($C_2 + C_3 + C_4 + C_5 + C_6$) ; 129,1 (CH (Ph)) ; 129,2 (CH (Ph)) ; 129,3 (CH (Ph)) ; 129,6 (CH (Ph)) ; 129,9 (CH (Ph)) ; 130,0 (CH (Ph)) ; 149,2 (C_{ipso}) ; 140, 3 (C_{ipso})

Synthèse du (\pm)-2,3,4,5,6-penta-*O*-benzyl-*myo*-inosityl phosphite de triéthylammonium
37¹²⁰

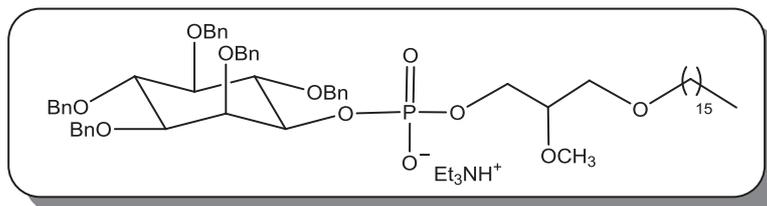


A une solution d'imidazole (1,41 g, 20,7 mmol) dans de l'acétonitrile anhydre (30 mL) à 0°C sont ajoutés, au goutte-à-goutte, du trichlorure de phosphore (1,93 mL, 6,20 mmol) et de la triéthylamine (3,12 mL, 23,1 mmol). Le milieu est agité pendant 20 minutes à 0°C puis le composé **36** (900 mg, 1,42 mmol) en solution dans de l'acétonitrile anhydre (30 mL) est ajouté au goutte-à-goutte. La solution est agitée à température ambiante pendant 2 heures après quoi quelques millilitres d'eau sont ajoutés. Le milieu est agité pendant 15 minutes puis du CH_2Cl_2 (100 mL) est ajouté. La phase organique est lavée par trois fois à l'eau (25 mL) et la phase aqueuse est extraite par trois fois au CH_2Cl_2 (25 mL). Les phases organiques rassemblées sont séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. L'huile brune obtenue est utilisée sans autre purification.

RMN ^{31}P (161,930 MHz, CDCl_3) : 4,73

RMN ^1H (400,012 MHz, CDCl_3) : 1,29 (t, 9H, $^3J_{\text{HH}}=7,2$, CH_3 (Et_3NH^+)) ; 3,00 (q, 6H, $^3J_{\text{HH}}=7,2$, CH_2 (Et_3NH^+)) ; 3,47-3,51 (m, 2H, $H_3 + H_5$) ; 4,01-4,28 (m, 4H, $H_1 + H_2 + H_4 + H_6$) ; 4,63-4,99 (m, 10H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$) ; 6,29 (d, 1H, $^1J_{\text{PH}}=636$, PH) ; 7,19-7,39 (m, 25H, CH (Ph))

Synthèse du 3-(hexadécyloxy)-2-méthoxypropyl (\pm)-2,3,4,5,6-penta-O-benzyl-myoinositol phosphate de triéthylammonium 38¹²⁰



A une solution de **37** (120 mg, 0,15 mmol) dans du THF anhydre (3,2 mL) sur tamis moléculaire 4 Å est ajoutée de la pyridine (0,61 mL, 7,50 mmol), la solution est agitée 30 minutes à température ambiante. Le milieu est amené à 0°C et le composé **5** (49 mg, 0,15 mmol) en solution dans du THF anhydre (2,7 mL) est ajouté en une fois immédiatement suivi de chlorure de pivaloyle (0,05 mL, 0,37 mmol). La solution est agitée pendant 24 heures à température ambiante puis une solution de diiode (76 mg, 0,30 mmol, 0,197 M) dans un mélange pyridine-eau (95 : 5) est ajoutée. Après 2 heures, l'excès de diiode est réduit par une solution de Na₂S₂O₃ (1M) (5 mL) et la phase aqueuse est extraite par trois fois au CH₂Cl₂ (5 mL). Les phases organiques combinées sont lavées successivement à l'eau (3 mL) puis deux fois par une solution tampon d'hydrogénocarbonate de triéthylammonium (0,1 M, pH = 8,4) (5 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂-MeOH-Et₃N (99 : 0 : 1) → (94 : 5 : 1)) pour obtenir un solide amorphe. Afin d'ôter l'excès de sel de triéthylammonium, le produit est repris dans le toluène, filtré et concentré pour donner le produit pur avec un rendement de 38 %.

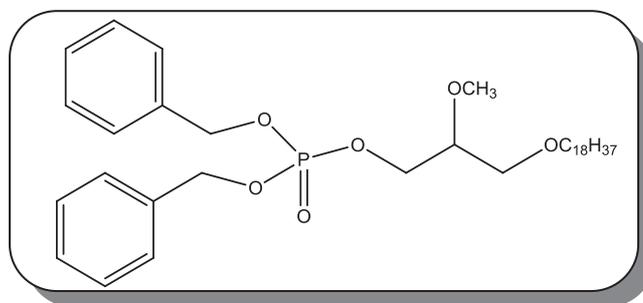
Rf (CH₃Cl/MeOH (9 : 1)) : 0,40

RMN ³¹P (161,970 MHz, CDCl₃) : -0,20

RMN ¹H (400,082 MHz, CDCl₃) : 0,87 (t, 3H, ³J_{HH}=6,4, CH₃ chaîne grasse) ; 1,17-1,29 (m, 26H, CH₂ chaîne grasse) ; 1,31 (t, 9H, ³J_{HH}=7,2, CH₃ (Et₃NH⁺)) ; 1,42-1,52 (m, 2H, CH₂ β chaîne grasse) ; 3,01 (q, 6H, ³J_{HH}=7,2, CH₂ (Et₃NH⁺)) ; 3,30-3,50 (m, 10H, CH₂ α chaîne grasse + CH *sn*-2 + CH₂ *sn*-1 + OCH₃ + H₄ + H₆) ; 3,92-4,00 (m, 4H, CH₂ *sn*-3 + H₃ + H₅) ; 4,08-4,12 (m, 1H, H₂) ; 4,51-4,53 (m, 1H, H₁) ; 4,60-4,97 (m, 10H, CH₂-Ph) ; 7,21-7,43 (m, 25H, CH (Ph))

RMN ^{13}C (75,480 MHz, CDCl_3): 8,5 (CH_3 (Et_3NH^+)) ; 14,4 (CH_3 chaine grasse) ; 23,6 (CH_2 chaine grasse) ; 27,1 (CH_2 chaine grasse) ; 30,4 (CH_2 chaine grasse) ; 30,5 (CH_2 chaine grasse) ; 30,6 (CH_2 chaine grasse) ; 30,7 (CH_2 chaine grasse) ; 33,0 (CH_2 chaine grasse) ; 46,2 (CH_2 (Et_3NH^+)) ; 58,3 (OCH_3) ; 66,1 (CH_2 *sn*-3) ; 70,9 (CH_2 *sn*-1) ; 71,0 (CH_2 α chaine grasse) ; 72,6 (CH_2 -Ph) ; 73,2 (CH_2 -Ph) ; 76,0 (CH_2 -Ph) ; 76,6 (CH_2 -Ph) ; 76,8 (CH_2 -Ph) ; 77,7 (C_1) ; 77,8 (C_2) ; 80,7 (CH *sn*-2) ; 81,6 (C_4) ; 82,1 (C_3) ; 82,7 (C_5) ; 84,3 (C_6) ; 128,3 (CH (Ph)) ; 128,4 (CH (Ph)) ; 128,6 (CH (Ph)) ; 129,0 (CH (Ph)) ; 129,1 (CH (Ph)) ; 129,2 (CH (Ph)) ; 129,3 (CH (Ph)) ; 129,4 (CH (Ph)) ; 139,6 (C_{ipso}) ; 139,8 (C_{ipso}) ; 140,0 (C_{ipso}) ; 140,5 (C_{ipso})

Synthèse du dibenzyl-(3-octadécyloxy-2-méthoxypropyl) phosphate 40¹³⁸



A une solution de 1*H*-tetrazole (1,00 g, 14,4 mmol) dans du THF anhydre (50 mL) refroidie à -40°C est ajouté en 5 min. du dibenzyl diisopropylphosphoramidite (1,96 g, 5,60 mmol). Le mélange est agité pendant 10 minutes à -40°C et le composé **5** (958 mg, 2,80 mmol) dissous dans du THF anhydre (20 mL) est ajouté goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 heures puis refroidi à -78°C . De la triéthylamine (2,58 g, 25,6 mmol) puis du *t*-BuOOH (10,0 mmol, 1,8 ml d'une solution à 5,5M dans du décane) sont ajoutés. La solution est agitée 4 heures à température ambiante et l'excès d'oxydant est détruit par addition d'une solution saturée de thiosulfate de sodium (10 mL). La phase aqueuse est extraite par de l'éther diéthylique (50 mL) puis par du CH_2Cl_2 (50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice (éluant acétate d'éthyle/hexane (1 : 3)) pour donner un liquide incolore avec un rendement de 82 %.

Rf (acétate d'éthyle/hexane (1 : 3)) : 0,21

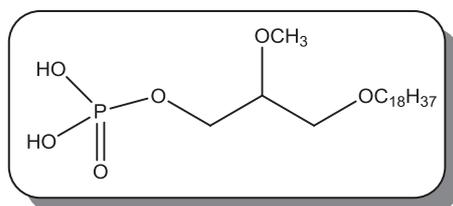
RMN ^{31}P (161,931 MHz, CDCl_3) : -0,39

RMN ^1H (400,012 MHz, CDCl_3) : 0,87 (t, 3H, $^3J_{\text{HH}}=6,8$, CH_3) ; 1,20-1,35 (m, 30H, CH_2 chaîne grasse) ; 1,48-1,54 (m, 2H, CH_2 β chaîne grasse) ; 3,36-3,48 (m, 5H, CH_2 $sn-1$ + CH $sn-2$ + CH_2 α chaîne grasse) ; 3,39 (s, 3H, OCH_3) ; 4,02-4,12 (m, 2H, CH_2 $sn-3$) ; 4,99-5,06 (m, 4H, CH_2 -Ph) ; 7,28-7,36 (m, 10H, CH (Ph))

RMN ^{13}C (75,480 MHz, CDCl_3) : 14,0 (CH_3) ; 22,6 (CH_2 chaîne grasse) ; 26,0 (CH_2 chaîne grasse) ; 29,3 (CH_2 chaîne grasse) ; 29,4 (CH_2 chaîne grasse) ; 29,6 (CH_2 chaîne grasse) ; 31,9 (CH_2 chaîne grasse) ; 58,0 (OCH_3) ; 66,5 (CH_2 $sn-3$) ; 69,2 (CH_2 $sn-1$) ; 69,3 (CH_2 -Ph) ; 71,8 (CH_2 α chaîne grasse) ; 78,6 (CH $sn-2$) ; 127,9 (CH (Ph)) ; 128,4 (CH (Ph)) ; 128,5 (CH (Ph)) ; 135,8 (C_{ipso})

Masse (MALDI-TOF) : m/z calculé pour $\text{C}_{32}\text{H}_{62}\text{O}_{13}$ (M+Na) 641,394, trouvé 641,338

Synthèse du (3-octadécyloxy-2-méthoxypropyl)phosphate 41



A une solution de **40** (843 mg, 1,4 mmol) dans du méthanol (10 mL) est ajouté du palladium (10% sur charbon, 36 mg). Le mélange est agité une nuit sous atmosphère de H_2 (1,5 atmosphère). Le catalyseur est filtré sur fritté, et le filtrat est concentré pour donner quantitativement le produit attendu sous forme d'un solide blanc.

Rf (acetate d'éthyle/ether de pétrole) : 0,37

RMN ^{31}P (161,931 MHz, CD_3OD) : 3,47

RMN ^1H (400,012 MHz, CD_3OD) : 0,80 (t, 3H, $^3J_{\text{HH}}=6,8$, CH_3) ; 1,10-1,30 (m, 30H, CH_2 chaîne grasse) ; 1,43-1,48 (m, 2H, CH_2 β chaîne grasse) ; 3,36 (s, 3H, OCH_3) ; 3,30-3,48 (m, 5H, CH_2 $sn-1$ + CH $sn-2$ + CH_2 α chaîne grasse) ; 3,86-3,99 (m, 2H, CH_2 $sn-3$)

RMN ^{13}C (75,480 MHz, CD_3OD) : 14,4 (CH_3); 23,7 (CH_2 chaine grasse) ; 27,2 (CH_2 chaine grasse) ; 30,5 (CH_2 chaine grasse) ; 30,6 (CH_2 chaine grasse) ; 30,8 (CH_2 chaine grasse) ; 33,1 (CH_2 chaine grasse) ; 58,3 (OCH_3) ; 66,3 (CH_2 *sn*-3) ; 70,9 (CH_2 *sn*-1) ; 72,7 (CH_2 α chaine grasse) ; 80,6 (CH *sn*-2)

Masse (MALDI-TOF) : m/z calculé pour $\text{C}_{32}\text{H}_{62}\text{O}_{13}$ (M+H) 439,318, trouvé 439,274

Etude de la solubilité

L'ohmline, le glycophospholipide et le glycothiophospholipide correspondant (soient les dérivés du lactose) ont été dissous dans de l'eau déminéralisée jusqu'à saturation. Le mélange est centrifugé pendant 3 minutes et 100 μL de surnageant est prélevé et placé au lyophilisateur pendant 15 heures.

Etudes de l'efficacité d'inhibition du courant du canal SK3 : Patch-clamp

Les études de l'efficacité d'inhibition du courant du canal SK3 ont été réalisées par patch-clamp en configuration « whole-cell » à l'aide de cellules HEK293T surexprimant stablement le canal SK3 recombinant. L'incidence des composés a été mesurée en suivant un protocole de rampe. Le potentiel imposé va varier progressivement de + 100 mV à - 100 mV en 500 ms à partir d'un potentiel de maintien (« holding ») de 0 mV toutes les 4 secondes. Chaque expérience dure 3 minutes.

Etudes de l'efficacité d'inhibition de la migration cellulaire

Les tests d'efficacité d'inhibition de la migration cellulaire ont été réalisés par comptage des cellules ayant migrées d'un compartiment à un autre au travers du filtre poreux d'un insert. Les inserts utilisés ont des pores de 8 μm et sont recouverts d'une membrane en polyéthylènetéréphtalate (PET), ils sont placés dans des plaques 24 puits. Les cellules ($8 \cdot 10^4$ cellules par puits) sont placées dans le compartiment supérieur et leur adhésion est assurée par la fibronectine présente dans le SVF ($1,6 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$). Les composés à tester sont placés dans les deux compartiments et après 15 heures d'incubation, les cellules qui n'ont pas migré sont enlevées de la face supérieure de la membrane alors que les cellules ayant migré

se trouveront sur la face inférieure de cette membrane. Les noyaux ont été colorés au DAPI et comptés. Chaque expérience est réalisée en triplicat.

Etudes de la toxicité des analogues de l'édelfosine : essais au MTT

Les études de la toxicité de nos composés ont été réalisées en suivant le test au MTT. Les cellules sont placées dans des plaques 24 puits ($4 \cdot 10^4$ cellules par puits) et sont mises en présence des molécules à tester pendant 48 heures. Une fois la période test terminée, le milieu cellulaire est retiré et remplacé par du MTT ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$). Après incubation, la solution de MTT est retirée et les cristaux de formazan sont dissous dans du DMSO et la DO est mesurée à 520 nm. Chaque expérience est réalisée en triplicat.

Tests de sélectivité vis-à-vis des canaux SKCa

Les tests de sélectivité reprennent les mêmes conditions de patch-clamp que les études de l'efficacité d'inhibition du canal SK3 sauf qu'elles sont réalisées à l'aide des cellules HEK293T surexprimant stablement le canal SK1 (HEK293-SK1), SK2 (HEK293-SK2) ou IKCa (HEK293-IKCa).

**PARTIE 2 : SYNTHÈSE ET
ÉVALUATION DE CO-LIPIDES
NEUTRES À TÊTE CIBLANTE POUR LA
VECTORISATION D'ARN
INTERFERENTS**

CHAPITRE 1 : GENERALITES

I - Le transfert de gènes

À ce jour, de nombreuses pathologies issues d'anomalies génomiques, innées ou acquises, sont traitées par des méthodes conventionnelles n'apportant que des réponses symptomatiques.

L'objectif de la thérapie génique est d'apporter le ou les gènes nécessaires au rétablissement des fonctions cellulaires défectueuses de ces pathologies. L'apport de ce matériel génétique peut servir à rétablir une fonction anormalement absente en faisant produire une protéine d'intérêt par les cellules, ou alors à passer sous silence l'expression d'une fonction en empêchant l'expression d'une protéine. Dans tous les cas, il s'agit d'une action au niveau du génome pour faire produire, ou au contraire pour empêcher la production d'une protéine d'intérêt : c'est le concept de « gène médicament »¹³⁹.

C'est à la fin des années 1960 que le concept même de thérapie génique est évoqué par la communauté scientifique¹⁴⁰. Cette approche ne pouvait néanmoins pas être exploitée du fait de la limitation des moyens technologiques disponibles à l'époque. Dès la fin des années 1980, l'évolution des techniques de culture cellulaire, l'avancée dans le domaine de la biologie moléculaire ainsi que le développement des outils et des méthodes dans le domaine des biotechnologies ont permis de mettre en pratique ce qui (jusqu'à présent) était purement théorique. Les premiers essais cliniques ont, par ailleurs, été réalisés durant cette période. Il s'agissait de traiter un patient atteint d'un déficit en adénosine désaminase (ADA)¹⁴¹.

La thérapie génique avait comme but primaire de soigner les maladies génétiques, ce concept s'est cependant élargi à d'autres pathologies, comme en témoignent les travaux réalisés par Rosenberg et coll.¹⁴² sur le traitement du mélanome malin. Cependant, malgré l'engouement du public notamment à travers de grands événements tel que le Téléthon et les résultats positifs sur les modèles animaux, les essais chez l'homme n'avaient (avant les années 2000) pas suffi à obtenir une amélioration clinique significative. C'est le traitement

¹³⁹ Kahn, A. ; Peschanski, M. *Med. Sci.* **1992**, *8*, 34-35

¹⁴⁰ Lederberg, J. ; Tatum, E *Columbia University* **1996**

¹⁴¹ Culver, K.W. ; Anderson, W.F. ; Blaese, R.M. *Hum. Gene Ther.* **1991**, *2*, 107-109

¹⁴² Rosenberg, S.A. ; Aebersold, P. ; Cornetta, K. ; Kasid, A. ; Morgan, R.A. ; Moen, R. ; Karson, E.M. ; Lotze, M.T. ; Yang, J.C. ; Topalian, S.L. *N Engl. J. Med.* **1990**, *323*, 570-578

des enfants-bulles, enfants atteints d'un déficit immunitaire combiné sévère lié au chromosome X (DICS-X) et contraints de vivre en milieu stérile, qui fut le premier succès thérapeutique de la thérapie génique. Ces essais cliniques, mis en place par Fisher et coll.¹⁴³ dans les années 2000, ont permis de démontrer formellement l'intérêt du concept. Plus récemment, le concept de thérapie génique a été appliqué à la β -thalassémie (maladie monogénique la plus fréquente) avec succès montrant là encore l'intérêt de cette approche¹⁴⁴.

De nombreuses recherches sont en cours dans le but de faire progresser les stratégies mais aussi les vecteurs employés en thérapie génique. D'une part, il y a le travail d'approfondissement des connaissances et des techniques de fabrication des gènes servant à la thérapie. D'autre part, il est nécessaire d'étudier et d'optimiser les techniques de transport de ces gènes dans les cellules et organismes à traiter.

Les cellules sont délimitées par une membrane cellulaire. Cette membrane présente un caractère fortement hydrophobe en surface et une nature anionique. Elle a pour but, notamment, de protéger la cellule des acides nucléiques exogènes. En effet, les acides nucléiques étant également anioniques (présence de groupements phosphates), hydrophiles, bien souvent de taille importante, ne peuvent franchir cette barrière.

L'injection d'acides nucléiques nus est une stratégie envisageable. Cette méthode permet une certaine activité de transfection notamment dans le cas du traitement du cancer de la vessie ou lors d'injection dans le muscle¹⁴⁵. Cependant, du fait de la rapide dégradation de ces acides nucléiques par le milieu biologique, une méthode de transfert doit être employée dans la plupart des cas. Différentes techniques telles que l'électroporation, la micro-injection ou encore les ultrasons, permettent l'introduction d'acides nucléiques nus dans les cellules¹⁴⁶. Cependant ces techniques physiques ne peuvent être envisagées dans le cadre

¹⁴³ Cavazzana-Calvo, M. ; Hacein-Bey, S. ; De Saint-Basile, G. ; Gross, F. ; Eric, Y. ; Nusbaum, P. ; Selz, F. ; Hue, C. ; Certain, S. ; Casanova, J.L. ; Bousso, P. ; Les Deist, F. ; Fisher, A. *Science* **2000**, *288*, 669-672

¹⁴⁴ Cavazzana-Calvo, M. ; Payen, E. ; Negre, O. ; Wang, G. ; Hahir, K. ; Fusil, F. ; Down, J. ; Denaro, M. ; Brady, T. ; Westerman, K. ; Cavalleco, R. ; Gillet-Legrand, B. ; Caccavelli, L. ; Sgarra, R. ; Maouche-Chretien, L. ; Bernaudin, F. ; Girot, R. ; Dorazio, R. ; Mulder, G.J. ; Polack, A. ; Bank, A. ; Soulier, J. ; Larghero, J. ; Kabbara, N. ; Dalle, B. ; Gourmel, B. ; Socie, B. ; Chretien, S. ; Cartier, N. ; Aubourg, P. ; Fischer, A. ; Cornetta, K. ; Galacteros, F. ; Beuzard, Y. ; Gluckman, E. ; Bushman, F. ; Hacein-Bey-Abina, S. ; Leboulch, P. *Nature* **2010**, *467*, 318-322

¹⁴⁵ a) Ohana, P. ; Gofrit, O. ; Ayes, S. ; Al-Sharef, W. ; Mizrahi, A. ; Birman, T. ; Schneider, T. ; Matouk, I. ; de Groot, N. ; Tavdy, E. ; Sidi, A.A. ; Hochberg, A. *Gene Ther. & Mol. Biol.* **2004**, *8*, 181-192. b) Herweijer, H. ; Wolff, J.A. *Gene Ther.* **2003**, *10*, 453-458

¹⁴⁶ Bertin, S. ; Neves, S. ; Pedrosa de Lima, M. ; Pierrefite-Carle, V. *Bull. Cancer* **2007**, *94*, 243-252

d'une thérapie à l'échelle humaine. L'utilisation de vecteurs, c'est-à-dire des objets capables de transporter un gène spécifique, est donc une alternative intéressante pour traiter des pathologies par la thérapie génique.

II - La vectorisation

Les vecteurs servent donc à améliorer la capacité de passage d'un acide nucléique à travers la membrane cellulaire tout en le protégeant des agressions intra et extra cellulaires. Pour augmenter l'efficacité de transfection du matériel génétique il faut masquer son caractère anionique et diminuer sa taille en le condensant au maximum. De plus, ce matériel ne doit pas être délivré dans n'importe quelle cellule, un ciblage spécifique du type cellulaire visé doit également être assuré. Pour finir, les vecteurs doivent présenter une toxicité la plus faible possible.

Deux types de vecteurs sont utilisés de nos jours : les vecteurs viraux recombinants et les vecteurs chimiques encore appelés vecteurs synthétiques.

1 - Les vecteurs viraux

Historiquement, ce sont les vecteurs viraux qui sont les plus utilisés. Ce sont des vecteurs constitués de virus modifiés ou de particules virales (Figure 77).

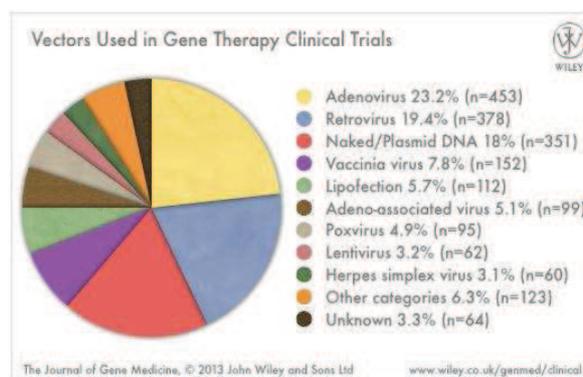


Figure 77 : Vecteurs utilisés dans les essais cliniques de thérapie génique
D'après Wiley et coll.¹⁴⁷

¹⁴⁷ <http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/> 2013

En effet, malgré toutes les stratégies développées par le corps humain pour se prémunir des agressions extérieures, de nombreux virus parviennent à contourner ces défenses. Dans le but de proliférer, un virus va s'introduire dans la cellule et détourner la machinerie cellulaire afin d'y introduire son propre matériel génétique pour pouvoir se multiplier. C'est en se basant sur ces propriétés que les chercheurs ont rapidement envisagé de se servir des virus comme moyen pour transporter des acides nucléiques d'intérêt dans des cellules (Figure 78).

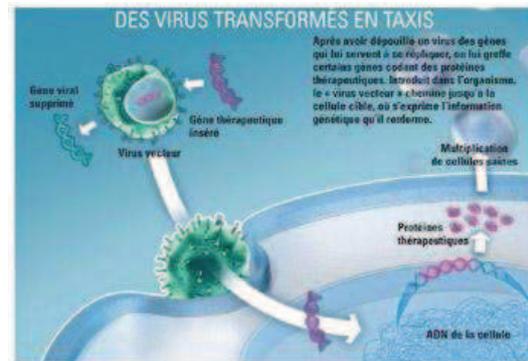


Figure 78 : Fonctionnement du vecteur viral
D'après A. Dagan¹⁴⁸

Bien que présentant généralement de très bonnes efficacités de transfection *in vivo* (ceci expliquant leur utilisation préférentielle), de nombreux inconvénients entachent l'utilisation de tels vecteurs. En effet, de nombreux effets secondaires plus ou moins graves tels que des réactions de types inflammatoire et immunologique peuvent résulter de leur utilisation, mais aussi des proliférations cellulaires de type oncologique¹⁴⁹. À cela s'ajoute la limite de la taille du matériel génétique pouvant être inséré dans le vecteur (35 Kb dans les adénovirus, 8 Kb dans les rétrovirus). A titre d'exemple, le plasmide codant pour le gène CFTR (gène impliqué dans la mucoviscidose) s'étend sur environ 250 Kb. De plus, le coût de production de tels édifices présente également un obstacle à l'utilisation de tels vecteurs.

¹⁴⁸ <http://www2.cnrs.fr/journal/2110.htm> - CNRS le journal 2005, 183

¹⁴⁹ Crystal, R.G. ; Mastrangeli, A. ; Sanders, A. ; Cooke, J. ; King, T. ; Gilbert, F. ; Henschke, C. ; Pascal, W. ; Herena, J. ; Harvey, B.G. ; Hirschowitz, E. ; Diaz, D. ; Russi, T. ; Pacheco, F. ; Sikand, V. ; Brion, P. *Hum. Gene Ther.* 1995, 6, 667-703

En raison de ce nombre considérable de désagréments, les chercheurs se sont tournés vers le développement de molécules capables de transporter et compacter les acides nucléiques : les vecteurs synthétiques¹⁵⁰.

2 - Les vecteurs synthétiques

Dans la plupart des cas les vecteurs non-viraux sont des dérivés cationiques qui vont former des complexes par interactions supramoléculaires avec les acides nucléiques. Bien que leur capacité à délivrer le matériel génétique dans les cellules-cibles soit bien inférieure à celle des vecteurs viraux, ils présentent de nombreux avantages :

- Une faible immunogénicité.
- Ils sont non-intégratifs (pas de risques de mutagénèse ou d'oncogénèse).
- Ils peuvent compacter des fragments d'acides nucléiques bien plus grands (supérieurs à 100 Kb).
- Leur coût nettement plus faible (possibilité de production à grande échelle).

La plupart des vecteurs non-viraux sont des polymères cationiques ou des lipides cationiques.

2.1. Les polymères cationiques

Les polymères cationiques sont des édifices présentant de nombreuses charges positives permettant de compacter des acides nucléiques via des interactions électrostatiques avec leurs groupements phosphates anioniques (Figure 79). Le complexe formé est nommé polyplexe.

¹⁵⁰ a) Felgner, P.L. ; Gadek, T.R. ; Holm, M. ; Roman, R. ; Chan, H.W. ; Wenz, M. ; Northrop, J.P. ; Ringold, G.M. ; Danielsen, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 7413-7417. b) Behr, J.P. ; Demeneix, B. ; Loeffler, J.P. ; Mutul, J.P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86*, 6982-6986

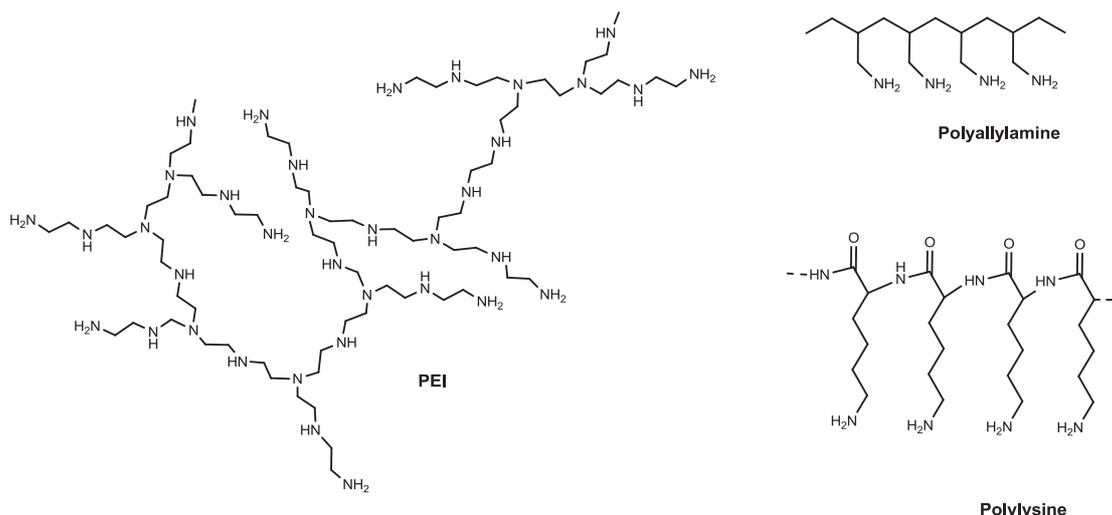


Figure 79 : Exemples de polymères cationiques

Le premier polymère cationique utilisé en transfert de gènes fut la poly-L-lysine (ou PLL)¹⁵¹. Bien qu'extrêmement efficace, il se révéla néanmoins très toxique et l'absence de pouvoir tampon rendait la sortie de l'endosome (vésicule contenant le polyplexe après l'internalisation dans la cellule) relativement compliquée¹⁵².

Un autre type de polymères cationiques développé est la famille des polyéthylènimines (PEI) linéaires ou ramifiés qui présentent un pouvoir tampon leur permettant de se délivrer de l'endosome grâce au phénomène dit d'« éponge à protons »¹⁵³. En effet, la protonation dans le milieu acide intracellulaire entraîne un influx stœchiométrique de contre-ions chlorures qui conduit alors à un éclatement de l'endosome selon un phénomène d'osmose. Mais malgré leur efficacité, ces polymères restent très toxiques.

D'autres molécules telles que les dendrimères ont également été employées¹⁵⁰.

2.2. Les lipides cationiques

A l'instar des polymères cationiques, les lipides cationiques vont interagir avec l'ADN par interaction électrostatique. La présence des chaînes lipidiques vont alors structurer l'édifice supramoléculaire conduisant à compacter l'ADN dans un agrégat supramoléculaire appelé lipoplexe. Ces lipoplexes étant généralement de charge apparente positive (utilisation d'un

¹⁵¹ Shapiro, J.T. ; Leng, M. ; Felsenberg, G. *Biochem.* **1969**, *8*, 3219-3232

¹⁵² Mintzer, M.A. ; Simanek, E.E. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 259-302

¹⁵³ Akine, A. ; Mini, T. ; Klibanov, A.M. ; Langer, R. *J. Gene Med.* **2005**, *7*, 657-663

excès de lipide cationique), ils vont pouvoir interagir avec les protéoglycanes (protéines membranaires anioniques), ceci permettant leur internalisation¹⁵⁴.

Les lipides cationiques ont une structure schématiquement divisée en trois parties distinctes (Figure 80) :

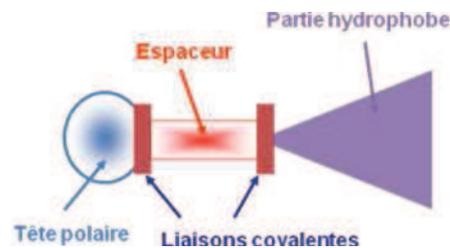


Figure 80 : Structure générale d'un lipide cationique

- **Une tête polaire** : il s'agit d'une partie hydrophile chargée positivement permettant l'interaction de type électrostatique avec la partie anionique des acides nucléiques (têtes phosphates). Cette tête cationique est accompagnée d'un contre-ion assurant la stabilité et la neutralité de la molécule.
- **Un espaceur** : c'est une chaîne plus ou moins longue servant à lier la partie hydrophile (tête polaire) et la partie hydrophobe (queue). Il sert à la stabilité de la molécule ainsi qu'à sa fusogénicité avec la membrane cellulaire.
- **Une queue hydrophobe** : elle est constituée de chaînes aliphatiques, saturées ou non, ou d'un motif cholestérol. Ce domaine participe à l'auto-organisation de ces composés sous forme de liposomes. La nature de ces chaînes grasses, du fait de leur différence de propriétés physico-chimiques, va influencer sur la stabilité et la fusogénicité des édifices supramoléculaires.

3 - Les liposomes

La vésicule formée par auto-organisation de ces lipides est appelée liposome (Figure 81). Les lipides cationiques peuvent être combinés à des lipides neutres nommés co-lipides. Ceux-ci ont pour but de stabiliser la structure du liposome et du complexe acide nucléique/liposome

¹⁵⁴ Mounkes, L.C. ; Zhong, W. ; Cipres-Palacin, G. ; Heath, T.D. ; Debs, R.J. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 26164-26170

nommé lipoplexe, mais peuvent également apporter un motif de ciblage au vecteur¹⁵⁵. Ces co-lipides sont en général formulés avec le lipide cationique à raison de 1 à 10 % molaire.

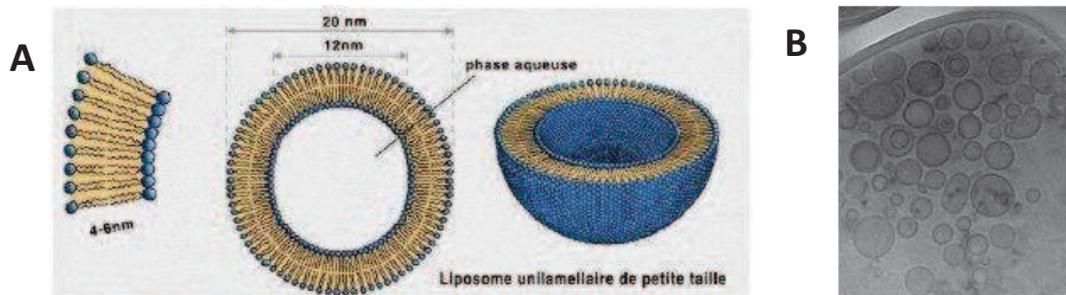


Figure 81 : A) Schéma d'un liposome B) Liposomes de phosphoramides observés en microscopie électronique
D'après Fraix¹⁵⁶

4 - Les lipoplexes

Comme nous venons de le voir, le complexe formé par ajout d'acide nucléique aux lipides cationiques est un lipoplexe. Les études menées à partir des années 90 montrent qu'ils vont s'organiser de manière à donner, par exemple, des structures lamellaires ou hexagonales, le lipide utilisé influant sur cette organisation (Figure 82)¹⁵⁷.

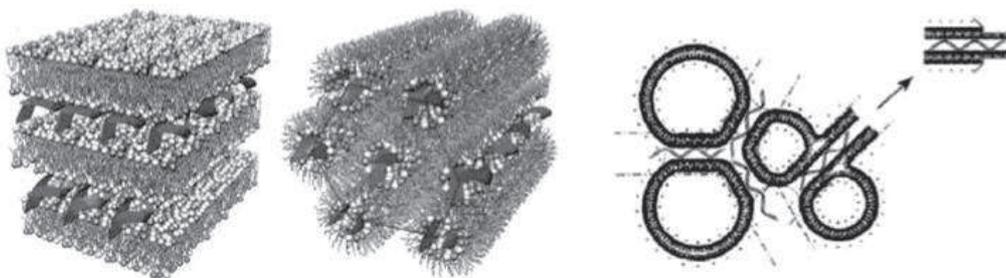


Figure 82 : Structure des lipoplexes. A gauche : modèle lamellaire. Au centre : modèle hexagonal. A droite : structure mixte circulaire
D'après Ewert et coll.¹⁵⁸

¹⁵⁵ Banerjee, R. ; Tyagi, P. ; Li, S. ; Huang, L. *Int. J. Cancer*. **2004**, *112*, 693-700

¹⁵⁶ Fraix, A. *Thèse de doctorat* **2011**, Université de Bretagne Occidentale, Brest

¹⁵⁷ a) Radler, J.O. ; Koltover, I. *Science* **1997**, *275*, 810-814. b) Koltover, I. ; Salditt, T. ; Safinya, C.R. *Science* **1998**, *281*, 78-81. c) Ewert, K.K. ; Heather, M.E. ; Zidovska, A. ; Bouxsein, N.F. ; Ahmad, A. ; Safinya, C.R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 398-406

¹⁵⁸ Ewert, K.K. ; Ahmad, A. ; Bouxsein, N.F. ; Evans, H.M. ; Safinya, C.R. *Methods Mol. Biol.* **2008**, *433*, 159-175

5 - Le transfert de gènes

Le transfert de gènes va pouvoir s'effectuer une fois les acides nucléiques compactés dans le lipoplexe. Celui-ci va devoir franchir de nombreuses barrières biologiques pour permettre à son matériel génétique de s'exprimer au sein d'une cellule, il assure donc un rôle de protection et de transport dans plusieurs étapes clés.

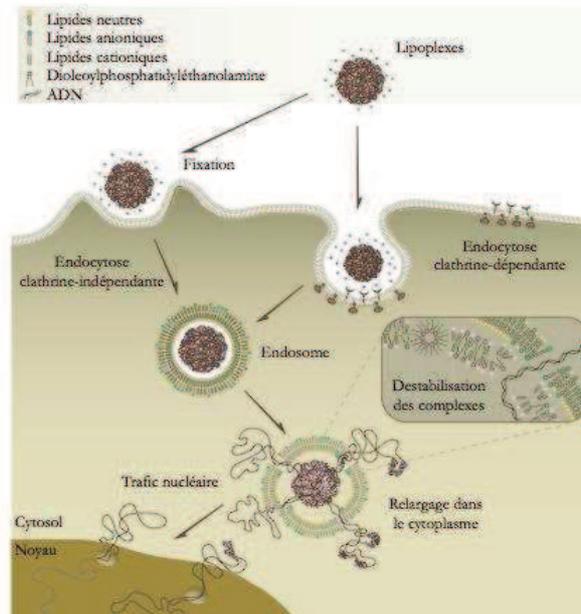


Figure 83 : Le processus de transfert de gènes

D'après Bertin S. et coll.¹⁵⁹

- **Le transport dans le milieu extra-cellulaire** : le milieu de culture cellulaire est connu et maîtrisé pour les tests *in vitro*¹⁶⁰, il n'y a donc aucune difficulté à transporter des acides nucléiques jusqu'à la cellule dans cette configuration. En revanche *in vivo* la situation est beaucoup plus complexe. En effet, le mode d'administration (injection systémique, par voie intra-trachéale, etc...) mais également la taille et la charge apparente du lipoplexe peuvent influencer l'efficacité de transfection (les lipoplexes de tailles importantes peuvent être piégés dans les capillaires sanguins¹⁶¹ ; des interactions avec des constituants sanguins peuvent conduire à la destruction des lipoplexes ; les lipoplexes liés à

¹⁵⁹ Bertin, S. ; Neves, S. ; Pedroso De Lima, M. ; Pierrefite-Carle, V. *Bull. Cancer* **2007**, *94*, 243-252

¹⁶⁰ Son, K.K. ; Tkach, D. ; Rosenblatt, J. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1511*, 201-205

¹⁶¹ Simberg, D. ; Weisman, S. ; Talmon, Y. ; Faerman, A. ; Shoshani, T. ; Barenholz, Y. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 39858-39865

certaines molécules (opsonisation) peuvent être reconnus et détruits par le système réticulo-endothélial¹⁶² ; etc).

- **L'entrée dans la cellule** : les lipoplexes, qui ont une charge apparente positive, vont pouvoir interagir avec la membrane plasmique cellulaire afin de pénétrer dans la cellule. Le mécanisme généralement admis est l'endocytose¹⁶³. Une fois l'endosome libéré dans la cellule, il subit une maturation jusqu'à devenir un lysosome. Il est nécessaire à ce stade que le lipoplexe s'extrait de son endosome avant d'être dégradé par des enzymes protéolytiques (en effet, l'acidification du milieu va entraîner la lyse des lysosomes).

- **La sortie de l'endosome** : Plusieurs mécanismes de sortie de l'endosome ont été proposés. Szoka et coll.¹⁶⁴ ont proposé un mécanisme de sortie via un phénomène de « flip-flop », c'est-à-dire de déstabilisation de la membrane de l'endosome par le complexe. Les lipides anioniques vont former une paire d'ions avec les lipides cationiques conduisant à la libération des acides nucléiques dans le cytoplasme (Figure 84). D'autres études ont montré que les acides nucléiques peuvent se retrouver libérés dans le cytoplasme après fusion de la membrane endosomale par les lipides cationiques ou encore après une déstabilisation liée au pH¹⁶⁵.

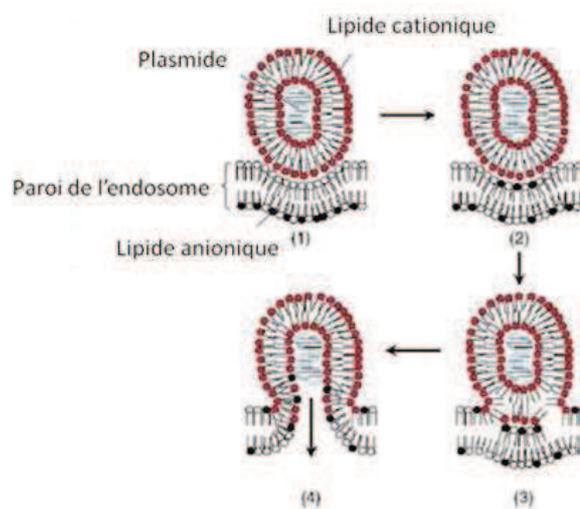


Figure 84 : Mécanisme "flip-flop"
D'après Medina-Kauwe, L.K. et coll.¹⁶⁶

¹⁶² Stolnik, S. ; Illum, L. ; Davis, S.S. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, *16*, 195-214

¹⁶³ Conner, S.D. ; Schmid, S.L. *Nature* **2003**, *422*, 37-44

¹⁶⁴ Xu, Y. ; Szoka, F.C. *Biochemistry* **1996**, *35*, 5616-5623

¹⁶⁵ Lechardeur, D. ; Verkman, A.S. ; Gergely, L.L. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 755-767

¹⁶⁶ Medina-Kauwe, L.K. ; Xie, J. ; Hamm-Alvarez, S. *Gene Ther.* **2005**, *12*, 1734-1751

- **Le transport intra-cellulaire** : les acides nucléiques, une fois libérés dans le cytoplasme, vont se déplacer et pénétrer dans le noyau. Le mécanisme de migration est assez mal connu, les études ne pouvant déterminer si les acides nucléiques sont libres ou toujours sous forme de complexes dans le cytoplasme. Diverses hypothèses tendent à croire que les acides nucléiques pourraient se servir du cytosquelette de la cellule pour atteindre son noyau, ou encore que le déplacement du complexe anionique est médié par un gradient polyanionique de la cellule¹⁶⁷.

- **L'entrée dans le noyau** : elle peut se faire par les pores, mais le matériel génétique doit alors être de petite taille (< 60 KDa), ou lors de la mitose qui induit la disparition de la membrane nucléaire. Il sera alors transcrit et traduit par la machinerie moléculaire de la cellule. Le gène-médicament pourra alors s'exprimer mais cela seulement transitoirement¹⁶⁸.

III - L'évolution des lipides cationiques

Le premier vecteur synthétique utilisé pour la transfection d'acides nucléiques est le DOTMA, un composé présentant deux chaînes oléyles et une tête cationique ammonium en association à la DOPE, un co-lipide zwitterionique (Figure 85). Cette combinaison de lipides a donné d'excellents résultats de transfections réalisées sur diverses lignées cellulaires^{150a}.

Diverses modifications de ces produits ont été réalisées notamment pour en diminuer la toxicité ou pour en favoriser l'hydratation¹⁶⁹.

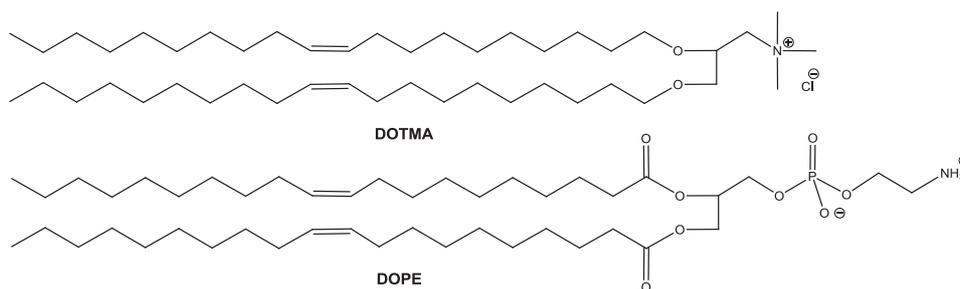


Figure 85 : Structures du DOTMA et de la DOPE

¹⁶⁷ a) Lechardeur, D. ; Lukacs, G.L. *Curr. Gene. Ther.* **2002**, 2, 183-194. b) Wiethoff, C.M. ; Middaugh, C.R. *J. Pharm. Sci.* **2003**, 92, 203-217

¹⁶⁸ Anderson, W.F. ; Kichler, A. ; Danos, O. ; Lehn, P. ; Durcuet, C. ; Callon, M. ; Rabeharisoa, V. ; Gaudillere, J.P. ; Lowy, I. *La Recherche* **1998**, 315, 52-71

¹⁶⁹ a) Leventis, R. ; Silviu, J.R. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, 1023, 124-132. b) Bennett, M.J. ; Aberle, A.M. ; Balasubramaniam, R.P. ; Malone, J.G. ; Malone, R.W. ; Nantz, M.H. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 4069-4078

Les polyamines et les lipides cationiques dérivés du cholestérol ont également fait l'objet de nombreuses études. Cependant le laboratoire s'est intéressé aux phospholipides. En effet, de nombreux phospholipides naturels sont connus comme étant des constituants majeurs des membranes plasmiques et plusieurs co-lipides composant le pool de molécules utilisées pour la transfection portent des fonctions phosphorées (tels que la DOPE). En partant de ces considérations, plusieurs générations de phospholipides cationiques ont été synthétisées :

- **Première génération** : ces composés monocationiques de type phosphonate tendent à mimer les composés phospholipidiques membranaires naturels. Ils se composent d'une tête cationique de type ammonium, d'un espaceur aliphatique et d'une queue hydrophobe constituée de deux chaînes grasses (Figure 86). Les tests *in vitro* et *in vivo* réalisés avec ces composés ont montré des résultats de transfection intéressants¹⁷⁰. En plus de cela, une localisation de ces lipoplexes dans les poumons a pu être mise en évidence après administration IV¹⁷¹. Cependant leur niveau d'expression, notamment *in vivo*, reste assez faible.

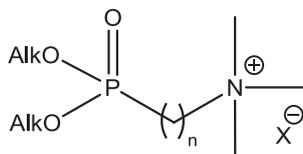


Figure 86 : Structure des lipides cationiques - 1^{ère} génération

- **Deuxième génération** : elle se distingue notamment par le remplacement de la tête ammonium par un motif phosphonium ou arsonium (Figure 87). Ces composés présentent une toxicité induite plus faible¹⁷² et une efficacité de transfection plus élevée¹⁷³ par rapport à la première génération, celle-ci reste néanmoins relativement faible.

¹⁷⁰ a) Floch, V. ; Le Bloc'h, G. ; Audrezet, M.P. ; Yaouanc, J.J. ; Clément, J.C. ; Des Abbayes, H. ; Mercier, B. ; Abgrall, J.F. ; Ferec, C. *Blood Cells Mol. Dis.* **1997**, *23*, 69-87. b) Floch, V. ; Delépine, P. ; Guillaume, C. ; Loisel, S. ; Chasse, S. ; Le Bloc'h, G. ; Gobin, E. ; Leroy, J.P. ; Ferec, C. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1464*, 95-103

¹⁷¹ Delépine, P. ; Guillaume, C. ; Montier, T. ; Clément, J.C. ; Yaouanc, J.J. ; Des Abbayes, H. ; Berthou, F. ; Le Pape, A. ; Ferec, C. *J. Gene Med.* **2003**, *5*, 600-608

¹⁷² Guenin, E. ; Herve, A.C. ; Clément, J.C. ; Yaouanc, J.J. ; Clément, J.C. ; Férec, C. ; Des Abbayes, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *112*, 643-645

¹⁷³ Floch, V. ; Loisel, S. ; Guenin, E. ; Herve, A.C. ; Clément, J.C. ; Yaouanc, J.J. ; Des Abbayes, H. ; Ferec, C. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4617-4628

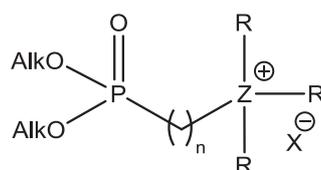


Figure 87 : Structure des phospholipides cationiques - 2^{ème} génération (Z⁺ : P⁺ ou As⁺)

- **Troisième génération** : elle est issue d'études liées à la biodistribution et au routage intracellulaire des lipoplexes¹⁶⁶. Ce sont des composés de type phosphoramidate pouvant s'hydrolyser en condition acide. Ces vecteurs potentiellement pH-sensibles ont été synthétisés dans le but de posséder une meilleure capacité de libération de la tête polaire couplée à l'ADN, l'hypothèse était de faciliter la sortie de l'endosome (Figure 88). Tout comme les vecteurs de la seconde génération, ils peuvent posséder une tête cationique de type phosphonium ou encore arsonium. Ils présentent une efficacité plus importante que les vecteurs de la seconde génération pour une toxicité semblable¹⁷⁴.

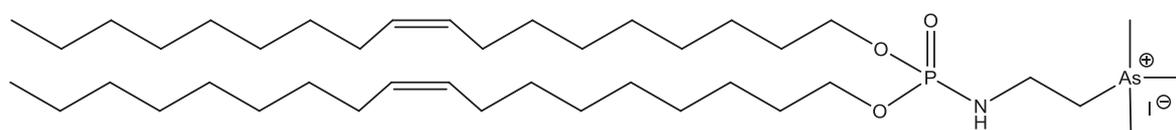
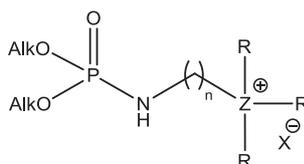


Figure 88 : Structure des lipophosphoramidates - 3^{ème} génération (Z⁺ : P⁺ ou As⁺) – Exemple du KLN47

D'autres variations de structure ont été rapportées plus récemment montrant en particulier l'impact de la structure de la chaîne lipidique,¹⁷⁵ de la nature de la fonction phosphorée¹⁷⁶,

¹⁷⁴ a) Montier, T. Delépine, P. ; Le Ny, K. ; Fichou, Y. ; Le Bris, M. ; Hardy, E. ; Picquet, E. ; Yaouanc, J.J. ; Clément, J.C. ; Férec, C. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1665*, 118-133. b) Montier, T. ; Delépine, P. ; Marianowski, R. ; Le Ny, K. ; Le Bris, M. ; Gillet, D. ; Potard, G. ; Mondine, P. ; Frachon, I. ; Yaouanc, J.J. ; Clément, J.C. ; Des Abbayes, H. ; Férec, C. *Mol. Biotech.* **2004**, *26*, 193-205. c) Picquet, E. ; Le Ny, K. ; Delépine, P. ; Montier, T. ; Yaouanc, J.J. ; Cartier, D. ; Des Abbayes, H. ; Férec, C. ; Clément, J.C. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1051-1053

¹⁷⁵ a) Le Gall, T. ; Loizeau, D. ; Picquet, E. ; Carmoy, N. ; Yaouanc, J.J. ; Burel-Deschamps, L. ; Delépine, P. ; Giamarchi, P. ; Jaffrès, P.A. ; Lehn, P. ; Montier, T. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1496-1508 ; b) Lindberg, M. ; Carmoy, N. ; Le Gall, T. ; Fraix, A. ; Berchel, M. ; Lorilleux, C. ; Couthon-Gourvès, H. ; Bellaud, P. ; Fautrel, A. ; Jaffrès, P.A. ; Lehn, P. ; Montier, T. *Biomaterials*, **2012**, *33*, 6240-6253.

¹⁷⁶ a) Fraix, A. ; Montier, T. ; Carmoy, N. ; Loizeau, D. ; Burel-Deschamps, L. ; Le Gall, T. ; Giamarchi, P. ; Couthon-Gourvès, H. ; Haelters, J.P. ; Lehn, P. ; Jaffrès, P.A. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2422-2432. b) Fraix, A. ; Montier, T. ; Le Gall, T. ; Sevrain, C.M. ; Carmoy, N. ; Lindberg, M.F. ; Lehn, P. ; Jaffrès, P.A. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 2051-2058

de la nature de la tête cationique¹⁷⁷ sur l'efficacité de transfection ou encore de l'introduction de pont disulfure au sein du domaine hydrophobe.¹⁷⁸ Un autre aspect très important de la vectorisation réside dans l'adressage moléculaire. Cette approche, qui n'avait pas été abordé dans l'équipe précédemment vise à fonctionnaliser les nanoparticules par un motif de ciblage qui sera reconnu spécifiquement par une cellule ou un tissu cible.

IV - ARN interférents et récepteurs sigma

1 - Les ARN interférents

Dans de nombreux cas la thérapie génique a pour but de rétablir l'activité d'une protéine déficiente comme c'est le cas pour la mucoviscidose ou pour les « enfants-bulles ». Certaines pathologies, en revanche, nécessitent l'extinction de l'expression d'une protéine. C'est le cas notamment des cancers durant lesquels certaines cellules cancéreuses sont connues pour exprimer ou surexprimer certaines protéines favorisant l'angiogénèse, la migration cellulaire ou tout simplement la croissance tumorale¹⁷⁹. Dans le but de réduire le niveau d'expression de ces protéines, il est envisageable d'employer un ARN simple ou double brins qui va interférer avec un ARN messenger spécifique afin de le dégrader et de diminuer ainsi sa traduction en protéine. Dans les années 90, Jorgensen et coll. ont découvert que l'introduction d'un gène dans une plante pouvait entraîner l'extinction de l'expression du gène naturel¹⁸⁰. Fire et coll. ont alors montré que l'expression de protéines contenues dans des cellules de *C. elegans* en y introduisant de l'ARN double brins pouvait être éteinte¹⁸¹. C'est de là qu'est issu le concept d'ARN interférent.

Pendant plusieurs années, les études sur les ARN interférents n'ont pas pu être réalisées sur des cellules de mammifères. En effet, l'introduction d'un ARN double brins de grande taille

¹⁷⁷ Berchel, M. ; Le Gall, T. ; Couthon-Gourvès, H. ; Haelters, J.P. ; Montier, T. ; Midoux, P. ; Lehn, P. ; Jaffrès, P.A. *Biochimie* **2012**, *94*, 33-41

¹⁷⁸ Fraix, A. ; Le Gall, T. ; Berchel, M. ; Denis, C. ; Lehn, P. ; Montier, T. ; Jaffrès, P.A. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, Accepted

¹⁷⁹ a) Slamon, D.J. ; Clark, G.M. ; Wong, S.G. ; Levin, W.J. ; Ullrich, A. ; McGuire, W.L. *Science* **1987**, *235* 177-182. b) Vogelstein, B. ; Kinzler, K.W. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 789-799

¹⁸⁰ a) Jorgensen, R.A.; Atkinson, R.G.; Forster, R.L.S.; Lucas, W.J. *Science* **1998**, *279*, 1486-1487. b) Kerschen, A. ; Napoli, C.A. ; Jorensen, R.A. ; Müller, A.E. *FEBS Letters* **2004**, *566*, 223-228

¹⁸¹ Timmons, L. ; Hiroaki, T. ; Mello, C. ; Fire, A.Z. *Mol. Biol. Cell.* **2003**, *14*, 2972-2983

induisait une réponse antivirale entraînant la dégradation des ARN cellulaires et donc la mort de la cellule (voie interféron). Le problème fut contourné par l'introduction de brins d'ARN beaucoup plus courts (20-25 paires de bases) qui ne déclenchaient pas la réponse interféron, les siRNA¹⁸².

D'un point de vue mécanistique plusieurs phénomènes peuvent se produire. Une fois dans la cellule, le siRNA est pris en charge par le complexe multi-protéique RISC (RNAi Induced Silencing Complex). Ce nouveau complexe va passer en revue les différents ARN messagers (ARNm) de la cellule. S'il n'y a aucune homologie entre le siRNA et l'ARNm, ce dernier sera normalement traduit en protéine. Si quelques séquences sont communes, la traduction est bloquée mais l'ARNm n'est pas dégradé. En revanche si la séquence est parfaitement homologue alors l'ARNm est coupé par RISC et dégradé et la protéine correspondante ne sera donc pas synthétisée (Figure 89). Comme les séquences d'ARNm codant pour des protéines cibles peuvent être connues, il est facile de synthétiser un siRNA capable de s'hybrider à ces séquences et ainsi empêcher la synthèse de ces protéines.

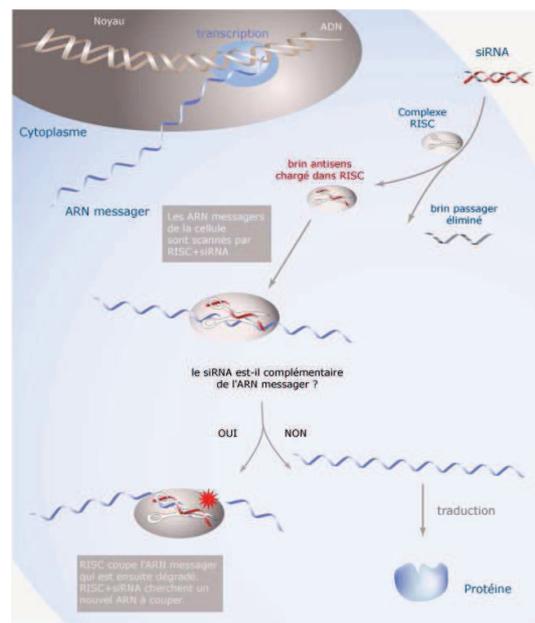


Figure 89 : Mécanisme d'action des ARNi
D'après Selexel¹⁸³

¹⁸² a) Elbashir, S.M. ; Lendeckel, W. ; Tuschl, T. *Gene & Development* **2001**, *15*, 188-200. b) Elbashir, S.M. ; Harborth, J. ; Lendeckel, W. ; Yalcin, A. ; Weber, K. ; Tuschl, T. *Nature* **2001**, *411*, 494-498

¹⁸³ <http://www.selexel.com/francais/rnai.php>

L'utilisation de siRNA est devenue extrêmement courante en biologie moléculaire pour étudier le rôle des gènes. Bien qu'étant encore très récente, cette technique *in vivo* a déjà montré des résultats très intéressants comme ceux de Zhang et coll.¹⁸⁴, qui ont montré l'extinction de l'expression de la protéine EGFR chez la souris atteinte de tumeur cérébrale (*Epidermal Growth Factor Receptor*, récepteur membranaire possédant un rôle oncogénique dans les cancers solides).

2 - Les récepteurs sigma

Les récepteurs sigma sont des récepteurs de membranes plasmiques bien connus ayant une forte affinité pour les neuroleptiques, les psychotropes tel que l'halopéridol mais également les substances connues comme étant des anti-arythmiques cardiaques (amiodarone ou clofilium)¹⁸⁵. Cette protéine a été décrite pour la première fois par Martin et coll. en 1976¹⁸⁶. En effet, cette équipe a décrit les effets psychomimétiques induits par la *N*-allyl-normétazocine (un dérivé d'opiacé) chez le chien, alors que les ligands spécifiques des récepteurs opiacés μ et κ n'induisaient aucun effet. Ils ont donc proposé les récepteurs sigma comme une sous-unité de ces récepteurs. Cependant, les tests pharmacologiques ont montré que les récepteurs sigma sont activés par des molécules sans rapport avec les opiacés (c'est le cas de la phencyclidine et l'halopéridol) (Figure 90).

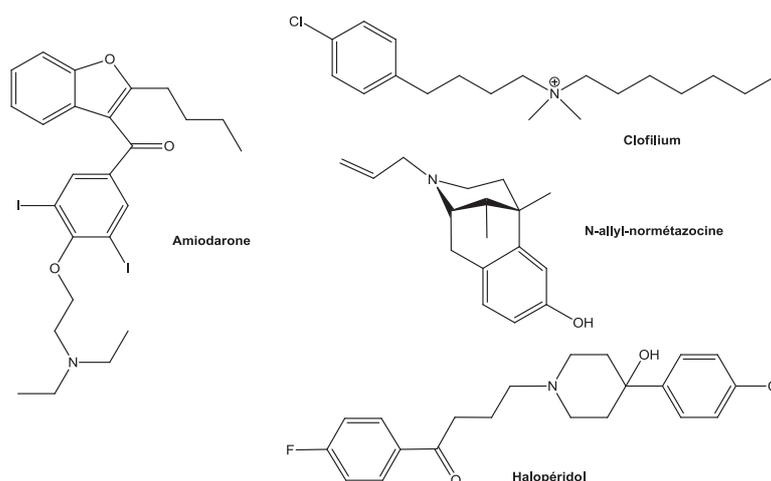


Figure 90 : Agonistes des récepteurs sigma

¹⁸⁴ Zhang, Y. ; Zhang, Y.F. ; Bryant, J. ; Charles, A. ; Boado, R.J. ; Pardridge, W.M. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 3667-3677

¹⁸⁵ Maurice, T. ; Urani, A. ; Phan, V.L. ; Romieu, P. *Brain Res. Rev.* **2001**, *37*, 116-132

¹⁸⁶ Martin, R.W. ; Eadezs, C.E. ; Thompsom, J.A. ; Huppler, R.E. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1976**, *197*, 517-532

Les différentes études ont également permis de constater que ce récepteur ne présentait pas de similitude structurale avec les récepteurs aux opiacés. De là, ils sont devenus une catégorie distincte de récepteurs (Figure 91). Ils sont présents dans le système immunitaire, endocrine et nerveux ainsi que dans certains tissus périphériques¹⁸⁷.

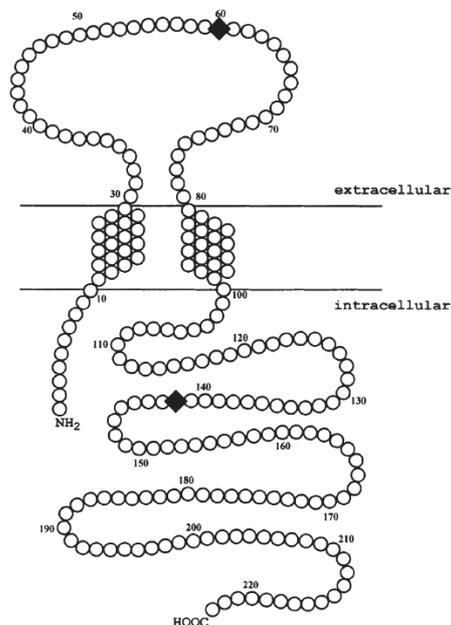


Figure 91 : Structure du récepteur sigma
D'après Aydar, E. et coll.¹⁸⁸

La fonction de ces récepteurs est encore mal connue¹⁸⁹. Leur activation par un agoniste peut induire des effets hallucinogènes et peut parfois même être responsable des convulsions paradoxales pouvant être observées lors des overdoses dues aux opiacés. Les molécules connues pour être des agonistes des récepteurs sigma incluent notamment la cocaïne, la diacétylmorphine et la méthamphétamine¹⁹⁰. Beaucoup de ces agonistes interagissent avec d'autres cibles, ce qui rend le rôle des récepteurs sigma difficile à établir.

L'activation des récepteurs sigma induit de nombreux effets physiologiques tels que de l'hypertension, de la tachycardie, de la tachypnée et de la mydriase. Souvent les effets de ses agonistes sont hétérogènes, quelques uns entraînent des convulsions chez l'animal (c'est le cas de la cocaïne), certains provoquent des sentiments de malaise et d'anxiété, d'autres

¹⁸⁷ a) Duncan, G. ; Wang, L. *Exp. Eye Res.* **2005**, *81*, 121-122. b) Wu, Z. ; Bowen, W.D. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 29198-28215

¹⁸⁸ Aydar, E. ; Palmer, C.P. ; Klyachko, V.A. ; Jackson, M.B. *Neuron.* **2002**, *34*, 399-410

¹⁸⁹ Leonard, B.E. *Pharmacopsychiatry* **2004**, *37*, 166-170

¹⁹⁰ Guitart, X. ; Codony, X. ; Monroy, X. *Psychopharmacology* **2004**, *174*, 301-319

ont des effets antidépresseurs en agissant comme des euphorisants¹⁹¹.

Les récepteurs sigma sont surexprimés dans de nombreux cancers tels que le mélanome, le carcinome du poumon à grandes cellules, les tumeurs mammaires d'origine neurale et le cancer de la prostate¹⁹², ils sont notamment présents dans les lignées surexprimant le canal SK3. Ces protéines membranaires sont donc idéales pour réaliser un ciblage de cellules cancéreuses dans le cas de la thérapie génique. En effet, les études des agonistes des récepteurs sigma réalisées par Gilligan puis Glennon ont permis de mettre en évidence un modèle structural type¹⁹³ (Figure 92).

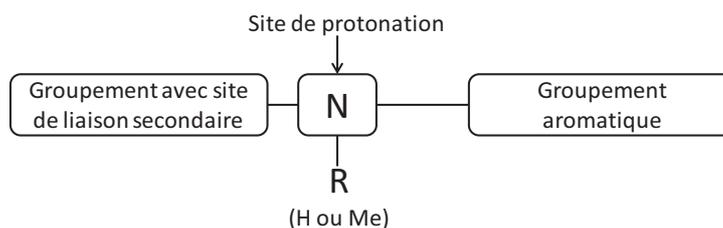


Figure 92 : Etude structure-activité des agonistes des récepteurs sigma
D'après Glennon, R.A.^{193b}

Une extinction de l'expression du canal SK3 peut donc être envisagée si des cellules cancéreuses surexprimant le récepteur sigma et la protéine SK3 sont traitées par thérapie génique. Il est possible d'intégrer au vecteur un ligand pouvant reconnaître la protéine membranaire sigma et ainsi transfecter les cellules cibles avec un ARN interférent permettant d'éteindre l'expression du canal SK3. Ce motif peut être lié de manière covalente ou électrostatique au lipide cationique. Ainsi, le vecteur se compose d'une tête cationique permettant les interactions avec les acides nucléiques et d'une tête de ciblage qui se trouve sur un co-lipide neutre ou cationique (la tête de ciblage dépendant de la protéine cible et du type cellulaire).

Comme nous l'avons indiqué précédemment, les récepteurs sigma possèdent de nombreux agonistes, les benzamides en font partie. L'utilisation de ligands présentant ce motif pour le

¹⁹¹ Wang, J. ; Mack, A.L. ; Coop, A. ; Matsumoto, R.R. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2007**, *17*, 708-716

¹⁹² a) John, C.S. ; Vilner, B.J. ; Bowen, W.D. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1737-1739. b) Vilner, B.J. ; John, C.S. ; Boxen, W.D. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 408-413. c) John, C.S. ; Vilner, B.J. ; Geyer, B.C. ; Moody, T. ; Bowen, W.D. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 4578-4583. d) John, C.S. ; Bowen, W.D. ; Fisher, S.J. ; Lim, B.B. ; Geyer, B.C. ; Vilner, B.J. ; Wahl, R.L. *Nucl. Med. Biol.* **1999**, *26*, 377-382

¹⁹³ a) Gilligan, P.J. ; Cain, G.A. ; Christos, T.E. ; Cook, L. ; Drummond, S. ; Johnson, A.L. ; Kergaye ; A.A. ; McElroy, J.F. ; Rohrbach, K.W. ; Schmidt, W.K. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4344-4361. b) Glennon, R.A. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*, **2005**, *5*, 927-940

diagnostic ou pour des thérapies de ciblage sur des tumeurs a donc été mise en place, ainsi plusieurs dérivés de benzamides ont été synthétisés et peuvent être présentés comme des agents d'imagerie de tumeurs^{192c,192d}. Les travaux menés par Huang et coll. ont permis de mettre en évidence le ciblage de cellules qui surexpriment la protéine sigma (B16F10 : cellules du mélanome murin, DU-145 : cellules de l'adénocarcinome de la prostate humaine, NCI-H460 : cellules du cancer pulmonaire humain), par des vecteurs présentant des motifs anisamides au bout d'un espaceur de type PEG₂₀₀₀¹⁹⁴ (Figure 93).

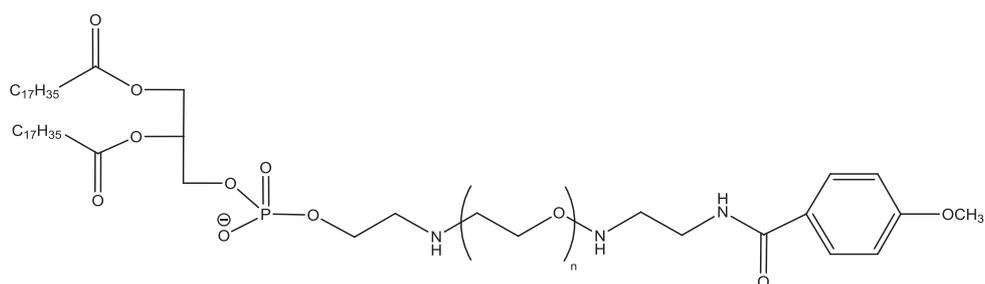


Figure 93 : Structure d'un lipide à tête ciblante pour les récepteurs sigma

V - Objectifs

Le ciblage des cellules à traiter lors de la vectorisation est un enjeu extrêmement important pour la thérapie génique. Un traitement des cellules *ex vivo* ou par injection directe dans l'organe à traiter permet un ciblage efficace cependant toutes les cellules ne sont pas accessibles par cette voie. L'injection systémique est la stratégie qui pourrait s'avérer la plus efficace si le vecteur est capable d'atteindre uniquement le type cellulaire à traiter. Le ciblage peut être envisagé par greffage (covalent ou électrostatique) d'un ligand spécifique à des récepteurs cellulaires spécifiques des membranes plasmiques d'une lignée cellulaire à traiter.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'incorporation de lipides neutres portant des motifs anisamides, ligands spécifiques des récepteurs sigma, à des formulations de lipides cationiques utilisés pour la transfection.

Le but de cette étude est de synthétiser et d'étudier le rôle de ces co-lipides neutres lors de transfections *in vitro* sur des lignées cellulaires exprimant ou non le récepteur sigma.

¹⁹⁴ a) Banerjee, R. ; Tyagi, S.L. ; Li, S. ; Huang, L. *Int. J. Cancer* **2004**, *112*, 693-700. b) Li, S.D. ; Huang, L. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2006**, *1082*, 1-8. c) Li, S.D. ; Huang, L. *Molecular Pharmaceutics* **2006**, *3*, 579-588

Une fois synthétisés, les différents co-lipides ont été formulés avec le KLN47, un lipophosphoramidate cationique dont les capacités de transfection sont déjà bien connues^{174c,195}.

L'étude d'efficacité de transfection de ces édifices sous la forme de liposomes et l'étude du ciblage des récepteurs sigma ont été réalisées sur différentes lignées cellulaires *in vitro* : les MDA-MB-435 sh rd (cellules cancéreuses hautement métastatiques du sein), les SKMEL28 (mélanome malin) et les cellules épithéliales HeLa (adénocarcinome du col de l'utérus). Les MDA-MB-435s et les SKMEL28 surexpriment les récepteurs sigma tandis que les cellules HeLa sont notre témoin négatif.

L'étude de l'efficacité de transfection des liposomes obtenus a été effectuée après réduction de leur taille par extrusion et de manière à obtenir des tailles de liposomes homogènes (entre 120 et 150 nm). De plus, l'étude du ciblage des cellules a été réalisée en effectuant les transfections en présence ou non d'halopéridol, un agoniste des récepteurs sigma, afin de pouvoir évaluer la capacité de ciblage des vecteurs. Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé un plasmide portant le gène rapporteur *luc* codant pour la luciférase (Figure 94). Si la transfection s'effectue, la luciférase sera produite par la cellule et, en présence de luciférine, une émission de photons pourra être observée et mesurée.

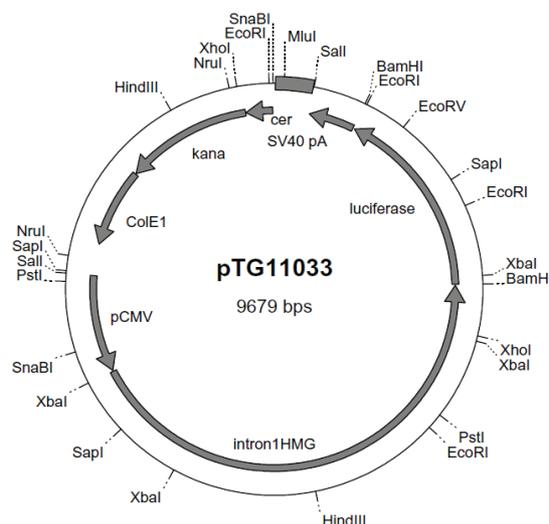


Figure 94 : Carte de restriction du plasmide pTG11033 ou pCMV-luc

¹⁹⁵ Clément, J.C. ; Delépine, P. ; Des Abbayes, H. ; Férec, C. ; Le Ny, K. ; Montier, T. ; Yaouanc, J.J. *French Patent N°0214044. Ext. Int. (PCT)(2003) 2002*

**CHAPITRE 2 : SYNTHÈSE ET ÉVALUATION
DE CO-LIPIDES NEUTRES À TÊTE CIBLANTE
POUR LA VECTORISATION D'ARN
INTERFERENTS**

I - Synthèse des différents co-lipides neutres

Comme nous l'avons précédemment énoncé, notre objectif est de synthétiser différents co-lipides neutres et de les formuler avec un lipide cationique afin de réaliser des tests biologiques permettant de vérifier le ciblage des cellules portant des récepteurs sigma.

Les co-lipides neutres que nous avons synthétisés sont des phosphoramides portant deux chaînes grasses de type oléyle ou phytanyle et une tête polaire de type anisamide afin de cibler le récepteur sigma (Figure 95). La variation de la nature des chaînes grasses (présence ou non d'insaturations ou de ramifications) nous permettra de déterminer l'incidence de cette dernière sur l'efficacité de ciblage de la molécule.

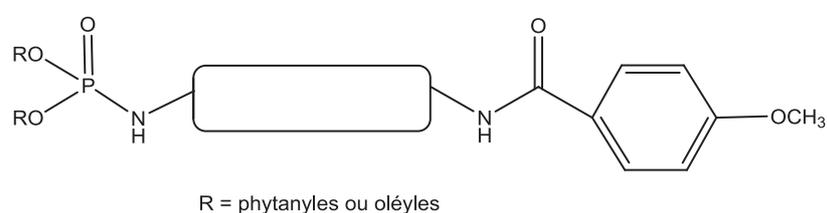


Figure 95 : Structure globale de nos co-lipides neutres

Nous avons également voulu déterminer l'influence de la longueur de l'espaceur. Les molécules que nous désirons synthétiser porteront donc soit un espaceur de type tétraéthylène glycol (TEG), soit un espaceur beaucoup plus long issu de la « click-chemistry » (Figure 96). En effet, si l'espaceur est trop court, le motif anisamide peut être ne pas être reconnu par le récepteur sigma.

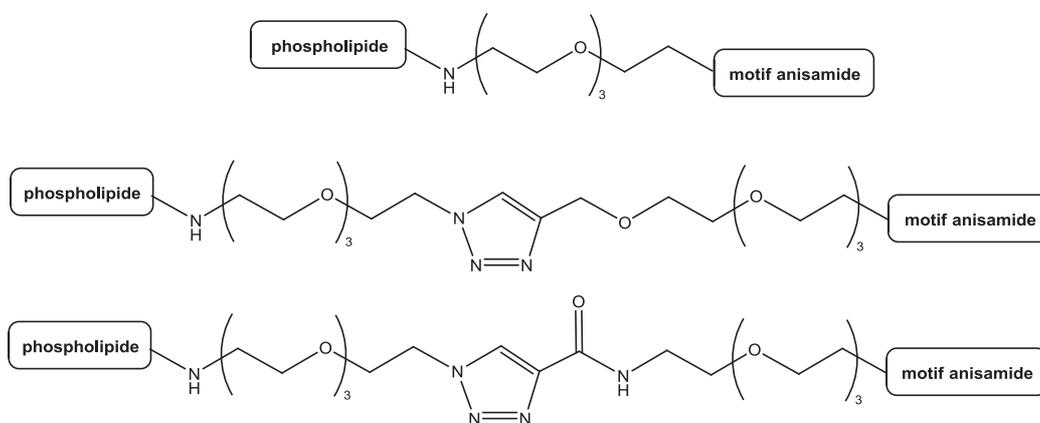


Figure 96 : Structures des différents espaceurs

En compilant les différentes données, nous avons cherché à synthétiser quatre co-lipides neutres (Figure 97).

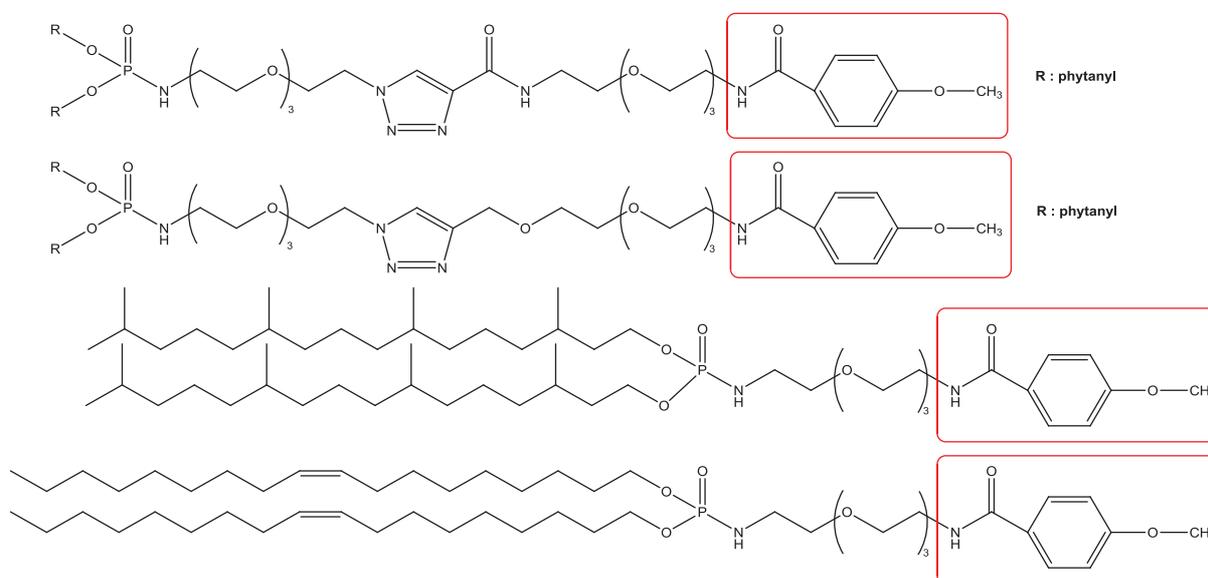


Figure 97 : Structures des co-lipides neutres à synthétiser

1 - Synthèse de phosphoramides : réaction d'Atherton et Todd

Les co-lipides neutres synthétisés ont comme point commun la présence d'un motif phosphoramide.

Il existe plusieurs méthodes pour préparer les phosphoramides développés depuis les années 1940. Généralement il s'agit de la condensation d'une amine (primaire ou secondaire) sur un dérivé phosphorylé halogéné (Figure 98).

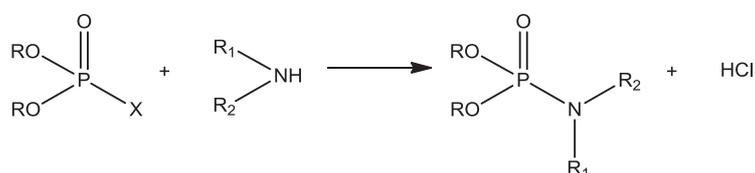


Figure 98 : Schéma général de la synthèse de phosphoramides

Ce dérivé peut être isolé comme c'est le cas dans les travaux de McCombie et coll.¹⁹⁶ ou formé *in situ* comme c'est le cas dans les travaux d'Atherton et Todd¹⁹⁷ ou de Zwierzak¹⁹⁸.

¹⁹⁶ McCombie, H. ; Saunders, B.C. ; Stacey, J. *J. Chem. Soc.* **1945**, 921-922

Les travaux de Zwierzak se réalisent à l'aide d'un mécanisme de transfert de phase alors que ceux d'Atherton et Todd, actuellement utilisés au laboratoire, s'effectuent en milieu homogène. Dans les deux cas, le phosphoramidate est formé à partir d'un phosphite en présence d'un dérivé halogéné de type CCl_4 ou CBrCl_3 , seule la nature de la base diffère (organique ou non selon la méthode employée) (Figure 99).



Figure 99 : Equation générale de la réaction de formation de phosphoramidates

Dans ces travaux, nous avons employé la dernière méthodologie de synthèse de phosphoramidates symétriques mis en place au laboratoire et basée sur les travaux d'Atherton-Todd. Les différentes synthèses ont été réalisées à partir de phosphite de dioléyle ou de phosphite de diphtanyle, respectivement synthétisés au laboratoire à partir d'alcool oléique et de phytanol (issu de l'hydrogénation du phytol). Cette réaction nécessite l'utilisation d'une base de type amine tertiaire telle que la DIPEA et d'un composé halogéné comme le CBrCl_3 . Elle induit le passage par un intermédiaire halogéné de type $[(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{Br}]$ (Figure 100).

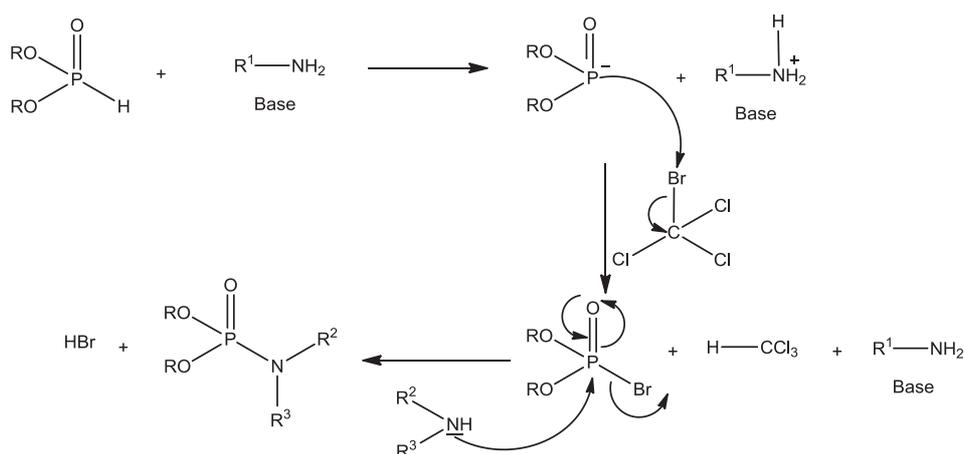


Figure 100 : Mécanisme de la réaction d'Atherton-Todd

¹⁹⁷ a) Atherton, F.R. ; Openshaw, H.T. ; Todd, A.R. *J. Chem. Soc.* **1945**, 382-385. b) Atherton, F.R. ; Todd, A.R. *J. Chem. Soc.* **1947**, 674-678

¹⁹⁸ Zwierzak, A. *Synthesis* **1975**, 8, 507-509

2 - La « click-chemistry » : cycloaddition de Huisgen

Un autre temps fort de nos synthèses est la formation de l'espaceur par réaction de « click-chemistry ». Ce terme a été introduit par Sharpless et coll.¹⁹⁹ au début des années 2000 et décrit toutes les réactions faciles à réaliser en une étape dans un solvant facilement éliminable (ou sans solvant) et stéréospécifiques. Les réactions de « click » conduisent à de bons rendements avec des produits secondaires faciles à éliminer. Bien que se rapportant à des critères très subjectifs, plusieurs réactions ont pu être classées dans cette famille, telles que les cycloadditions [3+2] (par exemple la cycloaddition de Huisgen), les réactions de type « thiol-ène »²⁰⁰, la réaction de Diels-Alder²⁰¹ etc.

La réaction qui nous intéresse est la cycloaddition de Huisgen (ou cycloaddition 1,3-dipolaire). Elle s'effectue entre un dipôle-1,3 et un dipolarophile (généralement un alcène ou un alcyne). La plupart du temps la cycloaddition de Huisgen fait référence à l'addition d'un azoture sur un alcyne vrai.

Le mécanisme de cette réaction par activation thermique a été proposé par Huisgen²⁰² en 1963 qui l'a décrite comme étant une réaction concertée sans intermédiaire radicalaire (comme il fut d'abord proposé par Firestone), le produit formé étant un hétérocycle à cinq centres. Cependant, il a longtemps été reproché le manque de réactivité et de sélectivité (deux régio-isomères formés) de cette réaction et il a fallu attendre les travaux de Medal et coll.²⁰³ d'une part et de Sharpless et coll.²⁰⁴ pour que la synthèse de ces composés *via* une catalyse au cuivre (I) soit développée.

Le mécanisme proposé pour la synthèse d'azoles catalysée par du cuivre (I) implique le passage par un acétylure de cuivre (I) (composé a). L'azoture remplace un des ligands du cuivre et se lie à ce dernier *via* l'azote lié à la chaîne carbonée (composé b) et l'azote terminal va pouvoir attaquer le carbone C-2 de l'acétylure pour former un metallacycle à six centres (composé c). Le cycle va se contracter pour former un hétérocycle à cinq centres

¹⁹⁹ Kolb, H.C. ; Finn, M.G. ; Sharpless, K.B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021

²⁰⁰ Hoyle, C.E. ; Bowman, C.N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1540-1573

²⁰¹ Waldmann, H. *Synthesis* **1994**, 535-551

²⁰² a) Huisgen, R. *Angew. Chem.* **1963** *75*, 604-637. b) Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 633-645

²⁰³ Tornøe, C.W. ; Christensen, C. ; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064

²⁰⁴ Himo, F. ; Lovell, T. ; Hilgraf, R. ; Rostovtsev, V.V. ; Noodleman, L. ; Sharpless, K.B. ; Fokin, V.V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210-216

(composé d) et enfin une étape de protéolyse va permettre la libération du triazole (composé e), ceci fermant ainsi la boucle catalytique (Figure 101).

L'apport en cuivre (I) peut être réalisé de différentes manières. Il peut être ajouté directement au milieu (utilisation de CuI par exemple) ou être formé *in situ* (composé apportant du Cu(II) avec un agent réducteur comme l'ascorbate de sodium).

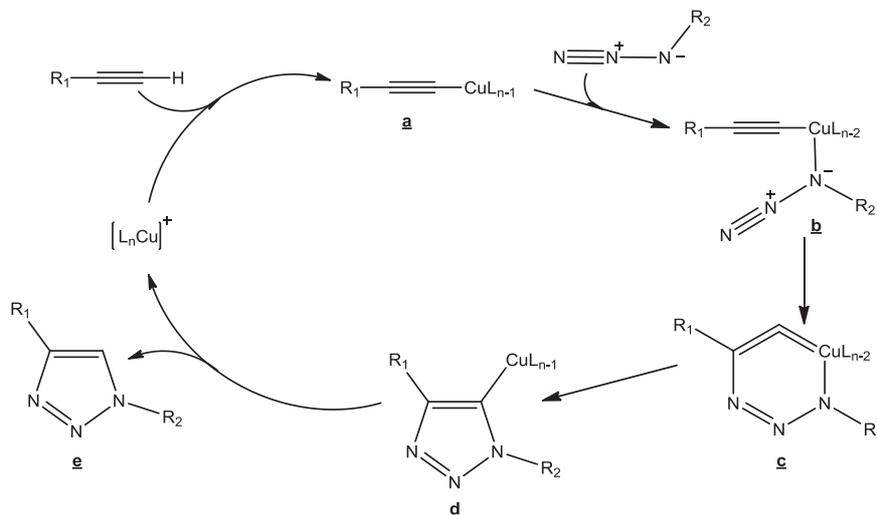


Figure 101 : Mécanisme proposé pour la réaction de "click-chemistry" catalysée par le Cu(I)
D'après Himo, F. et coll.²⁰⁴

3 - Synthèse des co-lipides neutres par la « click-chemistry »

3.1. Stratégie de synthèse

Nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, aux co-lipides possédant les bras espaceurs les plus longs. Il s'agit de phosphoramides portant deux chaînes grasses de type phytanyle. La différence entre les deux structures se trouve dans la présence d'un motif amide, plus facilement métabolisable, à la place de la liaison éther à proximité du triazole. Cette différence de groupement fonctionnel conduit à des réactions de « click-chemistry » dans différentes conditions et permet de mesurer l'incidence d'une fonctionnalisation de l'espaceur sur la transfection (Figure 102).

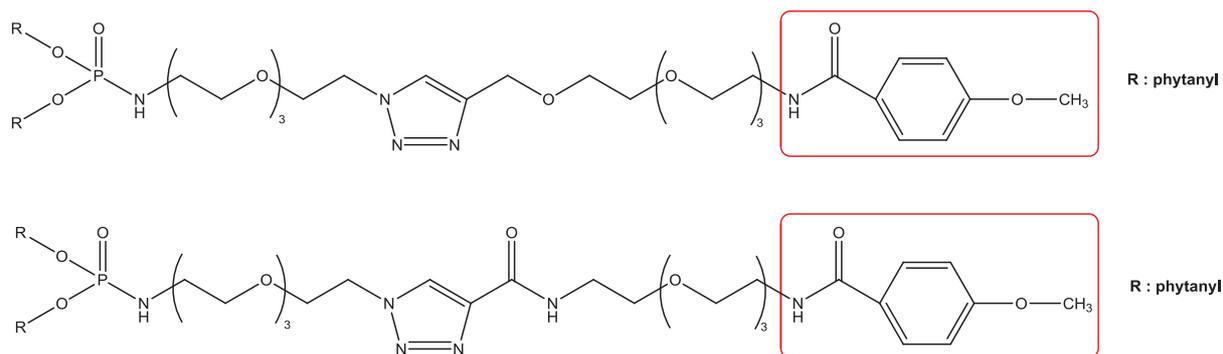


Figure 102 : Synthèse de deux co-lipides neutres par « click-chemistry »

Afin d'obtenir ces composés, nous devons synthétiser différentes « briques » que nous pourrions assembler par réaction de cycloaddition de Huisgen. Une première « brique », commune aux deux synthèses, est préparée. Elle est constituée d'un phosphoramidate portant deux chaînes phytanyles et un espaceur de type tétraéthylène glycol achevé par un motif azoture (Figure 103).

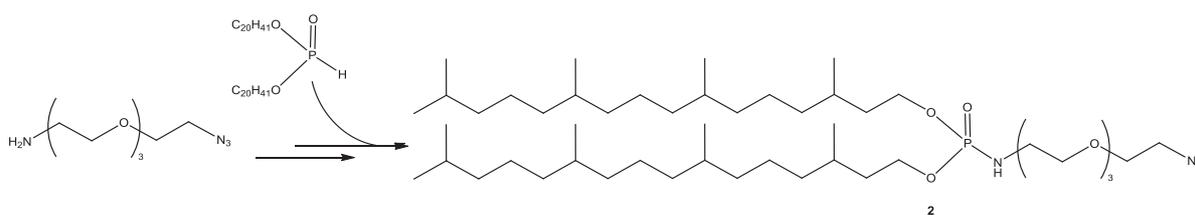


Figure 103 : Stratégie de synthèse du phosphoramidate portant le groupement azoture 2

La seconde brique est synthétisée dans le but d'obtenir une molécule portant un motif anisamide, d'une part, et un alcyne terminal, d'autre part (Figure 104).

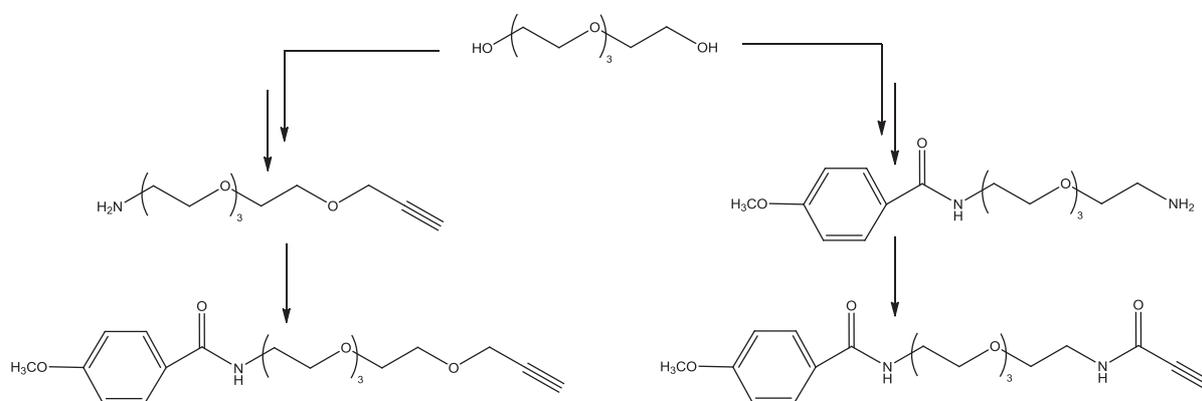


Figure 104 : Stratégie de synthèse des alcynes

3.2. Synthèse du bis(3,7,11,15-tetraméthylhexadécyl)-2-{4-[15-(4-méthoxyphényl)-15-oxo-2,5,8,11-tetraoxa-14-azapentadéc-1-yl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}-3,6,9-trioxaundécyl phosphoramidate 51

3.2.1. Synthèse du 11-azido-3,6,9-trioxaundécylphosphoramidate de bis-3,7,11,15-tetraméthyl-hexadécyle 45

La synthèse de la première « brique » s'effectue en réalisant préalablement la synthèse du bras azoté. Pour cela nous avons suivi les protocoles d'Iyer et coll.²⁰⁵ et de Schwabacher et coll.²⁰⁶.

A partir du tétraéthylène glycol commercial, nous avons réalisé la protection du diol par action de chlorure de mésyle en présence de Et₃N dans du THF anhydre. Le composé 42 est obtenu avec un rendement de 95 %. Le produit est alors mis en présence d'azoture de sodium dans du DMF, selon la méthodologie de Iyer et coll.²⁰⁵, afin de substituer les groupements mésyles et donner le diazoture 43 correspondant avec un rendement de 87 % (Figure 105).

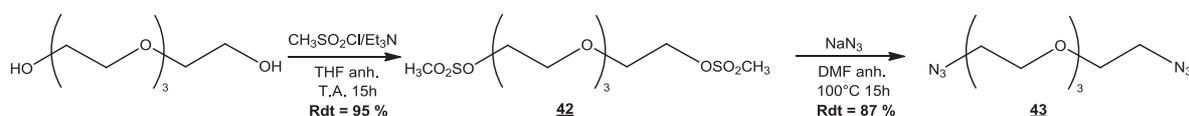


Figure 105 : Schéma de synthèse du diazoture dérivé du TEG 43

La réduction sélective d'un motif azoture du composé 43 est obtenue par réaction de Staudinger avec de la triphénylphosphine en milieu biphasique (acétate d'éthyle/HCl (1M))²⁰⁵, le composé monoréduit passant en phase aqueuse sous forme de sel d'ammonium ne subit pas la réduction du deuxième azoture. Le composé 44, obtenu avec un rendement de 64 %, est alors couplé à du phosphite de diphtanyle dans les conditions d'Atherton et Todd pour donner le composé 45 avec un rendement de 50 % (Figure 106).

²⁰⁵ Iyer, S.S. ; Anderson, A.S. ; Reed, S. ; Swanson, B. ; Schmidt, J.G. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4285-4288

²⁰⁶ Schwabacher, A.W. ; Lane, J.W. ; Schiesher, M.W. ; Leigh, K.M. ; Johnson, C.W. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1727-1729

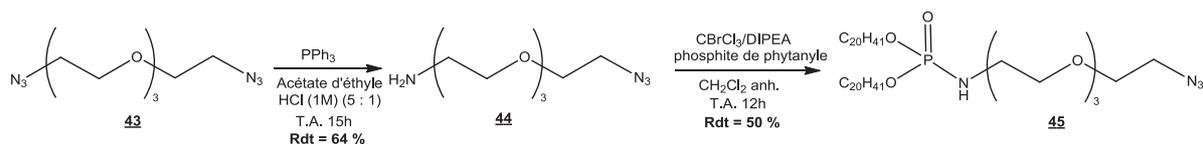


Figure 106 : Schéma de synthèse du phosphoramide **45**

3.2.2. Synthèse du 4-méthoxy-*N*-(3,6,9,12-tetraoxapentadéc-14-ynyl) benzamide **50**

La synthèse de la seconde « brique » s'effectue à partir du tétraéthylène glycol commercial en suivant la méthodologie de Ravoo et coll.²⁰⁷. L'alcoolate formé par action de *tert*-butylate de potassium dans du THF anhydre réagit avec le bromure de propargyle pour conduire à l'alcyne **46** avec un rendement de 63 %. L'hydroxyle restant est alors protégé par action de chlorure de mésyle en présence de Et₃N, le produit **47** est obtenu avec un rendement de 86 %. Le groupement mésyle est substitué par un azoture par réaction avec de l'azoture de sodium dans du DMF anhydre²⁰⁵ pour donner le composé **48** avec un rendement de 87 %. Un des groupements azoture est réduit selon les conditions de réduction de Staudinger en milieu biphasique²⁰⁶ pour donner le composé **49** avec un rendement de 75 %. Le motif anisamide est greffé par réaction de type S_N2 sur l'amine primaire du composé **49** et le produit **50** est obtenu avec un rendement de 24 % (Figure 107).

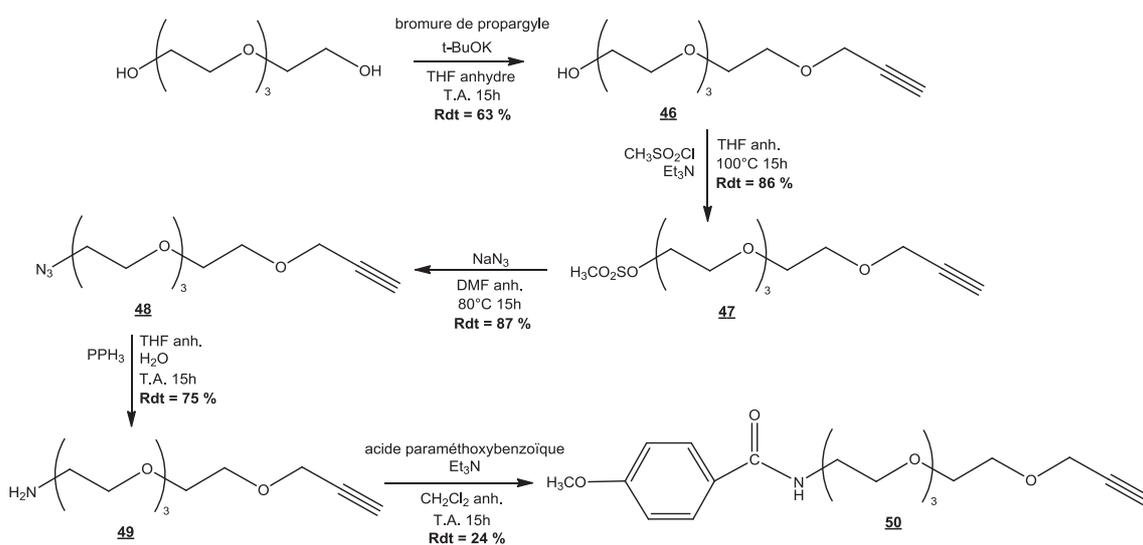


Figure 107 : Schéma de synthèse de l'alcyne **50**

²⁰⁷ Michel, O. ; Ravoo, B.J. *Langmuir* **2008**, *24*, 12116-12118

3.2.3. Synthèse du composé 51

Enfin, nous avons réalisé une cycloaddition de Huisgen entre les produits 45 et 50 en présence de CuSO_4 et d'ascorbate de sodium, selon la méthodologie de Rostovtsev et coll.²⁰⁸, pour donner le composé 51 avec un rendement de 80 % (Figure 108).

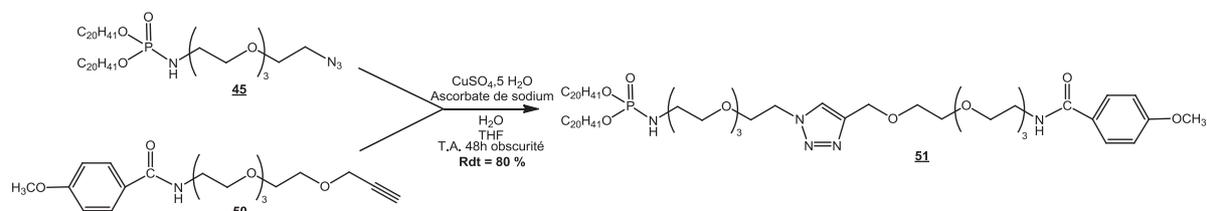


Figure 108 : Schéma de synthèse du co-lipide 51

3.3. Synthèse du bis(3,7,11,15-tetraméthylhexadécyl)-2-{4-[15-(4-méthoxyphényl)-15-oxo-5,8,11-trioxa-2,14-diazapentadéc-1-yl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}-3,6,9-trioxaundécyl phosphoramidate 55

3.3.1. Synthèse du *N*-(13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azapentadéc-14-yn-1-yl)-4-méthoxybenzamide 54

A partir du composé 44 un motif anisamide peut être greffé à l'amine primaire en présence de Et_3N dans du CH_2Cl_2 anhydre pour donner le composé 52 avec un rendement de 40 %. L'azoture est alors réduit par hydrogénation sous pression de H_2 en présence de palladium sur charbon dans de l'éthanol pour conduire à l'amine 53 avec un rendement de 86 %. Le composé 54 est obtenu par réaction de type couplage peptidique entre l'acide propiolique et le composé 53 en présence de dicyclohexylcarboxydiimide (DCC) avec un rendement de 31 % (Figure 109).

²⁰⁸ Rostovtsev, V.V. ; Green, L.G. ; Fokin, V.V. ; Sharpless, K.B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599

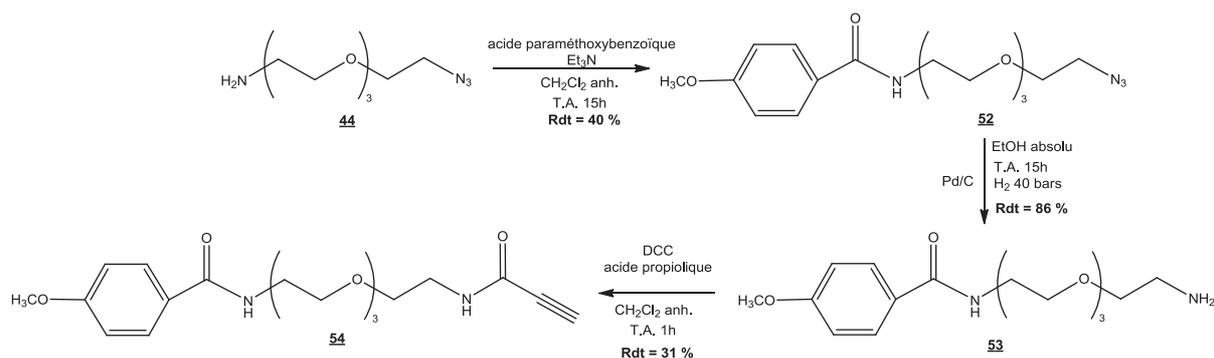


Figure 109 : Schéma de synthèse de l'alcyne **54**

3.3.2. Synthèse du composé **55**

L'étape finale est une cycloaddition de Huisgen entre les produits **45** et **54** en présence de CuI et de DIPEA, selon la méthodologie de Fazio et coll.²⁰⁹, pour donner le composé **55** avec un rendement de 31 % (Figure 110).

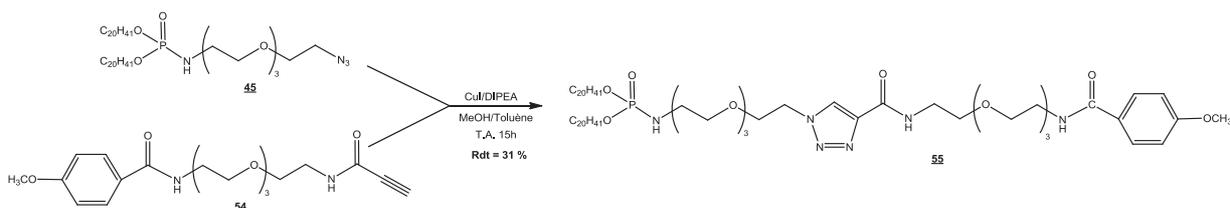


Figure 110 : Schéma de synthèse du co-lipide **55**

3.4. Synthèse du bis(3,7,11,15-tetraméthylhexadécyl)-13-(4-méthoxyphényl)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azatridéc-1-yl phosphoramide **56** et du bis(oléyl)-(4-méthoxyphényl)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azatridéc-1-yl phosphoramide **57**

Les synthèses des co-lipides neutres **56** (chaines phytanyles) et **57** (chaines oléyles) s'effectuent suivant les conditions de réaction d'Atherton et Todd précédemment décrite entre le composé **53** et, respectivement, le phosphite de phytanyle et le phosphite d'oléyle. Les produits sont obtenus avec des rendements de 14 % et 37 % (Figure 111).

²⁰⁹ Fazio, F. ; Bryan, M.C. ; Blixt, O. ; Paulson, J.C. ; Wong, C.H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14397-14402

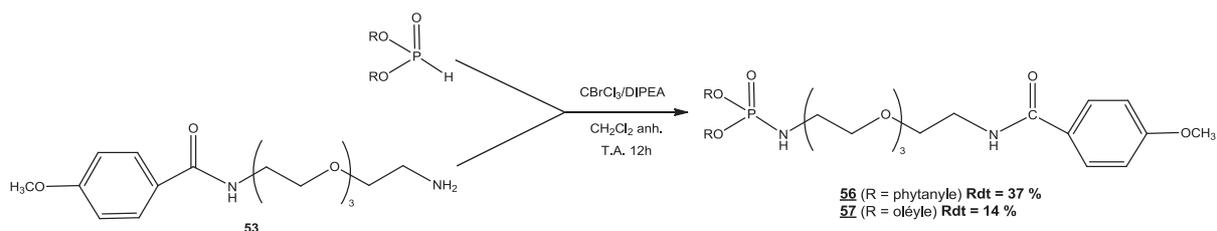


Figure 111 : Schéma de synthèse des co-lipides 56 et 57

II - Etudes physico-chimiques et évaluation biologique des composés

1 - Formulation des composés

Afin de réaliser les formulations, nous avons d'utilisé le KLN47, un phosphoramidate cationique à tête triméthylarsonium et portant deux chaînes grasses de type oléyle, qui est le lipide cationique le plus utilisé actuellement par notre laboratoire de part son efficacité de transfection et sa faible toxicité¹⁹⁵ (Figure 112).

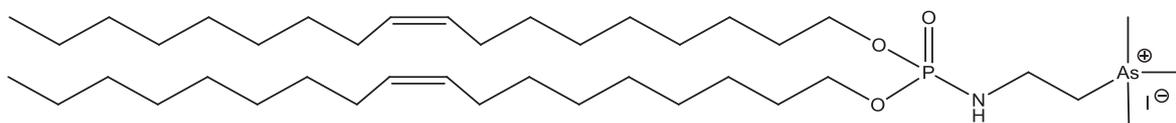


Figure 112 : Structure du KLN47

Les solutions liposomales utilisées pour les tests *in vitro* sont formulées de manière à contenir 7 % de co-lipides neutres. Les solutions aux concentrations désirées sont obtenues à partir d'une solution mère de lipide dans le CH_2Cl_2 (étape A). Les mélanges sont concentrés pour former un film lipidique sur les parois du tube (étape B). Les films sont hydratés par ajout d'eau stérile (étape C) et les liposomes sont obtenus après sonication des échantillons (étape D). Les solutions sont finalement extrudées sur une membrane de porosité de 100 nm dans le but de réduire la taille des liposomes et les mesures de taille et de potentiel zêta sont effectuées afin de s'assurer de la qualité des liposomes formés (étape E) (Figure 113).

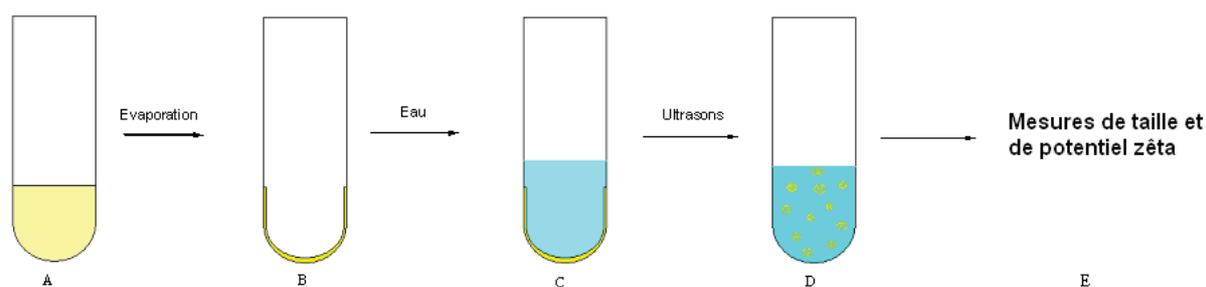


Figure 113 : Préparation des liposomes

2 - Mesures de taille et de potentiel zêta des liposomes

Les solutions liposomales ont été hydratées à 4°C pendant 4 jours. Nous pouvons constater l'efficacité du passage sur une membrane car nous obtenons des liposomes 1,6 à 2,2 fois plus petits lorsque les solutions sont extrudées. Comme nous le souhaitions, nous avons des liposomes de petites tailles (<200 nm) et globalement positifs (la charge est corrélée au potentiel zêta) (Tableau 4).

| Solutions liposomales | Structure du co-lipide Chaine grasse/ espaceur | Rapport | Taille moyenne (nm) | | Potentiel zêta (mV) | |
|-----------------------|---|---------|---------------------|---------|---------------------|---------|
| | | | Non extrudé | Extrudé | Non extrudé | Extrudé |
| KLN47 | - | 100 | 280,5 | 124,6 | +46,7 | +55,6 |
| KLN47/ <u>51</u> | Phytanyles/ TEG-Triazol-TEG | 93/7 | 219,1 | 141,5 | +42,8 | +59,8 |
| KLN47/ <u>55</u> | Phytanyles/ TEG-Triazole-amide-TEG | 93/7 | 268,6 | 166,9 | +43,0 | +47,3 |
| KLN47/ <u>56</u> | Phytanyles/TEG | 93/7 | 276,2 | 125,3 | +35,6 | +56,0 |
| KLN47/ <u>57</u> | Oléyles/TEG | 93/7 | 250,3 | 118,7 | +39,7 | +58,0 |

Tableau 4 : Mesure de taille et de potentiel zêta des liposomes

3 - Evaluation de la complexation de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose et par fluorimétrie

Avant d'effectuer les transfections sur modèles cellulaires, il est important de tester la capacité de chaque liposome à complexer l'ADN plasmidique. Il faut également déterminer les rapports de charges (rapport entre les charges positives apportées par le phospholipide et les charges négatives portées par les acides nucléiques) pour lesquels l'ADN est totalement complexé. Du BET (bromure d'éthidium) est utilisé lors de cette manipulation car c'est un intercalant de l'ADN dont la présence peut être détectée aux Ultraviolets. Le BET pourra s'intercaler dans l'ADN plasmidique libre et ainsi être visible sous un rayonnement UV. En revanche, si l'ADN plasmidique est complexé par les lipoplexes et donc compacté, le BET sera relargué et sera non fluorescent. C'est cette décroissance d'intensité sous UVs qui va être suivie par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. La lipofectamine (LFM) est utilisée comme référence commerciale pour la transfection (composé commercial constitué d'un mélange DOSPA/DOPE (3 : 1)).

Les résultats obtenus nous montrent que tous les vecteurs permettent de complexer totalement l'ADN dès le rapport de charge (RC) 1. La mesure par fluorimétrie confirme ce résultat (Figure 114).

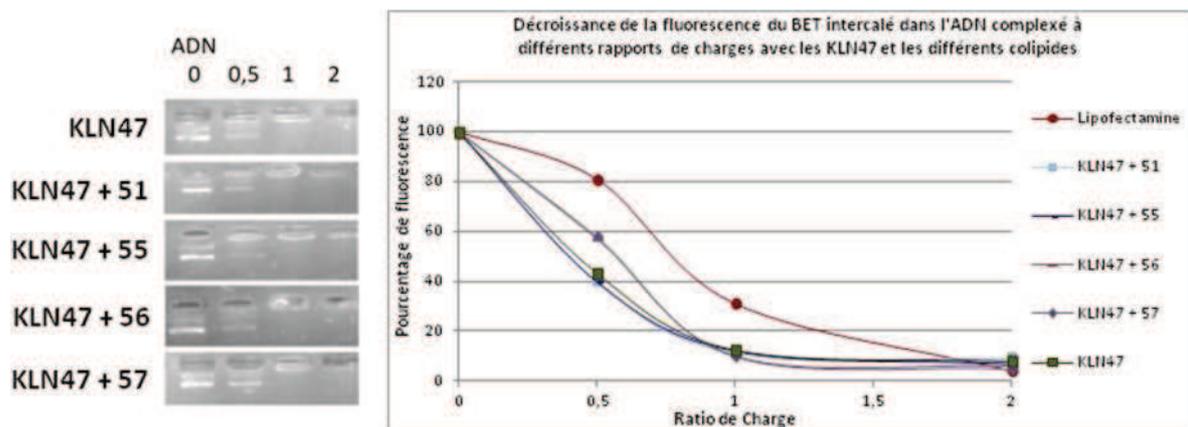


Figure 114: Test de complexation de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose et par fluorimétrie

4 - Mesure de la toxicité cellulaire

Nous avons réalisé les différentes études *in vitro* au laboratoire de l'unité INSERM U1078 dans l'équipe du Pr. Pierre Lehn. Les tests de mesure de l'efficacité de transfection et de la toxicité des différents co-lipides formulés avec le KLN47 ont été réalisés à différents rapports de charge sur trois lignées cellulaires cancéreuses adhérentes. La lignée MDA-MB-435 sh rd provient d'un cancer du sein hautement métastatique, fournies par le Pr. Christophe Vandier (Université de Tours, U1069, France). Les deux autres lignées utilisées sont les SKMEL28, provenant d'un mélanome malin et les cellules épithéliales HeLa provenant d'un adénocarcinome du col de l'utérus. Les MDA-MB-435s et les SKMEL28 présentent des récepteurs sigma contrairement aux HeLa qui seront donc la lignée servant de témoin négatif. Les protocoles des manipulations sont décrits en partie expérimentale de ce chapitre.

Le plasmide pCMV-luc, codant pour la luciférase est utilisé pour révéler l'efficacité de transfection. Les cellules transfectées produiront de la luciférase qui, en présence de luciférine, émettra des photons (description en annexes). Cette émission de lumière est exprimée dans une unité arbitraire (RLU) et ramenée à une quantité de RLU par milligramme de protéines totales afin de quantifier l'efficacité de transfection.

La toxicité est également mesurée par réaction de chimioluminescence. Il s'agit d'un dosage de la quantité d'adénylate kinase (AK) relarguée dans le milieu cellulaire par les cellules en souffrance. La cytotoxicité des vecteurs est proportionnelle à la quantité de photons émis dont la mesure est exprimée en RLU. Chaque lignée cellulaire possède une concentration intracellulaire propre en adénylate kinase, il est donc impossible d'effectuer des comparaisons inter-lignées.

Les résultats représentent le niveau de toxicité relatif des cellules traitées par les différents vecteurs rapporté au niveau de toxicité relatif des « cellules seules » (contrôle négatif) après 48 heures d'incubation. Ces cellules non traitées représentent le niveau de stress apoptotique minimal induit uniquement par l'homéostasie et la manipulation cellulaire, leur toxicité est fixée à 1 (rapport de leur niveau de toxicité relatif sur lui-même). Chaque valeur est la moyenne des résultats obtenus pour trois puits traités individuellement rapportée à la cytotoxicité moyenne des cellules non traitées (valeur sans unité).

Dans un souci de clarté, voici un rappel des structures des co-lipides neutres utilisés pour cette étude ainsi que celle du lipide cationique (Tableau 5). Les formulations ont été réalisées à raison de 7 % de co-lipides neutres par liposome.

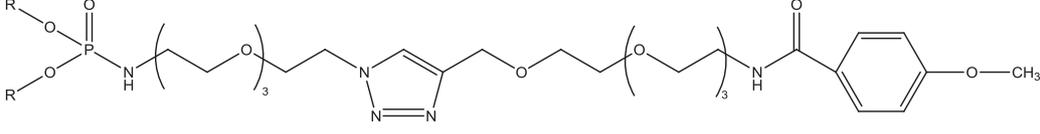
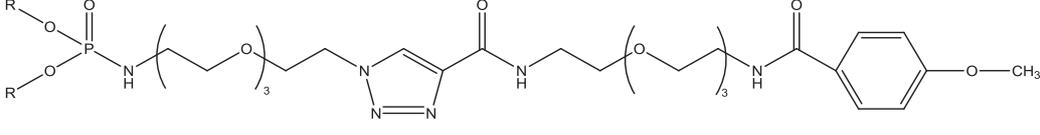
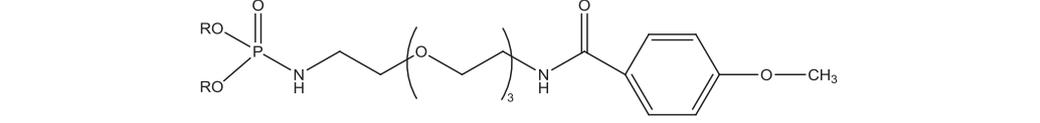
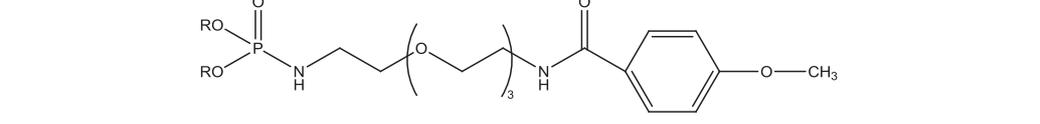
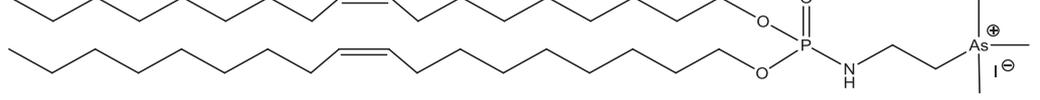
| Composé | Structure |
|--------------|---|
| 51 |  <p style="text-align: center;">R : phytanyl</p> |
| 55 |  <p style="text-align: center;">R : phytanyl</p> |
| 56 |  <p style="text-align: center;">R : phytanyl</p> |
| 57 |  <p style="text-align: center;">R : oléyl</p> |
| KLN47 |  |

Tableau 5 : Rappel des structures des différents co-lipides neutres et du lipide cationique

4.1. MDA-MB-435 sh rd

Après 48 heures d'incubation, il est intéressant de constater que l'halopéridol n'engendre pas de cytotoxicité supérieure pour les cellules non traitées. En revanche, au RC2, nous observons systématiquement une augmentation de la toxicité en présence d'halopéridol. Nous notons également que la cytotoxicité est toujours plus importante au RC2 qu'au RC1 (Figure 115) ce qui est conforme à des observations antérieures du laboratoire.

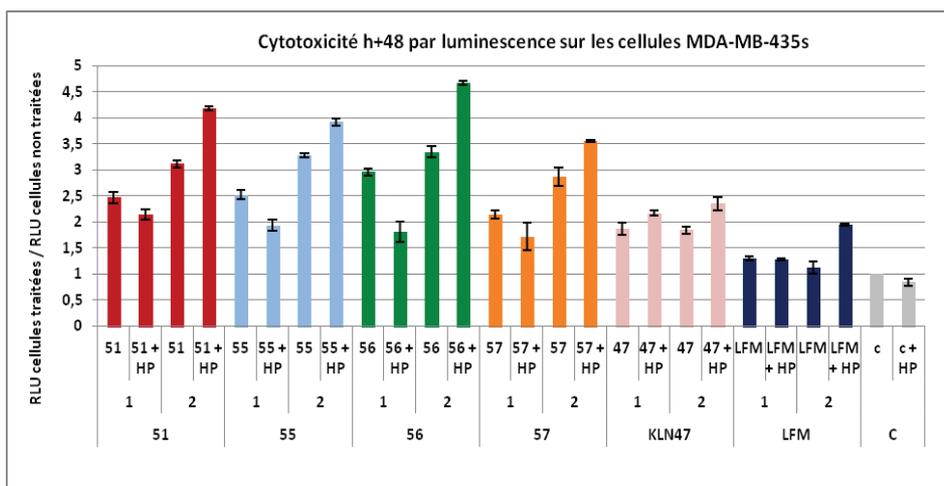


Figure 115 : Cytotoxicité aux charges ratio 1 et 2 et en présence ou absence d'halopéridol après 48 heures d'incubation des vecteurs (51, 55, 56, 57 et KLN47 seul) sur les cellules MDA-MB-435s

4.2. SKMEL28

Après 48 heures d'incubation, il faut noter en priorité une légère cytotoxicité induite par l'halopéridol sur les cellules seules. Au RC1, il n'y a pas de cytotoxicité apparente hormis pour les composés **56** et **57** en présence d'halopéridol (1,2 fois plus toxique que les cellules non traitées). Au RC2, en absence d'halopéridol, il n'y a pas de cytotoxicité apparente. En présence d'halopéridol, la cytotoxicité engendrée par les lipoplexes est 1,2 à 1,6 fois plus importante que celle des cellules non traitées (Figure 116).

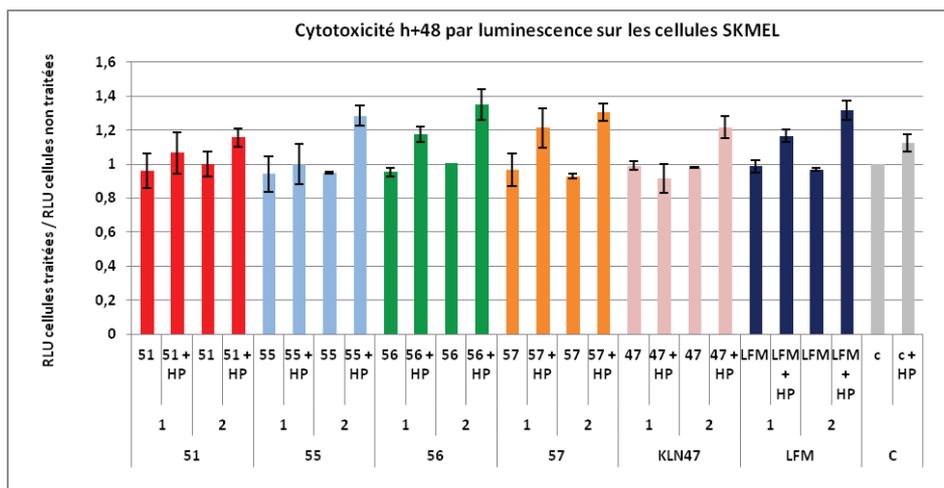


Figure 116 : Cytotoxicité aux charges ratio 1 et 2 et en présence ou absence d’halopéridol après 48 heures d’incubation des vecteurs (51, 55, 56, 57 et KLN47 seul) sur les cellules SKMEL28

4.3. HeLa

Pour les HeLa, qui servent de témoin négatif, il faut noter que l’halopéridol n’engendre pas de cytotoxicité supérieure à celle des cellules non traitées. Après 48 heures d’incubation, la première chose à constater est que l’halopéridol n’a pas d’effets significatifs sur les cellules seules. Au RC2, la cytotoxicité est plus importante qu’au RC1 (2 fois plus de cytotoxicité au RC1 que les cellules non traitées et 2,2 à 3,5 fois plus au RC2), hormis pour le KLN47 et le composé **57** où la cytotoxicité au RC1 est la même qu’au RC2 (2 fois plus de cytotoxicité au RC1 que les cellules non traitées) (Figure 117).

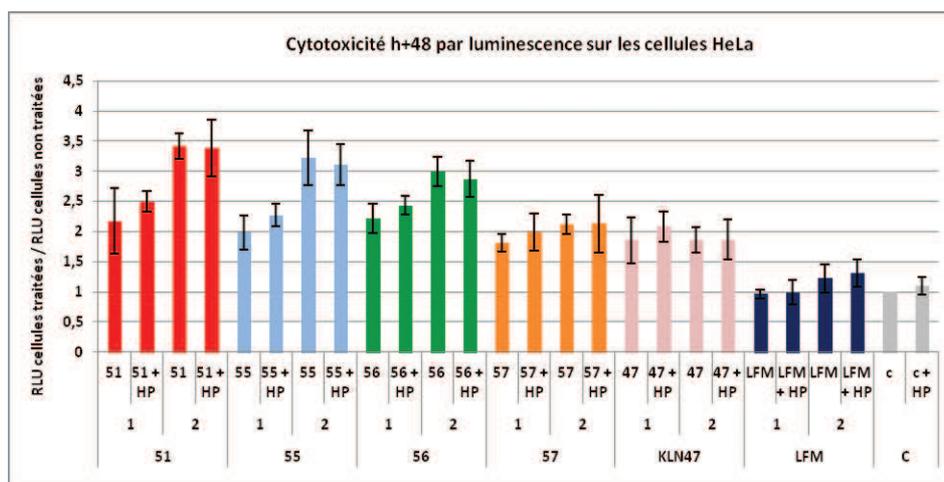


Figure 117 : Cytotoxicité aux charges ratio 1 et 2 et en présence ou absence d’halopéridol après 48 heures d’incubation des vecteurs (51, 55, 56, 57 et KLN47 seul) sur les cellules HeLa

5 - Révélation de l'efficacité de transfection des vecteurs

La révélation de l'expression du gène *luc* dans les cellules transfectées a été réalisée à l'aide du kit Luciferase Assay System. Les photons émis ont été quantifiés au luminomètre 48 heures post-transfection. Les résultats de luminescence sont rapportés aux masses de protéines totales dosées pour pouvoir les comparer entre eux.

5.1. MDA-MB-435 sh rd

Pour les MDA-MB-435s, quelques soient les vecteurs ou les conditions, les efficacités de transfection sont globalement meilleures que pour la lipofectamine, le vecteur de référence, et ce pour les mêmes rapports de charges.

Au RC1 l'efficacité de transfection est globalement meilleure qu'au RC2. Pour les composés **51**, **55**, **57** et le KLN47 l'halopéridol n'a pas d'effet significatif sur l'efficacité de transfection. En revanche, pour le composé **56**, l'efficacité de transfection augmente significativement en présence d'halopéridol (Figure 118).

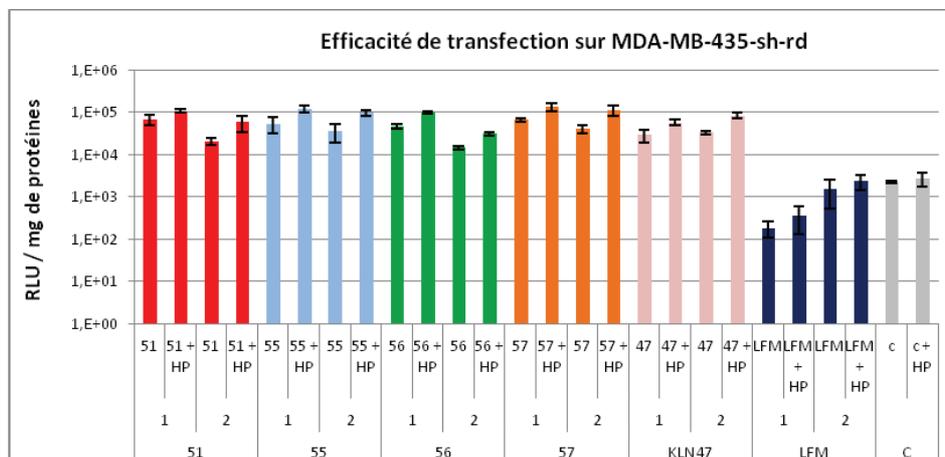


Figure 118 : Efficacité de transfection sur les cellules MDA-MB-435s

5.2. SKMEL28

Pour les SKMEL28, quelques soient les vecteurs ou les conditions, les efficacités de transfection sont globalement meilleures que pour la lipofectamine et cela pour les mêmes rapports de charges. Pour le composé **51** et le KLN47 la présence d'halopéridol augmente l'efficacité de transfection. Pour le composé **56**, l'halopéridol diminue significativement

l'efficacité de transfection au RC1 et au RC2. Pour le composé 57, au RC1, l'halopéridol n'a pas d'effets sur l'efficacité de transfection alors qu'au RC2 il la diminue significativement (Figure 119).

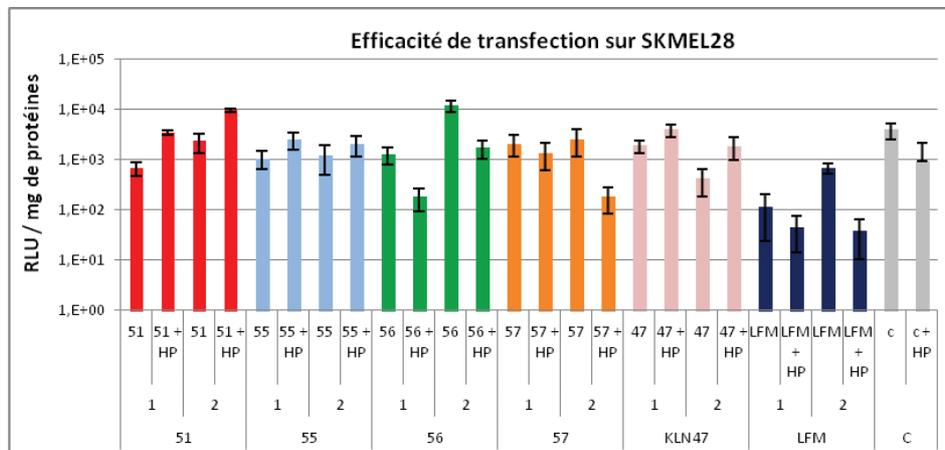


Figure 119 : Efficacité de transfection sur les cellules SKMEL28

5.3. HeLa

Pour les HeLa, le témoin négatif, l'efficacité de transfection est significativement plus importante pour tous les vecteurs que pour la lipofectamine (surtout pour le RC2). L'efficacité de transfection est significativement plus importante au RC2 qu'au RC1. Il n'y a pas de différences significatives d'efficacité de transfection quand les vecteurs sont en présence d'halopéridol, ce qui est cohérent de part le fait que ces cellules ne présentent pas de récepteurs sigma (Figure 120).

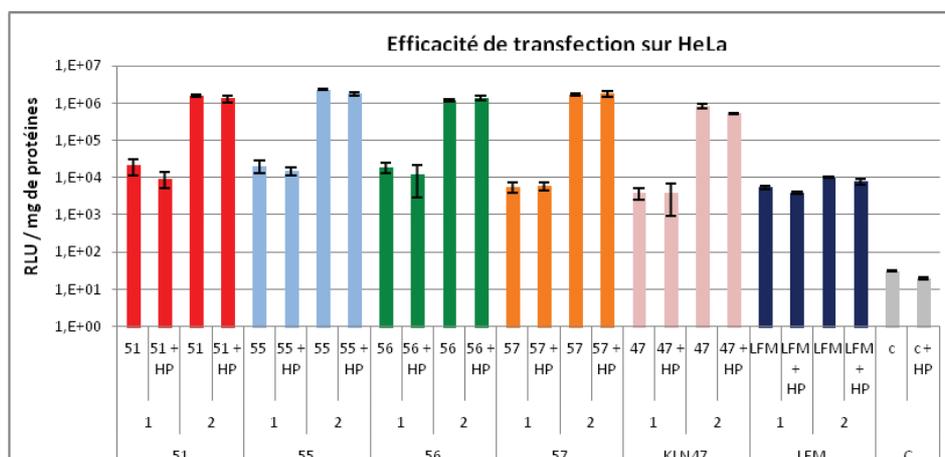


Figure 120 : Efficacité de transfection sur les cellules HeLa

III - Discussion et conclusion

Dans le but d'effectuer le ciblage de cellules exprimant le récepteur sigma, protéine membranaire surexprimée dans de nombreux cancers, nous avons réalisé la synthèse de plusieurs lipides neutres portant un motif anisamide, agoniste connu des récepteurs sigma. Ces molécules ont été synthétisées dans l'objectif d'être formulées avec le KLN47, un lipophosphoramide cationique synthétisé au laboratoire et dont les capacités de transfection ont été démontrées.

Nous avons obtenu deux phosphoramides neutres qui portent chacun deux chaînes phytanyles et séparés du motif anisamide par un espaceur possédant un triazole issu de la « click-chemistry ». Les deux autres co-lipides neutres qui ont été synthétisés ont un espaceur plus court, ceci afin de nous permettre d'étudier l'incidence de la longueur de l'espaceur sur le ciblage. Ce sont deux phosphoramides, l'un portant deux chaînes phytanyles et le second deux chaînes oléyles, ceci dans le but de mesurer l'impact de la nature de la chaîne grasse sur la formulation et les tests *in vitro*.

Les différences structurales de nos co-lipides neutres n'ont eu aucun impact sur la formulation de nos vecteurs que ce soit au niveau de la taille ou du potentiel zêta. En revanche, l'étape d'extrusion permet de réduire la taille moyenne des liposomes qui possèdent alors une taille voisine de 100 nm.

Les tests *in vitro* ont montré que, globalement, le KLN47 formulé avec nos co-lipides n'induit pas de cytotoxicité plus importante que le KLN47 seul. Cependant l'association lipide cationique-halopéridol à RC2 engendre une toxicité plus importante sur les lignées cellulaires exprimant le récepteur sigma. Ces résultats inattendus qui ne sont pas à ce jour expliqués, montre assez clairement l'effet de synergie halopéridol/lipide cationique au niveau de la toxicité. Les efficacités de transfection des formulations contenant un co-lipide « de type anisamide » sont généralement équivalentes à celle du KLN47 seul conduisant à la conclusion que lors de ces essais nous n'observons pas d'effet de ciblage attribuable à l'implication des récepteurs sigma. De surcroît, l'ajout d'halopéridol lors des essais de transfection n'entraîne pas de diminution significative des efficacités de transfection comme nous pouvions nous y attendre si les récepteurs sigma étaient impliqués. L'ensemble de ces

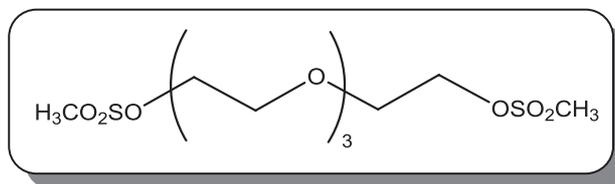
résultats indique donc que la transfection observée ne fait raisonnablement pas intervenir un phénomène de reconnaissance entre le motif anisamide et le récepteur sigma.

Plusieurs hypothèses peuvent néanmoins être émises pour expliquer ces résultats ou pour orienter de nouvelles expériences visant à utiliser les récepteurs sigma dans une stratégie d'adressage moléculaire. A la différence des travaux antérieurs de Huang et coll.¹⁹⁴, montrant l'effet ciblant des motifs anisamides, nos lipides comportent un motif anisamide placé en bout d'une chaîne PEGylée courte. Huang et al. utilisaient pour leur part, des chaînes PEGylées de type PEG2000. Sur la base de cette différence, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une chaîne PEGylée plus longue que celle que nous avons utilisée pourrait favoriser le ciblage. Un autre facteur qui peut influencer le ciblage est la proportion de co-lipide ciblant introduite dans les formulations. Le pourcentage utilisé dans cette étude (7%) est celui utilisé précédemment par Huang et coll.. Néanmoins compte tenu de la différence de structure de nos co-lipides ciblant, le pourcentage est sans doute à optimiser. Les rapports de charge lipide cationique/ADN est un autre facteur qui peut grandement influencer le mécanisme de transfection. Nous avons dans cette étude utilisé deux rapports de charge (RC = 1 et 2) mais sans doute aurait-il été intéressant de tester des RC <1 afin de disposer de formulation moins cationiques et donc d'éviter une internalisation initiée par des interactions non-spécifiques basées sur des interactions électrostatiques. Selon le même raisonnement, l'ajout d'un lipide PEGylé de type PEG2000 (sans motif de ciblage) en plus de l'un de nos lipides ciblant (anisamide) pourrait permettre de masquer les charges positives et donc pourrait permettre de mettre en évidence une transfection impliquant au préalable le rôle du ciblage. Enfin, il serait intéressant de tester ces molécules sur les mêmes lignées cellulaires que celles utilisées par Huang et coll.^{155,194}. Il faut aussi préciser ici que cette étude constitue les premiers essais de notre équipe visant à mettre en évidence l'implication de récepteurs sigma lors de transfection *in vitro*. Nos collègues biologistes Brestois (équipe du Prof. P. Lehn) avec qui j'ai réalisé ces tests n'avaient pas non plus d'expérience préalable dans ce domaine.

PARTIE EXPERIMENTALE

IV - Partie expérimentale

Synthèse du 11-[(méthylsulfonyl)oxy]-3,6,9-trioxaundécylméthanesulfonate **42**²⁰⁵

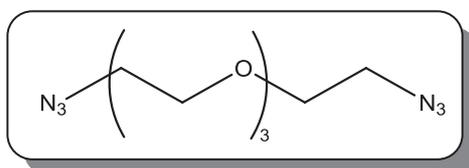


A une solution de tétraéthylène glycol commercial (19,4 g, 100 mmol) dans du THF anhydre (75 mL) est ajouté de la triéthylamine (35,3 mL, 250 mmol). Le milieu est refroidi à 0°C et du chlorure de méthanesulfonyle (17,0 mL, 220 mmol) dans du THF anhydre (25 mL) est ajouté au goutte-à-goutte. Le milieu est agité pendant 15 heures à température ambiante puis de l'eau (40 mL) est ajoutée au mélange qui est extrait à l'Et₂O (100 mL) puis au CH₂Cl₂ (100 mL). La phase organique est lavée à l'eau (50 mL) puis par une solution d'HCl (3M) (50 mL), elle est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. Le produit est obtenu, sans plus de purification, sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 95 %.

Rf (acétate d'éthyle) : 0,38

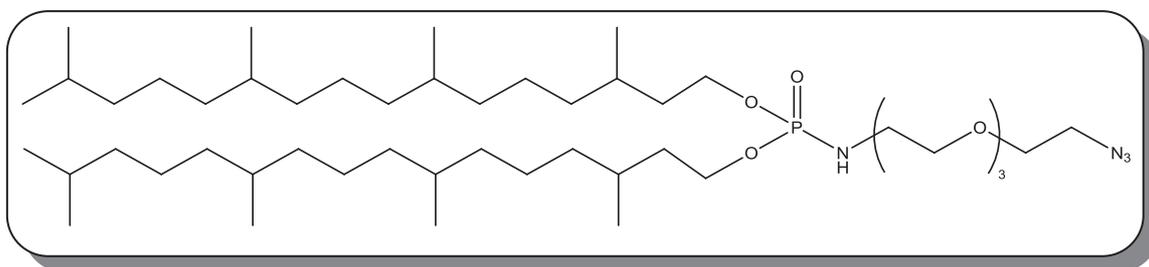
RMN ¹H (400,133 MHz, CDCl₃) : 3,02 (s, 6H, CH₃SO₂) ; 3,59-3,64 (m, 8H, CH₂-O) ; 3,71 (t, 2H, ³J_{HH}=4,0, CH₂-O) ; 4,32 (t, 4H, ³J_{HH} = 4,0, CH₂-OSO₂)

Synthèse du 1,11-diazido-3,6,9-trioxaundécane **43**²⁰⁵



A une solution de **42** (33,0 g, 94,5 mmol) dans du DMF anhydre (250 mL) est ajouté de l'azoture de sodium (24,6 g, 378 mmol). Le mélange est chauffé à 100°C et agité pendant 15 heures. Le milieu est filtré puis de l'eau (100 mL) est ajoutée au filtrat qui est extrait par trois fois à l'acétate d'éthyle (200 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et

Synthèse du 11-azido-3,6,9-trioxaundécylphosphoramidate de bis-3,7,11,15-tetraméthylhexadécyle 45¹⁹⁷



A une solution de CBrCl_3 (500 mg, 2,52 mmol) dans du CH_2Cl_2 anhydre (15 mL) est ajouté du phosphite de phytanyle (1,47 g, 2,29 mmol). Le milieu est agité pendant 1 heure sur tamis moléculaire 4 Å. Un mélange de **44** (500 mg, 2,29 mmol) et de DIPEA (327 mg, 2,52 mmol) en solution dans du CH_2Cl_2 anhydre (15 mL) est ajouté au goutte-à-goutte à 0°C. Le mélange est ramené à température ambiante et agité pendant 12 heures. L'avancement de la réaction est contrôlé par CCM et RMN ^{31}P . Le mélange est filtré sur coton et lavé par une solution saturée en NaCl (10 mL). La phase aqueuse est alors extraite par trois fois au CHCl_3 (20 mL). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur MgSO_4 , filtrées et concentrées. L'huile obtenue est purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/hexane (2 : 1)). Le produit est obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 50 %.

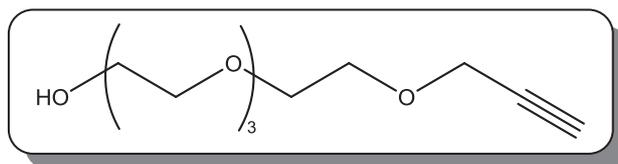
Rf (acétate d'éthyle/hexane (2 : 1)) : 0,34

RMN ^{31}P (161,970 MHz, CDCl_3) : 9,79

RMN ^1H (400,133 MHz, CDCl_3) : 0,83-0,90 (m, 30H, CH_3) ; 1,07-1,56 (m, 48H, CH_2 phytanyles) ; 3,05 (qt, 2H, $^3J_{\text{HH}}=4,0$, $\text{CH}_2\text{-NH-PO}$) ; 3,38 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}}=6,0$, $\text{CH}_2\text{-N}_3$) ; 3,52 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}}=4,0$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$) ; 3,61-3,69 (m, 10H, CH_2O) ; 4,01 (q, 4H, $^3J_{\text{HH}}=8,0$, $\text{CH}_2 \alpha$ phytanyles)

RMN ^{13}C (75,480 MHz, CDCl_3) : 19,4 (CH_3 phytanyle) ; 19,6 (CH_3 phytanyle) ; 19,7 (CH_3 phytanyle) ; 22,5 (CH_3 phytanyle) ; 22,6 (CH_3 phytanyle) ; 24,3 (CH_2 phytanyle) ; 24,4 (CH_2 phytanyle) ; 24,7 (CH_2 phytanyle) ; 27,9 (CH phytanyle) ; 29,4 (CH phytanyle) ; 32,7 (CH phytanyle) ; 37,3 (CH_2) ; 39,3 (CH_2) ; 41,0 ($\text{CH}_2\text{-NH-P}$) ; 50,6 ($\text{CH}_2\text{-N}_3$) ; 64,7 ($\text{CH}_2\text{-OP}$, $^2J_{\text{P-C}}=18,8$) ; 70,0 (CH_2O) ; 70,3 (CH_2O) ; 70,6 (CH_2O) ; 71,2 (CH_2O) ; 71,3 (CH_2O)

Synthèse du 3,6,9,12-tetraoxapentadéc-14-yn-1-ol 46²⁰⁷

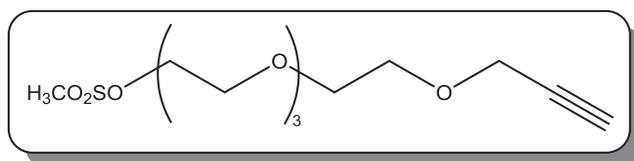


A une suspension de NaH (768 mg, 3,20 mmol) dans du THF anhydre (10 mL) refroidie à 0°C est ajouté du tétraéthylène glycol (11,7 g, 60,2 mmol). La solution est agitée pendant 30 minutes à 0°C et une solution de bromure de propargyle (2,38 g, 20,0 mmol) dans du THF anhydre (10 mL) est ajoutée au goutte-à-goutte. Le mélange est agité à température ambiante pendant 15 heures et de l'eau (5 mL) est ajoutée. La phase aqueuse est extraite par de l'éther diéthylique (20 mL) puis par du CH₂Cl₂ (20 mL). La phase organique est lavée par une solution aqueuse saturée en NaCl (15 mL), séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. Le produit est chromatographié sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle) pour donner le composé pur sous la forme d'une huile jaune avec un rendement de 63 %.

Rf (acétate d'éthyle) : 0,32

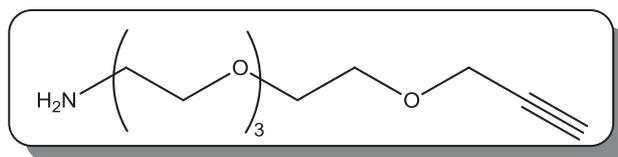
RMN ¹H (300,135 MHz, CDCl₃) : 1,62 (s large, 1H, OH) ; 2,42 (t, 1H, ⁴J_{HH}=2,4, CH) ; 3,59-3,71 (m, 16H, CH₂O) ; 4,19 (d, 2H, ⁴J_{HH}=2,4, CH₂-C)

Synthèse du 4-méthylsulfonate de 3,6,9,12-tetraoxapentadéc-14-ynyle 47²⁰⁵



A une solution de **46** (2,31 g, 10,0 mmol) dans du THF anhydre (50 mL) refroidie à 0°C sont ajoutés de l'Et₃N (1,61 mL, 12,0 mmol) et du chlorure de méthanesulfonyle (0,88 mL, 11,0 mmol) en solution dans du THF anhydre (2 mL) au goutte-à-goutte. Le mélange est agité 15 heures à température ambiante puis de l'eau (10 mL) est ajoutée. La phase aqueuse est extraite par de l'éther diéthylique (30 mL) puis par du CH₂Cl₂ (30 mL). La phase organique est lavée par une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ (20 mL) puis par de l'eau (20 mL). Elle est

Synthèse du 3,6,9,12-tetraoxapentadéc-14-yn-1-amine 49²⁰⁶



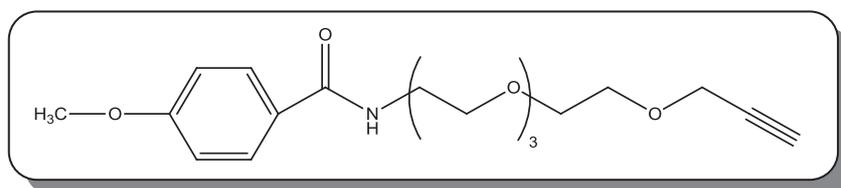
A une solution de **48** (1,90 g, 7,40 mmol) dans du THF anhydre (20 mL) est ajoutée de la triphénylphosphine (1,90 g, 7,40 mmol). Le mélange est agité pendant 1 heure à température ambiante puis 10 gouttes d'eau sont ajoutées. Le mélange est agité 15 heures à température ambiante, puis il est concentré et repris dans du CH₂Cl₂ (30 mL). Le milieu est séché sur MgSO₄, filtré et concentré. Le produit est obtenu sans autre forme de purification sous la forme d'une huile jaune pâle avec un rendement de 75 %.

Rf (acétate d'éthyle/éthanol (10 : 1)) : 0,42

RMN ¹H (400,133 MHz, CDCl₃) : 2,42 (s, 1H, C≡CH) ; 2,81-2,85 (m, 2H, CH₂-NH₂) ; 3,47 (t, 2H, ³J_{HH}=4, CH₂-CH₂-NH₂) ; 3,53-3,73 (m, 12H, CH₂-O) ; 4,18 (s, 2H, CH₂-C≡CH)

RMN ¹³C (75,480 MHz, CDCl₃) : 41,5 (CH₂-NH₂) ; 58,4 (CH₂-C≡CH) ; 70,4 (CH₂O) ; 70,9 (CH₂O) ; 71,3 (CH₂O) ; 71,5 (CH₂O) ; 71,8 (CH₂O) ; 72,4 (CH₂O) ; 72,6 (CH₂O) ; 72,9 (CH₂O) ; 74,7 (C≡CH) ; 79,5 (C≡CH)

Synthèse du 4-methoxy-N-(3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-ynyl)benzamide 50



A une solution de **49** (1,71 g, 7,40 mmol) dans du CH₂Cl₂ anhydre (25 mL) est ajoutée de la triéthylamine (822 mg, 8,14 mmol). Une solution de chlorure d'acide paraméthoxybenzoïque (1,26 g, 7,40 mmol) dans du CH₂Cl₂ anhydre (5 mL) est ajoutée au goutte-à-goutte. Le milieu est agité pendant 15 heures à température ambiante. De l'eau (15 mL) est ajoutée puis le mélange est extrait par trois fois au CH₂Cl₂ (20 mL). La phase organique est lavée

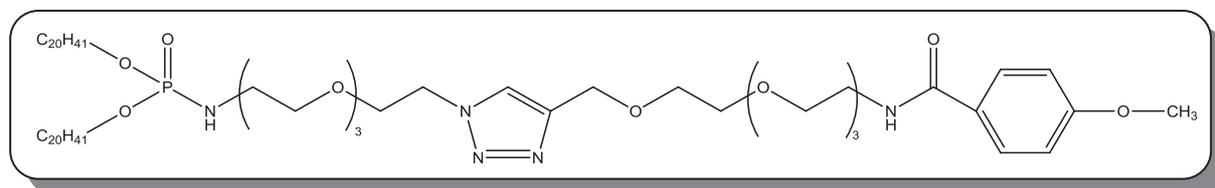
successivement par une solution de HCl à 5% (20 mL) et par une solution saturée en NaCl (20 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/hexane (2 : 1) -> acétate d'éthyle (100 %)). Le produit est obtenu sous la forme d'une huile jaune pâle avec un rendement de 24 %.

Rf (acétate d'éthyle) : 0,16

RMN ¹H (400,133 MHz, CDCl₃) : 2,42 (s, 1H, C≡CH) ; 3,58-3,67 (m, 16H, CH₂-O + CH₂-NH) ; 3,84 (s, 3H, O-CH₃) ; 4,15 (s, 2H, CH₂-C≡CH) ; 6,92 (d, 2H, ³J_{HH}=8,0, CH (Ph)) ; 7,80 (d, 2H, ³J_{HH}=8,0, CH (Ph))

RMN ¹³C (75,480 MHz, CDCl₃) : 39,8 (CH₂-NH) ; 55,4 (O-CH₃) ; 58,4 (CH₂-C≡CH) ; 69,1 (CH₂O) ; 70,1 (CH₂O) ; 70,2 (CH₂O) ; 70,4 (CH₂O) ; 70,5 (CH₂O) ; 70,6 (CH₂O) ; 74,7 (C≡CH) ; 79,5 (C≡CH) ; 113,6 (CH (Ph)) ; 127,0 (C_{para}) ; 128,9 (CH (Ph)) ; 162,1 (CH₃-O-C_{para}) ; 167,1 (CO)

Synthèse de bis(3,7,11,15-tetraméthylhexadécyl)-2-{4-[15-(4-méthoxyphényl)-15-oxo-2,5,8,11-tetraoxa-14-azapentadéc-1-yl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}-3,6,9-trioxaundécylphosphoramide 51²⁰⁸



A une solution de **45** (258 mg, 0,30 mmol) et de **50** (177 mg, 0,30 mmol) dans du THF (2,5 mL) est ajouté du CuSO₄, 5 H₂O (75 mg, 0,30 mmol) ainsi que de l'ascorbate de sodium (59 mg, 0,30 mmol) et de l'eau (2,5 mL). Le mélange est agité 48 heures à température ambiante à l'abri de la lumière. De l'éther diéthylique (8 mL) est ajouté au milieu et la phase aqueuse est extraite par deux fois au CH₂Cl₂ (5 mL). La phase organique est lavée avec une solution saturée en NaCl (8 mL) puis séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. L'huile obtenue est purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/méthanol (95 : 5)). Le produit est obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 80 %.

Rf (acétate d'éthyle/éthanol (9 : 1)) : 0,56

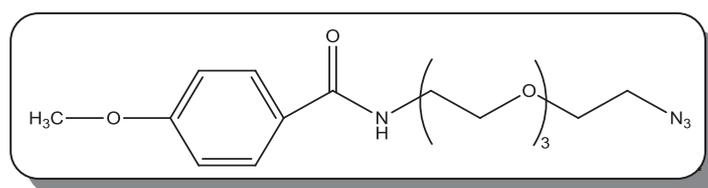
RMN ³¹P (121,498 MHz, CDCl₃) : 9,95

RMN ¹H (400,103 MHz, CDCl₃) : 0,83-0,91 (m, 30H, CH₃ phytanyles) ; 1,03-1,68 (m, 48H, CH₂ phytanyles) ; 3,02-3,10 (m, 2H, CH₂-NH-P) ; 3,17-3,25 (m, 1H, NH-P) ; 3,51 (t, 2H, ³J_{HH}=4,0, O-CH₂-CH₂-tetrazole) ; 3,58-3,68 (m, 24H, CH₂-O) ; 3,83 (s, 3H, CH₃-O) ; 3,84 (t, 2H, ³J_{HH}=4,0, O-CH₂-CH₂-NH) ; 3,95-4,03 (m, 4H, CH₂ α phytanyles) ; 4,51 (t, 2H, ³J_{HH}=4,0, O-CH₂-CH₂-tetrazole) ; 4,64 (s, 1H, O-CH₂-C=) ; 6,89 (d, 2H, ³J_{HH}=8,0, CH (Ph)) ; 7,02 (s large, 1H, C=CH-N) ; 7,79 (d, 2H, ³J_{HH}=8,0, CH (Ph))

RMN ¹³C (75,480 MHz, CDCl₃) : 19,7 (CH₃ phytanyle) ; 19,8 (CH₃ phytanyle) ; 22,7 (CH₃ phytanyle) ; 22,8 (CH₃ phytanyle) ; 24,6 (CH₂ phytanyle) ; 24,8 (CH₂ phytanyle) ; 25,1 (CH₂ phytanyle) ; 28,3 (CH phytanyle) ; 29,8 (CH phytanyle) ; 33,1 (CH phytanyle) ; 37,3 (CH₂ phytanyle) ; 39,7 (CH₂ phytanyle) ; 40,1 (CH₂ phytanyle) ; 41,4 (CH₂-NH-P) ; 50,5 (CH₂-N-N) ; 55,7 (CH₃-O) ; 64,5 (CH₂-CH₂-N-N) ; 64,7 (CH₂-O-P, ³J_{CP}= 17,8) ; 69,3 (CH₂-O) ; 69,7 (CH₂-O) ; 70,3 (CH₂-O) ; 70,8 (CH₂-O) ; 71,6 (CH₂-O) ; 72,8 (CH₂-O) ; 113,9 (CH (Ph)) ; 123,9 (C=CH-N) ; 127,0 (C_{para}) ; 129,0 (CH (Ph)) ; 144,6 (CH₂-C=CH) ; 162,1 (COCH₃)

Masse (MALDI-TOF) : m/z calculé pour C₆₇H₁₂₆N₅O₁₂PNa [M+Na] 1246,904 ; trouvé 1246,858

Synthèse du N-[11-azido-(3,6,9-trioxaundécyl)]-4-méthoxybenzamide 52



A une solution de **44** (2,40 g, 11,0 mmol) dans du CH₂Cl₂ anhydre (10 mL) est ajoutée de la DIPEA (1,56 g, 12,1 mmol). Le milieu est amené à 0°C et une solution de chlorure d'acide paraméthoxybenzoïque (1,89 g, 11,0 mmol) dans du CH₂Cl₂ anhydre (5 mL) est ajoutée au goutte-à-goutte. Le milieu est agité pendant 15 heures à température ambiante. De l'eau (10 mL) est ajoutée puis le mélange est extrait par trois fois au CH₂Cl₂ (20 mL). La phase organique est lavée successivement par une solution de HCl à 5% (10 mL) et par une solution

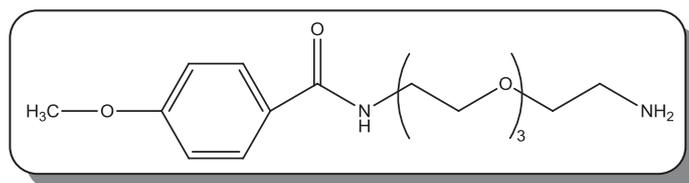
saturée en NaCl (10 mL). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/hexane (2 : 1) -> acétate d'éthyle (100 %)). Le produit est obtenu sous la forme d'une huile jaune pâle avec un rendement de 40 %.

Rf (acétate d'éthyle/hexane (2 : 1)) : 0,51

RMN ¹H (400,133 MHz, CDCl₃) : 3,32 (t, 2H, ³J_{HH} = 6,0 Hz, CH₂-N₃) ; 3,60-3,67 (m, 14H, CH₂) ; 3,83 (s, 3H, O-CH₃) ; 6,72 (s large, 1H, NH) ; 6,91 (d, 2H, ³J_{HH} = 8,0 Hz, CH (Ph)) ; 7,76 (d, 2H, ³J_{HH} = 8,0 Hz, CH (Ph))

RMN ¹³C (75,480 MHz, CDCl₃) : 39,7 (CH₂-NH) ; 50,6 (CH₂-N₃) ; 55,3 (O-CH₃) ; 70,2 (CH₂O) ; 70,4 (CH₂O) ; 70,7 (CH₂O) ; 71,3 (CH₂O) ; 71,5 (CH₂O) ; 71,8 (CH₂O) ; 73,1 (CH₂O) ; 113,5 (CH (Ph)) ; 127,0 (CO-C_{para}) ; 129,0 (CH (Ph)) ; 161,9 (CH₃-O-C_{para}) ; 167,1 (CO)

Synthèse du N-[11-amino-(3,6,9-trioxaundécyl)]-4-méthoxybenzamide 53



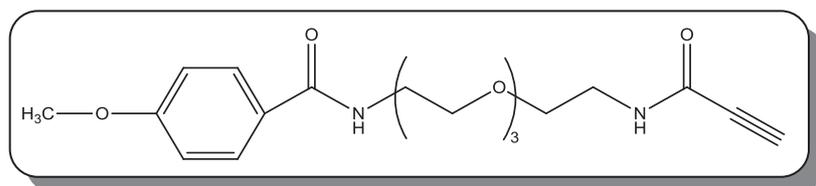
A une solution de **52** (528 mg, 1,50 mmol) dans de l'éthanol absolu (25 mL) est ajouté du palladium (10 % en masse/C) (53 mg, 0,50 mmol). Le mélange est agité sous une atmosphère de H₂ à 40 bars pendant 15 heures. La solution est filtrée sur fritté et concentrée. Le produit est obtenu sans plus de purification sous la forme d'une huile jaune pâle avec un rendement de 40 %.

Rf (acétate d'éthyle/hexane (2 : 1)) : 0,37

RMN ¹H (400,133 MHz, CDCl₃) : 1,72 (s large, 1H, NH₂) ; 2,82 (t, 2H, ³J_{HH}=4,0, CH₂-NH₂) ; 3,47 (t, 2H, ³J_{HH}=8,0, CH₂-CH₂-NH₂) ; 3,61-3,66 (m, 12H, CH₂) ; 3,84 (s, 3H, O-CH₃) ; 6,90 (d, 2H, ³J_{HH}=8,0, CH (Ph)) ; 7,25 (s large, 1H, NH) ; 7,80 (d, 2H, ³J_{HH}=8,0, CH (Ph))

RMN ¹³C (75,480 MHz, CDCl₃) : 39,7 (CH₂-NH) ; 41,5 (CH₂-NH₂) ; 55,3 (O-CH₃) ; 70,1 (CH₂O) ; 70,3 (CH₂O) ; 70,5 (CH₂O) ; 71,0 (CH₂O) ; 71,5 (CH₂O) ; 71,7 (CH₂O) ; 73,1 (CH₂O) ; 113,5 (CH (Ph)) ; 127,0 (CO-C_{para}) ; 129,0 (CH (Ph)) ; 162,0 (CH₃-O-C_{para}) ; 167,1 (CO)

Synthèse du *N*-(13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azapentadéc-14-yn-1-yl)-4-méthoxybenzamide 54²⁰⁷



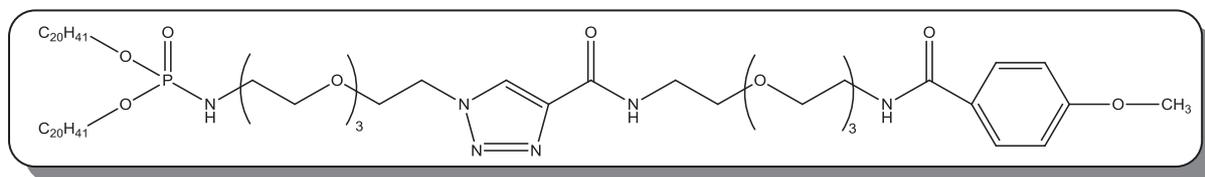
A une solution de dicyclohexylcarbodiimide (319 mg, 1,55 mmol) dans du CH₂Cl₂ anhydre (60 mL) à 0°C est ajouté de l'acide propiolique (75 mg, 1,29 mmol) dans du CH₂Cl₂ anhydre (20 mL). Après 10 minutes d'agitation, une solution de **53** (420 mg, 1,29 mmol) dans du CH₂Cl₂ anhydre (20 mL) est additionnée au goutte-à-goutte. Le mélange est agité pendant 1 heure à 0°C, puis 1 heure à température ambiante. Le mélange obtenu est filtré sur fritté et concentré. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CHCl₃/méthanol (95 : 5)) pour donner une huile jaune avec un rendement de 31 %.

Rf (CHCl₃/MeOH (95 : 5)) : 0,23

RMN ¹H (400,133 MHz, CDCl₃) : 2,40 (s large, 1H, NH) ; 2,78 (s, 1H, C≡CH) ; 3,41-3,48 (m, 2H, CH₂-NH) ; 3,51-3,57 (m, 2H, CH₂-O) ; 3,58-3,67 (m, 12H, CH₂) ; 3,85 (s, 3H, O-CH₃) ; 6,87 (d, 2H, ³J_{HH}=8,0, CH (Ph)) ; 6,92 (s large, 1H, NH) ; 7,77 (d, 2H, ³J_{HH}=8,0, CH (Ph))

RMN ¹³C (75,480 MHz, CDCl₃) : 39,5 (CH₂-NH) ; 55,4 (O-CH₃) ; 69,2 ; 69,9 ; 70,1 ; 70,3 ; 70,4 (O-CH₂ + C≡CH) ; 73,4 (C≡CH) ; 113,6 (CH (Ph)) ; 126,7 (CO-C_{ipso}) ; 128,8 (CH (Ph)) ; 152,3 (CO-CCH) ; 162,1 (CH₃-O-C_{ipso}) ; 167,1 (CO-NH)

Synthèse du bis(3,7,11,15-tetraméthylhexadécyl)-2-{4-[15-(4-méthoxyphényl)-15-oxo-5,8,11-trioxa-2,14-diazapentadéc-1-yl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}-3,6,9-trioxaundécyl phosphoramide **55**²⁰⁹



A une solution de **54** (100 mg, 0,27 mmol) dans un mélange toluène/méthanol (5 : 1) (6 mL) sont ajoutés le composé **45** (285 mg, 0,27 mmol), de l'iodure de cuivre (18 mg, 0,081 mmol) et de la DIPEA (36 mg, 0,27 mmol). La solution est laissée sous agitation pendant 15 heures. Le mélange obtenu est filtré sur célite puis concentré. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CHCl₃/méthanol (97 : 3)) pour donner une huile incolore avec un rendement de 31 %.

Rf (CHCl₃/MeOH (97 : 3)) : 0,12

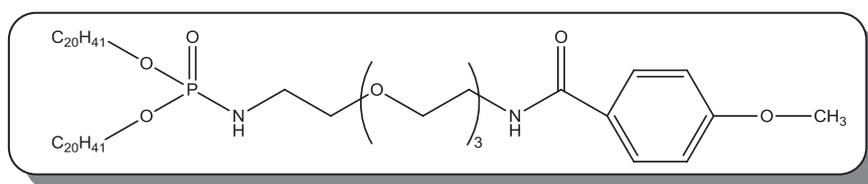
RMN ³¹P (161,970 MHz, CDCl₃) : 9,78

RMN ¹H (400,133 MHz, CDCl₃) : 0,84-0,96 (m, 30H, CH₃ phytanyle) ; 1,08-1,84 (m, 48H, phytanyle) ; 3,04-3,12 (m, 2H, CH₂-NH-P) ; 3,51-3,71 (m, 26H, CH₂-O) ; 3,87 (s, 3H, CH₃-O) ; 3,91 (t, 2H, ³J_{HH}=4,0, O-CH₂-CH₂-NH) ; 4,00-4,11 (m, 4H, CH₂ α phytanyle) ; 4,61 (t, 2H, ³J_{HH}=4,0, CH₂-NH) ; 6,91 (d, 2H, ³J_{HH}=8,0, CH (Ph)) ; 7,83 (d, 2H, ³J_{HH}=8, CH (Ph)) ; 8,32 (s, 1H, C=CH)

RMN ¹³C (75,480 MHz, CDCl₃) : 19,3 (CH₃ phytanyle) ; 19,5 (CH₃ phytanyle) ; 19,6 (CH₃ phytanyle) ; 22,5 (CH₃ phytanyle) ; 22,6 (CH₃ phytanyle) ; 24,2 (CH₂ phytanyle) ; 24,3 (CH₂ phytanyle) ; 24,7 (CH₂ phytanyle) ; 27,8 (CH phytanyle) ; 29,4 (CH phytanyle) ; 32,6 (CH phytanyle) ; 37,3 (CH₂ phytanyle) ; 38,7 (CH₂ phytanyle) ; 39,2 (CH₂ phytanyle) ; 39,6 (CH₂ phytanyle) ; 41,0 (CH₂ phytanyle) ; 41,0 (CH₂-NH-P) ; 50,4 (CH₂-N-N) ; 55,2 (CH₃-O) ; 64,6 (CH₂-CH₂-N-N) ; 68,2 (CH₂O) ; 69,4 (CH₂O) ; 69,6 (CH₂O) ; 69,8 (CH₂O) ; 70,1 (CH₂O) ; 70,2 (CH₂O) ; 70,3 (CH₂O) ; 70,4 (CH₂O) ; 71,1 (CH₂O) ; 71,2 (CH₂O) ; 113,4 (CH (Ph)) ; 126,5 (C=CH-N) ; 126,8 (CO-C_{ipso}) ; 128,8 (CH (Ph)) ; 143,0 (CH₂-C-N) ; 160,1 (COCH₃ (Ph)) ; 161,9 (CO-C-N) ; 167,0 (CO-NH)

Masse (MALDI-TOF) : m/z calculé pour C₆₇H₁₂₅N₆O₁₂PNa [M+Na] 1259,899; trouvé 1259,976

Synthèse du bis(3,7,11,15-tetraméthylhexadécyl)-13-(4-méthoxyphényl)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azatridéc-1-yl phosphoramidate 56¹⁹²



A une solution de CBrCl_3 (67 mg, 0,34 mmol) dans du CH_2Cl_2 anhydre (5 mL) est ajouté du phosphite de phytanyle (198 mg, 0,31 mmol). Le milieu est agité pendant 1 heure sur tamis moléculaire 4 Å. Un mélange de **53** (100 mg, 0,31 mmol) et de DIPEA (44 mg, 0,34 mmol) en solution dans du CH_2Cl_2 anhydre (5 mL) est ajouté au milieu au goutte-à-goutte à 0°C. Le mélange est ramené à température ambiante et agité pendant 12 heures. L'avancement de la réaction est contrôlé par RMN ^{31}P . Le mélange est filtré et lavé par une solution saturée en NaCl (10 mL). La phase aqueuse est alors extraite par trois fois au CHCl_3 (15 mL). Les phases organiques sont regroupées et séchées sur MgSO_4 . La phase organique est filtrée et concentrée. L'huile obtenue est purifiée par flash chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle (100 %) → acétate d'éthyle/éthanol (95 / 5)). Le produit est obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 37 %.

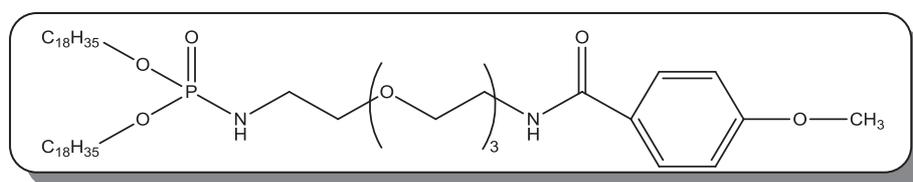
Rf (acétate d'éthyle/éthanol (95 : 5)) : 0,43

RMN ^{31}P (161,970 MHz, CDCl_3) : 9,86

RMN ^1H (400,133 MHz, CDCl_3) : 0,82-0,86 (m, 10H, CH_3 phytanyles) ; 1,04-1,72 (m, 48H, CH_2 phytanyles) ; 3,02-3,08 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH-PO}$) ; 3,26-3,32 (m, 1H, NH-PO) ; 3,49 (t, 2H, $^3\text{J}_{\text{HH}}=6,0$, $\text{CH}_2\text{-NH-CO}$) ; 3,59-3,66 (m, 12H, $\text{CH}_2\text{-O}$) ; 3,82 (s, 3H, O-CH_3) ; 3,96-4,02 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$) ; 6,88 (d, 2H, $^3\text{J}_{\text{HH}}=8,0$, CH (Ph)) ; 7,80 (d, 2H, $^3\text{J}_{\text{HH}}=8,0$, CH (Ph))

RMN ^{13}C (75,480 MHz, CDCl_3) : 19,8 (CH_3 phytanyle) ; 19,9 (CH_3 phytanyle) ; 21,0 (CH_3 phytanyle) ; 22,9 (CH_3 phytanyle) ; 23,1 (CH_3 phytanyle) ; 24,6 (CH_2 phytanyle) ; 24,8 (CH_2 phytanyle) ; 24,9 (CH_2 phytanyle) ; 25,1 (CH_2 phytanyle) ; 28,9 (CH phytanyle) ; 30,0 (CH phytanyle) ; 32,7 (CH phytanyle) ; 37,7 (CH_2 phytanyle) ; 39,7 (CH_2 phytanyle) ; 40,1 ($\text{CH}_2\text{-NHP}$) ; 41,4 ($\text{CH}_2\text{-NHCO}$) ; 55,7 (CH_3O) ; 65,1 (CH_2OP , $^2\text{J}_{\text{CP}}=17,4$) ; 70,3 (CH_2O) ; 70,8 (CH_2O) ; 70,9 (CH_2O) ; 71,4 (CH_2O) ; 71,6 (CH_2O) ; 114,7 (CH (Ph)) ; 127,3 ($\text{CO-C}_{\text{ipso}}$) ; 130,4 (CH (Ph)) ; 162,3 ($\text{CH}_3\text{-O-C}_{\text{ipso}}$) ; 167,4 (CO)

Synthèse du bis(oléyl)-(4-méthoxyphényl)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azatridéc-1-yl phosphoramide 57¹⁹²



A une solution de CBrCl_3 (67 mg, 0,34 mmol) dans du CH_2Cl_2 anhydre (5 mL) est ajouté du phosphite d'oléyle (64 mg, 0,31 mmol). Le milieu est agité pendant 1 heure sur tamis moléculaire 4 Å. Un mélange de **53** (100 mg, 0,31 mmol) et de DIPEA (44 mg, 0,34 mmol) en solution dans du CH_2Cl_2 anhydre (5 mL) est ajouté au milieu au goutte-à-goutte à 0°C. Le mélange est ramené à température ambiante et agité pendant 12 heures. L'avancement de la réaction est contrôlé par RMN ^{31}P . Le mélange est filtré sur coton et lavé par une solution saturée en NaCl (10 mL). La phase aqueuse est alors extraite par trois fois au CHCl_3 (15 mL). Les phases organiques sont regroupées et séchées sur MgSO_4 . La phase organique est filtrée et concentrée. L'huile obtenue est purifiée par flash chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle (100 %) → acétate d'éthyle/éthanol (95 / 5)). Le produit est obtenu sous la forme d'une huile incolore avec un rendement de 14 %.

Rf (acétate d'éthyle/éthanol (95 : 5)) : 0,42

RMN ^{31}P (161,970 MHz, CDCl_3) : 9,20

RMN ^1H (400,133 MHz, CDCl_3) : 0,87 (t, 6H, $^3J_{\text{HH}}=6,0$, CH_3 oléyles) ; 1,22-1,40 (m, 44H, CH_2 oléyle) ; 1,63 (qt, 4H, $^3J_{\text{HH}}=6,8$, CH_2 β oléyles) ; 1,95-2,05 (m, 8H, $\text{CH}_2\text{-CH=CH-}$) ; 3,02 (qt, 2H, $^3J_{\text{HH}}=6,8$, $\text{CH}_2\text{-NH-PO}$) ; 3,50 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}}=4,0$, Hz, $\text{CH}_2\text{-NH-CO}$) ; 3,58-3,67 (m, 12H, $\text{CH}_2\text{-O}$) ; 3,83 (s, 3H, OCH_3) ; 3,90-3,98 (m, 4H, CH_2 α oléyles) ; 5,29-5,37 (m, 4H, CH=CH oléyles) ; 6,88 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}}=8,0$, CH (Ph)) ; 7,80 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}}=8,0$, CH (Ph))

RMN ^{13}C (75,480 MHz, CDCl_3) : 14,1 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$ oléyles) ; 22,7 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$ oléyles) ; 25,2 ($\text{CH}_2\text{-CH=CH-}$) ; 27,2 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P-}$, $^2J_{\text{P-C}}=7,0$) ; 29,3 (CH_2 oléyle) ; 29,4 (CH_2 oléyle) ; 29,6 (CH_2 oléyle) ; 29,8 (CH_2 oléyle) ; 30,2 (CH_2 oléyle) ; 31,9 (CH_2 oléyle) ; 32,6 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ oléyle) ; 38,4 ($\text{CH}_2\text{-NH-PO}$) ; 67,3 ($\text{CH}_2\text{-O-P-}$, $^2J_{\text{P-C}}=17,4$) ; 129,8 (CH=CH) ; 130,0 (CH=CH)

Cultures cellulaires

Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires utilisées pour les tests *in vitro* sont issues de lignées cancéreuses. La lignée MDA-MB-435 sh rd provient d'un cancer du sein hautement métastatique, fournies par le Pr Vandier. Les deux autres lignées utilisées sont les SKMEL28, provenant d'un mélanome malin et les cellules épithéliales HeLa provenant d'un adénocarcinome du col de l'utérus. Les MDA-MB-435s et les SKMEL28 présentent toutes deux des récepteurs sigma contrairement aux HeLa qui seront donc la lignée servant de témoin négatif.

Plasmides

Le plasmide pCMV-luc, ou pTG11033 (Transgene S.A.) est utilisé pour révéler l'efficacité de transfection. C'est un plasmide de 9683 pb contenant entre autres :

- le gène rapporteur *luc* codant pour la luciférase.
- un promoteur ubiquitaire fort d'origine virale CMV (Cytomégalovirus).
- un gène de résistance à la kanamycine.

La concentration et la pureté du plasmide ont été estimées grâce à des mesures faites au spectromètre d'absorption à 260 nm et 280 nm. Seuls les plasmides ayant une pureté (A_{260}/A_{280}) comprise entre 1,8 et 2 ont été utilisés. L'identité du plasmide a été confirmée par digestion enzymatique (HindIII et XhoI) suivie d'un southern blot.

Préparation des lipoplexes

Préparation des solutions mères

Pour chaque lipide et co-lipide, des solutions mères sont préparées. Chaque produit est séché puis pesé avec précision avant d'être dissous dans un volume précis de chloroforme ou de dichlorométhane. Par exemple pour le KLN47, une solution mère à $10,6 \text{ mmol.L}^{-1}$ a été préparée (46,0 mg de produit dans 5,0 mL de CHCl_3).

Préparation des films lipidiques

Les solutions liposomales utilisées pour les tests *in vitro* sont à une concentration de 1,5 mmol.L⁻¹ de KLN47 et une concentration de 0,105 mmol.L⁻¹ pour les co-lipides neutres (7 %). A partir d'une solution mère de lipide dans le CH₂Cl₂, un volume précis est prélevé pour préparer les solutions aux concentrations désirées. Les mélanges sont concentrés sous pression réduite pour former un film lipidique sur les parois du tube. Les films sont hydratés par ajout d'eau stérile (2 mL) et les tubes sont stockés à 4°C pendant le temps d'hydratation de nos vecteurs (ce temps est variable en fonction de la structure du vecteur). Les lipides sont passés aux ultra-sons et vortexés jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Les solutions sont finalement extrudées, dans le but de réduire la taille des liposomes, par passages répétés sur une membrane de porosité de 100 nm. Les mesures de taille et de potentiel zêta sont effectuées afin de s'assurer de la qualité des liposomes formés.

Préparation et mesures de la taille et du potentiel zeta des liposomes

Les lipides hydratés sont passés aux ultra-sons 3 fois 10 minutes, 200 µL sont alors prélevés et placés dans une cuve à absorbance pour effectuer la mesure de taille (2,5 mL d'eau sont ajoutés pour compléter le volume dans la cuve). Afin de réduire la taille des liposomes, nous avons procédé à l'extrusion de nos lipides hydratés. L'extrusion s'effectue par passage répété des liposomes sur une membrane de porosité de 100 nm (Sodexim S.A.S, Muzion, France). La mesure de taille est réalisée par le ZetaSizer (ZetaSizer 3000 HSa, Malvern Instruments). Le contenu de la cuve est ensuite injecté dans la cellule du ZetaSizer afin de mesurer la charge apparente des liposomes.

Préparation des lipoplexes

Pour préparer les lipoplexes, le plasmide est ajouté à la solution contenant les liposomes et le mélange est laissé à température ambiante pendant 30 minutes (temps optimal de complexation).

Détermination des rapports de charges

Le rapport de charges (RC), ou charge ratio, est le rapport moléculaire du composé cationique (ici, il y a une charge positive par molécule) sur le composé phosphate de l'ADN chargé négativement. Il est calculé de manière théorique pour chaque lipoplexe et la formule utilisée est la suivante :

$$V_{lip} = R \times (3 \times m_{ADN}) / C_{lip}$$

avec :

- V_{lip} : Volume de lipide (μL)
- 3 : Quantité de charges négatives par μg d'ADN ($\text{nmol} \cdot \mu\text{g}^{-1}$)
- M_{ADN} : Masse molaire de l'ADN ($330 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$)
- R : Rapport de charges
- m_{ADN} : Quantité d'ADN (μg)
- C_{lip} : Concentration en lipide ($\text{nmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)

Les rapports de charges étudiés ici seront RC=1 et RC=2 (proches de la neutralité théorique), les lipoplexes seront préparés avec une masse constante d'ADN (1 μg).

Test de complexation de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose et par fluorimétrie

1 μg d'ADN plasmidique pCMV-luc a été ajouté à chaque lipide afin d'obtenir des complexes aux rapports de charges 0,5, 1 et 2. Pour cela, l'ADN plasmidique est préalablement mélangé à une solution de BET avant d'être mélangé à chaque lipide à raison d'1 μg d'ADN. Ici, 15 μL de chaque complexe est déposé dans chaque puits en présence d'un tampon de charge et mis à migrer pendant 40 minutes à 110 V. Les contrôles de cette manipulation sont des puits d'ADN plasmidique seuls avec le BET (RC=0). La décroissance de la fluorescence peut également être mesurée par fluorimétrie. En effet, plus l'ADN sera complexé et plus il y aura de BET relargué. Plus la quantité de BET intercalé est faible, et plus la fluorescence sera faible.

Transfection *in vitro*

Mise en plaque des cellules et transfection

Les transfections ont été réalisées sur les lignées cellulaires MDA-MB-435s, SKMEL28 et HeLa. Les cellules sontensemencées en plaque 24 puits à raison de 100 000 cellules/puits (comptage réalisé sur cellule de Malassez en présence de bleu Trypan). Les plaques sont alors placées à l'étuve (37°C, 5% de CO₂) pendant 24h. Les vecteurs sont évalués aux rapports de charges 1 et 2 en présence ou non d'un agoniste des récepteurs sigma, l'halopéridol.

Après 24h, les plaques sont vidées de leur milieu. Dans chaque puits sont ajoutés 2 mL de milieu complet contenant ou non 30 µM d'halopéridol. Les plaques sont placées à 37°C avec 5% de CO₂ en milieu humide pendant 2h.

Les liposomes sont mis en présence de l'ADN plasmidique dans du milieu Opti-MEM (Lonza, S.A.), un milieu pauvre en protéines servant à limiter l'apport de charges négatives pouvant interférer dans la formation des lipoplexes. Après 30 minutes de complexation, les lipoplexes sont déposés dans chaque puits contenant non plus le milieu complet mais 450 µL d'Opti-MEM ou 450 µL d'Opti-MEM à 30 µM d'halopéridol (250 µL de complexes correspondant à 1 µg d'ADN plasmidique par puits). Les plaques sont placées à l'étuve (37°C, 5% de CO₂ en atmosphère humide) jusqu'à la mesure de l'expression du gène rapporteur.

Mesure de la toxicité cellulaire

La mesure de la toxicité s'effectue à l'aide du kit ToxiLight BioAssay (Lonza, S.A). Ce kit permet de doser par chimiluminescence la quantité d'adénylate kinase (AK) relarguée dans le milieu cellulaire par les cellules en souffrance. La réaction se déroule en deux étapes, la première est la transformation de deux molécules d'ADP en une molécule d'ATP et une d'AMP sous l'action de l'adénylate kinase. La seconde, consécutive, est l'oxydation de la luciférine en présence de luciférase, d'ATP et de O₂ produisant ainsi de l'oxiluciférine, de l'AMP et libérant des photons (Figure 121).

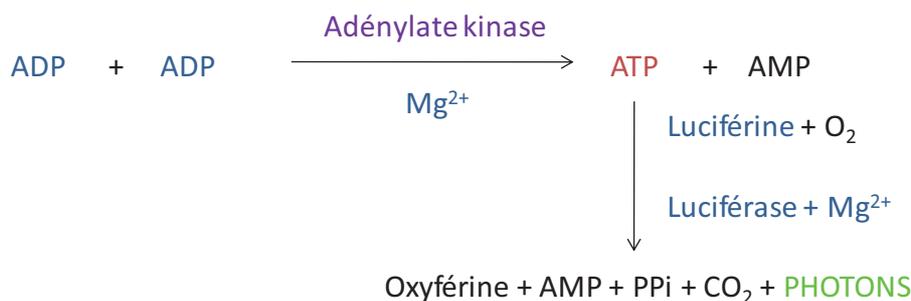


Figure 121 : Schéma réactionnel : dosage de l'adénylate kinase (en bleu : composants présumés du réactif AKDR ; en mauve : molécule provenant de l'échantillon à doser)

En pratique, après 3h d'incubation dans l'étuve à 37°C, 20 µL de surnageant sont prélevés et placés dans une plaque 96 puits blanche. À chaque puits sont ajoutés 100 µL d'AK Detection Reagent et la plaque est lue au luminomètre après 5 minutes d'incubation. La même opération est effectuée après 48h d'incubation.

La cytotoxicité des vecteurs est donc proportionnelle à la quantité de photons émis dont la mesure est exprimée en RLU (Relative Light Unit). Chaque lignée cellulaire possédant une concentration intracellulaire en adénylate kinase propre, il est impossible d'effectuer des comparaisons inter-lignées.

Révélation de l'efficacité de transfection des vecteurs

1 - Lyse cellulaire

Après 48h d'incubation des cellules avec les lipoplexes, le milieu de culture est retiré des plaques. Après un lavage les cellules sont lysées. Les plaques sont alors laissées sous agitation à 4°C pendant 30 minutes. Le lysat est alors transféré dans une plaque 96 puits et mis à centrifuger pendant 5 minutes à 4°C à une vitesse de 2000 tours/minute afin de séparer les débris cellulaires des protéines. Le surnageant est prélevé afin de doser les protéines totales et l'activité de la protéine luciférase.

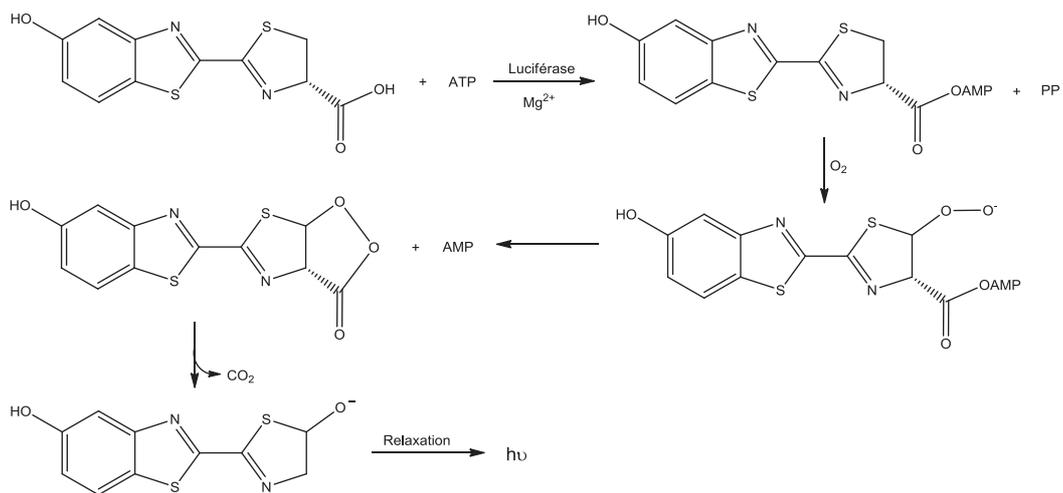


Figure 123 : Réaction de la luciférine en présence de luciférase

Étude statistique

Les analyses statistiques sont réalisées par des tests *t* de Student de distribution bilatérale de type hétéroscédastique (deux échantillons de variances différentes). Les tests sont réalisés sur le programme Microsoft Office Excel (Microsoft Office©, EULA). Les données sont considérées comme significatives si $p < 0,05$.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Au cours des travaux réalisés durant cette thèse, nous nous sommes attachés d'une part à la synthèse de composés amphiphiles présentant une activité de modulation de l'activité du canal SK3 et d'autre part, à initier une stratégie basée sur la régulation de l'expression de la protéine SK3.

Nous avons réalisé la synthèse d'un glyco-glycérolipide bio-inspiré par deux voies de synthèse différentes. Ces travaux portent sur la réalisation d'une α -glycosylation entre deux galactoses en utilisant deux types de groupements protecteurs. Après avoir réalisé une synthèse *via* une protection d'un galactose par des groupements benzyles, nous nous sommes intéressés à la synthèse faisant intervenir des groupements protecteurs de type triméthylsilyles. Cette seconde voie s'est avérée plus rapide et plus efficace que la première. Elle est d'autant plus intéressante que, à notre connaissance, aucune α -glycosylation entre deux saccharides n'a encore été décrite. C'est en suivant cette voie que nous avons également réalisé la synthèse de l' α -ohmline (le β -ohmline - ou ohmline - étant notre composé de référence).

Les études biologiques réalisées sur ces deux glyco-glycérolipides nous ont permis de constater que l'efficacité d'inhibition du courant induit par le canal SK3 de nos deux composés était largement inférieure à celle de l'ohmline. En effet, l' α -ohmline ne présente aucune activité et il faut une dose dix fois plus concentrée de digalactosylglycérolipide pour atteindre la même capacité d'inhibition du courant que notre référence.

Nous nous sommes alors penchés sur la synthèse de glycophosphoglycérolipides. Il s'agissait ici d'introduire une fonction phosphate entre le motif glycéro-lipide et le motif saccharidique présents dans le composé de référence Ohmline. Pour se faire nous avons travaillé avec trois disaccharides différents (afin de garder une structure proche de l'ohmline). En suivant la méthode du *H*-phosphonate, nous avons pu obtenir quatre glycophosphoglycérolipides dérivant du lactose, du mélibiose et de maltose. Le quatrième étant l'anomère α pur du maltose afin d'étudier l'influence de la configuration de la position anomérique sur

l'inhibition de l'activité de canal SK3. Un glycothiophosphoglycérolipide, dérivé du lactose, a également été synthétisé dans le but d'augmenter la stabilité du produit en milieu physiologique en comparaison des dérivés de type phosphate. Nous avons également montré que l'introduction du groupe phosphate permettait d'augmenter la solubilité en milieu aqueux (13 mg/mL versus 6 mg/mL)

Les études biologiques nous ont permis de constater que ni la nature du disaccharide (entre le lactose, maltose et mélibiose), ni l'anométrie n'avait d'incidence sur la capacité à inhiber le courant dû au canal SK3 ou la migration cellulaire. Ces produits sont aussi efficaces que l'ohmline aux mêmes concentrations et ils ne présentent aucune toxicité. Cependant, les tests de sélectivité réalisés avec le phosphate dérivé du lactose (composé **28a**) montrent que si la molécule inhibe le canal SK3, elle active les protéines SK1, SK2 et IKCa. Ces composés qui ne présentent pas une sélectivité totale vis-à-vis du canal SK3 sont néanmoins des outils précieux pour les électrophysiologistes étudiant ces canaux.

Ce résultat inattendu nous a poussés à nous interroger quant à l'influence de la charge de la molécule sur sa sélectivité vis-à-vis des canaux SKCa et IKCa. Nous avons donc réalisé la synthèse de deux autres molécules phosphorées anioniques, l'une porteuse d'une tête inositol et l'autre d'un motif acide phosphorique. Ces travaux sont toujours en cours de réalisation.

Dans un second temps, nous avons changé d'approche en choisissant d'empêcher l'expression du canal SK3 par transfection d'ARN interférent. Dans le but d'effectuer cette modification post-transcriptionnelle uniquement (ou majoritairement) au niveau des cellules tumorales, notre travail s'est principalement porté sur la synthèse et l'évaluation d'un système d'adressage moléculaire basé sur la reconnaissance des récepteurs sigma qui sont surexprimés dans des lignées cellulaires cancéreuses hautement métastatiques exprimant par ailleurs la protéine SK3. Ce récepteur sigma est connu pour être ciblé par des molécules de type benzamides. Nous avons donc réalisé la synthèse de co-lipides neutres portant un motif anisamide afin de réaliser des essais de transfection et d'évaluer l'efficacité du ciblage de cellules surexprimant le récepteur sigma.

Quatre co-lipides neutres portant un motif anisamide ont été synthétisés. Tous ces co-lipides sont des phosphoramides synthétisés *via* une réaction d'Atherton-Todd. Deux de ces molécules possèdent un bras espaceur plus long qui a nécessité une étape supplémentaire de « click-chemistry ».

Les différents co-lipides neutres ont été formulés avec du KLN-47, un phosphoramide cationique développé au laboratoire, connu pour sa très bonne efficacité de transfection. La taille et la charge apparente des liposomes ont été mesurées avant et après extrusion, le passage sur la membrane nous permettant d'obtenir des objets plus petits et de taille plus régulière. Des analyses basées sur la fluorescence du BET nous a permis de constater la bonne complexation des acides nucléiques par nos liposomes.

L'efficacité de transfection de nos vecteurs *in vitro* nous a permis de constater qu'il n'y a aucun ciblage visible dans nos conditions. Les scores de transfection correspondant à ceux du KLN47 seul. Aucune toxicité alarmante n'a par ailleurs été détectée.

Les travaux décrits dans ce manuscrit ouvrent énormément de perspectives. Dans un premier temps, la recherche de nouveaux inhibiteurs du canal SK3 reste un travail constant. L'influence de la charge de la molécule, l'effet de la configuration de la position anomérique et la nature du dissaccharide des glyco-glycérolipides sont autant de facteurs qui restent à étudier pour trouver les inhibiteurs de l'activité du canal SK3 et, par corrélation, les inhibiteurs de la migration cellulaire les plus efficaces. La deuxième perspective concerne l'optimisation de nos vecteurs pour le ciblage du récepteur sigma. Là encore de nombreux facteurs peuvent varier : la structure de nos co-lipides, notamment la longueur du bras espaceur, sa proportion par rapport au lipide cationique dans la formulation, le nombre de charges apparentes à la surface du lipoplexe afin de diminuer la transfection due à la charge et l'étude sur différentes lignées cellulaires (exprimant ou non le récepteur sigma).

ANNEXES

Publications :

Fraix, A. ; Montier, T. ; Le Gall, T. ; Sevrain, C.M. ; Carmoy, N. ; Lindberg, M.F. ; Lehn, P. ; Jaffrès, P.A. « Lipothiophosphoramidates for gene delivery: critical role of the cationic polar headgroup » *Org. Biomol. Chem.* 2012, 10, 2051-2058.

Sevrain, C.M. ; Haelters, J.P. ; Chantôme, A. ; Couthon-Gourvès, H. ; Girault, A. ; Vandier C. ; Jaffrès, P.A. « Glyco-Phospho-Glycero Ether Lipid (GPGEL): synthesis and evaluation as Small Conductance Ca^{2+} -Activated K^+ Channels (SK3) inhibitor » *MedChemComm* 2012, 3, 1471-1478 (présente ci-après).

Sevrain, C.M. ; Haelters, J.P. ; Chantôme, A. ; Couthon-Gourvès, H. ; Gueguinou, M. ; Potier-Cartereau, M. ; Vandier C. ; Jaffrès, P.A. « DiGalactosyl-Glycero-Ether Lipid: synthetic approaches and evaluation as SK3 channel inhibitor » (soumise-présente ci-après).

Communications orales:

Sevrain, C.M. ; Haelters, J.P. ; Chantôme, A. ; Couthon-Gourvès, H. ; Girault, A. ; Vandier C. ; Jaffrès, P.A. « Synthèse d'inhibiteurs potentiels du canal potassique SK3 - Nouvelle cible anti-cancéreuse », Journée des doctorants et post-doctorants en biologie-santé en Bretagne, Rennes, 14 juin 2010.

Sevrain, C.M. ; Haelters, J.P. ; Chantôme, A. ; Couthon-Gourvès, H. ; Girault, A. ; Vandier C. ; Jaffrès, P.A. « Synthèse de glycolycérophosphates inhibiteurs du canal potassique SK3 : composés anti-métastatiques potentiels », 7^{ème} colloque Axe « Valorisation des produits de la mer en cancérologie », Poitiers, 24-25 mars 2011.

Sevrain, C.M. ; Haelters, J.P. ; Chantôme, A. ; Couthon-Gourvès, H. ; Girault, A. ; Vandier C. ; Jaffrès, P.A. « Synthèse d'inhibiteurs du canal potassique SK3 : composés anti-métastatiques potentiels », Séminaire de l'UMR CNRS 6521 CEMCA, Brest, 31 mars 2011.

Sevrain, C.M. ; Haelters, J.P. ; Chantôme, A. ; Couthon-Gourvès, H. ; Girault, A. ; Vandier C. ; Jaffrès, P.A. « Synthèse de glycolycérophosphates inhibiteurs du canal potassique SK3 : composés anti-métastatiques potentiels », 48^{ème} Semaine d'Etudes de Chimie Organique (SECO), Agde, 22-27 mai 2011.

Sevrain, C.M. ; Haelters, J.P. ; Chantôme, A. ; Couthon-Gourvès, H. ; Girault, A. ; Vandier C. ; Jaffrès, P.A. « Action sur la migration cellulaire dans le cas de cancers métastatiques », 1^{ère} Journée des Doctorants de l'Ecole Doctorale SICMA, Brest, 06 juin 2011, prix de la meilleure communication orale groupement disciplinaire Matière.

Sevrain, C.M. ; Haelters, J.P. ; Chantôme, A. ; Couthon-Gourvès, H. ; Girault, A. ; Vandier C. ; Jaffrès, P.A. « Alkyl-lipides inhibiteurs du canal SK3 », 8^{ème} colloque Axe « Valorisation des produits de la mer en cancérologie », Le Mans, 05-06 avril 2012.

Sevrain, C.M. ; Girault, A. ; Chantome, A. ; Vandier, C. ; Couthon-Gourvès, H. ; Jaffrès, P.A. ; Haelters, J.P. « Glycophospholipids for the modulation of SK3 channel », 26th International Carbohydrate Symposium, Madrid, 22-26 juillet 2012 (Flash Communication).

Posters :

Sevrain, C.M. ; Haelters, J.P. ; Couthon-Gourvès, H. ; Jaffrès, P.A. « Synthèse de glycolycérophosphates inhibiteurs du canal potassique SK3 : composés anti-métastatiques potentiels » ; Journées Régionales de la Société Chimique de France section Bretagne-Pays de la Loire, Noirmoutier, 06-08 juin 2011.

Sevrain, C.M. ; Girault, A. ; Chantome, A. ; Vandier, C. ; Couthon-Gourvès, H. ; Jaffrès, P.A. ; Haelters, J.P. « Glycophospholipids for the modulation of SK3 channel », 26th International Carbohydrate Symposium, Madrid, 22-26 juillet 2012.

Sevrain, C.M. ; Girault, A. ; Chantome, A. ; Potier-Cartereau M. ; Vandier, C. ; Couthon-Gourvès, H. ; Jaffrès, P.A. ; Haelters, J.P. « Glyco- et glycophospholipides pour la modulation de l'activité du canal SK3 », 7^{ème} journée du Cancéropôle Grand Ouest, Sables d'Olonne, 02-03 avril 2013.

Cite this: DOI: 10.1039/c2md20207g

www.rsc.org/medchemcomm

CONCISE ARTICLE

Glyco-Phospho-Glycero Ether Lipids (GPGEL): synthesis and evaluation as small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel (SK3) inhibitors†Charlotte M. Sevrain,^a Jean-Pierre Haelters,^{*a} Aurélie Chantôme,^b Hélène Couthon-Gourvès,^a Alban Girault,^b Christophe Vandier^{*b} and Paul-Alain Jaffrès^{*a}

Received 23rd July 2012, Accepted 12th September 2012

DOI: 10.1039/c2md20207g

The SK3 channel, a member of the small conductance calcium-dependent potassium channels (SKCa), plays a central role with respect to the motility of highly metastatic cancerous cells (e.g. MDA-MB435s – breast cancer cell). Edelfosine, an ether lipid derivative, is able to partially inhibit this channel activity and thus reduce the SK3-dependent cell motility, but, due to its toxicity, analogues of this compound were highly desired. **Ohmline**, an edelfosine analogue that possesses a lactose unit in its polar domain, was the first efficient and non-toxic SK3 inhibitor that exhibits an amphiphilic structure. In the present work, we have modified the polar head of **Ohmline** by placing a disubstituted phosphate group between a disaccharide unit (lactose, maltose, and melibiose) and the glycerol ether-lipid moiety. It was first observed that this modification increases the water solubility of these compounds. All these novel compounds are efficient SK3 channel inhibitors with an activity comparable to **Ohmline** (patch-clamp measurements). These compounds are also able to reduce the SK3-dependent cell motility with similar efficacies to **Ohmline**. In a broader perspective it is shown that the presence of one anionic charge (coming from the presence of a phosphate group) in the polar head group does not alter the SK3 channel inhibition and provides insights into the future development of a class of migration-targeted anticancer agents.

Introduction

Ether lipids constitute a sub-class of natural lipids that are characterized by a molecular structure based on a glycerol unit functionalized at its *sn1* position with an alkyl chain bonded by an ether function.¹ Based on this common skeleton, structural variations can occur on its alkyl chain (chain length, presence of unsaturations) also by the presence of substituents at position *sn2* or *sn3* of the glycerol unit. Ether lipids have been studied for their implication in different physiological processes including immunostimulant properties,² tumour growth inhibition,³ antibacterial and antifungal activity,⁴ antiretroviral properties⁵ and more recently for their implication in adipogenesis.⁶ Moreover, abnormal quantities of ether lipids can be the signature of physiological disorders (deficiency has been observed in blood plasma of hypertensive patients⁷ and excess was observed in some tumor cells⁸). With respect to the use of ether lipids in cancer therapy, MonoAlkyl Glycero lipid Ether (MAGE), in particular those possessing unsaturated alkyl chains were identified for their anti-tumour activities⁹ via a likely anti-

neoangiogenic action.¹⁰ The substitution at position *sn2* and/or *sn3* of MAGE led to the discovery of other anti-cancer drugs. Among these compounds, edelfosine is one of the most studied

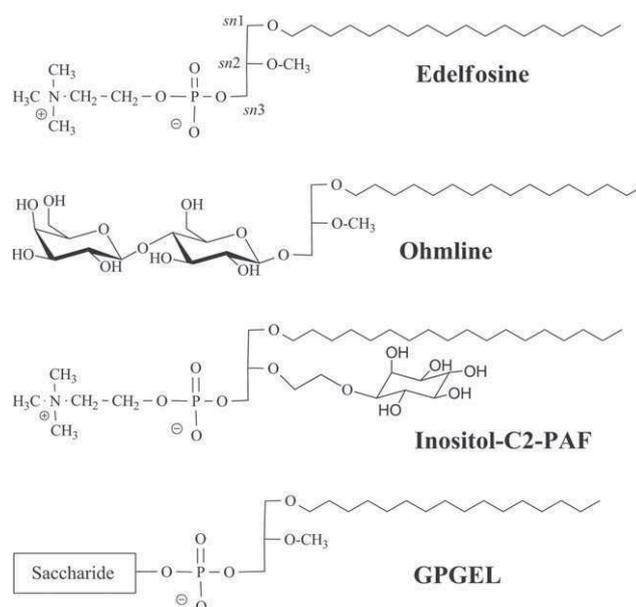


Fig. 1 Chemical structures of edelfosine, **Ohmline**, inositol-C2-PAF and the general formula of Glyco-Phospho-Glycero-Ether-Lipids (GPGEL) reported in this study.

^aUniversité de Brest, Université Européenne de Bretagne, CEMCA, CNRS UMR 6521, IFR 148 SchNBloS, 6 Avenue Le Gorgeu, 29238 Brest, France. E-mail: jean-pierre.haelters@univ-brest.fr

^bInserm, U1069, Université François Rabelais, Tours, F-37032 France. E-mail: christophe.vandier@univ-tours.fr

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c2md20207g

7 : 3) which were used without separation for the next synthetic steps (Table 1). The reaction of **2a** with 1-*O*-hexadecyl-2-*O*-methylglycerol and pivaloyl chloride produced, *via* a likely mixed anhydride intermediate,^{31a} a phosphite which was oxidized *in situ* with diiodide in the presence of water and pyridine to yield phosphate **3a** in 54% yield. Of note, we used racemic 1-*O*-hexadecyl-2-*O*-methylglycerol in all the synthesis. This choice was motivated by our previous work reporting that the chirality at the *sn2* position of the glycerol unit included in the structure of **Ohmline** has no effect on its ability to modulate SK3 channel activity (patch-clamp experiments).²⁹ In the last step, the deprotection of the alcohol functional groups, following a reported procedure,³² produced lactose-phosphate **4a** in a quantitative yield. Its solubility measured in water was equal to 13 mg mL⁻¹ (16 μM) and must be compared with the solubility of **Ohmline** (6 mg mL⁻¹; 9 μM). This expected increase of water solubility is attributed to the presence of the ionic phosphate in the molecule which enhances the hydrophilicity of the compound. With the aim to keep in the structure of the new compounds a polar head constituted by a phosphate functional group and a disaccharide unit, maltose and melibiose were also selected as disaccharide units. The synthetic scheme is similar to the one used for the synthesis of the lactose-based compound **4a** (Fig. 2). For maltose, the intermediate compound **2b** was isolated in 84% yield as a mixture of two diastereoisomers ($\alpha : \beta = 1 : 1$). For this maltose derivative and with the aim to study, for one disaccharide derivative, the influence of the stereochemistry of the anomeric position on the final SK3 channel inhibition, the next steps of the synthesis were achieved on both the mixture of diastereoisomers **2b1** ($\alpha : \beta = 1 : 1$) and the pure α -derivative **2b2** prepared by the treatment of compound **2b1** with phosphorous acid in acetonitrile (Table 1).^{31a} The next steps of the synthesis were identical to those used for the synthesis of the lactose-based compound. Accordingly, the two samples **4b1** (mixture of $\alpha : \beta = 1 : 1$) and **4b2** were isolated. Finally, to complete this series of compounds, the melibiose-based compound **4c** was synthesized in a similar manner (Fig. 2). In that case, compound **4c** was isolated as a mixture of two diastereoisomers ($\alpha : \beta = 8 : 2$) (Table 1).

The potency of compounds **4a–c** to inhibit the SK3 channel, compared to that of the reference compound **Ohmline**, was tested on HEK293T cells expressing homotetramer SK3 channels, HEK293T-SK3 cells. In parallel, the selectivity of the molecules on the SK3 channel was evaluated on HEK293T that does not express the SK3 channel. We first evaluated the inhibitory effect of compounds on the whole cell SK3 current using the patch-clamp technique (Table 2). It must be noted that this preliminary test aims to discard inactive compounds. The experimental conditions for these patch-clamp measurements were previously optimized.²⁹ It was found that testing the compounds at 10 μM on the SK3 channel permitted a fast and robust pre-selection of

Table 1 Diastereoisomeric ratio α/β of compounds **2a–c**

| Compound | Ratio α/β |
|------------|----------------------|
| 2a | 7 : 3 |
| 2b1 | 1 : 1 |
| 2b2 | 1 : 0 |
| 2c | 8 : 2 |

Table 2 Action of **Ohmline** and analogues compounds **4a–c** on SK3 channel activity (measured in whole cell configuration of the patch-clamp technique). The percentage of inhibition of SK3 channel activity corresponds to the ratio of the amplitude of the SK3 current, recorded at 0 mV, in HEK293T-SK3 cells before and after application of compounds at a concentration of 10 μM. Results are expressed in percentage \pm S.E.M. *n* indicates the number of cells tested

| Compound | SK3 activity inhibition (%) |
|----------------|-----------------------------------|
| Ohmline | 73.23 \pm 4.99 (<i>n</i> = 5) |
| 4a | 69.25 \pm 4.32 (<i>n</i> = 4) |
| 4b1 | 60.00 \pm 11.00 (<i>n</i> = 5) |
| 4b2 | 70.75 \pm 8.52 (<i>n</i> = 4) |
| 4c | 65.50 \pm 6.90 (<i>n</i> = 4) |

effective SK3-channel inhibitors that were then tested, at lower concentration (see below), to reduce SK3-dependent cancer cell migration. It is also noteworthy that the use of this technique allowed us to observe an entire inhibition of SK3 channel activity in less than 3 minutes after **Ohmline** application. The effect of **Ohmline** and compounds **4a–c** on the amplitude of the SK3 current was measured at 0 mV (the current is only carried by SK3 channels under these conditions – see ESI†) and 3 minutes after application of compounds. Currents generated before and after application of molecules using a ramp protocol from +100 mV to –100 mV are illustrated in Fig. S1 (ESI†). All compounds decreased the amplitude of SK3 current with a comparable efficacy at a concentration of 10 μM (~60 to 70% of inhibition – these values being very close and not statistically different to the inhibitory capacity of **Ohmline** –73%). Noticeably, the pure diastereoisomeric compound **4b2** and the mixture of diastereoisomers **4b1** exhibited comparable activities (no statistical relevant differences were observed between these two compounds).

Based on these promising results indicating that compounds **4** are able to inhibit SK3 channel activity as does **Ohmline**, the next experiments were dedicated to evaluate the capacity of these molecules to inhibit SK3-dependent cell migration; this type of migration being clearly implicated in cancer cell spreading. A 15 h treatment with 100 nM **Ohmline** or compounds **4a–c** inhibited cell migration of HEK293T-SK3 without affecting migration of HEK293T cells that did not express SK3 channels (Fig. 3). The capacity of **Ohmline** and compounds **4a–c** to reduce SK3-dependent cell migration was not significantly different (between 40% and 50%). Finally, the toxicity of this series of compounds was evaluated following MTT assays at 10 μM. As reported in the ESI† (Fig. S2), none of the compounds **4** exhibited a noticeable level of toxicity at this concentration.

Materials and experimental procedures

Synthesis – general

Solvents were dried with a solvent purification system MBraun-SPS (THF, CH₂Cl₂) or freshly distilled on appropriate driers. Dialkylphosphates **3a–c** were purified by flash chromatography (GRACE REVELERIS Flash Chromatography System) equipped with UV and DLS detectors allowing us to attest the high purity (>95%) of the purified compounds. All compounds were fully characterized by ¹H (500.13 or 400.133 or 300.135 MHz), ¹³C (125.773 or 75.480 MHz) and ³¹P (161.970 or 121.498 MHz)

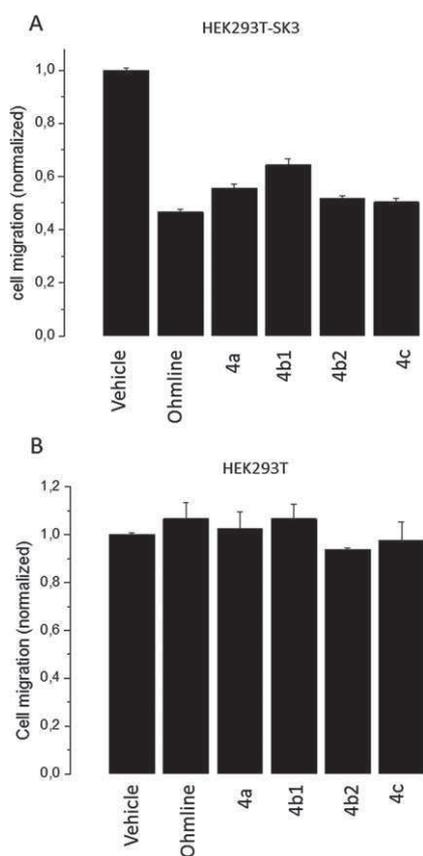


Fig. 3 SK3-dependent cell migration is inhibited in a similar manner by **Ohmline** and analogues compounds **4a–c**. (A) Histograms showing the effect of **Ohmline** and analogues on the cell migration of HEK293T expressing a recombinant SK3 channel. (B) Histograms showing that application of **Ohmline** and analogues had no effect on the cell migration of HEK293T wild-type. The normalized cell number corresponds to the ratio of the total number of migrating cells in the presence of compounds (100 nM) to the total number of migrating cells in the presence of vehicle. Results from 3 independent experiments performed in triplicate are expressed as mean \pm S.E.M. * Significantly different from vehicle application at $p < 0.05$.

NMR spectroscopy (Bruker AC 300, Avance DRX 400 and Avance DRX 500 spectrometers). Chemical shifts δ are given in ppm. Coupling constants J are given in Hertz. The following abbreviations were used: s for singlet, d doublet, t triplet, q quadruplet, qt quintuplet, m for multiplet and dt for doublet of triplets. When needed, ^{13}C heteronuclear HMQC and HMBC were used to unambiguously establish molecular structures. Mass spectroscopy analyses were performed by CRMPO (Université de Rennes 1, Rennes-France) by using a MS/MS high resolution Micromass ZABSpecTOF. Fourier Transform Infra-Red (FTIR) spectra were recorded on a Bruker Vertex 70 FT-IR (ATR) spectrometer. The melting points were not measured due to the degradation of the solid each time below 170 °C.

General procedure: synthesis of monoalkylphosphite **2a–c**

To a stirred solution of imidazole (14.6 equiv.) in anhydrous MeCN at 0 °C was added dropwise phosphorus trichloride (4.38 equiv.) followed by triethylamine (16.3 equiv.). Stirring was continued for 20 min at 0 °C, and then a solution of

heptaacetyldipyrano (1 equiv.) in anhydrous MeCN was added dropwise. The mixture was stirred at 20 °C for 2 h, after which 5 mL of water were added. The clear solution was stirred for 15 min, CH_2Cl_2 was added (100 mL), and the organic layer was washed with ice-water. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (2 \times 25 mL). The combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtered through cotton wool and concentrated *in vacuo*.

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- α , β -D-glucopyranosyl hydrogenephosphonate, triethylammonium salt (2a**).** Prepared by phosphorylation of compound **1a** (900 mg, 1.42 mmol) to give a yellow powder (980 mg, 87%). NMR ^{31}P (161.970 MHz, CDCl_3): 1.68 (β anomer), 0.63 (α anomer) ($\alpha : \beta = 7 : 3$). ^1H (400.133 MHz, CDCl_3): 6.16 (d, 1H, PH, $^1J_{\text{PH}} = 604$), 5.74 (dd, 1H, H-1, $^3J_{\text{HH}} = 3.2$, $^3J_{\text{PH}} = 8.8$), 5.46 (t, 1H, H-3, $^3J_{\text{HH}} = 9.6$), 5.31 (s, 1H, H-4), 5.06 (t, 1H, H-2', $^3J_{\text{HH}} = 9$), 4.91 (m, 1H, H-3'), 4.84 (m, 1H, H-2), 4.46 (m, 2H, H-6a, H-1'), 4.10 (m, 4H, H-6b, H-6', H-5), 3.85 (t, 1H, H-5', $^3J_{\text{HH}} = 6.4$), 3.80 (t, 1H, H-4, $^3J_{\text{HH}} = 9.6$), 3.00 (q, 6H, 3CH_2 (Et_3NH^+), $^3J_{\text{HH}} = 7.2$), 2.00 (m, 21H, 7CH_3 (OAc)), 1.38 (t, 9H, 3CH_3 (Et_3NH^+), $^3J_{\text{HH}} = 7.2$).

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- α , β -D-glucopyranosyl hydrogenephosphonate, triethylammonium salt (2b**).** Prepared by phosphorylation of compound **1b** (900 mg, 1.42 mmol) to give a yellow powder (950 mg, 84%). NMR ^{31}P (161.970 MHz, CDCl_3): 1.77 (β anomer), 1.10 (α anomer) ($\alpha : \beta = 1 : 1$).

With the aim to obtain a pure α anomer form, the amorphous solid was dissolved in anhydrous MeCN and H_3PO_3 (20 eq.) was added. The mixture was stirred at rt for 20 hours and then CH_2Cl_2 was added. The organic layer was washed twice with cold saturated sodium bicarbonate solution and twice with TEA hydrogen carbonate buffer (0.1 M, pH = 8.4). The organic phase was discarded. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (4 times). Then, the organic layer was dried with MgSO_4 , filtered through cotton wool and concentrated to give a powder (790 mg, 70%). NMR ^{31}P (161.970 MHz, CDCl_3): 1.10 (α anomer). ^1H (400.133 MHz, CDCl_3): 8.14 (s, 1H, NH (Et_3NH^+)), 6.13 (d, 1H, PH, $^1J_{\text{PH}} = 640$), 5.64 (dd, 1H, H-1, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$, $^3J_{\text{HH}} = 4.0$), 5.48 (t, 1H, H-3, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$), 5.14 (m, 2H, H-1', H-3'), 4.92 (m, 1H, H-4), 4.70 (m, 2H, H-2, H-2'), 4.35 (m, 1H, H-6a), 4.09 (m, 2H, H-5, H-6b), 3.85 (m, 4H, H-4, H-5', H-6'), 2.92 (q, 6H, 3CH_2 (Et_3NH^+), $^3J_{\text{HH}} = 7.0$), 1.85 (m, 21H, 7CH_3 (OAc)), 1.24 (t, 9H, 3CH_3 (Et_3NH^+), $^3J_{\text{HH}} = 7.0$).

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-2,3,6-tri-*O*-acetyl- α , β -D-glucopyranosyl hydrogenephosphonate, triethylammonium salt (2c**).** Prepared by phosphorylation of compound **1c** (900 mg, 1.42 mmol) to give a yellow powder (980 mg, 87%). NMR ^{31}P (161.970 MHz, CDCl_3): 1.27 (β anomer), 0.71 (α anomer) ($\alpha : \beta = 8 : 2$). ^1H (400.133 MHz, CDCl_3): 8.14 (s, 1H, NH (Et_3NH^+)), 6.20 (d, 1H, PH, $^1J_{\text{PH}} = 640$), 5.77 (dd, 1H, H-1, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$, $^3J_{\text{HH}} = 4.0$), 5.53 (t, 1H, H-3, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$), 5.43 (d, 1H, H-4', $^3J_{\text{HH}} = 4.0$), 5.29 (dd, 1H, H-3', $^3J_{\text{HH}} = 7.0$, $^3J_{\text{HH}} = 4.0$), 5.04 (m, 3H, H-1', H-2', H-4), 4.85 (dd, 1H, H-2, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$, $^3J_{\text{HH}} = 4.0$), 4.20 (m, 2H, H-5, H-5'), 4.04 (m, 2H, H-6'), 3.69 (m, 1H, H-6a), 3.53 (m, 1H, H-6b), 3.01 (q, 6H, 3CH_2 (Et_3NH^+),

$^3J_{\text{HH}} = 7.0$), 1.96 (m, 21H, 7CH₃ (OAc)), 1.30 (t, 9H, 3CH₃ (Et₃NH⁺), $^3J_{\text{HH}} = 7.0$).

General procedure: synthesis of dialkylphosphate 3a–c

H-Phosphonate (120 mg, 0.15 mmol, 1 equiv.) was dissolved in anhydrous THF (3.2 mL), sieve and pyridine (0.61 mL) were added and the mixture was stirred for 30 min. 1-*O*-Hexadecyl-2-*O*-methylglycerol (49 mg, 0.15 mmol, 1 equiv.) in anhydrous THF (2.7 mL) and pivaloyl chloride (0.05 mL, 0.37 mmol, 2.5 equiv.) were added at 0 °C and the solution was stirred at rt for 30 min, whereafter a freshly prepared solution of iodine (76 mg, 0.30 mmol, 2 equiv.) in a mixture of pyridine–water (95 : 5; 1.52 mL) was added. After 30 min, Na₂S₂O₃ (1 M) was added until uncolored solution was obtained. The aqueous layer was extracted with CHCl₃ and the combined organic layers were washed in turn with water and TEA hydrogen carbonate buffer (0.1 M, pH = 8.4). The organic layer was dried with Na₂SO₄, filtered through cotton wool and concentrated. A chromatography on silica gel (CH₂Cl₂–MeOH–Et₃N, (99 : 0 : 1) → (94 : 5 : 1)) of the residue gave the product as an amorphous solid. With the aim of removing the excess of triethylammonium salt, the product was washed with toluene, filtered through cotton wool and concentrated to give the pure compound.

Synthesis of 1-*O*-hexadecyl-2-*O*-methyl-*sn*-glycer-3-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-galactopyranosyl-(1 → 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-α,β-*D*-glucopyranosyl phosphate, triethylammonium salt (3a). Prepared by condensation of compound 2a (980 mg, 1.22 mmol) with 1-*O*-hexadecyl-2-*O*-methylglycerol (404 mg, 1.22 mmol) to give a yellow powder (750 mg, 54%). Rf (CH₂Cl₂–MeOH–Et₃N (94 : 5 : 1): 0.25; IR (ATR, cm⁻¹): 2292–2852 (C–H), 1717 (C=O), 1226 (P=O), 1044 (P–O). NMR ³¹P (161.970 MHz, CDCl₃): –1.91 (β anomer), 1.89 (α anomer) (α : β = 7 : 3). ¹H (400.133 MHz, CDCl₃): 5.65 (m, 1H, H-1), 5.45 (t, 1H, H-3, $^3J_{\text{HH}} = 9.8$), 5.32 (s, 1H, H-4'), 5.07 (t, 1H, H-2', $^3J_{\text{HH}} = 9.2$), 4.91 (dd, 1H, H-3', $^2J_{\text{HH}} = 10.4$, $^3J_{\text{HH}} = 3.2$), 4.86 (d, 1H, H-2, $^3J_{\text{HH}} = 10.4$), 4.46 (m, 2H, H-6a, H-1'), 4.10 (m, 4H, H-6b, H-6', H-5), 3.95 (m, 2H, *H-CH-CH-CH-H* glycerol), 3.85 (t, 1H, H-5', $^3J_{\text{HH}} = 6.8$), 3.78 (t, 1H, H-4, $^3J_{\text{HH}} = 9.8$), 3.53 (m, 2H, CH₂ α fatty chain), 3.43 (s, 3H, OCH₃ glycerol), 3.39 (m, 3H, *CH sn-2* glycerol, *H-CH-CH-CH-H* glycerol), 3.06 (q, 6H, 3CH₂ (Et₃NH⁺), $^3J_{\text{HH}} = 7.2$), 2.03 (m, 21H, 7CH₃ acetyl), 1.52 (m, 2H, CH₂ β fatty chain), 1.31 (t, 9H, 3CH₃ (Et₃NH⁺), $^3J_{\text{HH}} = 7.2$), 1.23 (m, 26H, 13CH₂ fatty chain), 0.86 (t, 3H, CH₃ fatty chain, $^3J_{\text{HH}} = 6.4$). ¹³C (75.480 MHz, CDCl₃): 170.6–169.2 (C(O) acetyl), 101.3 (s, CH-1'), 92.1 (s, CH-1), 79.8 (s, *CH sn-2* glycerol), 76.1 (s, CH-4), 72.0 (s, CH₂ α fatty chain), 70.8 (s, CH_{2 sn-1} glycerol), 70.0 (s, CH-3), 69.3 (s, CH-5, CH-2'), 66.9 (s, CH-4'), 61.8 (s, CH₂-6), 61.1 (s, CH₂-6'), 58.1 (s, OCH₃ glycerol), 46.2 (s, CH₂ Et₃NH⁺), 32.1 (s, CH₂ β fatty chain), 29.9–22.9 (CH₂ fatty chain), 21.2–20.9 (CH₃ acetyl), 14.4 (s, CH₃ fatty chain), 9.0 (s, CH₃ Et₃NH⁺). HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for C₄₆H₇₆O₂₃P [M – Et₃N – 2H] 1027.45205; found 1027.4518.

Synthesis of 1-*O*-hexadecyl-2-*O*-methyl-*sn*-glycer-3-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-α-*D*-glucopyranosyl-(1 → 4)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-α,β-*D*-glucopyranosyl phosphate, triethylammonium salt (3b). Prepared by condensation of compound 2b (300 mg, 1.22 mmol)

with 1-*O*-hexadecyl-2-*O*-methylglycerol (301 mg, 1.22 mmol) to give a yellow powder (750 mg, 58%).

3b1: IR (ATR, cm⁻¹): 2917–2850 (C–H), 1751 (C=O), 1235 (P=O), 1054 (P–O). NMR ³¹P (161.970 MHz, CDCl₃): –2.08 (β anomer), –2.30 (α anomer) (α : β = 1 : 1). HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for C₄₆H₇₆O₂₃P [M – Et₃N – 2H] 1027.45205; found 1027.4527.

3b2: IR (ATR, cm⁻¹): 2923–2853 (C–H), 1750 (C=O), 1219 (P=O), 1030 (P–O). NMR ³¹P (161.970 MHz, CDCl₃): –2.17 (α anomer). ¹H (400.133 MHz, CDCl₃): 11.62 (s, 1H, NH (Et₃NH⁺)), 5.61 (m, 1H, H-1), 5.56 (t, 1H, H-3, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz), 5.39 (d, 1H, H-1', $^3J_{\text{HH}} = 4.0$ Hz), 5.30 (t, 1H, H-3', $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz), 5.03 (t, 1H, H-4', $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz), 4.82 (m, 2H, H-2, H-2'), 4.48 (m, 1H, H-6a), 4.17 (m, 3H, H-5, H-6-b, H-6'a), 3.92 (m, 5H, H-4, H-5', H-6'b, *H-CH-CH-CH-H* glycerol), 3.52 (m, 3H, *CH sn-2* glycerol, *H-CH-CH-CH-H* glycerol), 3.07 (m, 6H, 6CH₂ (Et₃NH⁺)), 3.44 (m, 3H, OCH₃ glycerol), 3.38 (m, 2H, CH₂ α fatty chain), 1.97 (m, 21H, 7CH₃ acetyl), 1.41 (m, 2H, CH₂ β fatty chain), 1.29 (t, 9H, 3CH₃ (Et₃NH⁺), $^3J_{\text{HH}} = 7.0$), 1.23 (s, 26H, 13CH₂ fatty chain), 0.84 (t, 3H, CH₃ fatty chain, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$). ¹³C (75.480 MHz, CDCl₃): 169.5–170.6 (C(O) acetyl), 95.5 (s, CH-1'), 91.7 (s, CH-1), 79.3 (s, *CH sn-2* glycerol), 72.4 (s, CH-3), 72.3 (s, CH-4), 71.8 (s, CH₂ α fatty chain), 70.7 (s, CH-2'), 70.4 (s, CH_{2 sn-1} glycerol), 70.1 (s, CH-2), 69.4 (s, CH-3'), 68.6 (s, CH-5'), 68.3 (s, CH-5), 68.0 (s, CH-4'), 65.0 (s, *CH sn-3* glycerol), 62.5 (s, CH-6), 61.3 (s, CH-6'), 57.8 (s, OCH₃ glycerol), 45.7 (s, CH₂ Et₃NH⁺), 31.9–22.7 (CH₂ fatty chain), 20.9–20.6 (CH₃ acetyl), 14.1 (s, CH₃ fatty chain), 8.5 (s, CH₃ Et₃NH⁺). HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for C₄₆H₇₆O₂₃P [M – Et₃N – 2H] 1027.45205; found 1027.4523.

Synthesis of 1-*O*-hexadecyl-2-*O*-methyl-*sn*-glycer-3-yl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-galactopyranosyl-(1 → 6)-2,3,6-tri-*O*-acetyl-α,β-*D*-glucopyranosyl phosphate, triethylammonium salt (3c). Prepared by condensation of compound 2c (500 mg, 1.22 mmol) with 1-*O*-hexadecyl-2-*O*-methylglycerol (320 mg, 1.22 mmol) to give a yellow powder (320 mg, 86%). IR (ATR, cm⁻¹): 2922–2852 (C–H), 1750 (C=O), 1247 (P=O), 1035 (P–O). NMR ³¹P (161.970 MHz, CDCl₃): 0.22 (β anomer), –2.42 (α anomer) (α : β = 8 : 2). ¹H (400.133 MHz, CDCl₃): 7.26 (s, 1H, NH (Et₃NH⁺)), 5.68 (m, 1H, H-1), 5.49 (t, 1H, H-3, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$), 5.41 (m, 1H, H-4'), 5.27 (m, 1H, H-3'), 5.14 (m, 1H, H-4), 5.09 (dd, 1H, H-1', $^2J_{\text{HH}} = 11.2$, $^3J_{\text{HH}} = 3.6$), 4.90 (t, 1H, H-2', $^3J_{\text{HH}} = 7.0$), 4.85 (m, 1H, H-2), 4.21 (m, 1H, H-5), 4.15 (q, 1H, H-5', $^3J_{\text{HH}} = 7.0$), 4.02 (m, 2H, H-6'), 3.87 (m, 2H, CH₂ α fatty chain), 3.67 (m, 1H, H-6a), 3.52 (m, 1H, H-6b), 3.40 (m, 8H, *H-CH-CH-CH-H* glycerol, *CH sn-2* glycerol, *H-CH-CH-CH-H* glycerol, OCH₃ glycerol), 3.02 (q, 6H, 6CH₂ (Et₃NH⁺), $^3J_{\text{HH}} = 7.0$), 2.00 (m, 21H, 7CH₃ acetyl), 1.51 (m, 2H, CH₂ β fatty chain), 1.28 (t, 9H, 3CH₃ (Et₃NH⁺), $^3J_{\text{HH}} = 7.0$), 1.19 (s, 26H, 13CH₂ fatty chain), 0.81 (t, 3H, CH₃ fatty chain, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$). ¹³C (75.480 MHz, CDCl₃): 170.3–169.0 (C(O) acetyl), 96.4 (s, CH-1'), 91.7 (s, CH-1), 79.1 (s, *CH sn-2* glycerol), 71.5 (s, CH₂ α fatty chain), 70.1 (s, CH-2), 70.0 (s, CH_{2 sn-1} glycerol), 69.8 (s, CH-3), 69.1 (s, CH-5), 67.7–67.8 (m, CH-2', CH-4', CH-4), 67.3 (s, CH-3'), 65.9 (s, CH-5'), 65.1 (s, *CH sn-3* glycerol), 64.8 (s, CH₂-6), 61.4 (s, CH₂-6'), 57.5 (s, OCH₃ glycerol), 45.8 (s, CH₂ Et₃NH⁺), 31.6–22.4 (CH₂ fatty chain), 20.5–20.4 (CH₃ acetyl), 13.8 (s, CH₃ fatty chain), 8.5 (s,

CH₃ Et₃NH⁺). HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for C₄₆H₇₆O₂₃P [M – Et₃N – 2H] 1027.45205; found 1027.4524.

General procedure: deacetylation

The phosphonate was dissolved in freshly distilled MeOH and K₂CO₃ (0.5 equiv.) was added. The solution was stirred at 20 °C, then Amberlyste® IR-120 was added and the mixture was stirred for 30 minutes at rt. Then the solution was filtered through cotton wool in few mL of MeOH and Et₃N. The filtrate was concentrated to give a white solid.

Synthesis of 1-*O*-hexadecyl-2-*O*-methyl-*sn*-glycer-3-yl β-D-galactopyranosyl-(1 → 4)-α,β-D-glucopyranosylphosphate, triethylammonium salt (4a). Prepared by deprotection of **3a** (300 mg, 0.27 mmol) with K₂CO₃ (19 mg, 0.14 mmol) to give a white solid (220 mg, quantitative). IR (ATR, cm⁻¹): 3325 (O–H), 2917–2850 (C–H), 1222 (P=O), 1050 (P–O). NMR ³¹P (400 MHz; CD₃OD): 0.33 (β anomer), –1.24 (α anomer). ¹H (400 MHz, CD₃OD): 6.97 (brs, 1H, NH (Et₃NH⁺)), 5.32 (m, 1H, H-1), 4.28 (m, 1H, H-1'), 3.70 (m, 14H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 3.31 (m, 10H, CH₂ *sn*-1 glycerol, CH₂ *sn*-3 glycerol, CH *sn*-2 glycerol, CH₂ α fatty chain, OCH₃ glycerol), 1.41 (m, 2H, CH₂ β fatty chain), 1.15 (m, 26H, 13CH₂ fatty chain), 0.75 (m, 3H, CH₃ fatty chain). ¹³C (75.480 MHz, CD₃OD): 105.2 (s, CH-1'), 96.5 (s, CH-1), 81.0 (s, CH-4), 80.7 (s, CH *sn*-2 glycerol), 77.1 (s, CH-5'), 74.7 (s, CH-3), 73.4 (s, CH-5), 73.3 (s, CH-3'), 72.7 (s, CH₂ α fatty chain), 72.5 (s, CH-2, CH-2'), 71.5 (s, CH₂ *sn*-1 glycerol, CH₂ *sn*-3 glycerol), 70.3 (s, CH-4'), 67.6 (s, CH₂ *sn*-3 glycerol), 62.5 (s, CH₂-6), 61.6 (s, CH₂-6'), 58.3 (s, OCH₃ glycerol), 33.1–23.7 (CH₃ acetyl), 14.5 (s, CH₃ fatty chain). HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for C₃₂H₆₂O₁₆P [M – Et₃N – 2H] 733.3781; found 733.3778.

Synthesis of 1-*O*-hexadecyl-2-*O*-methyl-*sn*-glycer-3-yl α-D-glucopyranosyl-(1 → 4)-α,β-D-glucopyranosylphosphate, triethylammonium salt (4b). Prepared by deprotection of **3b** (300 mg, 0.27 mmol) with K₂CO₃ (19 mg, 0.14 mmol) to give a white solid (220 mg, quantitative).

4b1: IR (ATR, cm⁻¹): 3310 (O–H), 2918–2851 (C–H), 1222 (P=O), 1055 (P–O). NMR ³¹P (161.970 MHz, CD₃OD): 0.03 (α anomer), 0.09 (β anomer) (α : β = 1 : 1). HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for C₃₂H₆₂O₁₆P [M – Et₃N – 2H] 733.3781; found 733.3780.

4b2: IR (ATR, cm⁻¹): 3307 (O–H), 2917–2850 (C–H), 1223 (P=O), 1052 (P–O). NMR ³¹P (161.970 MHz, CD₃OD): –1.91 (α anomer). ¹H (400.133 MHz, CD₃OD): 5.22 (m, 1H, H-1), 5.09 (m, 1H, H-1'), 3.21 (m, 19H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6', CH₂ *sn*-1 glycerol, CH₂ *sn*-3 glycerol, CH *sn*-2 glycerol, CH₂ α fatty chain), 3.20 (s, 3H, OCH₃ glycerol), 1.35 (m, 2H, CH₂ β fatty chain), 1.14 (m, 26H, 13CH₂ fatty chain), 0.69 (m, 3H, CH₃ fatty chain). ¹³C (75.480 MHz, CD₃OD): 102.5 (s, CH-1'), 95.9 (s, CH-1), 81.2 (s, CH-4), 80.3 (s, CH *sn*-2 glycerol), 76.8 (s, CH-5), 74.5–72.7 (CH), 72.5 (s, CH₂ α fatty chain), 71.0 (s, CH₂ *sn*-1 glycerol), 69.0 (s, CH₂ *sn*-3 glycerol), 65.5 (s, CH₂-6'), 62.3 (s, CH₂-6), 58.2 (s, OCH₃), 32.6–26.7 (CH₂ fatty chain), 14.3 (s, CH₃ fatty chain). HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for C₃₂H₆₂O₁₆P [M – Et₃N – 2H] 733.3781; found 733.3782.

Synthesis of 1-*O*-hexadecyl-2-*O*-methyl-*sn*-glycer-3-yl α-D-galactopyranosyl-(1 → 6)-α,β-D-glucopyranosylphosphate, triethylammonium salt (4c). Prepared by deprotection of **3c** (500 mg, 0.44 mmol) with K₂CO₃ (30 mg, 0.22 mmol) to give a white solid (300 mg, 82%). IR (ATR, cm⁻¹): 3293 (O–H), 2920–2851 (C–H), 1221 (P=O), 1053 (P–O). NMR ³¹P (161.970 MHz, D₂O): –1.32 (α anomer), –1.21 (β anomer) (α : β = 7 : 3). ¹H (400.133 MHz, D₂O): 5.35 (m, 1H, H-1), 3.70 (m, 19H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6', CH₂ *sn*-1 glycerol, CH₂ *sn*-3 glycerol, CH *sn*-2 glycerol, CH₂ α fatty chain), 3.35 (s, 3H, OCH₃ glycerol), 1.16 (m, 2H, CH₂ β fatty chain), 1.25 (m, 26H, 13CH₂ fatty chain), 0.80 (m, 3H, CH₃ fatty chain). ¹³C (75.480 MHz, CD₃OD): 99.7 (s, CH-1'), 95.9 (s, CH-1), 80.9 (s, CH-4), 80.8 (s, CH *sn*-2 glycerol), 77.7 (s, CH-5), 75.6–70.1 (CH), 72.4 (s, CH₂ α fatty chain), 71.5 (s, CH₂ *sn*-1 glycerol), 69.0 (s, CH₂ *sn*-3 glycerol), 65.9 (s, CH₂-6'), 62.6 (s, CH₂-6), 58.3 (s, OCH₃), 33.1–23.7 (CH₂ fatty chain), 14.4 (s, CH₃ fatty chain). HRMS (ESI-TOF): *m/z* calcd for C₃₂H₆₂O₁₆P [M – Et₃N – 2H] 733.3781; found 733.3778.

Cell culture

HEK293T cells were purchased from ATCC, maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium, supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Lonza, France), 1 mM pyruvate sodium (Sigma-Aldrich, France), and 1% non-essential amino acid (Sigma-Aldrich, France) and were grown in a humidified atmosphere at 37 °C (95% air, 5% CO₂). HEK293T cells were transduced with a lentiviral vector containing rat SK3 cDNA to obtain stable expression of homotetramer SK3 channels following the same protocol as previously described.²⁶

Patch-clamp experiments

Experiments were performed in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. The extracellular solution contained 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 0.33 mM NaH₂PO₄, 11.5 mM D-glucose. pH was adjusted to 7.4 with NaOH. The intracellular solutions contained 145 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM Mg-ATP, 0.87 mM CaCl₂, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES and pH was adjusted to 7.2 with KOH (pCa 6)."

Patch-clamp experiments were conducted using an Axopatch 200B patch-clamp amplifier (Axon Instrument, USA) and data, digitized with a 1322-A Digidata converter (Axon Instrument, USA), were stored in a computer using the software Clampex of pClamp 9.2 (Axon Instrument, USA). The patch-clamp data were analyzed using both Clampfit 9.2 and Origin 7.0 software (Microcal Inc., Northampton, MA, USA). The effects of tested compounds on HEK293T-SK3 cells were measured for 3 min using a ramp protocol from +100 mV to –100 mV with a holding potential of 0 mV (500 ms duration; 4 s intervals) to inactive endogenous potassium currents. Potassium SK3 currents were analysed at 0 mV to minimize chloride currents (*E*_{Cl⁻} = 0 mV).

In vitro cell viability and cell migration assay

Cell viability was determined using the tetrazolium salt reduction method (MTT) as previously described.²⁵ Briefly, cells were seeded onto 24-well plates at a density of 4 × 10⁴ cells per well

and measurements were performed in triplicate 48 h after implantation.

Cell migration assay was performed in 24-well plates with polyethylene terephthalate membrane cell culture inserts with a pore size of 8 μm (Becton Dickinson, France) coated with fibronectin from bovine plasma (1.6 $\mu\text{g cm}^{-2}$) (Sigma-Aldrich). Briefly, 8×10^4 cells were seeded into the upper compartment and the supplemented medium culture was added in the upper and lower compartments. When a compound was evaluated, it was added into both compartments. After 15 h, stationary cells were removed from the top side of the membrane, whereas migrated cells in the bottom side of the inserts were fixed, the nuclei were stained with DAPI (Sigma-Aldrich) and then counted. Three independent experiments were performed in parallel and these were done in triplicate.

Conclusion

In this paper we reported the synthesis of a family of Glyco-Phospho-Glycerol Ether lipids (GPGEL). The structure of this series of compounds was inspired from the structure of **Ohline** that we recently identified as an efficient inhibitor of SK3 channel activity, this channel being directly involved in SK3-dependent cell migration and metastasis formation.²⁹ With this new family of compounds, a phosphate functional group is incorporated between the disaccharide unit and the glycerol moiety. Accordingly, the solubility of this series of compounds, as illustrated with compound **4a**, is improved. The phosphate functional group is placed at the anomeric position of a selected disaccharide. Compounds **4a–c** were isolated either as a mixture of anomers (the anomeric position where the phosphate group is attached) or as a pure anomeric form for one compound (compound **4b2**). The inhibitory effect of this series of compounds on SK3 channel activity was first evaluated by the patch-clamp technique. It was found that all the tested compounds were able to inhibit the SK3 current with a similar efficacy. These results point out that 1 – the structure of the disaccharide has a very limited effect on the SK3 inhibition process, 2 – the presence of the anionic phosphate group does not alter the SK3 channel inhibition capacity and 3 – the stereochemistry of the anomeric position linked to the phosphate group has no significant effect on the inhibition process. Based on these promising results, the SK3-dependent cell migration was measured and all these compounds were found to have a similar efficacy to reduce cell migration at a low concentration (100 nM).

The present study enriches, with a new series of compounds, our previous works that have shown that glycerol-based amphiphiles were able to inhibit potassium current carried by SK3 channels and therefore to reduce cell migration mediated by the SK3 channel in cancer cells. Currently, further studies are dedicated to elucidate the mechanism of action of these series of compounds which is likely not a pore-blocker mechanism.

Acknowledgements

This work was funded by 'Agence National de la Recherche no. ANR-08-EBIO-020-01', 'Ligue contre le Cancer', 'CNRS', Cancéropole Grand Ouest and FEDER (Fond européen de développement régional). We thank the 'Services Communs' of

the University of Brest and 'Région Centre' and 'Région Bretagne'.

Notes and references

- C. D. Magnusson and G. G. Haraldsson, *Chem. Phys. Lipids*, 2011, **164**, 315–340.
- B. Z. Ngwenya and D. M. Foster, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1991, **196**, 69–75.
- F. Pedrono, B. Martin, C. Leduc, J. Le Lan, B. Saiag, P. Legrand, J. P. Moulinoux and A. B. Legrand, *Nutr. Cancer*, 2004, **48**, 64–69.
- M. P. Haynes, H. R. Buckley, M. L. Higgins and R. A. Pieringer, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1994, **38**, 1523–1529.
- J. L. Hammond, D. L. Koontz, H. Z. Bazmi, J. R. Beadle, S. E. Hostetler, G. D. Kini, K. A. Aldern, D. D. Richman, K. Y. Hostetler and J. W. Mellors, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, **45**, 1621–1628.
- E. A. Homan, Y.-G. Kim, J. P. Cardia and A. Saghatelian, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 5178–5181.
- J. Graessler, D. Schudke, P. E. H. Schwarz, R. Herzog, A. Shevchenko and S. R. Bornstein, *PLoS One*, 2009, **4**(e6261), 1–13.
- S. J. Friedberg and M. Halpert, *J. Lipid Res.*, 1978, **19**, 57–64.
- A. L. Deniau, P. Mosset, D. Le Bot and A. B. Legrand, *Biochimie*, 2011, **93**, 1–3.
- E. Skopinska-Rozewska, M. Krotkiewski, E. Sommer, E. Rogala, M. Filewska, B. Bialas-Chromiec, K. Pastewka and H. Skurzak, *Oncol. Rep.*, 1999, **6**, 1341–1343.
- (a) R. Andreesen, *Prog. Biochem. Pharmacol.*, 1988, **22**, 118–131; (b) M. Lohmeyer and R. Bittman, *Drugs Future*, 1994, **19**, 1021–1037; (c) W. J. Houlihan, M. Lohmeyer, P. Workman and S. H. Cheon, *Med. Res. Rev.*, 1995, **15**, 157–223.
- (a) W. R. Vogler, J. Liu, O. Volpert, E. W. Ades and N. Bouck, *Cancer Invest.*, 1998, **16**, 549–553; (b) F. J. Candal, D. C. Bosse, W. R. Vogler and E. W. Ades, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1994, **34**, 175–178.
- T. Oskarsson, P. Nagorny, I. J. Krauss, L. Perez, M. Mandal, G. Yang, O. Ouerfelli, D. Xiao, M. A. Moore, J. Massague and S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 3224–3228.
- (a) K. Lirdprapamongkol, J. P. Kramb, T. Suthiphongchai, R. Surarit, C. Srisomsap, G. Dannhardt and J. Svasti, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 3055–3063; (b) F. Calvo, L. Agudo-Ibanez and P. Crespo, *BioEssays*, 2010, **32**, 412–421.
- D. Meitar, S. E. Crawford, A. W. Rademaker and S. L. Cohn, *J. Clin. Oncol.*, 1996, **14**, 405–414.
- (a) J. L. Marshall, S. Baidas, P. Bhargava and N. Rizvi, *IDrugs*, 2000, **3**, 518–524; (b) M. Egeblad and Z. Werb, *Nat. Rev. Cancer*, 2002, **2**, 161–174.
- G. Sala, F. Dituri, C. Raimondi, S. Previdi, T. Maffucci, M. Mazzeletti, C. Rossi, M. Iezzi, R. Lattanzio, M. Piantelli, S. Iacobelli, M. Brogini and M. Falasca, *Cancer Res.*, 2008, **68**, 10187–10196.
- A. Hoffman, B. Qadri, J. Frant, Y. Katz, S. R. Bhusare, E. Breuer, R. Hadar and R. Reich, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 1406–1414.
- (a) G. A. Storme, W. E. Berdel, W. J. van Blitterswijk, E. A. Bruyneel, G. K. De Bruyne and M. M. Mareel, *Cancer Res.*, 1985, **45**, 351–357; (b) D. C. Schallier, E. A. Bruyneel, G. A. Storme, P. Hilgard and M. M. Mareel, *Anticancer Res.*, 1991, **11**, 1285–1292.
- H. K. Haugland, S. J. Nygaard and O. B. Tysnes, *Anticancer Res.*, 1999, **19**, 149–156.
- M. Potier, A. Chantôme, V. Joulin, A. Girault, S. Roger, P. Besson, M. Jourdan, J. Y. LeGuennec, P. Bougnoux and C. Vandier, *Br. J. Pharmacol.*, 2011, **162**, 464–479.
- A. Fischer, D. Müller, M. Zimmermann-Kordmann, B. Kleuser, M. Mickleit, S. Laabs, W. Löwe, F. Cantagrel, W. Reutter and K. Danker, *ChemBioChem*, 2006, **7**, 441–449.
- G. Semini, A. Hildmann, H. U. Reissing, W. Reutter and K. Danker, *Biochem. Pharmacol.*, 2011, **81**, 985–995.
- A. Girault, J. P. Haelters, M. Potier-Cartreau, A. Chantome, P. A. Jaffrès, P. Bougnoux, V. Joulin and C. Vandier, *Curr. Med. Chem.*, 2012, **19**, 697–713.
- M. Potier, V. Joulin, S. Roger, P. Besson, M. L. Jourdan, J. Y. Leguennec, P. Bougnoux and C. Vandier, *Mol. Cancer Ther.*, 2006, **5**, 2946–2953.

- 26 A. Chantome, A. Girault, M. Potier, C. Collin, P. Vaudin, J. C. Pages, C. Vandier and V. Joulin, *Exp. Cell Res.*, 2009, **315**, 3620–3630.
- 27 (a) M. J. Coghlan, W. A. Carroll and M. Gopalakrishnan, *J. Med. Chem.*, 2001, **44**, 1627–1653; (b) H. Wulff, A. Kolski-Andreaco, A. Sankaranarayanan, J. M. Sabatier and V. Shakkottai, *Curr. Med. Chem.*, 2007, **14**, 1437–1457; (c) H. Wulff and B. S. Zhorov, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 1744–1773.
- 28 W. E. Berdel, U. Fink and J. Rastetter, *Lipids*, 1987, **22**, 967–969.
- 29 A. Girault, J. P. Haelters, M. Potier, A. Chantôme, M. Pineau, S. Marionneau-Lambot, T. Oullier, G. Simon, H. Couthon-Gourvès, P. A. Jaffrès, V. Joulin, B. Corbel, P. Bougnoux and C. Vandier, *Curr. Cancer Drug Targets*, 2011, **11**, 1111–1125.
- 30 S. Chittaboina, B. Hodges and Q. Wang, *Lett. Org. Chem.*, 2006, **3**, 35–38.
- 31 (a) A. J. Ross, I. A. Ivanova, M. A. J. Ferguson and A. V. Nikolaev, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2001, 72–81; (b) A. V. Nikolaev, I. V. Botvinko and A. J. Ross, *Carbohydr. Res.*, 2007, **342**, 297–344; (c) T. J. Martin, G. Dufner, B. Kratzer and R. R. Schmidt, *Glycoconjugate J.*, 1996, **13**, 547–553.
- 32 J. J. Plattner, R. D. Gless and H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, **94**, 8613–8615.

DiGalactosyl-Glycero-Ether Lipid: synthetic approaches and evaluation as SK3 channel inhibitor.

Charlotte M. Sevrain,^a Jean-Pierre Haelters,^{*a} Aurélie Chantôme,^b Hélène Couthon-Gourvès,^a Maxime Gueguinou,^b Marie Potier-Cartreau,^b Christophe Vandier^{*b} and Paul-Alain Jaffrès^{*a}

⁵ Received (in XXX, XXX) Xth XXXXXXXXX 200X, Accepted Xth XXXXXXXXX 200X

First published on the web Xth XXXXXXXXX 200X

DOI: 10.1039/b000000x

The recent discoveries of the involvement of SK3 channel in some cell motility mechanisms occurring in cancer disease have opened the way to the synthesis of inhibitors that could reduce metastasis formation. On the basis of our recent previous works showing that both lactose-glycero-ether lipid (**Ohmline**) and some phosphate analogues (**GPGEL**) were efficient compounds to modulate SK3 channel activity, the present study, which found its inspiration in the structure of the natural glycolipid digalactosyldiacylglycerol (DGDG), reports the incorporation of a digalactosyl moiety (α -galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -galactopyranosyl-) as polar head of a glycono ether lipid. For the construction of the digalactosyl fragment, two synthetic approaches were compared. The standard strategy which is based on the use of benzyl protecting group to produce 1 \rightarrow 6 disaccharide unit, was compared with a second method that made use of trimethylsilyl moiety as protecting group. This second strategy, which is applied for the first time to the synthesis of (1 \rightarrow 6)-di-saccharide unit, presents a net advantage in term of efficacy (reduction of the number of steps) and cost. Finally, compound **16** which is characterized by a (1 \rightarrow 6) DiGalactosyl unit (DG) as polar head of the amphiphilic structure, was tested as modulator of the SK3 channel activity. Patch-clamp experiments have shown that compound **16** reduced SK3 currents (-28.2 ± 2.0 % at 5 μ M) and, cell migration assays performed at 300 nM, have shown a reduction of cells migration (SK3+ HEK293T) by 19.6 ± 2.7 %.

25

1-Introduction

Most of the cancer chemotherapy approaches aims to reduce primary tumour growing. Beside the actions on tumor growth, the limitation of metastasis formation and cancerous cell spreading constitute a complementary therapeutic goal.¹ Many cell targets have been explored to develop anti-cancer agents² and more recently, it was shown that some ion channels were also involved in cancer spreading, and can be view as new targets.³ Some of us have demonstrated that SK3 channel (belonging to small conductance calcium-activated K⁺ channels family, SKCa) was a key actor of cell migration associated with some types of cancers.⁴ Moreover, the expression of this channel was found in several cancer cell lines known for their high metastatic potential.⁴ Interestingly, the inhibition of this channel by apamin (peptide consisting of 18-amino acid units), reduced cell migration in the course of *in vitro* assays.⁵ However, apamin which is able to block SKCa channels without any selectivity and which is a neurotoxic is therefore not relevant for *in vivo* studies. Many heterocyclic compounds have been identified as SKCa

channel inhibitors and used for *in vitro* assays.⁴ Beside the studies dedicated to heterocyclic compounds, we found that amphiphilic compounds like edelfosine (figure 1) was also able to modulate the activity of SKCa channels and more specifically SK3 channel.⁶ However, the toxicity of edelfosine limited its use for *in vivo* applications.

In very recent works, we have synthesized and shown that the replacement of the polar head of edelfosine by a saccharide or disaccharide unit produced very efficient SK3 channel inhibitors.⁷ As a consequence of this inhibition, cell migration was reduced *in vitro*. **Ohmline**, which is one of the more efficient and non-toxic compound in this series of glyco-ether lipids, was characterized by a polar head formed by a lactose unit (figure 1). More interestingly, this compound demonstrated its strong *in vivo* potential since its administration (systemic administration) lead to an improvement of the metastatic profile in a murine breast cancer model.⁷ These results, that demonstrated the interest to modulate SK3 channel activity to reduce metastasis formation, opened the way to the design and the evaluation of new structures. Toxicity of the new SK3 modulators constitutes another feature that must be considered with a great attention in order to select compounds having suitable properties for *in vivo* studies. In this way we have very recently reported a first modification of **Ohmline** by the introduction of a phosphate functional group that was placed between the saccharide and

^a Université de Brest, UEB, CEMCA, CNRS UMR 6521, SFR ScnBIOs, 6 Avenue Le Gorgeu, 29238 Brest, France. e-mail : jean-pierre.haelters@univ-brest.fr, pjaffres@univ-brest.fr

^b Inserm, U1069, Tours, F-37032 France ; Université François Rabelais, Tours, F-37032 France. E-mail: christophe.vandier@univ-tours.fr

the Glycero-Ether-Lipid moiety (figure 1) thus defining a new series of compounds labelled as Glyco-phospho-glycero Ether Lipids (GPGEL).⁸ This series of compounds was also efficient to reduce SK3 channel activity without any noticeable toxicity. These results point out those structural modifications of the polar head were possible without affecting SK3 inhibition. By a careful study of the wide structural diversity of natural glyco-lipids, our attention was focused on digalactosyldiacylglycerol (DGDG) (figure 1); this type of natural glycol-lipids being present in both prokaryotic and eukaryotic cells. It was reported that some plants (e.g. oat) can substitute phosphocholine-based glycerolipides by DGDG as a consequence of phosphate deprivation.⁹ These results suggest that (1→6) DiGalactosyl group (DG) could replace the phosphocholine moiety to produce glycerolipids having similar physiological function.¹⁰ On the basis of the hypothesis that the phosphocholine moiety (also present in the structure of edelfosine) can be replaced by a (1→6) digalactosyl fragment, we report herein, the synthesis of one ether lipid possessing a digalactosyl unit thus defining the polar head region. Following a biomimetic approach, the configuration of the anomeric position of the digalactosyl unit in the new ether lipid was controlled and similar to those present in DGDG (α -galactopyranosyl-(1→6)- β -galactopyranosyl-).¹¹ One important part of this study was dedicated to the comparison of two synthetic approaches used to synthesis the digalactosyl unit. Finally, the capacity of compound **16** to modulate SK3 channel activity is reported jointly with migration assays and toxicity measurements.

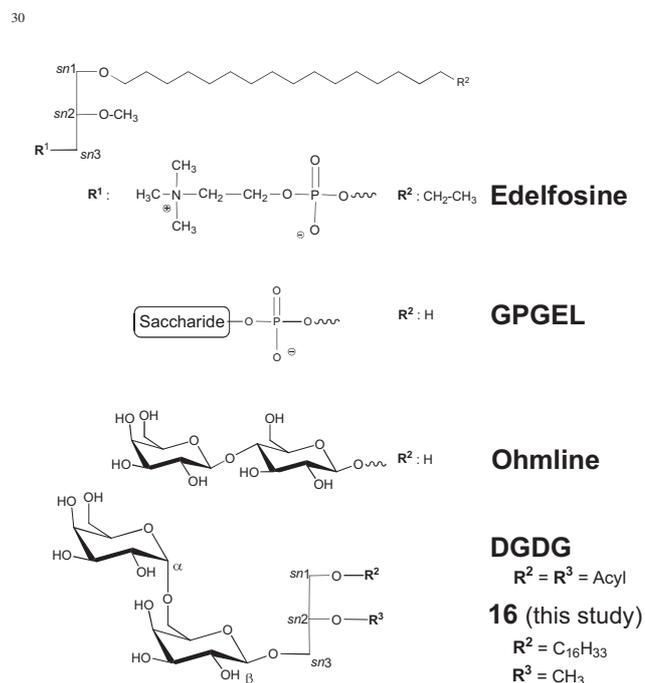


Fig. 1 Chemical structure of edelfosine, ohmline, Glyco-Phospho-Glycero-Ether Lipid (GPGEL) and DiGalactosylDiacylGlycerol (DGDG).

2- Results and discussion

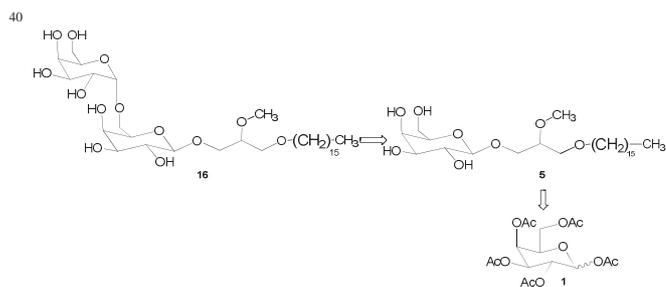


Figure 2 Retrosynthetic scheme for the synthesis of DiGalactosyl-Glycero-Ether Lipid **16** from galactosepentaacetate.

The general retrosynthetic scheme to produce the targeting compounds **16** that possess a polar head formed by a 1→6 connected disaccharide (digalactosyl) unit is based on the glycosylation reaction of compound **5** with a galactosyl derivative correctly protected. The synthesis of compound **5** can be easily achieved in 4 steps from galactosepentaacetate **1** (see figure S1). For the glycosylation reaction of compound **5**, the choice of orthogonal protecting groups (benzyl / trityl) constitute the classical synthetic strategy that permit a selective deprotection of the hydroxy group in position 6 of the galactose unit present in compound **5**. This strategy was previously reported for the construction of 1→6 connected disaccharide derivatives.¹² Herein, we have also tested a second strategy that was initially proposed for the synthesis of α -galactosylceramides¹³ and that made use of trimethylsilyl moiety as protecting group: one first advantage of such a strategy for the synthesis of disaccharide unit being the number of synthetic steps which is reduced when compared to the first approach. According to the first strategy (benzyl/trityl protecting groups),¹⁴ the hydroxyl group in position 6 of the galactosyl motif was first protected with a trityl moiety to produce **6** (figure 3 – part A). The three remaining hydroxyl groups were then protected with a benzyl motif to produce the intermediate **7**. This compound was then selectively deprotected in position 6¹⁵ thus affording the intermediate **8** that was subsequently (see below) engaged in the glycosylation reaction. Compound **8** was therefore synthesized from **5** in 50 % yield. According to the second strategy (trimethylsilyl as protecting group), the free hydroxyl groups of the glyco-lipid **5** were silylated¹⁶ to produce **9** (figure 3 – part B). Then the protected primary alcohol was selectively deprotected by reaction with acetic acid¹⁷ giving rise to compound **10** in two steps from **5** (49 % yield for two steps).

For the next step (glycosylation reaction), the second saccharid unit (in our case a galactopyranosyl fragment) must be previously protected with the adapted protecting groups. Moreover these protecting groups must be compatible with the activation of the anomeric position that will be used to produce α -glycosilation. First, a combination of benzyl and

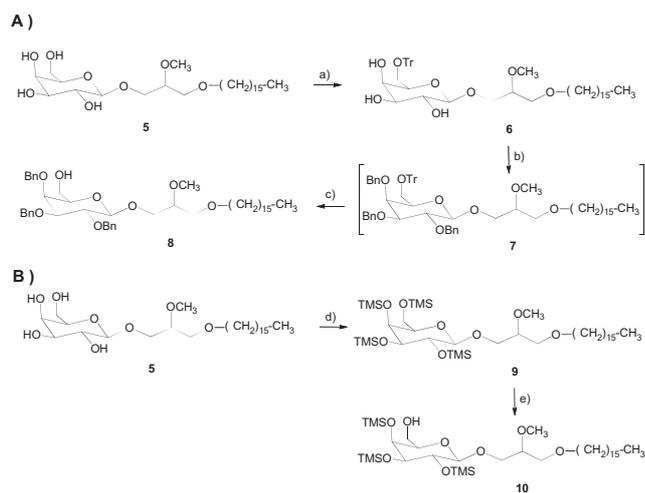


Figure 3 Synthesis of the two intermediates **8** and **10** that make use of two different kinds of protecting groups. **A-** Trityl and benzyl protecting groups: a) TrCl, DABCO, dry CH_2Cl_2 , 3 hours, R.T. 74% b) NaH, BnBr, dry DMF, 15 hours, R.T. c) APTS, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20 hours, R.T., 67% (two steps) **B-** Trimethylsilyl (TMS) as protecting group: d) TMSCl, Et_3N , dry DMF 92 % e) $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$, Acetone/MeOH, 48 hours, R.T., 53%.

acetyl protecting groups was selected (Figure 4 – Part A). According to this synthetic scheme, the galactosyl compound **12**, protected in position 1 and 6 with an acetyl moiety and a benzyl group at positions 2, 3 and 4, was prepared in two steps (56 % yield)¹⁸ from the quite expensive commercial compound **11** (1-O-methyl α -D-galactopyranoside). Then, the anomeric position was converted in the α -iodide derivative **13** which is, as previously reported^{19,13c}, suitable for α -glycosylation. The glycosylation reaction involving **13** and the glyco-glycero-lipid **8** was achieved in 65 % yield. The protected disaccharide **14** was then deprotected in two steps. First the acetyl group present in position 6 of the terminal galactosyl fragment was removed in 47 % yield followed by the debenzoylation of the remaining protected hydroxyl groups. This debenzoylation step required large amount of catalyst (Pd/C) to get completion of the reaction. After purification compound **16** was isolated in 56% yield. A second strategy based on the use of trimethylsilyl as protecting group was investigated. This second strategy that was recently employed for the synthesis of monosaccharide derivatives^{Erreur ! Signet non défini.} was, to the best of our knowledge, never applied to the synthesis of disaccharides compounds. This sequence starts from galactose **17** (figure 4 – part B). Of note, this starting material is much cheaper than 1-O-methyl α -D-galactopyranoside **11** (compound **11** is almost 10 times more expensive than galactose **17**) used in the first synthetic approach. The per-silylation reaction of galactose **17** produced compound **18** in excellent yield (92%). Then, the deprotection of the anomeric position and its one pot transformation in α -iodide derivative was achieved as reported by Gervay-Hague et al.^{19,13} Then, compound **19** was isolated in good yield (72 %, two steps) after a glycosylation reaction with the

previously prepared

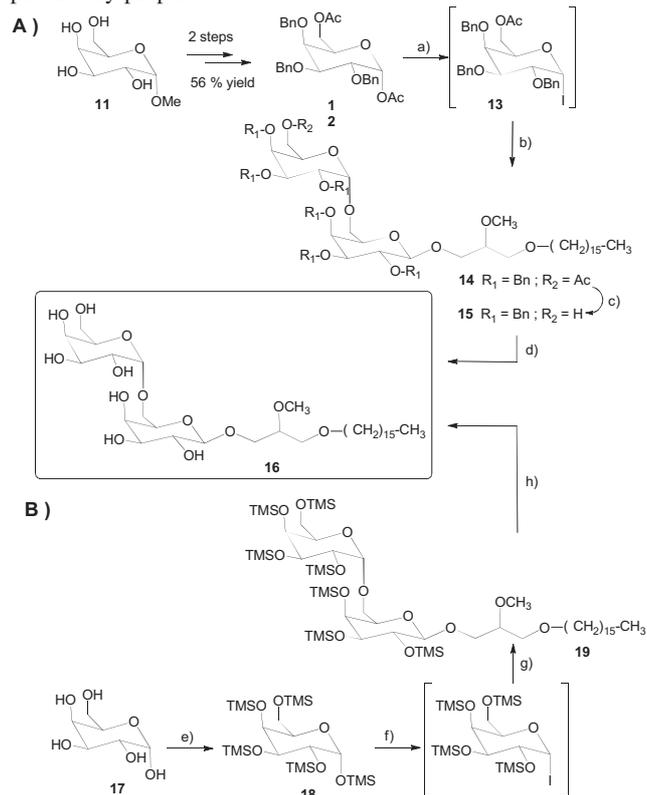


Figure 4 Final steps for the synthesis of **16** following two different synthetic schemes. **A-** strategy with benzyl and acetyl as protecting groups. a) TMSI, dry CH_2Cl_2 , 30 min., 0°C b) compound **8**, DIPEA, TBAI, dry benzene, 3 hours, reflux, 65% (two steps) c) K_2CO_3 , MeOH, 2 hours, 20°C, 47% d) Pd/C, MeOH, 20 bars H_2 , 48 hours, 20°C 56 %. **B-** Strategy with trimethylsilyl (TMS) as protecting group. e) TMSCl, Et_3N , dry DMF 92 % f) TMSI, dry CH_2Cl_2 , 2 hours, 0°C then g) compound **10**, DIPEA, TBAI, CH_2Cl_2 anh., 36 hours, 20°C, 72% (two steps); h) Dowex 50X8 H, MeOH, 4 hours, 20°C, 77 %.

TMS-protected mono-saccharide **10**. Finally, the deprotection of the alcohol functional groups occurred in only one step to produce compound **16** after reaction with Dowex 50WX8-200[®] ion exchange resin (77 % yield). Accordingly 101 mg of compound **16** were isolated and fully characterized (see experimental section). The two synthetic schemes shown on figure 4 allow producing the expected compound **16**. According to this first strategy 29 mg of compound **16** were isolated in 8 steps (figure 3 and 4) from **5** and **11** and with a global yield of 5 %. On the other hand, the second strategy (figure 3 and 4 part B) required a reduced number of steps (5 instead 8) and with a higher global yield (25 %). Moreover this second way was economically advantageous since galactose **17** is definitively cheaper than methyl α -D-galactopyranoside **11**.

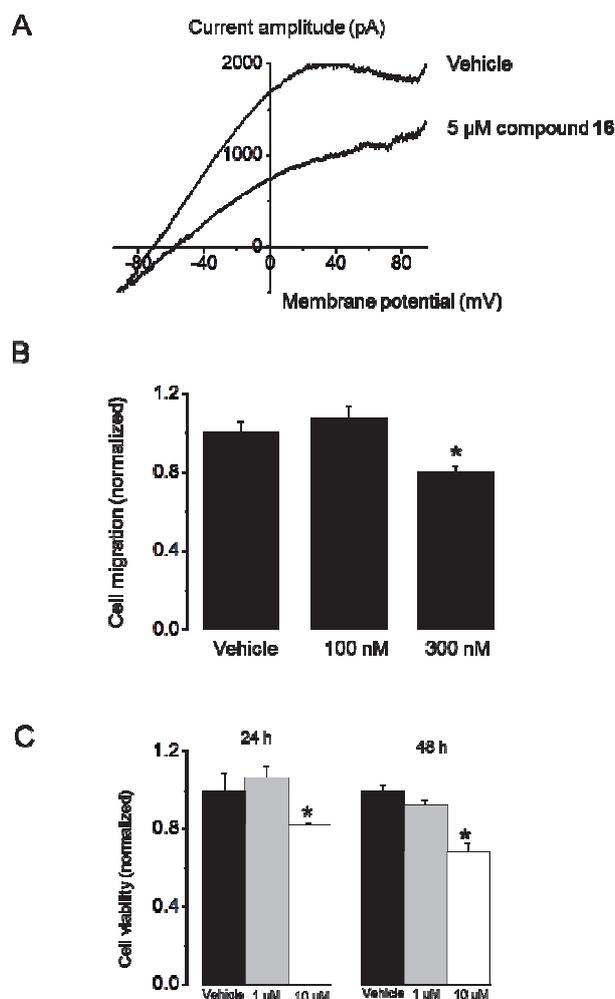


Figure 5 Compound **16** inhibited SK3 currents and SK3-dependent cell migration. (A) Typical example of whole cell K⁺ currents recorded in HEK293 T cells expressing recombinant SK3 channels before (vehicle: 0.6% ethanol/0.4% DMSO) and after application of 5 μ M compound **16** for 4 min. Currents were generated by ramp protocol from +95 mV to -95 mV in 500 ms from a holding potential of 0 mV. (B) Histograms showing the effect of 100 and 300 nM compound **16** on the cell migration of HEK293T cells expressing recombinant SK3 channel. The normalized cell number corresponds to the ratio of the total number of migrating cells in the presence of compound **16** (100, 300 nM) to the total number of migrating cells in the presence of vehicle. (C) Cell viability of compounds **16** determined with the tetrazolium salt reduction method (MTT). HEK293T cells expressing recombinant SK3 channel were either treated with vehicle or compound **16** (1 and 10 μ M) for 24h or 48h. Results from three independent experiments performed in triplicate are expressed as mean \pm S.E.M.* Significantly different from vehicle application at $p < 0.05$.

Next, compound **16** was tested as SK3 channel inhibitor on HEK293T cells expressing homotetramer SK3 channels, HEK293T-SK3 cells. We evaluated the inhibitory effect of

compound **16** on whole cell SK3 current using patch-clamp technique (figure 5A). It must be noted that testing the compounds at 5-10 μ M on SK3 channel permitted a fast and robust pre-selection of effective SK3-channel inhibitors that were then tested, at lower concentration (see below), to reduce SK3-dependent cancer cell migration. The effect of compound **16** on the amplitude of SK3 current was measured at 0 mV (the current is only carried by SK3 channels under these conditions) 2-4 min. after application of compound. Currents generated before and after application of molecules using ramp protocol from +95 mV to -95 mV are illustrated in Figure 5. Compounds **16**, at a concentration of 5 μ M, decreased the amplitude of SK3 current to 28.2 ± 2.0 % of inhibition ($n=5$). This value is lower to the inhibitory capacity of 10 μ M Ohmline, -73 % and close to that observed with 1 μ M Ohmline. Based on these results indicating that compound **16** is able to inhibit SK3 channel activity as does Ohmline, the next experiments were dedicated to evaluate the capacity of this molecule to inhibit SK3-dependent cell migration; this type of migration being clearly implicated in cancer cell spreading. If a 15 h treatment with 100 nM compound **16** has no effect on cell migration, increasing the concentration to 300 nM significantly inhibited cell migration of HEK293T-SK3 (figure 5B; reduction of 19.6 ± 2.7 %). The capacity of compound **16** to reduce SK3-dependent cell migration was lower than that observed with Ohmline (close to 50 % with 100 nM Ohmline). Finally, the toxicity of the compound **16** was evaluated following MTT assays at 1 and 10 μ M during 24 h and 48 h. As reported in figure 5C, compound **16** shows only a noticeable level of toxicity at 10 μ M demonstrating that it exhibited no toxicity at 5 μ M nor at 300 nM, the concentrations used in patch-clamp experiments and cell migration assays. These results, invite to some conclusions. First, this study clearly shows, once more, the consistency between the patch-clamp experiments and the SK3-dependent migration assays. Herein, the SK3 current reduction of 28.2 ± 2.0 % (patch-clamp) is correlated to a decrease of cell migration by 19.6 ± 2.7 %. Second, the decrease of SK3 current with compound **16** is less important than with Ohmline. This difference is likely explained by the (1 \rightarrow 6)-glycosidic link (compound **16**) where a (1 \rightarrow 4) connection is present for Ohmline and/or to the different anomeric configuration of the terminal saccharid unit (α in the case of compound **16** and β in the case of Ohmline).

3-Conclusion

The naturally occurring digalactosyldiacylglycerol (DGDG) is characterized by a (α -galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -galactopyranosyl-) as polar head. Previous studies have shown that this polar moiety can replace phosphocholine polar head in some plant submitted to phosphorus deprivation. Previously we have shown that edelfosine (a phosphocholine-based ether lipid) and edelfosine's analogues like Ohmline and Glyco-Phospho-Glycero-Ether Lipids (GPGE) were efficient inhibitors of SK3 channel activity. Following a hypothesis based on biomimetic approach, we report the incorporation of the digalactosyl unit present in DGDG in the

structure of ether lipid. To achieve this goal two synthetic strategies were explored. The first one, was based on the use of benzyl motif as protecting group. Following this classical strategy, the expected DiGalactosyl-Glycero-Ether Lipid was isolated but in a modest yield and a modest quantity. The second strategy based on the use of trimethylsilyl as protecting group was applied for the first time to produce disaccharide units. This new method is more efficient since the final compound **16** was isolated in better yield (25 %; 5 steps) starting from a cheaper starting material (galactose).

The inhibitory effect of compound **16** on SK3 channel activity was first evaluated by patch-clamp technique. It was found that this compound was able to inhibited SK3 current albeit to a lower extant than **Ohmlin**. These results point out that the structure of the disaccharide directly impact the SK3 inhibition process. Based on this inhibition effect of SK3 current, the SK3-dependent cell migration was measured and this compound was found to reduce cell migration as expected by an inhibitor of SK3 channel activity. Since the inhibitory capacity of compound **16** on SK3 channel was lower than that observe for **Ohmlin** it was not surprising to found a same lower capacity to reduce SK3-dependent cell migration. In addition to methodologic aspects, this study points out the importance of the glycosidic link of the disaccharide group incorporated in the glycerol-ether-lipid (1→6 *versus* 1→4 and α *versus* β glycosidic bond) on the SK3-dependent cell migration. The synthesis of other disaccharid-based glycerol-ether-lipids (current work) will be achieve with the aim to further study the consequence of the glycosidic link on SK3-dependent cell migration.

4- Experimental

4-1 General

Solvents were dried with a solvent purification system MBraun-SPS (Methanol, CH₂Cl₂, DMF) or freshly distilled on appropriate driers. All compounds were fully characterized by ¹H (500.13 or 400.133 or 300.135 MHz), ¹³C (125.773 or 75.480 MHz) NMR spectroscopy (Bruker AC 300, Avance DRX 400 and Avance DRX 500 spectrometers). Coupling constants J are given in Hertz. The following abbreviations were used: s for singlet, d doublet, t triplet, q quadruplet, qt quintuplet, m for multiplet and dt for doublet of triplets. When needed, ¹³C heteronuclear HMQC and HMBC were used to unambiguously establish molecular structures. Mass spectroscopy analyses were performed by the "Service commun de spectrometrie de masse" (Brest) on a Bruker Autoflex MALDI TOF-TOF III LRF200 CID. Fourier Transform Infra-Red (FTIR) spectra were recorded on a Bruker Vertex 70 FT-IR (ATR) spectrometer. Commercial compounds were used as received except DIPEA which was distilled over KOH and TMSI which was distilled over CaCl₂. Optical rotation were measured on a Jasco P-1010 polarimeter using a 100 mm cell.

4-2 Synthesis of 3-(hexadecyloxy)-2-methoxypropyl-6-O-trityl-β-D-galactopyranoside **6**

To a stirred solution of **5** (1.0 g, 2.03 mmol) in dry CH₂Cl₂ (10 mL) was added tritylchloride (1.4 g, 5.07 mmol) and

DABCO (569 mg, 5.07 mmol). The mixture was stirred 2 hours at room temperature, filtered on Celite and concentrated. The crude product was purified by chromatography on silica gel (ethyl acetate) and the pure compound was obtained as colorless oil (74 %). *R_f* (ethyl acetate/petroleum ether: 2/1): 0.27. ¹H NMR (300.131 MHz, CDCl₃): 0.88 (3H, t, ³J_{HH}=7.5, CH₃); 1.24-1.40 (26H, m, CH₂ fatty chain); 1.51-1.60 (2H, m, CH₂ β fatty chain); 3.34-3.71 (14H, m, CH₂ α fatty chain + OCH₃ + CH₂ sn-1 + CH₂ sn-3 + CH sn-2 + H₃ + H₅ + H₆); 3.93-4.02 (2H, m, H₂ + H₄); 4.21-4.25 (1H, m, H₁); 7.20-7.44 (15H, m, CH (Ph)). ¹³C NMR (75.475 MHz, CDCl₃): 14.1 (CH₃ fatty chain); 22.7(CH₂ fatty chain); 26.1 (CH₂ fatty chain); 29.4 (CH₂ fatty chain); 29.5 (CH₂ fatty chain); 29.7 (CH₂ fatty chain); 31.9 (CH₂ fatty chain); 57.9 (OCH₃); 62.6 (C₆); 69.0 (C₄); 69.2 (CH₂ sn-3); 70.2 (CH₂ sn-1); 71.7 (C₂); 71.9 (CH₂ α fatty chain); 73.6 (C₃); 73.8 (C₅); 79.3 (CH sn-2); 86.9 (O-C-(Ph)₃); 103.7 (C₁); 127.1 (CH_{para}); 127.9 (CH_{meta}); 128.7 (CH_{ortho}); 143.7 (C_{ipso})

4-3 Synthesis of 3-(hexadecyloxy)-2-methoxypropyl-2,3,4-tri-O-benzyl-β-D-galactopyranoside **8**

To a stirred solution of **6** (1.0 g, 1.50 mmol) in dry DMF (20 mL) was added NaH (162 mg, 6.73 mmol). The mixture was stirred 2 hours at room temperature and then cooled to 0°C. Benzyl bromide (0.81 mL, 6.73 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred 15 hours at room temperature. Excess of NaH was neutralized by addition of few mL of MeOH. The solution was diluted with Et₂O (30 mL) and washed with water (15 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated to give the compound **7**. The product was dissolved in CH₂Cl₂/MeOH (1/2) (30 mL) and p-toluenesulfonic acid (36 mg, 0.21 mmol) was added. The mixture was stirred 20 hours at room temperature and then concentrated. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ (30 mL) and washed twice with water (10 mL), then with an aqueous 10 % sodium carbonate solution (10 mL) and finally with Brine (10 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The crude product was purified by chromatography on silica gel (ethyl acetate/petroleum ether: 1/2) and the pure compound was obtained as a white powder (67 %). *R_f* (ethyl acetate/petroleum ether: 1/5): 0.21. ¹H NMR (400.012 MHz, CDCl₃): 0.89 (3H, t, ³J_{HH}=7.0, CH₃); 1.22-1.32 (26H, m, CH₂ fatty chain); 1.53-1.56 (2H, m, CH₂ β fatty chain); 3.36-3.42 (3H, m, CH₂ α fatty chain + H₅); 3.42 (3H, s, OCH₃); 3.44-3.67 (6H, m, H_a-CH sn-1 + CH₂ sn-3 + CH sn-2 + H₃ + H_{6a}); 3.75-3.79 (2H, m, H₄ + H_{6b}); 3.83-3.87 (1H, m, H₂); 3.97-4.10 (1H, m, H_b-CH sn-1); 4.39 (1H, t, ³J_{HH}=7.5, H₁); 4.65-4.98 (6H, m, CH₂-Ph); 7.29-7.38 (15H, m, CH (Ph)). ¹³C NMR (100.592 MHz, CDCl₃): 14.2 (CH₃ fatty chain); 22.7 (CH₂ fatty chain); 26.1 (CH₂ fatty chain); 29.4 (CH₂ fatty chain); 29.5 (CH₂ fatty chain); 29.7 (CH₂ fatty chain); 32.0 (CH₂ fatty chain); 58.0 (OCH₃); 62.1 (C₆); 68.7 (CH₂ sn-3); 70.3 (CH₂ sn-1); 71.8 (CH₂ α fatty chain); 73.0 (C₄); 73.5 (CH₂-Ph); 74.2 (CH₂-Ph); 74.7 (C₅); 75.1 (CH₂-Ph); 79.3 (C₂); 79.6 (CH sn-2); 82.3 (C₃); 104.4 (C₁); 127.4 (CH (Ph)); 127.9 (CH (Ph)); 128.5 (CH (Ph)); 129.1 (CH (Ph)); 138.3 (C_{ipso} (Ph)); 138.5 (C_{ipso} (Ph)); 138.7 (C_{ipso} (Ph)); 138.8 (C_{ipso} (Ph))

4-4 Synthesis of 3-(hexadecyloxy)-2-methoxypropyl-2,3,4,6-tetrakis-*O*-(trimethylsilyl)- α -D-galactopyranoside 9

To a stirred solution of the compound **5** (1.0 g, 2.0 mmol) and Et₃N (1.0 g, 10.0 mmol) in dry DMF (10 mL) cooled at 0°C was added TMSCl (1.1 g, 10.0 mmol) dropwise. The mixture was stirred at room temperature overnight. Et₂O (40 mL) was added and the solution was paid on ice. The aqueous layer was extracted twice with Et₂O (20 mL). The organic layer was washed with ice-water (10 mL) and with brine (10 mL), dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The expected product was obtained as colorless oil (92%). *Rf* (ethyl acetate/petroleum ether: 1/5): 0.42. ¹H NMR (400.012 MHz, CDCl₃): 0.10-0.15 (36H, m, CH₃ (OTMS)); 0.87 (3H, t, ³J_{HH}=6.8, CH₃); 1.20-1.35 (26H, m, CH₂ fatty chain); 1.53-1.58 (2H, m, CH₂ β fatty chain); 3.36-3.44 (5H, m, CH₂ α fatty chain + CH₂ *sn*-1 + CH *sn*-2); 3.43 (3H, s, OCH₃); 3.45-3.52 (6H, m, H₃ + H₅ + H₆ + CH₂ *sn*-3); 3.80-3.95 (2H, m, H₂ + H₄); 4.17 (1H, t, ³J_{HH}= 8.4, H₁). ¹³C NMR (125.816 MHz, CDCl₃): -0.45 (CH₃Si); 0.45 (CH₃Si); 0.7 (CH₃Si); 14.1(CH₃); 22.7 (CH₂ fatty chain); 26.1 (CH₂ fatty chain); 26.2 (CH₂ fatty chain); 29.4 (CH₂ fatty chain); 29.5 (CH₂ fatty chain); 29.7 (CH₂ fatty chain); 31.4 (CH₂ fatty chain); 57.8 (OCH₃); 67.2 (C₆); 68.7 (CH₂ *sn*-3); 70.7 (CH₂ *sn*-1); 71.7 (CH₂ α fatty chain); 71.5; 71.6; 75.2; 75.4 (C₂ + C₃ + C₄ + C₅); 79.5 (CH *sn*-2); 101.3 (C₁).

4-5 Synthesis of 3-(hexadecyloxy)-2-methoxypropyl-2,3,4-tris-*O*-(trimethylsilyl)- α -D-galacto-pyranoside 10

To a stirred solution of the compound **9** (1.0 g, 1.3 mmol) in a mixture of acetone/methanol (3: 4) (14 mL) at 0°C was added acetic acid (153 mg, 2.6 mmol). The solution was stirred 36 hours at room temperature. Sodium hydrogenocarbonate (450 mg, 5.4 mmol) was added to neutralize the acid. The mixture was filtered and concentrated. The residue was purified by chromatography on silica gel (ethyl acetate/petroleum ether: 1/2) to give the pure product as colorless oil (53%). *Rf* (ethyl acetate/petroleum ether: 1/3): 0.29. ¹H NMR (400.012 MHz, CDCl₃): 0.09-0.14 (27H, m, CH₃ (OTMS)); 0.88 (3H, t, ³J_{HH}=6.8, CH₃); 1.15-1.32 (26H, m, CH₂ fatty chain); 1.48-1.65 (2H, m, CH₂ β fatty chain); 3.33-3.46 (5H, m, CH₂ α fatty chain + CH₂ *sn*-3 + H₃); 3.41 (3H, s, OCH₃); 3.46-3.68 (5H, m, H₃ + H₄ + H₆ + H_a-CH *sn*-1); 3.69-3.72 (1H, m, H₄); 3.77-3.89 (2H, m, H₂ + H_b-CH *sn*-1); 4.21 (1H, t, ³J_{HH}=8.2, H₁). ¹³C NMR (75.475 MHz, CDCl₃): 0.46 (CH₃Si); 0.75 (CH₃Si); 14.2 (CH₃); 22.7 (CH₂ fatty chain); 26.1 (CH₂ fatty chain); 29.4 (CH₂ fatty chain); 29.5 (CH₂ fatty chain); 29.7 (CH₂ fatty chain); 32.0 (CH₂ fatty chain); 57.8 (OCH₃); 62.9 (C₆); 69.0 (CH₂ *sn*-3); 70.7 (CH₂ *sn*-1); 71.9 (CH₂ α fatty chain); 71.8; 72.5; 75.2; 75.3 (C₂ + C₃ + C₄ + C₅); 79.7 (CH *sn*-2); 104.6 (C₁).

4-6 Synthesis of 1,6-di-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-galactopyranose 12

To a stirred solution of methyl- α -D-galactopyranose **11** (3.0 g, 15.0 mmol) in dry DMF (60 mL) was added NaH (2.2 g, 93.0 mmol). The mixture was stirred 30 minutes at room temperature and then cooled to 0°C. Benzyl bromide (9.2 mL, 77.0 mmol) was added drop-wise and the mixture was stirred

2 hours at 0°C and 15 hours at room temperature. Excess of NaH was neutralized by addition of few mL of MeOH. The solution was diluted by Et₂O (200 mL) and washed with water (150 mL). The aqueous layer was extracted twice with Et₂O (100 mL) and the organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The crude product was purified by chromatography on silica gel (ethyl acetate/petroleum ether: 1/4) and the pure α -methyl benzylated compound was obtained as colorless oil. *Rf* (ethyl acetate ethyle/petroleum ether (1/4)): 0.30. This compound (5.9 g, 10.6 mmol) was dissolved in acetic acid/acetic anhydride (1/1) (70 mL) at 0°C and H₂SO₄ (1.3 mL, 23.4 mmol) was added dropwise. The mixture was stirred 5 hours at 0°C, washed twice with a cold saturated sodium bicarbonate solution (60 mL) and twice with water (30 mL). The aqueous layer was extracted twice with CH₂Cl₂ (100 mL) and then the organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The crude product was purified by chromatography on silica gel (ethyl acetate/petroleum ether: 1/4) and the pure compound was obtained as colorless oil (56 %). *Rf* (ethyl acetate/petroleum ether: 1/3): 0.14. ¹H NMR (400.012 MHz, CDCl₃): 1.99 (3H, s, CH₃); 2.13 (3H, s, CH₃); 3.71-4.20 (6H, m, H₂+ H₃ + H₄ + H₅ + H₆); 4.64-5.02 (6H, m, CH₂-Ph); 6.40-6.46 (1H, m, H₁); 7.26-7.41 (15H, m, CH (Ph)). ¹³C NMR (75.475 MHz, CDCl₃): 20.8 (OCH₃); 21.1 (OCH₃); 63.1 (C₆); 70.8 (C₅); 73.4 (CH₂-Ph); 74.2 (C₄); 74.7 (CH₂-Ph); 75.4 (C₂); 78.6 (C₃); 90.7 (C₁); 127.4 (CH (Ph)); 127.7 (CH (Ph)); 127.8 (CH (Ph)); 128.1 (CH (Ph)); 128.4 (CH (Ph)); 137.9 (C_{ipso}); 138.0 (C_{ipso}); 138.5 (C_{ipso}); 169.4 (CO); 170.6 (CO).

4-7 Synthesis of 3-(hexadecyloxy)-2-methoxypropyl-6-*O*-(6-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-2,3,4-tri-*O*-benzyl- β -D-galactopyranoside 14

To a stirred solution of **12** (700 mg, 1.31 mmol) in dry CH₂Cl₂ (4 mL) under argon was added TMSI (178 μ L, 1.31 mmol) at 0°C. The mixture was stirred 30 minutes at 0°C and few mL of freshly distilled toluene were added. The solvent was removed at 0°C and several azeotropes have been made until the total disappearance of the ¹H NMR TMSOAc signal. The compound **13** was obtained as brown oil which was characterized as follow and used without further purification. *Rf* (ethyl acetate/petroleum ether: 1/5): 0.47. ¹H NMR (400.012 MHz, CDCl₃): 2.23 (3H, s, CH₃); 3.48 (1H, dd, ³J_{HH}=9.8, ³J_{HH}=4.0, H₂); 4.07-4.12 (1H, m, H₃); 4.15-4.22 (1H, m, H₄); 4.35-4.50 (3H, m, H₅ + H₆); 4.80-5.19 (6H, m, CH₂-Ph); 7.12 (1H, d, ³J_{HH}=3.7, H₁); 7.34-7.57 (15H, m, CH (Ph)). To a stirred solution of **8** (170 mg, 0.22 mmol) in benzene (3 mL) was added TBAI (411 mg, 1.11 mmol), DIPEA (72 mg, 0.56 mmol) and molecular sieves 4 Å. The mixture was stirred 30 minutes at room temperature and the intermediate **13** (154 mg, 0.67 mmol) was added. The mixture was stirred at reflux during 3 hours, filtered and concentrated. The crude product was purified by chromatography on silica gel (ethyl acetate/petroleum ether: 0/1 to 1/1) and the pure compound **14** was obtained as colorless oil (65 %). *Rf* (ethyl acetate/petroleum ether: 1/5): 0.47. ¹H NMR (400.012 MHz, CDCl₃): 0.90 (3H, t, ³J_{HH}=7.0, CH₃); 1.22-1.30 (26H, m, CH₂ fatty chain); 1.52-1.63 (2H, m, CH₂ β fatty chain); 1.95 (s,

3H, OCH₃); 3.39-3.45 (2H, m, CH₂ α fatty chain); 3.43 (3H, s, OCH₃); 3.53-3.61 (6H, m, CH₂ sn-1 + CH₂ sn-3 + CH sn-2 + H₅); 3.75-4.14 (11H, m, H₂ + H₃ + H₄ + H₆ + H_{2'} + H_{3'} + H_{4'} + H_{5'} + H_{6'}); 4.39 (1H, t, ³J_{HH}=7.5, H₁); 4.61-4.96 (13H, m, CH₂-Ph + H_{1'}); 7.25-7.40 (30H, m, CH (Ph)). ¹³C NMR (75.475 MHz, CDCl₃): 14.1 (CH₃ fatty chain); 20.8 (OCH₃); 22.7 (CH₂ fatty chain); 26.1 (CH₂ fatty chain); 29.4 (CH₂ fatty chain); 29.5 (CH₂ fatty chain); 29.7 (CH₂ fatty chain); 31.9 (CH₂ fatty chain); 58.1 (OCH₃); 63.4 (C_{6'}); 66.9 (C₆); 68.6 (C_{5'}); 69.5 (CH₂ sn-3); 70.6 (CH₂ sn-1); 71.8 (CH₂ α fatty chain); 73.0 (C_{4'}); 73.2 (CH₂-Ph); 73.6 (CH₂-Ph); 74.0 (C₄); 74.4 (C_{2'}); 74.5 (CH₂-Ph); 75.0 (CH₂-Ph); 76.2 (C₅); 79.1 (C₂); 79.3 (C_{3'}); 79.4 (CH sn-2); 82.1 (C₃); 98.1 (C_{1'}); 104.2 (C₁); 127.4 (CH (Ph)); 127.5 (CH (Ph)); 127.6 (CH (Ph)); 127.8 (CH (Ph)); 128.0 (CH (Ph)); 128.3 (CH (Ph)); 128.4 (CH (Ph)); 138.2 (C_{ipso}); 138.7 (C_{ipso}); 170.5 (CO). MS (MALDI-TOF): m/z calcd for C₇₆H₁₀₀O₁₄ (M+Na) 1259.701; found 1259.698.

4-8 Synthesis of 3-(hexadecyloxy)-2-methoxypropyl-2,3,4-tri-*O*-benzyl-6-*O*-(2,3,4-tri-*O*-benzyl-α-D-galactopyranosyl)-β-D-galactopyranoside 15

The compound **14** (180 mg, 0.15 mmol) was dissolved in MeOH (10 mL) and K₂CO₃ (10 mg, 0.08 mmol) was added. The solution was stirred 2 hours at room temperature, then Amberlite IR-120H was added and the mixture was stirred 30 minutes at room temperature. The solution was filtered through Celite and concentrated. The crude product was purified by chromatography on silica gel (acetate/petroleum ether: 0/1 to 1/1) and the pure compound **15** was obtained as colorless oil (47 %). *Rf* (ethyl acetate/petroleum ether: 1/2): 0.42. ¹H NMR (400.012 MHz, CDCl₃): 0.89 (3H, t, ³J_{HH}=7.0, CH₃); 1.22-1.35 (26H, m, CH₂ fatty chain); 1.52-1.62 (2H, m, CH₂ β fatty chain); 1.95 (s, 3H, OCH₃); 3.36-3.42 (2H, m, CH₂ α fatty chain); 3.43 (3H, s, OCH₃); 3.48-3.62 (8H, m, CH₂ sn-1 + CH₂ sn-3 + CH sn-2 + H₃ + H₄ + H₅); 3.75-3.92 (8H, m, H₂ + H₄ + H₅ + H₆ + H_{3'} + H_{6'}); 4.02-4.06 (1H, m, H₂); 4.38 (1H, dd, ³J_{HH}=18.0, ³J_{HH}=9.0, H₁); 4.58-4.98 (13H, m, CH₂-Ph + H_{1'}); 7.20-7.33 (30H, m, CH (Ph)). ¹³C NMR (75.475 MHz, CDCl₃): 14.1 (CH₃ fatty chain); 22.7 (CH₂ fatty chain); 26.0 (CH₂ fatty chain); 29.3 (CH₂ fatty chain); 29.7 (CH₂ fatty chain); 31.9 (CH₂ fatty chain); 58.1 (OCH₃); 61.6 (C_{6'}); 67.6 (C₆); 69.4 (CH₂ sn-3); 70.4 (CH₂ sn-1); 70.6 (C_{5'}); 71.8 (CH₂ α fatty chain); 73.1 (CH₂-Ph); 73.2 (C_{4'}); 73.6 (CH₂-Ph); 74.0 (C₄); 74.4 (CH₂-Ph); 74.5 (CH₂-Ph); 74.8 (C₅); 75.0 (CH₂-Ph); 76.3 (C_{2'}); 79.1 (C₂); 79.2 (C_{3'}); 79.3 (CH sn-2); 82.1 (C₃); 98.1 (C_{1'}); 104.0 (C₁); 127.4 (CH (Ph)); 127.5 (CH (Ph)); 127.8 (CH (Ph)); 128.1 (CH (Ph)); 128.2 (CH (Ph)); 128.4 (CH (Ph)); 138.5 (C_{ipso}); 138.6 (C_{ipso}).

4-9 Synthesis of 3-(hexadecyloxy)-2-methoxypropyl-6-*O*-α-D-galactopyranosyl-β-D-galacto-pyranoside 16

The compound **15** (100 mg, 0.08 mmol) was dissolved in MeOH (5 mL) and palladium (10% on carbon) (150 mg, 0.14 mmol) was added. The solution was stirred 3 days at room temperature under 20 bars of pressure of H₂. The solution was filtered through Celite and concentrated. The pure compound **16** was obtained as colorless oil (29 mg; 56 %). [α]_D²⁰ +51 (c 0.83; MeOH). *Rf* (CH₂Cl₂/MeOH: 8/2) : 0.27. IR (ATR, cm⁻¹):

3337 (O–H), 2917–2850 (C–H). ¹H NMR (500.113 MHz, CD₃OD): 0.89 (3H, t, ³J_{HH}=7.0, CH₃); 1.26-1.38 (26H, m, CH₂ fatty chain); 1.55 (2H, qn, ³J_{HH}=7.0, CH₂ β fatty chain); 3.39-3.50 (5H, m, OCH₃ + CH₂ α fatty chain); 3.51-3.73 (8H, m, CH₂ sn-1 + CH₂ sn-3 + CH sn-2 + H₃ + H₄ + H₅); 3.75-3.92 (9H, m, H₂ + H₄ + H₅ + H₆ + H_{2'} + H_{3'} + H_{6'}); 4.23 (1H, dd, ³J_{HH}=18.0, ³J_{HH}=9.0, H₁); 4.86 (1H, d, ³J_{HH}=9.0, H_{1'}). ¹³C NMR (75.475 MHz, CDCl₃): 14.4 (CH₃ fatty chain); 23.7 (CH₂ fatty chain); 27.2 (CH₂ fatty chain); 30.4 (CH₂ fatty chain); 30.6 (CH₂ fatty chain); 30.7 (CH₂ fatty chain); 30.8 (CH₂ fatty chain); 33.0 (CH₂ fatty chain); 58.1 (OCH₃); 62.7 (C_{6'}); 67.7 (C₆); 69.7 (CH₂ sn-3); 70.0 (C₄); 70.2 (C_{2'}); 71.0 (C_{4'}); 71.3 (CH₂ sn-1); 71.4 (C_{3'}); 72.2 (C₂); 72.5 (C_{5'}); 72.7 (CH₂ α fatty chain); 74.4 (C₃); 74.7 (C₅); 80.6 (CH sn-2); 100.5 (C_{1'}); 105.2 (C₁); MS (MALDI-TOF): m/z calcd for C₃₂H₆₂O₁₃ (M+Na) 677.408; found 677.389.

4-10 Synthesis of 1,2,3,4,6-pentakis-*O*-(trimethylsilyl)-α-D-galactopyranose 18

To a solution of D-galactose (1.80 g, 10.0 mmol) and Et₃N (5.56 g, 55.0 mmol) in dry DMF (50 mL) at 0°C is added TMSCl (5.97 g, 55.0 mmol) and the mixture is stirred 4 hours at room temperature. n-pentane (150 mL) is added and the mixture is poured in crushed ice. The organic layer is washed three times with ice-water (50 mL), dried over MgSO₄ and concentrated to give the expected compound as colourless oil (92 %). *Rf* (CH₂Cl₂/MeOH: 5/1): 0.87. ¹H NMR (400.045 MHz, CDCl₃): 0.10-0.16 (45H, m, CH₃ (OTMS)); 3.51-3.65 (2H, m, H₆); 3.79-3.92 (4H, m, H₂ + H₃ + H₄ + H₅); 5.04 (1H, d, ³J_{HH}=2.4, H₁). ¹³C NMR (125.816 MHz, CDCl₃): -0.45 (CH₃Si); 0.2 (CH₃Si); 0.3 (CH₃Si); 0.5 (CH₃Si); 0.7 (CH₃Si); 61.2 (C₆); 70.0 (C₅); 70.5 (C₃); 71.2 (C₂); 72.3 (C₄); 94.6 (C₁);

4-11 Synthèse du 3-(hexadecyloxy)-2-methoxypropyl-6-*O*-[2,3,4-tris-*O*-(trimethylsilyl)-α-D-galacto-pyranosyl]-2,3,4-tris-*O*-(trimethylsilyl)-α-D-galactopyranoside 19

To a solution of compound **10** (454 mg, 0.84 mmol) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) at 0°C is added TMSI (131 μL, 0.92 mmol). The mixture is stirred 20 minutes at 0°C and benzene (3 mL) is added. The solution is concentrated at 0°C to give the α-iodide. The residue is dissolved in dry CH₂Cl₂ (5 mL) and stored under argon atmosphere. In another reactor a solution of TBAI (465 mg, 1.26 mmol), DIPEA (163 mg, 1.26 mmol) and compound **18** (200 mg, 0.28 mmol) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) is stirred at room temperature under argon atmosphere. The solution containing the iodide compound is added dropwise and the mixture is stirred for 36 hours at room temperature. The solution is concentrated and the residue is dissolved in dry diethyl ether (20 mL) to precipitate salts, filtered and concentrated. The residue is purified by chromatography on silica gel (ethyl acetate/petroleum ether: 1/9) to give colourless oil (72%). *Rf* (ethyl acetate/petroleum ether: 2/1): 0.27. ¹H NMR (400.012 MHz, CDCl₃): 0.06-0.17 (m, 63H, CH₃ (OTMS)); 0.87 (t, 3H, ³J_{HH}=6.8, CH₃); 1.15-1.32 (m, 26H, CH₂ fatty chain); 1.51-1.58 (m, 2H, CH₂ β fatty chain); 3.35-3.58 (m, 10H, OCH₃ + CH₂ α fatty chain + CH₂ sn-1 + CH₂ sn-3 + CH sn-2); 3.59-3.90 (m, 12H, H₂ + H₃ + H₄ + H₅ + H₆ + H_{2'} + H_{3'} + H_{4'} + H_{5'} + H_{6'}); 4.18 (dd, 1H, ³J_{HH}=7.5,

$^3J_{\text{HH}}=9.6, H_1)$; 4.69 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}}=3.6, H_1'$). ^{13}C NMR (125.816 MHz, CDCl_3): -0.9 (CH_3 (OTMS)); -0.1 (CH_3 (OTMS)); 0.1 (CH_3 (OTMS)); 0.2 (CH_3 (OTMS)); 0.3 (CH_3 (OTMS)); 13.6 (CH_3 fatty chain); 22.2 (CH_2 fatty chain); 25.6 (CH_2 fatty chain); 28.9 (CH_2 fatty chain); 31.4 CH_2 (fatty chain); 57.3 (OCH_3); 61.0 (C_6'); 64.8 (C_6); 68.1 (CH_2 *sn*-3); 70.3 (CH_2 *sn*-1); 71.2 (CH_2 α fatty chain); 68.7; 70.2; 70.9; 71.0; 71.3; 71.9; 72.6; 74.8 ($\text{C}_2 + \text{C}_3 + \text{C}_4 + \text{C}_5 + \text{C}_2' + \text{C}_3' + \text{C}_4' + \text{C}_5'$); 78.8 (CH *sn*-2); 99.6 (C_1'); 103.9 (C_1)

4-12 Synthesis of 3-(hexadecyloxy)-2-methoxypropyl-6-O- α -D-galactopyranosyl- β -D-galacto-pyranoside 16

To a stirred solution of **20** (235 mg, 0.20 mmol) in methanol (15 mL) was added Dowex 50WX8-200[®] ion exchange resin (300 mg). The mixture was stirred 4 hours at room temperature, filtered and concentrated. The residue was purified by chromatography on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 8/2) to give the expected product as a white solid (101 mg; 77%). The spectral characteristic were similar to those reported in section 4-10.

4-13 Cell culture

HEK293T cells were purchased from ATCC, maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium, supplemented with 10% (v:v) fetal bovine serum (Lonza, France), 1 mM pyruvate sodium (Sigma-Aldrich, France), and 1% non-essential amino acid (Sigma-Aldrich, France) and were grown in a humidified atmosphere at 37°C (95% air, 5% CO_2). HEK293T cells were transduced with lentiviral vector containing rat SK3 cDNA to obtain stable expression of homotetramer SK3 channels following the same protocol as previously described^{7,20}.

4-14 Patch-clamp experiments

Experiments were performed in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. The extracellular solution contained 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 0.33 mM NaH_2PO_4 , and 11.5 mM D-glucose. pH was adjusted to 7.4 with NaOH. The intracellular solutions contained 145 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM Mg-ATP, 0.7 mM CaCl_2 , 1 mM EGTA and 10 mM HEPES (pCa 6). pH was adjusted to 7.2 with KOH. Patch-clamp experiments were conducted using an Axopatch 200B patch-clamp amplifier (Axon Instrument, USA) and data, digitized with 1322-A Digidata converter (Axon Instrument, USA), were stored on a computer using the software Clampex of pClamp 9.2 (Axon Instrument, USA). The patch-clamp data were analyzed using both Clampfit 9.2 and Origin 7.0 software (Microcal Inc., Northampton, MA, USA). The effects of compound 16 on HEK293T-SK3 cells were measured for 2 to 4 min using a ramp protocol from +95 mV to -95 mV with a holding potential of 0 mV (500 ms duration; 4 sec intervals) to inactivate endogenous potassium currents. Potassium SK3 currents were analysed at 0 mV to minimize chloride currents ($E_{\text{Cl}^-} = 0\text{mV}$).

4-15 In Vitro Cell Viability and Cell Migration assay

Cell viability was determined using the tetrazolium salt reduction method (MTT) as previously described.²⁰ Briefly,

cells were seeded onto 24-well plates at a density of 4.10^4 cells per well and measurements were performed in triplicate 24 h and 48 h after implantation. Cell migration assay was performed in 24-well plates with polyethylene terephthalate membrane cell culture inserts with a pore size of 8- μm (Becton Dickinson, France) coated with fibronectin from bovine plasma (1.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Sigma-Aldrich). Briefly, 8.10^4 cells were seeded into the upper compartment and the supplemented medium culture was added in the upper and lower compartments. When a compound was evaluated, it was added into both compartments. After 15 h, stationary cells were removed from the top side of the membrane, whereas migrated cells in the bottom side of the inserts were fixed, the nuclei were stained with DAPI (Sigma-Aldrich) and then counted. Three independent experiments were performed in parallel and these was done in triplicate.

4-16 Statistics.

Data were expressed as mean \pm SEM (n = number of experiments). Statistical analyses were made using Kruskal-Wallis one-way analysis of variance followed by Dunn's test. Differences were considered significant when $p < 0.05$ (SigmaStat, Systat Software).

Acknowledgements

This work was funded by 'Région Centre', 'Région Bretagne', 'Ligue contre le Cancer', 'CNRS', INSERM, Cancéropole Grand Ouest and FEDER (Fond européen de développement regional). We thank the 'Services Communs' of the University of Brest.

Notes and references

† See DOI: 10.1039/b000000x/

- 1 a) D. Meitar, S.E. Crawford, A.W. Rademaker and S.L. Cohn, *J. Clin. Oncol.*, 1996, 14, 405-414. b) J.L. Marshall, S. Baidas, P. Bhargava and N. Rizvi, *I Drugs*, 2000, 3, 518-524. c) M. Egeblad and Z. Werb, *Nat. Rev. Cancer*, 2002, 2, 161-174. d) G. Sala, F. Dituri, C. Raimondi, S. Previdi, T. Maffucci, M. Mazzeletti, C. Rossi, M. Iezzi, R. Lattanzio, M. Piantelli, S. Iacobelli, M. Brogini and M. Falasca, *Cancer Res.*, 2008, 68, 10187-10196. e) K. Lirdprapamongkol, J.P. Kramb, T. Suthiphongchai, R. Surarit, C. Srisomsap, G. Dannhardt and J. Svasti, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 3055-3063. f) T. Oskarsson, P. Nagorny, I.J. Krauss, L. Perez, M. Mandal, G. Yang, O. Ouerfelli, D. Xiao, M.A. Moore, J. Massague and S.J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, 3224-3228.
- 2 (a) I. Collins, P. Workman, *Nature Chem. Biol.* 2006, 2, 689-700. (b) H. Ovaa, C. Kuijl, J. Neeffjes, *Drug Discovery Today: Technology*, 2009, 6, e3-e11.
- 3 (a) A. Arcangeli, O. Crociani, E. Lastraioli, A. Masi, S. Pillozzi and A. Becchetti, *Curr Med Chem*, 2009, 16, 66-93. (b) V.A. Cuddapah, and H. Sontheimer, *Am J Physiol Cell Physiol* 2011, 301, C541-9. (c) A. Schwab, A. Fabian, P.J. Hanley and C. Stock *Physiological Rev.* 2012, 92, 1865-913.
- 4 A. Girault, J.P. Haelters, M. Potier-Cartereau, A. Chantome, P.A. Jaffrès, P. Bougnoux, V. Joulin and C. Vandier, *Curr. Med. Chem.*, 2012, 19, 697-713.
- 5 M. Potier, V. Joulin, S. Roger, P. Besson, M.L. Jourdan, J.Y. Leguennec, P. Bougnoux and C. Vandier, *Mol Cancer Ther.* 2006, 5, 2946-53.

-
- 6 M. Potier, A. Chantôme, V. Joulin, A. Girault, S. Roger, P. Besson, M. Jourdan, J.Y. LeGuenec, P. Bougnoux and C. Vandier, *Br. J. Pharmacol.*, 2011, 162, 464-479.
- 7 A. Girault, J.P. Haelters, M. Potier, A. Chantôme, M. Pineau, S. Marionneau-Lambot, T. Oullier, G. Simon, H. Couthon-Gourvès, P.A. Jaffrès, V. Joulin, B. Corbel, P. Bougnoux and C. Vandier, *Current Cancer Drug Target* 2011, 11, 1111-1125.
- 8 C.M. Sevrain, J.P. Haelters, A. Chantôme, H. Couthon-Gourvès, A. Girault, C. Vandier and P.A. Jaffrès, *MedChemComm.*, 2012, 3, 1471-1478.
- 9 M.X. Andersson, K.E. Larsson, H. Tjellström, C. Liljenberg and A.S. Sandelius, *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 27578-27586.
- 10 H. Härtel and C. Benning, *Biochem. Soc. Trans.*, 2000, 28, 729-732.
- 11 J.B. Hauksson, M.H.J. Bergqvist and L. Rilfors, *Chem. Phys. Lipids*, 1995, 78, 97-102.
- 12 (a) C. Wing, J. C. Errey, B. Mukhopadhyay, J. S. Blanchard, R. A. Field, *Org. Biomol. Chem.* 2006, 4, 3945-3950. (b) V. Subramaniam, S. S. Gurucha, G. S. Besra, T. L. Gurucha, *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13, 1083-1094.
- 13 (a) W. Du, S.S. Kulkarni and J. Gervay-Hague, *ChemComm.* 2007, 23, 2336-2338. (b) M. Schombs, F.E. Park, W. Du, S.S. Kulkarni and J. Gervay-Hague, *J. Org. Chem.* 2010, 75, 4891-4898. (c) W. Du, J. gervay-Hague, *Org. Lett.* 2005, 7, 2063-2065.
- 14 B.K. Gadakh, P.R. Patil, S. Malik and K.P.R. Kartha, *Synthetic Commun.* 2009, 39, 2430-2438.
- 15 B. Dorgeret, L. Khemtémourian, I. Correia, J.L. Soulier, O. Lequin and S. Onger, *Eur. J. Med. Chem.* 2011, 46, 5959-5969.
- 16 T. Uchiyama and O. Hindsgaul, *Synlett* 1996, 6, 499-501.
- 17 (a) C. Fernandez, O. Nieto, E. Rivas, G. Montenegro, J.A. Fontenla, and A. Fernandez-Mayoralas, *Carbohydr. Res.* 2000, 327, 353-365. (b) P.J. Jervis, L.R. Cox and G.S. Besra, *J. Org. Chem.* 2011, 76, 320-323.
- 18 (a) Y. Nishida, Y. Takamori, K. Matsuda, H. Ohri, T. Yamada and K. Kobayashi, *J. Carbohydr. Chem.* 1999, 18, 985-997. (b) S.C. Hung, C.C. Lin and C.H. Wong, *Tetrahedron Lett.* 1997, 38, 5419-5422. (c) S.N. Lam and J. Gervay-Hague, *Org. Lett.* 2002, 4, 2039-2042.
- 19 (a) S. N. Lam, J. Gervay-Hague, *Org. Lett.* 2002, 4, 2039-2042. (b) M. J. Hadd, J. Gervay, *Carbohydr. Res.* 1999, 320, 61-69.
- 20 A. Chantome, A. Girault, M. Potier, C. Collin, P. Vaudin, J.C. Pages, C. Vandier and V. Joulin, *Exp. Cell Res.* 2009, 315, 3620-3630.

40